

能将对蛋白质动力学原子层面的研究成果应用到更高层面的蛋白质结构域之间或分子之间的相互作用当中，甚至应用到整个信号通路网络当中吗？

我们已经知道蛋白质在信号通路中是如何扮演信号接收器、开关控制器、转换器或者节点等功能的。对更高层面信号通路组成单位组织方式的了解有助于阐明生物体对多种信号的整合方式以及生物体是如何根据各种信号来做出相应反应的。已经有研究团体进行过类似的研究了。不过，目前对信号通路的研究要从分子层面提升到细胞层面乃至细胞层面之上都还存在不小的差距。这种差距既有空间上的（细胞是微米级的，蛋白是埃米级的），也有组织结构上的（在细胞器中的定位以及对信号通路的组织），还有时间上的（蛋白质分子处于皮秒级而细胞的时间尺度要长得多）和数量上的（各种细胞类型的数量、蛋白质以及小分子的数量、刺激信号的数量等，以及各种组合方式衍生出来的数量众多的功能等）。要跨越上述障碍还需要找出新的研究方法、新的研究策略以及新颖大胆的科研想法。目前开展的利用生物信息学对信号传递过程进行定量分析，利用多层次模型化方法（multiscale modeling）将分子模拟结果与生化网络联系起来，以及全细胞信号蛋白动力学图谱等研究方法都给了我们极大的信心，我们一定能够对细胞信号通路有一个全局的了解。

原文检索：

Robert G. Smock and Lila M. Gierasch. (2009) Sending Signals Dynamically, *Science*, 24:198-203.

 筱玥/编译

小词典



乐高（Lego）：1932年，丹麦木匠奥尔·科克·克里斯蒂安森发明了一种可以互相拼插的塑料玩具，并将“Leg”和“Godt”（丹麦语“玩得好”）合在一起，创造了“lego”（乐高）这一品牌。巧合的是，“lego”在拉丁语中的意思就是“拼在一起”。如果你有六块八颗凸起的长方体Lego积木，这六块积木可以砌出102,981,500多款组合。

二、用小分子物质捕获动态靶标

传统的基于结构来进行药物开发的方法主要都是借助静态的蛋白质分子来寻找药物活性靶点。不过生物大分子的别构调节效应（allosteric regulation）会受到蛋白质或蛋白质复合体构象以及动力学因素的双重影响，正是因为有了这种调节途径，我们在药物设计方面又多出了很多选择。

通常来说，生物学过程都是依靠非常精密调控的系统来控制的，这套系统会对生物大分子之间的相互作用进行调控，调节细胞内的各种生物信号的传导过程。如果这些信号调节机制出错，就会导致机体患病。比如在癌症细胞中，就是因为调控蛋白质之间相互作用的机制出现了问题，所以出现了未受检查的细胞信号。实际上，很多蛋白质失去固有结构或者与其配体蛋白结合之后折叠形成某种构象，从而与疾病发生扯上关系。

为了能在人体患病状态下控制这些蛋白复合体的活性，我们一直都在寻找那些能够竞争性地结合某个催化位点或活性中心的小分子配体药物。我们过去使用的都是蛋白复合体的静态模型（static model）来作为研究的出发点。通过这种方法我们找到了许多可供临床治疗使用的活性靶点，它们至今仍活跃于临床应用中。不过，想针对这些靶点来设计药物，成功率都很低。据统计，在所有进入I期临床实验的药物中，只有8%最终获得了FDA的认可，被批准上市。保守估算平均每一款新药的研发费用高达8亿美元。在新药研发的过程中浪费了大量的人力、物力和财力，而且很多药物靶点都是因为药物开发失败而被抛弃了。其实过去那种只

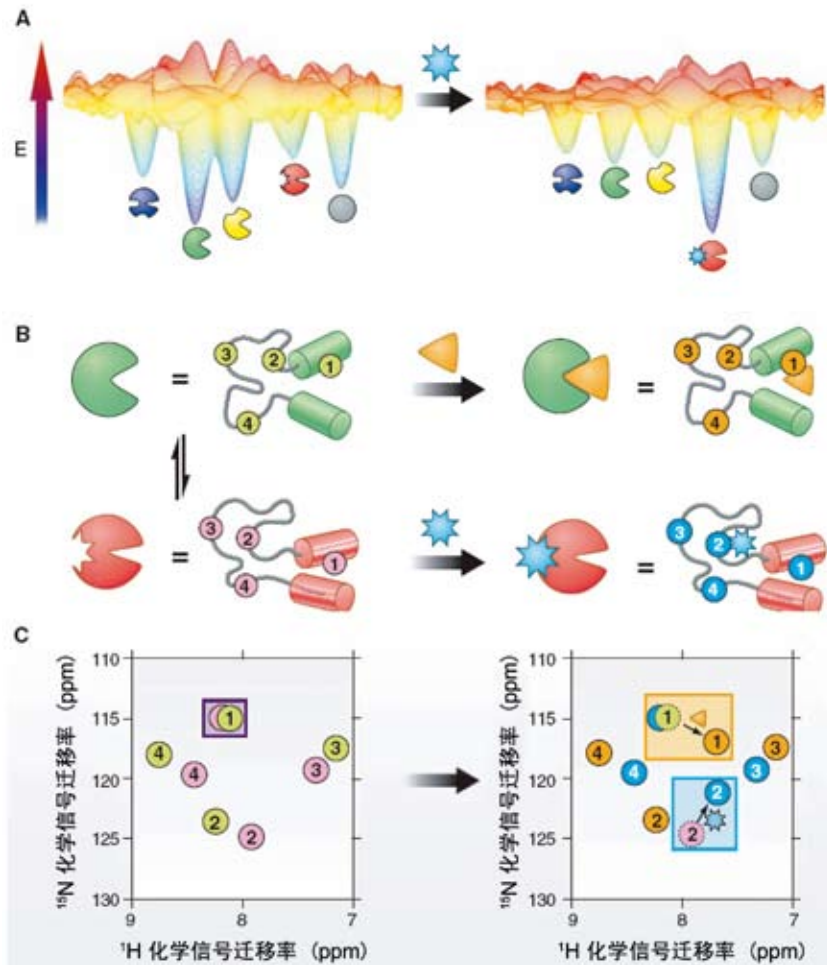


图1 A: 通过二维异核单量子相干光谱技术（HSQC），可以观察到生物大分子具有多种不同的构象状态，例如图中所示绿色的催化活性构象和蓝色、红色、黄色、灰色等失活构象。当蓝绿色星状的抑制剂分子与红色失活构象结合之后，整体分子的自由能最低，因此整个反应倾向于让抑制剂分子与红色构象结合；B: 绿色和红色分别代表一种酶的活性构象和失活构象。该酶由两个螺旋结构及其中间连接一个柔软的环状结构而成。当没有配体存在时，酶处于松弛状态，两种构象形成平衡。橘黄色三角形代表的天然底物可以与位于两螺旋结构之间的酶活性位点结合。蓝绿色星状抑制剂分子可以与位于中间的柔软的环状结构内的失活位点结合，通过别构效应使酶失活；C: 数字1至4表示酶分子中部分选定区域氨基酸残基的¹⁵N-HSQC光谱图。左侧小图内，绿色和粉红色分别代表酶在没有底物存在的情况下的活性构象和失活构象。右侧小图中的橘黄色和蓝绿色则分别代表酶与相应底物结合以后的活性构象和失活构象。如左侧小图图中被重点标出的粉红色框中所示，代表区域1活性构象和失活构象的信号都位于同一螺旋结构处，而区域2和4则位于柔软的环状结构之中。当酶与天然底物结合之后，只有代表区域1活性构象的信号发生了迁移（见右侧小图中的橘黄色框）。当酶与小分子抑制剂结合后，也只有代表区域2失活构象的信号发生了迁移（见右侧小图中的蓝绿色框）。

针对蛋白活性靶点来设计抑制剂的药物开发思路本身就存在很大问题，正是因为这种思维的束缚，我们错过了许多很好的治疗靶点。如果我们把视野扩展一下，看看那些活性位点之外的位点，比如蛋白质复合体的相互作用位点等等，这样就能获得更高的命中几率。这些别构效应分子能够触发一连串的后续改变，最终能够改变生物大分子靶标的活性。

生物大分子复合体的能量学包括焓和熵两个概念。焓和熵能够通过影响生物大分子构象的硬度和柔韧度来影响其活性。将别构调节效应与蛋白质构象以及动力学特性和最终功能改变现象联系起来的主要理论，通常都会将关注点放在蛋白质折叠或者配体结合的自由能问题上。别构效应的Monod-Wyman-Changeux (MWC) 对称模型认为，未结合配体的蛋白会以两种热力学稳定构象之中的任意一种构象形式存在，但是一旦它与配体结合，就会以预定方式朝另一种构象转变。与此相反，别构效应的Koshland-Nemethy-Filmer (KNF) 诱导契合模型 (induced-fit model) 则认为，靶蛋白与配体结合后，其分子构象的改变会在复合体系统内导致一系列的后续变化发生。换句话说，就是没有与配体结合的那部分蛋白构象还没有发生变化，它的改变是由蛋白动力学改变导致的。

后来的理论又拓展了MWC双状态模型 (two-state model) 理论。该理论认为，蛋白未与配体结合时有好几种构象形式，其中最少数量的蛋白分子具有的构象是最主要的构象。如果蛋白分子的自由能具有一个很浅的势阱 (energy well) 和跃迁障碍 (transition barrier)，就会让蛋白分子呈现非常适合与配体结合的构象 (图1)。通过让最少数的蛋白分子与配体结合，整个蛋白的自由能会发生变化，构象也会变成适合与配体结合的状态。别构效应的概念还可以扩展至构象捕获 (conformational trapping)，即可能会让蛋白从活性状态转变为失活状态。在某些情况下，别构效应只有在不发生构象改变的情况下

对蛋白动力学形成干扰，这表明配体结合可能只是因为熵值等因素发生了改变。

别构位点相比活性位点来说选择性更强。更重要的是，与只能针对一种构象中的结合位点的竞争性抑制剂相比，各种不同的别构抑制剂可以针对更多的构象、更多的靶点发挥作用。也就是说，别构抑制剂可以通过多种不同的选择方式来抑制生物大分子的活性。由于别构疗法针对的是一个生物大分子中的多个位点而不仅仅是一个活性位点，因此发生耐药性 (通常都是因为蛋白质大分子发生突变) 的几率会更低。如果别构抑制剂出现耐药现象，只要同时联用其它针对同一靶点的药物就可以解决这个问题了。实际上治疗艾滋病常用的鸡尾酒疗法就是最好的例子。

现在市场上已经出现了别构药物 (allosterically active drug)，还有一些同类药物正在进行后期临床试验。后面我们将要介绍的伊马替尼 (imatinib)，商品名格列卫 (Gleevec) 就是这类新药的代表。其它同类药物包括针对HIV病毒逆转录酶和疱疹病毒C聚合酶的非核苷类抑制剂药物。这些新型抑制剂主要是通过限制酶催化中心的构象可塑性来抑制其催化活性。经过临床前观察，半胱氨酸蛋白酶 (caspases，该蛋白能形成二聚体复合物，与炎症性疾病和凋亡有关) 别构抑制剂能够使其处于失活态的酶原构象状态 (zymogen conformational state)，从而被灭活。借助X射线衍射晶体分析技术 (X-ray crystallography)、核磁共振技术 (NMR) 以及计算机辅助技术等研究发现，HIV病毒蛋白酶也具有“开放”和“关闭”两种构象。这两种构象的互变可以控制底物与催化位点之间的相互作用。能够限制这种构象改变的抑制剂具有调节HIV蛋白酶活性的潜力。

小分子抑制剂同样也能够通过限制构象可塑性的方法调控蛋白质之间的相互作用。因

为蛋白质之间相互作用的界面通常都很大、很平，因此要找出能抑制这种相互作用的小分子物质比较困难。这一点与针对单体蛋白的小分子抑制剂不同，因为在单体蛋白上的结合位点都很小、呈口袋状，因此针对这种位点设计小分子抑制剂就会相对容易一些。大部分蛋白质之间的相互作用都只有纳摩尔级至毫摩尔级的亲和力，因此要找到可以将动态大分子“固定”于失活状态的小分子抑制剂还是非常困难的任务。疱疹病毒蛋白酶（Herpesvirus proteases）属于同源二聚体蛋白酶家族成员，该家族成员都是小分子抗病毒药物的主要作用靶点。该家族成员中每一个单体蛋白都含有两个可变螺旋结构。该结构与蛋白发生相互作用形成二聚体有关。在形成二聚体的过程中，这两个可变螺旋结构会从无序状态变为有序状态，这一点对于调节蛋白酶活性至关重要。如果能找到一种小分子药物，将蛋白酶单体“固定”在失活状态，阻止它们形成二聚体，该药物就有可能成为疱疹病毒蛋白酶抑制剂——我们多年来一直期望获得的药物。

虽然有好几种方法都能发现针对靶蛋白的抑制剂分子，但是NMR技术是最好的，最合适的技术，因为NMR技术可以多时段采样，这样我们就能观察到蛋白运动的情况。借助NMR技术，我们还能以残基级的分辨率发现蛋白质或蛋白质复合体构象改变的情况。传统上，只能使用NMR技术对分子量小于20KD~30KD的蛋白质进行分析。不过NMR技术的进步使得我们可以检测分子量高达1MD的蛋白质和蛋白质复合体的构象以及动态特性。NMR数据可以告诉我们蛋白质复合体与配体结合的能量学信息。比如，在有小分子物质共存的情况下，蛋白质会显出不同的构象，这实际上就说明焓发生了变化。同样，动力学特性的不同说明熵发生了改变。

如果使用稳定同位素¹⁵N和（或）¹³C标记蛋白质，然后借助二维异核单量子相干光谱技术（HSQC）就能观察到蛋白质构象改变的情况。使用这种方法可以对分子量更大的蛋白质复合体进行研究。蛋白质与配体结合时，结合位点处及其附近氨基酸残基的交叉峰（cross peak）会受到干扰，可能会移位或变宽。这些数据都会标注到蛋白质结构图上，最终形成一份指纹图谱，从图中可以轻易地发现竞争性位点和别构位点的差别（图1）。

用同样的方法，也可以对有小分子配体和没有小分子配体情况下的蛋白质动力学参数进行比较。实际上，这就是被广泛使用的发现生物大分子高亲和性配体的新方法——SAR-by-NMR的基础。SAR-by-NMR技术将NMR技术和逐步分析技术相结合，从而成为药物研发过程中非常重要的一项技术。借助NMR技术可以对蛋白与配体分子结合的亲和力进行定量测定，哪怕解离常数只有亚微摩尔至毫摩尔级也能成功检测。

SAR-by-NMR技术扩展之后还能进行高通量配体筛选工作。只需要对不同的靶蛋白进行不同的标记，就可以同时对好几种靶蛋白进行检测。NMR光谱编辑技术可以将每一个蛋白的信号分离出来，找出（如果有的话）哪些配体可以与之结合。

将NMR技术和X射线衍射晶体分析技术结合起来我们终于弄清楚了格列卫这种别构抑制剂抑制ABL酪氨酸激酶（该激酶与慢性髓细胞性白血病有关）的活性的机制。第二代ABL抑制剂现在也已经上市了，比如达沙替尼（dasatinib），商品名Sprycel和尼罗替尼（nilotinib），商品名Tasigna等。

对表达有Bcr-ABL蛋白的细胞进行细胞增殖试验发现，伊马替尼（imatinib）的半数抑制剂量（IC₅₀）为260 nM、尼罗替尼（nilotinib）的半数抑制剂量为13 nM，而达沙替尼（dasatinib）的半数抑制剂量为0.8 nM。ABL酪氨酸激酶活性是受一种结构基序控制的。该基序能够控制具有催化底物磷酸化能力

的氨基酸残基的方向。这个结构基序含有一个 α 螺旋结构和两个环状结构（分别是磷酸结合环状结构（P）和活化环状结构（A），其中A环有活化和失活两种状态）。

虽然我们把伊马替尼和尼罗替尼归为三磷酸腺苷抑制剂，但是用X射线衍射晶体分析技术对ABL-伊马替尼和ABL-尼罗替尼复合物进行检测后发现，ABL与这两种配体结合之后，A环会受别构效应影响转变成失活态。但是与上述活性研究结果相反，对ABL-达沙替尼复合物及上述两种复合物的结晶结构研究表明，激酶处于活性构象。最近的NMR实验数据结果也支持了上述结晶结构数据，这说明，激酶的A环结构仍然可以进行构象转变。在所有ABL-抑制剂复合体中，与酶活性有关的氨基酸残基信号都增宽，而且试验发现达沙替尼相比其它两种抑制剂更能增强激酶分子的动力学活性。这说明，上述抑制剂对激酶活性的影响是以改变激酶构象为基础的。今后的药物研发工作也都可以从活性构象和失活构象的HSQC指纹图谱比对中受益。

NMR技术除了能够快速发现酶分子因与配体结合而诱导发生构象改变之外，NMR技术还能通过监测复合体整体动力学参数，发现蛋白质复合体的解聚情况。蛋白质在单体形态下的共振信号峰会很尖锐，而一旦参与形成复合体之后，共振信号的峰就会增宽。因此，如果小分子物质破坏了蛋白复合体的结构，HSQC图谱就会呈现出单体蛋白的特征信号。该技术最大的好处就是无需蛋白共振。而且这些实验方法能够发现是蛋白质分子中的哪一部分与小分子配体结合。如果发现小分子物质能够与蛋白质分子结合，我们就可以用SAR-by-NMR方法进行后续研究了。

用检测蛋白复合体动力学特性的方法能发现破坏蛋白质间相互作用的小分子配体吗？p53-MDM2蛋白复合体是非常好的研究对象，可以用它来检测一下。我们最初发现P53蛋白，是以为它能抑制好几种肿瘤细胞的生长和增殖，不过它与MDM2蛋白结合形成的复合

体如果出错，不受控制，就会导致p53蛋白失控，出现问题。有人用nutlin家族蛋白nutlin-3（SOM）进行了竞争性结合实验。结果显示nutlin-3（SOM）蛋白能够抑制p53蛋白与MDM2蛋白结合， IC_{50} 为90nM。这种亲和力已经可以媲美用肽类似物实验和表面等离子体共振（SPR）实验检测到的p53蛋白与MDM2蛋白的亲和力了。p53蛋白的N末端具有明显的从无序到有序的转变倾向。在蛋白处于松弛状态下，N末端处于无序状态，但一旦与MDM2形成复合物之后，该结构域就会折叠形成 α 螺旋结构。与此同时，MDM2蛋白处于松弛构象时N末端也有一个短小的“盖子”样结构域，该区域在与p53蛋白结合之后，也可以从比较松弛的开放构象（该构象比例较少）缓慢转变为比较有序的螺旋状关闭构象（该构象比例较高）。根据对“盖子”样结构域动力学的研究表明，p53-MDM2蛋白复合体的构象可塑性要高于松弛的MDM2蛋白单体，也要高于MDM2-nutlin-3蛋白复合体。nutlin-3蛋白不能使MDM2蛋白或者p53蛋白失活。以上这些初步的实验工作为我们今后的药物研发工作打下了基础，在此工作基础之上，我们将来一定能找到p53-MDM2蛋白复合体抑制剂。

蛋白间的相互作用，包括cAMP效应元件结合蛋白（CREB）与它的结合蛋白（CBP）之间的相互作用同样可以为我们演示如何在一个更为复杂的动态环境下使用NMR方法筛选小分子抑制剂。CREB蛋白参与细胞信号通路，如果失控，就会导致多种神经系统疾病和癌症的发生。CBP蛋白是CREB蛋白的共活化蛋白。这两个蛋白间的相互作用受CREB蛋白的KID结构域和CBP蛋白的KIX结构域调控。KID结构域在CREB蛋白处于松弛构象时也是未折叠构象，但一旦与KIX结构域结合，就会形成两个螺旋结构。KIX结构域的情况与KID相似。

以前的抑制试验主要都集中于对能竞争性抑制KID-KIX结合的短肽进行研究。不过用NMR技术对762种小分子配体进行筛查后发

现，这种复合物能够被别构抑制。通过对HSQC图谱的分析我们发现，有两种小分子物质能与KIX结构域中的某个位点结合，但这些位点都不是KID结合位点。KID结合位点处的氨基酸残基信号会受到轻微干扰，这说明这些小分子物质影响了KIX的构象，使其不能与KID结构域结合。虽然目前这些小分子物质还没有进入临床，但是它们的抑制常数已经达到了微摩尔级，这预示着它们极有潜力成为药物市场中的生力军。

意识到了生物大分子之间结合的自由能问题，我们就会发现很多药物开发的新机会。过去那些被认为没有用处的受体靶点分子现在又重新焕发生机。在某些情况下，那些在过去越不被人重视的靶点，例如蛋白复合体或者人疱疹病毒蛋白酶体等，现在越来越受人欢迎。这些别构抑制剂具有非常灵活的可选择性，给了我们极大的便利，再面对诸如药物疗效问题、药代动力学问题以及药物毒性等问题的时候，我们就有解决办法了，并可以减少在药物研发过程中常见的高失败率的现象发生。同样，任何药物都会碰到的问题，比如亲和力和配体效力问题、原子结合自由能问题、药物吸收问题以及药物渗透性问题等等也都需要一一去解决。将NMR光谱技术、计算机建模技术等多种方法结合起来进行药物设计是最好的方法，这一定会极大地提高药物开发的成功率。

原文检索：

Gregory M. Lee and Charles S. Craik. (2009) Trapping Moving Targets with Small Molecules. *Science*, 324:213-215.



三、蛋白质动态性和进化论

传统观点认为，蛋白质具有绝对的功能特异性，同时也只具有单一、固定的结构，但事实并非如此。蛋白质具有很强的适应性，可以“进化”出新的功能与结构。

蛋白质发挥功能是非常准确的、充满特异性的，同时也是非常娴熟的、有效率的。这些特性都是由于蛋白质本身缺乏多能性造成的，不过蛋白质也有很强的获取新功能和新结构的能力。实际上，能够证明蛋白质进化适应性的例子随处可见，例如自然界中存在的、数量众多的起源于共同祖先的各种蛋白质，又比如最近几十年间由于滥用药物导致的耐药性机制，即各种耐药性酶（蛋白质）的产生等等进化事件。

那么是什么让蛋白质进化的呢？进化的过程就是将已经存在的多样性不断聚集的过程。如果真的像过去那种认为蛋白质只有一种功能、一种结构的传统观点所界定的那样，那么它就不可能适应环境，对新出现的选择压力做出适当的反应了。不过现在，一种所谓“天然态（native state）”的新观点开始流行。该观点由R. L. Baldwin 和K. A. Dill最先提出。他们认为蛋白质是由各种可变底物（alternative substructure）或构象异构体（conformer）组合起来的整体。起初，R. L. Baldwin等人只是用这种观点来解释蛋白质折叠现象，后来又将该观点推广到蛋白质是