

人 Toll-like receptor 2 配基模拟肽的初步研究*

刘艳君 罗海波 朱 平 富 宁**

(南方医科大学免疫学教研室, 广州 510515)

摘要 TLR-2 (Toll-like receptor 2)是介导天然免疫的重要模式识别分子, 可参与识别多种病原体及其产物. 为探索被 TLR-2 所识别配基的结构共性, 以真核细胞表达的人 TLR-2 胞外段蛋白 (A26~T588) 为钓饵筛选噬菌体 12 肽库, 获得一高度保守的阳性噬菌体克隆 P12-1, 实验发现 P12-1 可与不同形式的 TLR-2 胞外段结合, 并且可刺激细胞分泌 $\text{TNF}\alpha$, 提示 P12-1 可能模拟 TLR-2 配基的结构与生物学活性.

关键词 TLR-2, 噬菌体肽库, 模拟肽, 表位

学科分类号 R392

TLRs (Toll-like receptors) 是参与机体天然与抗感染免疫的重要分子, 目前已发现了 10 种人的 TLRs (TLR1~10), 其中以 TLR-2 识别病原体及其产物的种类最多, 如肽聚糖(PGN)、脂多糖(LPS)、脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)、脂蛋白、脂肽等, 而且这些配基可通过 TLR-2 引起相似的细胞内信号传导活动, 导致炎性细胞因子释放, 因此 TLR-2 被认为是具中心作用的或中枢型模式识别(central pattern recognition)受体^[1-3]. 但 TLR-2 怎样识别如此众多的外源以及内源性配基, 这些配基的结构特点是什么均属未知. 为此, 我们在获得了人 TLR-2 胞外段蛋白的基础上利用噬菌体肽库技术, 以人 TLR-2 胞外段蛋白为钓饵来筛选噬菌体线性 12 肽库, 旨在获得能够与人 TLR-2 胞外段结合的短肽序列, 为研究 TLR-2 配基的结构特点, 揭示模式识别的机制, 并探索可能的药物作用靶点奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

噬菌体 12 肽库(库容为 1.5×10^{13} pfu/ml)、受体菌 ER2738、测序引物 5' $^{\text{H}}$ CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG 3'购自 Biolab 公司; TLR-2 胞外段蛋白 (A26~T588) 系本室自行制备^[4]; TLR-2 胞外段多抗(Oncogene 公司); 大肠杆菌 J5LPS(Sigma 公司); PGN(Fluka 公司); HRP- 抗 M13 单抗购自 Pharmacia 公司、HRP- 兔抗山羊 IgG 购自晶美公司; 生物素化 12 肽由深圳翰宇公司合成; ACE 显色液购自 KPL 公司; 转染人 CD14 基因的 THP-1 细胞 (THP1-CD14) 由 Dr.Han (Scripps, La Jolla,

CA)惠赠; $\text{TNF}\alpha$ 试剂盒购自 eBioscience 公司; XTT 购自 Sigma 公司.

1.2 以 TLR-2 胞外段为靶筛选噬菌体 12 肽库

采用亲和富集法, 3 轮筛选均以人 TLR-2 胞外段蛋白(A26~T588) (200 mg/L), 100 μl /孔, 4℃孵育过夜. 0.5% BSA 于 4℃封闭 3~4 h, 0.1% TBS-Tween (TBST) 洗板 6 次, 加入 10 μl 噬菌体 12 肽库原液和 90 μl TBS, 室温缓摇 1 h, 0.1% TBST 洗板 10 次, 将未结合及低亲和力的噬菌体尽量去除, 加入 100 μl 0.2 mol/L 甘氨酸 - 盐酸缓冲液(pH 2.2), 室温缓摇 10 min, 洗脱结合的噬菌体. 将洗脱噬菌体侵染宿主菌 ER2738, 测定滴度, 扩增, 用于第二轮筛选. 第 2、3 轮人 TLR-2 胞外段蛋白的包被浓度仍为 200 mg/L, 100 μl /孔, 分别加入前一轮扩增纯化产物, 洗涤液改为 0.5% TBST, 其余筛选、扩增方法同前. 第 3 轮洗脱, 测定滴度, 并在 IPTG/Xgal 琼脂板上挑取噬菌体单斑制备噬菌体原种进行鉴定.

1.3 阳性噬菌体克隆鉴定

1.3.1 双夹心 ELISA 鉴定噬菌体阳性克隆. TLR-2 胞外段蛋白(1 mg/L), 50 μl /孔, 4℃包被过夜, 同时每个克隆设不包被对照(排除非特异性吸板序列), 5%脱脂奶粉于 37℃封闭 1 h, 0.1%PBST 洗板 5 次, 加噬菌体原种上清, 50 μl /孔, 37℃孵育 1 h, 0.1%PBST 洗板 5 次, 加 HRP- 抗 M13 单抗 (1:5 000 稀释), 50 μl /孔, 37℃孵育 1 h, 0.1%

*国家自然科学基金资助项目(30070719).

** 通讯联系人.

Tel: 020-61648221, E-mail: zfn@fimmu.com

收稿日期: 2004-12-21, 接受日期: 2005-01-28

PBST洗板 5 次, 加 OPD 底物液显色, 2 mol/L 硫酸终止反应, 于酶联仪 490 nm 波长下测 A 值, 以高于阴性对照 3 倍以上为阳性结果.

1.3.2 阳性噬菌体克隆 DNA 序列测定. 扩增阳性噬菌体克隆, 以 PEG/NaCl 纯化噬菌体克隆, NaI 融解抽提噬菌体单链 DNA, 琼脂糖电泳鉴定. 单链 DNA 由上海生工生物工程技术服务有限公司进行全自动测序.

1.3.3 配基抑制实验. TLR-2 胞外段蛋白(1 mg/L), 50 μ l/ 孔, 4℃ 包被过夜. 5% 脱脂奶粉于 37℃ 封闭 1 h, 0.1% PBST 洗板 5 次, 分别加不同稀释度的 PGN、大肠杆菌 J5 株 LPS, 室温孵育 40 min, 0.1% PBST 洗板 5 次, 加噬菌体上清 (1×10^{11} pfu/ml), 50 μ l/ 孔, 室温孵育 40 min, 0.1% PBST 洗板 5 次, 加 HRP-抗 M13 单抗, 50 μ l/ 孔, 室温孵育 30 min, 洗板, 加 OPD 底物液显色, 2 mol/L 硫酸终止反应, 于酶联仪 490 nm 波长测 A 值, 以高于阴性对照 3 倍以上为阳性结果.

1.4 生物素化 12 肽的活性鉴定

1.4.1 生物素化 12 肽与筛选靶蛋白的结合. TLR-2 胞外段蛋白(10 mg/L), 50 μ l/ 孔, 4℃ 包被过夜; 5% 脱脂奶粉 (含 0.1% BSA, 0.1% Tween) 于 37℃ 封闭 1 h, 0.2% PBST 洗板 4 次, 加入不同稀释度的 Biotin-12P/BSA 偶联物, 37℃ 孵育 1 h, 0.2% PBST 洗板 4 次, 加入 HRP-Avidin, 50 μ l/ 孔, 37℃ 孵育 30 min, 0.2% PBST 洗板 4 次, 加 TMB 显色, 终止液终止反应, 于酶联仪 450 nm 波长测 A 值.

1.4.2 生物素化 12 肽与细胞表面靶蛋白的结合. pcDNA3.1+ 转染的 CHO 细胞、pcDNA3.1+TLR-2 全长转染的 CHO 细胞分别在玻片上铺成单层细胞, 取出玻片迅速吹干后, 冷丙酮固定 10 min, 1×PBS 洗 3 次, 5 min/ 次; 3% H_2O_2 室温作用 10~15 min, 1×PBS 洗 3 次, 5 min/ 次, 3% BSA 于室温封闭 2~3 h, 1×PBS 洗 3 次, 10 min/ 次, 加 Bio-12P/BSA(20 mg/L), 100 μ l/ 片, 空白对照加 PBS (100 μ l/ 片), 室温孵育 2 h, 1×PBS 洗 5 次, 10 min/ 次, 加 HRP-Avidin (1:50 稀释) 100 μ l/ 片, 室温孵育 1 h, 1×PBS 洗 5 次, 10 min/ 次, 加 ACE 显色液, 显色 2~5 min, 去离子水终止后置入 1×PBS 中, 苏木素染色 2 min, 盐酸乙醇分化 3 s, 流水冲洗 15 min, 显微镜下观察.

1.4.3 生物素化 12 肽诱导细胞因子的产生. THP1-CD14 细胞常规培养至对数生长期, 离心收

集细胞并调整细胞浓度为 1×10^6 个 /ml, 加入 96 孔板, 100 μ l/ 孔, 置 37℃、5% CO_2 孵箱孵育 24 h, 加入不同浓度的 12 肽, 置 37℃、5% CO_2 孵箱孵育 6 h, 取细胞上清检测 TNF α 含量, 同时以 XTT 法检测细胞活性.

2 结 果

2.1 噬菌体 12 肽库的筛选结果

TLR-2 胞外段蛋白分别进行了 2 次独立的筛选, 每次进行 3 轮筛选, 筛选过程中均保持了钓饵蛋白 TLR-2 胞外段的量和投入噬菌体的量, 但筛选结果显示富集不明显, 表 1 为第 2 次筛选的结果.

Table 1 Affinity selection from Ph.D.-12 library

Round of biopanning	Input phage /pfu	Output phage /pfu	Yield /%
1 (200 mg/L)	7.5×10^{10}	7.8×10^4	1.04×10^{-4}
2 (200 mg/L)	1.64×10^{10}	1.1×10^5	6.70×10^{-5}
3 (200 mg/L)	3.78×10^{11}	1.5×10^7	3.97×10^{-3}

2.2 噬菌体 12 肽克隆鉴定

将 2 次筛选过程的第 3 轮洗脱下的噬菌体侵染宿主菌 ER2738, 铺板过夜, 随机挑取 IPTG/Xgal 琼脂板上噬斑, 2 次筛选共挑取了 50 个克隆, 制备噬菌体原种, 以 TLR-2 胞外段蛋白包被做夹心 ELISA, 鉴定噬菌体克隆是否能与 TLR-2 胞外段蛋白结合, 结果显示有 33 个克隆为阳性 (图 1).

2.3 阳性噬菌体克隆 DNA 序列分析

将 33 个阳性噬菌体克隆中的 20 个进行 DNA 测序, 以推测其相应的肽序列. 结果显示 20 个克隆的 DNA 序列均一致, 对应的氨基酸序列为: G-G-S-G-T-S-R-T-P-I-L-G (命名为 P12-1), 并送深圳翰宇公司合成. 经 BLAST 软件中的短肽分析程序分析, P12-1 的 4~11 位氨基酸与 COG1619 (属小菌素 C7 抗性蛋白 McFF 家族) 的 278~285 位氨基酸的同源性为 87%; P12-1 的 4~10 位氨基酸与 F14H8.2 (属秀丽杆隐虫蛋白) 的 293~299 位氨基酸的同源性为 100%; P12-1 的 3~10 位氨基酸与一种噬菌体尾蛋白的 22~31 位氨基酸的同源性为 87%; P12-1 的 4~11 位氨基酸与光滑念珠菌 CBS138 一种菌体蛋白的 488~495 位氨基酸的同源性为 87%.

2.4 TLR-2 配基的抑制作用

用大肠杆菌 J5 株 LPS、PGN 阻断阳性噬菌体

克隆与 TLR-2 胞外段蛋白的结合, 以说明阳性噬菌体克隆能否模拟以上配基与 TLR-2 的结合表位, 因阳性噬菌体克隆的 DNA 测序结果为同一序列,

只取 7 号克隆做抑制实验, 结果显示, 7 号克隆与 TLR-2 的结合可被 J5LPS 和 PGN 所抑制, 并呈剂量依赖性 (图 2).

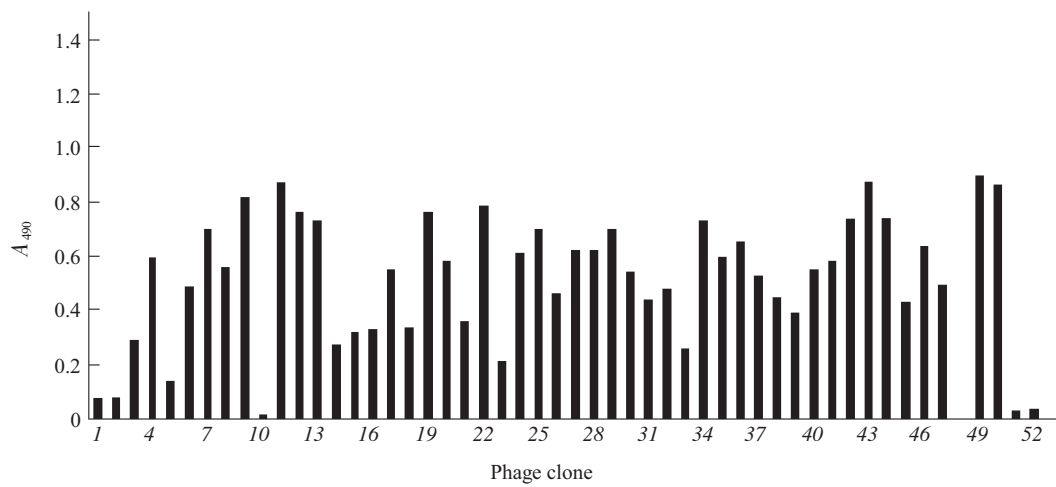


Fig.1 Binding of phage clone with TLR-2 extracellular fragment (A26~T588) determined by ELISA
1~50: phage clone; 51: unrelated phage clone as negative control; 52: 12 mer peptide library.

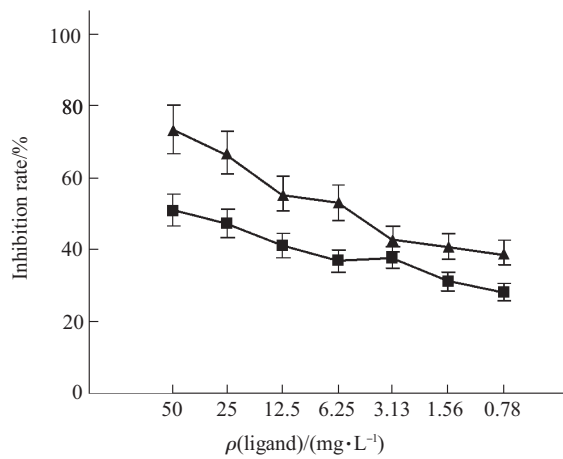


Fig.2 LPS, PGN inhibited the binding of specific phage clone No.7 with TLR-2
▲—▲: PGN; ■—■: LPS from *E.coli* J5.

2.5 生物素化 12 肽结合活性的鉴定

实验证明生物素 P12-1 可与真核表达的 TLR-2 胞外段蛋白结合, 但是结合力较弱, 因此将 Bio-P12-1 与 BSA 偶联, 偶联后可提高 P12-1 与 TLR-2胞外段蛋白的结合能力(图 3). 免疫组化的结果也证明, Bio-P12-1/BSA 偶联物可与 pcDNA3.1+ TLR-2 全长转染的 CHO 细胞膜表面表达的 TLR-2 结合, 而不与 pcDNA3.1+ 空质粒转染的 CHO 细胞结合(图 4).

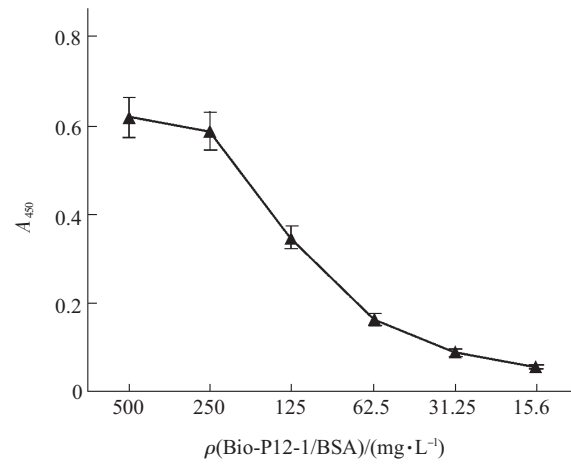


Fig.3 The binding of Bio -P12 -1 with the extracellular fragment of TLR-2

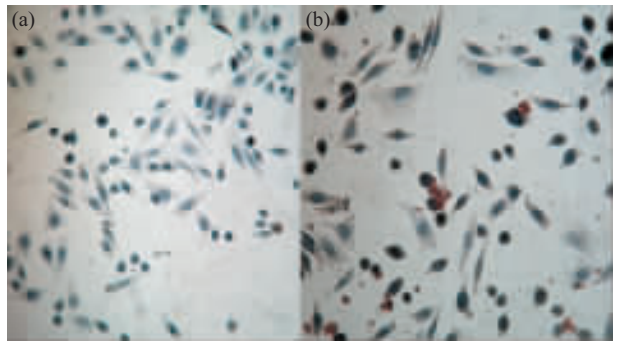


Fig.4 The binding of Bio-P12-1/BSA with pcDNA3.1 + TLR-2 transfected CHO cells
(a) cDNA3.1+ transfected CHO cells; (b) pcDNA3.1+TLR-2 transfected CHO cells.

2.6 生物素化 12 肽的活性测定

在经 XTT 检测细胞活性, 确定 Biotin-P12-1 和无关对照线性 12 肽均无细胞毒性 (结果未附) 的前提下, 进行了细胞因子诱生实验. 图 5 显示 P12-1 可剂量依赖性地刺激 THP-1/CD14 细胞分泌 $\text{TNF}\alpha$, 而无关对照 12 肽则无此作用, 提示 P12-1 不但可模拟 TLR-2 配基的结构特点, 而且可模拟其生物学活性.

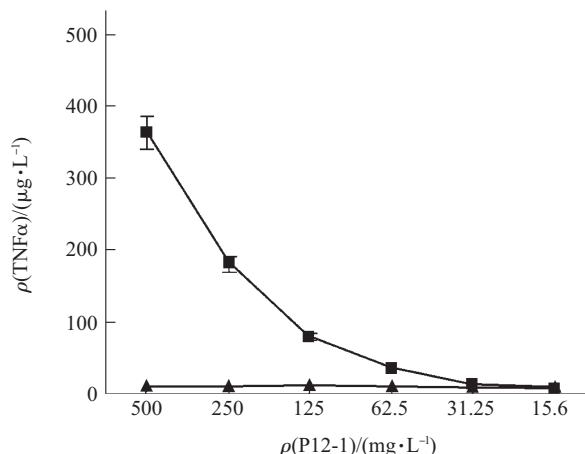


Fig.5 $\text{TNF}\alpha$ release from THP-1/CD14 cells stimulated by P12-1

■—■: Bio-P12-1; ▲—▲: control 12P.

3 讨 论

TLR-2 蛋白为 I 型跨膜蛋白, 可分为胞外区、胞浆区和跨膜区三部分. 胞外区富含亮氨酸, 胞内区与 IL-1 受体胞内区高度同源^[9]. 目前研究表明, TLR-2 不仅识别多种病原微生物及其产物, 也参与多种内源性损伤因素的识别 (如氧化应激、缺血再灌注、动脉粥样硬化、细胞凋亡等非炎症反应)^[6-9]. 更令人们关注是作为模式识别受体的 TLR-2 究竟如何识别这些不同的配基, 而这些配基是否有相对保守的结构特点.

为寻找 TLR-2 与其配基识别的关键表位和不同配基与 TLR-2 发生模式识别时的共同的结构特征, 本研究以 TLR-2 胞外段蛋白为钓饵进行噬菌体线性 12 肽库筛选, 经 2 次独立的筛选共获 33 个阳性克隆, 测序所得结果均为同一序列: G-G-S-G-T-S-R-T-P-I-L-G (命名为 P12-1), 蛋白质序列分析结果显示 P12-1 富含小分子疏水氨基酸, 其水溶液呈弱酸性. 在此我们推测未得到多种序列的原因可能是: 在 TLR-2 分子的胞外段结构中存在一高度保守的优势识别表位. 通过配基抑制试验

发现, J5 株 LPS 和 PGN 都可明显抑制 TLR-2 胞外段蛋白与阳性噬菌体克隆的结合, 提示该噬菌体克隆可能模拟 LPS 和 PGN 与 TLR-2 结合的表位, 且 LPS 和 PGN 被 TLR-2 识别的表位可能具有相似空间构象. 活性鉴定结果显示, P12-1 可与真核表达的人 TLR-2 胞外段蛋白 (A26~T588) 结合, 并且结合强度呈剂量依赖性. 同时, 免疫组化结果显示, P12-1 可与表达在 CHO 细胞膜上的人 TLR-2 结合. 但 P12-1 与 TLR-2 重组蛋白及全长表达的 CHO 细胞的结合均并未达到理想状态. 推测造成结合强度较弱的原因可能有三方面: a. 所获模拟肽为线性肽, 当其表达于噬菌体衣壳蛋白表面时其构象相对稳定, 而合成的小分子线性肽在缓冲液中的构象则可能不稳定, 而经改变缓冲液体系或偶联了载体蛋白后会得到一定程度的改善, 本研究采用了后者; b. TLR-2 对某些配基的识别不仅是模式识别, 而且是组合识别, 需要 TLRs 家族其他成员的帮助, 如对 LPS、脂肽的识别需要 TLR-1 或 TLR-6 辅助^[10,11], 而本实验的合成肽结合靶蛋白及转染 TLR-2 真核细胞则不具备组合识别的条件; c. 该序列虽高度保守, 但毕竟是模拟结构, 而不是配基所共同具备的脂和糖结构, 也许将该合成肽进行脂化或经突变改造可望提高亲和力.

值得关注的是, 模拟肽 P12-1 不仅是模拟 TLR-2 配基的保守结构, 而且体外试验也发现其可刺激 THP-1/CD14 细胞分泌 $\text{TNF}\alpha$, 提示 P12-1 可模拟 TLR-2 配基的生物学活性. 其意义在于: a. 模拟 TLR-2 配基的结构意味着可能将脂多糖和脂表位转换为多肽表位, 从而有助于寻求建立针对大多数为非肽结构细菌产物主动免疫的可能性. 已有研究表明: 感染性疾病病原体多糖表位, 如隐球菌荚膜多糖、B 族链球菌荚膜多糖、志贺氏福内氏菌 5 α LPS O-寡糖等的模拟肽, 并可诱导出保护性抗多糖的抗体应答^[12,13]. 而本实验所获得的 P12-1 在蛋白质同源性分析中显示其与小菌素、念珠菌、秀丽杆隐虫等蛋白质成分有一定的同源性, 并且其突出特点是序列高度保守, 因而更具疫苗候选表位的特点. b. 作为寻找药物新靶点的探索. 1998 年 Science 的评述是: “已有超过半打制药和生物技术公司和数十个研究室从事 TLR 领域的工作, 而制药公司对此领域尤为感兴趣”^[14], 2002 年 Zuany-Amorim 等^[15]在权威刊物 Nat Rev Drug Discov 撰文论述 TLRs 作为治疗多种疾病的药物靶点的可能性. Nishiguchi 等^[16]根据脂蛋白的 N 端部分序列合成的

脂六肽可刺激 TLR-2 表达细胞的信号传导, 这样一个小分子肽可刺激 TLR-2, 也提示以 TLR-2 为靶点的治疗可采用小分子物质作为兴奋剂或拮抗剂. 而 P12-1 可模拟 TLR-2 配基的生物学活性, 提示在此方面继续深入的可能性与必要性, 如通过氨基酸置换提高其刺激活性或将其改造为拮抗剂, 从而作为新药的先导化合物. c. P12-1 可作为研究 TLR-2 与配基结合机制的工具. 基于上述分析, 我们的后续工作拟以 TLR-2 转染细胞为钓饵进行肽库筛选更具配基活性的模拟肽, 并用突变库技术改造 P12-1 提高结合 TLR-2 的亲和力与生物学活性肽, 为阐明 TLR-2 与配基相互作用的机理、以及 TLR-2 为靶点的感染和非感染性疾病的防治提供实验依据.

参考文献

- Lien E, Sellati T, Yoshimura A, *et al.* Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem*, 1999, **274** (47): 33419~33425
- Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, *et al.* Peptidoglycan- and lipoteichoic acid- induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem*, 1999, **274** (25): 17406~17409
- Underhill D M, Ozinsky A, Hajjar A M, *et al.* The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*, 1999, **401** (6755): 811~815
- 刘艳君, 朱平, 韩强涛, 等. 人 Toll-like receptor 2 胞外段的克隆和表达. *免疫学杂志*, 2003, **19** (5): 332~335
Liu Y J, Zhu P, Han Q T, *et al.* *Immunological Journal*, 2003, **19** (5): 332~335
- Fujita M, Into T, Yasuda M, *et al.* Involvement of leucine residues at positions 107, 112, and 115 in a leucine-rich repeat motif of human Toll-like receptor 2 in the recognition of diacylated lipoproteins and lipopeptides and staphylococcus aureus peptidoglycans. *J Immunol*, 2003, **171** (7): 3675~3683
- Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, *et al.* Preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a Toll-like receptor 2 and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol*, 2000, **164** (2): 554~557
- LeBouder E, Rey-Nores J E, Rushmere N K, *et al.* Soluble forms of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR-2 signal are present in human plasma and breast milk. *J Immunol*, 2003, **171** (7): 6680~6689
- Thomas Decker. Sepsis: avoiding its deadly toll. *J Clin Invest*, 2004, **113** (10): 1387~1389
- Lopez M, Sly L M, Luu Y, *et al.* The 19-KDa Mycobacterium tuberculosis protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-2. *J Immunol*, 2003, **170** (5): 2409~2416
- Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, *et al.* Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol*, 2002, **169** (1): 10~14
- Shimizu T, Kida Y, Kuwano K, *et al.* Lipid-associated membrane proteins of Mycoplasma fermentans and *M. penetrans* activate human immunodeficiency virus long-terminal repeats through Toll-like receptors. *Immunology*, 2004, **113** (1): 121~129
- Kieber-Emmons T, Luo P, Qiu J, *et al.* Vaccination with carbohydrate peptide mimotopes promotes anti-tumor responses. *Nat Biotechnol*, 1999, **17** (7): 660~665
- 文维延, 韩强涛, 富宁, 等. 脂多糖保守表位模拟肽的筛选与鉴定. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28** (2): 222~226
Wen W Y, Han Q T, Fu N, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28** (2): 222~226
- Gretchen V. Fly development genes lead to immune find. *Science*, 1998, **281**(5385): 1942~1924
- Zuany-Amorim C, Hastewell J, Walker C, *et al.* Toll-like receptors as potential therapeutic targets for multiple diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, **1** (10): 797~807
- Nishiguchi M, Matsumoto M, Takao T, *et al.* Mycoplasma fermentans lipoprotein M161Ag-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2: role of N-terminal hydrophobic portion in its multiple functions. *J Immunol*, 2001, **166** (4): 2610~2616

Study in Peptide Mimics of Ligand of Human Toll-like Receptor 2 (TLR-2)*

LIU Yan-Jun, LUO Hai-Bo, ZHU Ping, FU Ning**

(Department of Immunology of The South Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract Toll-like receptor 2 is an important pattern recognition molecule of innate immune, which could recognize diverse pathogens and their products. Using the eukaryotic expression TLR-2 extracellular fragment as target to screen peptide mimics to ligand of TLR-2 from Ph.D.-12 phage display peptide library, 20 of positive phage clones were sequenced, which shared a very conservative sequence and was named as P12-1. Biotinylated

peptide P12-1 could bind with different form of TLR-2 extracellular fragment, and also stimulate THP-1/CD14 cells to secrete $\text{TNF}\alpha$. These results indicated that P12-1 could mimic the structure and activity of ligand of TLR-2.

Key words Toll-like receptor 2, phage display peptide library, mimic peptide, epitope

*This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30070719).

**Corresponding author . Tel: 86-20-61648221, E-mail: zfn@fimmu.com

Received: December 21, 2004 Accepted: January 28, 2005