

免疫突触形成的生物学特点及其光学成像研究*

林 玮¹⁾ 储以微^{2)**}

¹⁾ 山东省医学科学院基础医学研究所微生物室, 济南 250062; 山东中医药大学眼科研究所, 济南 250002;

²⁾ 复旦大学基础医学院免疫学系, 上海 200032)

摘要 免疫突触(immunological synapse, IS)是抗原提呈细胞与 T 细胞免疫识别时, 多种分子参与、分阶段不断变化的过程, 涉及黏附分子、细胞因子、信号传导分子、细胞骨架蛋白等多分子的聚集或离散。其形成不仅促进 T 细胞和抗原提呈细胞的稳定接触, 而且激活 T 细胞信号传导途径, 促进 T 细胞的活化和增殖。对 IS 的研究可以从分子水平解释免疫激活、免疫耐受、病原微生物感染与免疫细胞相互作用的机制, 为进一步揭示疾病发生的分子机制, 寻求疾病防治的靶向分子提供新的思路。近年来, 光学成像的发展为可视化研究 IS 形成与 T 细胞活化的关系提供了有力帮助, 为研究生理病理状态下的免疫应答提供了有力工具。

关键词 免疫突触(IS), T 细胞, 抗原提呈细胞, 免疫应答, 光学成像

学科分类号 R3.1

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0422

免疫应答的关键环节是 T 淋巴细胞的活化。活化的 T 细胞继而发挥免疫效应, 在最终清除病原体、促进疾病转归、预防再感染中起主导作用。这种获得性 T 细胞的活化依赖于 T 细胞与抗原提呈细胞 (antigen presenting cell, APC) 的相互识别。APC-T 细胞间免疫突触(immunological synapse, IS)的形成是影响 T 细胞活化增殖的关键因素^[1]。在 APC 与 T 细胞免疫识别过程中, 黏附分子、信号分子与其受体识别在细胞接触表面聚集, 形成的复杂的超分子结构。这个过程涉及接头蛋白的连接、黏附分子的相互作用、细胞骨架的极化、信号传导等一系列复杂的改变^[1]。IS 的形成不仅促进 T 细胞和 APC 的稳定接触, 而且激活 T 细胞信号传导途径, 促进 T 细胞的活化和增殖, 也是免疫调节、介导病原体感染免疫细胞的关键部位。调控 IS 形成中的分子分布可直接影响 T 细胞的活化状态。

由于形成 IS 的分子动态变化特点, 活体成像技术为实时动态监测 IS 形成与 T 细胞活化的关系提供了有利研究手段。活体成像技术不但可以实时监测到活体动物组织中细胞的迁移、免疫细胞的相互作用, 而且可以监测生理病理状态下, 免疫细胞的活化及调控。这为深入研究 T 细胞免疫活化及

调控在疾病中的作用提供了新视野。本文就 IS 的特点、功能以及其光学成像研究进展综述如下。

1 IS 形成的生物学特点

1.1 IS 形成是一个高度动态的过程

反射干涉显微镜(interference-reflection microscopy, IRM)光学成像技术最早监测到 IS 动态形成过程^[1-2]。IS 形成是多分子参与的动态过程: 包括突触连接形成、MHC-肽转运(major histocompatibility complex-peptide transport)和中央束稳定(stabilization)三个阶段^[1-2]。第一阶段在 T 细胞与 APC 接触的最初 0.5 min 内, T 细胞在趋化因子的作用下与负载抗原的 APC 识别活化, LFA-1/ICAM-1 和 CD2/CD58 等协同刺激分子相互识别, 促进 T 细胞与 APC 的相互作用。LFA-1/ICAM-1 先在 T-APC 交界面聚集, TCR 结

* 国家自然科学基金青年项目(81500710), 山东省卫生厅科技发展计划(2015WS0194), 山东省医学科学院科学发展计划(2015-25)和山东省医学科学院创新基金资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 021-541237350, E-mail: ywchu@shmu.edu.cn

收稿日期: 2017-11-14, 接受日期: 2017-12-04

合的 MHC- 肽复合物 (TCR-pMHC) 位于 LFA-1/ICAM-1 外周, TCR 被触发, T 细胞的信号传导被激发. 同时肌动蛋白等细胞骨架开始聚合, 形成树突状网络. 细胞骨架的聚合扩展了 T 细胞与 APC 细胞间紧密接触的面积. 第二阶段, T 细胞与 APC 接触 5 min 后, TCR-pMHC 向交界面的中心移动形成中央束, LFA-1/ICAM-1 随即移向接触区域的外侧, 在外周形成一环状结构. 这时 IS 的基本结构形成. 第三阶段, 细胞骨架网络的聚集促进了 IS 的稳定, 也有利于蛋白激酶 C 家族 θ 型 (protein kinase C- θ , PKC- θ) 等信号分子的募集, 为信号分子相互作用提供了脚手架. IS 的超分子结构可稳定数小时, 一方面增加了 APC 上 MHC- 肽复合物的密度, 另一方面提高了 T 细胞对 MHC- 肽刺激的敏感性^[3-5].

1.2 IS 的稳定性

IS 形成后, 树突状细胞(DC)与 T 细胞的稳定接触决定了免疫细胞的活化程度和增殖能力^[6]. T-DC 间形成的持续稳定的 IS(30 min 以上), 可有效激活 T 细胞^[6]. 而 T-DC 间不稳定的 IS(几分钟), 与诱发免疫耐受有关^[7-8]. 然而过长时间的接触也可能诱发 T 细胞的耐受(几个小时)^[7-8]. 祁海等^[9]应用双光子成像技术发现 IS 的稳定性长短与 T 细胞的亚群有关. 相比传统 T 细胞(conventional T cells,

Tconv)与 DC 间的 IS, 调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)可与 DC 形成更持续稳定的接触. 而且这种稳定性与 T 细胞的功能密切相关^[9-10]. 进而基于原子力显微镜的单细胞力谱仪和超分辨成像的分子研究发现, 由于 Treg 下调了钙蛋白酶(calpain)功能, 降低了黏附因子的回收, 造成了持续高强度附着. 并且由于 Treg 细胞的强附着使 DC 细胞骨架调节因子 Fascin1 (一种肌动蛋白集束因子)在 Treg-DC 细胞结合处聚集^[9-10]. 这个“稀缺”细胞骨架资源一旦被占据, DC 就不能正常向 Tconv 细胞极化和形成 IS, 导致对 Tconv 细胞活化抑制^[9-10]. 但当 Treg 细胞离开后, DC 细胞骨架资源又可以重新分配, 从而恢复正常的抗原呈递功能和对 Tconv 细胞的接触^[9-10]. 这些研究提示, T-DC 间 IS 的稳定性由黏附分子和骨架蛋白的聚集决定, Treg 的调节功能可以通过调节 DC 的骨架蛋白从而影响 DC 对 Tconv 的活化, IS 的稳定性影响 T 细胞活化.

1.3 IS 形成的分子结构类型

目前, 已报道的参与 IS 形成的分子可大致分为三类: 位于细胞膜的分子、位于细胞骨架蛋白和胞内信号传导分子. 这些分子在抗原提呈、促进细胞分化、细胞骨架运动、信号传导方面发挥重要作用^[11-16](表 1).

Table 1 The molecules involved in the formation of immune synapses^[11-16]
表 1 参与免疫突触形成的分子^[11-16]

分类	免疫突触相关分子	定位	功能
膜相关分子	TCR、CD3、CD4、趋化因子受体、钙通道相关蛋白、整合素(VLA4、LFA-1)、CTLA-4、PD-1、细胞因子受体; MHC、ICAM-1/3、CD40、B7-1/2、CD70、CD83、CD80、CD86、Notch 受体等	免疫突触的中心或外周部位	细胞黏附、细胞信号传导、钙通道活化、促进细胞骨架运动、促进 T 细胞分化, 与细胞的杀伤、提呈, 功能发挥有关
细胞骨架蛋白	F-actin、微管蛋白、细胞骨架相关蛋白、MTOC 等	免疫突触的外周部位, 有些定位在免疫突触的中心部位	细胞骨架运动、信号传导
信号传导分子	酪氨酸激酶家族、LAT、SLP-76、WASP、GTPases、TCR 激活信号通路分子, Akt、WASP、小 GTPase Rho 等	免疫突触的中心部位	信号传导、细胞骨架运动、细胞激活

通过共聚焦成像可以根据 IS 上聚集的分子排列分布的不同, 将 IS 的结构分为: “多聚集点的免疫突触(multifocal IS)”, “牛眼样免疫突触(bullseye IS)”和“不稳定的接触(kinapse)”^[17](图 1). “多聚集点的免疫突触(multifocal IS)”是 ICAM-1 与多个 TCR 聚集点相互交织形成的分子排布结构,

“牛眼样免疫突触(bullseye IS)”是 ICAM-1 围绕单一 TCR 聚集点的分子排布结构, 这种环状超分子结构被认为是成熟的 IS, 称为超分子活化簇(supermolecular activation clusters, SMAC), 包括中央超分子活化簇(central supramolecular activation cluster, cSMAC)、周边超分子活化簇(peripheral

supramolecular activation cluster, pSMAC)和远端超分子活化簇(distal supramolecular activation cluster, dSMAC)^[17-19]. 成熟 IS 的 cSMAC 为 pSMAC 所围, 最外周为 dSMAC. cSMAC 由 TCR/CD3、CD4 或 CD8、CD28 和 CD80/CD86 组成, 胞内信号分子 PKC- θ 、LCK、Fyn 和 ZAP70 等亦位于中央超分子活化簇的 T 细胞膜的内侧; 而 LFA-1 与细胞骨架蛋白 Talin 位于 pSMAC. 在成熟的免疫突触中, 大的糖分子蛋白 CD43 和 CD45 围绕在 pSMAC 外周为 dSMAC. cSMAC 是与 TCR 信号转导、维持

TCR 持续参与或内化相关的重要部位, pSMAC 为 T-APC 相互作用提供黏附锚定场所并保持其稳定结合. 而 dSMAC 有可能参与细胞骨架稳定维持及稳定免疫突触结构的形成^[18, 20-21]. “不稳定的接触(kinapse)”是 T-DC 间缺乏 TCR 聚集的形式, 与免疫耐受有关^[17, 19]. 在 T-DC 间“多聚集点的免疫突触(multifocal IS)”的形成比形成“牛眼样免疫突触(bullseye IS)”的 T 细胞释放更多的钙信号活化和 T 细胞活化信号^[17, 19, 22]. 因此, 组成 IS 的分子排布不同影响了 T 细胞的活化过程.

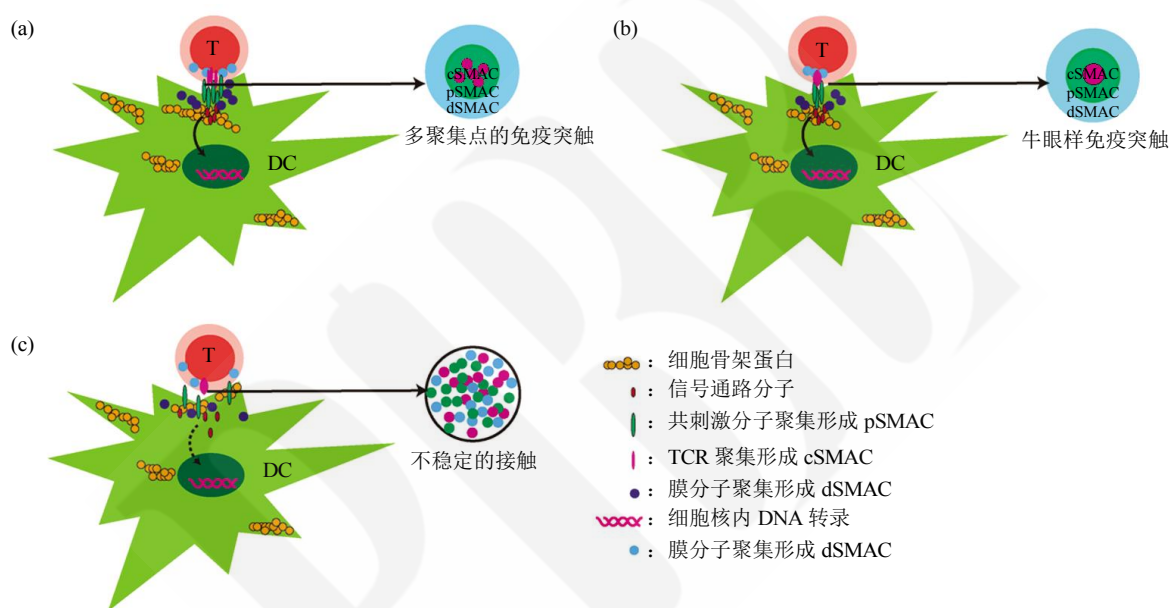


Fig. 1 Diagram of immunological synapse between T cells and DCs

图 1 T 细胞与 DC 细胞间形成的免疫突触类型示意图

(a) T 细胞与 DC 细胞间形成的“多聚集点的免疫突触”; (b) T 细胞与 DC 细胞间形成的“牛眼样免疫突触”; (c) T 细胞与 DC 细胞间形成的“不稳定的接触”. (a~c) 左图为 T 细胞和 DC 相互作用纵切面图; (a~c) 右图为 T 细胞和 DC 相互作用界面的横切面放大图.

2 免疫突触的作用

2.1 IS 是 T 细胞激活的初始平台

初始状态的 T 细胞(naive T cells)的 TCR 及信号分子等在细胞中均匀分布, 只有受到抗原刺激或 APC 呈递时, 发生聚集. 这一过程大大缩短了信号分子间的接触距离, 以及受体配体分子间的接触距离, 为信号通路激活提供了条件. TCR 在 DC-T 接触面上的聚集并接受 MHC-肽的刺激, 进而募集下游 PKC- θ 、LCK、Fyn 和 ZAP70 等 TCR 活化通路的信号分子在 IS 上聚集并活化^[3, 22-25]. 在此过程中细胞骨架蛋白也在 T-APC 细胞接触面极化,

一方面维持 T 细胞的极化状态保持稳定接触, 另一方面为信号分子活化聚集、钙离子活化相关蛋白、线粒体的细胞膜定位起到脚手架样作用, 从而协同保障了 T 细胞的活化^[22, 25]. ICAM-1 的动态运动与 T 细胞的钙激活有关, 如果 ICAM-1 丧失由接触中心向外侧运动的能力, 则不能形成 IS 的环状结构, T 细胞的钙激活则不容易被激活^[26]. 其作用有可能是 ICAM-1 的运动通过与其配体 LFA-1 的作用间接调节了 T 细胞活化^[26]. 此外, 有学者认为未致敏 T 细胞的 TCR 介导酪氨酸激酶信号的活化发生于 IS 外周, 并先于成熟 IS 的形成^[3, 24]. 因此, 虽然 T 细胞的初始活化先于成熟 IS 形成, 但仍有

赖于 IS 的动态形成^[24]. IS 形成过程与 T 细胞活化的关系仍待进一步研究.

2.2 IS 与免疫调节

不但活化信号分子参与了 IS 的形成, 调节性分子在 IS 上的定位决定了免疫细胞的激活或抑制状态. 细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4)在 T-DC 间 IS 上的定位, 竞争抑制了 CD28-B7 的信号通路, 导致 T 细胞活化状态受抑制, 并且促使一种缺乏 ZAP70, PLC- γ 信号分子聚集的抑制性 IS 的形成^[22, 27-28]. 而 CTLA-4 在 IS 上的缺失诱导了一种活化性 IS 的形成^[22]. 研究表明 CTLA-4 基因缺陷导致 CD28 介导的小鼠和人类严重的自身免疫性疾病, 提示 CTLA-4 的功能为抑制自身反应性 T 细胞的过度活化. 在癌症治疗方法的人性化, 靶向 CTLA-4 阻断抗体已被证明是通过逆转 T 细胞的耐受达到抗肿瘤的治疗^[29].

此外, 一些细胞因子受体也参与 IS 的形成. 这些细胞因子受体通过转位到 IS 上, 调节 IS 中的信号传导分子的表达, 影响 T 细胞的激活^[30-34]. 例如, γ 干扰素(IFN- γ)可以直接通过作用于 IFN- γ 受体(IFNGR)特异作用于 IS^[32-34]. IFNGR 和 IL-2R α 在 IS 上的定位, 有利于细胞间细胞因子的交流和调节 T 细胞的活化分化^[32-34]. 在 IL-4 存在的情况下, IFNGR 不能定位在辅助 T 细胞的 IS 上, 有可能影响了 IFN- γ 的 Jak/STAT 信号通路, 影响 T 细胞的激活, 抑制了 Th0 向 Th1 的分化^[32-33]. 更有趣的是, IS 中可检测到 IL-10 的分泌, 但 IL-10R 却不一定在所有细胞形成的 IS 上都能检测到^[32-33]. 在 T 细胞、B 细胞和 DCs 形成的 IS 中, IL-10 及其受体在 IS 上的分布也不同. IS 上缺乏 IL-10、IL-10R 可以抑制 IS 相关的细胞因子分泌及 T 细胞和 APC 间信号传导. 此外, IL-10 可以与 IL-10R 识别调节免疫细胞中骨架蛋白的运动, 从而调节免疫细胞的活化状态^[35].

2.3 IS 与病毒感染

在病毒感染机体时, 免疫细胞间形成的 IS 为病毒颗粒在细胞间传播提供了平台. 病毒侵入 APC, 进行复制、增殖、产生病毒颗粒, 在 APC 进行抗原提呈过程中, 这些病毒颗粒可以被呈递给 T 细胞或 B 细胞, 从而抑制了适应性的免疫应答. 例如人类免疫缺陷病毒(HIV)不但可以直接感染 T 细胞而且可以通过树突状细胞的呈递作用, 感染 T 细胞. 其作用机制主要通过 DC-T 突触间形成的肌

动蛋白丰富的片状膜扩展区(actin-rich sheet-like membrane extensions)快速转移模式(trans-enhancement)实现的^[36]. HIV 识别 DCs 上的受体, 例如 DC-SIGN 或甘露糖受体后, 内化, 并激活一系列信号分子 Src 激酶蛋白、Cdc42、Pak1 和 wasp 促进肌动蛋白 F-actin 富集的膜的移动, 并在 DC-T 间形成肌动蛋白丰富的片状膜扩展区, 促进 HIV 向 T 细胞的快速感染^[36-38]. 这一假说最近在人源化的小鼠身上得到证实^[39].

除了 HIV 外, 还有其他种类的病毒以直接和间接的方式通过影响免疫细胞的肌动蛋白细胞骨架重排, 调控 IS 的形成. 例如卡波西肉瘤相关疱疹病毒(KSHV), 可以诱导微管和肌动蛋白等细胞骨架在成纤维细胞(fibroblasts)中重排和 RhoA GTPase 表达和重排, 促进病毒颗粒通过 IS 转运^[40-42]. IS 为病毒颗粒在细胞间传播提供了平台.

2.4 IS 与神经递质分泌

近年来研究表明, IS 不但与神经突触的结构具有相似性, 而且其功能也有相似性, 可以传递神经递质信号^[43-44]. 研究者在分析了来自扁桃体摘除儿童的 200 个组织样本, 观察到一种特殊 T 细胞(follicular helper T, TFH 细胞)通过 IS 向 B 细胞传递多巴胺, 为 B 细胞提供额外动力, 从而帮助抗体生产以消除感染^[43]. IS 形成是否还有助于其他神经递质分子的传递以及对免疫细胞的功能如何调节还待深入研究. 尽管如此, 这种现象提示 IS 的形成不仅仅是一个细胞结构上的变化, 它在传递细胞间各种信息的过程中起到重要的平台作用.

3 IS 与光学成像技术

由于参与 IS 形成的分子动态分布特点, IS 的发现与研究主要通过光学成像系统, 例如共聚焦显微镜、双光子显微镜和超分辨显微镜等来实现. 由于 IS 形成对 T 细胞活化和免疫应答的重要性, 使 IS 研究逐渐受到关注. 而且随着荧光探针和光学成像技术的发展, 可以揭示更多传统免疫学方法所未知的现象. 光学成像技术为 IS 的深入研究提供了更有力手段.

3.1 新型探针的活体应用

新型探针的应用为免疫学研究提供了帮助^[45].
a. PA-GFP (photoactivatable (PA))^[46]和光转换荧光物质(Kaede^[47]和 KIKGR^[48])在免疫学的应用. 这些蛋白质能够在特定波长的光照射下表现出特异的光谱特性变化, 可以在特异标记的细胞或活体中使

用. 其高时空分辨率、低漂白性和对细胞的最小光毒性, 使之长时间成像可维持数小时甚至数天. 已有研究用 PA-GFP 示踪 B 细胞在淋巴结的生发中心不同区域间的迁移^[49]. 这种标记非常适合标记免疫细胞从一个区域迁移到另一个区域的长时程(几天到几周)的监测. b. “彩虹系统”(the brainbow system)采用了 Cre-lox 重组方法, 在目的序列前后加上 lox 序列的基因, 在 Cre 的介导下, 可以对 lox 序列中的特异基因切除, 从而表达未切除的基因. 进而使不同细胞谱系表达不同的颜色. 此系统应用于郎格罕细胞和滤泡树突状细胞的发育, 以及在生发中心, B 细胞发育成熟过程中抗原类型的转换^[50-52], 这种技术为研究 IS 形成对 T 细胞的克隆分化活化提供了可能. c. 远红外荧光蛋白^[53]和纳米管光学探针(nanotube-based optical sensor)^[54]可适合于深层组织(1 000~1 300 nm)的成像. 这为活体组织检测细胞间接触, 以及 IS 形成提供了可能.

3.2 活体光学成像

光学成像技术在监测活细胞内分子运动、活细胞动态变化、细胞因子的分泌过程等方面具有独特的优势. 应用光学技术研究 IS 的分子动态变化, 对于解释 IS 形成的分子机制以及免疫应答过程中分子运动机制具有重要的意义. 双光子成像技术在 1997 年首次应用于活体研究 DC 与 T 细胞的相互作用^[55], 此后研究者应用共聚焦和双光子成像技术监测到 IS 形成过程^[2, 6, 56], 以及 DC 与 T 细胞动态运动接触变化^[57]. Krummel 等^[6, 56]应用活体成像技术在体内监测到 DC-T 细胞间 TCR 的聚集、T 细胞活化及迁移. 此外, 活体双光子技术甚至可以监测到免疫应答中体内转录因子转位. 例如 Marangoni 等^[58]监测到在淋巴结和肿瘤环境中 T 细胞的 NFAT1-GFP 和 H2B-RFP 的结合导致了 NFAT 进出核的相对时间的不同. 动态原位流式细胞术(dynamic *in situ* cytometry, DISC)是结合活体多色成像技术和流式细胞仪样表型分析的系统, 使双光子成像技术在体内应用更简便^[59]. 由于 CD62L 分子从 T 细胞脱落可以反映 T 细胞的早期活化, 因此, 通过标记 CD4⁺T 细胞上的 CD62L 可示踪 T 细胞的动态变化及其与 DC 的相互作用, 以及 T 细胞活化^[59]. 但目前的技术尚不能解决活体状态下, DC 与 T 细胞相互作用的分子接触和激活状态的观察. 这对于生理病理状态下 T 细胞活化是十分重要的, 因此期待更灵敏的检测技术和方法的诞生.

4 问题与挑战

IS 的形成是一个多分子参与的动态变化过程, 是 APC 和 T 细胞相互识别时形成的分子结构. 对 IS 的研究可以从分子角度深入解释免疫细胞激活和增殖的信号传导机制, 以及免疫耐受、病原微生物与免疫细胞相互作用的分子机制, 从而为疾病防治提供新的思路. 然而, 参与免疫突触形成的分子如何影响 T 细胞活化? 是否可以通过调节这些分子的表达和定位来调节免疫反应? 这些分子是否可以作为疾病诊断的分子标志或治疗的靶标? 这些都是目前尚待解决的问题.

目前仪器的监测深度和时效性已有很大改进, 分子探针的生物相容性以及光学信号的稳定性也有很大提高, 使活细胞和活体内长时程(数天)动态监测蛋白质分子事件成为可能. 不同类型光学分子探针和多元化标记方法的联合使用, 使活体内多分子事件观察更加方便. 但目前还无法实现活体内亚细胞水平分子的成像. 由于 IS 是多分子参与的、细胞定位动态变化的过程, 需要采用更灵敏的检测方法实时动态监测活体状态下 IS 分子的运动及其和疾病的相关性, 因此期待更灵敏的仪器和探针的研发为免疫学分子水平研究提供更有力的工具.

参 考 文 献

- [1] Paul W E, Seder R A. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*, 1994, **76**(2): 241-251
- [2] Grakoui A, Bromley S K, Sumen C, *et al.* The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*, 1999, **285**(5425): 221-227
- [3] Lee K H, Holdorf A D, Dustin M L, *et al.* T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science*, 2002, **295**(5559): 1539-1542
- [4] Lee K H, Dinner A R, Tu C, *et al.* The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation. *Science*, 2003, **302**(5648): 1218-1222
- [5] Lee S J, Hori Y, Groves J T, *et al.* The synapse assembly model. *Trends Immunol*, 2002, **23**(10): 500-502
- [6] Friedman R S, Beemiller P, Sorensen C M, *et al.* Real-time analysis of T cell receptors in naive cells *in vitro* and *in vivo* reveals flexibility in synapse and signaling dynamics. *J Exp Med*, 2010, **207**(12): 2733-2749
- [7] Hugues S, Fetler L, Bonifaz L, *et al.* Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity. *Nat Immunol*, 2004, **5**(12): 1235-1242
- [8] Shakhar G, Lindquist R L, Skokos D, *et al.* Stable T cell-dendritic

- cell interactions precede the development of both tolerance and immunity *in vivo*. *Nat Immunol*, 2005, **6**(7): 707–714
- [9] Yan J, Liu B, Shi Y, *et al.* Class II MHC-independent suppressive adhesion of dendritic cells by regulatory T cells *in vivo*. *J Exp Med*, 2017, **214**(2): 319–326
- [10] Chen J, Ganguly A, Mucsi A D, *et al.* Strong adhesion by regulatory T cells induces dendritic cell cytoskeletal polarization and contact-dependent lethargy. *J Exp Med*, 2017, **214**(2): 327–338
- [11] Wei Lin Z F. Immunological synapse molecules. *Journal of Immunobiology*, 2016, **1** (3): 1000111 (DOI:10001101004172/1002476-1001966)
- [12] Wei Lin X W. Regulating Dcs in innate immune response and infection by cytoskeletal proteins. *Journal of Immunobiology*, 2017, **2**(2): 1000124 (DOI:10001101004172/1002476-1001966)
- [13] Suzuki J, Yamasaki S, Wu J, *et al.* The actin cloud induced by LFA-1-mediated outside-in signals lowers the threshold for T-cell activation. *Blood*, 2007, **109**(1): 168–175
- [14] Bouma G, Mendoza-Naranjo A, Blundell M P, *et al.* Cytoskeletal remodeling mediated by WASp in dendritic cells is necessary for normal immune synapse formation and T-cell priming. *Blood*, 2011, **118**(9): 2492–2501
- [15] Pulecio J, Tagliani E, Scholer A, *et al.* Expression of Wiskott-Aldrich syndrome protein in dendritic cells regulates synapse formation and activation of naive CD8⁺ T cells. *J Immunol*, 2008, **181**(2): 1135–1142
- [16] Rodriguez-Fernandez J L, Riol-Blanco L, Delgado-Martin C. What is an immunological synapse? *Microbes Infect*, 2010, **12**(6): 438–445
- [17] Thauland T J, Parker D C. Diversity in immunological synapse structure. *Immunology*, 2010, **131**(4): 466–472
- [18] Monks C R, Freiberg B A, Kupfer H, *et al.* Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*, 1998, **395**(6697): 82–86
- [19] Dustin M L, Chakraborty A K, Shaw A S. Understanding the structure and function of the immunological synapse. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, **2**(10): a002311
- [20] Gonzalez P A, Carreno L J, Figueroa C A, *et al.* Modulation of immunological synapse by membrane-bound and soluble ligands. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2007, **18**(1–2): 19–31
- [21] Rudd P M, Wormald M R, Stanfield R L, *et al.* Roles for glycosylation of cell surface receptors involved in cellular immune recognition. *J Mol Biol*, 1999, **293**(2): 351–366
- [22] Lin W, Fan Z, Suo Y, *et al.* The bullseye synapse formed between CD4⁺ T-cell and staphylococcal enterotoxin B-pulsed dendritic cell is a suppressive synapse in T-cell response. *Immunol Cell Biol*, 2015, **93**(1): 99–110
- [23] Masi G, Baldari C T. Signaling at the immune synapse: vesicular trafficking takes the stage. *Cell Mol Immunol*, 2013, **10**(6): 459–462
- [24] Dustin M L. Coordination of T cell activation and migration through formation of the immunological synapse. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, **987**: 51–59
- [25] Lin W, Suo Y, Deng Y, *et al.* Morphological change of CD4(+) T cell during contact with DC modulates T-cell activation by accumulation of F-actin in the immunology synapse. *BMC Immunol*, 2015, **16**(49): 1–15
- [26] Yuanzhen Suo W L, Yuting Deng, Zhichao Fan, *et al.* ICAM-1 depletion in the center of immunological synapses is important for calcium releasing in T-cells. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2017, **11**(1): 1750015
- [27] Schneider H, Smith X, Liu H, *et al.* CTLA-4 disrupts ZAP70 microcluster formation with reduced T cell/APC dwell times and calcium mobilization. *Eur J Immunol*, 2008, **38**(1): 40–47
- [28] Chikuma S, Bluestone J A. CTLA-4 and tolerance: the biochemical point of view. *Immunol Res*, 2003, **28**(3): 241–253
- [29] Chikuma S. CTLA-4, an Essential immune-checkpoint for T-cell activation. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017, doi: 101007/82_2017_61
- [30] Bollyky P L, Evanko S P, Wu R P, *et al.* Th1 cytokines promote T-cell binding to antigen-presenting cells *via* enhanced hyaluronan production and accumulation at the immune synapse. *Cell Mol Immunol*, 2010, **7**(3): 211–220
- [31] Takamatsu H, Okuno T, Kumanogoh A. Regulation of immune cell responses by semaphorins and their receptors. *Cell Mol Immunol*, 2010, **7**(2): 83–88
- [32] Maldonado R A, Irvine D J, Schreiber R, *et al.* A role for the immunological synapse in lineage commitment of CD4 lymphocytes. *Nature*, 2004, **431**(7008): 527–532
- [33] Huse M, Lillemeier B F, Kuhns M S, *et al.* T cells use two directionally distinct pathways for cytokine secretion. *Nat Immunol*, 2006, **7**(3): 247–255
- [34] Sanderson N S, Puntel M, Kroeger K M, *et al.* Cytotoxic immunological synapses do not restrict the action of interferon-gamma to antigenic target cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(20): 7835–7840
- [35] Xu X, Liu X, Long J, *et al.* Interleukin-10 reorganizes the cytoskeleton of mature dendritic cells leading to their impaired biophysical properties and motilities. *PLoS One*, 2017, **12** (2): e0172523
- [36] Cavois M, Neidleman J, Greene W C. The achilles heel of the trojan horse model of HIV-1 trans-infection. *PLoS Pathog*, 2008, **4**(6): e1000051
- [37] Do T, Murphy G, Earl L A, *et al.* Three-dimensional imaging of HIV-1 virological synapses reveals membrane architectures involved in virus transmission. *J Virol*, 2014, **88**(18): 10327–10339
- [38] Yu H J, Reuter M A, McDonald D. HIV traffics through a specialized, surface-accessible intracellular compartment during trans-infection of T cells by mature dendritic cells. *PLoS Pathog*, 2008, **4**(8): e1000134
- [39] Sewald X, Ladinsky M S, Uchil P D, *et al.* Retroviruses use CD169-mediated trans-infection of permissive lymphocytes to establish infection. *Science*, 2015, **350**(6260): 563–567
- [40] Akula S M, Naranatt P P, Walia N S, *et al.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) infection of

- human fibroblast cells occurs through endocytosis. *J Virol*, 2003, **77**(14): 7978–7990
- [41] Naranatt P P, Krishnan H H, Smith M S, *et al.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus modulates microtubule dynamics via RhoA-GTP-diaphanous 2 signaling and utilizes the dynein motors to deliver its DNA to the nucleus. *J Virol*, 2005, **79** (2): 1191–1206
- [42] Sharma-Walia N, Naranatt P P, Krishnan H H, *et al.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 envelope glycoprotein gB induces the integrin-dependent focal adhesion kinase-Src-phosphatidylinositol 3-kinase-rho GTPase signal pathways and cytoskeletal rearrangements. *J Virol*, 2004, **78** (8): 4207–4223
- [43] Papa I, Saliba D, Ponzoni M, *et al.* TFH-derived dopamine accelerates productive synapses in germinal centres. *Nature*, 2017, **547**(7663): 318–323
- [44] Qi H. Immunology: Nervous crosstalk to make antibodies. *Nature*, 2017, **547**(7663): 288–290
- [45] Lukyanov K A, Chudakov D M, Lukyanov S, *et al.* Innovation: Photoactivatable fluorescent proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, **6**(11): 885–891
- [46] Patterson G H, Lippincott-Schwartz J. A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science*, 2002, **297**(5588): 1873–1877
- [47] Ando R, Hama H, Yamamoto-Hino M, *et al.* An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(20): 12651–12656
- [48] Tsutsui H, Karasawa S, Shimizu H, *et al.* Semi-rational engineering of a coral fluorescent protein into an efficient highlighter. *EMBO Rep*, 2005, **6**(3): 233–238
- [49] Vitorica G D, Schwickert T A, Fooksman D R, *et al.* Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell*, 2010, **143**(4): 592–605
- [50] Ghigo C, Mondor I, Jorquera A, *et al.* Multicolor fate mapping of Langerhans cell homeostasis. *J Exp Med*, 2013, **210**(9): 1657–1664
- [51] Jarjour M, Jorquera A, Mondor I, *et al.* Fate mapping reveals origin and dynamics of lymph node follicular dendritic cells. *J Exp Med*, 2014, **211**(6): 1109–1122
- [52] Snippert H J, Van Der Flier L G, Sato T, *et al.* Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell*, 2010, **143**(1): 134–144
- [53] Tischbirek C H, Birkner A, Konnerth A. *In vivo* deep two-photon imaging of neural circuits with the fluorescent Ca^{2+} indicator Cal-590. *J Physiol*, 2016, **595**(10): 3097–3105
- [54] Roxbury D, Jena P V, Williams R M, *et al.* Hyperspectral microscopy of near-infrared fluorescence enables 17-chirality carbon nanotube imaging. *Sci Rep*, 2015, **21**(5): 14167
- [55] Ingulli E, Mondino A, Khoruts A, *et al.* *In vivo* detection of dendritic cell antigen presentation to CD4(+) T cells. *J Exp Med*, 1997, **185**(12): 2133–2141
- [56] Beemiller P, Jacobelli J, Krummel M F. Integration of the movement of signaling microclusters with cellular motility in immunological synapses. *Nat Immunol*, 2012, **13**(8): 787–795
- [57] Stoll S, Delon J, Brotz T M, *et al.* Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science*, 2002, **296**(5574): 1873–1876
- [58] Marangoni F, Murooka T T, Manzo T, *et al.* The transcription factor NFAT exhibits signal memory during serial T cell interactions with antigen-presenting cells. *Immunity*, 2013, **38**(2): 237–249
- [59] Moreau H D, Lemaitre F, Terriac E, *et al.* Dynamic *in situ* cytometry uncovers T cell receptor signaling during immunological synapses and kinapses *in vivo*. *Immunity*, 2012, **37**(2): 351–363

Biological Characteristics and Optical Imaging Research of Immunological Synapse Formation*

LIN Wei¹⁾, CHU Yi-Wei^{2)**}

¹⁾ Department of Microbiology, Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China;

Eye Institute of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250002, China;

²⁾ Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract Immunological synapse (IS) is a specialized and sophisticated supramolecular activation cluster structure that is formed at the interface between T cell and antigen presenting cells. It is a dynamic multistage progress, involving adhesion molecules, cytokines, signaling molecules, cell cytoskeletal proteins and other molecules. IS is not only contribute to the stability of the contact between T cells and APC, but also promotes T-cell activation and proliferation through T cells signaling pathway. Studying of the immunological synapse could explain molecular mechanisms of immune activation, immune tolerance, and the mechanism of interaction between pathogenic microbes and immune cells, which will provide new ideas for further revealing the pathogenic mechanism of disease, and seeking new target molecules for disease control and prevention. Recently, optical imaging provides a powerful help for visualization on the relationship between IS formation and T-cell activation. It provides a powerful tool for studying the immune response under physiological and pathological conditions.

Key words immunological synapse, T cell, antigen processing cell, immune response, optical imaging

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0422

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81500710), Projects of Medical and Health Technology Development Program in Shandong Province (2015WS0194), The Science and Technology Program from Shandong Academy of Medical Sciences (2015-25), and Innovation Project of Shandong Academy of Medical Sciences.

**Corresponding author.

Tel: 86-21-541237350, E-mail: ywchu@shmu.edu.cn

Received: November 14, 2017 Accepted: December 4, 2017