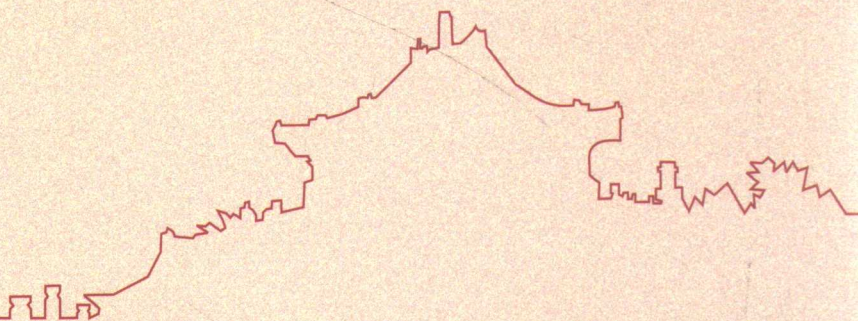


武汉大学优秀博士学位论文文库



MITA介导的 细胞抗病毒反应信号转导 及其调节机制

钟波 著



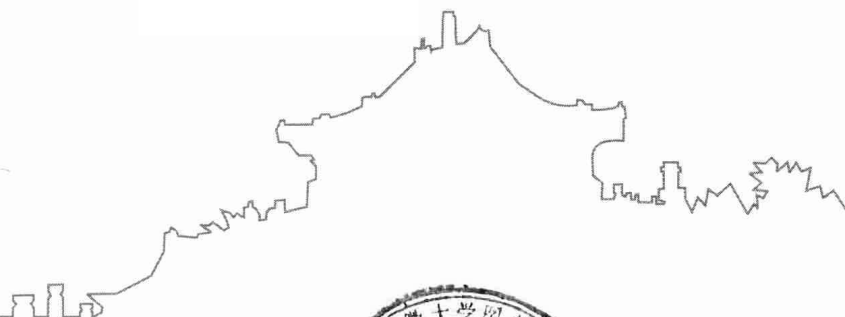
WUHAN UNIVERSITY PRESS
武汉大学出版社

武汉大学优秀博士学位论文文库



MITA介导的 细胞抗病毒反应信号转导 及其调节机制

钟波 著



WUHAN UNIVERSITY PRESS

武汉大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

MITA 介导的细胞抗病毒反应信号转导及其调节机制/钟波著. —武汉: 武汉大学出版社, 2013. 11

武汉大学优秀博士学位论文文库

ISBN 978-7-307-11713-6

I. M… II. 钟… III. 病毒病—细胞免疫学—研究 IV. R511

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 221640 号

责任编辑: 黄汉平

责任校对: 鄢春梅

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: 湖北恒泰印务有限公司

开本: 720 × 1000 1/16 印张: 11.25 字数: 156 千字 插页: 2

版次: 2013 年 11 月第 1 版 2013 年 11 月第 1 次印刷

ISBN 978-7-307-11713-6 定价: 28.00 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,更有他们的导师的辛勤汗水。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亦或努力的方向,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,不仅仅是为百廿武大增光添彩,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,病毒感染与宿主免疫的机制一直是生命科学领域的研究热点。病毒入侵宿主细胞后,首先被宿主模式识别受体(pattern-recognition receptors, PRRs)所识别,激活一系列的信号转导,诱导 I 型干扰素和白细胞介素 1β (interleukin $1-\beta$, IL- 1β) 等细胞因子的表达。这些细胞因子分泌到细胞外,与细胞表面受体结合,激活相应的信号转导,诱导大量抗病毒基因的表达,从而抑制病毒的复制,诱导被感染的细胞凋亡;同时,这些细胞因子诱导产生炎症反应,激活天然免疫细胞以及适应性免疫系统,从而杀灭病毒并清除病毒感染的细胞。因此, I 型干扰素等细胞因子的表达对宿主抵抗病毒入侵起着举足轻重的作用。

研究表明,病毒在感染与复制的过程中产生病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs),如 5'三磷酸具有柄状结构的 RNA (5' ppp panhandle RNA) 以及双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA)。宿主细胞内的 PRR 如 RIG-I (retinoic acid-inducible gene 1) 与 MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5) 识别相应的 PAMP 后构象发生变化,招募定位于线粒体的接头蛋白 VISA (virus-induced signaling adaptor)。VISA 通过与 TRAF6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6) 或 TRAF2 相互作用,激活 IKK (inhibitor of κ B kinase) 复合物,IKK 复合物磷酸化 I κ B (inhibitor of κ B),使 I κ B 经泛素-蛋白酶体途径降解,释放出转录因子 NF- κ B。同时 VISA 与 TRAF3 以及 TBK1 (TRAF family member-associated NF- κ B activator-binding kinase 1) 相互作用,促进 TBK1 磷酸化激活 IRF3 (interferon-regulatory factor 3)。激活的转录因子如 IRF3 与 NF- κ B 进入细胞核结合至 I 型干扰素等基因的启动子上,激活 I

型干扰素的转录。

尽管最近十年的研究初步揭示了病毒感染诱导 I 型干扰素产生的过程,但是仍然有很多未知的问题有待进一步研究。例如,VISA 通过保守的 TRAF 相互作用位点与 TRAF6 和 TRAF2 相互作用激活 NF- κ B,而 VISA 如何与 TBK1 相互作用并进一步激活 IRF3 则并不清楚。此外,DNA 病毒的受体及其介导 I 型干扰素的机制是什么,细胞中是否存在其它未知的激活 I 型干扰素的蛋白等。为了寻找参与激活 I 型干扰素表达的蛋白,我们利用表达克隆的方法筛选了人脾脏 cDNA 表达文库,发现一个功能未知的蛋白能有效激活 IRF3,我们将其命名为 MITA(mediator of IRF3 activator)。研究表明,MITA 能有效激活转录因子 IRF3 而不激活 NF- κ B。RNAi 下调 MITA 的表达则抑制病毒诱导的 IRF3 和 NF- κ B 的激活、*IFN- β* 等抗病毒基因的表达以及细胞抗病毒反应。MITA 的 N 端含有四个跨膜结构域,其中第三个跨膜结构域(aa111-150)对其线粒体定位、与 VISA 相互作用以及自身的多聚化非常重要,第二个跨膜结构与第三个跨膜结构之间的部分(aa81-110)对促进 TBK1-IRF3 相互作用是必需的。内源性免疫沉淀实验表明,MITA 持续性地与 VISA 和 IRF3 相互作用,病毒感染后,MITA 将 TBK1 招募至线粒体,介导 VISA-TBK1 相互作用;同时,MITA 通过自身多聚化形成 VISA- MITA-TBK1-IRF3 复合物。在这一复合物中,MITA 第 358 位的丝氨酸被 TBK1 磷酸化,这一过程为 IRF3 的磷酸化激活非常重要。

在研究 MITA 介导 I 型干扰素表达机制的过程中,我们发现没有病毒感染的情况下 MITA 已经被磷酸化,但是哪(几)种蛋白介导静息状态下 MITA 磷酸化还不清楚;同时我们也观察到 MITA 能被泛素化,但是 MITA 泛素化的机制与意义也不清楚。为了回答上述问题,我们以 MITA 为“诱饵”蛋白做了酵母双杂交实验,发现一个 E3 泛素连接酶 RNF5 能与 MITA 相互作用。RNF5 的 C 端含有一个跨膜结构域,并通过其 C 端与 MITA 相互作用。RNF5 在多种细胞中特异地抑制病毒感染引发的信号转导,包括 293、HeLa 以及原代巨噬细胞和树突状细胞(dendritic cells, DCs),并且其 E3 泛素连接酶活性对抑制信号转导过程是必需的。RNAi 下调 RNF5 的表达则促进病

毒感染引起的 IRF3 的激活以及 *IFN- β* 等抗病毒基因的表达。进一步的研究表明,病毒感染诱导 RNF5 在线粒体上聚集,与 MITA 和 VISA 相互作用,并催化 MITA 第 150 位赖氨酸以及 VISA 第 362 和 461 位的赖氨酸残基发生泛素化,并使其通过蛋白酶体途径降解,从而负调节病毒感染早期的信号转导,以防止过度的免疫反应。

我们的研究发现了一个定位于线粒体、介导 I 型干扰素表达的新的接头蛋白 MITA,进一步阐述了病毒感染诱导 I 型干扰素表达的机制;而定位于内质网和线粒体的 E3 泛素连接酶 RNF5 通过泛素化降解 MITA 和 VISA,负调控病毒感染诱导的 I 型干扰素的表达,防止免疫系统过度激活对宿主造成的伤害,也暗示着亚细胞器线粒体-内质网之间的“交流”(interplay)在抵御病毒感染与防止过度免疫的平衡过程中扮演着非常重要的角色。

Abstract

The mechanisms of viral infection and host immune response have long been recognized as a hot research field in life sciences. Pattern-recognition receptors (PRRs) encoded by the host genome recognize invading viruses, representing the first step for antiviral response. The PRRs initiates a series of signaling, which leads to production of a number of cytokines such as type I interferons (IFNs) and interleukin-1 β (IL-1 β). The secreted type I IFNs bind to the receptors in autocrine or paracrine manner and initiate signaling that activates transcription of thousands of genes. The produced proteins collaborate to inhibit viral replication or induce apoptosis of infected cells. On the other hand, type I IFNs activate innate immune cells to induce inflammatory response and/or adaptive immune system, resulting in clearance of invading virus and infected cells. Thus, type I IFNs play a vital role in host antiviral response.

The mechanisms of virus-triggered induction of type I IFNs have been extensively investigated during the past decade. Viral infection and replication generate pathogen associated molecular patterns (PAMPs) such as 5' triphosphate panhandle RNA and double-stranded RNA, which are recognized by the pattern-recognition receptors (PRRs). Among the PRRs, the cytoplasmic RIG-I-like receptors (RLRs), RIG-I and MDA5, have been demonstrated to bind to viral RNAs. Upon detection of viral RNA, RIG-I or MDA5 is associated with the mitochondrial adaptor protein VISA. VISA is associated with several downstream pro-

teins constitutively or in a viral infection dependent manner, including TRAF2, TRAF3 and TRAF6. On one hand, VISA interacts with TRAF2 and/or TRAF6 to activate IKK complex, which phosphorylates I κ B. The phosphorylated I κ B is ubiquitinated and degraded through proteasome, leading to the release and activation of NF- κ B. On the other hand, VISA recruits TRAF3 and TBK1 to phosphorylate and activate IRF3. The activated transcription factors IRF3 and NF- κ B enter into the nucleus and collaboratively activate transcription of type I IFN genes.

Although breakthrough advances on the virus-triggered type I IFN signaling pathways have been made during the past decade, there are a lot of key questions remaining to be elucidated. For example, it has been suggested that VISA interacts with TRAF2/TRAF6 via its conserved TRAF-interacting motifs, whereas how VISA is associated with TBK1 is not known yet. Also, what are the unknown proteins involved in virus-triggered type I IFN signaling is another research interest. To identify proteins involved in type I IFNs production, we performed expression cloning experiments, leading to the identification and characterization of MITA (mediator of IRF3 activation). Overexpression of MITA activated IRF3, whereas knockdown of MITA inhibited virus-triggered activation of IRF3, expression of type I IFNs, and cellular antiviral response. MITA contained four putative transmembrane domains at its N-terminus and was found to localize to the outer membrane of mitochondria and the third transmembrane is critical for its mitochondrial localization, VISA-MITA association and MITA oligomerization. MITA was found to be associated with VISA and IRF3 constitutively and recruited the kinase TBK1 to the VISA-associated complex. The serine 358 of MITA was phosphorylated by TBK1, which is required for MITA-mediated activation of IRF3.

During the process to characterize MITA, we found that MITA was basally phosphorylated without viral infection. However, the kinase(s) remained to be identified. In addition, we also observed that MITA was

ubiquitinated, whereas the mechanism of this process was unknown. To address these questions, we performed yeast two-hybrid assays with full-length MITA as bait, leading to the identification of an E3 ubiquitin ligase RNF5 as a MITA-interacting protein. RNF5 interacted with MITA through its C-terminus in a viral-infection-dependent manner. Overexpression of RNF5 inhibited virus-triggered IRF3 activation, *IFN- β* expression and cellular antiviral response, whereas knockdown of RNF5 had opposite effects. RNF5 targeted MITA at Lys150 for ubiquitination and degradation after viral infection. Both MITA and RNF5 were located at the mitochondria and endoplasmic reticulum (ER) and viral infection caused their redistribution to the ER and mitochondria, respectively. We further found that virus-induced ubiquitination and degradation of MITA by RNF5 occurred at the mitochondria. We also found that RNF5 targeted Lys 362 and Lys 461 of VISA for ubiquitination at the early phase of viral infection, thereby negatively regulating virus-induced type I IFN signaling and preventing excessive immune responses.

These studies further our understandings of the mechanisms and regulations of virus-induced type I IFN signaling and contribute to the elucidation of the complicated molecular mechanisms of cellular antiviral response. Our results also indicate that the interplay between mitochondria and ER plays a critical role in host defense against invading viruses as well as avoiding harmful excessive immune responses.

Key Words: MITA, RNF5, VISA, cellular antiviral response, signaling transduction

Bo Zhong

目 录

第一章 研究背景.....	1
第一节 抗病毒天然免疫概述.....	1
一、天然免疫简介	1
二、抗病毒天然免疫反应信号转导概述	3
三、I 型干扰素转录激活机制	5
第二节 PRRs 及其介导的天然抗病毒免疫反应信号转导.....	11
一、识别病毒的模式识别受体及其对病毒的识别.....	11
二、PRRs 协同作用介导细胞抗病毒反应	31
三、PRRs 介导的细胞抗病毒反应信号转导	34
第三节 PRRs 介导的信号转导的调节机制.....	45
一、阻断介导信号转导的分子间的相互作用.....	49
二、降解介导信号转导的蛋白.....	50
三、调节信号分子的去泛素化.....	51
四、其他.....	52
第二章 实验材料与实验方法	54
第一节 实验材料	54
一、荧光素酶报告基因实验相关材料.....	54
二、细胞、细胞因子与细胞培养	54
三、载体构建所需材料.....	55
四、酵母双杂交所需材料.....	55
五、免疫共沉淀以及 Western blot 实验相关材料	55
第二节 实验方法	56
一、质粒构建、DNA 纯化、磷酸钙沉淀转染 293 细胞、免疫	

共沉淀、Western blot 与 RNA blot	56
二、荧光素酶报告基因实验	57
三、表达克隆筛选	57
四、酵母双杂交实验	57
五、亚细胞器分离实验	60
六、RT-PCR 实验	60
七、VSV 空斑实验	61
八、泛素化实验	61
九、LC-MS/MS 鉴定 MITA 磷酸化位点	62
十、免疫荧光与激光共聚焦显微镜观察	62
十一、非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳	62
十二、原代细胞的培养与转染	63
十三、 ^{32}P <i>in vivo</i> 标记细胞与放射自显影实验	64
十四、体外泛素化实验	64
 第三章 实验结果与讨论	65
第一节 MITA 介导的信号转导机制	65
一、研究背景与立项依据概述	65
二、MITA 的鉴定与表达分析	66
三、过表达 MITA 能有效激活 IRF3	66
四、RNAi 下调 MITA 的表达抑制 SeV 诱导的 IFN- β 的表达	68
五、MITA 定位于线粒体	72
六、MITA 与 VISA、RIG-I 相互作用	78
七、MITA 作为支架蛋白促进 TBK1-IRF3 的相互作用	82
八、TBK1 介导 MITA 的磷酸化促进 MITA 对 IRF3 的 激活	86
九、小结与讨论	88
第二节 RNF5 对 MITA 介导信号转导的调节	92
一、研究背景和立项依据概述	92
二、RNF5 是 MITA 相互作用蛋白	92

三、过表达 RNF5 抑制病毒感染引起的 IFN- β 的激活	95
四、RNAi 下调 RNF5 的表达促进病毒感染引起的 IFN- β 的激活	99
五、RNF5 在 MITA 水平调节细胞抗病毒反应	101
六、RNF5 催化 MITA 泛素化降解	104
七、RNF5 催化 MITA 泛素化发生在 MITA K150	108
八、RNF5 在线粒体泛素化 MITA	109
九、小结与讨论	111
第三节 RNF5 催化 VISA 泛素化降解	112
一、研究背景与立项依据概述	112
二、病毒感染诱导 RNF5 与 VISA 相互作用	113
三、RNF5 诱导 VISA 通过泛素-蛋白酶体途径降解	113
四、RNF5 泛素化 VISA 发生在 K361 和 K462	118
五、RNF5 对 VISA 的泛素化独立于 Itch	119
六、小结与讨论	121
第四节 研究总结与展望	123
参考文献	125
缩略词表	156
致 谢	161

第一章 研究背景

第一节 抗病毒天然免疫概述

一、天然免疫简介

免疫系统是机体防御病原微生物的入侵、监视并清除体内的非正常细胞、发挥免疫耐受和免疫调节等重要功能的系统。总的来说,免疫系统由免疫分子(如识别病原微生物的分子、干扰素、细胞因子、抗体及补体等)、免疫细胞(如粒细胞、巨噬细胞、树突状细胞、自然杀伤细胞以及 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞等)、免疫组织(黏膜相关淋巴组织)和免疫器官(胸腺、骨髓、脾和淋巴结等)组成。机体受到病原微生物入侵后,感染部位的细胞和组织发生一系列的反应,诱导抵抗病原微生物复制的蛋白表达,同时产生大量的细胞因子。免疫细胞受到细胞因子的趋化和诱导而活化,经免疫应答等过程产生免疫效应细胞,释放免疫效应分子,消灭入侵的病原微生物、修复遭到破坏的组织并对病原微生物产生免疫记忆。

根据对入侵病原微生物识别的不同机制,免疫系统分为天然免疫系统(innate immune system)和适应性免疫系统(adaptive immune system)。适应性免疫(adaptive immunity)又叫获得性免疫(acquired immunity)或特异性免疫(specific immunity),是指体内 naive T/B 淋巴细胞表面受体识别和接受病原微生物的抗原表位(epitope)刺激后,自身活化、增殖、分化为效应细胞,产生一系列生物学效应的全过程。因此,T/B 淋巴细胞介导的体液或细胞免疫是适应性免疫发挥功能的主要形式,具有高度的抗原特异性和免疫记忆性等特点。天

然免疫(innate immunity)又叫固有免疫、先天免疫或非特异性免疫(non-specific immunity),包括生理屏障(皮肤和黏膜组织、血脑屏障和胎盘屏障等)、化学屏障(pH 值、脂肪酸、酶以及补体系统)以及参与天然免疫反应的细胞(如被感染的上皮细胞、粒细胞、单核细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞和树突状细胞等),能广谱地阻止病原微生物的入侵并抑制其在体内的复制。其中,细胞介导的天然免疫反应依赖于细胞表面或胞浆内的模式识别受体(pattern-recognition receptors, PRRs)对病原微生物上某些保守组分的识别,是介导天然免疫反应的重要组成部分。

尽管天然免疫与适应性免疫对病原微生物的识别机制不同,但它们并非两个相互割裂的部分,而是一个统一的整体。病原微生物突破生理屏障结构,进入皮肤下层或黏膜下层组织后,可被局部存在的巨噬细胞迅速吞噬清除。补体系统被入侵的病原微生物激活,产生杀伤作用;同时补体活化产物可介导调理作用,增强各种吞噬细胞的吞噬能力,发挥强大的杀伤效应,阻止病原微生物对靶细胞的吸附与感染。某些病原微生物能突破生理和化学屏障感染靶细胞,这些细胞受到病原微生物感染后,激活一系列的信号级联反应,诱导产生大量的细胞因子和趋化因子,这些细胞因子一方面通过自分泌(autoocrine)和旁分泌(paracrine)的形式激活下游信号通路,合成抑制或干扰病原微生物复制的蛋白,另一方面炎症细胞因子(inflammatory factors)(如 IL-8, IL-1 和 TNF 等)和趋化因子(chemokines)(如 CCL5 和 MCP-1 等)吸引附近组织或血管中的免疫细胞如中性粒细胞(neutrophil)、自然杀伤细胞(natural killer cell)以及巨噬细胞(macrophage)和树突状细胞(dendritic cell)迁移到感染部位。中性粒细胞、自然杀伤细胞和巨噬细胞能吞噬、杀伤并裂解被感染的细胞及入侵的病原微生物,在感染部位产生炎症反应;同时这些细胞可合成大量的促炎症细胞因子,进一步放大机体天然免疫反应和炎症反应,从而清除入侵的微生物,绝大多数的病原微生物感染终止于此。如果这一过程不能清除入侵的病原微生物,抗原呈递细胞巨噬细胞和树突状细胞对吞噬的病原微生物进行加工,随着血液和淋巴循环至淋巴结和脾脏,将加工过的短肽通过细胞表面的主要组织相容性复合物