癌胚抗原 CEA 三维空间结构同源模建

Homology Modeling of CEA
—protein tertiary structure prediction

（生命科学学院　生化与分子生物学　07 级　王吉龙　10711052　s1b2）

一，结构预测的作用

目前，对比核酸测序，通过实验方法进行的蛋白质三维结构解析的速度要慢很多。这样导致了核酸序列信息与蛋白质三维结构信息之间的鸿沟越来越大。而蛋白质三维结构的预测目的就是减小这个鸿沟。预测的结构信息虽没有 X 射线或 NMR 方法得到的蛋白质结构那么准确，但预测得到的结构信息可以用来合理设计生化实验，如：点突变，蛋白质的稳定性或功能分析。另外，预测的结构信息也可以用来辅助分析一些实验结果。

二，同源建模法预测蛋白质的三维结构

1、基本原理

同源建模法(homology modeling)又称比较建模法（comparative modeling）。两个蛋白质的序列具有很高的相似性，则它们可能具有相似的三维结构。如果通过 X 射线或 NMR 方法得到一个蛋白质（模板蛋白）的结构，就可以将该结构复制给另一个与其序列相似的结构未知蛋白，由此预测的蛋白质结构具有很高的可信度。同源建模通过未知结构蛋白与模板蛋白比对，可以产生一个全原子坐标结构模型。

2、基本步骤

挑选模板（template selection）；序列比对；基本骨架模型的建立；连接环(loop)的建模；侧链精修；使用能量方程进行模型精修。下面以 CEA 结构的预测为例加以说明：

(1) 挑选模板

在蛋白质结构数据库中挑选合适的同源序列来作为建模的模板，通常在 PDB 数据库中搜索。这种搜索可以使用 BLAST 或 FASTA 等启发式序列比对搜索程序。也可以使用 SSEARCH 或 ScanPS 等动态规划法的搜索程序，这样可以得到更将灵敏的搜索结果，而相对较小的蛋白质结构数据库，是这种动态规划法搜索得以实施的基础。

在 CEA 结构预测中，通过文献阅读得到 CEA 是免疫球蛋白家族成员，具有七个免疫球蛋白结构域。这里主要对其氮端三个结构域 CEA(N), CEA(1A), CEA(1B) 进行建模。挑选了 CD2(R1), CD4(H1), CD4(H2), 1REI(V), 3FAB(VH), 和 3FAB（VL）（这些结构是储存在 Brookhaven 的蛋白质结构数据库中的，而不是 PDB 数据库）作为待选模板，然后使用 ALIGN 程序进行序列比对，来选择合适的模板蛋白序列。这里需要注意，合适的模板并不一定意味着是序列比对的分最高的蛋白序列，还要综合考虑较高的序列相同性，结构的分辨率，合适的辅因子和一致的保守位点等。这里选择 CD4(H2)作为 CEA（1B）的主要模板，是因为它们具有较高的相似性，但它没有该保守二硫键，故还选择 CD4(H1)和 1REI(V)作为模板构建二硫键（C225-C265）对应区域，即 225-237 位和 252-265 位使用 CD4（H1）为模板。最终 CEA(N)以 CD2(R1), CD4(H1) 和 1REI(V) 为模板；

CEA(1A) 和 CEA(1B) 以 CD4(H1), CD4(H2) 和 1REI(V)为模板。

(2)序列比对

选择好模板后，目标蛋白和模板蛋白需要使用修改过的比对算法进行重新比对，来找到最佳比对结果。重新比对是同源建模中关键的一步，它将直接影响最终模型的质量。重新比对中发生的错误，可将同源残基分配到错误的位置上，并且在后续的步骤中是无法改正的。因此，应该综合使用不同比对算法的程序，如 Praline 和 T-Coffee 等，进行序列比对。但是最好的比对算法也可能出错，所以我们应该人工检查，来保证保守的关键残基进行了正确的比对。必要时，还要做一些手动修改来提高比对质量。

在 CEA 结构预测中，使用了手动修改，来确保以下几方面：(i)保证关键的折叠标记位点进行了比对，如 C 链保守的色氨酸，保守的盐桥和二硫键连接；(ii)保证每个折叠中保守的疏水核心；(iii)保持 β 链的结构，即将所有的插入和删除突变都在环形连接中进行；(iv)在可能的地方，以上几方面应该在待建模序列与其它临近的家族蛋白成员的比对中保持一致。

(3) 基本骨架模型的建立

得到最优化比对的结果后，待建模蛋白比对上的残基可以认为与模板的相应区域具有相似结构。这样就可以将模板蛋白对应残基的坐标简单复制给待建模蛋白。如果比对区域的残基是相同的，可以将模板蛋白残基的侧链原子同主链原子同时复制给待建模蛋白。如果比对区的两蛋白残基不同，仅将骨架原子的坐标复制给待建模蛋白。侧链原子坐标的重建将在后面侧链精修的步骤中进行。

在骨架原子坐标构建中，最简单的方法是只使用一个模板蛋白。但 CEA 的每个结构域都使用了三个模板蛋白分子。在使用模板进行构建之前，先将三个模板进行比对和叠加。可以选择取各个模板原子坐标的平均值或者选择每个模板与待建模蛋白最匹配区段作为构建时使用的原子坐标。CEA 构建时选择了后者，如 CEA（N）中：9-20 位使用 CD2（R1），43-48 位使用了 CD4(H1)，而 59-63 位使用了 1REI(V)。

(4) 连接环(loop)的建模

在为建模而进行的序列比对中，往往会出现由于插入或缺失造成的空位，这时需要使用连接环建模来填补结构上的空位。这一步也是同源结构建模中非常困难的一步，是同源建模误差的主要来源。

连接环(loop)的建模可以看作是微型蛋白建模问题。至今没有成熟的方法来构建可靠的连接环结构。目前有两种方法来构建连接环(loop)：数据库搜索法(database searching method)和从头构建法(ab initio method)：

(i)数据库搜索法

从已知蛋白质结构的数据库中找到与待建模蛋白 loop 环前后的主链原子形成的茎(stem)区域空间结构相匹配的区域。首先测定茎锚定区域的方向和距离，从 PDB 数据库中搜索具有相同长度，并与上面的端部构象吻合的片段。最佳 loop 环的选择要考虑序列相似性，并且与临近部分具有最少的立体结构冲突。最佳匹配片段的构象复制给茎的连接区域。

（ii）从头构建法

可以产生许多随机的 loop 结构，然后从中挑选一个 loop，与邻近侧链不发生冲突，具有较合理的低能量状态，并且Φ和ψ角位于允许区域。

一些专业 loop 构建软件有：FREAD（使用数据库搜索法)；PETRA（使用从头构建法)；CODA(综合运用两种方法)。

CEA 中的 loop 结构是使用数据库搜索法构建的。从 Brookhaven 数据中找到 12 个 Fab 片段（3FAB，4FAB，2HFL…)，从中找到最匹配的 loop 结构，如 107-112 位的 Link1 使用 3FAB（L)；93-98 位β链之间的 link 使用 2HFL（H)。

(5) 侧链精修

完成主链原子（及相同侧链原子）坐标构建后，需要确定序列重新比对中那些不同残基位点的侧链原子坐标。侧链的几何构象在评估蛋白活性位点上的蛋白－底物相互作用以及在蛋白质相互接触面上的蛋白－蛋白相互作用中，有非常重要的作用。

理论上侧链原子坐标的确定可以通过搜索侧链在每种扭转角度下能呈现的所有构象，来找到一个与临近原子具有最低相互作用能量构象作为侧链的原子坐标。但这种方法需要繁重的计算机计算工作，受到计算技术发展的限制往往无法实现。

当前常用的侧链预测程序使用旋转异构体（rotamers）的概念。旋转异构体是偏向于从已知蛋白晶体结构中提取的侧链扭转角度。这些倾向的侧链构象的集合构成了一个旋转异构体文库，并且文库中的旋转异构体按出现的频率排序。这样可以大大减少需要尝试的侧链构象数。预测的侧链构象选择与邻近原子具有最低相互作用能量的旋转异构体。

很多时候，使用旋转异构体的方法仍然非常费时。为了进一步缩短搜索时间，可以将骨架构象也考虑进去。因为骨架构象与一些特定的旋转异构体是相对应的。使用最适旋转异构体构建侧链构象后，还要对其进行优化来减少其与其它区域结构在立体构象上的重叠。

预测侧链结构的软件有：SCWRL。

CEA 侧链结构预测正好符合上述原理：

在(2)序列比对中对于重新比对结果

(i)如果比对中的残基与 CEA 相同，则使用模板等价残基的构象作为 CEA 的残基构象；

(ii)对于发生保守取代的，CEA 的侧链排布成与模板对应残基类似的区域；

(iii)对于发生非保守取代的，CEA 侧链排布成该残基通常观察到的构象；

(iv)最后，人眼检查将发生严重立体结构冲突的构象用另外可接受的构象替换掉。

(6) 使用能量方程进行模型精修

在上面连接环（loop）构建，侧链构建的步骤中都使用了势能计算来改善结构模型。但这样并不能保证整个模型不会出现结构异常，如:不利的键角，键长或过密的原子接触。这些结构的异常可以通过在整个模型范围应用能量最小化步骤来矫正，使得整个蛋白构象处于能量势处于最低状态。能量最小化的目的是在不显著改变整体结构的前提下，缓解立体结构的不利碰撞和张力。

但是能量最小化在使用时需要特别注意，因为过度的能量最小化可能导致残基离开其正确的位置。因此，推荐有限的能量最小化，来移除主要的错误，如短的键长和紧密的原子冲突。如果需要，关键的保守残基和那些设计辅因子结合的区域需要被限制使用能量最小化。

另外还有一种结构模型精修的方法是分子动态模拟（molecular dynamic

simulation），因为能量最小化原理只能使原子趋于当前结构的最小化，而没有搜索所有可能的构象，结果导致一种次优化结构（suboptimal structure）。寻找全局最能量最小化，需要在势能图谱中移动原子，使其能量上升或下降。分子动态模拟法通过加热或冷却来模拟分子能量上升和下降的运动。这样可以克服一些能量最小化原理无法接近的能量垒。人们希望这种模拟可以追踪蛋白质的折叠过程，有一个更好的机会得到蛋白质的真正结构。

目前的结构模型精修软件有：GROMOS 使用分子模拟法。

CEA 使用 CHARMM 程序来进行结构精修，首先使用 25 步来修改主要的立体结构冲突，然后通过 500 步得到能量最小化。这种最小化得到较好的肽段几何构象并修改了所有的立体结构冲突。最终每个结构域都得到一个稳定的能量值。

(7)模型评估

最终的同源结构模型需要通过评估来确保其结构的特性符合其生理生化规律。这包括检验Φ—ψ角度的异常性，键长，紧密接触面等。另一种检验蛋白质结构模型质量的方法是固定性考虑这些立体化学特性。这种方法可通过编辑实验得到的蛋白质结构的空间特性和相互作用能的统计谱，来发现模型的错误。通过比对统计参数与构建的模型，可以知道哪些区域折叠正常，哪些是异常的。

常用的评估程序有：Procheck 检测常用生理化学参数；WHAT IF 检验化学正确性；

ANOLEA 使用统计算的方法；Verify3D 使用统计计算的方法。

注意 ANOLEA 和 Verify3D 虽然都使用统计方法，但它们的阈值不同，并且分数高低代表的含义也不同：ANOLEA 分数越低模型越正确，而 Verify3D 中分数越高越正确。

CEA 在构建完个结构域的结构后使用 POL_DIAGNOSTICS 进行模型评估。

至此完成了同源建模法预测蛋白质三维结构的基本步骤。现在已经出现一些软件，可以自动进行同源建模结构预测：Modeller 需要提供比对的模板序列；Swiss-Model 和 3D-JIGSAW 可以全自动建模，也可以选择手动输入比对的模板序列。

另外，现在也出现了一些通过同源建模法预测的蛋白质三维结构数据库：ModBase 和 3Dcrunch。它们可以提供蛋白质结构进化的一些有用信息。

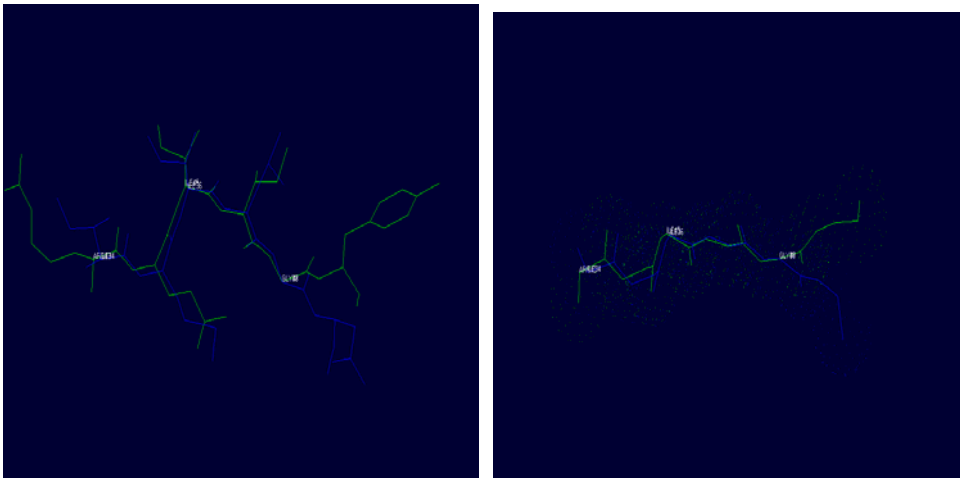
(8)其它

对于 CEA 蛋白来说，因为它是糖蛋白，存在多个糖基化位点，故需要预测可能的糖基化位点及糖的构象。从已知结构的糖蛋白可知通常糖核覆盖蛋白质表面的疏水残基。

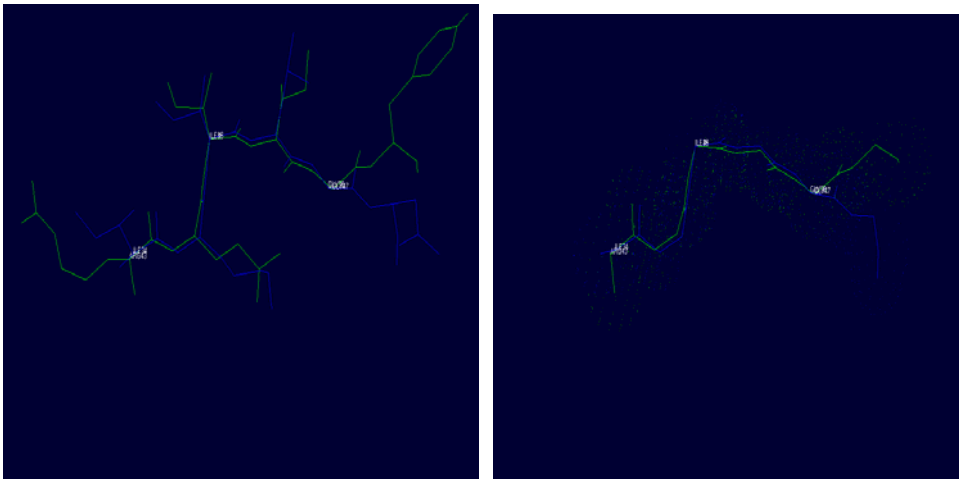
三，CEA 预测结构的一些分析

由于 CEA 预测结构 1E07 无法使用 Swiss-PdbView 打开。故只进行 CEAM5_HUMAN 的氮端 34-110 位的 X 射线晶体结构 2QSQ 与 CD4_HUMAN 第一，二个结构域的 X 射线晶体结构 3CD4 在 Swiss-PdbView 中进行了一些分析。

由于在 CEAM 结构预测中 43-48 残基是使用 CD4（H1）作为模板，故在 Swiss-PdbView 选择 2QSQ 的 43-48 位残基 RQIIGY（绿色），与其对应的 3CD4 中应为 34-39 位残基 IKILGN（蓝色），将这两段肽链进行叠合（superimposed），结果如图



图一，以 CEA-47G 与 CD4-38G 为第一对叠合原子，CEA-45I 与 CD4-36I 为第二对叠合原子，CEA-43R 与 CD4-34I 为第三对叠合原子，右图为左图去除侧链集团。



图二， 以 CEA-45I 与 CD4-36I 为第一对叠合原子，CEA-47G 与 CD4-38G 为第二对叠合原子，CEA-43R 与 CD4-34I 为第三对叠合原子，右图为左图去除侧链集团。

可以看出 CD4（H1）和 CEA 在对应区域中的主链构象基本吻合。 但对于侧链，同一种氨基酸的相同侧链具有相近的构象，而对于不同侧链，由于原子种类及数目的差别，导致构象发生很多差异，这也是在（五）侧链精修过程中，选择合适旋转异构体的原因。

四，蛋白质三维结构预测的其它方法

1) Threading

将未知蛋白的序列放入结构数据库中，并选择最适合的折叠，以此来预测蛋白质的三维结构。该方法不需要一级序列的相似性。该方法在一个折叠文库中计算一个氨基酸序列与一个已知结构的兼容性，如果一个预测所需要的蛋白质折叠不存在于该折叠文库，该方法将失效。相应程序有：3D-PSSM，Fugue。

2) Ab Initio Prediction

蛋白质一级序列中包含一些信息可以指导蛋白质找到其天然构象。早期生物物理学研究显示多数蛋白质可自发折叠成处于最低能量附近的稳定结构。这种结构状态叫做蛋白质的天然状态。预测程序使用能量最小化原理。这种算法搜索每

一种可能构象来确定一个具有最低全局能量的构象。正如同源建模中侧链精修一样，该方法并不可行。目前的从头预测法将片段搜索法与 Threading 相结合产生一个结构模型。相应程序有 Rosetta。

五，三种蛋白质结构预测方法的比较

	Homology Modeling	Threading	Ab Initio Prediction
原理	一级序列具有较高性的两个蛋白，很可能具有非常相似的三维结构。	蛋白质的结构比其一级序列更保守，故许多不存在序列相似性的蛋白可能具有相似的蛋白折叠	蛋白质的一级序列信息可以指导其正确折叠，天然状态的蛋白质接近其能量的最低状态
结构已知的模板	一级序列相似性很高的模板	高级结构（如二级结构）相似性很高的模板	不需要模板
能量最低化原理	用来优化构建的模型	用来优化构建的模型	预测的主要原理
准确性	最准确， 可以提供精修后的原子模型	较准确 ， 只能提供大致的拓扑结构	准确性较差，目前对蛋白质的一级序列与三维结构的关系认识不是很清楚