

國立台灣大學醫學院免疫學研究所

碩士論文

National Taiwan University Graduate Institute of Immunology

Master Thesis

JNK 及 p38 MAPK 磷酸化 paxillin 在 T 細胞活化

上之角色研究

Study on the Role of Paxillin Phosphorylated by JNK  
and p38 MAPK in T Cell Activation

研究生：黎于綺 (Yu-Chi Lee)

指導教授：賴明宗 (Ming-Zong Lai)

中華民國 九十八 年 六 月

June, 2009

## 誌謝

第一次踏進分生所那天陽光很好。警衛指著他的正上方笑著說 503 往這走。我還記得在瓶瓶罐罐標上自己名字的興奮，還有第一次上台報告時微微顫抖的雙手。總覺得不久前才害羞的在白板上自我介紹，轉眼間兩年就過去了。七百多個日子裡，首先要感謝的就是我的指導教授賴明宗老師。您一直是我心目中科學家的典範，謝謝您給予我這麼優渥的研究環境，在我遇到瓶頸時給我悉心的指導，並以無比的耐心包容我的不成熟。謝謝我的口試委員王萬波老師和繆希椿老師，在我的每一次進度報告都提供寶貴的建議，促使我不斷省視自己的研究方向，讓我的論文更加完整。謝謝免疫所的伍安怡老師、許秉寧老師、李建國老師和顧家綺老師，不論是課堂上的教學或課餘的討論都讓我獲益良多。

感謝 503 每天一起努力的大家，明仙學姐、劉文賢學長、駱學長、雅婷學姐、汶植學姐、惠文學姐、泳萱學姐、禹蓉學姐、妍庭學姐、晨音學姐、鈺璇學姐、祐毅學長、子勝學長和琬甄學姐，謝謝你們這段日子對我的照顧，不僅在實驗上給我指導與勉勵，生活上也給我許多意見，讓我覺得倍感溫馨。謝謝和我同甘共苦的好伙伴晨哲、凱婷和育全，總是陪我一起煩惱，替我打氣，讓實驗室充滿笑聲。謝謝雅敏學姐和華慧學姐，在細胞篩選和基因轉殖小鼠的實驗給予我莫大的幫助，讓我的研究得以順利進行。

謝謝凱潔、馥瑋、維璟、聖揚、俊樺、萍芳、安翔、坤珀、維樂、昶偉和文淵，很高興能遇見可愛又有才華的你們。我想我不會忘記兩年來一起經歷的點點滴滴，謝謝你們讓我的碩班生涯充滿美好回憶。

感謝林以行老師，謝謝您總是溫柔的傾聽我的煩惱，幫助我在迷惘時找回自信，給我繼續前進的勇氣。謝謝妮娜學姐、麗君學姐、國珍學長、文瑋學長、志鵬學長、雅慧學姐、明臻學姐、鵬如學姐和岳穎學姐。和你們在一起的時光總是充實又精采，感謝你們從我還是個不懂事的小毛頭時開始陪著我到現在，在我沮喪的時候給我最溫暖的鼓勵。這條路並不好走而謝謝你們讓我知道我不是孤獨一個。我好慶幸在這條路的起點遇見了你們。

最後，我要感謝我最親愛的家人。謝謝你們一直以來對我無條件的支持與信任，包容我的任性和壞脾氣。如果我有任何一點的成就，你們就是一切的理由。

黎于綺 於中研院分生所

2009/8/18

## 摘要

Paxillin 是大小為 68-kD 的細胞骨架轉接蛋白，可連結至 focal adhesion 複合體。它具有許多可和其他蛋白交互作用的區塊，並藉此整合外來訊息並加以傳遞。近年來有許多研究指出，paxillin 蛋白上絲胺酸及酪胺酸的磷酸化情形對其功能相當重要，但 paxillin 的磷酸化在 T 細胞的活化上所扮演的角色目前並不清楚。在本研究中，我們建立表現 paxillin 上 FAK、JNK 及 p38 MAPK 磷酸化位置突變蛋白的 DO11.10 細胞株，探討 paxillin 對 T 細胞活化的影響。

在我們的實驗中發現，雖然 paxillin 在上皮細胞及神經元細胞的延展及遷徙扮演關鍵角色，在 DO11.10 細胞中表現 paxillin 的突變株並不影響細胞的 integrin 黏附到其基質的能力，且只有表現 FAK 磷酸化位置 paxillin 突變株細胞之遷徙能力受到些微的抑制。雖然 JNK 和 p38 MAPK 磷酸化 paxillin 並不影響 T 細胞的移動，在表現 JNK/p38MAPK 雙磷酸化位置 paxillin 突變株的 DO11.10 細胞中，發現 TCR 活化後 IL-2 的產量明顯減少，而這個現象可歸因於轉錄因子 NFAT 的進核受到抑制。

為了更深入探討 paxillin 對於正常 T 細胞的活化有何影響，我們也建立表現 paxillin 磷酸化位置突變蛋白的基因轉殖小鼠。和同胎對照小鼠相比，基因轉殖小鼠的 T 細胞的發育並無明顯差異，細胞的黏附和遷徙也不受影響，但活化後細胞增生的速度及產生 IL-2 的能力都受到抑制。在基因轉殖小鼠中同樣可觀察到 NFAT 進入細胞核的量明顯減少，除了影響 IL-2 的分泌，IFN- $\gamma$  及 IL-4 的產生也受到影響。

綜合以上實驗結果，同時在 paxillin 的 p38MAPK 及 JNK 磷酸化位置進行突變，

可明顯抑制 T 細胞的活化。而被 p38 MAPK 及 JNK 所活化的 paxillin 是如何調控 NFAT 的進核以及 T 細胞的活化，則有待進一步的實驗探討。



## Abstract

Paxillin is a 68-kD cytoskeletal adaptor protein associated with focal adhesion complex. It is a multidomain adaptor that facilitates signal integration and transduction. Recent studies revealed critical roles for tyrosine and serine phosphorylation of paxillin by FAK, JNK and p38 MAPK, but the consequence of paxillin phosphorylation in T cells remains unknown. In this study, we addressed this issue by overexpressing paxillin mutants with respective phosphorylation sites of FAK, JNK, and p38 MAPK in T cells, and examined the role of paxillin phosphorylation in T cell activation, adhesion, and migration.

Contradictory to the reported effect on epithelial cells and neurite, all the paxillin mutants examined did not interfere with integrin-mediated T-cell adhesion. Overexpression of paxillin with mutations at phosphorylation sites of FAK (Y31F/Y118F) in T cells reduced SDF-1 $\alpha$ -stimulated migration, but did not affect T cell activation, and other parameters of T cell activation remain normal. In contrast, overexpression of paxillin with double mutations at phosphorylation sites of p38 MAPK and JNK (S85A/S178A) in T cells did not alter cell adhesion and migration, but effectively suppressed IL-2 production, the signature of T cell activation. Inhibition by [S85A/S178A]-paxillin could be partly attributed to a selective suppression of NFAT activation.

To study the role of paxillin in T cell activation in normal T cells, we further generated [S85A/S178A]-paxillin transgenic mice. Although no significant effect of [S85A/S178A]-paxillin on T cell development was observed, both T cell proliferation and IL-2 production were suppressed in transgenic mice compared to NLC mice. In

addition, NFAT translocation was partially interfered by [S85A/S178A]-paxillin transgene.

In summary, phosphorylations of paxillin by different kinases play different roles in T cells and non-T cells. How [S85A/S178A]-paxillin modulates T cell activation and NFAT activation will be further investigated.



## 目錄

摘要.....	ii
目錄.....	vi
第一章 緒論.....	1
1.1 Paxillin.....	1
1.2 Paxillin Superfamily.....	2
1.3 Paxillin 的結構.....	3
1.4 Paxillin 的磷酸化.....	4
1.5 Paxillin 與 integrin.....	5
1.6 T 細胞的活化.....	6
1.7 Paxillin 對於 T 細胞活化的初步研究結果.....	7
1.8 研究方向與目的.....	7
第二章 材料與方法.....	8
2.1 細胞株與細胞培養.....	8
2.1.1 細胞株.....	8
2.1.2 小鼠胸腺、脾臟細胞.....	8
2.1.3 細胞培養.....	8
2.2 藥品與試劑.....	8
2.3 抗體.....	9
2.4 質體構築.....	9
2.5 質體 DNA 的轉染(transfection).....	10
2.5.1 Calcium phosphate 轉染法.....	10
2.5.2 反轉錄病毒感染法 (retroviral infection).....	10
2.6 西方點墨法 (Western blot).....	11
2.7 IL-2 產量分析.....	11

2.8 Wound-healing assay.....	12
2.9 Conjugation assay.....	12
2.9.1 細胞染色.....	12
2.9.2 細胞結合.....	13
2.10 全細胞萃取液 (total cell lysate) 的製備.....	13
2.11 核萃取液 (nuclear extract) 的製備.....	13
2.12 Adhesion assay.....	14
2.13 Chemotaxis assay.....	14
2.14 建立 CD2-paxillin S178A/S85A 基因轉殖 鼠.....	15
2.14.1 Genomic DNA 測試.....	15
2.14.1.1 純化小鼠之 Genomic DNA.....	15
2.14.1.2 篩選待有轉殖基因之小鼠.....	15
2.14.2.1 RNA 的純化.....	16
2.14.2.2 反轉錄與聚合酶連鎖反應 (RT-PCR).....	16
2.15 CD2-paxillin S178A/S85A 基因轉殖鼠之分 析.....	17
2.15.2.1 T 細胞增殖分 析.....	17
2.15.2.2 IL-2 產量分 析.....	18
2.15.2.3 細胞表面染色分析.....	18
第三章 研究結果.....	19
3.1 表現 paxillin 磷酸化位置突變株對 T 細胞活化時產生 IL-2 能力之影響.....	19
3.2 Paxillin 的 JNK/p38MAPK 磷酸化位置突變會影響轉錄因子 NFAT 的進核..	20



3.3 表現 paxillin 磷酸化位置突變株不影響細胞的黏附(adhesion).....	21
3.4 表現 paxillin FAK 磷酸化位置突變株會抑制細胞的遷移.....	22
3.5 表現 Paxillin 磷酸化位置突變株不影響 T 細胞與 B 細胞的結合.....	22
3.6 Paxillin 磷酸化位置突變株會影響 NIH-3T3 移動的能力.....	23
3.7 建立 paxillin 的 JNK/p38MAPK 雙磷酸化位置突變的基因轉殖小鼠.....	24
3.8 Paxillin 的 JNK 和 p38MAPK 雙磷酸化位置突變的基因轉殖小鼠 T 細胞數量 與發育之分析.....	24
3.9 表現 paxillin S178A/S85A 雙磷酸化位置突變蛋白的基因轉殖小鼠的胸腺細 胞和脾臟細胞經活化後，細胞增生及 IL-2 的分泌量減少.....	25
3.10 表現 paxillin S178A/S85A 雙磷酸化位置突變蛋白的基因轉殖小鼠之 T 細胞 經活化後黏附及遷移的能力皆不受影響.....	26
3.11 表現 paxillin S178A/S85A 雙磷酸化位置突變蛋白的基因轉殖小鼠之 T 細胞 經活化後，細胞核內 NFAT 轉錄因子的量減少.....	26
3.12 表現 paxillin S178A/S85A 雙磷酸化位置突變蛋白的基因轉殖小鼠之 T 細胞 經活化後，產生之 IFN- $\gamma$ 及 IL-4 的量減少.....	27
第四章 結果討論.....	29
圖表.....	32
參考文獻.....	60



# 第一章 緒論

## 1.1 Paxillin

Paxillin 是組成細胞骨架的(cytoskeleton)蛋白之一，最初是因為其 tyrosine 在 v-src 轉型的雞胚胎纖維母細胞中被高度磷酸化而發現。由於此蛋白位在細胞 focal adhesion 的位置，被推測可連接細胞膜及 actin，故命名為 paxillin。其命名源自於拉丁文 *paxillus*，本意為樁。

Paxillin 在不同物種間具有高度的相似性，在雞、老鼠、青蛙、斑馬魚及果蠅上都證實有 paxillin 的表現，尤其人類和雞的胺基酸相似度高達百分之九十，此種演化上的保守性也暗示這個分子對生物而言相當重要。

Paxillin 的基因剔除小鼠會因中胚層(mesoderm)發育的缺陷而在發育第七-八天死亡，此表現型(phenotype)和 fibronectin 的基因剔除小鼠相似，代表 paxillin 在 fibronectin 所傳遞的訊息可能扮演關鍵角色。在體外培養的實驗中也發現，若將 paxillin 基因剔除，細胞移動(migration)或延展(spreading)的能力皆受到抑制。

## 1.2 Paxillin superfamily

Paxillin 屬於 paxillin superfamily 的一員，paxillin superfamily 三個成員，除 paxillin 之外，還有 Leupaxin 及 Hic-5。這三種蛋白質結構相似，分別位在染色體上不同的位置。其中 paxillin 在生物體的分佈最為廣泛，不論是低等或高等的真核生物都可以偵測到其 cDNA 表現，而 Leupaxin 及 Hic-5 目前只在高等真核

生物中被發現。研究指出高等的真核生物中可經選擇性剪接( alternative splicing ) 表現  $\alpha$  ,  $\beta$  及  $\gamma$  三種不同型式的 paxillin , paxillin- $\beta$  及 paxillin- $\gamma$  分別比 paxillin- $\alpha$  多出 34 及 48 個胺基酸。除此之外, 另有一種 paxillin- $\delta$  則是從第 132 個胺基酸開始轉譯, 因此缺少 N 端的 LD1 motif (Brown et al., 2004)。本論文所探討的 paxillin 指的是 paxillin- $\alpha$ 。

### 1.3 Paxillin 的結構

Paxillin 的分子量為 68-kDa, 是由 557 個胺基酸所組成。它不具有酵素活性, 主要是作為轉接蛋白(adaptor protein), 藉由 N 端的 LD motif 和 C 端的 LIM domain 和其他蛋白交互作用, 幫助細胞對各種外來刺激產生快速的反應。

Paxillin 的 N 端有五個含高量 leucine 的 LD motifs (LDXLLXXL),

- LD1 可以和 actopaxin、vinculin、ILK ( integrin- linked kinase)及 papillomavirus protein E6 作用。
- LD2 可以結合到 vinculin 及 FAK/PYK2, LD4 可以結合到 actopaxin 及 FAK/PYK2。其中 LD motif 3 是一個退化的(degenerate) LD motif, 缺少起始的 LD 序列。目前 LD3 和 LD5 沒有任何交互作用的對象被發現。

Paxillin 的 C 端則是由四個具有 double-zing finger 的 LIM domain 所構成,

- LIM 2 和 LIM 3 domain 可以和 tubulin 結合, LIM 3 和 LIM 4 可以和 PTP-PEST 結合。LIM 3 藉由和 LIM2 的合作, 能幫助 paxillin 分佈在細胞膜附近的位置。Hic-5 的 LIM domain 具有和 DNA binding 的能力, 也有研究支持 paxillin 能藉由 LIM domain 的作用, 分布到細胞核(Wang and Gilmore, 2002)。

除了 LD motif 及 LIM domain, paxillin 上還有許多 serine 及 tyrosine 可被不同的激酶磷酸化, 而磷酸化的 paxillin 會產生新的蛋白質結合位置, 招募其他酵素或轉接蛋白, 形成複合體 (signalosome), 進而活化下游的訊息傳導途徑; 目前已有文獻指出, 透過 paxillin 傳遞的訊息, 可刺激基因的表現, 影響細胞的增生, 或改變細胞骨架的結構。

## 1.4 Paxillin 的磷酸化

當細胞受到賀爾蒙或生長因子外來刺激時, 會使細胞中的 paxillin 被磷酸化。

Paxillin 最初是因為其 tyrosine 在 v-src 轉型的雞胚胎纖維母細胞中被高度磷酸化而被發現, 且利用免疫螢光染色可看到被磷酸化的 paxillin 會聚集在 focal adhesion 的位置。在 2003 年 Tang 等人發現 paxillin 第 31 及第 118 個 tyrosine 可被 FAK 及 Src 所磷酸化, 而此步驟對於調控細胞的遷徙及伸展相當重要(Tang et al., 2003; Romanova et al., 2004)。

Paxillin 上除了 tyrosine 可被磷酸化, 近年來也有許多研究指出 paxillin 的 serine 及 threonine 亦可被 ERK、JNK 及 p38 MAPK 等激酶磷酸化。若利用 PMA 或 hepatocyte growth factor 刺激細胞, 會使 paxillin 被 ERK MAP Kinase 所磷酸化, 並導致細胞型態的改變(Liu et al., 2002; Ku at al., 2000), 但此磷酸化位置尚未被確認。在 2003 年, Jacobson 的研究團隊發現 paxillin  $\beta$  上第 178 個 serine 會被 JNK 所磷酸化。當在小鼠膀胱癌上皮細胞株(NBT-II)中大量表現第 178 個 serine 被突變成 alanine 的 paxillin 突變株, 會造成細胞型態的改變, 並使細胞遷徙能力下降 (Huang et al., 2003)。隔年同一個研究團隊也發現, 當受到 nerve growth factor 的刺激時, p38 MAPK 會磷酸化 paxillin 的第 85 個 serine。若在神經細胞株(PC-12)中大量表現第 85 個 serine 無法被磷酸化的 paxillin 突變

株，會抑制神經細胞突觸的伸展(neurite extension) (Huang et al., 2004)。

除此之外，有研究指出 T 細胞活化時，也會引起 paxillin 的磷酸化。若以 anti-CD3 或 anti-CD45 刺激 T 細胞株(CTL clone 11)，可觀察到 paxillin 的 tyrosine 被磷酸化，(Ostergaard et al., 1998)。在用 PMA 刺激小鼠胸腺融合瘤細胞株(EL4)的實驗中，也發現 paxillin 的 serine/ threonine 會被 ERK 磷酸化。

根據以上研究可以得知，paxillin 除了可藉其 LD motif 及 LIM domain 和其他蛋白交互作用，其生理功能也會受到多種不同的激酶所調控。目前已有愈來愈多可磷酸化 paxillin 的激酶以及其對應的磷酸化位置被發現，但 paxillin 的生理功能是如何受到其磷酸化情形的調控，目前並不是相當清楚。有研究指出被磷酸化的 tyrosine 可和其他具有 SH2 domain 的蛋白結合，並傳遞訊息；被磷酸化的 serine 則可能是藉著影響 paxillin 的構型而改變其 binding specificity，但詳細的機制則有待進一步的實驗釐清。



## 1.5 Paxillin 與 integrin

Integrin 是細胞基質(extracellular matrix, ECM)受體的一種，是由  $\alpha$  及  $\beta$  兩種單元(subunit)形成的複合體。目前已有至少有 18 種不同的  $\alpha$  單元和 8 種  $\beta$  單元被發現，而這些不同的  $\alpha$  及  $\beta$  單元可組成至少 24 不同的 integrin，其中有 12 種被發現可在 T 細胞中表現。在不同發育階段的 T 細胞會表現不同種類的 integrin，進而影響其黏附及遷徙的能力。在 TCR 受到刺激時，integrin 會活化而產生構型的改變，使 integrin 和 ICAM-1 之間的親合力增加。此種藉外界訊息而改變其活性的傳遞方式，稱為 inside-out signal。而 T 細胞上 integrin 和其抗原呈獻細胞上 ligand ICAM-1 的緊密結合，能幫助抗原呈獻細胞傳遞給 T 細胞

的 outside-in signal。

Paxillin 是 integrin 下游重要的轉接蛋白之一。Integrin 在 T 細胞活化時可傳遞 co-stimulatory signal (Hogg et al., 2003)，並幫助 T 細胞和抗原呈獻細胞之間形成穩定的 synapse 結構。有研究指出，在人類的 T 淋巴瘤細胞株 Jurkat 中，paxillin 可直接和 integrin 結合，且此時 paxillin 的 tyrosine 會被磷酸化，並引起細胞骨架的結構改變。

Paxillin 在 T 細胞中大量表現，並會在 T 細胞活化時被磷酸化，並聚集到 T 細胞和抗原呈獻細胞接觸的區域；此外，也有研究指出 paxillin 參與在細胞骨架結構改變的調控上，而細胞骨架結構改變也是 T 細胞活化的特徵之一。



## 1.6 T 細胞的活化

T 細胞是免疫系統當中很重要的一環，而其活化過程受到極複雜而精密的調控。在活化初期，T 細胞利用 T 細胞受體(T cell receptor, TCR)辨認抗原呈獻細胞 (antigen presenting cell, APC)上的組織相容抗原(MHC)與抗原所形成的複合體而活化，並形成 immunological synapse 的構造。

當接收到來自 TCR 的訊息，tyrosine phosphatase CD45 可藉由將 C 端的 tyrosine 去磷酸化而活化 Src 家族 tyrosine kinase 的成員 Lck 和 Fyn。活化的 Lck 可磷酸化 TCR/CD3 之 ITAM 上的 tyrosine，藉此招募並活化 ZAP-70。活化的 ZAP-70 再將連接蛋白(linker)LAT 磷酸化。Phospholipase C  $\gamma$  (PLC  $\gamma$ )在與磷酸化的 LAT 結合後，可被 ZAP-70 及 ITK 活化。

活化的 PLC  $\gamma$  將細胞膜上的 PIP2 分解為 diacylglycerol(DAG) 和 inositol 1,4,5-triphosphate(IP3)。DAG 可活化 protein kinase C(PKC)，PKC 的活化可繼續活化下游蛋白質。IP3 和內質網上鈣離子通道蛋白質結合，使鈣離子由內質網釋放到細胞質，提升細胞質中鈣離子濃度，而活化 calcineurin，進而將 NF-AT 的 serine 去磷酸化，使 NF-AT 進入細胞核，活化下游基因。

此外，磷酸化 LAT 會藉 SLP-76 和 Vav 連結，進而活化 PKC  $\theta$ ；PKC  $\theta$  可以活化 IKK 複合體，造成 I $\kappa$ B 的磷酸化和分解，使 NF $\kappa$ B 轉錄因子 p65-p50 複合體由細胞質轉進入細胞核，活化下游基因。T 細胞活化也藉 Grb2 和 Sos 活化 Ras，Ras 依序活化 Raf-1 及 MEK，使 ERK 磷酸化進入細胞核中啟動 c-fos 的表現。另外，JNK 的活化可以直接磷酸化 c-Jun。c-fos 和 c-Jun 在細胞核內形成 dimer，即 AP-1 轉錄因子，活化下游基因。AP-1 轉錄因子也可以被 p38 MAPK 活化。

T 細胞透過 TCR 的訊息和其他共同活化訊息(co-stimulatory signal)，經由鈣離子、PKC 和 Ras 等主要的訊息傳遞路徑，將 NF-AT、NF $\kappa$ B 和 AP-1 等轉錄因子活化。最後啟動介白素二和其他細胞激素基因的表現，使 T 細胞活化並生長分裂。

## 1.7 Paxillin 對於 T 細胞活化的初步研究結果

在 T 細胞活化時，integrin 接受細胞外傳遞進來的訊息，幫助 T 細胞完整的活化。Paxillin 是 integrin 下游的轉接蛋白，於 T cell 活化過程中被磷酸化。另外，Paxillin 參與在細胞骨架結構改變的調控上，而細胞骨架結構改變是 T 細胞活化的特徵之一。所以推測 paxillin 可能在 T 細胞的活化過程中扮演重要角色。

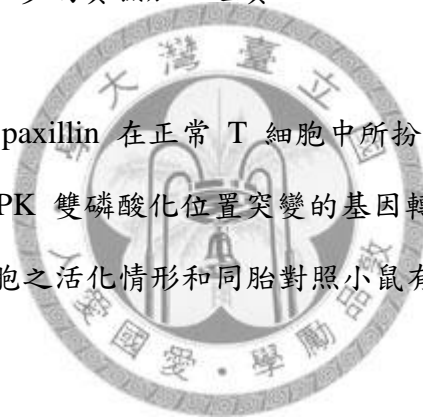


在本實驗室章安雲學姐的研究中發現，在 DO11.10 細胞株同時表現 paxillin p38 MAPK 及 JNK 磷酸化位置突變的蛋白，會影響 T 細胞產生 IL-2 的能力，而此現象可能是因為於轉錄因子 NFATp 及 NFATc 的進核受到抑制。

## 1.8 研究方向與目的

在表現 paxillin p38 MAPK 及 JNK 磷酸化位置突變株的細胞中，雖然 T 細胞的活化受到影響，但其黏附或遷徙的能力並沒有明顯的改變，此現象和目前文獻的報導並不一致，需要進一步的實驗加以證實。

此外，為了進一步了解 paxillin 在正常 T 細胞中所扮演的角色，所以建立表現 paxillin 的 JNK/p38MAPK 雙磷酸化位置突變的基因轉殖小鼠，並分析轉殖小鼠之胸腺細胞及脾臟 T 細胞之活化情形和同胎對照小鼠有何差異。



## 第二章 材料與方法

### 2.1 細胞株與細胞培養

#### 2.1.1 細胞株

DO11.10 細胞為的小鼠 T 細胞融合瘤，其 T 細胞受器(T cell receptor)可專一性辨認 OVA peptide 323-339。Phoenix 細胞是轉殖有反轉錄病毒複製及包被基因(gag-pol 及 env)的初級人類胚胎腎臟細胞(primary human embryonic kidney cells)。A20(ATCC TIB 208, I-Ad)細胞是小鼠 B 細胞淋巴瘤細胞(murine B cell lymphoma)。HT-2 細胞是老鼠的介白素二依賴型 T 細胞株(IL-2 dependent T cell)。NIH-3T3 細胞是小鼠纖維原母細胞(fibroblast)。

#### 2.1.2 小鼠胸腺、脾臟細胞

犧牲小鼠之後取小鼠胸腺及脾臟，於培養液中磨碎，置入離心管中離心，去除上清液，加入五毫升的 ACK buffer (RBC lysis buffer)，打散細胞以去除紅血球。紅血球去除完全後，將細胞打散於培養液中，用棉花球過濾細胞，以去除結締組織。脾臟細胞放入預先固定  $\alpha$ -mouse-IgM/IgG 抗體的十公分培養盤，室溫作用一小時，以去除大部分的 B 細胞，而得到純度約為 80%脾臟 T 細胞。

#### 2.1.3 細胞培養

DO11.10、A20 和 HT2 細胞株培養於含有 5% 胎牛血清、10  $\mu$ M glutamine、100 unit/ml 盤尼西林和 20 mM 二-硫基乙醇的 RPMI 1640 培養液。HT-2 細胞培養時需另外添加 10% 以 ConA 刺激過的大鼠脾臟細胞培養液(ConA supernatant)，依賴其中的介白素二以維持 HT-2 細胞的生長。新鮮取得的小鼠細胞培養於含有 10% 胎牛血清的培養液中。Phoenix 細胞以含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培養，其餘成分和 RPMI 相同。

## 2.2 藥品與試劑

Phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA)、PKH-26、carboxy-fluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFDA SE)、等藥品購自 Sigma ( St. Louis, MO )。Polybrene 購自 Calbiochem ( San Diego, CA )。Phenylmethanyl sulfonyl fluoride ( PMSF )、1,4-dithiothreitol ( DTT ) 和  $\beta$ -mercaptoethanol 購自 Merck ( Darmstadt, Germany )。TRIzol 試劑購自 Invitrogen ( Carlsbad, CA )。Methyl-[3H]-thymidine 和西方點墨測試劑購自 Amersham Bioscience ( Buckinghamshire, United Kindom )。PVDF 濾膜購自 Millipore ( Bedford, MA )。

## 2.3 抗體

Anti-paxillin 購自 Transduction Lab ( Lexington, KY )。Anti- $\beta$  tubulin 抗體購自 Upstate ( Lakeplacid, NY )。Anti-NFATc1 購自 ABR。Anti-NFATp 及 Anti-GAPDH 購自 Santa Cruz。Anti-lamin B1 購自 Zymed。PE-anti-mouse CD4 購自 eBioscience ( San Diego, CA )。FITC-anti-mouse CD8 購自 Caltag ( San Francisco, CA )。Anti-mouse polyvalent immunoglobulins 抗體購自 Sigma ( St. Louis, MO )。

## 2.4 質體構築

人類 paxillin 正常株和 Y118F 突變株的表現載體 pGEX2T-human paxillin WT、pBabe puro- paxillin Y118F 由 Dr. Sabe (Osaka University) 提供。

以聚合酶連鎖反應方式，分別設計引子將 paxillin 正常株上 p38 磷酸化位置

serine85 及 JNK 磷酸化位置 serine178 突變成 alanine(S85A,S178A)或 glutamic acid (S85E,S178E)。此外亦將此二胺基酸同時突變為 alanine 或 glutamic acid (S2A,S2E)。另外也設計引子在 paxillin Y118F 上另一 FAK 磷酸化位置 tyrosine 31 也突變成 phenylalanine，得到 Y2F。

聚合酶連鎖反應為 95°C 反應 3 分鐘，再以 20 循環進行 95°C 反應 1 分鐘→55°C 反應 2 分鐘→68°C 反應 20 分鐘，最後 68°C 反應 20 分鐘後，再以 Dpn I 限制酶分解模板 DNA 後，將聚合酶連鎖反應產物送到大腸桿菌體內，挑選正確的菌株。

## 2.5 質體 DNA 的轉染 (transfection)

### 2.5.1 Calcium phosphate 轉染法

進行轉染實驗前 16 小時，將 293 phoenix 細胞分盤。取 10  $\mu$ g 要進行轉染的質體 DNA 與滅菌水混合至總體積為 450 $\mu$ l，再加入 50 $\mu$ l 的 2.5M CaCl<sub>2</sub>。一面在 2×HBS 溶液中打入氣泡，一面緩慢加入均勻混合過的 500 $\mu$ l DNA/CaCl<sub>2</sub> 轉染溶液，最後劇烈混合 30 秒。將混合液置放在室溫 15 分鐘後，逐滴加入 Phoenix 細胞培養液。

### 2.5.2 反轉錄病毒感染法 (retroviral infection)

將反轉錄病毒載體的 DNA，以 calcium phosphate 轉染法送入 Phoenix 細胞，16 小時後，以 6 ml 含有 10 % 胎牛血清的 RPMI 1640 培養液置換原有的 DMEM 細胞培養液，再過 24 小時後，收集含有高濃度反轉錄病毒顆粒之上清液，並以 0.45  $\mu$ m 的濾膜過濾，去除可能含有的 Phoenix 細胞及細胞碎片。將 5×10<sup>5</sup> 個 DO11.10 細胞懸浮於 0.5 ml 的 RPMI 1640 培養液(含 5 % 胎牛血清)，加入 3 ml 含病毒的上清液，以及最後濃度為 5 $\mu$ g/ml 的 polybrene，均

勻混合後置於 6 凹槽培養盤中。以 1680 rpm 的轉速，在室溫下離心 45 分鐘後，將 6 凹槽培養盤置於 37 °C 的培養箱。經 6 小時，以新鮮的 RPMI 1640 培養液(含 5 % 胎牛血清)置換掉含有病毒的培養液。細胞持續培養約 48 小時，以流式細胞儀 FACS Vantage SE ( Becton Dickinson, Mountain View, CA)篩選表現 YFP (黃色螢光蛋白)的細胞。

## 2.6 西方點墨法 (Western blot)

將細胞萃取液以 SDS 聚丙醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE) 分析後，轉漬到 PVDF 濾膜。轉漬後的 PVDF 濾膜浸於含有 5 % 脫脂奶粉的潤洗緩衝液( 25 mM Tris pH 7.5、50 mM NaCl 和 10 mM EDTA)於室溫中搖盪約一小時。加入一次抗體，混合於 5 % 脫脂奶粉的潤洗緩衝液中。一次抗體稀釋倍數從 250 倍到 10000 倍不等。一次抗體於 4°C 隔夜作用，之後以含 0.05% Tween 20 之潤洗緩衝液浸洗濾膜 3 次，每次 15 分鐘。接著再加入結合山葵過氧化酶( Horseradish peroxidase, HRP)可辨識老鼠免疫球蛋白的二次抗體(500 到 4000 倍稀釋)。二次抗體於室溫作用 2 小時，再以含 0.05% Tween 20 之潤洗緩衝液浸洗濾膜 3 次，每次 15 分鐘。最後以 ECL 西方點墨測試劑處理 PVDF 濾膜，並置於底片下感光顯影。

## 2.8 IL-2 產量分析

利用 IL-2 依賴型細胞(HT-2)對於 IL-2 的增殖反應，來測定 T 細胞經活化後，其 IL-2 的產量。96 個凹槽的細胞培養盤預先吸附不同濃度的抗老鼠 CD3/CD28 抗體，隔夜以 1×生理緩衝溶液潤洗去除多餘未吸附的抗體。將表現 paxillin 突變蛋白的 DO11.10 細胞株，以每個凹槽十萬個細胞懸浮於 100  $\mu$ l，放入培養盤，最後每個凹槽體積為 200 $\mu$ l。將培養盤置於 37 °C 培養箱中培養 16 小時，取出封好，於 -80 °C 放置一小時以上，冷凍後回溫。將這些含 IL-2 的細胞培養液作適當濃度的稀釋，並於其他凹槽中連續稀釋已知濃度的老鼠 IL-2 作

為標準。

HT-2 細胞以不含胎牛血清的 RPMI 1640 潤洗三次，去除黏附細胞表面的 IL-2，於每個凹槽加入一萬顆 HT-2 細胞。在 37 °C 培養箱中培養 16 到 24 小時，觀察細胞死亡程度達 70-80 % 時，每個凹槽加入 0.5  $\mu$ Ci 的 [3H]- thymidine，繼續培養 4 小時。最後以 96 凹槽細胞收集器 (Packard) 收集細胞，細胞的 DNA 會固定在玻璃纖維濾膜上。待濾膜乾燥後，以  $\beta$  粒子計數器 (Packard) 測量 [3H]- thymidine 併入 DNA 的含量，即可反映 HT-2 細胞分裂生長的快慢。將 IL-2 標準品的放射線讀值做成回歸曲線，可將各實驗組的放射線讀值，換算成培養液中所含 IL-2 的濃度。

## 2.8 Wound-healing assay

在六公分培養盤中加入 1 ml 的 fibronectin (20  $\mu$ g/ml)，在 4°C 放置隔夜後吸去未吸附的 fibronectin。將  $1 \times 10^6$  顆表現有 paxillin 突變株的 NIH-3T3 細胞懸浮在 DMEM 培養液，加入培養盤中使其均勻貼附。約十二小時細胞長滿成 confluent monolayer 狀態時，利用 yellow tip 小心刮出一條界線，利用 LEICA-DM-IRB time-lapse microscopy 觀察細胞生長情形，並每三十分鐘拍攝影像。

## 2.9 Conjugation assay

### 2.9.1 細胞染色

將欲進行分析的 DO11.10 細胞株以生理緩衝溶液潤洗一次，調整細胞濃度為  $1 \times 10^7$  / ml，再加入最後濃度為 50 nM 的 CF SE，均勻混合後於 37 °C 避光反應 15 分鐘。接著以生理緩衝溶液潤洗細胞一次，加入含 5 % 胎牛血清的 RPMI 1640 培養液，於 37°C 避光反應 30 分鐘，以固定染劑。A20 細胞株以生理緩衝溶液潤洗一次，利用 PKH-26 Red Fluorescent Cell Linker Kit 中的 Diluent C，調整細胞

濃度為  $2 \times 10^7$ /ml，再加入等體積的  $8 \mu\text{M}$  PKH-26 染劑(以 Diluent C 稀釋)。細胞與染劑均勻混合後，於  $25^\circ\text{C}$  反應 5 分鐘，再加入 2% BSA 在  $25^\circ\text{C}$  作用 1 分鐘，以終止反應。最後用含 5% 胎牛血清的 RPMI 1640 培養液，潤洗細胞三次。

### 2.9.2 細胞結合

先將上述已標定好染劑的 A20 細胞株，於  $37^\circ\text{C}$  培養箱中與 OVA 胜肽反應 30 分鐘。接著加入標定顏色的 DO11.10 細胞株，兩種細胞以 1 比 1 的比例混合，各  $1 \times 10^5$  個細胞。最後反應體積為  $200 \mu\text{l}$ ，OVA 胜肽濃度  $10 \mu\text{g/ml}$ 。於  $37^\circ\text{C}$  培養箱中反應 1 小時，以流式細胞儀收集並分析同時帶有兩種螢光的細胞佔所有 T 細胞的比例。每個實驗都是二重複的平均值，並估算其標準誤差。

### 2.10 全細胞萃取液 (total cell lysate) 的製備

收集處理後的細胞，以磷酸生理溶液潤洗一次之後，用 RIPA lysis buffer (含 1% Triton X-100; 50 mM Tris, pH 7.5 ; 200 mM NaCl; 0.5% deoxycholate; 0.1% SDS; 1 mM EDTA) 溶解細胞，並在冰上靜置三十分鐘，之後以微量離心機離心(13000 rpm)十分鐘，以去除不溶物，所得上清液即為全細胞萃取液，可直接分析或暫存於  $-80^\circ\text{C}$  冰箱。

### 2.11 核萃取液 (nuclear extract) 的製備

收集處理後的細胞，以磷酸生理溶液潤洗一次後輕輕拍散，加入冰的 NP-40 低張溶液 (含 10 mM Tris, pH 7.5 ; 10 mM NaCl; 3 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0.25% NP-40)，在冰上靜置三分鐘半，此時細胞膜會因滲透壓而脹破，但細胞核仍維持完整。之後以微量離心機離心三分鐘(3600 rpm) 收取細胞核，而上清液即為細胞質之萃取液。將細胞核以不含 NP-40 之低張溶液潤洗一次，去除殘餘的細胞質之後，即可以 RIPA

細胞溶解液溶解，離心所得上清液即為核萃取液。

## 2.12 Adhesion assay

本實驗方法主要是參考 Current Protocols in Cell Biology 9.1.1-9.1.11

(J.Humpharies, 1998)。預先在九十六孔細胞培養盤上吸附 20  $\mu\text{g/ml}$  的 fibronectin 或 5  $\mu\text{g/ml}$  的 ICAM-I，在 4°C 隔夜後以 PBS 洗去未吸附的 fibronectin 或 ICAM-I。之後加入 2% 的 heat-denatured BSA，在 37°C 培養箱放置兩小時，以避免非專一性的細胞吸附。

將 DO11.10 細胞或新鮮分離的小鼠 T 細胞用 CFSE 標定之後懸浮在 migration medium 中，每個凹槽加入五萬顆 DO11.10 細胞或十五萬顆小鼠 T 細胞，再分別利用不同濃度之 TPA 或 biotin-anti-CD3 及 streptavidin 活化。在 37°C 培養箱靜置一小時(DO11.10)或三小時(小鼠 T 細胞)後，利用回溫的 migration medium 小心洗去未黏附的細胞，再利用 96-well cytofluoro-reader 讀取吸光值(excitation:480 nm / emission:535 nm)，並計算細胞貼附在培養盤上的比例。

## 2.13 Chemotaxis assay

本實驗利用孔徑為 5  $\mu\text{m}$  之 transwell plate (Costar) 分析細胞遷移的能力。將 DO11.10 細胞或新鮮分離的小鼠 T 細胞用 CFSE 標定之後懸浮在 migration medium 中，在 transwell plate 的上層加入  $1 \times 10^6$  個細胞，下層則加入不同濃度之 SDF-1a，在 37°C 培養箱放至三小時之後，收集移動至下層的細胞，離心之後重新懸浮在 100  $\mu\text{l}$  的培養液中，利用 96-well cytofluoro-reader 讀取吸光值並換算成相對之細胞數，以計算細胞移動的比例。



## 2.16 建立 CD2-paxillin S178A/S85A 基因轉殖鼠

將 paxillin 的 JNK/p38MAPK 雙磷酸化位置突變的基因片段(1.7 kb)接入 CD2 基因轉殖載體(14 kb)後，以 Cla I 與 Sac II 限制酶，切出含 CD2 啟動子(5.5 kb)、paxillin S178A/S85A(1.7 kb)及 CD2 enhancer (5.7 kb)的基因片段(12.9 kb)，委託中研院分子生物研究所轉殖基因老鼠中心，將此基因片段以顯微注射注入 B6 小鼠受精卵。

### 2.14.1 Genomic DNA 測試

#### 2.14.1.1 純化小鼠之 Genomic DNA

為了篩選有表達 paxillin transgene 的小鼠，在小鼠三至四周大時，剪約 0.2-0.3 公分的小鼠尾巴，加入 600  $\mu$ l 的 50 mM NaOH，於沸水中加熱三十分鐘，再加入 50  $\mu$ l 之 1M Tris 溶液(pH=8.0)，於室溫離心 14000 rpm，十五分鐘，去除不溶物，即可得到含有小鼠 genomic DNA 之上清液。

#### 2.14.1.2 篩選待有轉殖基因之小鼠

為了確認轉殖基因是否有成功嵌入小鼠之染色體，取其中 2  $\mu$ l 進行聚合酶連鎖反應。反應總體積 50  $\mu$ l，含 0.2 mM dNTP、0.5  $\mu$ l Taq DNA 聚合酶、0.4  $\mu$ M 正向及反向引子。使用正向引子為 paxillin 專一性的引子，序列 ACAAGCAGAAATCAGCT。反向引子為 CD2 載體專一性的引子，序列 GTAGCCAGCTTCCTTCTGAT。聚合酶連鎖反應為 95 $^{\circ}$ C 反應五分鐘，再以 35 循環進行 95 $^{\circ}$ C 反應 1 分鐘 $\rightarrow$  55 $^{\circ}$ C 反應 2 分鐘 $\rightarrow$  72 $^{\circ}$ C 反應 2 分鐘，最後 72 $^{\circ}$ C 再反應 5 分鐘，以 4 $^{\circ}$ C 保存。

聚合酶連鎖反應完成後，取 10  $\mu$ l 的反應溶液，以 agarose 電泳分析確認 CD2-paxillin S178A/S85A 的 DNA 是否有嵌入基因轉殖鼠的 genomic DNA 之中。基因轉殖鼠的 genomic DNA 確實有嵌入 CD2-paxillin S178A/S85A DNA 的小鼠，進一步採血測試是否有 mRNA 的表現。

#### 2.14.2.1 RNA 的純化

待分析之小鼠先以聚光燈照射 5 分鐘，使體溫上升促進血液循環。固定小鼠後，以刀片輕劃破尾巴側面血管，將血液滴入含有紅血球溶解液的離心管，取 5 到 10 滴血液進行分析。紅血球溶解後離心，將得到的細胞以 1 ml TRIzol 試劑均質化，室溫反應 5 分鐘，加入 0.2 ml 氯仿(chloroform)後震盪 15 秒，並於室溫反應 3 分鐘。再於 4  $^{\circ}$ C 以 12000 $\times$ g 離心 15 分鐘，取含 RNA 的上層無色水層置入另一乾淨離心管，加入 0.5 ml isopropyl alcohol 均勻混合。室溫反應 10 分鐘，再於 4 $^{\circ}$ C 以 12000 $\times$ g 離心 10 分鐘，可在管壁觀察到析出的 RNA。以 75 % 的酒精潤洗析出的 RNA，於 4  $^{\circ}$ C 以 7500 $\times$ g 離心 5 分鐘，去除上清液，將析出的 RNA 風乾置半透明，回溶於 20  $\mu$ l 的滅菌水(預先以 DEPC 處理過)。

#### 2.14.2.2 反轉錄與聚合酶連鎖反應(RT-PCR)

取 2  $\mu$ g 的 RNA 加入 1  $\mu$ l 的 oligo dT 引子(100ng/ml)，補水至最後體積為 11.5  $\mu$ l。於 65 $^{\circ}$ C 反應 5 分鐘，置冰上冷卻。加入 5  $\mu$ l first strand 緩衝液、0.5  $\mu$ l RNasin (40 U/ml)、1  $\mu$ l 10mM dNTP 與 1  $\mu$ l MMLV-RT (50U/ml)，混合均勻並補水至最後體積為 20  $\mu$ l。於 37  $^{\circ}$ C 反應 1 小時，再置於 75  $^{\circ}$ C 作用 5 分鐘終止反應，得到 cDNA 樣品溶液。取 5  $\mu$ l cDNA 樣品溶液，進行聚合酶連鎖反應。

反應總體積 25  $\mu$ l，含 0.2 mM dNTP、0.25 $\mu$ l Taq DNA 聚合酶、0.4  $\mu$ M 正向及反向引子。使用正向引子為 paxillin 專一性的引子，序列 AACAAAGCAGAAATCAGCT。反向引子為 CD2 載體專一性的引子，序列 GTAGCCAGCTTCCTTCTGAT。聚合酶連鎖反應為 95°C 反應五分鐘，再以 35 循環進行 95°C 反應 1 分鐘→ 55°C 反應 2 分鐘→ 72°C 反應 2 分鐘，最後 72°C 再反應 5 分鐘，保存於 4°C。再以 agarose 電泳分析確認，基因轉殖鼠是否有 CD2- paxillin S178A/S85A 的 mRNA 表現。

## 2.17 CD2-paxillin S178A/S85A 基因轉殖鼠之分析

取小鼠胸腺、脾臟與淋巴結後，於培養液中磨碎，置入離心管中離心，去除上清液，以五毫升的紅血球溶解液打散細胞，在 4°C 中作用五分鐘後離心。紅血球去除完全後，將細胞打散於培養液中，以棉花球過濾細胞，去除結締組織。胸腺及淋巴結細胞懸浮於培養液中置冰上備用。

脾臟細胞則放入預先固定  $\alpha$ -mouse-IgM 及  $\alpha$ -mouse-IgG 抗體的十公分培養盤，室溫作用一小時，以去除大部分的 B 細胞，得到純度約為 80% 之脾臟 T 細胞。

在本研究中，主要分析小鼠之 T 細胞受到不同濃度之 anti-CD3/CD28 刺激後的增生程度，轉錄因子 NFAT 進入細胞核的情形，和活化產生 IL-2, IL-4 及 IFN-gamma 的量。

### 2.15.2.3 T 細胞增殖分析

小鼠胸腺細胞以每個凹槽 80 萬顆置於 96 凹槽培養盤，或純化過的脾臟 T 細胞以每個凹槽 40 萬顆置於 96 凹槽培養盤，以不同濃度的固定式抗 CD3 抗體加上抗 CD28 抗體活化。於 37 °C 培養箱中培養 48 小時後，每個凹槽加入 0.5  $\mu$ Ci 的 [3H]-thymidine，繼續培養 4 小時。最後以 96 凹槽細胞收集器 (Packard) 收集細胞，並以 95 % 的酒精打破細胞，細胞的 DNA 會固定在玻璃纖維濾膜上。待濾膜乾燥後，以  $\beta$  粒子計數器 (Packard) 測量 [3H]- thymidine 併入 DNA 的含量，即可反應小鼠 T 細胞分裂生長的快慢。每個實驗都是二重複的平均值，並估算其標準誤差。

#### 2.15.2.4 IL-2 產量分析

將上述方式活化之小鼠胸腺細胞或純化過的脾臟 T 細胞，於 37 °C 活化 24 小時後，吸取一半的培養上清液，置入一乾淨的 96 凹槽培養盤中，封好並於 -80 °C 放置一小時以上，冷凍後回溫。測量培養液中所含 IL-2 的濃度方法如前所述。每個實驗都是二重複的平均值，並估算其標準誤差。

#### 2.15.2.3 細胞表面染色分析

新鮮取得的小鼠胸腺細胞或脾臟細胞，懸浮於細胞染色液 (含 1% 胎牛血清的生理緩衝液) 中，每個樣品取  $1 \times 10^6$  個細胞置於 V 形底的 96 凹槽培養盤中。針對所要分析的細胞表面抗原，加入細胞表面抗體溶液。細胞表面抗體最後濃度為 200 倍稀釋，於 100  $\mu$ l 中進行細胞染色。在 4 °C 避光作用 1 小時，再以細胞染色液潤洗細胞 5 次，去除多餘未結合的抗體。最後將細胞懸浮於 200  $\mu$ l 細胞染色液，以流式細胞儀分析細胞表面抗原的表現情形。

### 第三章 研究結果

#### 3.1 表現 paxillin 磷酸化位置突變株對 T 細胞活化時產生 IL-2 能力之影響

延續本實驗室之前的研究，爲了探討 paxillin 的磷酸化在 T 細胞活化所扮演的角色，我們在 DO11.10 細胞株建立大量表現 paxillin 突變蛋白的細胞株。我們針對 JNK、p38 MAPK 及 FAK 磷酸化 paxillin 的位置，分別將 paxillin 的第 178 個 serine、第 85 個 serine 和第 31 及第 118 個 tyrosine 突變成無法被磷酸化的 alanine 及 phenylalanine(圖四)。

我們將這些 paxillin 突變株放入反轉錄病毒的 DNA 載體(pGC-YFP)，將質體以 calcium phosphate 轉染法送入反轉錄病毒包被細胞 Phoenix 中，利用帶有 paxillin 突變基因的反轉錄病毒感染 DO11.10 細胞，48 小時之後，利用 FACS Vantage SE 收集表現 YFP 的細胞，即為穩定表現 paxillin 不同磷酸化位置突變蛋白的 DO11.10 突變株。分別收集 YFP 細胞或 paxillin 突變細胞株的細胞萃取液，利用西方點墨法確認 paxillin 突變蛋白的表現(圖七)。

首先我們檢測這些細胞株產生 IL-2 的能力，做為其 T 細胞活化是否受到影響的指標。利用不同濃度的 anti-CD3/CD28 抗體活化表現各種 paxillin 磷酸化位置突變的 T 細胞株，並測量細胞培養液中 IL-2 的含量。

表現 JNK/p38MAPK 磷酸化位置突變 paxillin(S178A/S85A,S2A)的 T 細胞株，在利用不同濃度 anti-CD3/CD28 抗體活化時，產生 IL-2 的量和對照組 YFP 細胞

相比，大約減少 50 % 到 60 % (圖九)。但表現 FAK 磷酸化位置突變(Y31F/Y118F, Y2F)的 T 細胞株，產生 IL-2 的量和對照組 YFP 並無明顯差異。

因為 JNK 及 p38 MAPK 磷酸化 paxillin 為 T 細胞活化所必須，我們也另外建立了將 paxillin 的第 178 及第 85 個 serine 突變成 glutamic acid 的突變株，藉此模擬被磷酸化的 paxillin。但是不同於我們的預期，表現這些模擬活化態 paxillin 突變株的細胞產生 IL-2 的能力相較於 YFP 細胞並無明顯增加(圖八)。

### 3.2 Paxillin 的 JNK/p38MAPK 磷酸化位置突變會影響轉錄因子 NFAT 的進核

IL-2 的產生是 T 細胞活化的主要特徵，而此過程受到許多不同轉錄因子的調控(圖二)。而在本實驗室先前的研究中發現，當利用 anti-CD3/CD28 抗體活化表現 paxillin S2A 突變株的 DO11.10 細胞，可觀察到細胞核內 NFATp 及 NFATc 的量減少，而這可能就是導致 S2A 細胞無法產生大量 IL-2 的原因。


為了釐清 paxillin 的磷酸化情形對於轉錄因子 NFAT 進核的影響，我們利用 anti-CD3/CD28 (5/2.5  $\mu\text{g/ml}$ ) 抗體活化 DO11.10 細胞，在不同時間點收取細胞核及細胞質的萃取液，利用西方點墨法分析 NFAT 在細胞核內外的分布情形。

在 T 細胞活化後 20 及 40 分鐘，觀察到同時表現 p38/JNK 磷酸化位置 paxillin 突變株之細胞(S2A)，其核內 NFATp 明顯減少，但在細胞質中 NFATp 的量則無明顯差異。表現單一磷酸化位置 paxillin 突變株之細胞及表現 FAK 磷酸化位置 paxillin 突變株之細胞核內外 NFATp 的量皆無明顯差異(圖十)。

同樣地，在 T 細胞活化後 2 小時及 4 小時也同樣觀察到類似的現象：同時表現 p38/JNK 磷酸化位置 paxillin 突變株之細胞(S2A)，其核內 NFATc 明顯減少，但在細胞質中 NFATc 的量則無明顯差異。表現單一磷酸化位置 paxillin 突變株之細胞及表現 FAK 磷酸化位置 paxillin 突變株之細胞核內外 NFATc 的量皆無明顯差異(圖十一)。

根據以上結果我們可以得知，只有在同時將 paxillin 的 p38 及 JNK 磷酸化位置加以突變，才會使得細胞核內 NFATp 及 NFATc 的量減少，而此現象也和這些 paxillin 突變株產生 IL-2 的趨勢一致，也暗示 NFAT 的進核受影響可能就是導致 S2A 細胞 IL-2 產量減少的主因。

### 3.3 表現 paxillin 磷酸化位置突變株不影響細胞的黏附(adhesion)



Paxillin 是 focal adhesion complex 的組成之一，也有許多文獻指出 paxillin 對於細胞 integrin 黏附至其基質的能力相當重要。在本實驗中，我們利用不同濃度之 TPA 活化 DO11.10 細胞，觀察其黏附至 fibronectin 的能力。表現各種 paxillin 突變蛋白的 DO11.10 細胞相較於對照組 YFP 細胞，其黏附至 fibronectin 的比例並無明顯差距(圖十二)。利用另一種基質 ICAM-I 進行本實驗我們也得到類似的結果。

Paxillin 是 TCR 下游的轉接蛋白，而 TPA 可不經 TCR 而直接非專一性的活化 T 細胞。我們認為利用 TPA 活化可能並不適合用於觀察 paxillin 對 T 細胞黏附的影響，因此改用 anti-CD3-biotin 抗體活化細胞，並利用 streptavidin 進行 cross-link。但是當利用不同濃度之 anti-CD3 活化 DO11.10 細胞，表現 paxillin 突變蛋白的 DO11.10 細胞相較於對照組 YFP 細胞，其黏附至 fibronectin 的比例仍

然無明顯差距(圖十三)。

### 3.4 表現 paxillin FAK 磷酸化位置突變株會抑制細胞的遷移

我們進一步分析當表現各種 paxillin 突變株的 DO11.10 細胞受到 SDF-1 $\alpha$  刺激時，遷移(chemotaxis)的能力是否受到影響。利用不同濃度之 SDF-1 $\alpha$  刺激 DO11.10 細胞，利用 transwell 培養盤觀察其移動的能力。表現 paxillin FAK 磷酸化位置突變蛋白的 DO11.10 細胞相較於對照組 YFP 細胞，其移動的比例降低，但表現 JNK/p38 磷酸化位置突變蛋白的組別則無明顯差距(圖十四)。

### 3.5 表現 Paxillin 磷酸化位置突變株不影響 T 細胞與 B 細胞的結合

T 細胞與目標細胞作用時，於兩細胞接觸的區域會形成 immunological synapse 的構造。包括中心區域會有 TCR-MHC 複合物和其他分子聚集以傳遞訊息，周圍則是黏著分子(adhesion molecule)所形成的環狀構造。Integrin 是 T 細胞上重要的黏著分子，和目標細胞上的 ICAM-1 結合，能幫助 immunological synapse 穩定的形成。由於 paxillin 是 integrin 下游重要的分子，在 T 細胞被抗原呈獻細胞活化時，會聚集在 synapse 的位置，而且 MAP kinase 可以調控 paxillin 和 FAK 的結合。所以想探討在細胞中大量表現 paxillin 磷酸化位置的突變蛋白，是否會影響 synapse 形成，而造成 T 細胞和 B 細胞結合能力受影響。將穩定表現不同 paxillin 單一磷酸化位置突變蛋白的 T 細胞株，和對照組 YFP 細胞，以綠色螢光染劑 CFSE 標記，B 細胞 A20 以紅色螢光染劑 PKH-26 標記。DO11.10 T 細胞和 B 細胞在有無特定抗原 OVA (323-339) 胜肽(10  $\mu$ g/ml)，在 37  $^{\circ}$ C 培養箱中作用 1 小時，接著以流式細胞儀分析 T 細胞和 B 細胞結合的情形。在上機分析前，先震盪數秒以去除非專一性結合的細胞。比較表現不同



paxillin 單一磷酸化位置突變蛋白的 T 細胞株，和對照組 YFP 的 T 細胞之間，其抗原主導的 B 細胞結合的程度並沒有明顯的差異(圖十五)。此結果顯示在 DO11.10 中表現 paxillin 單一磷酸化位置突變蛋白並不影響其與 B 細胞的結合。

### 3.6 Paxillin 磷酸化位置突變株會影響 NIH-3T3 移動的能力

在前述實驗中，我們發現表現 paxillin 磷酸化位置突變株對於 DO11.10 細胞的黏附和移動並沒有明顯的影響，和文獻中的研究結果也相牴觸；由於 T 細胞是一種懸浮細胞，其移動的特性也和一般細胞不同，我們猜測 paxillin 在 T 細胞及非 T 細胞中或許扮演不同角色，因此我們需要建立一個非 T 細胞的實驗系統，進一步釐清 paxillin 對於細胞黏附及移動能力的影響。

由於有研究指出 paxillin 對於上皮細胞的移動相當重要，我們選用纖維原母細胞 (NIH3T3) 進行此實驗。利用帶有 paxillin 突變基因的反轉錄病毒感染 NIH3T3 細胞，48 小時之後，利用 FACS Vantage SE 收集表現 YFP 的細胞，即為穩定表現 paxillin 不同磷酸化位置突變蛋白的 NIH3T3 突變株。分別收集 YFP 細胞或 paxillin 突變細胞株的細胞萃取液，利用西方點墨法確認 paxillin 突變蛋白的表現(圖十六)。

接著我們利用 wound-healing assay 分析 NIH3T3 細胞移動的能力。在六公分培養盤中加入 1 ml 的 fibronectin (20  $\mu\text{g/ml}$ )，在 4°C 放置隔夜後吸去未吸附的 fibronectin。將  $1 \times 10^6$  顆表現有 paxillin 突變株的 NIH-3T3 細胞懸浮在 DMEM 培養液，加入培養盤中使其均勻貼附。約十二小時細胞長滿成 confluent monolayer 狀態時，利用 yellow tip 小心刮出一條界線，利用 LEICA-DM-IRB time-lapse microscopy 觀察細胞生長情形，並每三十分鐘拍攝影像。相較於對照組細胞

YFP，不論是表現 S85A, S178A, S2A, Y2F 之細胞，其移動能力皆明顯降低(圖十七)。

### 3.7 建立 paxillin 的 JNK/p38MAPK 雙磷酸化位置突變的基因轉殖小鼠

為了進一步了解 paxillin 在正常 T 細胞中所扮演的角色，所以於 FVB 與 B6 小鼠建立表現 paxillin 的 JNK/p38MAPK 雙磷酸化位置突變的基因轉殖小鼠。將 paxillin 的 JNK/p38MAPK 雙磷酸化位置突變的基因片段(1.7 kb)接入 CD2 基因轉殖載體(14 kb)後，以 Cla I 與 Sac II 限制酶，切出含 CD2 啟動子(5.5 kb)、paxillin S178A/S85A(1.7 kb)及 CD2 enhancer (5.7 kb)的基因片段(12.9 kb)(圖 13 A)，委託中研院分子生物研究所轉殖基因老鼠中心，將此基因片段以顯微注射注入 FVB 與 B6 小鼠受精卵。



### 3.8 Paxillin 的 JNK 和 p38MAPK 雙磷酸化位置突變的基因轉殖小鼠 T 細胞數量與發育之分析

我們首先分析基因轉殖小鼠的胸腺及脾臟細胞發育是否異常。將小鼠胸腺或脾臟的細胞取出，懸浮於培養液，以細胞計數器計算細胞數目。結果，基因轉殖小鼠和同胎對照小鼠相比，胸腺或脾臟細胞數目大致相當(圖十八)。

接著我們進一步分析基因轉殖小鼠之 T 細胞發育的情形有無差異。以 PE-anti-CD4 和 FITC-anti-CD8 進行小鼠胸腺細胞及脾臟 T 細胞的染色。圖為流式細胞儀分析的結果。每個樣本收 10000 個細胞，數字代表各族群細胞的比例。

基因轉殖小鼠之 CD4 和 CD8T 細胞之比例和同胎小鼠相比並無明顯差異(圖十九)。

### 3.9 表現 paxillin S178A/S85A 雙磷酸化位置突變蛋白的基因轉殖小鼠的胸腺細胞和脾臟細胞經活化後，細胞增生及 IL-2 的分泌量減少

在前面的實驗中，我們發現在 DO11.10 細胞大量表現 paxillin S178A/S85A 雙磷酸化位置突變蛋白，會抑制細胞在活化後產生 IL-2(圖九)。在 paxillin S178A/S85A 雙磷酸化位置突變的基因轉殖小鼠中，也同樣去分析正常 T 細胞活化是否受到影響。以 IL-2 的分泌量和 T 細胞的增生作為活化程度的指標。

新鮮取得的小鼠胸腺細胞以不同濃度的 anti-CD3 和 anti-CD28 共同活化 (5:2  $\mu\text{g/ml}$  及 2:0.8  $\mu\text{g/ml}$ ) 24 小時，收集培養細胞的一半上清液，分析其中 IL-2 的含量。再將細胞繼續培養，活化 48 小時的時候，加入 0.5  $\mu\text{Ci}$  的  $[^3\text{H}]$ -thymidine，繼續培養 4 小時後，收細胞並分析  $[^3\text{H}]$ -thymidine 併入 DNA 的含量，即可反應小鼠 T 細胞增生的快慢。

T 細胞增生的分析中，以不同濃度的 anti-CD3 和 anti-CD28 共同活化，paxillin S178A/S85A 基因轉殖小鼠的胸腺及脾臟細胞增生比其同胎對照小鼠皆明顯減少(圖二十)。

T 細胞活化時產生 IL-2，並誘導 IL-2 受體產生，促進細胞本身的增殖。除了細胞的增生外，細胞分泌 IL-2 的量也是 T 細胞活化的重要指標。分析 paxillin S178A/S85A 基因轉殖小鼠的胸腺細胞及脾臟 T 細胞分泌 IL-2 的量，結果發現和同胎對照小鼠相比，以不同濃度的 anti-CD3 和 anti-CD28 共同活化，paxillin

S178A/S85A 基因轉殖小鼠的 T 細胞分泌 IL-2 的量都明顯降低 (圖二十一)。

綜合上述實驗結果，paxillin S178A/S85A 基因轉殖小鼠和同胎對照小鼠相比，胸腺細胞及脾臟 T 細胞，在 anti-CD3 和 anti-CD28 共同活化下，基因轉殖小鼠細胞的增生及分泌 IL-2 的量都明顯減少。

### 3.10 表現 paxillin S178A/S85A 雙磷酸化位置突變蛋白的基因轉殖小鼠之 T 細胞經活化後黏附及遷移的能力皆不受影響

DO11.10 細胞是 T 細胞融合瘤，其特性可能還是和正常 T 細胞有所差異，並不足以證明 paxillin 並不影響 T 細胞的黏附及遷移，因此我們也利用小鼠的 T 細胞進行類似的實驗。

如前所述，以 TPA 刺激小鼠胸腺細胞或脾臟 T 細胞( $5 \times 10^5$  個細胞/sample)。與同胎對照小鼠相比，基因轉殖小鼠的胸腺細胞或脾臟 T 細胞活化後黏附(adhesion)至 fibronectin 之能力並無明顯差異(圖二十二)。同樣的，利用不同濃度之 SDF-1 $\alpha$  刺激 DO11.10 細胞，利用 transwell 培養盤觀察其移動的能力。與同胎對照小鼠相比，基因轉殖小鼠的胸腺細胞活化後遷徙(migration)之能力也沒有觀察到明顯差異(圖二十三)。

### 3.11 表現 paxillin S178A/S85A 雙磷酸化位置突變蛋白的基因轉殖小鼠之 T 細胞經活化後，細胞核內 NFAT 轉錄因子的量減少

在先前的實驗中，我們觀察到當利用 anti-CD3/CD28 抗體活化表現 paxillin S2A

突變株的 DO11.10 細胞，可觀察到細胞核內 NFATp 及 NFATc 的量減少。而在基因轉殖小鼠中，其 T 細胞的增生及產生 IL-2 的能力也都受到抑制，因此我們猜測在小鼠的 T 細胞中轉錄因子 NFAT 的活化可能也受到抑制。

利用 anti-CD3/CD28 (10/5  $\mu\text{g/ml}$ ) 抗體活化小鼠 T 細胞，在不同時間點收取細胞核及細胞質的萃取液，利用西方點墨法分析 NFAT 在細胞核內外的分布情形。基因轉殖小鼠的 T 細胞經 anti-CD3/CD28 活化 20 及 40 分鐘之後，其核內 NFATp 相較於同胎對照小鼠明顯減少(圖二十四)。

同樣地，在 T 細胞活化後 2 小時及 4 小時也同樣觀察到類似的現象：與同胎對照小鼠相比，基因轉殖小鼠的 T 細胞經 anti-CD3/CD28 活化之後，其核內 NFATc 明顯減少，在細胞質中則無明顯差異(圖二十五)。

### 3.12 表現 paxillin S178A/S85A 雙磷酸化位置突變蛋白的基因轉殖小鼠之 T 細胞經活化後，產生之 IFN- $\gamma$ 及 IL-4 的量減少

NFAT 是免疫系統當中相當重要的轉錄因子，可調控多種細胞激素(cytokine)的分泌，進而影響 T 細胞的分化(differentiation)。在前面的實驗我們發現，基因轉殖小鼠之 T 細胞經活化後，細胞核內 NFAT 轉錄因子的量減少，也代表其下游基因的表現量可能受到影響。因此，我們希望進一步分析，在基因轉殖小鼠之 T 細胞中，除了 IL-2 之外，產生其他受 NFAT 調控之細胞激素如 IFN-g 及 IL-4 的產生是否受到影響。

96 個凹槽的細胞培養盤預先吸附不同濃度的抗老鼠 CD3/CD28 抗體，隔夜以  $1\times$  生理緩衝溶液潤洗去除多餘未吸附的抗體。在每個凹槽中加入 80 萬顆小鼠胸

腺細胞或 40 萬顆純化過的脾臟 T 細胞以，活化兩天之後，以 ELISA 測量培養液中 IFN-gamma 含量。可觀察到基因轉殖小鼠的胸腺細胞及脾臟 T 細胞在 TCR 刺激下，細胞分泌的 IFN-gamma 量相較於同胎對照小鼠減少(圖二十六)。

因為 IL-4 需要經過兩次 TCR 刺激才會產生，我們選用另一種培養方式：脾臟 T 細胞以 anti-CD3 與 anti-CD28 共同活化兩天之後，取活化細胞以外加 IL-2(10U/ml)之 RPMI 培養三天，再次利用不同濃度之 anti-CD3 與 anti-CD28 共同活化，以 ELISA 測量培養液中 IFN-gamma 及 IL-4 含量。基因轉殖小鼠的脾臟 T 細胞在 TCR 刺激下，細胞分泌的 IFN-gamma 及 IL-4 的量皆減少(圖二十七)。



## 第四章、結果討論

T細胞的活化受到極複雜而精密的調控，當T細胞受體和抗原結合，會啟動一連串的訊息傳遞，而使得細胞核內活化相關的基因表現。近年來有愈來愈多研究指出，轉接蛋白(adaptor protein)在此過程中扮演相當重要的角色。轉接蛋白雖然不具有酵素活性，但能做為支架(scaffold)而同時和多個訊息傳導分子結合，將訊息加以整合，並幫助各蛋白移動至適當的位置，使細胞得以有效的活化。

在本研究中，我們利用表現不同磷酸化位置突變的 paxillin，研究轉接蛋白 paxillin 的磷酸化在 T 細胞活化中扮演的角色。在收到來自 T 細胞受體(T cell receptor) 的訊息時，JNK 及 p38 MAPK 會被活化，進而磷酸化 paxillin。我們發現，當同時阻斷 JNK 及 p38 MAPK 對 paxillin 的磷酸化，會抑制轉錄因子 NFAT 進入細胞核，並使細胞產生 IL-2、IFN- $\gamma$ 、IL-4 等細胞激素的能力降低，而導致 T 細胞的活化受到抑制。

NFAT 進入細胞核的過程主要受到細胞中鈣離子濃度的調控。當 T 細胞被活化，會使得內質網釋出鈣離子，鈣離子會和攜鈣素(calmodulin)合作活化去磷酸酶 calcineurin，進而將 NFAT 的 serine 去磷酸化，使 NFAT 進入細胞核，活化下游基因。但是在我們的實驗中，表現 paxillin S2A 的 DO11.10 細胞之 calcium influx 只有約 15% 的下降(An-yun Chan, unpublished data)，並不足以解釋為何 IL-2 的產量會明顯下降，這也暗示可能 paxillin 是經由另一條和鈣離子不相關的途徑調控 NFAT 的活化。

除了 calcineurin 的活性，還有許多其他機制可調控 T 細胞活化後核內 NFAT 的

量，包括 NFAT mRNA 的穩定性(stability) 或被轉譯(translation)的量，以及 NFAT 蛋白本身的穩定性等。但從我們西方點墨法的實驗結果，各種表現 paxillin 突變株的細胞被活化之後細胞質內 NFAT 量並沒有明顯差異，代表細胞本身合成 NFAT 的能力並不受影響，因此我們可以初步排除前兩種可能性。另外，NFATp 在細胞活化之前就已經大量存在細胞質，在接受到活化訊息之後才會進入核內。若是 NFATp 進核的過程受到抑制，應該可在細胞質中觀察到較多量的 NFATp。然而，雖然表現 paxillin S2A 的 DO11.10 細胞在活化後細胞核內的 NFATp 減少，但我們並沒有觀察到 NFATp 有累積在細胞質中(圖十)。因此，表現 paxillin S2A 的細胞究竟是經由抑制 NFAT 進核或是影響 NFAT 的穩定性而使細胞核內 NFAT 減少，有待進一步實驗的釐清。

目前我們並沒有足夠的證據可解釋 paxillin 的磷酸化是如何調控 T 細胞的活化。由於 paxillin 在 JNK 或 p38MAPK 磷酸化位置的單一突變並不影響 T 細胞的活化，除了可能是藉其他位置磷酸化傳遞訊息的補償(compensation)使細胞正常活化，亦有可能是因為 JNK 及 p38 MAPK 磷酸化的 paxillin 會產生構型(conformation)改變而形成一特殊的結合位置，藉由招募某個未知的蛋白質而影響到細胞核內 NFAT 轉錄因子的量，並改變下游基因的表現，這也是我們目前認為最有可能的假設。

雖然 paxillin 的磷酸化為 T 細胞活化所必須，但在我們的研究結果中，paxillin 的磷酸化對於 T 細胞的黏附、移動以及和 B 細胞結合的能力並沒有明顯的影響，對於這個現象我們有幾種可能的解釋。首先，T 細胞的黏附過程受到非常精密且細微的調控，且 T 細胞可表現至少 12 種由不同  $\alpha/\beta$  單元組合而成的 integrin。雖然我們的實驗中選用的 fibronectin 和 ICAM-I 是 T 細胞最普遍可黏附的基質，但仍無法完全排除 paxillin 的磷酸化會影響 T 細胞黏附到其他基質的可能性。



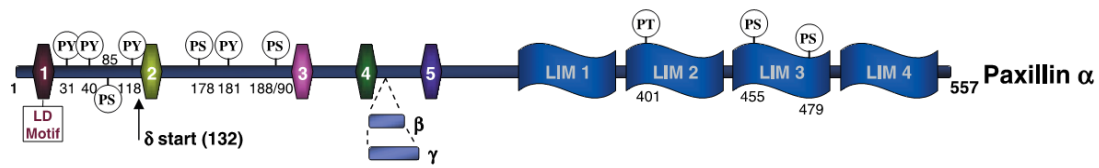
再者，不論是表現 paxillin 突變株的 DO11.10 細胞或是基因轉殖小鼠，其中都含有相當量的內生性(endogenous) paxillin。這些仍可被磷酸化的內生性 paxillin 可能已經足夠維持 T 細胞黏附或移動的能力，所以我們無法觀察到明顯的差異。要解決此問題，可設計針對非轉譯區域的 siRNA 來降低內生性 paxillin 的表現，或是製造 paxillin 突變株的 knock-in mice。

此外，T 細胞本來就是一種懸浮(suspension)細胞，調控其黏附及移動的機制也和一般會附著(adherent)的細胞不同。有可能 paxillin 在 T 細胞及非 T 細胞中扮演不同角色，雖然 paxillin 的磷酸化對於上皮細胞或神經元細胞等細胞的黏附移動非常重要，但對於 T 細胞而言並非必須。我們在 NIH3T3 細胞中的實驗結果也佐證了這個猜測。

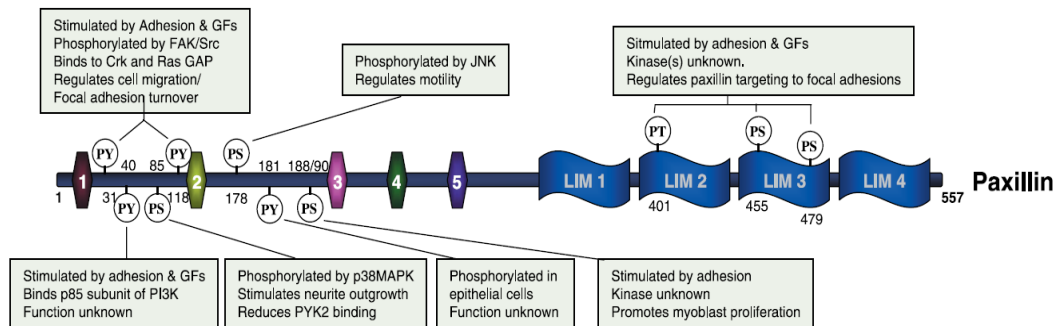


NFAT family 是免疫系統當中相當重要的轉錄因子，其中以 NFATp 及 NFATc 最為重要。雖然 NFATp 及 NFATc 對於 T 細胞的活化都相當關鍵，但這兩種基因的剔除鼠卻出現相反的 phenotype。NFATp 的基因剔除鼠產生 IL-4 的能力上升，且 IFN- $\gamma$  的分泌受到抑制，使其 T 細胞的分化偏向 T<sub>H</sub>2；在 NFATc 的基因剔除鼠中則無法有效產生 IL-4，T 細胞的分化也以 T<sub>H</sub>1 為主。

在 paxillin 基因轉殖小鼠中，我們觀察到小鼠 T 細胞活化之後細胞核內的 NFATp 及 NFATc 都減少，且產生的 IFN- $\gamma$  及 IL-4 的量也較同胎對照小鼠低，這樣的現象並無法單純用 NFATp 及 NFATc 的基因剔除鼠來解釋。而 paxillin 除了會影響 T 細胞的活化，對於 T 細胞分化及其功能有何影響，需要更進一步的分析。

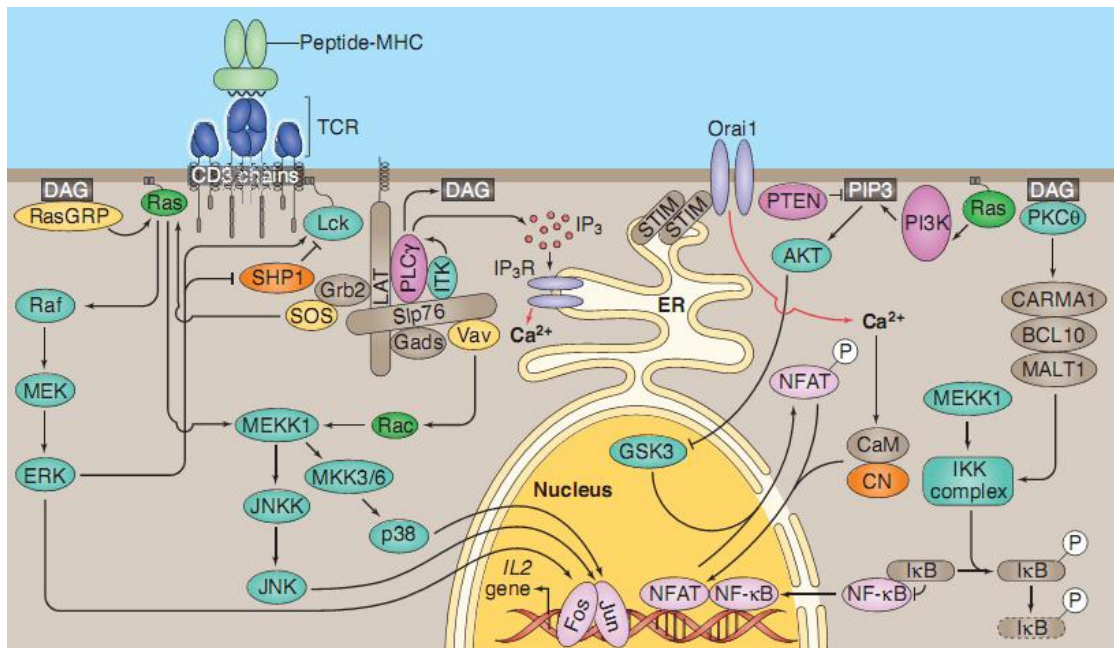


### Paxillin Phosphorylation and Function



圖一、Paxillin 的結構與磷酸化位置，及其對生理功能的影響

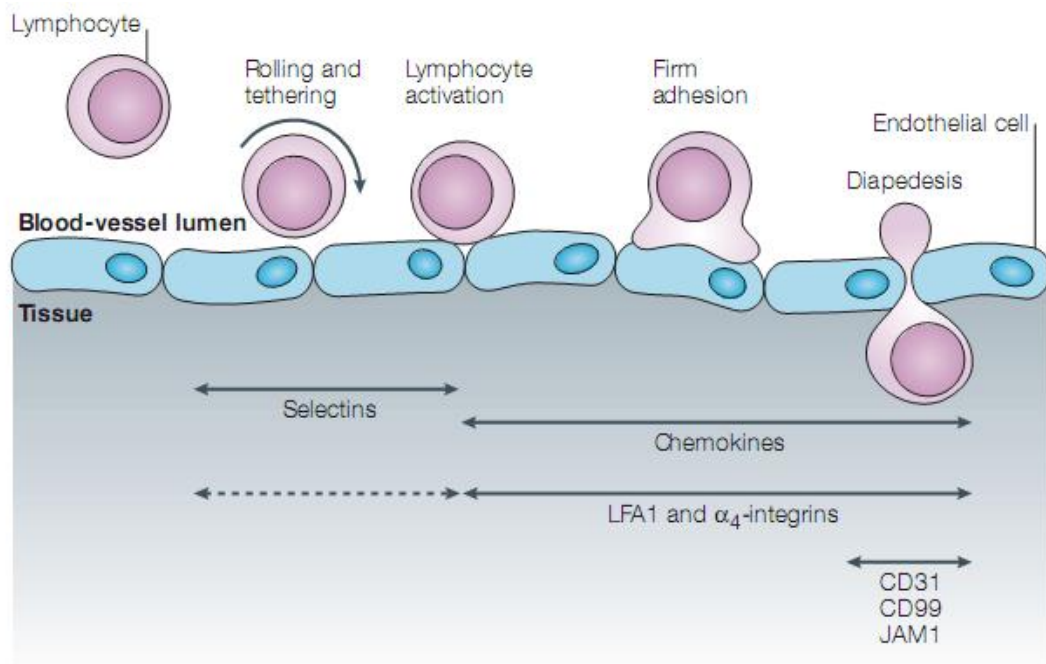
- (A) Paxillin 的結構 Paxillin 的 N 端含有五個 LD motif，C 端則由四個 LIM domain 組成，皆為蛋白質之間進行交互作用的區域。除最廣泛表現的  $\alpha$  型之外，還有在第四個 LD motif 後插入一段胺基酸序列的  $\beta$  型及  $\gamma$  型，以及不同轉譯起始位置的  $\delta$  型。
- (B) Paxillin 上有多個 serine 及 tyrosine 可被不同激酶磷酸化，進而影響其生理功能。被磷酸化的 tyrosine 可和其他具有 SH2 domain 的蛋白結合，並傳遞訊息；被磷酸化的 serine 則可能是藉著影響 paxillin 的構型而改變其 binding specificity。
- (圖擷取自 Brown et al., 2004, *Physiol. Rev.* 84:1315)



圖二、T 細胞活化的訊息傳遞

當 T 細胞受體(T cell receptor)辨認由抗原呈獻細胞所呈獻的組織相容抗原-抗原 胜肽複合體，會傳遞一活化訊息，使 CD45 將 Lck 去磷酸化，使 Lck 恢復活性。Lck 在催化本身的磷酸化之後，可進一步磷酸化 CD3 及 Zap-70。Zap-70 可磷酸化 LAT 及 SIp-76 等重要的轉接蛋白(adaptor protein)，將活化訊息傳遞給 PLC-γ 或 Ras 及 Rac 等 small G protein。Small G protein 可進而活化特定的 MAPK pathway，而啟動 c-fos 及 c-jun 的表現。PLC-γ 活化之後則可催化 PIP2 分解產生 DAG 和 IP3，前者可在細胞膜附近活化 PKC，而後者則是能使內質網是出鈣離子以活化 calcineurin，將 NFAT 去磷酸化使其進入細胞核，並啟動 IL-2 基因的表現。

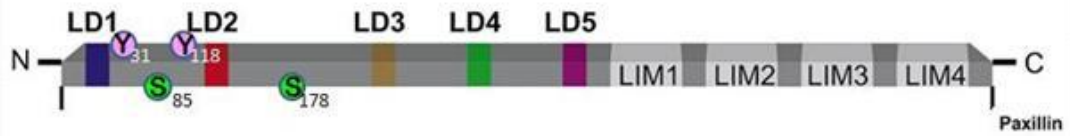
(圖擷取自 Huse M, 2009, J Cell Sci 122:1269)



### 圖三、T 細胞黏附(adhesion)的過程

T 細胞進入組織或淋巴結時需要和 high endothelial venules (HEVs) 交互作用。首先 T 細胞藉著滾動和內皮細胞接觸，並靠著 selectin 形成不穩定的結合(rolling and tethering)。活化後的 T 細胞可利用 integrin 和內皮細胞緊密的黏附(adhesion)，並被趨化激素(chemokine)吸引而滲入組織中(diapedesis)

(圖擷取自 Kinashi et al., 2005, *Nat. Rev. Immunol.* 5:546)



FAK and Src : Y31F/Y118F(Y2F)

p38 MAPK : S85A

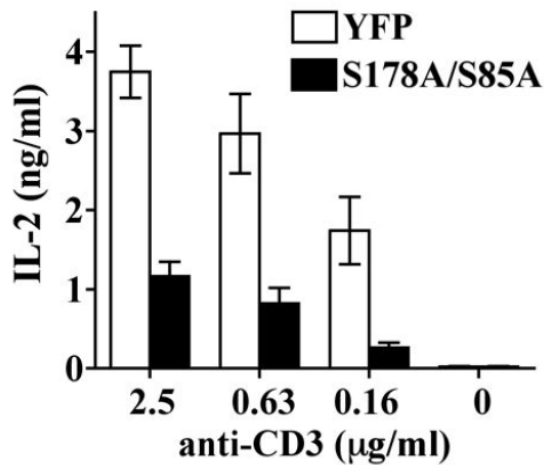
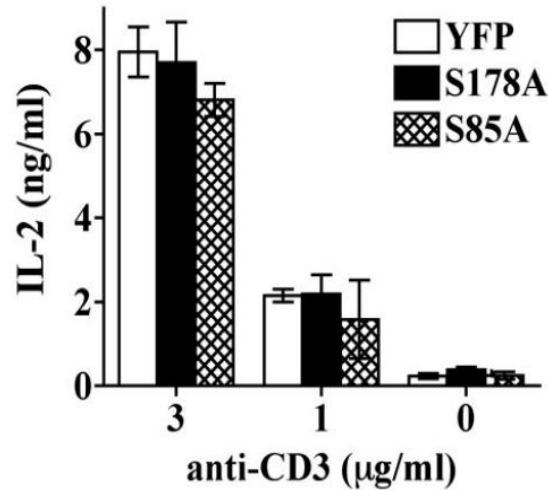
JNK : S178A

Dual mutation: S85A/S178A (S2A)



圖四、本實驗所使用之 paxillin 突變株示意簡圖

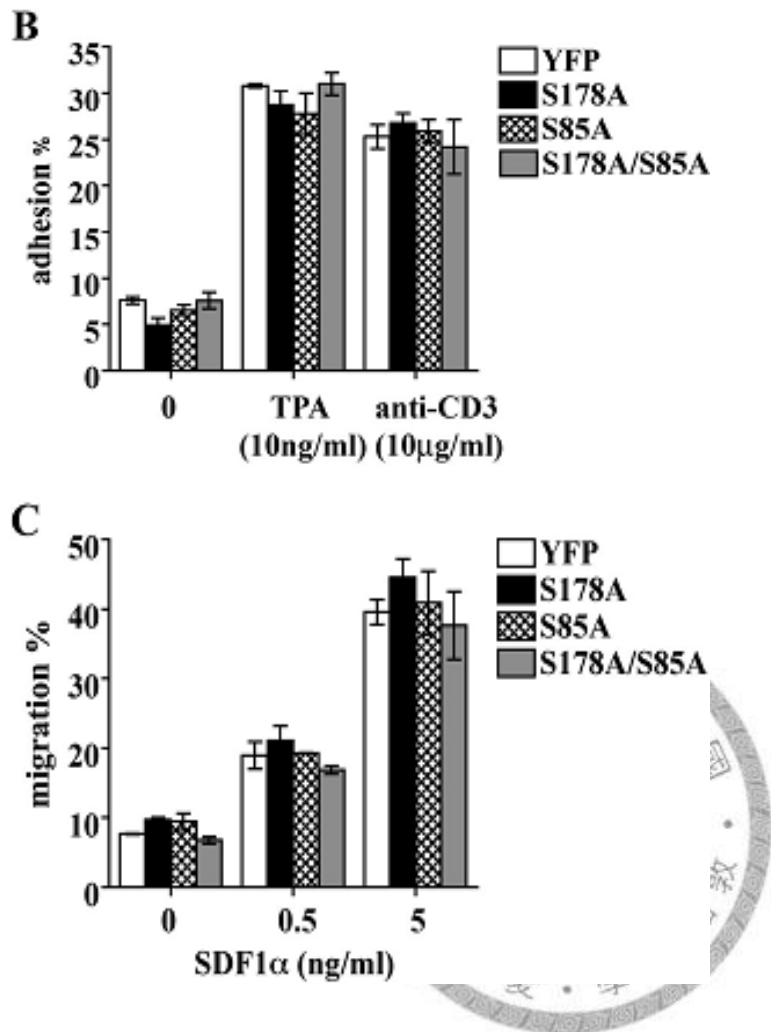
在本實驗中，我們將 paxillin 可被磷酸化的 serine 及 tyrosine 做點突變，藉由在 DO11.10 細胞及基因轉殖小鼠中表現這些 paxillin 突變株，研究 paxillin 之磷酸化情形和其生理功能之相關性。



圖五、表現 paxillin 雙磷酸化位置突變蛋白的 DO11.10 突變株在 anti-CD3 刺激下，IL-2 的分泌較 YFP 對照組細胞減少。

DO11.10 突變株以固定於 96 凹槽培養盤的不同濃度 anti-CD3 活化 12 小時，收集培養上清液。並測定其中 IL-2 的含量。與 YFP 對照組細胞相比，表現 JNK/p38MAPK 磷酸化位置突變蛋白(S178A/S85A)的細胞株，IL-2 分泌顯著減少。而表現 paxillin 單一磷酸化位置突變蛋白的 DO11.10 突變株在 anti-CD3 刺激下，分泌 IL-2 的情形和 YFP 對照組細胞相當。

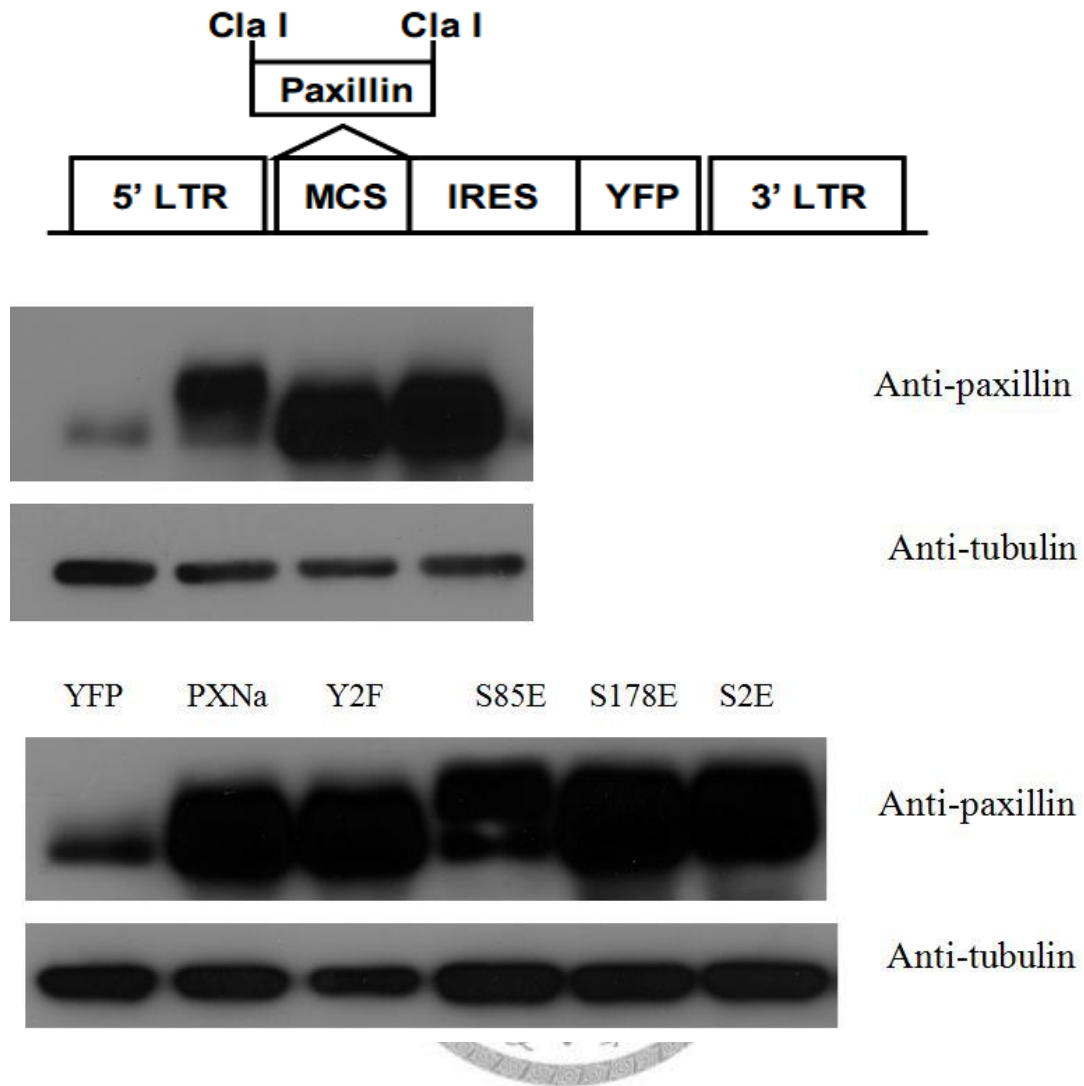
(An-yun Chang, unpublished data)



圖六、表現 paxillin 磷酸化位置突變蛋白的 DO11.10 突變株之黏附或移動的能力並無顯著影響。

- (A) 利用不同濃度之 TPA 或 biotin-anti-CD3 活化 DO11.10 細胞，觀察其黏附至 ICAM-I 的能力。表現 paxillin 突變蛋白的 DO11.10 細胞相較於對照組 YFP 細胞，其黏附至 ICAM-I 的比例並無明顯差距。
- (B) 利用不同濃度之 SDF-1α 刺激 DO11.10 細胞，利用 transwell 培養盤觀察其移動的能力。表現 paxillin 突變蛋白的 DO11.10 細胞相較於對照組 YFP 細胞，其移動的比例並無明顯差距。

(An-yun Chang, unpublished data)

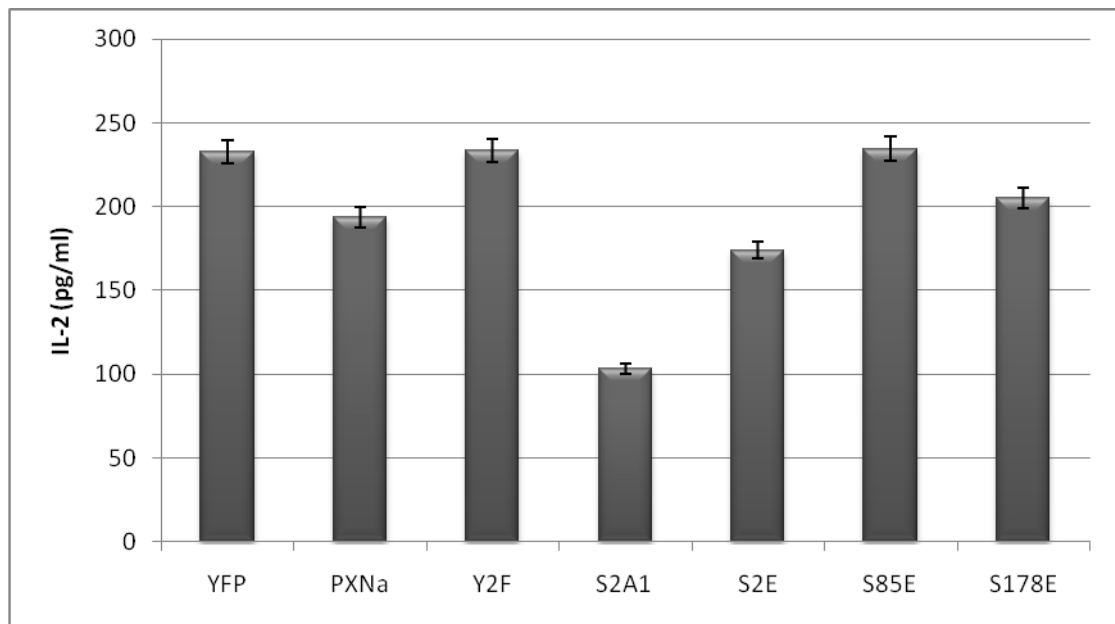


圖七、在 DO11.10 細胞中建立 paxillin 突變株

(A) pGC-paxillin-myc-YFP 質體構築。pGC-YFP 反轉錄病毒載體全長 7.8 kb，paxillin-myc 基因片段全長 1.7 kb。Paxillin-myc 由 multiple cloning site (MCS) 嵌入載體，由 5' LTR 啟動 paxillin-myc 的表現。黃色螢光蛋白(YFP)的表現由 IRES 啟動。

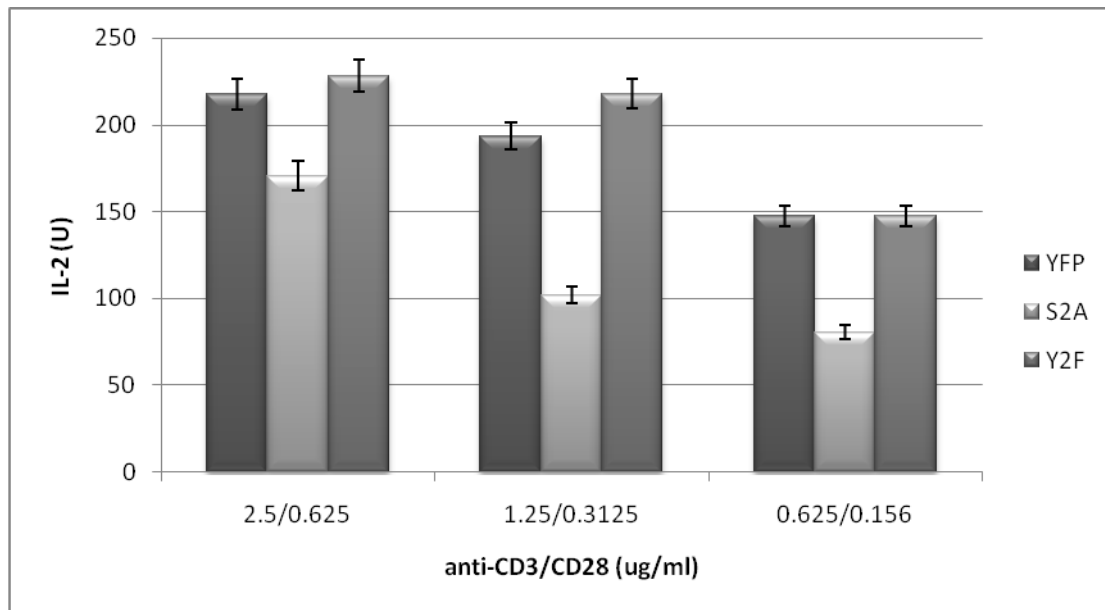
(B) 以帶有 paxillin 突變基因的反轉錄病毒感染 DO11.10 細胞株，篩選表現黃色螢光蛋白的細胞。收集表現黃色螢光蛋白的細胞之細胞萃取液，以 anti-paxillin 抗體偵測外源表現的 paxillin。





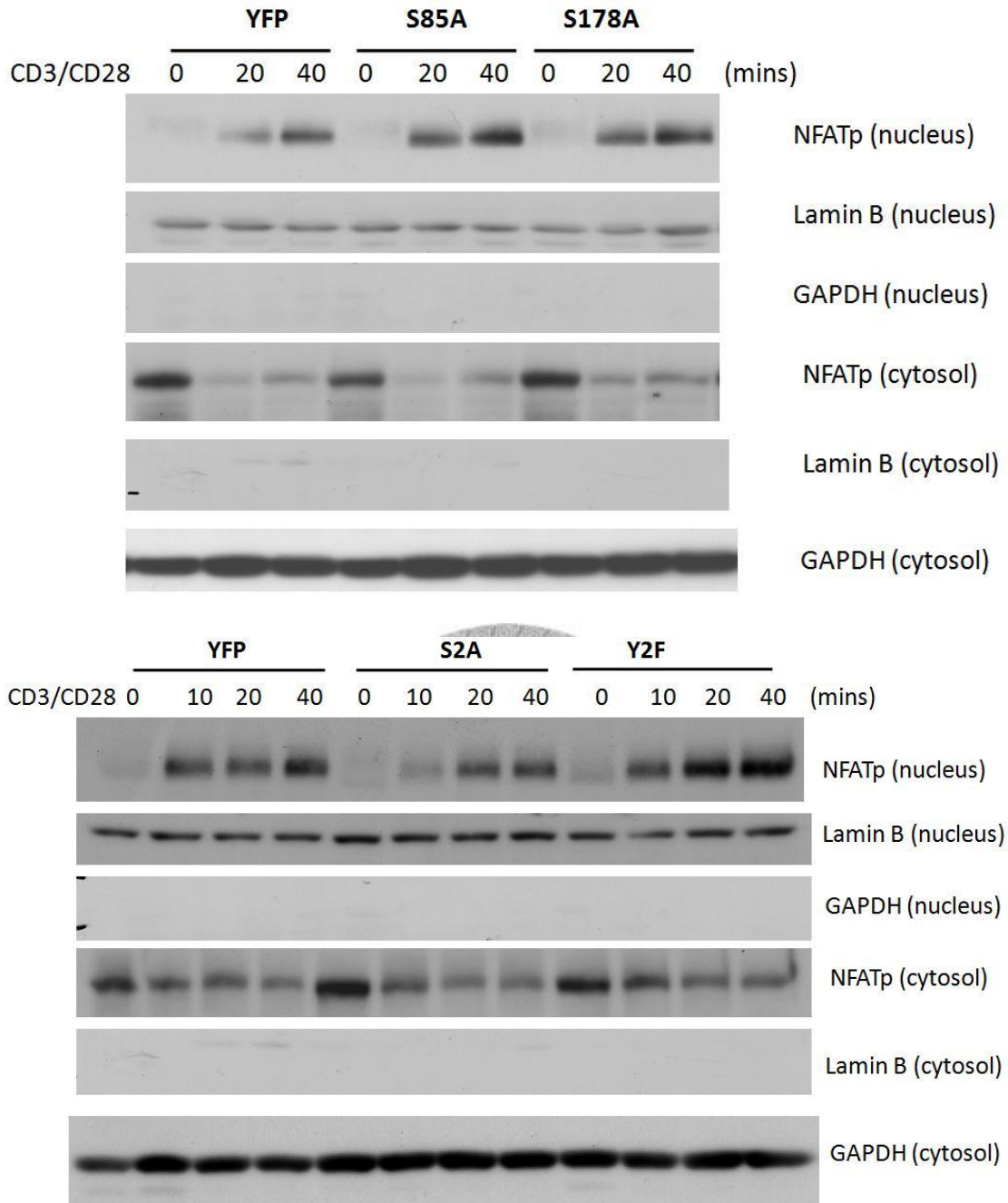
圖八、表現 paxillin 雙磷酸化位置突變蛋白的 DO11.10 突變株在 anti-CD3 及 anti-CD28 刺激下，IL-2 的分泌較 YFP 對照組細胞減少。

DO11.10 突變株以固定於 96 凹槽培養盤的不同濃度 anti-CD3 活化 12 小時，收集培養上清液。並測定其中 IL-2 的含量。與 YFP 對照組細胞相比，表現 JNK/p38MAPK 磷酸化位置突變蛋白(S178A/S85A)的細胞株，IL-2 分泌顯著減少。而表現其他 paxillin 磷酸化位置突變蛋白的 DO11.10 突變株在 anti-CD3 及 anti-CD28 刺激下，分泌 IL-2 的情形和 YFP 對照組細胞相當。



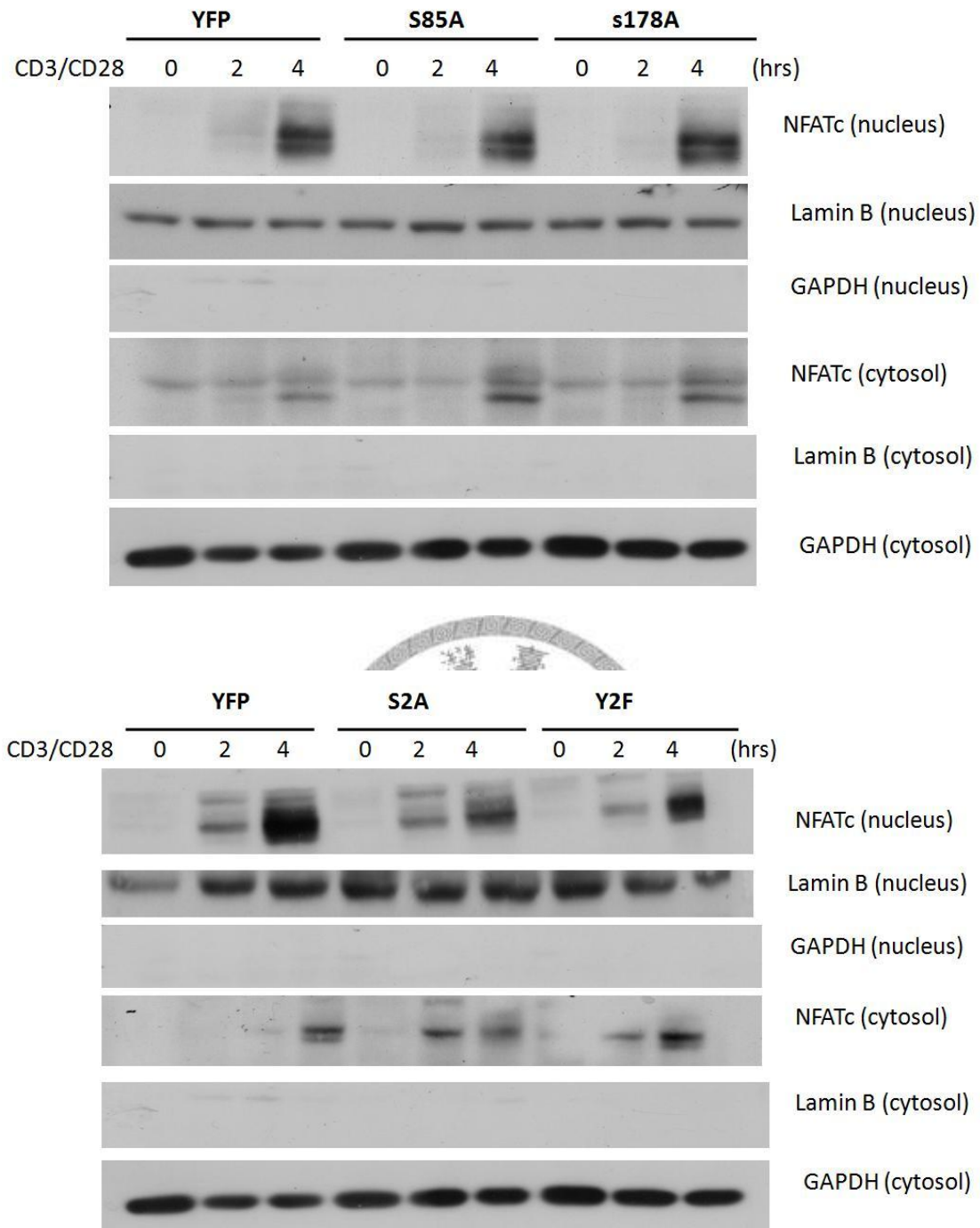
圖九、表現 paxillin 雙磷酸化位置突變蛋白的 DO11.10 突變株在 anti-CD3 及 anti-CD28 刺激下，IL-2 的分泌較 YFP 對照組細胞減少。

DO11.10 突變株以固定於 96 凹槽培養盤的不同濃度 anti-CD3 活化 12 小時，收集培養上清液。並測定其中 IL-2 的含量。與 YFP 對照組細胞相比，表現 JNK/p38MAPK 磷酸化位置突變蛋白(S178A/S85A)的細胞株，IL-2 分泌顯著減少。而表現 paxillin FAK 磷酸化位置突變蛋白的 DO11.10 突變株在 anti-CD3 及 anti-CD28 刺激下，分泌 IL-2 的情形和 YFP 對照組細胞相當。



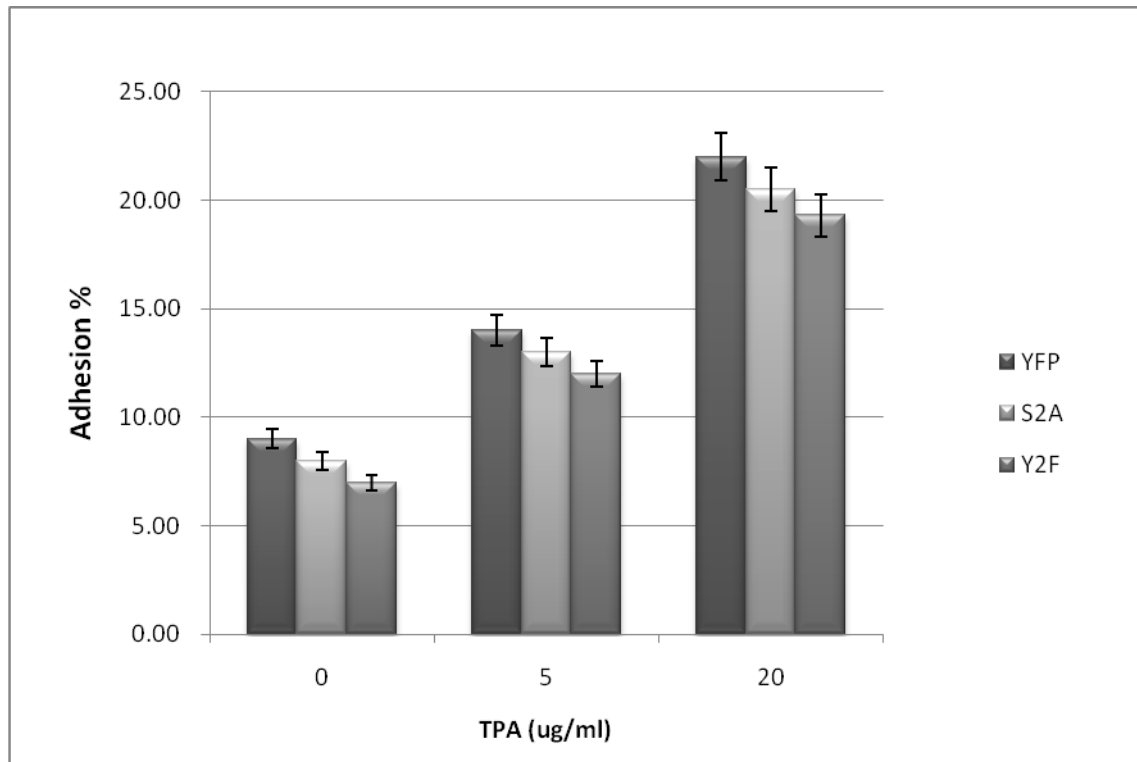
圖十、利用西方點墨法分析 T 細胞活化後細胞核內外 NFATp 量之變化。

同時表現 p38/JNK 磷酸化位置 paxillin 突變株之細胞(S2A)，其核內 NFATp 明顯減少，但在細胞質中 NFATp 的量則無明顯差異。表現單一磷酸化位置 paxillin 突變株之細胞及表現 FAK 磷酸化位置 paxillin 突變株之細胞核內外 NFATp 的量皆無明顯差異。



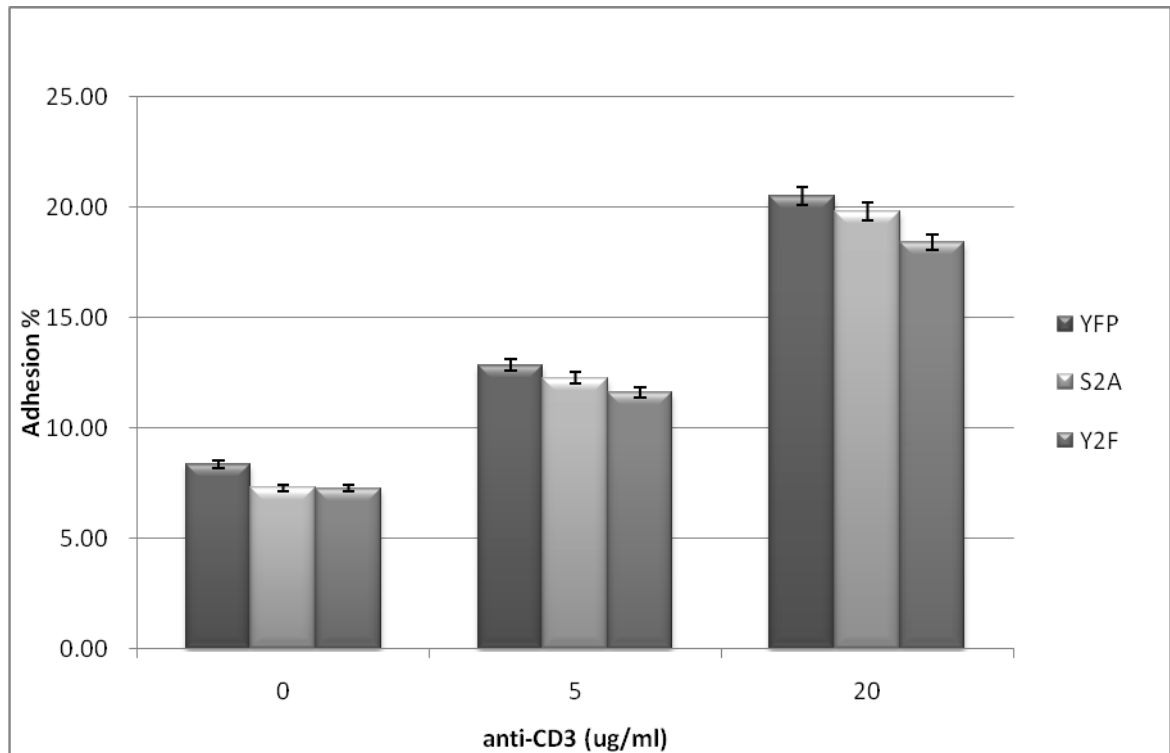
圖十一、利用西方點墨法分析 T 細胞活化後細胞核內外 NFATc 量之變化。

同時表現 p38/JNK 磷酸化位置 paxillin 突變株之細胞(S2A)，其核內 NFATc 明顯減少，但在細胞質中 NFATc 的量則無明顯差異。表現單一磷酸化位置 paxillin 突變株之細胞及表現 FAK 磷酸化位置 paxillin 突變株之細胞核內外 NFATc 的量皆無明顯差異。



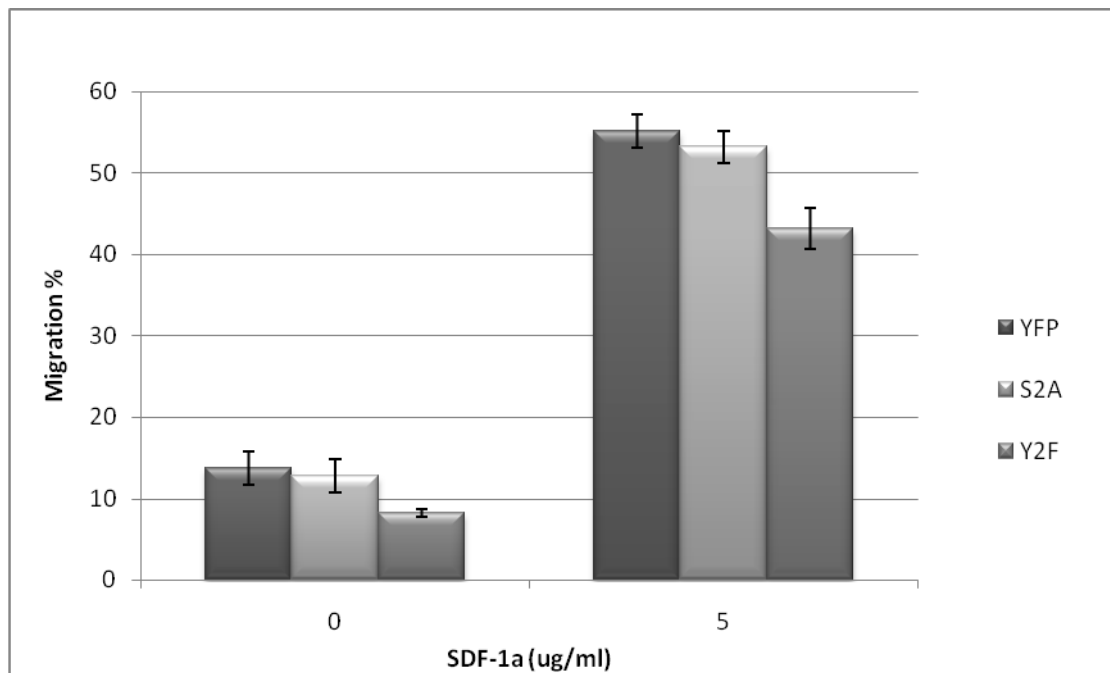
圖十二、表現 paxillin 磷酸化位置突變蛋白的 DO11.10 突變株之黏附至 fibronectin 的能力並無顯著差異。

利用不同濃度之 TPA 活化 DO11.10 細胞，觀察其黏附至 fibronectin 的能力。表現 paxillin 突變蛋白的 DO11.10 細胞相較於對照組 YFP 細胞，其黏附至 fibronectin 的比例並無明顯差距。



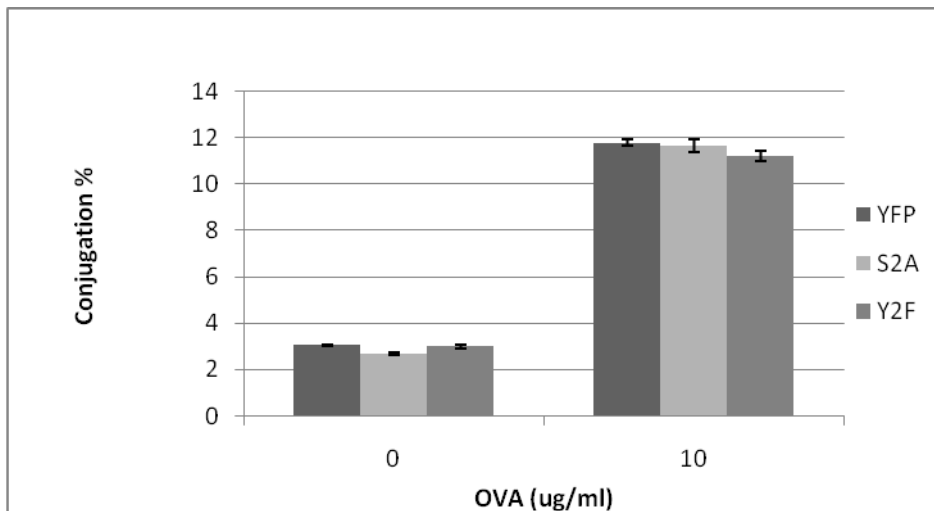
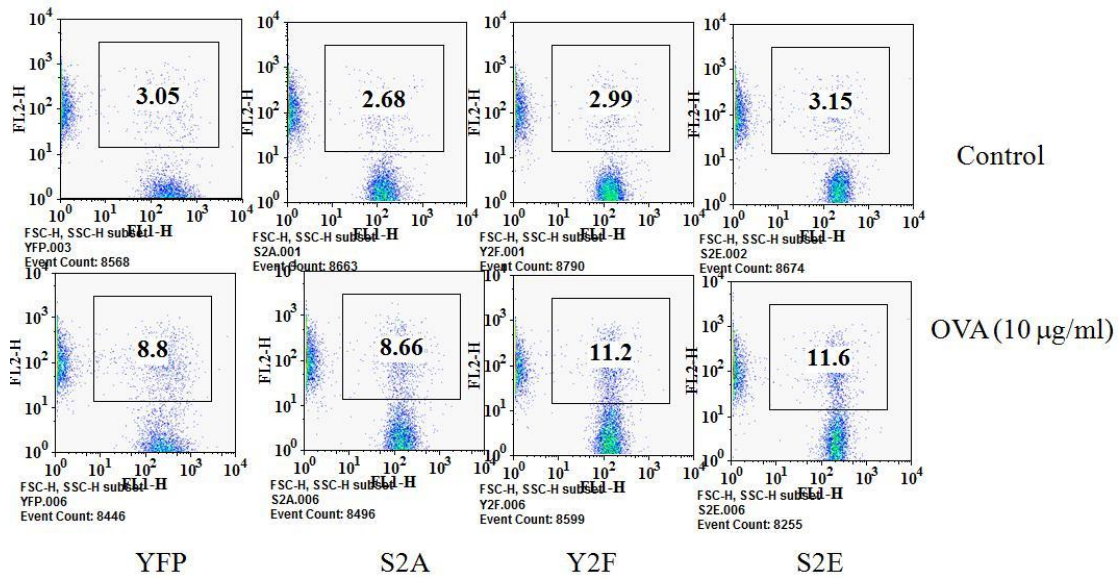
圖十三、表現 paxillin 磷酸化位置突變蛋白的 DO11.10 突變株之黏附至 fibronectin 的能力並無顯著差異。

利用不同濃度之 anti-CD3 活化 DO11.10 細胞，觀察其黏附至 fibronectin 的能力。表現 paxillin 突變蛋白的 DO11.10 細胞相較於對照組 YFP 細胞，其黏附至 fibronectin 的比例並無明顯差距。



圖十四、表現 paxillin FAK 磷酸化位置突變蛋白的 DO11.10 突變株之移動的能力受到抑制。

利用不同濃度之 SDF-1 $\alpha$  刺激 DO11.10 細胞，利用 transwell 培養盤觀察其移動的能力。表現 paxillin FAK 磷酸化位置突變蛋白的 DO11.10 細胞相較於對照組 YFP 細胞，其移動的比例降低，但表現 JNK/p38 磷酸化位置突變蛋白的組別則無明顯差距。



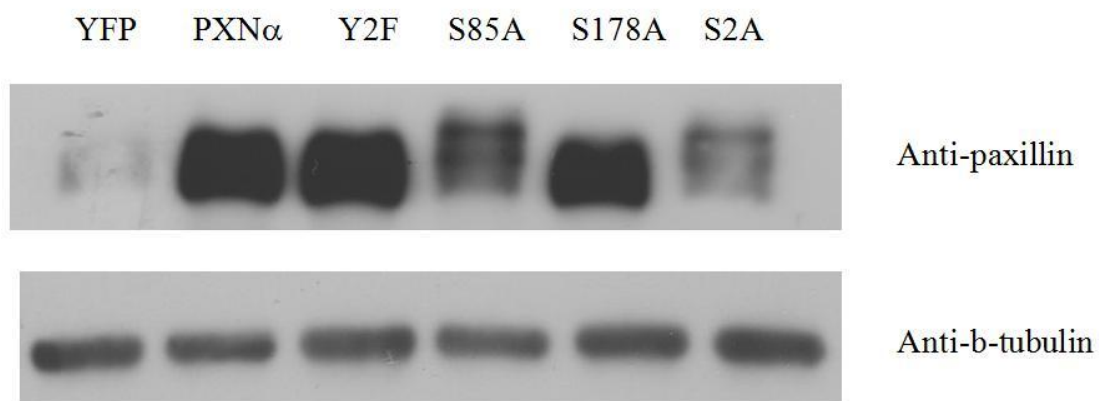
圖十五、表現 paxillin 雙磷酸化位置突變蛋白的 DO11.10 突變株和 B 細胞株之結合並無顯著差異。

(A) 表現不同的 paxillin 雙磷酸化位置突變蛋白之 T 細胞和 B 細胞株 A20，在有無 OVA 胜肽的情況下，於 37°C 培養箱中作用 1 小時，以流式細胞儀分析 T 細胞和 B 細胞結合的比率。(FL1: CFSE 標記的 T 細胞；FL2: PKH-26 標記的 B 細胞)

(B) 將(A)分析得到的數值加以換算成 T 細胞和 B 細胞結合的比率。

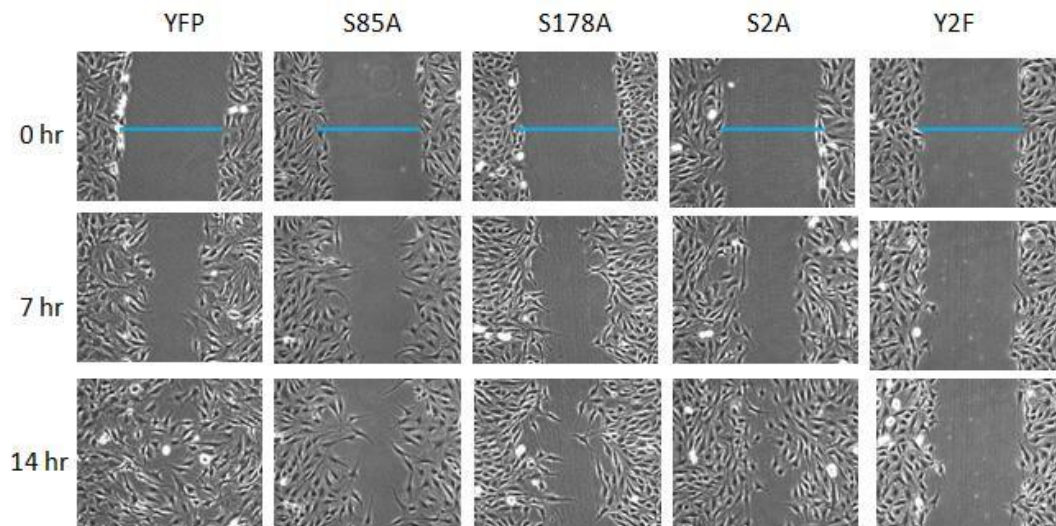
(有 OVA 存在下與 B 細胞結合的 T 細胞 / 所有 T 細胞)×100% - (無 OVA 存在下與 B 細胞結合的 T 細胞 / 所有 T 細胞)×100% = T 細胞和 B 細胞結合的比率





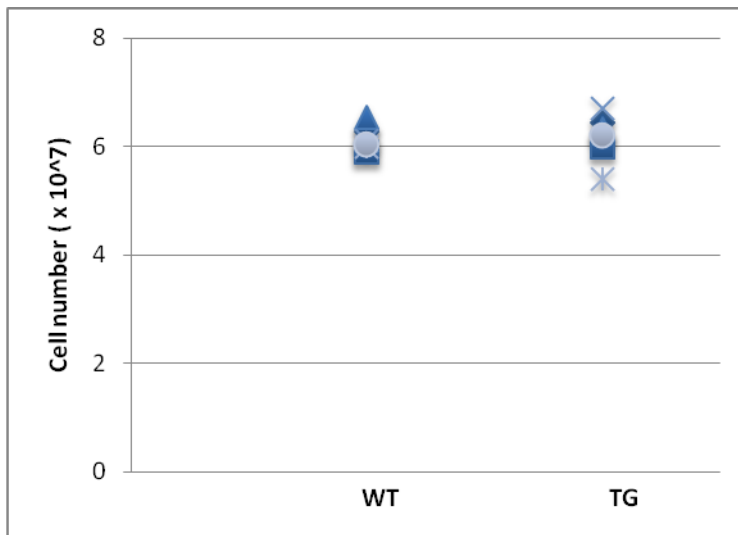
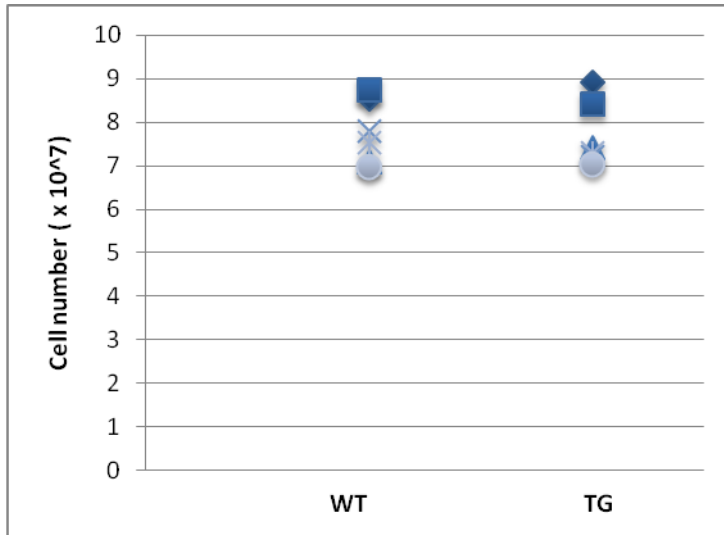
圖十六、在 NIH3T3 細胞中建立 paxillin 突變株

以帶有 paxillin 突變基因的反轉錄病毒感染 NIH3T3 細胞株，篩選表現黃色螢光蛋白的細胞。收集表現黃色螢光蛋白的細胞之細胞萃取液，以 anti-paxillin 抗體偵測外源表現的 paxillin。



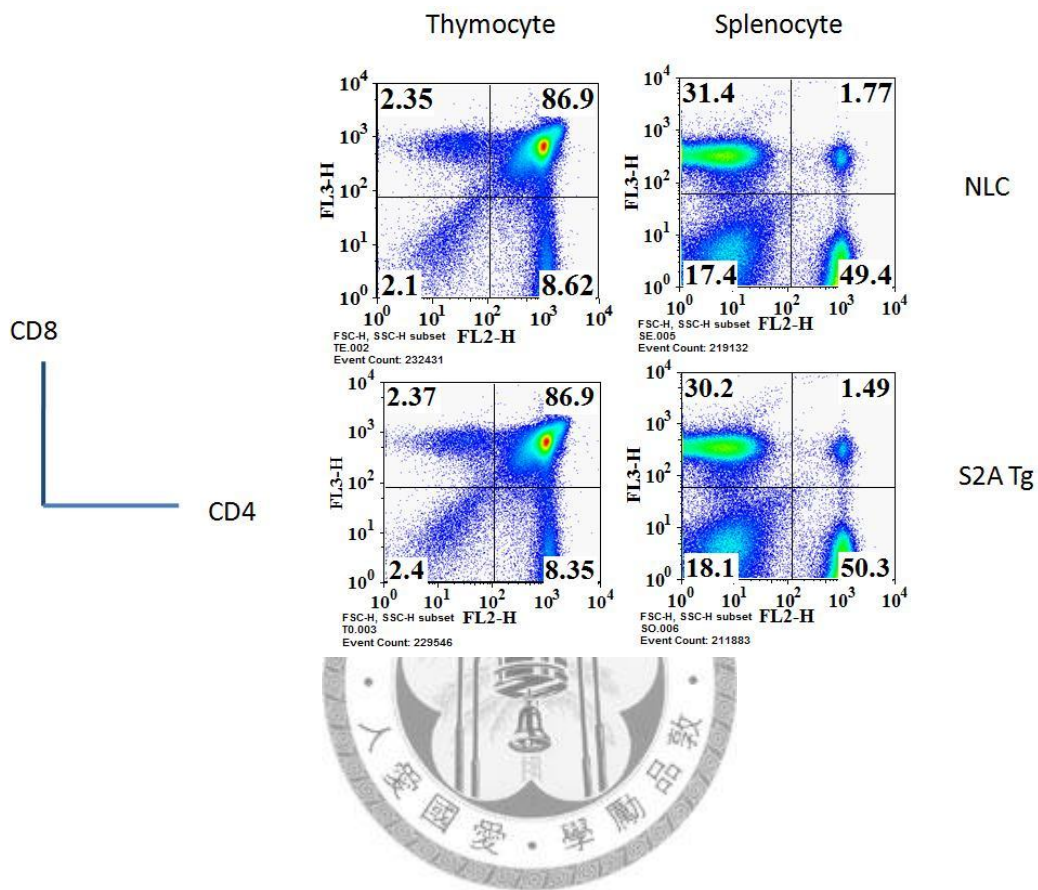
圖十七、由 wound-healing assay 分析表現各種 paxillin 突變株之 NIH3T3 細胞之移動能力。

利用 wound-healing assay 分析表現 paxillin 磷酸化位置突變蛋白之 NIH3T3 細胞的移動是否受到影響。相較於對照組細胞 YFP，不論是表現 S85A, S178A, S2A, Y2F 之細胞，其移動能力皆明顯降低。



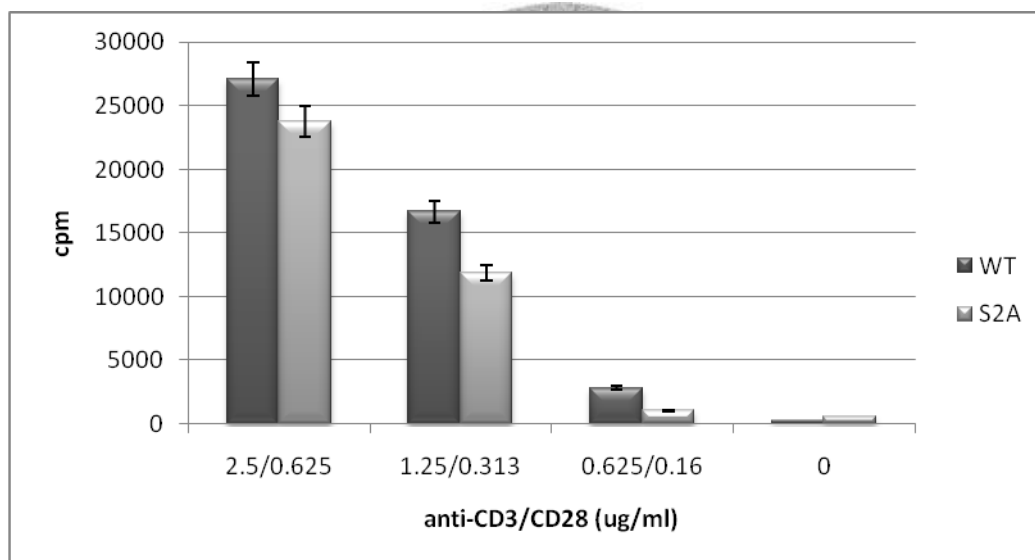
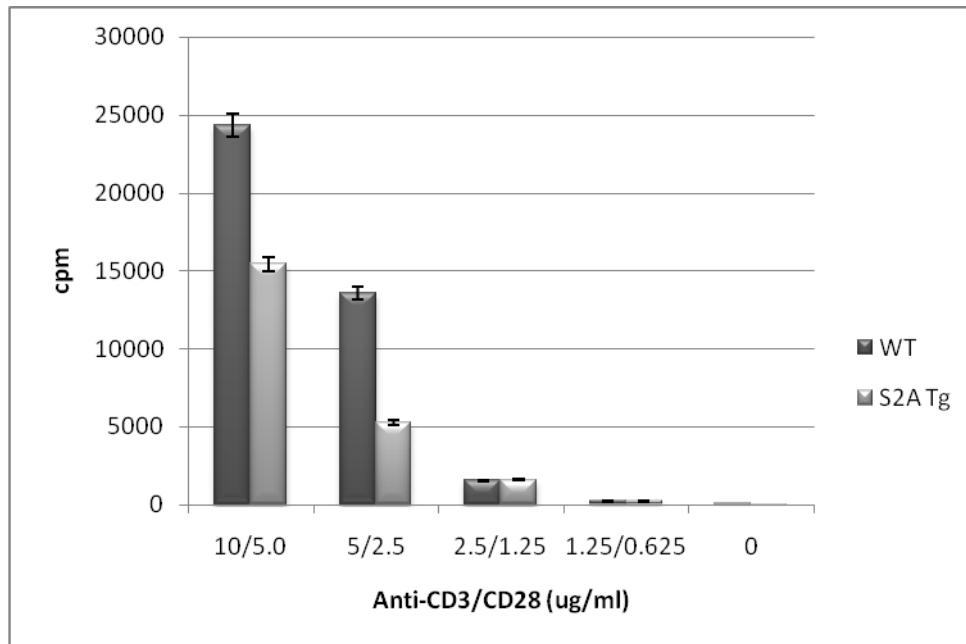
圖十八、Paxillin S178A/S85A 的基因轉殖小鼠胸腺及脾臟細胞數目與同胎對照小鼠相近。

將小鼠的脾臟(圖 A)及胸腺(圖 B)細胞取出，懸浮於培養液。以細胞計數器計算細胞數目。每個記號代表一隻小鼠。WT:同胎對照小鼠; Tg :Paxillin S178A/S85A 突變的基因轉殖小鼠。



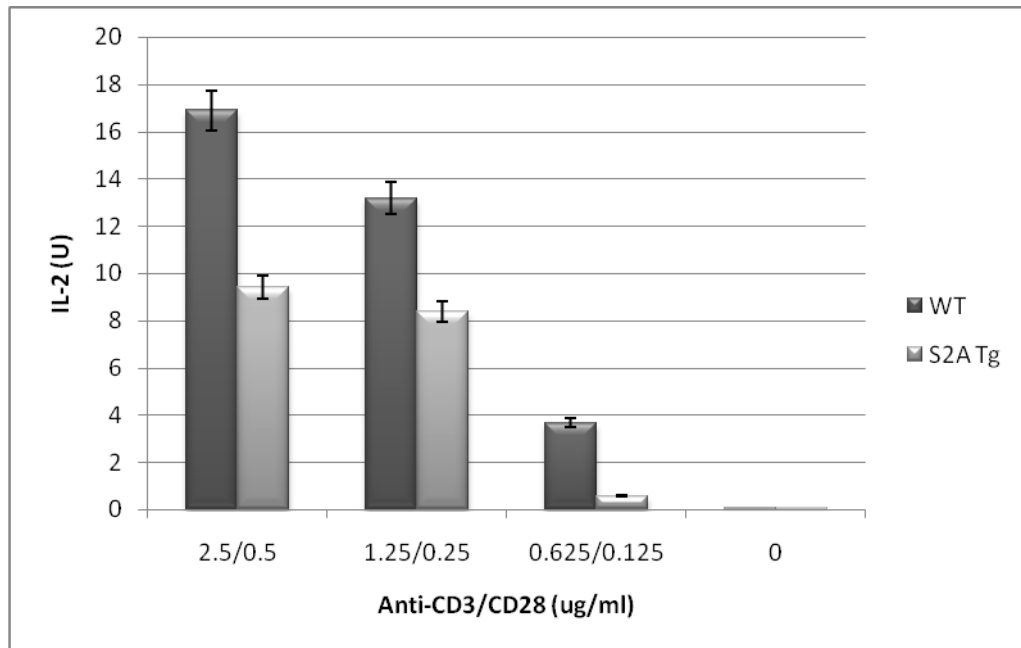
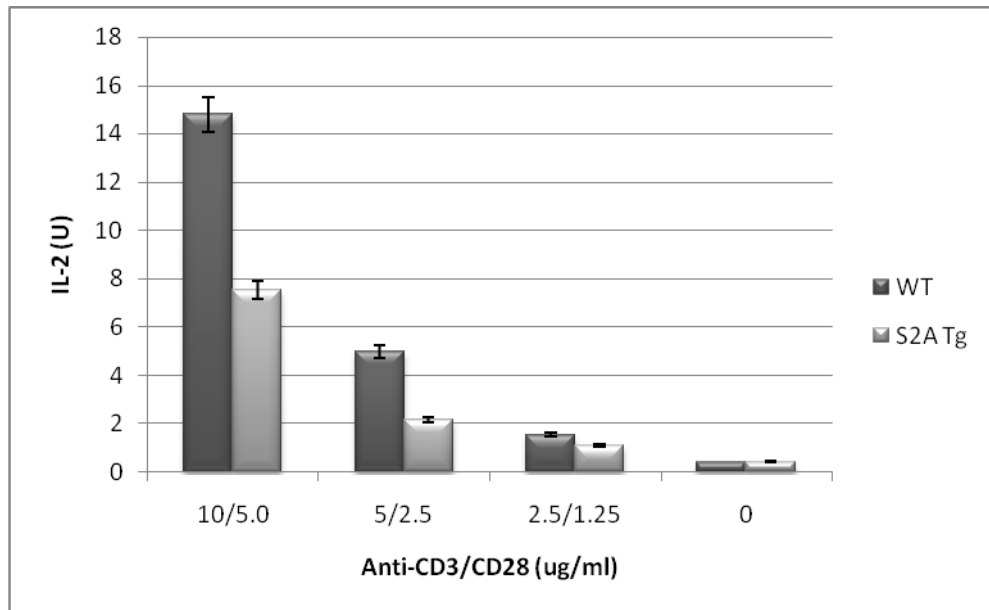
圖十九、Paxillin S178A/S85A 的基因轉殖小鼠胸腺細胞與脾臟細胞族群的分析。

以 PE-anti-CD4 和 FITC-anti-CD8 進行小鼠胸腺細胞及脾臟 T 細胞的染色。圖為流式細胞儀分析的結果。每個樣本收 10000 個細胞，數字代表各族群細胞的比例。基因轉殖小鼠之 CD4 和 CD8T 細胞之比例和同胎小鼠相比並無明顯差異。



圖二十、Paxillin S178A/S85A 的基因轉殖小鼠胸腺細胞及脾臟 T 細胞在活化後細胞增生減少。

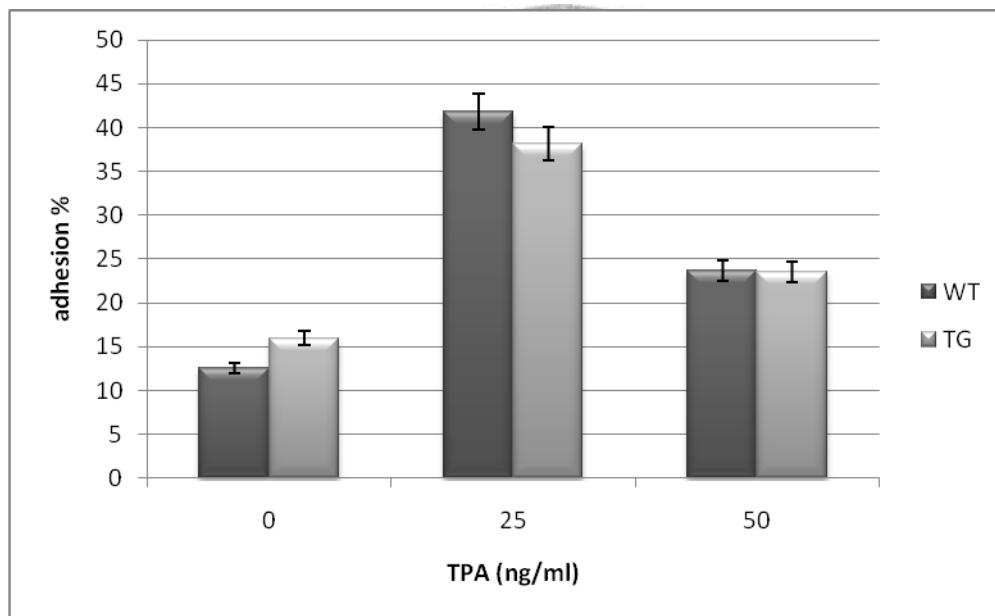
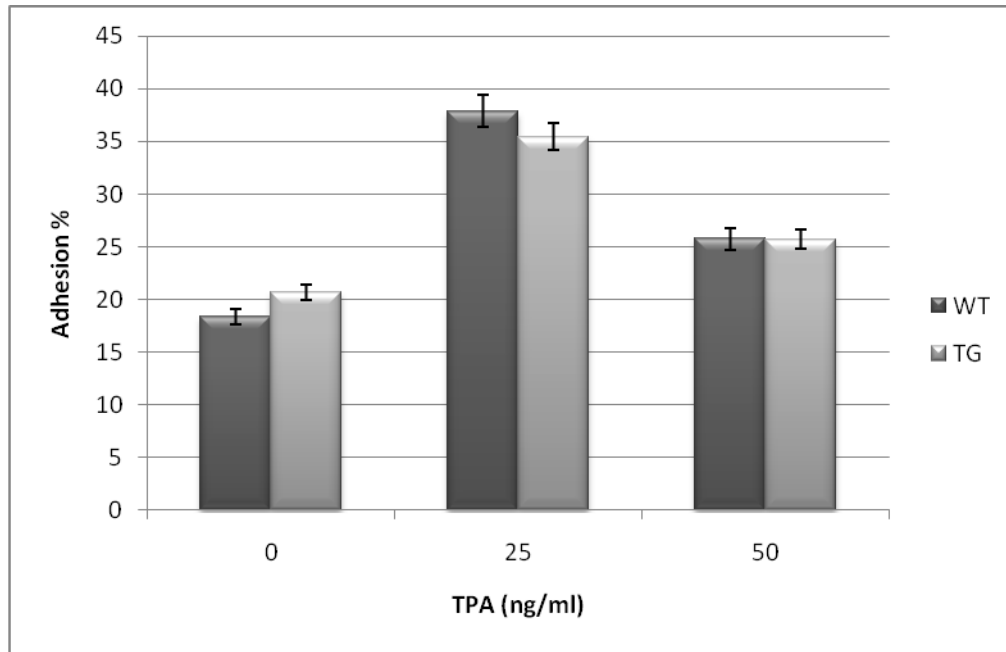
(A) 以 anti-CD3 與 anti-CD28 共同活化刺激小鼠胸腺細胞( $7 \times 10^5$  個細胞/well)。與同胎對照小鼠相比，基因轉殖小鼠的胸腺細胞在 TCR 刺激下，細胞增生減少。  
 (B) 以 anti-CD3 與 anti-CD28 共同活化刺激小鼠胸腺 T 細胞( $4 \times 10^5$  個細胞/well)。與同胎對照小鼠相比，基因轉殖小鼠的脾臟 T 細胞在 TCR 刺激下，細胞增生減少。



圖二十一、Paxillin S178A/S85A 的基因轉殖小鼠之胸腺細胞及脾臟 T 細胞在活化後細胞分泌的 IL-2 減少。

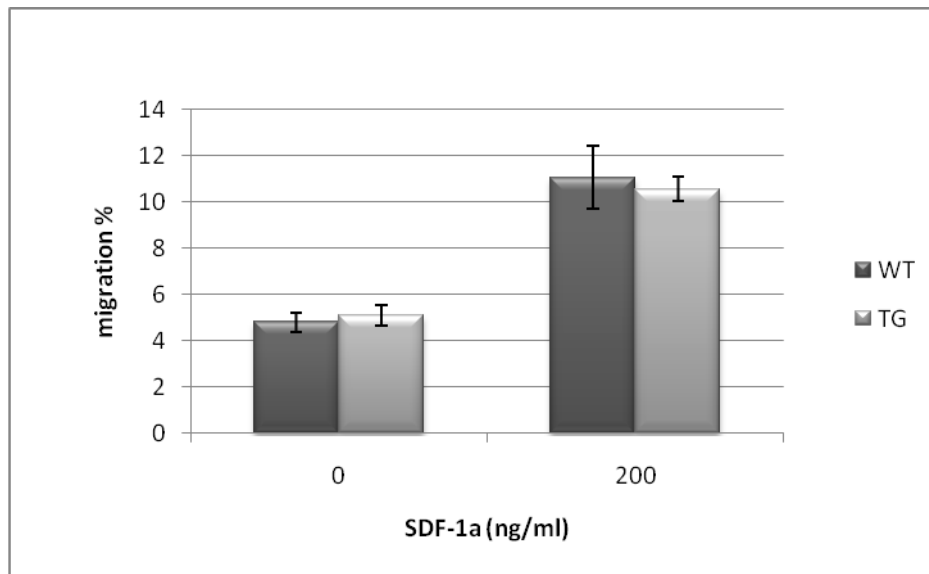
(A) 以 anti-CD3 與 anti-CD28 共同活化刺激小鼠胸腺細胞( $7 \times 10^5$  個細胞/sample)。與同胎對照小鼠相比，基因轉殖小鼠的胸腺細胞在 TCR 刺激下，細胞分泌的 IL-2 減少。

(B) 以 anti-CD3 與 anti-CD28 共同活化刺激小鼠脾臟 T 細胞( $4 \times 10^5$  個細胞/well)。與同胎對照小鼠相比，基因轉殖小鼠的脾臟 T 細胞在 TCR 刺激下，細胞分泌的 IL-2 減少。



圖二十二、Paxillin S178A/S85A 的基因轉殖小鼠之脾臟 T 細胞黏附 fibronectin 的能力並無顯著差異。

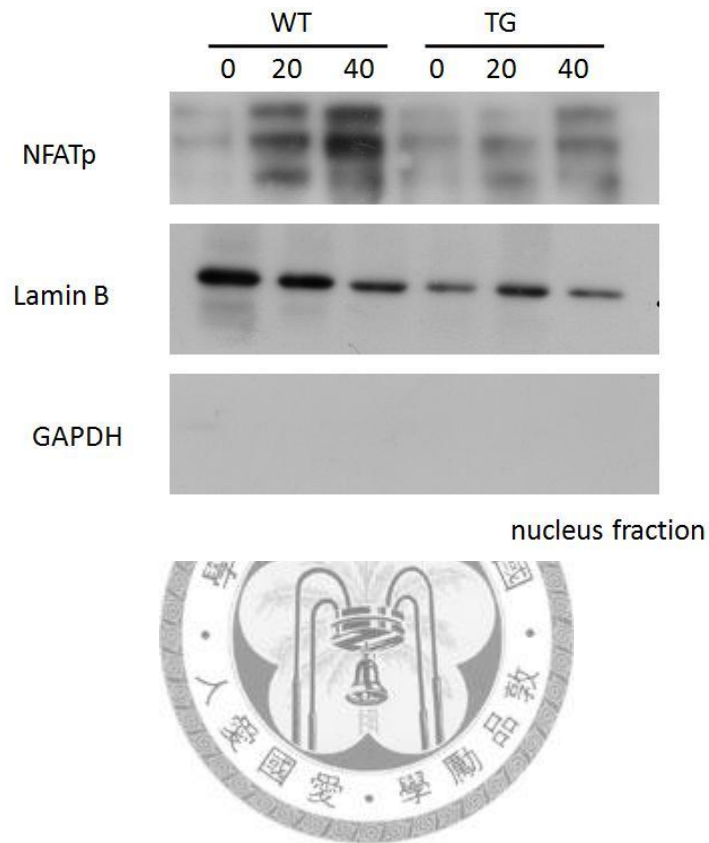
以 TPA 刺激小鼠腺細胞或脾臟 T 細胞( $5 \times 10^5$  個細胞/sample)。與同胎對照小鼠相比，基因轉殖小鼠的胸腺細胞或脾臟 T 細胞活化後黏附(adhesion)至 fibronectin 之能力並無明顯差異。



圖二十三、Paxillin S178A/S85A 的基因轉殖小鼠之胸腺細胞遷徙的能力並無顯著差異。

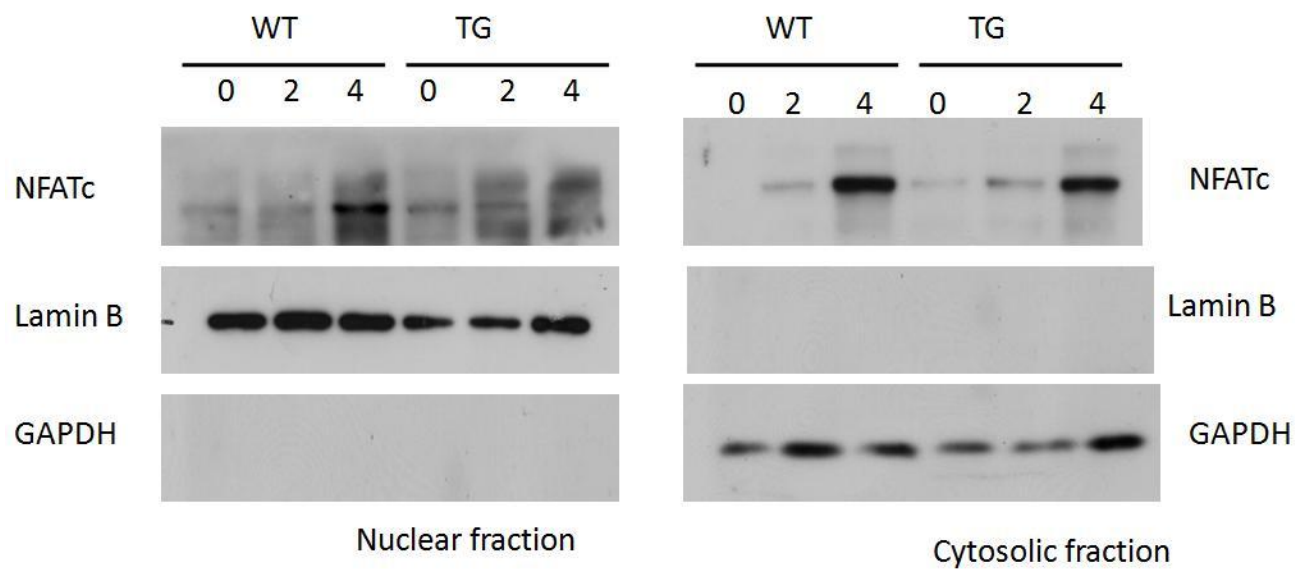
利用不同濃度之 SDF-1 $\alpha$  刺激 DO11.10 細胞，利用 transwell 培養盤觀察其移動的能力。與同胎對照小鼠相比，基因轉殖小鼠的胸腺細胞活化後遷徙(migration)之能力並無明顯差異。





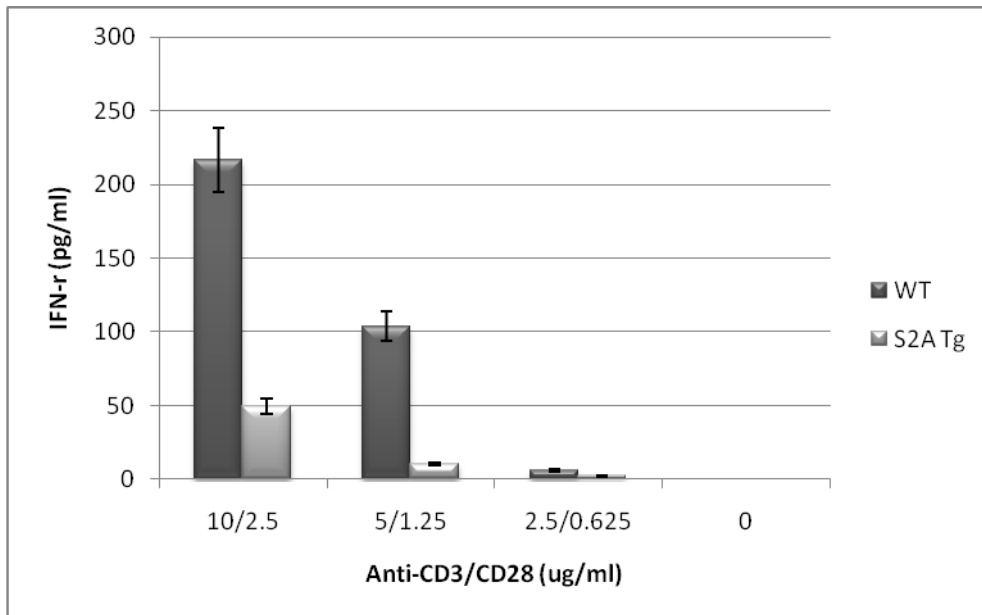
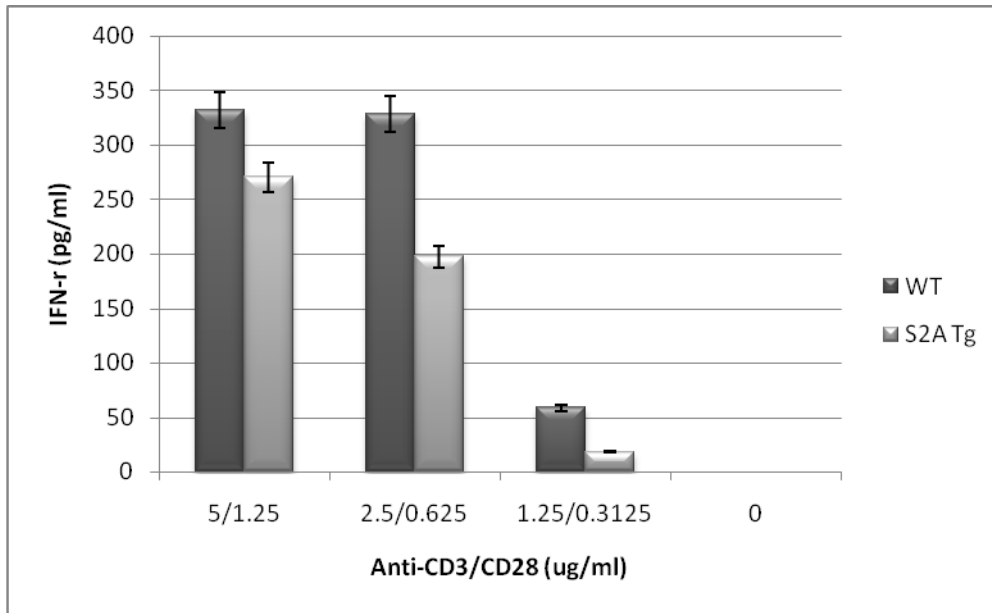
圖二十四、利用西方點墨法分析 T 細胞活化後細胞核內外 NFATp 量之變化。

與同胎對照小鼠相比，基因轉殖小鼠的 T 細胞經 anti-CD3/CD28 活化之後，其核內 NFATp 明顯減少。



圖二十五、利用西方點墨法分析 T 細胞活化後細胞核內外 NFATc 量之變化。

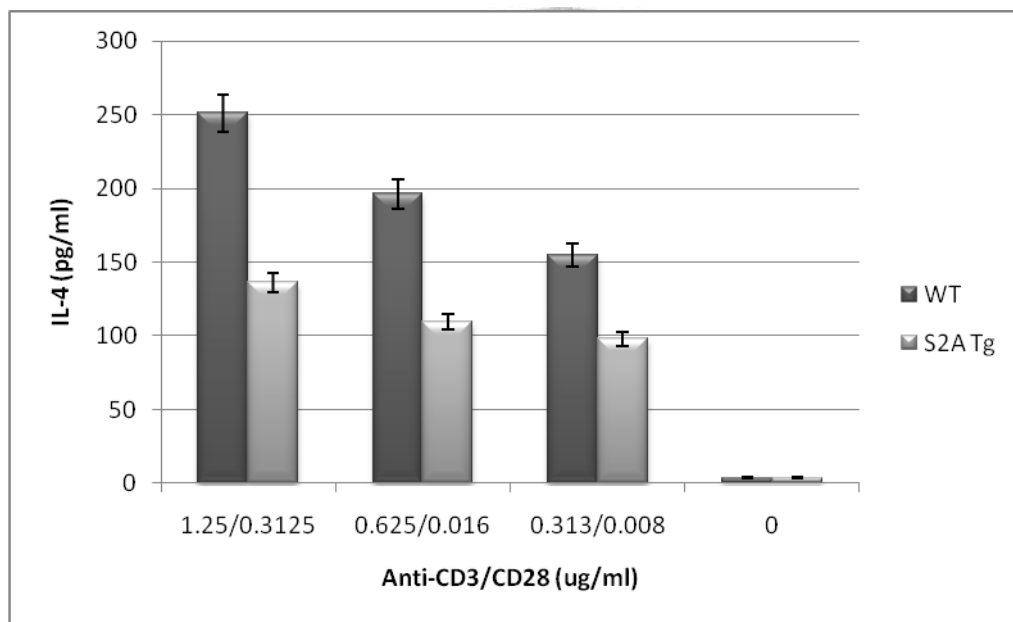
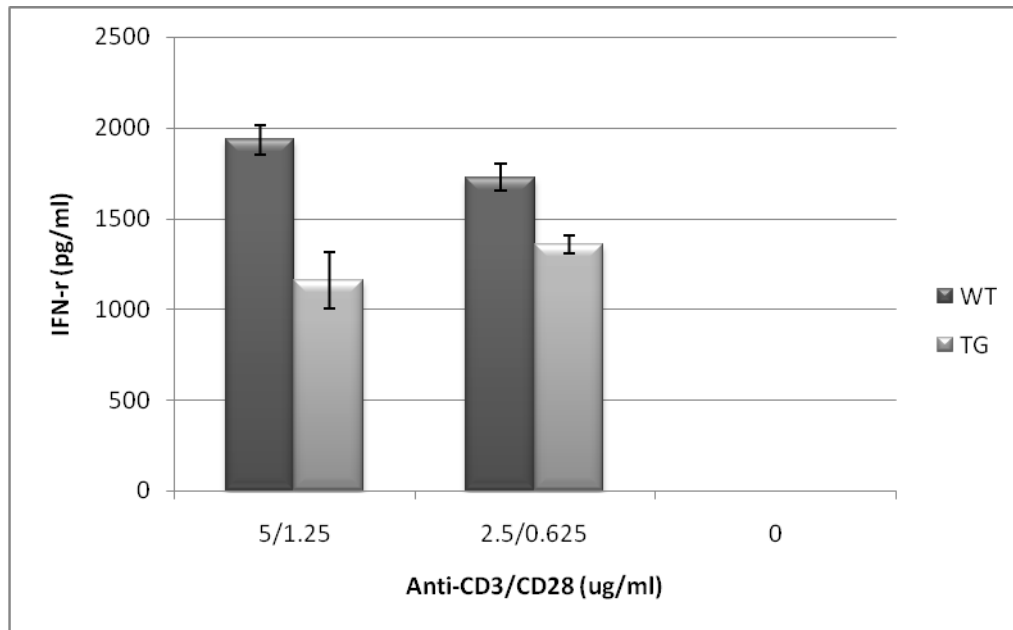
與同胎對照小鼠相比，基因轉殖小鼠的 T 細胞經 anti-CD3/CD28 活化之後，其核內 NFATc 明顯減少。



圖二十六、Paxillin S178A/S85A 的基因轉殖小鼠之胸腺細胞及脾臟 T 細胞在活化後細胞分泌的 IFN- $\gamma$ 減少。

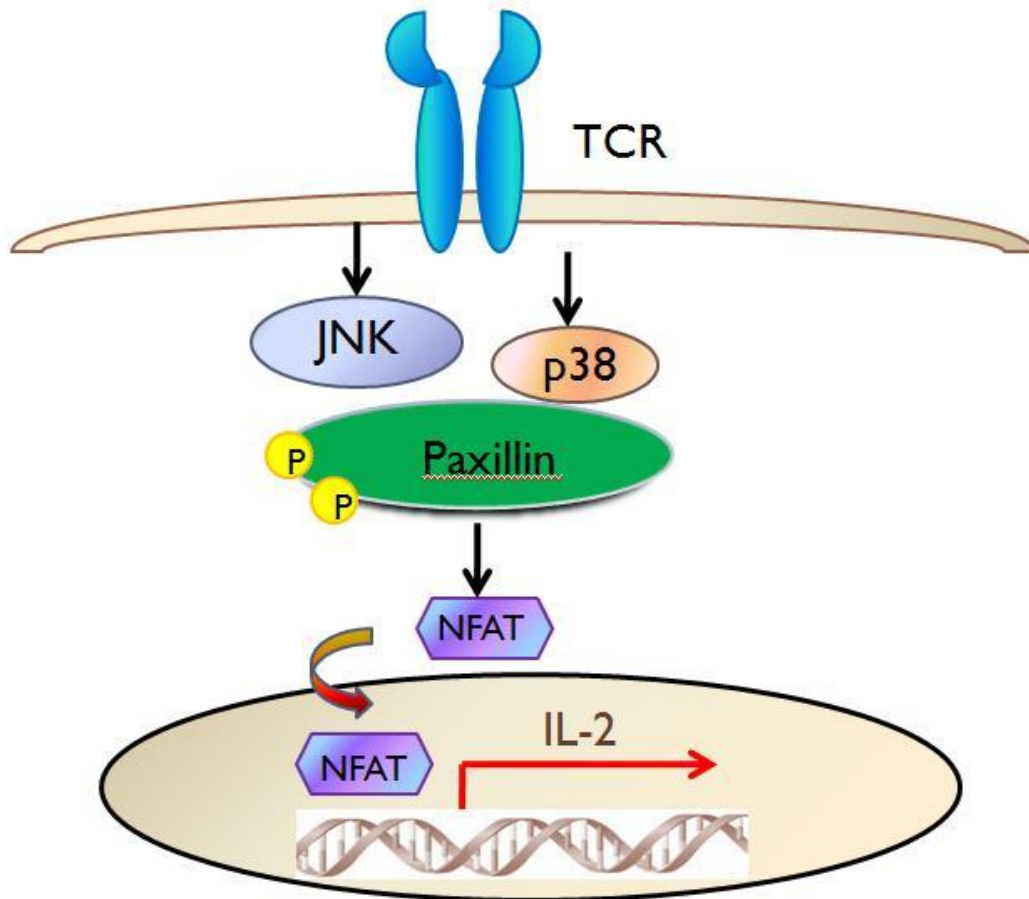
(A) 脾臟 T 細胞以 anti-CD3 與 anti-CD28 共同活化兩天之後，以 ELISA 測量培養液中 IFN-gamma 含量。基因轉殖小鼠的脾臟 T 細胞在 TCR 刺激下，細胞分泌的 IFN-gamma 量相較於同胎對照小鼠減少。

(B) 胸腺細胞以 anti-CD3 與 anti-CD28 共同活化兩天之後，以 ELISA 測量培養液中 IFN-gamma 含量。基因轉殖小鼠的胸腺細胞在 TCR 刺激下，細胞分泌的 IFN-gamma 量相較於同胎對照小鼠減少。



圖二十七、Paxillin S178A/S85A 的基因轉殖小鼠之脾臟 T 細胞在活化後細胞分泌的 IFN- $\gamma$  及 IL-4 皆減少。

脾臟 T 細胞以 anti-CD3 與 anti-CD28 共同活化兩天之後，取活化細胞以外加 IL-2(10U/ml)之 RPMI 培養三天，再次利用不同濃度之 anti-CD3 與 anti-CD28 共同活化，以 ELISA 測量培養液中 IFN-gamma 及 IL-4 含量。基因轉殖小鼠的脾臟 T 細胞在 TCR 刺激下，細胞分泌的 IFN-gamma 及 IL-4 的量皆減少。



圖二十八、Paxillin 在 T 細胞活化中可能扮演的角色

在收到來自 T 細胞受體(T cell receptor)的訊息時，JNK 及 p38 MAPK 會被活化，進而磷酸化 paxillin。被磷酸化的 paxillin 可能因構型改變而形成一特殊的結合位置，藉由招募某個未知的蛋白質而影響到 NFAT 轉錄因子的進核，並改變下游基因的表現。

## 參考文獻

Brown, M. C. and Turner, C. E. (2004). "Paxillin: adapting to change." *Physiol Rev* 84 : 1315-39.

Doucey, M. A. and Legler, D. F., Faroudi, M., Boucheron, N., Baumgaertner, P., Naeher, D., Cebecauer, M., Hudrisier, D., Ruegg, C., Palmer, E., Valitutti, S., Bron, C. and Luescher, I. F. (2003). "The  $\beta 1$  and  $\beta 3$  integrins promote T cell receptor-mediated cytotoxic T lymphocyte activation." *J Biol Chem* 278 : 26983-91.

Garcia, G. G. and Miller, R. A. (2002). "Age-dependent defects in TCR-triggered cytoskeletal rearrangement in CD4<sup>+</sup> T cells." *J Immunol* 169 : 5021-7.

Glenney, J. R., Jr. and Zokas, L. (1989). "Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton." *J Cell Biol* 108 : 2401-8.

Haaland, R. E., Yu, W. and Rice, A. P. (2005). "Identification of LKLF-regulated genes in quiescent CD4<sup>+</sup> T lymphocytes." *Mol Immunol* 42 : 627-41.

Hagel, M., George, E. L., Kim, A., Tamimi, R., Opitz, S. L., Turner, C. E., Imamoto, A. and Thomas, S. M. (2002). "The adaptor protein paxillin is essential for normal development in the mouse and is a critical transducer of fibronectin signaling." *Mol Cell Biol* 22 : 901-15.

Hogg, N., Laschinger, M., Giles, K. and McDowall, A. (2003). "T-cell integrins: more than just sticking points." *J Cell Sci* 116: 4695-705.

Huang, C., Borchers, C. H., Schaller, M. D. and Jacobson, K.(2004). "Phosphorylation of paxillin by p38MAPK is involved in the neurite extension of PC-12 cells." *J Cell Biol* 164 : 593-602.

Huang, C., Rajfur, Z., Borchers, C., Schaller, M. D. and Jacobson, K. (2003). "JNK phosphorylates paxillin and regulates cell migration." *Nature* 424 : 219-23.

Huppa, J. B. and Davis, M. M. (2003). "T-cell-antigen recognition and the immunological synapse." *Nat Rev Immunol* 3: 973-83.

Huse M. (2009). The T-cell-receptor signaling network. *J Cell Sci* 122:1269-1273

Ishibe, S., Joly, D., Liu, Z. X. and Cantley, L. G. (2003).

"Phosphorylation-dependent paxillin-ERK association mediates hepatocyte growth factor-stimulated epithelial morphogenesis." *Mol Cell* 12 : 1275-85.

Ku, H. and Meier, K. E. (2000). "Phosphorylation of paxillin via the ERK mitogen-activated protein kinase cascade in EL4 thymoma cells." *J Biol Chem* 275 : 11333-40.

Liu, S., Slepak, M. and Ginsberg, M. H. (2001). "Binding of Paxillin to the alpha 9 Integrin Cytoplasmic Domain Inhibits Cell Spreading." *J Biol Chem* 276 : 37086-92.

Liu, S., Thomas, S. M., Woodside, D. G., Rose, D. M., Kiosses, W. B., Pfaff, M. and Ginsberg, M.H. (1999). "Binding of paxillin to alpha4 integrins modifies integrin-dependent biological responses." *Nature* 402 : 676-81.

Liu, Z. X., Yu, C. F., Nickel, C., Thomas, S. and Cantley, L.G. (2002). "Hepatocyte growth factor induces ERK-dependent paxillin phosphorylation and regulates paxillin-focal adhesion kinase association." *J Biol Chem* 277 : 10452-8.

Ostergaard, H. L., Lou, O., Arendt, C. W. and Berg, N. N. (1998). "Paxillin phosphorylation and association with Lck and Pyk2 in anti-CD3- or anti-CD45-stimulated T cells." *J Biol Chem* 273 : 5692-6.

Romanova, L. Y., Hashimoto, S., Chay, K. O., Blagosklonny, M. V., Sabe, H. and Mushinski, J. F. (2004). "Phosphorylation of paxillin tyrosines 31 and 118 controls polarization and motility of lymphoid cell and is PMA-sensitive." *J Cell Sci* 117 : 3759-68.

Rose, D. M., Liu, S., Woodside, D. G., Han, J., Schlaepfer, D. D. and Ginsberg, M. H. (2003). "Paxillin binding to the alpha 4 integrin subunit stimulates LFA-1 (integrin alpha L beta 2)-dependent T cell migration by augmenting the activation of focal adhesion kinase/proline-rich tyrosine kinase-2." *J Immunol* 170 : 5912-8.

Sechi, A. S. and Wehland, J. (2004). "Interplay between TCR signaling and actin cytoskeleton dynamics." *Trends in Immunol* 25 : 257-65.

Tang, D. D., Turner, C. E. and Gunst, S. J. (2003). "Expression of



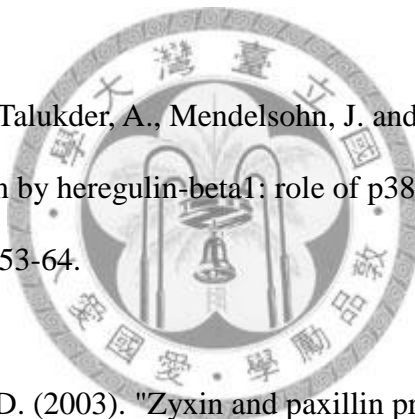
non-phosphorylatable paxillin mutants in canine tracheal smooth muscle inhibits tension development." *J Physiol* 553 : 21-35.

Turner, C. E. (1998). "Paxillin." *Int J Biochem Cell Biol* 30 : 955-9.

Turner, C. E. (2000). "Paxillin and focal adhesion signalling." *Nat Cell Biol* 2 : E231-6.

Turner, C. E., Glenney, J. R. Jr. and Burridge, K. (1990). "Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions." *J Cell Biol* 111 1059-68.

Vadlamudi, R., Adam, L., Talukder, A., Mendelsohn, J. and Kumer, R. (1999). "Serine phosphorylation of paxillin by heregulin-beta1: role of p38 mitogen activated protein kinase." *Oncogene* 18 : 7253-64.



Wang, Y. and Gilmore, T. D. (2003). "Zyxin and paxillin proteins: focal adhesion plaque LIM domain proteins go nuclear." *Biochim Biophys Acta* 1593 : 115-20.

Zuckerman, L. A. and Pullen, L. and Miller, J. (1998). "Functional consequences of costimulation by ICAM-1 on IL-2 gene expression and T cell activation." *J Immunol* 160: 3259-68.