

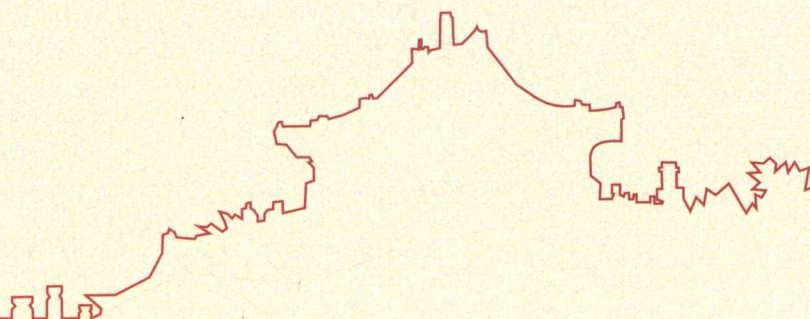
武汉大学优秀博士学位论文文库



# 细胞抗病毒天然免疫信号 转导的调控机制

Regulatory Mechanisms of Signal Transduction in Antiviral Innate Immunity

李颖 著



WUHAN UNIVERSITY PRESS  
武汉大学出版社

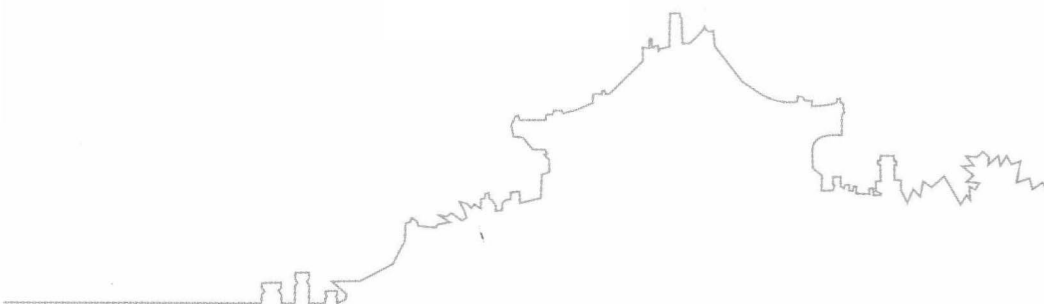
武汉大学优秀博士学位论文文库



# 细胞抗病毒天然免疫信号 转导的调控机制

Regulatory Mechanisms of Signal Transduction in Antiviral Innate Immunity

李颖 著



WUHAN UNIVERSITY PRESS

武汉大学出版社

## 图书在版编目(CIP)数据

细胞抗病毒天然免疫信号转导的调控机制/李颖著. —武汉: 武汉大学出版社, 2015.3

武汉大学优秀博士学位论文文库

ISBN 978-7-307-14850-5

I. 细… II. 李… III. 病毒—免疫—信息传递—人体细胞学—研究  
IV. R329.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 263768 号



责任编辑:任翔 黄琼

责任校对:汪欣怡

版式设计:马佳

出版发行:武汉大学出版社 (430072 武昌 珞珈山)

(电子邮件: cbs22@whu.edu.cn 网址: www.wdp.com.cn)

印刷:武汉市洪林印务有限公司

开本: 720 × 1000 1/16 印张:9 字数:126 千字 插页:2

版次: 2015 年 3 月第 1 版 2015 年 3 月第 1 次印刷

ISBN 978-7-307-14850-5 定价:22.00 元

版权所有, 不得翻印; 凡购我社的图书, 如有质量问题, 请与当地图书销售部门联系调换。

武汉大学  
优秀博士学位论文文库  
编委会

主 任 李晓红

副主任 韩 进 舒红兵 李 斐

委 员 (按姓氏笔画为序)

马费成	邓大松	边 专	刘正猷	刘耀林
杜青钢	李义天	李建成	何光存	陈 化
陈传夫	陈柏超	冻国栋	易 帆	罗以澄
周 翔	周叶中	周创兵	顾海良	徐礼华
郭齐勇	郭德银	黄从新	龚健雅	谢丹阳

# 总 序

创新是一个民族进步的灵魂,也是中国未来发展的核心驱动力。研究生教育作为教育的最高层次,在培养创新人才中具有决定意义,是国家核心竞争力的重要支撑,是提升国家软实力的重要依托,也是国家综合国力和科学文化水平的重要标志。

武汉大学是一所崇尚学术、自由探索、追求卓越的大学。美丽的珞珈山水不仅可以诗意栖居,更可以陶冶性情、激发灵感。更为重要的是,这里名师荟萃、英才云集,一批又一批优秀学人在这这里砥砺学术、传播真理、探索新知。一流的教育资源,先进的教育制度,为优秀博士学位论文的产生提供了肥沃的土壤和适宜的气候条件。

致力于建设高水平的研究型大学,武汉大学素来重视研究生培养,是我国首批成立有研究生院的大学之一,不仅为国家培育了一大批高层次拔尖创新人才,而且产出了一大批高水平科研成果。近年来,学校明确将“质量是生命线”和“创新是主旋律”作为指导研究生教育工作的基本方针,在稳定研究生教育规模的同时,不断推进和深化研究生教育教学改革,使学校的研究生教育质量和知名度不断提升。

博士研究生教育位于研究生教育的最顶端,博士研究生也是学校科学研究的重要力量。一大批优秀博士研究生,在他们学术创作最激情的时期,来到珞珈山下、东湖之滨。珞珈山的浑厚,奠定了他们学术研究的坚实基础;东湖水的灵动,激发了他们学术创新的无限灵感。在每一篇优秀博士学位论文的背后,都有博士研究生们刻苦钻研的身影,更有他们导师的辛勤汗水。年轻的学者们,犹如在海边拾贝,面对知识与真理的浩瀚海洋,他们在导师的循循善诱下,细心找寻着、收集着一片片靓丽的贝壳,最终把它们连成一串串闪闪夺目的项

链。阳光下的汗水,是他们砥砺创新的注脚;面向太阳的远方,是他们奔跑的方向;导师们的悉心指点,则是他们最值得依赖的臂膀!

博士学位论文是博士生学习活动和研究工作的主要成果,也是学校研究生教育质量的凝结,具有很强的学术性、创造性、规范性和专业性。博士学位论文是一个学者特别是年轻学者踏进学术之门的标志,很多博士学位论文开辟了学术领域的新思想、新观念、新视阈和新境界。

据统计,近几年我校博士研究生所发表的高质量论文占全校高水平论文的一半以上。至今,武汉大学已经培育出 18 篇“全国百篇优秀博士学位论文”,还有数十篇论文获“全国百篇优秀博士学位论文提名奖”,数百篇论文被评为“湖北省优秀博士学位论文”。优秀博士结出的累累硕果,无疑应该为我们好好珍藏,装入思想的宝库,供后学者慢慢汲取其养分,吸收其精华。编辑出版优秀博士学位论文文库,即是这一工作的具体表现。这项工作既是一种文化积累,又能助推这批青年学者更快地成长,更可以为后来者提供一种可资借鉴的范式抑或努力的方向,以鼓励他们勤于学习,善于思考,勇于创新,争取产生数量更多、创新性更强的博士学位论文。

武汉大学即将迎来双甲华诞,学校编辑出版该文库,不仅仅是为武大增光添彩,更重要的是,当岁月无声地滑过 120 个春秋,当我们正大踏步地迈向前方时,我们有必要回首来时的路,我们有必要清晰地审视我们走过的每一个脚印。因为,铭记过去,才能开拓未来。武汉大学深厚的历史底蕴,不仅在于珞珈山的一草一木,也不仅仅在于屋檐上那一片片琉璃瓦,更在于珞珈山下的每一位学者和学生。而本文库收录的每一篇优秀博士学位论文,无疑又给珞珈山注入了新鲜的活力。不知不觉地,你看那珞珈山上的树木,仿佛又茂盛了许多!

李晓红

2013 年 10 月于武昌珞珈山

## 摘 要

长期以来,病毒感染诱导 I 型干扰素表达的过程,一直是细胞抗病毒天然免疫研究的热点。宿主细胞通过自身的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)识别病原微生物的病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs),从而启动下游信号级联反应,诱导 I 型干扰素(type I interferons)、促炎症细胞因子(proinflammatory cytokines)和趋化因子等的产生。

在病毒感染宿主细胞的过程中,病毒的核酸可以被 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)(如 TLR3、TLR7 和 TLR9)、RIG-I 样受体(RIG-I-like receptors, RLRs)(如 RIG-I 和 MDA5)和近年来发现的 DNA 受体(如 DAI 和 IFI16)识别。其中 RIG-I 和 MDA5 识别病毒 RNA 后,招募其下游接头蛋白 VISA(也叫 MAVS、IPS-1 和 Cardif),一方面通过招募 TRAF2/6 活化 IKK 激酶复合物,激活转录因子 NF- $\kappa$ B;另一方面通过招募 TRAF3 和 TBK1,促进 IRF3 的磷酸化激活。活化的转录因子 NF- $\kappa$ B 和 IRF3 进入细胞核后,协同促进 I 型干扰素基因的表达。MITA(也叫 STING)是近年来发现的 RLRs 介导的抗病毒信号转导中另一个重要的接头蛋白,它通过与 VISA 相互作用,病毒感染后招募 TBK1,通过自身寡聚化形成 VISA-MITA-TBK1-IRF3 复合物,促进 TBK1 对 IRF3 的磷酸化激活,从而介导 I 型干扰素的表达。

细胞抗病毒天然免疫中,宿主细胞对病毒感染的识别一直是研究的热点问题。尽管近十几年来的研究发现了许多 PRRs,揭示了天然免疫中宿主对病原微生物的识别机制,但许多问题仍然需要进一步的研究。为了寻找参与病毒诱导的 I 型干扰素信号转导的未知信号分子,我们以 pGL3-ISRE 为报告基因,进行了基因筛选。我们的



研究发现,LSM14A 能有效激活 ISRE 和 IFN- $\beta$  启动子,并显著协同仙台病毒(Sendai virus, SeV)和单纯疱疹病毒(herpes simplex virus type, HSV)感染诱导的 I 型干扰素的表达。下调内源性 LSM14A 的表达显著抑制 SeV 感染早期诱导的 I 型干扰素表达,同时,也抑制胞质 dsRNA 和 dsDNA 诱导的 IFN- $\beta$  启动子的激活。水疱性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)空斑实验和新城疫病毒(Newcastle Disease virus, NDV)复制水平检测实验表明,LSM14A 有效抑制病毒在细胞内的复制。此外,我们还发现 LSM14A 可以直接结合病毒 RNA 和 DNA,作为一种新型胞质病毒核酸受体,通过与 RIG-I 或 VISA 相互作用,介导病毒感染诱导的 I 型干扰素的表达。

为了进一步研究 MITA 在 RLRs 介导的抗病毒信号转导中的调控机制,我们进行了 Flag-亲和层析实验,通过质谱分析鉴定得到了 MITA 相互作用蛋白 ISG56。ISG56 是最早被鉴定出可被病毒和 I 型干扰素诱导表达的蛋白之一。我们的研究发现,过量表达 ISG56 抑制 SeV 感染诱导的 IRF3、NF- $\kappa$ B 和 IFN- $\beta$  启动子的激活;下调内源性 ISG56 的表达则得到相反的结果。同样的,过量表达 ISG56 抑制 poly(I:C)诱导的抗病毒反应,促进 VSV 的复制;而下调内源性 ISG56 的表达则抑制 VSV 的复制。竞争性免疫共沉淀实验表明,ISG56 通过与 MITA 结合,阻断 MITA 与其上游分子 VISA 和下游分子 TBK1 的相互作用。我们的研究表明,ISG56 负反馈调控病毒感染诱导的 I 型干扰素表达和细胞抗病毒反应。

我们的研究发现,LSM14A 可能作为一种新型病毒核酸受体,参与病毒感染诱导的 I 型干扰素表达的信号转导,这将为细胞抗病毒天然免疫提供一种新的病原分子识别机制。此外,我们还发现了 ISG56 作为 I 型干扰素诱导蛋白,负反馈调节病毒感染诱导 I 型干扰素的表达,此项研究揭示了一种新的抗病毒天然免疫信号转导负反馈调控机制。

**关键词:**干扰素 信号转导 核酸识别 LSM14A ISG56 MITA 负反馈调节



## Abstract

The induction of type I IFNs by viral infection has been the hot topics of innate immune responses against viral infection. The host cells recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) of pathogen by pathogen recognition receptors (PRRs), which trigger intracellular signaling cascades, leading to the production of type I IFNs, proinflammatory cytokines and chemokines.

During viral infection of cells, the viral nucleic acids are recognized by Toll-like receptors (TLRs) (such as TLR3, TLR7 and TLR9), and RIG-I-like receptors (RLRs) (such as RIG-I and MDA5), and recent identified DNA receptors (such as DAI and IFI16). Among the PRRs, the RLRs, RIG-I and MDA5, exist in cytoplasm and recognize viral RNA. Upon binding to viral RNA, RIG-I and MDA5 recruit the adaptor protein VISA (also known as MAVS, IPS-1 and Cardif). On one hand, VISA interacts with TRAF2/6 to activate IKK kinase complex, leading to activation of transcription factor NF- $\kappa$ B; on the other hand, VISA is associated with TRAF3 and TBK1 to activate IRF3 by phosphorylation. Then, the activated transcription factors IRF3 and NF- $\kappa$ B enter into the nucleus and collaboratively trigger the expression of type I IFN genes. MITA (also known as STING) is another important adaptor protein, which was recently identified in signaling pathway mediated by RLRs. MITA is also located in mitochondria and constitutively associated with VISA. After viral infection, TBK1 is recruited by the association of MITA and VISA, leading to the formation of VISA-MITA-TBK1-IRF3 complex through self-oligomerization. The complex enhances the phosphorylation

and activation of IRF3 mediated by TBK1, triggering the expression of type I IFNs.

Recognition of invading virus by host cells has long been a hot research field in the antiviral innate immunity. Although many PRRs have been identified during the last decades, there are still some questions remaining to be answered. In order to search for the unknown molecules which play roles in the signaling transduction of induction of type I IFNs triggered by viral infection, we screened a gene library by using pGL3-ISRE as a reporter gene. We found that LSM14A activated the ISRE and the IFN- $\beta$  promoters and markedly increased the expression of type I IFNs induced by Sendai virus (SeV) and herpes simplex virus type (HSV). On the contrary, knockdown of endogenous LSM14A remarkably inhibited early expression of type I IFNs induced by SeV infection and also inhibited activation of the IFN- $\beta$  promoter triggered by cytoplasmic dsRNA and dsDNA. Vesicular stomatitis virus (VSV) plaque assay showed that LSM14A effectively inhibited cytoplasmic replication of virus. LSM14A could directly bind to viral RNA and DNA, acted as a new potential cytoplasmic receptor for viral nucleic acids and interacted with RIG-I of VISA to mediate the expression of type I IFNs induced by viral infection.

To further investigate how the functions of MITA in virus-induced signaling pathways are regulated, we identified ISG56 as a MITA-associated protein through a biochemical purification approach. ISG56 is one of the first identified proteins induced by viral infection and type I IFNs. We found that overexpression of ISG56 inhibited SeV-triggered activation of IRF3, NF- $\kappa$ B, and the IFN- $\beta$  promoter, whereas knockdown of endogenous ISG56 had opposite effects. Consistently, overexpression of ISG56 reversed cytoplasmic poly(I:C)-induced inhibition of VSV replication, whereas knockdown of endogenous ISG56 inhibited VSV replication. Competitive co-immunoprecipitation experiments indicated that ISG56 disrupted the interactions of MITA with up-stream VISA and down-

stream TBK1 by binding to MITA. These results suggest that ISG56 is a mediator of negative-feedback regulation of virus-triggered induction of type I IFNs and cellular antiviral responses.

Our studies identified LSM14A as a new potential receptor for viral nucleic acids, which is involved in signal transduction of virus-induced production of type I IFNs, which disclosed a new pathogen-recognition mechanism in cellular antiviral immune responses. We also found that ISG56, a protein induced by type I IFNs, negatively regulate virus-triggered type I IFNs production, demonstrating a new negative-feedback regulatory mechanism of antiviral innate immune responses.

**Key words:** Interferon    signal transduction    recognition    LSM14A  
ISG56    MITA    negative-feedback regulation

## 摘 要

长期以来,病毒感染诱导 I 型干扰素表达的过程,一直是细胞抗病毒天然免疫研究的热点。宿主细胞通过自身的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)识别病原微生物的病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs),从而启动下游信号级联反应,诱导 I 型干扰素(type I interferons)、促炎症细胞因子(proinflammatory cytokines)和趋化因子等的产生。

在病毒感染宿主细胞的过程中,病毒的核酸可以被 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)(如 TLR3、TLR7 和 TLR9)、RIG-I 样受体(RIG-I-like receptors, RLRs)(如 RIG-I 和 MDA5)和近年来发现的 DNA 受体(如 DAI 和 IFI16)识别。其中 RIG-I 和 MDA5 识别病毒 RNA 后,招募其下游接头蛋白 VISA(也叫 MAVS、IPS-1 和 Cardif),一方面通过招募 TRAF2/6 活化 IKK 激酶复合物,激活转录因子 NF- $\kappa$ B;另一方面通过招募 TRAF3 和 TBK1,促进 IRF3 的磷酸化激活。活化的转录因子 NF- $\kappa$ B 和 IRF3 进入细胞核后,协同促进 I 型干扰素基因的表达。MITA(也叫 STING)是近年来发现的 RLRs 介导的抗病毒信号转导中另一个重要的接头蛋白,它通过与 VISA 相互作用,病毒感染后招募 TBK1,通过自身寡聚化形成 VISA-MITA-TBK1-IRF3 复合物,促进 TBK1 对 IRF3 的磷酸化激活,从而介导 I 型干扰素的表达。

细胞抗病毒天然免疫中,宿主细胞对病毒感染的识别一直是研究的热点问题。尽管近十几年来的研究发现了许多 PRRs,揭示了天然免疫中宿主对病原微生物的识别机制,但许多问题仍然需要进一步的研究。为了寻找参与病毒诱导的 I 型干扰素信号转导的未知信号分子,我们以 pGL3-ISRE 为报告基因,进行了基因筛选。我们的

研究发现,LSM14A 能有效激活 ISRE 和 IFN- $\beta$  启动子,并显著协同仙台病毒(Sendai virus, SeV)和单纯疱疹病毒(herpes simplex virus type, HSV)感染诱导的 I 型干扰素的表达。下调内源性 LSM14A 的表达显著抑制 SeV 感染早期诱导的 I 型干扰素表达,同时,也抑制胞质 dsRNA 和 dsDNA 诱导的 IFN- $\beta$  启动子的激活。水疱性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)空斑实验和新城疫病毒(Newcastle Disease virus, NDV)复制水平检测实验表明,LSM14A 有效抑制病毒在细胞内的复制。此外,我们还发现 LSM14A 可以直接结合病毒 RNA 和 DNA,作为一种新型胞质病毒核酸受体,通过与 RIG-I 或 VISA 相互作用,介导病毒感染诱导的 I 型干扰素的表达。

为了进一步研究 MITA 在 RLRs 介导的抗病毒信号转导中的调控机制,我们进行了 Flag-亲和层析实验,通过质谱分析鉴定得到了 MITA 相互作用蛋白 ISG56。ISG56 是最早被鉴定出可被病毒和 I 型干扰素诱导表达的蛋白之一。我们的研究发现,过量表达 ISG56 抑制 SeV 感染诱导的 IRF3、NF- $\kappa$ B 和 IFN- $\beta$  启动子的激活;下调内源性 ISG56 的表达则得到相反的结果。同样的,过量表达 ISG56 抑制 poly(I:C)诱导的抗病毒反应,促进 VSV 的复制;而下调内源性 ISG56 的表达则抑制 VSV 的复制。竞争性免疫共沉淀实验表明,ISG56 通过与 MITA 结合,阻断 MITA 与其上游分子 VISA 和下游分子 TBK1 的相互作用。我们的研究表明,ISG56 负反馈调控病毒感染诱导的 I 型干扰素表达和细胞抗病毒反应。

我们的研究发现,LSM14A 可能作为一种新型病毒核酸受体,参与病毒感染诱导的 I 型干扰素表达的信号转导,这将为细胞抗病毒天然免疫提供一种新的病原分子识别机制。此外,我们还发现了 ISG56 作为 I 型干扰素诱导蛋白,负反馈调节病毒感染诱导 I 型干扰素的表达,此项研究揭示了一种新的抗病毒天然免疫信号转导负反馈调控机制。

**关键词:**干扰素 信号转导 核酸识别 LSM14A ISG56 MITA 负反馈调节

## Abstract

The induction of type I IFNs by viral infection has been the hot topics of innate immune responses against viral infection. The host cells recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) of pathogen by pathogen recognition receptors (PRRs), which trigger intracellular signaling cascades, leading to the production of type I IFNs, proinflammatory cytokines and chemokines.

During viral infection of cells, the viral nucleic acids are recognized by Toll-like receptors (TLRs) (such as TLR3, TLR7 and TLR9), and RIG-I-like receptors (RLRs) (such as RIG-I and MDA5), and recent identified DNA receptors (such as DAI and IFI16). Among the PRRs, the RLRs, RIG-I and MDA5, exist in cytoplasm and recognize viral RNA. Upon binding to viral RNA, RIG-I and MDA5 recruit the adaptor protein VISA (also known as MAVS, IPS-1 and Cardif). On one hand, VISA interacts with TRAF2/6 to activate IKK kinase complex, leading to activation of transcription factor NF- $\kappa$ B; on the other hand, VISA is associated with TRAF3 and TBK1 to activate IRF3 by phosphorylation. Then, the activated transcription factors IRF3 and NF- $\kappa$ B enter into the nucleus and collaboratively trigger the expression of type I IFN genes. MITA (also known as STING) is another important adaptor protein, which was recently identified in signaling pathway mediated by RLRs. MITA is also located in mitochondria and constitutively associated with VISA. After viral infection, TBK1 is recruited by the association of MITA and VISA, leading to the formation of VISA-MITA-TBK1-IRF3 complex through self-oligomerization. The complex enhances the phosphorylation

and activation of IRF3 mediated by TBK1, triggering the expression of type I IFNs.

Recognition of invading virus by host cells has long been a hot research field in the antiviral innate immunity. Although many PRRs have been identified during the last decades, there are still some questions remaining to be answered. In order to search for the unknown molecules which play roles in the signaling transduction of induction of type I IFNs triggered by viral infection, we screened a gene library by using pGL3-ISRE as a reporter gene. We found that LSM14A activated the ISRE and the IFN- $\beta$  promoters and markedly increased the expression of type I IFNs induced by Sendai virus (SeV) and herpes simplex virus type (HSV). On the contrary, knockdown of endogenous LSM14A remarkably inhibited early expression of type I IFNs induced by SeV infection and also inhibited activation of the IFN- $\beta$  promoter triggered by cytoplasmic dsRNA and dsDNA. Vesicular stomatitis virus (VSV) plaque assay showed that LSM14A effectively inhibited cytoplasmic replication of virus. LSM14A could directly bind to viral RNA and DNA, acted as a new potential cytoplasmic receptor for viral nucleic acids and interacted with RIG-I of VISA to mediate the expression of type I IFNs induced by viral infection.

To further investigate how the functions of MITA in virus-induced signaling pathways are regulated, we identified ISG56 as a MITA-associated protein through a biochemical purification approach. ISG56 is one of the first identified proteins induced by viral infection and type I IFNs. We found that overexpression of ISG56 inhibited SeV-triggered activation of IRF3, NF- $\kappa$ B, and the IFN- $\beta$  promoter, whereas knockdown of endogenous ISG56 had opposite effects. Consistently, overexpression of ISG56 reversed cytoplasmic poly(I:C)-induced inhibition of VSV replication, whereas knockdown of endogenous ISG56 inhibited VSV replication. Competitive co-immunoprecipitation experiments indicated that ISG56 disrupted the interactions of MITA with up-stream VISA and down-



stream TBK1 by binding to MITA. These results suggest that ISG56 is a mediator of negative-feedback regulation of virus-triggered induction of type I IFNs and cellular antiviral responses.

Our studies identified LSM14A as a new potential receptor for viral nucleic acids, which is involved in signal transduction of virus-induced production of type I IFNs, which disclosed a new pathogen-recognition mechanism in cellular antiviral immune responses. We also found that ISG56, a protein induced by type I IFNs, negatively regulate virus-triggered type I IFNs production, demonstrating a new negative-feedback regulatory mechanism of antiviral innate immune responses.

**Key words:** Interferon    signal transduction    recognition    LSM14A  
ISG56    MITA    negative-feedback regulation

# 目 录

第一章 研究背景	1
第一节 天然免疫对病原微生物的识别	1
一、天然免疫概述	1
二、天然免疫的模式识别受体	2
第二节 抗病毒天然免疫的信号转导及其调控机制	14
一、抗病毒天然免疫信号转导概述	14
二、I 型干扰素基因转录调控机制	15
三、模式识别受体介导的天然免疫信号转导	18
四、模式识别受体介导的信号转导的调控机制	25
第三节 病毒诱导 I 型干扰素表达的早、晚期事件和 干扰素效应因子	28
一、病毒诱导 I 型干扰素基因表达的早、晚期事件	28
二、干扰素诱导的效应因子	31
第二章 实验材料和实验方法	34
第一节 实验材料	34
一、细胞系、细胞培养和细胞因子	34
二、病毒	34
三、抗体	35
四、表达载体	35
五、核酸操作及检测试剂盒	36
六、其他试剂	36
七、耗材	36
八、特殊仪器和设备	36
第二节 实验方法	37