

## 研究报告



## EB 病毒蛋白 BNLF2a 阻止抗原转运蛋白 TAP 的构象变化

尹利敏 林嘉成\*

福建医科大学基础医学院 消化道恶性肿瘤教育部重点实验室 肿瘤微生物福建省重点实验室 病原生物学系 福建 福州 350122

**摘要:**【背景】EB 病毒是一个常见的病原, 它能引起霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤以及胃癌、鼻咽癌。该病毒编码的膜蛋白 BNLF2a 抑制抗原转运蛋白 TAP (Transporter associated with antigen processing) 从而逃逸 T 细胞的清除。TAP 属于 ABC (ATP-binding cassette) 转运蛋白超家族, 是由 TAP1 和 TAP2 两个亚基构成的。TAP 通过 ATP 提供能量, 跨膜转运抗原多肽, 这一过程伴随着构象变化。【目的】旨在揭示 BNLF2a 是否影响 TAP 的构象变化。【方法】TAP 蛋白核酸结合结构域的二聚体界面的 D-loop 进行点突变, 引入半胱氨酸。在表达和不表达 BNLF2a 情况下, 采用氧化性的二价铜离子交联半胱氨酸, 并通过 Western blot 对比 TAP 的半胱氨酸形成二硫键的比例。【结果】BNLF2a 表达使 TAP 被交联的比例增高。【结论】BNLF2a 可能将 TAP 稳定在核苷酸结合结构域二聚化的构象, 从而同时抑制 ATP 和抗原多肽结合到 TAP 上来。

**关键词:** EB 病毒, BNLF2a, TAP, ABC 转运蛋白, 抗原多肽

## Epstein-Barr viral protein BNLF2a suppresses the conformational change of antigenic peptide transporter TAP

YIN Li-Min LIN Jia-Cheng\*

Key Laboratory of Tumor Microbiology in Fujian Province, Key Laboratory of Ministry of Education for Gastrointestinal Cancer, Department of Pathogen Biology, School of Basic Medical Sciences, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350122, China

**Abstract:** [Background] Epstein-Barr virus (EBV) is a common pathogen causing Burkitt's lymphoma, Hodgkin's disease, gastric cancer and nasopharyngeal carcinoma. A membrane protein BNLF2a encoded by EBV inhibits antigen transportation by transporter associated with antigen processing (TAP) and thereby evades the elimination by cytotoxic T cells. TAP is a member of the ATP-binding cassette (ABC) superfamily and composed of two subunits of TAP1 and TAP2. Using the energy of ATP hydrolysis, TAP transports antigenic peptides across the membrane with a conformational change. [Objective] The aim of this study was to study if BNLF2a affects the conformational switch of TAP. [Methods] Cysteines were introduced into the D-loop at the interface of TAP's nucleotide binding domains. TAP were cross-linked by oxidizing agent Cu(II). The ratios of disulfide formed TAP were compared in the presence or absence of BNLF2a by western

**Foundation items:** Natural Science Foundation of Fujian Province (2015J05156); National Natural Science Foundation of China (81501755)

\*Corresponding author: Tel: 86-591-22862005; E-mail: linjc@mail.fjmu.edu.cn

**Received:** 30-07-2018; **Accepted:** 16-11-2018; **Published online:** 24-12-2018

**基金项目:** 福建省自然科学基金青年基金项目(2015J05156); 国家自然科学基金青年基金项目(81501755)

\*通信作者: Tel: 0591-22862005; E-mail: linjc@mail.fjmu.edu.cn

**收稿日期:** 2018-07-30; **接受日期:** 2018-11-16; **网络首发日期:** 2018-12-24

blot. **[Results]** The expression of BNLF2a increased the ratio of cross-linked TAP. **[Conclusion]** BNLF2a appears to stabilize TAP in the nucleotide binding domains dimerized conformation and thereby inhibit both of ATP and antigenic peptide binding to TAP.

**Keywords:** Epstein-Barr virus, BNLF2a, TAP, ABC transporter, Antigenic peptide

EB 病毒也称为人疱疹病毒 4 型, 它的感染可导致单核细胞增多症, 并且与霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤以及鼻咽癌、胃癌相关<sup>[1]</sup>。EB 病毒可潜伏感染, 很难被免疫系统清除。EB 病毒编码了多重机制使得其感染的细胞可以逃过免疫细胞如杀伤性 T 细胞的清除。此前有研究表明 EB 病毒编码的蛋白 BNLF2a 可以结合到抗原转运蛋白 TAP (Transporter associated with antigen processing) 上, 进而抑制 TAP 的抗原转运功能, 从而避免 EB 病毒的抗原被递呈到细胞表面<sup>[2-3]</sup>。

TAP 在 MHC I 类分子抗原呈递中起关键性作用, 其将胞浆内经过蛋白酶体降解后产生的抗原多肽转位到内质网(Endoplasmic reticulum, ER)的内腔中, 并在此与 MHC I 类分子结合, 肽-MHC 复合物随后运输到细胞表面, 被 CD8<sup>+</sup>细胞毒性 T 淋巴细胞(Cytotoxic lymphocyte, CTL)识别, 诱导机体的细胞免疫清除感染的细胞和肿瘤细胞<sup>[4-6]</sup>。

TAP 蛋白属于 ATP 结合盒(ATP-binding cassette, ABC)转运蛋白超家族 B 族, 其通过结合和水解 ATP 来提供能量, 跨膜转运不同种类的溶质<sup>[7-8]</sup>。TAP 蛋白是由 TAP1 和 TAP2 组成的异源二聚体, 每个亚基由 N-末端跨膜结构域 (Transmembrane domains, TMD) 和 C-末端核苷酸结合结构域 (Nucleotide binding domains, NBD) 组成。NBD 位于胞质中, 其主要作用是催化 ATP 的水解并为肽段的转运提供能量。基于结构和生物化学数据, NBDs 在 ATP 的存在下二聚化, 其中 2 个 ATP 分子在二聚体界面处络合<sup>[9-10]</sup>。NBDs 在 ATP 结合和水解中具有不同功能的保守基序, 并且这两个复合 ATP 结合位点在功能上是非等效的。ATP 结合使两个 NBD 二聚化, NBDs 的二聚化加上多肽的结合诱导 TMD 从内向外的构象转换, 从而将抗原多肽从胞质侧转移到 ER 腔内, 肽转运和 ATP 水解紧密耦

合, ATP 水解又会使 TAP 复合物重新回到面向细胞内打开的状态<sup>[11]</sup>。在 ATP 结合的 NBD 二聚体中, 两个 D-loop 在二聚体界面处相互接触。

有报道表明 EB 病毒的 BNLF2a 可以通过抑制 ATP 和抗原多肽结合到 TAP 上, 从而抑制 TAP 的转运功能<sup>[2-3]</sup>。可是 BNLF2a 如何同时抑制 ATP 和抗原多肽结合到 TAP 上? BNLF2a 是否抑制 TAP 的构象变化, 抑制 TAP 后是否使其停留在 TMD 向细胞质打开的构象或是 TMD 向内质网腔打开的构象? 这些进一步的分子机制还不清楚。鉴于此, 本研究选择将 TAP 蛋白 D-loop 进行点突变, 通过半胱氨酸二硫键交联, 首次用此方法研究 BNLF2a 对 TAP 构象的影响。为病毒逃逸抗原呈递的具体机制提供了进一步的阐释, 为 ABC 转运蛋白的构象变化研究建立了重要方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

pFastBac Dual 载体(10712024), Thermo Fisher Scientific 公司; 细胞 Con A 琼脂糖珠子、甲基- $\beta$ -D-吡喃甘露糖苷、铜/菲啰啉(1 mmol/L CuSO<sub>4</sub>/4 mmol/L 1,10-Phenanthroline, Cu/Phen)、N-马来酰亚胺(N-ethylmaleimide, NEM), Sigma 公司; 荧光素标记的和无标记的多肽 PRYQKSTEL, 上海淘普生物科技有限公司; anti-TAP1 抗体(ab83817)、anti-TAP2 抗体(ab180611), Abcam 公司; anti-Flag 抗体(14793S), Cell Signaling Technology (CST)公司; Western 及 IP 细胞裂解液、BCA 法定量试剂, 碧云天生物技术公司; Protein A&G Agarose, Santa Cruz 公司; 转染试剂 BaculoGold Transfection Kit, BD 公司; 96 孔真空过滤板(0.65  $\mu$ m of polyvinylidene difluoride membranes), Millipore 公司; 荧光定量酶标仪( $\lambda_{\text{ex/em}}$ =485/520 nm), BMG Labtech 公司; Dounce Tissue Grinders (tight), WHEATON 公司。高速冷冻

离心机, Eppendorf 公司; 蛋白电泳仪、化学发光成像系统, Bio-Rad 公司; Bio-Tek 酶标仪, Applied Biosystems 公司; 生化培养箱, 上海精宏实验设备有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 突变株的构建与表达

TAP1 和 TAP2 的突变序列由通用公司合成同时做了密码子优化, 所有半胱氨酸替换成丝氨酸等其它氨基酸, 仅留下 TAP2 的 213 位半胱氨酸以保持 TAP 的活性。TAP1 和 TAP2 D-loop 上的丝氨酸被突变成半胱氨酸, 然后克隆到 pFastBac Dual 载体中。BNLF2a 序列由通用公司合成并在 N 端融合了 Flag 标签, 然后克隆到 pFastBac1 载体中。

### 1.2.2 *sf9* 昆虫细胞转染及杆状病毒扩增与表达

将  $1.5 \times 10^6$  个 *sf9* 细胞种板于 6 孔板中, 27 °C 孵育 1 h 后, 细胞贴壁。10  $\mu$ g pFastBac Dual-TAP 转染 *sf9* 细胞(根据 BaculoGold Transfection Kit 说明书操作)。将 6 孔板置于 27 °C, 孵育 4 h 后弃掉转染试剂, 加入 3 mL 新鲜的 SF900 II 培养液, 于 27 °C 继续培养 7 d, 最后产生重组杆状病毒。其病毒量被扩增了三代后, 用于感染 *sf9* 细胞, 3 d 后收集过表达 TAP 或突变体的细胞。采用相同的方法包装编码 BNLF2a 的杆状病毒并表达蛋白。

### 1.2.3 膜蛋白的提取

将细胞置于 20 mL 的冰浴 PI 混合缓冲液的冰上, 用 Dounce Tissue Grinders (tight) 裂解细胞。然后, 将裂解后的细胞于 4 °C、1 000 r/min 离心 12 min, 弃去细胞碎片及核。取上清, 4 °C、20 000 r/min 离心 30 min, 取沉淀即为粗膜重悬于 3 mL PBS 缓冲液中, 并分装保存于 -80 °C。另外, 用 BCA 法测定总蛋白浓度。

### 1.2.4 肽结合检测

将含 TAP 的膜抽提物(25  $\mu$ g 总蛋白)与 1  $\mu$ mol/L 荧光素标记的多肽 RRYQKSTEL 在 50  $\mu$ L 的结合缓冲液(5 mmol/L MgCl<sub>2</sub> in PBS, pH 7.4)中 4 °C 孵育 15 min。在 96 孔真空过滤板中加入 100  $\mu$ L 冰预冷的结合缓冲液洗膜蛋白 2 次, 去除未结合的肽。

通过  $\gamma$ -计数仪量化膜相关放射性。阴性对照采用 200 倍的未标记肽(RRYQKSTEL)竞争结合含 TAP 的膜抽提物。

### 1.2.5 肽转运检测

将含 TAP 的膜抽提物(150  $\mu$ g 总蛋白)重悬于 50  $\mu$ L 的结合缓冲液[包含 3 mmol/L ATP 或 2 单位的三磷酸腺苷双磷酸酶(Apyrase)]中, 加入 1  $\mu$ mol/L 的荧光素标记的多肽 RRYQNSTC(F)L, 32 °C 孵育 5 min, 然后加入终止缓冲液(含 10 mmol/L EDTA 的 PBS, pH 7.4), 置于冰上终止转运反应。随后离心, 将膜蛋白溶解于裂解缓冲液(50 mmol/L Tris/HCl, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L MnCl<sub>2</sub>, 1% Nonidet P-40, pH 7.4), 冰上裂解 20 min, 加入 Con A 琼脂糖珠子, 4 °C 过夜, 回收 N-core 糖基化的多肽及转运的多肽, 然后用裂解缓冲液洗涤, 糖基化的多肽将会被裂解缓冲液中的 200 mmol/L 甲基- $\beta$ -D-吡喃甘露糖苷洗脱下来, 用荧光定量酶标仪定量。

### 1.2.6 半胱氨酸交联

将含 TAP 的膜蛋白(0.5 mg 总蛋白)与铜/菲啰啉(Cu/Phen)在 100  $\mu$ L PBS (pH 7.4)中 4 °C 孵育 0–16 min, 加入 10 mmol/L N-马来酰亚胺(N-ethylmaleimide, NEM)以终止反应。用 500  $\mu$ L 的反应缓冲液(包含 10 mmol/L EDTA)洗涤膜蛋白, 4 °C、20 000 r/min 离心 8 min 收集膜蛋白。将膜蛋白重悬于 SDS 样品缓冲液(含有 10 mmol/L NEM)中, 通过非还原性 6% SDS/PAGE 进行分析, 并用 TAP1 抗体和 TAP2 抗体进行免疫印迹。

### 1.2.7 免疫共沉淀

取 1 mg 膜蛋白, 加入 1% 的 Digitonin 溶解 90 min, 20 000 r/min 离心 30 min, 取上清加入 20  $\mu$ L Protein A&G Agarose (已用 Western 及 IP 细胞裂解液洗涤 3 遍), 同时加入 2  $\mu$ g anti-TAP2 抗体, 4 °C、8 r/min 摇动孵育过夜。4 °C、20 000 r/min 离心 1 min, 弃上清, 用 Western 及 IP 细胞裂解液洗涤 Protein A&G Agarose 3 遍。加入 20  $\mu$ L 2 $\times$ SDS 样品缓冲液, 100 °C 水浴 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min。取上清,

并通过非还原性 6% SDS/PAGE 进行分析,并用 TAP1 抗体进行免疫印迹。

## 2 结果与分析

### 2.1 TAP 蛋白同源的 ABC 转运蛋白的结构分析

TAP 转运蛋白的晶体结构虽然还未被解析出来,但是一些与 TAP 同源性较高的三型 ABC 转运蛋白的晶体结构已经被解析,例如耐药功能相关的小鼠的 P-glycoprotein (PDB ID: 3G5U)<sup>[12]</sup>和细菌的 Sav1866 (PDB ID: 2HYD)<sup>[13-15]</sup>。对上述两种蛋白的构象进行了分析发现,当 ABC 转运蛋白 Sav1866 处于 TMD 向细胞外打开时,NBD 形成二聚体,NBD 二聚体界面的 D-loop 上两个丝氨酸,其距离为 2.6 Å (图 1A)。当 ABC 转运蛋白 P-glycoprotein 处于 TMD 向细胞质打开时,NBD 不互相结合形成二聚体,NBD 二聚体界面的 D-loop 上两个丝氨酸,其距离

为 27.9 Å (图 1B)。为了研究 TAP 是处于 NBD 分离还是 NBD 二聚化的构象,通过重新合成 TAP1 和 TAP2 基因,TAP 的半胱氨酸被替换成丝氨酸等其它氨基酸,仅留下 TAP2 的 213 位半胱氨酸以保持 TAP 的活性,并且 D-loop 上的丝氨酸被突变成半胱氨酸。合成后的 TAP 突变体被构建到 pFastBac Dual 载体上。三型 ABC 转运蛋白在转运过程中需要在向细胞外打开和向细胞内打开的两种构象交替变化。假设 D-loop 是 TAP 的 NBD 的二聚界面,则可以通过在 D-loop 引入的半胱氨酸是否能形成二硫键来检测其构象。

### 2.2 TAP 突变株的表达

采用编码 TAP1 和 TAP2 突变体的 pFastBac Dual 和编码 N 端融合 Flag 标签的 BNLF2a 的 pFastBac1 分别转染昆虫细胞系 sf9,从而包装编码

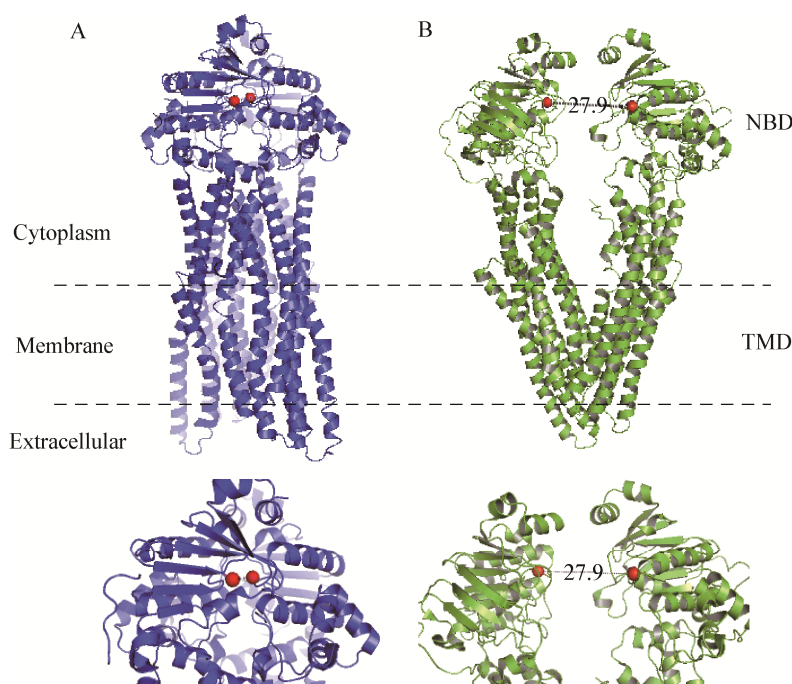


图 1 三型 ABC 转运蛋白 Sav1866 和 P-glycoprotein 的结构

Figure 1 The structure of Type III ABC transporter Sav1866 and P-glycoprotein

注: A: 同型二聚体 Sav1866 的前视图. 转运体结合核苷酸时处于 TMD 向细胞外(Extracellular)的状态, 2 个 NBD 结合在一起, 红色的点显示为在 NBD 二聚体界面的 D-loop 上两个丝氨酸, 其距离为 2.6 Å. B: 小鼠 P-glycoprotein 的前视图. 当处于 TMD 向细胞质(Cytoplasm)打开的状态, NBD 不互相结合, 红色的点显示为在 NBD 二聚体界面的 D-loop 上两个丝氨酸, 其距离为 27.9 Å.

Note: A: Front views of the homodimeric Sav1866 are shown. When the transporter binds nucleotide, TMD is in the outward facing state. The two NBDs are bound together. The red point is shown as two serines on the D-loop at the NBD dimer interface, with a distance of 2.6 Å. B: The structure of mouse P-glycoprotein is showed in an inward facing apostate. When TMD opens into the cytoplasm, NBD does not bind to each other, and the red dots show two serines on the D-loop at the NBD dimer interface, with a distance of 27.9 Å.

TAP1 和 TAP2 突变体和 BNLF2a 的杆状病毒,并进一步扩增病毒。为了验证 TAP 突变株是否能正常表达,使昆虫细胞系 *Sf9* 感染编码 TAP1 和 TAP2 或编码 TAP1 和 TAP2 突变体的杆状病毒。48 h 后,收集细胞,按 1.2.3 的方法提取含有 TAP 的膜,通过 10% SDS/PAGE (20  $\mu$ g 蛋白/道)聚丙烯酰胺凝胶电泳及免疫印迹分析,使用 TAP1 抗体和 TAP2 抗体和 Flag 抗体进行检测。如图 2 所示,表达和不表达 BNLF2a,突变株与野生株相比,TAP1 和 TAP2 均有表达,因此,此突变株满足本实验的需求,可用于后续转运活性和交联实验。

### 2.3 BNLF2a 抑制 TAP 突变株的多肽结合活性和转运活性

此前的研究表明 BNLF2a 可以抑制抗原多肽结合到 TAP 上从而抑制 TAP 的多肽转运功能。在本研究构建的 TAP 突变体中,BNLF2a 是否也有类似的机制,抑制 TAP 结合抗原多肽?为了研究这一问题,用 2.2 中表达或不表达 BNLF2a 的生物膜进行了多肽结合实验。结果如图 3A 所示,表达了

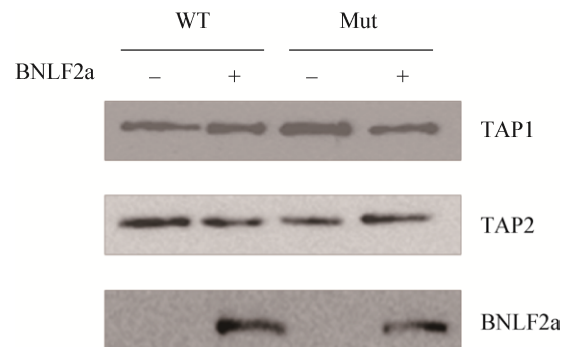


图 2 TAP 突变株的表达

#### Figure 2 The expression of TAP mutant

注:通过 10% SDS/PAGE (20  $\mu$ g 蛋白/道)聚丙烯酰胺凝胶电泳及免疫印迹分析检测了表达或不表达 BNLF2a 情况下,突变株与野生株中 TAP1 和 TAP2 的表达水平。TAP1 和 TAP2 检测所用抗体分别为 TAP1 和 TAP2 抗体,BNLF2a 检测采用 Flag 抗体。  
Note: The expression levels of TAP1 and TAP2 in mutant and wild strains were detected by 10% SDS/PAGE (20  $\mu$ g protein/channel) polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblot analysis in the presence or absence of BNLF2a expression. TAP1 and TAP2 antibodies were used for TAP1 and TAP2 detection respectively, and flag antibody was used for BNLF2a detection.

BNLF2a 之后,不管是野生型 TAP 还是突变型 TAP,多肽结合的能力都降到原来的 20%左右。那么,BNLF2a 能否通过抑制 TAP 的多肽结合活性进而抑制 TAP 的多肽转运活性呢?为了研究这一问题同

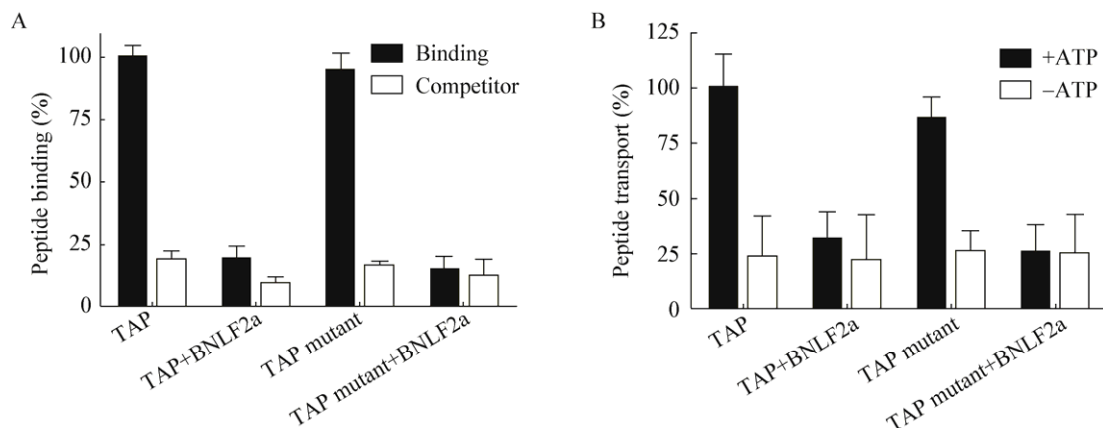


图 3 BNLF2a 抑制 TAP 突变株的多肽结合活性和转运活性

#### Figure 3 BNLF2a inhibits the polypeptide binding and transport activity of TAP mutant

注:A:通过肽结合检测实验检测了 BNLF2a 对 TAP 野生株和 TAP 突变株的抗原多肽结合活性的影响,其中,阴性对照采用 200 倍的未标记肽(RRYQKSTEL)竞争结合含 TAP 的膜抽提物;B:通过肽转运检测实验检测了存在或不存在 ATP 条件下,BNLF2a 对 TAP 野生株和 TAP 突变株的抗原多肽转运活性的影响。

Note: A: The effect of BNLF2a on the antigen peptide binding activity of TAP wild strains and TAP mutant strains was detected by peptide binding test, and for negative control, 200 times of unlabeled peptides (RRYQKSTEL) were used to compete with TAP-containing membrane extracts. B: The effect of BNLF2a on the antigen peptide transport activity of TAP wild strains and TAP mutant strains was detected by peptide transport test in the presence or absence of ATP.



样进行了多肽转运实验。实验结果如图 3B 所示,表达了 BNLF2a 之后,野生型及突变型 TAP 的多肽转运活性均降到原来的 20%–30%。因此, BNLF2a 能通过抑制 TAP 突变株的抗原多肽结合活性进而抑制其转运活性。

## 2.4 TAP 突变株 ATP 结合结构域的二聚化

在 ATP 结合的 NBD 二聚体中, 2 个 D-loop 在二聚体界面处相互接触, 距离很近, 这为 2 个突变后的 D-loop 实现半胱氨酸交联提供了基础。结果如图 4 所示, 突变株在 Cu/Phen 的作用下, 在约 180 kD 大小处可见能被 TAP1 抗体检测的交联产物。当用 100 mmol/L DTT 作用后, 二硫键被切开而回复为单体, 交联产物消失。为了证明该交联产物是 TAP1 和 TAP2 的异源二聚体, 而不是 TAP1 和其它蛋白发生的交联, 在交联后用 TAP2 的抗体进行了免疫共沉淀, 该交联产物可以被 TAP2 沉淀下来并且能被 TAP1 抗体识别。因此证明该产

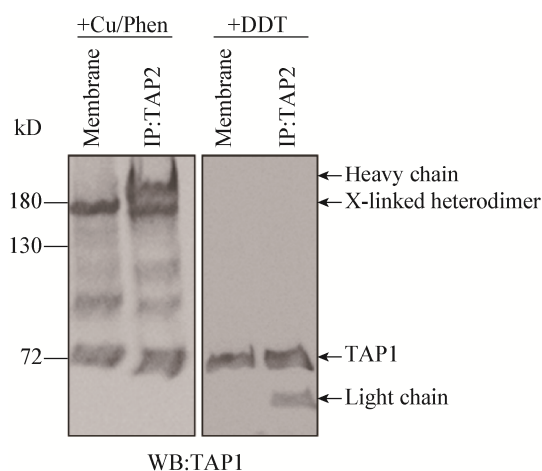


图 4 TAP 突变株 NBD 异源二聚体交联

### Figure 4 Cross-linking of NBDs of TAP heterodimer in TAP mutants

注: 氧化条件(Cu/Phen)及还原条件(DTT)下, TAP 突变株二硫键交联情况。免疫共沉淀所用抗体为 TAP2 抗体, 并用 TAP1 抗体检测 TAP1 的表达情况。Heavy chain: 抗体重链。Light chain: 抗体轻链。

Note: The disulfide cross-linking of TAP mutant under oxidation conditions (Cu/Phen) and reduction conditions (DTT). The TAP2 Antibody was used for immunoprecipitation and TAP1 expression was detected with TAP1 antibody. Heavy chain: antibody heavy chain. Light chain: antibody light chain.

物是 TAP 异源二聚体。综上所述, D-loop 确实在 TAP1 和 TAP2 的 NBD 的二聚体界面上, 突变株的半胱氨酸可以发生交联形成二硫键, 这一方法可以用来检测 TAP 是否处于向细胞内关闭 NBD 结构域保持二聚化的状态, 是研究病毒因子影响 TAP 构象变化的良好系统。

## 2.5 BNLF2a 促进 TAP 突变株二硫键交联

含有 TAP 的膜中加入  $\text{Cu}^{2+}$ , 于 0、1、4、16 min 后用 N-乙基顺丁烯二烯亚胺(NEM)终止反应。样品在非还原条件下在 SDS-PAGE 胶中分离, 转膜后分别用 TAP1 和 TAP2 的抗体检测, 结果如图 5A、C 所示。 $\text{Cu}^{2+}$  存在的氧化条件下, 图 5A 中显示了 TAP1、TAP2 单体及交联后的异源二聚体 TAP1 和 TAP2 的位置大小。为了研究 EB 病毒的蛋白 BNLF2a 是否影响 TAP 蛋白的构象变化, 在过表达 BNLF2a 的情况下, 对突变株 TAP 二硫键形成实验进行了检测, 如图 5B、C 所示。结果表明当过表达 BNLF2a 时 TAP 突变株形成二硫键的比例大幅提高。因此, BNLF2a 促进了 TAP 突变株二硫键的形成, 表明 BNLF2a 提高了 TAP 固定在 NBD 二聚化, 向细胞外打开的构象的比例。

## 2.6 BNLF2a 1–39 抑制 TAP 突变株的活性

BNLF2a 分为 N 端 1–40 氨基酸的细胞质区和 41–60 氨基酸的跨膜区, 是细胞质区还是跨膜区发挥了抑制 TAP 活性的功能目前还不太清楚。为了研究这一问题本研究合成了 BNLF2a 的 N 端 1–39 氨基酸(BNLF2a 1–39)。接着再次检测了 TAP 野生株和 TAP 突变株的多肽转运活性, 将 200  $\mu\text{mol/L}$  的 BNLF2a 1–39 加入含有 TAP 的生物膜中, 孵育 30 min 后检测多肽转运能力, 结果如图 6A 所示。200  $\mu\text{mol/L}$  的 BNLF2a 1–39 处理可以抑制野生型和突变型 TAP 的多肽转运活性。同样对突变株 TAP 二硫键形成实验进行了检测, 如图 6B 所示, 经 200  $\mu\text{mol/L}$  的 BNLF2a 1–39 处理后, TAP 突变株形成二硫键的比例明显提高。因此, BNLF2a 1–39 促进了 TAP 突变株的 NBDs 二聚化, 抑制了其多肽转运活性。

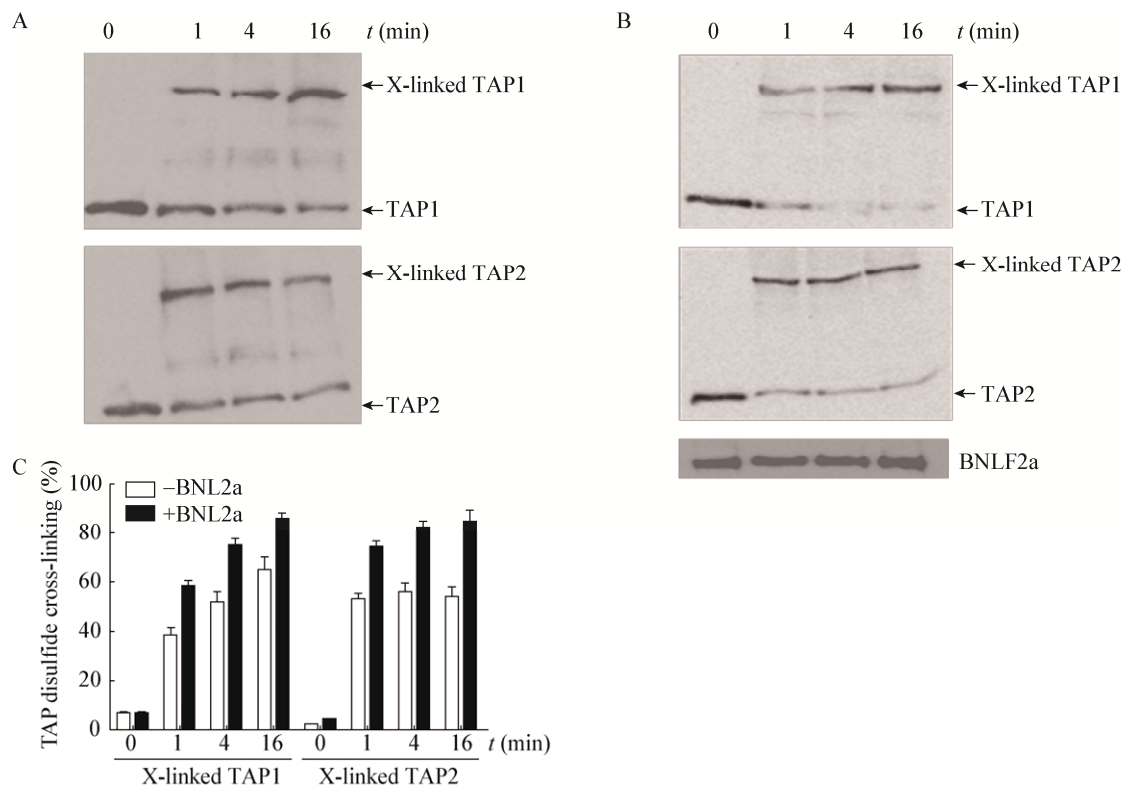


图 5 BNLF2a 影响半胱氨酸突变的 TAP1 和 TAP2 的交联效率

Figure 5 BNLF2a affects the crosslinking efficiency cysteine mutant TAP1/TAP2

注: A: 氧化条件下, 0、1、4、16 min 后 TAP 突变株二硫键交联情况。图中所示 TAP1、TAP2 单体及交联后的异源二聚体 X-linked TAP1、X-linked TAP1。B: 氧化条件下, 过表达 BNLF2a 后, 0、1、4、16 min 后 TAP 突变株二硫键交联情况。C: 图 A 和图 B 中 TAP 二硫键交联的相对比例的定量结果。

Note: A: The disulfide cross-linking of TAP mutant at 0, 1, 4 and 16 min under oxidation conditions. The monomers of TAP1 and TAP2 and the heterodimers of X-linked TAP1 and X-linked TAP1 are shown in the figure. B: The disulfide cross-linking of TAP mutant at 0, 1, 4 and 16 min under oxidation conditions after the overexpression of BNLF2a. C: Quantitative results of the relative proportion of TAP disulfide cross-linking in figure A and figure B.

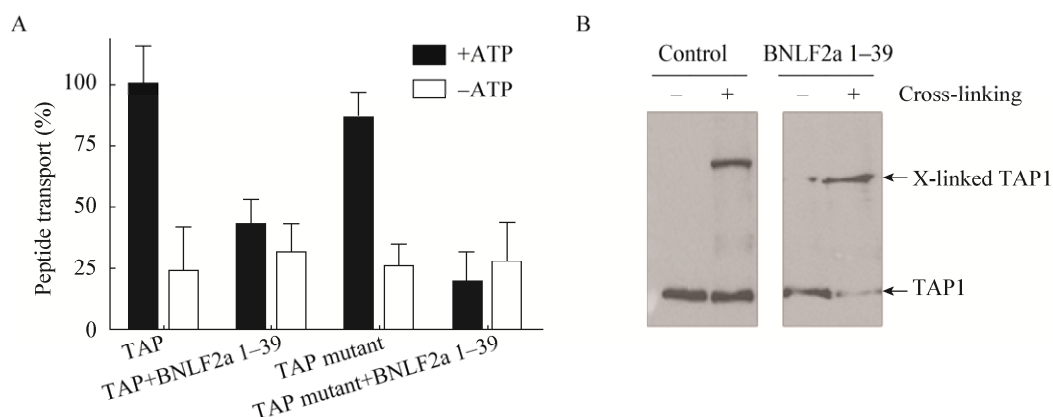


图 6 BNLF2a 1-39 抑制 TAP 突变株的活性

Figure 6 BNLF2a 1-39 inhibits the activity of TAP mutant

注: A: 200  $\mu$ mol/L BNLF2a 1-39 对 TAP 野生株和 TAP 突变株的抗原多肽转运活性的影响; B: 200  $\mu$ mol/L BNLF2a 1-39 和对照多肽对 TAP 突变株二硫键交联情况的影响。

Note: A: The effect of 200  $\mu$ mol/L BNLF2a 1-39 on the antigen peptide transport activity of TAP wild strains and TAP mutant strains was detected by peptide transport test. B: The effect of 200  $\mu$ mol/L BNLF2a 1-39 and control polypeptides on disulfide cross-linking of TAP mutant.

### 3 讨论与结论

Epstein-Barr 病毒属于疱疹病毒科,与其它疱疹病毒类似,它可以造成潜伏感染,一旦感染常常终生潜伏在人体内。在机体内,细胞内的病原体主要靠细胞免疫清除,因此细胞免疫在 EBV 感染中起着关键性作用<sup>[16]</sup>。EB 病毒感染的细胞如何逃过 CTL 的杀伤是一个重要的科学问题。其中的机制之一是由于 EB 病毒编码的蛋白 BNLF2a<sup>[2]</sup>可以抑制 ATP 和抗原多肽结合到 TAP 上,这样 TAP 就失去转运抗原的能力,EB 病毒的抗原就不能通过 MHC class I 被递呈到细胞表面,被感染的细胞就不被 CTL 杀伤。

目前 BNLF2a 抑制 TAP 的分子机制尚未完全清楚,例如 BNLF2a 如何同时抑制 ATP 和抗原多肽结合到 TAP。基于 ABC 转运蛋白的晶体结构和生物化学的实验结果,目前 TAP 转运多肽的机制模型是:初始状态下 TAP 蛋白位于一个面向细胞内打开的构象中,NBDs 不形成二聚体。TAP 装载 ATP 并结合抗原多肽后,TAP 的 NBDs 会二聚化,这会诱导 TMDs 的构象变化,变成向细胞外(内质网腔)打开的构象,从而将抗原多肽从胞质侧转移到 ER 腔内。当 ATP 水解后,NBDs 不再二聚化并触发 TMDs 向细胞内打开的构象运动<sup>[7]</sup>。

假设 BNLF2a 结合 TAP 后使其停留在 NBDs 二聚化 TMD 向内质网腔打开的构象,当 TAP 在这一构象时 ATP 和抗原多肽都无法结合到 TAP 上。这一假说可以解释为何 BNLF2a 同时抑制 ATP 和抗原多肽结合到 TAP 上。为了验证这一假说,需要检测 BNLF2a 是否影响 NBDs 的二聚化。基于 TAP 同源性较高的三型 ABC 转运蛋白的晶体结构 P-glycoprotein 和 Sav1866,猜测 D-loop 可能是 NBDs 二聚化的界面。因此本研究在 D-loop 上引入了半胱氨酸,通过二硫键形成的交联实验证实了 D-loop 确实在 NBDs 二聚化的界面,二硫键的形成一般需要 2 个半胱氨酸的硫原子距离在 2–3 Å 的范围内。这一改造的 TAP 转运蛋白可以用来研究 BNLF2a

的抑制机制。本研究结果表明 BNLF2a 对改造的 TAP 具有类似野生型 TAP 的抑制效果,说明改造后的 TAP 突变体与野生型一样可以被抑制。实验结果表明表达 BNLF2a 的情况下,TAP 二聚化的比例大大提高了,这一结果支持了 BNLF2a 结合 TAP 后促进 NBDs 二聚化的状态这一猜想。相比于哺乳动物细胞,sf9 细胞和杆状病毒是可以表达更高水平的 TAP 和 BNLF2a 等膜蛋白,更适于生化研究,但是与人体内感染的情形有一定差距,特别是 BNLF2a 的表达修饰状况在两种细胞中是否一致有待进一步研究。我们还研究了 BNLF2a 的细胞质区还是跨膜区发挥了促进 NBDs 二聚化的功能。实验结果清楚表明 BNLF2a 的细胞质区的多肽足以促进同样位于细胞质的 NBDs 的二聚化。此前有研究表明 BNLF2a 是一个 TA 蛋白(Tail anchor)<sup>[2-3]</sup>。我们认为 BNLF2a 的 C 端疏水跨膜域帮助其作为 TA 蛋白,以翻译后的插入的形式定位在内质网膜上。BNLF2a N 端的亲水多肽暴露在细胞质,与 TAP 细胞质部位结合,抑制其构象变化。这一研究为 ABC 转运蛋白的转运机制研究提供了方法借鉴,也为 EB 病毒抑制抗原提呈的具体分子机制提供了进一步的阐释。

### REFERENCES

- [1] Ascherio A, Munger KL. Epstein-barr virus infection and multiple sclerosis: a review[J]. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 2010, 5(3): 271-277
- [2] Horst D, Favalaro V, Vilardi F, et al. EBV protein BNLF2a exploits host tail-anchored protein integration machinery to inhibit TAP[J]. *The Journal of Immunology*, 2011, 186(6): 3594-3605
- [3] Wycisk AI, Lin JC, Loch S, et al. Epstein-barr viral BNLF2a protein hijacks the tail-anchored protein insertion machinery to block antigen processing by the transport complex TAP[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(48): 41402-41412
- [4] Ortmann B, Copeman J, Lehner PJ, et al. A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes[J]. *Science*, 1997, 277(5330): 1306-1309
- [5] Groothuis T, Neefjes J. The ins and outs of intracellular peptides and antigen presentation by MHC class I molecules[A]/Wiertz E, Kikkert M. *Dislocation and Degradation of Proteins from the Endoplasmic Reticulum*[M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2005, 300: 127-148
- [6] El Hage F, Durgeau A, Mami-Chouaib F. TAP expression level in tumor cells defines the nature and processing of MHC class I peptides for recognition by tumor-specific cytotoxic T lymphocytes[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2013, 1283(1): 75-80



- [7] Hollenstein K, Dawson RJP, Locher KP. Structure and mechanism of ABC transporter proteins[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2007, 17(4): 412-418
- [8] Davidson AL, Dassa E, Orelle C, et al. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2008, 72(2): 317-364
- [9] Smith PC, Karpowich N, Millen L, et al. ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer[J]. *Molecular Cell*, 2002, 10(1): 139-149
- [10] Chen J, Lu G, Lin J, et al. A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle[J]. *Molecular Cell*, 2003, 12(3): 651-661
- [11] Hollenstein K, Frei DC, Locher KP. Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein[J]. *Nature*, 2007, 446(7132): 213-216
- [12] Aller SG, Yu J, Ward A, et al. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding[J]. *Science*, 2009, 323(5922): 1718-1722
- [13] O'Mara ML, Tieleman DP. P-glycoprotein models of the apo and ATP-bound states based on homology with Sav1866 and MalK[J]. *FEBS Letters*, 2007, 581(22): 4217-4222
- [14] Oliveira AS, Baptista AM, Soares CM. Conformational changes induced by ATP-hydrolysis in an ABC transporter: a molecular dynamics study of the Sav1866 exporter[J]. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, 2011, 79(6): 1977-1990
- [15] Dawson RJ, Locher KP. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter[J]. *Nature*, 2006, 443(7108): 180-185
- [16] Hislop AD, Taylor GS, Sauce D, et al. Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus[J]. *Annual Review of Immunology*, 2007, 25: 587-617

~~~~~  
(上接 p.1389)

### 征 稿 简 则

3.5 参考文献: 参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- [1] Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. *Electrophoresis*, 1991, 12(5): 376-377
- [2] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)  
王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(1): 6-17
- [3] Shen T, Wang JY. *Biochemistry*[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)  
沈同, 王镜岩. *生物化学*[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)  
刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

(下转 p.1484)