

Pellino1 SUMO 修饰位点突变对 TRAF6 介导的 NF- κ B 信号转导的影响

张亚萍, 李建涛, 施芃曦, 阙玲俐, 李跃华*

南京医科大学病理生理学系, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的:研究 Pellino1 蛋白翻译后修饰——小泛素相关修饰物(small ubiquitin-related modifier, SUMO)修饰对肿瘤坏死因子受体相关分子-6(TNF receptor associated factor 6, TRAF6)介导的核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)信号转导的影响。方法:构建 Pellino1 SUMO 修饰位点突变的质粒,与 TRAF6、泛素(ubiquitin, Ub)质粒共转染至 HEK-293 细胞中,荧光显微镜观察转染效率,免疫共沉淀的方法检测突变型 Pellino1 与 TRAF6 的相互结合作用;同时,检测 Pellino1 和 TRAF6 的泛素化修饰水平。采用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导炎症反应,分提胞浆核蛋白,Western blot 检测核因子 κ B 的抑制蛋白 α (inhibitor of NF- κ B α , I κ B α)的磷酸化和 NF- κ B P65 的核转位,分析 Pellino1 蛋白 SUMO 修饰突变对 TRAF6 介导的 NF- κ B 信号通路的影响。结果:与野生型 Pellino1 相比, SUMO 修饰突变型 Pellino1 不仅增加 Pellino1 的自身泛素化修饰水平,而且可增加其与 TRAF6 的相互结合作用,并增强 TRAF6 的泛素化修饰;LPS 刺激可增加 I κ B α 的磷酸化和 NF- κ B P65 的核转位,转染使 Pellino1 SUMO 修饰突变高表达可明显增强 LPS 诱导的 NF- κ B 信号激活。结论:Pellino1 SUMO 修饰突变,可通过增加 Pellino1 的自身泛素化修饰及其与 TRAF6 的结合,增强 TRAF6 的泛素化,最终促进 TRAF6 介导的 NF- κ B 信号通路的激活。

[关键词] Pellino1; SUMO 修饰; TRAF6; NF- κ B

[中图分类号] R393

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)07-863-06

doi:10.7655/NYDXBNS20180701

Effects of Pellino1 SUMO modification site mutation on TRAF6 mediated NF- κ B signal transduction

Zhang Yaping, Li Jiantao, Shi Pengxi, Que Lingli, Li Yuehua*

Department of Pathophysiology, NMU, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** To study the effects of Pellino1's post-translational modification—small ubiquitin-related modifier(SUMO) modification of Pellino1 in the nuclear factor κ B(NF- κ B)signaling pathway mediated by the TNF receptor associated factor6(TRAF6). **Methods:** We constructed the plasmid of the SUMO modification sites mutant of Pellino1, then cotransfected with TRAF6 plasmid and ubiquitin(Ub)plasmid into HEK-293 cells. The efficiency of plasmid transfection was observed by fluorescence microscopy. We detected the combination of mutant Pellino1 with TRAF6 by co-immunoprecipitation, and monitored the ubiquitination level of Pellino1 and TRAF6. Lipopolysaccharide (LPS) was used to induce inflammatory response, and the cytoplasmic nucleocapsid was extracted. Western blot was used to detect the phosphorylation of inhibitor of NF- κ B α (I κ B α)and the nuclear translocation of NF- κ B P65. The effect of Pellino1 SUMO modification on TRAF6 mediated NF- κ B signaling pathway was analyzed. **Results:** Compared with wild type Pellino1, mutant of Pellino1 SUMOylation not only increased ubiquitination of Pellino1 itself, but also the combination with TRAF6, and the ubiquitination modification of TRAF6 were also increased. LPS stimulation significantly increased the phosphorylation of inhibitor of NF- κ B α (I κ B α)and NF- κ B P65 nuclear translocation. High expression of mutant of Pellino1 SUMO after transfection significantly enhanced the LPS induced NF- κ B signal activation. **Conclusion:** Mutant of Pellino1 SUMOylation can promote TRAF6 mediated activation of NF- κ B signaling pathway by increasing the ubiquitination of Pellino1 and binding with TRAF6 and the ubiquitination level of TRAF6.

[Key words] Pellino1; SUMOylation; TRAF6; NF- κ B

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(07):863-868]

[基金项目] 国家自然科学基金(81470418, 81270292)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yhli@njmu.edu.cn

Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)属于模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)家族,在先天免疫和适应性免疫中发挥重要作用^[1]。TLRs可识别高度保守的微生物组分-病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs),一旦识别并结合PAMPs就会导致下游信号和转录因子的协调激活,从而诱导抗微生物分子、化学趋化因子、细胞因子和共刺激分子的表达^[2]。研究证实,肿瘤坏死因子受体相关分子-6(TNF receptor associated factor 6, TRAF6)在TLRs信号介导的核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)信号通路中起了非常关键的作用^[3]。TLRs通过白细胞介素-1受体相关激酶-1(interleukin-1 receptor-associated kinase 1, IRAK1)结合TRAF6的TRAF-C结构域,引起TRAF6泛素化,从而引起下游NF- κ B信号激活,诱导炎症细胞因子的表达^[4]。

Pellino1是一种具有E3泛素连接酶活性的蛋白,其与接头蛋白Tube和丝氨酸/苏氨酸激酶Pelle结合参与TLRs信号通路的调控^[5]。已有研究报道,Pellino1可通过调节髓样分化因子88(myeloid differentiation factor88, MyD88)依赖的IRAK/TRAF6途径或MyD88非依赖含有TIR结构域的诱导干扰素 β 的配体(TIR-domaincontaining adaptor molecule 1, TRIF)/受体相互作用蛋白-1(receptor interacting protein-1, RIP1)/TRAF6途径,最终导致NF- κ B信号通路的激活^[6]。Pellino1可以发生多种翻译后修饰如磷酸化、泛素化修饰以及小泛素相关修饰物(small ubiquitin-related modifier, SUMO)化修饰^[7]。Pellino1的磷酸化和泛素化修饰与其E3泛素连接酶活性的激活存在密切关系^[8]。然而,有关Pellino1蛋白SUMO化修饰的作用,尤其对TLRs介导的细胞内信号转导的影响尚未阐明。本文主要通过突变Pellino1的5个SUMO修饰位点抑制其SUMO化修饰,着重探讨Pellino1 SUMO修饰对TLRs介导的细胞内信号通路中的关键信号分子TRAF6的泛素化修饰及其介导的NF- κ B信号转导的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

HEK-293细胞为本实验室保存,质粒Flag-Peli1-FL(带Flag标签蛋白的全长野生型Pellino1)、Flag-Peli1-5M(带Flag标签蛋白的5个SUMO位点突变型Pellino1)、Myc-Traf6(带Myc标签蛋白的Traf6)、HA-Ub[带HA标签蛋白的泛素(ubiquitin, Ub)]和表达

GFP的质粒均为本实验室构建,Adv-GFP、Adv-Peli1-5M病毒(深圳百恩维生物科技有限公司)。DMEM高糖培养基、胎牛血清(Gibco公司,美国),opti-MEM(Life Technologies公司,美国),Lipofectin 2000(Invitrogen公司,美国),胰酶、MG132(蛋白酶体抑制剂)、GADPH抗体(杭州碧云天生物技术有限公司),Ub、Pellino1、p-I κ B、T-I κ B、Laminb、P65抗体(Santa Cruz公司,美国),Flag抗体、脂多糖(Sigma公司,美国),Myc、HA抗体(Cell Signaling Technology公司,美国),山羊抗小鼠IgG二抗、山羊抗兔IgG二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司),BCA蛋白测定试剂盒(Pierce公司,美国),Protein A+G琼脂糖珠(Sigma-Aldrich公司,美国),NR40(合肥Biosharp公司),荧光正置显微镜(奥林巴斯公司,日本),CO₂培养箱(Thermo Fisher Scientific公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 HEK-293细胞的复苏、传代和培养

从液氮中取出冻存的细胞,立即在37℃水浴锅中不停地摇动,使之迅速融化后,加入预先装好培养基离心管内,稍微吹打混匀后以2 000 r/min 5 min离心,去除上清后加入适量培养基,吹打成细胞悬液后,种板于中皿,置于37℃,5% CO₂培养。HEK-293细胞48 h换液1次,换液时动作要轻;细胞长至80%~90%融合时,用0.25%胰酶消化1~2 min,并加入适量完全培养基终止消化,用手掌轻轻敲打使细胞脱壁,悬浮,分散,用滴管轻轻吹打几次,获得细胞悬液,然后按照1:3的比例加入倍量的培养基,温和混匀后,均匀种至皿中,传代扩增细胞。HEK-293细胞用高糖DMEM培养基培养。

1.2.2 质粒的构建、转化与提取

将质粒pcDNA3.1/Flag和已纯化的Peli1-5M PCR产物用HindⅢ和BamHⅠ双酶切,琼脂糖凝胶电泳分别回收并纯化线性化的pcDNA3.1/Flag和酶切好的Peli1-FL PCR产物。在T4 DNA连接酶的作用下,22℃水浴过夜,取连接产物转化感受态细胞DH5 α ,涂布于含氨苄青霉素抗性的LB平板上,37℃温箱培养过夜,挑取单克隆菌落,接种于含氨苄青霉素抗性的LB培养液,用质粒纯化试剂盒提取质粒,并用HindⅢ和BamHⅠ双酶切,1%琼脂糖凝胶电泳鉴定;筛选的阳性克隆质粒委托南京金斯瑞生物科技有限公司进行DNA测序分析。以证实目的DNA片段克隆入pcDNA3.1质粒中,构建的重组质粒命名为Flag-Peli1-5M。

取3 μ L质粒Flag-Peli1-5M加入30 μ L感受态

E.coli 中,冰上放置 30 min 后,42 ℃热激 45 s,立即放入冰上 2 min。再分别加入 1 mL LB 液体,置 37 ℃摇 45 min,后再加入 4 mL 的试管内,并按计算比例加入氨苄青霉素,置 37 ℃过夜。小剂量质粒参照 QIAprep Spin Miniprep 试剂盒说明书方法提取,质粒中提参照 QIAGEN plasmid plusMidi kit 试剂盒说明书方法进行,琼脂糖凝胶电泳鉴定后,于-20 ℃保存备用。

1.2.3 质粒转染与转染效率检测

实验所用的质粒均采用 Lipofectin 2000 转染至 HEK-293 细胞。具体步骤如下:当 HEK-293 细胞长至 40%~60%时,转染前 2 h 换无抗无血清培养基;用 opti-MEM 分别溶解质粒和 Lipofectin,混匀后室温孵育 15 min 使 DNA-Lipofectin 2000 复合物形成;将 DNA-Lipofectin 2000 复合物加入培养皿中。转染 4 h 后换完全培养基,转染 36 h 后在荧光显微镜下采用细胞计数的方法,根据转染效率等于荧光视野下的细胞数比明场视野下的细胞数,计算质粒的转染效率。

1.2.4 蛋白质免疫印迹(Western blot)

提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。配置合适浓度的聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE),每组取 50 μ g 蛋白,加入 6 \times loading buffer,99 ℃煮 5 min 后上样电泳。电泳结束后用湿转的方法将蛋白条带转移至 PVDF 膜上,将膜置于含 5%脱脂奶粉的 TBS-T 中,室温封闭 1 h。封闭结束后,TBS-T 洗膜 3 次,加入相应一抗 4 ℃孵育过夜,次日回收一抗后,1 \times TBS-T 洗膜 3 次,二抗室温孵育 1.5 h,1 \times TBS-T 洗膜 3 次,ECL 显色液显影,采用 Image J 图像分析软件对灰色条带进行分析,统计结果。

1.2.5 免疫共沉淀

通过免疫共沉淀的方法检测蛋白之间的相互作用和蛋白质泛素化水平。具体步骤如下:每组蛋白样品 450 μ g,按体积比(50:1)加入相应特异性抗体,于 4 ℃持续混合反应 4 h;加入 30 μ L Protein-A+G 琼脂糖珠,4 ℃混合孵育过夜;次日以 2 500 r/min 转速 4 ℃离心 5 min,弃上清。细胞裂解液清洗 3 遍后,加入 40 μ L 的 1 \times SDS Loading buffer 99 ℃加热 5 min 后离心,收集上清,进行 Western blot 实验。

1.2.6 分提胞浆胞核蛋白

HEK-293 细胞中转染 Myc-*traf6* 质粒后并感染 Adv-Peli1-5M 及对照病毒 Adv-GFP,再给予 LPS 诱导。弃去培养液,用预冷的 PBS 清洗 3 遍,加入 Buffer A 刮取培养皿中的细胞,冰上放置 20 min 后,加入

10% NP-40 快速震荡 10 s,1 000 r/min 4 ℃离心 5 min,上清即是胞浆蛋白;接着在沉淀中加入相应体积的 Buffer C,于冰上裂解 1 h,期间每隔 5 min 涡旋 1 次,以 1 000 r/min 转速 4 ℃离心 10 min,上清即是胞核蛋白,采用 BCA 法测蛋白浓度后进行 Western blot 分析。

1.3 统计学方法

所涉及数据均用 GraphPad Prism 5 统计软件进行处理,数值均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 ANOVA 方法。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Pellino1 SUMO 修饰位点突变可增加 Pellino1 蛋白的自身泛素化修饰

与明场总细胞数相比,在 HEK-293 细胞中 GFP 质粒的转染效率达到 90%。提示在 HEK-293 细胞中通过质粒转染可以达到实验所需要的转染要求(图 1A)。

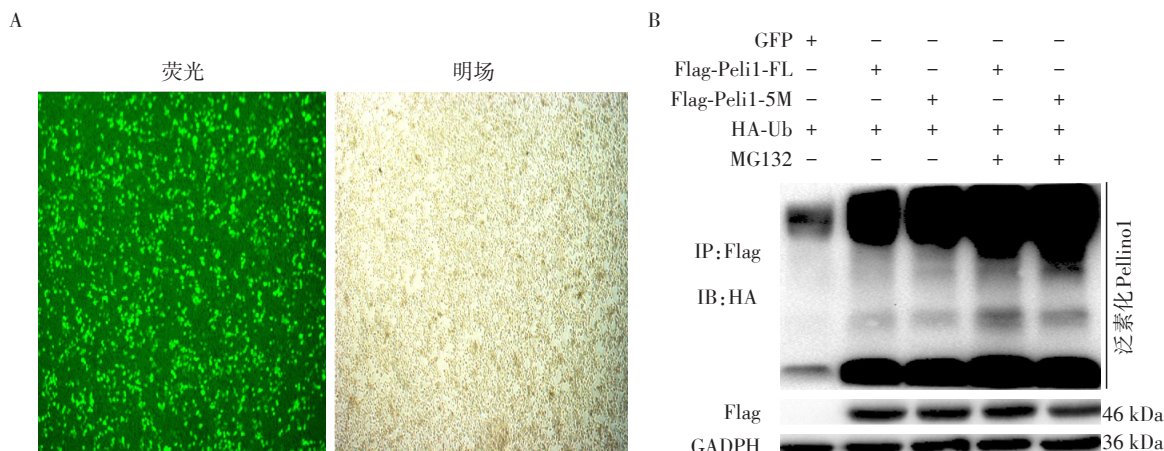
分别将质粒 GFP、Flag-Peli1-FL 或 Flag-Peli1-5M 和 HA-Ub 共转染入 HEK-293 细胞,通过免疫共沉淀检测 Pellino1 泛素化修饰,结果显示:与对照组 GFP 相比,Flag-Peli1-FL 组的泛素化水平明显增加,而 Flag-Peli1-5M 组的泛素化水平进一步增加。MG132 为蛋白酶体抑制剂,可以抑制泛素蛋白酶途径降解,当加入 MG132 后,Flag-Peli1-5M 组的泛素化相较于 Flag-Peli1-FL 组也明显增加,进一步说明 Pellino1 的 SUMO 修饰会影响其泛素化修饰。提示 Pellino1 的 SUMO 修饰突变后,可以促进 Pellino1 的自身泛素化修饰(图 1B)。

2.2 Pellino1 SUMO 修饰位点突变可增加其与 TRAF6 的相互结合

在 TLRs 信号通路中,Pellino1 可以与 TRAF6 发生结合,而且二者结合的增加可促进其下游 NF- κ B 信号通路的激活^[9]。分别将 Flag-Peli1-FL 或 Flag-Peli1-5M 与 Myc-Traf6 质粒共转染入 HEK-293 细胞,免疫共沉淀实验结果显示,无论是用 Flag 还是用 Myc 抗体做免疫共沉淀,相较于野生型,转染 Flag-Peli1-5M 后,其 Pellino1 与 TRAF6 的相互结合均明显增加(图 2A、B)。提示,Pellino1 的 SUMO 修饰可能参与了 Pellino1 与 TRAF6 相互结合的调节。

2.3 Pellino1 SUMO 修饰位点突变可增加 TRAF6 的泛素化修饰

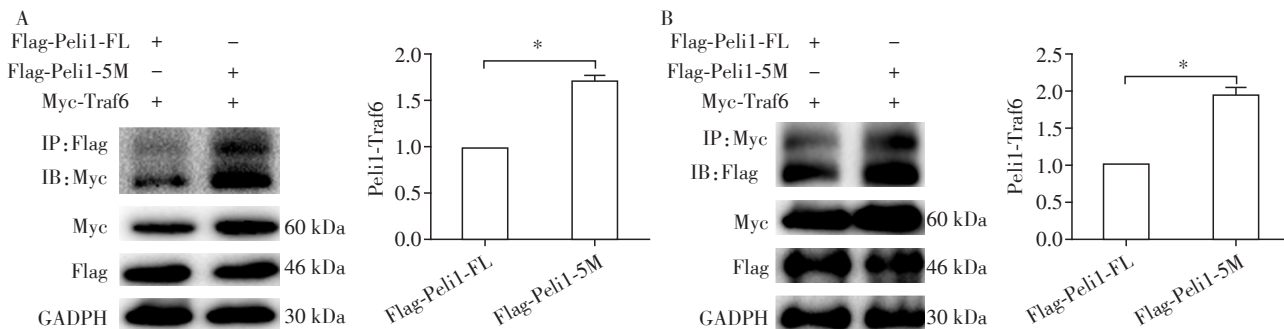
Pellino1 是一种具有 E3 泛素连接酶活性的蛋白,在 Pellino1 参与的 TLRs 信号通路中,Pellino1 可促进 TRAF6 泛素化修饰,从而介导其下游信号转导^[10]。如图 3 显示,转染质粒后,与野生型相比,



A:质粒在 HEK-293 细胞的转染效率($\times 50$);B:Pellino1 蛋白泛素化修饰;IP:免疫沉淀;IB:免疫印迹。

图1 Pellino1 SUMO 修饰位点突变对 Pellino1 蛋白自泛素化的影响

Figure 1 Effect of Pellino1 SUMO modification site mutation on the self-ubiquitination of Pellino1 protein



A:免疫共沉淀检测 Pellino1 与 TRAF6 的结合作用;B:免疫共沉淀检测 TRAF6 与 Pellino1 的结合作用。两组比较, $^*P < 0.05 (n=4)$ 。IP:免疫沉淀;IB:免疫印迹。

图2 Pellino1 SUMO 修饰位点突变对 Pellino1 与 TRAF6 的相互结合作用的影响

Figure 2 Effect of Pellino1 SUMO modification site mutation on the interaction of Pellino1 and TRAF6

Flag-Peli1-5M 组的 TRAF6 泛素化水平明显上升。表明 Pellino1 的 SUMO 修饰可能参与了 Pellino1 E3 泛素连接酶活性的调节过程,从而影响 TRAF6 的泛素化修饰。

2.4 突变 Pellino1 的 SUMO 修饰可以促进 LPS 诱导的 NF- κ B 激活

已有研究证实,LPS 可激活 TLR4,最终引起 NF- κ B 的活化^[11]。HEK-293 细胞感染 Pellino1 SUMO 修饰位点突变病毒载体(Adv-Peli1-5M),再给予 LPS 诱导,与对照组相比,LPS 处理后 I κ B α 蛋白的磷酸化水平增加,而转染 Adv-Peli1-5M 后 I κ B α 磷酸化进一步增加(图 4A)。I κ B α 磷酸化降解可导致 NF- κ B 的 P50、P65 亚基入核,与相应的反式作用元件结合,增加 NF- κ B 的 P50、P65 亚基入核,增加 NF- κ B 结合活性。分提各组细胞的胞浆胞核蛋白,如图 4B 所示,LPS 刺激后 HEK-293 细胞胞浆内 NF- κ B P65 表

达减少而胞核内增多,说明 P65 核转位增加。在转染了 Adv-Peli1-5M 后这种蛋白变化进一步增强。

3 讨论

TLRs 介导的细胞内信号转导在机体免疫炎症反应中起着至关重要的调节作用^[12],Pellino1 蛋白是 TLRs 信号转导通路中的一个重要调控蛋白^[13],也是 TLRs、白介素-1 受体(interleukin-1 receptor, IL-1R)和肿瘤坏死因子受体 1(tumor necrosis factor receptor 1, TNFR1)等介导免疫炎症信号激活时均可参与调控的关键信号分子^[14]。大量文献报道 Pellino1 是参与 TLR/IL-1R 介导的 NF- κ B 活化中的关键蛋白,在 IL-1R 的刺激下,Pellino1 可以与 IRAK1、IRAK4 以及 TRAF6 形成复合物^[15],随后传递给转化生长因子 β 激活激酶 1(transforming growth factor- β -activated kinase 1, TAK1)导致 NF- κ B 的激活^[16]。此外,之

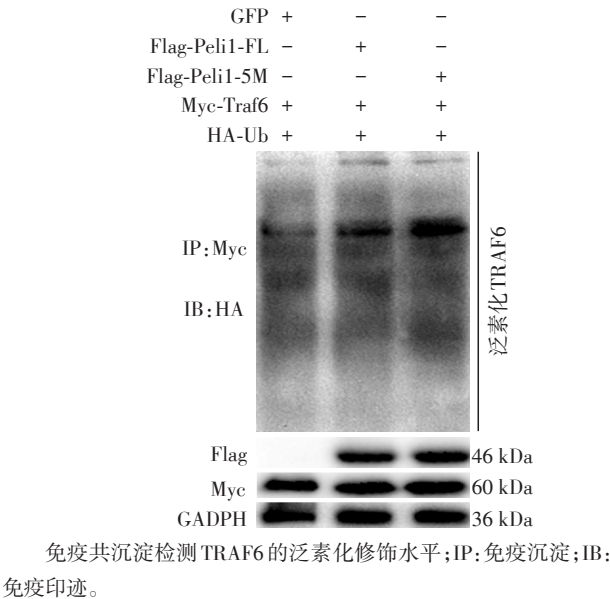


图3 突变Pellino1 SUMO修饰对TRAF6泛素化的影响
Figure 3 Effect of mutation Pellino1 SUMO modification on TRAF6 ubiquitination

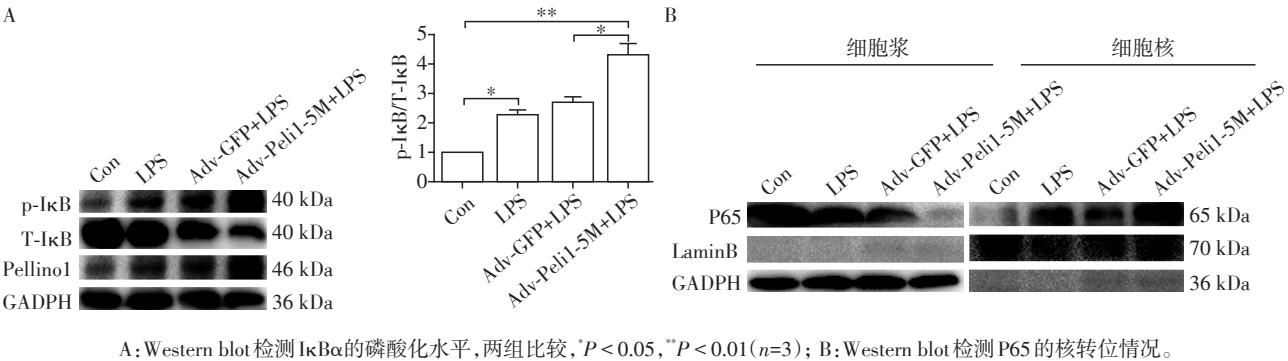


图4 Pellino1 SUMO修饰突变对脂多糖(LPS)诱导的NF-κB的影响
Figure 4 Effect of Pellino1 SUMO modification on the activation of NF-kappa B induced by lipopolysaccharide

以通过改变靶蛋白构象从而改变其功能^[24]。Pellino1 蛋白有 5 个赖氨酸位点,在泛素连接酶 Ubc9 的存在下发生 SUMO 化修饰,其中有 3 个赖氨酸位点与 Pellino1 泛素化修饰位点重合 (Lys169、Lys202、Lys266),表明 SUMO 很可能与泛素竞争结合同一赖氨酸位点^[7];其中有个发生 SUMO 修饰的赖氨酸位点 (Lys303) 位于 Pellino1 的 RING 结构区域,而该区域是 Pellino1 发挥 E3 泛素连接酶作用的区域^[25],因此突变了 Pellino1 的 SUMO 修饰位点很可能也影响其 E3 泛素连接酶活性。以上研究提示 SUMO 化修饰的 Pellino1 蛋白可能具有不同的细胞功能^[7]。

本研究结果显示,相较于野生型 Pellino1, SUMO 修饰位点突变后可以增加 Pellino1 和 TRAF6 的泛素化修饰,也促进 Pellino1 与 TRAF6 的结合。提示 SUMO 修饰位点突变可能增强了 Pellino1 的 E3 泛

前的研究证明在心肌细胞中干扰 Pellino1 的表达可以通过减少 RIP1 和 TRAF6 的泛素化修饰,从而减少 NF-κB 的激活,改善心梗和压力过负荷诱导的心脏纤维化^[17-18]。本文通过定点突变技术,研究 Pellino1 SUMO 修饰对 TLRs 信号通路中 TRAF6 介导的 NF-κB 激活的影响,并分析其中可能机制。

研究发现,Pellino1 的翻译后修饰对其参与信号通路调节有重要作用^[19]。例如 Pellino1 磷酸化后,可以激活它本身的 E3 酶活性,从而激活下游的 NF-κB 信号通路^[20]。但是,关于 Pellino1 SUMO 修饰的具体作用尚不清楚。SUMO 化修饰是 SUMO 蛋白共价结合到底物蛋白赖氨酸残基的一种翻译后修饰^[21],根据文献报道,发生 SUMO 修饰的蛋白有多种细胞功能,SUMO 可与泛素竞争结合底物蛋白的同一赖氨酸位点,从而达到阻止蛋白发生泛素化修饰的作用^[22];SUMO 化修饰也可能破坏底物与某些蛋白,从而促进与其他蛋白的相互作用^[23];SUMO 修饰还可

素连接酶活性,从而促进 TRAF6 的泛素化修饰,初步证实了 Pellino1 的 SUMO 修饰与 TRAF6 介导的信号通路的激活有关。

LPS 是 TLR4 的经典配体^[26],为了进一步验证 Pellino1 SUMO 修饰的具体生理作用,采用 LPS 刺激 TLR4 信号通路,从而促使 NF-κB 发生核转位激活。研究发现 LPS 刺激可以显著增加细胞中 IκBα 的磷酸化水平和 NF-κB P65 的核转位,转染 Pellino1 SUMO 修饰突变体可加强 LPS 诱导的 NF-κB 信号激活。进一步表明 Pellino1 的 SUMO 修饰在 TLR4 介导的 NF-κB 信号激活中具有重要的调节作用。

综上所述,突变 Pellino1 蛋白 SUMO 化修饰位点可以促进 TRAF6 介导的 NF-κB 的激活,其机制可能与增加 Pellino1 的泛素化修饰及其与 TRAF6 的结合,增强 TRAF6 的泛素化相关。为进一步阐明 Pel-

lino1 的 SUMO 修饰在 TLRs 信号通路调控中的作用提供了重要依据。

[参考文献]

- [1] Liu W, Liu J, Triplett L, et al. Novel insights into rice innate immunity against bacterial and fungal pathogens[J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2014, 52: 213–241
- [2] Vidya MK, Kumar VG, Sejian V, et al. Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals[J]. *Int Rev Immunol*, 2018, 37(1): 20–36
- [3] Wi SM, Moon G, Kim J, et al. TAK1-ECSIT-TRAF6 complex plays a key role in the TLR4 signal to activate NF-kappaB[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(51): 35205–35214
- [4] Lopez-Pelaez M, Lamont DJ, Pegg M, et al. Protein kinase IKKbeta - catalyzed phosphorylation of IRF5 at Ser462 induces its dimerization and nuclear translocation in myeloid cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(49): 17432–17437
- [5] Rednam CK, Wilson RL, Selvaraju V, et al. Increased survivability of ischemic skin flap tissue in Flk-1 (+/-) mice by Pellino-1 intervention[J/OL]. *Microcirculation*, 2017, doi:10.1111/micc.12362
- [6] Murphy M, Xiong Y, Pattabiraman G, et al. Pellino-1 positively regulates toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 signaling and is suppressed upon induction of endotoxin tolerance[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(31): 19218–19232
- [7] Kim JH, Sung KS, Jung SM, et al. Pellino-1, an adaptor protein of interleukin-1 receptor/toll-like receptor signaling, is sumoylated by Ubc9[J]. *Mol Cells*, 2011, 31(1): 85–89
- [8] Humphries F, Moynagh PN. Molecular and physiological roles of Pellino E3 ubiquitin ligases in immunity[J]. *Immunol Rev*, 2015, 266(1): 93–108
- [9] Schaubliege R, Janssens S, Beyaert R. Pellino proteins: novel players in TLR and IL-1R signalling[J]. *J Cell Mol Med*, 2007, 11(3): 453–461
- [10] Song J, Zhu Y, Li J, et al. Pellino1-mediated TGF-beta1 synthesis contributes to mechanical stress induced cardiac fibroblast activation[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 79: 145–156
- [11] Guijarro-Munoz I, Compte M, Alvarez-Cienfuegos A, et al. Lipopolysaccharide activates Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated NF-kappaB signaling pathway and proinflammatory response in human pericytes[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(4): 2457–2468
- [12] Crews FT, Walter TJ, Coleman LJ, et al. Toll-like receptor signaling and stages of addiction[J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2017, 234(9-10): 1483–1498
- [13] Moynagh PN. The Pellino family: IRAK E3 ligases with emerging roles in innate immune signalling[J]. *Trends Immunol*, 2009, 30(1): 33–42
- [14] Chang M, Jin W, Sun S. Peli1 facilitates TRIF-dependent Toll-like receptor signaling and proinflammatory cytokine production[J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(10): 1089–1095
- [15] Vollmer S, Strickson S, Zhang T, et al. The mechanism of activation of IRAK1 and IRAK4 by interleukin-1 and Toll-like receptor agonists[J]. *Biochem J*, 2017, 474(12): 2027–2038
- [16] Li YW, Mo XB, Zhou L, et al. Identification of IRAK-4 in grouper (*Epinephelus coioides*) that impairs MyD88-dependent NF-kappaB activation[J]. *Dev Comp Immunol*, 2014, 45(1): 190–197
- [17] Song J, Zhu Y, Li J, et al. Pellino1-mediated TGF-beta1 synthesis contributes to mechanical stress induced cardiac fibroblast activation[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 79: 145–156
- [18] Wu W, Hu Y, Li J, et al. Silencing of Pellino1 improves post-infarct cardiac dysfunction and attenuates left ventricular remodelling in mice[J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 102(1): 46–55
- [19] Moynagh PN. The roles of Pellino E3 ubiquitin ligases in immunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(2): 122–131
- [20] Goh ETH, Arthur JSC, Cheung PCF, et al. Identification of the protein kinases that activate the E3 ubiquitin ligase Pellino 1 in the innate immune system[J]. *Biochem J*, 2012, 441(1): 339–346
- [21] Yang W, Paschen W. SUMO proteomics to decipher the SUMO-modified proteome regulated by various diseases[J]. *Proteomics*, 2015, 15(5-6): 1181–1191
- [22] Kho C, Lee A, Jeong D, et al. Small-molecule activation of SERCA2a SUMOylation for the treatment of heart failure[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7229
- [23] Lee JE, Kim JH. SUMO modification regulates the protein stability of NDRG1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 459(1): 161–165
- [24] Sarangi P, Zhao X. SUMO-mediated regulation of DNA damage repair and responses[J]. *Trends Biochem Sci*, 2015, 40(4): 233–242
- [25] Butler MP, Hanly JA, Moynagh PN. Kinase-active interleukin-1 receptor-associated kinases promote polyubiquitination and degradation of the pellino family[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(41): 29729–29737
- [26] Plociennikowska A, Hromada-Judycka A, Borzecka K, et al. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(3): 557–581

[收稿日期] 2018-03-19