

· 研究进展 ·

## 我国科学家在肿瘤免疫治疗 新靶点研究方面取得重要进展

王璞玥\* 杨正宗 杜生明

(国家自然科学基金委员会生命科学部,北京 100085)

**[摘要]** 近年来,人们对于肿瘤免疫逃逸机制有了更为全面的认识,肿瘤免疫治疗成为继手术、放疗、化疗以后的第4种疗法。最近,国家杰青获得者许琛琦研究员课题组首次发现细胞的胆固醇代谢可以调控T细胞的抗肿瘤活性,并鉴定了肿瘤免疫治疗的新靶点——胆固醇酯化酶ACAT1以及相应的小分子药物前体,从脂代谢角度开辟了肿瘤免疫治疗基础研究的全新领域。

**[关键词]** T细胞;获得性免疫;肿瘤免疫治疗;胆固醇代谢

人体的免疫系统负责保卫机体健康,其中T淋巴细胞(简称T细胞)是获得性免疫系统中重要的功能细胞,负责识别抗原,并协同其他免疫细胞进行免疫应答<sup>[1]</sup>,然而肿瘤细胞能够通过多种机制抑制T细胞的抗肿瘤活性,从而逃逸免疫系统的攻击<sup>[2]</sup>。近年来,人们对于肿瘤免疫逃逸的细胞与分子机制有了较过去更为全面的认识,从而提出了阻断肿瘤诱导的免疫抑制的方法进行肿瘤治疗。著名学术期刊*Nature*在2014年11月同期发表了5篇论文,将肿瘤治疗的焦点转向免疫系统,正如其中一篇论文的作者伦敦大学玛丽女王学院肿瘤学家Thomas Powles所说:“我们在寻找非常不同的生物标记物模式,我们现在不再将焦点放在肿瘤细胞上,而是聚焦到肿瘤周围的免疫细胞。”免疫疗法的本质在于针对的不是癌症细胞,而是如何激活人体自身的免疫系统来治疗癌症,从而革命性的改变了治疗癌症的理念。肿瘤免疫疗法在理论上明显的优势:不直接损伤机体免疫,反而是增强免疫系统;可以治疗多种癌症,对较多患者有效;可以抑制癌细胞进化,从而降低复发率等。因此,肿瘤的免疫治疗被认为是继手术、放疗、化疗以后的第4种治疗方法,具有高响应率、高特异性等诸多优点,其前景被广泛看好。目前,基于T细胞的肿瘤免疫治疗已经取得较大的成功,如针对CTLA-4和PD-1这两个受体的抗体

药物已经进入临床应用,在部分黑色素瘤、肺癌、肾癌患者中显示了显著的治疗效果<sup>[3,4]</sup>,尤其对接受其他治疗无效的患者仍可诱导出较为持久的免疫应答,CTLA-4和PD-1抗体药物对其他肿瘤的治疗也在临床试验中。但不容忽视的是,这些针对免疫检验点的治疗方法仍面临许多难题。一方面,目前针对肿瘤抑制免疫检验点、降低免疫反应门槛研发的2种疗法PD-1和CTLA-4,它们的抗体并不是选择性地降低抗肿瘤免疫反应的激活门槛,也就是说机体正常的免疫反应也被过分激活,这样很有可能导致自身免疫性疾病,特别是CTLA-4,因为表达在重要的抗原递呈细胞上,抑制CTLA-4对正常的免疫反应影响更大,易引发“细胞因子风暴”。另一方面,针对肿瘤细胞特异性受体的免疫细胞(CAR-T)疗法,除了有炎症反应的风险,对于实体瘤的治疗效果不如淋巴瘤这样的松散细胞效果好,因为这些改造过的免疫细胞在实体瘤的抑制性环境中并不能最大效用地发挥功能。由于治疗存在很大的个体化差异,尤其是临床实验中很大一部分患者对针对T细胞的免疫检验点治疗仍不能响应,提示仍然需要开辟T细胞抗肿瘤免疫治疗新思路,以基于免疫检验点抑制剂的联合疗法来改善疗效并让更多的病人受益。

2014年度国家杰出青年科学基金获得者,中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所、分子生

收稿日期:2016-08-12;修回日期:2016-10-13

\* 通信作者,Email:wangpy@nsfc.gov.cn

物学国家重点实验室许琛琦研究员近年来在 T 细胞抗原受体(TCR)活化机制中取得了显著进展,在 *Nature*、*Cell* 等国际著名研究期刊上共发表论文多篇,论文多次被 *Cell*, *Faculty of 1000 Biology* 和 *Sci Signaling* 等作为研究亮点点评。近期,许琛琦研究员与李伯良研究员、刘小龙研究员等合作,综合运用免疫学、肿瘤学、生物化学、分子生物学和细胞生物学等多种技术手段开展交叉研究,在提高 T 细胞抗肿瘤免疫功能的研究方面取得重要进展,首次发现细胞的胆固醇代谢可以调控 T 细胞的抗肿瘤活性,并鉴定了肿瘤免疫治疗的新靶点——胆固醇酯化酶 ACAT1 以及相应的小分子药物前体,为开发新的肿瘤免疫治疗方法奠定了基础。

## 1 细胞胆固醇代谢对 CD8<sup>+</sup>T 细胞免疫效应有调节作用

最近,许琛琦课题组和国际上其他课题组都发现细胞质膜直接调控 T 细胞活化与功能,如在静息的 T 细胞中,细胞质膜中的酸性磷脂可以通过静电相互作用于 CD3 胞内区结合,从而将其酪氨酸磷酸化位点屏蔽于细胞质膜中,以维持 TCR 的静息状态,防止 T 细胞的自动活化;在活化的 T 细胞中,钙离子可以直接结合细胞质膜中的酸性磷脂,而中和其所带的负电荷,消除酸性磷脂和 CD3 胞内区之间的静电结合,引起酪氨酸磷酸化位点的暴露等<sup>[5,6]</sup>。胆固醇是细胞质膜的重要脂类分子,又是 TCR 成簇及 T 细胞活化所必需<sup>[7]</sup>,因此,他们首先探讨了 CD8<sup>+</sup>T 细胞的抗肿瘤免疫反应是否被胆固醇代谢过程所调控。

胆固醇代谢主要包括合成、运输、储存。胆固醇酯化是储存的主要形式。实验结果表明,在 CD8<sup>+</sup>T 细胞活化后,细胞的胆固醇代谢状况发生了显著变化,全细胞水平的胆固醇和细胞质膜胆固醇水平都明显上升,编码胆固醇合成及转运的基因表达水平也上调,而胆固醇流出的通路则被下调;他们还检测了胆固醇酯化反应相关基因——胆固醇酯化酶 *Acat1* 和 *Acat2* 的 mRNA 表达水平,当 CD8<sup>+</sup>T 细胞被活化时,在各组织器官普遍存在的 *ACT1* 基因<sup>[8]</sup>的 mRNA 水平在 6 小时内就迅速上升,而在肝脏和小肠特异性表达的 *ACT2* 基因的 mRNA 水平在 6 小时下降,24 小时后则显著上升。当使用 ACAT1/ACAT2 的抑制剂后,质膜上的游离胆固醇含量更高,CD8<sup>+</sup>T 细胞能分泌更多细胞毒性的颗粒酶和细胞因子,具有更高的细胞毒性;反之,当胆固

醇的生物合成通路或转移通路被抑制时,CD8<sup>+</sup>T 细胞分泌的颗粒酶和细胞因子都显著降低。经检测发现,CD8<sup>+</sup>T 细胞中的 *Acat1* 基因的 mRNA 水平是 *Acat2* 基因 mRNA 水平的 20 倍,CD8<sup>+</sup>T 细胞基本检测不到 *Acat2* 的蛋白。在 CD8<sup>+</sup>T 细胞里敲除 *Acat2* 不影响其功能,而抑制 *Acat1* 则显著增强其效应功能,提示 ACAT1 是 CD8<sup>+</sup>T 细胞的主要胆固醇酯化酶。

为了进一步揭示 ACAT1 作为胆固醇酯化酶,对 CD8<sup>+</sup>T 细胞效应功能的抑制作用,许琛琦课题组进一步制备了 T 细胞特异性的 *Acat1* 基因敲除小鼠(*Acat1CKO*)。小鼠体内实验表明,ACAT1 的缺失不影响小鼠胸腺发育和外周 T 细胞的平衡,大部分外周 T 细胞保持初始 T 细胞(CD62LhiCD44lo)状态。静息态下,野生型和 ACAT1 特异性敲除鼠的 CD8 记忆 T 细胞在细胞因子分泌等指标无差别;而当被激活时,*Acat1CKO* 小鼠的 CD8<sup>+</sup>T 细胞效应功能比野生型显著提高,同时,ACAT1 缺失能导致 CD8<sup>+</sup>T 细胞的增殖和存活率显著提高。为了验证 ACAT1 是否在体内免疫应答过程中调控 CD8<sup>+</sup>T 细胞效应,他们用单核细胞增生李斯特菌感染模型诱发体内 T 细胞强烈免疫反应,并发现 *AcatCKO* 小鼠比野生型小鼠的 CD8<sup>+</sup>T 细胞分泌更多  $\gamma$  干扰素,免疫应答更为强烈,导致血清中  $\gamma$  干扰素水平更高,而病毒载量更低。同时,*Acat1CKO* 小鼠和野生型小鼠相比,由 CD4<sup>+</sup>T 细胞分泌的  $\gamma$  干扰素基本持平,这也与之前的发现相吻合。他们进一步制备了 *Acat1CKO* OT-1TCR 转基因小鼠,检查 *Acat1CKO* 小鼠的 CD8<sup>+</sup>T 细胞对不同抗原的应答能力,发现 *Acat1CKO* 小鼠对强或弱的 OVA 抗原都有强于对照的免疫应答,而对自身抗原如 *Catnb* 或 *R4*<sup>[9]</sup>没有过度的免疫应答,对 *Acat1* 敲除小鼠血清的抗双链 DNA 免疫球蛋白以及  $\gamma$  干扰素水平检测都表明没有异常。因此抑制胆固醇酯化,增加细胞质膜的游离胆固醇在显著增强 CD8<sup>+</sup>T 细胞免疫效应的同时,并未导致自身免疫反应。

## 2 *Acat1CKO* 小鼠 CD8<sup>+</sup>T 细胞抗肿瘤免疫功能增强的细胞和分子机制

许琛琦课题组应用了两种肿瘤模型:皮肤黑色素瘤和肺癌,检测胆固醇酯化酶基因 *Acat1* 条件性敲除小鼠的 CD8<sup>+</sup>T 细胞对肿瘤发展及转移的抑制作用。黑色素瘤动物模型实验结果提示,*Acat1CKO* 小鼠的载瘤变小,存活期延长,在肿瘤发展早期(小鼠接

种 B16F10 黑色素瘤细胞后 7 天),引流淋巴结的 T 细胞活性检测表明 Acat1CKO 小鼠的 CD8<sup>+</sup> T 细胞活性更高,表达大量的 CD44 和分泌更多的  $\gamma$  干扰素;并且 CD8<sup>+</sup> T 细胞的数量也显著增加,有趣的是,PD-1 和 CTLA-4 这两个免疫抑制分子和免疫抑制性细胞(调节性 T 细胞, Treg)都不受 ACAT1 缺失的影响。在肺癌转移动物模型的研究表明, Acat1CKO 小鼠的肺部肿瘤数量减少,存活期延长。Acat1CKO 小鼠的肺组织浸润的 CD8<sup>+</sup> T 细胞比野生型小鼠活性更高。为了进一步验证 ACAT1 对 CD8<sup>+</sup> T 细胞功能的内在调节作用,他们在黑色素瘤模型小鼠中做了 T 细胞过继转移的肿瘤治疗实验,和野生型相比,来自 Acat1 CKO 小鼠的杀伤性 T 淋巴细胞显示了更强的抗肿瘤活性,肿瘤变得更小,受体小鼠的存活期显著延长。

由于在 Acat1CKO 小鼠中 CD8<sup>+</sup> T 细胞的细胞质膜胆固醇水平高于野生型,而 CD4<sup>+</sup> T 细胞质膜的胆固醇水平与野生型持平,提示细胞质膜的胆固醇水平是 Acat1CKO 小鼠 CD8<sup>+</sup> T 细胞效应功能显著增强的主要原因。由于胆固醇在 T 细胞受体(TCR)成簇过程所必须的,而 TCR 成簇又是 T 细胞活化和增殖的重要信号转导因素,他们应用超分辨率显微技术,发现在 Acat1CKO 小鼠中,初始 CD8<sup>+</sup> T 细胞和活化 CD8<sup>+</sup> T 细胞的 TCR 微簇都比野生型显著增大,增强了活性,但是不会改变对肿瘤抗原的亲和力。由于胆固醇是免疫突触的组成部分,免疫突触对 CD8<sup>+</sup> T 细胞极性分泌 T 细胞杀伤性颗粒酶从而特异性攻击抗原具有重要作用,他们进一步观察了 Acat1 CKO 小鼠免疫突触形成的影响。活细胞成像研究发现, ACAT1 缺失导致细胞膜 TCR 微簇向免疫突触中心的定向运动更迅速,在 Acat1CKO 小鼠的 CD8<sup>+</sup> T 细胞中,成熟的免疫突触结构更质密,形成更迅速,导致细胞毒性颗粒酶的极化和脱颗粒水平增强。因此,他们的假设得到了证实:胆固醇脱脂酶的缺失引起免疫突触更迅速而有效的形成是 ACAT1 缺失小鼠的 CD8<sup>+</sup> T 细胞效应能力增强的主要机制。

为了研究 Acat1 CKO 小鼠 CD8<sup>+</sup> T 细胞质膜的胆固醇水平升高的原因,他们检测了胆固醇代谢相关基因的表达水平,发现 ACAT1 基因缺失导致了初始和活化态 CD8<sup>+</sup> T 细胞胆固醇合成酶的信使 RNA(mRNA)水平降低,而胆固醇转运和流出的基因转录水平没有变化。因此, ACAT1 缺失不仅引起胆固醇从游离到胆固醇脂的量减少,而且还能引

发更多胆固醇分子的合成,从而使得细胞质膜的胆固醇含量更高。而当他们用甲基- $\beta$ -环糊除细胞质膜的胆固醇后,发现 CD8<sup>+</sup> T 细胞的效应功能被破坏了;反之,如果用甲基- $\beta$ -环糊包被的胆固醇补充细胞质膜的胆固醇, CD8<sup>+</sup> T 细胞的效应功能则显著增强。甲基- $\beta$ -环糊包被的胆固醇处理的细胞并不改变 TCR 的数目,但是显著地提高了 TCR 成簇和信号转导。这些结果进一步强调了细胞质膜胆固醇水平的升高是 Acat1 CKO 小鼠的 CD8<sup>+</sup> T 细胞功能增强的重要原因。

他们进一步研究了 *Acat1* 缺失对细胞的能量代谢是否有显著影响。发现糖酵解、氧化磷酸化和脂肪酸氧化这几项基本细胞生物化学代谢指标在 Acat1 CKO 和野生型小鼠中都没有明显变化。对 Acat1CKO 小鼠 CD8<sup>+</sup> T 细胞到二级淋巴结的归巢情况的研究发现,细胞表面表达趋化因子受体 CCR7 和 CD62L 的水平不受影响。混合注射野生型小鼠和 Acat1CKO 小鼠的 CD8<sup>+</sup> T 细胞至携带黑色素瘤小鼠体内, Acat1CKO 小鼠的细胞在血液和二级淋巴器官有略高的比例,这很有可能是因为 Acat1CKO 小鼠的 CD8<sup>+</sup> T 细胞存活率比较高。他们还检测了 Acat1CKO 小鼠的 CD8<sup>+</sup> T 细胞归巢至肿瘤浸润的淋巴结与非肿瘤浸润的淋巴结,发现二者没有显著差异。

### 3 ACAT1 抑制剂作为肿瘤免疫治疗的可能药物靶点

阿伐麦布(Avasimibe)是一个小分子药物,具有较高的安全性,在 III 期临床试验中曾用于治疗动脉粥样硬化,在动物模型里被用来治疗老年痴呆症<sup>[10,11]</sup>。作为 ACAT1 的抑制剂,阿伐麦布在体外能增强 CD8<sup>+</sup> T 细胞的效应功能,由于阿伐麦布处理不影响黑色素瘤细胞的活性,说明此小分子并不直接作用于肿瘤细胞。许琛琦等人发现,经阿伐麦布处理后, CD8<sup>+</sup> T 细胞质膜的胆固醇水平显著上升, TCR 成簇、信号及免疫突触形成都明显增强。他们继而黑色素瘤载瘤小鼠多次腹腔注射阿伐麦布,发现阿伐麦布处理的小鼠表现出与 Acat1CKO 小鼠相同的表型:肿瘤生长被抑制;存活期得到了延长;肿瘤浸润的 CD8<sup>+</sup> T 细胞数量增多、增值能力增强、效应功能增大;效应 CD8<sup>+</sup> T 细胞/效应记忆 CD8<sup>+</sup> T 细胞的比例显著上升,而中枢记忆细胞群体没有变化。他们还发现,阿伐麦布处理增高了 CD8<sup>+</sup> T 细胞表面的 T 细胞受体水平,但不影响免



疫检验点受体的水平,而且肿瘤微环境中的调节性T细胞和髓系来源的免疫抑制细胞水平保持不变。

他们继续检测阿伐麦布和抗PD-1抗体联合疗法的效果,发现联合治疗在抑制肿瘤生长和延长小鼠存活率方面都优于单独疗法。阿伐麦布单独治疗对PD-1hi和PD-1lo两个类群的CD8<sup>+</sup>T细胞效应都有促进作用,而抗PD-1抗体单独治疗明显的增加了肿瘤浸润的CD8<sup>+</sup>T细胞分泌的 $\gamma$ 干扰素,但不影响Acat1及其他胆固醇脂化酶基因的转录水平。这些数据表明阿伐麦布和抗PD-1抗体可通过不同的途径抑制肿瘤,联合应用对肿瘤免疫治疗效果产生叠加作用。此外,阿伐麦布在Lewis肺癌模型中也有显著的抗肿瘤效果。进一步,应用人类CD8<sup>+</sup>T细胞系,他们发现阿伐麦布能增强细胞因子的分泌,提示此药物对人类CD8<sup>+</sup>T细胞有效。

#### 4 小结与展望

许琛琦课题组从调控T细胞胆固醇代谢出发,为肿瘤免疫治疗提供了崭新的视角。活化的CD8<sup>+</sup>T细胞的胆固醇代谢发生重编程,会合成更多的游离胆固醇来助力细胞的快速增殖。这项工作的发现表明抑制一个重要胆固醇脂化酶ACAT1活性能上调CD8<sup>+</sup>T细胞质膜的胆固醇水平,从而增强T细胞受体成簇信号以及形成更多免疫突触。继而,细胞因子和细胞毒性颗粒酶的产生、对肿瘤的杀伤和CD8<sup>+</sup>T细胞的增殖都显著上升(如图1所示)。以前有报道抑制ACAT1的小分子药物对心血管疾病和神经退行性疾病有治疗作用<sup>[12]</sup>,研究人员此次发现抑制ACAT1对肿瘤免疫治疗有明显作用,并且可以作为免疫检验点治疗的辅助手段,与抗PD-1抗体联合使用,从胆固醇代谢机制的角度增强免疫治疗的效果。

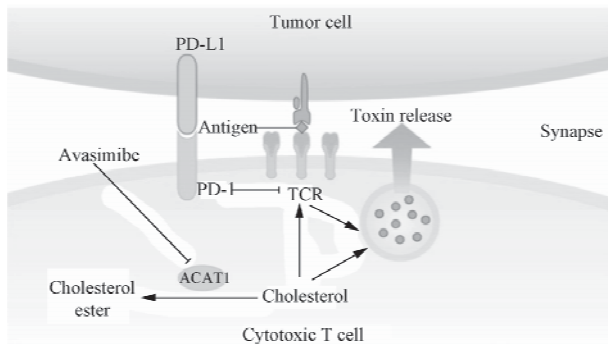


图1 抑制胆固醇脂化酶ACAT1,阻断细胞质膜胆固醇代谢,增加游离胆固醇含量,能增强CD8<sup>+</sup>T细胞对肿瘤的杀伤效应

本研究从调控T细胞代谢的角度探讨肿瘤免疫新机制,开辟了肿瘤免疫治疗研究的一个全新领域<sup>[13,14]</sup>,一方面由于T细胞信号转导往往通过影响代谢发挥作用,基于代谢调控的方法更为直接且更具广谱性;另一方面,基于T细胞代谢调控的方案不仅可应用于晚期肿瘤治疗,还适应于早期干预,亦可用于现有针对免疫检验点疗法的补充。国际上的同类研究还处于起步阶段,本研究揭示了细胞脂类代谢对肿瘤免疫应答起到关键调控作用,同时发现了ACAT1这一新的药物靶点,提示ACAT1小分子抑制剂的应用前景,为肿瘤免疫治疗新思路与新方法提供了理论基础。研究成果以“通过调节胆固醇代谢增强CD8<sup>+</sup>T细胞的抗肿瘤反应”(Potentiating the antitumour response of CD8<sup>+</sup>T cells by modulating cholesterol metabolism)为题,于2016年3月17日在线发表于国际顶尖学术期刊*Nature*<sup>[15]</sup>,得到广泛关注,许琛琦研究员受邀为国际权威综述期刊*Nat Rev Immunol*撰写综述,总结膜脂分子对T细胞免疫的调控机制。

#### 参 考 文 献

- [1] Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*, 2011, 480: 480—489.
- [2] Tumeh P, Harview C, Yearley J, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*, 2014, 515: 568—571.
- [3] Yao S, Zhu Y, Chen L. Advances in targeting cell surface signaling molecules for immune modulation. *Nature Rev. Drug Discov.* 2013, 12: 130—146.
- [4] Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science*, 2015, 348: 56—61.
- [5] Xu C, Gagnon E, Call ME, et al. Regulation of T cell receptor activation by dynamic membrane binding of the CD3 $\epsilon$  cytoplasmic tyrosine-based motif. *Cell*, 2008, 135: 702—713.
- [6] Shi X, Bi Y, Yang W, et al. Ca<sup>2+</sup> regulates T-cell receptor activation by modulating the charge property of lipids. *Nature*, 2013, 493: 111—115.
- [7] Chang T, Chang C, Ohgami N, et al. Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006, 22: 129—157.
- [8] Pal P, Gandhi H, Giridhar R, et al. ACAT inhibitors: the search for novel cholesterol lowering agents. *Mini Rev Med Chem.* 2013, 13: 1195—1219.
- [9] Joyce J, Fearon T. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor micro environment. *Science*, 2015, 348: 74—80.
- [10] Chang T, Li B, Chang C, et al. Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferases. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009, 297: E1—E9.
- [11] Pal P, Gandhi H, Giridhar R, et al. ACAT inhibitors: the search for novel cholesterol lowering agents. *Mini Rev Med Chem.* 2013, 13: 1195—1219.
- [12] Huttunen HJ, Kovacs DM. ACAT as a drug target for Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis.* 2008, 5: 212—214.

- [13] Page D, Postow M, Callahan M, et al. Immune modulation in cancer with antibodies. *Annu Rev Med.* 2014, 65:185—202.
- [14] Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science.* 2015, 348: 69—74.
- [15] Yang W, Bai Y, Xiong Y, et al. Potentiating the antitumor response of CD8<sup>+</sup> T cells by modulating cholesterol metabolism. *Nature.* 2016, 531: 651—655.

### Progress in T cell anti-tumor immunity study

Wang Puyue Yang Zhengzong Du Shengming

(Department of Life Sciences, National Natural Science Foundation of China, Beijing 100085)

**Abstract** In recent years, people are getting more comprehensive understandings on tumor immune escape mechanism. Therefore tumor immunotherapy has become the fourth therapy strategy following surgery, radiotherapy and chemotherapy. Recently, Dr. Xu Chenqi's group reported an exciting discovery that through cholesterol metabolism the antitumor activity of T cells was up regulated. A novel tumor immunotherapy drug precursor of cholesterol esterification enzyme ACAT1 was identified. This work has opened up a new field of cancer immunotherapy research from the angle of lipid metabolism.

**Key words** T cells; acquired immunity; tumor immunity; cholesterol metabolism

· 资料信息 ·

## 我国学者揭示大肠杆菌抵抗酸刺激新机制

北京大学化学与分子工程学院陈鹏课题组利用新开发的“比较蛋白质组学”技术,揭示了大肠杆菌抵抗酸刺激的新机制。相关研究成果近期以“Comparative proteomics reveal distinct chaperone-client interactions in supporting bacterial acid resistance(比较蛋白质组学技术揭示细菌抗酸伴侣蛋白的独特底物)”为题在《美国科学院院刊》发表(论文链接:<http://www.pnas.org/content/early/2016/09/09/1606360113>)。该研究得到了国家自然科学基金项目(项目批准号:2152100005,212250022,913133006)等资助。

肠道病原微生物独特的抗酸机制使得它们能够顺利通过人体胃液的强酸环境,进而在肠道造成感染甚至导致人体死亡。HdeA 和 HdeB 是目前在这些病原微生物膜间质内发现的唯一一套抗酸伴侣系统,在许多肠道菌中高度保守。因此,研究它们抵御强酸环境的机制有助于我们更好地理解这些致病菌与宿主之间的作用关系。另外,HdeA 和 HdeB 是典型的“条件无序”分子伴侣蛋白,利用无序结构与多种不同的底物蛋白质相互作用以发挥功能,对它们的研究也能帮助我们更好的理解蛋白质无序结构与功能之间的关系。该课题组一直致力于抗酸伴侣蛋白底物的捕捉与研究。2011年,他们与北京大学生命科学院昌增益课题组合作,开发了一种遗传编码的蛋白质光交联探针 DiZPK,并以大肠杆菌为模型,成功地捕获并鉴定了 HdeA 的底物蛋白,揭示了细菌在抵御酸胁迫过程中独特的分子伴侣协作机制(*Nat. Chem. Biol.* 2011, 7: 671—677)。

为进一步揭示 HdeA 和 HdeB 这两个看似冗余的分子伴侣如何相互合作以及在保护大量不同底物蛋白的同时避免非特异性结合的机制,陈鹏课题组将新一代的可切割型光交联探针 DiZSeK 与荧光差异双向凝胶电泳(2D-DIGE)相结合,发展了一种名为 CAPP-DIGE 的“比较蛋白质组学”的策略,实现了 HdeA 与 HdeB 整个底物蛋白组的直接比较和鉴定。研究表明,HdeA 与 HdeB 在活细胞条件下对底物蛋白表现出明显的差异。研究人员进一步发现,这种差异性来源于二者对酸刺激的不同响应,使得 HdeA 和 HdeB 分别保护了对酸刺激耐受性不同的底物蛋白组。在酸回复过程中,他们发现底物在被分子伴侣释放时也是受 pH 调控的,且这种 pH 调控的底物释放过程保证了底物在酸回复过程中的有效重折叠。综合以上研究结果,他们提出了细菌抵御酸胁迫过程中 pH 对分子伴侣底物特异性的调控机制,即 pH 通过系统性地调控 HdeA、HdeB 以及底物蛋白的折叠状态和功能,让分子伴侣蛋白在不同条件下逐步激活、协同分工保护不同的客户蛋白,同时保证了底物蛋白在被释放后有效地进行重折叠。这一模型为细菌抵抗酸刺激提供了一种高效、经济、灵活和协调的蛋白质质量控制策略。该调控机制很可能也适用于其他的条件无序分子伴侣系统,而这一新开发的 CAPP-DIGE 技术对于利用蛋白质组学鉴定和比较动态条件下的蛋白-蛋白相互作用及其变化都有着广阔的应用前景。

(供稿:化学科学部 郑企雨 张艳 陈拥军)