

领域前沿 · 中国



吴蓓丽, 2006年7月获清华大学博士学位, 2007年至2011年在美国Scripps研究所从事博士后研究工作。2011年入选中国科学院“百人计划”, 现任中国科学院上海药物研究所研究员。吴蓓丽博士一直致力于生物大分子蛋白质的结构生物学研究, 主要利用蛋白质晶体X射线衍射的方法测定蛋白质分子的三维结构, 进而研究其结构与功能关系。吴蓓丽博士在中国科学院上海药物研究所成功建立了一整套GPCR结构生物学研究技术平台, 并利用该平台针对多种重要GPCR蛋白开展结构生物学研究, 已取得突破性进展。目前, 她的研究重点在于深入理解HIV-1病毒共受体CCR5和CXCR4与配体的相互作用模式, 为研发治疗艾滋病的新方法提供基础。2010年和2013年, 吴蓓丽博士先后解析了CXCR4和CCR5的三维晶体结构(Wu *et al.* Science, 2011; Tan *et al.* Science, 2013), 这些结构为深入理解HIV-1病毒感染人体细胞的分子机制, 以及这两种受体与其天然配体的相互作用模式提供了新的线索, 并有助于新型抗HIV-1病毒感染药物的研发。

HIV-1共受体的结构生物学研究

谭秋香 吴蓓丽*

(中国科学院上海药物研究所, 中国科学院受体结构与功能重点实验室, 上海 201203)

据世界卫生组织统计资料显示, 目前全球约有4 000万艾滋病患者, 约占世界人口总数的1/150, 而且该数字还在以每天1.6万的速度递增^[1]。因此, 研发抗艾滋病药物迫在眉睫, 了解人免疫缺陷病毒(艾滋病病毒, human immunodeficiency virus, HIV)的入侵以及感染的机制对于研发抗艾滋病药物尤为重要。目前, 已知HIV-1病毒主要通过病毒表面糖蛋白gp120与细胞表面受体CD4结合, 然后与共受体CCR5或CXCR4相互作用, 引起病毒的另外一种糖蛋白gp41的构象变化, 从而实现病毒入侵^[2-5]。此外, 最近Melikyan等^[6]的研究称, HIV也可能通过内吞的方式进入细胞, 但仍未被证实。为了阐明HIV-1病毒侵入细胞的分子机制, 科学家们进行了大量的研究工作。经过努力, 研究人员在结构生物学领域取得了多项突破, 其中包括gp120与CD4复合物的结构解

析^[7], 而HIV-1病毒共受体CCR5和CXCR4的结构与功能关系一直未能被明确阐明。这两种共受体属于G蛋白偶联受体超家族(G protein-coupled receptor, GPCR), GPCR是人体内最大的受体蛋白家族, 与多种人体疾病密切相关, 超过40%的上市药物以GPCR为作用靶点^[8-9], 其研究价值巨大。但由于GPCR在天然组织中含量极低, 且存在多种功能和构象状态, 因此难以纯化和结晶, 使得其三维晶体结构的解析极具挑战性, 目前国际上仅有少数几个实验室有解析GPCR晶体结构的能力, 这也成为制约以GPCR为靶点的药物研发的重要因素。

早在20多年以前, 科学家们就针对抗艾滋病病毒药物的研发展开了一系列的研究, 主要集中在以下几个方面: (1)抗HIV病毒疫苗的研发; (2)阻断HIV病毒糖蛋白gp120与CD4结合的药物的筛选; (3)利用CCR5缺失型供体进行骨髓移植; (4)研发共受体CCR5或CXCR4的小分子抑制剂。在这些思路中, 人们最先想到的是抗病毒疫苗的研发, 但HIV病毒

*通讯作者。Tel: 021-20239065, E-mail: beiliwu@simm.ac.cn

*Corresponding author. Tel: +86-21-20239065, E-mail: beiliwu@simm.ac.cn

网络出版时间: 2013-10-18 16:33

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20131018.1633.002.html>

变异较快且难以控制, 这给疫苗研发带来了巨大困难; 同时, 由于HIV病毒的感染力强, 即使减活疫苗也可能使接种者感染, 所以接种抗HIV病毒疫苗存在很大的风险^[10-12]。科学家研发出一种风险相对较低的新型抗HIV病毒疫苗, 但它也只能通过一定程度上抑制HIV病毒的复制速度而延缓艾滋病的发病, 并不能完全阻断病毒的传播^[10]。人们也尝试阻断HIV病毒表面糖蛋白gp120与CD4的结合, 研发出一系列gp120的抗体和小分子抑制剂, 但都由于缺乏治疗效果及HIV变异太快而失败^[13]。与此同时, 利用天然CCR5基因缺失型的供体进行骨髓移植成功治疗艾滋病的例子给人们带来了希望, 但CCR5基因自然缺失的人数极少且骨髓移植配对成功率非常低, 限制了这一技术的使用^[14-16]。目前, 仅有的少数成功案例在一定程度上证明了CCR5基因的改变在抑制HIV病毒感染人体细胞的同时不会显著影响机体的其他生理功能, 其他很多研究也证实了这一点^[17-19]。因此, HIV-1的共受体CCR5和CXCR4成为新型抗HIV病毒药物研发的重要靶点, 而其高分辨率三维结构的解析无疑是基于结构的药物研发的首要难题。

为了进一步深入理解HIV病毒感染细胞的分子机制, 同时为抗HIV病毒感染新药研发提供基础, 我们开始着手于HIV-1共受体CXCR4和CCR5的三维结构解析工作。第一个瓶颈是如何提高蛋白稳定性并增加其产量, 为了解决这一难题, 我们尝试了多种方法。首先, 在蛋白纯化和结晶的过程中添加配体分子以稳定受体蛋白的构象。通过对大量配体的筛选, 我们发现小分子拮抗剂IT1t及环肽CVX15对于稳定CXCR4的构象最为有利, 目前唯一上市的口服类抗艾药物Maraviroc(马拉维若)则可有效提高CCR5蛋白的稳定性。受体与配体复合物的三维结构信息可以帮助我们更为直观地理解这些抑制剂分子与受体分子相互作用的机制, 从而指导未来的新型药物研发。其次, 大量实验数据表明, 在GPCR蛋白的第三个胞内Loop(ICL3)区域插入合适的可溶蛋白片段能够显著提高蛋白的热稳定性和产量^[20-21]。经过筛选和优化, 我们发现在CXCR4的ICL3区域插入T4溶菌酶(T4 lysozyme, T4L)能够显著提高其热稳定性, 而在CCR5的ICL3区域插入红素氧还蛋白(Rubredoxin), 效果要显著优于其他6种融合蛋白; 插入位点的选择也直接影响蛋白分子在结晶过程中的

相互作用和堆积, 因此必须找到一个合适的插入位点, 必要时需要通过删除和添加氨基酸改变连接肽段的长度。

另外, 由于受体分子N末端及C末端区域通常活性较大, 截除N端或C端的部分区段也可能有效提高蛋白的稳定性。CXCR4和CCR5的N端在与天然配体趋化因子以及gp120蛋白的结合中发挥重要的作用^[22-30], 我们的筛选实验结果表明, 删除这两种受体蛋白的N末端残基显著降低了蛋白的表达量和稳定性, 而在C末端进行适当截短则可改善蛋白样品的质量, 提高蛋白的稳定性和均一性。除此之外, Roth等^[30]的研究表明, 氨基酸突变也是一种可有效提高GPCR蛋白稳定性的方法, 因此我们采用计算机辅助设计的方法对CXCR4和CCR5的三维结构进行模拟, 选择性地在某些位点进行点突变实验。结果表明, 在CXCR4中氨基酸突变L125W和T240P能够显著提高蛋白的热稳定性; 在CCR5中, C58Y、G163N、K303E、A233D等四个单点突变均能提高蛋白热稳定性, 四个突变组合后则能够达到最佳效果。经过一系列改造之后, 蛋白稳定性得到了充分的提高, 随后通过测定改造后的受体与配体的结合能力, 并与野生型蛋白进行比较, 以确定蛋白分子改造不影响受体分子构象。

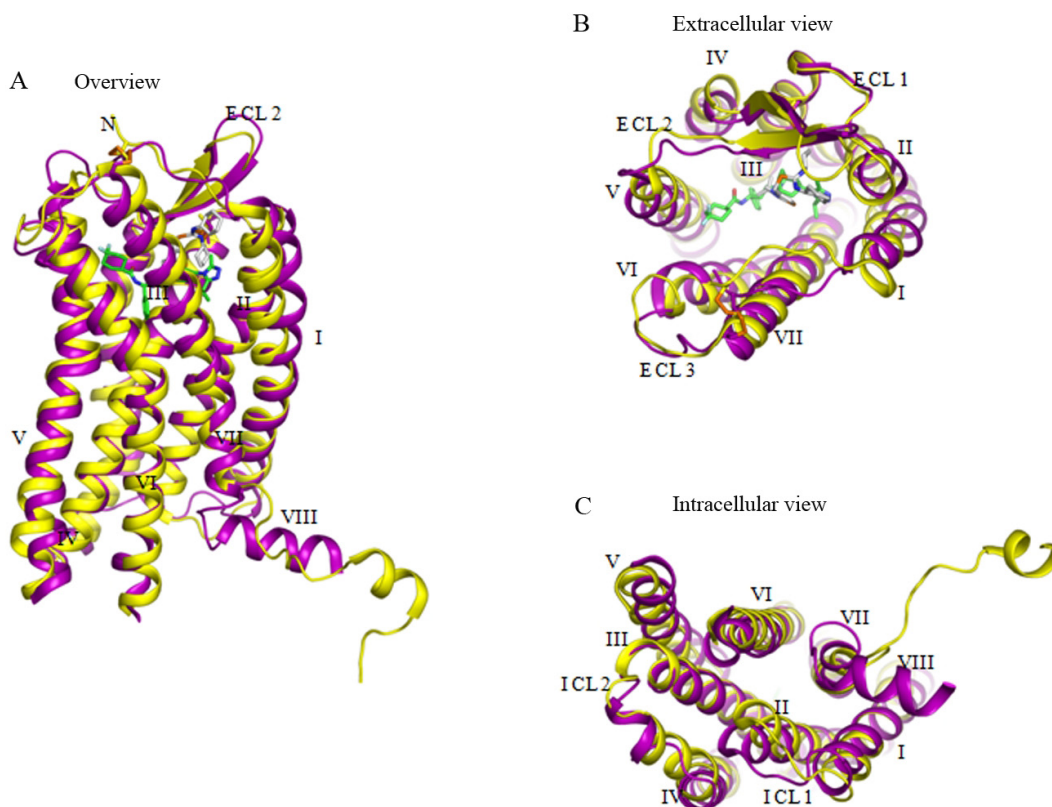
获得了稳定的蛋白样品, 接下来要解决的另一瓶颈问题是蛋白质结晶。我们采用膜蛋白脂立方相(lipidic cubic phase, LCP)结晶技术进行CXCR4和CCR5蛋白质的结晶实验, 模拟膜蛋白的天然脂环境, 进一步提高受体分子的稳定性和结晶能力。此外, 我们利用荧光淬灭恢复(fluorescence recovery after photo-bleaching, FRAP)方法对上万种溶液条件进行高通量筛选, 可大大提高筛选效率。获得初始蛋白质结晶条件后进行细致优化, 最终得到分辨率为2.5~3.2埃的五种CXCR4晶体结构和分辨率为2.7埃的CCR5晶体结构^[19,31]。

比较CXCR4和CCR5的晶体结构, 我们发现这两种共受体整体结构类似(图1), 都具有典型的GPCR七次跨膜螺旋结构和两对保守的二硫键。与其他已知的GPCR结构相比, CXCR4的配体结合位点更加靠近胞外, 配体结合口袋体积更大、开口也更宽。随后解析的CCR5结构显示, 其配体结合口袋比CXCR4的更深、开口更大。不同种类的HIV-1病毒使用不同共受体感染人体细胞, 研究表明, 使用

CCR5的HIV-1病毒主要在病毒传播过程中起作用,以CXCR4作为共受体的HIV-1病毒则在感染后期才会出现,往往导致病情恶化发展成艾滋病^[3,6],两种共受体的配体结合口袋的差异为HIV-1病毒的共受体选择性提供了结构基础。为了进一步深入了解HIV-1病毒对共受体的选择性,我们通过比较CCR5和CXCR4的结构,并搭建了这两种共受体与gp120的第三个可变区——V3 loop(研究表明,V3 loop是HIV-1病毒使用哪种共受体的主要决定因素^[32-33])的复合物模型,发现这两种受体在配体结合区域的一些微小差异可能是造成不同类型HIV-1病毒对共受体具有选择性的主要原因,这些差异包括电荷分布和由氨基酸侧链造成的空间位阻。这些发现帮助我们进一步理解HIV-1病毒的向性(HIV-1 tropism),同时有助于开展针对不同类型HIV-1病毒的新型药物研发。

以往研究表明,CCR5的N端及胞外Loop区域

是CCR5与其天然配体趋化因子和gp120结合的主要位点,在细胞信号传导和HIV-1病毒感染中起着重要作用^[22-27]。而Maraviroc是通过一种变构机制抑制CCR5与趋化因子和gp120的结合^[34-36],但是这种抑制作用的分子机理一直未能被明确阐明。CCR5结构显示,Maraviroc位于受体跨膜螺旋区内部,与CCR5的N端和胞外Loop区无相互作用,其结合位点与人们公认的趋化因子和gp120的主要结合位点没有重叠,这为我们深入理解这种药物分子的变构调节机制提供了依据。此外,CCR5结构证明,Maraviroc作为一种反向激动剂,可将CCR5的构象稳定在一种非活性状态。因此,这种药物分子是通过一种间接性机制达到抵抗病毒感染的目的,通过改变CCR5的构象,使其处于一种HIV病毒非敏感的状态,从而阻断病毒与CCR5的结合,使得病毒无法感染人体细胞。相比之下,CXCR4结构中的抑制剂分子IT1t和CVX15与CXCR4的胞外Loop区紧密



CCR5用洋红色代表,CXCR4用黄色表示,Maraviroc用绿色棍棒表示,IT1t用白色表示。A:侧视图;B:细胞外区域的俯视图;C:细胞内区域仰视图。

CCR5 is shown in magenta, and CXCR4 is in yellow. The ligands are shown in stick representation. Maraviroc in CCR5 and IT1t in CXCR4 have green and white carbons, respectively. A: side view; B: top view of extracellular side; C: bottom view of intracellular side.

图1 CXCR4与CCR5结构的比较

Fig.1 Structure comparison between CXCR4 and CCR5

相互作用,可直接形成空间位阻阻断CXCR4与天然配体CXCL12和gp120的结合,起竞争性抑制作用。CCR5和CXCR4的结构揭示了HIV-1病毒共受体与各自抑制剂分子的相互作用模式,可以帮助人们在分子水平理解这些配体分子的作用机理,有助于在生物学角度进一步研究艾滋病毒,并促进此类作用模式的靶向药物研究。

很多研究表明,CXCR4能够形成同源或异源二聚体^[37-38],并参与调节细胞信号转导。我们的研究发现,虽然分子堆积方式不同,但在五种CXCR4晶体结构中,CXCR4分子都形成一致保守的二聚体结构,首次为GPCR的二聚化研究提供了直接结构依据。而在CCR5的结构中,我们未发现CCR5形成类似的二聚体结构,但有其他研究显示CCR5也是以二聚体的形式与gp120相互作用的^[39-40],因此,CCR5有可能采取其他方式形成二聚体。这些研究结果表明,阻断CXCR4和CCR5形成同源二聚体可能达到抑制HIV-1病毒感染的目的,这为新型抗艾药物的研发提供了新的思路。要完全理解HIV感染的分子机制并攻克艾滋病还有一段很长的路要走。目前,我们已经着手开展下一步的研究工作,进一步深入研究HIV-1病毒共受体与gp120-CD4的作用模式,从结构生物学的角度上更好地理解HIV病毒入侵人体细胞的机制,为新型抗HIV病毒感染药物的研发提供更坚实的结构基础。

参考文献 (References)

- Luo M, Guan YX, Yao SJ. On-column refolding of denatured lysozyme by the conjoint chromatography composed of SEC and immobilized recombinant DsbA. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2011; 879(28): 2971-7.
- Simmons G, Clapham PR, Picard L, Offord RE, Rosenkilde MM, Schwartz TW, *et al.* Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. *Science* 1997; 276(5310): 276-9.
- Murakami T, Nakajima T, Koyanagi Y, Tachibana K, Fujii N, Tamamura H, *et al.* A small molecule CXCR4 inhibitor that blocks T cell line-tropic HIV-1 infection. *J Exp Med* 1997; 186(8): 1389-93.
- Howard OM, Korte T, Tarasova NI, Grimm M, Turpin JA, Rice WG, *et al.* Small molecule inhibitor of HIV-1 cell fusion blocks chemokine receptor-mediated function. *J Leukoc Biol* 1998; 64(1): 6-13.
- Melby T, Westby M. Inhibitors of viral entry. *Handb Exp Pharmacol* 2009; (189): 177-202.
- Miyauchi K, Kim Y, Latinovic O, Morozov V, Melikyan GB. HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes. *Cell* 2009; 137(3): 433-44.
- Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 1998; 393(6686): 648-59.
- Heilker R, Wolff M, Tautermann CS, Bieler M. G-protein-coupled receptor-focused drug discovery using a target class platform approach. *Drug Discov Today* 2009; 14(5/6): 231-40.
- Klabunde T, Hessler G. Drug design strategies for targeting G-protein-coupled receptors. *Chembiochem* 2002; 3(10): 928-44.
- Burton DR, Desrosiers RC, Doms RW, Koff WC, Kwong PD, Moore JP, *et al.* HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nat Immunol* 2004; 5(3): 233-6.
- Klausner RD, Fauci AS, Corey L, Nabel GJ, Gayle H, Berkley S, *et al.* The need for a global HIV vaccine enterprise. *Science* 2003; 300(5628): 2036-9.
- Sekaly RP. The failed HIV Merck vaccine study: A step back or a launching point for future vaccine development? *J Exp Med* 2008; 205(1): 7-12.
- Gottardo R, Bailer RT, Korber BT, Gnanakaran S, Phillips J, Shen X, *et al.* Plasma IgG to linear epitopes in the V2 and V3 regions of HIV-1 gp120 correlate with a reduced risk of infection in the RV144 vaccine efficacy trial. *PLoS One* 2013; 8(9): e75665.
- Stephens JC, Reich DE, Goldstein DB, Shin HD, Smith MW, Carrington M, *et al.* Dating the origin of the CCR5-Delta32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes. *Am J Hum Genet* 1998; 62(6): 1507-15.
- Grimaldi R, Shindo N, Acosta AX, Dourado I, Brites C, de Melo Carvalho O, *et al.* Prevalence of the CCR5Delta32 mutation in Brazilian populations and cell susceptibility to HIV-1 infection. *Hum Genet* 2002; 111(1): 102-4.
- Wilkinson DA, Operskalski EA, Busch MP, Mosley JW, Koup RA. A 32-bp deletion within the CCR5 locus protects against transmission of parenterally acquired human immunodeficiency virus but does not affect progression to AIDS-defining illness. *J Infect Dis* 1998; 178(4): 1163-6.
- Zimmerman PA, Buckler-White A, Alkhatib G, Spalding T, Kubofcik J, Combadiere C, *et al.* Inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5: Studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk. *Mol Med* 1997; 3(1): 23-36.
- Chackerian B, Briglio L, Albert PS, Lowy DR, Schiller JT. Induction of autoantibodies to CCR5 in macaques and subsequent effects upon challenge with an R5-tropic simian/human immunodeficiency virus. *J Virol* 2004; 78(8): 4037-47.
- Wu B, Chien EY, Mol CD, Fenalti G, Liu W, Katritch V, *et al.* Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* 2010; 330(6007): 1066-71.
- Chun E, Thompson AA, Liu W, Roth CB, Griffith MT, Katritch V, *et al.* Fusion partner toolchest for the stabilization and crystallization of G protein-coupled receptors. *Structure* 2012; 20(6): 967-76.
- Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, *et al.* High-resolution crystal structure

- of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 2007; 318(5854): 1258-65.
- 22 Brower ET, Schon A, Klein JC, Freire E. Binding thermodynamics of the N-terminal peptide of the CCR5 coreceptor to HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *Biochemistry* 2009; 48(4): 779-85.
- 23 Dettin M, Zanchetta M, Pasquato A, Borrello M, Piatier-Tonneau D, Di Bello C, *et al.* CCR5 N-terminus peptides enhance X4 HIV-1 infection by CXCR4 up-regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 307(3): 640-6.
- 24 Dragic T, Trkola A, Lin SW, Nagashima KA, Kajumo F, Zhao L, *et al.* Amino-terminal substitutions in the CCR5 coreceptor impair gp120 binding and human immunodeficiency virus type 1 entry. *J Virol* 1998; 72(1): 279-85.
- 25 Blanpain C, Doranz BJ, Vakili J, Rucker J, Govaerts C, Baik SS, *et al.* Multiple charged and aromatic residues in CCR5 amino-terminal domain are involved in high affinity binding of both chemokines and HIV-1 Env protein. *J Biol Chem* 1999; 274(49): 34719-27.
- 26 Doranz BJ, Lu ZH, Rucker J, Zhang TY, Sharron M, Cen YH, *et al.* Two distinct CCR5 domains can mediate coreceptor usage by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1997; 71(9): 6305-14.
- 27 Farzan M, Choe H, Vaca L, Martin K, Sun Y, Desjardins E, *et al.* A tyrosine-rich region in the N terminus of CCR5 is important for human immunodeficiency virus type 1 entry and mediates an association between gp120 and CCR5. *J Virol* 1998; 72(2): 1160-4.
- 28 Rabut GE, Konner JA, Kajumo F, Moore JP, Dragic T. Alanine substitutions of polar and nonpolar residues in the amino-terminal domain of CCR5 differently impair entry of macrophage- and dualtropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1998; 72(4): 3464-8.
- 29 Horejsh D, Ruckwardt TJ, David Pauza C. CXCR4-dependent HIV-1 infection of differentiated epithelial cells. *Virus Res* 2002; 90(1/2): 275-86.
- 30 Roth CB, Hanson MA, Stevens RC. Stabilization of the human beta2-adrenergic receptor TM4-TM3-TM5 helix interface by mutagenesis of Glu122(3.41), a critical residue in GPCR structure. *J Mol Biol* 2008; 376(5): 1305-19.
- 31 Tan Q, Zhu Y, Li J, Chen Z, Han GW, Kufareva I, *et al.* Structure of the CCR5 chemokine receptor-HIV entry inhibitor maraviroc complex. *Science* 2013; 341(6152): 1387-90.
- 32 Lin G, Baribaud F, Romano J, Doms RW, Hoxie JA. Identification of gp120 binding sites on CXCR4 by using CD4-independent human immunodeficiency virus type 2 Env proteins. *J Virol* 2003; 77(2): 931-42.
- 33 Cashin K, Roche M, Sterjovski J, Ellett A, Gray LR, Cunningham AL, *et al.* Alternative coreceptor requirements for efficient CCR5- and CXCR4-mediated HIV-1 entry into macrophages. *J Virol* 2011; 85(20): 10699-709.
- 34 Garcia-Perez J, Rueda P, Alcamí J, Rognan D, Arenzana-Seisdedos F, Lagane B, *et al.* Allosteric model of maraviroc binding to CC chemokine receptor 5 (CCR5). *J Biol Chem* 2011; 286(38): 33409-21.
- 35 Thiele S, Steen A, Jensen PC, Mokrosinski J, Frimurer TM, Rosenkilde MM. Allosteric and orthosteric sites in CC chemokine receptor (CCR5), a chimeric receptor approach. *J Biol Chem* 2011; 286(43): 37543-54.
- 36 Bernard L C-PJ, Kellenberger E. Modeling the allosteric modulation of CCR5 function by Maraviroc. *Drug Discov Today Technol* 2013; 10(2): e219-314.
- 37 Kofuku Y, Yoshiura C, Ueda T, Terasawa H, Hirai T, Tominaga S, *et al.* Structural basis of the interaction between chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12 and its G-protein-coupled receptor CXCR4. *J Biol Chem* 2009; 284(50): 35240-50.
- 38 Hammad MM, Kuang YQ, Yan R, Allen H, Dupre DJ. Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor-1 is involved in chemokine receptor homodimer CCR5 internalization and signal transduction but does not affect CXCR4 homodimer or CXCR4-CCR5 heterodimer. *J Biol Chem* 2010; 285(45): 34653-64.
- 39 Issafras H, Angers S, Bulenger S, Blanpain C, Parmentier M, Labbe-Jullie C, *et al.* Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors. *J Biol Chem* 2002; 277(38): 34666-73.
- 40 Springael JY, Urizar E, Parmentier M. Dimerization of chemokine receptors and its functional consequences. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16(6): 611-23.