2

结核杆菌进化出大量真核样效应器，可能对逃避宿主免疫反应起作用

结核分枝杆菌（Mtb）是一种古老的病原体，能引发结核病，已经进化出大量的胞内生存策略以逃避宿主免疫，从而导致结核病的发生发展。Mtb进化出了一个显著特征，具有一系列**真核样效应蛋白**，但其在病原-宿主相互作用中的宿主靶点及调节功能仍然未知。为了预测Mtb分泌的可能直接靶向宿主因子的真核样蛋白，作者检查了MtbHRv的全基因组，发现了540个含有真核样的motif或domain的基因，其中201个基因的产物是分泌型蛋白。在重组系统中，用ELISA检测了这些蛋白对AIM2和NLRP3炎症小体通路的效果(Fig.1A)。炎症小体组装引发了caspase-1的自切割，这随后切割了IL-1β前体和GSDMD，接着成熟的IL-1β通过N-GSDMD在细胞膜所成的孔释放出来。

3

PtpB是细菌逃避炎症小体-焦亡的重要抑制剂

在炎症小体重组系统中，PtpB对两种炎症小体介导的IL-1β释放都显示出强烈的抑制效果，也是Mtb在感染过程中分泌最多的蛋白。因此，作者聚焦PtpB，构建了ptpB敲除的结核分枝杆菌突变株，突变株显示出比野生型更强的焦亡诱导效应，表明PtpB对宿主炎症小体焦亡通路是一个重要的抑制剂。

4

PtpB抑制GSDMD依赖的焦亡细胞因子释放

正常焦亡过程中，成熟的IL-1β、caspase-1和GSDMD-C在炎症小体活化后从焦亡细胞中释放出来。PtpB敲除增加了IL-1β、IL-18、caspase-1和GSDMD-C的分泌，降低了胞内钾离子浓度，促进巨噬细胞焦亡，并导致结核分枝杆菌在巨噬细胞内的存活率下降。这些都是是依赖GSDMD进行的。但PtpB敲除的结核分枝杆菌在没有宿主的情况下并未表现出任何生长缺陷。总而言之，这些数据表明PtpB抑制GSDMD依赖的炎症小体细胞因子释放和焦亡，**以提高Mtb的胞内存活率**。

5

PtpB干扰GSDMD-N的膜定位

GSDMD-N是GSDMD介导细胞因子释放和焦亡的功能结构域。作者构建了人源GSDMD4A突变体，造成了GSDMD-N失活。用野生型人源GSDMD补偿GSDMD敲除的的巨噬细胞，重新获得了巨噬细胞感染分支结核杆菌的表型，像预期一样，上清中的IL-1β和IL-18增加，细胞毒性增加，细菌存活力下降，但4A突变体则无法恢复表型(Fig. 2, B to E)。此外，PtpB的表达显著降低了GSDMD-N的膜定位和细胞毒性（Fig2 FGH）。相应的，ptpB敲除显著促进了结核杆菌感染过程中巨噬细胞GSDMD-N向质膜的转移（2I）。因此，PtpB干扰了GSDMD-N的膜定位，**从而阻碍巨噬细胞分泌细胞因子并发生焦亡**。

6

PtpB通过其磷酸酶活性来干扰GSDMD-N的膜定位

**GSDMD-N显示了对细胞膜脂的强亲和性，特别是磷脂酰肌醇-4-磷酸和磷脂酰肌醇-4，5-二磷酸.这种亲和性使得它能够定位在质膜的内层上并打孔**。PtpB是一种真核样酪氨酸蛋白磷酸酶，为了检测PtpB是否通过对宿主质膜进行去磷酸化而干扰GSDMD-N的膜定位，作者构建了两种PtpB突变体。C160S突变体丧失了磷酸酪氨酸和磷酸肌醇磷酸酶活性，而K164A突变仅仅丢失了磷酸酪氨酸磷酸酶活性。感染过程中，PtpB及其突变体从结核分枝杆菌中分泌出来，随后定位到巨噬细胞质膜上（Fig3A,B）。与GSDMD-N和膜脂结合的行为相似，PtpB表现出对PI4P强烈的亲和性，其次是PI(4,5)P2（Fig 3C）。将PtpB和两个突变体与含有磷脂酰肌醇的脂质体共孵育，发现它们都能被PI4P和PI(4,5)P2所捕获(Fig. 3D)。

7

与ptpB敲除相似， C160S突变体促进了GSDMD-N向质膜的转移，增强了IL-1β和IL-18的分泌，细胞毒性增强，结核分枝杆菌胞内存活率下降，而K164A不能。这些结果显示，**PtpB是一种膜脂结合蛋白**，其赖氨酸依赖的磷酸酶活性对损害GSDMD-N的膜定位至关重要。

8

PtpB降低了质膜PI4P and PI(4,5)P2 浓度以损害GSDMD介导的免疫功能

在野生型和PtpB补偿的结核分枝杆菌感染的巨噬细胞中，给予外源性PI4P都能促进IL-1β和IL-18的分泌、细胞毒性增加、胞内存活率下降，达到与ptpB敲除和C160S突变相似的水平(Fig. 4, A to D)。用PI(4,5)P2处理，部分消除了四个感染组之间差异，而另外两种磷脂酰肌醇不能。在结核分枝杆菌感染时，PtpB显著地降低了质膜中PI4P and PI(4,5)P2的浓度，而对胞内膜没有显著影响(Fig. 4, E and F)。因此，PtpB损害GSDMD介导的免疫反应很可能是通过去除宿主质膜上的PI4P和PI(4,5)P2。

9

为了证实这一猜想，作者利用一种融合蛋白PJ对两种磷脂酰肌醇进行去磷酸化。在雷帕霉素作用下，PJ向质膜的募集降低了质膜PI4P and PI(4,5)P2浓度，而PJ-Sac和PJ-INPP5E分别选择性地降低了质膜PI4P 和PI(4,5)P2的浓度，而PJ-DEAD无法对任何一种磷脂酰肌醇去磷酸化(Fig. 4, H to J)。最终，PJ显著降低了IL-1β和IL-18释放、细胞毒性，提高了结核分枝杆菌的胞内生存率。同时，PJ-Sac 或 PJ-INPP5E单独的影响都很小，表明质膜PI4P和PI(4,5)P2对GSDMD-N的质膜定位有协同作用(Fig. 4, K to N)。**总而言之，PtpB能对质膜上的PI4P and PI(4,5)P2去磷酸化，并降低他们的浓度，从而损害GSDMD介导的免疫反应。**

10

PtpB干扰GSDMD介导的免疫反应需要泛素连接

结构上，PtpB拥有一个活性位点，带有磷酸结合环，被一个灵活的双螺旋“盖子”覆盖，提示PtpB的磷脂磷酸酶活性在体内可调节。此前，他们发现另一个Mtb蛋白酪氨酸磷酸酶PtpA能利用宿主的泛素。对PtpB和泛素进行结构分析，发现PtpB拥有一个泛素相互作用基序，可能和泛素的44位异亮氨酸相结合（F5A）。为了确认该泛素结合区域是否介导PtpB与泛素的相互作用，作者构建了PtpB3E突变体，该突变破坏了PtpB的泛素结合区域。PtpB在体外和泛素直接结合，而PtpB 3E和泛素I44A突变体丢失了它们间的相互作用(Fig. 5B)。果然，泛素提高了野生型PtpB的催化效率，但对PtpB 3E突变体没有影响(Fig. 5C)。

11

感染期间，PtpB 3E突变显著增加了质膜上PI4P, PI(4,5)P2,和GSDMD-N的含量(Fig. 5, D to F)。体外试验进一步说明，额外的泛素显著增加了野生型PtpB对PI4P的催化活性，但对C160S和3E突变体无影响(Fig. 5G)，而对其他磷脂的催化活性影响较弱。因此，泛素结合似乎促进了PtpB对宿主的磷酸肌醇进行去磷酸化从而抑制GSDMD介导的免疫反应。为了进一步确认该假设，作者用各种结核分枝杆菌PtpB突变体感染巨噬细胞。与PtpB敲除株和C160S突变相似，3E突变体增强了IL-18和IL-1β的分泌，增加了细胞毒性，并降低了结核分枝杆菌的胞内生存率，但在GSDMD敲除的巨噬细胞中无影响（Figure 5 HIJK）。因此，泛素结合对PtpB干扰GSDMD依赖的免疫反应是必要的。

12小鼠模型

Mtb逃避宿主GSDMD依赖的免疫需要PtpB泛素相互作用

最后，作者想要确认小鼠模型中PtpB在GSDMD依赖的宿主免疫。与PtpB敲除相似，PtpB C160S和3E突变体显著降低了Mtb诱导的肺部炎症浸润以及肺部和脾脏的细菌负荷(Fig. 6, ABCD)。然而，每种结核分枝杆菌ptpB突变体都在GSDMD敲除小鼠中造成了相似的病理变化。

13

此外，ptpB敲除和ptpB突变株还显著增加了BULF和肺内的IL-1β、IL-18和IFN-γ的数量，并在小鼠肺部造成了更多的TUNEL阳性细胞，而细菌负荷降低，**提示宿主焦亡和抗细菌免疫增强**。在GSDMD敲除的小鼠中，不同菌株造成的炎症细胞因子数量差异都消失了。总之，结核分枝杆菌需要PtpB来逃避宿主GSDMD介导的免疫反应，这需要PtpB由泛素活化的脂质磷酸酶活性。

14

总结：

炎症小体介导GSDMD切割，引发焦亡和炎症因子释放来控制病原体感染。该研究发现来自分支结核杆菌的磷脂磷酸酶PtpB能够抑制宿主炎症小体焦亡通路。机制上，PtpB对宿主膜上的磷脂酰肌醇-4-磷酸和磷脂酰肌醇-4，5-二磷酸进行去磷酸化，从而干扰GSDMD切割后的膜定位以抑制细胞因子释放和巨噬细胞焦亡。这种磷脂磷酸酶活性需要PtpB与泛素结合。干扰磷脂磷酸酶活性或PtpB的泛素结合区域均能增强宿主细胞GSDMD依赖的免疫反应，并降低胞内病菌存活。这阐明了一种机制，病原体操纵泛素，通过改变宿主质膜磷脂组分来抑制宿主焦亡。PtpB泛素结合结构域与任一人类蛋白均不同源，这可能为抗结核病提供潜在疗法。