

HIV gp41 七肽重复区五螺旋蛋白的高效表达及对病毒融合的抑制

王久强¹, 潘煦文², 田波², 刘思当¹

1 山东农业大学动物医学院, 泰安 271018

2 中国科学院微生物研究所 分子病毒中心, 北京 100101

摘要: 人工构建的五螺旋蛋白(5-helix)能抑制人类免疫缺陷综合症病毒(HIV)介导的膜融合过程中发卡三聚体的形成, 从而抑制病毒感染靶细胞。但 5-helix 基因在原核细胞中直接表达时易形成包涵体, 复性困难, 给研究带来不便。本研究探讨了将蛋白结构模拟用于寻找合适的表达载体的方式: 通过同源建模, 模拟了 5-helix 在 pGEX-6P-1 载体及 pET44b 载体上的融合蛋白形成的最有可能的 2 种构象。通过对比发现其在 pET44b 载体中与 NusA 的融合蛋白的溶剂化能远大于其在 pGEX-6P-1 中与 GST 融合蛋白的溶剂化能, 且酶切位点位于蛋白表面。应用 PCR 将 5-helix 基因从 pGEX-6P-1-5H 克隆出来, 鉴定正确后连接到 pET44b 载体上, 构建成重组载体 pET44b-PSP-5Helix。将重组载体转化入大肠杆菌 BL21(DE3), 于不同温度诱导表达。用镍柱及 GST 柱纯化蛋白, SDS-PAGE 证实成功得到了目的蛋白。用纯化蛋白验证抑制 HIV 假病毒感染 GHOST-CXCR4 的活性。结果显示: 与 NusA 融合的 5-helix 蛋白能够实现高效的可溶表达, 且酶切容易; 纯化蛋白抑制 HIV 假病毒感染 GHOST-CXCR4 的半数抑制浓度为(22.77±5.64) nmol/L, 为进一步探讨其在 HIV-1 病毒感染中的应用奠定了基础。

关键词: HIV-1 融合抑制物, 七肽重复区, 同源建模

High level expression of 5-helix protein in HIV gp41 heptad repeat regions and its virus fusion-inhibiting activity

Jiuqiang Wang¹, Xuwen Pan², Po Tien², and Sidang Liu¹

1 Veterinary Academy of Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

2 Center for Molecular Virology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: The artificial 5-helix can inhibit the formation of trimer-of-hairpins structure during the course of HIV-directed membrane fusion and then inhibit human immunodeficiency virus (HIV) infecting target cells. But 5-helix was apt to form inclusion body when expressed directly in prokaryotic cell and was difficult to renature, which causes inconvenience to future study. We found a proper expression vector by simulating protein structure. We simulated its proper conformation in two vectors pGEX-6P-1 and pET44b by homology modeling. The contrast of conformations showed that the energy of salvation of its fusion protein with NusA in vector pET44b was higher than its fusion protein with glutathione-S-transferase (GST) in pGEX-6P-1 and its restriction site lay on the surface of its fusion protein in vector pET44b. 5-helix gene was amplified from pGEX-6P-1-5H by PCR, and was ligated to pET44b to construct recombinant vector pET44b-PSP-5Helix after tested correctly by enzymes digestion. The recombinant vector

Received: October 27, 2008; **Accepted:** December 31, 2008

Corresponding author: Po Tien. Tel: +86-10-64807420; E-mail: tienpo@sun.im.ac.cn

Sidang Liu. Tel: +86-538-8249526; E-mail: liusid@sdau.edu.cn

was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) to express 5-helix protein at different temperatures. Aim protein was purified with Ni column and GST column, and was determined by SDS-PAGE. Then the purified 5-Helix was used to test the inhibitive activity of pseudo HIV virus infecting GHOST-CXCR4. Results show that its fusion protein with NusA can be effectively soluble expressed and easier to be cleaved, and that the purified 5-helix can efficiently inhibit pseudo HIV virus infecting GHOST-CXCR4 and its IC50 value is (22.77 ± 5.64) nmol/L, which lay the foundation to further discuss the application in HIV-1 infection.

Keywords: HIV-1 fusion inhibitors, heptad-repeat regions, homology modeling

人类免疫缺陷病毒 I 型(HIV-1)侵入靶细胞时由囊膜糖蛋白介导完成一个膜融合过程^[1]。在这个过程中,囊膜糖蛋白的表面亚单位 gp120 实现识别及与受体吸附,而跨膜亚单位 gp41 主要介导病毒囊膜和细胞膜的融合。在 gp41 上的 2 个七肽重复序列(HR1 和 HR2)在这一过程中发挥着重要的作用。当 HIV-1 侵染靶细胞时, gp41 的构象发生一系列不可逆的变化^[2],最终形成一种发卡三聚体(或称六螺旋束)的结构,即 3 个 HR2 螺旋以反向平行的方式附着到 3 个 HR1 螺旋聚合形成的中心三聚体的沟槽中^[3,4]。推测在膜融合发生前存在一个 HR1 和 HR2 区暴露但未形成最终的发卡结构的发卡前体中间态^[5]。在中间态时,HR1 和 HR2 区能结合外源加入的 HR1、HR2 或类似多肽,这就使得处在发卡前体中间态的 gp41 本身的 HR1 和 HR2 之间不能发生相互作用,从而导致 gp41 最终不能转变成发卡三聚体的结构,即抑制了膜融合^[6,7]。

将 HR1 与 HR2 通过连接肽的方法构建成的不同重组蛋白,均具有一定的抗 HIV 膜融合的特性。其中有 IZN 系列 HR1 结构,其具有可溶性,半数抑制浓度为 10 nmol/L^[8]; 5-Helix 为包涵体表达,复性后测得的半数抑制浓度为 13 nmol/L^[9]; 当它加上 3myc 后,半数抑制浓度为 46 nmol/L(羧基端)或 111 nmol/L(氨基端)^[10]; 通过二硫键强化方式构建的 NCCG-gp41,是以可溶的方式表达 HR1 结构,其半数抑制浓度为 16 nmol/L^[11]; 另外,本实验室于 2004 年构建的三螺旋 HR121 和 HR212 蛋白也都具有抑制 HIV-1 侵染细胞的活性,半数抑制浓度分别为 (16.2 ± 2.8) nmol/L 和 (2.8 ± 0.63) nmol/L^[12]。

在这些结构中,已经上市的药物是 HR2 的类似物 T-20,而五螺旋结构(以下简称 5-Helix)理论上只存在一个特异的 HR2 结合沟,而且这个疏水的沟对多种不同变异类型的 HIV 株均具有较高的抑制膜融合的能力,因为在研究膜融合机理及作为广谱抑制 HIV 入侵药物方面有特殊的意义^[13]。

本实验通过结构模拟方式,试行了以 NusA 为融合蛋白的表达方式,不仅表达量上升,而且对于表达要求的条件也得以大幅放宽。测得的半数抑制浓度在 (22.77 ± 5.64) nmol/L 浓度范围内。

1 材料和方法

1.1 质粒与菌株

pGEX-6p-1_5H 质粒由中国科学院微生物研究所分子病毒室构建; pET44-His-tag 来自 Merck 公司; pNL43LucE-R 由中国科学院生物物理研究所的唐宏研究员惠赠; pMT3-HXB-2 由中国科学院微生物研究所高福研究员惠赠; GHOST-CXCR4 细胞由武汉大学王利老师惠赠; 大肠杆菌 DH5 α 及 BL21(DE3)均为本实验室保存。GST 融合的鼻病毒 3C 蛋白酶(以下简称 GST-3C,与 Pre ScissionTM 蛋白酶识别相同的氨基酸序列)由 K. Hudson 和 J. Heath 博士惠赠。

1.2 5-Helix 表达载体的选择及酶切位点的设计

首先采用同源建模法,运用 Ds Modeling 1.1 模拟了 5-Helix 的可能构象。选用的模式蛋白是 HIV 膜融合时形成的六螺旋结构。其参数如下:

1df5.pdb 2.70 Å R-value 0.183

1szt.pdb 2.40 Å R-value 0.208

1AIK.pdb 2.00 Å R-value 0.238

1k33.pdb 1.75 Å R-value 0.206

得到初步模型,初步模型在显溶液模式下,通过最下降法分子力学化 500 步,牛顿法至 4000 步,再缓慢加热至 300 K,平衡 100 ns, NVT 方式模拟 150 ms,每 10 ms 记录一次数据,最终结构选用均方根偏差(RMSD)小于 0.4 的数据。

同样,由于 pET44 上的 NusA 结构也是未知的,需要通过计算机模拟方式来预测它的结构。与 5-Helix 相比,该蛋白需要将蛋白分子对接与同源建模相结合的方式模拟它的结构。选用的建模蛋白为:

1hh2 2.10 Å R-value 0.244

Issc 2.00 A R-value 0.166

lwcl (NMR)

lwcn (NMR)

建模方法与 5-Helix 类似。

同样用 1b8x_A(2.70 A R-value 0.209)和 1bg5 (2.60 A R-value 0.193)为建模蛋白模拟了 pGEX-6P-1 上的 GST 融合蛋白的结构。

将模拟出的载体上的融合蛋白与模拟的 5-Helix 结构依 D-Dock 程序计算出可能的结合方式后,再用 Ds Modeling1.1 的大分子间构象结合模拟及自由能计算程序来筛选可能的二者结合方式。

通过调整表达的目的蛋白与载体的融合蛋白间的连接肽的序列来选择合适的酶切位点,再用分子动力学模拟确定该区域是否适宜于成为酶切位点。

1.3 5-Helix 基因的克隆

按照结构模拟的结果,利用上游引物 P1: 5'-GTCCCCCGGGGCAGCAACGGTGGTGGCGACC ATCC-3'和下游引物 P2: 5'-ACACCCGCCAACCCC GCTGAC-3' (分别带有 *Sma* I 与 *Xho* I 位点)从已构建的 pGEX-6P-1-5H 克隆目的基因 5-Helix, 将 PCR 产物加 A 后与 pMD18-T 载体相连。通过蓝白斑筛出白色菌落,提取质粒, *Sma* I 与 *Xho* I 双酶切鉴定测序。

将 pET44b 同样用 *Sma* I 和 *Xho* I 双酶切后,与目的片段连接,在这个过程中, PSP 酶切位点也转移到了 pET44b 上,重组质粒命名为 pET44b-PSP-5Helix(图 1)。转化大肠杆菌 JM109, 挑选单菌落接种液体培养基,提取质粒用 *Sma* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定。

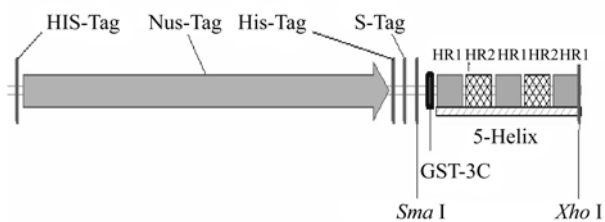


图 1 构建的表达质粒上与融合蛋白相关部分的序列简图
Fig. 1 The sketch of part of fusion protein in constructed expressive plasmid.

1.4 5-Helix 蛋白的融合表达

将 pET44b-5H 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 挑取单菌落于 LB 液体培养基中过夜培养,按 1/100 接种量转接于 2×YT 培养基并振荡培养至 OD_{600} 为 0.8~1.0 左右,加 IPTG(终浓度 1 mmol/L)于 20°C 或 25°C

诱导 4 h, 收集菌体, 超声破碎后加入 TritonX-100 至终浓度 1%, 12 000 r/min 离心取上清; 将上清过 Ni 柱后, 先用 TBS(pH 6.0)洗柱, 然后分别用 20 mmol/L 和 100 mmol/L 咪唑洗脱蛋白。蛋白浓缩后, 用酶切缓冲液再次清洗, 然后用过量的 GST-3C 蛋白酶 5°C 酶切(2~16 h), 过 Ni 柱, TBS 洗柱, 再用 20 mmol/L 咪唑洗下目标蛋白。

纯化所得的蛋白使用 12% SDS-PAGE 分离鉴定, 用 Bio-Rad DC 蛋白试剂确定浓度。

1.5 5-Helix 的细胞融合抑制试验

参照文献[17]制备 HIV-1 假病毒。转染前 24 h, 消化 293T 细胞并传至 10 cm 皿中, 浓度为 $4 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ /皿。24 h 后, 细胞密度约为 80% 时用磷酸钙法将 pNL43LucE-R 和 pMT3-HXB-2 两个质粒共转染 293T 细胞。转染 48 h 后, 细胞长满变圆, 离心 (3000 r/min×10 min) 收获含 HIV-1 假病毒的上清液。接假病毒前 24 h, 消化 GHOST-CXCR4 细胞并转至 24 孔板中, 细胞浓度为 8×10^4 /孔。将纯化的 5-Helix 蛋白过滤除菌并作 5 倍梯度稀释, 每个稀释度分别和等体积的 HIV-1 假病毒混合; 然后将这种病毒蛋白混合物接种到 GHOST-CXCR4 细胞中, 待病毒吸附细胞 2 h 后, 吸弃病毒和蛋白的混合物, 加入新鲜培养基继续培养, 每个稀释度做 2 个重复, 48~72 h 后收获并裂解细胞, 测定细胞上清中萤火虫荧光酶的活性。根据 Langmuir 函数[标准化荧光酶活性 = $1/(1 + C/IC_{50})$]计算的半数抑制浓度 (IC_{50}), 其中 C 表示蛋白的浓度。

2 结果

2.1 5-Helix 表达载体的选择及酶切位点的设计

将模拟出的 5-Helix(图 2)与建模的六螺旋相比可以看出, 5-Helix(HR1-HR2-HR1 -HR2-HR1)由原来六螺旋对称结构变为一个近似的对称结构, 其中的 HR1 位于中间, 另 4 个螺旋围绕 HR1 形成一个环形桶。预期的 2 个 HR1 形成的沟是存在的, 但角度更加扭曲, 沟的宽度变窄, 其中重要的疏水氨基酸残基内折, 使表面更亲水, 但与 HR2 的亲合力下降(结合自由能由 -227 kcal/mol 降为 -181 kcal/mol)。虽然如此, 5-Helix 总体上亲水性仍不高, 总的溶剂化自由能为 -1641.03 kcal/mol (共 190 个氨基酸)。因此, 借助于载体使新表达的蛋白分隔来降低 2 种螺旋间

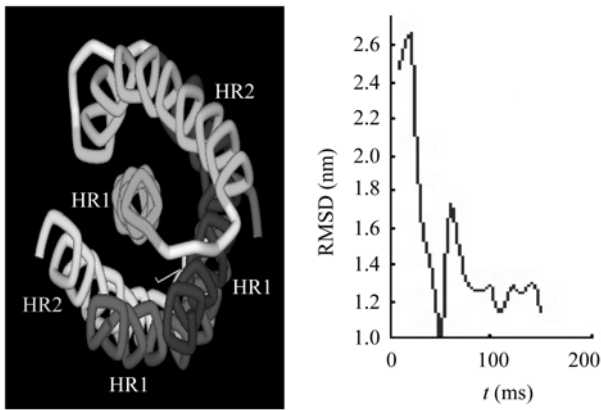


图2 模拟的5-Helix结构(左)及MD时RMSD变化图(右)
Fig. 2 Simulated structure of 5-Helix (left) and RMSD change during MD (right).

不正确的结合,同时增加整个蛋白的亲水性,对于可溶性表达就非常重要。

用类似的方法模拟出 NusA 和 GST 融合蛋白后,通过蛋白对接程序筛选与 5-Helix 的最佳结合方式。已模拟出的数据显示, NusA 结合方式上有一个比较易于与 5-Helix 结合的方式(图 3),其结合自由能为 -147 kcal/mol。同时,这种结合方式产生的新蛋白溶剂化能高达 -7745.98 kcal/mol(末端 549 个氨基酸的数值),远高于 GST 方式的 -4400 kcal/mol(全部 424 个氨基酸的数值)。因此用 NusA 表达时,融合蛋白的可溶性会高于用 GST 融合方式。

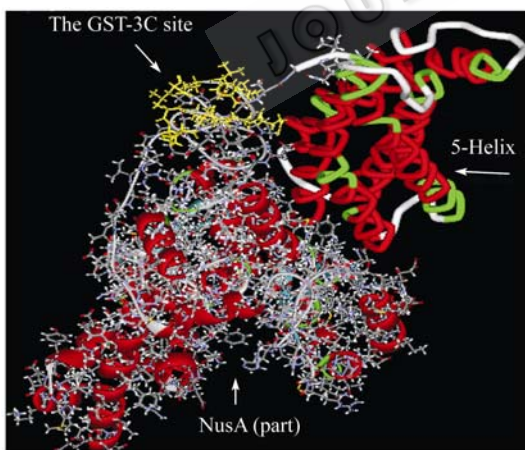


图3 5-Helix 与 NusA 的对接
Fig. 3 Dock site for 5-helix with NusA.

由于 GST-3C 蛋白酶在分离纯化时通过 GST 柱容易去除,并且成本较低。因此,在 NusA 融合表达载体 pET44b 上引入了该酶的位点。在模拟的猜测构象上,这个酶切位点突出在蛋白表面,而 GST 的酶

切位点恰好位于一个沟中,因而预期 NusA 融合蛋白酶切要容易一些(图 4)。后续的酶切实验也证实了这一点,完全酶切的时间也只需 2 h,而 GST 融合表达要过夜才能彻底酶切。

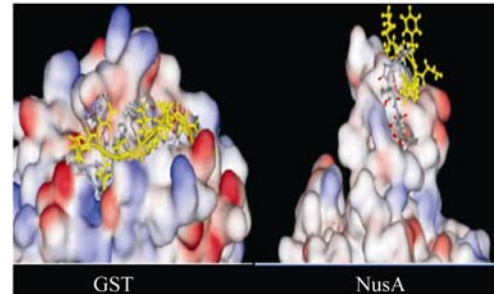


图4 模拟的 GST 及 NusA 的 GST-3C 酶切位点构象
Fig. 4 Site conformation of GST and NusA for GST-3C's recognition (AA sequence LEVLFQGP lies on the surface of NusA structure but in the channel of GST structure).

2.2 5-Helix 蛋白在大肠杆菌中高度可溶性表达

将重组质粒 pET66b-PSP-5Helix 转入大肠杆菌 BL21(DE3)后,首先进行了表达温度的探讨。无论在 20°C 或者 25°C 诱导时,表达的融合蛋白绝大部分存在于上清中,而在 81 kD 左右沉淀中看不到与上清中类似的条带,这与预期的融合蛋白可溶性高相一致(图 5)。

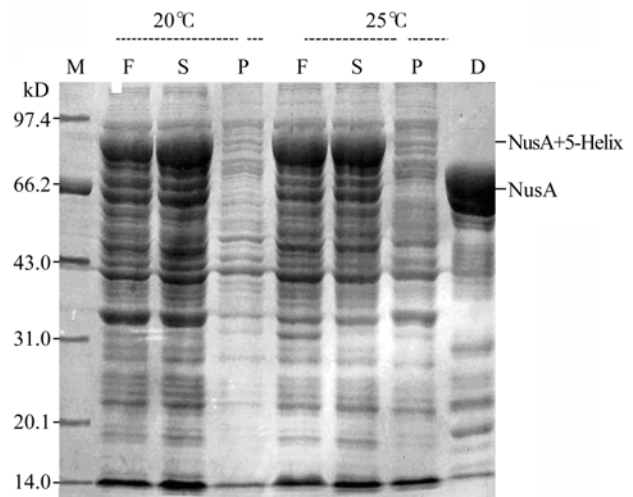


图5 不同诱导温度下 5-Helix 蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3)中的表达

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of 5-Helix expression in *E. coli* BL21(DE3) carrying pET44b-5Helix vectors at different induction temperature. M+BSA: protein marker (Medium, and Add part of BSA). Left team shows the culture was induced at 20°C and lane F was full cell lysate, lane S was supernatant and lane P was precipitation. Right team shows the culture was induced at 25°C ; D: NusA-5helix has been cleavage by GST-3C.

pET44 上的 NusA 融合表达时, 它上面带有 2 个六组氨酸标签, 结构模拟显示这 2 个区的组氨酸标签均位于融合蛋白表面, 适宜于 Ni 柱纯化。从图上看, 100 mmol/L 咪唑的洗脱物带有较多的杂蛋白, 但由于 5-Helix 表面有 5 个比较靠近的组氨酸, 因而柱下酶切产物再次上 Ni 柱去除 NusA 时, 先用 TBS 除去可能被切下的杂蛋白后, 再用 20 mmol/L 咪唑可以将 5-Helix 洗脱下来, 最后再过一次 GST 柱除去 GST-3C 酶, 产物经 SDS-PAGE 电泳检测其分子量与预测的相符(为 22.2 kD)(图 6)。在用摇瓶培养条件下, 每升菌液可得约 12 mg 以上该种终产物。

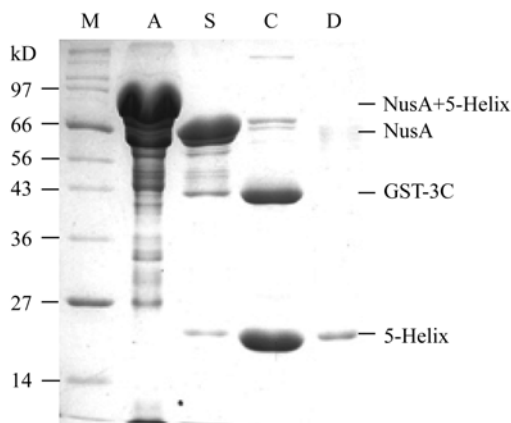


图 6 5-Helix 蛋白的酶切和纯化

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of 5-Helix cleavage and purifying. M: protein marker; A: the elution of 100 mmol/L imidazole buffer; B: products after digested by GST-3C; C: the elution of digested product (purified by His Bind Columns); D: the final 5-Helix.

2.3 5-Helix 能够抑制 HIV-1 囊膜蛋白介导的病毒和细胞的融合

pNL43LucE-R 带有 HIV-1 的突变基因组, 该基因组中囊膜蛋白基因(Env)的密码子框发生了移码, 同时用萤火虫荧光酶的基因 *Luc* 代替 HIV-1 基因组中的 *nef* 基因; 而 pMT3-HXB-2 中带有 HIV 的 HxB 株的 *Env* 基因, 当两者共转染 293T 细胞后成功包装成 HIV 假病毒。分离的 HIV 假病毒如果能够通过膜融合过程并侵染 GHOST-CXCR4 细胞, 则可通过假病毒的 *Luc* 表达情况判断是否发生了膜融合, 因此荧光强度与融合能力呈正比关系。

经过 3 次细胞融合实验, 测得 5-Helix 蛋白抑制 HIV-1 假病毒侵染靶细胞的抑制曲线趋势相似, 均呈近倒 S 形曲线。随 5-Helix 蛋白的浓度增加, 标准化的荧光素酶活性快速下降区在相对值的 30%~70%

之间, 而对应的 5-Helix 蛋白浓度在 10 nmol/L 至 100 nmol/L 之间, 取典型值按 Langmuir 函数计算的半数抑制浓度为 (22.77 ± 5.64) nmol/L, 对照 GST 则不具有这种融合抑制活性(图 7)。

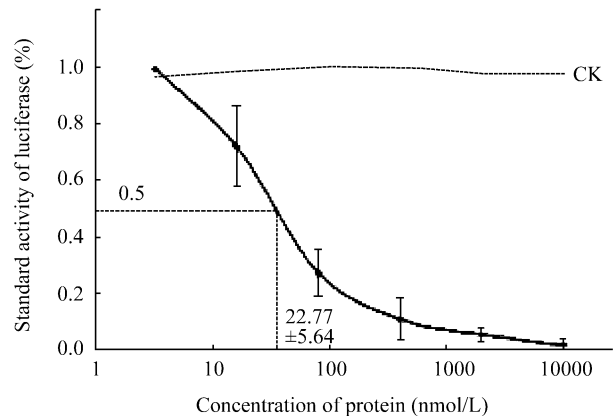


图 7 5-Helix 融合抑制活性的测定

Fig. 7 Inhibition of viral infectivity by 5-Helix as determined by an HIV-1 luciferase assay. The data represents the mean of three separate experiments. The approximate IC_{50} value of 5-Helix is (22 ± 5.64) nmol/L.

3 讨论

与稳定的六螺旋束结构相比, 5-Helix 少了一个 HR2 螺旋, 这种结构使得 5-Helix 能够特异性地结合一个 HR2 多肽, 并且结合位点范围广, 因此, 5-Helix 是一种高效广谱的抗 HIV-1 的蛋白抑制物, 其半数抑制浓度在纳摩尔水平。然而, 5-Helix 在大肠杆菌中是以包涵体的形式表达^[9], 正确复性这些能相互作用的多螺旋蛋白, 比可溶性表达要复杂, 产率也低。

本研究曾探讨了用 pET-DB、pTYB11 和 pEGX-6p-1 三种载体表达 5-Helix 的效果。其中使用 pET-DB 表达的蛋白呈不溶形式, 改变诱导表达条件没有明显作用; 用 pTYB11 的表达是可溶的, 但量低于 1 mg/L; 用 pGEX-6p-1 表达的蛋白可溶, 每升培养物可得 5 mg 以上纯度大于 90% 的 5-Helix。但诱导温度, 时间必须严格掌握, 否则每升培养基蛋白纯化量会低于 1 mg, 且酶切时间长, 纯化的成本也高。通过结构模拟选择 pET-44 载体, 以 NusA 融合形式表达时, 诱导条件较宽、重复性高、酶切容易、纯化成本低。虽然该方式的表达量高, 但是用 Ni 纯化时损失多, 加上纯化中杂蛋白类型多及 NusA 分子量的影响, 纯化中处理的蛋白量大, 工作量因而

加大。后来改用柱上直接酶切的方法时,纯化过程简化,但收率不稳定。由于该蛋白带有大量的负电荷(pH 7.0 时有 46 个有效净负电荷),大批量生产时用离子柱可以非常方便地分离出融合蛋白,因而仍然具有改进纯化方法并进一步提高产率的潜力。

经测定 HIV 假病毒入侵半数抑制浓度为 (22.77 ± 5.64) nmol/L, 介于 Michael 与 Takumi 测定的数据之间,但处于纳摩尔范围内,且该蛋白半数抑制浓度与 T-20 对常见病毒株的半数抑制浓度相近。本试验虽证实了 5-Helix 对假病毒的抑制能力,对于实际 HIV 感染的作用,还有待进一步探讨。

REFERENCES

- [1] Freed EO, Martin MA. The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection. *J Biol Chem*, 1995, **270** (41): 23883–23886.
- [2] Eckert DM, Kim PS. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem*, 2001, **70**: 777–810.
- [3] Lu M, Kim PS. A trimeric structural subdomain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *J Biomol Struct Dyn*, 1997, **15** (3): 465–471.
- [4] Weissenhorn W, Dessen A, Harrison SC, *et al.* Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature*, 1997, **387**(6631): 426–430.
- [5] Kliger Y, Shai Y. Inhibition of HIV-1 entry before gp41 folds into its fusion-active conformation. *J Mol Biol*, 2000, **295** (2000): 163–168.
- [6] Jiang SB, Lin K, Strick N, *et al.* HIV-1 inhibition by a peptide. *Nature*, 1993, **365** (6442): 113.
- [7] Wild CT, Shugars DC, Greenwell TK, *et al.* Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (21): 9770–9774.
- [8] Eckert DM, Kim PS. Design of potent inhibitors of HIV-1 entry from the gp41 N-peptide region. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (20): 11187–11192.
- [9] Root MJ, Kay MS, Kim PS. Protein design of an HIV-1 entry inhibitor. *Science*, 2001, **291** (5505): 884–888.
- [10] Koshiba T, Chan DC. The Prefusion intermediate of HIV-1 gp41 contains exposed c-peptide regions. *J Biol Chem*, 2003, **278**(9): 7573–7579.
- [11] Louis JM, Bewley CA, Clore GM. Design and properties of N(CCG)-gp41, a chimeric gp41 molecule with nanomolar HIV fusion inhibitory activity. *J Biol Chem*, 2001, **276**(31): 29485–29489.
- [12] Ni L, Gao GF, Tien P. Rational design of highly potent HIV-1 fusion inhibitory proteins: Implication for developing antiviral therapeutics. *Biochem Biophys Commun*, 2005, **332**(3): 831–836.
- [13] Greenberg M, Cammack N, Salgo M, *et al.* HIV fusion and its inhibition in antiretroviral therapy. *Rev Med Viro*, 2004, **14**(5): 321–337.
- [14] Berman HM, Westbrook J, Feng Z, *et al.* The protein data bank. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28**(1): 235–242.
- [15] Blundell TL, Sibanda BL, Sternberg MJE. Knowledge-based prediction of protein structures and the design of novel molecules. *Nature*, 1987, **326**(6111): 347–349.
- [16] Bowie J, Luthy R, Eisenberg DA. Method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science*, 1991, **253**(5016): 164–170.
- [17] Deng HK, Unutmaz D, KewalRamani VN, *et al.* Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature*, 1997, **388** (6639): 296–300.