

17 Pawson T. Protein modules and signalling networks. *Nature*, 1995, **373**: 573~ 580

18 Waksman G, Kominos D, Robertson S *et al.* Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH2 of v-src complexed with tyrosine-phosphorylated peptides. *Nature*, 1992, **358**: 646~ 653

Structural Basis of Protein Phosphorylation. LI Lin (*Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai*

200031, China).

Abstract Protein reversible phosphorylation is critically involved in regulation of almost every cellular process. Several factors which influence or determine the specificity of protein kinases and the structural aspects of regulation of protein by phosphorylation are mainly discussed.

Key words protein phosphorylation , specificity, structural basis, regulation

神经生长因子结构与功能研究进展

俞萍 柳川 王会信

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 神经生长因子 (NGF) 是神经营养因子家族的典型代表, 它控制着脊椎动物周围和中枢神经系统中部分神经元的发育和存活. NGF 的三维结构是以“胱氨酸结”和 β 折叠为基础, 它以二聚体的形式结合细胞表面的受体从而发生生物学效应. 参与这些反应的氨基酸残基已通过化学修饰和定点突变法加以确定, 这有助于更进一步理解其结构与功能的关系.

关键词 神经生长因子, 结构, 功能, 基因突变, 化学修饰

阐明蛋白质和酶的结构与功能的相互关系必须精确了解其空间结构及识别作用底物的活性中心基团, 蛋白质的三维结构可以通过 X 射线晶体衍射方法进行研究, 活性中心基团则可以用传统的化学修饰法和现在常用的定点突变法得以确定. 这些实验方法和手段为我们提供了更多更新的结构与功能的信息.

小鼠颌下腺神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 是最早发现的生长因子之一, 很久以前就对其进行过大量的化学修饰实验, 得出了许多零星散在的研究结果. 直到前不久阐明了 NGF 的空间结构才使我们对它的结构与功能有了系统的了解. 近几年 Ibanez 等利用基因工程技术进一步研究了 NGF 结构与活性的关系, 使我们逐步对其结构和功能的相关性有了更深入更完整更丰富的认识.

1 NGF 的三维结构和“胱氨酸结”超家族

神经生长因子最早是从小鼠颌下腺中分离纯化的, 其活性功能中心是同源 β 二聚体, 即 β NGF, 每个单体由 118 个氨基酸残基组成, 含三对分子内二硫键. 1991 年 McDonald 等^[1]成功地用 X 射线衍射方法分析了 NGF 分子的三维结构. NGF 富含 β 折叠, 每个单体的折叠由三条伸长的扭曲的反平行的 β 折叠形成. 整个分子呈长形, 有一个平的疏水性很强的表面, 该表面使两个亚基头对头由疏水的非共价作用连结形成二聚体. 这些连结位于分子的上、中、下三个区域, 由芳香性残基和三个二硫键起主导作用. 每个单体的上部是三个 β 发

收稿日期: 1996-10-03, 修回日期: 1997-02-03

夹环；分子的中部是二硫键核心，这个二硫键的拓扑结构很特别，两个二硫桥 Cys58-Cys108、Cys68-Cys110 和内部的残基 59~ 67 及 109 形成一个环结构，第三个二硫桥 Cys15-Cys80 穿过该环形成一个紧密包裹的“胱氨酸结”。这与转化生长因子 (TGFβ2)、血小板衍生生长因子 (PDGF-BB) 和人绒毛促性腺激素 (hCG) 的基本空间结构极其相似，都具有“胱氨酸结”基元和 β 片层形成的不对称折叠，它们组成了“胱氨酸结”超家族。但是它们亚基间的组合和亚基内的键合形式不同，从而活化不同的受体，转导不同的信号通路^[2,3]；NGF 分子的底部在 58~ 68 残基区域有三个相邻的反向转角，在神经营养因子家族中，很多可变残基位于转角区，它们可能是与特异受体作用的位点。另外在电子密度图谱上不能确定端区 (包括 1~ 10 和 112~ 118 的残基) 和环区 43~ 48 残基的结构，说明这些残基在晶体结构中具有柔性。

2 神经营养因子家族及其相关的受体

NGF 是神经营养因子家族中的典型代表，该家族成员还包括 BDNF、NT-3、NT4/5 和 NT6^[4]，它们在中枢和周围神经系统中起存活和分化效应。在氨基酸序列上具有高度的同源性，其生物学活性形式均为非共价连接的同源二聚体，具有相似的生物学活性，都与低亲和力受体 p75 相互作用，但是与高亲和力受体 Trk 家族的反应各不相同 (表 1)。

表 1 神经营养因子与其受体的作用	
受 体	配 体
p140trkA	NGF, NT3
p145trkB	BDNF, NT4/5, NT3
p145trkC	NT3
p75	NGF, BDNF, NT3, NT4/5

高亲和力受体 HNGFR-TrkA 是原癌基因产物，具有 Tyr 激酶区结构，与 NGF 结合后可使 Tyr 发生磷酸化，产生信号转导，决定其

在靶细胞上发生生物学效应^[5]。

许多实验表明低亲和力受体 LNGFR-p75 不能传递神经分化增殖的信号，但是最近的研究表明它可导致程序性细胞死亡 (细胞凋亡)，这可能是由于受体的胞外区与 TNF 的受体 p55 和淋巴细胞表面抗原 CD40 具有相关性^[6]。

p75 的功能是增加 NGF 与 TrkA 结合的亲和力，增强 TrkA 的自身磷酸化作用，从而影响信号转导。p75 的潜在作用可能是增加 NGF 或 NTs 在细胞表面的有效浓度来增强与 Trk 的结合，或是引起 Trk 构象的改变从而有利于结合 NGF 和信号转导功能^[7]。NGF 结合 p75 能引起鞘磷脂水解成神经酰胺，这可能产生有利于结合 TrkA 的膜环境，引起由 TrkA 介导的信号转导。

3 NGF 的结构与功能

传统的化学修饰法在研究蛋白质的结构与功能的相互关系上具有一定的局限性，它不像基因突变法可以进行任何氨基酸残基的取代，所以它已逐步被定点突变法所替代。但是它有一个主要的优点，即它是在完整蛋白上进行，不需要经过蛋白质的变性复性。这两种方法在研究 NGF 的结构与功能的关系上为我们提供了比以往更多的信息。

小鼠 NGF 包含 8 个 Lys 残基，其中 4 个聚集在分子的顶部。对 Lys 残基进行的许多化学修饰产生了稳定的具有活性的衍生物。Ibanez 等对单个 Lys 残基取代进行了详细研究，发现 Lys32、Lys34 和 Lys95 参与与 p75 的接触，它们的突变体与 p75 结合力显著下降而不影响与 TrkA 的结合，因而也不影响其体外的生物学活性。说明这三个带正电荷的残基对结合低亲和力受体 p75 是必需的，而对结合活化 TrkA 受体和其介导的 NGF 生物学效应不是必需的。

小鼠 NGF 包含 7 个 Arg 残基，它们位于分子表面，NGF 的晶体结构表明：Arg69 和 Arg100 的侧链分别与 Asp16 和 Thr91 形成内

部氢键, 是主要的结构顺序. 用定点突变法确定了两个特异性的 Arg 残基, Arg100 被 Lys 取代后的突变体与受体结合力和生物学活性没有显著变化. 而当 Arg100 和 Arg103 都被 Gly 取代后, 其结合力和活性都降低 90% 以上, 这些结果说明 Arg 残基起结构作用, 不直接参与受体的相互作用.

小鼠 NGF 包含 4 个 His 残基, 其中两个位于 N 端前 8 个残基中. 定点突变技术显示 His4 对高亲和力受体结合是必需的, 是 TrkA 的磷酸化位点^[8]. 其余两个 His 残基位于 75 和 84 位, His75 侧链与 Asp72 以氢键相连, 有利于稳定这个区域的构象; His84 直接参与结合 TrkA.

除以上带电荷残基外, 小鼠 NGF 中还分布着 12 个侧链带羧基的氨基酸残基, 其中有三个已知结构作用的 Asp 残基, Asp16、Asp72 和 Glu55 的侧链分别与 Arg69、His75 和 Lys25 形成氢键, Asp30 参与稳定 30~34 环区结构. Ibanez 用定点突变法修饰三个含羧基 (Asp24、Asp30 和 Glu35) 的侧链, 它们对受体的结合和生物学活性没有显著影响.

NGF 包含 2 个 Tyr 和 3 个 Trp 的芳香性氨基酸残基. Tyr52 和 3 个 Trp 都参与二聚体表面芳香性残基的堆积, Tyr52 与另一单体的 Phe101 相接触. Drinkwater 用 Phe、Leu 取代 Trp21 的衍生物具有全部的生物学活性, 只是与 p75 受体的结合力下降. Ibanez 将每个 Trp 用 Phe 取代后的突变体也都具有生物学活性和受体结合力.

利用水解切割和定点突变使 NGF 缺失氨基端前 10 个氨基酸残基, 缺失体显著降低了与 TrkA 的结合力和生物学活性^[9]. N 端区由于其柔韧性所以是受体的接触区; NGF 的 C 端缺失也影响活化 TrkA 和诱导 PC12 细胞分化的能力, 说明 C 端可能参与 TrkA 的非特异性反应.

研究发现, 以下氨基酸残基介导 NGF 与 TrkA 的相互作用, 这包括 N 端的 3~9、I 区的 Ile31、II 区的 Glu41、Asn45、IV 区的

Tyr79、Thr81、His84 和 V 区的 94~98 残基, 它们对结合 TrkA 及生物学活性非常重要. 尽管与 TrkA 受体作用的结合位点的氨基酸残基分布不连续, 但从 NGF 的三维结构来看, 这些残基集中在 NGF 二聚体的一端, 形成一个与分子二重轴平行的连续的伸长的表面, 两个对称表面提供了一个配体介导的受体的二聚化的模型, 位于二聚体一边 β 折叠的保守残基为 TrkA 的接触提供了最大的结合能量, 而在转角和环区处的可变残基决定了其生物学特异性.

4 NTs 及其突变体的结构与功能

科学家在研究神经营养因子 (neurotrophins, NTs) 的结构与功能关系中已确定了对结合 p75 和 Trk 受体有重要贡献的氨基酸残基, 它们主要位于蛋白质的可变区 (表 2). 其可变区序列分为七个不同区域: 氨基端区 (包括残基 1~9)、羧基端区 (包括残基 111~118)、环区 I、II、III、IV 和 V (分别包括残基 23~25、40~49、59~66、79~88 和 94~98).

将神经营养因子不同可变区进行互换构建了不同的嵌合体, 通过研究它们的特性可以阐明其结构与功能的关系. Suter^[10] 和 Ibanez 在两个不同的实验室将 BDNF 的五个可变区的十几个连续氨基酸残基取代到 NGF 的相应区产生不同的 NGF 嵌合体, 这些嵌合体在鸡胚背根神经节、交感神经元和 PC12 细胞中都保持 NGF 的生物学活性, 同时在结状神经节分离块中具有 BDNF 样的活性, 显示了两种分子的特性. 最近研究表明 NGF/BDNF 嵌合体具有协同作用, 可以促使前脑基底胆碱能神经元的存活, 比 BDNF 的活性高 100 倍.

1994 年 Ilag 等^[11] 将 NGF、NT-3 和 NT-4 的可变环区 II 进行互换形成能活化两种不同 Trk 受体的嵌合体, 在不同效应的神经元上具有广泛的生物特异性. NGF 的可变 II 区残基可使 NT-3 嵌合体活化 TrkA. 利用定点突变技术将 NGF II 区的 43、44、45、48、49 残基

取代入 NT-3 中产生的突变体也具有 NGF 样的生物学活性; 将 NGF 的 N 端取代入 NT-3 的相应区形成的嵌合体可使胚胎交感神经元存活, 获得结合活化 TrkA 的特性, 这些结果都显示 NGF 的可变 II 区和 N 端对结合活化 TrkA 的特异性是重要的. 而具有 BDNF N 端的 NGF 嵌合体没有获得活化 TrkA 的特性, 说明 N 端在不同的神经营养因子中起不同的作用.

此后 Ilag 等^[12] 将 NGF 的 N 端 1~ 9 残基, BDNF 可变 V 区的 94~ 98 残基取代到 NT-3 的相应区域构建了 PNT-1 嵌合体, 该分子比 NT-3 具有更多的高亲和受体的结合位点. PNT-1 可以有效阻断 NGF、BDNF 及 NT-3 和其相应受体的化学交联, 在神经细胞和非神经细胞中具有结合 TrkA、TrkB 和 TrkC 的能力. PNT-1 是多功能的神经营养因子, 具有临床应用价值.

最近 Ryden 等^[13] 将 NT-3 的 Arg31 和 His33 被 Ala 取代产生 NT-3 突变体, 在研究这两个带正电荷的氨基酸残基与 TrkC 和 p75 的作用中发现, 该突变体与 p75 的结合力下降而不影响与 TrkC 的作用, 这点类似于 NGF 的 Lys32 和 Lys34 的作用. 同时意外发现它与 TrkA 和 TrkB 的结合能力减弱. 这些结果说明: 这两个残基在 NT-3 与 p75、TrkA 和 TrkB 的结合中起重要作用, NT-3 与这三种受体的结合活化是通过一个共同的结构决定簇起作用的, 这不同于与 TrkC 的作用. 但是它与 TrkA 和 TrkB 的作用方式不同于 NGF 和 BDNF 对 TrkA 和 TrkB 的结合活化, 因为在 BDNF 相应区缺乏这些带正电荷的残基, 而在其环区结构上有 Lys95、Lys96 和 Arg97, 它们相当于 NT-3 的 Arg31 和 His33^[14].

表 2 对神经营养因子结合 Trk 和生物学活性有重要贡献的氨基酸残基

测定的不同 结构区域	不同的神经营养因子			
	NGF	BDNF	NT-3	NT-4
氨基端区	1~ 8, His4	—	Arg8, Tyr11	—
环区 I	23~ 25, Ile31	26~ 35	Thr22	—
环区 II	40~ 49, Glu41 Asn43, Ile44 Asn45, Val48 Phe49	45~ 49	39~ 48	42~ 53
环区 III	—	—	—	—
环区 IV	79~ 88	79~ 88	Lys80, Gln83	—
环区 V	94~ 98	Lys95, Lys96 Arg97	—	—
羧基端区	112~ 118	—	—	—
保守氨基 酸残基	Val21, Arg99 Arg102	—	Glu10, Tyr51 Glu54, Arg56 Arg103, Asp15	—

注: “—” 表示没有被识别的氨基酸残基.

神经营养因子家族中的各个成员结构相似提示它们是从同一个前体分子进化而来.

它们在结合不同 Trk 中可能具有共同的结构决定簇, 该决定簇由其保守残基或氨基酸主链

提供, 其可变区残基的差异表现了各个神经营养因子的特异活性, 从而导致同一个神经营养因子结合不同的 Trk (如 NT-3), 而不同的神经营养因子结合同一个 Trk (如 BDNF). 对神经营养因子嵌合体和突变体的研究不仅可以深入理解其结构与功能的关系, 而且可以为构建新型的具有特异功能的分子开创一个新局面.

5 结 语

NGF 最初是 40 多年前发现的, 是认识最详细的生长因子之一, 对其结构与功能关系的研究有利于阐明 NGF 作用的分子基础, 帮助我们设计具有临床应用价值的神经营养因子的拮抗剂和非肽类药物.

参 考 文 献

1 McDonald N Q, Lapatto R, Murray-rust J *et al.* New protein fold revealed by a 2.3 Å resolution crystal structure. *Nature*, 1991, **354**: 411~ 415

2 Schlunegger M P, Grutter M G. Refined crystal structure of hTGFβ2 at 1.95 Å resolution. *J Mol Biol*, 1993, **231**: 445 ~ 458

3 Laphorn A J, Harris D C, Littlejohn A *et al.* Cystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature*, 1994, **369**: 455~ 461

4 Gotz R, Koster R, Winkler C *et al.* NT-6 is a new member of NGF family. *Nature*, 1994, **372**: 266~ 269

5 Mahadeo D, Kaplan L, Chao M V *et al.* High affinity NGF binding displays a faster rate of association than Trk binding. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 6884~ 6891

6 Rabizadeh S, Oh J, Zhong L T *et al.* Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science*, 1993, **261**: 345 ~ 348

7 Chao M V, Hempstead B L. p75 and Trk: a two-receptor system. *TINS*, 1995, **19**: 321~ 326

8 Shih A, Laramée G R, Schmelzer C H *et al.* Mutagenesis identifies amino-terminal residues of NGF necessary for Trk receptor activity. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 27679~ 27686

9 Woo S B, Timm D E, Neet K E. Alteration of NH₂-terminal residues of NGF affects activity and Trk binding without

affecting stability or conformation. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 6278~ 6285

10 Suter U, Angst C, Tien C L *et al.* NGF/BDNF chimeric proteins analysis of neurotrophin specificity by homolog-scanning mutagenesis. *J Neurosci*, 1992, **12**: 306~ 318

11 Ilag L L, Lonnerberg P, Persson H *et al.* Role of variable β hairpin loop in determining biological specificities in neurotrophin family. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 19941~ 19946

12 Ilag L L, Lonnerberg P, Persson H *et al.* Par neurotrophin 1: A genetically engineered neurotrophic factor displaying multiple specificities in peripheral neurons *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 607~ 611

13 Ryden M, Ibanez C F. Binding of neurotrophin 3 to p75, TrkA, TrkB mediated by a single functional epitope distinct from that recognized by TrkC. *J Biol Chem*, 1996, **271** (10): 5623~ 5627

14 Robinson R C, Radziejewski C, Stuart D I *et al.* Structure of the BDNF/NT-3 heterodimer. *Biochemistry*, 1995, **34**: 4139~ 4146

Progress in the Studies of Structure and Function of Nerve Growth Factor. YU Ping, LIU Chuan, WANG Huixin (*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

Abstract Nerve growth factor (NGF) is the prototype of a family of neurotrophins (NTs), which control the development and maintenance of some vertebrate neurons in the peripheral and central nervous system. The three-dimensional structure of NGF is based on the cystine knot and β strands. It binds as a dimer to cell-surface receptors and shows its biological response. Residues involved in these interactions have been identified by chemical modification and site-directed mutagenesis. They have substantially advanced knowledge of NGF structure and function.

Key words nerve growth factor, structure, function, site-directed mutagenesis, chemical modification