

死亡相关蛋白激酶 1 的分子结构与炎症调节作用的研究进展

夏海发 尚游 姚尚龙

外伤感染以及各器官的常见病常涉及炎症反应,如何调节炎症反应在临床治疗中起重要作用^[1-3]。死亡相关蛋白激酶 1 (DAK1) 是一种钙离子钙调蛋白调节的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是凋亡的正性调节因子之一,其广泛参与 γ -干扰素 (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、Fas 和转化生长因子- β (TGF- β) 等多种途径诱导的细胞凋亡^[4-6]。有研究证明, DAK1 可以促进肿瘤细胞凋亡并抑制肿瘤转移^[7-8];还可介导自噬小泡形成和膜出泡引起细胞自噬^[9]。DAK1 除具有介导细胞凋亡和自噬作用外,近年来不断有研究发现在其固有免疫以及炎症信号通路中也有重要作用,现将 DAK1 的基本分子结构、参与的免疫炎症信号通路以及相关机制进行综述。

1 DAK1 的分子结构

DAK1 是一类钙离子钙调蛋白调节的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族,包括 DAK1、DAK2、DAK3、DAK1 相关蛋白 1 和 DAK1 相关蛋白 2 共 5 位成员。由于 DAK2、DAK3 的催化区域和 DAK1 的催化区域分别有 83%、80% 氨基酸同源序列,通常将 DAK1、DAK2 和 DAK3 划为一个超家族^[10]。然而,在催化区域外,这些激酶在分子大小和结构上有很大差异,这就决定了它们具有不同的功能。

DAK1 的相对分子质量为 160 000,是由多个功能区域组成的蛋白质,包含 1 个催化区域、1 个钙离子钙调蛋白调节区域、8 个锚蛋白重复序列区、2 个 P 环结构、1 个细胞骨架结合区域以及 1 个死亡区域 (death domain)^[7]。

1.1 催化区域及相关功能: DAK1 的 N 端催化区域由 11 个亚区域组成,催化区域的底物结合位点有 2 个氨基酸酸性基团,能够与底物中心磷酸化位点周围的碱性残基团相互作用,在底物识别中起重要作用^[10]。许多 DAK1 的底物都有 2~3 个碱性残基团,促进 N 端的丝氨酸或者苏氨酸磷酸化,如果碱性残基团变异,将会使磷酸化效率降低^[11]。

1.2 钙离子钙调蛋白调节区域: 钙调蛋白通过与催化区域缝隙结合抑制其催化活性,该区域在丝氨酸 308 位点自磷酸化可减少与钙调蛋白的亲合性,进一步促进底物结合位点的稳定性。DAK1 是通过“双锁机制”调节的钙离子钙调蛋白依赖型激酶,激活 DAK1 需要两步。首先,结合钙离子激活钙调蛋白,使钙调蛋白结合片段从催化裂隙中分离;其次,丝

氨酸 308 位点去磷酸化增加钙调蛋白亲和性,钙调蛋白即使处于低水平也能提高催化活性。去除 DAK1 的钙离子钙调蛋白调节区域或者用丙氨酸代替丝氨酸 308 位点,会持续激活激酶,显示出更高的催化活性和更强的致死性^[6]。

1.3 锚蛋白重复序列和 P 环结构: 锚蛋白重复序列参与蛋白-蛋白之间的相互反应以及通过泛素-蛋白酶体途径促进 DAK1 降解^[11]。锚蛋白重复序列对于激酶正确定位与肌动蛋白应力纤维形成非常必要,如锚蛋白重复序列缺失, DAK1 会从黏附点分开,不能诱导细胞死亡形态改变^[12]。两个 P 环高度有序,富含碱性残基,分别位于 DAK1 序列 639-646 和 695-702 氨基酸残基位点^[13],第 2 个 P 环与细胞骨架结合区域重叠, P 环的功能还不清楚,可能与 DPAK1 作用于肌动蛋白有关^[14]。

1.4 死亡区域和尾部结构: DAK1 的 C 端包含 1 个死亡区域,其后紧跟有 1 个富含丝氨酸残基的尾部结构,其他 DAK 也有类似结构^[5]。死亡区域与尾部结构都是重要的调节元件,表达死亡区域能够保护肾上皮细胞株 293 细胞免于 TNF- α 和 Fas 引起的凋亡,肝癌细胞株 Hep3B 细胞转染 TGF- β 引起的凋亡,去除尾部结构能够显示更强的杀伤力^[15],表明死亡区域与尾部结构都能独立负性调节 DAK1 功能^[16]。DAK1 的死亡区域主要与蛋白-蛋白相互作用、激酶活性及凋亡有关。有研究证实,切除死亡区域能够消除 TNF- α 和 Fas 介导的细胞死亡^[4]。且通过活体内外实验都证实了 DAK1 的死亡区域是与抑癌基因结节性硬化基因 2 (TSC2) 作用的主要位点。DAK1 正性调节生长因子以及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物 1 (mTORC1) 信号,进而影响细胞自噬存活或凋亡^[17]。死亡区域含有与固有免疫相关的蛋白,通过双向接头蛋白诸如髓样分化因子 88 (MyD88) 与 Toll 样受体 (TLR) 连接,进而参与免疫炎症相关过程^[18]。

2 DAK1 与炎症反应

最近有相关研究发现 DAK1 参与了一系列炎症调节,而且 DAK1 可正性也可负性调节炎症过程。一方面, DAK1 在促炎症因子如白细胞介素-1 β (IL-1 β) 产生中起重要作用^[19];另一方面, DAK1 能抑制 IFN- γ 诱导单核细胞产生炎症因子^[20],抑制 DAK1 表达可提高核转录因子- κ B (NF- κ B) 的活性,促进激活 T 细胞受体 (TCR) 信号^[21]。由于 NF- κ B 入核启动基因表达多种促炎症因子以及抗凋亡分子,因此 DAK1 可能参与调节不同炎症刺激信号过程。

2.1 DAK1 正性调节炎症过程: 促炎症因子 IL-1 β 在感染和炎症中有重要作用^[22],产生 IL-1 β 分为两个步骤:第一步,炎症刺激激活 NF- κ B 促进 IL-1 β 前体合成;第二步, IL-1 β 通过天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1 (caspase-1) 作用后

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.02.018

基金项目:国家自然科学基金 (81372036)

作者单位: 430022 湖北武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院麻醉与重症医学研究所 (夏海发、尚游、姚尚龙), ICU (尚游), 麻醉科 (姚尚龙)

通讯作者: 尚游, Email: you_shang@yahoo.com

分裂产生成熟的 p17 IL-1 β 蛋白。然而在巨噬细胞和单核细胞中激活 caspase-1 依赖于 NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎性体的合成^[23-24]。DAK1 可与原位 NLRP3 反应,如果 DAK1 缺失将抑制 IL-1 β 合成和 caspase-1 活性, DAK1 基因缺失影响 NLRP3 炎性体的合成, NLRP3 炎性体完全激活需要 DAK1 的参与, NLRP3 炎性体参与一系列炎症疾病,如痛风、2 型糖尿病、动脉粥样硬化等^[19,25-26]。DAK1 还能与组织蛋白酶 B 反应^[27],而组织蛋白酶 B 能与 NLRP3 结合刺激 NLRP3 炎性体活化^[28],提示组织蛋白酶 B 可能参与调节了 DAK1 相关的 NLRP3 炎性体的形成。

DAK1 通过磷酸化 TSC2 导致 TSC1-TSC2 复合物分离,从而调节表皮生长因子 (EGF) 诱导的 mTORC1 激活^[17],而 mTORC1 是炎症信号通路中的重要角色, DAK1 可能通过此途径正性调节炎症。另外,炎症刺激通常激活 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 信号转导通路,氧化应激时 DAK1 结合蛋白激酶 D (PKD) 并激活 JNK^[29],然而 DAK1 是否参与 JNK 途径相关的炎症反应还有待进一步证实。

有研究发现 DAK1 在调节炎症因子 IL-17 和 IL-32 中起中间信号作用。抑制 DAK1 表达可显著减少巨噬细胞 THP-1 中 IL-17 和 IL-32 诱导 IL-8 的分泌, THP-1 中 DAK1 表达缺失可减少 TNF- α 和 IL-1 β 诱导 IL-8 产生^[30]。IL-17 和 IL-32 能够促进 DAK1 308 位点丝氨酸磷酸化,但 DAK1 究竟如何调节 IL-17 和 IL-32 的信号转导机制还不清楚。Geering 等^[31]研究发现, DAK2 对于中性粒细胞向趋化物的迁移有重要作用, DAK2 磷酸化肌球蛋白轻链 (MLC) 产生细胞极性,这是向趋化物迁移的必要条件,用小分子抑制剂阻断 DAK2 可以明显抑制粒细胞的运动能力。在小鼠腹膜炎模型中发现,抑制 DAK2 可以明显减少中性粒细胞向炎症部位迁移。

2.2 DAK1 负性调节炎症反应: TNF- α 是一个促炎症因子,与很多炎症及免疫疾病相关, TNF- α 有两条不同的信号通路,一条是 NF- κ B 介导的炎症免疫反应信号通路^[32];另一条是凋亡^[33]。TNF- α 在调节其他炎症因子如 IL-1 β 、IL-6、IL-8 和粒-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 的产生中起重要作用^[34-35],能诱导 DAK1 308 位点丝氨酸迅速去磷酸化^[36]。TNF- α 与 TNF 受体 1 (TNFR1) 结合,促进 TNF 受体相关蛋白 TRADD、受体反应蛋白 1 (RIP1) 与泛素 E3 连接酶的募集。RIP1 上的 K63 相关多聚泛肽链作为模板与 TAK1 复合物和 I κ B 激酶 (IKK) 结合,诱导 IKK 和 NF- κ B 激活^[37-38]。在卵巢肿瘤 OVCAR3 细胞中, DAK1 抑制 IFN- γ 和 TNF- α 诱导 NF- κ B 激活,并抑制 IFN- γ 诱导环氧合酶-2、细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 和凋亡抑制蛋白 XIAP 的表达^[39]。Chakilam 等^[40]用 TNF- α 处理肠上皮细胞,用小分子干扰 RNA (siRNA) 抑制 DAK1 表达或者给予 DAK1 抑制剂能促进转录激活因子 3 (STAT3) 激活,增加 IL-6 的 mRNA 水平和分泌。表明 DAK1 能抑制 STAT3 激活,为溃疡性结肠炎的治疗提供了新的选择思路。在结直肠的肿瘤细胞中经 TNF- α 处理后, DAK1 能与磷酸化

的 p38 丝裂素活化蛋白激酶 (p38MAPK) 相结合, DAK1 在溃疡性结肠炎及其相关肿瘤的慢性炎症中起保护作用^[41]。TNF- α 持续刺激能够上调 DAK1 的表达,表明 DAK1 是 TNF- α 信号通路的反馈调节点^[41]。

T 淋巴细胞活化后能诱导炎症因子如 TNF- α 和 IL-6 的分泌,刺激 TCR 能够激活 DAK1,使 DAK1 308 位点丝氨酸去磷酸化并促进 DAK1 依赖的 MLC 磷酸化^[20]。下调 DAK1 能促进 T 淋巴细胞的激活,上调 DAK1 则显著抑制 T 淋巴细胞增生和 IL-2 生成。DAK1 不干扰 TCR 诱导的细胞外信号调节激酶 (ERK) 磷酸化,与有研究称 DAK1 可抑制磷酸化的 ERK 核转位并抑制 ERK 的核内功能相一致^[42]。

DAK1 参与 IFN- γ 激活 / 翻译抑制 (GAIT) 复合物的形成^[20], GAIT 复合物与一系列转录子中未翻译区元件 3' 端结合,包括血管内皮生长因子 (VEGF)、趋化因子配体 22 (CCL22) 及趋化因子受体 (CCR3、CCR4、CCR6),并抑制编码这些炎症因子 mRNA 的翻译。因此, DAK1 能够参与抑制多种与 GAIT 复合物形成有关的炎症因子。

有研究证实 DAK1 能抑制 TLR4 炎症反应,在气管滴注脂多糖 (LPS) 致急性肺损伤模型中,与野生型小鼠相比, DAK1 基因敲除小鼠分泌较高浓度的 IL-6 和角质细胞趋化因子 (KC)^[43]。另一项研究发现, DAK1 在秀丽隐杆线虫引起的表皮损伤后能够抑制固有免疫,秀丽隐杆线虫引起的表皮损伤过程是由 TLR/ 白细胞介素-1 受体介导以及 p38MAPK 级联反应过程^[44]。最近有研究证实, DAK1 mRNA 水平可通过非经典 Flt3-ITD/NF- κ B 途径负性调节^[45]。

3 展望

综上,细胞内炎症信号通路各异又相互联系^[46], DAK1 参与炎症信号通路呈现出不同甚至相反的炎症作用。一方面可能是 DAK1 调节 NF- κ B 活性与细胞种类有关;另一方面可能在同一种细胞中 DAK1 调节 NF- κ B 活性与不同刺激有关^[47],如在 T 淋巴细胞中 DAK1 抑制 TCR 诱导的 NF- κ B,而不抑制 TNF- α 诱导的 NF- κ B 活性^[21]。因此,我们需要进一步研究阐明 DAK1 调节炎症作用的具体信号通路机制,设计相关药物加以干预,为全身各种炎症治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] 赵露茜,刘志锋,苏磊. 炎症反应影响甲状腺激素水平变化的机制[J]. 中国危重病急救医学,2012,24(8): 503-505.
- [2] 王彦斌,孟伟,张辉,等. 改善微炎症状态对尿毒症顽固性中重度心功能衰竭患者的疗效观察及多因素分析[J]. 中国危重病急救医学,2012,24(12): 754-758.
- [3] 刘学花,卢建荣,李玲,等. 社区获得性肺炎中医证型与血清 C-反应蛋白及甘露聚糖结合凝集素的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志,2014,21(2): 112-116.
- [4] Cohen O, Inbal B, Kissil JL, et al. DAP-kinase participates in TNF-alpha- and Fas-induced apoptosis and its function requires the death domain [J]. J Cell Biol, 1999, 146(1): 141-148.
- [5] Jang CW, Chen CH, Chen CC, et al. TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase [J]. Nat Cell Biol, 2002, 4(1): 51-58.
- [6] Bialik S, Kimchi A. The death-associated protein kinases: structure, function, and beyond [J]. Annu Rev Biochem, 2006, 75: 189-210.

- [7] Raveh T, Droguett G, Horwitz MS, et al. DAP kinase activates a p19ARF/p53-mediated apoptotic checkpoint to suppress oncogenic transformation [J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3 (1): 1-7.
- [8] Kuo JC, Wang WJ, Yao CC, et al. The tumor suppressor DAPK inhibits cell motility by blocking the integrin-mediated polarity pathway [J]. *J Cell Biol*, 2006, 172 (4): 619-631.
- [9] Inbal B, Bialik S, Sabanay I, et al. DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death [J]. *J Cell Biol*, 2002, 157 (3): 455-468.
- [10] Nair S, Hagberg H, Krishnamurthy R, et al. Death associated protein kinases: molecular structure and brain injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14 (7): 13858-13872.
- [11] Lai EC, Roegiers F, Qin X, et al. The ubiquitin ligase Drosophila Mind bomb promotes Notch signaling by regulating the localization and activity of Serrate and Delta [J]. *Development*, 2005, 132 (10): 2319-2332.
- [12] Bialik S, Bresnick AR, Kimchi A. DAP-kinase-mediated morphological changes are localization dependent and involve myosin-II phosphorylation [J]. *Cell Death Differ*, 2004, 11 (6): 631-644.
- [13] Tereshko V, Teplova M, Brunzelle J, et al. Crystal structures of the catalytic domain of human protein kinase associated with apoptosis and tumor suppression [J]. *Nat Struct Biol*, 2001, 8 (10): 899-907.
- [14] Inbal B, Shani G, Cohen O, et al. Death-associated protein kinase-related protein 1, a novel serine/threonine kinase involved in apoptosis [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20 (3): 1044-1054.
- [15] Pelled D, Raveh T, Riebeling C, et al. Death-associated protein (DAP) kinase plays a central role in ceramide-induced apoptosis in cultured hippocampal neurons [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (3): 1957-1961.
- [16] Raveh T, Berissi H, Eisenstein M, et al. A functional genetic screen identifies regions at the C-terminal tail and death-domain of death-associated protein kinase that are critical for its proapoptotic activity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97 (4): 1572-1577.
- [17] Stevens C, Lin Y, Harrison B, et al. Peptide combinatorial libraries identify TSC2 as a death-associated protein kinase (DAPK) death domain-binding protein and reveal a stimulatory role for DAPK in mTORC1 signaling [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284 (1): 334-344.
- [18] O'Neill LA, Dunne A, Edjeback M, et al. Mal and MyD88: adapter proteins involved in signal transduction by Toll-like receptors [J]. *J Endotoxin Res*, 2003, 9 (1): 55-59.
- [19] Chuang YT, Lin YC, Lin KH, et al. Tumor suppressor death-associated protein kinase is required for full IL-1 β production [J]. *Blood*, 2011, 117 (3): 960-970.
- [20] Mukhopadhyay R, Ray PS, Arif A, et al. DAPK-ZIPK-L13a axis constitutes a negative-feedback module regulating inflammatory gene expression [J]. *Mol Cell*, 2008, 32 (3): 371-382.
- [21] Chuang YT, Fang LW, Lin-Feng MH, et al. The tumor suppressor death-associated protein kinase targets to TCR-stimulated NF-kappa B activation [J]. *J Immunol*, 2008, 180 (5): 3238-3249.
- [22] Dinarello CA. Anti-inflammatory Agents: Present and Future [J]. *Cell*, 2010, 140 (6): 935-950.
- [23] 张任飞, 杨泓, 郭立新. 白细胞介素-1 β 、炎症小体 NLRP3 对 2 型糖尿病和牙周炎的影响 [J]. *中华糖尿病杂志*, 2013, 5 (6): 368-370.
- [24] 李德培, 徐国政, 杜浩, 等. 炎性体成分 NOD 样受体家族含 pyrin 结构域蛋白 3 对重型颅脑损伤患者预后评估的价值 [J]. *中华实验外科杂志*, 2014, 31 (6): 1343-1344.
- [25] Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression [J]. *J Immunol*, 2009, 183 (2): 787-791.
- [26] 原孟, 尚丽新. NLRP1 和 NLRP3 炎性体的研究进展 [J]. *中华临床医师杂志 (电子版)*, 2013, 7 (23): 10894-10897.
- [27] Lin Y, Stevens C, Hupp T. Identification of a dominant negative functional domain on DAPK-1 that degrades DAPK-1 protein and stimulates TNFR-1-mediated apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282 (23): 16792-16802.
- [28] Bruchard M, Mignot G, Derangère V, et al. Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth [J]. *Nat Med*, 2013, 19 (1): 57-64.
- [29] Eisenberg-Lerner A, Kimchi A. DAP kinase regulates JNK signaling by binding and activating protein kinase D under oxidative stress [J]. *Cell Death Differ*, 2007, 14 (11): 1908-1915.
- [30] Turner-Brannen E, Choi KY, Arsenault R, et al. Inflammatory cytokines IL-32 and IL-17 have common signaling intermediates despite differential dependence on TNF-receptor 1 [J]. *J Immunol*, 2011, 186 (12): 7127-7135.
- [31] Geering B, Stoeckle C, Rozman S, et al. DAPK2 positively regulates motility of neutrophils and eosinophils in response to intermediary chemoattractants [J]. *J Leukoc Biol*, 2014, 95 (2): 293-303.
- [32] 高丽杰, 李崇辉, 汪江淮, 等. 细菌脂蛋白耐受中核转录因子核转位机制研究 [J]. *中华危重病急救医学*, 2011, 23 (5): 267-270.
- [33] Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease [J]. *J Pathol*, 2008, 214 (2): 149-160.
- [34] Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? [J]. *Annu Rev Immunol*, 2001, 19: 163-196.
- [35] 赵明亮, 杨细平, 田竺, 等. 亚低温联合依达拉奉对重型颅脑创伤患者脑脊液肿瘤坏死因子- α 及白细胞介素-6 表达的影响 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2014, 21 (4): 258-261.
- [36] Jin Y, Blue EK, Gallagher PJ. Control of death-associated protein kinase (DAPK) activity by phosphorylation and proteasomal degradation [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281 (51): 39033-39040.
- [37] Wertz IE, Dixit VM. Signaling to NF-kappaB: regulation by ubiquitination [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, 2 (3): a003350.
- [38] Chen ZJ. Ubiquitination in signaling to and activation of IKK [J]. *Immunol Rev*, 2012, 246 (1): 95-106.
- [39] Yoo HJ, Byun HJ, Kim BR, et al. DAPK1 inhibits NF-kB activation through TNF- α and INF- γ -induced apoptosis [J]. *Cell Signal*, 2012, 24 (7): 1471-1477.
- [40] Chakilam S, Gandesiri M, Rau TT, et al. Death-associated protein kinase controls STAT3 activity in intestinal epithelial cells [J]. *Am J Pathol*, 2013, 182 (3): 1005-1020.
- [41] Bajbouj K, Poehlmann A, Kuester D, et al. Identification of phosphorylated p38 as a novel DAPK-interacting partner during TNFalpha-induced apoptosis in colorectal tumor cells [J]. *Am J Pathol*, 2009, 175 (2): 557-570.
- [42] Chen CH, Wang WJ, Kuo JC, et al. Bidirectional signals transduced by DAPK-ERK interaction promote the apoptotic effect of DAPK [J]. *EMBO J*, 2005, 24 (2): 294-304.
- [43] Nakav S, Cohen S, Feigelson SW, et al. Tumor suppressor death-associated protein kinase attenuates inflammatory responses in the lung [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012, 46 (3): 313-322.
- [44] Tong A, Lynn G, Ngo V, et al. Negative regulation of Caenorhabditis elegans epidermal damage responses by death-associated protein kinase [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106 (5): 1457-1461.
- [45] Shanmugam R, Gade P, Wilson-Weekes A, et al. A noncanonical Flt3ITD/NF-kB signaling pathway represses DAPK1 in acute myeloid leukemia [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18 (2): 360-369.
- [46] 刘辉, 姚咏明. 细胞内炎症信号通路交汇作用研究进展 [J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21 (8): 1607-1613, 1627.
- [47] Lai MZ, Chen RH. Regulation of inflammation by DAPK [J]. *Apoptosis*, 2014, 19 (2): 357-363.

(收稿日期: 2014-08-25)

(本文编辑: 李银平)