

可溶性三聚化 CD40-异亮氨酸拉链融合蛋白的制备及鉴定 Preparation and Identification of Soluble Trimeric CD40- isoleucine Zipper Fusion Protein

徐丽慧^{1,2}, 刘毅¹, 何贤辉^{1*}

XU Li-Hui^{1,2}, LIU Yi¹ and HE Xian-Hui^{1*}

1 暨南大学组织移植与免疫教育部重点实验室, 广州 510632

2 暨南大学生物工程研究所, 广州 510632

1 Key Laboratory of Ministry of Education for Tissue Transplantation and Immunology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

2 Institute of Bioengineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China

摘 要 以克隆的 CD40 cDNA 为模板, 经多步 PCR 构建羧基端融合异亮氨酸拉链 (isoleucine zipper, IZ) 三聚化基序和 His₆ 标签的可溶性 CD40 融合蛋白 (sCD40IZ) 的原核表达载体, 在大肠杆菌中获得高效表达, 分子量为 27kD, 与理论大小相符, 表达产物主要存在于包涵体中, 对包涵体蛋白进行稀释复性和纯化得到可溶性的 sCD40IZ 重组蛋白, 该蛋白在溶液中的分子量为 91kD, 表明最有可能以三聚体形式存在。活性分析显示该蛋白能够与细胞上的 CD40L 结合, 并且其结合活性与不含 IZ 基序的可溶性 CD40 相比明显提高。这些结果表明, 在可溶性 CD40 羧基端融合 IZ 基序能够促进形成三聚体, 并且具有增强的配基结合活性。

关键词 CD40, 三聚化, 异亮氨酸拉链, 原核表达, 包涵体, 复性

中图分类号 Q78;R392.12 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)03-0477-06

Abstract The interaction of CD40 with its cognate ligand, CD40L (CD154), plays important roles in immune responses. Blockade of CD40-CD40L signal pathway can protect the progression of antibody- and cell-mediated autoimmune diseases, and reduce allograft rejection thus prolonging graft survival, even engendering long-lived antigen-specific tolerance. The present study aims to enhance the binding activity of CD40 by incorporating an isoleucine zipper (IZ) trimeric motif into CD40 ectodomain to promote the formation of soluble CD40 trimers, which would be useful for blocking CD40-CD40L interaction. A prokaryotic expression vector for soluble human CD40 ectodomain fused with an IZ motif and a hexa-histidine (His₆) tag at its carboxyl terminus (sCD40IZ) was constructed by multiple round PCR using cloned CD40 cDNA as a template. The recombinant sCD40IZ protein was expressed highly in *Escherichia coli* (*E. coli*) with a molecular weight of 27kD, which is consistent with its theoretical value. It mainly existed in inclusion bodies. After refolding from inclusion bodies, soluble sCD40IZ protein was purified by gel filtration. Its molecular weight in solution was about 91kD when determined by gel filtration, suggesting that it most probably existed in the form of trimers. Moreover, this protein could bind to CD40L expressed on Jurkat T cells and its binding activity was significantly higher than that of soluble CD40 without an IZ motif. These results suggest that incorporation of an IZ motif at the carboxyl terminus of soluble CD40 can facilitate the formation of trimers and enhance its binding activity with CD40L. Thus, the trimeric CD40 protein may be used to block CD40-CD40L signal pathway, suggesting that it may have

Received: November 8, 2005; Accepted: February 17, 2006.

This work was supported by the grants from National Natural Science Foundation of China (No.30371651, No.30572199 and No.30230350).

* Corresponding author. Tel:86-20-85220679; E-mail:thexh@jnu.edu.cn

国家自然科学基金面上项目(No.30371651、No.30572199)和重点项目(No.30230350)资助。

potential application in preventing autoimmune diseases and transplantation rejection.

Key words CD40, trimerization, isoleucine zipper, prokaryotic expression, inclusion body, refolding

CD40 为 I 型跨膜糖蛋白,属肿瘤坏死因子受体 (tumor-necrosis factor receptor, TNFR) 超家族成员,主要表达于 B 细胞、内皮和上皮细胞、单核/巨噬细胞、树突状细胞上^[1]。其配基为 CD40L (CD154),属 TNF 超家族成员,短暂表达于活化的 CD4⁺ T 细胞上^[2]。CD40 胞外域含有四个富含半胱氨酸的重复序列,其中结构域 2 和 3 为配基结合区^[3, 4];其胞浆区存在两个独特的结构域即 cyt-N 和 cyt-C,分别与不同的 TNFR 相关因子 (TRAF) 结合,从而进一步活化 NF- κ B;近膜区含一个富含脯氨酸区,能与 Jak3 相互作用而发挥功能^[2]。CD40-CD40L 相互作用无论在体液免疫和细胞免疫应答中均发挥重要作用。在体液免疫方面,CD40L 激活 CD40 信号传导途径,是 B 细胞扩增、免疫球蛋白类别转换、成熟为记忆 B 细胞或浆细胞、分泌细胞因子以及上调共刺激分子 CD80/CD86 等所必需,促进静息 B 细胞转化为有效的抗原提呈细胞;在细胞免疫中,CD40-CD40L 信号途径为树突状细胞提供促生存信号、上调共刺激分子/辅助分子表达、增强树突状细胞的抗原提呈功能;同时,该信号通路具有双向性,反过来经 CD40L 向 T 细胞传递信号,在 CD4⁺ T 细胞活化、扩增和成熟过程中发挥重要作用^[1, 2]。

可见,一方面 CD40-CD40L 信号途径的异常可导致出现病理反应,人类 CD40L 突变而引起的功能丧失导致严重的 X-连锁型免疫缺陷高 IgM 综合症,病人不能产生 IgG、IgA 和 IgE,并且易发生复发感染,存在淋巴瘤和胃肠癌高风险^[1, 2];另一方面,阻断 CD40-CD40L 的相互作用能够阻止抗体和细胞介导的自身免疫病的进程、降低移植排斥反应、延长移植存活,甚至产生长期的抗原特异性耐受^[5-7]。目前一般利用抗 CD40L 单抗阻断 CD40-CD40L 的相互作用^[6, 7],但也有研究利用 CD40 与免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) 的 Fc 融合的 CD40Ig 研究其对移植排斥反应的影响^[8, 9]。已有研究表明 CD40L 天然状态即以三聚体形式存在^[10],而 CD40 与 CD40L 结合后也能形成三聚体,这是激活 NF- κ B 信号的最小多聚化形式^[11]。因此,制备三聚化的 CD40 分子,对于进一步研究 CD40-CD40L 信号通路,以及通过阻断该信号通路而用于防治移植排斥反应或治疗某些自身免疫病等具有重要意义。异亮氨酸拉链 (isoleucine zipper, IZ) 是能够在溶液中自发形成三聚

体的基序^[12, 13],且也可促进融合 IZ 的蛋白形成稳定的三聚体结构^[14]。本研究目的在于构建可溶性 CD40 胞外域与 IZ 基序的融合蛋白 (sCD40IZ) 的原核表达载体,并从大肠杆菌中获得可溶性 CD40 三聚体产物,为研究和阻断 CD40-CD40L 的相互作用提供新策略。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH5 α 、BL21 (DE3) 菌株和质粒 pET-3c 购自 Novagen;限制性内切酶 *Nde* I 和 *Bam*HI、T4 DNA 连接酶、高保真 DeepVent DNA Taq 聚合酶等均为美国 New England Biolabs 产品;SeeBlue[®] Plus2 预染蛋白分子量标准、小鼠抗 His₆ 单抗 (羧基端特异性) 购自 Invitrogen;兔抗人 CD40 多抗 (H-120) 购自 Santa Cruz 公司;辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗兔 IgG 为美国 Jackson Immune Research 产品;PE-anti-CD40L 和同型对照 (isotype control) 为美国 PharMingen 产品;PE 标记的兔抗小鼠 IgG 为丹麦 Dako 产品;凝胶过滤层析分子量标准品 (MW-GF-200: 12kD ~ 200kD) 购自 Sigma;异丙基- β -硫代半乳糖苷 (Isopropyl-beta-D-thiogalactoside, IPTG)、4-氯-1-萘酚等化学试剂均为进口或国产分析纯试剂;可溶性 CD40 (sCD40) 按前文报道的方法^[15]制备。

1.2 方法

1.2.1 sCD40IZ 表达载体的构建:以前文^[15]克隆的 CD40 的 cDNA 片段为模板,经多轮 PCR 构建 sCD40IZ 的原核表达载体,所用引物见表 1,所有引物均由上海博亚 (Bioasia) 公司合成,PCR 反应过程见图 1B。PCR 反应在 50 μ L 总体积中进行,以 2 μ L cDNA 第一链为模板,反应条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 2min 后开始循环,然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 共 35 个循环,再于 37 $^{\circ}$ C 延伸 10min。最后一步获得的 PCR 产物以 *Nde* I + *Bam*HI 双酶切并从凝胶中回收,与同样双酶切的 pET-3c 连接后,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,以碱裂解法从转化子中提取质粒,双酶切法筛选接入正确外源基因的转化子,由上海博亚公司测定 DNA 序列。获得的表达载体称 pET/sCD40IZ。

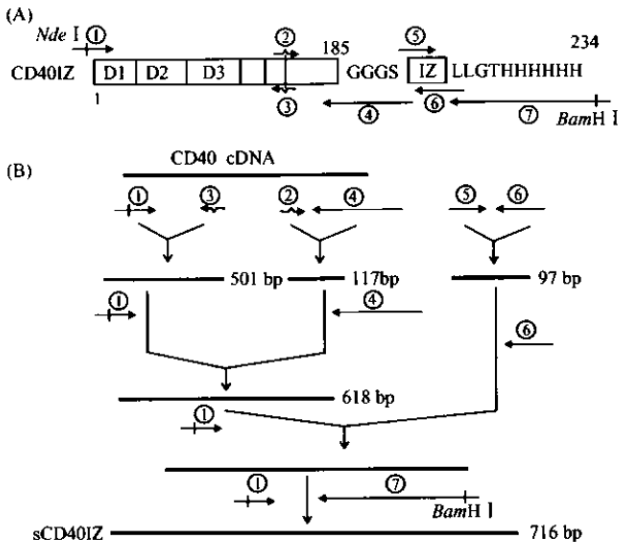


图1 sCD40IZ原核表达载体构建流程

Fig. 1 Flow chart of the construction of the prokaryotic expression vector for sCD40IZ

(A) Schematic illustration of sCD40IZ sequence; (B) Flow chart of PCRs.

人CD40抗体(图4A)和抗His₆抗体(图4B)均有特异性反应,出现明显的特异性反应条带(图4, lane 3, 箭头所示);而阴性对照(即转入pET-3c空载体的同一菌株)经IPTG诱导后,无任何特异性反应条带(图4, lane 1),表明表达的重组蛋白为sCD40IZ。

2.4 sCD40IZ的复性和纯化

经稀释法复性的sCD40IZ以凝胶过滤层析(图5)分为两个峰,峰I为含杂蛋白的多聚体,峰II是纯的sCD40IZ蛋白,纯度约95%(图6)。免疫印迹分析显示,纯化的可溶性sCD40IZ与抗CD40抗体具有特异性反应(图4, lane 4)。以凝胶过滤分子量标准校准计算出峰II sCD40IZ的Mr为91kD(图7),而不含IZ基序的可溶性CD40(sCD40)的分子量为32kD^[15]。

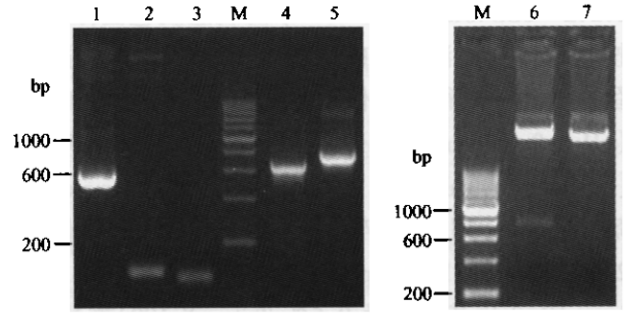


图2 PCR产物及pET/sCD40IZ双酶切产物的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR products and double restriction enzyme digested product of pET/sCD40IZ
M: 200bp DNA ladder; 1: PCR product of primers 1 + 3; 2: PCR product of primers 2 + 4; 3: PCR product of primers 5 + 6; 4: PCR product of primers 1 + 4; 5: PCR product of primers 1 + 7; 6: recombinant plasmid of sCD40IZ cut with *Nde* I + *Bam* H I; 7: pET-3c cut with *Nde* I + *Bam* H I.

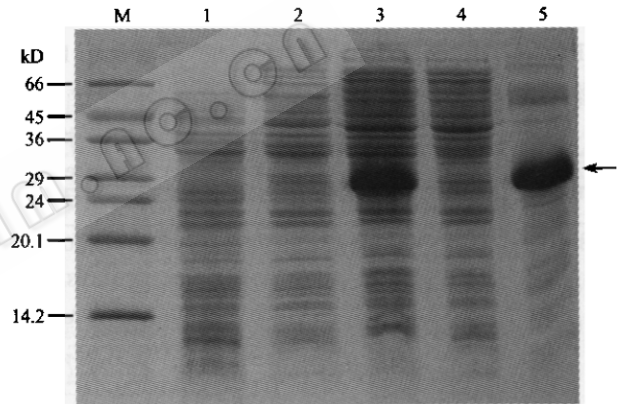


图3 重组sCD40IZ的SDS-PAGE分析结果

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of recombinant sCD40IZ
M: protein MW marker; 1: BL21 (pET-3c) + IPTG; 2: BL21 (pET/sCD40IZ) without IPTG; 3: BL21 (pET/sCD40IZ) + IPTG; 4: supernatant of BL21 (pET/sCD40IZ) + IPTG; 5: washed pellet (inclusion body) of BL21 (pET/sCD40IZ) + IPTG.

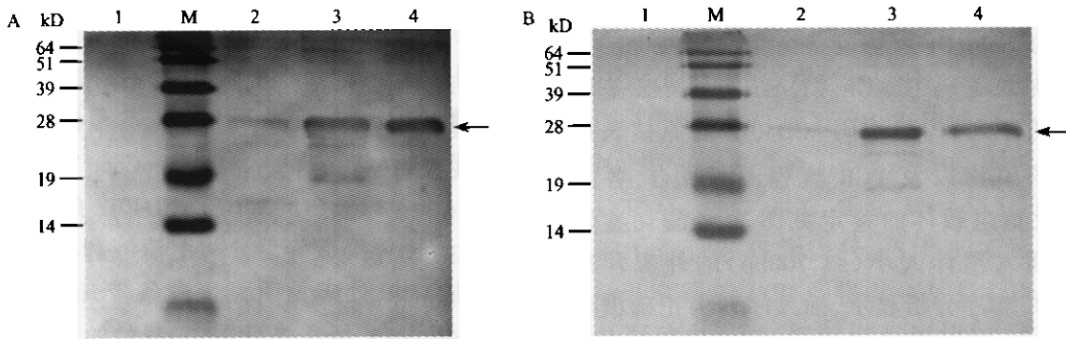


图4 重组sCD40IZ的免疫印迹分析结果

Fig. 4 Western blot analysis of recombinant sCD40IZ

(A) Immunoblotting with anti-CD40 antibody; (B) Immunoblotting with anti-His₆ antibody. M: pre-stained protein MW marker; 1: BL21 (pET-3c) + IPTG; 2: BL21 (pET/sCD40IZ) without IPTG; 3: BL21 (pET/sCD40IZ) + IPTG; 4: purified sCD40IZ.

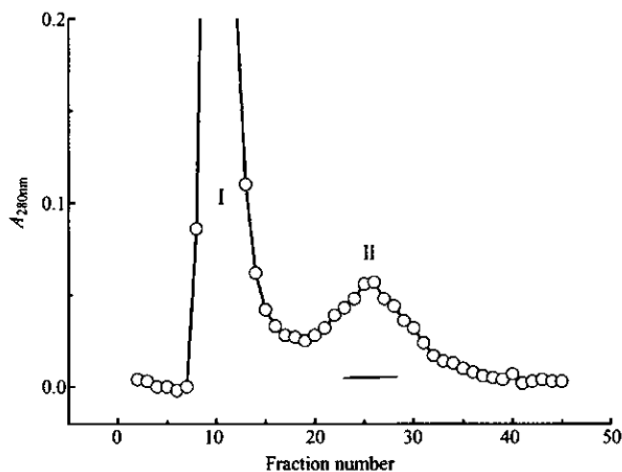


图 5 复性的 sCD40IZ 凝胶过滤洗脱图

Fig. 5 Elution profile of refolded sCD40IZ by gel filtration

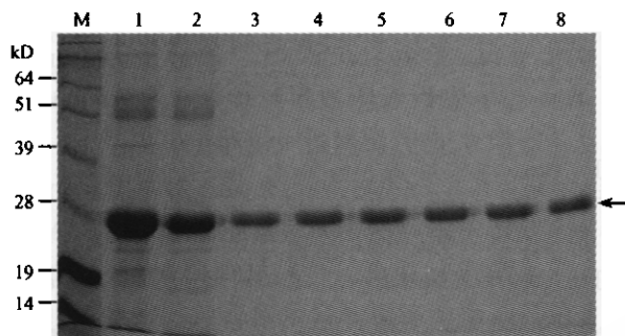


图 6 纯化的 sCD40IZ 的 SDS-PAGE 分析结果

Fig. 6 Analysis of purified sCD40IZ with SDS-PAGE

M: pre-stained protein MW marker; 1: refolded sCD40IZ; 2: fraction 11 of Fig 5 (peak I); 3-8: fractions 24-29 of Fig. 5 (peak II), respectively.

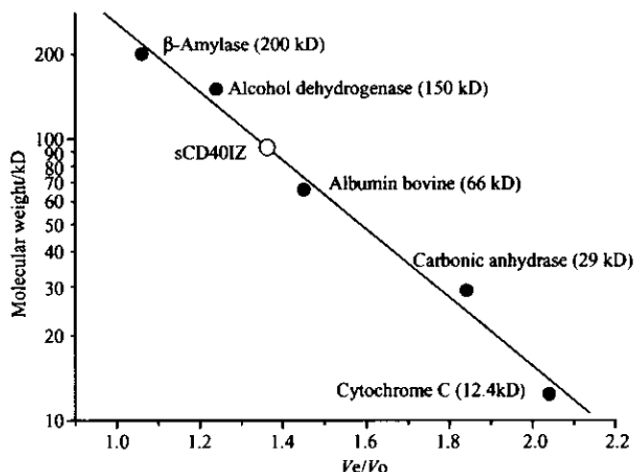


图 7 sCD40IZ 分子量凝胶过滤测定结果

Fig. 7 Determination of the molecular weight of sCD40IZ by gel filtration

2.5 sCD40IZ 的配基结合活性

利用流式细胞仪分析可溶性 sCD40IZ 与表达于 Jurkat T 细胞上的 CD40L 的结合活性。以 PE-anti-CD40L 染色显示, Jurkat T 细胞表达 CD40L 的百分率为 23.81%。以可溶性 sCD40IZ 或不含 IZ 基序的 sCD40 与 Jurkat T 细胞温育后,再以小鼠抗 His₆ 抗体和 PE 标记的兔抗小鼠 IgG 进行荧光染色,结果显示, sCD40IZ 和 sCD40 与 Jurkat T 细胞的结合百分率分别为 21.87% 和 15.25% (图 8),其相对结合活性(以平均荧光强度 MFI 表示)分别为 40.73 和 23.91,表明可溶性 sCD40IZ 与 Jurkat T 细胞上表达的 CD40L 的结合活性比 sCD40 强。

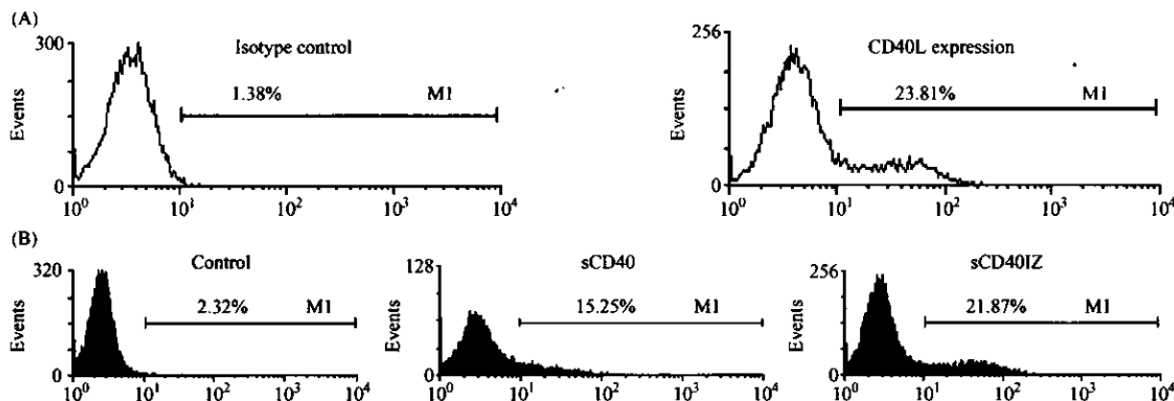


图 8 sCD40IZ 和不含 IZ 基序的可溶性 CD40 与 CD40L 结合活性

Fig. 8 Binding activity of sCD40IZ and soluble CD40 (sCD40 without IZ motif) with CD40L

(A) CD40L expression on Jurkat T cells; (B) Binding activity with CD40L.

3 讨论

TNF 超家族成员在细胞膜上能以三聚体的形式

存在,如 CD40L 无论在膜上或可溶性状态均以三聚体形式存在^[10],CD40L 的受体 CD40 与其配基结合后也能形成三聚体或多聚体^[11],因此,CD40 也具有

形成三聚体的倾向^[17]。异亮氨酸拉链 (isoleucine zipper, IZ) 是一种能在溶液中自发形成三聚体结构的基序^[12, 13], 在可溶性 CD40L 中融合 IZ 基序, 可稳定 CD40L 三聚体结构, 加强其生物活性^[18]。本研究中, 我们在可溶性 CD40 的羧基端融合表达 IZ 基序, 通过包涵体复性获得可溶性重组蛋白, SDS-PAGE 变性胶分析显示其单体分子量为 27kD, 凝胶过滤分析表明其在溶液中的分子量为 91kD。因为 CD40 胞外结构域呈长柱形, 形成三聚体后理论上仍呈长柱形, 而非标准的球状蛋白 (凝胶过滤的分子量标准蛋白均为球状蛋白), 所以三聚体在溶液中的表观分子量比从变性条件下电泳法测定单体分子量计算的值要大。因此, 该融合蛋白在溶液中最有可能以三聚体的形式存在。与之相反, 没有融合 IZ 基序的 CD40 分子在溶液中的分子量为 32kD^[15], 考虑其以 SDS-PAGE 测定的分子量为 23kD, 推测它不易自发形成稳定的三聚体, 而以单体形式存在。由此可见, 引入 IZ 基序促进 CD40 形成较为稳定的三聚体结构。

一般来说, 受体与配基的结合活性与其结合位点的价位有关, 即其价位数与结合活性成正比, 故通过形成多聚体形式可以加强受体与配基间的结合活性。在 CD40L^[14] 和 FasL^[18] 上的研究已经证明三聚化的 IZ 基序促进形成稳定的三聚体结构, 并且可显著增强其与受体的结合活性甚至生物学活性。本研究与这些研究结果一致, 即三聚化的 sCD40IZ 与其配基的结合活性显著高于 CD40 单体分子, 说明在可溶性 CD40 中引入三聚化 IZ 基序, 促进并稳定 CD40 三聚体的形成, 从而增强其配基结合活性。

综上所述, 通过将三聚化 IZ 结构域与 CD40 融合, 可以获得稳定的 CD40 三聚体, 该三聚体分子较单体分子具有更高的配基结合活性, 因而可望用于阻断 CD40-CD40L 分子间的相互作用, 在防止移植排斥反应等领域具有潜在的应用价值。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Quezada SA, Jarvinen LZ, Lind EF *et al.* CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*, 2004, **22**: 307 - 328
- [2] Xu Y, Song G. The role of CD40-CD154 interaction in cell immunoregulation. *J Biomed Sci*, 2004, **11**(4): 426 - 438
- [3] Bajorath J, Aruffo A. Construction and analysis of a detailed three-dimensional model of the ligand binding domain of the human B cell receptor CD40. *Proteins*, 1997, **27**(1): 59 - 70
- [4] Singh J, Garber E, Van Vlijmen H *et al.* The role of polar interactions in the molecular recognition of CD40L with its receptor CD40. *Protein Sci*, 1998, **7**(5): 1124 - 1135
- [5] Rossi G, Sarkar J, Scandella D. Long-term induction of immune tolerance after blockade of CD40-CD40L interaction in a mouse model of hemophilia A. *Blood*, 2001, **97**(9): 2750 - 2757
- [6] Wang X, Huang W, Mihara M *et al.* Mechanism of action of combined short-term CTLA4Ig and anti-CD40 ligand in murine systemic lupus erythematosus. *J Immunol*, 2002, **168**(4): 2046 - 2053
- [7] Homann D, Jahreis A, Wolfe T *et al.* CD40L blockade prevents autoimmune diabetes by induction of bitypic NK/DC regulatory cells. *Immunity*, 2002, **16**(3): 403 - 415
- [8] Jin YZ, Xie SS. Bicistronic adenovirus-mediated gene transfer of CTLA4Ig gene and CD40Ig gene result in indefinite survival of islet xenograft. *Transplant Proc*, 2003, **35**(8): 3165 - 3166
- [9] Liu H, Mao N, Hou C *et al.* Protective effect of human CD40-Ig fusion protein in a murine model of acute graft-versus-host disease. *Chin Med J (Engl)*, 2001, **114**(7): 685 - 689
- [10] Pietravalle F, Lecoanet-Henchoz S, Blasey H *et al.* Human native soluble CD40L is a biologically active trimer, processed inside microsomes. *J Biol Chem*, 1996, **271**(11): 5965 - 5967
- [11] Pullen SS, Labadia ME, Ingraham RH *et al.* High-affinity interactions of tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) and CD40 require TRAF trimerization and CD40 multimerization. *Biochemistry*, 1999, **38**(31): 10168 - 10177
- [12] Sorger PK, Nelson HC. Trimerization of a yeast transcriptional activator via a coiled-coil motif. *Cell*, 1989, **59**(5): 807 - 813
- [13] Harbury PB, Kim PS, Alber T. Crystal structure of an isoleucine zipper trimer. *Nature*, 1994, **371**(6492): 80 - 83
- [14] Morris AE, Remmele RL Jr, Klinke R *et al.* Incorporation of an isoleucine zipper motif enhances the biological activity of soluble CD40L (CD154). *J Biol Chem*, 1999, **274**(1): 418 - 423
- [15] He XH (何贤辉), Xu LH (徐丽慧), Liu Y (刘毅) *et al.* Purification and identification of human CD40 extracellular domain expressed in *Escherichia coli*. *Immunological Journal (免疫学杂志)*, 2006, **22**(2): (In press)
- [16] He XH (何贤辉), Xu LH (徐丽慧), Liu Y (刘毅) *et al.* Preparation and characterization of HLA-A * 0201 monomer and tetramer loaded with HCMV antigenic peptide. *Chinese Journal of Biotechnology (生物工程学报)*, 2004, **20**(3): 382 - 388
- [17] Contin C, Pitard V, Delmas Y *et al.* Potential role of soluble CD40 in the humoral immune response impairment of uraemic patients. *Immunology*, 2003, **110**(1): 131 - 140
- [18] Shiraiishi T, Suzuyama K, Okamoto H *et al.* Increased cytotoxicity of soluble Fas ligand by fusing isoleucine zipper motif. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **322**(1): 197 - 202