

· 成果快报 ·

SUMO 化修饰调控 T 细胞免疫突触形成和 T 细胞活化

李迎秋* 王旭东 龚宇 陈志龙
龚贝妮 谢吉佶 汪启龙 刁良辉

(中山大学生命科学学院,教育部基因工程重点实验室,有害生物控制与资源利用国家重点实验室,广州 510275)

[关键词] T 细胞活化;SUMO 化修饰;PKC- θ ;免疫突触

T 淋巴细胞是机体适应性免疫系统的核心组成细胞,它所介导的免疫应答在机体清除入侵病原体或病变细胞的过程中发挥着重要作用,不恰当的 T 细胞免疫应答会导致相关免疫疾病的发生。因此,T 细胞活化必须受到严格精细的调控。T 细胞活化,起始于 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)复合物特异性地识别抗原递呈细胞 APC 所递呈的 MHC 抗原肽复合物 pMHC,接着转化为 TCR 信号及其共刺激受体信号并经过一系列的转导、放大和整合,最终激活 T 细胞关键转录因子 NF κ B, AP-1 及 NFAT,从而活化 T 细胞。近年来的研究表明,在 TCR 受体近端信号转导中,酪氨酸蛋白激酶 Lck 及 Zap70 等所介导的底物酪氨酸磷酸化,接头蛋白 LAT 及 slp76 等所介导的信号蛋白间特异性结合,T 细胞与 APC 细胞的受体和配体在 T-APC 接触面主动再分布形成的融合结构——免疫突触(又称超分子活化簇 supramolecular activation cluster, SMAC)所介导的信号隔离与整合^[1],细胞骨架重构^[2,3],囊泡运输及蛋白泛素化及 SUMO 化修饰^[4-7]等调节机制,相互交织协同实现 TCR 信号在时空上的转导放大与整合。虽然目前对 T 细胞活化的分子机制已有较深入的认识,然而,关于 TCR-pMHC 的结合如何导致 T 细胞活化的详细机制仍不甚明了。就免疫突触如何调控 TCR 信号方面而言,已知免疫突触是调节整合 TCR 信号的重要平台,成熟免疫突触结构含有蛋白激酶 PKC- θ 富集的中央超分子活化簇 cSMAC、整联蛋白富集的外周超分子活化簇 pSMAC 和肌动蛋白富集的远端超分子活化簇 dSMAC,它们分别行使不同的调节 TCR 信

号的功能^[8,9]。其结构形成机制涉及到蛋白相互作用及蛋白翻译后修饰,细胞骨架蛋白重构以及囊泡运输等^[2,10-12]。然而,免疫突触与 TCR 信号间相互调控的具体机制仍有许多未知。

SUMO (small ubiquitin-like modifier) 化修饰是一类非常迅速且可逆的翻译后蛋白修饰,它是由 SUMO 特异性的 E1 活化酶、E2 结合酶(Ubc9)和 E3 连接酶共同催化完成;而去 SUMO 化修饰则由 SUMO 异肽酶 SENPs 催化完成。在脊椎动物中,SUMO 主要含 SUMO1, SUMO2/SUMO3 两类,两类间有 50% 的相似度,SUMO2 与 SUMO3 则只有 3 个氨基酸不同^[13,14]。SUMO 化修饰参与调控细胞的许多进程,包括细胞骨架构建,线粒体活性,囊泡运输,应激反应,细胞衰老,细胞凋亡和炎症反应等^[15,16]。但是,SUMO 化修饰是否参与调控 T 细胞受体 TCR 近端信号在我们的研究发现之前并不清楚。

1 TCR 刺激诱导 PKC- θ 发生 SUMO 化修饰

本课题组主要研究 T 细胞免疫的分子基础。在本项研究工作中,我们发现用抗 CD3 和 CD28 的单克隆抗体对 T 细胞进行共刺激后,western blot 分析的结果显示有多个分子量比 PKC- θ 大且可以被 PKC- θ 抗体识别的条带,提示刺激可能诱导 PKC- θ 发生翻译后修饰。接着,我们用金黄色葡萄球菌肠毒素(SEE)超抗原结合的 APCs 刺激人原代 CD4⁺ T 细胞,在严谨的实验条件下进行免疫沉淀^[17],然后用 SUMO1 的抗体进行检测,可以清晰地检测到 PKC- θ 发生 SUMO 化修饰的条带。利用

投稿日期:2016-03-21;修回日期:2016-05-24

* 通信作者,Email:lsslyq@mail.sysu.edu.cn

同样的实验手段,发现 PKC- θ 主要发生 SUMO-1 而不发生 SUMO-3 的修饰。

我们进一步用串联质谱技术分析 T 细胞中 PKC- θ 发生 SUMO 化修饰的位点。首先,将 SUMO1 的第 95 位 Thr 突变为 Arg,这种 SUMO1-T95R 的羧基端为 RGG,发生 SUMO1-T95R 修饰的蛋白经胰酶消化会在 SUMO1 修饰位点处产生含有 GG 的特征肽段,这种短的侧链容易被质谱所鉴定^[18]。然后,在 T 细胞中共表达 PKC- θ 和 SUMO1-T95R,对发生 SUMO1-T95R 修饰的 PKC- θ 进行分析,发现 PKC- θ 有 5 个赖氨酸位点发生了 SUMO 化修饰。将这些赖氨酸分别突变成精氨酸后,发现其中 325 或 506 位赖氨酸的突变均可显著降低 PKC- θ 的 SUMO 化水平,当同时将这两个赖氨酸位点突变为精氨酸,PKC- θ 的 SUMO 化修饰基本消失。在人原代 CD4⁺ T 细胞中,我们在敲低内源 PKC- θ 的同时,过表达 K325R 和 K506R 双突变的 PKC- θ (2KR),结果发现,在 APC 呈递 SEE 抗原 (APC-SEE) 刺激下,PKC- θ (2KR) 不能发生 SUMO 化修饰。这些结果表明 325、506 位赖氨酸是 TCR 和 CD28 诱导 PKC- θ 发生 SUMO 化修饰的主要位点,并且这两个位点都位于保守的 SUMO 化修饰序列 ψ KXD/E 中 (ψ 代表疏水性氨基酸,D/E 代表天冬氨酸或者谷氨酸)^[19]。

2 T 细胞活化和 TH2 分化需要 PKC- θ 发生 SUMO 化修饰

为了进一步阐述 PKC- θ SUMO 化修饰的免疫学意义,我们在 PKC- θ 敲除的小鼠原代 CD4⁺ T 细胞中用慢病毒载体转导表达了野生型 PKC- θ 和突变型 PKC- θ (2KR)。结果发现,转导表达野生型 PKC- θ 可以拯救 T 细胞的活化,而转导表达 PKC- θ (2KR) 不仅不能拯救 T 细胞活化,反而抑制了活化标志蛋白 CD69 的表达水平。同样,PKC- θ (2KR) 也不能拯救 IL-2 生成和细胞增殖。已知,敲除 PKC- θ 阻滞初始 CD4⁺ T 细胞分化成 TH2,但不影响 TH1 分化^[20,21]。当转导表达野生型 PKC- θ 时,可以拯救 TH2 分化;当转导表达 PKC- θ (2KR) 时,不能拯救 TH2 分化;而且两者的表达均对 TH1 的分化并没有影响。我们的结果与已有发现相一致。此外,当在人原代 CD4⁺ T 细胞中过表达去 SUMO 化修饰酶 SENP1,用 CD3、CD28 抗体共刺激时,发现 IKK β 和 ERK 的磷酸化受到抑制,并且 IL-2 的产生也显著减少。这些结果表明 PKC- θ 的 SUMO 化修饰对其

免疫学功能是必需的。

3 PIASx β 是 PKC- θ 的 SUMO E3 连接酶

PIAS 蛋白是 SUMO 化修饰 E3 连接酶最大的家族^[22]。PIAS 蛋白家族包括 PIAS1, PIAS3, PIASx α , PIASx β , PIASy, 我们发现只有 PIASx β 可以增强 PKC- θ 的 SUMO 化修饰水平。在人原代 CD4⁺ T 细胞中,TCR 和 CD28 共刺激诱导 PIASx β 与 PKC- θ 相互作用。利用共聚焦显微镜技术,我们观察到在 APC-SEE 的刺激下,人原代 CD4⁺ T 细胞中 PIASx β 和 PKC- θ 会被招募到免疫突触,在大约 25% 的免疫突触中,二者有很好的共定位。同时,我们在人原代 CD4⁺ T 细胞中也验证了敲低 PIASx β 会抑制 TCR 诱导的 PKC- θ 发生 SUMO 化修饰。因此,PIASx β 是 PKC- θ 在 TCR 信号通路中的 SUMO E3 连接酶。

4 PKC- θ 的 SUMO 化修饰是其与 CD28 在 cSMAC 共定位所必需

为了阐明去 SUMO 化修饰的 PKC- θ (2KR) 突变体不能拯救 PKC- θ 基因敲除的 T 细胞的活化和 TH 分化是否与其激酶活性有关,我们对其生化酶活性和 TCR 诱导的生理酶活性进行了分析。发现 PKC- θ 去 SUMO 化修饰并不影响 PKC- θ 的生化酶活性,但是抑制 TCR 诱导的 PKC- θ 生理酶活性,提示 PKC- θ 去 SUMO 化修饰可能影响了它的定位或与相关蛋白的结合等。因为 PKC- θ 是 PKC 蛋白家族唯一一个可以在抗原刺激的情况下,稳定定位于免疫突触 cSMAC 的异构体,这种独特定位对于 T 细胞的活化是必需的^[23-27],所以我们接着探讨了缺失 SUMO 化修饰 PKC- θ (2KR) 是否能正确定位到 cSMAC。当用 APC-SEE 刺激人原代初始 CD4⁺ T 细胞时,PKC- θ (2KR) 与野生型 PKC- θ 一样可以转位到免疫突触,但是,PKC- θ (2KR) 在免疫突触中呈现弥散分布,且不与 CD28 共定位于 cSMAC;而过表达的野生型 PKC- θ 与内源 CD28 可以正确共定位于 cSMAC。通过三维重建可以更直观的看到 PKC- θ (2KR) 与 CD28 定位弥散且不能共定位。这些现象表明,PKC- θ 的 SUMO 化修饰不影响其本身招募到免疫突触,却是其自身和 CD28 共定位于 cSMAC 所必需。我们进一步通过在人原代初始 CD4⁺ T 细胞中敲低 PIASx β (PKC- θ 的 E3 连接酶) 或过表达 SENP1,验证了 PIASx β 介导的 PKC- θ SUMO 化修饰对 PKC- θ 定位到 cSMAC 的重要性。

5 PKC- θ 的 SUMO 化修饰介导其与 CD28、filamin A 相结合

根据上述共定位结果,我们推测去 SUMO 化可能影响了 TCR 诱导的 PKC- θ 与 CD28 相结合。而 filamin A 是肌动蛋白纤维的组织者,它连接肌动蛋白网络与细胞膜^[28], filamin A 能够与 PKC- θ 和 CD28 相互作用^[29,30]。因此,我们进一步分析 PKC- θ 的 SUMO 化修饰是否影响其与二者的结合。我们发现人原代 CD4⁺ T 细胞在 TCR 刺激下,与野生型 PKC- θ 相比,PKC- θ (2KR)与 CD28 和 filamin A 的结合显著减少;当过表达 SENP1 时,刺激诱导的内源 PKC- θ 、CD28 和 filamin A 相互间的结合消失。利用共聚焦显微镜观察在 APC+SEE 的刺激下,野生型 PKC- θ 和 filamin A 分别定位到免疫突触的 cSMAC 和 pSMAC;而过表达 PKC- θ (2KR)或敲低内源的 PIASx β 的 T 细胞,其免疫突触变得混乱无

序,PKC- θ 与 filamin A 的定位没有明显的分离,且均呈不对称定位,在免疫突触外周这种现象更为明显(图 1)。综上所述表明,PKC- θ 的 SUMO 化修饰对成熟免疫突触的结构形成非常重要。

6 小结与展望

蛋白的翻译后修饰是调控细胞内信号通路的重要因素。我们的研究揭示了 SUMO 化修饰对 TCR 近端信号的调控作用,阐明 PKC- θ 的 SUMO 化修饰对于其功能、T 细胞的活化以及成熟免疫突触的正常形成都是必需的,鉴定了 SUMO E3 连接酶 PIASx β 为 PKC- θ 的 E3 连接酶及其在 T 细胞活化中的重要性,解析了免疫突触的结构形成对 T 细胞活化的关键作用,为 TCR 信号通路 SUMO 化修饰途径之间的相互调节提供了实验证据,为认识 T 细胞活化的分子机制提供了新角度。可以预见,PKC- θ

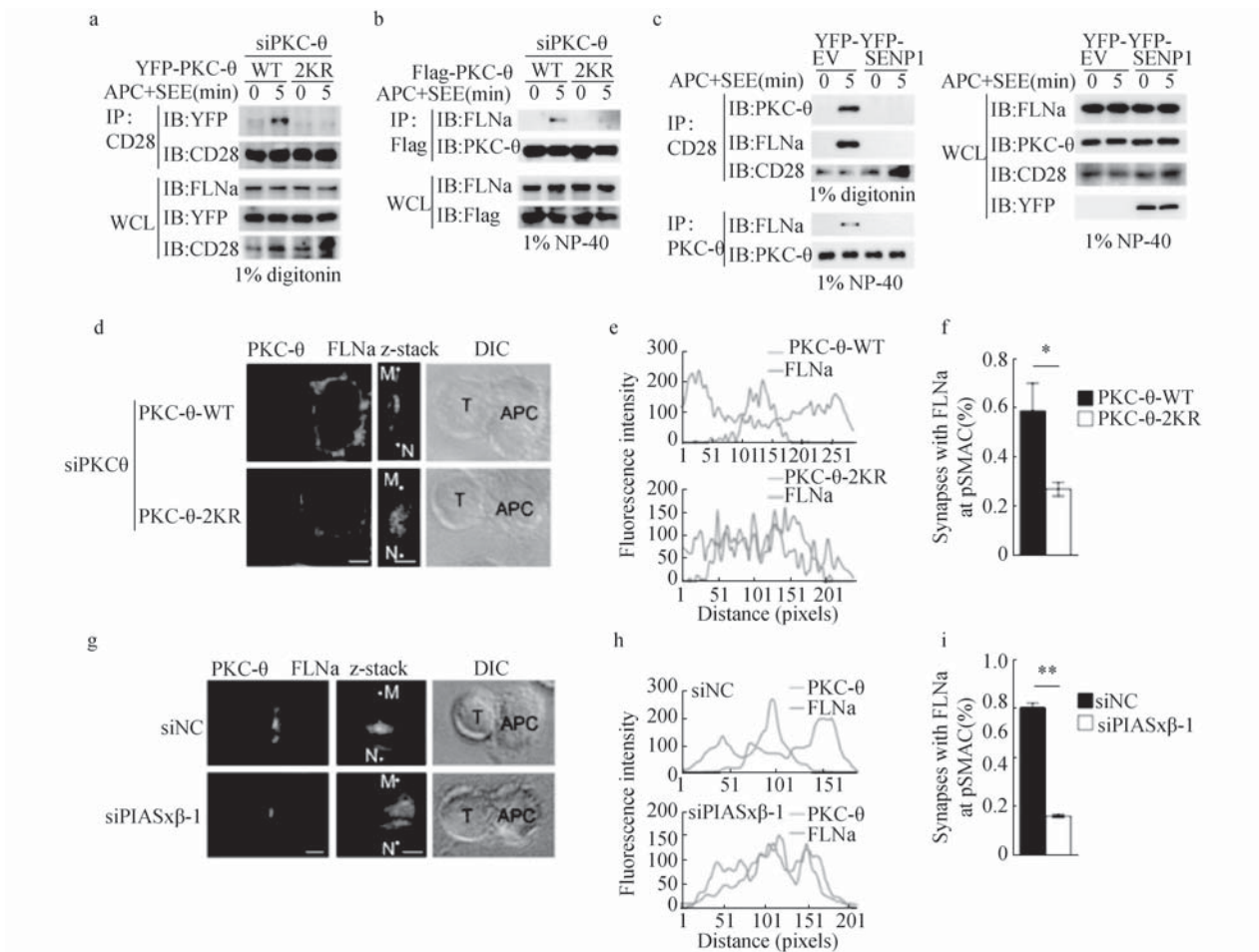


图 1 (a,b) PKC- θ 成(WT/2KR)与 CD28、filamin A 的结合;(c) 过表达 SENP1 对 PKC- θ 和 CD28、filamin A 之间结合的影响;(d,e) PKC- θ (WT/2KR)与 filamin A 的共定位;(g,h) 敲低 PIASx β 对 PKC- θ 与 filamin A 共定位的影响

绝不是 TCR 近端信号通路中唯一受 SUMO 化修饰调节的蛋白, SUMO 化修饰还可以通过其它方式调控 T 细胞近端信号通路。目前, 寻找 SUMO 化修饰底物的主要困难在于其高度瞬时性导致的不易检测性。近年来, 人们不断探索寻找 SUMO 化修饰底物的新途径, 从生物信息学预测到实验技术改进^[31], 未来借助这些方法, 相信会在 SUMO 化修饰调控 TCR 信号通路方面有更多新发现。关于 SUMO 化修饰与疾病的相关性, 近年来的研究发现, SUMO 化修饰异常促进癌症发生发展, 病原微生物可以通过劫持 SUMO 化修饰系统增进自身繁殖^[15]。综上, 深入研究 SUMO 化修饰系统在 T 细胞活化中的调控机制, 不仅进一步丰富 T 细胞活化的基础理论知识, 也将为 T 细胞相关的疾病治疗提供理论参考。本研究工作发表在免疫学期刊 *Nature Immunology* (2015), 并入选 *Science* 子刊 *Science Signaling* 的 Editors' Choice, 以“SUMO wrestles PKC to the immunological synapse”为题予以报道推荐(*Sci. Signal.*, 2015, 8(400): ec307)。

致谢 本研究项目得到国家自然科学基金(30771962, 31170846)和科技部 973 项目(2013CB835300)等的资助。

参 考 文 献

- [1] Brownlie RJ, Zamoyska R. T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13: 257—269.
- [2] Kumari S, Curado S, Mayya V, et al. T cell antigen receptor activation and actin cytoskeleton remodeling. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1838: 546—556.
- [3] Esensten JH, Helou YA, Chopra G, et al. CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity*, 2016, 44: 973—988.
- [4] Onnis A, Finetti F, Baldari CT. Vesicular Trafficking to the Immune Synapse: How to Assemble Receptor-Tailored Pathways from a Basic Building Set. *Front Immunol*, 2016, 7: 50.
- [5] O'Leary CE, Lewis EL, Oliver PM. Ubiquitylation as a Rheostat for TCR Signaling: From Targeted Approaches Toward Global Profiling. *Front Immunol*, 2015, 6: 618.
- [6] Xie JJ, Liang JQ, Diao LH, et al. TNFR-Associated Factor 6 Regulates TCR Signaling via Interaction with and Modification of LAT Adapter. *J Immunol*, 2013, 190: 4027—4036.
- [7] Wang XD, Gong Y, Chen ZL, et al. TCR-induced sumoylation of the kinase PKC-theta controls T cell synapse organization and T cell activation. *Nat Immunol*, 2015, 16: 1195—1203.
- [8] Fooksman DR, Vardhana S, Vasiliver-Shamis G, et al. Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. *Annu Rev Immunol*, 2010, 28: 79—105.
- [9] Freiberg BA, Kupfer H, Maslanik W, et al. Staging and resetting T cell activation in SMACs. *Nat Immunol*, 2002, 3: 911—917.
- [10] Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 591—619.
- [11] Bunnell SC. Multiple Microclusters: Diverse Compartments Within the Immune Synapse. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2010, 340: 123—154.
- [12] Alcover A, Thoulouze MI. Vesicle traffic to the immunological synapse: a multifunctional process targeted by lymphotropic viruses. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2010, 340: 191—207.
- [13] Johnson ES. Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem*, 2004, 73: 355—382.
- [14] Geiss-Friedlander R, Melchior F. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8: 947—956.
- [15] Flotho A, Melchior F. Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. *Annu Rev Biochem*, 2013, 82: 357—385.
- [16] Liu B, Shuai K. Summon SUMO to wrestle with inflammation. *Mol Cell*, 2009, 35: 731—732.
- [17] Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, et al. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF- κ B signalling. *Nature*, 2004, 430: 694—699.
- [18] Knuesel M, Cheung HT, Hamady M, et al. A method of mapping protein sumoylation sites by mass spectrometry using a modified small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1) and a computational program. *Mol Cell Proteomics*, 2005, 4: 1626—1636.
- [19] Seeler JS, Dejean A. Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4: 690—699.
- [20] Marsland BJ, Soos TJ, Spath G, et al. Protein kinase C theta is critical for the development of in vivo T helper (Th)2 cell but not Th1 cell responses. *J Exp Med*, 2004, 200: 181—189.
- [21] Salek-Ardakani S, So T, Halteman BS, et al. Differential regulation of Th2 and Th1 lung inflammatory responses by protein kinase C theta. *J Immunol*, 2004, 173: 6440—6447.
- [22] Roose JP, Mollenauer M, Gupta VA, et al. A diacylglycerol-protein kinase C-RasGRP1 pathway directs Ras activation upon antigen receptor stimulation of T cells. *Mol Cell Biol*, 2005, 25: 4426—4441.
- [23] Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, et al. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*, 1998, 395: 82—86.
- [24] Yokosuka T, Kobayashi W, Sakata-Sogawa K, et al. Spatiotemporal regulation of T cell costimulation by TCR-CD28 microclusters and protein kinase C theta translocation. *Immunity*, 2008, 29: 589—601.
- [25] Thuille N, Heit I, Fresser F, et al. Critical role of novel Thr-219 autophosphorylation for the cellular function of PKC theta in T lymphocytes. *EMBO J*, 2005, 24: 3869—3880.
- [26] Kong KF, Yokosuka T, Canonigo-Balancio AJ, et al. A motif in the V3 domain of the kinase PKC-theta determines its localization in the immunological synapse and functions in T cells via association with CD28. *Nat Immunol*, 2011, 12: 1105—1112.

- [27] Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, et al. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*, 1999, 285: 221—227.
- [28] Kim H, McCulloch CA. Filamin A mediates interactions between cytoskeletal proteins that control cell adhesion. *FEBS Lett*, 2011, 585: 18—22.
- [29] Hayashi K, Altman A. Filamin A is required for T cell activation mediated by protein kinase C- θ . *J Immunol*, 2006, 177: 1721—1728.
- [30] Tavano R, Contento RL, Baranda SJ, et al. CD28 interaction with filamin-A controls lipid raft accumulation at the T-cell immunological synapse. *Nat Cell Biol*, 2006, 8: 1270—U1246.
- [31] Impens F, Radoshevich L, Cossart P, et al. Mapping of SUMO sites and analysis of SUMOylation changes induced by external stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111: 12432—12437.

TCR-induced sumoylation of the kinase PKC- θ controls T cell synapse organization and T cell activation

Li Yingqiu Wang Xudong Gong Yu Chen Zhilong
Gong Beini Xie Jiji Wang Qilong Diao Lianghui

(Key Laboratory of Gene Engineering of the Ministry of Education, State Key Laboratory of Biocontrol, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275)

Key words T cell activation; SUMOylation; PKC- θ ; immunological synapse

• 资料信息 •

我国科学家在长碳链分子搜寻方面取得重要进展

近日,中国科学院上海天文台沈志强研究员领导的天马望远镜研究团队利用上海天文台 65 米口径的天马射电望远镜对巨蛇座区域内南侧(Serpens South)的一个云核进行了碳链分子的搜寻,并在其中探测到了丰富的碳链分子。相关研究成果以“TMRT Observations of Carbon-chain molecules in Serpens South 1A”(天马射电望远镜在巨蛇座区域内南侧发现长碳链分子)为题,于 2016 年 6 月 21 日在 *Astrophysical Journal* (《天体物理学报》)上发表。论文链接:<http://dx.doi.org/10.3847/0004-637X/824/2/136>。该研究得到了国家自然科学基金重大项目(项目批准号:11590780)的资助。

碳是宇宙中含量最丰富的元素之一,也是复杂多样的星际分子的重要组成部分。在星际冷暗云核中,碳主要以线性碳链分子的形式存在,如 HC_nN, C_nH, C_nS 分子等。这些高度不饱和分子不但与含碳化合物的形成和破坏有着密切的关系,而且还是

恒星形成研究中重要的化学探针。该研究团队此次探测到的丰富碳链分子包括 C₃S, HC₅N, HC₇N, HC₉N, C₆H, C₈H, 以及 HC₃N 和它的同位素分子 H¹³CCCN, HC¹³CCN, HCC¹³CN。得益于天马望远镜的高灵敏度和速度分辨率,有 9 条跃迁线首次在星际空间被探测到,2 条精细结构线首次被分解开。

他们研究发现,Serpens South 1A 中碳链分子的柱密度约为 10¹²—10¹³ cm⁻²,与 TMC-1 和 Lupus-1A 相当。因此,同 Lupus-1A 一样,这个源也属于“类 TMC-1 分子云”,Serpens South 也成为 Taurus 和 Lupus 外第三个探测到长碳链分子 HC₉N 和 C₈H 的分子云复合体。HC₃N 的同位素分子的丰度比 [H¹³CCCN]:[HC¹³CCN]:[HCC¹³CN]与 TMC-1 的观测结果类似,表明两个源中的长碳链分子可能具有类似的形成机制。

(供稿:数理科学部 刘强)