

• 医药生物技术 •

## N-糖基化修饰对热休克蛋白 gp96 免疫学功能的影响

郭鹏<sup>1,2</sup>, 李长菲<sup>1,2</sup>, 鞠莹<sup>1,2</sup>, 刘二龙<sup>3</sup>, 张含<sup>1,2</sup>, 胡俊<sup>4</sup>, 孟颂东<sup>1,2</sup>

1 中国科学院微生物研究所 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

2 中国科学院大学, 北京 100049

3 北京热体生物技术有限公司, 北京 100123

4 北京康明海慧生物科技有限公司, 北京 100101

郭鹏, 李长菲, 鞠莹, 等. N-糖基化修饰对热休克蛋白 gp96 免疫学功能的影响. 生物工程学报, 2021, 37(11): 4036-4046.

Guo P, Li CF, Ju Y, et al. N-glycosylation modification of heat shock protein gp96 affects its immunological function. Chin J Biotech, 2021, 37(11): 4036-4046.

**摘要:** 文中旨在以 N-糖基化位点突变的重组热休克蛋白 gp96 为对象, 研究 N-糖基化修饰对其免疫功能的影响。首先利用昆虫表达系统表达野生型和突变型 gp96 蛋白, 并检测其糖基化水平。进一步通过体外和体内实验, 利用流式细胞术和酶联免疫吸附试验 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测小鼠 CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T 细胞亚群和 IFN- $\gamma$  的分泌, 查明糖基化对 gp96 抗原呈递功能的影响, 进一步用 ATPase 试剂盒检测 gp96 的 ATPase 活性。最后通过小鼠免疫实验探究糖基化对 gp96 疫苗佐剂功能和活化流感疫苗特异性 T 细胞的影响。结果显示, N-糖基化修饰位点突变后, 重组 gp96 蛋白总含糖量下降了 27.8%。与野生型重组蛋白相比, 突变 gp96 的抗原呈递能力减弱, 同时 ATPase 活性明显降低。同时与野生型重组 gp96 相比, 突变 gp96 佐剂活化流感疫苗特异性 T 细胞水平也明显减少。这些结果表明, N-糖基化修饰参与调节 gp96 的 ATPase 活性和抗原呈递功能, 进而影响其疫苗佐剂功能, 为开发基于 gp96 的佐剂疫苗提供了依据。

**关键词:** 热休克蛋白 gp96, N-糖基化修饰, 佐剂, ATPase, 抗原呈递

**Received:** December 10, 2020; **Accepted:** February 3, 2021

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 81761128002, 81621091, 81871297, 81672815, 31700803), Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (No. XDB29040000), One Belt and One Road International Science and Technology Cooperation of Chinese Academy of Sciences (No. 153211KYSB20170001).

**Corresponding author:** Songdong Meng. Tel: +86-10-64807350; E-mail: mengsd@im.ac.cn

国家自然科学基金 (Nos. 81761128002, 81621091, 81871297, 81672815, 31700803), 中国科学院 B 类先导项目 (No. XDB29040000), 中国科学院“一带一路”科技合作专项 (No. 153211KYSB20170001) 资助。

网络出版时间: 2021-02-22

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210222.1510.002.html>

# N-glycosylation modification of heat shock protein gp96 affects its immunological function

Peng Guo<sup>1,2</sup>, Changfei Li<sup>1,2</sup>, Ying Ju<sup>1,2</sup>, Erlong Liu<sup>3</sup>, Han Zhang<sup>1,2</sup>, Jun Hu<sup>4</sup>, and Songdong Meng<sup>1,2</sup>

1 CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 Heat Shock Biotechnology Co., Ltd., Beijing 100123, China

4 Cominghealth Biotechnology Co., Ltd., Beijing 100101, China

**Abstract:** N-glycosylation modification, one of the most common protein post-translational modifications, occurs in heat shock protein gp96. The purpose of this study is to investigate the effect of N-glycosylation modification on immunologic function of the recombinant gp96 using the mutant gp96 in N-glycosylation sites. Firstly, wild-type and mutant gp96 proteins were expressed by insect expression system and their glycosylation levels were detected. To determine the effect of N-glycosylation on gp96 antigen presentation function, the IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in gp96-immunized mice and secretion level of IFN- $\gamma$  were examined by flow cytometry and ELISA. The ATPase activity of gp96 was further detected by the ATPase kit. Finally, the effect of N-glycosylation on adjuvant function of gp96 for influenza vaccine was investigated in immunized mice. It was found that total sugar content of mutant recombinant gp96 was reduced by 27.8%. Compared to the wild type recombinant gp96, mutations in N-glycosylation sites resulted in decreased antigen presentation ability and ATPase activity of gp96. Furthermore, influenza vaccine-specific T cell levels induced by mutant gp96 as adjuvant were dramatically reduced compared to those by wild type recombinant gp96. These results demonstrate that N-glycosylation modification is involved in regulation of ATPase activity and antigen presentation function of gp96, thereby affecting its adjuvant function. The results provide the technical bases for development of gp96- adjuvanted vaccines.

**Keywords:** heat shock protein gp96, N-glycosylation modification, adjuvant, ATPase, antigen presentation

热休克蛋白 gp96 (Glycoprotein 96, 糖蛋白 96) 是 HSP90 家族的成员, 又称为 HSP90B1、内质酶和 GRP94 (Glucose-regulated protein 94, 糖调控蛋白 94)<sup>[1]</sup>。gp96 是一种遗传单态性分子, 在种属之间氨基酸序列高度保守。gp96 蛋白包含 4 个结构域: N 端结构域、连接域 (Linker domain, LD)、中间结构域 (Middle domain, MD) 和 C 端结构域。其中 N 端包括核苷酸结合域以及多肽结合位点, 酸性区包含至少一个高亲和力的钙结合位点<sup>[2]</sup>, 调节蛋白的相互作用。C 端包括多肽结合位点、客户端蛋白结合区 (Client protein binding domain) 以及二聚化域<sup>[3]</sup>, 此外 C 端还具有内质网 (Endoplasmic reticulum, ER) 腔定位滞留信号 KDEL 序列 (Lys-Asp-Glu-Leu)。gp96 具有一定 Mg<sup>2+</sup> 依赖的 ATPase 活性, 其对于 gp96 构象改

变、底物释放和客户蛋白成熟起重要作用。研究发现抗原肽与 gp96 分子以 ATP 依赖的方式结合, 利用 gp96 的 ATPase 活性水解 ATP 释放能量, 使 gp96 结合的抗原肽经加工修剪后转移到 MHC I 类分子, 供 CD8<sup>+</sup> T 细胞识别<sup>[4-5]</sup>。

gp96 是真核细胞内质网中最丰富的糖蛋白<sup>[6]</sup>, 作为分子伴侣有促进蛋白质正确折叠以及在内质网中的质量控制等功能。研究表明, gp96 在天然免疫和获得性免疫中都发挥着重要的作用。在天然免疫中, gp96 能通过 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 信号通路活化 NF- $\kappa$ B 信号通路, 促进免疫细胞分泌细胞因子<sup>[7]</sup>; 可诱导巨噬细胞和树突状细胞生成一氧化氮 (Nitric oxide, NO) 合成酶, 进而合成 NO<sup>[8]</sup>。在获得性免疫中, 一方面 gp96 可诱导树突细胞 (Dendritic cell, DC) 成

熟, 增强 DC 的抗原呈递能力<sup>[9]</sup>; 另一方面 gp96 可以与病毒或肿瘤抗原肽结合<sup>[10-11]</sup>, 形成复合物, 通过抗原呈递细胞 (Antigen presenting cell, APC) 表面的受体 CD91 等内吞进入细胞, 交叉呈递到 MHC I 类分子<sup>[12]</sup>, 刺激机体产生特异性抗肿瘤或抗病毒的多个和多种细胞毒性 T 淋巴细胞 (Cytotoxic T lymphocyte, CTL) 克隆以及产生长期记忆的抗肿瘤或抗病毒的 T 细胞, 杀伤肿瘤和病毒感染的细胞, 并有效防止免疫逃逸<sup>[13-18]</sup>。

作为糖蛋白, 除了 O-糖基化外, gp96 有 6 个潜在的 N-糖基化位点 Asn62、Asn107、Asn217、Asn445、Asn481 和 Asn502<sup>[1]</sup>。N-糖基化主要是糖链在内质网和高尔基体中通过与 gp96 中特定的天冬酰胺 (N-X-S/T) 连接的翻译后修饰。在 T 细胞中, N 聚糖修饰通过改变 T 细胞受体的聚集或信号传导, 以及细胞表面一些分子的定位, 比如 CD4、CD8 和细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4), 来调节发育、生长、分化和自身免疫<sup>[19]</sup>。1994 年有研究报道, gp96 只有第 217 位的天冬酰胺被正常糖基化修饰, 而第 445、481、502 位是 gp96 高度糖基化修饰的位点, 这两种糖基化形式是由 gp96 的 N 端决定的, 并且 N-糖基化修饰可能改变 gp96 的折叠方式<sup>[1,20-21]</sup>。随后 Suriano 等发现不同肿瘤组织中的 gp96 的单糖含量不同, 而且 gp96 的糖基化修饰与细胞的转化和癌症的进程密切相关<sup>[22]</sup>。后来有研究发现, gp96 会依赖钙离子和 N 糖基化修饰的方式促进 TLR4 和 TLR9 蛋白的加工、成熟, 并且 TLR4 和 TLR9 会优先结合高度 N-糖基化修饰的 gp96<sup>[23]</sup>。

目前为止没有直接证据证实糖基化修饰能影响 gp96 的免疫学功能。笔者实验室前期利用汉逊酵母和昆虫细胞成功表达了具有免疫学功能的重组 gp96<sup>[16,24-25]</sup>, 发现重组的 gp96 与天然组织来源的 gp96 的糖含量有明显的差异。鉴于有文献报道提示 N-糖基化可能对 gp96 的功能产生影响<sup>[1,22]</sup>,

因此, 本研究进一步探究 N-糖基化修饰对 gp96 免疫学功能的影响, 包括对 ATP 酶活力、抗原交叉呈递和佐剂功能的影响, 这将为设计基于 gp96 的佐剂疫苗和药物提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养、多肽及其他试剂

小鼠腹腔巨噬细胞、脾脏淋巴细胞在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中培养, 培养基中添加了 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的硫酸链霉素和 100 U/mL 氨苄青霉素。

K<sup>b</sup> 限制性表位 OVA8 (SIINFEKL) 以及 OVA20 (SGLEQLESIINFEKLTWEWS)、K<sup>d</sup>-限制性表位 NP<sub>147-155</sub> (TYQRTRALV), 由金斯瑞生物科技股份有限公司化学合成, 其纯度均大于 95%。实验所用 H1N1 流感裂解疫苗原液, 不含任何佐剂及其他辅助成分, 由北京科兴生物制品有限公司 (Sinovac Biotech) 提供, 疫苗毒株源自 NYMC X-179A。

PerCP-Cy5.5-conjugated anti-mouse CD3、PE-conjugated anti-mouse CD8、APC-conjugated anti-mouse IFN- $\gamma$  购自 eBioscience, 用于流式检测; ELISPOT 试剂盒购自 BD; gp96 抗体购自 Santa Cruz, 用于 Western blotting。

### 1.2 N-糖基化位点突变设计

将 6 个潜在的 N-糖基化位点的天冬酰胺氨基酸序列 (AAC/T) 突变为天冬氨酸序列 (GAC/T), 序列与 pFast Bac1 载体连接形成重组质粒, 进行后续实验。

### 1.3 gp96 蛋白的制备及 Western blotting 鉴定

利用 Bac-to-Bac<sup>®</sup> 杆状病毒表达系统表达重组 gp96 (Recombinant gp96, rgp96) 和 N-糖基化位点突变 gp96 (Mutant gp96, mgp96)。同时提取胎盘中的天然 gp96 蛋白 (Natural gp96, ngp96), 上述 3 种蛋白经离子交换、亲和层析纯化后<sup>[26]</sup>, 进一步进行 SDS-PAGE, 并通过 Western blotting

进行鉴定。纯化后的蛋白进行内毒素检测,结果显示蛋白样品中内毒素浓度低于 10 EU/mg,可以用于免疫。

#### 1.4 gp96 蛋白的糖染鉴定和糖含量测定

利用糖蛋白染色试剂盒 (Thermo Fisher Scientific, USA) 对不同来源的 gp96 蛋白按照说明书进行糖染色鉴定。利用苯酚-硫酸法对糖蛋白的糖含量进行定量分析,向含有 1 mL 葡萄糖对照品和样品的试管中加入 0.6 mL 6% 苯酚溶液,混匀,迅速加入 3 mL 浓硫酸,混匀,置沸水浴中反应 20 min。显色后冷却至室温,在波长 490 nm 处测定吸光度值<sup>[27]</sup>。

#### 1.5 gp96 蛋白的 ATPase 活性测定

利用 Transcreeper<sup>®</sup>ADP<sup>2</sup> FI 检测试剂盒 (Sigma, Germany) 检测 ATPase 的活力,该试剂盒以竞争性荧光免疫分析法为基础,ATPase 活性越强,测量到的荧光偏振值越低。首先加入 10 μmol/L 的 ATP 与不同浓度的 gp96 反应,终体积是 10 μL,37 °C 孵育 1.0–1.5 h,加入 10 μL ADP 检测混合物 (ADP<sup>2</sup> antibody, ADP alexa fluor\*633 tacer, 1X stop & detect buffer B, 水),室温孵育 1 h 后进行检测。

#### 1.6 小鼠免疫

6–8 周的雌性 BALB/c 及 C57BL/6 小鼠购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司,饲养于中国科学院微生物研究所 SPF 级实验动物中心。每组 5 只小鼠,在 C57BL/6 或 BALB/c 小鼠第 6、7、9 周龄时进行皮下免疫,共 3 次。每次免疫时,多肽 (OVA20、OVA8、NP<sub>147–155</sub>) 免疫剂量为 50 μg/只, H1N1 裂解病毒疫苗免疫剂量为 1.5 μg HA/只, 3 种不同 gp96 蛋白均为 20 μg/只。每次免疫前将抗原与 gp96 蛋白在 50 °C 条件下孵育 10 min,然后室温静置 30 min,以形成 gp96-肽复合物<sup>[16]</sup>。三次免疫完成后,一般在 2–4 d 内处死小鼠进行实验。

#### 1.7 IFN-γ EISPOT 分析

使用 ELISPOT (Enzyme linked immunospot assay, 酶联免疫斑点实验) 试剂盒检测 3 种 gp96 激活抗原特异性 T 细胞分泌 IFN-γ 的能力。实验分为 5 组,每组 5 只小鼠。每只小鼠分别设置阴性孔、阳性孔和实验孔。以牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 处理的 T 细胞为阴性孔,以 CD3、CD28 抗体处理的 T 细胞为阳性孔,以 20 μg/mL 疫苗处理的 T 细胞作为实验孔。根据 ELISPOT 检测试剂盒说明书 (BD-Pharmingen, San Diego, CA) 检测抗原特异性的 T 细胞应答。

#### 1.8 流式染色分析

取  $2 \times 10^6$  个脾脏淋巴细胞,体外经过 20 μg/mL 的 NP<sub>147–155</sub> 肽或 H1N1 流感病毒裂解疫苗刺激 5 d 后,用磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffered saline, PBS) 洗 2 次,用含 1% BSA 的 PBS 封闭 30 min,加 PerCP-Cy5.5-conjugated anti-mouse CD3、PE-conjugated anti-mouse CD8, 4 °C 避光孵育 30 min, PBS 清洗,每管加入等体积 100 μL 固定/破膜剂 (eBioscience), 4 °C 孵育 20 min,后用清洗剂 (eBioscience) 清洗 2 次,在 100 μL 体系中加入 APC-conjugated anti-mouse IFN-γ, 4 °C 避光孵育 30 min,清洗剂清洗 2 次,用流式细胞仪 (FACS Calibur, BD, USA) 检测。

#### 1.9 抗原呈递实验

##### 1.9.1 体外抗原呈递

选取 6–8 周雌性未做任何处理的 C57BL/6 小鼠,按照之前描述的实验方法提取腹腔巨噬细胞<sup>[28]</sup>,取  $5 \times 10^4$  个腹腔巨噬细胞铺于 96 孔板,加入终浓度 10 ng/mL OVA20 和 8 μg/mL gp96 的复合物,形成条件具体见 1.6,刺激 2 h,洗去多余的复合物,加入  $1 \times 10^5$  个 OVA8 肽特异性 T 细胞。37 °C 孵育 48 h,收取上清,使用 ELISA 试剂盒 (eBioscience) 检测 IFN-γ 水平。

##### 1.9.2 体内抗原呈递

利用 NP<sub>147–155</sub> 肽联合 3 种 gp96 蛋白免疫小鼠

3次, 3免后 2–4 d 内取小鼠脾脏淋巴细胞, 在体外用 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 NP<sub>147–155</sub> 肽刺激培养 5 d 后, 通过流式细胞术分析特异性 IFN- $\gamma^+$  T 细胞的比例。

## 2 结果与分析

### 2.1 天然和重组 gp96 的 N-糖基化修饰位点的预测和分析

有研究报道称 gp96 有 6 个潜在的 N-糖基化位点, 分别位于蛋白第 62、107、217、445、448、502 位天冬酰胺 (Asn, N) (图 1)。在北京百泰派克生物科技有限公司对 gp96 蛋白进行糖基化位点检测, 通过酶切、液质联用 (LC-MS/MS) 等技术检测分析了天然提取的 gp96 (ngp96) 和昆虫细胞表达的重组 gp96 (rgp96) 这两种蛋白的糖基化位点, 结果表明, ngp96 有 5 个 N-糖基化位点, 分别为第 62、217、445、481、502 位氨基酸残基; rgp96 有 3 个明显的 N-糖基化位点, 分别为第 107、217、481 位氨基酸残基, 这 6 个氨基酸位点全是天冬酰胺 (表 1), 从而确定了 gp96 的 N-糖基化

位置在这 6 个氨基酸位点上。

### 2.2 重组 gp96 表达、鉴定以及糖含量测定

将 6 个潜在 N-糖基化位点的天冬酰胺突变为天冬氨酸 (Asp, D) (AAC/T 突变为 GAC/T) (图 2A), 利用昆虫系统表达野生型 gp96 (rgp96) 和突变 gp96 (mgp96), 同时提取天然组织 ngp96 作为对照。将 gp96 蛋白纯化后通过 10% 的 SDS-PAGE 分离, 进行考马斯亮蓝染色, 对染色条带进行扫描分析 gp96 纯度在 95% 以上, 通过 Western blotting 对 ngp96、rgp96 和 mgp96 蛋白进行鉴定 (图 2B)。进一步利用糖蛋白特异性显色反应对 gp96 蛋白的糖含量进行初步分析, 结果显示, rgp96 和 mgp96 的糖含量相对较少 (图 2C)。后利用苯酚-硫酸法对野生型与突变重组 gp96 蛋白的糖含量进行了定量分析, 发现与野生型重组蛋白相比, 突变重组 gp96 糖含量下降 27.8%, 有显著性差异 ( $P < 0.01$ ) (图 2D), 以上结果说明, 糖基化位点突变成功, mgp96 蛋白的糖基化修饰水平降低。

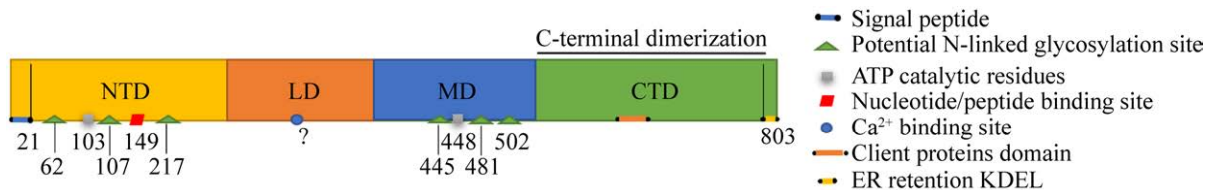


图 1 gp96 的结构域及潜在 N-糖基化位点

Fig. 1 Structure of gp96 domains and the potential N-glycosylation sites. There are 6 predicted N-glycosylation sites, which are asparagines at amino acid position 62, 107, 217, 445, 448, and 502 located at the C- and N-terminals. The ATP binding site is located at Asp149 of the N-terminal. One catalytic residue is located at Glu103 of the N-terminal and another is at Arg448 of the middle domain. Besides, the ER retention signal KDEL and a client proteins domain are at the C-terminal.

表 1 天然提取和重组表达 gp96 的 N-糖基化位点检测结果

Table 1 N-glycosylation sites of natural gp96 and recombinant gp96

Sources of gp96	Amino acid sequences (N-linked glycosylation sites)					
Predicted amino acid sites	DGLNASQ (62)	LISNASD (107)	KHNNDTQ (217)	LPLNVS R (445)	DKYNDTF (481)	DHSNRTR (502)
ngp96	Y	N	Y	Y	Y	Y
rgp96	N	Y	Y	N	Y	N

Note: the red letter represents the N-glycosylation site. "Y" or "N" means that this site is or is not a N-glycosylation site.

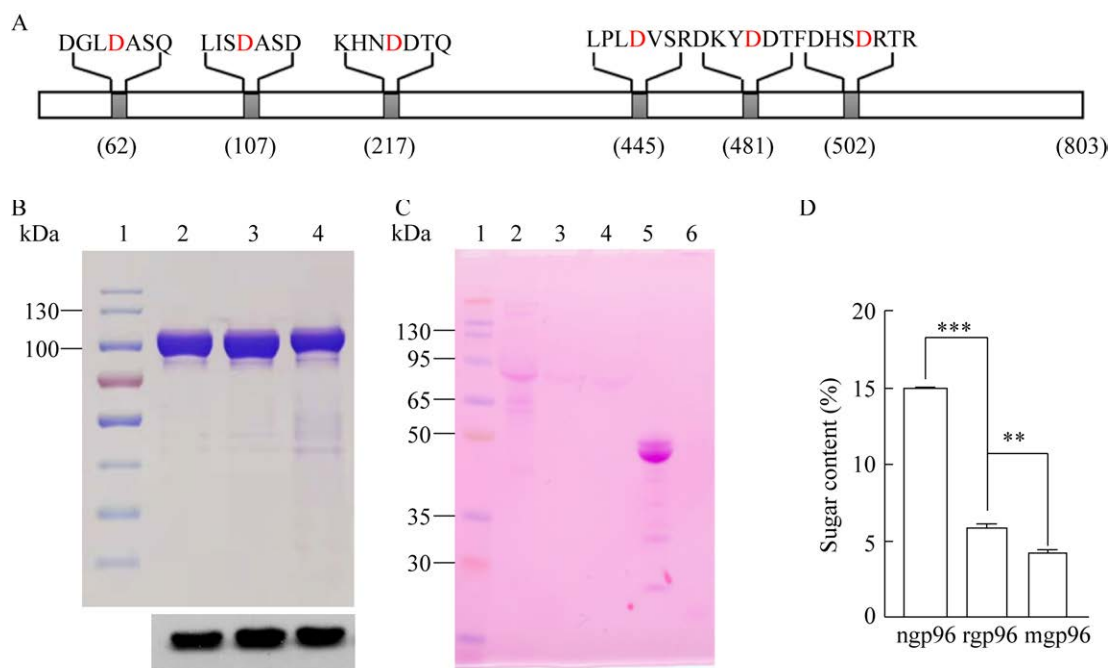


图 2 重组 gp96 蛋白的表达与鉴定

Fig. 2 Expression and identification of recombinant gp96. (A) The asparagine of six N-glycosylation sites within gp96 were mutated to aspartic acid (shown in red). (B) Recombinant gp96 preparations expressed by baculovirus expression system were subjected to 10% SDS-PAGE, and stained with Coomassie blue (upper) and detected by Western blotting with anti-gp96 antibody (lower) (lane 2, 3, 4 represent natural gp96 (ngp96), recombinant gp96 (rgp96) and mutant recombinant gp96 (mgp96), respectively). (C) Protein samples were subjected to SDS-PAGE while sugar content was analyzed by using glycoprotein staining kit (lane 1, 2, 3, 4 represents molecular marker, ngp96, rgp96, mgp96, respectively). Horseradish peroxidase (lane 5) and soybean trypsin inhibitor (lane 6) were used as positive and negative controls, respectively). (D) The sugar contents of ngp96, rgp96 and mgp96 were determined by the phenol-sulfuric acid method. The experiments were carried out in triplicate and the error bars are shown.  $P < 0.01$  (\*\*) and  $P < 0.001$  (\*\*\*)

### 2.3 N-糖基化位点突变的 gp96 蛋白抗原呈递能力降低

首先利用鸡卵白蛋白 (Ovalbumin, OVA) 体外抗原呈递系统<sup>[29]</sup>研究 N-糖基化对 gp96 抗原交叉呈递能力的影响。将 20 mer 的 OVA 前体肽 (OVA20) 与 gp96 蛋白孵育形成复合物, 同时利用 OVA8-gp96 复合物免疫 C57BL/6 小鼠后, 分离 OVA8 肽特异性的 CD8<sup>+</sup> T 细胞。将小鼠巨噬细胞作为抗原呈递细胞, OVA8 肽特异性的 CD8<sup>+</sup> T 细胞作为效应细胞, 通过 ELISA 检测活化的 T 细胞分泌的 IFN- $\gamma$ <sup>[14]</sup>, 研究 gp96 抗原交叉呈递能力。结果如图 3A 所示, 与单独 OVA20 肽相比, rgp96 和 mgp96 的抗原交叉呈递能力分别增加了约 1.9 倍

和 1.4 倍 ( $P < 0.05$ ), 相对于 rgp96, mgp96 抗原呈递能力降低了 23.1% ( $P < 0.05$ )。而单独 rgp96 和 mgp96 或煮沸变性的 gp96-OVA20 复合物刺激 T 细胞分泌 IFN- $\gamma$  的水平与对照 (OVA20) 相比无明显区别 (图 3B), 说明该体外抗原呈递体系具有特异性。

接着利用小鼠体内呈递流感病毒 K<sup>d</sup>-限制性表位 NP<sub>147-155</sub> 实验研究 gp96 的抗原呈递功能。将 NP<sub>147-155</sub> 肽或 ngp96-、rgp96-或 mgp96-NP<sub>147-155</sub> 肽复合物分别免疫小鼠 (图 3C)。如图 3D 所示, 与多肽单独免疫对照组相比, rgp96-或 mgp96-肽复合物免疫后, 多肽特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞比例分别增加了约 3.2 倍和 1.9 倍, 突变 gp96 免疫组特异

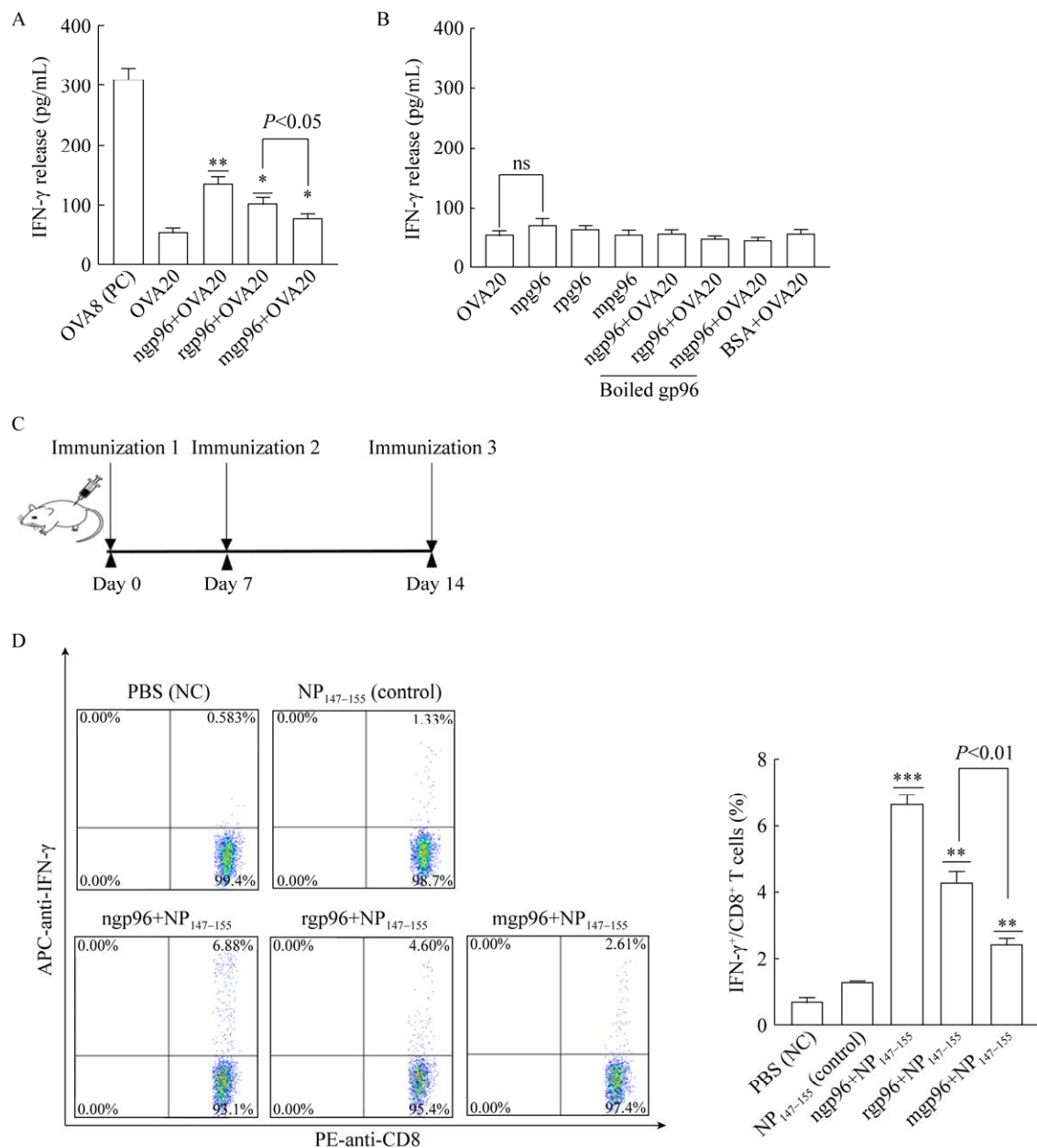


图 3 N-糖基化位点突变减弱 gp96 的抗原呈递功能

Fig. 3 The antigen cross-representation function of gp96 is reduced by mutation in its N-glycosylation sites. (A) Macrophage cells were isolated from the abdomen of naive C57BL/6 mice. C57BL/6 mice were immunized with the gp96-OVA8 complex at weeks 1, 2 and 4, respectively, and T cells were isolated from the spleen within 2–4 days after the last immunization. ngp96-, rgp96- or mgp96-OVA20 (A) or boiled gp96-OVA20, or gp96 alone (B) were incubated with macrophage cells for 2 h. Then T cells were added to the culture. The IFN- $\gamma$  levels in the supernatant were measured by ELISA 48 h later. OVA8 and OVA20 were used as a positive and negative control, respectively. (C) Schematic representation of the immunization schedule. Female BALB/c mice were immunized with ngp96, rgp96 or mgp96-NP<sub>147-155</sub> peptide complex for three times on day 0, 7 and 14, respectively. Mice treated with PBS or NP<sub>147-155</sub> peptide alone were used as control. (D) Splenocytes were isolated 2–4 days after the last immunization, and were cultured for 5 days with NP<sub>147-155</sub> peptide. IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells was analyzed by flow cytometry. The data show the  $\bar{x} \pm s$  of five mice. The data are representative of three independent experiments with similar results.  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*) compared to control and ns means no significance in results.

性 T 细胞水平明显低于野生型 gp96 组 ( $P<0.01$ )。这些结果提示, N-糖基化位点突变会减弱 gp96 的抗原呈递功能。

#### 2.4 N-糖基化位点突变减弱 gp96 的 ATPase 活性

由于 ATPase 的活性直接影响 gp96 抗原呈递和蛋白相互作用能力, 因此我们进一步利用荧光偏振原理检测野生型和突变 gp96 的 ATPase 活性, 结果表明, gp96 蛋白的 ATPase 活性随蛋白浓度呈剂量依赖性增加, 直至达到饱和浓度。在 400  $\mu\text{g/mL}$  的蛋白浓度下, 与 rgp96 相比, mgp96 的 ATPase 活性明显降低 ( $P<0.001$ ) (图 4)。以上数据说明, N-糖基化修饰位点突变会降低 gp96 的 ATPase 活性。

#### 2.5 N-糖基化修饰突变降低 gp96 的免疫佐剂功能

最后, 通过 gp96 蛋白联合 H1N1 流感病毒裂解疫苗免疫实验研究 N-糖基化对其活化 T 细胞免疫佐剂功能的影响。结果表明, rgp96 和 mgp96-佐剂疫苗组疫苗抗原特异性  $\text{CD8}^+$  T 细胞水平分别

是单独疫苗组的 2.1 倍和 1.4 倍 ( $P<0.01$ ), 其中与 rgp96 佐剂疫苗组相比 mgp96 佐剂疫苗组特异性  $\text{CD8}^+$  T 细胞水平显著降低 ( $P<0.05$ ) (图 5A、B), 通过 ELISPOT 检测也得到类似的结果 (图 5C), mgp96 佐剂活化特异性  $\text{CD8}^+$  T 细胞水平和 ELISPOT 斑点数分别比 rgp96 下降了 32.5% 和 72.0%。说明 N-糖基化位点突变明显降低 gp96 佐剂活化疫苗特异性 T 细胞应答的能力。

### 3 讨论

热休克蛋白 gp96 在天然免疫和获得性免疫中的功能已经在很多实验中得到验证, 一方面, gp96 具有与肿瘤或病毒肽相结合的能力<sup>[30-31]</sup>, 免疫后 gp96-抗原肽复合物可以被巨噬细胞和树突细胞表面的 CD91 等受体识别, 将抗原肽交叉呈递给 MHC I 类分子, 引起特异性的  $\text{CD8}^+$  T 细胞反应<sup>[32]</sup>。另一方面, 外源性的 gp96 与 APCs 上的 TLRs (TLR2、TLR4) 或者 CD91 结合, 激活下游的 NF- $\kappa\text{B}$  信号通路, 导致 APCs 的成熟, 刺激分泌细胞因子并上调共刺激分子的表达, 增强天然免疫反应, 发挥其免疫佐剂的功能<sup>[33-34]</sup>。近来研究者利用 gp96 增强机体抗肿瘤和抗病毒的特性, 设计疫苗和药物, 进行抗肿瘤或病毒的预防和治疗。这些研究需要大量的 gp96 蛋白, 天然组织提取的 gp96 不能满足其需要。昆虫细胞表达系统虽然能高效表达有免疫学功能的重组 gp96 蛋白, 但是该系统的糖基化修饰水平与天然提取的蛋白有很大的差异。本文对 N-糖基化修饰对 gp96 免疫学功能的影响进行了探究, 发现突变 N-糖基化位点使 gp96 的 ATPase 活性、抗原交叉呈递能力和免疫佐剂功能都会减弱, 提示糖基化水平对 gp96 的免疫学功能产生直接影响, 这为将来利用重组蛋白设计疫苗或药物提供了理论基础。

目前 N-糖基化修饰影响 gp96 的免疫学功能的具体机制还不是很清楚。可能的机制有 3 个: 一个是 gp96 的 ATP 结合位点和催化残基位于 N 端和 M 端, 而 N-糖基化位点位于 N 端和 M 端,

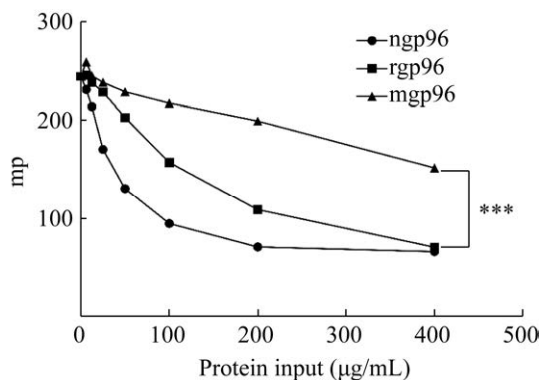


图 4 N-糖基化修饰突变对 gp96 的 ATPase 活性的影响

Fig. 4 Effect of mutation on the N-glycosylation sites on the ATPase activity of gp96. The ATPase activity of ngp96, rgp96 or mgp96 of different concentrations were determined using ATPase kit. The mp value refers to the polarization value, which is negatively correlated with ATPase activity. The data were presented as the  $\bar{x} \pm s$  from three independent experiments. \*\*\*:  $P<0.001$ .



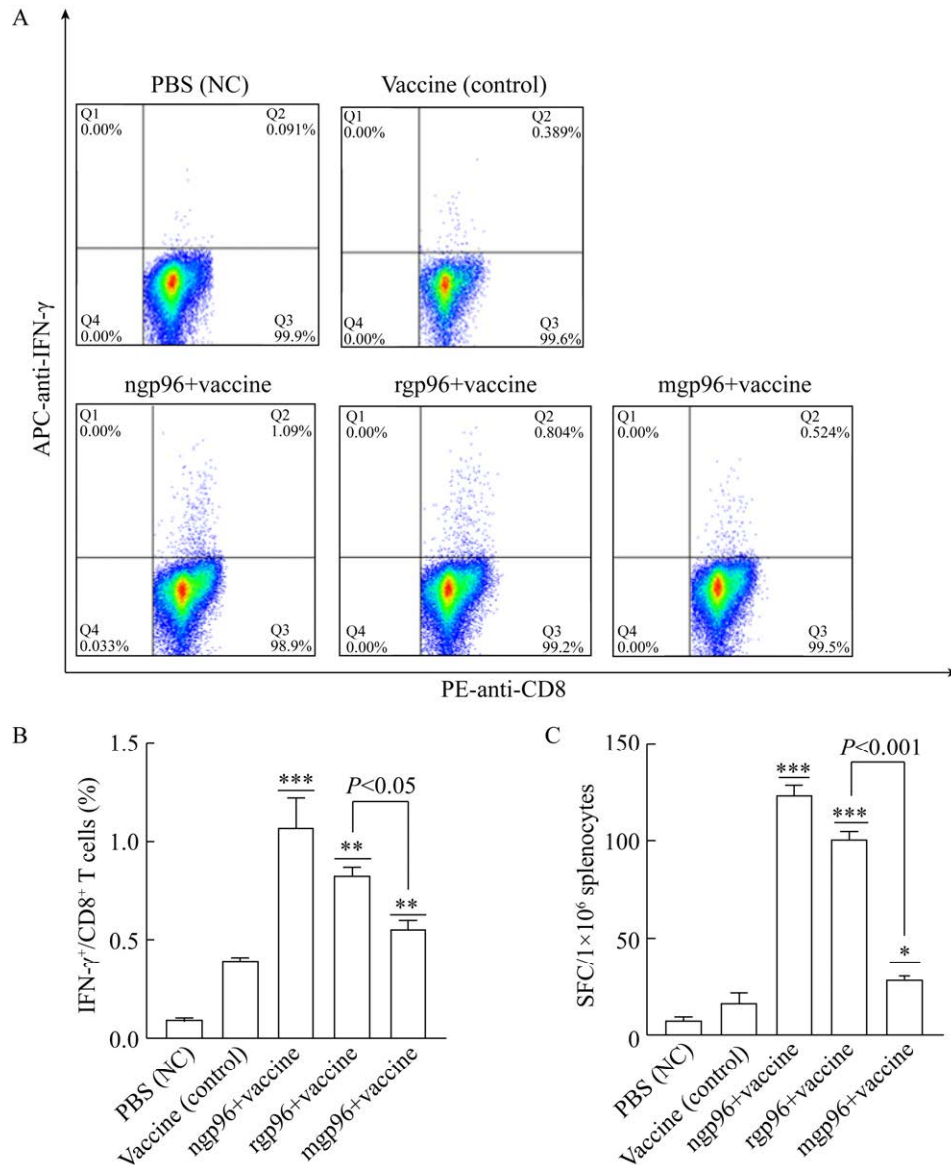


图5 N-糖基化修饰突变降低 gp96 的活化流感疫苗 T 细胞应答的佐剂功能

Fig. 5 N-glycosylation site mutations decreased gp96 adjuvant capacity to induce specific T cell response to the split influenza vaccine. Female BALB/c mice were subcutaneously immunized with H1N1 split vaccine alone or with ngp96, rgp96 or mgp96 adjuvant at weeks 1, 2, and 4, respectively. The spleen lymphocytes were collected 2–4 days after the last immunization, and were stimulated with the vaccine antigens for 5 days. The frequency of CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> IFN-γ<sup>+</sup> T cells (A, B) and antigen-specific CTLs (C) were detected by flow cytometry analysis and ELISPOT assay. The data were presented as the  $\bar{x} \pm s$  from five mice/group.  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*) compared to control.

且位置相隔较近，将位点替换为天冬氨酸，N-糖基化修饰消失，可能会影响 gp96 的局部空间构象，进而影响与 ATP 的结合和 ATPase 的活力，而 ATPase 活性水解直接调节 gp96 构象变化和与抗原肽的结合与分离，进而影响其 ATP 依赖的加

工呈递抗原、活化特异性 T 细胞的能力，该假设得到本研究数据的支持；第二个机制可能是 gp96 的 N 端为多肽结合位点<sup>[35]</sup>，N-糖基化修饰可能改变空间构象，直接影响 gp96 与多肽结合，进而影响其免疫功能；第三个机制可能是 N-糖基化修饰

影响 gp96 与 CD91 受体、TLRs 或内质网膜上其他抗原呈递链分子 (包括抗原加工相关转运体 (Transporter associated with antigen processing, TAP)、钙联素等) 的相互作用<sup>[21]</sup>, 进而影响其进入抗原呈递细胞、活化免疫细胞或参与抗原传递链的功能<sup>[36]</sup>, 这需要进一步深入研究。

本研究利用氨基酸位点突变的方法构建了 N-糖基化位点突变的 gp96, 并不能完全排除由于氨基酸突变后直接引起蛋白功能改变。因为天冬氨酸和天冬酰胺的化学性质不同, 很可能引起蛋白质构象改变, 进而影响其功能, 这有待进一步的验证。另外, 我们也检测到 gp96 蛋白还存在 O-糖基化修饰, 关于其功能研究的文献报道相对较少。后续我们将对 rgp96 蛋白进行单个 N-糖基化位点的突变以及 O-糖基化位点的突变等, 进一步深入研究糖基化修饰对 gp96 免疫学功能的影响。

## REFERENCES

- [1] Hoter A, Amiri M, Warda M, et al. Molecular cloning, cellular expression and characterization of Arabian camel (*Camelus dromedarius*) endoplasmic. *Int J Biol Macromol*, 2018, 117: 574-585.
- [2] Eletto D, Dersh D, Argon Y. GRP94 in ER quality control and stress responses. *Semin Cell Dev Biol*, 2010, 21(5): 479-485.
- [3] Linderoth NA, Popowicz A, Sastry S. Identification of the peptide-binding site in the heat shock chaperone/tumor rejection antigen gp96 (Grp94). *J Biol Chem*, 2000, 275(8): 5472-5477.
- [4] Udono H, Srivastava PK. Comparison of tumor-specific immunogenicities of stress-induced proteins gp96, hsp90, and hsp70. *J Immunol*, 1994, 152(11): 5398-5403.
- [5] Li Z, Srivastava PK. Tumor rejection antigen gp96/grp94 is an ATPase: implications for protein folding and antigen presentation. *EMBO J*, 1993, 12(8): 3143-3151.
- [6] Robert J. Evolution of heat shock protein and immunity. *Dev Comp Immunol*, 2003, 27(6/7): 449-464.
- [7] Basu S, Binder RJ, Suto R, et al. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF- $\kappa$ B pathway. *Int Immunol*, 2000, 12(11): 1539-1546.
- [8] Panjwani NN, Popova L, Srivastava PK. Heat shock proteins gp96 and hsp70 activate the release of nitric oxide by APCs. *J Immunol*, 2002, 168(6): 2997-3003.
- [9] Zheng H, Dai J, Stoilova D, et al. Cell surface targeting of heat shock protein gp96 induces dendritic cell maturation and antitumor immunity. *J Immunol*, 2001, 167(12): 6731-6735.
- [10] Argon Y, Simen BB. GRP94, an ER chaperone with protein and peptide binding properties. *Semin Cell Dev Biol*, 1999, 10(5): 495-505.
- [11] Nieland TJF, Tan MCAA, Muijen MMV, et al. Isolation of an immunodominant viral peptide that is endogenously bound to the stress protein GP96/GRP94. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(12): 6135-6139.
- [12] Robert J, Ramanayake T, Maniero GD, et al. Phylogenetic conservation of glycoprotein 96 ability to interact with CD91 and facilitate antigen cross-presentation. *J Immunol*, 2008, 180(5): 3176-3182.
- [13] Hutchins J, Tahiliani V, Miriyala J, et al. Effect on anti-tumor immunity and long-term memory CD8<sup>+</sup> T-cell generation with a novel, allogeneic cell-based, Gp96-Ig/OX40L cancer vaccine. *J Clin Oncol*, 2019, 37(15): e14016.
- [14] Binder RJ, Srivastava PK. Essential role of CD91 in re-presentation of gp96-chaperoned peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(16): 6128-6133.
- [15] Murshid A, Gong JL, Calderwood SK. The role of heat shock proteins in antigen cross presentation. *Front Immunol*, 2012, 3: 63.
- [16] Liu WW, Chen M, Li XH, et al. Interaction of Toll-like receptors with the molecular chaperone gp96 is essential for its activation of cytotoxic T lymphocyte response. *PLoS ONE*, 2016, 11(5): e0155202.
- [17] Ju Y, Fan HX, Liu J, et al. Heat shock protein gp96 adjuvant induces T cell responses and

- cross-protection to a split influenza vaccine. *Vaccine*, 2014, 32(23): 2703-2711.
- [18] Guo BN, Xu PF, Chai DF, et al. gB co-immunization with gp96 enhances pulmonary-resident CD8 T cells and exerts a long-term defence against MCMV pneumonitis. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(24): 14426-14440.
- [19] Araujo L, Khim P, Mkhikian H, et al. Glycolysis and glutaminolysis cooperatively control T cell function by limiting metabolite supply to N-glycosylation. *eLife*, 2017, 6: e21330.
- [20] Qu DF, Mazzarella RA, Green M. Analysis of the structure and synthesis of Grp94, an abundant stress protein of the endoplasmic reticulum. *DNA Cell Biol*, 1994, 13(2): 117-124.
- [21] Yan PR, Patel HJ, Sharma S, et al. Molecular stressors engender protein connectivity dysfunction through aberrant N-glycosylation of a chaperone. *Cell Rep*, 2020, 31(13): 107840.
- [22] Suriano R, Ghosh SK, Ashok BT, et al. Differences in glycosylation patterns of heat shock protein, gp96: implications for prostate cancer prevention. *Cancer Res*, 2005, 65(14): 6466-6475.
- [23] Yang Y, Liu B, Dai J, et al. Heat shock protein gp96 is a master chaperone for Toll-like receptors and is important in the innate function of macrophages. *Immunity*, 2007, 26(2): 215-226.
- [24] Li Y, Song HL, Li J, et al. *Hansenula polymorpha* expressed heat shock protein gp96 exerts potent T cell activation activity as an adjuvant. *J Biotechnol*, 2011, 151(4): 343-349.
- [25] Liu FX, Wu XD, Li L, et al. Formation of peste des petits ruminants spikeless virus-like particles by co-expression of M and N proteins in insect cells. *Res Vet Sci*, 2014, 96(1): 213-216.
- [26] Meng SD, Song J, Rao ZH, et al. Three-step purification of gp96 from human liver tumor tissues suitable for isolation of gp96-bound peptides. *J Immunol Methods*, 2002, 264(1/2): 29-35.
- [27] 杨晓华, 于广利, 赵峡, 等. 灰树花糖蛋白中总糖含量的测定. *中国海洋大学学报*, 2006, 36(6): 929-931.
- Yang XH, Yu GL, Zhao X, et al. Determination of total sugar in glycoprotein of grifola frondosa. *Period Ocean Univ China*, 2006, 36(6): 929-931 (in Chinese).
- [28] Ray A, Dittel BN. Isolation of mouse peritoneal cavity cells. *J Vis Exp*, 2010, (35): 1488.
- [29] Messmer MN, Pasmowitz J, Kropp LE, et al. Identification of the cellular sentinels for native immunogenic heat shock proteins *in vivo*. *J Immunol*, 2013, 191(8): 4456-4465.
- [30] Li HZ, Li CW, Li CY, et al. Isolation and identification of renal cell carcinoma-derived peptides associated with gp96. *Technol Cancer Res Treat*, 2013, 12(4): 285-293.
- [31] Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(3): 185-194.
- [32] Wang SF, Qiu LP, Liu GZ, et al. Heat shock protein gp96 enhances humoral and T cell responses, decreases Treg frequency and potentiates the anti-HBV activity in BALB/c and transgenic mice. *Vaccine*, 2011, 29(37): 6342-6351.
- [33] Vabulas RM, Braedel S, Hilf N, et al. The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *J Biol Chem*, 2002, 277(23): 20847-20853.
- [34] Pawaria S, Binder RJ. CD91-dependent programming of T-helper cell responses following heat shock protein immunization. *Nat Commun*, 2011, 2: 521.
- [35] Gidalevitz T, Biswas C, Ding H, et al. Identification of the N-terminal peptide binding site of glucose-regulated protein 94. *J Biol Chem*, 2004, 279(16): 16543-16552.
- [36] 郭鹏, 张含, 李长菲, 等. Toll 样受体通路调节 Tregs 功能的研究进展. *生物工程学报*, 2020, 36(9): 1701-1712.
- Guo P, Zhang H, Li CF, et al. Research progress on Toll-like receptors pathways regulating function of regulatory T cells. *Chin J Biotech*, 2020, 36(9): 1701-1712 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)