

抗胃癌单链抗体可变区序列分析及空间结构模拟

杨丽娟, 侯颖春, 白玉杰, 药立波, 苏成芝

杨丽娟, 中国人民解放军总医院内分泌科 北京市 100853
侯颖春, 陕西师范大学生命科学学院 陕西省西安市 710062
白玉杰, 浙江大学迪诺遗传与基因组医学研究中心 浙江省杭州市 310058
药立波, 苏成芝, 中国人民解放军第四军医大学生物化学与分子生物学教研室 陕西省西安市 710032
杨丽娟, 1997年中国人民解放军第四军医大学博士, 副主任医师, 副教授, 主要从事内科的基础和临床工作。
作者贡献分布: 此课题由杨丽娟, 侯颖春, 白玉杰, 药立波及苏成芝设计; 研究过程由杨丽娟, 侯颖春及白玉杰操作完成; 数据分析由杨丽娟与侯颖春完成; 本论文由杨丽娟写作完成。
通讯作者: 杨丽娟, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院内分泌科。ljyang2828@163.com
电话: 010-66936234 传真: 010-68168917
收稿日期: 2008-04-28 修回日期: 2008-05-21
接受日期: 2008-06-02 在线出版日期: 2008-07-28

Analysis of primary structure and modeling of spatial structure of single-chain variable region of antibody against human gastric cancer

Li-Juan Yang, Ying-Chun Hou, Yu-Jie Bai, Li-Bo Yao, Cheng-Zhi Su

Li-Juan Yang, Department of Endocrinology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China
Ying-Chun Hou, School of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, Shaanxi Province, China
Yu-Jie Bai, Adinovo Center for Genetic and Genomic Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang Province, China
Li-Bo Yao, Cheng-Zhi Su, Department of Biochemistry and Molecular Biology, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Li-Juan Yang, Department of Endocrinology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China. ljyang2828@163.com
Received: 2008-04-28 Revised: 2008-05-21
Accepted: 2008-06-02 Published online: 2008-07-28

Abstract

AIM: To analyze the sequence of heavy and light chain of the variable region (V_H and V_L) in the anti-human gastric cancer antibody, select a suitable linker peptide to construct single chain antibody, model the 3-D structure and predict the relationship between its structure and function.

METHODS: Using the sequences of V_H and V_L , which derived from the phage display library

of antibodies against human gastric cancer, a suitable linker peptide was chosen to obtain the primary structure of the single-chain antibody with considering the C-terminal and N-terminal structural character. Furthermore, the 3-D theoretical structure was modeled with computer-guided homology modeling method. The stable spatial conformation of the single-chain variable region was determined with mechanism optimization and molecular dynamic simulation. The structural property and physical-chemical characters were analyzed using the distance geometry, surface electrostatic distribution and solvent accessible surface calculation.

RESULTS: The conformation of the successfully constructed single-chain antibody was stable. Except one amino acid conformation of connecting peptide, others' were reasonable. V_L CDR1, CDR2 and V_H CDR3 solution accessibility surface area distributed strongly, but V_L CDR3, V_H CDR1, and CDR2 were comparatively weak. V_H CDR3 region had strong electronegativity.

CONCLUSION: The 3-D structure of the created single chain antibody is proved reasonable and reliable.

Key Words: Gastric cancer; Single-chain antibody; Mechanism optimization; Molecular dynamic simulation; Solvent accessible surface; Surface electrostatic distribution

Yang LJ, Hou YC, Bai YJ, Yao LB, Su CZ. Analysis of primary structure and modeling of spatial structure of single-chain variable region of antibody against human gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(21): 2333-2336

摘要

目的: 考察抗人胃癌抗体可变区轻、重链序列, 选择合适的连接肽构建单链抗体, 并模拟其三级结构, 预测单链抗体结构与功能关系。

方法: 利用获得的源自抗人胃癌噬菌体抗体库中筛选出的抗体可变区轻、重链序列, 通过分析抗体轻重链可变区C-端、N-端结构特征, 选择合适的连接肽, 进而利用分子模拟原理构

■背景资料

在肿瘤的诊断治疗中, 抗体占有重要的作用。本研究利用噬菌体抗体库技术, 绕过杂交瘤技术, 获得了鼠抗人胃癌重链及轻链可变区片段, 并通过分析其N-端、C-端序列及结构特征, 选择合适的连接肽构建单链抗体, 经计算机辅助分子模拟方法构建其空间构象。为今后胃癌的显像和导向治疗奠定了一定的基础。

■同行评议者

李奇林, 教授, 南方医科大学附属珠江医院急诊部

■研发前沿

目前所获得的抗体大部分为鼠源性, 在应用过程中会引发HAMA反应而限制了其应用. 必须先进行人源化改造, 才能更好地应用于临床. 如何进行人源化改造是亟待研究的问题.

建单链抗体可变区的空间构象; 经过力学优化、动力学模拟确定其稳定的三维结构; 借助距离几何学、表观静电分布、溶液可及性表面积分析, 对单链抗体的结构特征及理化性质进行理论分析.

结果: 成功获得的单链抗体稳定构象, 除连接肽位置的1个氨基酸构象不合理之外, 其他位置构象合适. 轻链CDR1、CDR2以及重链CDR3溶液可及性表面积分布较强, 而轻链CDR3、重链CDR1、CDR2分布较弱. 重链CDR3区带有较强的负电性.

结论: 所构建的单链抗体三维空间结构具有较高的合理性和可靠性.

关键词: 胃癌; 单链抗体; 力学优化; 动力学模拟; 溶液可及性表面积; 表观静电分布

杨丽娟, 侯颖春, 白玉杰, 药立波, 苏成芝. 抗胃癌单链抗体可变区序列分析及空间结构模拟. 世界华人消化杂志 2008; 16(21): 2333-2336
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2333.asp

0 引言

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率及病死率均为恶性肿瘤的第1位^[1], 因此, 胃癌的早期诊断和有效治疗就显得极为重要. 单链抗体作为抗体分子中保留抗原结合部位的最小功能片段, 在肿瘤的早期诊断和治疗中越来越受到人们的广泛关注. 本研究利用源自噬菌体抗体库技术获得的鼠抗人胃癌轻、重链可变区片段, 通过分析其N-端、C-端序列及结构特征, 选择合适的连接肽构建单链抗体, 经计算机辅助分子模拟方法构建其空间构象. 利用相关理论方法对其结构进行分析, 预测了结构功能关系, 为进一步抗体的合理改造奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 细菌菌株*E.coli* TG1, 克隆及表达载体pCANTAB5E, 分别扩增轻链可变区片段(VL)和重链可变区片段(VH), 引物及RS Primer Mix均为Pharmacia公司产品. 其他有关分子生物学试剂系华美公司和Promega公司产品. Insight II (2005)软件包为MSI公司产品.

1.2 方法 抗人胃癌抗体轻、重链序列参见文献[2]. 分析人胃癌抗体轻、重链可变区序列, 借助其空间构象分析其N-、C-端结构特征, 选择合适的连接肽(GGGGS)₃, 利用分子模拟方法

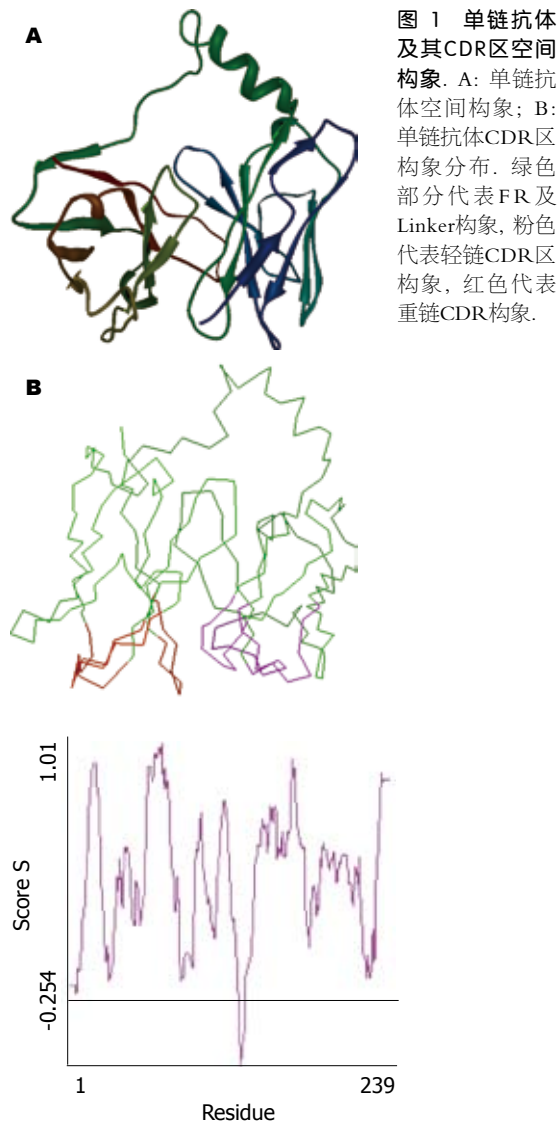


图1 单链抗体及其CDR区空间构象. A: 单链抗体空间构象; B: 单链抗体CDR区构象分布. 绿色部分代表FR及Linker构象, 粉色代表轻链CDR区构象, 红色代表重链CDR构象.

图2 Profile_3D对于模拟的单链抗体构象结构评估.

搭建单链抗体空间构象. 依次选择CVFF力场、Gromos96力场, 利用Discover、Discover_3程序包, 经最陡下降、共轭梯度算法进行分子力学优化; 通过常温动力学模拟, 收集100个稳定构象进行分析, 最终确定单链抗体的稳定构象. 利用Profile_3D对单链抗体的结构进行可信性分析; 进而通过Access_Surf模块对单链抗体的表面溶液可及程度进行分析; 利用Delphi程序, 考虑溶剂效应进行表观静电分布分析.

2 结果

2.1 抗人胃癌单链抗体结构模拟 考察抗体重链、轻链可变区N、C端氨基酸理化特征, 选择合适的连接肽(GGGGS)₃, 构建单链抗体可变区序列. 通过http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BlastP, 检索PDB数据库, 得到模板蛋白, 其PDB注册号为1h8s. 利用同源模建方法搭建其三维结构, 通过分子力学、

■相关报道

人们通过对类似蛋白质空间结构的对比发现, 蛋白质的三维结构较其一级序列更为保守. 氨基酸残基序列有50%相同的蛋白质, 约有90%的Ca原子偏差不超过0.3 nm, 均方根偏差约0.1 nm. 氨基酸的残基替换通常发生在蛋白质表面回折区域. 蛋白质主链结构, 特别是疏水中心的结构受序列变异的影响很小. 因此, 用类似蛋白来预测目标蛋白的空间构象是比较可靠的.

■创新盘点

本文先从噬菌体抗体库着手, 得到抗体重链及轻链可变区片段后, 选择合适的连接肽, 利用三维重建得到空间结构, 为人源化改造奠定基础。

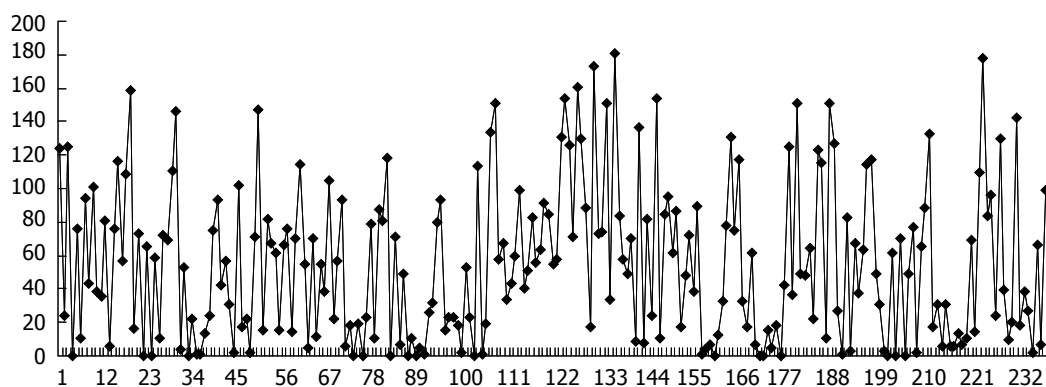


图 3 单链抗体可及性表面积分布情况。

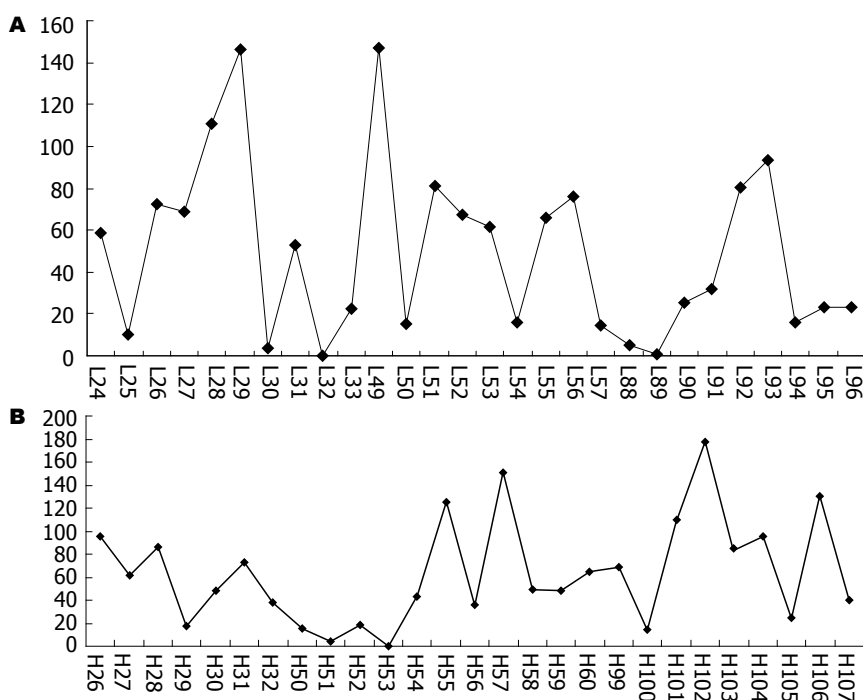


图 4 单链抗体质量、轻链CDR可及性表面积分布情况. A: 轻链; B: 重链。

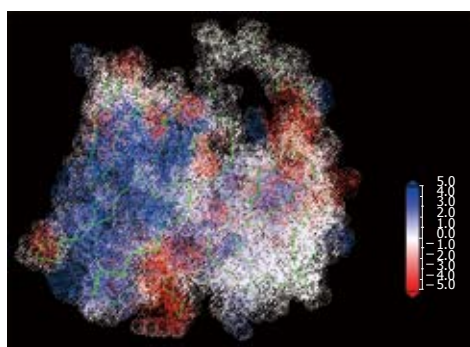


图 5 单链抗体表面静电分布. 利用Delphi程序对于单链抗体表面静电分布的理论分析, 其中红色部分代表负电区, 蓝色部分代表正电区, 白色部分代表中性区。

动力学模拟获得其稳定构象(图1A-B)。

2.2 抗人胃癌单链抗体结构评估 为评判模拟构象结构的可靠性, 我们对优化获得的单链抗体空间结构进行了理论评估, 结果模拟的构象除连接肽位置的1个氨基酸构象不合理之外, 其他

位置构象合适(图2)。

2.3 抗人胃癌单链抗体性质 轻链CDR1、CDR2以及重链CDR3溶液可及性表面积分布较强, 而轻链CDR3、重链CDR1、CDR2分布较弱, 提示在发挥作用的过程中, 重链CDR3区参与跟抗原的结合(图3-4)。重链CDR3区带有较强的负电性, 提示在与相应抗原作用过程中, 通过与正电的抗原表位发生静电作用(图5)。

3 讨论

人们通过对类似蛋白质空间结构的对比发现, 蛋白质的三维结构较其一级序列更为保守。因此, 用类似蛋白来预测目标蛋白的空间构象是比较可靠的^[6]。据此原理, 人们已成功预测了许多目标蛋白, 在抗体的结构预测中尤为突出^[4-10], 这对抗体工程的发展具有十分重要的意义, 能够使人们在了解抗体空间结构及其与生物学功

■同行评价

本文在查阅了大量文献资料的基础上进行设计,对胃癌的研究有较大的指导性,为防治消化系肿瘤提供了较好的基础研究理论.

能关系之基础上,对已有的抗体分子加以改造,使其更符合临床诊断和治疗的需要.

小分子抗体具有分子小,免疫原性弱,穿透力强易于进入实体瘤周围的微循环,血清和全身廓清快,无肾脏蓄积作用,肿瘤显像时清晰度高,可作载体与药物、同位素、毒素等结合之优点^[1],在肿瘤的诊断和治疗方面有极高的理论和应用价值.单链抗体是小分子抗体的一种,其由VH和VL和连接肽构成,是抗体分子中保留抗原结合部位的最小功能片段.本研究利用计算机辅助分子设计与蛋白空间结构模拟技术,利用获得的源自抗人胃癌噬菌体抗体库中筛选出的VH、VL序列,通过分析抗体轻重链可变区C-端、N-端结构特征,选择合适的连接肽,进而利用分子模拟原理构建单链抗体可变区的空间构象;经过力学优化、动力学模拟确定其稳定的三维结构;借助距离几何学、表观静电分布、溶液可及性表面积分析,对单链抗体的结构特征及理化性质进行了理论分析.获得的单链抗体构象表明,其CDR区形成合理的口袋结构,易于结合抗原表位而发挥功能.这为该抗体的进一步合理化改造提供了理论依据.

4 参考文献

- 1 华积德. 肿瘤外科学. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 1995: 1180-1182
- 2 杨丽娟, 苏成芝. 抗人胃癌全套单链抗体基因噬菌体表面呈现文库的构建、初步筛选及鉴定. 第四军医大学学报 1998; 19: 22-24
- 3 Blundell TL, Sibanda BL, Sternberg MJ, Thornton JM. Knowledge-based prediction of protein structures and the design of novel molecules. *Nature* 1987; 326: 347-352
- 4 Fontayne A, Vanhoorelbeke K, Pareyn I, Van Rompaey I, Meiring M, Lamprecht S, Roodt J, Desmet J, Deckmyn H. Rational humanization of the powerful antithrombotic anti-GPIIb/IIIa antibody: 6B4. *Thromb Haemost* 2006; 96: 671-684
- 5 Paula S, Monson N, Ball WJ Jr. Molecular modeling of cardiac glycoside binding by the human sequence monoclonal antibody 1B3. *Proteins* 2005; 60: 382-391
- 6 Thompson AJ, Price KL, Reeves DC, Chan SL, Chau PL, Lummis SC. Locating an antagonist in the 5-HT₃ receptor binding site using modeling and radioligand binding. *J Biol Chem* 2005; 280: 20476-20482
- 7 Mendez R, Leplae R, Lensink MF, Wodak SJ. Assessment of CAPRI predictions in rounds 3-5 shows progress in docking procedures. *Proteins* 2005; 60: 150-169
- 8 Gee GV, Tsomaia N, Mierke DF, Atwood WJ. Modeling a sialic acid binding pocket in the external loops of JC virus VP1. *J Biol Chem* 2004; 279: 49172-49176
- 9 Arndt MA, Krauss J, Schwarzenbacher R, Vu BK, Greene S, Rybak SM. Generation of a highly stable, internalizing anti-CD22 single-chain Fv fragment for targeting non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* 2003; 107: 822-889
- 10 Mohan S, Sinha N, Smith-Gill SJ. Modeling the binding sites of anti-hen egg white lysozyme antibodies HyHEL-8 and HyHEL-26: an insight into the molecular basis of antibody cross-reactivity and specificity. *Biophys J* 2003; 85: 3221-3236
- 11 Colcher D, Bird R, Roselli M, Hardman KD, Johnson S, Pope S, Dodd SW, Pantoliano MW, Milenic DE, Schlom J. In vivo tumor targeting of a recombinant single-chain antigen-binding protein. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 1191-1197

编辑 李军亮 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志标点符号用法

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求,本刊论文中的句号都采用黑圆点;数字间的起止号采用“-”字线,并列的汉语词间用顿号分开,而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开,参考文献中作者间一律用逗号分开;表示终了的标点符号,如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半,通常不用于一行之首;而表示开头的标点符号,如括号及书名号的前一半,不宜用于一行之末.标点符号通常占一格,如顿号、逗号、分号、句号等;破折号应占两格;英文连字符只占一个英文字符的宽度,不宜过长,如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体,两横线表示用小写,三横线表示用大写,波纹线表示用黑体.(常务副总编辑:张海宁 2008-07-28)