

· 论 著 ·

利用定点突变研究 CCR5 膜外襻上与 HIV gp120 结合的关键残基

道书艳,郭葆玉*,卞广兴(第二军医大学药学院生化药学教研室,上海 200433)

[摘要] 目的:研究 CCR5 在作为I型人类免疫缺陷病毒(HIV-I)进入细胞的辅助受体时,发挥关键作用的氨基酸。方法:通过定点突变对 CCR5 膜外各襻上的某些氨基酸进行突变,将非极性氨基酸变为极性氨基酸,疏水氨基酸变为亲水氨基酸,芳香族氨基酸变为非芳香族氨基酸,通过将其与 gp120 分别表达,进行结合实验,寻找与病毒结合活性降低的突变型。结果:当 CCR5 膜外第一襻用 Tyr 替代 Cys,第三襻用 Ser 替代 Pro 后,CCR5 与病毒表面糖蛋白 gp120 的结合活性极大降低。而对其他膜外襻上的氨基酸进行突变后,结合活性无明显改变。结论:病毒进入受体细胞需要受体和辅助受体的介导。CCR5 作为辅助受体,主要是通过膜外特定的氨基酸与病毒的 gp120 发生识别,寻找到这些识别氨基酸就可以为 AIDS 的预防和治疗提供一定的靶点。

[关键词] CCR5; I 型人类免疫缺陷病毒;点突变

[中图分类号] R 512.91 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2006)01-0068-03

Key residues in CCR5 extracellular loops binding with HIV gp120: a site-directed mutagenesis study

DAO Shu-yan, GUO Bao-yu*, BIAN Guang-xing (Department of Biochemical Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] Objective: To investigate the role of CCR5 key residues as a co-receptor for the cellular entry of human immunodeficiency virus type I (HIV- I). Methods: Mutation of amino acids was introduced in different extracellular loops of CCR5 by site-directed mutagenesis technique, turning the non-polar amino acids into polar ones, the non-hydrophilic into hydrophilic, and the aromatic into non-aromatic. The mutants of CCR5 were expressed in BamH I /Xho I and were allowed to bind with gp120, and the binding activity of the mutants was compared with that of wild-type CCR5. Results: The coreceptor activity of CCR5 was reduced greatly when Cys in the first extracellular loop was replaced by Tyr and Pro in the third extracellular loop was replaced by Ser. There was no obvious change in the coreceptor activity of CCR5 when other replacements were introduced. Conclusion: HIV- I virus needs receptor and co-receptor to achieve its cellular entry. CCR5 is a co-receptor and some of its extracellular loop amino acids are essential for gp120 recognition of HIV- I.

[KEY WORDS] CCR5; human immunodeficiency virus type I; point mutation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(1): 68-70]

CCR5 是 CC 趋化因子亚家族的受体。它的配体包括巨噬细胞炎性蛋白 1 α (MIP-1 α),巨噬细胞炎性蛋白 1 β (MIP-1 β)和 RANTES。CCR5 基因位于 3q21.3,长度为 1.9 kb,编码 352 个氨基酸。CCR5 是 G 蛋白偶联受体(GPCR),它含有 7 个跨膜区域(7TM),跨膜区的序列高度保守。其中第一膜外区(ECL1)和第二膜外区(ECL2)通过二硫键相连,保持蛋白稳定的二级结构。自从发现 CCR5 可以作为 HIV-I 感染的辅助受体,它就成为了一个研究热点。

从理论上讲,只要封闭或者改变了 HIV- I 感染的受体,就可以阻断病毒的感染。HIV- I 的第一受体是 CD4,但是 CD4 的表达是细胞正常生理功能必须的,因此就必须寻找其他的受体。HIV- I 进入细胞还需要辅助受体的参与,很多与 CD4 共表达的趋化因子受体都可以作为 HIV- I 感染的辅助受体^[1~3]。T 细胞嗜性病毒与 CXCR4 结合,而巨噬细胞嗜性病毒则利用 CCR5。但是研究发现,带有某些 CCR5 突变的个体则对 HIV- I 具有免疫性^[4~6]。

在本实验中,我们试图通过定点突变的方法找到 CCR5 介导 HIV- I 感染中起决定作用的氨基酸,为研究 CCR5 作用机制提供一个新思路。

1 材料和方法

1.1 细胞及培养情况 人 COS-7 细胞有本室保存。细胞在 37℃,5%CO₂ 的孵箱中培养,培养基为 10%小牛血清(BCS)、2 mmol/L L-谷氨酸、抗生素的 DMEM。

1.2 定点突变 CCR5 DNA 序列由 Michael Samson 博士惠赠。利用 QuikChange site-directed mutagenesis kit (TaKaRa)对 CCR5 进行定点突变,其中第一、三襻的突变分别为:CCR5-loop1 (G⁵⁹→A),CCR5-loop3- Ser (C⁵⁴⁷→T),正常对照组引物为 FOR:GGC GGA TCC AGG GCC ATG GAT TTT

[作者简介] 道书艳,助教。

* Corresponding author. E-mail:byguo1632000@yahoo.com.cn

CAA GGG TCA GTT CCG ACC 和 BACK;GGC AAG CTT TCA TAA ACC AGT AGA AAC TTC ATG。第一襻突变引物为:FOR:GGC GGA TCC AGG GCC ATG GAT TTT CAA GGG TCA GTT CCG ACC, BACK: GGC AAG CTT TCA TAA ACC AGT AGA AAC TTC ATG, 1 FOR:CGG AGC CCT A CC AAA AAA TCA, 1 BACK:TGA TTT TTT GG T TGG GCT CC。第三襻突变引物为:FOR:GGC GGA TCC AGG GCC ATG GAT TTT CAA GGG TCA GTT CCG ACC, BACK: GGC AAG CTT TCA TAA ACC AGT AGA AAC TTC ATG, 3 FOR:CCT GCA GCT CTC ATT T T T CAT, 3 BACK:ATG A A A AAT GAG AGC TGC AGG(其中 为突变位点)。PCR 体系组成按照 TaKaRa 试剂盒说明书。PCR 条件:95℃ 1 min→94℃ 45 s, 45℃ 45 s, 72℃ 45 s→(94℃ 45 s, 60℃ 45 s, 72℃ 45 s)×30 个循环→72℃ 5 min。然后通过 DNA 测序对突变的序列加以验证,见图 1。

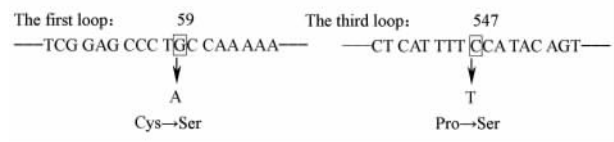


图 1 膜外襻中突变的碱基及对应的氨基酸变化
Fig 1 Mutagenesis of nucleotides and amino acids of extracellular loop

1.3 细胞表面表达 突变的 CCR5 基因亚克隆到 pcDNA3.0 表达载体 (*Bam*H I /*Xho* I), 并对序列加以确认。同法表达 HIV- I gp120, 亚克隆到 pcDNA3.0, 转染 Cos-7 细胞, 并用 FITC 标记。

1.4 细胞功能分析 野生及突变型 CCR5 表达水平通过荧光标记抗体染色加以确定。过夜培养后, (0.5~1.0)×10⁶ 细胞用含有 2.5% 羊血清的 PBS 洗涤两次。细胞重悬于 100 μl 含有 2.5% 兔血清的 PBS 中, 加入 2 μg FITC 标记的 HIV- I gp120, 冰浴 1 h, 然后用 PBS 洗涤 3 次, 2% 多聚甲醛固定。

2 结果

2.1 突变 CCR5 的构建 通过定点突变构建的 CCR5 片段分别加以扩增, 利用 *Bam*H I、*Xho* I 将其插入 pcDNA 3.0 (Promega) 成为 CCR5-pcDNA 3.0 进行真核表达, 并且对这些克隆加以测序 (TaKaRa), 结果见图 2。

图 2 CCR5-pcDNA3.0 DNA 测序结果

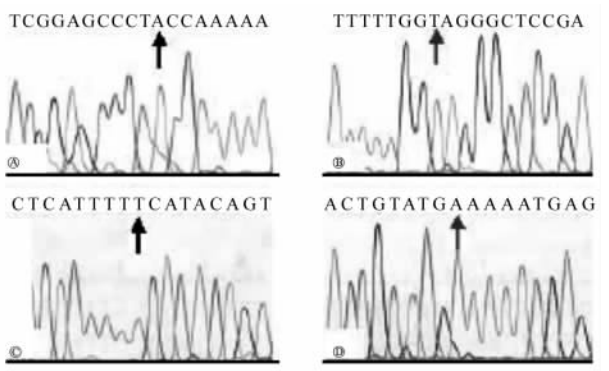


Fig 2 Confirmation of amino acid substitutions in recombinant mutants by DNA sequencing

The mutant sequences were confirmed by 2 direction sequencing. A, C were the results of sequencing forward; B, D were the result of sequencing reverse. Mutant bases 59(G⁵⁹→A), 547(C⁵⁴⁷→T) were indicated by arrow

2.2 突变 CCR5 与 FITC 标记的 HIV- I gp120 结合活性测定 细胞表面抗体染色表明, 除了个别例外, 大部分突变 CCR5 的表达水平与野生型 CCR5 类似。通过测定各种 CCR5 突变体与 FITC 标记 HIV- I gp120 结合活性来比较野生型与突变型 CCR5 作为辅助受体的功效 (图 3)。结果表明第一襻 Cys→Ser 及第三襻 Pro→Ser 后 CCR5 的结合活性受到很大影响, 而其他襻内的氨基酸变化则对其活性没有影响 (结果没有显示)。

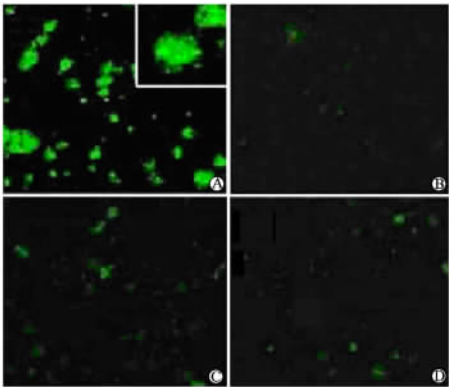


图 3 CCR5 与 FITC 标记的 HIV- I gp120 结合测定
Fig 3 Binding of CCR5 mutants with FITC labeled HIV- I gp120

A: wild-type CCR5; B: negative control; C: CCR5-loop1-Ser; D: CCR5-loop3-Ser

3 讨论

HIV- I 辅助受体的三级结构至今还不明确, 但是根据对 G 蛋白偶联受体的序列分析已经建立了 CCR5 理论上的三维结构^[7]。这些模型有两个显著特征: 第一, 是多个膜外区域在 CCR5 作为辅助受体的过程中有着重要的作用^[8,9]; 第二, 这些模型展示

了这些蛋白膜外区域的电荷特性,而这可能就决定了不同 HIV- I 亚型选择不同的辅助受体。根据研究,我们认为不同的 HIV- I 膜蛋白可能倾向于利用不同的辅助受体,而这个过程是通过 gp120 与受体膜外襟的直接相互作用来完成的^[10]。

由于 CCR 家族(CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5)在 HIV- I 辅助受体中占了重要地位,我们认为其保守序列可能有重要的作用,所以我们选择了其中最保守的序列进行突变,我们定点突变的设计原则是将非极性氨基酸变为极性氨基酸,疏水氨基酸变为亲水氨基酸,芳香族氨基酸变为非芳香族氨基酸,然后根据改变的氨基酸序列设计对应的碱基序列。在大多数突变实验中,突变 CCR5 与 gp120 的结合活性没有发生明显的变化(结果略),但是在膜外第一和第三襟保守氨基酸的突变引起了结合活性的较大变化。第一和第三襟选择的保守氨基酸见图 4。

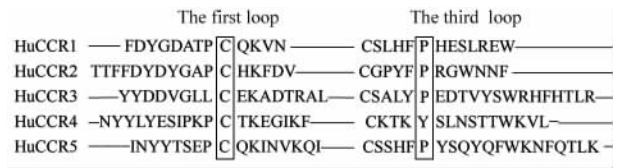


图 4 人 CCR 家族膜外序列的比较

Fig 4 Comparison of extracellular domain of human CCRs
□ was the chosen conservative amino acid

研究表明 CCR5 膜外的第三襟参与了辅助受体与 HIV- I gp120 的结合,当 Pro→Ser 时,使 CCR5 与 HIV- I gp120 的结合率与野生型 CCR5 相比降低 80%(D 从 0.2 降到 0.04)。发生突变的其他碱基对 CCR5 作为辅助受体的作用影响不大。这表明第三襟有着重要的作用,而这个作用可能是通过该襟上一些亲水的氨基酸。

总的来说,我们的研究结果与其他研究者的结论基本相符^[11],此外,我们的实验还表明膜外第一襟中 Cys→Ser 会直接影响其与 HIV- I gp120 的结合活性,这可能是由于破坏了膜外第一和第二襟中的二硫键引起的,从而影响膜外部分的二级结构引起的。但是我们没有研究这个变化对于 CCR5 的正常结构和生理作用是否有影响。我们将在后继的工作中对其加以研究。此外,由于很多研究表明膜外或者跨膜的亲水氨基酸对于 CCR5 作为辅助受体有重要的作用^[12],而跨膜的蛋白对于 CCR5 与 7TM GPCR 的偶联有一定的作用^[13],因此我们希望对其进行进一步的研究。

总的来说,我们的研究加深了对 CCR5 中一些特定氨基酸在 HIV- I 感染过程中作用的理解。我

们发现在膜外襟上一些亲水的氨基酸作用重大,对这些氨基酸作用机制的一种可能性的解释是它们通过一定的三级结构直接与 gp120 发生结合,或者它们的存在对于保持 CCR5 膜外区域特定的空间构型有重要的作用,但是对于这些氨基酸是否是维持 CCR5 正常生理作用所必须的还没有进一步加以研究。本研究为将来对 HIV- I 感染的机制以及辅助受体的研究提供了一个良好的基础,对进一步的研究有一定的指导意义。

[参考文献]

[1] Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, et al. CC CKR5: a RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1[J]. Science, 1996, 272: 1955-1958.
[2] Dean M, Carrington M, Winkler C, et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CCR5 structural gene[J]. Science, 1996, 273: 1856-1862.
[3] Deng H, Liu R, Ellmeier W, et al. Identification of a major coreceptor for primary isolates of HIV-1[J]. Nature, 1996, 381: 661-666.
[4] Dragic T, Litwin V, Allaway GP, et al. HIV-1 entry into CD4⁺ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5[J]. Nature, 1996, 381: 667-673.
[5] Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, et al. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor[J]. Science, 1996, 272: 872-877.
[6] He J, Chen Y, Farzan M, et al. CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia[J]. Nature, 1997, 385: 645-649.
[7] Dimitrov DS, Norwood D, Stantchev TS, et al. A mechanism of resistance to HIV-1 entry: inefficient interactions of CXCR4 with CD4 and gp120 in macrophages[J]. Virology, 1999, 259: 1-6.
[8] Hill CM, Kwon D, Jones M, et al. The amino terminus of human CCR5 is required for its function as a receptor for diverse human and simian immunodeficiency virus envelope glycoproteins[J]. Virology, 248: 357-371.
[9] Lu Z, Berson JF, Chen Y, et al. Evolution of HIV-1 coreceptor usage through interactions with distinct CCR5 and CXCR4 domains[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 6426-6431.
[10] Broder CC, Dimitrov DS. HIV and the 7-transmembrane domain receptors[J]. Pathobiology, 1996, 64: 171-179.
[11] Speck RF, Wehrly K, Platt EJ, et al. Selective employment of chemokine receptors as human immunodeficiency virus type 1 coreceptors determined by individual amino acids within the envelope V3 loop[J]. J Virol, 1997, 71: 7136-7139.
[12] Rabut GEE, Konner JA, Kajumo F, et al. Alanine substitutions of polar and nonpolar residues in the amino-terminal domain of CCR5 differently impair entry of macrophage- and dualtropic isolates of human immunodeficiency virus type 1[J]. J Virol, 1998, 72: 3464-3468.
[13] Strader CD, Fong TM, Graziano MP, et al. Tota the family of G-protein-coupled receptors[J]. FASEB J, 1995, 9: 745-754.

[收稿日期] 2005-07-19 [修回日期] 2005-10-27
[本文编辑] 尹 茶