

睫状神经营养因子突变体的设计及活性分析*

毕 华^{1)**} 岳俊杰²⁾ 袁力勇¹⁾ 饶春明¹⁾ 陈惠鹏²⁾ 王军志¹⁾

(¹⁾中国药品生物制品检定所生化室, 北京 100050; ²⁾军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

摘要 利用计算机分子模拟系统建模了 CNTFR α 的三维结构, 并对 CNTF 与 CNTFR α 结合的关键部位进行分析, 同时综合了同源比较的结果及 CNTF 分子自身的特点, 设计了 2 个 CNTF 的突变体 A 和 B. 表达纯化后得到目的蛋白, TF-1 细胞增殖实验的结果表明, 2 个突变体蛋白的比活性均达到 10^6 U/mg 的水平, 且 A 的活性大于 B 的活性. 上述结果初步表明设计的合理性, 为其进一步的开发和应用奠定了基础.

关键词 计算机分子模拟, 表达, 纯化, 睫状神经营养因子突变体

学科分类号 Q71

睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)是分子质量为 22~26 ku 的酸性蛋白质. 因为最初是从鸡的睫状体中提取出来, 并可维持鸡副交感神经节的存活而得名. 经研究发现, CNTF 具有多种功能, 在神经系统, 肌肉系统, 肥胖症及其相关疾病的治疗中具有重要意义, 具有广阔的临床开发前景^[1~3]. 天然序列的 CNTF 蛋白因为其副作用比较大, 在临床应用上受到一定的限制. 为了找到更为安全有效的 CNTF, 人们致力于其突变体的研究. 本实验从建模能与 CNTF 特异性结合部位, 决定哪些细胞对 CNTF 有反应的 CNTFR α 的结构入手, 构建出 CNTF/CNTFR α 复合物的模型, 分析 CNTF 与 CNTFR α 之间众多的特异相互作用, 以及参与这些相互作用的氨基酸残基. 对分析中获得的参与受体结合的氨基酸残基进行研究, 再与 hCNTF 的同源序列相互比较来确定 hCNTF 分子中真正的关键受体结合和活性位点, 设计了 2 个 CNTF 的突变体 A 和 B. CNTF(A): 第 17 位半胱氨酸变为丝氨酸, 53 位的丙氨酸变为缬氨酸, 并去掉 C 端的 16 个氨基酸; CNTF(B): 第 17 位半胱氨酸变为丝氨酸, 第 35 位的苏氨酸变为甲硫氨酸, 第 178 位的苯丙氨酸变为缬氨酸, 并去掉 C 端的 16 个氨基酸. 我们利用原核表达体系表达, 纯化后得到 2 种突变体蛋白的纯品, 经 TF-1 细胞增殖实验测定它们的活性并与天然序列的 CNTF 突变体蛋白活性相比较.

1 材 料

1.1 晶体结构及氨基酸序列的数据库检索

CNTF 的晶体结构、IL-6 的晶体结构、IL-6R 的晶体结构及 IL-6-IL-6R 的晶体结构取自蛋白质结构数据库(PDB).

hCNTF, hCNTFR α , hIL-6, hIL-6R, 鼠 CNTF, 鸡 CNTF, 猪 CNTF, 兔 CNTF 等的氨基酸序列取自 NCBI 蛋白质序列数据库.

1.2 质粒, 菌株, 培养基

表达载体 pThioHisA, 质粒 pThioHisA-CNTF, 宿主菌 DH5 α 株和 BL21(DE3)为本室保存. 胎牛血清购自杭州四季青公司, DMEM 培养基购自 Hyclone 公司.

1.3 纯化介质及设备

Q Sepharose Fast Flow, Sephadex G-25 购自 Pharmacia 公司; 蛋白质纯化系统为 AKTA explorer P-900, Amersham Pharmacia Biotech 公司.

2 方法和结果

2.1 三维结构的建模

2.1.1 hCNTFR α 空间结构的建模.

进行 CNTF 的分子设计, 需要 CNTF-

*国家高技术研究发展计划资助项目 (2003AA2Z3480).

** 通讯联系人. Tel: 010-67095684, E-mail: bihua9418@126.com

收稿日期: 2006-09-01, 接受日期: 2006-09-30

CNTFR α 复合物空间结构的知识. 目前的情况, PDB 数据库中并没有 CNTF- CNTFR α 复合物的空间结构信息. 但是 CNTF 的晶体结构已经得到解析, 而且与 CNTFR α 同源的 IL-6R 的结构也得到了解析, 所以可以 IL-6R 的结构为模板, 模建 CNTFR α 的结构, 从而得到 CNTF- CNTFR α 复合物的空间结构.

经过数据库搜索和序列比较, 发现, PDB 数据库中 with CNTFR α 序列同源性最高的是 IL-6R, 它们的序列同源性是 30%, 可以 IL-6R 的晶体结构为模板来模建 CNTFR α 的三维结构.

模建采用的程序是 MODELER. 该程序是近来由 Sali^[6,7]发展的一种新的蛋白质结构同源模建方法. 该方法首先从参考蛋白质结构中抽取出一些空间制约条件, 如键长、键角、 α 碳原子之间间距和主链及侧链二面角等, 将这些制约条件用几率密度函数 (probability density functions, PDFs) 来表示, 然后根据氨基酸类型、等位残基的主链构象和序列之间局部的相似程度而对空间制约条件施加以不同的权重因子. 模建时将几率密度函数应用到未知结构蛋白质序列上, 通过优化分子的几率密度函数使制约条件有最小的冲突而得到目标蛋白的三维结构, 整个优化过程通过分子力学和分子动力学模拟来实现. 利用同源模建技术模拟蛋白质的结构时, 参考蛋白与目标蛋白的同源性越高, 得到的结果越可靠.

所有计算工作均使用了 BIOSYM/MSI 分子模拟系统, 采用的是 Insight II 软件包 (version 2000), 序列搜索程序是 FASTA3.0. 所用的计算机是 SGI Origin 300 图形工作站. 结果见图 1.



Fig. 1 Modeled the structure of CNTFR α

2.1.2 CNTF 突变体的分子设计.

a. CNTF- CNTFR α 复合物结构模型的初步建立

在以 IL-6R 的结构为模板, 模建了 CNTFR α 的结构之后. 利用这个模建的 CNTFR α 结构, 以及数据库中存放的已经测定的 CNTF 的结构, 我们可以建立 CNTF- CNTFR α 复合物的模型. 经过数据库搜索, 利用已知的 IL-6-IL-6R 的复合物结构为参考模型, 采用了结构叠合的方法, 即 CNTF 的结构向复合物中的 IL-6 分子, CNTFR α 向复合物中的 IL-6R 分子做结构叠合, 叠合时以分子的主链结构作为结构比较对象^[8], 搭建初始的 CNTF- CNTFR α 复合物的模型. 之后, 在 Discover 模块下进行模型的优化, 力场选用 CVFF. 优化采用分子力学的方法, 先用最陡下降法, 后用共轭梯度法. 将优化后的模型作为我们建立的 CNTF- CNTFR α 复合物结构的初步模型 (图 2).

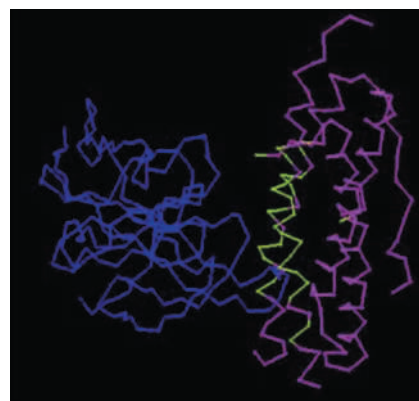


Fig. 2 The sketch map of CNTF-CNTFR α

The blue part shows the bone structure of C α in CNTFR α , the purple part is the bone structure of C α in CNTF. The whole figure displays the structure of CNTF-CNTFR α . The green part reveals the important part of CNTF participating in interaction with CNTFR.

b. CNTF 与受体结合部位的确定及 CNTF 的分子设计

利用建立的 CNTF- CNTFR α 复合物结构模型, 分析 CNTF- CNTFR α 的作用情况, 以大致了解 CNTF 分子中负责与受体结合的区域.

方法是先计算复合物结构模型中 CNTF 与 CNTFR α 残基的距离, 根据残基的距离判定该残基是否参与了分子间作用. 经过考察残基后, 确定 CNTF 与受体结合的区域主要在螺旋 D、ABloop 和螺旋 A (图 3).

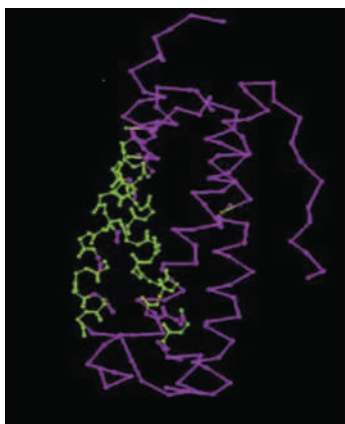


Fig. 3 The sketch map of CNTF and determined crucial site
The purple part represents the bone structure of $\text{C}\alpha$ in CNTF, the green part is the important part of interaction with CNTFR conformed by analysis.

根据上述对 CNTFR α 及 CNTF-CNTFR α 的分子模拟, 并参照兔、鸡、猪的 CNTF 序列, 可以基本确定 CNTF 分子中与受体结合的重要氨基酸区域. 同时结合 CNTF 自身序列的特点, 考虑到表达蛋白的稳定性、溶解性及免疫原性, 设计 2 个突变

体. CNTF(A): 第 17 位半胱氨酸变为丝氨酸, 第 53 位的丙氨酸变为缬氨酸, 并去掉 C 端的 16 个氨基酸; CNTF(B): 第 17 位半胱氨酸变为丝氨酸, 第 35 位的苏氨酸变为甲硫氨酸, 第 178 位的苯丙氨酸变为缬氨酸, 并去掉 C 端的 16 个氨基酸.

2.2 表达纯化

利用本室已有的 pThioHisA-CNTF 质粒, 采用重叠延伸 PCR 的方法, 得到目的基因, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 以 IPTG 进行表达. 稀释复性, 纯化采用离子交换和分子筛相结合的方法. 结果目的蛋白的表达量在 30% 左右, 纯化后的 HPLC 纯度达到 95% 以上.

2.3 突变体蛋白质活性测定

采用 TF-1 细胞, 利用 CNTF 蛋白对其增殖效应进行检测. 方法参考文献[5], 但实验中采用的是 MTT 测定法, 而不是放射性同位素标记法. CNTF 标准品购自 NIBSC. 经多次测定得到的结果为: CNTF(A)的比活性不低于 2.0×10^6 U/mg, CNTF(B)的比活性不低于 1.7×10^6 U/mg (图 4).

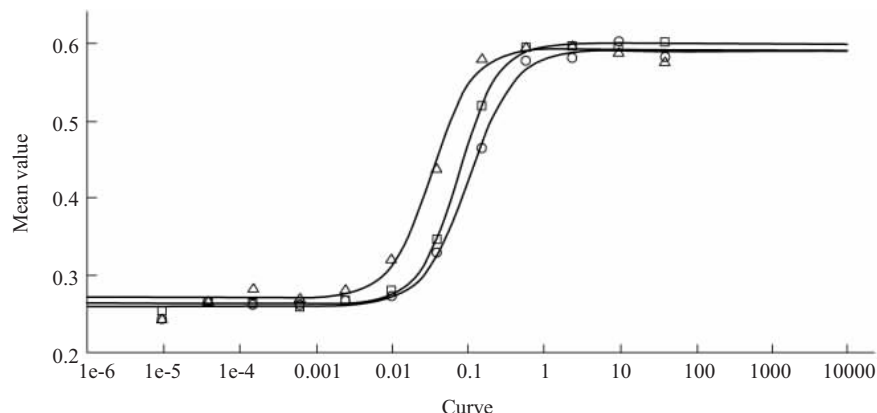


Fig. 4 CNTF mutant effect on TF-1 proliferation

○—○: Standards; □—□: CNTF(A); △—△: CNTF(B).

3 讨 论

本实验采用生物信息学技术, 用计算机同源模拟的方法模拟 CNTF 以及 CNTFR α 等蛋白质的空间结构和结合情况. 目前的研究情况是 CNTF 的晶体结构有明确的解析, 并收录在 PDB 数据库中. 但是, CNTFR α 完整的晶体结构及 CNTF-CNTFR α 的晶体结构则无解析. 要研究两者之间的相互作用, 就要从能够与 hCNTF 结合并且能引起信号转导的其他相关分子入手. CNTF 与 IL-6 在结构上极

为相似, 同属四环 α 螺旋型细胞因子, 有文献报道 hCNTF 可以与 IL-6R 相结合并引起 gp130 和 LIFR 的二聚化而引起信号转导^[9]. hCNTF 在不表达 CNTFR 的肝细胞中引起的急性时相反应就是因为激活了 IL-6R, gp130 和 LIFR 的受体复合物^[10]. 经过数据库搜索和序列比较, 确定以 IL-6R 的晶体结构为模板来模建 CNTFR α 的三维结构, 以 IL-6-IL-6R 的晶体结构模建 CNTF-CNTFR α 的晶体结构.

总之, 本实验在设计上综合了计算机同源模

建、蛋白质的同源序列分析及 CNTF 蛋白本身的溶解性、稳定性及免疫原性等性质的分析, 设计、表达、纯化的 CNTF(A)和 CNTF(B)经活性实验结果表明, 具有较高的生物学活性, 这必将为合理地控制 hCNTF 信号转导及设计用于人类疾病治疗的 hCNTF 药物提供重要线索, 为临床上发现更高活性、更低副作用的 CNTF 蛋白提供思路, 并为其今后的开发利用奠定基础。

参 考 文 献

- 1 Adler R, Landa K B, Manthorpe M, *et al.* Cholinergic neuronotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons. *Science*, 1979, **204** (4400): 1434~1436
- 2 Barbin G, Manthorpe M, Varon S. Purification of the chick eye ciliary neuronotrophic factor. *J Neurochem*, 1984, **43** (5): 1468~1478
- 3 Lin L F, Mismar D, Lile J D, *et al.* Purification, cloning, and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF). *Science*, 1989, **246** (4933): 1023~1025
- 4 Lam A, Fuller F, Miller J, *et al.* Sequence and structural organization of the human gene encoding ciliary neurotrophic factor. *Gene*, 1991, **102** (2): 271~276
- 5 Lambert P D, Anderson K D, Sleeman M W, *et al.* Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (8): 4652~4657
- 6 Sali A. Modeling mutations and homologous proteins. *Curr Opin Biotechnol*, 1995, **6** (4): 437~451
- 7 Sali A. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *Mol Med Today*, 1995, **1** (6): 270~277
- 8 Schuster B, Kovaleva M, Sun Y, *et al.* Signaling of human ciliary neurotrophic factor (CNTF) revisited. The interleukin-6 receptor can serve as an alpha-receptor for CTNF. *J Biol Chem*, 2003, **278** (11): 9528~9535
- 9 Panayotatos N, Everdeen D, Liten A, *et al.* Recombinant human CNTF receptor alpha: production, binding stoichiometry, and characterization of its activity as a diffusible factor. *Biochemistry*, 1994, **33** (19): 5813~5818
- 10 Bonni A, Frank D A, Schindler C, *et al.* Characterization of a pathway for ciliary neurotrophic factor signaling to the nucleus. *Science*, 1993, **262** (5139): 1575~1579

The Design and Bioactivity Analysis of CNTF Mutants*

BI Hua^{1)**}, YUE Jun-Jie²⁾, YUAN Li-Yong¹⁾, RAO Chun-Ming¹⁾, CHEN Hui-Peng²⁾, WANG Jun-Zhi¹⁾

⁽¹⁾Department of Biochemistry, National Institute for The Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China;

⁽²⁾ Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract In order to present clues to find safer and more efficient ciliary neurotrophic factor(CNTF), computer molecular modeling system was used to gain the three-dimension structure of CNTFR α . Then through analysing the CNTF/CNTFR α crucial sites to its bioactivity combined with the homologous sequences comparison and CNTF molecular characters, two CNTF mutants were designed. The mutants' bioactivity were tested by the experiment of TF-1 proliferation. The two mutants' bioactivity reached 10⁶ U/mg level after expression and purification and the bioactivity of A is higher than that of B. The results proved primarily that the design was reasonable and provided premise and basement for CNTF's development and application.

Key words computer molecular modeling, expression, purification, CNTF mutants

*This work was supported by a grant from High-Tech Research and Development Program of China (2003AA2Z3480).

**Corresponding author . Tel: 86-10-67095684, E-mail: bihua9418@126.com

Received: September 1, 2006 Accepted: September 30, 2006