

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410025728.6

[51] Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 11/04 (2006.01)

[43] 公开日 2006年1月4日

[11] 公开号 CN 1715926A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 11/02 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 1/02 (2006.01)
A61P 1/18 (2006.01)
A61P 27/16 (2006.01)
A61P 13/00 (2006.01)
A61P 13/08 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 5/14 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)

[22] 申请日 2004.7.2

[21] 申请号 200410025728.6

[71] 申请人 上海泽生科技开发有限公司

地址 201203 上海市浦东新区张江高科技园
区碧波路328号C座2楼

[72] 发明人 周明东 徐凌飞

权利要求书3页 说明书35页 附图10页

[54] 发明名称

神经调节蛋白突变体、筛选方法及应用

[57] 摘要

本发明提供了筛选特异性激活 ErbB 受体的 NRG 突变体的方法,该方法包括:用同源建模方法建立 NRG、ErbB3、ErbB4、NRG/ErbB3 和 NRG/ErbB4 复合物的三维结构;分子动力学模拟 NRG/ErbB3 和 NRG/ErbB4 在溶液中的构象和稳定性;MM/PBSA 方法计算 NRG 与 ErbB3 或 ErbB4 的结合自由能;丙氨酸理论扫描计算方法确定 NRG 残基突变成丙氨酸后对 NRG 与受体亲合性变化,根据该变化确定特异性激活 ErbB 受体的 NRG 突变体方法。本发明还提供了 NRG 突变体、NRG 突变体的应用及制备。

1. 筛选特异性激活 ErbB3 受体的 NRG 突变体的方法, 该方法包括:
 - a) 用同源模建方法建立 NRG、ErbB3、ErbB4、NRG /ErbB3 和 NRG /ErbB4 复合物的三维结构
 - b) 分子动力学模拟 NRG /ErbB3 和 NRG /ErbB4 在溶液中的构象变化和稳定性
 - c) MM/PBSA 方法计算 NRG 与 ErbB3 或 ErbB4 的结合自由能
 - d) 丙氨酸理论扫描计算方法确定 NRG 残基突变成丙氨酸后对 NRG 与受体亲合性变化
 - e) 计算 $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}} = \Delta G_{\text{wildtype}} - \Delta G_{\text{mutant}}$
 - f) 根据步骤 e) 计算结果中 NRG /ErbB3 的 $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ 为正值, NRG /ErbB4 的 $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ 为负值的位点残基突变成 Ala 后特异性激活 ErbB3 受体的 NRG 突变体。
2. 权力要求 1 所述方法筛选的 NRG 突变体, 该 NRG 突变体包括 SEQ ID NO: 1 的氨基酸残基位点 25 突变成丙氨酸的氨基酸序列。
3. 权力要求 1 所述方法筛选的 NRG 突变体, 该 NRG 突变体包括 SEQ ID NO: 1 的氨基酸残基位点 35 突变成丙氨酸的氨基酸序列。
4. 权力要求 1 所述方法筛选的 NRG 突变体, 该 NRG 突变体包括 SEQ ID NO: 1 的氨基酸残基位点 46 突变成丙氨酸的氨基酸序列。
5. 权力要求 1 所述的方法筛选的 NRG 突变体在制备特异性激活 ErbB2/ErbB3 受体药物的应用。
6. 权力要求 5 所述的应用, 其中 NRG 突变体通过激活哺乳动物 ErbB2/ErbB3 受体, 从而治疗、预防或延缓哺乳动物疾病。
7. 根据权力要求 6 所述的应用, 其中所述哺乳动物为人类。
8. 根据权力要求 6 所述的应用, 其中所述哺乳动物疾病包括发生在骨、耳、眼睛、眼睑、头颈部、心脏、喉、下颚、下颚外侧髁、上颌骨、嘴、鼻咽、

鼻子、口腔、胰腺、腮腺、耳廓、垂体、前列腺视网膜、唾液腺、皮肤、肌肉、脊髓、甲状腺、扁桃腺、神经系统、呼吸系统、消化系统、循环系统、生殖系统、泌尿系统、内分泌系统、心血管疾病、造血系统的疾病。

- 5 9. 根据权力要求 8 所述的应用, 其中神经系统疾病包括中枢神经系统疾病、周围神经系统疾病、脊髓疾病、脑膜疾病、脱髓鞘性疾病、锥体外系统疾病。

10. 筛选特异性激活 ErbB4 受体的 NRG 突变体的方法, 该方法包括:

- 10 a) 用同源模建方法建立 NRG、ErbB3、ErbB4、NRG /ErbB3 和 NRG /ErbB4 复合物的三维结构
- b) 分子动力学模拟蛋白质/小分子配体或者蛋白质/蛋白质在溶液中的构象变化和稳定性
- c) MM/PBSA 方法计算 NRG 与 ErbB3 或 ErbB4 的结合自由能
- 15 d) 丙氨酸理论扫描计算方法确定 NRG 每一个残基突变成丙氨酸后对 NRG 与受体亲合性变化
- e) 计算 $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}} = \Delta G_{\text{wildtype}} - \Delta G_{\text{mutant}}$
- f) 根据步骤 e) 计算结果中 NRG /ErbB4 的 $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ 为正值, NRG /ErbB3 的 $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ 为负值的位点残基突变成 Ala 后特异性激活 ErbB4 受体的
- 20 NRG 突变体。

11. 权力要求 10 所述方法筛选的 NRG 突变体, 该 NRG 突变体包括 SEQ ID NO: 1 中氨基酸残基位点 16 突变成丙氨酸的氨基酸序列。

- 25 12. 权力要求 10 所述方法筛选的 NRG 突变体, 该 NRG 突变体包括 SEQ ID NO: 1 中氨基酸残基位点 29 突变成丙氨酸的氨基酸序列。

13. 权力要求 10 所述方法筛选的 NRG 突变体, 该 NRG 突变体包括 SEQ ID NO: 1 中氨基酸残基位点 31 突变成丙氨酸的氨基酸序列。

30

14. 权力要求 10 所述方法筛选的 NRG 突变体, 该 NRG 突变体包括 SEQ ID NO: 1 中氨基酸残基位点 33 突变成丙氨酸的氨基酸序列。

15. 权力要求 10 所述方法筛选的 NRG 突变体, 该 NRG 突变体包括 SEQ ID

NO: 1 中氨基酸残基位点 47 突变成丙氨酸的氨基酸序列。

16.权力要求 10 所述的方法筛选的 NRG 突变体在制备特异性激活 ErbB2/ErbB4 受体药物的应用。

5

17.根据权力要求 16 所述的应用, 其中 NRG 突变体通过激活哺乳动物 ErbB2/ErbB4 受体, 从而治疗、预防或延缓哺乳动物疾病。

18.根据权力要求 16 所述的应用, 其中所述哺乳动物为人类。

10

19.根据权力要求 17 所述的应用, 其中所述哺乳动物疾病包括发生在骨、耳、眼睛、眼睑、头颈部、心脏、喉、下颚、下颚外侧髁、上颌骨、嘴、鼻咽、鼻子、口腔、胰腺、腮腺、耳廓、垂体、前列腺视网膜、唾液腺、皮肤、肌肉、脊髓、甲状腺、扁桃腺、神经系统、呼吸系统、消化系统、循环系统、生殖系统、泌尿系统、内分泌系统、心血管疾病、造血系统的疾病。

15

20.根据权力要求 19 所述的应用, 其中心血管疾病包括心力衰竭、心肌梗死、快速心律失常、家族性心肌肥大型心肌病、缺血性心脏病、原发性扩张型心肌病和心肌炎。

20

21.根据权力要求 20 所述的应用, 其中所述导致心力衰竭的原因为充血性心衰、心肌梗死、快速心律失常、家族性心肌肥大型心肌病、缺血性心脏病、扩张型心肌病和心肌炎。

25

22.根据权力要求 19 所述的应用, 其中肌肉疾病包括平滑肌、骨骼肌、心肌疾病。

神经调节蛋白突变体、筛选方法及应用

5 技术领域:

本发明涉及特异性激活 ErbB 受体的 NRG 突变体、筛选方法及其应用。

背景技术:

神经调节蛋白 (Neuregulins , NRGs) 及受体 ErbBs 家族在神经、肌肉、
上皮等组织、器官形成过程中细胞信号传导的作用已经有广泛的认识
10 (Lemke, Mol. Cell. Neurosci. 7: 247-262, 1996; Burden et al., Neuron 18:
847-855, 1997)。

研究较深入的是 NRG-1 基因编码的蛋白质, 约包括结构相同的 15 种不
同的亚型(Lemke, Mol. Cell. Neurosci. 7: 247-262, 1996 and Peles and Yarden,
15 BioEssays 15: 815-824, 1993)。NRG-1 亚型包括 Neu Differentiation Factor
(NDF; Peles et al., Cell 69, 205-216, 1992 及 Wen et al., Cell 69, 559-572, 1992),
Heregulin (HRG; Holmes et al., Science 256: 1205-1210, 1992), Acetylcholine
Receptor Inducing Activity (ARIA; Falls et al., Cell 72: 801-815, 1993), 以及
glial growth factors GGF1, GGF2 和 GGF3 (Marchionni et al., Nature 362: 312-8,
20 1993)。

用同源克隆方法(Chang et al., Nature 387:509-512, 1997; Carraway et al.,
Nature 387:512-516, 1997; 及 Higashiyama et al., J. Biochem. 122: 675-680,
1997)及基因组方法发现了 NRG-2 基因 (Busfield et al., Mol. Cell. Biol.
25 17:4007-4014, 1997)。NRG-2 基因编码的 NRG-2 亚型包括 Neural-and
Thymus-Derived Activator of erbB Kinases (NTAK; Genbank Accession No.
AB005060), Divergent of Neuregulin (Don-1)以及 Cerebellum-Derived Growth
Factor (CDGF; WO 97/09425)。表达 ErbB4 或 ErbB2/ErbB4 受体的细胞显示
出对 NRG-2 有较强的应答效应(Pinkas-Kramarski et al., Mol. Cell. Biol. 18:
30 6090-6101, 1998)。研究显示 NRG-3、NRG-4 基因编码蛋白主要结合并激活
ErbB4 受体磷酸化,但NRG-3 对ErbB4 受体的生物应答效应较低,而NRG-4
则不产生对 ErbB4 受体的生物应答效应 (Zhang et al., Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 94: 9562-9567, 1997Hijazi et al., Int. J. Oncol. 13:1061-1067, 1998; Hobbs

et al., *Oncogene*, 21(55): 8442-52, 2002)。

EGF-like 结构域是各种 NRG 的重要功能域, 是 NRG 结合并激活 ErbB 受体家族功能域, ErbB 家族属于生长因子家族, 包括 EGFR (或 ErbB1), ErbB2, ErbB3 和 ErbB4 或称为 HER1、HER2、HER3、HER4 (Meyer et al., *Development* 124: 3575-3586, 1997; Orr-Urtreger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1867-71, 1993; Marchionni et al., *Nature* 362: 312-8, 1993; Chen et al., *J. Comp. Neurol.* 349: 389-400, 1994; Corfas et al., *Neuron* 14: 103-115, 1995; Meyer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1064-1068, 1994; and Pinkas-Kramarski et al., *Oncogene* 15: 2803-2815, 1997)。

NRG 在各种生命活动有非常重要的作用, 除了在神经系统中有重要的作用外(Garratt et al., *Bioessays* 22: 987-996, 2000; Jessen et al., *Microsc. Res. Tech.* 41: 393-402, 1998; Jessen et al., *Neurosci.* 22:402-410,1999; Vartanian et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:731-735,1999; Bermingham-McDonogh et al., *Mol.Cell. Neurosci.*10:184-195,1997; Canoll et al., *Mol.Cell. Neurosci.*13:79-94,1999)还在心脏发育及功能正常起重要的作用(Meyer et al, *Nature* 378: 386-390,1995; Lee et al, *Nature.* 378: 394-398,1995; Gassmann et al, *Nature* 378: 390-394,1995; Liu et al, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 13024-13029. 1998; Douglas et al, *Circulation* 2002;105: 1551-1554 以及 Crone et al, *Nat Med* 8(5): 459-465,2002)。NRG 在心脏病的治疗有重要的作用 (WO00/37095 , WO0064400, USPN6444642)。

NRGs 与 ErbB3 或 ErbB4 受体有较高的结合作用。这种配体-受体的结合导致 ErbB3 或 ErbB4 受体与其他 ErbB 受体形成二聚体, 该二聚体激活特定酪氨酸基团磷酸化。研究发现 rhNRG 在激活 ErbB4 受体治疗心脏病的同时会激活其它 ErbB 受体产生副作用。本发明提供了特异性激活 ErbB 受体的 NRG 突变体、筛选方法及其应用。本发明提供的特异性激活 ErbB 受体的 NRG 突变体可避免激活其它 ErbB 受体引起的副作用。

发明概述:

本发明提供了筛选特异性激活 ErbB 受体的 NRG 突变体的方法, 该方法包括: 用同源建模方法建立 NRG、ErbB3、ErbB4、NRG /ErbB3 和 NRG /ErbB4 复合物的三维结构; 分子动力学模拟 NRG /ErbB3 和 NRG /ErbB4 在溶液中的构象和稳定性; MM/PBSA 方法计算 NRG 与 ErbB3 或 ErbB4 的结合自由能;

丙氨酸理论扫描计算方法确定 NRG 残基突变成丙氨酸后对 NRG 与受体亲合性变化, 根据该变化确定特异性激活 ErbB 受体的 NRG 突变体的筛选方法。本发明还提供了 NRG 突变体、NRG 突变体的应用及制备方法。具体说, 本发明提供了特异性激活 ErbB3 受体的 NRG 突变体和特异性激活 ErbB4 受体的 NRG 突变体以及上述 NRG 突变体的应用。

附图说明:

图 1 NRG-1 β 和 NRG-1 α 的序列联配结果图。

10 图 2 (A) ErbB4 和 EGFR 的序列联配结果图: 在图中, “*”号, 代表等同的残基; “:”, 号代表保守的残基取代; “.”代表半保守的取代。联配结果为: 等同性, 47.7%; 相似性, 80.9%。(B) ErbB3 和 EGFR 的序列联配结果图: 在图中, “*”号, 代表等同的残基; “:”, 号代表保守的残基取代; “.”代表半保守的取代。联配结果为: 等同性, 44.9%; 相似性, 77.1%。

15 图 3 (A) NRG-1 β (兰) 与 EGF (红) 结构叠合立体图 (B) ErbB3 (兰) 和 EGFR (红) 结构叠合立体图 (C) ErbB4 (兰) C α 链与 EGFR (红) 结构叠合立体图。

图 4 (A) NRG-1 β /ErbB3 的 PROCHECK 图

图 4 (B) NRG-1 β /ErbB4 的 PROCHECK 图

20 图 5 NRG-1 β /ErbB3 和 NRG-1 β /ErbB4 分子动力学模拟 C α (A) RMSD 图和 (B) RMSF 图

图 6 NRG-1 β /ErbB3 (A) 和 NRG-1 β /ErbB4 (B)带状模型图: 在复合物中 NRG-1 β 部分显示为红色; 复合物中受体结构域 I、II、III 和 IV 分别显示为: 兰色、绿色、橙色和灰色。本图由 MOLSCRIPT 程序制作。

25 图 7 ErbB3 (绿色)和 NRG-1 β (红) 通过三个作用位点的相互作用图(A) 在位点 1 间的配体/受体相互作用; (B) 在位点 2 间的配体/受体相互作用; (C) 在位点 3 间的配体/受体相互作用。在本图中只列出相互作用于残基的侧链, 绿色的点代表氢键。

图 8 ErbB4 (绿色)和 NRG-1 β (红) 通过三个作用位点的相互作用图(A) 在位点 1 间的配体/受体相互作用; (B) 在位点 2 间的配体/受体相互作用; (C) 在位点 3 间的配体/受体相互作用。在本图中只列出相互作用于残基的侧链, 绿色的点代表氢键。

30 图 9 (A) NRG-1 β 的 Arg31 的侧链与 ErbB3 的 Glu131 的侧链形成氢键距离在分子动力学过程中的变化(B)NRG-1 β 的 Asn47 的侧链与 ErbB3 的 Asp343

的侧链形成氢键距离在分子动力学过程中的变化

图 10 NRG-1 β /ErbB3 和 NRG-1 β /ErbB4 MM-PBSA 自由能计算结果表示图, 负值的 $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ 表示取代会导致结合能力降低; 正值的 $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ 表示取代会提高结合能力。

- 5 图 11. NRG-1 β /ErbB3 和 NRG-1 β /ErbB4 结合位点附近的 MM-PBSA 自由能计算对 $\Delta\Delta G_{\text{binding}}$ 中 $\Delta\Delta E_{\text{vdw}}$ 、 $\Delta\Delta G_{\text{nonpolar}}$ 和 $\Delta\Delta E_{\text{ele}} + \Delta\Delta G_{\text{PB}}$ 能量分解示意图. 图中 (o) 代表 $\Delta\Delta E_{\text{vdw}}$; (\blacktriangle) 代表 $\Delta\Delta G_{\text{nonpolar}}$; (\bullet) 代表 $\Delta\Delta E_{\text{ele}} + \Delta\Delta G_{\text{PB}}$ 。(A) 为 NRG-1 β /ErbB3; (B) 为 NRG-1 β /ErbB4。

- 10 图 12 分子动力学模拟的蛋白质 C α 的 RMSD 和 RMSF 图。(A) NRG-1 β /ErbB3 和 NRG-1 β /ErbB4 的 RMSD 图, (B) NRG-1 β /ErbB3 和 NRG-1 β /ErbB4 的 RMSF 图。

实施发明方式

为清楚公开发明内容而不是限制发明, 分以下小节详细说明。

A. 释义

- 15 除另有定义, 这里使用的所有科技术语与本发明所属技术领域的普通技术人员理解含义相同。所有专利文献、专利申请文献、公开的专利文献和其他出版物均作为参考。如本节阐述的定义与上述参考文献所述的定义不一致或相反时, 以本节阐述的定义为准。

- 20 在此所用“一个”的意思是“至少一个”或“一个或多个”。

- 在此所用“神经调节蛋白”或“neuregulin”或“NRG”、“NRG-1”、“NRG-2”、“NRG-3”、“NRG-4”的意思是指与 ErbB2/ErbB4 或 ErbB2/ErbB3 结合, 可以激活上述受体的蛋白质或多肽。它能激活上述受体, 25 并调控多种生物反应: 如刺激乳腺癌细胞分化和乳蛋白的分泌; 诱导神经脊细胞分化为 Schwann 细胞; 刺激骨骼肌细胞内乙酰胆碱受体的合成; 以及促进心肌细胞成活。常见神经调节蛋白可由如 NRG-1、NRG-2、NRG-3、NRG-4 基因或核酸(如 cDNA) 编码的蛋白质或多肽。由于在多肽的非功能区域个别氨基酸的改变对其功能无影响(参见 Watson 等. *Molecular Biology of the Gene*, 4th Edition, 1987, The Bejacmin/Cummings Pub. co., p.224), 这里, NRG 30 也包括保留 NRG 保守氨基酸序列, 但其生物学活性不变的 NRG 异构体。

在此所用“EGF样结构域”或“epidermal growth factor-like domain”或“EGF-like domain”是指与 ErbB2/ErbB4 或 ErbB2/ErbB3 结合，具有与 EGF 受体结合区域相同结构的多肽结构，常见“EGF样结构域”可由 NRG-1、NRG-2、NRG-3，NRG-4 基因或核酸（如 cDNA）编码。“EGF样结构域”包括 α 、 β 亚型。关于 EGF 样结构域参见 WO 00/64400, Holmes 等., *Science*, 256:1205-1210 (1992); 美国专利 Nos. 5,530,109 及 5,716,930; Hijazi 等, *Int. J. Oncol.*, 13:1061-1067 (1998); Chang 等, *Nature*, 387:509-512 (1997); Carraway 等, *Nature*, 387:512-516 (1997); Higashiyama 等, *J. Biochem.*, 122:675-680 (1997) 及 WO 97/09425。

在此所用“功能片段或类似物”是指神经调节蛋白的功能片段或类似物保留对灵长类疾病的预防、治疗或延缓作用。通常，这些功能片段或类似物至少保留 50% 对预防、治疗或延缓灵长类疾病的作用，更好的情况下，这些功能片段或类似物至少保留 60%，70%，80%，90%，95%，99% 或 100% 预防、治疗或延缓灵长类疾病的作用。

在此所用“erb”指两种癌基因，erb A 和 erb B，与骨髓成红血细胞增多症病毒相关（一种急性的转化性逆转录病毒）。

在此所用“用于治疗特定疾病的化合物的有效用量”是指足以改善，或是以某种方式减少与该疾病相关的症状的用量。这样的用量可以作为单一剂量或者根据一个配方其可有效的服用剂量。这个用量可能治愈疾病，但是典型的情况是为了改善疾病症状而服用。为达到期望的症状改善，可能需要连续服用。

在此所用“治疗”的意思是使任何状态、不适或疾病的症状得到改善或存在有益变化的方法。治疗也包括其中组合物的任意药物治疗应用。

在此，通过服用特定的药物治疗组合物达到特定不适的症状“改善”是指任何的减轻，不管是永久的还是暂时的，持久的还是短暂，只要该减轻可以归功于或是与服用组合物有关系。

在此所用“重组方法生产”是指使用重组核酸方法的生产方法。本方法是以众所周知、用克隆化的核酸表达所编码的蛋白质的分子生物学方法。

在此所用“互补的”当是指两个核酸分子时，意思是两个核苷酸序列能杂交，优选是低于 25%，更优选是低于 15%，甚至更加优选是低于 5%，最优选是在相对的核苷酸处不存在错误配对。优选在严格条件下，这两个分子

5 杂交。

在此所用决定错误配对百分率的“杂交的严格性”如下规定：

高严格性：0.1 x SSPE, 0.1% SDS, 65°C；

中等严格性：0.2 x SSPE, 0.1% SDS, 50°C；（也指适度严格性）

10 低严格性：1.0 x SSPE, 0.1% SDS, 50°C；

应理解为使用对等的缓冲液、盐和温度，可以获得相当的严格性。

“载体（质粒）”是指用于将外源 DNA 导入细胞进行表达或复制的不连续的元件。选择和使用此种载体在这种技术人员的技术范围内是广为人知的。

15 表达载体包括能表达 DNA 的载体，其 DNA 有效地与调控序列，例如启动子区域，连接在一起。调控序列能影响该段 DNA 片段的表达。所以，一个表达载体是指重组 DNA 或 RNA 构成物，例如质粒、噬菌体、重组病毒或其他载体，它们一旦导入适当的宿主细胞中，导致克隆的 DNA 表达。合适的表达载体对本领域的技术人员而言十分清楚，并且包括能在真核细胞和（或）

20 原核细胞中复制的载体以及保持游离态或整合进宿主细胞基因组的载体。

在此所用“启动子区域或启动子元件”是指控制与其有效连接的 DNA 或 RNA 的转录 DNA 或 RNA 片段。启动子区域包含足以让 RNA 聚合酶识别、结合和转录起始的特定序列。启动子区域的这一部分是指启动子。并且，启动子区域还包括调节 RNA 聚合酶识别、结合和转录起始活动的序列。这些

25 序列可以是顺式作用因子或对反式作用因子作出响应。依据调节的性质，启动子可以是组成型的或调节型的。考虑用于原核生物的典型的启动子包括噬菌体 T7 和 T3 启动子和相似的启动子。

在此所用“有效连接和有效结合”是指核苷酸效应序列和调节序列，例如启动子、增强子、转录和翻译终止位点和其他信号序列与 DNA 间的功能关系。举例而言，DNA 和启动子的有效连接是指 DNA 和启动子间的物理和功能关系，该关系使专一识别、结合和转录该段 DNA 的 RNA 聚合酶能够从启动子处起始该段 DNA 的转录。为便于优化表达和（或）体外转录，有必

30

要去掉、增加或改变克隆的 5'不翻译部分，以便消除多余的、潜在在不适当替代性翻译起始密码子或其他不论是在转录或翻译水平上干扰或减少表达的序列。其他方法还有将核糖体结合位点共有序列紧接起始密码子的 5'插入，可以增强表达。(参考实例，Kozak, 生物化学杂志 (*J. Biol. Chem.*, 5 266:19867-19870 (1991)。

B. 筛选特异性激活 ErbB 受体的 NRG 突变体的方法

本发明提供了筛选特异性激活 ErbB 受体的 NRG 突变体的方法，该方法包括：用同源模建方法建立 NRG、ErbB3、ErbB4、NRG /ErbB3 和 NRG /ErbB4 复合物的三维结构；分子动力学模拟 NRG /ErbB3 和 NRG /ErbB4 在溶液中的构象和稳定性；MM/PBSA 方法计算 NRG 与 ErbB3 或 ErbB4 的结合自由能；
10 丙氨酸理论扫描计算方法确定 NRG 残基突变成丙氨酸后对 NRG 与受体亲合性变化，根据该变化确定特异性激活 ErbB 受体的 NRG 突变体的筛选方法。

C. NRG 突变体及其制备

本发明涉及编码 NRG 突变体的核酸片段。编码 NRG 突变体的核苷酸序列包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 25 突变成丙氨酸的氨基酸序列的核酸片段。编码 NRG 突变体的核苷酸序列包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 35 突变成丙氨酸的氨基酸序列的核酸片段。编码 NRG 突变体的核苷酸序列包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 46 突变成丙氨酸的氨基酸序列的核酸片段。编码 NRG 突变体的核苷酸序列包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 16 突变成丙氨酸的氨基酸序列的核酸片段。编码 NRG 突变体的核苷酸序列包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 29 突变成丙氨酸的氨基酸序列的核酸片段。编码 NRG 突变体的核苷酸序列包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 31 突变成丙氨酸的氨基酸序列的核酸片段。编码 NRG 突变体的核苷酸序列包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 33 突变成丙氨酸的氨基酸序列的核酸片段。编码 NRG 突变体的核苷酸序列包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 47 突变成丙氨酸的氨基酸序列的核酸片段。
15
20
25

核酸片段可以适当的形式存在。例如，分离的核酸片段包括 DNA、RNA、PNA 或其衍生物。此外，分离的核酸片段可以包含 DNA 和 RNA 或其衍生物。分离的核酸片段能够是单链形式并且适合杂交分析。另外，分离的核酸片段也能够是双链形式并在杂交分析前变性成单链结构。
30

分离的核酸片段可以包括包含遗传密码和（或）自然发生结构的任何一种寡聚核苷酸或核酸链。分离的核酸片段能够包括非自然结构，例如非自然碱基，例如次黄嘌呤和黄嘌呤，非自然糖类，例如 2'-甲氧基核酸，或非自然磷酸二酯键，例如甲基磷酸酯、偶磷酸酯和多肽。

5

分离的核酸片段能用任何适合的方法产生。例如，分离的核酸片段由化学合成(参见, Ausubel, 分子生物学流行方法 (*Current Protocols in Molecular Biology*), 2.11.寡核苷酸的合成和纯化 (*Synthesis and purification of oligonucleotides*), John Wiley & Sons 公司(2000)), 自然物中分离, 由重组方法产生或由上述方法结合产生。优选地, 用重组方法产生分离的核酸片段。

10

本发明还提供了包括上述核酸片段的质粒。同时, 提供了包括上述质粒的细胞, 包括任何适合的细胞, 例如, 细菌细胞、酵母细胞、真菌细胞、植物细胞、昆虫细胞、动物细胞和人细胞。

15

本发明涉及生产 NRG 突变体的方法, 该方法包括培养表达 NRG 突变体的细胞, 以及回收表达的 NRG 突变体。

本发明涉及 NRG 突变体的蛋白质或肽, NRG 突变体包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 25 突变成丙氨酸的氨基酸序列, 包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 35 突变成丙氨酸的氨基酸序列, 包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 46 突变成丙氨酸的氨基酸序列, 包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 16 突变成丙氨酸的氨基酸序列, 包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 29 突变成丙氨酸的氨基酸序列, 包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 31 突变成丙氨酸的氨基酸序列, 包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 33 突变成丙氨酸的氨基酸序列, 包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 47 突变成丙氨酸的氨基酸序列的蛋白质或肽。任何一种合适的方法能产生 NRG 突变体。例如, NRG 突变体能化学合成、从自然材料中分离、用重组方法产生或由上述方法结合生产。优选地, 用重组方法生产 NRG 突变体。

20
25
30

本发明涉及一种药物组合物, 该药物组合物包括分离的核酸片段和药学上可以接受的载体或赋形剂, 该核酸片段编码 NRG 突变体的核苷酸序列包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 25 突变成丙氨酸的氨基酸序列的核酸片段。编码 NRG 突变体的核苷酸序列包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 35

突变成丙氨酸的氨基酸序列的核酸片段。编码 NRG 突变体的核苷酸序列包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 46 突变成丙氨酸的氨基酸序列的核酸片段。编码 NRG 突变体的核苷酸序列包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 16 突变成丙氨酸的氨基酸序列的核酸片段。编码 NRG 突变体的核苷酸序列包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 29 突变成丙氨酸的氨基酸序列的核酸片段。编码 NRG 突变体的核苷酸序列包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 31 突变成丙氨酸的氨基酸序列的核酸片段。编码 NRG 突变体的核苷酸序列包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 33 突变成丙氨酸的氨基酸序列的核酸片段。编码 NRG 突变体的核苷酸序列包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 47 突变成丙氨酸的氨基酸序列的核酸片段。包括编码的氨基酸序列所对应的核苷酸序列或其互补链。

本发明涉及一种药物组合物，该药物组合物包括基本上纯化的蛋白质或肽和一种药学上可接受的载体或赋形剂，该蛋白质或肽包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 25 突变成丙氨酸的氨基酸序列，包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 35 突变成丙氨酸的氨基酸序列，包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 46 突变成丙氨酸的氨基酸序列，包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 16 突变成丙氨酸的氨基酸序列，包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 29 突变成丙氨酸的氨基酸序列，包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 31 突变成丙氨酸的氨基酸序列，包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 33 突变成丙氨酸的氨基酸序列，包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 47 突变成丙氨酸的氨基酸序列的蛋白质或肽。

D. NRG 突变体的应用

在本发明中，特异性激活 ErbB 受体的 NRG 突变体，通过专一性激活 ErbB2/ErbB4 受体或专一性激活 ErbB2/ErbB3 受体途径预防、治疗或延缓哺乳动物疾病。

本发明中，筛选的 NRG 突变体在制备特异性激活 ErbB2/ErbB3 受体药物的应用。本发明中，筛选的 NRG 突变体在制备特异性激活 ErbB2/ErbB4 受体药物的应用。

本发明中，特异性激活 ErbB 受体的 NRG 突变体能用于预防、治疗或延缓任何哺乳动物例如小鼠、大鼠、兔子、猫、狗、猪、奶牛、牛、绵羊、山羊、马和灵长类动物。

本发明中，哺乳动物疾病包括发生在骨、耳、眼睛、眼睑、头颈部、心脏、喉、下颚、下颚外侧髁、上颌骨、嘴、鼻咽、鼻子、口腔、胰腺、腮腺、耳廓、垂体、前列腺视网膜、唾液腺、皮肤、肌肉、脊髓、甲状腺、扁桃腺、神经系统、呼吸系统、消化系统、循环系统、生殖系统、泌尿系统、内分泌系统、心血管疾病、造血系统的疾病。

在本发明中，特异性激活 ErbB2/ErbB3 受体的 NRG 突变体，通过专一性激活 ErbB2/ErbB3 受体途径，预防、治疗或延缓哺乳动物神经系统疾病，其中神经系统疾病包括中枢神经系统疾病、周围神经系统疾病、脊髓疾病、脑膜疾病、脱髓鞘性疾病、锥体外系统疾病。这里特异性激活 ErbB2/ErbB3 受体的 NRG 突变体包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 25 突变成丙氨酸的氨基酸序列，包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 35 突变成丙氨酸的氨基酸序列，包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 46 突变成丙氨酸的氨基酸序列，的蛋白质或肽。

15

在本发明中，特异性激活 ErbB2/ErbB4 受体的 NRG 突变体，通过专一性激活 ErbB2/ErbB4 受体途径，预防、治疗或延缓哺乳动物心脏病。这里特异性激活 ErbB4 受体的 NRG 突变体包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 16 突变成丙氨酸的氨基酸序列，包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 29 突变成丙氨酸的氨基酸序列，包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 31 突变成丙氨酸的氨基酸序列，包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 33 突变成丙氨酸的氨基酸序列，包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基位点 47 突变成丙氨酸的氨基酸序列的蛋白质或肽。本发明中，特异性激活 ErbB2/ErbB4 受体的 NRG 突变体，可预防、治疗或延缓哺乳动物心脏病如人的心力衰竭、心肌梗塞、扩张型心脏病及心肌炎。

25

NRG 突变体用于预防、治疗或延缓哺乳动物疾病的配方、剂量和给药途径，尤其作为药物组合物时，可根据本技术领域所知的方法加以确定。（参见，例如，雷明顿：药剂学科学与实践（Remington: The Science and Practice of Pharmacy），Alfonso R. Gennaro (编者)，Mack 出版社，1997 年四月；治疗用肽和蛋白：配方、加工和传递系统（Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems），Banga, 1999；和肽和蛋白制药配方的发展（Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins），Hovgaard 和 Frkjr (编者)，Taylor & Francis 公司，2000；脂质体的

30

医学应用 (Medical Applications of Liposomes), Lasic 和 Papahadjopoulos (编者), Elsevier Science, 1998; 基因治疗教程 (Textbook of Gene Therapy), Jain, Hogrefe & Huber 出版社, 1998; 腺病毒: 基因治疗的基本生物学 (Adenoviruses: Basic Biology to Gene Therapy), 15 卷, Seth, Landes Bioscience, 1999; 生物制药的药物设计和发展 (Biopharmaceutical Drug Design and Development), Wu-Pong 和 Rojanasakul (编者), Humana 出版社, 1999; 治疗学上的血管发生: 从基础科学到临床 (Therapeutic Angiogenesis: From Basic Science to the Clinic), 28 卷, Dole 等(编者), Springer-Verlag New York, 1999)。NRG 突变体可配制成用于口服, 直肠给药, 局部用药, 吸入法用药, 口腔用药 (例如舌下), 注射用药 (例如, 皮下的, 肌内的, 皮内的, 静脉的), 经皮给药或其他适合的给药途径。在任何给定的情况下, 最合适的给药途径将取决于要治疗情况的性质和严重程度以及所用的特定 NRG 突变体的性质。优选地, 本发明中 NRG 突变体通过静脉注射给药。

NRG 突变体能够单独使用。优选的方式是, NRG 突变体与药物治疗上可接受的载体或者赋形剂共同使用。任何合适的药物治疗可以接受的载体或者赋形剂能用于本方法中 (参见, 例如, 雷明顿: 药剂学科学与实践 (*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*), Alfonso R. Gennaro (编者), Mack 出版社, 1997 年四月)。

根据本发明, 无论单独或是与其它药剂、载体或赋形剂联合使用的 NRG 突变体或者编码 NRG 突变体的核酸, 可以系统用于任何的给药途径, 诸如海绵体内注射、皮下注射、静脉注射、肌肉注射、皮内注射、口服或局部用药。本方法可以使用以单位剂量形式、一次用量针剂或多剂量容器的含有添加的防腐剂的注射制剂。该配方可以采用油质或水质赋形剂中的悬浊液, 溶液或乳浊液形式并且可以包含配方试剂, 例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。活性成分也可以是粉状, 以便在使用前与适合的载体、无菌不含热源的水或其他溶剂混合。本发明的局部用药可以采用泡沫状物、凝胶体、霜、药膏、透皮药膏或软膏。任何适合给药途径可以使用。剂量形式包括片剂、锭剂、扁囊剂、分散体、悬浊液、溶液、胶囊、药膏和类似形态 (参考, 雷明顿氏药物治疗科学)。优选地, 本发明中 NRG 突变体或者编码 NRG 突变体的核酸是冻干粉方式。

治疗或预防中药物治疗剂量的大小将随治疗的状况的严重程度和给药途径变化。剂量和剂量频率根据病人自身年龄、体重、疾病状况和反应而变化。

主治医生应当知道怎样和何时由于药物毒性或不利的效应终止、中断或将治疗调整到低剂量。相反地，医生应当知道怎样和何时由于临床效应不足（排除了毒性副效应），将治疗调整到高水平。

5

在实际应用中，无论单独或是与其它药剂联合使用的 NRG 突变体可以根据传统药物治疗混合技术作为活性成分与诸如 β -环糊精和 2-羟基-丙基- β -环糊精的药物治疗载体或赋形剂形成紧密添加混合物。载体根据期望使用方式，局部或注射用药，采取多种配制形式。在制备用于注射剂的组合物时，
10 例如静脉注射或静脉灌输，相同的制药介质可以使用，水、乙二醇、油、缓冲液、糖、防腐剂、脂质体和其他具有本技术领域技能的人所知的介质。注射组合物的实例包括，但不限于，5% w/v 的葡萄糖、正常生理盐溶液或其他溶液。待给药的 NRG 突变体总剂量可以在一小瓶含有体积从 1 毫升到 2000 毫升的静脉内液体中使用。根据所用总剂量，稀释液体体积将有所变化。

15 实施例 筛选特异性激活 ErbB 受体的 NRG 突变体

1. 方法

NRG-1 β 的 EGF 样域能结合并激活受体执行生物功能。在本研究中，为了简化模型，配体选择 NRG-1 β 的 EGF 样域（NRG- β 177-229，残基 1-52），下面简称其为 NRG-1 β 。由于目前缺乏 NRG-1 β 和受体 ErbB 的三维结构信息，因此有必要用理论预测方法构建出它们的蛋白质三维结构，从而在微观上研究其配体/受体相互作用。另外，目前为止，在理论生物学研究上运用同源模建、分子动力学模拟和自由能计算在原子水平上研究蛋白质/小分子配体或者蛋白质/蛋白质相互作用已经有很多成功的例子¹²⁻¹⁷。同源蛋白模建方法
20 在预测蛋白和模板蛋白序列同源性高于 30%时可准确地构建预测蛋白的三维结构，而分子动力学方法可用于模拟蛋白质/小分子配体或者蛋白质/蛋白质在溶液中的构象变化¹⁵。而且，近年来，一种新的理论研究方法—MM/PBSA（the Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area），由于其同时兼有快速的计算和准确的结果两大优点引起了众多计算生物学家的注意并在研究
25 中得到广泛的应用¹⁸⁻²¹。这种方法结合了用于连续溶液方法计算溶剂的分子力学能量和正则模式分析估计整个体系的自由能，它通过计算各个终态的自由能而无需考虑模拟中间状态，从而极大地减小了计算量。众所周知，丙氨酸扫描实验可以研究实验上配体与受体作用界面上残基对复合物中配体与受体亲合性的贡献。而基于 MM/PBSA 方法，丙氨酸扫描理论计算方法可以从
30

理论预测突变点残基对配体/受体结合的贡献,这种方法已经被应用于研究工作并取得了极大的成功^{21,22}。

由于 ErbB 家族胞外区具有很高的序列同源性,如表 3.1。因此,在本章的研究中, NRG-1 β /ErbB3 和 NRG-1 β /ErbB4 复合物三维结构的构建是以 EGF/EGFR 复合物晶体结构 (PDB 号:livo)²³ 和 NRG-1 α 的 NMR 结构 (EGF 样域, PDB 号: 1haf)²⁴ 作为模板结构。MM/PBSA 方法用来分别估算 NRG-1 β 与 ErbB3 或 ErbB4 的结合自由能。另外,丙氨酸理论扫描计算方法用来研究 NRG-1 β 每一个残基突变成丙氨酸后对 NRG-1 β 与受体亲合性变化情况。从而建立一个关于 NRG-1 β /ErbB3 和 NRG-1 β /ErbB4 的理论模型,为下一步设计增加 NRG-1 β 对 ErbB4 选择性结合的研究提供有意义的指导。

表 3.1 ErbB 家族间胞外区序列同源性比较图

| ErbB3 胞外区 | 结构域 I% | 结构域 II% | 结构域 III% | 结构域 IV% |
|-----------|--------|---------|----------|---------|
| ErbB1 胞外区 | 56 | 67 | 64 | 48 |
| ErbB2 胞外区 | 43 | 48 | 42 | 49 |
| ErbB4 胞外区 | 43 | 48 | 41 | 40 |

3.3 结果和讨论

3.3.1 ErbB3 和 ErbB4 与 NRG-1 β 三维结构的构建和评估

3.3.1.1 ErbB3 和 ErbB4 三维结构的构建

通过 Fasta 和 Blast 搜索到与 ErbB3 或 ErbB4 序列同源性较高的蛋白结构主要有: ErbB 家族中无配体的 ErbB3 晶体结构 (pdb 号: 1m6b)²⁵、未激活的 EGF/EGFR 晶体结构 (pdb 号: 1nql)²⁶ 以及人类表皮生长因子及其受体胞外区 (EGF/EGFR) X 射线晶体结构 (PDB 号:livo)²³。虽然 ErbB 家族中无配体的 ErbB3 晶体结构具有与 ErbB3 完全一致的序列,但是,经配体活化后的含配体的 ErbB3 具有与之完全不同的构象。而在本章我们研究 ErbB3 或 ErbB4 与其配体 NRG-1 β 间的相互作用,因此,综合上面因素,我们选取了 EGF/EGFR 的 X 射线晶体结构 (PDB 号:livo)²³ 作为 ErbB3 和 ErbB4 模板结构。ErbB3、ErbB4 和 EGF 的序列取自于 Swiss-Prot/TrEMBL 数据库。

在 ErbB 家族中,它的胞外区结构分为四个结构域 (I—IV)。其中结构域 II 和结构域 IV 是半胱氨酸区,分别含有 24 和 21 个 Cys²⁷。由于在 EGFR 的晶体结构,由残基 513—619 的结构域 IV 是一个无序的结构。因此,在我们进行同源模建结构时不包含这个区域。所有的序列联配都是用 InsightII 的 Homology 模块分别对 ErbB3 和 EGFR、ErbB4 和 EGFR 与 NRG-1 β (NRG- β 177-229) 和 NRG-1 α 序列联配后产生。具体参数为: Gap Penalty 为 6; Gap

length Penalty 为 1.65。NRG-1 β 以 NRG-1 α 的 NMR 结构为模板结构，而 ErbB3 和 ErbB4 以上述的 EGFR 晶体结构为模板结构。所有在模板结构中
5 存在缺失原子的残基均用 Sybyl 的 Biopolymer 补齐其缺失的原子。在模板结构 EGFR 中几个与配体 EGF 残基存在疏水作用的关键残基 Leu69、Leu98、
Val350、Asp355 和 Phe357 在 ErbB3 和 ErbB4 中均设定为保守残基^{23,27}；另外，构成 EGFR 中甘氨酸堆积的残基（结构域 I 的 39、63、85 和 122 位及结构 III 中的 343、379、404 和 435 位）在 ErbB3 和 ErbB4 中也设定为保守残基；最后，在所有的模板中，构成二硫键的 Cys 设定成保守残基。最终的
10 NRG-1 β 和 NRG-1 α 的序列联配结果如图 1、ErbB3 和 EGFR 及 ErbB4 和 EGFR 联配结果如图 2(A)和(B)。如图 2，ErbB3 的序列（残基 8—511）、ErbB4 的序列（残基 25—533）与晶体结构 EGFR（残基 3—512）的序列同源性分别为 44%和 48%，而两者的序列相似性则高达约 80%。构建好后 ErbB3、ErbB4 结构与 EGFR 模板结构的 RMSD 分别为 0.55Å 和 0.39Å，如图 3 (B)、(C) 所示。

15 3.3.1.2 NRG-1 β 三维结构的构建

NRG-1 β (NRG- β ₁₇₇₋₂₂₉，下文将其序号从 1 开始) 以 NRG-1 α 的 NMR 结构 (EGF 样域，PDB 号：1haf)²⁴ 为模板结构。NRG-1 β 、NRG-1 α 的序列取自于 Swiss-Prot/TrEMBL 数据库，它们间的序列同源性高达 80%，如图
20 1。由于 NRG-1 α 的 NMR 结构中 C 末端（残基 51—63）是一个柔性大的无序结构，而有研究表明²⁸，NRG-1 β 的残基 1 至 50 就己能维持与受体结合并激活受体的正常生物功能。因此，在本章的研究中，我们选取了 NRG-1 β 的剪切体（残基 1—52）作为研究模型。从结构上看，它的 N 末端包括三条 β 折叠和一个 α 螺旋区以及 C 末端上有一个短的 β 折叠。同时，整个结构通过形成六个 Cys 形成三对二硫键 (Cys6-Cys20、Cys14-Cys34 和 Cys36-Cys45)。

25 3.3.1.3 NRG-1 β /ErbB 复合物三维结构的构建

在 NRG-1 β 、ErbB3 和 ErbB4 最初的模型分别建立后，重要的一步是 NRG-1 β /ErbB3 和 NRG-1 β /ErbB4 复合物结构的构建。由于缺乏 NRG-1 β /ErbB3 和 NRG-1 β /ErbB4 复合物结构信息，因此，这两个复合物结构的构建以 EGF/EGFR 晶体结构为模板。从三维结构上看，NRG-1 α 的 EGF 样结构域与 EGF/EGFR 复合物中配体 EGF 的结构非常的相似，因而在我们研究
30 NRG-1 β 结构与 EGF 结构极其相似，RMSD 为 1.3Å，如图 3 (A)。因此，复合物结构的构建是将 NRG-1 β 结构重叠入 EGF/EGFR 中 EGF 结构的位置，

也即位于 ErbB3 或 ErbB4 的结构域 I 和结构域 III 之间，这与实验报道²⁹认为 NRG-1 β 与 ErbB3 发生作用的位点位于结构域 I 和 III 的结果相一致。同时，定点突变实验表明 NRG-1 β 的 N 末端和 C 末端区域对于配体与受体的结合是极其重要的²⁸。由于这两个区域在结构上相互距离很远，也即 NRG-1 β /ErbB 之间的作用是多个区域联合作用的，这与同源模建得到的复合物结构结果是一致的。虽然 NRG-1 β 结构与 EGF 结构非常相似，但它们结构上一个环区（NRG-1 β 中是残基 21-33、EGF 中是残基 21-30）存在较大差别。但是，有实验证明当 NRG-1 β 上的残基 21-33 被 EGF 上的残基 21-30 代替对它的配体/受体结合能力及激活受体磷酸化能力没有任何影响²⁸。综上所述，NRG-1 β 与 EGF 结构上伸出的环区结构的不同对于构建复合物结构并不影响配体/受体的作用。因此，我们分别构建了 NRG-1 β /ErbB3 和 NRG-1 β /ErbB4 的复合物结构。

3.3.1.4 ErbB3、ErbB4、NRG-1 β 及其复合物三维结构的评估

同源模建方法建立的结构必须经过一些方法对其结构进行检验以证明其结构的可靠性。所有的结构均经 PROCHECK 和 Profiles-3D 程序检验理论模建所得结构的立体化学及蛋白质结构的正确性。

(1) Profiles-3D 相容性评估

在 Profiles-3D 的结构评估中，它对蛋白质中每一个残基进行相容性打分的测试。结果为表 3.2。最后可以看出 Profiles-3D 评估得到了较好的结果。从表中可以看出，我们建立的这些结构的蛋白的相容性得分是相当高的，这说明了这些结构在溶液环境中相容性是很好的。

表 3.2 ErbB3 和 ErbB4 结构的 Profiles-3D 的结构评估结果表

| 模型 | 相容性得分 | 总分 | 可靠模型所需的最低得分 |
|----------------------|--------|--------|-------------|
| NRG-1 β | 19.21 | 23.33 | 10.50 |
| ErbB3 | 208.62 | 232.60 | 104.67 |
| ErbB4 | 213.36 | 232.60 | 104.67 |
| NRG-1 β /ErbB3 | 200.89 | 237.66 | 106.95 |
| NRG-1 β /ErbB4 | 198.68 | 239.97 | 107.98 |

PROCHECK 立体化学评估

表 3.3 NRG-1 β /ErbB3 和 NRG-1 β /ErbB4 三维结构 PROCHECK Ramachandran 表

| | ErbB3 | ErbB4 |
|---------------------|-------|-------|
| 位于有利区域的残基百分数% | 68.0 | 73.9 |
| 位于附加的可接受区域的残基百分数% | 28.2 | 23.6 |
| 位于一般情况下可接受区域的残基百分数% | 2.3 | 0.8 |
| 位于不利区域的残基百分数% | 1.5 | 1.6 |
| 除非甘氨酸和脯氨酸外残基总百分数% | 100.0 | 100.0 |
| G 因子 | -0.23 | -0.18 |

由于复合物结构是我们最终需要的结构,在这里我们仅对复合物结构进行评估, PROCHECK 评估结果列于表 3.3 和图 (A)和 (B)。 PROCHECK 主要通过 Ramachandran 图分析蛋白质结构的立方化学性质(如主链的 Φ 和 Ψ 角度)的合理性, 以及通过将蛋白质划分成“有利区域”、“附加的可接受区域”、“一般情况下可接受区域”和“不利区域”四种区域, 然后通过统计蛋白质中除甘氨酸和脯氨酸外残基位于不同区域的百分数以描述蛋白质结构的优劣。从结果上看, 对于 NRG-1 β /ErbB3 和 NRG-1 β /ErbB4 复合物结构来说, 位于“有利区域”和“可接受区域”的残基百分数分别占 96.2%和 97.5%。而 G 因子, NRG-1 β /ErbB3 和 NRG-1 β /ErbB4 的分别为-0.23 和-0.18。对 G 因子来说, 一般认为高于-0.5, 蛋白质结构的立体化学性质是相当合理的。同时, 从键长分析上看, 100%的键长均符合正常范围; 从键角分析上看, 对 NRG-1 β /ErbB3 和 NRG-1 β /ErbB4 这一数字分别为 97.7%和 97.9%; 从二面角分析上看, 对 NRG-1 β /ErbB3 和 NRG-1 β /ErbB4 这一数字分别为 94.1%和 93.4%。通过立体化学验证, 说明我们所建立的 NRG-1 β /ErbB3 和 NRG-1 β /ErbB4 结构是相当合理的。

综上所述, 通过 Profiles-3D 相容性评估和 PROCHECK 立体化学评估, 我们建立的 NRG-1 β /ErbB3 和 NRG-1 β /ErbB4 结构具有相当的准确性, 它不仅在蛋白质结构上是合理的, 而且它能初步反映一些实验信息, 是基于知识的结构模建的结果, 可以为我们下一步的分子动力学模拟和自由能计算提供一个良好的起点。

3.3.2、分子动力学模拟

在理论构建出复合物结构基础上, 我们通过 Sybyl6.8 软件包用 Amber 力场进行能量最小化以优化结构。优化策略如下: 先优化蛋白质结构的 H 原子, 固定其它所有原子; 接着优化所有的侧链原子, 固定主链原子; 再接着固定

保守区原子，优化结构变异区原子；最后，优化所有原子至收敛。能量最小化过程中用到的参数如下：Kollman-united-atom 力场，非键 cutoff 为 9.5Å，介电常数为 4.0，最后优化的模型用以做分子动力学模拟的初始点。

3.3.2.1 分子动力学模拟方法及策略

5 为了考察蛋白的构象变化以及配体与受体作用时的动态信息，我们采取了分子动力学方法来进行研究。分子动力学是在分子力学的基础上发展起来的，它采用牛顿第二运动方程来描述原子核的运动，所有电子的运动以及电子运动对核运动的影响都被忽略。整个分子动力学的计算流程如下：

- 10 ● 确定体系所有粒子的初始坐标 $\vec{r}_i^0(t)$ 和 $\vec{v}_i^0(t)$ 。这里 $\vec{v}_i^0(t)$ 通常都是按照体系的初始温度根据波尔兹曼分布赋值。
- 采用特定的力场参数和能量评价函数从 $\vec{r}_i^0(t)$ 得到体系的势函数，由此计算每个粒子上的 $\vec{f}_i^0(t)$ 。再根据牛顿运动方程计算每个粒子的加速度 $\vec{a}_i^0(t)$ 。
- 运用牛顿第一运动方程由 $\vec{r}_i^0(t)$ ， $\vec{v}_i^0(t)$ ， $\vec{a}_i^0(t)$ 积分计算 $\vec{r}_i^1(t+\Delta t)$ ， $\vec{v}_i^1(t+\Delta t)$ 。
- 15 ● 用 $\vec{r}_i^1(t+\Delta t)$ ， $\vec{v}_i^1(t+\Delta t)$ 作为输入，计算再下一步的 $\vec{r}_i^2(t)$ ， $\vec{v}_i^2(t)$ 。不断重复上述 2-4 步骤。

在我们的模拟中，采用 AMBER7.0 分子动力学程序，全部蛋白质复合物的分子动力学模拟均通过 AMBER7.0 软件包及 Parm99 力场模拟。模拟中用 TIP3P 水来模拟蛋白质溶液环境；与氢原子相连的键都采用了 SHAKE 算法进行了限制；整个复合物结构外包 10Å 的水，以保证复合物中任一原子离模拟系统盒子的边界至少 10Å；对于带电体系，加入适量的离子以中和整个体系；PME 方法用以计算长程静电相互作用。所有的动力学模拟均基于下列同样的方法：首先，所有复合物原子先用最陡下降法进行 200 步的优化，然后接着用共轭梯度法优化，以达到最后对整个复合物—水体系优化 500 步。对于两个复合物体系的总原子数及其盒子的大小列表 3.4 中。

25 表 3.4 分子动力学模拟中体系的条件的描述

| 系统 | 总原子数/水的数目 | 盒子的尺寸 (Å ³) |
|-------------|------------|-------------------------|
| ErbB3/NRG β | 79315/7976 | 100.23 × 95.83 × 82.85 |
| ErbB4/NRG β | 76954/8075 | 104.00 × 102.29 × 87.05 |

优化后的结构用以分子动力学模拟。整个体系分三个阶段在 150ps 从 0K 逐步升温 300K，然后在 300K 平衡 25ps，然后再进行数据采集，总的模拟过程对于 NRG-1 β /ErbB3 进行了 1100ps，对 NRG-1 β /ErbB4/进行了 900ps。对于非键的 cutoff 设定为 8Å，非键相互作用设定为每 25 步更新一次。SHAKE

方法用以限制包括 H 原子内的共价键原子。每个模拟都应用 Berendsen 算法在 300K 和 1.0 个大气压下进行。对于温度浴和压力浴参数分别设定为 0.2ps 和 0.05ps。进行分子动力学模拟的每一个步长定为 2fs。在能量最小化和分子动力学模拟过程中，在各个方向上用周期性的边界条件。每个蛋白质的分子动力学的初始位置 (t=0ps) 用以作研究模拟体系的稳定性及可能的结构涨落的 C α 的 RMSD 的基准点。所有的模拟都在中国科学院上海药物研究所药物发现与设计中心的 SGI3800 和 SGI3200 上完成。

3.3.2.2 分子动力学模拟结果和讨论

对于分子动力学模拟后蛋白质结构的 RMSD，见图 5。在图中可以明显看到在轨迹的前 100ps RMSD 很快的上升，然后倾向于平衡。这些 RMSD 曲线的变化幅度，在数据收集阶段并没有太大变化，这表明这两个体系已经趋向于平衡。在 NRG-1 β /ErbB4 体系中，经过前 400ps 的平衡后，它的平均 RMSD 约为 2.6 Å；而在 NRG-1 β /ErbB3 体系中，这一数值为 3.7 Å。同时，对 RMSF 的分析表明，一方面，RMSD 变化比较大的主要在末端及远离配体/受体作用位的结构域 II，而配体/受体作用位点的变化比较小；另一方面，同 RMSD 变化的趋势相同，NRG-1 β /ErbB3 体系的 RMSF 的变化要大于 NRG-1 β /ErbB4 体系。从分子动力学运动轨迹中各残基变化的幅度可以看出，在 NRG-1 β /ErbB3 体系(残基 243-256)和 NRG-1 β /ErbB4 体系(残基 265-278)构象变化的幅度较大。从无配体的 ErbB3 晶体结构上看，这些残基是结构域 II 中伸展开来 20 个 Å 的 β 发夹式结构的一部分。在 EGFR 家族中，这个 β 发夹式结构是高度保守，不仅起着连接结构域 II 和结构域 IV 的作用，而且在受体/受体相互作用中起着重要作用^{23,25,26}。由于我们选择经过剪切的配体受体 1:1 作为我们的复合物模型 RMSF，这个模型缺乏受体/受体相互作用导致缺乏结构域 II 和结构域 IV 的相互作用，因而在我们的模拟模型中，这个区域的 RMSF 比较大些。但是，整个结构的分析表明，我们的模型在分子动力学模拟过程中，结构上并没有很显著的变化，仍然保持一个比较稳定的结构。计算的步长为 1ps。对于分子动力学模拟后配体与受体的相互作用用 LIGPLOT 程序来描述。

四、配体-受体相互作用

在我们研究的 NRG-1 β /ErbB 这两个体系中，它们和 EGF/EGFR 类似，它们的配体/受体相互作用主要在三个位点存在(如图 6)。其中，NRG-1 β 的残基 20-35 和 Leu3 与受体相互作用主要发生在受体结构域 I 的位点 1；而 NRG-1 β 的残基 10-19 和 Arg44 与受体相互作用主要发生在受体结构域 III 的

位点 2; 最后, NRG-1 β 在 Tyr48 后的 C-末端残基与受体相互作用主要发生在受体结构域 III 的位点 3。NRG-1 β 的这些残基通过各种各样的静电、疏水和氢键相互作用与受体结合。

在配体/受体相互作用的氢键作用分析中, 我们主要列出了 ErbB3/NRG-1 β 和 ErbB4/NRG-1 β 配体受体间侧链形成的氢键。这些氢键主要列于表 3.5。从表上可以看出, 无论哪一个体系, NRG-1 β 上的 Arg44 和 Tyr48(Arg41 和 Arg45 在 EGF 中) 都与受体有很强的氢键相互作用^{23,30}。在氢键分析中可以看出, NRG-1 β 的 Arg44 分别与 ErbB3 的 Asp352 和 ErbB4 的 Asp376 形成盐桥。因此, 如果将 Arg44 突变成 Ala 的话, 将导致 NRG-1 β 与 ErbB3 或 ErbB4 的结合活性显著下降。

NRG-1 β 的 Arg44 与 ErbB3 的 Asp352 的侧链存在氢键作用; 而 Tyr48 则与 Asn379 的侧链存在氢键作用。而从图 8 来看, NRG-1 β 的 Arg44 与 ErbB4 的 Asp376 的侧链存在氢键作用; 而 Tyr48 则与 Asn403 的侧链存在氢键作用。

除了氢键, 如表 3.5A, 在配体 NRG-1 β 和受体 ErbB3 或 ErbB4 的位点 1、2 和 3 中存在着广泛的疏水相互作用。

在 ErbB3/NRG-1 β 复合物中, 在位点 1, ErbB3 的 Val47、Leu48、Met72、和 Leu102 的侧链原子和 NRG-1 β 的 Leu3、Val23、和 Leu33 存在较强的疏水作用(如图 7A)。如图 7B, 在位点 2 中, ErbB3 的结构域 III 的 Trp354 和 NRG-1 β 的 Phe13 和 Tyr32 形成疏水作用。进一步, NRG-1 β 的 Arg44 的长且非极性的侧链也与 Trp354 的侧链也有一定疏水作用。在位点 3 中, 如图 7C, ErbB3 的结构域 III 的 Tyr405, Phe409 和 Ile413 与 NRG-1 β 的 Tyr48 周围的残基形成一个大的疏水腔。

在 ErbB4/NRG-1 β 复合物中可看到相似的疏水作用, 作为这些疏水作用的结果, 在 ErbB4/NRG-1 β 的界面中形成了三个疏水腔。在图 8A 中, NRG-1 β 的 Leu3, Val23 和 leu33 的侧链与 ErbB4 的结构域 I 的位点 1 的 Leu36, Leu91 和 Leu121 的侧链构成第一个疏水腔。在图 8B、8C 中, NRG-1 β 的 Phe13, Val15 和 Tyr48 周围的残基分别于 ErbB4 的结构域 III 的位点 2、位点 3 分别以相似的作用形成了另两个疏水腔。所有这些通过这两个模型的而得到的相互作用均与对 NRG-1 β 和 ErbB3 及 ErbB4 的定点突变实验相吻合^{30,31}。

30

表 3.5 配体 NRG-1 β 和受体 ErbB 的氢键和疏水作用列表: (A) NRG-1 β /ErbB 在整个分子动力学模型过程中的氢键列表 (图中黑体部分为 NRG-1 β 形成氢键的残基, 仅列出 NRG-1 β 通过侧链形成氢键的残基; 平均距离为整个动力学过程所有结构该氢键的平均距离 (B) 配体 NRG-1 β 和受体的疏水作用列表

| NRG-1 β /ErbB3 | | | NRG-1 β /ErbB4 | | |
|----------------------|------------|--------|----------------------|------------|--------|
| 氢键受体 | 氢键供体 | 平均距离 A | 氢键受体 | 氢键供体 | 平均距离 A |
| ASN25 ND2 | ASN38 OD1 | 3.336 | GLU33 N | THR41 OG1 | 3.285 |
| ASN379ND2 | TYR48 OH | 3.163 | LYS35 NZ | ASP43 OD2 | 2.788 |
| ARG31NH2 | GLU131 OE1 | 3.272 | GLN151NE2 | ASP25 OD2 | 3.003 |
| ARG31NH2 | GLU131 OE2 | 2.884 | LEU437N | TYR48 OH | 3.323 |
| ARG31NH1 | GLU131 OE1 | 2.781 | LYS438NZ | GLU39 OE1 | 2.780 |
| ARG31NH1 | GLU131 OE2 | 3.317 | SER27 OG | ASP150 OD2 | 2.996 |
| ASN38ND2 | ASN25 OD1 | 3.700 | ASN28 ND2 | TYR148 OH | 3.265 |
| ARG44NH1 | ASP352 OD1 | 2.921 | ARG44 NH2 | ASP376 OD1 | 2.857 |
| ARG44NH1 | ASP352 OD2 | 3.016 | ARG44 NH1 | ASP376 OD1 | 2.927 |
| ARG44NH2 | ASP352 OD2 | 3.018 | TYR48 OH | ASN403 OD1 | 2.943 |
| ARG44NH2 | ASP352 OD1 | 3.083 | TYR48 OH | ILE436 O | 3.348 |
| ASN47ND2 | ASP343 OD1 | 2.922 | | | |
| ASN47 ND2 | TYR405 OH | 3.224 | | | |
| TYR48 OH | ASN379 OD1 | 3.067 | | | |

(B) 配体 NRG-1 β 和受体的疏水作用列表

| NRG-1 β /ErbB3 | | | NRG-1 β /ErbB4 | | |
|----------------------|------------|-------------|----------------------|------------|-------------|
| NRG-1 β | ErbB3 | Distance(Å) | NRG-1 β | ErbB4 | Distance(Å) |
| TYR48 CD2 | LYS415 CD | 3.83 | MET50 CB | TYR459 CE1 | 3.49 |
| TYR48 CG | LYS415 CD | 3.81 | TYR48 CZ | LYS438 CD | 3.64 |
| TYR48 CB | LYS415 CD | 3.90 | TYR48 CE2 | LYS438 CD | 3.20 |
| TYR48 CZ | LYS415 CB | 3.82 | TYR48 CE2 | LYS438 CB | 3.28 |
| TYR48 CE2 | LYS415 CB | 3.83 | MET50 CE | ILE436 CD1 | 3.48 |
| TYR48 CE1 | LYS415 CB | 3.68 | MET50 CE | LEU432 CB | 3.57 |
| TYR48 CD2 | LYS415 CB | 3.75 | TYR48 CE1 | TYR429 CZ | 3.72 |
| TYR48 CD1 | LYS415 CB | 3.63 | TYR48 CD1 | TYR429 CZ | 3.79 |
| TYR48 CG | LYS415 CB | 3.79 | TYR48 CE1 | TYR429 CE1 | 3.49 |
| TYR48 CZ | MET414 C | 3.69 | TYR48 CD1 | TYR429 CE1 | 3.59 |
| MET50 CG | PHE409 CZ | 3.59 | TYR48 CE2 | GLN405 CD | 3.67 |
| MET50 CG | PHE409 CE2 | 3.48 | TYR48 CZ | GLN405 CG | 3.41 |
| ALA51 CA | PHE409 CE1 | 3.72 | TYR48 CE2 | GLN405 CG | 3.14 |
| MET50 CG | PHE409 CE1 | 3.75 | TYR48 CD2 | GLN405 CG | 3.38 |
| MET50 C | PHE409 CE1 | 3.59 | TYR48 CG | GLN405 CG | 3.83 |
| MET50 CG | PHE409 CD2 | 3.64 | TYR48 CE1 | ASN403 CG | 3.70 |
| MET50 CG | PHE409 CD1 | 3.77 | PHE13 CD1 | TYR378 CZ | 3.28 |
| MET50 CG | PHE409 CG | 3.76 | PHE13 CG | TYR378 CZ | 3.79 |
| ARG44 CZ | TRP354 CE3 | 3.66 | PHE13 CB | TYR378 CZ | 3.57 |
| PHE13 CD1 | TRP354 CE2 | 3.59 | PHE13 CD1 | TYR378 CE2 | 3.23 |
| PHE13 CB | TRP354 CD1 | 3.66 | PHE13 CA | TYR378 CE2 | 3.88 |
| GLU10 CG | TRP354 CD1 | 3.70 | PHE13 CB | TYR378 CE1 | 3.51 |
| VAL15 CG2 | ILE346 CG2 | 3.87 | ARG44 CZ | TYR378 CD2 | 3.48 |
| GLN46 CD | LEU345 CD2 | 3.79 | PHE13 CA | TYR378 CD2 | 3.73 |
| ASP25 CG | GLU131 CD | 3.64 | PHE13 CA | TYR378 CD1 | 3.59 |
| LEU 3 CD2 | MET 72 CE | 3.82 | PHE13 CA | TYR378 CG | 3.58 |
| LEU 3 CD1 | MET 72 CE | 3.80 | THR12 CB | TYR378 CB | 3.69 |
| LYS35 CE | LEU 48 CD2 | 3.84 | THR12 C | TYR378 CB | 3.85 |
| LEU33 CD2 | LEU 48 CD2 | 3.84 | THR12 CG2 | PRO377 CG | 3.78 |
| LEU33 CD1 | LEU 48 CD2 | 3.82 | ARG44 CZ | ASP376 CG | 3.82 |
| LEU33 CD1 | VAL 47 CG2 | 3.36 | VAL15 CG2 | THR371 CG2 | 3.89 |
| | | | ASN47 CG | LEU369 CD1 | 3.60 |

3.3.3 NRG-1 β 与受体 ErbB 的 MM-PBSA 自由能计算

3.3.3.1 方法

MM-PBSA 是一个新发展起来的自由能计算方法，MM-PBSA/GBSA 即用 MM (Molecular Mechanics)，分子力学的方法计算配体和受体之间的静电和范德华相互作用能，用 PB (Poisson-Boltzman)，泊松玻尔兹曼方程或 GB (General Born)，波恩方程求溶剂化自由能的静电作用贡献^{32,33}，用 SA (solvent-accessibility surface areas) 和疏水自由能之间的经验关系求溶剂化自由能中的疏水作用贡献^{34,35}，从而得到配体和受体的结合自由能，如式 1、2。

$$\Delta G_{bind} = \langle E_{mm} \rangle + \Delta G_{PB} + \Delta G_{NP} - TS \quad (1)$$

$$\Delta G_{bind} = \Delta G_{complex} - [\Delta G_{receptor} + \Delta G_{ligand}] \quad (2)$$

许多研究都表明 MM-PBSA 法可以有效地计算分子间的结合自由能，利用谐振子模型估算熵的条件下也可以较好地给出分子的绝对结合自由能。但是需要指出的是在对熵的估算还是非常粗略的。虽然这些近似的方法不如自由能微扰法那么严格，但是它们可以快速的大量地对分子的结合自由能进行排序和估算，大大加速药物分子的设计和发现过程。

在 NRG-1 β /ErbB3 和 NRG-1 β /ErbB4 研究体系中，我们采用的策略具体如下：首先，从分子动力学运动轨迹中每 4ps 取一个结构 (snapshot)，总计从平衡后的 400ps 中取 100 个结构；然后，运用 AMBER7.0 的 MM-PBSA 模块中的 delphi 程序计算自由能。蛋白质的每一个结构通过上面方法取出后，然后计算出每一个复合物和受体、配体的自由能差值。由于在我们研究中，NRG-1 β 的突变体和野生型的 NRG-1 β 的差别只有一个残基，因此，我们假设熵的影响对于不同 NRG-1 β 突变体是相差很小的。从以前 Massova 和 Kollman 的计算人类 p53 的一个 12 肽和它的突变体的 T Δ S 结果表明，这种假设是可行的³⁶。因此，在下列的研究中，我们用不含 T Δ S 的 Δ G 来估计不同 NRG-1 β 突变体和 ErbB3 及 ErbB4 的结合能力的不同。因此，我们对 NRG-1 β 的 52 个残基 (除了 N 末端的 Ser1、所有的 Gly 和保持蛋白质结构的形成二硫键的 Cys) 用 MM-PBSA 方法研究其每个残基对 NRG-1 β 与受体的结合能力的贡献。

3.3.3.2 结果与讨论

3.3.3.2.1 配体/受体结合位点附近 MM-PBSA 自由能计算

表 3.6 分别列出了结合界面附近残基突变后 NRG-1 β 与 ErbB3 和 ErbB4 的结合自由能的各能量项。表 3.7 列出了运用丙氨酸扫描的计算方法计算 NRG-1 β 中约所有除 Gly、Cys、Ala 和 Pro 外共 38 个残基的突变分别对 NRG-1 β 与 ErbB3 和 ErbB4 结合的影响。 $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ 值越负代表该取代会导致配体和受体的结合更弱。另一方面,也就是说 $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ 为正值的代表将该残基突变成 Ala 后 NRG-1 β 突变体与受体的结合将增强。同时,图 10 也描述了运用丙氨酸扫描的计算方法对这两个体系的研究结果。从表 3.7 和图 10 可以看出, NRG-1 β 的几个位置的突变同时极大地减少了它与 ErbB3 或 ErbB4 的结合能力,尤其是在 44、48 和 50 位的突变。从图 7A 和表 3.5A 上可知, NRG-1 β 的 Arg44 与 ErbB3 的 Asp352 的侧链存在氢键作用;而 Tyr48 则与 Asn379 的侧链存在氢键作用。而从图 8B 和表 3.5A 来看, NRG-1 β 的 Arg44 与 ErbB4 的 Asp376 的侧链存在氢键作用;而 Tyr48 则与 Asn403 的侧链存在氢键作用。同时从 $\Delta\Delta E_{\text{ele}}$ 项可以看出, NRG-1 β 的 Arg44 和 Tyr48 结合能中主要成分来自于静电相互作用,因此,当这两个残基被非极性的 Ala 取代时,其 NRG-1 β 突变体与受体结合的能力被严重削弱了。另外,从 $\Delta\Delta E_{\text{vdw}}$ 上和表 3.5B 可以看出, Tyr48 和 Met50 突变后结合能力降低的原因可能是范德华作用的急剧减小。同时,配体和受体的疏水相互作用包含了这些基团,这些结果和实验上的定点突变结果相当的一致³⁰。理论预测的结果的可信性不仅验证了同源建模构建的蛋白质结构的可靠性,而且它为从原子水平上提供了更多实验上无法得到结构信息。从上述结果上看, Arg44、Tyr48 和 Met50 的 Ala 的突变对配体和受体的结合是不利的。

前面生物背景部分讲到, NRG-1 β 通过与 ErbB4 的结合可以加强成人心肌细胞中的肌原组织、显著地提高或者保护心肌、避免心肌进一步恶化。因此,这些能提高 NRG-1 β 与 ErbB4 结合的选择性的突变具有更大的意义。从表 3.7 和图 10 并结合实验信息³⁰可以看出,属于这类的 NRG-1 β 突变主要在 31、47 位的突变。从表 3.5A 上可知, NRG-1 β 的 Arg31 的侧链与 ErbB3 的 Glu131 的侧链存在很强的氢键作用; NRG-1 β 的 Asn47 的侧链与 ErbB3 的 Asp343 和 Tyr405 的侧链存在氢键作用。为了从动态上研究分子动力学过程中 NRG-1 β 的 Arg31 和 Asn47 的氢键,我们对其氢键距离随动力学过程的变化作图。如图 9A,可以看出,与 ErbB3 结合时, NRG-1 β 的 Arg31 的 NH1 和 NH2 分别与 Glu131 的 OE1 和 OE2 形成了一个很强的氢键网络,而这种

的氢键网络在 NRG-1 β 与 ErbB4 结合时并不存在(在与 ErbB4 结合时, NRG-1 β 的 Arg31 对结合的贡献几乎可以忽略)。而对 NRG-1 β 的 Asn47 来说, 它的情况与 Arg31 类似。如图 9B, Asn47 的 ND2 和 ErbB3 的 Asp343 的侧链形成两根较强的氢键, 另外它还与 Tyr405 形成一根较弱的氢键; 而对它与 ErbB4 结合时, NRG-1 β 的 Asn47 仅参与了部分的疏水作用。因此, 当这两个残基分别被非极性的 Ala 取代时, 其 NRG-1 β 突变体与受体 ErbB3 结合的能力被严重削弱了, 而与受体 ErbB4 结合能力变化并不大³⁰。

表 3.6 (A) NRG-1 β /ErbB3 的 MM-PBSA^a 自由能计算结果列表

10

| Contribution | Complex | | Receptor | | Ligand | | Delta ^b | |
|-----------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|------------------|
| | Mean ^c | Std ^d | Mean ^c | Std ^d | Mean ^c | Std ^d | Mean ^c | Std ^d |
| E _{ele} | -16753.91 | 112.64 | -14940.46 | 102.75 | -1361.15 | 22.58 | -452.30 | 25.80 |
| E _{vdw} | -2006.94 | 32.49 | -1739.60 | 31.19 | -123.33 | 10.46 | -144.02 | 7.29 |
| E _{int} | 10831.80 | 63.57 | 9798.05 | 60.27 | 1033.75 | 20.77 | 0.00 | 0.00 |
| E _{gas} | -7929.04 | 133.98 | -6882.00 | 123.65 | -450.73 | 25.50 | -596.31 | 25.25 |
| G _{nonpolar} | 143.01 | 1.19 | 132.17 | 1.01 | 19.13 | 0.18 | -8.28 | 0.44 |
| G _{PB} | -7440.22 | 101.09 | -6863.61 | 88.32 | -1139.12 | 18.86 | 562.52 | 25.27 |
| G _{sol} | -7297.21 | 100.53 | -6731.44 | 87.93 | -1120.00 | 18.84 | 554.23 | 25.12 |
| G _{subtotal} | -15226.25 | 66.86 | -13613.45 | 65.36 | -1570.72 | 18.19 | -42.08 | 7.21 |
| -T Δ S | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

(B) NRG-1 β /ErbB4 的 MM-PBSA^a 自由能计算结果列表

| Contribution | Complex | | Receptor | | Ligand | | Delta ^b | |
|-----------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|------------------|
| | Mean ^c | Std ^d | Mean ^c | Std ^d | Mean ^c | Std ^d | Mean ^c | Std ^d |
| E _{ele} | -16888.05 | 94.37 | -15171.74 | 66.74 | -1343.04 | 33.13 | -373.27 | 27.41 |
| E _{vdw} | -2068.19 | 31.77 | -1815.76 | 29.10 | -119.74 | 10.70 | -132.69 | 6.88 |
| E _{int} | 10794.92 | 61.48 | 9749.46 | 56.82 | 1045.46 | 19.44 | 0.00 | 0.00 |
| E _{gas} | -8161.32 | 117.81 | -7238.04 | 90.27 | -417.32 | 43.40 | -505.97 | 26.96 |
| G _{nonpolar} | 138.41 | 1.45 | 126.65 | 1.24 | 19.44 | 0.41 | -7.68 | 0.52 |
| G _{PB} | -7327.22 | 94.47 | -6658.67 | 67.14 | -1153.33 | 36.53 | 485.77 | 25.23 |
| G _{sol} | -7188.82 | 93.77 | -6532.02 | 66.67 | -1134.89 | 36.22 | 478.09 | 25.09 |
| G _{subtotal} | -15359.14 | 68.76 | -13770.06 | 63.84 | -1552.20 | 20.79 | -27.88 | 10.09 |
| -T Δ S | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

^a 上述表所列值单位为 kcal mol⁻¹;

15 ^b 差值 (Delta) = Contribution (复合物) - Contribution (受体) - Contribution (配体);

^c 400 个结构的平均值 (mean);

^d 平均值的标准偏差 (Std).

表 3.7. NRG-1 β /ErbB3 和 NRG-1 β /ErbB4 结合位点附近的 MM-PBSA 自由能计算结果 ($\Delta\Delta G_{\text{subtotal}} = \Delta G_{\text{wildtype}} - \Delta G_{\text{mutant}}$)

| NRG-1 β Position | NRG-1 β /ErbB3 $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ (kcal/mol) | NRG-1 β /ErbB4 $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ (kcal/mol) | NRG-1 β Position | NRG-1 β /ErbB3 $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ (kcal/mol) | NRG-1 β /ErbB4 $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ (kcal/mol) |
|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| His2Ala | -0.10 \pm 0.54 | 0.13 \pm 1.90 | Ser27Ala | 0.29 \pm 1.12 | 0.37 \pm 1.04 |
| Leu3Ala | -1.14 \pm 1.24 | -0.87 \pm 1.19 | Asn28Ala | 0.07 \pm 0.44 | 0.37 \pm 1.20 |
| Val4Ala | -0.02 \pm 0.14 | 0.38 \pm 1.32 | Ser30Ala | -0.62 \pm 1.45 | 0.09 \pm 1.08 |
| Lys5Ala | -0.01 \pm 0.04 | 0.09 \pm 1.03 | Arg31Ala | -5.90 \pm 1.14 | 1.83 \pm 4.21 |
| Glu8Ala | 0.34 \pm 0.54 | 0.18 \pm 1.01 | Tyr32Ala | 0.32 \pm 0.57 | -0.34 \pm 0.01 |
| Lys9Ala | -0.07 \pm 0.00 | 0.28 \pm 1.94 | Leu33Ala | -3.31 \pm 0.38 | -0.32 \pm 1.27 |
| Glu10Ala | 0.28 \pm 0.54 | 0.22 \pm 1.01 | Lys35Ala | 1.13 \pm 0.93 | 0.00 \pm 2.09 |
| Lys11Ala | -0.01 \pm 0.24 | -0.70 \pm 1.05 | Asn38Ala | 0.59 \pm 0.76 | 1.31 \pm 0.89 |
| Thr12Ala | -0.53 \pm 1.14 | -0.18 \pm 1.55 | Phe40Ala | 0.75 \pm 2.09 | -0.51 \pm 2.67 |
| Phe13Ala | -1.06 \pm 0.76 | -0.25 \pm 0.90 | Thr41Ala | 1.59 \pm 2.12 | 1.08 \pm 3.50 |
| Val15Ala | -0.78 \pm 0.86 | -1.19 \pm 0.63 | Asp43Ala | -0.77 \pm 0.54 | -0.07 \pm 1.49 |
| Asn16Ala | 0.78 \pm 0.85 | 1.90 \pm 2.94 | Arg44Ala | -0.14 \pm 2.90 | -0.05 \pm 1.44 |
| Glu19Ala | -0.39 \pm 0.44 | 0.12 \pm 1.02 | Gln46Ala | -5.43 \pm 4.79 | -5.30 \pm 2.77 |
| Phe21Ala | -0.35 \pm 0.54 | -0.65 \pm 1.02 | Asn47Ala | 3.57 \pm 2.69 | -1.01 \pm 1.62 |
| Met22Ala | -0.10 \pm 0.54 | -0.35 \pm 1.02 | Met50Ala | -0.07 \pm 2.22 | 2.03 \pm 1.72 |
| Val23Ala | -0.50 \pm 1.60 | -1.53 \pm 1.00 | Val49Ala | -2.99 \pm 2.45 | -3.05 \pm 2.40 |
| Lys24Ala | -0.07 \pm 0.44 | -0.81 \pm 1.06 | Ser52Ala | -3.45 \pm 0.54 | -0.17 \pm 1.36 |
| Asp25Ala | 2.26 \pm 0.66 | -2.20 \pm 3.71 | Tyr48Ala | -0.40 \pm 0.24 | -1.92 \pm 1.45 |
| Leu26Ala | -0.10 \pm 0.31 | 0.59 \pm 1.24 | Asn | -0.21 \pm 1.77 | 0.49 \pm 2.25 |

为了进一步研究每一个残基的 Ala 突变后对结合能的影响,我们分析了
 5 每一个突变后的分子内的范德华作用和静电相互作用的变化。在 MM-PBSA
 计算结果中,大多数情况下的分子内的静电能的变化和溶剂化能的变化相反。
 因此,综合考虑 $\Delta\Delta G_{\text{ele}}$ 和 $\Delta\Delta G_{\text{PB}}$ 是非常重要的。从图 11 上看, $\Delta\Delta G_{\text{nonpolar}}$ 相
 相对于自由能中其它能量项的变化来说几乎可以忽略不计。自由能中 $\Delta\Delta E_{\text{vdw}}$
 项大多为负,这表明进行 Ala 定点突变后,它与野生型相比,突变体减小了
 10 配体/受体结合界面的范德华作用。另一方面,大多数的残基进行 Ala 定点突
 变对能量项中 $\Delta\Delta E_{\text{ele}}$ 和 $\Delta\Delta G_{\text{PB}}$ 之和是增加的,这其中一个是例外是 Arg44 的。
 在 NRG-1 β /ErbB3 和 NRG-1 β /ErbB4 的野生型复合物中,由于正电性的
 NRG-1 β 的 Arg44 与负电性的 Asp (ErbB3 中是 Asp352, ErbB4 中是 Asp376)
 15 形成了很强的静电相互作用。类似的结果在 NRG-1 β 的 Arg31 被 Ala 取代后
 与 ErbB3 相互作用变化的结果中可以看到,而由于 NRG-1 β /ErbB4 体系的
 Arg31 与受体不存在强的静电相互作用,因此,在 NRG-1 β /ErbB4 体系则没
 有呈现出上述的现象。在 NRG-1 β /ErbB3 中,当 NRG-1 β 的 Arg31 突变成 Ala

后，它破坏了原先存在的氢键作用。而对于当受体是 ErbB4 来说，NRG-1 β 的 Arg31 与受体并不存在氢键相互作用。它的突变体的自由能的变化主要是来自于范德华作用的丧失和 $\Delta\Delta E_{\text{elec}} + \Delta\Delta G_{\text{PB}}$ 的增加之间的平衡，从无论实验还是理论结果上看，它的这种突变是有利于 NRG-1 β 和 ErbB4 间的结合，而极大地削弱了 NRG-1 β 和 ErbB3 的亲合作用³⁰。

3.3.4 不同分子动力学轨迹下 NRG-1 β 的 R31A 和 N47A 的 $\Delta\Delta G_{\text{binding}}$ 的比较研究

为了评估在 Ala 突变后，复合物体系构象变化的大小以及它对 $\Delta\Delta G_{\text{binding}}$ 的影响，我们对 NRG-1 β /ErbB3 和 NRG-1 β /ErbB4 的 Arg31Ala 和 Asn47Ala 都分别进行分子动力学的模拟。所有模拟的方法同上述部分野生型复合物的分子动力学模拟。选这两个位点的原因主要因为这两个位点的定点突变对 NRG-1 β /ErbB4 这个体系来说结合能是增强的；而对 NRG-1 β /ErbB3 体系来说结合能是减弱的。这些分子动力学的初始结构取自于同源建模得到的 NRG-1 β /ErbB3 和 NRG-1 β /ErbB4 结构，只不过这些结构中 NRG-1 β 的 Arg31 或者 Asn47 突变成 Ala。然后，我们同样有 MM-PBSA 方法计算了这几个突变体的 $\Delta\Delta G_{\text{binding}}$ 。如表 3.8 所示，用突变体重新做分子动力学模拟后计算的 $\Delta\Delta G_{\text{binding}}$ 与前面所计算得到的 $\Delta\Delta G_{\text{binding}}$ 的结果基本相似。在所有四个例子中，这两种不同方法得到的 $\Delta\Delta G_{\text{binding}}$ 能量相差不到 1kcal/mol。这说明无论在 NRG-1 β /ErbB3 还是在 NRG-1 β /ErbB4 体系中，单个 Ala 突变对整个蛋白质的构象影响较小，从而，我们可以用同一套野生型复合物的分子动力学轨迹进行计算的 Ala 扫描模拟。

表 3.8. (A) 基于野生型 NRG-1 β /ErbB3 分子动力学轨迹的 Arg31Ala 和 Asn47Ala 的 MM-PBSA 结果与基于 Arg31Ala 和 Asn47Ala 后分子动力学轨迹的 MM-PBSA 结果比较表

| ErbB3 Contribution | Arg31Ala modified trajectory of the wild type ^a | | Trajectory of the Arg31Ala mutant ^b | | Asn47Ala modified trajectory of the wild type ^a | | Trajectory of the Asn47Ala mutant ^b | |
|------------------------------|---------------------------------------------------------------|-------|---------------------------------------------------|-------|---------------------------------------------------------------|-------|---------------------------------------------------|-------|
| | Mean | Std | Mean | Std | Mean | Std | Mean | Std |
| ΔE_{ele} | -375.84 | 25.66 | -481.47 | 28.15 | -443.90 | 27.79 | -547.58 | 15.65 |
| ΔE_{vdw} | -141.02 | 7.16 | -143.31 | 7.28 | -140.22 | 6.72 | -151.41 | 5.89 |
| ΔE_{gas} | -516.86 | 25.50 | -624.78 | 27.24 | -584.12 | 27.45 | -698.99 | 15.56 |
| $\Delta G_{\text{nonpolar}}$ | -7.80 | 0.39 | -8.51 | 0.60 | -7.99 | 0.50 | -9.44 | 0.34 |
| ΔG_{PB} | 488.48 | 25.81 | 596.67 | 28.29 | 550.12 | 26.29 | 646.72 | 15.97 |
| ΔG_{sol} | 480.68 | 25.65 | 586.16 | 28.12 | 542.13 | 26.11 | 657.27 | 15.93 |
| $\Delta G_{\text{subtotal}}$ | -36.18 | 7.30 | -36.62 | 7.55 | -42.01 | 6.86 | -41.71 | 7.82 |

(B) 基于野生型 NRG-1 β /ErbB4 分子动力学轨迹的 Arg31Ala 和 Asn47Ala 的 MM-PBSA 结果与基于 Arg31Ala 和 Asn47Ala 后分子动力学轨迹的 MM-PBSA 结果比较表

| ErbB4 Contribution | Arg31Ala modified trajectory of the wild type ^a | | Trajectory of the Arg31Ala mutant ^b | | Asn47Ala modified trajectory of the wild type ^a | | Trajectory of the Asn47Ala mutant ^b | |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------|-------|---------------------------------------------------|-------|---------------------------------------------------------------|-------|---------------------------------------------------|-------|
| | Mean | Std | Mean | Std | Mean | Std | Mean | Std |
| ΔE_{ele} | -341.13 | 27.04 | -382.51 | 20.14 | -371.70 | 27.00 | -476.53 | 19.18 |
| ΔE_{vdw} | -128.92 | 6.64 | -151.00 | 6.14 | -130.88 | 6.78 | -139.35 | 5.93 |
| ΔE_{gas} | -470.04 | 26.18 | -533.51 | 19.18 | -502.58 | 26.43 | -615.88 | 18.92 |
| $\Delta G_{nonpolar}$ | -7.26 | 0.52 | -8.46 | 1.29 | -7.58 | 0.51 | -8.09 | 0.41 |
| ΔG_{PB} | 447.59 | 25.20 | 511.86 | 19.34 | 480.25 | 25.32 | 593.59 | 14.90 |
| ΔG_{sol} | 440.33 | 25.08 | 503.40 | 19.65 | 472.67 | 25.19 | 585.51 | 14.80 |
| $\Delta G_{subtotal}$ | -29.71 | 9.14 | -30.11 | 22.59 | -29.91 | 10.24 | -30.37 | 13.36 |

^a 基于野生型的 NRG-1 β /ErbB 分子动力学轨迹的 Arg31Ala 和 Asn47Ala 的 MM-PBSA 结果

^b 基于 Arg31Ala 和 Asn47Ala 分别突变后分子动力学轨迹的 MM-PBSA 结果

5 3.3.5 分子动力学模拟研究 NRG-1 β /ErbB Pro29Ala 选择性的差异

从丙氨酸扫描试验上看,当 NRG-1 β 的 Pro29Ala 时, NRG-1 β 和受体 ErbB3 亲合性减弱了几倍;而 NRG-1 β 和 ErbB4 的亲合性则得到了极大的增强。众所周知,Pro 常位于蛋白质的拐角处,起着维持蛋白质结构稳定的作用。一方面,如果 Pro 突变成 Ala 后其蛋白质的结构可能发生大的变化;另一方面,由于我们上述所用的 MM-PBSA 方法不适用于直接将 Pro 突变成 Ala 后预测其自由能变化。因此,为了考察在 Pro 突变成 Ala 后,复合物体系结构变化的大小以及这种结构变化导致 NRG-1 β 和不同受体结合能力的变化的原因,我们对 NRG-1 β /ErbB3 和 NRG-1 β /ErbB4 的 Pro29Ala 分别进行分子动力学模拟。所有模拟方法同上述分子动力学模拟部分策略一致,只不过为了能更详尽的研究这种结构上的变化,这部分研究的分子动力学模拟时间均为 2ns。模拟的初始结构取自于同源模建得到的 NRG-1 β /ErbB3 和 NRG-1 β /ErbB4 结构,只不过这些结构中 NRG-1 β 的 Pro29 突变成 Ala。然后,我们同样用 MM-PBSA 方法计算了它们的 $\Delta G_{subtotal}$,并用 Nmode 方法预测了熵变,从而得到了总的 $\Delta G_{binding}$ 。

20 3.3.5.1 分子动力学模拟结果和讨论

对于分子动力学模拟后蛋白质结构的 RMSD,见图 12 (A)。在图中可以明显看到在轨迹的前 100ps RMSD 很快的上升,然后倾向于平衡。这些 RMSD 曲线的变化幅度,在数据收集阶段并没有太大变化,这表明这两个体系已经

趋向于平衡。在 NRG-1 β /ErbB4 体系中, 经过前 400ps 的平衡后, 它的平均 RMSD 约为 3.1 Å;而在 NRG-1 β /ErbB3 体系中, 这一数值为 3.0 Å。同时, 对 RMSF 的分析表明(如图 12 (B)), RMSD 变化比较大的主要在末端及远离配体/受体作用位的结构域 II; 但是, 与野生型的 NRG-1 β /ErbB 体系的分子动力学模拟的 RMSF (如图 5B) 不同, 它的配体结构的变化还是比较明显的 (在 ErbB3 中, 配体是残基 469–520; 在 ErbB4 中, 配体是残基 474–525)。另一方面, 从分子动力学运动轨迹中 NRG-1 β 各残基变化的幅度可以看出, 无论 NRG-1 β /ErbB3 还是 NRG-1 β /ErbB4 体系, 它们的构象变化的幅度较大。而且, 这种变化趋势与 RMSD 变化的趋势相同, NRG-1 β /ErbB4 体系的中配体的 RMSF 的变化要大于 NRG-1 β /ErbB3 体系。同时, 对于突变的 Pro29 位附近的 NRG-1 β 残基的 RMSF 明显比其它区域要大 (两个末端除外)。

3.3.5.2 配体受体相互作用

在对配体/受体相互作用的氢键作用分析中, 我们主要列出了 ErbB3/NRG-1 β 和 ErbB4/NRG-1 β 配体侧链与受体形成的氢键。这些氢键主要列于表 3.9 中。从表上可以看出, 无论哪一个体系, NRG-1 β 上的 Asp25、Ser27、Arg31、Arg44 和 Tyr48 都与受体有很强的氢键相互作用。同时, 与野生型的 NRG-1 β /ErbB 体系相同, NRG-1 β 的 Arg44 分别与 ErbB3 的 Asp352 和 ErbB4 的 Asp376 形成盐桥。这说明, Arg44 在 NRG-1 β /ErbB 体系是相当保守的。因此, 如果将突变体 NRG-1 β 的 Arg44 突变成 Ala 的话, 将也可能导致 NRG-1 β 与 ErbB3 或 ErbB4 的结合活性显著下降。

与野生型的 NRG-1 β /ErbB3 体系相比, 突变体 NRG-1 β 与受体 ErbB3 结合在 N 末端得到加强。它新增了 Asn16、Asp25 和 Ser27 与受体形成氢键。但是, 在原本形成很强的氢键的 C 末端, 它的结合被严重削弱了。突变体 NRG-1 β 与受体 ErbB3 结合在 C 末端的氢键少了 Asn47 与 Asp343、Asn47 与 Tyr405 和 Asn38 与 Asn25 的氢键。而 Tyr48 与 Asn379 的氢键虽然维持, 但是其数目由它们的侧链原子互相作氢键受体供体形成的两根氢键 (% occupied 数分别为 78.45 和 72.36) 减至 Tyr48 的 OH 与 Asn379 的 ND2 一根氢键 (% occupied 数降至 61.65)。另外, 原本在野生型 NRG-1 β /ErbB3 体系中存在的 Tyr48 与 ErbB3 的 Tyr405 氢键则消失了。虽然突变体 NRG-1 β 的 Arg44 仍与 ErbB3 的 Asp352 的侧链存在氢键作用, 但是, 它只形成了三根氢键, 而不象野生型 NRG-1 β 的 Arg44 的 NH1 和 NH2 与 ErbB3 的 Asp352 的 OD1 和 OD2 形成一个氢键网络, 它的氢键的强度显然减弱了。对 NRG-1 β 的 Arg31 来说, 突变后变化情况与 Arg44 类似; 并且, 它们的氢键 % occupied

数从近 100 降至只有 60 左右。因此, 综合考虑, 由于 NRG-1 β 的 Pro29Ala 后, 它与受体 ErbB3 的结合构象发生了一些变化, 虽然在 N 末端(靠近结构域 I 部分)可能结合更紧密了, 但是原来形成很强的氢键网络的 C 末端则被削弱得更多。因此, 从定性上可以认为当 NRG-1 β 的 Pro29Ala, 其整体结合可能会减弱, 这与丙氨酸扫描实验中 NRG-1 β 的 Pro29Ala 时它与受体的结合减弱了几倍是一致的³⁰。

而突变体 NRG-1 β 和 ErbB4 的结合恰恰相反, 从分子动力学模拟结果上看, NRG-1 β 的 Pro29Ala 的氢键网络得到了加强。首先, 在 C 末端, 虽然 Tyr48 与受体形成的氢键消失了, 但是, Arg44 和 Asp376 形成的盐桥得到了极大的加强。而且, 它们的氢键% occupied 数从 80 左右上升至约 100%。同样, Glu39 和 Lys438 不仅形成的氢键% occupied 数上升了, 而且, 它的形成的氢键的数目也增加了。特别是, 由于突变后蛋白质结构的变化, 在 NRG-1 β 和受体 ErbB3 结合中起着重要贡献而对 NRG-1 β 和受体 ErbB4 结合没有特别大影响的 Arg31 也参与了 NRG-1 β 和受体 ErbB4 的结合, 而且, 它形成了三根很强的氢键。而在原来形成氢键并不多的 N 端, NRG-1 β 的 Asp25、Ser27 与受体结合的氢键数不仅增加了, 而且氢键% occupied 数也上升至近 90%。由于氢键作用在维系蛋白质/蛋白质相互作用中起着关键的作用, 因此, 由于 NRG-1 β 的 Pro29Ala 后, 配体与受体 ErbB4 结合的构象尤其是侧链的构象发生变化, 导致 NRG-1 β 与 ErbB4 结合时, 无论与受体的结构域 I 还是结构域 III 的氢键网络得到了极大的加强, 因此, 这也从定性上与丙氨酸扫描实验中 NRG-1 β 的 Pro29Ala 时它与受体的结合能力得到了很大的提高这一实验事实相符的。

除了氢键, 和野生型的 NRG-1 β 和受体 ErbB 存在的疏水作用相似, 见表 3.10, 在突变体 NRG-1 β 和受体 ErbB3 或 ErbB4 的位点 1、2 和 3 中存在着广泛的疏水相互作用。

在突变体 ErbB3/NRG-1 β 复合物中, 在位点 1, ErbB3 的 Asn25、Met72、Leu102 和 Tyr104 的侧链原子和 NRG-1 β 的 His2、Val23、和 Asn38 存在较强的疏水作用。在位点 2 中, ErbB3 的结构域 III 的 Trp354 和 NRG-1 β 的 Phe13 形成疏水作用;而且, NRG-1 β 的 Arg44 的长且非极性的侧链也与 Trp354 的侧链也有一定疏水作用。在位点 3 中, 如图 8C, ErbB3 的结构域 III 的 Gln381、Lys415、Tyr436 以及稍远一点(距离 4Å 左右)的 Tyr405 和 Phe409 与 NRG-1 β 的 Phe40 和 Tyr48 周围的残基形成一个大的疏水腔。

在突变体 ErbB4/NRG-1 β 复合物中也可以看到相似的疏水作用, 作为这些疏水作用的结果, 在 ErbB4/NRG-1 β 的界面中形成了三个疏水腔。NRG-1 β 的 Leu26、Pro37、Glu39 和 Asp43 的侧链与 ErbB4 的结构域 I 的位点 1 的 Glu33、

Lys35、Leu39、Ser40、Ala48、Tyr52、Phe120、Leu121 和 Gln151 的侧链构成第一个疏水腔。NRG-1 β 的 Val15、Arg44 和 Tyr48 周围的残基分别于 ErbB4 的结构域 III 的位点 2、位点 3 分别以相似的作用形成了另两个疏水腔。

综合 NRG-1 β /ErbB 的 Pro29Ala 氢键和疏水作用分析，可以看出无论野生型还是突变体、无论受体是 ErbB3 还是 ErbB4，配体/受体间存在着广泛的疏水相互作用，并没因为突变后有太大的变化。但是，在氢键方面，NRG-1 β /ErbB3 突变体的氢键强度有了少许减弱；而 NRG-1 β /ErbB4 突变体不仅氢键强度得到了加强，而且它所形成的氢键数目也增加了，这可能正是实验上 NRG-1 β 的 Pro29/Ala 后，NRG-1 β 呈现出与 ErbB3 和 ErbB4 结合能力变化不同的根本原因。

表 3.9 NRG-1 β /ErbB 的 Pro29/Ala 和野生型复合物的氢键在整个分子动力学模型过程中比较 (图中黑体部分为 NRG-1 β 形成氢键的残基, 这边仅列出 NRG-1 β 通过侧链形成氢键的残基; 表中% occupied 为分子动力学模拟过程中可能有氢键作用结构数占总结结构数的百分数)

| 复合物类型 | Pro29/Ala | | | Wild type | | | |
|----------------------|----------------------|------------|------------|-----------|------------|------------|-------|
| | 氢键受体 | 氢键供体 | % occupied | 氢键受体 | 氢键供体 | % occupied | |
| NRG-1 β /ErbB3 | LYS132 NZ | ASP25 OD2 | 76.55 | ASN25 ND2 | ASN38 OD1 | 61.54 | |
| | LYS132 NZ | SER27 OG | 70.05 | ASN379ND2 | TYR48 OH | 78.45 | |
| | ILE346 N | ASN16 OD1 | 98.75 | ARG31NH2 | GLU131 OE1 | 91.63 | |
| | THR347OG1 | ASN16 OD1 | 57.00 | ARG31NH2 | GLU131 OE2 | 99.72 | |
| | THR347 N | ASN16 OD1 | 89.85 | ARG31NH1 | GLU131 OE1 | 91.63 | |
| | ASN379ND2 | TYR48 OH | 61.65 | ARG31NH1 | GLU131 OE1 | 99.90 | |
| | LYS415 NZ | GLU39 OE2 | 65.75 | ASN38ND2 | ASN25 OD1 | 62.31 | |
| | ASN16 ND2 | GLN381 OE1 | 98.40 | ARG44NH1 | ASP352 OD1 | 98.63 | |
| | ARG31 NH1 | GLU124 OE2 | 61.70 | ARG44NH1 | ASP352 OD2 | 98.27 | |
| | ARG31 NH1 | GLU124 OE1 | 58.75 | ARG44NH2 | ASP352 OD2 | 98.27 | |
| | ARG31 NH1 | GLU124 OE2 | 57.70 | ARG44NH2 | ASP352 OD1 | 79.27 | |
| | ARG44 NH2 | ASP352 OD1 | 93.70 | ASN47ND2 | ASP343 OD1 | 77.54 | |
| | ARG44 NH2 | ASP352 OD2 | 97.25 | ASN47 ND2 | TYR405 OH | 68.63 | |
| | ARG44 NH1 | ASP352 OD1 | 93.90 | TYR48 OH | ASN379 OD1 | 72.36 | |
| | NRG-1 β /ErbB4 | LYS35 NZ | ASP43 OD2 | 60.40 | GLU33 N | THR41 OG1 | 69.33 |
| | | GLN151NE2 | ASP25 OD1 | 91.25 | LYS35 NZ | ASP43 OD2 | 96.33 |
| GLN151NE2 | | ASP25 OD2 | 91.85 | GLN151NE2 | ASP25 OD2 | 82.22 | |
| GLN151NE2 | | SER27 OG | 63.25 | LEU437N | TYR48 OH | 86.22 | |
| LYS438 NZ | | GLU39 OE1 | 77.50 | LYS438NZ | GLU39 OE1 | 69.33 | |
| LYS438 NZ | | GLU39 OE2 | 65.60 | SER27 OG | ASP150 OD2 | 64.88 | |
| SER27 OG | | ASP150 OD1 | 82.10 | ASN28 ND2 | TYR148 OH | 65.21 | |
| SER27 OG | | ASP150 OD2 | 91.55 | ARG44 NH2 | ASP376 OD1 | 86.44 | |
| ARG31 NH2 | | TYR148 OH | 60.35 | ARG44 NH1 | ASP376 OD1 | 79.55 | |
| ARG31 NH2 | | ASP150 OD1 | 87.05 | TYR48 OH | ASN403 OD1 | 88.55 | |
| ARG31 NH1 | | TYR148 OH | 88.35 | TYR48 OH | ILE4360 | 78.88 | |
| ASN38 ND2 | | GLN44 OE1 | 60.20 | | | | |
| THR41 OG1 | | ASN34 OD1 | 83.65 | | | | |
| ARG44 NH2 | | ASP376 OD1 | 98.20 | | | | |
| ARG44 NH2 | | ASP376 OD2 | 93.45 | | | | |
| ARG44 NH1 | | ASP376 OD2 | 99.95 | | | | |

表 3.10 NRG-1 β /ErbB 的 Pro29/Ala 的疏水相互作用 ligplot 表 (所有结构取自分子动力学平衡过程的平均结构, 平衡结构以从 400ps 后开始计算)

| NRG-1 β /ErbB3 | | | NRG-1 β /ErbB4 | | |
|----------------------|------------|-------------|----------------------|------------|-------------|
| NRG-1 β | ErbB3 | Distance(Å) | NRG-1 β | ErbB4 | Distance(Å) |
| MET50 CE | TYR436 CZ | 3.86 | SER52 C | ARG488 CD | 3.78 |
| MET50 CG | TYR436 CZ | 3.73 | MET50 CG | TYR459 CZ | 3.71 |
| MET50 CE | TYR436 CE1 | 3.72 | MET50 CG | TYR459 CE2 | 3.90 |
| MET50 CE | TYR436 CD1 | 3.67 | MET50 CG | TYR459 CE1 | 3.69 |
| MET50 CE | TYR436 CG | 3.90 | MET50 CB | TYR459 CE1 | 3.85 |
| PHE40 CZ | LYS415 CE | 3.42 | MET50 SD | TYR459 CD1 | 3.45 |
| PHE40 CE2 | LYS415 CE | 3.80 | MET50 CG | TYR459 CD1 | 3.70 |
| TYR48 CG | LYS415 CD | 3.79 | MET50 SD | TYR459 CG | 3.67 |
| TYR48 CB | LYS415 CD | 3.70 | TYR48 CE2 | TYR429 CZ | 3.59 |
| TYR48 CE2 | GLN381 CD | 3.78 | TYR48 CD2 | TYR429 CZ | 3.75 |
| TYR48 CD2 | GLN381 CD | 3.42 | TYR48 CZ | TYR429 CE1 | 3.80 |
| TYR48 CE2 | GLN381 CG | 3.67 | TYR48 CE2 | TYR429 CE1 | 3.45 |
| TYR48 CD2 | GLN381 CG | 3.72 | TYR48 CD2 | GLN405 CD | 3.75 |
| TYR48 CE2 | GLN381 CB | 3.61 | ARG44 CZ | TYR378 CD2 | 3.60 |
| ARG44 CZ | TRP354 CE3 | 3.54 | VAL15 CG2 | VAL370 CG2 | 3.63 |
| PHE13 CE1 | TRP354 CE2 | 3.86 | GLN46 C | LEU369 CD2 | 3.87 |
| PHE13 CD1 | TRP354 CE2 | 3.76 | LEU26 CD2 | GLN151 CD | 3.38 |
| PHE13 CD1 | TRP354 CD2 | 3.76 | ARG31 CG | LEU121 CD2 | 3.69 |
| PHE13 CD1 | TRP354 CD1 | 3.64 | ARG31 CZ | PHE120 CD2 | 3.75 |
| PHE13 CD1 | TRP354 CG | 3.83 | VAL49 CG1 | TYR 52 CE2 | 3.68 |
| PHE40 CZ | ILE346 CD1 | 3.79 | VAL49 CG2 | ALA 48 CB | 3.84 |
| HIS 2 CE1 | TYR104 CZ | 3.62 | PRO37 CA | SER 40 CB | 3.80 |
| HIS 2 CE1 | TYR104 CE1 | 3.33 | GLU39 C | LEU 39 CD2 | 3.88 |
| HIS 2 CE1 | TYR104 CD1 | 3.78 | ASP43 C | LYS 35 CE | 3.70 |
| VAL23 CG2 | LEU102 CD1 | 3.77 | GLY42 CA | GLU 33 C | 3.71 |
| VAL23 CG2 | MET 72 SD | 3.74 | | | |
| ASN38 CG | ASN 25 CG | 3.69 | | | |
| ASN38 CB | ASN 25 CG | 3.68 | | | |

3.3.5.3 配体受体结合自由能

- 5 为了从结合自由能角度研究 NRG-1 β /ErbB3 和 NRG-1 β /ErbB4 体系中突变后, NRG-1 β /ErbB 的 Pro29Ala 和野生型复合物结合能力的变化, 我们结合 MM-PBSA 和 Nmode 方法估计野生型和突变体的结合自由能。具体策略如下: 首先, 用 MM-PBSA 方法得到 G_{subtotal} , 具体计算部分策略与前面所述策略一致。其次, 用谐振子的正则分析 Nmode 计算蛋白质的熵效应 $T\Delta S$ 部分,
- 10 由于 Nmode 通过一阶和二阶导数进行简正模式分析, 用于寻找局域最小值,

进行振动分析，需要相当多的计算资源，因此，只从 MM-PBSA 方法所取的 100 个结构中取出 10 个结构。由于， NMODE 方法只能用于估算不到 200 个残基的蛋白。因此，我们在进行 NMODE 计算中切除了远离突变点 Pro29 的受体的结构域 II 和结构域 III，从而估算出野生型复合物和突变体复合物的自由能，具体结果列于表 3.13。

在 NRG-1 β /ErbB3 方面（表 3.11A），与野生型复合物相比，突变体复合物的 E_{vdw} 与之相差无几（野生型中是-144.02，突变体中是-148.71），这与前面所做的疏水相互作用分析中是一致的。虽然，与野生型复合物相比，体系的静电作用的增加被体系的溶剂化能的减少给抵消了。另外，从熵效应上看，突变体的熵效应尤其是配体部分明显大于野生型复合物的熵效应，这与前面 RMSF 分析中，突变体的配体原子构象的变化明显大于野生型是一致的。而且，受体部分的熵变对野生型还是突变体的熵变效应变化并不太大，这说明 NRG-1 β /ErbB3 的 Pro29/Ala 突变后主要是配体结构发生变化，导致了配体/受体结合能力的变化。从最后的结合自由能看，两者相差无几，这与实验中突变体的 NRG-1 β 与 ErbB3 的结合能力是野生型的 NRG-1 β 的 80%的实验基本相符的³⁰。

在 NRG-1 β /ErbB4 方面（表 3.11B），与野生型复合物相比，突变体复合物的 E_{vdw} 和 NRG-1 β /ErbB3 情况大致相同（野生型中是-139.35，突变体中是-144.99），但是，体系的静电作用大幅度增加（这与氢键分析中突变体复合物氢键强度和数量都增加相符），虽然体系的溶剂化能的减少和熵效应抵消了对体系总结合自由能的贡献，但是，从最后的结果上看，突变体 NRG-1 β 与 ErbB4 的结合自由能还是增加了 2.73kcal/mol，这与实验上 NRG-1 β 的 Pro29Ala 与 ErbB4 的结合是野生型 NRG-1 β 与 ErbB4 约 10 倍是基本一致的。

表 3.11 (A) NRG-1 β /ErbB3 的 Pro29/Ala 的 MM-PBSA^a 及 Nmode 自由能计算结果表

| Contribution | Complex | | Receptor | | Ligand | | Delta ^b | | |
|-----------------------------------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|------------------|--|
| | Mean ^c | Std ^d | Mean ^c | Std ^d | Mean ^c | Std ^d | Mean ^c | Std ^d | |
| E _{ele} | -16950.85 | 134.39 | -15132.69 | 125.08 | -1325.99 | 31.58 | -492.17 | 33.09 | |
| E _{vdw} | -2026.15 | 32.89 | -1756.15 | 31.40 | -121.29 | 10.71 | -148.71 | 7.75 | |
| E _{int} | 10836.49 | 63.98 | 9819.68 | 62.33 | 1016.80 | 21.97 | 0.00 | 0.00 | |
| E _{gas} | -8140.52 | 146.73 | -7069.16 | 134.54 | -430.48 | 33.09 | -640.87 | 33.18 | |
| G _{nonpolar} | 139.82 | 1.22 | 130.18 | 1.21 | 18.88 | 0.24 | -9.24 | 0.64 | |
| G _{pb} | -7264.75 | 113.35 | -6671.28 | 108.03 | -1191.64 | 29.40 | 598.17 | 33.06 | |
| G _{sol} | -7124.93 | 113.00 | -6541.11 | 107.58 | -1172.76 | 29.34 | 588.93 | 33.02 | |
| G _{subtotal} | -15265.45 | 65.86 | -13610.27 | 63.15 | -1603.24 | 19.62 | -51.94 | 9.23 | |
| T Δ S ^e | 1983.55 | | 1405.60 | | 624.31 | | -46.37 | | |
| Δ G _{binding} | | | | | | | -5.57 | | |
| TΔS^e | 1894.55 | | 1388.25 | | 540.47 | | -36.66 | | |
| ΔG_{binding} | | | | | | | -5.42 | | |

(B) NRG-1 β /ErbB4 的 Pro29/Ala 的 MM-PBSA^a 及 Nmode 自由能计算结果表

| Contribution | Complex | | Receptor | | Ligand | | Delta ^b | | |
|-----------------------------------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|------------------|--|
| | Mean ^c | Std ^d | Mean ^c | Std ^d | Mean ^c | Std ^d | Mean ^c | Std ^d | |
| E _{ele} | -17121.95 | 85.84 | -15258.73 | 95.85 | -1388.30 | 31.44 | -474.93 | 28.98 | |
| E _{vdw} | -2068.88 | 39.90 | -1799.59 | 38.36 | -124.30 | 10.05 | -144.99 | 5.93 | |
| E _{int} | 10768.26 | 64.17 | 9730.60 | 63.12 | 1037.66 | 21.46 | 0.00 | 0.00 | |
| E _{gas} | -8422.57 | 108.20 | -7327.72 | 113.62 | -474.94 | 39.95 | -619.91 | 29.46 | |
| G _{nonpolar} | 137.27 | 1.46 | 127.48 | 1.35 | 19.03 | 0.23 | -9.25 | 0.58 | |
| G _{pb} | -7073.24 | 98.88 | -6539.20 | 107.10 | -1112.96 | 28.21 | 578.92 | 27.08 | |
| G _{sol} | -6935.97 | 98.26 | -6411.72 | 106.23 | -1093.93 | 28.13 | 569.67 | 26.92 | |
| G _{subtotal} | -15358.54 | 61.44 | -13739.44 | 61.40 | -1568.87 | 20.64 | -50.24 | 10.14 | |
| T Δ S ^e | 1950.40 | | 1377.48 | | 614.53 | | -41.61 | | |
| Δ G _{binding} | | | | | | | -8.63 | | |
| TΔS^e | 1953.34 | | 1375.26 | | 600.07 | | -21.98 | | |
| ΔG_{binding} | | | | | | | -5.90 | | |

备注：^a 上述表所列值单位为 kcal mol⁻¹；^b 差值 (Delta) = Contribution (复合物) - Contribution (受体) - Contribution (配体)；^c 400 个结构的平均值 (mean)；^d 平均值的标准偏差 (Std)。^e Nmode 计算熵效应，Nmode 方法只取与 MMPBSA 计算方法同一套分子动力学运动轨迹的 10 个结构 (即每 40ps 一个结构)，图中黑斜体部分为同样方法计算野生型 NRG-1 β /ErbB 的熵值后体系的自由能。 Δ G_{binding} = G_{subtotal} - T Δ S (T = 298.15K)

5

序列表

<110> 上海泽生科技发展有限公司
 <120>
 <130>
 5 <140>
 <141> 2004-7-2
 <150>
 <151>
 <160> 2
 10 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
 <210> 1
 <211> 183
 <212> DNA
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 15 <400> 1
 agccatcttg taaaatgtgc ggagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggggagtgc 60
 ttcatgggtga aagacctttc aaacccctcg agatacttgt gcaagtgcc aaatgagttt 120
 actggtgatc gctgcaaaa ctacgtaatg gcgagcttct acaaggcgga ggagctgtac 180
 cag
 20 <210> 2
 <211> 61
 <212> PRT (SEQ ID NO.1)
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 2
 25 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val
 5 10 15
 Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser
 20 25 30
 Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys
 30 35 40 45
 Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln
 50 55 60

5 图 1

| | | | | | | | |
|----------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|-----|
| | 177 | 187 | 197 | 207 | 217 | 227 | 237 |
| NRG-1 β | SHLVKCAEKE | KTFCVNGGEC | FMVKDLSNPS | RYLCKCPNEF | TGDRQCQNYVM | ASFYKAEELY | Q |
| (SEQ ID NO.1) | | | | | | | |
| NRG-1 α | SHLVKCAEKE | KTFCVNGGEC | FMVKDLSNPS | RYLCKCPGF | TGARCTENVP | MKVQNQEKAE | ELY |
| (SEQ ID NO.2) | | | | | | | |

图 2(A)

```

EGFR  EKKVCGQTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEVAGYVLLALNIVVERIPLLENLQI
ERBB4  SSVVCAGTSENKLSLSDLEQQYRALRKYFNCEVVMGNLEITSIEHNRDLSFLRSVREVTVGYVLVALNQFYFLPLENLR
***
EGFR  I RGNMYEENSVALAVLSNYDA-NKTGLKELPMRNLQELIHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNHLS
ERBB4  I RGTRLYEDRYALALFLNVRKDNFGLQELGLKLNLEILNGGVYVDQNKFLCYADTIHWQDIVRNPWFNSNLTLVSTNGSS
***
EGFR  SCQKCDPSPNGSCWAGAGEENCQRLTKIICAQQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTCF
ERBB4  CGGRCHKSC-TGRCWGPTIENHCQTLTRTVCAEQCDGRCYGPIVSDCCHRECAAGCSGPKDTCFACMNFNDSGACVTQCF
***
EGFR  FLMLYNPTTYQMDVNFEGKYSFGATCVKCKPRNYVVDTHGSCVFRACGADSYEMEDGVKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEF
ERBB4  QTFVYNPTTFQLEHNFNAKYTYGAFVCKKCPHFVV-DSSSVCVRACPSKMEVEENGIKMKCPCTDICPKACDGIPTGSL
***
EGFR  KDSLSINATNIKHFKNCTSIISGDLHILPVAFRGDSFHTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEI
ERBB4  MSAQTVDSSNIDKFINCTKINGNLIPLVTVGIHGDPIYNALEADPEKLNVRFRVREITGYLNIQSWPFFMHTDFSVFNSLVT
***
EGFR  I RGRTRKQHGQFSLAVV-SLNITSLGLRSLKEISDGDVITSGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQ
ERBB4  I GRRVLYS-GLSLLILKQQGITSLOFQSLKEISAGNIYITDNSNLCYHTINWTTLFTSTINQRIVIRDNRKAENCTAEGS
***
EGFR  VCHALCSPEGCGPEPRDCVSCRNVSRGRECV
ERBB4  VCNHLCSBDGCGWGPDPQCLSCRNYSRGRICV

```

图 2(B)

```

EGFR  EKKVCGQTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEVAGYVLLALNIVVERIPLLENLQI
ERBB3  --AVCPGTLNLSVTDGDAENQYQTYLKYLYERCEVVMGNLEIVLTGHNADLSFLQWVREVTVGYVLVAMNEFSTLPLPNLRV
***
EGFR  I RGNMYEENSVALAVLSNYDANKT-GLKELPMRNLQELIHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNHLS
ERBB3  VRGTQVYDGRFAIFVMLNYNTNSHALRQLRLTLQELTEILSGGVYIEKNDKLCRMDTIDWRDIV---RDRDAEIVVKDNGR
***
EGFR  SCQKCDPSPNGSCWAGAGEENCQRLTKIICAQQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTCF
ERBB3  SCPPCHEVC-KGRCWGPGSEDCQTLTKIICAPQCNHCFGPNPNQCCHDECAGGCSGPDQDTCFACRHFNDSGACVPRPC
***
EGFR  FLMLYNPTTYQMDVNFEGKYSFGATCVKCKPRNYVVDTHGSCVFRACGADSYEMEDGVKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEF
ERBB3  QPLVYNKLTTFQLEPNPHTKYQYGVVAVSCPHNFVV-DQTSVCVRACPPDKMEVDKNGLKMCEPQGLCPKACEGTGSG--
***
EGFR  KDSLSINATNIKHFKNCTSIISGDLHILPVAFRGDSFHTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEI
ERBB3  SRFQTVDDSSNIDGFVNCTKILGNLDPLITGLNGDPWHRIPALDPEKLNVRFRVREITGYLNIQSWPFFMHTDFSVFNSLVT
***
EGFR  I RGRTRKQHGQFSLAVV-SLNITSLGLRSLKEISDGDVITSGNKNLCYANTINW-KKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQ
ERBB3  I GGRSLYNRGFSLLIMKNLNVTSLOFRSLKEISAGRIYISANRQLCYHHSLNWTKVLRGFTTEERLDIKHNKPRRDCVAEG
***
EGFR  VCHALCSPEGCGPEPRDCVSCRNVSRGRECV
ERBB3  KVCDPLCSSGGCGWGPDPQCLSCRNYSRGGVCVT

```


图 3

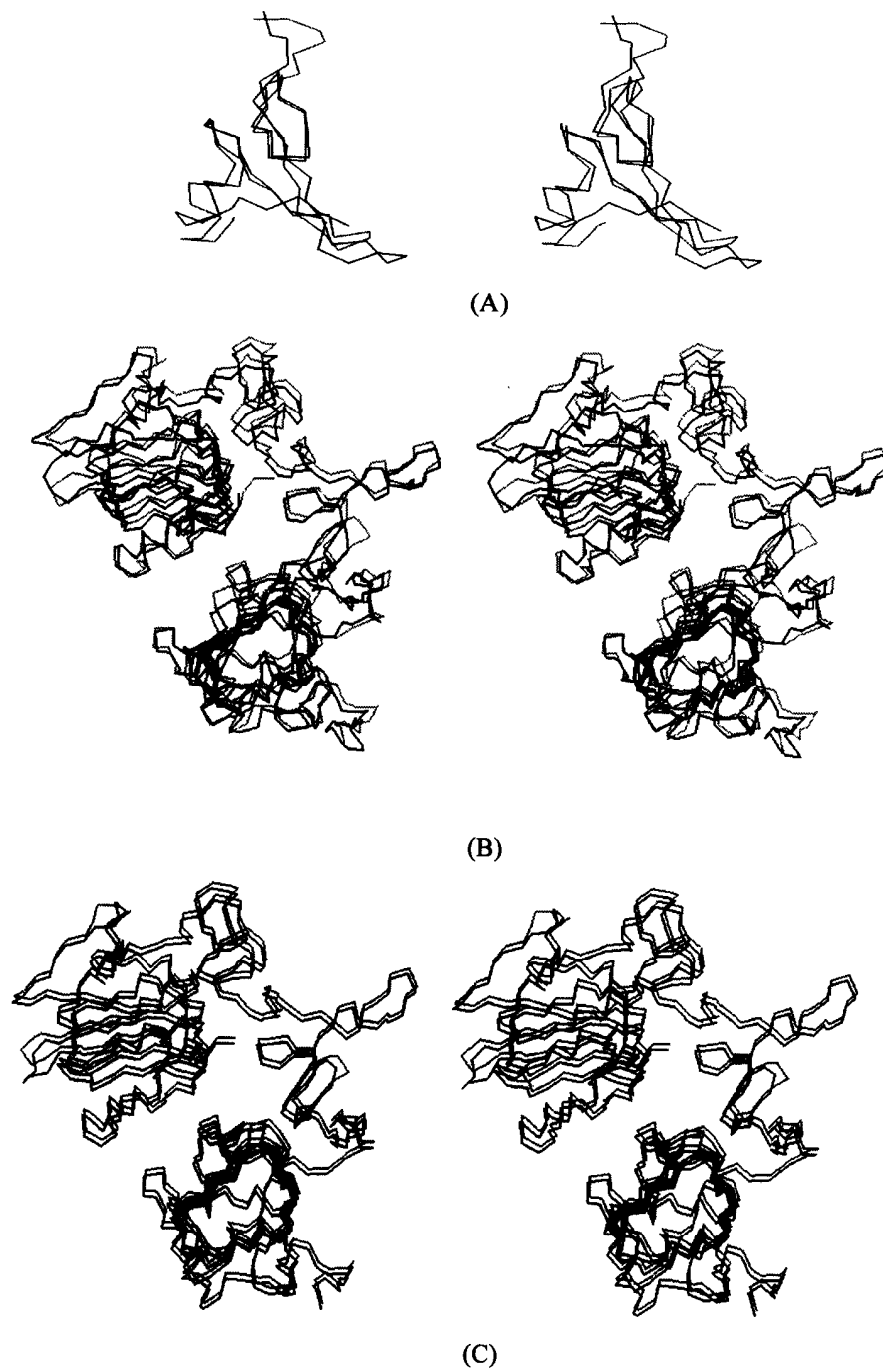
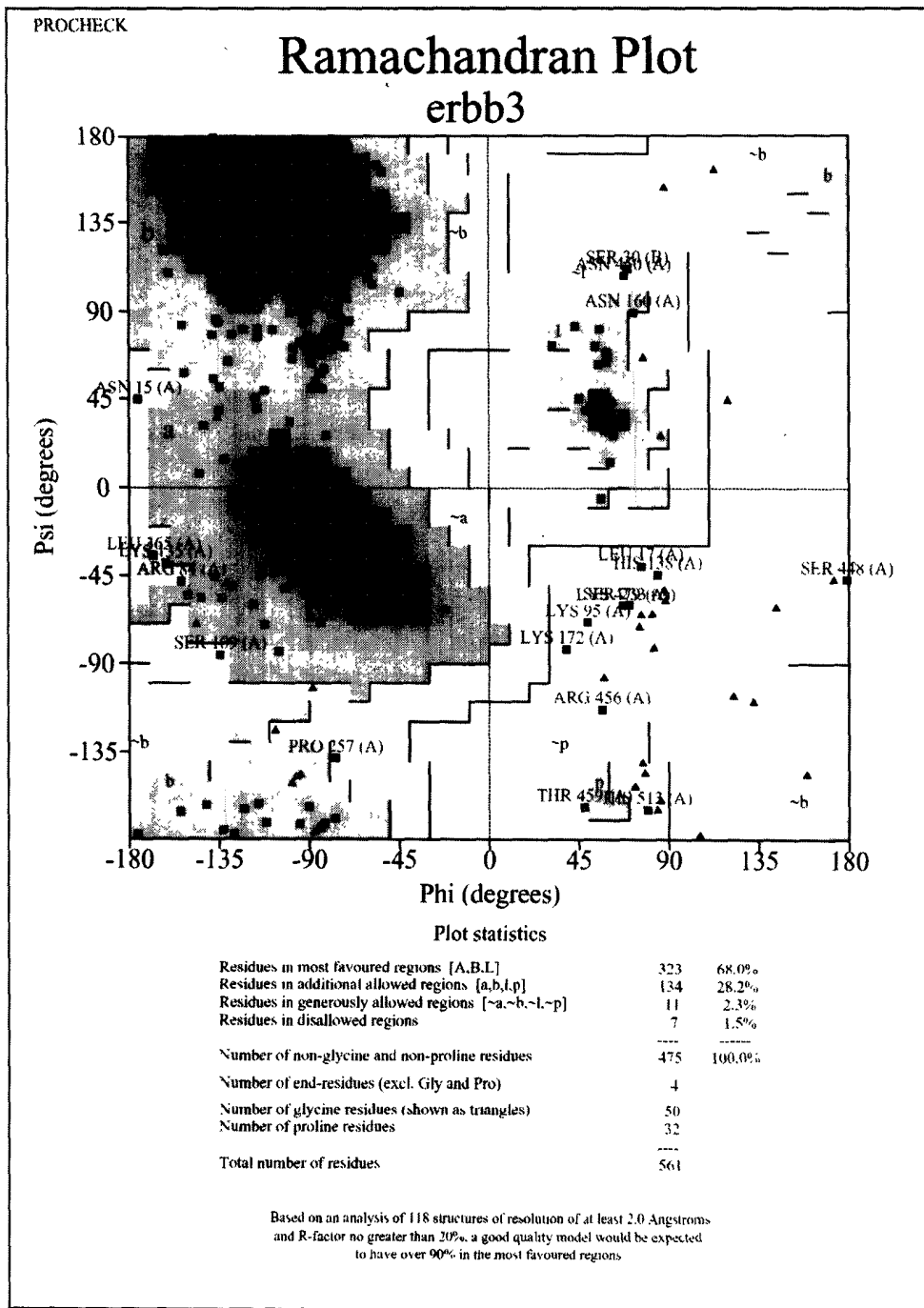


图 4 (A)



erbb3_01.ps

图 4 (B)

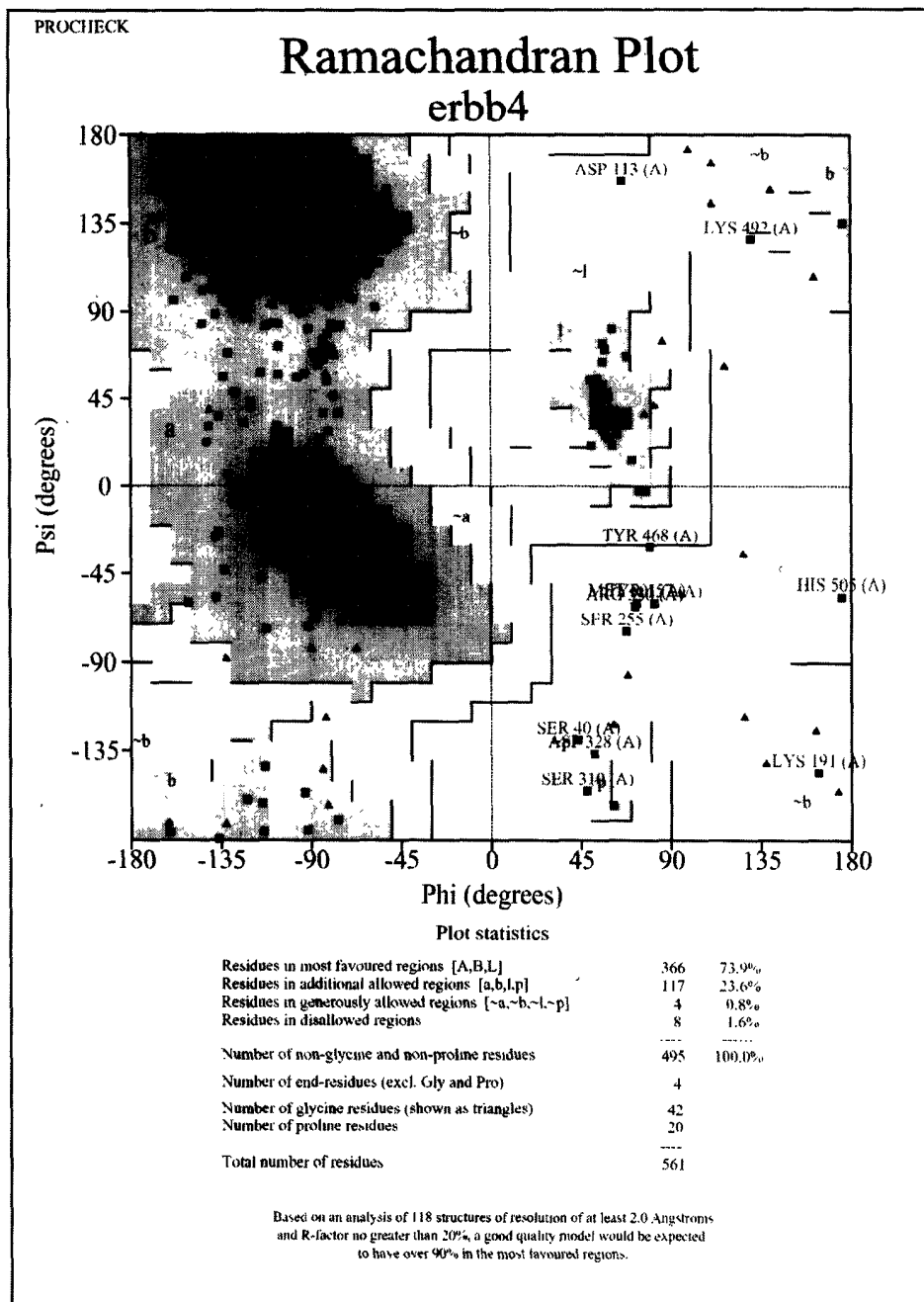
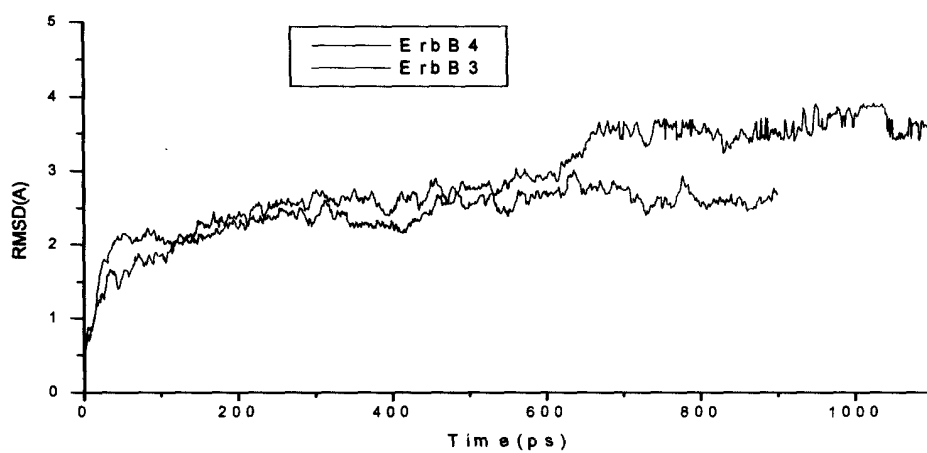
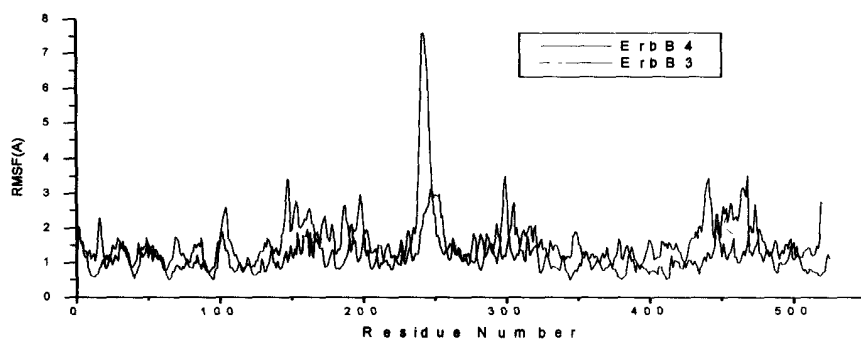


图 5



(A)



(B)

图 6

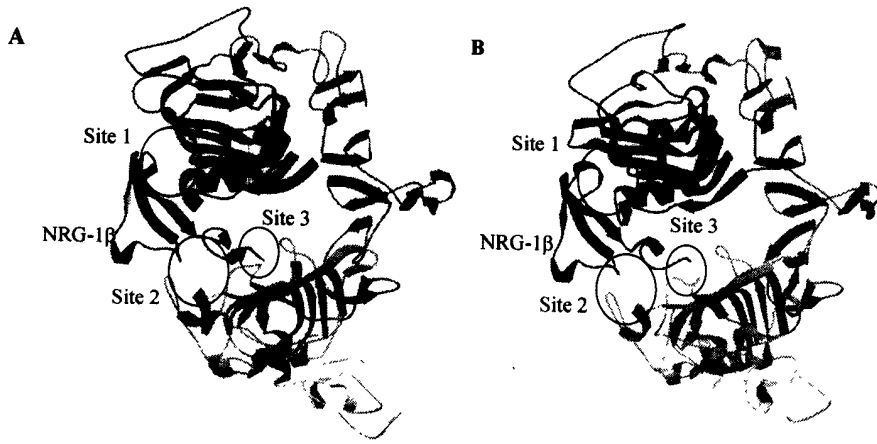


图 7

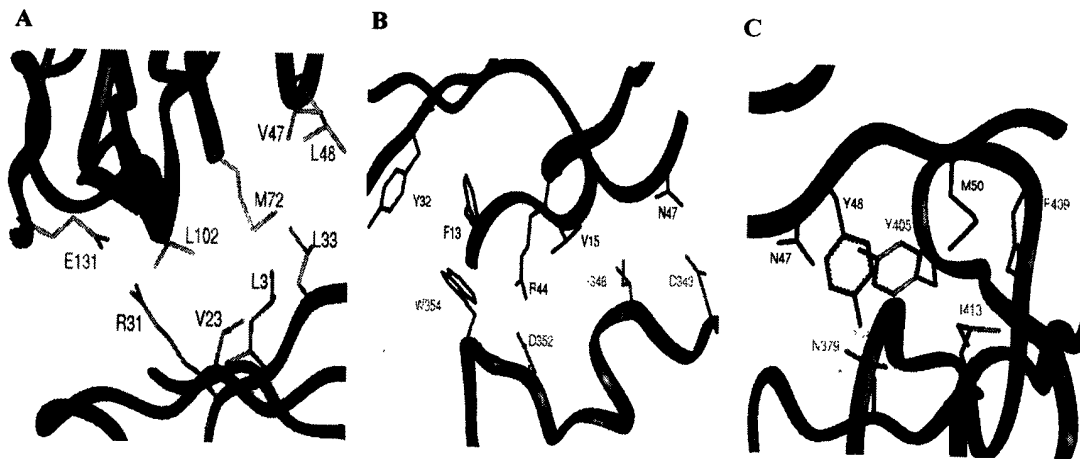


图 8.

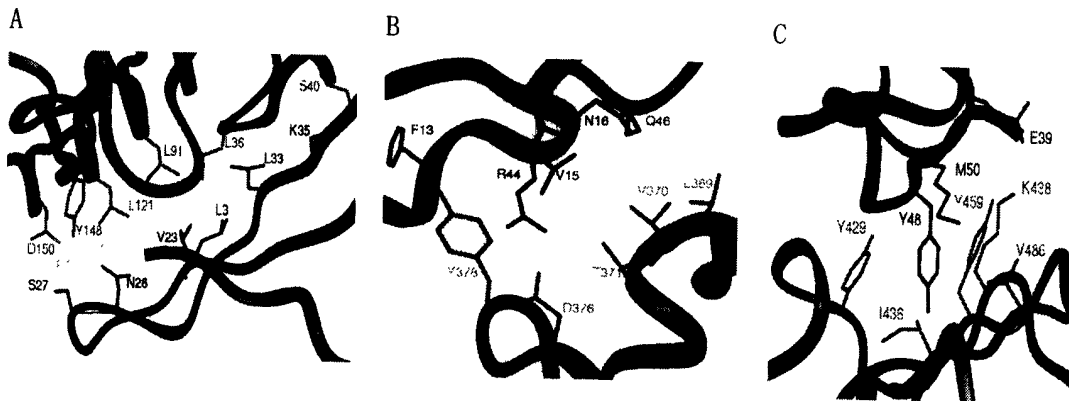
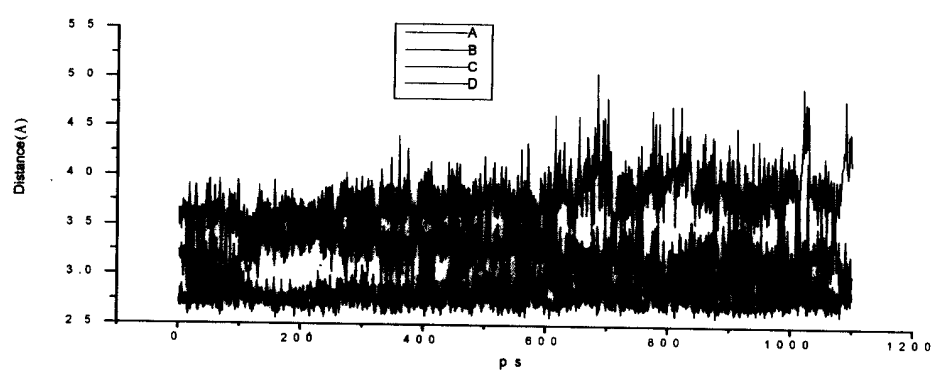
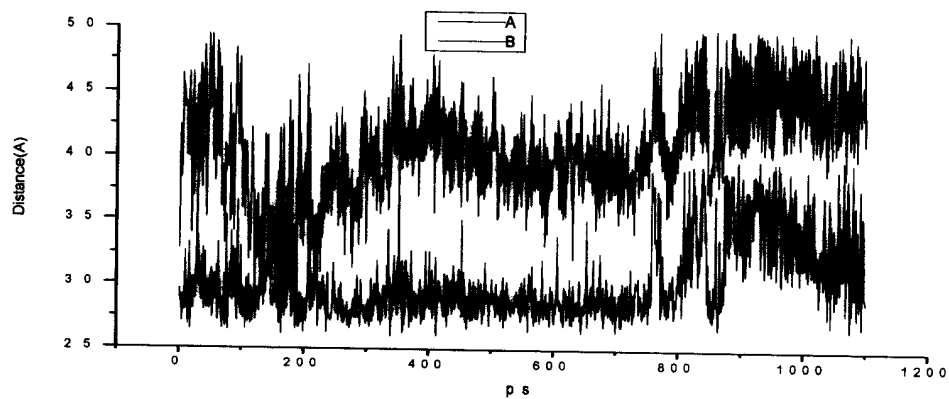


图 9



(A)



(B)

图 10.

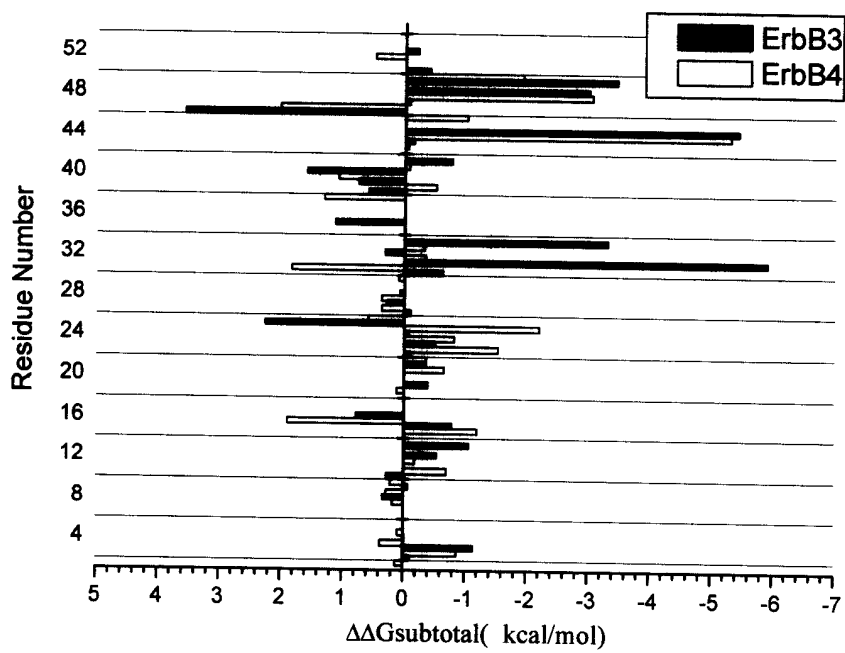
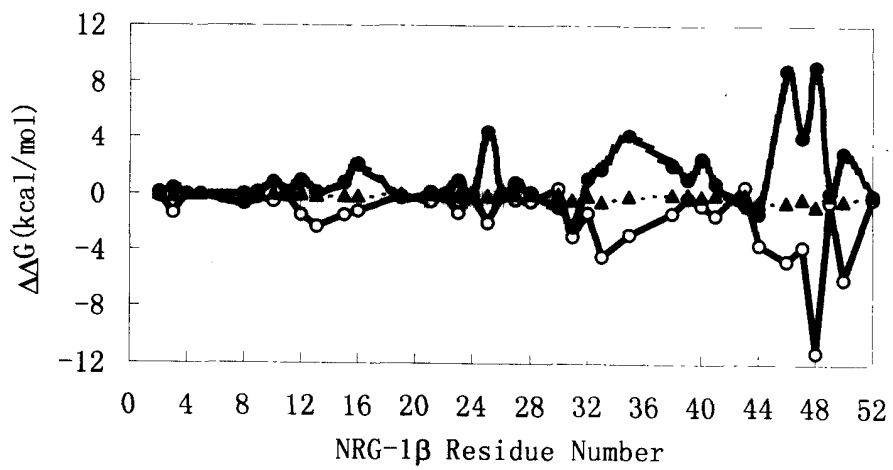
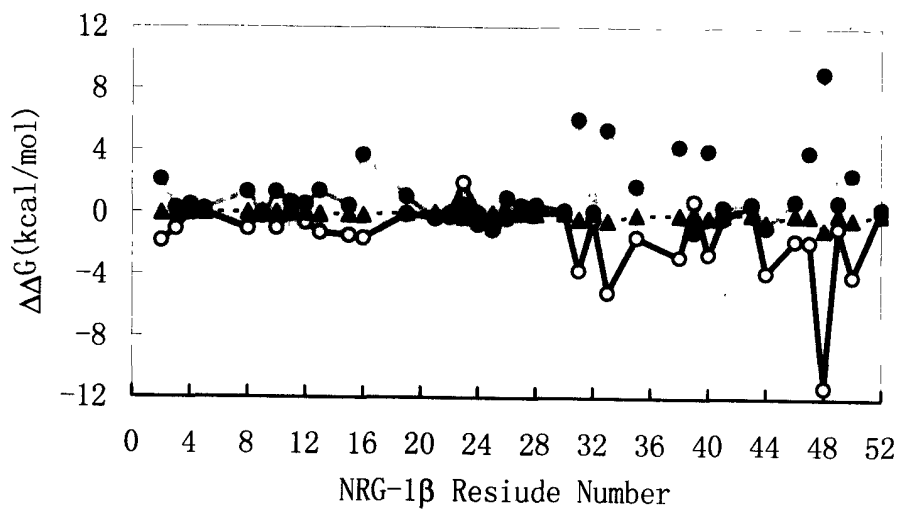


图 11

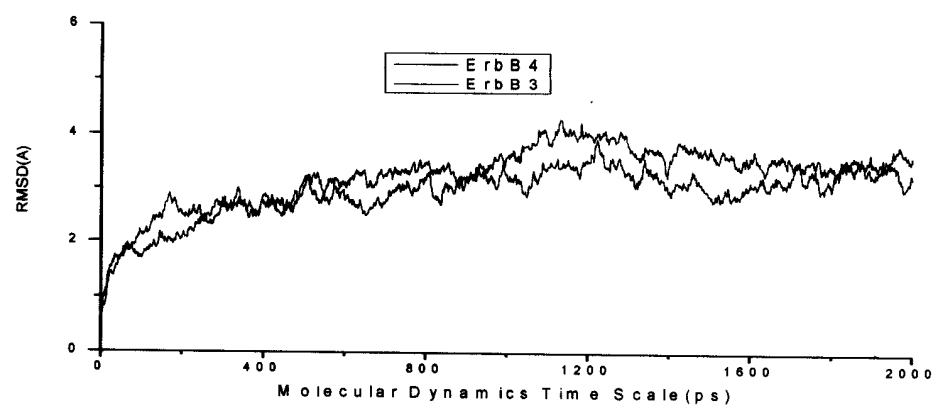


(A)

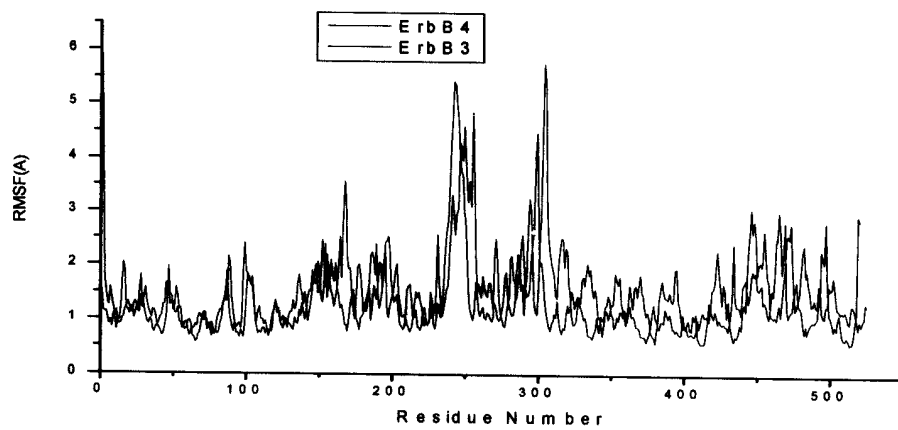


(B)

图 12



(A)



(B)