

· 成果快报 ·

Hippo 信号通路调控宿主抗感染的重要防御机制

耿晶 孙秀峰 王平 王晓珍
张世浩 赵昊 熊晓琳 陈兰芬 周大旺*

(厦门大学生命科学学院, 细胞应激生物学国家重点实验室, 厦门 361102)

[关键词] 信号通路; 激酶; 活性氧; 固有免疫

细菌(特别是致病菌或者条件性致病菌)感染一直是临床治疗各类疾病所面临的一项难题。微小的细菌能通过破损的皮肤、粘膜或者血液入侵机体, 当自身免疫功能下降或失衡, 就可能造成致病菌群的大量扩增, 并诱发机体破损部位或组织器官产生脓肿溃烂、炎症因子风暴和组织坏死, 最终导致败血症或致死性脓毒性休克^[1]。已知在生理条件下, 当细菌侵入后, 天然免疫细胞如巨噬细胞、嗜中性粒细胞等立即响应, 识别并吞噬致病菌后形成吞噬小泡, 并协同招募胞内线粒体和 NADPH 氧化酶向吞噬泡内释放大量的活性氧(ROS), 进而实现杀伤和清除细菌的作用^[2-4]。这一功能是通过其活化后发挥的吞噬和杀伤作用来实现的, 然而其具体机制一直以来都不甚明了。

在哺乳动物中 Hippo 信号通路上游关键激酶 Mst1 和 Mst2 与果蝇中 Hippo 激酶属于同源物, 该通路在进化过程中十分保守, 通过接受上游生长抑制信号而引起下游信号级联反应元件 WW45、Mob1 和 Lats1/2、NDR1/2 发生激酶级联反应, 最终将下游效应因子 Yap 和同源物 Taz 磷酸化, 使其滞留在细胞浆中并被降解, 起到抑制 Yap/Taz 转录共激活的作用, 从而发挥着调控组织器官大小和促进细胞增殖或死亡的功能^[5]。近年来的研究工作显示 Hippo 信号通路在调控肿瘤发生发展、干细胞功能调控和组织再生方面具有十分重要的作用^[6]。本课题组围绕 Hippo 信号通路关键激酶 Mst1 和 Mst2 在免疫系统中的功能开展了一系列的研究, 发现该通路在免疫功能调节中发挥重要作用。我们揭示了 Mst1 激酶和 Rassf 家族中 Nore1b 参与了对

Naive T 细胞增殖和活化的负调控^[7]。Mst1 基因缺失会导致初始 T 细胞减少, 活化效应 T 细胞大量增加, 从而造成严重自身免疫性疾病。随后我们课题组又发现 Mst1 和 Mst2 的下游底物 Mob1 能通过作用于 Dock8, 从而促进小 G 蛋白 Rac1 的活化, 继而促进 T 细胞的细胞骨架重组和细胞迁移功能^[8]。最近与其他课题组合作发现 Mst1/2 下游的激酶 NDR1/2 具有和 Mst1/2 类似的免疫调节功能^[9]。近年来关于 Hippo 信号通路在获得性免疫系统中作用的研究愈发广泛, 然而, Hippo 信号通路在天然免疫系统中扮演何种角色还知之甚少。

2012 年来自德国汉诺威医学院的研究团队发现了一种新的人类原发性免疫缺陷综合症临床表型, 即患该病患者出现复发性、易感性细菌或病毒感染、黏膜与皮肤的念珠菌感染, 皮肤出现化脓性肉芽或脓肿, 并且伴随有淋巴细胞和嗜中性粒细胞减少的症状^[10]。经过后期分析后发现病人体内 Mst1 基因出现家族性遗传性突变, 使得 Mst1 基因不能表达。这项研究为我们展示出 Hippo 信号通路上游关键激酶 Mst1 对于人的免疫系统和宿主抵御感染的过程是不可或缺的, 但这项研究仅仅是展现出 Mst1 在免疫系统防御机制中发挥的部分作用, 还远远不能阐明 Hippo 信号通路 Mst1/2 激酶在这一过程中到底扮演了何种关键角色。

1 Mst1 和 Mst2 缺失型小鼠表现出明显的严重病原体感染和自身免疫疾病

本课题组长期从事 Hippo 通路研究, 通过基因敲除、敲入或转基因手段发现 Hippo 通路在组织稳

收稿日期: 2015-12-26; 修回日期: 2015-12-30

* 通信作者, Email: dwzhou@xmu.edu.cn

态维持中起到十分重要的作用^[7,11-20]。在本项研究工作中,我们发现在小鼠骨髓造血干细胞中敲除 Mst1 和 Mst2 会造成严重病原体感染和自身免疫疾病,在此基础上,我们进一步构建了能精确靶向天然免疫细胞如巨噬细胞、嗜中性粒细胞等的 Mst1 和 Mst2 敲除小鼠(Mst1^{f/f} Mst2^{f/f} Lyz-Cre 即 Mst1/2 cDKO)^[11]。

通过 6—8 个月的连续观察,发现其在正常培养条件下并没有表现出很明显的感染和免疫缺陷,于是我们用研究脓毒血症常用的盲肠结扎穿刺(CLP)模型处理野生型或 Mst1/2 cDKO 小鼠。结果发现,与野生型小鼠相比,Mst1/2 cDKO 小鼠的生存率明显降低。通过对小鼠主要脏器的 H&E 染色、ELISA 检测血清中细胞炎症因子和组织匀浆点板计数发现,Mst1/2 cDKO 小鼠表现出对复杂性细菌感染更加敏感、细菌清除能力缺陷等细菌脓毒血症表型。于是我们用标记的大肠杆菌感染巨噬细胞或嗜中性粒细胞并检测其吞噬和杀伤细菌的功能,结果发现与野生型小鼠相比,Mst1/2 cDKO 小鼠巨噬细胞或嗜中性粒细胞在吞噬和杀伤细菌的能力均明显降低。

因为巨噬细胞或嗜中性粒细胞在应答细菌入侵信号时会产生呼吸爆发,释放大量依赖于线粒体和 NADPH 氧化酶活性的 ROS,发挥杀伤和清除功能^[4,21,22],所以我们也通过特异性的活性氧探针检测细胞内或线粒体释放的 ROS,结果发现与野生型小鼠相比,Mst1/2 cDKO 小鼠巨噬细胞或嗜中性粒细胞中线粒体 ROS(mtROS)的产生明显减少。随后我们针对 Mst1/2 cDKO 小鼠巨噬细胞或嗜中性粒细胞中线粒体功能进行了一系列检测,结果发现与野生型细胞相比并没有很明显的差异。于是我们将乳胶小球用 PBS、LPS 或 Pam3csk4 包被,以 Hsp60 抗体来标记线粒体,通过免疫荧光染色技术和激光共聚焦显微镜我们观察到与野生型小鼠相比,Mst1/2 cDKO 小鼠巨噬细胞或嗜中性粒细胞的线粒体不能够募集到用 LPS 或 Pam3csk4 包被的乳胶小球周围,随后通过感染持续表达绿色荧光蛋白的大肠杆菌实验也同样验证了这一结论。那么,是否是由于某些调节细胞骨架重构的蛋白有缺陷进而影响线粒体在细胞内的穿梭,导致线粒体向细菌吞噬泡的募集失效呢? 随后我们通过细胞骨架染色、GST-PAK pulldown 等实验证实小 G 蛋白 Rac1 在 Mst1/2 cDKO 小鼠巨噬细胞或嗜中性粒细胞中的活性显著降低。

有文献报道,Rac1 蛋白在吞噬性细胞应激细菌或病毒的入侵中发挥着关键作用^[4,23]。因此,我们将 Mst1/2 cDKO 小鼠与在髓系细胞中表达持续激活的 Rac1(Rac1G12V)敲入小鼠杂交,得到 Mst1/2 cDKO-Rac1G12V 小鼠,以验证其是否能够加强 Mst1/2 cDKO 小鼠对细菌的抵抗能力。通过免疫荧光染色、细胞骨架染色、GST-PAK pulldown 和 mtROS 探针等一系列实验证实持续激活的 Rac1 确实能够显著恢复 Mst1/2 cDKO 小鼠巨噬细胞或嗜中性粒细胞的上述免疫缺陷表型。那么,Mst 激酶是怎样实现对 Rac1 蛋白的活性的调节呢?

2 Mst1 和 Mst2 能够通过磷酸化激活 PKC 介导 Rac1 蛋白的活化,进而促进 TRAF6-ECSIT 复合体的形成并促进线粒体向细菌吞噬泡的募集

通过蛋白质谱鉴定出 PKC 家族与 Mst1 和 Mst2 存在潜在的相互结合和磷酸化修饰作用,于是我们利用 phostag 探针鉴定出只有 PKC α 能够被 Mst1 和 Mst2 磷酸化,我们用磷酸化质谱和点突变发现并分析得到了 Mst1 和 Mst2 能够同时磷酸化修饰 PKC α 的第 226 位丝氨酸和第 228 位苏氨酸。有文献报道,激活的 PKC α 能够磷酸化下游底物 LyGDI 第 31 位苏氨酸介导其与 Rac1 解聚,从而促进了 Rac1 的活化^[24]。同样地,我们通过 phostag 探针、免疫共沉淀和 GST-PAK pulldown 也验证了该结论,从而在巨噬细胞内建立了一条 Mst1/2-PKC α -LyGDI-Rac1 级联反应信号通路,这条通路的激活能够导致 Rac1 蛋白的活化。接下来我们构建了 Rac1 的持续失活突变体质粒(Rac1^{T17N})和 Rac1 的持续激活突变体质粒(Rac1^{G12V}),通过蛋白质谱鉴定发现,Rac1^{T17N}能够特异性的与 TRAF6 相互结合并被鉴定出来。TRAF6 既是一个 E3 泛素连接酶,也是 TLR 信号通路中一个关键的下游接头蛋白^[1],于是我们想进一步验证 TRAF6 与 Rac1 之间的关系。通过免疫共沉淀、构建体内或体外泛素化体系,我们发现 Rac1 上的第 16 位赖氨酸可以被 TRAF6 以泛素第 63 位赖氨酸依赖的方式进行聚泛素化修饰,后续的实验我们发现,只有能够被活化的 Rac1 才能够被 TRAF6 泛素化并激活,并保持与 TRAF6 的低亲和力;而失活的 Rac1 不能够被 TRAF6 泛素化并激活,并保持与 TRAF6 的高亲和力。根据文献报道 TRAF6 能够与线粒体膜蛋白 ECSIT 相互作用,介导线粒体向细菌吞噬小泡的募集^[3,22],于是我们通

过免疫荧光染色和免疫共沉淀实验发现 Rac1^{G12V}能够加强 TRAF6 与 ECSIT 的相互作用,而 Rac1^{T17N}能够明显减弱 TRAF6 与 ECSIT 复合体的形成。在 Mst1/2 cDKO 小鼠巨噬细胞或嗜中性粒细胞中 Rac1 活性明显降低,并且失活的 Rac1 能够与 ECSIT 竞争性的结合 TRAF6,从而阻断了 TRAF6-ECSIT 复合体的形成,进而减少了线粒体向细菌吞噬小泡的募集。

有文献报道 Rac2 的家族遗传突变会导致免疫缺陷,病人嗜中性粒细胞中 Rac2 的第 57 位天冬氨酸(D)突变为天冬酰胺(N),从而导致粒细胞对细菌的反复感染无法清除,ROS 的释放明显降低等症[25]。根据序列比对,Rac2 与 Rac1 蛋白的序列同源性高达 80%,于是我们猜想 Rac2 失活突变导致的这种疾病,是否就是因为上述机制导致的呢?我们通过免疫荧光染色、免疫共沉淀实验、构建腺病毒、GST-PAK pull-down 和 mtROS 探针检测到 Rac2^{D57N}突变体确实会阻断 TRAF6-ECSIT 复合体的形成,从而减少了线粒体向细菌吞噬小泡的募集。

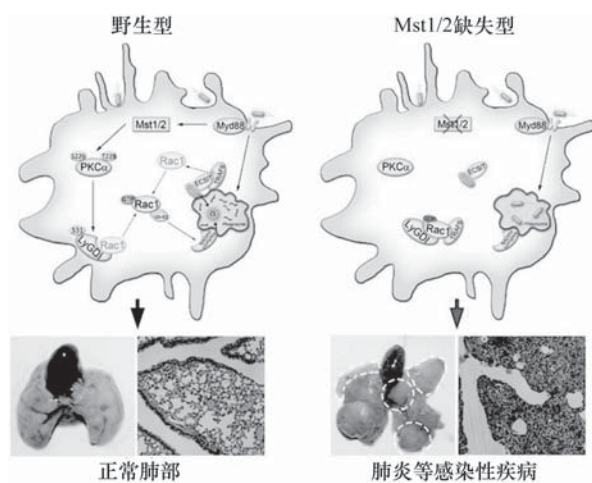


图1 Hippo 信号通路介导的天然免疫
宿主防御性信号通路模型

3 小结与展望

上述研究成果揭示了吞噬性细胞内 Hippo 信号通路关键激酶 Mst1 和 Mst2 通过活化 Rac 家族蛋白来协同招募胞内线粒体和 NADPH 氧化酶向吞噬泡内释放大量的活性氧(ROS),进而实现杀伤和清除病原体^[11],在天然免疫和宿主防御中发挥着重要作用。该研究成果从固有免疫和宿主防御角度解析了人的 Mst1 基因缺失或 Rac2 基因突变引发免疫缺陷综合症的致病机理,为研究人类感染性疾病提供了全新视角。由于 Mst1 缺失与 Rac2 失活

突变引起的人类免疫缺陷综合症表型十分相似,本研究揭示了其内在机制即失活的 Rac2 可能是通过与 TRAF6 紧密结合来破坏 TRAF6-ECSIT 复合体,使得产生的 ROS 大大减少进而增加了对病原体的易感性。该成果同时解析了人的 Mst1 基因缺失或 Rac2 基因突变引发免疫缺陷综合症的致病机理,为该疾病的治疗提供了可能的细胞和分子生物学依据,同时也为研究人类感染性疾病提供了全新的视角。这项工作被选为 *Nature Immunology* 杂志当期的封面论文发表。著名免疫学家 Lynda M Stuart 和 Adam Lacy-Hulbert 在同期 *Nature Immunology* 的 News and Views 栏目发表了评论,进一步解释了该发现的重要意义^[26]。论文同时被作为亮点在 *Nature Reviews Immunology* 以专文介绍^[27]。

致谢 本研究得到国家自然科学基金(项目批准号:31270918,81222030,81422018)、“青年千人计划”和科技部 973 项目(2015CB910502)等资助。

参 考 文 献

- [1] O'Neill LA, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors-redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(6): 453—460.
- [2] Stuart LM, Ezekowitz RA. Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(2): 131—141.
- [3] West AP, Brodsky IE, Rahner C, et al. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature*, 2011, 472(7344): 476—480.
- [4] Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(3): 181—189.
- [5] Pan DJ. The Hippo Signaling Pathway in Development and Cancer. *Developmental cell*, 2010, 19(4): 491—505.
- [6] Moroishi T, Hansen CG, Guan KL. The emerging roles of YAP and TAZ in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(2): 73—79.
- [7] Zhou D, Medoff BD, Chen L, et al. The Nore1B/Mst1 complex restrains antigen receptor-induced proliferation of naive T cells. *PNAS*, 2008, 105(51): 20321—20326.
- [8] Mou F, Praskova M, Xia F, et al. The Mst1 and Mst2 kinases control activation of rho family GTPases and thymic egress of mature thymocytes. *J Exp Med*, 2012, 209(4): 741—759.
- [9] Tang F, Gill J, Ficht X, et al. The kinases NDR1/2 act downstream of the Hippo homolog MST1 to mediate both egress of thymocytes from the thymus and lymphocyte motility. *Sci Signal*, 2015, 8(397): ra100.
- [10] Abdollahpour H, Appaswamy G, Kotlarz D, et al. The phenotype of human STK4 deficiency. *Blood*, 2012, 119(15): 3450—3457.
- [11] Geng J, Sun X, Wang P, et al. Kinases Mst1 and Mst2 positively regulate phagocytic induction of reactive oxygen species and bactericidal activity. *Nat Immunol*, 2015, 16(11): 1142—1152.

- [12] Wu H, Wei L, Fan F, et al. Integration of Hippo signalling and the unfolded protein response to restrain liver overgrowth and tumorigenesis. *Nat Commun*, 2015, 6: 6239.
- [13] Wu HT, Xiao YB, Zhang SH, et al. The Ets Transcription Factor GABP Is a Component of the Hippo Pathway Essential for Growth and Antioxidant Defense. *Cell Reports*, 2013, 3(5): 1663—1677.
- [14] Mou F, Praskova M, Xia F, et al. The Mst1 and Mst2 kinases control activation of rho family GTPases and thymic egress of mature thymocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 2012, 209(4): 741—759.
- [15] Zhou DW. Diversity in function and regulation of the Hippo pathway. *Cell and Bioscience*, 2013, 3.
- [16] Hong LX, Cai YB, Jiang MT, et al. The Hippo signaling pathway in liver regeneration and tumorigenesis. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 2015, 47(1): 46—52.
- [17] Funiu Qin JT, Dawang Zhou and Lanfen Chen. Mst1 and Mst2 kinases: regulations and diseases. *Cell & Bioscience*, 2013, 3:31.
- [18] Chen LF, Qin FN, Deng XM, et al. Hippo pathway in intestinal homeostasis and tumorigenesis. *Protein & Cell*, 2012, 3(4): 305—310.
- [19] Dawang Zhou YZ, Hongtan Wu, et al. Mst1 and Mst2 protein kinases restrain intestinal stem cell proliferation and colonic tumorigenesis by inhibition of Yes-associated protein (Yap) overabundance. *PNAS*, 2011, 108.
- [20] Zhou D, Conrad C, Xia F, et al. Mst1 and Mst2 maintain hepatocyte quiescence and suppress hepatocellular carcinoma development through inactivation of the Yap1 oncogene. *Cancer Cell*, 2009, 16(5): 425—438.
- [21] Nathan C, Cunningham-Bussel A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(5): 349—361.
- [22] West AP, Shadel GS, Ghosh S. Mitochondria in innate immune responses. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(6): 389—402.
- [23] Wu W, Hsu YM, Bi L, et al. CARD9 facilitates microbe-elicited production of reactive oxygen species by regulating the LyGDI-Rac1 complex. *Nat Immunol*, 2009, 10(11): 1208—1214.
- [24] Griner EM, Churchill ME, Brautigam DL, et al. PKCalpha phosphorylation of RhoGDI2 at Ser31 disrupts interactions with Rac1 and decreases GDI activity. *Oncogene*, 2013, 32(8): 1010—1017.
- [25] Ambruso DR, Knall C, Abell AN, et al. Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation. *PNAS*, 2000, 97(9): 4654—4659.
- [26] Stuart LM, Lacy-Hulbert A. De-Mst-ifying microbicidal killing. *Nat Immunol*, 2015, 16(11): 1107—1108.
- [27] Minton K. Phagocytosis: Mitochondria and phagosomes: better together. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(11): 667.

Hippo signaling controls phagocytic induction of reactive oxygen species and bactericidal activity

Geng Jing Sun Xiufeng Wang Ping Wang Xiaozhen Zhang Shihao
 Zhao Hao Xiong Xiaolin Chen Lanfen Zhou Dawang
 (State Key Laboratory of Cellular Stress Biology, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102)

Key words Hippo signaling; kinases Mst1/2; ROS; innate immunity