埃博拉病毒入侵: 人TIM分子的结构与结合PS的分子基础

王寒^①, 齐建勋^①, 刘宁宁^①, 李燕^①, 高俊^②, 张廷虹^①, 柴彦^①, 高峰^③, 张浩^④, 李向东^②, 叶昕^①, 严景华^{①⑤}, 逯光文^{⑥*}, 高福^{①⑦⑧*}

① 中国科学院微生物研究所病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101;

② 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193;

③ 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101;

④ 安徽大学生命科学院, 合肥 230039;

⑤ 中国科学院微生物研究所微生物生理与代谢工程重点实验室, 北京 100101;

⑥ 四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室, 成都 610041;

⑦ 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 102206;

⑧ 中国科学院北京生命科学研究院免疫与健康联合研究中心, 北京 100101

* 联系人, E-mail: luguangwen2001@126.com, gaof@im.ac.cn

2015-11-09 收稿, 2015-11-13 接受, 2015-11-26 网络版发表

国家自然科学基金(81590761)、中国科学院战略重点研究项目(XDB08020100)以及中国科学院院长基金埃博拉病毒研究特别项目资助

摘要 研究表明, 人T细胞免疫球蛋白黏蛋白(human T-cell immunoglobulin and mucin domain, hTIM)受体分子能够促进包括埃博拉病毒在内的很多囊膜病毒的入侵。hTIM介导的病毒入侵过程高度依赖于位于受体分子胞外区远膜端的免疫球蛋白V区(immunoglobulin variable (IgV)-like)结构域与病毒囊膜中磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)的特异性相互作用。人类TIM家族共有3个成员: hTIM-1, hTIM-3和hTIM-4。虽然相应的小鼠TIM分子的结构已经解析, 但hTIM分子的IgV结构特征及其识别PS的分子基础仍然未知。同时, 有研究表明, 引起西非大规模埃博拉疫情爆发的2014-扎依尔-埃博拉病毒可能较其先前流行株具有更强的致病能力。但目前尚未有2014-扎依尔-埃博拉病毒利用hTIM分子入侵细胞及其与1976-扎依尔-埃博拉病毒的入侵能力比较的研究报道。本研究证明了整合有1976-和2014-扎依尔-埃博拉病毒囊膜糖蛋白(glycoprotein, GP)的假病毒均可以利用hTIM-1和hTIM-4入侵细胞, 并且表现出相近的入侵效率。进一步证明了hTIM分子不与埃博拉病毒GP蛋白直接相互作用, 而是通过结合病毒囊膜中的PS分子而促进病毒感染。随后解析了3种hTIM分子IgV结构域的高分辨率晶体结构以及hTIM-4与磷酸丝氨酸的复合物晶体结构。令人意外的是, 3种hTIM分子的PS结合槽呈现出各自不同的局部结构特征且在目前已解析结构的小鼠同源分子中均未被观察到。这些结构特征很可能提示hTIM分子具有不同于小鼠同源分子、且彼此间亦各不相同的PS识别模式。上述结构和功能数据丰富了我们hTIM结合PS的分子基础的认识, 从而将帮助我们更深入地了解埃博拉和相关囊膜病毒利用hTIM受体入侵细胞的分子机制。

关键词

人T细胞免疫球蛋白黏蛋白分子
蛋白质晶体结构
埃博拉病毒入侵
磷脂酰丝氨酸结合
机制

引用格式: 王寒, 齐建勋, 刘宁宁, 等. 埃博拉病毒入侵: 人TIM分子的结构与结合PS的分子基础. 科学通报, 2015, 60: 3438-3453

Wang H, Qi J X, Liu N N, et al. Crystal structures of human TIM members: Ebolavirus entry-enhancing receptors (in Chinese). Chin Sci Bull, 2015, 60: 3438-3453, doi: 10.1360/N972015-01255

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/N972015-01255>

T细胞免疫球蛋白黏蛋白分子(T-cell immunoglobulin and mucin domain molecules, TIM)家族是一类I型的跨膜糖蛋白家族。人TIM基因家族共有3个成员(hTIM-1, hTIM-3和hTIM-4), 同源的小鼠TIM基因家族则有8个成员(mTIM1-8)^[1]。TIM家族成员结构相似, 由远膜区的N-端免疫球蛋白V区结构域(IgV)、高度糖基化的黏蛋白样结构域(mucin-like domain)、跨膜区以及胞内区构成^[1,2]。TIM家族分子在过敏反应、哮喘、移植耐受以及自身免疫等免疫应答调节中发挥着重要作用^[1,3]。之前的研究表明, TIM家族中除mTIM-2以外, 其他成员(h/mTIM-1, -3和-4)均能够特异性的识别并结合凋亡细胞表面的磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PtdSer, PS), 并以此介导凋亡小体的内容^[4-8]。最近, hTIMs被证明可以促进黄病毒(flaviviruses)、丝状病毒(filoviruses)、沙粒病毒(arenaviruses)、甲病毒(alphaviruses)和杆状病毒(baculoviruses)等一系列囊膜病毒的入侵^[9-16]。值得一提的是, 由于能够增强病毒对细胞的入侵能力, hTIMs在埃博拉病毒(ebolavirus)的致病机制中也起到了重要作用^[9-11,13,15,16]。

埃博拉病毒属于丝状病毒科, 是一类能够感染并引起人和灵长类动物发生埃博拉出血热(EHF)的囊膜病毒^[17]。埃博拉病毒可以分为5个种: 扎伊尔型(*Zaire ebolavirus*, ZEBOV)、苏丹型(*Sudan ebolavirus*, SUDV)、塔伊森林型(*Tai Forest ebolavirus*, TAFV)、本迪布焦型(*Bundibugyo ebolavirus*, BDBV)和莱斯顿型(*Reston ebolavirus*, RESTV)埃博拉病毒^[18]。2014年, 一场突如其来的扎伊尔型埃博拉病毒疫情席卷了整个西非。截至2015年5月, 这次疫情共导致了至少26000人感染和11000人死亡(<http://apps.who.int/ebola/ebola-situation-reports>)^[19]。埃博拉病毒因其所引发的极高的病死率而被世界卫生组织列为对人类危害最严重的烈性病毒之一。近期的研究表明, 一些PS结合受体, 特别是hTIM-1能够增强埃博拉病毒的入侵。hTIM-1表达在多种细胞的表面, 包括多种上皮细胞、肥大细胞、B细胞以及激活的CD4⁺ T细胞等。其广泛分布的特性被认为与埃博拉病毒的广谱感染能力和高致病性相关^[1,20-24]。而且, hTIM分子的磷脂酰丝氨酸结合能力在促进埃博拉病毒感染方面是不可或缺的^[9,11,15,16]。

TIM分子通过其IgV区与PS相互作用。mTIM-1, -3和-4的IgV区蛋白晶体结构显示其CC'环(loop)由2个保守的二硫键桥接到AGFCC'C"片层(β -sheet)上,

从而使得CC'环靠近FG环, 而这两段环中间形成的夹缝区域正是PS分子的结合槽^[4,25-27]。虽然mTIM-2的结构中也有这2个二硫键, 然而由于缺少了在其他mTIM分子中保守的、能够稳定CC'环构象的氢键, 使得mTIM-2的CC'环有别于其他mTIM分子的环, 不能形成PS结合槽。也正是这样的结构特征赋予了mTIM-1, -3和-4分子结合PS的能力, 而mTIM-2不能结合PS^[5-7]。TIM分子与PS结合的另一个关键因素是位于该结合槽内的一个金属离子, 通常为Ca²⁺离子。FG环上的2个氨基酸(一个天冬酰胺和一个天冬氨酸)与这个金属离子相互作用, 并通过该离子稳定PS分子中带负电的磷酸基团^[4,25], 最终实现TIM分子对PS的识别和结合。

虽然以上结果揭示了TIM受体与PS分子相互作用的机制, 然而, 目前所有的研究均基于小鼠的TIM分子。尽管与小鼠同源分子的高序列同源性暗示了人TIM分子可能也具有相似的PS结合模式, 但精细的人TIM分子的结构特征和PS识别机制仍然未知。本研究证明, 整合了1976-(1976-ZEBOV)和2014-扎伊尔-埃博拉(2014(C05)-ZEBOV)病毒糖蛋白(glycoprotein, GP)的假病毒均可以利用hTIM-1和hTIM-4而入侵细胞, 并且表现出类似的入侵效率, 但hTIM-3不具备增强病毒入侵的能力。这一促进病毒入侵的功能与hTIM分子IgV区的PS结合能力密切相关。通过构建mucin区互换的嵌合TIM受体分子, 我们进一步证明mucin区的长度(图1(a))在hTIM分子介导假病毒入侵中也发挥着重要作用。其次, 我们提供了确凿证据证明尽管能够增强埃博拉病毒的入侵, 但是hTIM分子不能够直接与埃博拉GP蛋白相互作用。最后, 我们解析了hTIM-1, -3和-4的IgV区晶体结构以及hTIM-4与磷酸丝氨酸(phosphoserine)的复合物晶体结构, 并揭示了hTIM分子区别于mTIM的局部结构特征。

1 材料与amp;方法

(i) 蛋白的表达与纯化。用于结晶的hTIM-1, hTIM-3, hTIM-4的IgV区蛋白用大肠杆菌BL21(DE3)表达。蛋白首先以包涵体的形式被诱导表达, 经过体外复性并纯化后用于后续实验^[28]。将编码hTIM-1的19~123位氨基酸, hTIM-3的22~130位氨基酸及hTIM-4的24~134位氨基酸的cDNA克隆至pET21a载体上, 酶切位点为Nde I 和Xho I。以上经过复性的蛋白可以直接使用分子筛凝胶层析柱HiLoad 16/60

图1 hTIM分子增强埃博拉假病毒入侵细胞。(a) hTIM分子以及hTIM嵌合体分子(hTIM-3*1和hTIM-1*3)拓扑结构示意图。(b) hTIM-1介导埃博拉假病毒入侵。分别用1976-ZEBOV(76)或2014(C05)-ZEBOV(14(C05))埃博拉假病毒感染瞬时转染了不同浓度hTIM-1基因的293T细胞。荧光素酶活性值(以倍数变化表示)如图所示。(c, d) IgV区蛋白(c)及PS脂质体(d)对埃博拉假病毒入侵的抑制。用埃博拉假病毒(76和14(C05))感染外源表达hTIM-1基因的293T细胞,感染过程中加入不同浓度hTIM-1的IgV区蛋白(GST蛋白用作无关对照)或PS脂质体(PE脂质体用作无关对照)。浓度依赖型的抑制作用如图所示。(e) 免疫印迹法比较hTIM分子(hTIM-1, -3, 和-4)以及hTIM嵌合体分子(hTIM-3*1和hTIM-1*3)在293T细胞上的表达水平。(f) hTIM-1, -4, 和-3*1增强埃博拉假病毒入侵。荧光素酶活性值(以倍数变化表示)如图所示。所有实验数据的误差线代表3次重复实验数据的标准差

Figure 1 Entry-enhancement of ebola-pseudoviruses mediated by hTIMs. (a) A schematic figure showing the topological structures of hTIM members and of the chimeric hTIM receptors between hTIM-1 and -3 (hTIM-3*1 and hTIM-1*3). The IgV-like, mucin-like, and transmembrane (TM) & cytoplasmic domains were indicated. (b) A dose-dependent enhancement of ebola-pseudovirus infection mediated by hTIM-1. The 293T cells were transfected for ectopic expression of hTIM-1, and were then infected with lentivirions pseudotyped with either the 1976-ZEBOV (76) or the 2014(C05)-ZEBOV (14(C05)) GPs. The resultant luciferase activities (shown as folds relative to that of the mock transfected controls) were recorded. (c, d) Specific inhibition of the ebola-pseudovirus infection by the IgV-like domain protein of hTIM-1 (c) and by the PS liposomes (d). The 293T cells ectopically expressing hTIM-1 were infected with ebola-pseudoviruses (76 and 14(C05)) in the presence of gradient concentrations of either hTIM-1 IgV-like domain protein (GST as an irrelevant protein control) or PS liposomes (PE as the liposome control). The dose-dependent inhibition was recorded. (e) A western blot result showing the comparable expression levels of the wild type (hTIM-1, -3, and -4) and the chimeric (hTIM-3*1 and hTIM-1*3) hTIM receptors in 293T cells. (f) Enhancement of ebola-pseudovirus infection mediated by hTIM-1, -4, and -3*1, but not by hTIM-3, and -1*3. The recorded luciferase activities (shown as folds relative to that of the mock transfected controls) were histogrammed. For all the data, the error bars represent $\pm$ SD for triplicate experiments

Superdex® 75 PG column (GE Healthcare)纯化。

以上用于结晶的hTIM蛋白均不带有任何标签,为了使hTIM蛋白能够用于固相ELISA实验,分别构建了带His标签的hTIM-1, hTIM-3和hTIM-4的IgV结构域原核表达载体。上述蛋白以包涵体形式表达和复性,纯化过程同上所述。

在流式细胞术的检测中,分别构建1976-ZEBOV GP全部胞外段(GP-ecto, 1-632位氨基酸)及缺失mucin区的胞外段(GPΔmucin, 1~311+464~632)分泌表达载体。将编码相应氨基酸序列的cDNA克隆至真核表达载体pCAGGS中, C-末端融合了His₆标签。将上述表达质粒转染到HEK 293T细胞中, 72 h后收集细胞上清,

用10 kD的超滤浓缩管浓缩细胞上清并经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定后,用于流式细胞术。

(ii) 蛋白结晶、数据收集以及结构解析。所有晶体均生成于18℃,由坐滴气相扩散法获得。其中hTIM-1晶体生长的条件为0.1 mol/L咪唑和20% (v/v) Jeffamine® ED-2001, pH 7.0; hTIM-3晶体生长条件为0.8 mol/L 酒石酸钠钾(potassium sodium tartrate tetrahydrate)和0.1 mol/L 羟乙基哌嗪乙硫磺酸钠(sodium HEPES), pH 7.5; hTIM-4晶体生长条件为0.1 mol/L 磷酸-柠檬酸缓冲液(phosphate/citrate)和40% (v/v)聚乙二醇300(PEG300)。hTIM-1及hTIM-3结晶所需的蛋白浓度为5 mg/mL, hTIM-4结晶所需的蛋白浓

度为20 mg/mL. 为获得hTIM-4和磷酸丝氨酸复合物晶体, 将已生成的hTIM-4的晶体置于额外添加了20 mmol/L O-Phospho-L-serine (sigma-aldrich)和5 mmol/L CaCl₂的原池液中, 浸泡20 h后收集衍射数据.

数据收集过程: 将所有晶体从池液中捞出, 并浸泡入添加了20% (v/v)甘油的防冻液中, 捞出后快速冻于液氮中. 以上晶体衍射数据均于上海同步辐射光源(SSRF)BL17U线站收集, 数据收集后用HKL2000软件处理^[29].

hTIM-1, hTIM-3, hTIM-4的结构是通过CCP4程序包^[30]中的Phaser^[31]程序以对应的小鼠同源分子的结构(mTIM-1 (2OR8), mTIM-3 (2OYP)及mTIM-4 (3B19))为模型, 用分子置换法解析的^[25-27]. hTIM-4/磷酸丝氨酸复合物结构通过相同的方法解析. 然后用REFMAC5^[32]程序做最初的精修, 并用COOT^[33]软件对照电子密度图修改模型. 接下来用Phenix软件包^[34]中的phenix.refine程序进行几轮进一步的精修, 最终模型的立体化学质量通过PROCHECK^[35]程序进行评估. 所有数据的收集、处理和精修数据总结在表1中. 所有文章中用到的结构图均由Pymol软件生成(<http://www.pymol.org>).

(iii) hTIM嵌合体的构建. 将编码hTIM-1 (NM_012206.3), hTIM-3 (NM_032782.4)和hTIM-4 (NM_138379.2)的野生型全长cDNA序列克隆至pcDNA4.0表达载体中.

为了获得hTIM嵌合体, 将编码hTIM-1 IgV区(1~123位氨基酸)的cDNA与hTIM-3 (129~301位氨基酸)拼接在一起, 称为hTIM-1*3. 将编码hTIM-3 IgV区(1~128位氨基酸)与hTIM-1 (124~329位氨基酸)拼接在一起, 称为hTIM-3*1. 2个目的基因均由金唯智公司(苏州, 中国)合成, 并按前文所述克隆至pcDNA4.0载体中.

(iv) 假病毒的包装及感染实验. ZEBOV假病毒的制备及滴度测定方法都按文献[36]所述. 简而言之, 先将编码1976-ZEBOV GP或2014(C05)-ZEBOV GP的pcDNA4.0质粒与pNL4-3.luc.RE共转染入HEK 293T细胞中. 48 h后, 将含有假病毒的细胞上清收获、离心, 并用0.45 μ m的无菌滤器过滤, 分装冻存于-80℃, 并用Huh7细胞来测定假病毒的TCID₅₀.

假病毒入侵实验前24 h, 将目的基因(hTIM-1, hTIM-3, hTIM-4, hTIM-1*3, hTIM-3*1)以及对照(pcDNA4.0)瞬时转染HEK 293T细胞, 4个重复. 将200 TCID₅₀/孔的假病毒加至上述HEK 293T细胞的24

孔板中. 孵育5 h后, 将培养基换成含有10% FBS的DMEM, 并将培养板置于37℃, 5% CO₂细胞培养箱中培养48 h. 荧光活性采用GloMax 96 Microplateluminometer (Promega)检测.

(v) 蛋白、脂质体抑制实验. 将PS (1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine, Sigma)和PE (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, Avanti)分别用氯仿制备成10 mg/mL的溶液. 将溶解后的PE及PS用旋转蒸发仪真空蒸干为薄膜状, 而后按1 mmol/L的浓度溶于PBS中, 超声后用0.45 μ m无菌滤器过滤. 至此, 脂质体制备完毕. 脂质体抑制实验中, 将脂质体按不同浓度溶于DMEM中, 与上述瞬时转染了hTIM-1表达载体的HEK 293T细胞孵育1 h后进行假病毒感染.

蛋白抑制实验中, 将200 TCID₅₀/孔的假病毒与hTIM-1 (如前所述, 在体外复性纯化)蛋白在37℃下孵育0.5 h后, 加入到转染有hTIM-1表达载体的HEK 293T细胞中. 假病毒感染实验步骤如前所述进行.

(vi) 蛋白质印迹与免疫荧光实验. 蛋白质印迹实验中, 将转染了hTIM的HEK 293T细胞裂解, 按常规进行SDS-PAGE, 转膜. 用抗myc抗体(Santa Cruz Biotechnology)检测hTIM的表达水平, 抗 β -actin抗体(ZSGB-BIO)作为内参.

免疫荧光实验在其他研究中已有详述^[37]. 简而言之, 将HEK 293T细胞铺在24孔板中细胞玻片上, 然后转染hTIM表达质粒, 24 h后将细胞用甲醇固定, 0.2% Triton X-100室温通透、10%羊血清封闭后, 将Alexa Fluor 594偶联的myc抗体(Cell Signaling Technology)及DAPI与细胞孵育. 最后用激光共聚焦显微镜(Leica SP8)检测hTIM在细胞中的分布.

(vii) 表面等离子共振实验. 表面等离子共振实验(surface plasma resonance, SPR)采用CM5芯片(GE Healthcare)在室温下(25℃)用BIAcore® 3000机器完成. 先将蛋白通过凝胶层析法置换入BIAcore® 3000的缓冲液(含有pH 7.5的10 mmol/L HEPES, 150 mmol/L NaCl及0.005% (v/v) Tween-20)中. 将约1000个响应值(RU)的ZBOV-GP蛋白固定在CM5芯片上. 将hTIM-1蛋白及2G4抗体分别以10 μ mol/L及4 μ mol/L的浓度作为流动相流过芯片. 每个循环后, 用10 mmol/L NaOH对芯片表面进行再生.

(viii) 流式细胞术(Flow cytometric assay). 将表达全长hTIM基因的pcDNA4.0载体瞬时转染HEK

293T细胞, 转染后24 h收获细胞. 先将细胞用PBS重悬, 与GP-ecto或者GP Δ mucin蛋白室温孵育30 min. 洗涤细胞后, 将细胞与带FITC荧光的His抗体(Abcam)室温孵育30 min, 而后洗涤、重悬、上机检测.

(ix) 复合体凝胶层析分析. 将ZEBOV GP蛋白、hTIM蛋白以及混合物分别制备为相同体积. 而后, 分别用Superdex® 200 column (GE Healthcare)层析. 将层析谱记录并叠加至一起. 所收集样品均通过15% SDS-PAGE电泳并用考马斯亮蓝染色鉴定.

(x) hTIM蛋白与磷脂分子的结合实验. hTIM蛋白与磷脂分子的结合采用Octet RED96 机器 (ForteBio, Inc.) 分析. 先将hTIM蛋白用EZ-Link NHS-LC-LC-Biotin (Thermo) 生物素化, 然后以25 μ g/mL的浓度偶联到ForteBio's Streptavidin (SA) 芯片上. 脂质体溶解在10 mmol/L HEPES, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl₂, pH 7.5缓冲液中. 将偶联有hTIM蛋白的芯片浸润到脂质体溶液中300 s, 用以检测二者相互作用.

(xi) 固相ELISA. 在hTIM与磷脂结合的固相ELISA的实验中, 首先将PS溶于甲醇中(20 μ g/mL), 并取100 μ L加至聚苯乙烯ELISA板中, 风干. 将干燥后的板子用5%山羊血清室温封闭2 h. 然后将hTIM-flag蛋白用含有10 mmol/L HEPES, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl及5 mmol/L CaCl₂的缓冲液稀释成不同浓度, 并加至上述板子中, 4 $^{\circ}$ C过夜孵育. 用含有0.05% Tween-20的PBS洗板, 然后加入抗Flag抗体 (Sigma) 及二抗 (Santa Cruz Biotechnology) 孵育. 用分光光度计检测样品在450 nm波长的吸收值.

2 结果

2.1 hTIM分子增强1976-和2014(C05)-ZEBOV假病毒入侵细胞能力

为了阐明hTIM分子对埃博拉病毒入侵的影响, 我们首先用分别整合了1976-(1976-ZEBOV)^[38]和2014-扎依尔-埃博拉(2014(C05)-ZEBOV)^[39]病毒糖蛋白(glycoprotein, GP)的假病毒检测hTIM-1对于病毒入侵的介导能力, 其中2014(C05)-ZEBOV毒株为2014年西非流行的扎伊尔型埃博拉病毒的代表株^[40]. 利用缺乏内源TIM基因表达的HEK 293T细胞^[13], 研究结果显示, 转染外源hTIM-1能够有效增强2种假病毒的入侵, 且呈浓度依赖关系(图1(b)). 其后, 为了检

测TIM分子与PS的相互作用在hTIM-1介导假病毒入侵中的作用, 在大肠杆菌(*E. coli*)中表达、复性并纯化了hTIM-1的IgV区蛋白. 纯化得到的蛋白在体外能够特异性结合PS而不结合磷脂酰乙醇胺(PE)(图2). 与对照蛋白GST相比, hTIM-1 IgV区蛋白能够有效抑制假病毒入侵, 并且其抑制作用与蛋白浓度存在剂量依赖关系(图1(c)). PS也能够抑制假病毒的入侵且存在剂量依赖性, 而PE对假病毒入侵无抑制作用(图1(d)). 上述结果与之前报道的结果一致^[9], 研究结果再次表明, hTIM-1对于PS的结合能力在促进病毒入侵方面是不可或缺的. 同时, 也证明了尽管2014 (C05)-ZEBOV的GP蛋白存在多个氨基酸位点的突变, 但其介导病毒入侵能力与1976-ZEBOV的GP蛋白相似.

除hTIM-1外, hTIM-3和hTIM-4也能够结合PS^[4-7,25]. 然而hTIM-3虽然具有相似的PS结合特性, 但由于其mucin区长度较短(图1(a)), 明显区别于其他2种分子. 这种分子间的差异促使我们去检测mucin区在hTIM分子介导的埃博拉病毒入侵中所起的作用. 用相似的方法, 表达纯化得到了hTIM-3和hTIM-4的IgV区蛋白, 结果表明二者均能够结合PS, 不结合PE(图2). 进一步, 我们调查了hTIM-3和hTIM-4能否介导病毒入侵. 在HEK 293T细胞上表达水平相似的前提下(图1(e)), hTIM-4能够介导假病毒入侵细胞, 而hTIM-3不能(图1(f)). 这一结果与之前的报道相一致, 暗示足够长度的mucin区在hTIM介导病毒入侵中是必需的. 为了进一步证实这个观点, 将hTIM-1和hTIM-3的IgV区进行了互换, 并且检测了2种嵌合体TIM分子对于假病毒入侵情况的影响. 与预期结果一致, 由hTIM-1的mucin区和hTIM-3的IgV区构成的嵌合体分子hTIM3*1能够有效地增强假病毒的入侵, 而由hTIM-3的mucin区和hTIM-1的IgV区构成的嵌合体hTIM1*3则不能(图1(e)和(f)). 以上结论以及之前的报道^[9,11,15]都证明, 除结合PS的IgV区外, hTIM-1的mucin区也在介导埃博拉病毒入侵中起到重要作用. 更重要的是, 以上的实验中, 我们都用到了2014(C05)-ZEBOV假病毒, 数据均显示2014年的埃博拉病毒的GP在介导病毒入侵方面与之前的毒株无明显差别.

2.2 hTIM分子与埃博拉病毒GP蛋白无直接相互作用

hTIM-1最初被认为是埃博拉病毒GP蛋白的受

图2 hTIM 分子结合 PS 不结合 PE. (a) 固相 ELISA 法检测 hTIM 分子结合 PS 脂质体. (b) Octet 96 分子相互作用检测仪检测 hTIM 分子结合 PS 脂质体(GST 蛋白以及 PE 脂质体作为对照)

Figure 2 hTIMs bind to PS not PE. (a) solid-phase ELISA test the binding of hTIM proteins to PS in liposome. (b) The binding assays of hTIM proteins and liposomes were performed using Octet RED96 machine. Using GST protein and PE liposome as an irrelevant protein control

体^[13], 然而随后被报道是通过结合病毒囊膜上的PS分子而促进病毒的入侵^[9]. 为了全面剖析hTIM分子与埃博拉病毒入侵之间的关系, 我们进一步检测3个hTIM分子是否能够直接结合病毒的GP蛋白. 埃博拉GP蛋白也含有一段mucin样区域, 但该区域在病毒对细胞的黏附和入侵中并无明显作用^[41]. 因此, 我们首先检验缺失了mucin区的hTIM分子和埃博拉GP蛋白间的相互作用(hTIM的IgV区蛋白和GP缺失mucin区的蛋白构建参考之前的文献^[42]). 结果证明, hTIM分子和GP蛋白无论在溶液中(图3(a))还是在表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)实验中(图3(b))都不能够相互结合. 为了进一步证明我们观察到的现象, 将全长的hTIM分子表达质粒转染HEK 293T细胞, 免疫荧光实验显示, hTIM表达在细胞表面(图3(c)). 用HEK 293T细胞表达了两种形式的埃博拉病毒GP蛋白, 一种是全部的GP蛋白胞外段, 一种是缺失了mucin的胞外段. 这样hTIM和GP都保持了生理条件下的翻译后修饰和构象状态. 利用流式细胞染色技术, 我们发现两种不同形式的GP蛋白均不能与表达在细胞表面的hTIM结合(图3(c)). 以上证据表明, 无论mucin区存在与否, 埃博拉病毒GP蛋白都不能够与hTIM分子直接相互作用. 这一结果也排除了GP在hTIM分子介导的埃博拉病毒黏附中的作用, 反过来证明了hTIM分子与PS相互作用对于病毒入侵的重要意义. 这促使我们去解析hTIM分子的晶体结构并探索其识别PS的结构基础.

2.3 hTIM分子的IgV区晶体结构

3个hTIM分子的IgV区被分别结晶, 并解析出高分辨率的晶体结构(表1). 总体来看, 全部3个结构都呈现出典型的IgV结构域特征: 包括2个 β -片层, 分别由B, E, D折叠片(strand)和A, G, F, C, C', C''折叠片构成; 以及位于E和F折叠片之间的一个小的螺旋(helix)(η 1). 正如预期, hTIM分子的结构都由3个保守的二硫键来稳定, 这3个二硫键在同源的小鼠分子中也存在^[4,25-27]. 第一个二硫键将BC环和F折叠片桥接在一起, 拉近了2个 β -片层; 另外2个二硫键位于AGFCC'C''片层中, 将CC'环拉向临近的FG环(图4). 这一结构特点在CC'和FG环间形成了一个夹缝, PS结合槽就位于这个夹缝中. 与hTIM-1和hTIM-4相比, hTIM-3在CD'边缘进一步地结合了一个金属离子, 破坏了C''折叠片, 并在结构种形成了一个额外的螺旋(η'). 基本上, hTIM分子与其同源的mTIM分子具有高度的结构相似性. 结构比较显示, 他们的主链的C α 原子的均方根偏差(root mean square deviation, RMSD)为1.1~2.6 Å. 虽然呈现出相似的整体结构, 但hTIM分子在其PS结合槽附近的局部结构特征却各不相同, 这些特征将在下文中详述.

2.4 hTIM-1结构中特殊的FG环

相较于其他的hTIM分子, hTIM-1具有一个独特的FG环, 该段环比其他分子的FG环短2个氨基酸(图5). 图5比较了包括hTIM-1, -3, -4和mTIM-1, -3, -4在内的

图 3 hTIM 分子与埃博拉 GP 蛋白间不存在直接的相互作用。(a) 凝胶层析分析结果表明 hTIM (hTIM-1, -3, 和-4) 的 IgV 区蛋白和埃博拉 GP 蛋白在溶液中不能形成稳定的复合物。图中所示为分子筛层析图和 SDS-PAGE 鉴定结果。(b) 表面等离子共振法检测 hTIM 分子的 IgV 区蛋白与埃博拉病毒缺失 mucin 区的 GP 胞外段蛋白间的相互作用。GP 的单克隆抗体 2G4 用作阳性对照。(c) 免疫荧光分析表明 hTIM 分子(绿色荧光)分布在 293T 细胞膜上。蓝色为 DAPI 染料染色的细胞核。(d) 流式细胞仪分析 hTIM 分子与埃博拉 GP 蛋白的相互作用。hTIM 分子表达于细胞膜上(如图(c)所示), 用于染色的 GP 蛋白由哺乳动物细胞表达

Figure 3 The lack of direct and specific protein-protein interactions between hTIMs and ebolavirus GP. (a) A gel filtration survival assay showing that hTIM (hTIM-1, -3, and -4) IgV domain proteins and the ecto-domain protein of ebolavirus GP lacking mucin cannot form stable complex in solution. The individual chromatographs and the SDS-PAGE analyses of the pooled samples were shown. (b) SPR analyses of the interactions between hTIM IgV and the mucin-lacking GP ecto-domain protein of ebolavirus. The binding profiles were shown. Clearly shown is that monoclonal antibody 2G4, but not the IgV domain proteins of hTIM-1, -3, and -4, interacts with ebolavirus GP. (c) An immune-fluorescence assay demonstrating the proper surface localization of hTIMs in 293T cells. The microscopic images were shown. (d) Flowcytometric analyses of the hTIM/GP interactions using the native and fully-glycosylated receptor and viral proteins. The hTIM receptors were expressed on the cell surface (as shown in (c)) and stained with GP ecto-domain (with or without mucin) proteins prepared from mammalian cells. The binding profiles were shown

6个TIM分子结构,从工整的F和G 折叠片对阵中可以看到, F折叠片一贯的结束于第87位(为了避免混淆

结构中的等位氨基酸在不同TIM分子中序列位置的差异,如无特殊说明,此后的氨基酸编号均根据成

图4 hTIM-1, hTIM-3 和 hTIM-4 的 IgV 区结构. (a) hTIM-1 分子的 IgV 区结构. (b) hTIM-3 分子的 IgV 区结构. (c) hTIM-4 分子的 IgV 区结构. 图中标注了 IgV 区特有的 β -折叠片和 $\eta 1$ 螺旋. hTIM-3 中, 标注出金属离子结合位点(球形)以及额外形成的螺旋结构(η'). 图中亦标注出了 hTIM 分子的 PS 结合槽、二硫键以及其氨基和羧基端

Figure 4 The IgV domain structures of hTIM-1, -3, and -4. The IgV-specific β -strands, as well as the $\eta 1$ helix, were labeled. In hTIM-3, a novel metal (shown as spheres) binding site was observed. The extra helix (η') built at this site was indicated. The FG and CC' loops, which were shown to form a cleft for PS accommodation in the mouse homologues, are highlighted. The three TIM-specific disulfide linkages and the protein N- and C-termini, were marked. (a) Structure of hTIM-1 IgV. (b) Structure of hTIM-3 IgV. (c) Structure of hTIM-4 IgV

熟的hTIM-1蛋白编号)的缬氨酸或者异亮氨酸. 而G折叠片在hTIM-1中的起始位点为第94位氨基酸, 区别于其他的TIM分子起始于第96位氨基酸(图5(a)). 在hTIM-1结构中, Asn-Asp基序中的天冬氨酸(aspartic acid, Asp)通过与F折叠片中的末尾缬氨酸(Val87)间形成典型的主链间的氢键而被收入到G折叠片中. 而其他TIM分子则利用C-端紧邻Asn-Asp基序的氨基酸(hTIM-4和mTIM-4中是96位缬氨酸, hTIM-3中是96位谷氨酸, mTIM-1中是96位谷氨酰胺, mTIM-3中是96位赖氨酸)与F折叠片末端的氨基酸(87位缬氨酸或者87位异亮氨酸)形成氢键, 所以其G折叠片从96位氨基酸起始(图5(c)). 这使得hTIM-1的FG环短了2个氨基酸, 造成本应位于FG环中的Asn-Asp基序被带入到G折叠片中(图5).

2.5 hTIM-3结构中的金属离子结合位点

通过对6个具有PS结合能力的TIM结构的比对, 揭示了hTIM-3中存在一个特殊的、新的金属离子结合位点(图6(a)). 由于结晶时池液中含有高浓度的钠离子, 所以我们将结构中出现的这个金属离子定义为钠离子. 在空间位置上, 这一金属离子位于D折叠片的侧面, 它的存在使得C'折叠片发生扭曲形成了一个额外的 η' 螺旋, 从而使之固定下来. 在原子水平上, 这一离子可以很好地与51位酪氨酸(Tyr51)、54

位丝氨酸(Trp54)和57位酪氨酸(Tyr57)主链上的羰基氧以及与54位丝氨酸(Ser54)侧链的羟基配位. 除此之外, 新形成的 η' 螺旋将51位酪氨酸(Tyr51)和52位色氨酸(Trp52)的侧链芳香环拉向临近的D折叠片中的58位色氨酸(Trp58), 从而形成了一个疏水的“帽子”覆盖于金属离子上方(图6(b)). 这一独特的结合模式极大地稳定了钠离子的结合, 同时也表明上述与钠离子结合相关的2个Tyr-Trp基序在该金属离子结合位点中的重要性. 值得一提的是, 这2个元件只特异的存在于hTIM-3中, 从而也证明了hTIM-3结构在TIM分子中的独特性.

2.6 hTIM-4结构中特殊的CC'环构象

与其他的h/mTIM分子相比, hTIM-4分子的CC'环呈现出不同于其他TIM分子的特殊构象. 结构比对显示, hTIM-4的CC'环的位置相对于其他TIM分子向C'折叠片的方向偏移了 ~ 4 Å的距离. 这使得hTIM-4的CC'环远离G折叠片而靠近C'折叠片, 不同于其他TIM分子更临近G折叠片的CC'环构象(图7(a)).

通常来说, 一段环构象的稳定需要2个方面的因素: (1) 氨基酸相互作用或者稳定力的存在; (2) 不存在空间位阻. 为进一步了解导致该环特殊构象的原子机制, 我们仔细考察了CC'环附近的氨基酸, 由此发现了位于C'折叠片上的43位氨基酸的侧链朝向变

图5 hTIM-1 结构中变短的 FG 环。(a) 具有 PS 结合能力的 TIM 分子序列比对图，图中标注出 FG 环以及它旁边的折叠片结构区。F 和 G 折叠片以及 FG 环分别用实线和虚线标注在序列比对图上方。F 折叠片末端氨基酸用黑框圈出，hTIM-1 中的 Asn-Asp 基序序列用绿框圈出，其他 TIM 分子中的 Asn-Asp 基序序列则标记为黄框。氨基酸序列号标记在序列下方。(b) 小鼠和人的 TIM 分子 F 和 G 折叠片结构对比图。(a) 中圈出的氨基酸用相同颜色框圈注于相应位置，用以表明 Asn-Asp 基序在 hTIM-1 结构上的位置。(c) TIM 分子 F 折叠片末端氨基酸与 G 折叠片起始氨基酸间的氢键相互作用示意图。图中标注出正文中提及的以及(a)中圈出的氨基酸

Figure 5 A shortened FG loop in hTIM-1. (a) Sequence alignment among PS-binding competent mouse and human TIMs highlighting the FG loop and its flanking strand regions. The strands (F and G) and the inter-strand FG loop were marked on the top of the sequence as solid and dashed lines, respectively. The F-strand terminal residue was highlighted by encircling with a black box, and the Asn-Asp di-residue motif was marked with a green box in hTIM-1 and with a yellow box in the remaining TIM molecules. The residue numbers were listed below the sequence. (b) Superimposition of the mouse and human TIM structures highlighting the F and G strands. The residues encircled in the boxes in (a) were mapped onto the structures to highlight the strand-localization of the Asn-Asp di-residue motif in hTIM-1. (c) Comparison of the inter-strand H-bond linkages marking the end of the F strand and the start of the G strand. The residues referred to in the text were labeled. The encircled amino acids in (a) were highlighted. Color selections: hTIM-1, green; mTIM-1, blue; hTIM-4, magenta; mTIM-4, red; hTIM-3, cyan; mTIM-3, orange

化(图7(b))。在hTIM-4中，43位的精氨酸(Arg43)侧链的胍基朝向远离CC'环的方向，使CC'环有足够的空间向C'折叠片方向偏移。由于与3个亲水性氨基酸(24位丝氨酸(Ser24)和88位谷氨酸(Glu88)的侧链以及44位苏氨酸(Thr44)的主链)相互作用，精氨酸侧链被牢牢的固定住，并进一步通过与37位半胱氨酸(Cys37)

图6 hTIM-3 结构中的金属离子结合位点。(a) 具有 PS 结合能力的 TIM 分子结构对比图，图中标注出 IgV 结构域特异的 C'、C'' 和 D 折叠片。金属离子(用球形表示)结合位点使 C'' 折叠片扭曲并在 C''D 环的位置形成了一个新的 η' 螺旋，这 2 个区域也在图中标示出来。图中各分子的颜色与图 5 中一致。(b) hTIM-3 中金属离子结合位点形成的结构基础。其中，上图为该位点上原子水平的结合细节，虚线代表氢键。下图为该位点上 TIM 分子的序列对比。2 个 Try-Trp 基序以及与阳离子配位的丝氨酸标注为阴影，氨基酸序列号标注于对比图下方

Figure 6 A novel metal binding site in hTIM-3. (a) Structural superimposition of the PS-binding competent mouse and human TIMs highlighting the IgV-specific C', C'', and D strands. The bound metal ion (shown as spheres) distorted the C'' strand and the following C''D loop in hTIM-3, creating an extra η' helix which was highlighted and labeled. The TIM color selections are the same as in Figure 4. (b) Structural basis of the metal binding site formation in hTIM-3. Upper panel: atomic binding details at the binding site. The residues referred to in the text were labeled. Dashed lines indicate H-bonds. Lower panel: comparison of the TIM sequences highlighting those residues coordinating and stabilizing the bound metal in hTIM-3. The two Try-Trp motifs and the cation-coordinating serine residue were shaded. Residue numbers were listed below the sequence

间形成氢键而稳定CC'环。然而在其他TIM分子中，该位点上的相应氨基酸(色氨酸或精氨酸)却朝向CC'环，若采用hTIM-4中CC'环构象，将与43位氨基酸的侧链基团产生强烈的空间位阻(图7(b))。以mTIM-4的结构为例，精氨酸的构象由40位谷氨酸(Glu40)和88位谷氨酸(Glu88)所稳定。与Glu40形成的强亲水相互作用使得Arg43侧链被拉向CC'环。相对于hTIM-4，mTIM-4的CC'环更靠近G折叠片，使在32位半胱氨酸(Cys32)的主链氨基和99位天冬酰胺(Asn99)的侧链氧之间形成了稳定的氢键(图7(c))。

值得一提的是，Glu40通过维持Arg43的侧链构象，在mTIM-4形成靠近G折叠片的CC'环构象中发挥着重要作用，而hTIM-4由于40位氨基酸突变为丙氨酸而失去了这一极性互作，使得其CC'环呈现出独特的构象。但Glu40在TIM分子中并不保守，只存在于mTIM-3和mTIM-4中(图7D)。在h/mTIM-1中，虽然其40位氨基酸并非Glu，但其43位氨基酸也非Arg，而

图7 hTIM-4结构中的CC'环。(a) 具有PS结合能力的TIM分子CC'环结构区对比图。hTIM-4分子的CC'环相较于其他分子偏移了~4 Å 的距离。二硫键和其他折叠片区也在图中标注出来。TIM分子的颜色与图5中相同。(b) hTIM-4分子CC'环偏移的原子水平决定因素。CC'环附近的43位氨基酸影响了该环的构象。小鼠的TIM分子和人的TIM分子的43位氨基酸的侧链走向用阴影标出, 箭头表明氨基酸侧链偏转方向。(c) hTIM-4(上图)和mTIM-4(下图)结构中, 稳定43位氨基酸侧链构象的原子间相互作用。图中标注出了二硫键、正文中提及氨基酸以及C'和G折叠片。虚线代表氢键。(d) TIM分子序列对比图, 标注出40位和43位氨基酸。(e) hTIM-3中稳定43位氨基酸侧链的氢键网络, 该网络形成依赖于金属离子结合位点。图中标注为参与作用的氨基酸。虚线表示氢键

Figure 7 The unusual CC' loop conformation in hTIM-4. (a) Superimposition of the PS-binding competent mouse and human TIM structures highlighting the CC' loop. Clearly shown is that hTIM-4 CC' shifted for a large distance of ~4 Å from the location of the equivalent loops in other TIMs, which was highlighted and labeled. The disulfide linkages and the well-aligned strands (C, C', F, and G) were marked. The TIM color selections are the same as in Figure 4. (b) Atomic determinants of the CC' conformation difference between hTIM-4 and other TIMs. Scrutinization of the residues in the vicinity of CC' revealed that residues at position 43 could dramatically affect the CC' loop conformation. The side-chain orientations of residue 43 in mouse and human TIMs were shaded and marked with arrows. (c) Comparison of the atomic interactions stabilizing the respective side-chain conformations of Arg43 in hTIM-4 (upper panel) and mTIM-4 (lower panel). The disulfide linkages, the residues referred to in the text, and C' and G strands were labeled. Dashed lines indicate H-bonds. (d) Comparison of the TIM sequences highlighting the residue variations at positions 40 and 43. (e) An H-bond network in hTIM-3 stabilizing Arg43 in an orientation unfavouring steric adjacency between CC' and strand C'. The formation of such a network is dependent on the novel metal binding site. The residues involved are labeled. Dashed lines indicate H-bonds

是具有大环侧链的色氨酸(Trp43)。其侧链吲哚环缺少柔性且占据空间较大, 无法创造出足够空间使得其CC'环如hTIM-4一样偏向C'折叠片。hTIM-3的40位氨基酸同样不是Glu, 但结构中独特的金属结合位点的存在形成了特有的极性互作网络(图7E), 代偿了Glu40对Arg43的极性牵引, 因此其CC'环相似于其他TIM分子而不同于hTIM-4。

2.7 hTIM-4与磷酸丝氨酸复合物结构

通过浸泡或共结晶, 我们都没能获得hTIM-1和hTIM-3与1,2-Dicaproyl-sn-glycero-3-(Phospho-L-Serine) (一种磷脂类似物)或者L-O-phosphoserine (PS的头部基团)的复合物晶体, 但在钙离子的存在下, 我们成功地获得了hTIM-4与磷酸丝氨酸(phosphoserine)的晶体结构, 分辨率为2.5 Å(表1)。磷酸丝氨酸组成了磷脂酰丝氨酸分子(PS)的头部, 负责与TIM分子的结合。正如预期, 一个磷酸丝氨酸分子和一个钙离子共

同结合于CC'/FG环构成的结合槽中(图8(a))。整体上, hTIM-4在结合磷酸丝氨酸前后无明显变构(图8(b))。但将我们的结构与之前报道的mTIM-3或mTIM-4与PS的复合物结构(PDB号分别为3KAA, 3BIB)进行比较发现, 金属离子和PS的磷酸基团在空间位置上均能够很好的对应上, 但PS的丝氨酸部分则存在明显的构象差异。相较于mTIM-3或mTIM-4, PS结合hTIM-4时, 其结合的角度发生了~90°的偏转。这是由于特殊的CC'环构象所带来的明显的空间位阻, 使磷酸丝氨酸不能够完全采用mTIM分子中的空间取向结合hTIM-4。

通过进一步分析和比较hTIM-4和mTIM-4在PS结合面的分子间互作细节, 发现在两个复合物中, 金属离子都能够同时与89位缬氨酸(Val89)和91位甘氨酸(Gly91)的主链氧以及94位天冬酰胺(Asn94)和95位天冬氨酸(Asp95)的侧链氧相互作用(图8(d)和(e))。位于FG环上的这4个氨基酸为金属离子提供了一个带

表 1 晶体学数据收集及精修数据统计^{a)}
Table 1 Crystallographic data collection and refinement statistics

	hTIM1	hTIM3	hTIM4	hTIM4-phosphoserine
Datacollection				
Spacegroup	P212121	P212121	P1	C2
Cell dimensions				
<i>a,b,c</i> (Å)	27.79, 33.77, 86.86	54.00, 61.96, 67.15	30.46, 43.78, 44.73	212.44, 65.03, 68.85
	90,90,90	90,90,90	77.32,86.78,85.34	90, 108.55, 90
Resolution(Å)	50~1.80 (1.86~1.80)	50~2.40 (2.49~2.40)	50~1.50 (1.55~1.50)	50~2.50 (2.59~2.50)
<i>R</i> _{merge}	0.105(0.469)	0.130(0.842)	0.057(0.283)	0.116(0.810)
<i>I/I</i>	11.1(2.0)	13.3(1.8)	24.1(5.8)	12.1(1.3)
Completeness(%)	97.8(95.5)	100.0(100.0)	96.1(94.6)	99.1(95.3)
Redundancy	4.0(4.0)	5.8(5.9)	3.2(2.7)	4.6(4.2)
Refinement				
Resolution(Å)	26.47~1.80	34.81~2.40	27.63~1.50	48.22~2.50
No.reflections	7932	9173	34342	30928
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0.1972/0.2591	0.2146/0.2571	0.1716/0.1894	0.2097/0.2780
No.atoms				
Protein	795	1726	1772	5280
Ligand/ion	0	2	0	72
Water	86	61	271	116
<i>B</i> -factors				
Protein	26.0	41.2	17.3	50.8
Ligand/ion		34.1		61.1
Water	35.9	32.7	30.2	44.5
R.m.s.deviation				
Bondlengths(Å)	0.007	0.007	0.009	0.008
Bondangles(°)	1.188	1.252	1.195	1.280
Ramachandran analysis				
Mostfavoured(%)	84.3	82.6	87.2	81.2
Additional allowed(%)	15.7	16.3	11.7	17.1
Generally allowed(%)	0	1.1	0	0.7
Disallowed(%)	0	0	1.0	1.0

a) 括号中的数据为最高分辨率范围

负电的结合口袋. PS的磷酸根基团特异的结合该金属离子, 并且进一步通过与93位苯丙氨酸(Phe93)、94位天冬酰胺(Asn94)和95位天冬氨酸(Asp95)的主链氨基相互作用而稳定在结合槽内. PS的丝氨酸基团的羟基也能够与TIM分子相互作用, 然而mTIM-4与hTIM-4分子与该基团的互作面存在明显的区别. hTIM-4中, 该互作面由86位精氨酸(Arg86)和97位赖氨酸(Lys97)的侧链构成, 而在mTIM-4中, 该互作的关键氨基酸则变为86位精氨酸(Arg86)和36位赖氨酸(Lys36).

3 讨论

过去几年间, 新发和突发性病毒性传染病一定程度上呈现出愈演愈烈的趋势, 如2013年的H7N9禽流感疫情、2014年的西非埃博拉疫情、2015年在韩国发生的中东呼吸综合征冠状病毒的局部爆发等^[43~45]. 近些年的研究表明, TIM分子很可能在很多囊膜病毒, 尤其是埃博拉病毒的入侵中扮演重要角色^[9,14,46]. 过去的研究和我们当前的工作均揭示了hTIM分子促进病毒入侵与其PS结合活性密不可分. 因此, 认识

图8 hTIM-4与磷酸丝氨酸相互作用的结构基础。(a) hTIM-4与磷酸丝氨酸的复合物结构。图中标注出CC'和FG环、结合的Ca²⁺(用球形表示)以及磷酸丝氨酸组分。(b) hTIM-4分子结合磷酸丝氨酸前(紫红色)后(黄色)的结构对比图。(c) hTIM-4与磷酸丝氨酸的复合物结构与之前报道的mTIM-3(橘色)和mTIM-4(灰色)结合PS的复合物结构对比图。图中标注出磷酸丝氨酸结合hTIM-4时发生了90°偏转。(d, e) hTIM-4分子(d)和mTIM-4分子(e)PS结合面的原子间相互作用的比较图。图中彩色阴影标注出相互作用的三个关键位点: 结合槽中的金属离子、稳定PS或磷酸丝氨酸的支撑区、与PS的丝氨酸羧基相互作用的平台区。此3个位点的表面电荷特征在下图中展示, 蓝色示正电荷, 红色示负电荷

Figure 8 Structural basis of the hTIM-4/phosphoserine interactions. (a) The complex structure between hTIM-4 and phosphoserine. The CC' and FG loops, the bound calcium (shown as spheres), and the phosphoserine moiety (composed of a phosphate group and a serine) were highlighted and labeled. (b) Comparison of the hTIM-4 structures in the free (magenta) and ligand-bound (yellow) states. (c) Comparison of the hTIM-4/phosphoserine (yellow) structure with previously reported complex structures of mTIM-3 (orange) and -4 (gray) bound with PS. The well-aligned calcium and phosphate groups were shown. The PS-serine, however, rotated by ~90 degrees in hTIM-4 relative to that in mTIM-3 or -4. The orientation differences in PS-serine were highlighted. The CC' loops were marked with arrows. (d, e) Comparison of the atomic interaction details at the TIM/PS binding interface between hTIM-4 and mTIM-4. In each case, the interaction involves a pocket accommodating the metal ion, a stretch stabilizing PS-phosphate, and a patch interacting with the carboxyl group of PS-serine. The compositions of the three elements were highlighted and labeled in the upper panel. These three elements were further mapped on the electrostatic surface of the hTIM-4 and mTIM-4 structures, which were presented in the lower panel. (d) Interactions between hTIM-4 and PS. (e) Interactions between mTIM-4 and PS

hTIM分子识别和结合PS的分子机制是解码埃博拉病毒入侵过程的关键环节。由于2014-ZEBOV病毒较以前的病毒分离株(以1976-ZEBOV为代表)在GP蛋白中存在若干氨基酸突变, 我们首先测定了两种假病毒的入侵能力, 并证明两者利用hTIM分子入侵的效率相当。我们进一步解析了3个hTIM分子负责PS结合的IgV区的晶体结构。虽然hTIM-1, hTIM-3和hTIM-4均呈现出与其小鼠同源分子mTIM相似的整体结构特征, 但在局部结构细节上, 尤其是与PS结合相关的结构模块中, hTIM分子表现出各自的结构特点。

在hTIM-1中, 其FG环与其他的TIM分子相比短2个氨基酸。这使得本应位于FG环上的Asn94和Asp95两个氨基酸在hTIM-1中定位于G折叠片上。而先前对小鼠同源分子与PS的复合物结构研究^[4,25]以及本研究中解析的hTIM-4与磷酸丝氨酸的复合物结构均显示, Asn94和Asp95直接参与结合金属离子, 而后者在结合PS分子中发挥着关键作用。因此, 这2个氨基酸在hTIM-1中定位于折叠片的结构特征很可能破坏其与金属离子的配位。生化数据分析显示, 用于结晶的hTIM-1分子在体外表现出明显的PS结合活性, 我

们在结构中所观察到的特殊FG环很可能提示hTIM-1具有与其他TIM分子不同的PS结合模式。

与其他的TIM分子相比, hTIM-4具有典型的FG环, 但意外的是, 与PS结合相关的另一个环(CC'环)却呈现出特殊的构象。这一构象在结合磷酸丝氨酸后仍然保持不变。我们进一步比较了CC'环在单独的hTIM-4晶体(2个分子/非对称单元)以及hTIM-4与磷酸丝氨酸复合物晶体(6个复合物分子/非对称单元)的非对称单元中各个分子的情形, 发现CC'环均保持这一特殊构象。这一发现一定程度上排除了hTIM-4结构中CC'环的构象是由于晶体堆积时相邻分子间氨基酸互作而造成的假象的可能, 因为很难想象上述8个分子均存在高度相似的分子间互作而使得CC'环保持高度一致的空间构象。因此, 我们认为hTIM-4 CC'环的特有构象并非晶体堆积的结果, 而是与蛋白43位氨基酸侧链基团的空间方位密切相关。在hTIM-4与磷酸丝氨酸的复合物结构中, 后者改变了其丝氨酸基团的空间方位以适应hTIM-4 CC'环的特殊构象, 这使得hTIM-4的PS结合模式与之前观察到的小鼠TIM分子与PS的结合模式呈现出差异。

基于上述分析, 我们认为TIM分子的CC'环构象

与蛋白43位氨基酸的侧链基团的性质和空间方位存在着显著的相关性. 在人或小鼠的TIM-1分子中, 其43位氨基酸均为色氨酸(Trp43), 这一大侧链基团的吡咯环因占据了较大空间, 导致空间不足而使得其CC'环不能采取hTIM-4中所观察到的构象. 在小鼠TIM-3和-4中, 其43位氨基酸为精氨酸(Arg43), 但由于40位谷氨酸(Glu40)的极性吸引, 使得Arg43的侧链空间取向与人和小鼠TIM-1中的Trp43高度相似, 因此其CC'环同样不能采取hTIM-4中所观察到的构象. 在hTIM-4中, 由于40位氨基酸的突变(Glu40到Ala40)而去除了这一极性互作, 从而使得Arg43可以自由摆动而给予了CC'特殊构象形成的空间. 值得注意的是, hTIM-3的40位氨基酸为缬氨酸(Val40), 因此同样缺少上述极性互作. 但由于其特有的金属结合位点的存在, 形成了一个替代性的极性互作网, 代偿小鼠TIM-3和-4中的Arg43/Glu40相互作用, 从而维持了CC'环的典型构象.

我们还测定了3种hTIM分子与埃博拉GP蛋白是否存在直接的蛋白/蛋白互作. 本研究既使用了去除mucin也使用了保留mucin且完全糖基化的TIM受体和病毒GP蛋白, 但任何两者间的直接互作都未能检测到. 虽然hTIM-1最初被认为是埃博拉病毒GP蛋白的特异性受体^[13], 但若干后续研究证实hTIM-1可以介导众多(包括埃博拉病毒)囊膜病毒的入侵^[9], 甚至能够促进不含任何病毒糖蛋白的假病毒粒子的入侵^[14]. 这些结果均暗示hTIM分子所介导的囊膜病毒入侵不具特异性, 表明其并非识别病毒表面的糖蛋白而促进感染. 这与我们本研究中的结果一致. 排除了hTIM分子与病毒糖蛋白的直接互作, hTIM对PS分子的识别和结合就成为了其介导的病毒入侵的最关键因素.

但需要注意, 虽然PS结合能力是hTIM分子促进病毒入侵的关键, 但并非所有的PS结合分子均能如hTIM分子一样促进埃博拉病毒感染. 一个典型的例

子就是RAGE (receptor for advance glycation end products)分子. 该受体分子能够通过结合PS而促进凋亡小体被吞噬细胞吞噬^[47,48], 但却不能够促进埃博拉病毒的入侵^[11,16]. 类似的hTIM-3也能够结合PS, 但却不具备增强埃博拉病毒感染的活性和能力. 我们的研究表明由hTIM-3的IgV结构域和hTIM-1的mucin区以及胞内段所组成的嵌合受体分子可以显著促进病毒感染. 这一结果与若干以前的研究报道相一致^[9,11,15,16], 表明TIM分子的mucin区在其介导病毒入侵过程中也发挥着一定作用. 有报道认为, TIM受体的mucin区很可能作为脚手架而将其IgV结构域突出于细胞外, 从而辅助TIM对病毒囊膜PS的结合, 因此mucin的长度非常关键. 我们的结果与这一观点一致. 但最近的研究显示, 利用与mucin区(~165氨基酸)大小相似的两个串联的免疫球蛋白样结构域(~180氨基酸)替换hTIM-1的mucin, 其介导病毒入侵的能力显著下降^[11]. 因此, mucin结构域的固有结构特征很可能也在其促进病毒感染中发挥一定作用.

4 结论

本研究证明了1976-和2014-扎伊尔型埃博拉病毒的假病毒可以利用hTIM-1和hTIM-4入侵细胞, 并且表现出类似的入侵效率, 但hTIM-3不具备增强病毒入侵的能力, 其促进病毒入侵的功能与hTIM分子IgV区的PS结合能力密切相关. 本研究进一步证明mucin区的长度在hTIM分子介导假病毒入侵中也发挥着重要作用. 同时提供了确凿证据证明尽管hTIM能够增强埃博拉病毒的入侵, 但是它不能够直接与埃博拉GP蛋白相互作用. 解析了hTIM-1, hTIM-3和hTIM-4的IgV区晶体结构以及hTIM-4与磷酸丝氨酸(phosphoserine)的复合物晶体结构, 并揭示了hTIM分子区别于mTIM的局部结构特征. 综上所述, 我们的结构和功能数据将帮助我们更深入地认识hTIM分子所介导的囊膜病毒入侵细胞的分子机制.

本文所提及的蛋白结构均已在 Protein Data Bank (PDB)上注册登记, 其注册号分别为:

蛋白名称: PDB code

hTIM-1: 5F70

hTIM-3: 5F71

hTIM-4: 5F7F

hTIM-4/phosphoserine: 5F7H

参考文献

- 1 Freeman G J, Casasnovas J M, Umetsu D T, et al. TIM genes: A family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*, 2010, 235: 172–189
- 2 Rennert P D. Novel roles for TIM-1 in immunity and infection. *Immunol Lett*, 2011, 141: 28–35
- 3 Rodriguez-Manzanet R, DeKruyff R, Kuchroo V K, et al. The costimulatory role of TIM molecules. *Immunol Rev*, 2009, 229: 259–270
- 4 DeKruyff R H, Bu X, Ballesteros A, et al. T cell/transmembrane, Ig, and mucin-3 allelic variants differentially recognize phosphatidylserine and mediate phagocytosis of apoptotic cells. *J Immunol*, 2010, 184: 1918–1930
- 5 Nakayama M, Akiba H, Takeda K, et al. Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation. *Blood*, 2009, 113: 3821–3830
- 6 Miyanishi M, Tada K, Koike M, et al. Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature*, 2007, 450: 435–439
- 7 Kobayashi N, Karisola P, Pena-Cruz V, et al. TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells. *Immunity*, 2007, 27: 927–940
- 8 Tietjen G T, Gong Z, Chen C H, et al. Molecular mechanism for differential recognition of membrane phosphatidylserine by the immune regulatory receptor Tim4. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: E1463–E1472
- 9 Jemielity S, Wang J J, Chan Y K, et al. TIM-family proteins promote infection of multiple enveloped viruses through virion-associated phosphatidylserine. *PLoS Pathog*, 2013, 9: e1003232
- 10 Li M, Ablan S D, Miao C, et al. TIM-family proteins inhibit HIV-1 release. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: E3699–E3707
- 11 Moller-Tank S, Kondratowicz A S, Davey R A, et al. Role of the phosphatidylserine receptor TIM-1 in enveloped-virus entry. *J Virol*, 2013, 87: 8327–8341
- 12 Kaplan G, Totsuka A, Thompson P, et al. Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *EMBO J*, 1996, 15: 4282–4296
- 13 Kondratowicz A S, Lennemann N J, Sinn P L, et al. T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) is a receptor for Zaire Ebola virus and Lake Victoria Marburgvir. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 8426–8431
- 14 Meertens L, Carnec X, Lecoin M P, et al. The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. *Cell Host Microbe*, 2012, 12: 544–557
- 15 Moller-Tank S, Albritton L M, Rennert P D, et al. Characterizing functional domains for TIM-mediated enveloped virus entry. *J Virol*, 2014, 88: 6702–6713
- 16 Morizono K, Chen I S. Role of phosphatidylserine receptors in enveloped virus infection. *J Virol*, 2014, 88: 4275–4290
- 17 Dolnik O, Kolesnikova L, Becker S. Filoviruses: Interactions with the host cell. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65: 756–776
- 18 Kuhn J H, Becker S, Ebihara H, et al. Proposal for a revised taxonomy of the family Filoviridae: Classification, names of taxa and viruses, and virus abbreviations. *Arch Virol*, 2010, 155: 2083–2103
- 19 Organization W H. Ebola Response Roadmap-Situation Report, accessed, 24 June 2015. <http://apps.who.int/ebola/ebola-situation-reports>
- 20 McIntire J J, Umetsu S E, Akbari O, et al. Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nat Immunol*, 2001, 2: 1109–1116
- 21 Umetsu S E, Lee W L, McIntire J J, et al. TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance. *Nat Immunol*, 2005, 6: 447–454
- 22 Nakae S, Iikura M, Suto H, et al. TIM-1 and TIM-3 enhancement of Th2 cytokine production by mast cells. *Blood*, 2007, 110: 2565–2568
- 23 Sizing I D, Bailly V, McCoon P, et al. Epitope-dependent effect of anti-murine TIM-1 monoclonal antibodies on T cell activity and lung immune responses. *J Immunol*, 2007, 178: 2249–2261
- 24 Ichimura T, Bonventre J V, Bailly V, et al. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem*, 1998, 273: 4135–4142
- 25 Santiago C, Ballesteros A, Martinez-Munoz L, et al. Structures of T cell immunoglobulin mucin protein 4 show a metal-Ion-dependent ligand binding site where phosphatidylserine binds. *Immunity*, 2007, 27: 941–951
- 26 Cao E, Zang X, Ramagopal U A, et al. T cell immunoglobulin mucin-3 crystal structure reveals a galectin-9-independent ligand-binding surface. *Immunity*, 2007, 26: 311–321
- 27 Santiago C, Ballesteros A, Tami C, et al. Structures of T Cell immunoglobulin mucin receptors 1 and 2 reveal mechanisms for regulation of immune responses by the TIM receptor family. *Immunity*, 2007, 26: 299–310
- 28 Zhang S, Lu G, Qi J, et al. Competition of cell adhesion and immune recognition: insights into the interaction between CRTAM and nectin-like 2. *Structure*, 2013, 21: 1430–1439

- 29 Otwinowski Z, Minor W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Macromolecular Crystallography*, 1997, 276: 307–326
- 30 Collaborative Computational Project. The CCP4 suite: Programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1994, 50: 760–763
- 31 Read R J. Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2001, 57: 1373–1382
- 32 Murshudov G N, Vagin A A, Dodson E J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1997, 53: 240–255
- 33 Emsley P, Cowtan K. Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2004, 60: 2126–2132
- 34 Adams P D, Afonine P V, Bunkoczi G, et al. PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2010, 66: 213–221
- 35 Laskowski R A, Macarthur M W, Moss D S, et al. Procheck: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr*, 1993, 26: 283–291
- 36 Gao J, Lu G, Qi J, et al. Structure of the fusion core and inhibition of fusion by a heptad repeat peptide derived from the S protein of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J Virol*, 2013, 87: 13134–13140
- 37 Mi S, Li Y, Yan J, et al. Na(+)/K(+)-ATPase beta1 subunit interacts with M2 proteins of influenza A and B viruses and affects the virus replication. *Sci China Life Sci*, 2010, 53: 1098–1105
- 38 Volchkov V E, Volchkova V A, Chepurinov A A, et al. Characterization of the L gene and 5' trailer region of Ebola virus. *J Gen Virol*, 1999, 80 (Pt 2): 355–362
- 39 Baize S, Pannetier D, Oestereich L, et al. Emergence of Zaire Ebola virus disease in Guinea. *N Engl J Med*, 2014, 371: 1418–1425
- 40 Tong Y G, Shi W F, Di L, et al. Genetic diversity and evolutionary dynamics of Ebola virus in Sierra Leone. *Nature*, 2015, 526: 595
- 41 Kaletsky R L, Simmons G, Bates P. Proteolysis of the Ebola virus glycoproteins enhances virus binding and infectivity. *J Virol*, 2007, 81: 13378–13384
- 42 Lee J E, Fusco M L, Hessel A J, et al. Structure of the Ebola virus glycoprotein bound to an antibody from a human survivor. *Nature*, 2008, 454: 177–182
- 43 Liu D, Shi W, Shi Y, et al. Origin and diversity of novel avian influenza A H7N9 viruses causing human infection: phylogenetic, structural, and coalescent analyses. *Lancet*, 2013, 381: 1926–1932
- 44 Su S, Wong G, Liu Y, et al. MERS in South Korea and China: A potential outbreak threat? *Lancet*, 2015, 385: 2349–2350
- 45 Hersey S, Martel L D, Jambai A, et al. Ebola Virus Disease - Sierra Leone and Guinea, August 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2015, 64: 981–984
- 46 Feigelstock D, Thompson P, Mattoo P, et al. The human homolog of HAVcr-1 codes for a hepatitis A virus cellular receptor. *J Virol*, 1998, 72: 6621–6628
- 47 Friggeri A, Banerjee S, Biswas S, et al. Participation of the receptor for advanced glycation end products in efferocytosis. *J Immunol*, 2011, 186: 6191–6198
- 48 He M, Kubo H, Morimoto K, et al. Receptor for advanced glycation end products binds to phosphatidylserine and assists in the clearance of apoptotic cells. *EMBO Rep*, 2011, 12: 358–364

Crystal structures of human TIM members: Ebolavirus entry-enhancing receptors

WANG Han¹, QI JianXun¹, LIU NingNing¹, LI Yan¹, GAO Jun², ZHANG TingHong¹, CHAI Yan¹, GAO Feng³, ZHANG Hao⁴, LI XiangDong², YE Xin¹, YAN JingHua^{1,5}, LU GuangWen⁶ & GAO George Fu^{1,7,8}

¹ CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

² State Key Laboratory of Agro-biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

³ Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

⁴ School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230039, China;

⁵ CAS Key Laboratory of Microbial Physiological and Metabolic Engineering, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

⁶ State Key Laboratory of Biotherapy and Cancer Center, West China Hospital, West China Medical School, Sichuan University, Chengdu 610041, China;

⁷ National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention (China CDC), Beijing 102206, China;

⁸ Research Network of Immunity and Health (RNIH), Beijing Institutes of Life Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Human T-cell immunoglobulin and mucin domain (hTIM) receptor was recently identified as the entry-enhancing receptor for various enveloped viruses, including ebolavirus. This hTIM-mediated virus entry is highly dependent on the immunoglobulin variable (IgV)-like domain of the receptor and on the specific interactions between hTIM IgV and the phosphatidylserine (PS) moieties on the viral envelope. There are three members in the hTIM family, including hTIM-1, -3, and -4. However, their IgV domain structures and the PS binding basis remain elusive thus far, though their murine homologues have been structurally well defined. In addition, it is suspected that the 2014-Zaire-ebolavirus, which has caused the largest pandemic ever recorded last year in West Africa, might have different pathogenic capacity from the earlier isolates. Nevertheless, it remains uninvestigated if the 2014-Zaire-ebolavirus can recognize hTIMs to enhance virus infection similarly to the previously tested 1976-Zaire-ebolavirus. In this study, we first showed that pseudoviruses incorporating either the 1976- or the 2014-Zaire-ebolavirus glycoprotein (GP) exhibit similarly enhanced cell entry via hTIM-1 and -4, but not with hTIM-3. Though 2014-GP mutations are suspected giving rise to a higher virulence, analogous entry rate was observed for 1976- and 2014-GP. We further showed that the hTIM receptors do not directly interact with either the mucin-deleted or the mucin-reserved intact ebolavirus GP, and that hTIM-1 and -4 engage envelope PS to facilitate the viral infection. We then solved all the three hTIM IgV-domain structures as well as the hTIM-4/phosphoserine complex structure. Several unexpected regional features, which have not been observed in any of the mouse homologues, were identified in the individual PS-binding clefts of the three hTIMs, including a shortened FG loop in hTIM-1, a novel metal binding site in hTIM-3, and an alternative conformation for the CC' loop in hTIM-4. These characteristics astonishingly indicated variant PS-recognition basis established by individual hTIMs that is different from that of the mouse receptors. Taken together, our observations will merit our understanding of the binding basis between hTIMs and PS, thereby shedding light on the entry mechanisms of ebolavirus and other related enveloped viruses.

human T-cell immunoglobulin and mucin domain receptors, structure, ebolavirus entry, phosphatidylserine-binding basis

doi: 10.1360/N972015-01255