

圆柱瘤蛋白相互作用蛋白 SPATA2 调控 TNFR 介导的炎症应答和细胞死亡

张双艳, 李文果, 吴丹丹, 蒋小丽, 杨晓东

(上海交通大学医学院 上海市免疫学研究所, 上海 200025)

摘要: 去泛素化酶(deubiquitinase, DUB)圆柱瘤蛋白(cylindromatosis, CYLD)是肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR)介导的炎症反应和细胞死亡的重要调节因子, 然而 CYLD 特异性识别底物的机制尚不清楚。本研究通过生物识别(BioID)筛选得到 CYLD 的相互作用蛋白——精子发生相关蛋白 2(spermatogenesis associated 2, SPATA2), 并利用免疫沉淀法(immunoprecipitation, IP)和双分子荧光互补技术(bimolecular fluorescence complementation, BiFC)证实了 CYLD 与 SPATA2 的相互作用。SPATA2 敲降或敲除抑制了 TNF- α 诱导的细胞凋亡和程序性死亡, 增强了炎症相关基因的表达。机制研究发现, 响应 TNF- α 刺激, SPATA2 促进 CYLD 向肿瘤坏死因子受体信号复合物(tumor necrosis factor receptor signaling complex, TNFRSC)招募和催化受体相互作用蛋白 1(receptor-interacting protein 1, RIP1)去泛素化, 进而将 TNF- α 信号的效果由促炎反应向细胞死亡转变。小鼠模型研究发现, SPATA2 敲除小鼠在从出生到成年过程中其生长发育和生殖方面均无明显异常。然而对 12~15 个月龄小鼠器官的苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色和病理形态学分析发现, SPATA2 敲除小鼠的结肠和肺部较野生型小鼠出现更为严重的自发性炎症反应, 说明 SPATA2 在体内也具有抑制炎症的功能。本研究揭示了 SPATA2 通过调控 CYLD 抑制炎症反应、促进细胞死亡的作用和分子机制, 为炎症性相关疾病的治疗提供了新的潜在靶点。

关键词: 精子发生相关蛋白 2; 圆柱瘤蛋白; 蛋白-蛋白相互作用; 去泛素化; 细胞死亡; 炎症应答

中图分类号: R392.11

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2019)06-0446-08

去泛素化酶(deubiquitinase, DUB)对炎症和免疫反应发挥重要的调节作用^[1], 已成为炎症和免疫学领域的研究热点之一。DUB 突变和功能异常与多种肿瘤、神经退行性疾病、炎症和自身免疫性疾病等密切相关, 是极具应用前景的制药靶标^[2]。然而成功的药物开发依赖于对重要 DUB 功能和调控机制的深入认识。

圆柱瘤蛋白(cylindromatosis, CYLD)是泛素特异性蛋白酶(ubiquitin-specific protease, USP)家族的一员, 最早被作为肿瘤抑制因子, 是家族性圆柱瘤、多发性家族性毛发上皮瘤和 Brook-Spiegler 综合征等皮肤附属器良性肿瘤的致病基因^[3-5]。近年来发现 CYLD 可调控肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR)介导的炎症反应和细胞死亡, 然而其中的分子机制尚不明确。

生物识别(BioID)是近几年建立起来的筛查相互作用蛋白的方法。与常用的免疫沉淀方法相比, 该方法能有效富集弱相互作用、瞬时相互作用以及一些普通裂解缓冲液难以溶解的细胞结构中的蛋白相互作用, 是免疫沉淀法(immunoprecipitation, IP)的一种很好的补充^[6]。本研究旨在通过对 CYLD 的 BioID 筛查, 发现新的 CYLD 相互作用蛋白, 在此基础上深入理解 CYLD 调控炎症反应和细胞死亡的机制。

1 材料与方法

1.1 小鼠 以 C57BL/6NCrl 为遗传背景的 Spata2 小鼠品系 Spata2^{tm1.1(KOMP)Vlcg} 购自 KOMP 存储库(www.komp.org)。Spata2^{+/+}(野生型)和 Spata2^{-/-}(Spata2 敲除型)由杂合子小鼠相互交配, 并通过基因型鉴定获得。所有小鼠均在上海交通大学医学院 SPF 级动物房饲养, 所有动物实验均按照上海交通大学医学院动物保护与利用委员会批准的方案进行。

1.2 细胞 HEK293T 细胞、HeLa 细胞、MEF 细胞、骨髓来源巨噬细胞(bone marrow derived macro-

收稿日期: 2019-03-13

基金项目: 国家自然科学基金(31770818;31570770)

作者简介: 张双艳(1992-), 女, 硕士生, 主要从事炎症和免疫信号转导研究

通信作者: 杨晓东(E-mail: xdyang@shsmu.edu.cn)

phage, BMDM)均使用含 10 % FCS 的 DMEM 培养液, 在 37 °C 5 % CO₂ 培养箱中培养。在 BMDM 诱导过程中需添加巨噬细胞-集落刺激因子 (macrophage-colony stimulating factor, M-CSF)。

1.3 试剂 DMEM 培养液购自康宁公司; FCS 购自 Gibco 公司; TNF- α 购自 Thermo Fisher Scientific 公司; 放线菌酮 (cyclohexane, CHX)、Flag-M2 微珠和抗 Flag 抗体购自 Sigma-Aldrich 公司; Z-VAD 和 Nec-1 购自美国 Selleck 生物科技公司; 抗精子发生相关蛋白 2 (spermatogenesis associated 2, SPATA2) 抗体、抗 CYLD 抗体和抗受体相互作用蛋白 1 (receptor-interacting protein 1, RIP1) 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司; 偶联辣根过氧化物酶 (horse radish peroxidase, HRP) 的抗 HA 抗体购自罗氏制药公司; K63 泛素化抗体购自 Millipore 公司; Hoechst 购自 Invitrogen 公司; RNeasy Mini 试剂盒购自 QIAGEN 公司; Prime Script RT Reagent 试剂盒购自 TaKaRa 公司; SYBR Green mix for real-time PCR 购自 Applied Biosystems 公司; Annexin V-Alexa Fluor 647/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司。

1.4 BioID 用 BirA * (pCLXSN-GFP-Myc-BirA *) 或 BirA * -CYLD (pCLXSN-GFP-Myc-BirA * -CYLD) 反转录病毒表达载体包装病毒, 并感染 HEK293T 细胞, 使用流式细胞术筛选绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 阳性细胞, 获得稳定表达的细胞库。用 50 μ mol/L 生物素处理细胞 20 h 后, 裂解细胞直接用于 Western blotting 检测生物素化蛋白水平或用链霉亲和素微珠亲和纯化生物素化蛋白用于蛋白质谱鉴定。根据质谱结果, 把只出现在 BirA * -CYLD 样品中的蛋白或出现在 2 个样品中, 但在 BirA * -CYLD 中的丰度高于 BirA * 样品 5 倍的蛋白定义为 CYLD 相互作用候选蛋白。

1.5 IP 用 NP-40 裂解液 (pH 7.4, 50 mmol/L Tris-HCl, 250 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 % NP-40) 将细胞在 4 °C 冷库中裂解 20 min, 裂解物与抗体结合的琼脂糖微珠在 4 °C 孵育 2 h, 然后用裂解液洗 3 次, 2 \times SDS 样品缓冲液重悬微珠, 95 °C 10 min 煮样, 用于 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测。对于蛋白泛素化实验, 用含 1 % SDS 的 NP-40 裂解液裂解细胞, 并超声变性, 用

细胞裂解液稀释 10 倍后, 用与抗体结合的琼脂糖微珠孵育 3 h, 裂解液洗 3 次, 2 \times SDS 样品缓冲液重悬微珠, 95 °C 10 min 煮样, 用于 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测。

1.6 双分子荧光互补技术 (bimolecular fluorescence complementation, BiFC) 按照文献报道的方法^[7]构建 SPATA2 和黄色荧光蛋白 (yellow fluorescent protein, YFP) N 端 1~158 氨基酸片段融合蛋白 SPATA2-YFPn 以及 CYLD 和 YFP C 端 159~239 氨基酸片段融合蛋白 CYLD-YFPc 表达载体, HeLa 细胞单转或共转染 SPATA2-YFPn 和 CYLD-YFPc, 8 h 后换新鲜培养基, 24 h 后加入 DNA 染料 Hoechst 进行活细胞染色, 用倒置荧光显微镜 (Axio Vert A1, 卡尔·蔡司股份公司) 进行荧光成像分析。

1.7 RT-PCR 用 TNF- α 刺激小鼠 BMDM 4 h 后, 使用 RNeasy Mini 试剂盒按照说明书提取总 RNA。使用 Prime Script RT Reagent 试剂盒进行反转录获得 cDNA。使用 SYBR Green mix for real-time PCR 进行实时定量 PCR, 每个基因重复 3 次, 以 GAPDH 为内参。(表 1)

表 1 RT-PCR 引物

引物名称	引物序列 (5'→3')
GAPDH	正义链 AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	反义链 TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
Tnfr3	正义链 GAACAGCGATCAGGCCAGG
	反义链 GGACAGTTGGGTGTCTCACATT
TNF- α	正义链 CCCTCACACTCAGATCATCTTCT
	反义链 GCTACGACGTGGGCTACAG
IL-10	正义链 GCTCTTACTGACTGGCATGAG
	反义链 CGCAGCTCTAGGAGCATGTG

1.8 流式细胞术检测细胞死亡 按照凋亡试剂盒操作说明书进行操作。首先将细胞全部收集至流式管中, 离心弃上清; 每管加 150 μ L 1 \times binding buffer 重悬细胞, 离心弃上清, 开始染色; Annexin V 按照 1:20 稀释至 50 μ L 1 \times binding buffer, 室温避光孵育 15 min; 每管加入 5 μ L PI, 室温避光孵育 15 min; 孵育期间注意弹匀, 防止细胞沉底; 最后每管加 250 μ L PBS, 1 h 内使用 FCM (BD LSRFortessa X20) 进行分析。

1.9 组织病理切片苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色 取 12~15 个月龄未做任何处理、性别匹配的野生型和 SPATA 2 敲除小鼠肝脏、脾脏、

肾脏、结肠、肺等器官，经 4 % 多聚甲醛固定处理后做病理切片、HE 染色，进行病理形态学分析。

1.10 统计学处理 使用 GraphPad Prism 6.01 软件处理数据，实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示，两样本均数的比较采用 *t* 检验，以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 BioID 筛查发现 CYLD 相互作用蛋白 SPATA2

按照 BioID 文献报道的方法^[6]，本研究构建了表达 BirA*-CYLD 融合蛋白的反转录病毒载体，与只表达 BirA* 的空载体一起包装病毒并分别感染 HEK293T 细胞，获得稳定表达的细胞库。用生物素处理细胞后，在只表达 BirA* 的细胞裂解液中可以检测到一定量的生物素化蛋白条带，而表达 BirA*-CYLD 融合蛋白的细胞中可以检测到更多的生物素化蛋白条带。2 种细胞在不用生物素处理

时均检测不到明显的生物素化蛋白条带。这一结果说明，BirA*-CYLD 融合蛋白按照该方法的设计预期以依赖 CYLD 的方式特异性地标记了多个蛋白。通过链霉亲和素微珠把生物素处理的 2 种细胞中的生物素化蛋白亲和纯化出来并进行质谱分析鉴定，发现了 40 多个 CYLD 相互作用候选蛋白，SPATA2 是其中之一。为了进一步确定 SPATA2 与 CYLD 的相互作用，先采用 IP 进行验证，结果发现表达在 HEK293T 细胞中的 SPATA2 与 CYLD 呈现出非常强的相互作用。在采用 BiFC 进行验证时发现，SPATA2-YFPn 和 CYLD-YFPc 共转染细胞时呈现强的点状荧光信号，而不转染或只转染其中一个蛋白的细胞则无明显的荧光信号，这一方面进一步证实 SPATA2 与 CYLD 有较强的相互作用，另一方面提示 SPATA2 与 CYLD 可能在特定的细胞结构中形成复合物而发挥功能。（图 1）

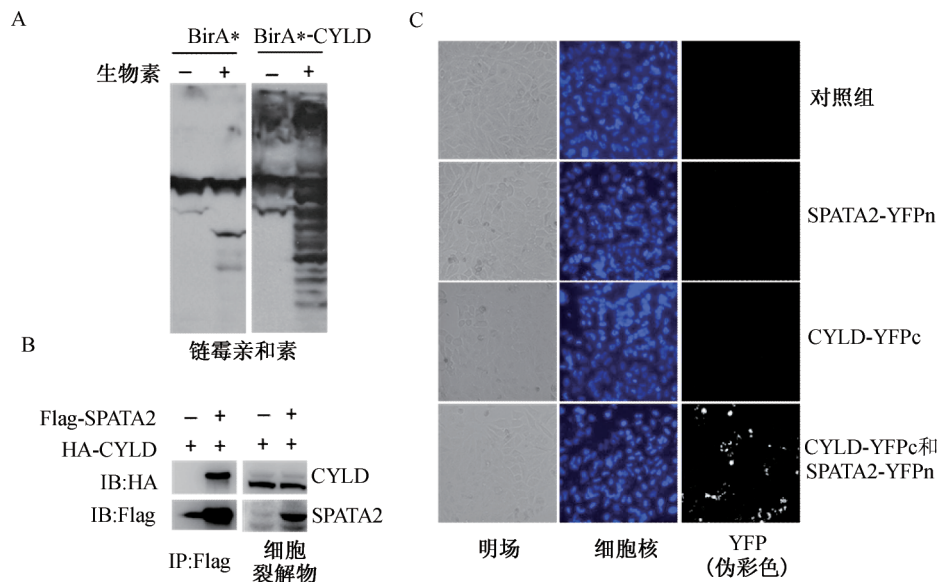


图 1 SPATA2-CYLD 相互作用的鉴定与验证

注：A. HEK293T 细胞转染 BirA* 或 BirA*-CYLD 融合蛋白，不处理或用 50 $\mu\text{mol/L}$ 生物素处理 20 h 后，裂解细胞，Western blotting 检测生物素化蛋白；B. HA-CYLD 单转或与 Flag-SPATA2 共转染 HEK293T 细胞，通过 Flag-M2 微珠 IP Flag-SPATA2，Western blotting 检测与之结合的 CYLD；C. HeLa 细胞单转或共转染 CYLD-YFPc 和 SPATA2-YFPn 24 h 后，加入 DNA 染料 Hoechst 进行活细胞染色，用倒置荧光显微镜进行荧光成像分析

2.2 SPATA2 促进 TNF- α 诱导的细胞凋亡

CYLD 的一个重要功能是在 TNFR 介导的信号通路中去泛素化 RIP1，进而抑制 NF- κ B 激活，促进细胞死亡。为了阐明 SPATA2 是否在这一过程中发挥作用，本研究分析了 SPATA2 敲降对 TNF- α 诱导的细胞凋亡的影响。用 TNF- α 和蛋白合成抑制剂 CHX 处理对照组和 SPATA2 敲降组的 HeLa

细胞，诱导细胞凋亡，然后用 Annexin V 和 PI 染色，用 FCM 分析细胞凋亡情况。结果显示，TNF- α 和 CHX 联合处理导致明显的细胞凋亡；与对照组细胞相比，SPATA2 敲降组细胞凋亡显著减少，说明 SPATA2 有促进细胞凋亡的作用。（图 2）

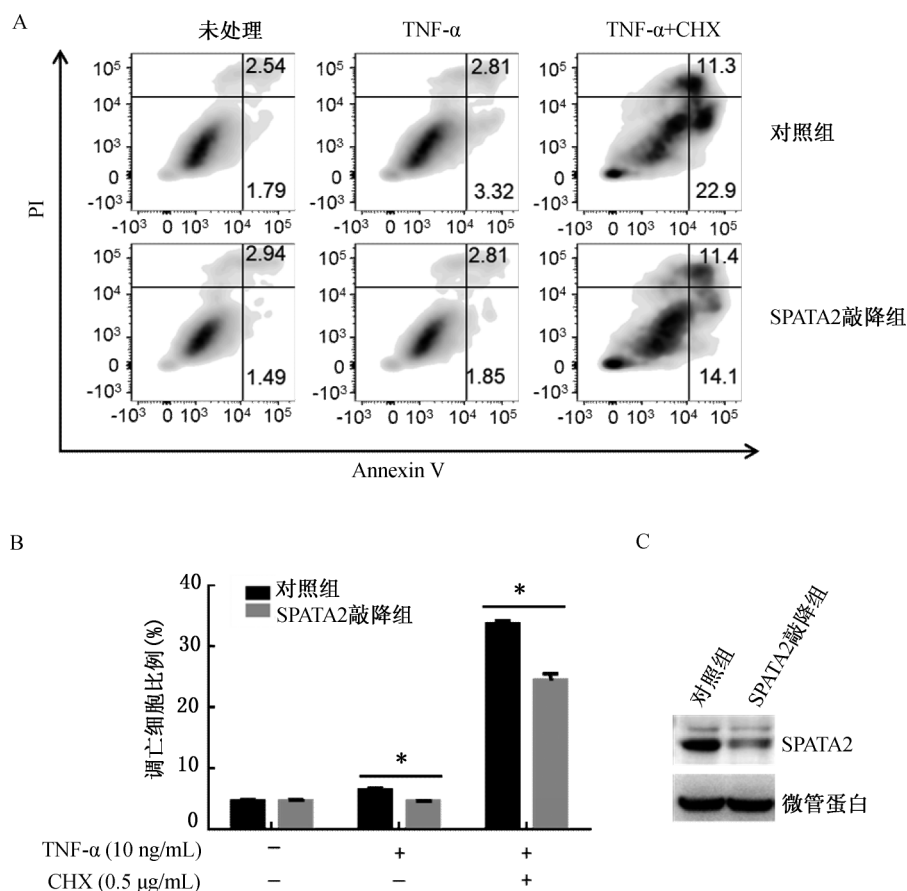


图2 SPATA2敲降导致细胞凋亡减少

注：A. 用 TNF- α 和蛋白合成抑制剂 CHX 处理对照组和 SPATA2 敲降组的 HeLa 细胞 24 h，用 Annexin V 和 PI 染色，用 FCM 分析细胞凋亡；B. 对 3 次重复实验进行定量分析，* $P < 0.05$ ；C. Western blotting 检测 SPATA2 敲降效果

2.3 SPATA2 促进 TNF- α 诱导的细胞坏死 研究表明，TNF- α 诱导的细胞凋亡依赖于 Caspase 激活，激活的 Caspase 能够抑制 RIP1/RIP3 介导的细胞程序性死亡^[8]。在 Caspase 活性被抑制的条件下，TNF- α 可以诱导细胞发生程序性死亡。为了进一步确认 SPATA2 对 TNF 信号通路介导的细胞死亡的影响，在野生型和 SPATA2 敲除的 MEF 细胞中分析了 TNF- α 和 Caspase 广谱抑制剂 Z-VAD 诱导的细胞坏死。结果显示，TNF- α 和 Z-VAD 诱导野生型 MEF 细胞大量死亡，而且这种死亡可以被 RIP1 的抑制剂 Nec-1 抑制，说明是程序性死亡。但在 SPATA2 敲除的细胞中，程序性死亡显著降低，说明 SPATA2 促进细胞发生 TNF- α 诱导的程序性死亡。(图 3)

2.4 RT-PCR 检测炎症因子的相对表达 CYLD 通过去泛素化 RIP1 能够促进细胞死亡，抑制 NF- κ B 依赖的促炎基因表达。为了分析 SPATA2 对促炎基因表达的影响，用 TNF- α 刺激来自野生型和 SPATA2 敲除小鼠的 BMDM，用 RT-PCR 检测炎

症相关基因的表达。结果显示，SPATA2 敲除后，促炎因子 TNF- α 、肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 3 (tumor necrosis factor alpha-induced protein 3, Tnfrsf3) 表达上调，而抑炎因子 IL-10 表达下调。提示 SPATA2 可能通过调控炎症相关基因的表达抑制 TNF- α 介导的炎症反应。(图 4)

2.5 SPATA2 招募 CYLD 到肿瘤坏死因子受体信号复合物 (tumor necrosis factor receptor signaling complex, TNFRSC) 促进 RIP1 泛素化 以上研究结果显示，SPATA2 在调控 TNF 通路介导的炎症反应和细胞死亡方面具有与 CYLD 相一致的功能，推测 SPATA2 作为 CYLD 的相互作用蛋白可能在这个过程中发挥调控 CYLD 的作用。为了验证这一推测，采用 IP 检测了 TNF 下游信号复合物 TNFRSC 的聚集和 RIP1 泛素化修饰。结果显示，在对照组细胞中 TNF- α 诱导 CYLD 向 TNFRSC 的招募，而在 SPATA2 敲降组细胞中，CYLD 的招募大幅减少(图 5A)，说明 SPATA2 促进 CYLD 的招募。与 CYLD 招募水平相一致，SPATA2 敲

降明显增加了 RIP1 的泛素化水平, 达到了与 CYLD 敲降类似的效果(图 5B)。这些结果表明, SPATA2 促进 CYLD 招募到 TNFRSC 进行 RIP1

的泛素化, 同时很好地解释了 SPATA2 如何响应 TNF- α 刺激促进细胞死亡、抑制炎症反应。

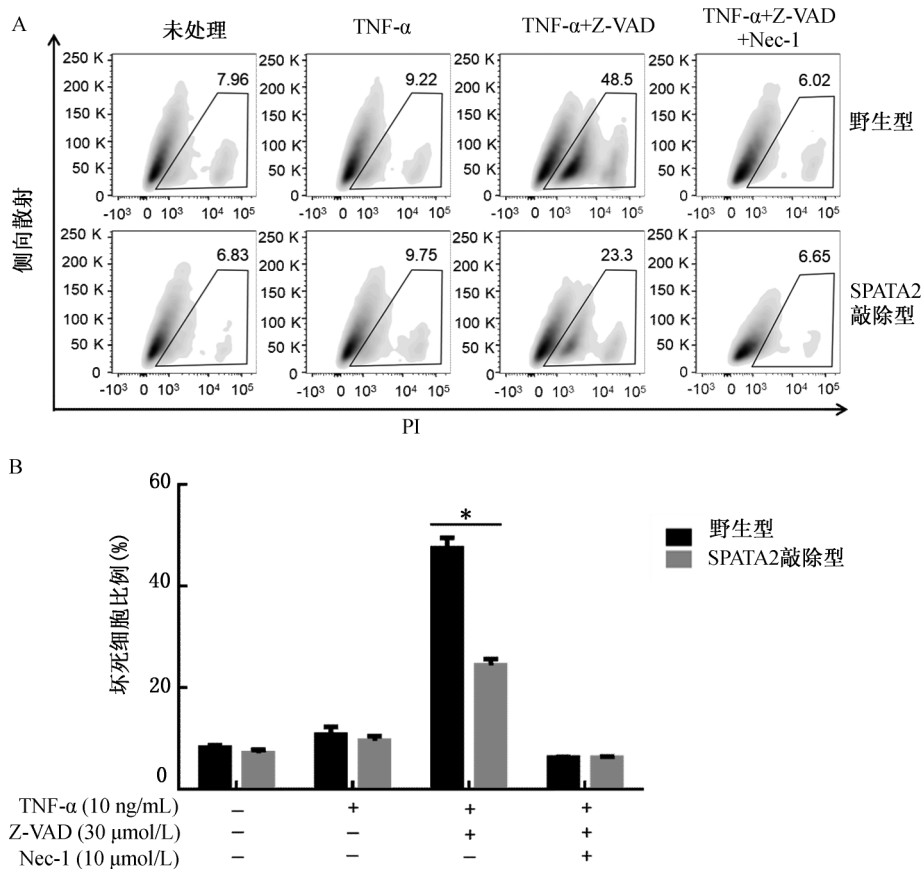


图3 SPATA2 敲除显著降低细胞程序性坏死

注: A. 用 TNF- α 、Caspase 广谱抑制剂 Z-VAD 以及 RIP1 的抑制剂 Nec-1 处理野生型和 SPATA2 敲除的 MEF 细胞 24 h, 用 PI 染色, 用 FCM 分析细胞死亡情况; B. 对 3 次重复实验进行定量分析, * $P < 0.05$

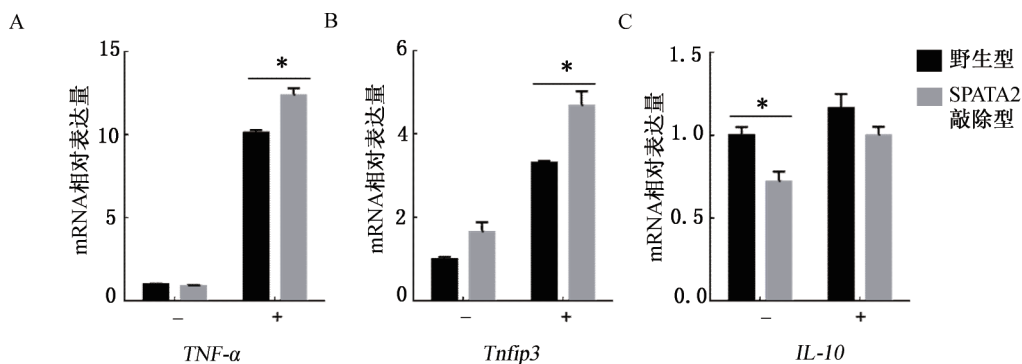


图4 野生型和 SPATA2 敲除的 BMDM 诱导的细胞因子表达变化情况

注: 不处理或用 TNF- α 处理来自野生型和 SPATA2 敲除小鼠的 BMDM 4 h, 用 RT-PCR 检测炎症相关基因的表达, “-”代表不处理, “+”代表 20 ng/mL TNF- α 处理。* $P < 0.05$

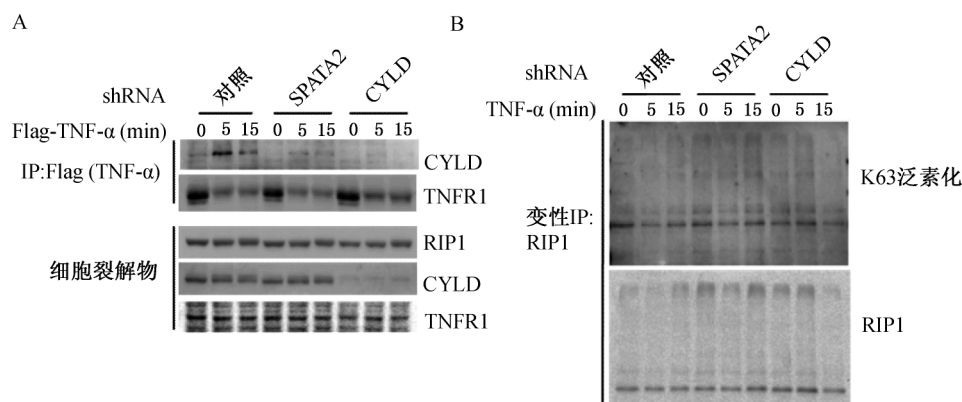


图5 SPATA2对CYLD招募以及RIP1泛素化的影响

注：A. Western blotting 检测 CYLD 的结合水平；B. Western blotting 检测 RIP1 的 K63 泛素化

2.6 SPATA2 敲除小鼠表现出更强的自发性炎症反应 为探究 SPATA2 的体内功能，分析了野生型和 SPATA2 敲除小鼠的形态学变化。SPATA2 敲除小鼠在从出生到成年过程中其生长发育和生殖等方面均无明显异常。然而在用 HE 染色观察 12~15 个月龄小鼠肝脏、脾脏、肾脏、结肠、肺等器官病理形态学变化时，发现 SPATA2 敲除小鼠结肠和肺部较野生型小鼠出现更加严重的自发性炎症

反应，其他器官差别不明显。SPATA2 敲除小鼠较野生型小鼠肠壁黏膜层增厚，肠黏膜腺体排列紊乱，基底部可见较多的炎性结节浸润。另外，与野生型小鼠相比，SPATA2 敲除小鼠肺部可见大量炎性细胞浸润及小支气管管壁纤毛增生，说明 SPATA2 缺失的小鼠肺部更易发生炎症浸润。以上小鼠病理形态学结果表明，SPATA2 在体内具有抑制炎症的功能。（图 6）

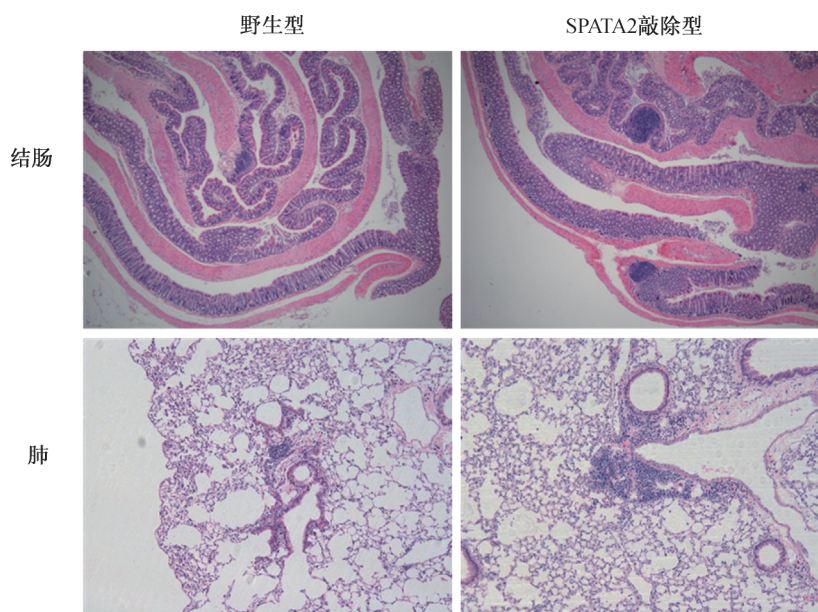


图6 小鼠结肠和肺部病理切片 HE 染色

注：未做处理的 12 个月龄性别匹配的野生型和 SPATA2 敲除小鼠不同组织的病理切片 HE 染色和病理形态学观察

3 讨论

DUB 底物特异性决定机制是 DUB 领域的重要问题，至今仍未解决。有零星报道显示 CYLD 和 A20 等 DUB 通过接头蛋白(adaptor)作用于它们的

特定底物^[9-11]，提示通过接头蛋白决定底物特异性可能是 DUB 广泛存在的机制。因此，筛查和鉴定 CYLD 的相互作用蛋白是深入理解 CYLD 底物特异性的有效策略。通过 BioID 筛查和 IP 以及 BiFC 验证，发现 SPATA2 是 CYLD 的强相互作用蛋

白。SPATA2 基因最初被发现是一个精子发生过程中高表达的基因^[12]。对果蝇 SPATA2 同源基因 TAMO 的研究发现, 缺失该基因的果蝇表现出依赖于 NF- κ B 的卵子发育缺陷和应对病原菌感染时 NF- κ B 激活的改变^[13]。这一线索提示 SPATA2 可能通过影响 NF- κ B 功能调节炎症和固有免疫反应。在哺乳动物中研究发现 SPATA2 除了在睾丸中高表达, 在免疫器官胸腺和脾脏中也有较高的表达^[12]。另外对炎症性疾病银屑病的遗传学研究显示, SPATA2 可能是与银屑病发病相关联的基因之一^[14-15]。这些证据提示在哺乳动物中 SPATA2 可能参与炎症和免疫调控。

本研究结果显示, SPATA2 通过招募 CYLD 到 TNFRSC 上促进 RIP1 去泛素化, 增强 TNF- α 诱导的细胞凋亡和程序性死亡, 调控 TNF- α 信号通路下游细胞因子基因表达, 促进炎症反应。这一发现表明, 在 TNF- α 信号通路中 SPATA2 作为接头蛋白调控 CYLD 作用于特定底物。与体外实验相一致的是, 本研究发现在小鼠模型中 SPATA2 敲除导致更严重的自发性炎症反应。在本课题进行过程中, 有几篇文章几乎同时报道用不同的策略和方法也发现 SPATA2 是 CYLD 的相互作用蛋白, 并且在体外细胞水平上显示 SPATA2 具有调节 RIP1 依赖的细胞程序性死亡的作用^[16-19]。稍后的研究发现, SPATA2 还能通过 RIP1 不依赖的方式调节炎症和细胞程序性死亡^[20]。

SPATA2 敲除小鼠在衰老之前未表现出明显的炎症和免疫缺陷, 说明 SPATA2 的功能可能主要在于应对外来刺激时的保护作用。最近有报道证实了这一点, 在 TNF- α 诱导的小鼠急性系统性炎症反应综合征(systemic inflammatory reactive syndrome, SIRS)模型中, SPATA2 敲除小鼠比野生型小鼠更敏感, 死亡更早, 而且这种敏感性是细胞坏死依赖的^[20]。本研究发现的衰老小鼠 SPATA2 敲除造成的自发性炎症反应是否依赖细胞坏死还有待于深入研究。

小鼠各组织 SPATA2 蛋白表达分析结果显示, 除了在睾丸高表达外, SPATA2 还在肠道和肺高表达^[20], 这与本研究主要在 SPATA2 敲除小鼠的肠道和肺检测到严重的自发性炎症反应相一致, 提示 SPATA2 主要在这 2 个器官发挥抗炎作用。有报道发现, CYLD 敲除小鼠也表现出肠道自发性炎症反应^[21], 提示 SPATA2 和 CYLD 共同在

肠道发挥抑制炎症作用, 但 SPATA2 是否作为 CYLD 的接头蛋白促进其底物识别还需进一步研究。持续炎症反应是人溃疡性结肠炎的重要诱因^[22], 目前仍缺乏对此类疾病病理机制的认识及有效的治疗手段。鉴于 SPATA2 和 CYLD 在促进细胞死亡和抑制炎症方面的重要作用, 它们将成为潜在的炎症等相关疾病的制药靶标, 为炎症等相关疾病的治疗提供新的选项。

参考文献

- [1] Sun SC. CYLD: A tumor suppressor deubiquitinase regulating NF- κ B activation and diverse biological processes[J]. Cell Death Differ, 2010, 17(1): 25-34.
- [2] Lopez-Castejon G, Edelmann MJ. Deubiquitinases: Novel therapeutic targets in immune surveillance? [J]. Mediators Inflamm, 2016, 2016:3481371.
- [3] Bignell GR, Warren W, Seal S, *et al.* Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene [J]. Nat Genet, 2000, 25(2): 160-165.
- [4] Takahashi M, Rapley E, Biggs PJ, *et al.* Linkage and LOH studies in 19 cylindromatosis families show no evidence of genetic heterogeneity and refine the CYLD locus on chromosome 16q12-q13[J]. Hum Genet, 2000, 106(1): 58-65.
- [5] Zhang XJ, Liang YH, He PP, *et al.* Identification of the cylindromatosis tumor-suppressor gene responsible for multiple familial trichoepithelioma[J]. J Invest Dermatol, 2004, 122(3): 658-664.
- [6] Roux KJ, Kim DI, Burke B. BioID: A screen for protein-protein interactions[J]. Curr Protoc Protein Sci, 2013, 5(74):19-23.
- [7] Lai HT, Chiang CM. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay for direct visualization of protein-protein interaction *in vivo* [J]. Bio Protoc, 2013, 3(20):e935.
- [8] Brenner D, Blaser H, Mak TW. Regulation of tumour necrosis factor signalling: Live or let die[J]. Nat Rev Immunol, 2015, 15(6): 362-374.
- [9] Harhaj EW, Dixit VM. Regulation of NF- κ B by deubiquitinases. [J]. Immunol Rev, 2012, 246(1): 107-124.
- [10] Jin W, Chang M, Paul EM, *et al.* Deubiquitinating enzyme CYLD negatively regulates RANK signaling and osteoclastogenesis in mice[J]. J Clin Invest, 2008, 118(5): 1858-1866.
- [11] Wooten MW, Geetha T, Babu J, *et al.* Essential role of sequestosome 1/p62 in regulating accumulation of Lys(63)-ubiquitinated proteins[J]. J Biol Chem, 2008, 283(11): 6783-6789.
- [12] Graziotto R, Foresta C, Scannapieco P, *et al.* cDNA cloning and characterization of PD1: A novel human testicular protein with different expressions in various testiculopathies[J]. Exp Cell Res, 1999, 248(2): 620-626.
- [13] Minakhina S, Yang J, Steward R. Tamo selectively modu-

- lates nuclear import in drosophila[J]. *Genes Cells*, 2003, 8(4): 299-310.
- [14] Capon F, Bijlmakers MJ, Wolf N, *et al.* Identification of ZNF313/RNF114 as a novel psoriasis susceptibility gene[J]. *Hum Mol Genet*, 2008, 17(13): 1938-1945.
- [15] Li XL, Yu H, Wu GS. Investigating the genetic association of HCP5, SPATA2, TNIP1, TNFAIP3 and COG6 with psoriasis in Chinese population [J]. *Int J Immunogenet*, 2014, 41(6): 503-507.
- [16] Kupka S, De Miguel D, Draber P, *et al.* SPATA2-mediated binding of CYLD to HOIP enables CYLD recruitment to signaling complexes[J]. *Cell Rep*, 2016, 16(9): 2271-2280.
- [17] Elliott PR, Leske D, Hrdinka M, *et al.* SPATA2 links CYLD to LUBAC, activates CYLD, and controls LUBAC signaling[J]. *Mol Cell*, 2016, 63(6): 990-1005.
- [18] Wagner SA, Satpathy S, Beli P, *et al.* SPATA2 links CYLD to the TNF- α receptor signaling complex and modulates the receptor signaling outcomes[J]. *EMBO J*, 2016, 35(17): 1868-1884.
- [19] Schlicher L, Wissler M, Preiss F, *et al.* SPATA2 promotes CYLD activity and regulates TNF-induced NF- κ B signaling and cell death[J]. *EMBO Rep*, 2016, 17(10): 1485-1497.
- [20] Wei R, Xu LW, Liu J, *et al.* SPATA2 regulates the activation of RIPK1 by modulating linear ubiquitination[J]. *Genes Dev*, 2017, 31(11): 1162-1176.
- [21] Reiley WW, Jin W, Lee AJ, *et al.* Deubiquitinating enzyme CYLD negatively regulates the ubiquitin-dependent kinase Tak1 and prevents abnormal T cell responses[J]. *J Exp Med*, 2007, 204(6): 1475-1485.
- [22] 崔畅婉, 孙峥嵘. 溃疡性结肠炎发病机制研究进展[J]. *现代免疫学*, 2019, 39(1): 77-81.

Regulation of TNFR-mediated inflammatory response and cell death by cylindromatosis-interacting protein SPATA2

ZHANG Shuang-yan, LI Wen-guo, WU Dan-dan, JIANG Xiao-li, YANG Xiao-dong (Shanghai Institute of Immunology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract: Deubiquitinase (DUB) cylindromatosis (CYLD) is a critical regulator for tumor necrosis factor receptor (TNFR)-mediated cell death and inflammatory response. However, the molecular mechanism by which CYLD specifically recognizes its substrates is largely unknown. In this study, we identified spermatogenesis associated 2 (SPATA 2) as one of CYLD-interacting proteins by BioID and validated SPATA2-CYLD interaction by immunoprecipitation (IP) and bimolecular fluorescence complementation (BiFC). Knockdown or knockout of SPATA2 suppressed TNF- α -induced apoptosis and necroptosis and enhanced induction of proinflammatory cytokines. Mechanistically, in response to TNF- α stimulation, SPATA2 promoted the recruitment of CYLD to the tumor necrosis factor receptor signaling complex (TNFRSC) for the deubiquitination of receptor-interacting protein 1 (RIP1), thereby promoting the transition of TNF- α signaling from proinflammatory response to cell death. Furthermore, our *in vivo* study showed that SPATA2 knockout mice were born at expected Mendelian ratios and displayed no obvious abnormalities in growth and survival from birth to adulthood. Nevertheless, histological examination of different organs from 12-15-month old mice identified evidence of severer autoinflammatory responses in the colon and liver from SPATA 2 knockout mice, suggesting an important role for SPATA2 in suppressing inflammation *in vivo*. Our data reveals the regulatory function and molecular mechanism of SPATA2 as a CYLD adaptor in controlling cell death and inflammatory response and provides another therapeutic target for treating inflammatory diseases.

Key words: spermatogenesis associated 2; cylindromatosis; protein-protein interaction; deubiquitination; cell death; inflammatory response