

巴尔通氏体效应蛋白 BepE 干扰人源 Csk 蛋白 信号通路的结构与功能分析*

张柯^{1,2)} 刘清波¹⁾ 胡永林^{1)**} 王大成^{1)**}

(¹⁾中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101; (²⁾中国科学院大学, 北京 100049)

摘要 巴尔通氏体作为多种人类疾病的病原菌, 可分泌多种毒力效应蛋白。其中的 7 个毒力效应蛋白 BepA~BepG 由一个 IV 型分泌系统 VirB 注入宿主细胞内, 干扰宿主细胞的多种信号传递通路。在这 7 个效应蛋白中, BepD~F 的 N 端含有特征的 EPIYA 基序。注入宿主细胞后, 这些 EPIYA 基序上的酪氨酸残基被宿主细胞中的 SFK 激酶磷酸化, 磷酸化后的 EPIYA 基序可与宿主细胞中含 SH2 结构域的蛋白结合并干扰宿主细胞的 SH2 蛋白相关信号通路。在此之前, 已经有多种病原菌的效应蛋白被发现含有 EPIYA 基序, 并且通过磷酸化的 EPIYA 干扰哺乳动物宿主的 SH2 信号通路。这些毒性效应蛋白除 EPIYA 基序之外并没有明显的序列同源性。与此相应, 在人类蛋白质组中目前只发现了 6 种含有 EPIYA 基序的蛋白, 这个基序出现的频率显著低于基于随机预测的频率, 这可能是在人类进化过程中含有 EPIYA 基序的蛋白会干扰正常信号通路传导而被淘汰。JAM-A 是已报道的 6 个人体内 EPIYA 蛋白之一, 它存在于人血小板中, 可通过招募 Csk 至血小板来避免血栓的形成。已有的报道证明了 BepE 可与人源 Csk 相互作用, 通过影响 Csk 的功能进而干扰一系列信号通路。人源 Csk 蛋白作为一个可以同时被来自于病原菌毒力蛋白和内源蛋白中磷酸化 EPIYA 基序识别并结合的分子, 为我们研究并对比这两种含 EPIYA 基序的蛋白质对人类细胞中 SH2 信号通路的作用提供了一个理想的靶标。本文报道了 Csk 与 BepE 及 JAM-A 2 种磷酸化多肽复合物高分辨率晶体结构并分别测定其亲和力。Csk 与多肽复合物结构显示, Csk 与 2 种多肽结合方式相似, 都是通过 SH2 结构域与磷酸化酪氨酸结合, 多肽链垂直于 SH2 结构域中的 β 片层。SPR 实验结果显示, 来源于巴尔通氏体的 BepE 比人源 JAM-A 与 Csk 亲和力高, 这暗示毒力蛋白通过磷酸化的 EPIYA 基序以高亲和力结合人体内含 SH2 结构域的蛋白, 进而干扰 SH2 蛋白所涉及的信号通路。

关键词 巴尔通氏体, BepE, EPIYA, Csk, 晶体结构

学科分类号 Q71

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0290

巴尔通氏体(*Bartonella henselae*)是一种人畜共患病原体^[1], 可导致多种人类疾病, 如: 猫抓病、杆菌性血管瘤、发热菌血症和神经性视网膜炎^[2-3]。巴尔通氏体携带了编码 VirB/VirD 四型分泌系统以及 7 种效应蛋白的致病岛(PAI)。致病岛上编码的 7 种效应蛋白分别标记为 BepA~G, 其中 BepA~C 都含有 FIC 结构域, 该结构域位于效应蛋白的 N 端, 与细菌的细胞分裂有关, FIC 结构域在许多细菌中非常保守; BepD~F 的 N 端含有 Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala(EPIYA)或类 EPIYA 序列, EPIYA 基序可以被 SFK 磷酸化, 磷酸化后的 EPIYA 基序可以与含 SH2 结构域的蛋白形成复合物, 这可以导致宿主细胞信号传导紊乱从而引发严重疾病的产生。

Src 家族酪氨酸激酶(SFK)作为分子开关, 涉及

多细胞动物中各种细胞活动的起始, 包括细胞生长和分裂、细胞附着和运动、细胞分化、存活与死亡^[4-7]。SFKs 通常以非活性状态存在, C 端磷酸化的酪氨酸与自身 SH2 结构域结合。一旦受到外部刺激, C 端的酪氨酸去磷酸化或与其他蛋白质结合从而使 SFKs 激活。SFKs 的酪氨酸磷酸化受另一个磷酸酪氨酸激酶调节, 即 C 端 Src 激酶(Csk)。Csk 是 SFKs 中不可或缺的负调控因子^[8], 其在各种细胞信号传导中起到关键作用。Csk 功能的缺失可

* 中国科学院战略性先导科技专项(XDB08020202), 生物大分子国家重点实验室资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-64888548, E-mail: dcwang@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2017-07-14, 接受日期: 2017-10-10

导致 SFKs 持续激活, 这会导致胚胎发育出现严重缺陷. 而如果 Csk 功能增强, 可以明显下调 SFK 介导的细胞信号传导. Csk 由 SH2、SH3 及激酶结构域组成, 相比 SFK 缺少 N 端酰化信号, 这使得 Csk 与 SFK 的调节机制截然不同^[4].

Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala(EPIYA) motif 最初是在幽门螺杆菌 CagA 的 C 端发现的酪氨酸磷酸化基序. 目前的研究显示, 人体内含有 EPIYA 基序的蛋白只有 6 个^[9-11], 这个数目大大低于基于随机序列计算得到的可能出现次数. 这可能是由于 EPIYA 基序易干扰 SH2 结构域蛋白参与的信号通路, 所以在人类进化过程中尽量避免体内蛋白含有 EPIYA 基序. 连接黏附因子 A(JAM-A) 是人体含有 EPIYA 基序的蛋白之一, 最近有研究显示 JAM-A 可以通过抑制整合素信号传导来避免血栓的形成^[10]. JAM-A 可以将 Csk 招募到血小板中^[12], Csk 通过其 SH2 结构域与磷酸化的 JAM-A 相互作用从而抑制 c-src 的活性继而避免血栓的形成.

本研究的目标分子人源 Csk 蛋白既可以结合低特异性的毒性蛋白 BepE, 又可以结合高特异性的人源蛋白 JAM-A, 是研究 SH2 结构域与磷酸化多肽特异性结合的理想目标. 解析 Csk 与 BepE 及 JAM-A 含 EPIYA 基序的磷酸化多肽复合物晶体结构, 这有助于更深入地理解 Csk 与人源蛋白及毒性蛋白结合方式的差异, 从而解释含有 EPIYA 基序的毒性蛋白干扰人体信号通路的具体方式.

我们通过 X 射线晶体衍射的方法获得了人源 Csk 与 BepE 及 JAM-A 含 EPIYA 基序的磷酸化多肽复合物三维结构, 并通过 SPR 的方法分别测定了 Csk 与 BepE、JAM-A 磷酸化多肽的亲和力. 实验结果显示, Csk 通过 SH2 结构域与含 EPIYA 基序的磷酸化多肽相互作用, 同时, Csk 与病原菌来源的 BepE 亲和力是人来源的 JAM-A 的 7.28 倍, 这说明病原菌通过模仿人源蛋白 EPIYA 基序降低特异性, 提高亲和力的方法竞争性抑制人源 EPIYA 蛋白与 Csk 结合从而导致一系列与 Csk 相关信号通路紊乱进而导致严重疾病. 该项研究为探索含 EPIYA 基序的病原蛋白致病机制提供了新的证据, 对于药物靶点的筛选具有重要意义.

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 基因、表达菌株和表达载体

实验所用到的人源 Csk 基因为本实验室所保

存, Csk 全长基因克隆至 pET22b 原核表达载体上, 酶切位点为 *Nde* I 与 *Xho* I. 最终表达出的 Csk 蛋白的 C 端带有 His₆ 标签, 以便于纯化样品. 表达菌株为购自北京全式金生物技术有限公司的 BL21 (DE3) 感受态细胞.

1.1.2 仪器与试剂

PCR 仪、核酸电泳仪、蛋白质电泳仪均购自美国 Bio-Rad 公司; AKTA purifier/FPLC 蛋白质纯化系统购自美国 GE 公司; 高保真 DNA 聚合酶、dNTP、5× P.S buffer 等均购自 Takara 公司; T4 DNA 连接酶、连接缓冲液、Cutsmart 缓冲液、*Nde* I、*Xho* I 等多种限制性内切酶、DNA marker 等均购自 New England Biolab(NEB)公司; 质粒小量提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒均购自 Axygen 公司.

1.2 方法

1.2.1 Csk 蛋白的表达

将含有人源全长 Csk 基因的表达质粒转化至 BL21(DE3)感受态细胞中, 涂布至含 100 mg/L 氨苄西林钠的抗性 LB 固体平板, 37°C 温箱培养 12 h.

固体平板 37°C 培养 12 h 之后, 平板上已长出均匀的带有目的质粒的转化菌落, 挑取单菌落到 5 ml 相应抗性 LB 液体培养基中, 37°C 摇床培养 12 h. 之后取 1.5 ml 加入到 50 ml 相应抗性 LB 液体培养基中, 37°C 摇床培养 3 h. 将 50 ml 菌液加入到 800 ml 相应抗性 LB 液体培养基中, 37°C 摇床培养至 $A_{600} = 0.8 \sim 1.0$, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 37°C 摇床诱导表达 3 h 后用离心瓶将菌液于 4 000 r/min 离心 30 min 以收集细菌.

1.2.2 Csk 蛋白的纯化

将离心后的菌液去上清, 按每升 15 ml 的体积加入裂解缓冲液 (Lysis Buffer: 50 mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7.5, 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑), 用漩涡震荡器充分重悬离心下来的菌体. 重悬之后, 以高压破碎仪破菌, 高压破碎压力为 120 MPa, 破菌 3 次, 破碎后得到清亮的菌液. 将破菌后的液体转移到 40 ml 离心管中, 在 4°C, 13 000 r/min 下离心 30 min, 收集上清. 将上清用蠕动泵缓慢上样到用 Lysis Buffer 平衡好的 Ni-NTA 柱中, 此过程中 Ni-NTA 柱始终浸于冰水混合物中. 上样结束后, 用洗涤缓冲液 (Washing Buffer: 50 mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7.5, 300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑) 冲洗 Ni-NTA 柱, 用低浓度的咪唑洗掉与 Ni-NTA 柱非特异性

结合的蛋白. 待紫外检测仪示数稳定后, 用洗脱缓冲液(Elute Buffer: 50 mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7.5, 300 mmol/L NaCl, 250 mmol/L咪唑)洗脱目的蛋白, 收集洗脱下来的目的蛋白准备浓缩并取样进行 SDS-PAGE 鉴定目的蛋白的纯度与浓度.

将 Ni-NTA 柱上洗脱下来的 Csk 蛋白低速(4 000 r/min)离心浓缩至 1 ml, 准备进一步分子筛纯化. 将分子筛层析柱(HiLoad 16/60 Superdex 75column, GE Healthcare)正确安装到 ÄKTA purifier 层析系统上, 整个系统处于 4℃层析冷柜中. 层析柱预先用缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.2 mmol/L EDTA, 5 mmol/L DTT)平衡, 浓缩后的蛋白样品以 1 ml/min 的流速上样. 收集蛋白洗脱峰, 浓缩至 40 g/L 备用.

1.2.3 Csk 与磷酸化多肽复合物晶体生长及优化

结晶实验所用的磷酸化多肽由南京金斯瑞生物科技有限公司合成. 两条磷酸化多肽均含 15 个氨基酸残基, 分别是 BepE 蛋白的 BepE-Y37(序列为: SPQPEPLpYATVNKRK, 其中 pY 代表磷酸化酪氨酸)及 JAM-A 蛋白的 JAM-A-Y280(序列为: TSSKKVlpYSQPSARS). 将合成的磷酸化多肽用分子筛缓冲液溶解后与 Csk 蛋白混合, 最终得到的混合溶液中蛋白质与多肽的摩尔比为 1:2. 原始结晶条件来自于所内 Mosquito 蛋白质结晶自动化工作站搜索, 搜索使用的条件为 Hampton Research 的试剂盒: Index, Crystal Screen I, Crystal Screen II, PEG Ion Screen I, PEG Ion Screen II, PEGRx I, PEGRx II, SaltRx I 及 SaltRx II 结晶试剂盒. 2 天后, 在多个以 PEG 为沉淀剂的条件下观察到晶体.

晶体初筛之后, 在搜索到的结晶条件基础上进行优化. 结晶条件的优化主要从以下几个方面进行: 蛋白质样品浓度、沉淀剂浓度、缓冲液的种类及 pH、添加剂的种类及浓度. 晶体的优化是使用悬滴气相扩散法, 1 μl 蛋白溶液与 1 μl 池液在硅化的玻片上混合, 然后将玻片倒盖于装有池液的悬滴板上用真空油脂密封, 放置于 22℃环境下生长.

经过多轮优化后, 晶体较之前尺寸变大, 衍射也明显好于优化前. 两种晶体的外形相似, 都呈棒状. 最终优化后的结晶条件为 Csk-Y37: 0.2 mol/L Tris pH 7.0, 0.2 mol/L Potassium sodium tartrate tetrahydrate, 16%PEG3350; Csk-Y280: 0.1 mol/L Tris pH 8.4, 13.7% w/v PEG3350, 2% Tacsimat pH 8.0.

1.2.4 数据收集与处理及结构解析

Csk 与磷酸化多肽复合物晶体衍射数据是在上海同步辐射 beam line 17U1 上收集完成的. 数据收集均在 95K 温度下进行, 每幅画面回摆角为 1°, 每套数据收集 180 幅画面. 数据收集所用探测器为 MX225CCD, 使用的 X 射线波长为 0.9795Å. 衍射数据用 XDS 程序进行指标化和积分. 计算得到晶体的 Matthews coefficient 为 2.78 及 2.76 $\text{Da}/\text{Å}^3$, 复合物晶体的溶剂含量均在 55%~60%之间, 晶胞一个不对称单位中有 2 个分子. Csk-Y37 与 Csk-Y280 衍射数据分别能处理到 3.0Å 与 2.77Å, 空间群都为 $\text{P2}_12_12_1$, R_{merge} 、 I/σ 、 $\text{CC}_{1/2}$ 及完整度都在合理范围内.

两个复合物的结构均以分子置换法解析. 我们以大鼠 Csk 结构为模板, 用 Phenix 程序包中的 AutoMR 进行分子置换^[13], 得到正确解之后使用 Coot 软件手动搭建模型^[14], 之后用 Phenix 中的 refine 进行结构修正^[15-16]. 经过多轮的手动搭建与结构修正交替进行, 以及模拟退火、B 因子修正及加水等步骤, 最终完成 Csk 与多肽复合物晶体结构解析^[17-19]. 结构修正完毕后, 使用 CCP4 软件中的 PROCHECK 程序进行模型质量评估. 根据评价结果, Csk 多肽复合物晶体结构模型各项指标均在合理范围内. Csk-多肽复合物晶体学参数见表 1.

1.2.5 表面等离子共振技术测定 Csk 蛋白与磷酸化多肽的亲合力

表面等离子共振技术(SPR)可以在天然条件下通过传感器芯片实时测定各种生物分子如蛋白质、多肽、核苷酸、糖类及小分子化合物之间相互作用. 本实验使用的仪器是中国科学院生物物理研究所的 BIAcore T100 SPR 仪, 使用的芯片是 CM5 芯片. 用脱盐柱将 Csk 蛋白缓冲液置换为 SPR 缓冲液(20 mmol/L HEPES pH 8.0, 150 mmol/L NaCl), Csk 蛋白作为固定相, 多肽溶液作为流动相. 首先将 EDC 与 NHS 1:1 混合, 以 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的速度注入以活化芯片. 用 pH 5.0 的醋酸钠溶液稀释 Csk 蛋白, 以 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的速度注入至芯片并观察固定量, 最终 Csk 蛋白固定量达到 5713 RU. 蛋白固定完成后以 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的速度注入乙醇胺封闭. 将磷酸化多肽分别稀释至不同的浓度梯度, 每个浓度的样品都以 40 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的速度注入 60 s, 然后解离 2 min, 观察不同磷酸化多肽样品与 Csk 蛋白结合力的差异. SPR 实验数据处理是使用 BIAevaluation 软件, 用 1:1 Langmuir binding model 进行拟合.

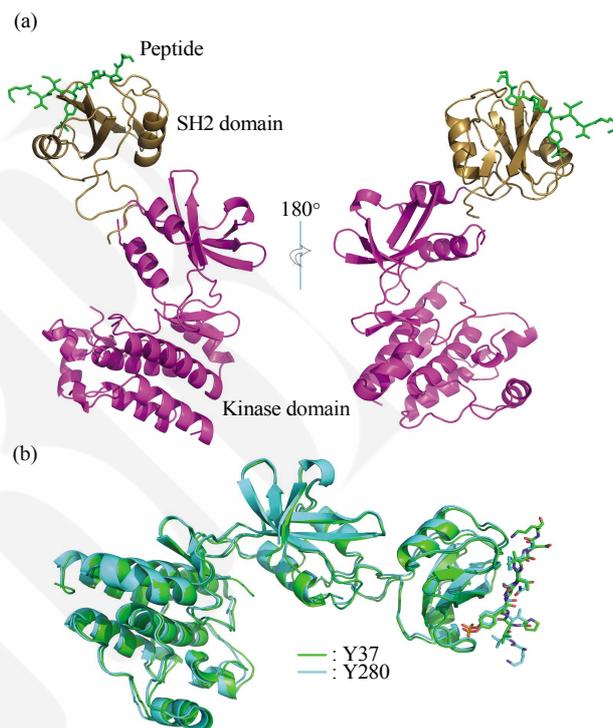
Table 1 X-ray data collection and refinement statistics

	Csk-Y37	Csk-Y280
Data collection		
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cell dimensions		
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> /Å	83.75, 97.03, 142.07	85.08, 97.20, 142.35
α , β , γ (°)	90.00, 90.00, 90.00	90.00, 90.00, 90.00
Resolution/Å	47.31-3.0(3.15-3.0)	142.35-2.77(2.84-2.77)
<i>R</i> _{merge}	0.068 (0.592)	0.070 (0.617)
<i>R</i> _{meas}	0.074 (0.662)	0.081 (0.718)
<i>R</i> _{pim}	0.044 (0.213)	0.042 (0.363)
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	17.7 (2.5)	19.5 (2.9)
CC _{1/2}	99.6(89.8)	99.9 (86.9)
Completeness/%	99.5 (99.8)	99.9 (100)
Redundancy	3.6 (3.7)	7.1 (7.4)
Refinement		
Resolution/Å	47.31-3.0	142.35-2.77
No. reflections	23546	30781
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0.2370/0.2950	0.2314/0.2801
No. atoms		
Protein	5734	5641
Ligand/ion	125	125
Water	-	44
B factors		
Protein	85.05	63.54
Ligand/ion	80.25	55.79
Water	-	53.14
R.m.s. deviations		
Bond lengths/Å	0.006	0.006
Bond angles/(°)	0.863	1.037

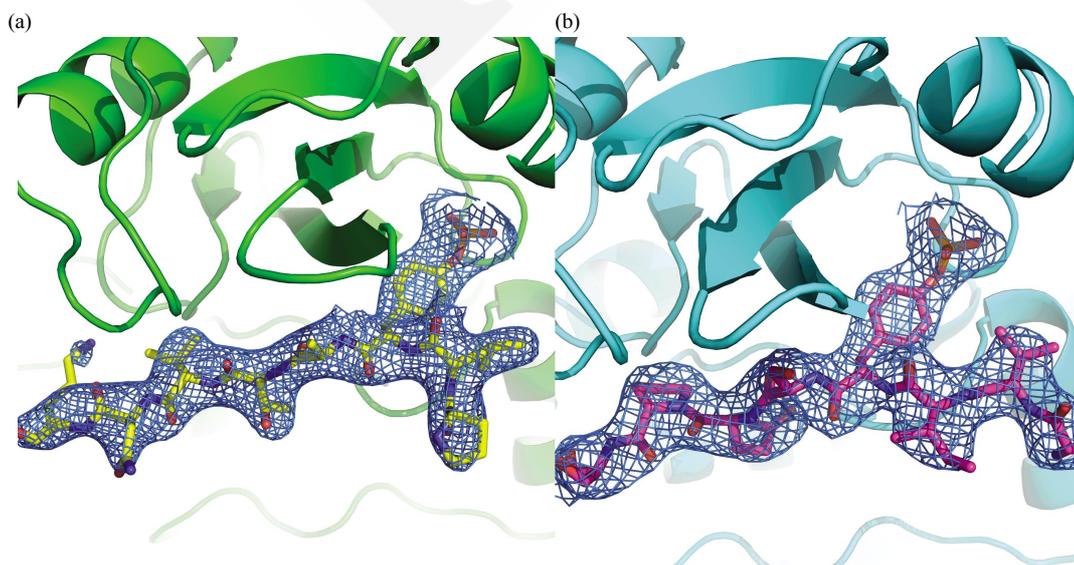
2 结 果

2.1 Csk 与磷酸化多肽晶体结构

我们解析了 Csk 与 BepE-Y37 的复合物。Csk-Y37 及 Csk 与 JAM-A-Y280 的复合物 Csk-Y280 晶体结构，分辨率分别为 3.0Å 及 2.77Å。晶体结构如图 1、图 2 所示，二者结构类似

**Fig. 1** Structures of Csk-peptide complex

(a) Overall structure of Csk-peptide complex. (b) Alignment of Y37 and Y280.

**Fig. 2** Structure and density of Csk-Y37 and Csk-Y280

(a) Structure and density of Csk-Y37. (b) Structure and density of Csk-Y280.

(图 1b), 一个晶体学不对称单元中有 2 个 Csk 分子, 二者之间存在 1 个非晶体学二次轴. Csk 单体由 SH2、SH3 及 Kinase 这 3 个结构域构成, 3 个结构域排布呈“Y”字形. 在解析的 Csk 与多肽复合物结构中 SH3 结构与密度较差, 这可能是因为 SH3 结构域具有较大的柔性. 磷酸化多肽与 Csk 蛋白的 SH2 结构域以 1:1 的摩尔比结合, 与 SH3 及 Kinase 结构域并没有直接的相互作用.

激酶结构域位于 Csk 蛋白的 C 端, 是由 9 个 α 螺旋及 2 个反向 β 片层组成. 激酶结构域的 C 端由 7 个相对平行的 α 螺旋组成, α 螺旋之间由柔性 loop 连接形成一组刚性较强的 α 螺旋束.

SH2 结构域由 2 个 α 螺旋夹着反向 β 片层核心组成, 2 个 α 螺旋及 β 片层在不同的 SH2 结构域中相对保守. SH2 结构域中, Arg-89、Arg-107、Ser-109、Thr-110、Asn-111 及 Thr-117 与多肽上的磷酸化酪氨酸形成氢键网络, 这为磷酸化多肽与 SH2 结构域结合提供了主要的亲和力.

2.2 磷酸化多肽与 Csk 的相互作用

在 Csk 与磷酸化多肽复合物结构中, 磷酸化多肽垂直于 SH2 结构域的 β 片层伸展, 多肽的磷酸基团插入到 SH2 结构域中的一个带正电的亲水口袋中. 多肽的 C 端可以与 SH2 结构域的特异性口袋结合, 该口袋可以特异性地识别并结合相应的多肽链.

磷酸化酪氨酸结合口袋由 SH2 结构域上的 Arg-89、Arg-107、Ser-109、Thr-110、Asn-111 及 Thr-117 组成(图 3). 磷酸化酪氨酸结合口袋具有很强的正电性, 可以与带有负电荷的磷酸基团结合, 这一结合方式在 SH2 结构域与底物结合中较常见. 组成磷酸化酪氨酸结合口袋的氨基酸残基可以与磷酸基团形成氢键网络, 这为 SH2 结构域与磷酸多肽的结合提供较强的结合力. 除了磷酸酪氨酸结合口袋, 在 SH2 结构域上还存在一个特异性口袋, 是由 Tyr-129、Ile-140、Asp-141、Asp-161 及 Leu-163 组成的. 特异性口袋对于 SH2 与磷酸多肽的特异性识别非常重要, 不用 SH2 结构域的特异性口袋差别很大, 有的与 P+2 位(pTyr 的 C 端第 2 位)的残基作用, 有的与 P+3 或 P+4 位的残基作用, Csk 的特异性口袋是与多肽的 P+3 位氨基酸残基的侧链相互作用. 大多数 SH2 结构域特异性口袋是由疏水氨基酸残基构成, 但是 Csk 的 SH2 特异性口袋是由 2 个亲水氨基酸(Asp-141, Asp-161)及 3 个疏水氨基酸(Tyr-129, Ile-140, Leu-163)构成,

这使其既可以与疏水氨基酸结合又可以与亲水氨基酸结合(图 4).

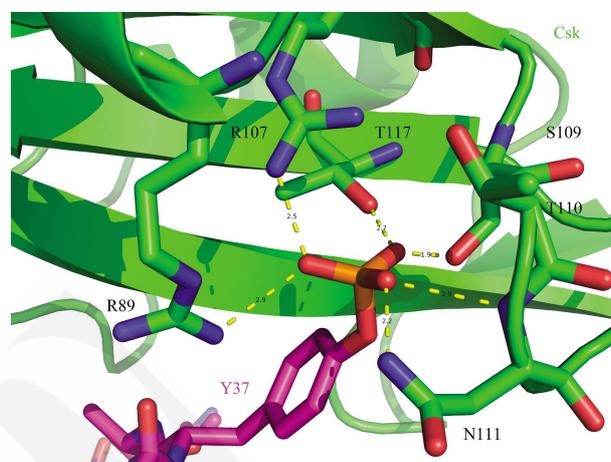


Fig. 3 The hydrogen bond net between phosphotyrosine and hydrophilic pocket of Csk-SH2

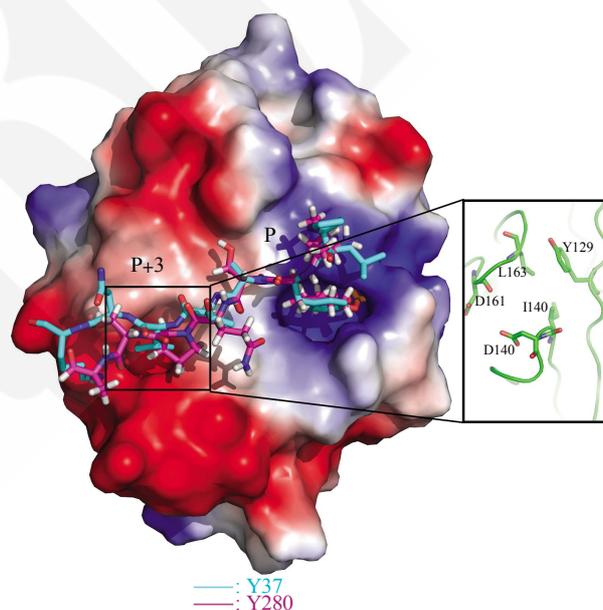


Fig. 4 The P+3 specificity-determining pocket of Csk

2.3 SPR 测定 Csk 与不同磷酸化多肽的亲和力

Csk 与 BepE-Y37 及 JAM-A-Y280 2 种多肽的 SPR 结果如图 5 所示, 其中, 来源于 *B. henselae* 效应蛋白的多肽 BepE-Y37 与 Csk 的解离常数(K_d)达到了 $0.607 \mu\text{mol/L}$, 而来源于人体的 JAM-A-Y280 与 Csk 亲和力较 BepE-Y37 弱, 解离常数为 $4.42 \mu\text{mol/L}$. 细菌毒蛋白来源的 Y37 与 Csk 的亲和力是人体来源的 Y280 的 7.28 倍, 这暗示了细菌毒蛋白通过 EPIYA motif 与 Csk 紧密结合, 竞争性地抑制 Csk 与其在人体细胞内原始配体结合从而导

致 Csk 功能紊乱, 进一步导致 SFK 持续激活. SFK 的持续激活使得 SFK 涉及的各种信号通路紊乱, 进而引发一系列的严重疾病.

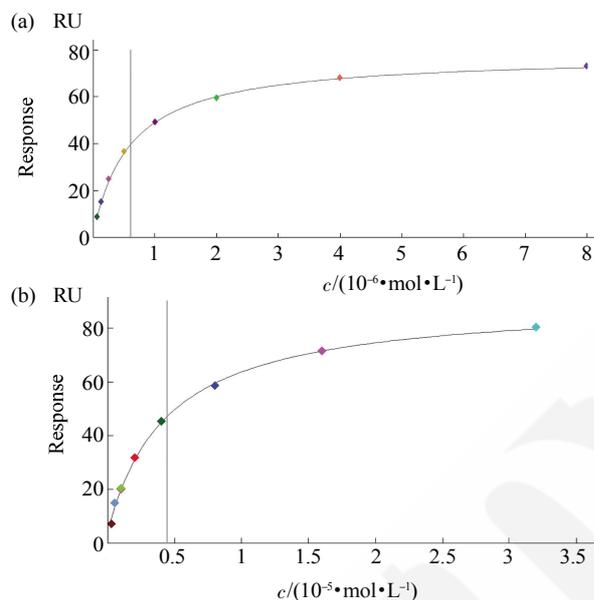


Fig. 5 SPR result of Csk-Y37 and Csk-Y280
(a) SPR result of Csk-Y37. (b) SPR result of Csk-Y280.

人类蛋白质组中目前仅发现 6 个含 EPIYA 基序的蛋白, JAM-A 即是其中之一. 由此也可以看出, EPIYA 基序可能对细胞有潜在风险, 因此在进化过程中被排除掉. 而细菌的很多效应蛋白中存在 EPIYA 基序, 这些效应蛋白通过模仿人体内存在的 EPIYA 基序蛋白, 降低特异性提高亲和力的方式与人体内含有 SH2 结构域的蛋白相互作用, 强烈干扰宿主 SH2 蛋白所涉及的信号通路.

2.4 Csk-Y37 及 Csk-Y280 复合物结构

晶体结构显示, BepE、JAM-A 与 Csk 的结合方式非常相似, 所以我们认为影响亲和力的主要因素是两种多肽一级序列的差异. 根据 Huang 等^[20]所做的 SH2 结构域蛋白磷酸酪氨酸序列偏好性实验显示, Csk 可识别含 pY(T/A/S)(K/R/Q/N)(M/I/V/R) 基序的磷酸化多肽. BepE 与 JAM-A 的 P+1 位分别是 A 与 S, 符合 Csk 的偏好, P+2 位分别是 T 与 Q, P+3 位分别是 V 与 P, BepE 的 P+3 位与 JAM-A 的 P+2 位符合 Csk 偏好, 由于 Csk 的特异性口袋识别的是 P+3 位的氨基酸残基, 所以 P+3 位对于多肽与 Csk 亲和力更为重要. 通过对比分析两种多肽序列上的差异可以解释其与 Csk 亲和力的

差异, 证明 BepE 能以远高于 JAM-A 的亲和力与 Csk 结合.

3 讨 论

含 EPIYA 基序的致病菌效应蛋白因与人体多种严重疾病密切相关而受到很大的关注, 巴尔通氏体(*Bartonella henselae*)的效应蛋白 BepE 就是其中之一. BepE 可以通过 VirD 四型分泌系统分泌至宿主体内, SFK 可以磷酸化 BepE 蛋白第 37 位的酪氨酸, 磷酸化后的 BepE 通过磷酸基团与 Csk 的 SH2 结构域相互作用, 干扰 Csk 正常功能的执行. JAM-A 是存在于人血小板中的黏附因子, 它被 SFK 磷酸化后可招募 Csk 至血小板中抑制 SFK 的活性, 进而避免血栓的形成.

Csk 与 2 种磷酸化多肽的晶体结构显示, 2 种磷酸化多肽与 Csk 结合方式相似, 都是以伸展的状态垂直于 SH2 结构域的 β 片层, 结合力大部分来自于 SH2 结构域上的 Arg-89、Arg-107、Ser-109、Thr-110、Asn-111 及 Thr-117 与磷酸基团形成的氢键网络. 在 Csk-SH2 结构域中还存在一个特异性口袋, 决定 SH2 结构域与底物结合特异性, 这个口袋与多肽 P+3 位氨基酸残基侧链相互作用. 用 SPR 的方法, 将 Csk 蛋白作为固定相, 多肽溶液作为流动相分别测定磷酸化多肽与 Csk 的亲和力. SPR 实验结果显示, Csk 与 BepE 的亲和力是与 JAM-A 亲和力的 7.28 倍, 即巴尔通氏体效应蛋白来源的多肽亲和力更强. 我们认为 BepE 正是通过它的低特异性高亲和力与 Csk 紧密结合, 竞争性地抑制人体内蛋白如 JAM-A 与 Csk 的结合, 这使得 Csk 无法执行其正常功能.

通过解析 Csk-Y37 及 Csk-Y280 复合物晶体结构, 我们提出了巴尔通氏体效应蛋白 BepE 感染宿主后干扰宿主信号通路进而引发疾病的可能机制, 该机制符合 EPIYA 相关生化实验的报道, 也显示了 Csk 是 BepE 发挥毒理作用的重要靶蛋白, 这为今后进一步深入理解巴尔通氏体致病机制及探索巴尔通氏体可能的药物靶点提供了结构基础.

参 考 文 献

- [1] Mada P K, Joel Chandranesan A S. *Bartonellosis*. StatPearls City: StatPearls Publishing StatPearls Publishing LLC., 2017
- [2] Schulein R, Guye P, Rhomberg T A, et al. A bipartite signal mediates the transfer of type IV secretion substrates of *Bartonella henselae* into human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(3): 856-861

- [3] Okaro U, Addisu A, Casanas B, *et al.* *Bartonella* species, an emerging cause of blood-culture-negative endocarditis. *Clin Microbiol Rev*, 2017, **30**(3): 709–746
- [4] Cole P A, Shen K, Qiao Y, *et al.* Protein tyrosine kinases Src and Csk: a tail's tale. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2003, **7**(5): 580–585
- [5] Hayashi T, Morohashi H, Hatakeyama M. Bacterial EPIYA effectors—Where do they come from? What are they? Where are they going?. *Cell Microbiol*, 2013, **15**(3): 377–385
- [6] Wang J, Zhuang S. Src family kinases in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2017, **313**(3): F721–F728
- [7] Senis Y A, Mazharian A, Mori J. Src family kinases: at the forefront of platelet activation. *Blood*, 2014, **124**(13): 2013–2024
- [8] Howell B W, Cooper J A. Csk suppression of Src involves movement of Csk to sites of Src activity. *Mol Cell Biol*, 1994, **14**(8): 5402–5411
- [9] Wang X T, Zheng R, Suo Z W, *et al.* Activity-dependent dephosphorylation of paxillin contributed to nociceptive plasticity in spinal cord dorsal horn. *Pain*, 2016, **157**(3): 652–665
- [10] Naik M U, Caplan J L, Naik U P. Junctional adhesion molecule-A suppresses platelet integrin α IIb β 3 signaling by recruiting Csk to the integrin-c-Src complex. *Blood*, 2014, **123**(9): 1393–1402
- [11] Senda Y, Murata-Kamiya N, Hatakeyama M. C-terminal Src kinase-mediated EPIYA phosphorylation of Pragmin creates a feed-forward C-terminal Src kinase activation loop that promotes cell motility. *Cancer Science*, 2016, **107**(7): 972–980
- [12] Ford C E, Furlong M T, Geahlen R L, *et al.* Signaling-induced association of a tyrosine-phosphorylated 36-kDa protein with p50csk. *J Biol Chem*, 1994, **269**(48): 30378–30385
- [13] Ogawa A, Takayama Y, Sakai H, *et al.* Structure of the carboxyl-terminal Src kinase, Csk. *J Biol Chem*, 2002, **277**(17): 14351–14354
- [14] Emsley P, Lohkamp B, Scott W G, *et al.* Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2010, **66**(Pt 4): 486–501
- [15] Adams P D, Afonine P V, Bunkoczi G, *et al.* The Phenix software for automated determination of macromolecular structures. *Methods*, 2011, **55**(1): 94–106
- [16] 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**(Pt 2): 213–221
- [17] Matthews B W. Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol*, 1968, **33**(2): 491–497
- [18] Chruszcz M, Potrzebowski W, Zimmerman M D, *et al.* Analysis of solvent content and oligomeric states in protein crystals—does symmetry matter?. *Protein Sci*, 2008, **17**(4): 623–632
- [19] He H, Su W P. Direct phasing of protein crystals with high solvent content. *Acta Crystallogr A Found Adv*, 2015, **71**(Pt 1): 92–98
- [20] Huang H, Li L, Wu C, *et al.* Defining the specificity space of the human SRC homology 2 domain. *Mol Cell Proteomics*, 2008, **7**(4): 768–784

Structural and Functional Analysis of Disruption of The Human Csk Signaling Pathways by Effector Protein BepE From *Bartonella henselae**

ZHANG Ke^{1,2)}, LIU Qing-Bo¹⁾, HU Yong-Lin^{1)**}, WANG Da-Cheng^{1)**}

¹⁾ Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²⁾ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract The vasculotropic pathogenic bacteria *Bartonella henselae* secretes 7 Bep effector proteins (BepA–G) and injects these proteins into host cells using a type IV secretion system. Among these effector proteins, BepD–F contain multiple copies of Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) motifs in their N-terminal regions. After injection into host cells, the tyrosine residues in these EPIYA motifs will be phosphorylated by SFK, and the tyrosine-phosphorylated EPIYA motifs can subsequently interact with various SH2 domain-containing proteins from host cell and interfere with the SH2 signaling pathways of the host cells. In addition to *B. henselae* Bep effector proteins, numerous pathogenic bacteria effector proteins had been identified previously to contain EPIYA motifs. They were also found to utilize their EPIYA motifs to disrupt the SH2-signaling pathways of respective host cells, although they share no obvious overall sequence similarities. In contrast, only 6 proteins containing EPIYA motifs were found in human proteome, much lower than random occurrences, probably due to its toxicity in human cells. JAM-A is one of EPIYA motif containing proteins occurring in blood platelet, which can recruit Csk to avoid thrombus formation. BepE was reported to interact with Csk and disturb Csk-related signaling pathways. Here we reported the crystal structures of complexes between Csk and the phosphorylated EPIYA motifs from BepE and JAM-A, and biophysical measurements of their binding affinities. The complex structures show that Csk binds with two phosphopeptides in a similar way. The Csk SH2 domain binds with phosphotyrosine. Phosphopeptides are perpendicular to β -sheets in SH2 domain. Results of SPR show that the affinity of BepE with Csk is much higher than that of JAM-A. These results suggest that the EPIYA motif of toxic proteins binds with the SH2 domain of human Csk by a higher affinity, then disturb the SH2 domain proteins involved signaling pathways. The results reported here laid a solid foundation for our understanding of the structural basis of how toxic EPIYA motifs interrupt the SH2 signaling pathways of host cells.

Key words *Bartonella henselae*, BepE, EPIYA, Csk, crystal structure

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0290

*This work was supported by grants from The Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences(XDB08020200), the National Laboratory of Biomacromolecules.

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64888548, E-mail: dcwang@sun5.ibp.ac.cn

Received: July 14, 2017 Accepted: October 10, 2017