

Ubc9融合表达时SUMO化修饰影响 蛋白激酶C θ 在免疫突触的聚集

龚宇^{1,2*} 李迎秋²

(¹广州医科大学附属第三医院, 广州 510150; ²中山大学, 广州 510275)

摘要 SUMO化修饰具有广泛的功能, 包括调控神经突触的形成和传递。神经突触和免疫突触共享某些特性, 而蛋白激酶C θ (protein kinase C θ , PKC θ)是蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)家族中唯一能在抗原刺激后定位于免疫突触中央超分子活化簇的一员。为了探讨SUMO化修饰对免疫突触的影响, 该文采用“Ubc9融合介导的SUMO化修饰系统(Ubc9 fusion-directed SUMOylation system, UFDS)”方法检测Ubc9-PKC θ 与SUMO的相互作用; 应用体外定点突变技术构建多个SUMO化修饰位点突变的Ubc9-PKC θ ; 通过荧光显微镜观察Raji B-Jurkat T细胞之间的接触面。结果显示, Ubc9-PKC θ 能被SUMO化修饰, 且抗原刺激后能在免疫突触聚集; 而当多个SUMO化修饰位点突变后, Ubc9-PKC θ 的SUMO化水平显著下调, 抗原刺激后虽然还是被招募到免疫突触上, 但呈现弥散状态。综上所述, Ubc9融合表达时SUMO化修饰影响PKC θ 在免疫突触的聚集。

关键词 SUMO化修饰; UFDS; PKC θ ; 免疫突触

SUMOylation Affects Aggregation of PKC θ at the Immunological Synapse When Ubc9 Is Fusion Expressed

Gong Yu^{1,2*}, Li Yingqiu²

(¹The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510150, China;

²Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract SUMOylation has diverse functions, including regulating the neural synapse formation and transmission. The neural and immunological synapses share common features, while protein kinase C θ (PKC θ) is the only PKC (protein kinase C) isoform which is localized in the cSMAC of the immunological synapse following antigen stimulation. To unravel the effects of sumoylation on the immunological synapse, this study measured the interaction between Ubc9-PKC θ and SUMO by Ubc9 fusion-directed SUMOylation system (UFDS), constructed multipoint KR mutant of Ubc9-PKC θ by PCR site-directed mutagenesis, observed the contact surface between Raji B and Jurkat T cells by fluorescence microscope. The results showed that Ubc9-PKC θ could be modified by SUMO, and accumulated at the immunological synapse after antigen stimulation. Furthermore, after multiple SUMOylation sites were mutated, the sumoylated Ubc9-PKC θ had a significant reduction, and was still targeted to the immunological synapse but displayed a diffuse pattern. In conclusion, SUMOylation can affect aggregation of

收稿日期: 2018-01-26 接受日期: 2018-03-12

广州医科大学博士项目(批准号: 2011C43)和广州医科大学附属第三医院博士启动项目(批准号: 2012Y20)资助的课题

*通讯作者。Tel: 020-81290030, E-mail: shirley_gong17@hotmail.com

Received: January 26, 2018 Accepted: March 12, 2018

This work was supported by Ph.D. Program from Guangzhou Medical University (Grant No.2011C43) and Ph.D. Staring Program from the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University (Grant No.2012Y20)

*Corresponding author. Tel: +86-20-81290030, E-mail: shirley_gong17@hotmail.com

网络出版时间: 2018-05-25 10:36:06

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180525.1035.002.html>

PKC θ at the immunological synapse when Ubc9 is fusion expressed.

Keywords SUMOylation; UFDS; PKC θ ; immunological synapse

蛋白质翻译后修饰是一种在蛋白质的翻译水平上调控基因功能的重要方式,使蛋白质的功能更为完善,调节更为精细。目前已有几百种蛋白质翻译后修饰被报道,常见的有磷酸化、糖基化、甲基化、乙酰化、泛素化和SUMO化等,其中,SUMO化被发现已有十余年时间。SUMO化与泛素化有不同之处,也有相似之处。与泛素化不同的是,SUMO化不介导蛋白酶体依赖的蛋白降解过程,而是可逆性的修饰靶蛋白;与泛素化相似的是,SUMO化修饰底物的过程也包括前体成熟、活化、共价结合靶蛋白和水解脱离靶蛋白进入下一轮循环等一系列酶的级联反应,但是参与SUMO化修饰的酶与参与泛素化修饰的酶完全不同^[1]。SUMO化修饰具有广泛的功能,包括调节蛋白质之间的相互作用、调节蛋白质在核质间的转运、调控转录活性、参与线粒体分裂的调控、调节离子通道的活性、参与维持基因组的完整性、调节染色体凝集和分离、参与DNA修复过程、调控细胞周期及调节细胞信号传导等^[2-5]。

蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)是一类丝氨酸/苏氨酸激酶家族,通过催化底物蛋白质发生磷酸化来发挥多种生物学功能。PKC θ 是其重要的成员之一,在TCR/CD28双信号触发成熟T细胞的活化和增殖中扮演关键角色^[6]。同样地,蛋白质翻译后修饰在PKC θ 功能的发挥中起到了决定性作用,例如:PKC θ 是通过磷酸化一些转录因子(NF- κ B、AP-1或NFAT等)将细胞外信息传导至细胞核内,诱导编码淋巴因子及其受体的基因活化,最终促进淋巴因子表达、分泌及淋巴细胞活化^[7-9]。SUMO化修饰已被报道在神经突触的形成和传递过程中行使调节功能^[10-11],而PKC θ 具有其独特的性质,即它能够高选择性的被募集到免疫突触的中心性超分子活化复合体区域。免疫荧光研究显示,TCR信号传导能刺激PKC θ 在免疫突触聚集^[12-14],因此可以推断SUMO化修饰可能调控PKC θ 在免疫突触的聚集。考虑到SUMO化修饰的高度瞬时性所导致的不易检测性,本研究采用“Ubc9融合介导的SUMO化修饰系统(Ubc9 fusion-directed SUMOylation system, UFDS)”方法^[15],即融合表达Ubc9和PKC θ 来检测PKC θ 的SUMO化修饰,进一步探索SUMO化修饰对PKC θ 在

免疫突触聚集的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人胚肾293T细胞、人B淋巴瘤Raji(Raji B)细胞及人T淋巴瘤Jurkat细胞均为本实验室保存。人胚肾293T细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM培养液中,37℃、5% CO₂,饱和湿度的培养箱内。人B淋巴瘤Raji细胞和人T淋巴瘤Jurkat细胞均培养于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液,37℃、5% CO₂,饱和湿度的培养箱内。

1.1.2 试剂 pFLAG-CMV-2、pEF6/cMyc真核细胞表达载体为本实验室保存;Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司;PfuUltra II Fusion HS DNA polymerase、QuikChange site-directed mutagenesis kit均购自Stratagene公司;各种限制性内切酶均购自TaKaRa公司;DNA连接酶购自New England公司;用于免疫共沉淀的PKC θ (610090)抗体购自BD公司;用于Western blot的cMyc(9E10)和PKC θ (C-19)抗体均购自Santa Cruz公司,FLAG M2(F3165)抗体购自Sigma-Aldrich公司。金黄色葡萄球菌肠毒素E(staphylococcal enterotoxin E, SEE)购自Toxin Technology公司。CellTracker Blue购自Molecular Probes公司。

1.2 方法

1.2.1 构建Ubc9-PKC θ 融合表达质粒 构建FLAG-Ubc9真核表达载体:人全长Ubc9 CDS以Jurkat E6.1细胞总cDNA为模板进行PCR反应,PCR产物经琼脂糖凝胶电泳,回收大小约477 bp的电泳条带,即Ubc9。Ubc9的PCR纯化产物经Hind III和Bgl II酶切消化后,与事先制备好的同样具有Hind III和Bgl II粘性末端的pFLAG-M2质粒载体连接,得到FLAG-Ubc9质粒。

构建FLAG-Ubc9-PKC θ 真核表达载体:人全长PKC θ CDS以Jurkat E6.1细胞总cDNA为模板进行PCR反应,PCR产物经琼脂糖凝胶电泳,回收大小约2 121 bp的电泳条带,即PKC θ 。PKC θ 的PCR纯化产物经Kpn I和BamH I酶切消化后,与事先制备好的同样具有Kpn I和BamH I黏性末端的FLAG-Ubc9质粒载体连接,最终得到FLAG-Ubc9-PKC θ 质粒。

表1 Ubc9-PKC θ 点突变引物序列Table 1 The primer sequences used for the point mutations of Ubc9-PKC θ

引物名称 Primer names	引物序列 Primer sequences
PKC θ -K227R	5'-CCA CAA GGA GAG ATT CAG AAT TGA CAT GCC ACA CAG-3'
PKC θ -K261R	5'-CAC GGC AAG GAC TCA GGT GTG ATG CAT GTG G-3'
PKC θ -K325R	5'-CCC ATG CTC CAT CAG AAA TGA AGC AAG GCC-3'
PKC θ -K376R	5'-CCA TCT CTG CAG ATT AAA CTA AGA ATT GAG GAT TTT ATC TTG CAC-3'
PKC θ -K412R	5'-CGC AAT AAA GGC CTT AAG GAA AGA TGT GGT CTT GAT-3'
PKC θ -K506R	5'-GTC TAC AGG GAC CTG AGG CTA GAT AAC ATC CTG-3'
PKC θ -K656R	5'-GTT CCG GCC GAA AGT GAG ATC ACC ATT TGA CTG C-3'

1.2.2 构建Ubc9-PKC θ 多点突变质粒 参考Stratagene公司QuikChange site-directed Mutagenesis kit操作说明。以野生型FLAG-Ubc9-PKC θ 质粒为模板,根据实验目的设计引物,在PfuUltra II Fusion HS DNA polymerase的作用下进行PCR反应。为了增加阳性克隆的检出率,将扩增结束后的PCR产物用限制性内切酶Dpn I消化,从而使原始模板DNA被消化,选择性地保留突变DNA。Dpn I消化产物转化大肠杆菌后通过氨苄抗性筛选阳性克隆,突变体由DNA测序加以验证。我们对野生型FLAG-Ubc9-PKC θ 依次进行单点突变,最终构建多点同时突变的FLAG-Ubc9-PKC θ 。点突变引物序列见表1。

1.2.3 Lipofectamine 2000脂质体转染293T细胞 转染前24 h用含10%胎牛血清的无抗DMEM培养基将人胚肾293T细胞接种于6孔板中,接种量以转染时70%~80%的细胞密度为宜。用50 μ L opti-MEMI稀释1 μ L Lipofectamine 2000脂质体,室温静置5 min;期间用50 μ L opti-MEMI稀释1 μ g质粒,然后将上述两种溶液混匀,室温静置20 min后加入6孔板中;37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 常规培养4~6 h后换新鲜DMEM培养基,24~48 h收细胞。

1.2.4 电穿孔转染Jurkat T细胞 1 000 r/min离心5 min收集Jurkat T细胞,然后用适量无血清RPMI-1640培养基重悬,调整细胞浓度约每电转杯中 $3 \times 10^6/400 \mu$ L;在离心管中混匀上述Jurkat T细胞和5 μ g质粒,接着转移到预冷的电转杯中,混匀,250 V/950 μ F电击,然后尽快转移到6孔板,加含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基至2 mL,于37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 培养箱中常规培养24~48 h。

1.2.5 免疫共沉淀和Western blot检测 转染48 h后收集细胞,裂解上清加入0.4~1 μ g抗体,4 $^{\circ}$ C转动结合过夜,再加入25~50 μ L蛋白G琼脂糖珠,4 $^{\circ}$ C转动结合

3 h;接着用细胞裂解液冲洗3次,每次15 000 r/min离心3 min,最后一次吸去上清,再加入等量的2 $\times$ SDS加样缓冲液,于95 $^{\circ}$ C变性10 min,离心后取上清。对取得的上清进行SDS-PAGE电泳,转膜至PVDF膜上,在5%脱脂奶粉中室温封闭1 h;加入用4% BSA以一定比例(1:1 000~1:2 500)稀释的一抗,4 $^{\circ}$ C轻摇过夜。第2天用TBST洗膜3次,每次10 min;加入用5%脱脂奶粉以一定比例(1:10 000~1:50 000)稀释的二抗,室温轻摇1 h, TBST中洗膜3次,每次10 min;用化学发光法显色,X光胶片显影。

1.2.6 荧光显微镜观察Raji B-Jurkat T细胞接合 Raji B细胞作为抗原提呈细胞,先加入终浓度为10 μ mol/L CellTracker Blue CMAC,37 $^{\circ}$ C孵育30 min,然后1 000 r/min离心5 min,再重悬于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基,并加入超抗原SEE(终浓度为1 μ g/mL),37 $^{\circ}$ C孵育至少30 min,设置未加SEE的Raji B细胞作为阴性对照。接着向上述Raji B细胞中加入等量等体积的Jurkat T细胞,1 000 r/min离心1 min,37 $^{\circ}$ C孵育5 min后,轻柔地滴加到多聚赖氨酸包被的玻片上,置荧光显微镜下观察并拍照。

2 结果

2.1 Ubc9-PKC θ 与SUMO1的共价结合

如图1所示,在共转染FLAG-Ubc9-PKC θ 与cMyc-SUMO1时,细胞裂解液经抗FLAG抗体免疫沉淀后有几条迁移率较慢的条带可被抗cMyc抗体和抗FLAG抗体同时识别,其中略高于175 kDa的条带最为明显,其分子大小相当于2个或3个cMyc-SUMO1(32.5 kDa)和FLAG-Ubc9-PKC θ (100 kDa)的总和。当FLAG-Ubc9-PKC θ 或cMyc-SUMO1单独转染时(阴性对照),相应的条带检测不到,说明Ubc9-PKC θ 能与SUMO1共价结合,且可能存在多个结合

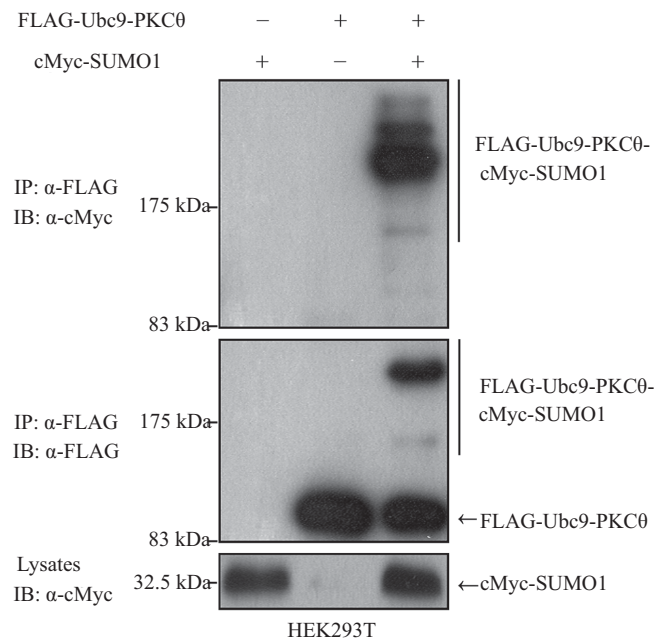


图1 免疫共沉淀和Western blot检测Ubc9-PKC0与SUMO1的相互作用

Fig.1 The interaction between Ubc9-PKC0 and SUMO1 was detected by co-immunoprecipitation and Western blot

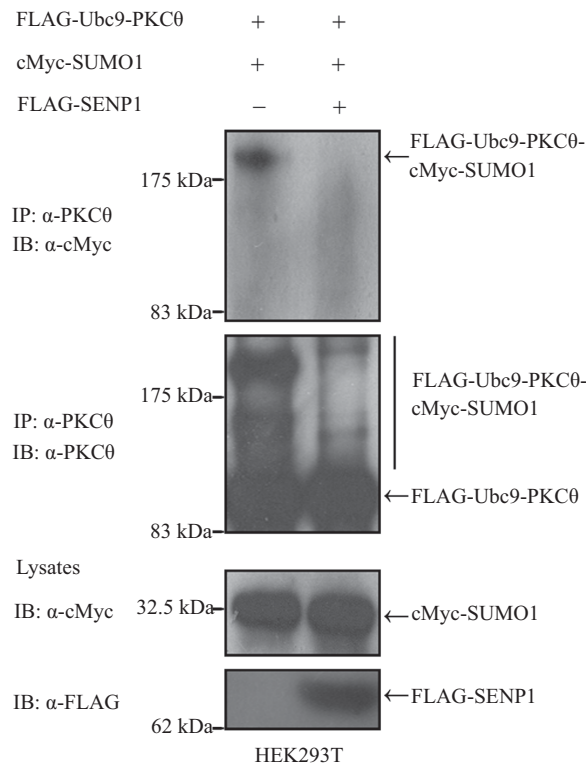


图2 免疫共沉淀和Western blot检测SENPI导致Ubc9-PKC0的去SUMO化修饰

Fig.2 De-sumoylation of Ubc9-PKC0 caused by SENPI was detected by co-immunoprecipitation and Western blot

位点。

我们进一步利用去SUMO化酶SENPI验证迁移率较慢的条带是否是SUMO1修饰ubc9-PKC0的条带。如图2所示, 当SENPI与Ubc9-PKC0和SUMO1共同表达时, 没有检测到那条略高于175 kDa的条带,

证明其确实是Ubc9-PKC0与SUMO1共价结合的条带。

2.2 SUMO化修饰对Ubc9-PKC0在免疫突触聚集的影响

应用在线预测软件SUMOplot™, 我们发现,

表2 SUMOplot™预测PKCθ潜在SUMO化修饰位点的得分表
Table 2 The score table for potential SUMOylation sites of PKCθ predicted by SUMOplot™

编号 Number	位置 Position	序列 Sequence	得分 Score
1	K325	GLPCS I <u>K</u> NE ARPPC	0.94
2	K506	IVYRD L <u>K</u> LD NILLD	0.91
3	K412	FAIKA L <u>K</u> KD VVLMD	0.91
4	K376	SLQIK L <u>K</u> IE DFILH	0.91
5	K261	LARQG L <u>K</u> CD ACGMN	0.91
6	K227	FHKER F <u>K</u> ID MPHRF	0.85
7	K656	PFRPK V <u>K</u> SP FDCSN	0.82
8	K338	CLPTP G <u>K</u> RE PQGIS	0.67
9	K102	CRKNN G <u>K</u> TE IWLEL	0.67
10	K612	AKDLL V <u>K</u> LF VREPE	0.58
11	K475	HIQSC H <u>K</u> FD LSRAT	0.52
12	K48	GQMYI Q <u>K</u> KP TMYPP	0.39
13	K514	DNILL D <u>K</u> DG HIKIA	0.33
14	K393	GKGSF G <u>K</u> VF LAEFK	0.32
15	K666	DCSNF D <u>K</u> EF LNEKP	0.15

相应位置的K(赖氨酸)用下划线标示。
The K (lysine) in corresponding position was indicated by underscore.

PKCθ上有多个潜在的能与SUMO分子结合的赖氨酸(K)位点, 其中预测分高于0.8的有7个, 分别为K325、K376、K412、K261、K506、K227和K656(表2)。

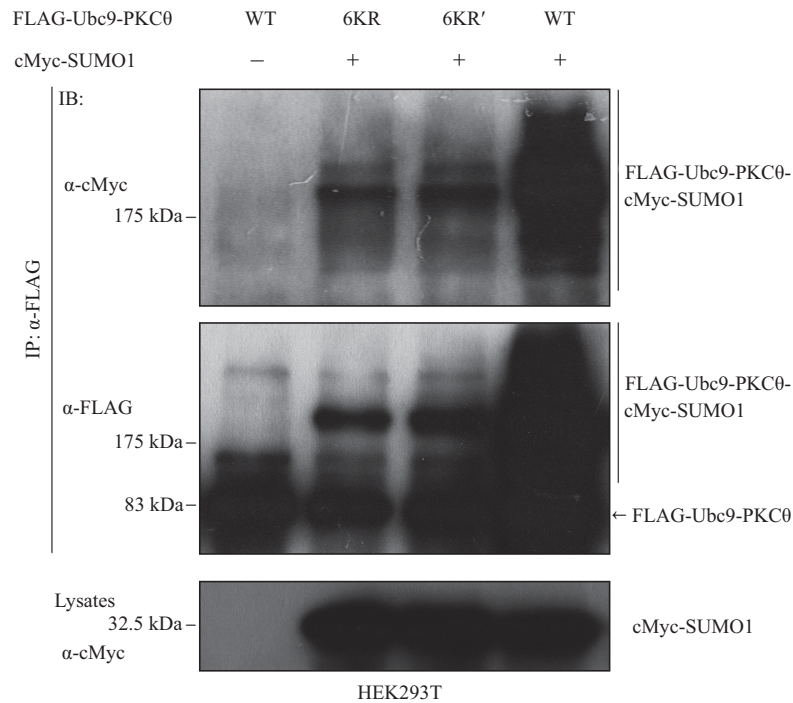
因此, 为了探索SUMO化修饰对Ubc9-PKCθ生物学功能的影响, 我们构建了两种6个SUMO化修饰位点同时突变的FLAG-Ubc9-PKCθ: 6KR(K227/261/325/376/412/506R)和6KR'(K261/325/376/412/506/656R)。如图3所示, 与野生型FLAG-Ubc9-PKCθ相比, 六点突变型FLAG-Ubc9-PKCθ与SUMO1共转染时, 检测到的与SUMO1结合的条带明显减弱, 说明六点突变后Ubc9-PKCθ能被SUMO1修饰的程度大大降低。

PKCθ在T淋巴细胞活化时从胞浆中被招募并聚集到细胞膜的免疫突触来发挥其激酶作用, 因此, 我们检测了Ubc9-PKCθ在免疫突触的聚集。如图4所示, 野生型和六点突变型Ubc9-PKCθ都能被招募到免疫突触上, 但野生型Ubc9-PKCθ在免疫突触上呈聚集状态, 而六点突变型Ubc9-PKCθ在免疫突触上呈较弥散的状态, 说明缺失SUMO化修饰的突变虽不影响Ubc9-PKCθ转位到免疫突触, 但影响其在免疫突触的聚集程度。

3 讨论

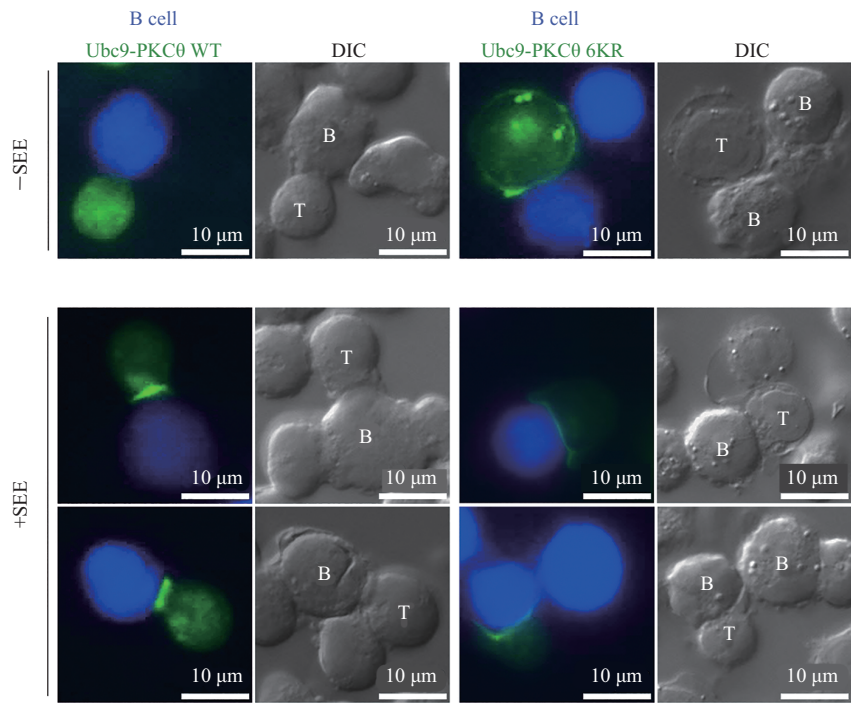
本研究中, 我们应用UFDS方法检测了PKCθ的SUMO化修饰, 实验结果显示, 与Ubc融合表达的PKCθ能与SUMO1共价结合, 且这种共价结合能被去SUMO化酶SEN1P1水解, 证实了Ubc融合表达时PKCθ能发生SUMO化修饰。接着, 我们鉴定了PKCθ上SUMO化修饰位点的预测结果, 当六个预测位点都突变后, PKCθ的SUMO化修饰程度明显减弱。进一步的实验结果显示, SUMO化修饰位点突变后, PKCθ还是转位到免疫突触, 但是在免疫突触中呈现弥散分布, 证实了Ubc融合表达时SUMO化修饰能影响PKCθ在免疫突触的聚集。

Ubc9是SUMO化修饰过程中唯一的SUMO结合酶E2, 借助硫酯键能与SUMO相连接, 并将SUMO转移到底物蛋白上^[16]。依据此特点, Rainer研究团队^[15]提出了一种检测蛋白SUMO化修饰的方法: UFDS, 即通过融合表达Ubc9和靶蛋白人为地增强SUMO与靶蛋白的结合, 从而大大提高检测靶蛋白SUMO化修饰的效率。UFDS确实能放大靶蛋白SUMO化修饰的检测信号, 即使很微弱的靶蛋白SUMO化修饰的现象也能被检测到, 但因此也带来一定的缺陷, 我们的实验结果显示, PKCθ上6个预测



6KR: 6个K(赖氨酸)同时突变为R(精氨酸), 包括第227、261、325、376、412和506位的K; 6KR': 6个K(赖氨酸)同时突变为R(精氨酸), 包括第261、325、376、412、506和656位的K。
6KR: six sites of K (lysine) mutate to R (arginine) simultaneously, including the 227th, 261st, 325th, 376th, 412nd and 506th K; 6KR': six sites of K (lysine) mutate to R (arginine) simultaneously, including the 261st, 325th, 376th, 412nd, 506th and 656th K.

图3 免疫共沉淀和Western blot检测野生型和两种六点突变型Ubc9-PKCθ的SUMO化修饰
Fig.3 Sumoylation of wild type and two kinds of six-point mutant Ubc9-PKCθ were detected by co-immunoprecipitation and Western blot



T: Jurkat T细胞; B: Raji B细胞。
T: Jurkat T cell; B: Raji B cell.

图4 Jurkat T细胞外源表达野生型和六点突变型Ubc9-PKCθ被招募并在免疫突触聚集的比较

Fig.4 The comparison about recruitment and aggregation at the immunological synapse between wild type and six-point mutant Ubc9-PKCθ exogenous expressed in Jurkat T cells

的SUMO化修饰位点同时突变时仍然能检测到一定程度的SUMO化修饰,说明UFDS鉴定SUMO化修饰位点的精确度不够。虽然无法鉴定出PKC θ 上具体的SUMO化修饰位点,但不影响我们探讨SUMO化修饰对PKC θ 生物学功能的影响。

PKC θ 已被报道具有多种生物学功能,特别是参与T细胞活化方面。T细胞活化需要识别抗原提呈细胞(APC)提供的信号,而免疫突触的形成就是关键步骤。免疫突触是T细胞与APC表面粘附分子通过受体-配体相互作用形成的特殊接触面。PKC家族中只有PKC θ 在T细胞活化时被招募并聚集到免疫突触,从而与免疫突触上的其他分子相互作用,传递T细胞活化的信号。免疫突触和神经突触在结构和功能上具有一定的相似性,即都是细胞与细胞之间形成的桥梁,使得两个免疫细胞或者神经细胞能进行交流和协同运作。而在神经突触形成和传递的过程中,SUMO化修饰也是一种重要的调控方式,即心肌细胞增强因子2A(MEF2A)的第395位赖氨酸残基能被SUMO化修饰,而MEF2A的SUMO化和磷酸化修饰能协同抑制NUR77这种对树突分化起负调控作用的转录因子的活性,从而促进神经突触分化^[17]。红藻氨酸受体(KAR)在调控神经突触谷氨酸神经递质传递和神经元兴奋性中起到关键作用,而其亚基GluR6的SUMO化修饰能调控KAR的内吞最终调控神经突触传递^[2]。本研究中我们应用UFDS方法指出SUMO化修饰在免疫突触形成过程中同样扮演了重要的角色,SUMO化修饰虽然不影响PKC θ 被定位到免疫突触上,但是影响PKC θ 凝聚到免疫突触的中央超分子活化簇(c-SMAC)上;而成熟的免疫突触至少包括两个集中区域,即c-SMAC和外周超分子活化簇(p-SMAC),提示SUMO化修饰对成熟免疫突触的形成起到关键作用^[18]。TCR、CD2、CD3、CD28、Lck和Fyn等重要蛋白同样定位在c-SMAC上,那么SUMO化修饰是否也对它们在免疫突触的聚集产生影响呢?进一步探索SUMO化修饰调控免疫突触形成和成熟的具体机制有助于我们更好地理解T细胞的活化过程,进而为T细胞相关疾病的治疗提供理论基础。

参考文献 (References)

- Geiss-Friedlander R, Melchior F. Concepts in sumoylation: A decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(12): 947-56.
- Martin S, Nishimune A, Mellor JR, Henley JM. Sumoylation regulates kainate-receptor-mediated synaptic transmission. *Nature* 2007; 447(7142): 321-5.
- Dadke S, Cotteret S, Yip SC, Jaffer ZM, Haj F, Ivanov A, *et al.* Regulation of protein tyrosine phosphatase 1b by sumoylation. *Nat Cell Biol* 2007; 9(1): 80-5.
- Wuerzberger-Davis SM, Nakamura Y, Seufzer BJ, Miyamoto S. Nf-kappab activation by combinations of nemo sumoylation and atm activation stresses in the absence of DNA damage. *Oncogene* 2007; 26(5): 641-51.
- Mabb AM, Miyamoto S. Sumo and nf-kappab ties. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64(15): 1979-96.
- Sedwick CE, Altman A. Perspectives on pkctheta in t cell activation. *Mol Immunol* 2004; 41(6/7): 675-86.
- Baier-Bitterlich G, Uberall F, Bauer B, Fresser F, Wachter H, Grunicke H, *et al.* Protein kinase c-theta isoenzyme selective stimulation of the transcription factor complex ap-1 in t lymphocytes. *Mol Cell Biol* 1996; 16(4): 1842-50.
- Pfeifhofer C, Kofler K, Gruber T, Tabrizi NG, Lutz C, Maly K, *et al.* Protein kinase c theta affects Ca²⁺ mobilization and nfat cell activation in primary mouse t cells. *J Exp Med* 2003; 197(11): 1525-35.
- Manicassamy S, Sadim M, Ye RD, Sun ZM. Differential roles of pkc-theta in the regulation of intracellular calcium concentration in primary t cells. *J Mol Biol* 2006; 355(3): 347-59.
- Scheschonka A, Tang Z, Betz H. Sumoylation in neurons: Nuclear and synaptic roles? *Trends Neurosci* 2007; 30(3): 85-91.
- Coussen F, Choquet D. Neuroscience: Wrestling with sumo. *Nature* 2007; 447(7142): 271-2.
- Huang J, Lo PF, Zal T, Gascoigne NR, Smith BA, Levin SD, *et al.* Cd28 plays a critical role in the segregation of pkc theta within the immunologic synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(14): 9369-73.
- Wang XD, Gong Y, Chen ZL, Gong BN, Xie JJ, Zhong CQ, *et al.* Tcr-induced sumoylation of the kinase pkc-theta controls t cell synapse organization and t cell activation. *Nat Immunol* 2015; 16(11): 1195-203.
- Zanin-Zhorov A, Ding Y, Kumari S, Attur M, Hippen KL, Brown M, *et al.* Protein kinase c-theta mediates negative feedback on regulatory t cell function. *Science* 2010; 328(5976): 372-6.
- Jakobs A, Koehnke J, Himstedt F, Funk M, Korn B, Gaestel M, *et al.* Ubc9 fusion-directed sumoylation (ufds): A method to analyze function of protein sumoylation. *Nat Methods* 2007; 4(3): 245-50.
- Muller S, Hoege C, Pyrowolakis G, Jentsch S. Sumo, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2(3): 202-10.
- Shalizi A, Bilimoria PM, Stegmuller J, Gaudilliere B, Yang Y, Shuai K, *et al.* Piasx is a mef2 sumo e3 ligase that promotes postsynaptic dendritic morphogenesis. *J Neurosci* 2007; 27(37): 10037-46.
- Dustin ML, Colman DR. Neural and immunological synaptic relations. *Science* 2002; 298(5594): 785-9.