



TCR-CD3 复合物跨膜区自组装的分子机制*

王凤丽 陈佳林 何程智** 罗施中**

(北京化工大学生命科学与技术学院, 北京软物质科学与工程高精尖创新中心, 北京 100029)

摘要 **目的** T细胞受体-共受体复合物 (TCR-CD3) 在适应性免疫应答中起着重要作用, 其亚基间的相互作用一直是研究热点。由于传统实验的局限性, 对于跨膜蛋白 TCR-CD3 复合物的研究不能深入到微观层面。**方法** 利用分子动力学模拟方法 (包括粗粒化模拟、拉伸动力学、全原子模拟) 分析 TCR-CD3 复合物的自组装机制。**结果** 通过粗粒化模拟 (CGMD) 发现, TCR-CD3 复合物在组装过程中存在着 $\alpha\beta$ 依次结合 $\delta\epsilon'$ 、 $\gamma\epsilon$ 、 $\zeta\zeta'$ 的组装顺序, 并阐述了 α^{R253} 突变会降低 α^{K258} 与 $\delta\epsilon'$ 的相互作用。**结论** 本文论证了仅存在 TCR-CD3 复合物的跨膜区不足以介导 TCR-CD3 复合物亚基间的特异性相互作用。拉伸动力学 (SMD) 和全原子模拟 (AAMD) 的结果说明, $\zeta\zeta'$ 与 TCR-CD3 其余部分之间的胞外区相互作用强于跨膜区, 同时 $\zeta\zeta'$ 的缺失对 $\alpha\beta\delta\epsilon'\gamma\epsilon$ 的稳定性影响最小, 而 $\delta\epsilon'$ 的缺失对 $\alpha\beta\gamma\epsilon\zeta\zeta'$ 的稳定性影响最大。

关键词 TCR-CD3复合物, 粗粒化模拟, 全原子模拟, 拉伸动力学模拟, 跨膜蛋白**中图分类号** Q6, R9**DOI:** 10.16476/j.pibb.2021.0134

T细胞作为适应性免疫系统中很关键的一部分, 在病毒感染、癌症以及自身的免疫中有着举足轻重的地位^[1]。T细胞介导免疫反应主要由T细胞受体 (TCR) 首先辨识结合抗原肽的抗原呈递细胞 (APC) 形成 MHC 复合物 (pMHC), 接着 TCR 经过与之非共价结合的 CD3 共受体将抗原信号传递到 CD3 ζ 亚基的胞内免疫受体酪氨酸激活基序 (ITAM), 之后通过启动下游的 T 细胞内级联免疫信号通路等生理过程来杀死病原感染细胞或者肿瘤细胞^[2]。TCR-CD3 复合物主要包括由二硫键共价连接的 TCR $\alpha\beta$ 联合, 包括 γ 、 δ 、 ϵ 和 ζ 亚基非共价结合的 3 个 CD3 信号传导二聚体^[3-4]。TCR-CD3 复合物各亚基在配体的辨识、信号传导等过程中都有着不可替代的重要作用。由于 TCR α 、TCR β 并没有胞内信号传递区域序列, 因此普遍认为 TCR $\alpha\beta$ 主要通过 CD3 的胞外区、跨膜区的相互作用, 将信号传递给 CD3 的胞内区完成下游生理过程^[5-6]。

Call 等^[7] 发现每一个 CD3 二聚体与 TCR 的组装都需要一个碱性残基和两个酸性残基的作用界面。最近有研究再一次证实了 TCR-CD3 复合物由二硫键相连的 $\alpha\beta$ 异二聚体与 $\gamma\epsilon$ 、 $\delta\epsilon'$ 和 $\zeta\zeta'$ 三个非共价连接的 CD3 信号传递共受体以 $\alpha\beta : \delta\epsilon' : \gamma\epsilon : \zeta\zeta' =$

1 : 1 : 1 : 1 的占比组成^[8] (附件图 S1)。然而在该结构解析之前, 针对 TCR-CD3 复合物的研究多是以其胞外区为主, 而且是单独的二聚体、三聚体的研究, 甚至脱离了细胞膜环境^[2, 9-12]。

大多数为研究蛋白质-蛋白质相互作用而设计的技术都是针对可溶性蛋白质开发的, 对膜蛋白中疏水的跨膜部分结构和功能研究仍缺乏有效的方法。由于计算机科学的飞速发展, 分子动力学模拟逐渐成为研究膜蛋白结构和组装的一种重要手段。在 2008 年就有研究团队通过粗粒化模拟 (CGMD) 的方法模拟了最具代表性的跨膜蛋白二聚体 GPA, 其野生型模拟结果与核磁共振 (NMR) 结构一致^[13]。除此以外, 分子动力学模拟在糖蛋白 Ib β ^[14]、PSGL-1^[15]、DAP12-NKG2C^[16] 等跨膜蛋白的研究上已经取得重要的进展。

目前针对 TCR-CD3 复合物亚基间相互作用的研究多是单独胞外区^[12]的研究, 且只涉及到二

* 国家自然科学基金 (22077010, 11902023) 和天津大学精密测试技术及仪器国家重点实验室开放课题 (pilab1902) 资助项目。

** 通讯联系人。

何程智 Tel: 13370154991, E-mail: czhe@mail.buct.edu.cn

罗施中 Tel: 13683546821, E-mail: luosz@mail.buct.edu.cn

收稿日期: 2021-05-11, 接受日期: 2021-09-28

聚^[10]、三聚^[9, 11]等, 并不全面。同时由于实验条件的限制, 多数研究都脱离了细胞膜环境, 然而已知细胞膜环境对于膜蛋白的信号传递这类生理活动是至关重要的^[17]。尽管解析出了TCR-CD3八聚体复合物较为完整的晶体结构^[8], 但对于其自组装机制尚未完全清楚。从研究的目的来看, 目前的传统实验是很难在原子级别上对生物大分子的行为进行纳秒微秒尺度的实时观测和分析, 而分子动力学模拟恰好可以弥补传统实验研究的这一缺点。传统实验和新兴理论模拟技术能够做到相辅相成、互相佐证, 从而可以多方面、多角度、深层次地研究生物体内生物大分子结构与功能的性质。由于模拟体系的限制, 难以通过模拟来达到分析TCR-CD3复合物全长的组装, 且跨膜蛋白的跨膜区受到难分离等特点的限制, 导致难以通过传统实验技术分析, 使得相应的研究较少。因此本文主要利用CGMD对TCR-CD3跨膜区进行自组装的模拟, 随后通过拉伸动力学模拟(SMD)来分析全长序列亚基间跨膜区、胞外区的结合特点, 最后通过分别去除 $\delta\epsilon'$ 、 $\gamma\epsilon$ 、 $\zeta\zeta'$ 二聚体的跨膜区六聚体的全原子模拟(AAMD), 分析各二聚体对其余六聚体的影响。结合以上模拟和分析, 探讨TCR-CD3复合物的自组装机制。

1 模拟方法

传统的实验技术手段耗时、成本高, 且多数得到宏观、静态的结果, 难以分析原子级别的细节。相比之下, 分子动力学模拟可以研究分析生物体内动态、原子级别的生物过程, 这也是与实验手段相比最具有优势的一点。

1.1 粗粒化模拟(CGMD)

在本研究中所有模拟均是在GROMACS-2018.3^[18]平台进行, CGMD力场选用Martini22力场^[19]。CD3二聚体的特异性不是由其跨膜区介导而是由胞外区介导^[20], 因此在模拟过程中, 将每一个二聚单体间主链原子约束在其原先距离1 nm范围内, 这样就维持了由于胞外区影响的跨膜区二聚整体构象, 但又不是将其像位置限制一样将其固定^[21]。

在蛋白质结构数据库PDB中下载TCR-CD3复合物的结构文件(PDB ID 6JXR), 之后在Pymol下仅保存附件表S1中跨膜区部分。以 $\alpha\beta$ 与 $\delta\epsilon'$ 的组装为例, 为了研究各二聚体相互之间的作用, 先将 $\alpha\beta$ 与 $\delta\epsilon'$ 放置在距离5 nm的位置, 添加DPPC双分

子层膜之后进行溶剂化, 并加入抗衡离子 Na^+ 、 Cl^- 使体系保持电中性。通过最陡下降法能量最小化保证体系的原子之间距离不会过近, 结构正常, 之后进行限制平衡使脂质更好地堆积在蛋白质附近。非键合Lennard-Jones^[22]相互作用截断值为1.2 nm, 使用粒子网格Ewald(PME)方案处理静电。V-rescale(323.15 K)和parrinello-rahman(1.0 bar、 $4.5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$)用于耦合, 压力和温度耦合的时间常数分别为5 ps和1 ps, 所有模拟均在时间步长为2 fs的周期性边界条件进行。足够的平衡以后, 进行最终3 μs 的模拟。

1.2 拉伸动力学模拟(SMD)

SMD最初是由Schulten小组提出的, 建模者从单分子力谱学中获得了这个灵感^[22]。与普通MD不同的是, 在对蛋白质大分子体系进行SMD模拟时, 会人为地对蛋白质分子中的某个或某几个原子施加一个假想的外力, 或者对其位置进行固定^[23-24]。通过CHARMM-GUI^[25-26](<http://www.charmm-gui.org/>)网站建立SMD的体系, 选用CHARMM36全原子力场^[27], 模拟PDB ID 6JXR中所包含的全部序列, 即: 胞外区、跨膜区及部分胞内区。同样选用DPPC双分子层膜、TIP3水模型、添加抗衡离子。由于在GROMACS中受周期性边界的影响, 要对蛋白质进行拉伸, 盒子大小必须大于拉伸距离的两倍。经过多次尝试, 拉伸距离在小于15 nm左右就能将其完全拉开, 因此设置体系大小为30 nm $\times$ 15 nm $\times$ 17 nm。同时还需注意的是, 蛋白质一开始放置的位置应该保证 $\alpha\beta$ 跨膜区的质心到被拉伸的二聚体跨膜区质心的矢量方向在x正方向。在完成能量最小化和平衡操作之后(与CGMD相似), 需要对TCR $\alpha\beta$ 进行固定, 之后分别拉伸 $\delta\epsilon'$ 、 $\gamma\epsilon$ 、 $\zeta\zeta'$ 跨膜区的质心, 使其沿着x正方向以1 m/s的速度恒速拉伸15 nm。

1.3 全原子模拟(AAMD)

AAMD虽然计算量巨大, 但是能够精细模拟体系间相互作用。所有的AAMD均采用CHARMM36力场^[27], 全原子的体系建立同样通过CHARMM-GUI网站来完成。根据CGMD中TCR-CD3复合物跨膜区序列, 保留分别去掉 $\delta\epsilon'$ 、 $\gamma\epsilon$ 、 $\zeta\zeta'$ 二聚的六聚体, 调整好正确的取向, 将其提交到CHARMM-GUI网站, 设置x、y方向长度为12 nm, z方向根据体系大小自动适配, 大约在9 nm。膜仍旧采用DPPC双层膜, 溶剂采用经典的TIP3三点水模型, 抗衡离子为 Na^+ 、 Cl^- 。全部步骤

完成后下载整个输入输出文件，之后于GROMACS平台做能量最小化、平衡，该步骤与CGMD相似，之后设置最终产品模拟时长为200 ns。

2 结果与讨论

2.1 CGMD模拟TCR-CD3复合物跨膜区的自组装

通过CGMD模拟TCR-CD3复合物跨膜区的自组装，首先将 $\alpha\beta$ 与 $\delta\epsilon'$ 放置在相距5 nm的位置，经过3 μs 的模拟， $\alpha\beta$ 与 $\delta\epsilon'$ 形成四聚体（图1a）。 $\alpha\beta$ 与 $\delta\epsilon'$ 形成的四聚体，主要表现为两种类型：a. α 出现在 $\alpha\beta$ 与 $\delta\epsilon'$ 作用的界面上（图1b右）；b. β 出现在

$\alpha\beta$ 与 $\delta\epsilon'$ 作用界面上（图1b左），且在模拟的14个样本中，出现的比例为1:1（附件图S2）。已知， $\delta\epsilon'$ 的两个酸性残基（天冬氨酸）应该是与 α 的碱性残基（赖氨酸）相互作用的^[7-8]，因此本文对两种结合模式进行了相互作用能的比较。 α 在作用界面上的模式相互作用力值更低，表示该种结合模式更具优势（图1c）。这一模拟也说明了TCR-CD3复合物亚基间的特异性作用不是仅由跨膜区介导的，在胞外区可能存在更强的特异性作用，使 $\delta\epsilon'$ 与 α 作用而非 β 。随后分析了 $\alpha\beta\delta\epsilon'$ 四聚体的构象（图1d），与晶体结构（PDB ID 6JXR）中一致。 α^{K258} 与 $\delta^{D111}\epsilon'^{D137}$ 通过侧链接触稳定了 $\alpha\beta\delta\epsilon'$ 四聚体，同时还存在 $\alpha^{I^{250}}XXXI^{254}$ 、 $\epsilon'^{V^{130}}XXXV^{134}$ 形成V、I的相互作用

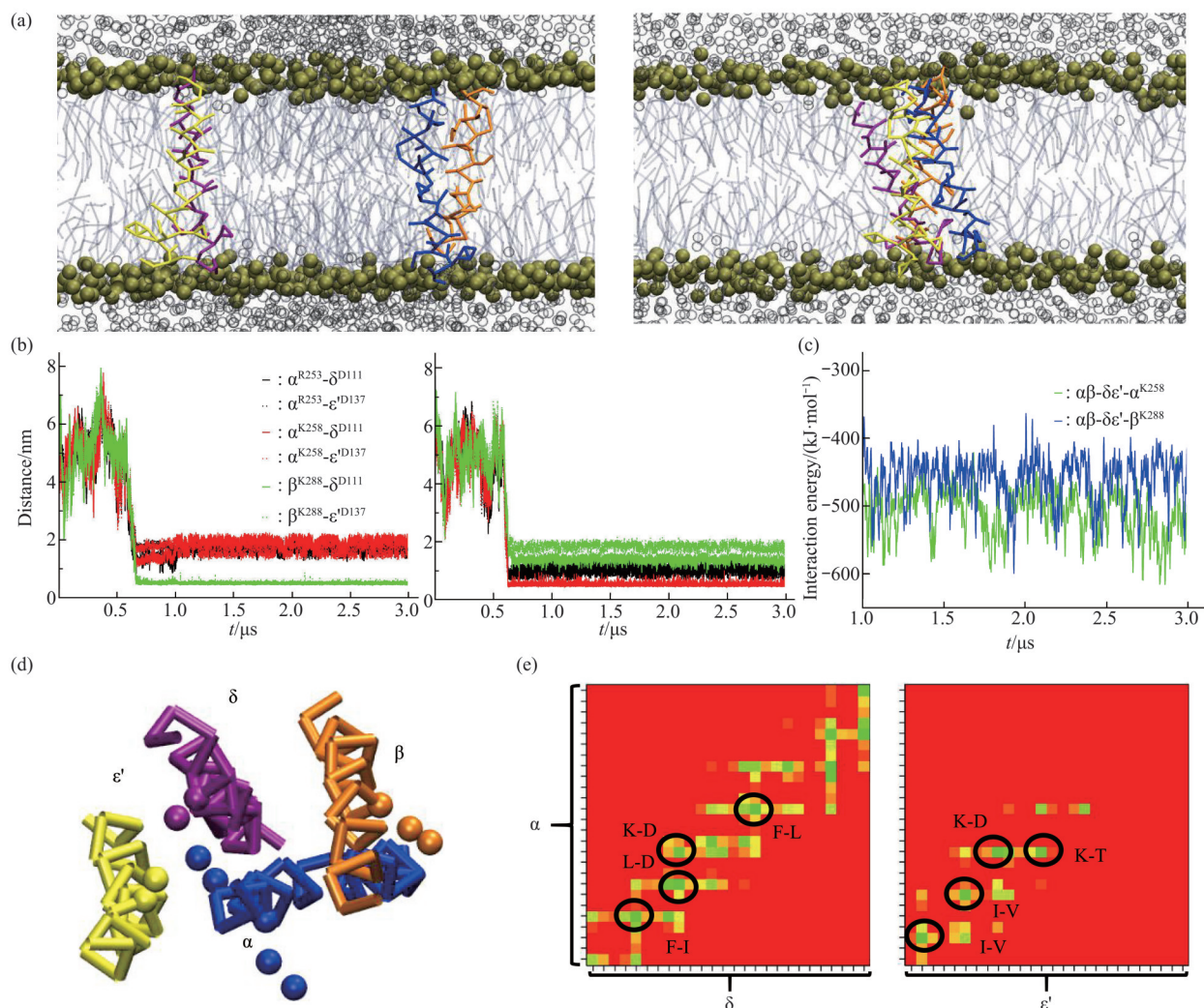


Fig. 1 Coarse-grained simulation of the assembly of $\alpha\beta$ and $\delta\epsilon'$

(a) Schematic diagram of the system under VMD: the gray ball represents the DPPC phospholipid head, the off-white stick shape represents the phospholipid tail, the off-white small balls at both ends of the phospholipid are water molecules, α is represented by a blue spiral, β is represented by an orange spiral, and a purple spiral is represented δ , the yellow spiral represents ϵ' . (b) The distance between key residues. On the left is a schematic diagram of β at the binding interface; on the right is a schematic diagram of α at the binding interface. (c) The interaction energy of the two tetramer conformations. (d) $\alpha\beta\delta\epsilon'$ Tetramer conformation. (e) Enter-spiral contact matrix calculated using a cutoff value of 1 nm.

用, α^{F252} 、 $L255$ 、 $F262$ 、 δ^{I107} 、 $L118$ 、 ϵ^{T141} 等残基参与进一步稳定构象的作用 (图 1e)。

对 $\alpha\beta$ 与 $\delta\epsilon'$ 的组装做关键残基的突变模拟发现 (图 2), 对 α^{K258} 、 β^{K288} 做单突变, 并不影响 $\alpha\beta$ 与 $\delta\epsilon'$ 的结合; 突变 α^{K258} , $\alpha\beta\delta\epsilon'$ 就表现为 β^{K288} 与 $\delta^{D111}\epsilon^{D137}$ 作用; 突变 β^{K288} , 表现为 α^{K258} 与 $\delta^{D111}\epsilon^{D137}$ 作用, 这也再次说明仅靠跨膜区不足以介导 TCR-CD3 复合

物亚基间的特异性相互作用。当 α^{K258} 、 β^{K288} 均突变后, 破坏了 $\alpha\beta$ 与 $\delta\epsilon'$ 的相互作用。而同为碱性残基的 α^{R253} 并不参与亚基间的相互作用, 但是从 $\alpha^{R253L}\beta^{K288L}$ 的双突变模拟来看, α^{R253} 的突变却不利于 α^{K258} 与 $\delta^{D111}\epsilon^{D137}$ 的作用, 这也是在之前的研究中鲜少提到的关于 α 两个碱性残基间关系的研究。

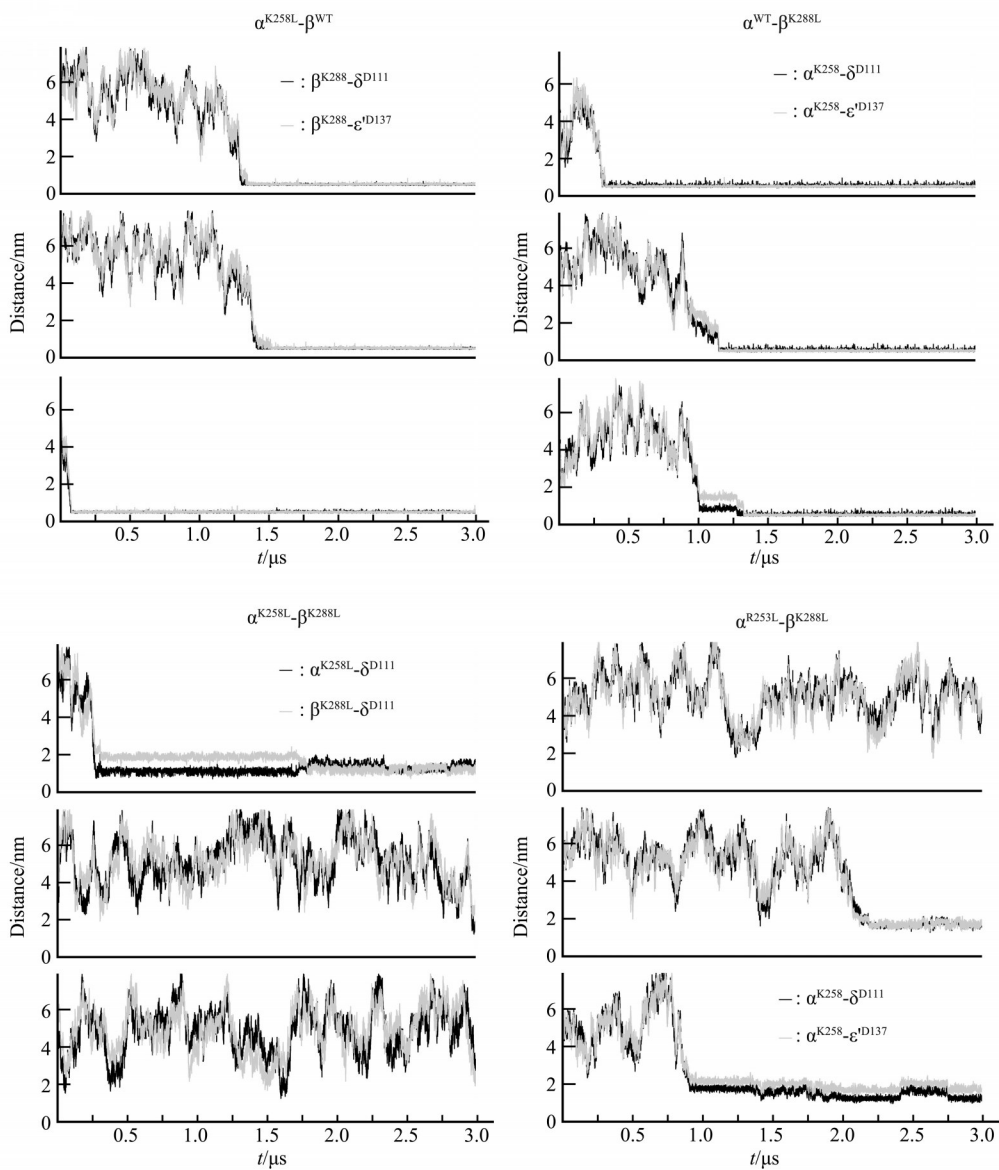


Fig. 2 Mutations in key residues of $\alpha\beta$ in the assembly of $\alpha\beta\delta\epsilon'$
Three parallel samples are shown for each mutation experiment.

之后按照同样的方法进行了 $\alpha\beta$ 与 $\gamma\epsilon$ 、 $\alpha\beta\delta\epsilon'$ 与 $\gamma\epsilon$ 的组装 (图 3a), $\gamma\epsilon$ 放在组装的第一步不利于其与 β 的作用。而在 $\delta\epsilon'$ 存在的前提下, $\gamma^{E122}\epsilon^{D137}$ 与 β^{K288} 作用更有效 (图 3a, c), 所形成的六聚体构象与解析的晶体结构一致 (图 3b)。同时, β^{I280} 、 $L281$ 、 $I284$ 、 $Y292$ 、

γ^{F118} 、 $S125$ 、 $L129$ 、 ϵ^{V130} 、 $V134$ 、 $T141$ 参与进一步稳定 β 与 $\gamma\epsilon$ 的相互作用 (图 3c)。

组装为 $\alpha\beta\delta\epsilon'\gamma\epsilon$ 六聚体以后, 将 $\zeta\zeta'$ 与之前组装好的 $\alpha\beta\delta\epsilon'\gamma\epsilon$ 六聚体进行了八聚体的模拟, $\zeta\zeta'^{DD36}$ 并不能组装到 α^{R253} , 其出现的位置在六聚体附近, 没

有规律，甚至是不能与六聚体形成八聚体（附件图S3）。之后将 $\zeta\zeta'$ 分别放在组装的第一步、第二步进

行了 $\alpha\beta$ 与 $\zeta\zeta'$ 、 $\alpha\beta\delta\epsilon'$ 与 $\zeta\zeta'$ 的组装， $\zeta\zeta'^{\text{DD36}}$ 均不能像晶体结构中那样结合到 α^{R253} （图4）。

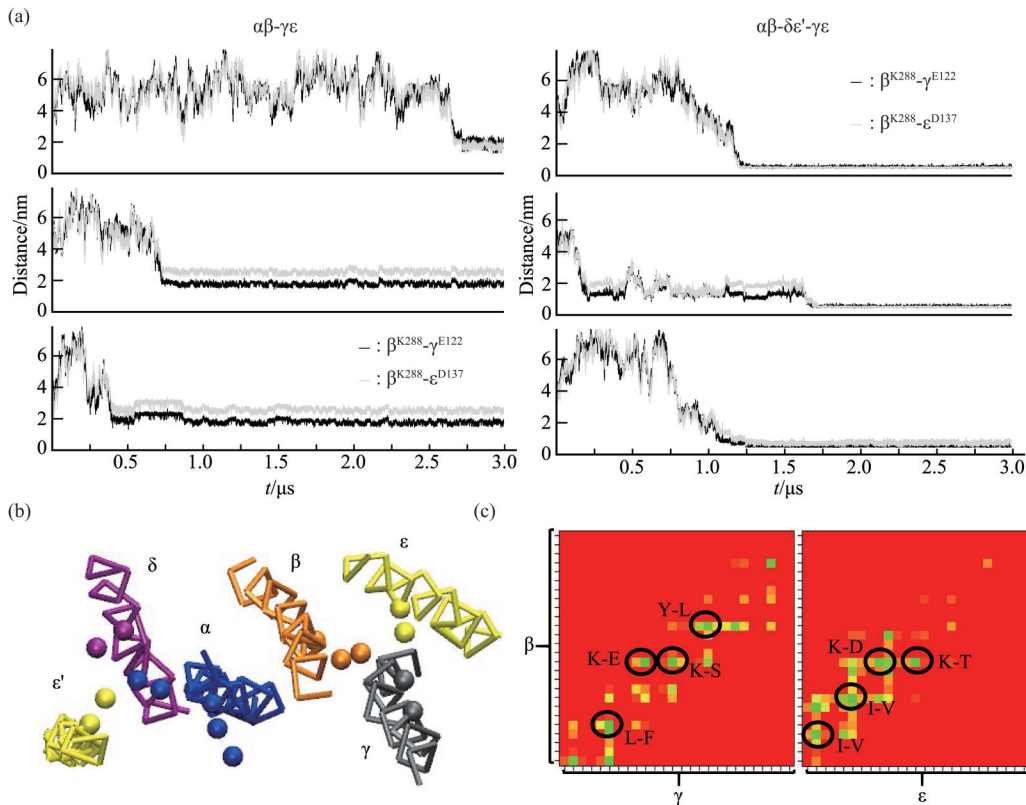


Fig. 3 The assembly of $\alpha\beta\gamma\epsilon$ and $\alpha\beta\delta\epsilon'\gamma\epsilon$

(a) The distance between key residues. Three parallel samples are shown for each experiment. (b) The conformation of $\alpha\beta\delta\epsilon'\gamma\epsilon$ hexamer; (c) Contact analysis of residues with a cutoff value of 1 nm.

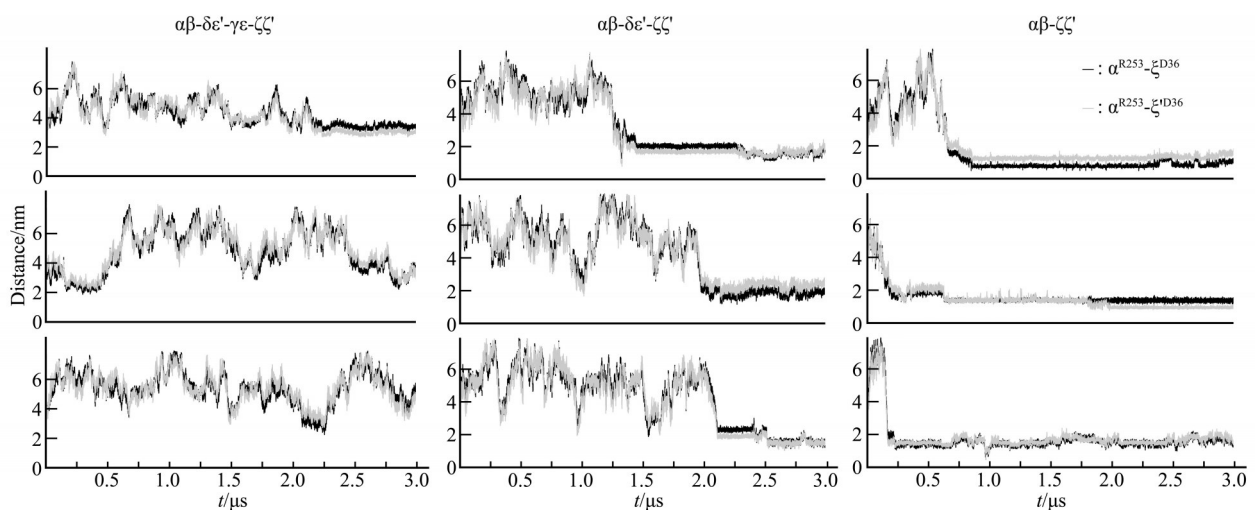


Fig. 4 The distance between key residues during $\zeta\zeta'$ assembly

Three parallel samples are shown for each experiment.

至此，将仅含跨膜区的TCR-CD3复合物组装到 $\alpha\beta\delta\epsilon'\gamma\epsilon$ 六聚体，加上关键残基的突变，得到

TCR-CD3复合物亚基间的特异性作用并非仅由跨膜区来介导，而是在其胞外区可能存在更强的特异

性相互作用;同时还发现 α^{R253} 的突变降低了 α^{K258} 与 $\delta^{D111}\epsilon^{D137}$ 的作用;然而在跨膜区CGMD中, $\zeta\zeta'$ 没能和六聚体组装成八聚体。反观TCR-CD3复合物八个亚基间的异同,不同于其他六聚体的是, $\zeta\zeta'$ 的胞外区较短。可能对于 ζ 来说,其胞外区对于其与其他二聚体的组装来说非常重要。在其他文献中也有各亚基间胞外区的大量相互作用的描述^[8, 12]。基于此,接下来将对各亚基间胞外区、跨膜区相互作用的差异进行研究。

2.2 SMD研究TCR-CD3复合物胞外区、跨膜区的结合作用力

利用SMD模拟TCR-CD3复合物全长序列(PDB ID 6JXR)各亚基间的结合特点,固定复合物中心的 $\alpha\beta$,分别拉开 $\delta\epsilon'$ 、 $\gamma\epsilon$ 、 $\zeta\zeta'$ 到完全脱离六聚体,通过比较拉开各二聚体跨膜区、胞外区的力的大小,从而分析其结合特点。

如图5所示,对于 $\zeta\zeta'$ -SMD而言,在1 000 ps时对应的力为拉开其跨膜区的力($\zeta\zeta'$ - $F_{tm}\approx$

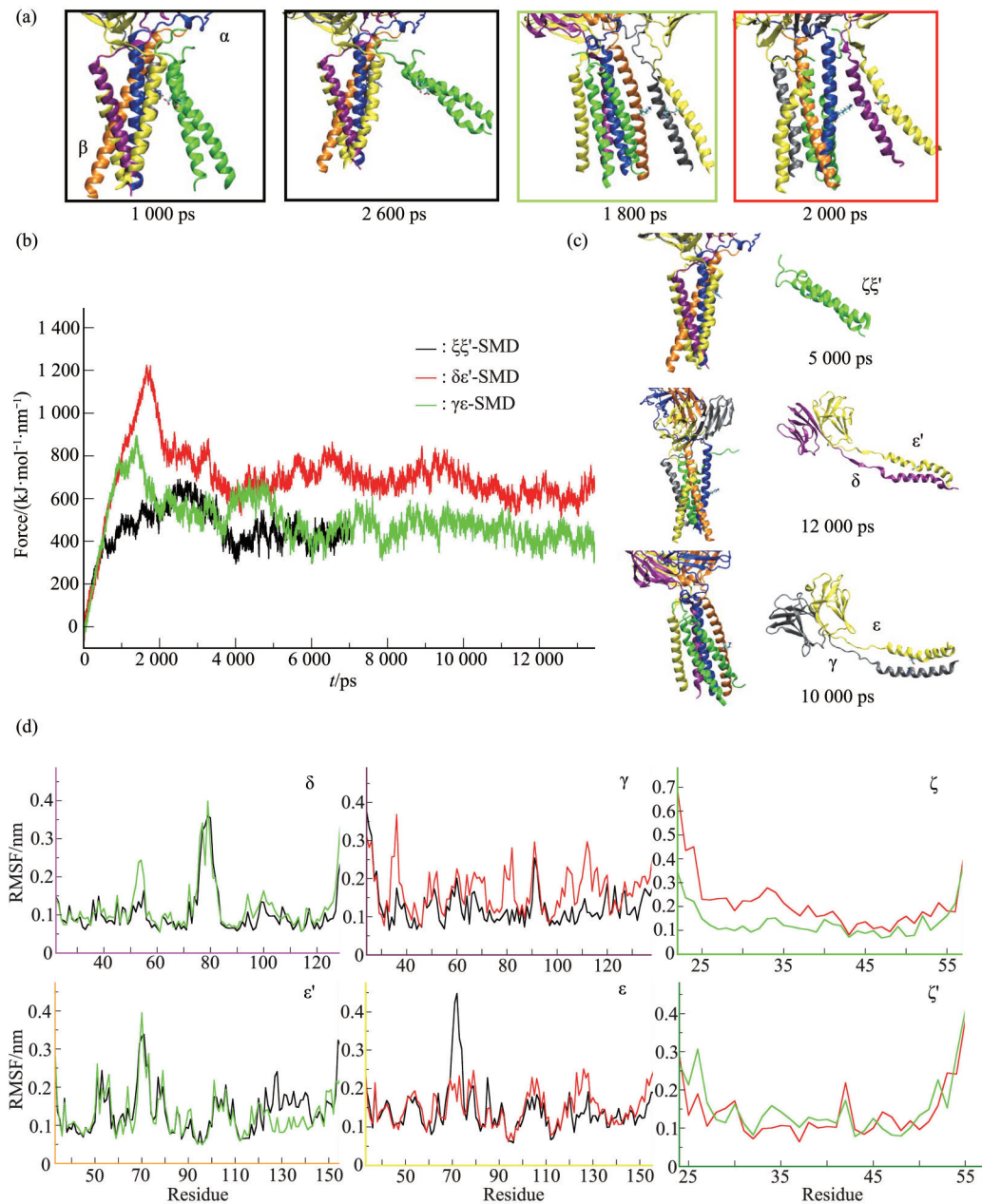


Fig. 5 SMD simulations

(a, c) Schematic diagram of the steered process, each monomer is represented by cartoon, and different colors represent different monomers. The color representation method is consistent with Figure 3b, and the green represents $\zeta\zeta'$. (b) Pull force as a function of time. (d) RMSF of each monomer. red: $\delta\epsilon'$ -SMD; black: $\zeta\zeta'$ -SMD; green: $\gamma\epsilon$ -SMD.

400 KJ/mol/nm), 在 2 600 ps 时, 其胞外区与其余六聚体之间仍有相互作用, 在 2 800 ps 左右对应的力为拉开其胞外区的力 ($\zeta\zeta'$ - $F_{extra} \approx 680$ KJ/mol/nm), 在 5 000 ps 之后, $\zeta\zeta'$ 已完全脱离 $\alpha\beta\delta\epsilon'\gamma\epsilon$ 六聚体; 对于 $\delta\epsilon'$ -SMD 而言, 在 2 000 ps 左右对应的力为拉开其跨膜区的力 ($\delta\epsilon'$ - $F_{tm} \approx 1240$ KJ/mol/nm), 在 4 300 ps 附近对应的力为拉开其胞外区的力 ($\delta\epsilon'$ - $F_{extra} \approx 600$ KJ/mol/nm), 在 6 000 ps 以后, $\delta\epsilon'$ 就已完全脱离 $\alpha\beta\gamma\epsilon\zeta\zeta'$ 六聚体; 对于 $\gamma\epsilon$ -SMD 而言, 在 1 800 ps 时对应的力为拉开其跨膜区的力 ($\gamma\epsilon$ - $F_{tm} \approx 900$ KJ/mol/nm), 在 3 500 ps 对应的力为拉开其胞外区的力 ($\gamma\epsilon$ - $F_{extra} \approx 480$ KJ/mol/nm), 在 4 000 ps 以后, $\gamma\epsilon$ 已完全脱离 $\alpha\beta\delta\epsilon'\zeta\zeta'$ 六聚体。

在 SMD 模拟中发现, 对于 $\zeta\zeta'$ 而言, $F_{tm} < F_{extra}$; 但对于 $\delta\epsilon'$ 和 $\gamma\epsilon$ 而言, $F_{tm} > F_{extra}$ 。这说明稳定 $\zeta\zeta'$ 与 $\alpha\beta\delta\epsilon'\gamma\epsilon$ 六聚体的主要结构域是 $\zeta\zeta'$ 的胞外区而非跨膜区, 这也就进一步解释了本文的跨膜区 CGMD 中, $\zeta\zeta'$ 不能结合到 α -R, 却能形成 $\alpha\beta\delta\epsilon'\gamma\epsilon$ 六聚体的现象。

2.3 AAMD 分析其中一个二聚体对其余六聚体的影响

根据 RMSF 结果 (图 5d) 发现, $\delta\epsilon'$ -SMD 对其他二聚体的 RMSF 影响最大, 且对跨膜区的影响差异最大, 因此通过 AAMD 研究 TCR-CD3 复合物的跨膜区, 分析去除掉其中一个二聚体对其余六聚体的影响。如图 6 所示, 去除掉 $\delta\epsilon'$ 的模拟组 RMSD 变化最大, 去除 $\gamma\epsilon$ 的次之, 变化最小的是去除 $\zeta\zeta'$ 的模拟组。这也与 SMD 结果相符合, 即: 拉开 $\delta\epsilon'$ 跨膜区的力是 3 个 CD3 二聚体中最大的。RMSD 变化越大, 表示结构越不稳定, 说明 $\zeta\zeta'$ 的缺失, 对 $\alpha\beta\delta\epsilon'\gamma\epsilon$ 六聚体的构象几乎没有影响, 再一次解释了在组装过程中 $\zeta\zeta'$ 结合不上, 却不影响 $\alpha\beta\delta\epsilon'\gamma\epsilon$ 组

装的现象; $\delta\epsilon'$ 的缺失对 $\alpha\beta\gamma\epsilon\zeta\zeta'$ 的构象影响最大, 这就说明 $\delta\epsilon'$ 对 TCR-CD3 复合物跨膜区构象的稳定起着关键作用。

3 结 论

本文通过 CGMD 的方法组装了仅存在跨膜区的 TCR-CD3 复合物, $\alpha\beta$ 与 $\delta\epsilon'$ 的组装以及相关关键残基的突变, 都证明了仅由跨膜区不足以介导 TCR-CD3 复合物亚基间的特异性相互作用, 在胞外区可能存在更强的特异性作用, 从而使得 $\delta\epsilon'$ 更倾向于与 α 发生相互作用而非 β 。在组装的过程中还发现, $\gamma\epsilon$ 在 $\delta\epsilon'$ 也存在的前提下与 $\alpha\beta$ 的结合才更有效, 这一点是与实验研究结果^[7]相一致的, 从侧面说明, $\gamma\epsilon$ 的组装发生在 $\delta\epsilon'$ 之后。 $\zeta\zeta'$ 不管在组装的哪一步, 均没有与 α 产生有效的相互作用, 加上 AAMD 分析去除 $\zeta\zeta'$ 后对其余亚基形成的六聚体的稳定性影响较小, 暗示着 $\zeta\zeta'$ 是发生在 $\delta\epsilon'$ 、 $\gamma\epsilon$ 组装之后。本文从分子动力学模拟的角度阐述了 TCR-CD3 复合物组装的顺序: $\alpha\beta$ 依此结合 $\delta\epsilon'$ 、 $\gamma\epsilon$ 、 $\zeta\zeta'$ 。至于在跨膜区 CGMD 中, 尚未将 $\zeta\zeta'$ 与 $\alpha\beta\delta\epsilon'\gamma\epsilon$ 六聚体组装成八聚体的现象, 可以通过 SMD 模拟结果来解释。在 SMD 模拟中表明, $\zeta\zeta'$ 与 $\alpha\beta\delta\epsilon'\gamma\epsilon$ 六聚体的胞外区相互作用强于其跨膜区作用, 而在本文的组装模拟中仅包含了跨膜区。由于模拟体系大小的限制以及跨膜单体序列太长放置膜环境中会发生疏水错配导致倾斜等原因^[28], 要想模拟全长蛋白质的组装很难, 因此只能做到仅含跨膜区的组装模拟。已经有文献^[29]表明, 不同于其他亚基, $\zeta\zeta'$ 能独立于 $\alpha\beta\delta\epsilon'\gamma\epsilon$ 之外被单独运送, 这似乎在暗示 $\zeta\zeta'$ 组装到 $\alpha\beta\delta\epsilon'\gamma\epsilon$ 六聚体上形成八聚体的过程可能需要胞外区、甚至是配体的激活等过程的参与。之后通过 SMD 模拟说明了 $\zeta\zeta'$ 胞外区的重要性, 同时辅助说明了 TCR-CD3 复合物的组装顺序。最后通过 AAMD 表明 $\delta\epsilon'$ 二聚体是 CD3 信号体中稳定 TCR-CD3 复合物的核心成分。

本文不仅分析了 TCR-CD3 复合物自组装的一些机制, 也提出 TCR-CD3 复合物间的特异性相互作用可能由其胞外区主导, TCR-CD3 复合物胞外区跨膜区共同调控自组装的现象响应了跨膜蛋白在细胞内外传递信号的方式, 但详细的机制尚不清楚, 可能成为下一步的研究内容。

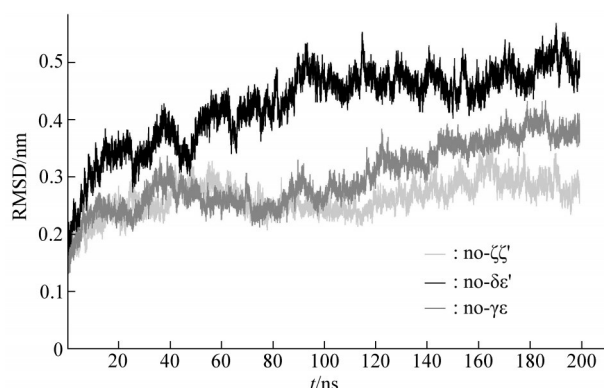


Fig. 6 Using all-atom simulation to analyze the RMSD of removing one of the dimers on the remaining hexamers

附件 PIBB_20210134_Doc_S1.pdf 见本文网络版 (<http://www.pibb.ac.cn> 或 <http://www.cnki.net>)。

参 考 文 献

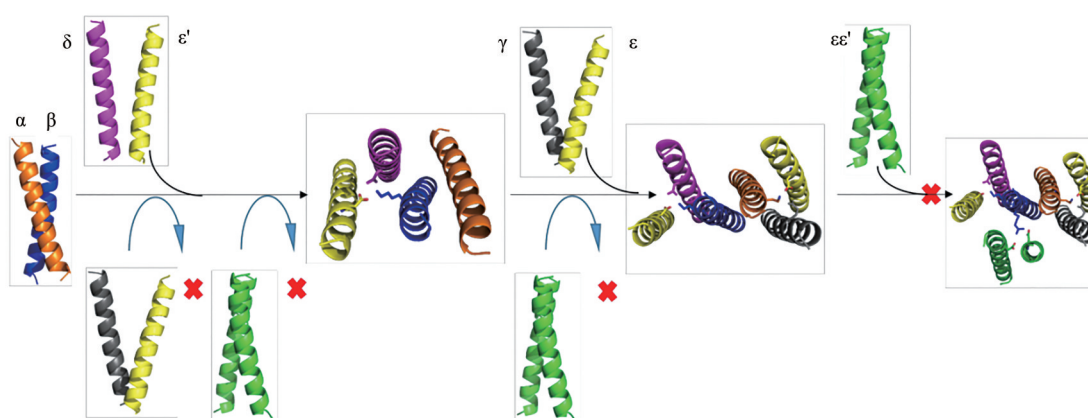
- [1] Germain R N, Stefanová I. The dynamics of T cell receptor signaling: complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation. *Annu Rev Immunol*, 1999, **17**(1): 467-522
- [2] Birnbaum M E, Berry R, Hsiao Y S, *et al.* Molecular architecture of the $\alpha\beta$ T cell receptor-CD3 complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(49): 17576-17581
- [3] Rudolph M G, Stanfield R L, Wilson I A. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol*, 2006, **24**: 419-466
- [4] Wang J, Reinherz E L. The structural basis of $\alpha\beta$ T-lineage immune recognition: TCR docking topologies, mechanotransduction, and co-receptor function. *Immunol Rev*, 2012, **250**(1): 102-119
- [5] Gaud G, Lesourne R, Love P E. Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 2018, **18**(8): 485-497
- [6] Kane L P, Lin J, Weiss A. Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr Opin Immunol*, 2000, **12**(3): 242-249
- [7] Call M E, Pyrdol J, Wiedmann M, *et al.* The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell*, 2002, **111**(7): 967-979
- [8] Dong D, Zheng L, Lin J, *et al.* Structural basis of assembly of the human T cell receptor - CD3 complex. *Nature*, 2019, **573**(7775): 546-552
- [9] Arnett K L, Harrison S C, Wiley D C. Crystal structure of a human CD3- ϵ/δ dimer in complex with a UCHT1 single-chain antibody fragment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(46): 16268-16273
- [10] Call M E, Schnell J R, Xu C, *et al.* The structure of the $\zeta\zeta$ transmembrane dimer reveals features essential for its assembly with the T cell receptor. *Cell*, 2006, **127**(2): 355-368
- [11] Yin Y, Wang X X, Mariuzza R A. Crystal structure of a complete ternary complex of T-cell receptor, peptide - MHC, and CD4. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(14): 5405-5410
- [12] Natarajan A, Nadarajah V, Felsovalyi K, *et al.* Structural model of the extracellular assembly of the TCR-CD3 complex. *Cell Rep*, 2016, **14**(12): 2833-2845
- [13] Psachoulia E, Fowler P W, Bond P J, *et al.* Helix-helix interactions in membrane proteins: coarse-grained simulations of glycoporphin A helix dimerization. *Biochemistry*, 2008, **47**(40): 10503-10512
- [14] Wei P, Liu X, Hu M H, *et al.* The dimerization interface of the glycoprotein Ib β transmembrane domain corresponds to polar residues within a leucine zipper motif. *Protein Sci*, 2011, **20**(11): 1814-1823
- [15] Chai M, Liu B, Sun F, *et al.* The dimerization of PSGL-1 is driven by the transmembrane domain *via* a leucine zipper motif. *Proteins*, 2018, **86**(8): 844-852
- [16] Wei P, Xu L, Li C D, *et al.* Molecular dynamic simulation of the self-assembly of DAP12-NKG2C activating immunoreceptor complex. *PLoS One*, 2014, **9**(8): e105560
- [17] Call M E, Wucherpfennig K W. The T cell receptor: critical role of the membrane environment in receptor assembly and function. *Annu Rev Immunol*, 2005, **23**: 101-1025
- [18] Abraham M J, Murtola T, Schulz R, *et al.* GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 2015, **1-2**: 19-25
- [19] de Jong D H, Singh G, Drew Bennett W F, *et al.* Improved parameters for the martini coarse-grained protein force field. *J Chem Theory Comput*, 2013, **9**(1): 687-697
- [20] Kuhns M S, Davis M M, Garcia K C. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. *Immunity*, 2006, **24**(2): 133-139
- [21] Krshnan L, Park S, Im W, *et al.* A conserved $\alpha\beta$ transmembrane interface forms the core of a compact T-cell receptor-CD3 structure within the membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, **113**(43): E6649-E6658
- [22] Mehta A D, Rief M, Spudich J A, *et al.* Single-molecule biomechanics with optical methods. *Science*, 1999, **283**(5408): 1689-1695
- [23] Jitonnom J, Sontag C. Comparative study on activation mechanism of carboxypeptidase A1, A2 and B: first insights from steered molecular dynamics simulations. *J Mol Graph Model*, 2012, **38**: 298-303
- [24] Lin Y W, Wang Z H, Ni F Y, *et al.* Forced unfolding of apocytochrome b5 by steered molecular dynamics simulation. *Protein J*, 2008, **27**(3): 197-203
- [25] Foloppe N, MacKerell A D. All - atom empirical force field for nucleic acids: I. parameter optimization based on small molecule and condensed phase macromolecular target data. *J Comput Chem*, 2000, **21**(2): 86-104
- [26] Brooks B R, Brooks III C L, Mackerell A D, *et al.* CHARMM: the biomolecular simulation program. *J Comput Chem*, 2009, **30**(10): 1545-1614
- [27] Best R B, Zhu X, Shim J, *et al.* Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone ϕ , ψ and side-chain $\chi(1)$ and $\chi(2)$ dihedral angles. *J Chem Theory Comput*, 2012, **8**(9): 3257-3273
- [28] Kandasamy S K, Larson R G. Molecular dynamics simulations of model trans-membrane peptides in lipid bilayers: a systematic investigation of hydrophobic mismatch. *Biophys J*, 2006, **90**(7): 2326-2343
- [29] Alcover A, Alarcón B, Di Bartolo V. Cell biology of T cell receptor expression and regulation. *Annu Rev Immunol*, 2018, **36**: 103-125

The Molecular Mechanism of TCR-CD3 Complex Self-assembly*

WANG Feng-Li, CHEN Jia-Lin, HE Cheng-Zhi**, LUO Shi-Zhong**

(Beijing Advanced Innovation Center for Soft Matter Science and Engineering, College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Graphical abstract



Abstract Objective The T cell receptor-co-receptor complex (TCR-CD3) plays an important role in the adaptive immune response, and the interaction between its subunits has always been a research hotspot. Due to the limitations of traditional experiments, the study of transmembrane protein TCR-CD3 complexes cannot go deep into the microscopic level. **Methods** Therefore, we used molecular dynamics simulation methods to analyze the self-assembly mechanism of TCR-CD3 complexes. **Results** Through coarse-grained simulation (CGMD), we found that the TCR-CD3 complex has an assembly sequence in which $\alpha\beta$ sequentially binds $\delta\epsilon'$, $\gamma\epsilon$, and $\zeta\zeta'$ during the assembly process, and explained that the α^{R253} mutation reduces the interaction between α^{K258} and $\delta\epsilon'$. **Conclusion** We demonstrated that only the transmembrane region of the TCR-CD3 complex is not sufficient to mediate the specific interaction between the subunits of the TCR-CD3 complex. The results of steered dynamics (SMD) and all-atom simulation (AAMD) indicate that the extracellular interaction between $\zeta\zeta'$ and the rest of TCR-CD3 is stronger than the transmembrane region. The absence of $\zeta\zeta'$ makes the stability of $\alpha\beta\delta\epsilon'\gamma\epsilon$ little change, while the absence of $\delta\epsilon'$ greatly reduces the stability of $\alpha\beta\gamma\epsilon\zeta\zeta'$.

Key words TCR-CD3 complex, coarse-grained simulation, all-atom simulation, steered dynamics, transmembrane protein

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0134

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (22077010, 11902023) and Open Project Fund of the State Key Laboratory of Precision Measuring Technology and Instruments (Tianjin University) (pilab1902).

** Corresponding author.

HE Cheng-Zhi. Tel: 86-13370154991, E-mail: czhe@mail.buct.edu.cn

LUO Shi-Zhong. Tel: 86-13683546821, E-mail: luosz@mail.buct.edu.cn

Received: May 11, 2021 Accepted: September 28, 2021