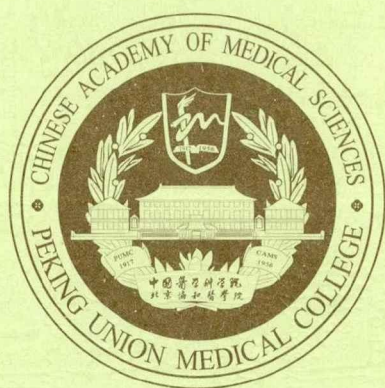


北京協和醫學院
中國醫學科學院

碩士研究生學位論文



北京協和醫學院研究生院

学校代码: 10023
学 号: S2012009016

硕士学位论文

抗肿瘤药物靶蛋白: DUSP26 和 Tks4 的结构与 反应机制的研究

所 院: 北京协和医学院药用植物研究所

姓 名: 黄钰馨

指导教师: 谢勇 副研究员

导师小组: 蔡大勇 研究员, 王晓英 副研究员

专 业: 生药学

研究方向: 生物化学

完成日期: 2015 年 5 月

中英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文名称
<i>Amp</i>	Ampicillin	氨苄青霉素
ATC	Anaplastic thyroid cancer	未分化型甲状腺癌
bp	Base pair	碱基对
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
CADD	Computer aided drug design	计算机辅助药物设计
cDNA	Complementary DNA	互补 DNA
ddH ₂ O	Double distilled water	双蒸水
dNTPs	Deoxyribonucleoside triphosphates	脱氧核糖核苷三磷酸
DUSP	Dual-specificity phosphatase	二重特异性去磷酸酶
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	乙二胺四乙酸
FTC	Follicular thyroid carcinoma	滤泡状腺癌
Gln	Glutamine	谷氨酰胺
Gly	Glycine	甘氨酸
GST	Glutathione S-transferase	谷胱甘肽 S 移换酶
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactoside	异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷
Kb	Kilobase pairs	千碱基对
kDa	Kilodalton	千道尔顿
Leu	Leucine	亮氨酸
MAPK p38	Mitogen-activated Protein Kinase p38	分裂原激活的蛋白激酶 p38
MES	2-Morpholinoethanesulfonic Acid	2-(N-吗啉)-乙基磺酸
MNPDB	Microbial Natural Products Database	微生物天然产物数据库
MTC	Medullary thyroid carcinoma	髓样癌
OD	Optical Density	光密度
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
P-NPP	4-Nitrophenyl phosphate	4-硝基苯磷酸二钠
PTC	Papillary thyroid carcinoma	乳头状腺癌
PTKs	Protein tyrosine kinase	蛋白酪氨酸激酶
PTPs	Protein tyrosine phosphatase	蛋白酪氨酸磷酸酶
Arg	Arginine	精氨酸
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
TEMED	N,N,N,N-teramethyl ethylene diamine	N,N,N,N-四甲基乙二胺
Tris	Hydroxymethyl aminomethane	三羟甲基氨基甲烷

计量单位表

A	Absorbance	吸光度
K	Kalven	绝对温度
μM	micromole/liter	微摩尔/升
L	Liter	升
min	Minute	分钟
mL	Milliliter	毫升
mM	millimole/liter	毫摩尔/升
rpm	revolutions per minute	转/分
μL	Microliter	微升

目录

摘要.....	I
Abstract.....	II
第一篇二重特异性去磷酸化酶结构与反应机制研究.....	3
第一章文献综述.....	3
1.1 计算机辅助药物筛选简介.....	3
1.2 Dual-specificity phosphatase 26(DUSP26)的研究现状.....	4
1.3 本研究的目的是和意义.....	9
第二章 DUSP26 的药物作用靶位研究.....	10
第一节 DUSP26 及截断体表达质粒的构建.....	12
1.1 材料与试剂.....	12
1.2 实验方法.....	12
1.3 实验结果与讨论.....	20
第二节蛋白的表达与纯化.....	21
2.1 材料与试剂.....	21
2.2 实验方法.....	21
2.3 实验结果与讨论.....	24
第三节 DUSP26 酶动力学研究.....	26
3.1 材料与试剂.....	26
3.2 实验方法.....	26
3.3 实验结果与讨论.....	28
第三章计算机辅助药物筛选和小分子抑制活性验证.....	33
第一节 DUSP26 抑制剂药效团模型的建立及虚拟筛选.....	33
1.1 材料与方法.....	33
2.2 结果与讨论.....	34
第二节候选化合物生物活性测试研究.....	39
2.1 实验材料.....	39
2.2 实验方法.....	39
2.3 结果与讨论.....	41
第一篇研究结果.....	46
参考文献.....	47
第二篇人体内 Tks4 蛋白质的 C 端 SH3 结构域初期蛋白质晶体学研究.....	49
第一章文献综述.....	49
第二章 SH3 结构域的表达、纯化、晶体化与 X 射线衍射数据收集.....	50
2.1 蛋白表达与纯化.....	50
2.2 蛋白质晶体的制备与 X 射线衍射数据的收集.....	51
2.3 结果与讨论.....	52
参考文献.....	54
附录.....	56
致谢.....	58
作者简介.....	59

摘要

解析抗肿瘤药物作用靶蛋白的结构和功能的相互关系是开展抗肿瘤新药的筛选的前提。本项研究中开展了人体内的两个抗肿瘤药物靶点蛋白质：二重特异性去磷酸化酶 26(Dual-specificity phosphatase 26, 简称 DUSP26)和 Tks4 的结构与功能研究。在本论文中, 第一篇报道 DUSP26 的反应机制研究和利用计算机辅助药物筛选的 DUSP26 小分子抑制剂发现研究的结果, 第二篇报道 Tks4 的 C-端 Src homology 3 (SH3)结构域的晶体学研究结果。

DUSP26 是近期确定的抗甲状腺未分化癌等肿瘤药物作用的新靶标。作者的导师已经成功测定了 DUSP26 的催化结构域的晶体结构, 但 DUSP26 的反应机理尚不明确。为了获得靶向 DUSP26 的抗肿瘤新药的先导化合物, 本项研究首先利用对硝基苯磷酸为底物的酶促动力学开展 DUSP26 反应机制研究, 从研究结果中获得可作为药物作用靶位后, 利用计算机辅助设计技术构建了用于分子对接筛选的药效团模型, 而后利用分子对接法从中国医学科学院/北京协和医学院医药生物技术研究所微生物来源天然化合物库和百灵威公司化合物库实施虚拟筛选, 获得了 232 种候选化合物。以对硝基苯磷酸为底物, 验证这些候选化合物的对 DUSP26 的抑制活性, 从中发现了 8 种化合物具有抑制活性, 其中的化合物 2-hydroxy-4-{6-[(5Z)-5-[(4-methylphenyl)methylidene]-4-oxo-2-sulfanylidene-1,3-thiazolidin-3-yl]hexanamido}benzoic acid 的抑制活性高于已知唯一的 DUSP26 的抑制剂 NSC-87877。研究结果证明了本人推测的 DUSP26 反应机制的准确性, 化合物可以作为靶向 DUSP26 的抗肿瘤药物先导化合物开展进一步的研究。

人体内的抗肿瘤药物靶蛋白 Tks4 的空间结构尚不明确, 为了解析它的结构和功能的相互关系, 开展了 Tks4 的 C 端 SH3 结构域的晶体学研究。迄今为止, 完成了这个结构域的大肠杆菌原核表达、纯化、结晶化和 X 射线衍射数据的测定, 获得了 Tks4 的 C 端 SH3 结构域晶体的结晶学参数。为了获得晶体结构, 利用同晶置换法的晶体结构研究正在开展。

关键词: 二重特异性去磷酸化酶 26; 反应机理; 计算机辅助药物筛选; 人体内 Tks4 的 C 端 Src homology 3 (SH3) 结构域; 晶体学研究

Abstract

Investigating the relationship between structure and function of anti-tumor target protein is the necessary step in the screening novel anti-tumor drugs process. In this study, structural and functional assay of two anti-tumor target proteins from human, dual-specificity phosphatase 26 (DUSP26) and Tks 4 had been carried out. In this paper, investigation of reaction mechanism using the enzyme kinetic assay and inhibitors identification of DUSP26 using computer aided drug screening method were reported in part I. Results of preliminary crystallographical studies of the C-terminal of Src homology 3 (SH3) domain of human Tks4 were reported in part II.

DUSP26 is a new anti-tumor target protein found in anaplastic thyroid cancer (ATC) *et al.* tumor tissues. The crystal structure of catalytic domain of DUSP26 had been determined successfully. The reaction mechanism of DUSP26 has not been determined. To identify the novel anti-tumor drugs, we investigated the reaction mechanism detail of DUSP26 using enzyme kinetics assay with the *p*-nitrobenzene phosphate (*p*-NPP) as the substrate. Based on results of the enzyme kinetics assay, a hypothetical reaction mechanism and a drug binding site in the DUSP26 molecule had been identified. Then the pharmacophore model had been designed and inhibitor candidates of DUSP26 identification from the microbial natural products database in institute of medicinal biotechnology, Chinese academy of medical science & Peking union medical college and the compounds database in J & K corporation had been carried out using virtual screening. 232 compounds had been identified as the inhibitor candidates. The inhibitory activity of these inhibitor candidates was judged using enzyme kinetic assay with *p*-NPP as the substrate. 8 compounds show inhibitory activity. The inhibitory activity of 2-hydroxy-4-{6-[(5Z)-5-[(4-methylphenyl)methylidene]-4-oxo-2-sulfanylidene-1,3-thiazolidin-3-yl]hexanamido} benzoic acid is stronger than the compound NSC-87877, which is only known inhibitor of DUSP26. These results suggest that the hypothetical reaction mechanism is real reaction mechanism of DUSP26. The compound may be as a anti-tumor drug candidate targeting DUSP26.

The three-dimensional structure of human Tks4, which is a known anti-tumor drug target protein, has not been determined. To understand the relationship between the structure and function, crystallographical studies of C-terminal SH3 domain of human Tks4 had been carried out in this study. So far, the C-terminal SH3 domain of human Tks4 was expressed in *Escherichia coli*, purified, crystallized and X-ray diffraction data were collected. The crystal parameters had been determined. To solve the crystal structure, the isomorphous replacement method is being utilized.

Key words: Dual-specificity phosphatase 26 (DUSP26); Reaction mechanism; Computer aided drug screening; C-terminal Src homology 3 (SH3) domain of human Tks 4; Crystallographic studies

第一篇 二重特异性去磷酸化酶结构与反应机制研究

第一章 文献综述

1.1 计算机辅助药物筛选技术简介

新药的研发至今仍然是一件耗费巨大且效率低下的工作，具有高投入、高风险、高收益的缺点，造成这种状况的一个重要原因是新药的发现还缺乏成熟的理论依据，新药的研制主要依赖反复试验^[1]。新药从发现到临床应用必经的研究流程是：靶分子的确定和选择；靶分子的优化；先导化合物的发现；先导化合物的优化；工业化制备及工艺研究；临床试验(共 IV 期)。其中最为核心的是“先导化合物的发现”，它是一个随机的过程，耗时长，效率低^[2]。长期以来研究人员希望能够应用一种新的技术加以改进。近年来在计算机科学、信息学、结构生物学等学科的发展推动下，计算机辅助药物设计(computer aided drug design, CADD)技术逐渐完善并且在药物研发领域得到了越来越广泛的应用^[3-7]。它是以化学生物学理论为基础，通过模拟小分子药物与生物大分子受体的相互作用以及通过分析已有药物结构与活性内在关系，发现和合理设计药物先导化合物并优化其结构的方法^[8]。

计算机辅助药物设计的最初思想起源于 1894 年 E. Fischer 提出的药物作用的“锁钥原理”，即小分子药物和体内的某个靶点(大部分是蛋白质)作用，如同钥匙与锁那样，特定的钥匙(药物分子)只与特定的锁(蛋白质)作用，作用机理相当精密^[1]。基于这一原理的计算机辅助药物设计具体研究始于 20 世纪 60 年代，当时 C. Hansch 和 T. Fujita 两位研究者发现了经典的定量构效关系^[9]。到 20 世纪 80 年代中期开始，定量构效关系理论应用于创新药物先导结构的发现和优化上取得了突破性进展，逐渐成为创新药物研究的核心技术之一。

依据具体研究内容 CADD 主要为两类，即基于配体的药物设计方法和基于受体的药物设计方法^[10]。在药物设计中，一般把基于受体空间结构对配体的分子对接的数据库搜索方法称为计算机药物虚拟筛选。计算机药物虚拟筛选技术覆盖了计算机辅助药物设计的大部分领域，它利用计算机强大的计算功能，从已经建立的结构多样性丰富的化合物三维结构数据库中搜寻与靶标生物大分子活性部位或结合部位相匹配的化合物，快速地从几十到上百万个分子中，发现有苗头的化合物，进行后续的研发。由于虚拟筛选不受实验条件的限制，因此先进行虚拟筛选，然后再进行药理测试来获得先导化合物效率大于传统高通量筛选效率。有利于缩短研究周期，节约研究经费。发现药物作用靶点蛋白质并明确药物作用

靶标部位的空间结构是靶向抗肿瘤药物研究的前提条件之一,有研究表明根据计算模型的不同,通过计算机药物虚拟筛选技术发现的新的先导化合物有 1%-20% 在随后的实验中证明有效^[11]。由此可见计算机辅助药物筛选技术可以大幅度提高筛选效率,无论是在提高药物研究与开发的效率,还是在获得新结构活性化合物的速度方面,均具有十分重要应用前景^[12]。

肿瘤严重威胁着人体健康,寻找抗肿瘤新药是保障人体健康必须的研究^[13]。近年来,随着对肿瘤的多学科交叉研究的不断深入,一些肿瘤的致病机理被不断阐明,新的药物作用靶蛋白不断被发现,一部分靶蛋白的结构和功能也被解析,为发现高效、低毒、特异性强的靶向抗肿瘤新药奠定基础^[14]。对抗肿瘤药物来说,自从第一只靶向抗肿瘤用药利妥昔单抗于 1997 年上市后,全球陆续上市了超过 20 只靶向抗肿瘤用药,利妥昔单抗是中国首只上市的靶向抗肿瘤用药,罗氏于 2000 年将该产品引入中国,至 2009 年,共有 8 只国外靶向抗肿瘤药物进入中国。从 2006 年起,包括恩度在内的 5 只具有自主知识产权的国产靶向制剂获准在中国上市,但从市场份额来看,国产品种的销售额还远远比的上进口品种,目前中国靶向用药市场依然被跨国企业垄断。在长期以来临床上的药物治疗中发现,中草药来源有效成分在减轻临床症状、防止复发转移等方面对比化学药物而言有良好的效果而备受关注。我国有极其丰富的药用植物资源学上的厚重的科研成果积累,引入靶向用药研究方法开展天然产物的靶向药物筛选,更有利于获得作用机理明确、具有自主知识产权的天然靶向药物,提升为我国的传统药物在全世界范围内的竞争能力。

1.2 Dual-specificity phosphatase 26 (DUSP26)的研究现状

1.2.1 DUSP26 功能简介

特定蛋白质酪氨酸残基的磷酸化与去磷酸化调控生物体内细胞信号通路等基本生命活动,这样的蛋白质化学修饰过程是通过蛋白酪氨酸激酶(protein tyrosine kinase, PTK)和蛋白酪氨酸磷酸酶(protein tyrosine phosphatase, PTP)的作用下实现的^[15]。人体内 PTP 成员已经被全部鉴定,活性中心含有半胱氨酸残基的 PTP 可以分为一类。根据亚基的不同,这类 PTP 分为两类,即酪氨酸特异性蛋白酪氨酸磷酸酶和二重特异性去磷酸化酶(Dual-specificity phosphatase, DUSP)。DUSP 是功能多样的 PTP,具有使磷酸化的丝氨酸、苏氨酸以及磷酸化的酪氨酸残基去磷酸化的活性^[16]。DUSP26 是 DUSPs 亚组的成员,也具有让磷酸化酪氨酸去磷酸化功能。已发现 DUSP26 可以让磷酸化的热冲击转录因子去磷酸化,显示出调控该转录因子和 DNA 结合活性的功能,是构成细胞内信号传导通路的蛋

白质之一^[17]。

1.2.2 DUSP26 是近期确认的抗肿瘤药物作用靶蛋白

2007 年著名科技期刊《*Oncogene*》发表了关于 DUSP26 是抗甲状腺未分化癌药物作用靶蛋白的研究论文。论文作者发现,在未分化型甲状腺癌(anaplastic thyroid cancer, ATC)中 DUSP26 的表达量异常高。高表达的 DUSP26 造成磷酸化的分裂原激活的蛋白激酶 p38 (Mitogen-activated Protein Kinase p38, MAPK p38) 去磷酸化,并与之形成复合体。与 DUSP26 形成复合体后的 MAPK p38 丧失了原本具有的启动细胞凋亡的功能, DUSP26 造成的细胞凋亡功能的丧失被认为是 ATC 细胞增生异常迅速的原因。临床上已把甲状腺肿瘤组织内 DUSP26 是否过量表达作为 ATC 发病的诊断依据之一^[18]。这些蛋白作用机理的发现证明了 DUSP26 是一个抗 ATC 药物作用的新靶点。

甲状腺癌的临床病理类型主要分为 4 种类型:乳头状腺癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)、滤泡状腺癌(follicular thyroid carcinoma, FTC)、髓样癌(medullary thyroid carcinoma, MTC)和 ATC^[19]。各类型甲状腺癌的发病年龄、生长速度、转移途径、预后都明显不同, PTC 发病率约占全部甲状腺癌的 60%,属于低度恶性肿瘤,是甲状腺癌中最常见的病理类型; FTC 约占甲状腺癌的 20%,属于中度恶性肿瘤,特点是血行播散快,多有远处转移,可到骨组织及肺,常常缺乏明显的局部恶性表现。MTC 又称滤泡旁细胞癌,是发生自甲状腺滤泡旁细胞的恶性肿瘤,可通过血道发生远处转移,在我国国内平均发病率约占甲状腺癌总发病率的 4%,临床上少见^[20]。未分化型甲状腺癌发病率约占全部甲状腺癌的 15%^[21]。这种甲状腺癌的癌细胞增生迅速,早期可发生全身转移,患者从发病到死亡往往仅有几个月的时间,其 5 年生存率低于 10%,6 个月致死率为 68.4%,12 个月致死率为 80.7%^[22-24]。由此可见, ATC 是严重危害人体健康的恶性肿瘤之一。

目前为止临床上治疗 ATC 的方法有许多种,诸如基因治疗、根治性切除、活检术、预防性气管切开术等的手术治疗^[25]、放射性线治疗、化学治疗等。ATC 常规性的临床治疗中,单纯依靠手术治疗的患者术后生存率很低。化疗可延长部分患者的生存时间,但整体而言对改善本病的愈后作用不大。ATC 患者因失去摄碘能力而导致常规 I 治疗无效^[26]。诱导分化治疗在体外试验中有较好的效果,但现在没有大规模的临床试验,有待更进一步的研究。随着近年来各国 ATC 的发病率呈逐年增加的趋势^[27],若能找到有效且可靠的抑制 DUSP26 与 MAPK p38 结合的药物,将有可能减少由 DUSP26 过表达诱导的 MAPK p38 丧失维持细胞周期的功能,从而在甲状腺组织内促进 ATC 细胞的凋亡,达到抑制或阻止 ATC 的病程发展。因此, DUSP26 的活性抑制剂可作为治疗 ATC 新药的先导化合物

开展更深入的研究。

2007 年以后对 DUSP26 的深入研究发现 DUSP26 在神经组织内也呈现高表达状态, 大脑以外的神经组织中表达量高于脑组织, 此外, 在骨骼肌、前列腺和卵巢中也能发现 DUSP26 呈现高表达状态^[28]。在 PC12 细胞中, 高表达的 DUSP26 能够降低 Akt 的 473 位丝氨酸的磷酸化^[29], DUSP26 通过下调 Akt 通路和威廉姆肿瘤基因的产生减低表皮因子受体水平, 降低表皮因子水平, 从而抑制细胞生长, 这表明 DUSP26 参与 PC12 细胞的分化, 通过调控 PI3K/Akt 信号传递使神经生长因子和表皮生长因子水平发生变化。DUSP26 与细胞粘连和细胞内转运有关^[30]。在神经上皮癌细胞、成神经癌细胞和成视网膜癌细胞中发现了 DUSP26 过表达造成 MAPK p53 丧失了原本具有的启动细胞凋亡的功能的现象。如果能消除 DUSP26 和 MAPK p38 或 p53 形成的复合体, 恢复 MAPK p38 或 MAPK p53 调控细胞凋亡的功能, 让相关癌细胞的增殖受到抑制, 有望实现肿瘤的治疗。因此, DUSP26 的活性抑制剂可以降低 MAPK p38 或 MAPK p53 介导的肿瘤细胞异常性增生, 可作为 ATC、神经上皮癌细胞、成神经癌细胞和成视网膜癌等肿瘤的治疗新药的先导化合物开展成药性研究。

1.2.3 DUSP26 的结构生物学研究现状

DUSP26 基因位于第 8 号染色体的第 12 位, 其基因编码的肽链含有 211 个氨基酸。研究发现 PTP 组的去磷酸化酶含有一个大约 150 个氨基酸残基的序列高度保守的催化结构域, 其中的活性中心由一个高度保守的氨基酸序列: His-Cys-X-X-Gly-X-X-Arg-Ser 构成, 称为 PTP-loop (X 为非保守氨基酸)^[31]。DUSP26 的催化结构域含有 61-211 残基。本人的导师谢勇副研究员成功培育了 DUSP26 (61-211) 的单晶体, 并成功测定了 1.67 Å 分辨率 X 射线衍射数据。这种晶体的空间群为 C2, 非对称单位内含有一个 DUSP26 (61-211), 利用多波长异常散射法解决相位问题后成功测定了 DUSP26 (61-211) 的晶体结构(PDB ID: 2E0T)^[32], 它含有 7 条 α 螺旋和一个 5 条 β 折叠构成的 β -片层。以 β -片层为中心, $\alpha 1$ - $\alpha 6$ 环绕在其周围形成一个主体区(图 1-1A), $\alpha 7$ 则从主体区延伸而出与另一个 DUSP26 的催化结构域的 $\alpha 5$ 形成分子间相互作用, 使得 DUSP26 形成 2 聚体的结构(图 1-1B)。二聚体中的分子间相互作用面主要由位于 $\alpha 5$ 的 Thr161, Met168, Leu169 和位于 $\alpha 7$ 的 Phe198, Leu198, Leu201, Leu205 构成, 分子间相互作用形式以疏水性相互作用为主(图 1-1B), 另外 Ser157, Asp120, Asn191 形成的跨两个分子的氢键网, 有稳定 DUSP26 的催化结构域二聚体结构的作用(图 1-1C)^[32]。美国科学家也成功培养了另一种 DUSP26 (61-211) 的晶体, 测定了 2.1 Å 分辨率 X 射线衍射数据后获得了 DUSP26 (61-211) 的晶体结构(PDB ID: 4HRF)^[33], 这种

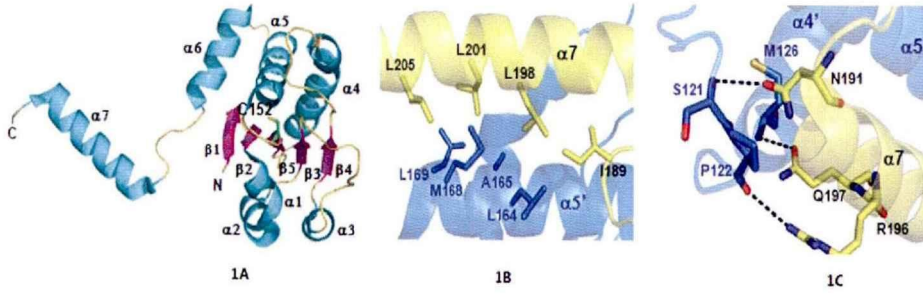


图 1-1 . A. 用绸带模型表示的 DUSP26(61-211)单体的结构。B 和 C 分别表示 DUSP26(61-211)二聚体中分子间的疏水相互作用和氢键相互作用。氢键用黑色虚线表示。

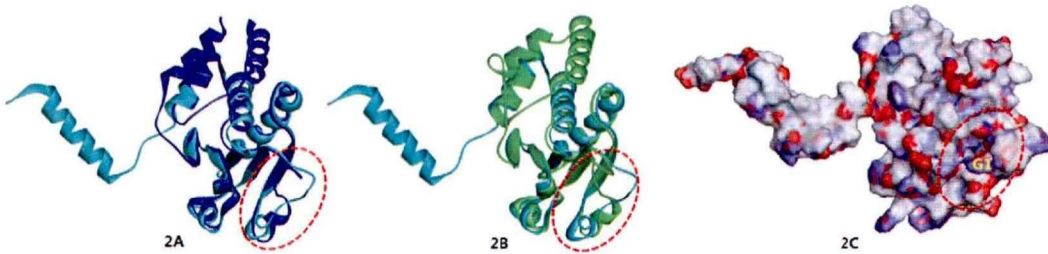


图 1-2. A, DUSP26 (61-211)结构(浅蓝色)和 DUSP13 结构(深蓝色)的叠合。B, DUSP26 (61-211)和 VHR 结构(绿色)的叠合。C, DUSP26 (61-211)的表面电荷。正电荷和负电荷分别用蓝色和红色表示。红色虚线圈内标注的是 DUSP26 分子中出现的新空穴。

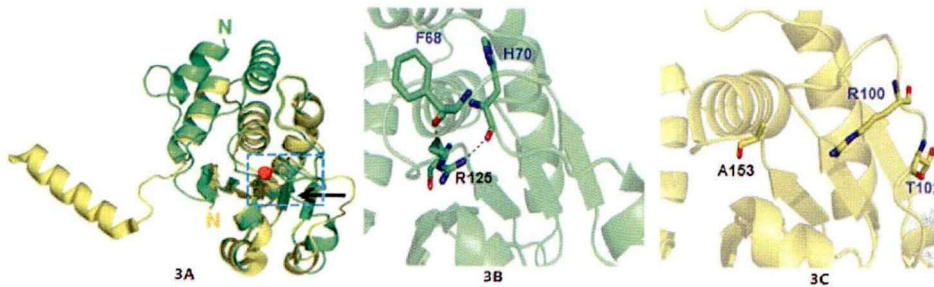


图 1-3. A. DUSP26 (61-211) 结构(黄色)和 VHR 结构(绿色)的叠合。蓝色虚线框内标注的是 DUSP26 的 $\alpha 3$ - $\beta 3$ 之间的 loop 环的偏移, 红色圆点是催化中心。B.VHR 的 PTP-loop 上的 R125 残基与 loop 环上的 F68 和 H70 形成氢键作用。C. DUSP26 (61-211)中 PTP-loop 和其周围 loop 环无氢键作用。

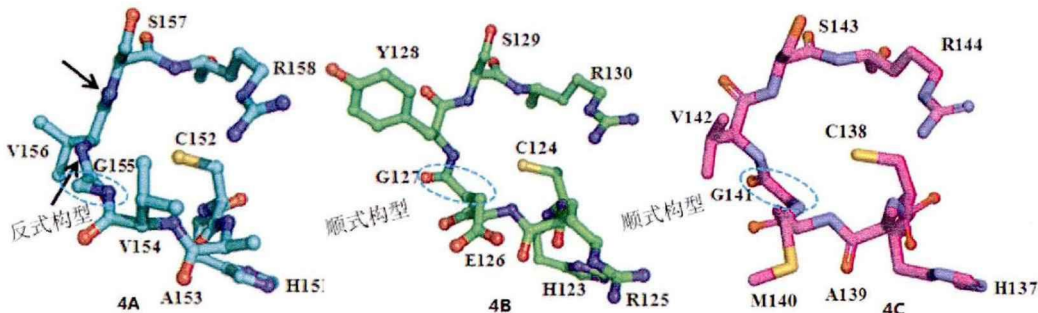


图 1-4.DUSP26(61-211)、VHR 和 DUSP13 PTP-loop 中甘氨酸的构型。A. DUSP26 的 Gly155 是反式结构。黑色箭头标注的是 V156 和 S157 偏离活性中心的主链 N 原子。B.VHR 的 Gly127 是顺式构型。C. DUSP13 中 G141 是顺式构型。

晶体的空间群为 $P2_12_12_1$, 非对称单位内含有两个 2 聚体。这样的 DUSP26 (61-211) 的晶体结构显示无论是单体还是 2 聚体的结构都和本课题组测定的 DUSP26 (61-211) 的结构(PDB ID: 2E0T)^[32]基本相同。

DUSP26、VHR (vaccinia H1-related phosphatase, 又称为 DUSP3)^[34]和 DUSP13^[35]的氨基酸序列相似度大于 50%。将三者的空间结构进行比对发现 DUSP26 (61-211)与 VHR 和 DUSP13 在空间结构上存在显著的结构异性。首先, 最大差异在于 VHR, DUSP13 的 C 末端 α 螺旋和相当于 DUSP26 (61-211) 的 $\alpha 5$ 螺旋部分形成分子内相互作用, 而 DUSP26 (61-211)的 C 末端 $\alpha 7$ 螺旋和另一个 DUSP26 (61-211)的 $\alpha 5'$ 螺旋形成分子间相互作用。其次, 相较于 VHR 和 DUSP13 的相应区域, DUSP26 (61-211) $\alpha 3$ - $\beta 3$ 之间的 loop 远离 DUSP26 的催化中心, 形成一个在其它 DUSP 中未见的新空穴(图 1-2)。DUSP26 (61-211) $\alpha 3$ - $\beta 3$ 之间的 loop 远离 DUSP26 的催化中心导致其和 PTP-loop 之间形成的氢键作用被破坏(图 1-3), 不易维持 PTP-loop 为活性构象。其次, 大多数 DUSP 家族成员的 PTP-loop 中, 以 X 表示的基本是极性氨基酸, 能和分子内的其他肽键形成氢键, 让活性中心保持容易和底物结合的构型, 测定的晶体结构显示 PTP-loop 中都保留的甘氨酸, Gly127 (VHR)和 G141 (DUSP13)的构型均为顺式, 和附近氨基酸形成氢键, 有利于稳定活性中心处于开放状态, 与底物结合(图 1-4)^[35, 36]。而 DUSP26 的 PTP-loop 中, X 表示的氨基酸都是非极性氨基酸, 不能形成类似 VHR、DUSP13 等的活性中心氢键网, 缺乏使活性中心处于开放构型的稳定因素, 观测到的活性中心为关闭状态, 此时 Gly155 (DUSP26)的构型为反式构型。上述结构研究表明, DUSP26 的活性中心及附近区域具有独特的空间结构, 具有未知的与底物结合机制, 它的抑制剂的专一性可能很强。

1.2.4 靶向 DUSP26 药物筛选的研究现状

“新靶标·新结构·新机制”是推动创新药物研究发展的动力。作为近期确定的抗肿瘤药物作用的靶点, 开展靶向 DUSP26 抗肿瘤药物研究已成为一个抗癌新药研发中的重要课题。目前为止, 高通量筛选研究仅发现一个 DUSP26 的小分子抑制剂 NSC-87877 (图 5), IC_{50} 值为 $16.67 \mu M$ ^[37, 38]。由于抑制 DUSP26 的活性较弱, 作为靶向 DUSP26 的抗肿瘤药物先导化合物开展成药性研究的可行性不高。

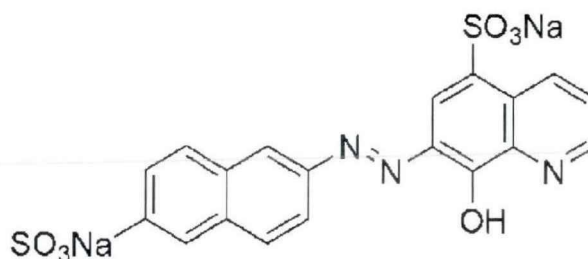


图 1-5. NSC-87877 的化学结构。

中国医学科学院/北京协和医学院药用植物研究所在国家基础研究项目“重大新药创制”、财政部专项资金的资助下正在建设中药天然化合物库。本课题组的合作方中国医学科学院/北京协和医学院医药生物技术研究所开发了微生物天然产物数据库(Microbial Natural Products Database, MNPD)。百灵威公司给本单位提供小分子化合物库。MNPD 是国内唯一的微生物天然产物数据库,利用 MDL ISIS Base 化学信息管理系统进行构建,从公开发表的文献、专利中收集了包括了 16000 多个微生物天然产物的来源、制备、理化性质、二维和三维化学结构、生物活性和原始文献等信息资料,可用于微生物天然产物的信息查询和总结性检索,还可以与分子模拟和药物设计软件配合使用进行计算机辅助药物设计和虚拟筛选研究。这些化合物库为开展靶向 DUSP26 的抗肿瘤药物先导化合物筛选研究提供了保障。从中有望发现具有更高活性的 DUSP26 小分子抑制剂,因此本论文作者开展了 DUSP26 的反应机理的研究和利用计算机辅助药物筛选等技术的 DUSP26 的小分子抑制剂的发现和活性评价研究。

1.3 本研究的意义及目的

鉴于目前对 DUSP26 研究中还没有获得明晰的 DUSP26 的反应机理和可作为抗肿瘤新药候选品的 DUSP26 抑制剂,本项研究首先开展了 DUSP26 的反应机理的研究,从 DUSP26 的结构特征上提出了存在控制酶活性分子开关的假说,进一步利用对硝基苯磷酸(4-Nitrophenyl phosphate, p-NPP)为底物,实施蛋白质分段表达-酶促动力学、点突变-酶促动力学、计算机辅助药物设计等方法,从不同的角度证实了假说的客观真实性,从而确定了 DUSP26 分子上的抑制剂作用部位。而后开展 DUSP26 新抑制剂的筛选,利用 CADD 技术构建了用于分子对接筛选的药效团模型,利用分子对接法开展从 MNPD、百灵威公司化合物库中筛选可作为 DUSP26 抑制剂的候选化合物,之后建立 p-NPP 为底物的 DUSP26 酶抑制活性评价方法,验证从计算机辅助药物筛选中获得候选化合物的对 DUSP26 的抑制活性,从计算机筛选到的 232 个化合物中共计发现 8 种化合物具有抑制 DUSP26 的活性,其中之一的抑制活性高于 NSC-87877,研究结果证明推测的 DUSP26 反应机理符合事实。可以说本项研究是基于“干实验”和“湿实验”数据确定的 DUSP26 的催化机理实施的计算机辅助药物筛选,避免了抑制剂筛选的盲目性,为深入研究 DUSP26 的反应机制和研发具有更高活性和特异性的 DUSP26 小分子抑制剂奠定了基础。

第二章 DUSP26 的药物作用靶位研究

由于在 DUSP26 (61-211)的晶体结构中没有底物或底物的结构类似物存在,以 p-NPP 为底物开展的酶活性测试结果表明 DUSP26 (61-211)也没有显示出磷酸反应活性,表明已测定的 DUSP26 (61-211)晶体结构是一个非活性型的结构,基于此结构直接开展计算机辅助靶向 DUSP26 药物筛选是不合适的,必须先确认小分子药物可作用的靶位的结构信息,利用计算机辅助药物筛选才可能获得具有高活性的 DUSP26 抑制剂。

DUSP26 (61-211)分子的表面电荷分布图显示,活性中心的表面是电荷为近中性的平滑表面,这样的结构不利于 DUSP26 与磷酸化的酪氨酸结合。目前为止还没有与 DUSP26 与底物复合体的晶体结构被测定。VHR 是与 DUSP26 结构最相似的蛋白质之一,已有 VHR 和底物结构类似物复合体(PDB ID: 1VHR)^[34]含有磷酸化酪氨酸肽链结合复合体的晶体结构(PDB ID: 1J4X)被成功测定^[40],这些活性型的 DUSP 结构可以作为参考来推测 DUSP26 与底物结合后发生的构型变化,解析 DUSP26 的反应机制。表面电荷分布图显示, VHR 与底物结合后, PTP-loop 显示出一个带正电荷的凹穴状的表面,正好匹配磷酸的结合(图 2-1A)。因此可以认为 DUSP26 在催化磷酸化酪氨酸去磷酸反应时,当底物与 DUSP26 结合形成酶-底物复合体时, DUSP26 的 PTP-loop 应该由电荷中性的平滑表面转变为类似 VHR 与底物结合后的带正电荷的空穴结构,这时 PTP-loop 应该和 VHR 的 PTP-loop 的构型相似。

DUSP26 (61-211)和 VHR 的与底物复合体的晶体结构对比可见, DUSP26 的 PTP-loop 上的 Gly155 形成反式构型(图 2-1B),对应其表面电荷分布图来看,这样的结构不利于与底物结合。而在 VHR 分子中, PTP-loop 与底物结合形成开放型结构,等同于 Gly155 的 Gly127 呈现为顺式构型,此时,位于 Gly127 附近的 Arg158 和 Gly127 附近的氧原子形成 2 个氢键,位于 PTP-loop 上的极性氨基酸也和附近的主链形成氢键,这些氢键的生成有利于 PTP-loop 与底物结合后的稳定化。由于 PTP-loop 和周围氨基酸容易形成多重氢键,有利于活性型结构的 PTP-loop 的稳定化。而对于 DUSP26, PTP-loop 上基本为非极性氨基酸,不能形成类似 VHR 的 PTP-loop 上侧链与周围部分的氢键,容易维持低能级的非活性型结构。这些研究结果证明了 DUSP26 从非活性的天然结构转化为底物结合的活性型结构之间的能级差大于 VHR。

参考 VHR 和 DUSP26 氨基酸序列相似度和空间结构的相似性,我们发现当 DUSP26 和底物结合时, PTP-loop 结构应该转化为类似于 VHR 的构型,此时 Gly155 的构型应从反式转变类似 VHR 中 Gly127 的顺式结构, PTP-loop 处于高能级状态,附近 Arg186(等同于 VHR 中的 R158)应当发生构型的改变,与 PTP-loop 形成类似于 VHR 活性型结构中的多重氢键,让 PTP-loop 稳定为活性型的结构,只有这样,才能使 DUSP26 酶与底物的结合后实现去磷酸化反应。因此

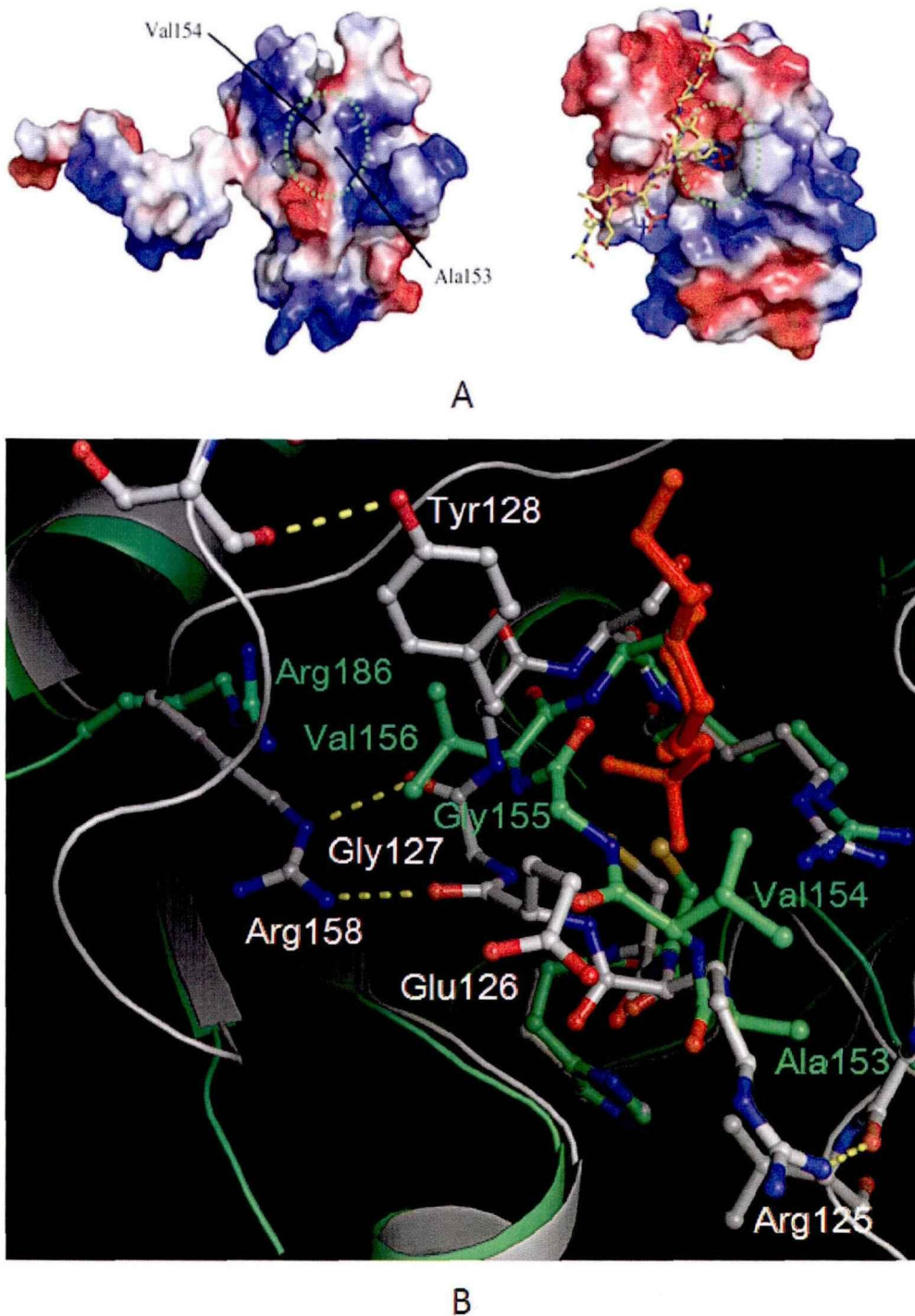


图 2-1. DUSP26 (61-211)和 VHR 与底物复合体晶体结构中活性中心附近结构的比较。

A. DUSP26 (61-211)和 VHR 与底物复合体的表面电荷分布图，左侧为 DUSP26 (61-211)，右侧为 VHR 与底物复合体，椭圆虚线圈内为活性中心部分。B. DUSP26 (61-211)和 VHR 与底物复合体晶体结构活性中心的结构对比。DUSP26 (61-211)主链及碳原子用绿色表示，VHR 与底物复合体晶体结构主链及碳原子用灰色表示。两个酶的 PTP-loop 和 VHR 结合的肽链用球棍模型表示，其他蛋白质主链部分用绸带模型表示。肽链的碳原子用黄色表示，所以结构中的氮原子用蓝色表示，氧原子用红色表示。氢键用黄色虚线表示。VHR 的底物用球棍模型表示，所有原子标记为红色。

可以认为 Arg186 可能是控制 DUSP26 活性的分子开关。即当 Arg186 和 PTP-loop 形成氢键, DUSP26 的活性中心结构才能转变为带有正电荷的匹配磷酸结合的凹穴。当 Arg186 构型改变, 恢复成测定的晶体结构中显示的 PTP-loop 构型时, DUSP26 的活性中心恢复成电荷中性的平滑表面, 可促进产物释放。DUSP26 主链分为三个相对独立的结构域: N 端结构域 (1-60)、催化中心结构域 (61-190) 和 C-端结构域 (190-211)。为了验证假说是否真实, 在开展计算机辅助药物筛选研究前, 开展了分段表达-酶促动力实验, 检测 DUSP26, DUSP26 (1-190), DUSP26 (35-211), DUSP26 (35-190), DUSP26 (35-185) 对 p-NPP 去磷酸反应的催化活性, 同时开展 Arg186 的突变体-酶促动力学研究来证明 Arg186 是否确为控制 DUSP26 活性的分子开关的研究。本章将介绍具体的研究方法和取得的研究成果。

第一节 DUSP26 及截断体表达质粒的构建

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株与表达载体

人源 DUSP26 的 cDNA 和蛋白质表达用大肠杆菌 [*Escherich coli* BL21(DE3)] 感受态细胞由中国医学科学院/北京协和医学院医药生物技术研究所司书毅教授提供, pGEX-4T-2 表达载体购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 酶与试剂

限制性 DNA 内切酶 *BamH* I 和 *EcoR* I 购自纽英伦生物技术(NEB)北京有限公司; PCR 试剂 2 x Taq PCR Master Mix、DNA Marker AL2000、T4 DNA 连接酶、核酸染料购自北京博奥龙免疫技术有限公司; DNA 胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒购自北京康润诚业生物技术有限公司; 氨苄青霉素(*Amp*)、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷、苯甲基磺酰氟、乙二醇四乙酸、Tris、十二烷基硫酸钠购自 Amresco 公司; NaCl、CaCl₂、KCl、MgCl₂、NaOH、冰醋酸、甘油、乙醇、二甲苯青蓝、溴酚蓝购自北京化工厂; 引物合成和质粒 DNA 测序由北京擎科生物技术有限公司完成。

试剂盒:

质粒小提试剂盒 : 北京康润诚业生物技术有限公司, 50 次。

RNase A(10mg/mL)	150 μ L
细胞悬浮液(S1)	15 mL
细胞裂解液(S2)	15 mL
中和缓冲液(S3)	20 mL
去蛋白液(PR)	30 mL

浓缩漂洗液(WB)	20 mL
洗脱缓冲液(EB)	5 mL
离心吸附柱	50 套
无菌离心管(1.5 mL)	50 个

2 x Taq PCR Master Mix QuickCloning 系列: 北京博奥龙免疫技术产品。

2 x Taq PCR Master Mix	1 mL
------------------------	------

DNA 片段快速胶回收试剂盒: 北京康润诚业生物技术有限公司, 50 次。

膜结合液(MB)	20 mL
膜漂洗液(MW)	6 mL
洗脱缓冲液(EB)	5 mL
1.5mL 无菌离心管	50 个

1.1.3 主要仪器

微量移液器(EPPENDORF)

聚合酶链式反应仪(EPPENDORF)

恒压恒流电泳仪、电泳槽(Bio-RAD)

自动凝胶成像仪(SAGECREATION, chempGel 6000)

电子天平(Mettler Toledo 产 PB303-E 型)

高速冷冻离心机(湘仪)

紫外可见分光光度计(LengGuang Tech SpectrumLab 752 Sp)

超低温冰箱(Sanyo)

自动高压灭菌锅(合肥新华医疗设备公司产)

DHP-9082 型可控温空气摇床(上海一恒科技有限公司)

纯水系统(世韩宝龙实验室专用纯水设备)

1.1.4 PCR 引物

根据 PCR 技术的引物设计原则, 利用 Primer Premier 5.0 软件, 设计 DUSP26 全长和不同片段长度蛋白基因的 PCR 引物, 由北京擎科生物技术有限公司合成。所用引物序列如表 2-1 所示。

1.2 实验方法

1.2.1 PCR 扩增 cDNA

表 2-1 引物及引物序列

Primer	Sequence(5'-3')
DUSP26	Forward:5'-CGGGATCCATGTGCCCTGGTAACTGGCTTTG-3' Reverse:5'-GGAATTCTCATGCTTCCAGACCCTGCC-3'
DUSP26 (1-190)	Forward:5'-CGGGATCCATGTGCCCTGGTAACTGGCTTTG-3' Reverse:5'-CACCGAGGCATCATCCCCTGATGAGAATTCC-3'
DUSP26 (35-211)	Forward:5'-CGGGATCCTTTTATGGGCCCGCTTCTCCCG-3' Reverse:5'-GGAATTCTCATGCTTCCAGACCCTGCC-3'
DUSP26 (35-190)	Forward:5'-CGGGATCCTTTTATGGGCCCGCTTCTCCCG-3' Reverse:5'-CACCGAGGCATCATCCCCTGATGAGAATTCC-3'
DUSP26 (35-185)	Forward:5'-CGGGATCCTTTTATGGGCCCGCTTCTCCCG-3' Reverse:5'-GGAATTCTCATGCTTCCAGACCCTGCC-3'

PCR 反应体系:

DNA 模板 (5 ng/ μ L)	1.0 μ L
Primer Forward (10 μ M)	1.0 μ L
Primer Reverse (10 μ M)	1.0 μ L
2xTaq PCR Master Mix	25.0 μ L
ddH ₂ O	22.0 μ L
Total volume	50.0 μ L

PCR 条件:

步骤	温度	时间
第 1 步	367 K	5 min
第 2 步	367 K	20 s
第 3 步	330 K	20 s
第 4 步	345 K	30 s
第 5 步	345 K	5 min
第 6 步	277 K	∞

第 4 步完成后转为第 2 步, 重复 30 次后开始第 5 步操作

1.2.2 DNA 胶回收纯化

将 PCR 或酶切产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并切下目的条带, 参照北京博奥龙免疫技术有限公司提供 StarPrep 快速 DNA 胶回收试剂盒说明书, 回收目的 DNA。具体操作步骤如下:

- (1) 取高压灭菌后的离心管(1.5 mL)称重, 标记;
- (2) 在凝胶成像仪的紫外下割取目的片段所在的琼脂糖胶块, 分别放入对应管中, 再次称重, 求的琼脂糖凝胶块的质量;
- (3) 按每 1 mg 凝胶加入 1 μ L 膜结合液(MB)的比例(1:1)加入膜结合液(MB),

将加入膜结合液的胶块混匀后置于 328 K 水浴中，每间隔 1-2 分钟混匀一次，直至胶体完全溶解；

(4) 待凝胶溶液冷却至室温后，转移到插入收集管的离心吸附柱内，标记，室温静置 1 min，室温下 13,000 rpm，离心 1 min，弃除收集管中的废液，再将离心吸附柱重新放入收集管中；

(5) 向离心吸附柱中加入 600 μL 膜漂洗液(MW)，13,000 rpm 离心 30 s，弃去收集管中的废液，将离心吸附柱重新插回收集管中；

(6) 向离心吸附柱中加入 600 μL 膜漂洗液(MW)，13,000 rpm，离心 30 s，弃去收集管中的废液，将离心吸附柱重新插回收集管中；

(7) 将离心柱去盖再次 13,000 rpm，离心 2 min，彻底除去残余漂洗液；

(8) 小心取出离心吸附柱，将其套入一个 1.5 mL 灭菌离心管中。室温静置干燥 5 min，至乙醇完全挥发，向硅胶吸附膜的中间部位滴加 30 μL 的洗脱缓冲液(EB)，室温静置 1 min；

(9) 13,000 rpm 离心 1 min，收集纯化的 DNA 片段。离心收集后将洗脱后的溶液再次加入离心吸附柱中重复洗脱一次；

(10) 弃除离心吸附柱，将回收产物收集到无菌离心管中，于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存、备用。

1.2.3 双酶切实验

回收的 cDNA 和 pGEX-4T-2 利用如下条件开展双酶切反应：

载体/片段	20.0 μL
10 \times Buffer	5.0 μL
<i>Bam</i> HI	1.0 μL
<i>Eco</i> RI	1.0 μL
BSA	0.50 μL
ddH ₂ O	22.5 μL
310 K 恒温 12 h。	

反应完成后，利用 1%琼脂糖凝胶电泳纯化酶切后的 cDNA 和 pGEX-4T-2。依据 1.2.2 部分记述的 DNA 回收条件回收酶切后的 cDNA 和 pGEX-4T-2。

1.2.4 目的片段与载体的连接

(1) 算外源片段与载体的量：插入 DNA 与载体的摩尔比

一般插入片段分子摩尔数：载体分子摩尔数 = 3 - 8:1

外源片段与载体的量主要根据下列公式计算:

$$\frac{\text{载体的量 (ng)} \times \text{外源片段长度 (bp)}}{\text{载体长度 (bp)}} \times \text{片段与载体摩尔比} = \text{外源片段的量 (ng)}$$

(2) 将回收的目的片段与 Vector 连接, 连接反应体系(10 μ L)

(3) 连接反应: 将双酶切回收的载体和目的片段用博奥龙公司的 T4 DNA 连接酶按 1: 7 的比例, 289 K 连接过夜。连接反应体系如下:

Vector DNA	1.0 μ L
Insert DNA	7.0 μ L
Ligase 10 \times buffer	1.0 μ L
T4 DNA Ligase	1.0 μ L

1.2.5 大肠杆菌 CaCl₂ 法感受态细胞的制备及转化

- (1) 取大肠杆菌 DE3 100 μ L 加入 5 mL LB 液体培养基中, 310 K 振荡培养过夜;
- (2) 取 2 mL 菌液转接到 100 mL LB 液体培养基中, 310 K, 200 rpm 振荡培养 2-3 h, 至 OD₆₀₀ 为 0.4-0.5;
- (3) 将菌液转移到 50 mL 离心管中, 在冰上放置 10 min;
- (4) 将装有菌液的离心管放入离心机, 277 K, 4, 000 rpm 离心 10 min 收集菌体;
- (5) 倾倒培养液, 将管口倒置以便将培养液流尽;
- (6) 用 10 mL 冰冷的 0.1 M CaCl₂ 悬浮菌体沉淀, 立即冰浴 30 min;
- (7) 将离心管放入离心机, 277 K, 4, 000 rpm 离心 10 min 收集菌体;
- (8) 倒出上清液, 用冰冷的 0.1 M CaCl₂(含 15 %甘油)2 mL 悬浮菌体(冰上操作);
- (9) 以每份 100 μ L 规格分装制备好的感受态细胞, 放入 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。
- (10) 取制备好的大肠杆菌 DE3 感受态细胞, 冰上融化, 加入 10 μ L 连接反应产物, 轻轻混匀, 冰浴 30 min;
- (11) 迅速 315 K 热激 30 s, 取出后随即冰浴 2 min;
- (12) 加入 600 μ L LB 液体培养基, 放入 310 K 培养 1 h(150 rpm);
- (13) 将菌液取出, 室温 2000 rpm, 离心 2 min, 弃去上清, 吸取下层 100 μ L 复苏细胞, 涂布在含有 100 μ g/mL 氨苄西林的 LB 平板培养基上;
- (14) 倒置培养皿于 310 K 培养 12-16 h, 挑取单菌落进行菌落 PCR 鉴定和酶切鉴定。

1.2.6 重组质粒菌落 PCR 鉴定

- (1) 从培养皿中随机挑取单菌落, 接入含相应抗性的 LB 液体培养基中;
- (2) 310 K 振荡培养过夜;
- (3) 将培养过夜的菌液煮沸 2 min;

(4) 12,000 rpm 离心 1 min, 取上清作为 PCR 模板;

PCR 反应体系:

裂解菌液	1.0 μL
Primer Forward (10 μM)	0.5 μL
Primer Revised (10 μM)	0.5 μL
2xTaq PCR Master Mix	12.5 μL
ddH ₂ O	10.5 μL
Total	25.0 μL

PCR 条件依照 1.2.1 中记述的条件进行。

(5) PCR 产物经 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测, 选取与目的条带大小相一致的菌液, 提取质粒。

1.2.7 质粒提取

参照 GenStar 质粒小提试剂盒说明书, 提取质粒 DNA。

(1) 收菌: 将过夜培养(310 K, 12-16 小时)的菌液室温 12,000 rpm, 离心 1 min, 彻底弃除上清;

(2) 重悬: 向留有菌体沉淀的离心管中加入 250 μL 含 RNaseA 的细胞悬浮液(S1), 使用移液器、涡旋震荡器或用枪头反复吹打菌体, 彻底悬浮细菌沉淀;

(3) 裂解: 向离心管中加入 250 μL 细胞裂解液(S2), 轻轻上下颠倒混合 5 次, 室温静置 1-5 min, 待细菌充分裂解, 溶液变半透明;

(4) 中和: 再向离心管中加入 350 μL 中和缓冲液(S3), 立即温和的上下翻转 6-8 次, 充分混匀, 此时将出现白色絮状沉淀。12,000 rpm 离心 10 min, 此时在离心管底部形成白色沉淀;

(5) DNA 结合: 将上一步收集的上清液用移液器转移到离心吸附柱中(吸附柱放入收集管内), 尽量不要吸出沉淀。室温 12,000 rpm 离心 1 min, 弃除收集管中的废液, 将离心吸附柱重新放入收集管中;

(6) 去除蛋白: 向离心吸附柱中加入 500 μL 去蛋白液(PR), 室温 12,000 rpm 离心 1 min, 倒掉收集管中的废液, 将离心吸附柱重新放回收集管中;

(7) 清洗: 向离心吸附柱中加入 700 μL 漂洗液(WB), 室温 12,000 rpm 离心 1 min, 倒掉收集管中的废液, 将离心吸附柱重新放回收集管中;

(8) 干甩: 将离心吸附柱重新放回收集管中, 去盖, 室温 12,000 rpm 离心 2 min, 目的是将离心吸附柱中残留的漂洗液去除;

(9) 洗脱: 小心去除离心吸附柱, 将其置于一个干净的离心管中, 向硅胶吸附膜的中央滴加 50-100 μL 洗脱缓冲液(EB), 室温放置 2 min, 12,000 rpm 离心 1 min

将质粒溶液收集到离心管中；

(10) 储存：弃除离心吸附柱，纯化的质粒置于 253 K 保存备用。

1.2.8 重组质粒双酶切鉴定

(1) 将菌落 PCR 鉴定正确的质粒用 *Bam*HI 和 *Eco*R I，310 K 酶切 3h 鉴定；

酶切反应体系：

质粒	5.0 μ L
10 \times Buffer	2.5 μ L
<i>Bam</i> HI	0.5 μ L
<i>Eco</i> R I	0.5 μ L
BSA	0.25 μ L
ddH ₂ O	to 25.0 μ L

(2) 产物经 1.0 %琼脂糖凝胶电泳检测，酶切鉴定正确的菌落送到擎科生物技术有限公司测序。

(3) 比对将测序结果，判断表达载体是否构建成功。

1.2.9 基因定点突变实验

(1) 设计点突变引物。

突变引物设计的特殊原则：

A、通常点突变引物长度一般为 30~35 bp。是以要突变的碱基为中心，加上两边的一段序列，两边长度至少为 11-12 bp。若两边引物太短了，很可能造成突变实验失败，因为引物至少要 11-12 个 bp 才能与模板搭上，而这种突变 PCR 要求两边都能与引物搭上，所以两边最好各设至少 12 个 bp，并且合成多一条反向互补的引物。

B、如果设定的引物长度为 30 bp，接下来需要计算引物的 T_m 值，看是否达到 351 K(GC 含量应大于 40%)。

C、如果 T_m 值低于 351 K，则适当改变引物的长度以使其 T_m 值达到 351 K (GC 含量应大于 40%)。

D、设计上下游引物时确保突变点在引物的中央位置。

E、最好使用经过纯化的引物。

T_m 值计算公式： $T_m = 0.41 \times (\% \text{ of GC}) - 675/L + 81.5$

注：L：引物碱基数；% of GC：引物 GC 含量。

根据以上原则，DUSP26(R186Q)、DUSP26(R186L)基因定点突变的引物设计如表 2-2 所示：

表 2-2 基因定点突变引物及引物序列

Primer	Sequence(5'-3')
DUSP26 (R186Q)	Forward:5'- GAAAGTCAAAGACCACCAAGGCATCATCCC-3' Reverse: 5'- GGGATGATGCCTTGGTGGTCTTTGACTTTC-3'
DUSP26 (R186L)	Forward: 5'-GAAAGTCAAAGACCACCTAGGCATCATCCC-3' Reverse: 5'-GGGATGATGCCTAGGTGGTCTTTGACTTTC-3'

(2) 准备模板质粒 DNA

用 *dam*⁺型菌株(例如 DH5 α 菌株)作为宿主菌。在 *end*⁺型菌株中常有克隆数低的现象，但是对突变效率没有影响。

(3) 样品反应体系(50 μ L 反应体系)

10 \times Reaction Buffer	5.0 μ L
Sample plasmid	2.0 μ L
Sample primer (F)	1.0 μ L
Sample primer (R)	1.0 μ L
dNTP mixture	2.0 μ L
ddH ₂ O	38.0 μ L
Muta-direct TM Enzyme	1.0 μ L

(4) PCR 反应条件

步骤	温度	时间
第 1 步	368 K	30 s
第 2 步	368 K	30 s
第 3 步	328 K	1 min
第 4 步	345 K	1 min

第 4 步完成后转为第 2 步，重复 20 遍

(5) PCR 扩增反应完成后冰育 5 分钟，然后置于室温(避免反复冻融)。

(6) 去除模板：

PCR 反应结束后使用 MutazymeTM酶消化甲基化模板的质粒，在 PCR 反应产物内加入 1 μ L(10U/ μ L)MutazymeTM酶 310 K 温育 1 小时。

(7) 转化

反应完毕后在质粒 DNA 上会产生缺口，当把这个质粒 DNA 转入 *E.coli* 中选择 *dam*⁺型菌株做转化，依据 1.2.5 中所示转化条件开展工作。

(8) 序列分析

转化后, 310 K 培养 12 小时, 通常当 LB 平板上出白色菌落则表明发生了突变。依照 1.2.7 中所示质粒提取条件提取点突变质粒后, 送交基因公司测定碱基序列。

1.3 实验结果与讨论

1.3.1 DUSP26 全长和片段基因的克隆

以人源 DUSP26 的 cDNA 为模板, 用其特异性上、下游引物进行 PCR 扩增利用不同长度的特异性上、下游引物, 扩增出目的基因, 如图 2-2 所示, PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳可见 DUSP26 (1-211)、DUSP26 (35-211)、DUSP26 (1-190)、DUSP26 (35-190)、DUSP26 (35-185)的 cDNA 被顺利扩增。

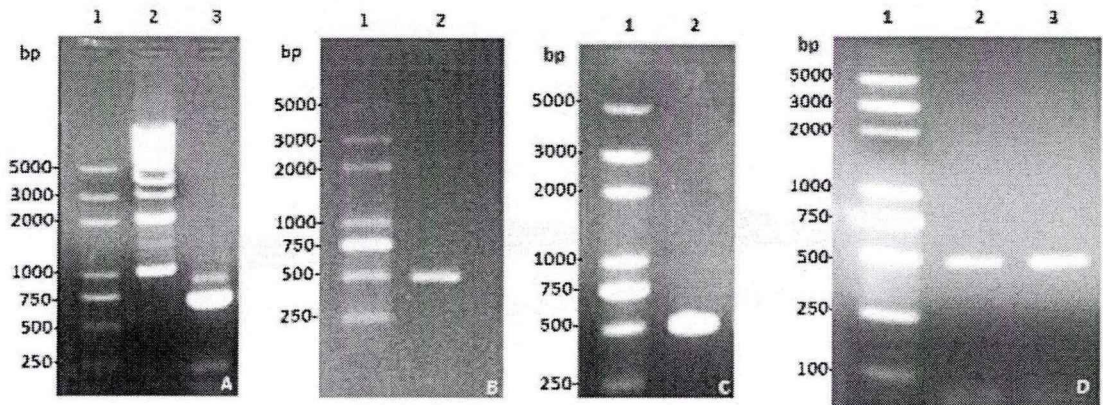


图 2-2. A. DUSP26(1-211)基因扩增的琼脂糖凝胶电泳图谱: 1-Maker: 1KB; 2-Maker: DL2000; 3-DUSP26(1-211); B. DUSP26(35-211)基因扩增的琼脂糖凝胶电泳图谱: 1-Maker: 1KB; 2-DUSP26(35-211); C. DUSP26(1-190)基因扩增的琼脂糖凝胶电泳图谱: 1-Maker: 1KB; 2- DUSP26(1-190); D. DUSP26(35-190)、DUSP26(35-185)基因扩增的琼脂糖凝胶电泳图谱: 1-Maker: 1KB; 2-DUSP26(35-190)、3-DUSP26(35-185);

1.3.2 DUSP26 重组表达载体双酶切鉴定

利用 PCR 技术从质粒扩增出目的基因片段并回收扩增产物。将表达载体和回收的 PCR 片段用 *BamH* I 和 *EcoR* I 双酶切并分别回收目的条带, 连接、转化。通过菌落 PCR, 筛选阳性克隆并提取质粒。对 PCR 阳性克隆进行进一步鉴定。其中 *BamH* I 和 *EcoR* I 酶切获得 DUSP26 (1-211)分子量为 633bp 的目的片段(图 2-3A 泳道 3、4)和 DUSP26 (35-211)分子量为 528bp 的目的片段(图 2-3B 泳道 2)。酶切鉴定结果与预计结果一致, 经过鉴定后的质粒送北京擎科生物技术有限公司测序, 通过 CLC-Sequence 软件将测序结果与原始序列比对, 结果显示表达载体的 *BamH* I 和 *EcoR* I 位点之间的 cDNA 序列准确无误, 证明表达载体构建成功。DUSP26 (1-190)、DUSP26 (35-190)、DUSP26 (35-185)的 pGEX-4T-2 表达载体未

实施双酶切鉴定，直接测序的结果证明表达载体构建成功。

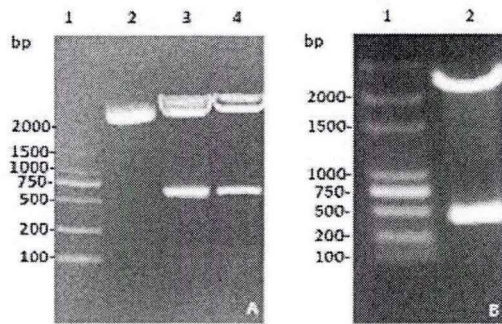


图 2-3. 部分重组质粒双酶切产物的 1%琼脂糖凝胶电泳图

A: 1-DL2000 marker; 2-pGEX-4T-2-DUSP26 (1-211)质粒; 3、4-*Bam*HI 和 *Eco*R I 双酶切产物。B: 1-DL2000 marker; 2-pGEX-4T-2-DUSP26 (35-211)质粒的 *Bam*HI 和 *Eco*R I 双酶切产物。

1.3.3 点突变质粒的鉴定

根据基因定点突变的实验步骤，成功完成了 DUSP26 (R186Q)、DUSP26 (R186L)基因的定点突变，擎科生物技术公司对提取质粒测序的结果证明 DUSP26 的两个突变体表达载体制备成功。

第二节 蛋白质的表达与纯化

2.1 材料与试剂

2.1.1 实验材料

MD34 透析袋(MW7000); Millpore 超滤管(MWCO:10KD); 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷丙烯酰胺(IPTG)、甲叉双丙烯酰胺、还原型谷胱甘肽、PMSF、凝血酶均由 Sigma 公司提供; GST 琼脂糖亲和介质由中国科学院过程工程研究所提供。

2.1.2 实验试剂

SDS-PAGE 所需用溶液的配制见附录。

2.2 实验方法

2.2.1 DUSP26 及其截短体蛋白的表达

(1) 将构建好的测序正确的 DUSP26 及其截短体的表达载体转化到表达菌株 DE3 中，之后在平板培养基上 310 K 培养过夜 8-12 小时;

(2) 挑去平板培养基上的单个菌落将其接种到含有 100 μg/mL 氨苄西林的 5 mL LB 培养基中，310 K，200 rpm 振荡培养 8-12 小时;

(3) 取 3 mL 菌液加入到 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄西林的 1 L LB 培养基中, 310 K, 200 rpm 继续培养;

(4) 在培养过程中, 用紫外可见分光光度计测量菌液 A_{600} , 当 A_{600} 约为 1.0 时, 向菌液中加入终浓度为 0.5 mM 的 IPTG 诱导蛋白表达, 将温度降至 289 K, 160 rpm 培养 16 小时。

2.2.2 DUSP26 及其截短体蛋白的纯化

(1) 将诱导培养后的菌液倒入离心管, 室温 5000 rpm 离心 30 分钟, 弃除上清, 加入冰冷的 PBS 缓冲液 20 mL 悬浮菌体;

(2) 将菌体收集到一个小烧杯中, 加入终浓度为 1 mM 的 PMSF, 用超声 20-30 分钟破碎菌体直至菌液变澄清;

(3) 超声破碎后, 把菌液置于离心管中, 277 K, 12000rpm 离心 30 分钟;

(4) 收集上清液, 将样品加入 GST 蛋白纯化柱中, 使液体通过纯化介质, 废液从下面流出;

(5) 用 PBS 清洗柱子三次, 每次 5 mL, 洗去不与柱子结合的其他杂蛋白;

(6) 用与柱子相同体积的还原性谷胱甘肽(50 mL 50 mM Tris-HCl 8.0 与 0.154 g 还原性谷胱甘肽粉末配制)洗脱柱子 5 次, 收集洗脱液。

2.2.3 DUSP26 及其截短体蛋白的 SDS-PAGE 检测

(1) 固定胶板, 用胶布将其底部封住, 保证密封良好;

(2) 配制 12% 的分离胶(双蒸水 3.3 mL, 30 % 的丙烯酰胺 4 mL, 1.5 M 的 Tris-HCl (pH 8.8) 2.5 mL, 10% 的 SDS 100 μL , 10% 的过硫酸铵 100 μL , TEMED 4 μL)。混匀后加入两玻璃板夹缝中, 并小心在胶面上加入约 0.5 cm 蒸馏水(使胶面保持平整), 约 30 min, 等胶凝聚后倾斜倒出蒸馏水;

(3) 配制 5% 的浓缩胶(双蒸水 2.1 mL, 30 % 的丙烯酰胺 0.5 mL, 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 0.38 mL, 10 % 的 SDS 30 μL , 10% 的过硫酸铵 30 μL , TEMED 3 μL)。混匀后加入两玻璃板夹缝中, 并在两玻璃板夹缝中水平插入 1.5 mm 的梳子待凝固后小心拔出梳子, 用 100 μL 微量注射器抽取电极缓冲液冲洗梳子拔出后的加样凹槽底部, 清除未凝的丙烯酰胺;

(4) 样品制备, 取纯化后的 DUSP26 蛋白及其不同长度截短体蛋白, 分别与 2 \times protein sample buffer 按 1:1 混匀, 并在 373 K 沸水中煮 10 min;

(5) 电泳, 将玻璃板凝胶放入电泳槽中, 并在槽中加入电极液, 依次用微量进样器在孔内加入 Protein Marker 和样品, 接通电源, 电压调制 80 V, 当样品进入分离胶时, 调节电压使恒定在 120 V。当溴酚蓝移动到离底部约 0.5 cm 时, 切断电源, 停止电泳;

(6) 将胶板从电泳槽中取出,小心从玻璃板上取下胶,切去浓缩胶,用考马斯亮蓝染色液进行染色,放在平缓摇动的平台上室温染色 1 小时后,换脱色液过夜脱色;

(7) 将脱色完成的聚丙烯酰胺凝胶置于凝胶成像系统进行扫描分析。

2.2.4 DUSP26 及其截短体蛋白的 BSA 法定量

(1) 标准曲线绘制:取一块酶标板按照下表加入相应的试剂

表 2-3 标准曲线样品的制备

孔号	0	1	2	3	4	5	6	7
BSA (μL)*	0	2	4	6	8	12	16	20
PBS 缓冲液 (μL)	20.0	18.0	16.0	14.0	12.0	8.0	4.0	0
BSA 浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0	20.0	40.0	60.0	80.0	120.0	160.0	200.0

*蛋白质标准溶液为 0.2 mg/mL

(2) 根据样品数量,将 5 x G250 工作液混匀,稀释为 1 x G250 工作液;

(3) 每孔加入 200 μL 的 1 x G250 工作液;

(4) 把酶标板放在振荡器上振荡 30 秒;

(5) 测定各个样品的 A_{595} 。以蛋白含量($\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标,吸光值为纵坐标,绘出标准曲线。

(6) 将待测样品按 2 倍、4 倍、8 倍稀释,使样品稀释液总体积为 20 μL ,加入 1 x G250 工作液 200 μL ,充分混匀;

(7) 测定并记录样品对 595 nm 的吸光度(A_{595});

(8) 根据所测样品的吸光值,在标准曲线上即可查得相应的蛋白浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)。

样品计算质量浓度在标准曲线的浓度范围内(25-2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$),样品结果为可信值;样品计算浓度超出标准曲线浓度范围,样品浓度结果判定为不可信。应按测定表观浓度进行双人平行样稀释到标准曲线范围内检测,重测的稀释后样品浓度在标准曲线的浓度范围内,样品浓度结果为可信值;重测浓度均在标准曲线的浓度范围外,样品浓度为不可信值,将以其它方法进行检测。

2.2.5 DUSP26 及其截短体蛋白的透析

透析前进行透析袋的处理

(1) 把透析袋剪成长度适当(10-20 cm)的小段;

(2) 将剪好的透析袋放入大体积的 2%(W/V)碳酸氢钠和 1 mM EDTA(pH8.0)中,将透析袋煮沸 10 分钟;

(3) 取出透析袋用蒸馏水彻底清洗透析袋;

- (4) 将透析袋放入 1 mM EDTA(pH8.0)溶液中煮沸 10 分钟;
 - (5) 用蒸馏水彻底清洗透析袋,冷却后,用蒸馏水浸没,存放在 4 度备用。
- 具体透析方法:

- (1) 把待纯化的蛋白质溶液装在半透膜的透析袋中,密封透析袋的两个端口;
- (2) 将装有蛋白质溶液的透析袋放入含有 50 mM Tris-HCl(pH7.4)和 100 mM NaCl 蛋白透析缓冲液的烧杯中;
- (3) 在烧杯内放入一个磁力小转子,并将烧杯放在磁力搅拌器上,启动磁力搅拌器使得透析缓冲液慢慢旋转搅拌;
- (4) 整个装置放入 4 度冰箱,透析液一天更换一次,透析两天。

2.3 实验结果与讨论

2.3.1 BSA 法定量蛋白浓度结果

根据 BSA 蛋白浓度测定方法,紫外酶标仪上测定标准品 BSA 蛋白并制作出标准曲线,同时计算出线性回归系数和对应正相关公式,结果(如图 2-4)所示。

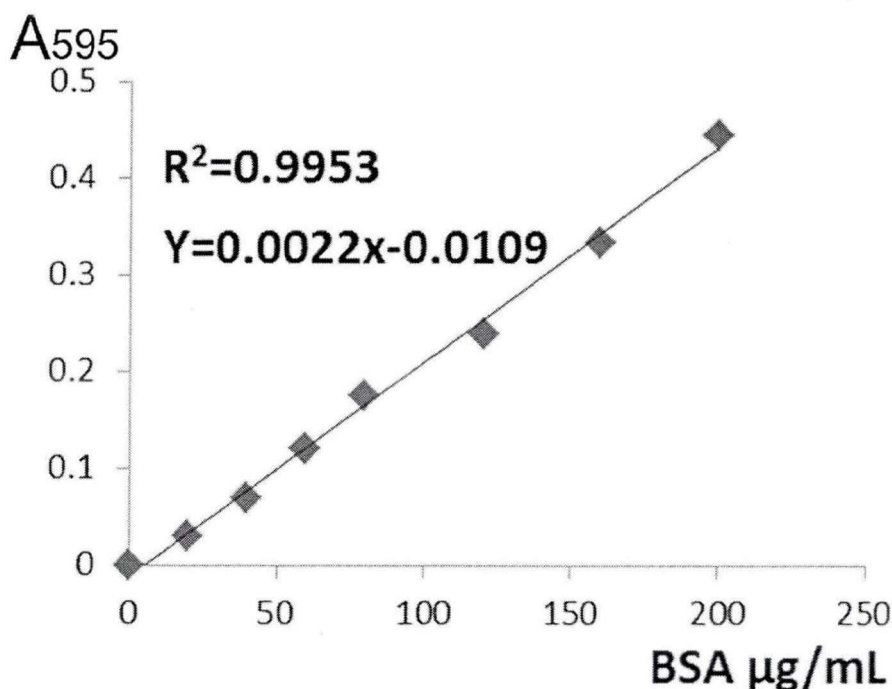


图 2-4 BSA 法测量蛋白浓度标准曲线

相同条件下测量 DUSP26 (1-211)、DUSP26 (1-190)、DUSP26 (35-211)、DUSP26 (35-190)、DUSP26 (35-185)蛋白在 595 nm 处的吸光度值,将测量所得吸光度值去掉空白对照后带入公式 $Y=0.0022X-0.0109$ 中,记算出相应的蛋白浓度($\mu\text{g/mL}$)。结果表 2-4 所示:

表 2-4 获得蛋白质浓度

测试蛋白	A ₅₉₅	浓度(μg/mL)
DUSP26(1-211)	1.529	699.9
DUSP26(1-190)	1.499	686.3
DUSP26(35-211)	1.612	741.3
DUSP26(35-190)	1.601	732.7
DUSP26(35-185)	1.512	692.2

2.3.2 SDS-PAGE 验证 DUSP26 的纯化结果

pGEX-4T-2-DUSP26 在大肠杆菌 DE3 内表达的 DUSP26 融合蛋白质有包含 DUSP26 自身 211 个氨基酸(分子量 23kDa)外, 在 DUSP26 的 C 末端含有一个具有 242 个氨基酸的 GST 标签(分子量 26kDa)。因此, 融合蛋白共有 453 个氨基酸, 融合蛋白的大小为 49 kDa。图 2-5 泳道 3 显示 DUSP26 (1-211) 作为融合蛋白质被成功表达。其他 4 个片段也以 GST 融合蛋白的形式被成功表达, 考虑到蛋白片段的稳定性较 DUSP26 差, 未开展用凝血酶去除 GST 标签。

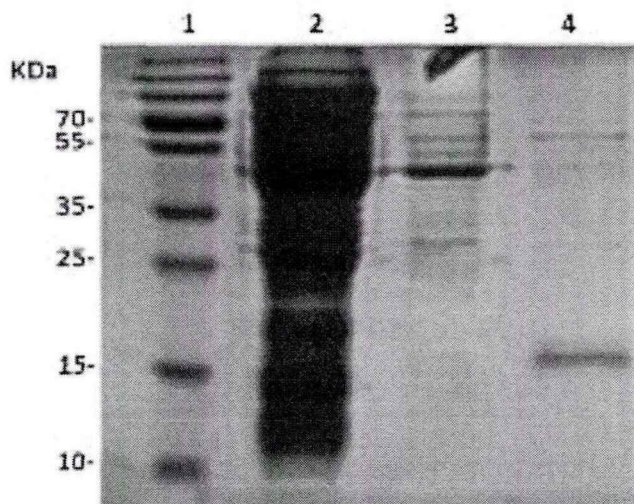


图 2-5. DUSP26(1-211)表达和纯化各阶段蛋白溶液的 SDS-PAGE。泳道 1-maker; 泳道 2-细胞裂解液上清; 泳道 3-纯化后 DUSP26 (1-211)与 GST 的融合蛋白; 泳道 4-凝血酶酶切去掉 GST 标签后 DUSP26 蛋白。

2.3.3 讨论

pGEX-4T-2 表达的 GST 融合蛋白中含有凝血酶的酶切位点, 此位点分割 GST 和 DUSP26。在适宜的条件下, 可以用凝血酶将 DUSP26 与 GST 切开, 随后分离 GST 得到单一的 DUSP26 蛋白。在本实验中, 用凝血酶酶切后得到的 DUSP26, 不是完整的 23 kDa, 多次试验出现相同的结果, 推测凝血酶酶切过程中破坏了

蛋白的完整性，得到的可能是 DUSP26 的催化结构域。通过查阅文献发现 GST 不参加实验所涉及到的酶活性反应，因此保留 GST 标签，后续的酶促动力学研究都以 GST 融合蛋白的形式开展活性等研究。

第三节 DUSP26 酶动力学研究

3.1 材料与试剂

KJ 酶标仪；恒温摇床；96 孔板；DUSP26 及其 4 个片段按 GST 融合蛋白制备；对 P-NPP 为 Merck 公司产品

3.2 实验方法

3.2.1 DUSP26 蛋白的活性测定

酶活力测定参照文献^{[34][35]}报道的条件上进一步优化为：称取 0.9277g 的 P-NPP，将其溶解于 ddH₂O 中，在容量瓶中定容到 50.0 mL，配成 50.0 mM 母液。取 10.0 mL 母液，用双蒸水稀释在 100.0 mL 容量瓶中定容，配制成 5.0 mM 底物溶液。定量反应酶液为 0.7 mg/mL。每 70.0 μ L 底物溶液加入 10.0 μ L 酶液，并加入 100.0 μ L 50.0 mM Tris-HCl(pH7.0)置于普通 96 孔板中，反应体系在 310 K 孵育，分别在 10min、20min、30min、40min、50min、加入 120.0 μ L 0.2 M NaOH 溶液终止反应，混匀后置于酶标仪中测定其在 405 nm 光吸收值。三组平行试验，在此条件下，以每分钟催化生成 1 μ mol 对硝基苯酚的酶量定义为一个活力单位。

(1) 反应体系(300 μ L):

Tris-HCl (pH7.4; 50 mM)	100.0 μ L
DUSP26 (0.7 mg/mL)	10.0 μ L
P-NPP (5.0 mM)	70.0 μ L
NaOH (0.2M)	120.0 μ L

(2) 对照组：参照实验组，对照组反应体系中以同等体积的 ddH₂O 代替酶的体积，其余成分加入体积不变，总体积 300.0 μ L 置于 310 K 反应 30 分钟后，测定其在 405nm 光吸收值。

3.2.2 DUSP26 酶学性质研究

(1) 酶的最适 pH 实验

分别用 pH5.0、5.5 的醋酸盐缓冲溶液；pH6.0、6.5 的 MES 缓冲溶液；pH7.0、PH7.4、pH7.5、pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲溶液作为酶反应的缓冲溶液以 P-NPP 为底物，按照酶活测定方法，测定酶液在 310 K 条件下，进行反应最佳 pH 条件的检测。平行试验三组。

反应体系(300 μ L):

不同 pH 缓冲溶液	100.0 μ L
DUSP26 (0.7 mg/mL)	10.0 μ L
P-NPP (5.0 mM)	70.0 μ L
NaOH (0.2 M)	120.0 μ L

空白对照组设置: 在 96 孔板上按照下表设置实验组与对照组

组别 pH 条件	空白对照组				实验组			
	5.0	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7
5.5	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8
6.0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
6.5	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8
7.0	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
7.4	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
7.5	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
8.0	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8

(2) 酶的最适温度实验

依照酶活测定方法, 在 293 K、303 K、310 K(考虑到待测蛋白为人源蛋白, 人体正常温度为 310 K)、313 K、323 K 反应 30 分钟后, 测定 405nm 处的吸光值。

3.2.3 米氏常数(K_m)的测定

在之前实验测出最适反应条件下, 测定酶液在不同底物浓度(1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 mM)下的反应速度, 数据依据 Michaelis-Menten 公式(公式 1), 以 $1/V$ 为对 $1/[S]$ 作 Lineweaver-Burk 双倒数法作图。

$$v = V_{\max}[S] / K_m + [S] \quad (\text{公式 1})$$

v 和 V_{\max} 分别是初始速率和最大反应速率, K_m 是米氏常数, S 是底物浓度。

DUSP26 及其突变体的 K_m 值测定条件如下:

测定分为实验组和对照组。

实验组: 反应体系的配比如下:

Tris-HCl (pH7.4; 50 mM)	100.0 μ L
DUSP26 (0.7 mg/mL)	10.0 μ L
*P-NPP	70.0 μ L
NaOH (0.2 M)	120.0 μ L

*P-NPP 的浓度从 1.0 mM 到 5.0 mM 进行测定, 实验平行测定 3 组。

对照组：参照实验组，对照组反应体系中以同等体积的 ddH₂O 代替 P-NPP 的体积，其余成分加入体积不变，总体积 300.0 μ L，置于 310 K 反应 30 分钟后，测定其在 405 nm 光吸收值。反应体系的配比如下：

Tris-HCl (pH7.4; 50 mM)	100.0 μ L
DUSP26 (0.7 mg/mL)	10.0 μ L
ddH ₂ O	70.0 μ L
NaOH (0.2 M)	120.0 μ L

(2) DUSP26 (R186L)和 DUSP26 (R186Q)定点体的 K_m 值测定

测定分为实验组和对照组。

实验组：反应体系的配比如下：

Tris-HCl (pH7.4; 50 mM)	100.0 μ L
DUSP26 (R186L)/ (R186Q)	10.0 μ L
*P-NPP	70.0 μ L
NaOH (0.2 M)	120.0 μ L

*P-NPP 的浓度从 1.0 mM 到 5.0 mM 进行测定，实验平行测定 3 组。

对照组：参照实验组，对照组反应体系中以同等体积的 ddH₂O 代替 P-NPP 的体积，其余成分加入体积不变，总体积 300.0 μ L，置于 310 K 反应 30 分钟后，测定其在 405nm 光吸收值。反应体系的配比如下：

Tris-HCl (pH7.4; 50 mM)	100.0 μ L
DUSP26 (R186L)/ (R186Q)	10.0 μ L
ddH ₂ O	70.0 μ L
NaOH (0.2 M)	120.0 μ L

3.3 实验结果与讨论

3.3.1 温度和反应体系 pH 对 DUSP26 活性的影响

以 5 mM P-NPP 为底物，在 pH7.4 条件下，按照酶活力测定方法测定不同温度条件下的酶活力，其吸光度平均值如表 2-5 所示，结果表明，温度范围选择 293-323 K，结果表明 DUSP26 的最适温度为 310 K。

表 2-5 不同温度(K)下检测到的酶反应体系吸光度变化

温度(K)	293	303	310	313	323
吸光度值	0.11	0.26	0.45	0.35	0.19

以 5 mM P-NPP 为底物，在 310 K 下，按照酶活力测定方法测定 pH5.0-8.0 范围不同条件下的酶活力，其吸光度平均值如表 2-6 所示，结果表明 DUSP26 的最

适 pH 为 7.4。

表 2-6 不同 pH 下检测到的酶反应体系吸光度变化

pH	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.4	7.5	8.0
吸光度值	0.10	0.12	0.21	0.32	0.42	0.50	0.49	0.36

以上结果证明, 在 pH 7.4 温度为 310 K 的反应环境中 DUSP26 具有良好的活性, 因此 pH7.4 和 310 K 是 DUSP26 发挥最佳活性的条件, 后续的试验都以这个参数条件为基准开展。

3.3.2 DUSP26及不同长度截断体活性测试结果

以 5 mM P-NPP 为底物, 在 pH7.4 条件下, 分别用浓度为 700.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DUSP26 (1-211)、DUSP26 (1-190)、DUSP26 (35-211)、DUSP26 (35-190)、DUSP26 (35-180) 为酶液 310 K 反应 30 分钟, 在 405nm 处测量其吸光度值。其结果如表所示:

表 2-7 不同长度蛋白质酶活性测试结果

蛋白长度	全长	1-190	35-211	35-190	35-185
吸光度值	0.082	0.047	0.049	0.044	0.01

结果显示, 与整体分子相比, 蛋白 N 端、C 端部分肽段的缺失会导致酶活性一定幅度降低, 但缺失了第 186 位的精氨酸后 DUSP26 (35-185) 活性大幅度降低, 此项结果证明 Arg186 是控制 DUSP26 活性关键氨基酸。为了验证推论的准确性, 利用点突变法将 Arg186 突变为 Gln 和 Leu, 测量 DUSP26 和这两个突变体对 P-NPP 的米氏常数 (K_m)。

3.3.4 DUSP26、DUSP26(R186Q)和DUSP26(R186L) K_m 测定结果

在 DUSP26、DUSP26 (R186Q) 和 DUSP26 (R186L) 的活性最佳条件, 测定不同底物浓度 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 (mM) 下的反应速度来计算 K_m 值, 测定的数据汇总在下表中, 表中数据为测定在不同浓度底物下反应体系的每分钟的吸光度。将单位时间内吸光值的变化作为酶反应速率 v , 以 v 对底物浓度 S 做双倒数图。双倒数图的曲线 R^2 值达到 0.9 以上, 判断为此浓度区间内的双倒数曲线有效。

表 2-8 DUSP26 在不同底物浓度测定结果

每分钟吸光度差值							
浓 度							
(mM)	组 1	组 2	组 3	组 4	组 5	组 6	组 7
1.0	0.164	0.158	0.137	0.139	0.146	0.144	0.149
1.5	0.222	0.209	0.204	0.202	0.209	0.217	0.220
2.0	0.230	0.225	0.200	0.201	0.208	0.212	0.228
2.5	0.273	0.262	0.232	0.252	0.249	0.264	0.274
3.0	0.328	0.305	0.302	0.315	0.291	0.292	0.313
3.5	0.237	0.302	0.305	0.314	0.321	0.322	0.329
4.0	0.254	0.321	0.311	0.310	0.309	0.312	0.311
4.5	0.367	0.327	0.328	0.321	0.321	0.320	0.317
5.0	0.350	0.351	0.334	0.340	0.360	0.361	0.360

表 2-9 DUSP26(R186Q)在不同底物浓度测定结果

每分钟吸光度差值							
浓 度							
(mM)	组 1	组 2	组 3	组 4	组 5	组 6	组 7
1.0	0.112	0.106	0.109	0.105	0.104	0.116	0.107
1.5	0.126	0.120	0.122	0.124	0.120	0.123	0.119
2.0	0.147	0.148	0.149	0.142	0.148	0.151	0.145
2.5	0.174	0.175	0.171	0.169	0.174	0.171	0.172
3.0	0.183	0.182	0.183	0.179	0.181	0.181	0.188
3.5	0.194	0.195	0.196	0.182	0.183	0.187	0.188
4.0	0.194	0.184	0.190	0.186	0.183	0.183	0.190

4.5	0.200	0.195	0.201	0.193	0.189	0.189	0.192
5.0	0.209	0.205	0.206	0.197	0.202	0.192	0.200

表 2-10 DUSP26(186R-L)在不同底物浓度测定结果

每分钟吸光度差值							
浓度							
(mM)	组 1	组 2	组 3	组 4	组 5	组 6	组 7
1.0	0.035	0.035	0.025	0.026	0.032	0.04	0.013
1.5	0.046	0.047	0.036	0.045	0.048	0.054	0.028
2.0	0.053	0.056	0.047	0.053	0.053	0.06	0.038
2.5	0.064	0.065	0.055	0.062	0.064	0.07	0.044
3.0	0.07	0.069	0.059	0.068	0.067	0.073	0.051
3.5	0.073	0.078	0.065	0.067	0.064	0.075	0.052
4.0	0.081	0.088	0.07	0.078	0.083	0.08	0.06
4.5	0.084	0.085	0.07	0.085	0.076	0.1	0.064
5.0	0.087	0.083	0.076	0.08	0.083	0.085	0.06

所得结果中的速度 v 用每分钟吸光度差值来表示, 底物浓度用每个底物设定的 C 来表示。数据依据 Michaelis-Menten 公式(公式 1), 用 Graphpad 软件以 $1/V$ 为对 $1/[S]$ 作 Lineweaver-Burk 双倒数法作图。从图上读出 $-1/K_m$ 值, 以及每个模拟曲线的 R^2 值, 在 R^2 值达到 0.9 以上时判断为数据可靠, 选择的底物浓度区间为有效范围。得到的双倒数图为图 2-6 所示, DUSP26, DUSP26 (R186Q) 和 DUSP26 (R186L) 对应的 R^2 值分别 0.982、0.9773 和 0.9813 均为可信的范围, 从双倒数图上测定的 DUSP26, DUSP26 (R186Q) 和 DUSP26 (R186L) 的 K_m 值分别为 4.3, 26.27 和 135.6 (mM)。

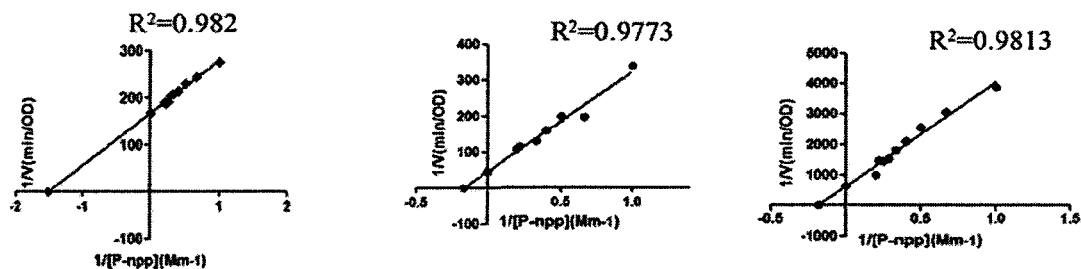


图 2-6. DUSP26, DUSP26 (R186Q)以及 DUSP26 (R186L)的底物浓度与反应速度的双倒数图

3.3.5 结果与讨论

I. DUSP26发挥最大催化活性反应体系的pH为7.4，温度为310 K。从测定的数据来看，人体内的DUSP26显示出最大反应活性。

II. 前期研究发现已测定晶体结构的DUSP26催化结构域几乎没有使P-NPP去磷酸反应活性，表明N端的氨基酸残基是DUSP26实现去磷酸反应不可缺少的。本项研究的结果证明，DUSP26整体具有最高活性。DUSP26 (1-190)和DUSP26 (35-211) 的活性数据证明DUSP26缺失C端分子间相互作用部分和部分N端1-34残基后，酶活性降低，依然具有整体蛋白60%左右的催化活性。DUSP26 (35-190)的活性和DUSP26(1-190)和DUSP26 (35-211)相似，表明DUSP26的C端不是影响酶活性的关键因素。而DUSP26 (35-185)的明显低于这4个的活性，表明Arg186缺失会导致DUSP26的失活。这些实验数据证明在对DUSP26的结构研究中推测的Arg186是控制DUSP26活性的分子开关是准确的。

III. K_m 等于酶促反应速度达最大值一半时的底物浓度，是表征酶和底物亲和能力大小的参数。 K_m 值越小，则酶与底物的亲和力越大；反之，则越小。以 P-NPP 为底物测得 DUSP26(野生型)，DUSP26 (R186Q) 和 DUSP26 (R186L)的 K_m 值分别为 4.3, 26.27 和 135.6 (mM)，证明当 Arg186 分别突变为谷氨酰胺或亮氨酸后，DUSP26 对 P-NPP 的亲和力依次显著降低。其原因是 DUSP26 在反应中，PTP-loop 转变为开放型结构才能实现酶和底物的结合，此时 186 位的氨基酸残基与 PTP-loop 形成氢键可以稳定开放型结构，谷氨酰胺残基由于侧链比精氨酸短，能给予 PTP-loop 开放型结构稳定性贡献比精氨酸要小，因此对 P-NPP 的亲和力大幅减小，而亮氨酸不具备这一能力，PTP-loop 转变为开放型结构更不稳定，更不利于 P-NPP 与 DUSP26，所以 K_m 数值比 DUSP26 和 DUSP26(R186Q)显著性增大，从酶促动力学研究验证结果了 Arg186 是 DUSP26 的分子开关。

第三章 计算机辅助药物筛选和小分子抑制活性验证

本节内容是利用Accelrys公司的专业生命科学分子模拟软件Discovery Studio 3.1, 通过同源建模构建DUSP26活性构象的三维结构, 以包含Arg186和PTP-loop的区域为靶位点构建药效团筛选模型, 对化合物库中的各个化合物开展虚拟筛选, 构建靶向DUSP26的小分子抑制剂的候选化合物库, 而后购买这些化合物, 开展其对DUSP26抑制活性的验证。

第一节 DUSP26抑制剂药效团模型的建立及虚拟筛选

1.1. 材料与方法

1.1.1. DUSP26活性构象的同源建模

由于到目前为止仍没有 DUSP26 活性构象晶体结构的报道, 本研究首先利用 Discovery Studio 3.1(Accelrys Inc.)中的同源建模模块构建了 DUSP26 活性构象。DUSP26 的氨基酸序列来源于 UniProKB (ID: Q9BV47-1)^[26-28]。我们利用 PDB-BLAST 服务进行序列相似性搜索以得到可以提供 DUSP26 PTP-loop 活性构象的最佳晶体结构模板。在所有搜索到的含有 PTP-loop 活性构象的 DUSP 家族晶体结构中, DUSP13 和 DUSP27 与 DUSP26 有最高的序列同源性, 分别为 71% 和 68.6%。DUSP13 是单体结构而 DUSP27 是二聚体结构, 是选择单体的 DUSP13 为模板呢还是选择二聚体的 DUSP27 为模板呢? 我们做了 DUSP26 的离心沉降实验, 证明 DUSP26 在溶液中是单体的形式存在的。最终选择 DUSP13 晶体结构^[29]的作为模板, 其分辨率为 2.30Å。利用 Discovery Studio 3.1 中的序列分析模块将选定的模板序列氨基酸和 DUSP26 进行序列比对, 然后对两条氨基酸序列的叠合结果进行手动优化。以优化后的序列比对结果做为输入, 我们利用 Discovery Studio 3.1 中的同源建模模块构建包含 PTP-loop 活性构象的 DUSP26 催化结构域的晶体结构模型。于此同时, 在同源建模过程中我们开启了优化 loop 的功能, 并将“number of models”设为 5。最终构建了 30 个模型, 我们从中选取具有最低 Probability Density Functions (PDF)总能量的模型利用 Profiles-3D 进行优化。最后利用 Verify-3D 对同源建模得到的模型进行优化。

1.1.2 DUSP26 小分子抑制剂药效团模型的构建

为了更准确的构建 DUSP26 小分子抑制剂的药效团模型, 我们首先将 DUSP13 与构建的 DUSP26 的结构进行了叠合, 叠合结果发现 DUSP26 的 PTP-loop 及其周围氨基酸残基比 DUSP13 相应的氨基酸残基疏水性较高, 且 DUSP26 底物结合位点相比于 DUSP13 的底物结合位点, 有一个更深的空穴, 可利用此空穴和 DUSP26 PTP-loop 及其周围氨基酸残基疏水性较高的特点设计 DUSP26 特异性小分子抑制剂。

利用 Discovery Studio 3.1 (Accelrys, San Diego, CA, USA)的“Interaction

Generation”药效团构建模块,以 DUSP26 活性构象的三维立体结构作为输入文件,产生基于受体的药效团模型。在本研究中产生基于受体的药效团模型而不是基于配体产生药效团模型,是因为到目前为止已报道的 DUSP26 小分子抑制剂种类和数量都非常得少,无法用于构建药效团模型。利用 Discovery Studio 3.1 对 DUSP26 活性构象立体结构进行加氢和加水分子的处理。亲脂性位点密度参数设为 15,极性位点参数设为 20。Interaction Generation 模块可以识别活性位点中所有可能和配体相互作用的作用位点。去除那些离 PTP-loop 及特异性深穴较远的作用位点,仅保留和关键性氨基酸残基相互作用的作用位点,然后依据和受体的相互作用模式对所有的作用位点进行聚类,最后得到可用于虚拟筛选的药效团模型。

1.1.3 基于药效团模型的虚拟筛选

把最后构建好的药效团模型作为 3D 提问输入对大型化合物数据库进行高通量虚拟筛选,以期得到靶向 DUSP26 活性位点的小分子抑制剂。仅保留那些匹配一半以上药效特征元素的化合物。这些化合物再次通过 Lipinski 规则进行过滤,以保障其具有类药性。

1.1.4 基于分子对接的虚拟筛选

所有的对接研究都是利用 GOLD4.0^[30]进行对接的。GOLD 采取遗传算法把柔性的小分子对接到蛋白质的结合位点中。在对接研究中,采用同样的 DUSP26 的活性构象的三维结构。对接中采用的是 Charmm 力场。对接位点定义为一个以活性位点为中心的半径 10Å 的球形,这个球形足以覆盖 DUSP26 底物结合位点的关键氨基酸残基。为了选取打分函数和对接参数,本研究将 P-NPP(DUSP26 活性测试中所用的底物)对接到 DUSP26 活性位点,以对接构象是否满足催化机制为依据进行打分函数的选择和参数优化。

1.2 结果与讨论

1.2.1 同源建模法构建 DUSP26 活性型结构

已解析的 DUSP26(61-211)形成非活性构象,且其 1-60 段氨基酸序列的三维构象未知。本研究是研发靶向 DUSP26 活性位点的小分子抑制剂,所以在本研究中首先要构建 DUSP26 活性构象的三维立体结构。以 DUSP26 的氨基酸序列,利用 blast 方法对蛋白质结构数据库(PDB)进行广泛的搜索,结果得到 DUSP13 是 DUSP26 高同源性的蛋白结晶。DUSP13 是单体结构而 DUSP27 是二聚体结构,是选择单体的 DUSP13 为模板呢还是选择二聚体的 DUSP27 为模板呢?依据 DUSP26 的 C 端部分是影响酶活性的关键点,所以我们选择了分辨率为 2.30Å 的 DUSP13 晶体结构(PDB code: 2PQ5)作为模板进行同源建模。

因为 DUSP26 中 N 端 60 个氨基酸的活性构象未知, 我们首先利用软件 PsiPred 对 DUSP13 (1-198)和 DUSP26 进行了二级结构的预测, 接下来, 我们将预测的二级结构与已经结晶的高级结构进行了比对, 比对结果见表 1-1。从表 1-1 中, 我们可以看到 PsiPred 预测 DUSP13 (1-198)由 7 个 α -螺旋和 5 个 β -折叠组成, DUSP26 由 9 个 α -螺旋和 3 个折叠组成, 其中 DUSP26 (61-211)由 7 个 α -螺旋和 3 个折叠组成, 预测 N 端 60 个氨基酸残基由 2 个 α -螺旋组成, 且组成二级结构的序列和已经解析的高级结构高度吻合, 说明 PsiPred 预测准确度非常高。DUSP26N 端 60 个氨基酸残基从第 42 个氨基酸残基开始相对应的 α -螺旋和 DUSP13 N 端第一个 α -螺旋相对应, 所以在本研究中我们选择 DUSP26(42-211)这段序列进行同源建模。

表 1-1. DUSP13 和 DUSP26 二级结构预测氨基酸序列和实际结晶序列比对结果。

二级结构	DUSP13		DUSP26	
	PsiPred 预测	蛋白结晶	PsiPred 预测	蛋白结晶
α 1	L28-R38	L28-V37	N5-S18	未结晶
α 2	A58-A61	A58-R62	V45-Y53	未结晶
α 3	K64-Q69	K64-Q69	Q74-A77	Q74-A77
α 4	S103-V104	K90-T92	R80-R85	R80-R85
α 5	F116-L127	S113-S128	S126-I127	T106-L109
α 6	R144-C156	R144-E157	F130-L141	S127-Q143
α 7	L161-A170	L161-Q169	R158-Y170	S157-Y170
α 8	S178-T195	S178-R193	L175-D184	L175-D184
α 9	不存在	不存在	R192-L209	G193-Q207
β 1	未预测	I46-V49	未预测	H61-V65
β 2	L53-L55	L53-D57	未预测	L69-D73
β 3	H75-N78	H74-A78	H90-N94	H90-N94
β 4	L97-A104	E98-I102	R102-A108	R112-V116
β 5	V134-H137	V134-C138	I148-H151	I148-C152

依据表图 1-1 显示了 DUSP13 (25-193)和 DUSP26 (42-211)催化结构域氨基酸序列的比对结果, 以优化后的序列比对结果做为输入, 我们利用 Discovery Studio 3.1 中的同源建模模块构建包含 PTP-loop 活性构象的 DUSP26 催化结构域的晶体结构模型(图 1-1A)。然后利用 Verify-3D 模块进行模型的验证, 验证结果见图 1-2B 和图 1-1C, 从图 1-1B 中我们可以看到每个氨基酸残基的打分都高于 0, 说明构建的 DUSP26 (42-211)的高级结构中氨基酸残基的分布是合理的。从 DUSP26 (42-211)的三维结构的拉式图中(图 1-1C), 我们可以看到 98%以上的氨基酸残基都处于合理二面角分布区域。说明通过同源建模构建的 DUSP26 (42-211)的活性型三维结构是合理的。最终构建的 DUSP26 (42-211)的活性构象由 7 个 α -螺旋组成, 42-54 组成一个 N 端 α -螺旋, 此 α -螺旋和 DUSP26(42-211)其它 α -螺旋形成分

子间相互作用且此 α -螺旋在保持酶的活性中是必需的；C 端 191-211 组成的 α -螺旋向内折叠形成分子间的相互作用，因为此 α -螺旋形成分子间相互作用，导致 186-190 这段 loop 上的氨基酸残基与 PTP-loop 上的氨基酸残基形成氢键作用，起到稳定 PTP-loop 活性构象的功能，此外构建的模型还包含 5 个 β -折叠和若干个 loop。从活性型 DUSP26 的结构中可见 Arg186 和 PTP-loop 形成了多重氢键。

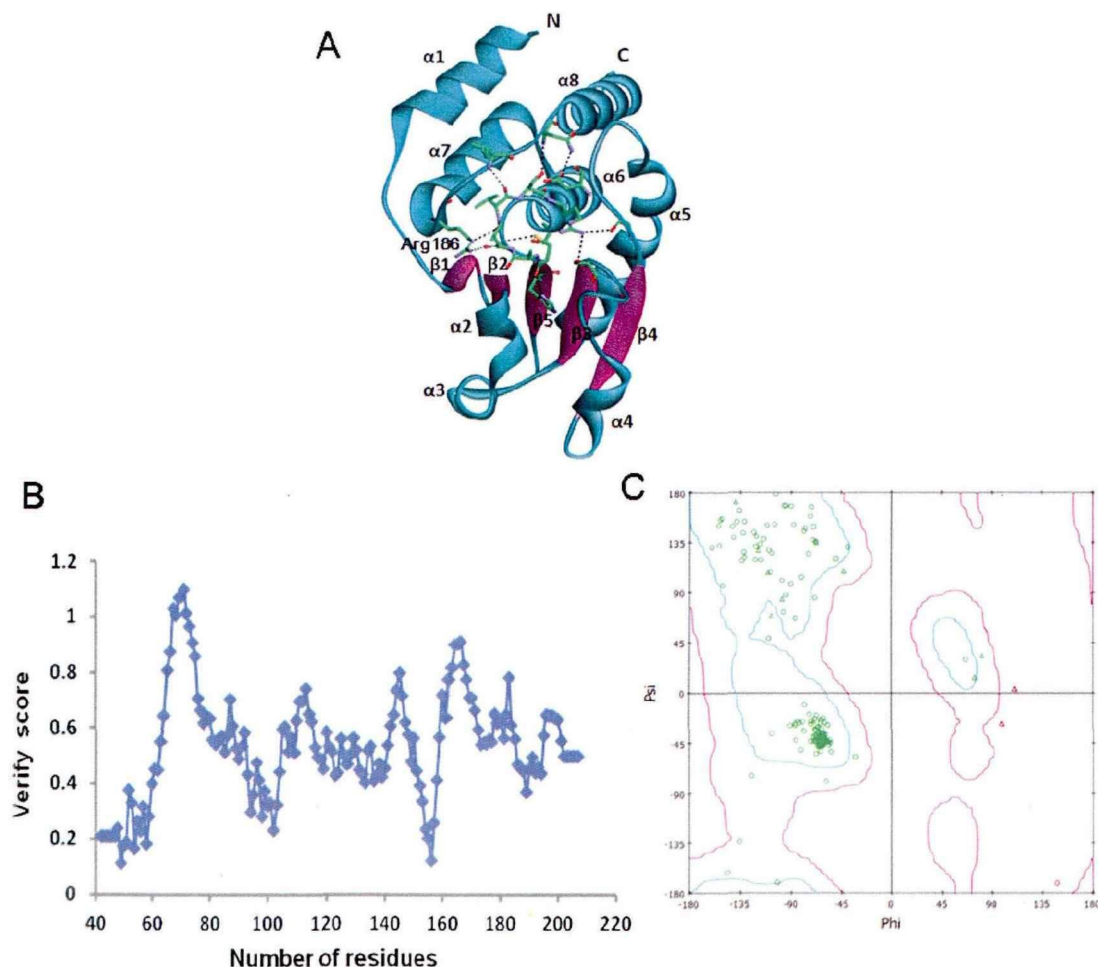


图 1-1. A. 同源模建的 DUSP26 活性构象的空间结构。B. Verify-3D 模块对 DUSP26(42-211) 模型的验证结果。C. 同源模建的 DUSP26 活性构象的拉式图。

1.2.2 基于 DUSP26 活性构象构建药效团模型

为了更准确的构建 DUSP26 小分子抑制剂的药效团模型，我们首先将 DUSP13 与构建的 DUSP26 的结构进行了叠合，结果见图 1-2。从中可以看到 DUSP26 的 PTP-loop(Val154 和 Val156)及其周围氨基酸残基(Ile189)比 DUSP13 相应的氨基酸残基(Met140、Val42 和 Cys175)疏水性高。

接下来我们分析了 DUSP26 底物结合位点周围空穴的分布情况，从图 1-3 中，我们看到 DUSP26 底物结合位点相比于 DUSP13 的底物结合位点，有一个更深

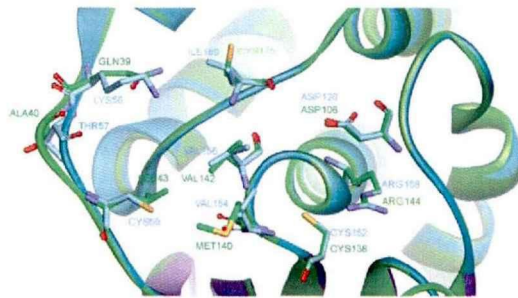


图 1-2. DUSP26 与 DUSP13 的叠合结果图。蓝色表示的是 DUSP26，绿色条带表示的是 DUSP13。

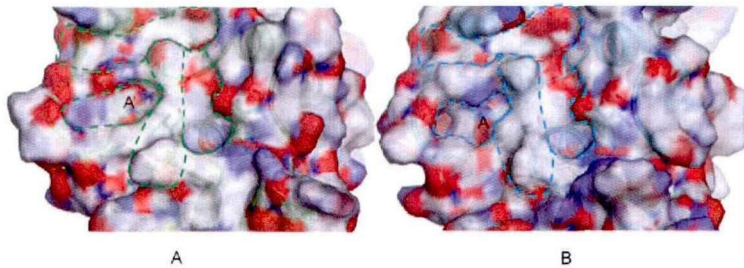


图 1-3. DUSP13 和 DUSP26 的表面电荷及表面空穴分布图。A，DUSP13 的表面电荷和表面空穴分布。B，DUSP26 的表面电荷和表面空穴分布。红色代表负电荷分布，蓝色代表正电荷分布，白色代表中性。

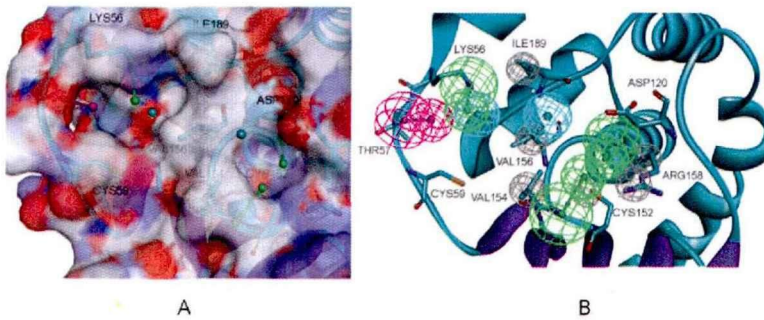


图 1-4. 可用于虚拟筛选的药效团模型。

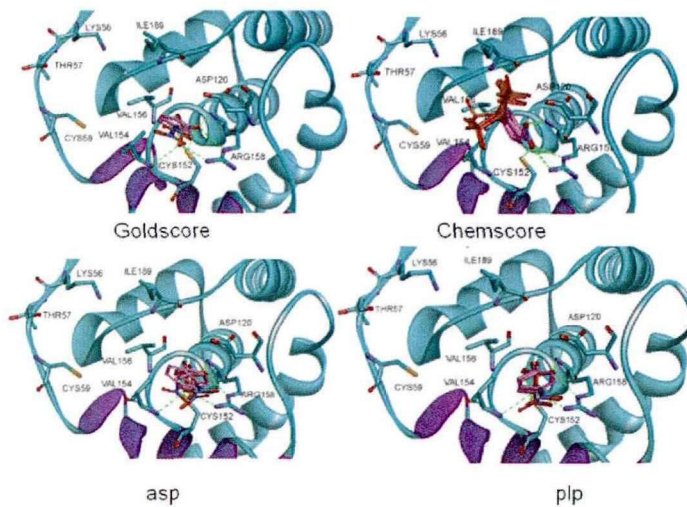


图 1-5. 四种不同打分函数得到的对接结果。

的空穴 A，可利用此空穴和 DUSP26 PTP-loop 及其周围氨基酸残基疏水性较高的特点设计 DUSP26 特异性小分子抑制剂。

因为到目前为止已报道的 DUSP26 小分子抑制剂种类和数量都非常得少，无法用于构建药效团模型。所以，在本研究中利用 Discovery Studio 3.1 的“Interaction Generation”药效团构建模块，以 DUSP26 活性构象的三维立体结构作为输入文件，产生了基于受体的药效团模型。Interaction Generation 模块可以识别活性位点中所有可能和配体相互作用的作用位点，此模型太复杂，基于前文提到的利用 DUSP26 三维结构表面特有的空穴和疏水性氨基酸残基对此模型进行简化，仅保留与关键氨基酸残基相对应的药效特征元素，得到药效团模型。其中包含三个氢键受体，分别和 Val154, Arg158 和 Lys56 相互作用；与 Thr57 相互作用的一个氢键供体；两个疏水特征元素，与 Ile189, Val154 和 Val156 相互作用，此外还包含四个排斥球(图 1-4)。

1.2.3 基于药效团模型的虚拟筛选

把最后构建好的药效团模型作为 3D 提问输入对中国医学科学院医药生物技术研究所微生物来源化合物库和百灵威化合物库进行高通量虚拟筛选，以期得到靶向 DUSP26 活性位点的小分子抑制剂。虚拟筛选中，仅保留那些匹配一半以上药效特征元素的化合物，共有 16453 个化合物通过此轮筛选。这些化合物再次通过 Lipinski's rule of five 进行过滤，以保障其具有类药性，最后得到个 5432 化合物用于后续的对接研究。

1.2.4 基于分子对接的虚拟筛选

所有的对接研究都是利用 GOLD4.0^[30]进行。GOLD 采取遗传算法把柔性的小分子对接到蛋白质的结合位点中。在对接研究中，采用同样的 DUSP26 的活性构象的三维结构。对接中采用的是 Charmm force field。对接位点定义为一个以活性位点为中心的半径 10Å 的球形，这个球形足以覆盖 DUSP26 关键的底物结合位点。为了选取打分函数和对接参数，本研究将 P-NPP(DUSP26 活性测试中所用的底物)对接到 DUSP26 活性位点，以是否满足催化机制为依据进行打分函数的选择和参数优化。不同打分函数和参数组合得到的对接效果见图 1-5。

从图中我们可以看到除了 ChemScore 打分得到的对接结果是完全错误的，其它的打分函数和对接结果得到的对接结果都满足 DUSP26 催化 P-NPP 的催化机制，所以本研究选择了除 ChemScore 之外的三种打分函数进行排序。共发现 232 种化合物可以作为候选品开展抑制 DUSP26 的研究。

第二节 候选化合物生物活性测试研究

2.1 实验材料

2.1.1 实验试剂

二甲基亚砜(DMSO)、5 mM P-NPP、50 mM Tris-HCl(pH 7.4)、0.2 M NaOH、700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DUSP26、待测定的小分子化合物

2.1.2 实验器材

KJ 酶标仪; 恒温摇床; 96 孔板

2.2 实验方法

2.2.1 小分子抑制剂的筛选

在第一轮小分子化合物抑制活性筛选测试中, 首先将被筛选的具有潜在抑制作用的小分子化合物用 DMSO 溶解, 并稀释成浓度 1 mg/mL 待用。在含有 96.0 μL 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10.0 μL 浓度为 700.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DUSP26 蛋白液构成的反应体系中加入 4.0 μL 1mg/mL 待测化合物, 将酶与底物在 310 K 下孵育 15 分钟后, 加入 70.0 μL 5 mM P-NPP, 在 310 K 下反应 30 分钟后, 再加入 120 μL 0.2 M NaOH 终止反应。摇匀 96 孔板中的溶液, 在酶标仪 405nm 测定 A_{405} 。通过计算抑制率(公式 2), 确定加入的化合物对 DUSP26 是否存在抑制作用, 进而筛选出具有抑制效果的化合物。

在反应体系中, 以不添加酶所测的反应体系的 A_{405} 值为空白对照, 以不添加待筛选化合物的正常酶反应体系为阴性对照。

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{样品的 } A_{405} \text{ 值} - \text{空白对照 1 的 } A_{405} \text{ 值}}{\text{阴性对照的 } A_{405} \text{ 值} - \text{空白对照 2 的 } A_{405} \text{ 值}}\right) \times 100\% \quad (\text{公式 2})$$

(1)样品组实验体系:

Tris-HCl (pH7.4; 50 mM)	96.0 μL
DUSP26 (700.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	10.0 μL
P-NPP (5 mM)	70.0 μL
候选化合物(1 mg/mL)	4.0 μL
NaOH (0.2 M)	120.0 μL

(2)空白对照1组实验体系:

Tris-HCl (pH7.4; 50 mM)	96.0 μL
ddH ₂ O	10.0 μL

P-NPP (5 mM)	70.0 μL
候选化合物(1mg/mL)	4.0 μL
NaOH (0.2 M)	120.0 μL

(3)阴性对照组实验体系(无抑制剂)

Tris-HCl (pH7.4; 50 mM)	100.0 μL
DUSP26 (700.0 $\mu\text{g/mL}$)	10.0 μL
P-NPP (5 mM)	70.0 μL
NaOH (0.2 M)	120.0 μL

(4)空白对照2组实验体系:

Tris-HCl (pH7.4; 50 mM)	96.0 μL
ddH ₂ O	10.0 μL
P-NPP (5 mM)	70.0 μL
NaOH (0.2 M)	120.0 μL

2.2.2 小分子抑制剂IC₅₀的测定

第二轮测试对第一轮测试发现的具有高抑制率的小分子化合物开展IC₅₀值的测试。整个反应是在小分子抑制剂存在的情况下，DUSP26与底物P-NPP反应，反应体系为300 μL ，每种抑制剂浓度3组平行实验。操作步骤如下表所示。

表3-2. 抑制剂IC₅₀测定体系

编号	DUSP26(μL)	抑制剂(mg/mL)	p-NPP(μL)	反应时间(min)
1	10	1.0000	70	30
2	10	0.8000	70	30
3	10	0.7000	70	30
5	10	0.6000	70	30
6	10	0.5000	70	30
7	10	0.4000	70	30
8	10	0.2500	70	30
9	10	0.1250	70	30
10	10	0.0625	70	30
11	10	0.03125	70	30

*p-NPP初始浓度为5 mM, 反应在310 K进行

2.3 结果与讨论

2.3.1 小分子抑制剂筛选结果

第一轮筛选所用的化合物浓度都是22.2 $\mu\text{g/mL}$, 结果显示筛选到的232个化合物中, 8个化合物具有抑制DUSP26的活性。抑制率如表3-3所示, 化合物结构式如图3-6所示。这些骨架的化合物之前没有作为DUSP26的抑制剂被报道过。

表 3-3. 8个化合物抑制率

Compound	inhibitory rate at 22.2 $\mu\text{g/mL}$
H6	100%
B5	100%
F6	98.9%
H5	77%
B1	70.4%
F8	55.8%
E6	40.0%
A5	38.2%

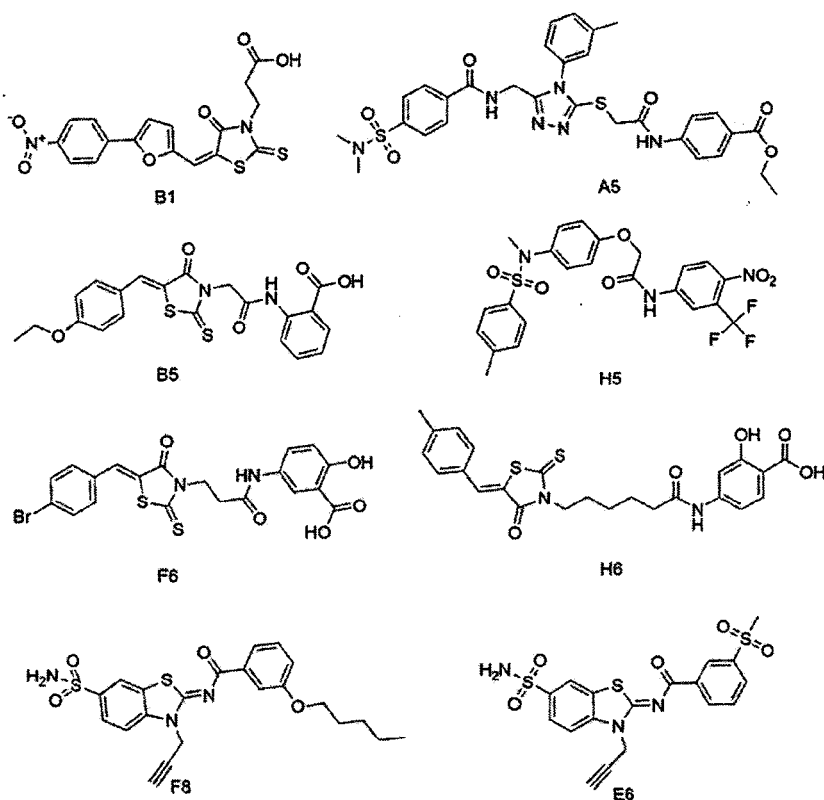


图3-6. 具有抑制DUSP26活性的化合物的结构

2.3.2 候选化合物IC₅₀值测定结果

依据候选化合物的抑制率测定了H6、B5、F6和H5的IC₅₀值。由于H5, F8, E6和A5的抑制率显著小于前4种化合物, 未开展IC₅₀的测定。测定的数据如下:

H6

浓 度	1.0	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.25	0.125	0.0625	0.03125
($\mu\text{g/mL}$)										
样品的	0.127	0.136	0.140	0.139	0.128	0.139	0.163	0.211	0.212	0.207
A ₄₀₅	0.119	0.131	0.134	0.128	0.128	0.136	0.224	0.212	0.213	0.213
	0.123	0.134	0.137	0.136	0.128	0.138	0.194	0.211	0.213	0.210
空白对	0.128	0.115	0.112	0.111	0.108	0.116	0.108	0.122	0.118	0.118
照 1 的	0.125	0.12	0.115	0.111	0.11	0.108	0.106	0.123	0.122	0.124
A ₄₀₅	0.126	0.118	0.114	0.111	0.109	0.112	0.107	1.123	0.120	0.121
阴性对照的A ₄₀₅			0.212	0.211	0.212					
空白对照2的A ₄₀₅			0.115	0.118	0.116					

B5

浓 度	1.0	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.25	0.125	0.0625	0.03125
($\mu\text{g/mL}$)										
样品的	0.144	0.143	0.140	0.139	0.136	0.137	0.135	0.134	0.202	0.208
A ₄₀₅	0.145	0.142	0.143	0.137	0.136	0.136	0.135	0.134	0.202	0.193
	0.144	0.143	0.142	0.138	0.136	0.137	0.135	0.134	0.203	0.200
空空白	0.120	0.121	0.12	0.110	0.109	0.106	0.106	0.097	0.100	0.100
对照 1	0.118	0.123	0.112	0.109	0.114	0.103	0.102	0.099	0.090	0.090
的A ₄₀₅	0.119	0.121	0.116	0.109	0.109	0.104	0.104	0.098	0.095	0.095
阴性对照的A ₄₀₅			0.152	0.155	0.151					
空白对照2的A ₄₀₅			0.099	0.098	0.100					

F6

浓 度 ($\mu\text{g/mL}$)	1.0	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.25	0.125	0.0625	0.03125
样品的 A_{405}	0.135	0.134	0.144	0.146	0.142	0.144	0.156	0.160	0.170	0.180
	0.139	0.135	0.144	0.135	0.142	0.144	0.156	0.163	0.172	0.171
	0.138	0.134	0.141	0.136	0.145	0.153	0.152	0.163	0.168	0.169
空白对 照 1 的 A_{405}	0.114	0.108	0.106	0.106	0.11	0.112	0.104	0.103	0.102	0.100
	0.109	0.107	0.107	0.104	0.109	0.107	0.104	0.102	0.102	0.101
	0.113	0.106	0.107	0.105	0.109	0.107	0.105	0.103	0.102	0.101
阴性对照的 A_{405}			0.168	0.165	0.169					
空白对照2的 A_{405}			0.104	0.104	0.103					

H5

浓 度 ($\mu\text{g/mL}$)	1.0	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.25	0.125	0.0625	0.03125
样品的 A_{405}	0.315	0.281	0.251	0.225	0.192	0.177	0.142	0.117	0.101	0.094
	0.284	0.272	0.249	0.128	0.189	0.176	0.153	0.112	0.101	0.094
	0.293	0.277	0.247	0.241	0.189	0.178	0.152	0.115	0.099	0.092
空白对 照 1 的 A_{405}	0.299	0.253	0.112	0.216	0.200	0.184	0.175	0.138	0.128	0.123
	0.315	0.257	0.115	0.203	0.205	0.189	0.176	0.146	0.129	0.125
	0.306	0.243	0.114	0.211	0.211	0.193	0.178	0.156	0.140	0.129
阴性对照的 A_{405}			0.115	0.133	0.131					
空白对照2的 A_{405}			0.087	0.085	0.085					

以抑制剂浓度对数为横坐标,以相应浓度下抑制率为纵坐标,利用*Graphpad*软件,绘制化合物的抑制率-底物浓度对数曲线,从曲线图上读出各个抑制剂的 IC_{50} 值。4种化合物的IUPAC名称如下:

H6:

2-hydroxy-4-{6-[(5Z)-5-[(4-methylphenyl)methylidene]-4-oxo-2-sulfanylidene-1,3-thiazolidin-3-yl]hexanamido}benzoic acid

H5:

2-{4-[N-methyl(4-methylphenyl)sulfonamido]phenoxy}-N-[4-nitro-3-(trifluoromethyl)phenyl]acetamide

B5:

2-{2-[(5Z)-5-[(4-ethoxyphenyl)methylidene]-4-oxo-2-sulfanylidene-1,3-thiazolidin-3-yl]acetamido}benzoic acid

F6:

5-{3-[(5Z)-5-[(4-bromophenyl)methylidene]-4-oxo-2-sulfanylidene-1,3-thiazolidin-3-yl]propanamido}-2-hydroxybenzoic acid

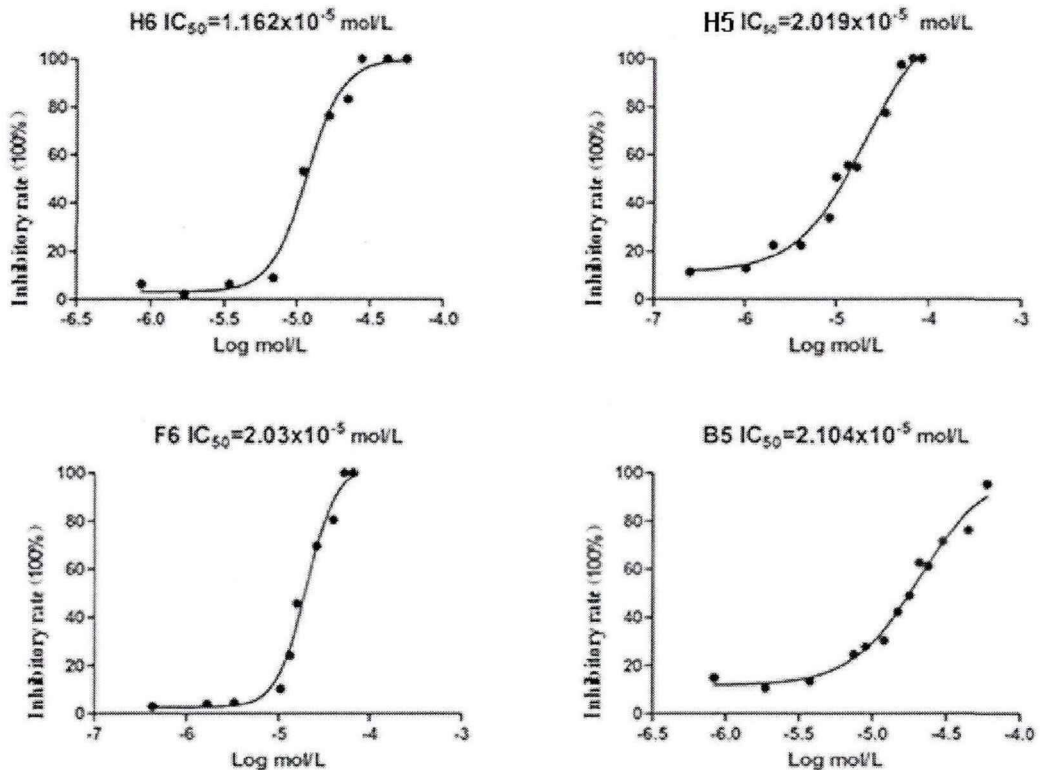


图 1-12 四种小分子化合物的抑制率-底物浓度对数曲线。

2.3.3 结果与讨论

通过第一轮对潜在抑制活性小分子化合物的筛选，我们从224个候选化合物中筛选到了8个具有较高抑制率的小分子化合物，随后测出这8个小分子化合物中4个具有高抑制率的小分子的 IC_{50} ，分别为11.62、21.04、20.3、20.19 μ M。 IC_{50} 是指反应被抑制一半时抑制剂的浓度， IC_{50} 值可以用来衡量抑制剂的抑制能力，即抑制能力越强，该数值越低。从酶抑制动力学研究确定的化合物

2-hydroxy-4-{6-[(5Z)-5-[(4-methylphenyl)methylidene]-4-oxo-2-sulfanylidene-1,3-thiazolidin-3-yl]hexanamido}benzoic acid (H6)的 IC_{50} 为11.62 μ M, 低于已报道DUSP26的抑制剂NSC-878771 (IC_{50} =16.67 μ M)。

第一篇研究结果

1. 构建了以 DUSP26 及其四种不同长度蛋白的原核表达系, 成功表达了相应的蛋白质, 从酶促动力学研究的结果显示, DUSP26 在 pH7.4 和 310 K 环境中具有最大活性, Arg186 的缺失能导致 DUSP26 的失活。对 Arg186 的突变体对 P-NPP 的亲合性的测定结果表明, Arg186 具有稳定 PTP-loop 转化为高能量状态下的开放性构型的功能, 证明了包含 Arg186 的 PTP-loop 的区域是筛选小分子抑制剂的位点。

2. 利用计算机辅助药物虚拟筛选, 获得的候选化合物中酶抑制动力学验证发现 4 个化合物显示较好抑制活性。IC₅₀ 值分别为 11.62、21.04、20.3、20.19 (μM)。最大抑制活性的化合物的 IUPAC 名称为 2-hydroxy-4-{6-[(5Z)-5-[(4-methylphenyl)methylidene]-4-oxo-2-sulfanylidene-1,3-thiazolidin-3-yl]hexanamido}benzoic acid, 它的 IC₅₀ 低于已报道 DUSP26 的抑制剂 NSC-878771(IC₅₀=16.67 μM), 其余 3 个的 IC₅₀ 值接近于 NSC-878771, 从计算机辅助药物筛选的结果也证明推测的 DUSP26 反应机理是准确的。2-hydroxy-4-{6-[(5Z)-5-[(4-methylphenyl)methylidene]-4-oxo-2-sulfanylidene-1,3-thiazolidin-3-yl]hexanamido}benzoic acid 可以作为靶向 DUSP26 的抗肿瘤先导化合物开展进一步研究。

参考文献

- [1] 朱伟; 陈可冀; 徐筱杰; 计算机药物虚拟筛选技术在中医药领域中的应用前景. 中国中西医结合杂志. 2007-27-3.
- [2] Burbaum J, Tobal GM. Proteomics in drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2002; 6: 427.
- [3] Ferrara P, Gohlke H, Price DJ, Klebe G, Brooks CL. Assessing scoring functions for protein-ligand interactions. *J Med Chem*. 2004; 47: 3032-3047.
- [4] 袁身刚, 计算机辅助药物设计, 科学. 1995; 4: 28-31.
- [5] 稽汝运, 唐赞, 戎锁宝, 陈凯先. 计算机辅助药物设计研究. 中国药学杂志. 1997, 32, 647-677.
- [6] 稽汝运. 漫谈药物学与计算机辅助药物设计. *Science and Technique in East of China*. 1996, 26-27.
- [7] 徐筱杰, 候延军, 乔学斌. 计算机辅助药物分子设计. 北京; 化学工业出版社, 2004: 12-15.
- [8] Dravs J. Drug discovery: A history perspective. *Science*. 2002; 287: 1960.
- [9] Hansch C, Fujita T. ρ - σ - π analysis: a method for the correlation of biological activity and chemical structure. *J Am Chem Soc* 1964;86(8):1616-1626.
- [10] Tang Z, Chen K-X, Ji Ry. De novo in CADD. 1995; 22: 1-6.
- [11] Good AC, Krystek SR, Mason JS. High-throughput and virtual screening: core lead discovery technologies move towards integration. *Drug Discov Today*. 2000; 5: 61-69.
- [12] 廉德君, 许根俊. 蛋白质结构与功能中的结构域[J]. 生物化学与生物物理进展. 1997; 06.
- [13] 史宁, 韦林毅, 吴久鸿. 小分子抗肿瘤蛋白激酶抑制剂的研究进展. 中国药学杂志. 2011; 46: 23.
- [14] Millet R, Domarkas J, Houssin R, et al. Potent and selective farnesyl transferase inhibitors. *J Med Chem*. 2004; 47: 6812.
- [15] Hunter T. *Cell*. 1995; 80: 225-236.
- [16] Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Osterman A, Godzik HT, Dixon J, Mustelin T. *Cell*. 2004; 117: 699-711
- [17] Hu Y, Mivechi NF, Association and Regulation of Heart Shock Transcription Factor 4b with both Extracellular Signal-Regulated Kinase Mitogen-Activated Protein Kinase and Dual-Specificity Tyrosine phosphate DUSP26. *Mol Cell Biol*. 2006; 3282-3294.
- [18] Yu W, Imoto I, Inoue J, Onda M, Emi M, Inazawa JA. Novel amplification target, DUSP26, promote sanaplastic thyroid cancer cell growth by inhibiting p38 MAPK activity. *Oncogene*. 2007; 26: 1178-1187.
- [19] Sherman SI. Thyroid carcinoma. *Lancet*. 2003; 361: 501-511.
- [20] Takeda T, Inaba H, Yamazaki M, et al. Tumor-specific gene therapy for undifferentiated thyroid carcinoma utilizing the telomerase reverse transcriptase promoter. *Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88: 3531-3538.
- [21] Pronker ES, Weenen TC, Commandeur HR, Osterhaus AD, Claassen HJ. The gold industry standard for risk and cost of drug and vaccine development revisited. *Vaccine*. 2011; 29: 5846-5849.
- [22] 陈国锐, 王深明. 甲状腺外科. 北京: 人们卫生出版社. 240-316.
- [23] 燕山, 詹维伟, 周建桥. 甲状腺和甲状旁腺超声影像学. 北京: 科学技术文献出版社. 171-208.

- [24] Kebebew E, Greenspan FS, Clark OH, et al. Anaplastic thyroid carcinoma. Treatment outcome and prognostic factors. *Cancer*. 2005; 103: 1330-1335.
- [25] Urciuoli P, Ghinassis S, Iavarone C, et al. Thyroid anaplastic tumor: our experience. *Chirita*. 2003; 55:835-840.
- [26] Nagayama Y, Nishihara E, Namba H, et al. Targeting the replication of adenovirus to p53-defective thyroid carcinoma with a p53-regulated Cre/loxP system. *Cancer Gene Ther*. 2001; 8: 36-44.
- [27] 连小兰. 美国《甲状腺结节和分化型甲状腺癌诊治指南(2006)》解读. *中国实用外科杂志*. 2007; 27: 933-936.
- [28] Hu Y, Mivechi NF. *Mol Cell Biol*. 2006; 26: 3282-3294
- [29] Adams PD. *Acta Cryst*. 2010; 66: 213-221.
- [30] Tanuma N, Nomura M, Kasugai I, Tsubaki Y, Takagaki K, Kawamura T, et al. Protein pHspHatase Dusp26 associates with KIF3 motor and promotes N-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Oncogene*. 2009; 28: 752-761.
- [31] Jeong DG, Cho YH, Yoon T, Kim JH, Ryu SE, Kim SJ. Crystal structure of the catalytic domain of human DUSP5, a dual specificity MAP kinase protein pHspHatase. *Proteins*. 2007; 66: 253-258.
- [32] Won EY, Xie Y, et al. High-resolution crystal structure of the catalytic domain of human dual-specificity pHspHatase 26. *Acta Crystallogr*. 2013; 69: 1160-1170.
- [33] Lokareddy RK, Bhardwaj A, Cingolani G. Atomic structure of dual-specificity pHspHatase 26, a novel p53 pHspHatase. *Biochemistry*. 2013; 52: 938-948.
- [34] Yuvaniyama J, Denu JM, Dixon JE, Saper MA. Crystal Structure of the Dual Specificity Protein phosphate VHR. *Science*. 1996; 272: 1328-1331.
- [35] <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2pq5>.
- [36] Chen L, Sung SS, Yip ML, et al. Discovery of a novel shp2 protein tyrosine phosphatase inhibitor. *Mol Pharmacol*. 2006; 70: 562-70.
- [37] Song M; Park JE, Park SG, Lee DH, Choi HK, Park BC, Ryu SE, Kim JH, Cho S. NSC-87877, inhibitor of SHP-1/2 PTPs, inhibits dual-specificity phosphatase 26 (DUSP26). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009; 381: 491-495.
- [38] Schumacher MA, Todd JL, Rice AE, Tanner KG, Denu JM. Structural Basis for the Recognition of a Bisphosphorylated MAP Kinase Peptide by Human VHR Protein Phosphatase. *Biochemistry*. 2002; 41: 3009-3017.

第二篇 人体内Tks4蛋白质的C端SH3结构域初期蛋白质结晶学研究

第一章 文献综述

人类脂肪分化细胞因子(fad49)编码一个含有911个氨基酸残基的蛋白质,包含了一个phox同源(PX)结构域和4个Src同源3(SH3)结构域^[1]。此蛋白也被称为Tks4^[2]。Tks4的缺乏会造成伪足小体的形成并且抑制细胞外基质降解^[2]。Tks4也参与肿瘤细胞产生活性氧的过程^[3-5]和白色脂肪组织的分化^[6]。人体Tks4缺乏是Frank-ter Haar 综合症的主要原因^[7]。在上皮生长因子(EGF)治疗中, Tks发生络氨酸磷酸化同时与EGF受体相联,这是细胞迁移的调控的新机制。Tks4在肿瘤细胞转移调控中可以作为一个靶点^[8]。

在静止细胞中, Tks4几乎都存在于细胞质中。在生长因子治疗应激中, Tks4至少通过两种途径转移到质膜上: Src结合位点和油脂结合PX结构域。PX结构域可识别膜上的油脂产物磷酸肌醇3-激酶(PI 3-kinase)。PI 3-kinase催化细胞生存途径中磷酸酰肌醇-3,4,5的去磷酸化。PI 3-激酶影响了细胞生长、存活和细胞迁移等环节的下游生物信号。因此, PI 3-激酶在包含糖尿病和肿瘤在内的人体疾病中均有作用^[9]。在质膜上, Tks4是被Src 激酶通过络氨酸磷酸化磷酸化的行为被磷酸化的。然而, Tks4中酪氨酸磷酸化的作用还未知。总的来讲, Tks4对伪足小体的形成和肌动蛋白细胞骨架有作用。SH3结构域是由60个氨基酸残基与富含脯氨酸的多肽形成的蛋白复合物,是一个小的无催化作用的结构域。SH3结构域参与细胞间交流以及细胞核内核外的信号传导,同样也调节蛋白间的相互作用^[10-12]。

SH3的氨基和羧基端相互临近,说明此结构域可以在不破坏临近结构的情况下从蛋白的表面延伸出去^[13]。在人体Tk4中, PX结构域位于N端,而第四个SH3的结构域(853-911的氨基酸位置)位于C端。PX结构域与SH3的第三个结构域相结合以便位于Tks4 C端的第四个SH3的结构域与PX结构域、另外三个SH3结构域保持足够远距离,同时还能延伸到Tks4的表面^[6]。一般来讲, SH3结构域有一个由5(或6)个 β -折叠紧密包裹的以两条反平行 β -折叠组成的 β -桶状折叠。然而,少量的SH3结构域有不同的结构。比如,人体 p47 phox 的SH3结构域 A可形成一个第四和第五条 β -折叠相互交叉的二聚体结构^[17,18]。人体Tks4的SH3结构域与p47 phox 的SH3结构域(包含残基159-213)表现出 43%的氨基酸序列相似性。但是,人体Tks4的C端SH3结构域是否与人体 p47 phox 的SH3结构域一样形成一个二聚体仍然是未知的。为了了解Tks4的C-端结构域的结构与功能相互关系,本研究开展了人体内Tks4的C端SH3结构域的晶体学研究。

第二章 SH3结构域的表达、纯化、结晶化与X射线衍射数据收集

2.1 蛋白表达与纯化

2.1.1 实验材料

Hela细胞、TRIzol反转录试剂盒 (Invitrogen公司)、内切酶BamHI、EcoRI (NEB公司)、pGEX-4T-2质粒 (Amersham,England)、DNA ligase (Takara)。

2.1.2 实验方法

- (1) 按照TRIzol反转录试剂盒说明对培养好的Hela细胞进行反转录。
- (2) 将反转录获得的cDNA进行分子克隆，实验中用到的forward primer序列为：
5'-CGGGATCCTTGTATGTGGCCGTGGCCGAC-3' (BamHI的酶切位点用下划线标记)，reverse primer序列为：
5'-GGAATCCCTACGGCTTCTTTCTGATAGTTCG-3'(EcoRI酶切位点用下划线标记，终止子用斜体字标记)。以如下PCR条件开展cDNA扩增。

PCR 条件：

步骤	温度	时间
第 1 步	367 K	5 min
第 2 步	367 K	30 s
第 3 步	330 K	30 s
第 4 步	345 K	30 s
第 5 步	345 K	5 min
第 6 步	277 K	∞

第 4 步完成后转为第 2 步，重复 30 次后开始第 5 步操作

PCR产物利用1%琼脂糖电泳检测，利用胶回收试剂盒回收cDNA。

- (3) 用BamHI和EcoRI对cDNA和pGEX-4T-2载体进行酶切，然后用连接酶DNA Ligase将克隆好的DNA片段与pEGX-4T-2表达载体相连接组成重组质粒，相关反应依照第二章第一节1.2所述条件实施。
- (4) 蛋白质表达依照第二章第二节2.2.1所述条件实施。
- (5) 蛋白质纯化

4000 rpm, 15 min收集菌体，20 mL PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.3)溶液重悬，加入0.2 mL PMSF (100 mM)，

超声30 min, 35000 g, 20 min离心, 收集上清。

将Glutathione-Sepharose 4B柱用PBS缓冲溶液平衡化后, 将收集的上清液加入到柱子中, 待上清液全部流过Glutathione-Sepharose填料层后, 用PBS溶液洗去不与Glutathione-Sepharose 4B结合的蛋白质后, 用2 mL PBS溶液悬浮Glutathione-Sepharose 4B, 加入10 unit的凝血酶在293K反应12小时使得GST标签分离, 而后回收上层PBS缓冲溶液。277K下使用AKTA 蛋白纯化系统(GE医疗)中使用HiLoad 16/60 Superdex 75 prepgrade柱进行纯化, 洗脱液成分为 20 mM pH 8.0 的Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM 二硫代苏糖醇(DTT)。

2.2 蛋白质晶体的制备与X射线衍射数据的收集

2.2.1 实验材料

Amicon Ultra-15(MWCO 3000; Millipore)、MgSO₄(北京化工厂)、PEG 3350(Merck); Crystal Screen HT kit, PEG/Ion Screen kit和Index Screen kit (美国Hampton Research公司)

2.2.2 实验方法

2.2.2.1 蛋白质结晶化

(1) 将纯化的人体Tks4 C端SH3结构域蛋白用Amicon ultra-15(MWCO 3000)浓缩到近10 mg/mL。

(2) 在293K时, 采用坐滴-蒸气扩散法进行蛋白结晶。每个坐滴由1 μ l蛋白和1 μ l结晶化试剂溶液组成。美国Hampton Research公司生产的蛋白质结晶条件筛选试剂盒: Crystal Screen HT kit, PEG/Ion Screen kit和Index Screen kit用来寻找Tks4的C-端SH3结构域的结晶条件。

2.2.2.2 衍射数据收集

用微晶分离工具(Hampton Research, catalogue No.HR4-817)从获得的晶簇中分离一个维度约为0.15 \times 0.1 \times 0.05 mm的单晶, 将单晶体浸入到Paratone和石蜡油等体积混合后的低温防护剂内, 去除晶体表面的结晶化试剂溶液后, 安装上海光源(Shanghai Synchrotron Radiation Facility)的生物大分子光束线站BL17U上测定X射线衍射数据。X射线波长、相机距离、振幅和曝光时间分别为1.000 Å、200 mm、1.0°和8 s。衍射图用ADSC Quantum 315r CCD相机记录。一套完整的X射线衍射数据包含了震动角0~200°范围产生的衍射数据。

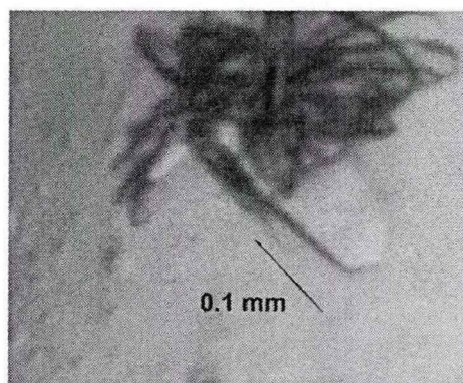
2.2.2.3. 衍射数据的处理

测定的衍射密度数据用HKL-2000软件进行处理。获得了人体内Tks4蛋白质的C端SH3结构域晶体的晶系、空间群等晶体学参数。

2.3 结果和讨论

2.3.1 人体内Tks4蛋白质的C端SH3结构域的结晶条件

利用PEG/Ion Screen kit在No.32号溶液 [200mM $MgSO_4$, 20%(v/v) PEG 3350]与纯化后的蛋白质溶液等体积混合的坐滴内, 293 K环境中一星期内获得了人体Tks4 C端SH3结构域的结晶簇, 内含多个其维度大于 $0.15 \times 0.1 \times 0.05$ mm单结晶 (图I)。



图I. 人体Tks4 C端SH3结构域的结晶。

2.3.2 人体内Tks4蛋白质的C端SH3结构域的晶体的结晶学常数

X射线衍射数据经HKL-2000处理后见有效最大分辨率为 2.30 \AA 。C-端SH3结构域的晶体属于三方晶系, 选取空间群 $P321$ 和 $P312$ 计算的X射线衍射数据 R_{merge} 值分别为7.2%和46.5%。用PHENIX软件包^[19]中的`phenix.data_viewer`程序展示的 $(0, k, l)$ 面的X射线衍射图证明允许的反射条件是 $0, 0, l = 3n$ 。因此, 人体Tks4的C端SH3结构域结晶的空间群为 $P3_121$ (或 $P3_221$)。纯化后的人体Tks4的C端的SH3结构域分子量为6775.49 Da。用CCP4软件包^[20]的`MATTHEWS COEF`程序^[21]计算的蛋白晶体的Matthews系数和溶剂含量表明, 在一个不对称的单元中可能存在6、7或8个蛋白分子(图II)。用CCP4软件包内的`MOLREP`软件计算的自转函数图显示晶体的非对称单位不存在与结晶学的对称轴非平行的二重旋转轴和三重旋转轴。PHENIX软件包^[19]的`phenix.xtriage`软件计算显示在天然帕特逊函数中最大的峰高度仅相当于原点峰的4.6%。这个结果也表明, 晶体的非对称单位不存在与结晶学的对称轴非平行的二重旋转轴和三重旋转轴。因此, 晶体的非对称单位内可能存在6、7或8个C端SH3结构域。蛋白质晶体

的非对称单位内分子的排列直接反应细胞内存在相互作用模式, 本项研究中获得的结果证明人体内 Tks4 蛋白质的 C-端具有未知的相互作用模式, 这种相互作用的结构生物学证据和对应的生物学功能是今后的研究课题。人体内 Tks4 蛋白质的 C-端的 SH3 结构域的晶体的晶体学参数总结在表 I 中。

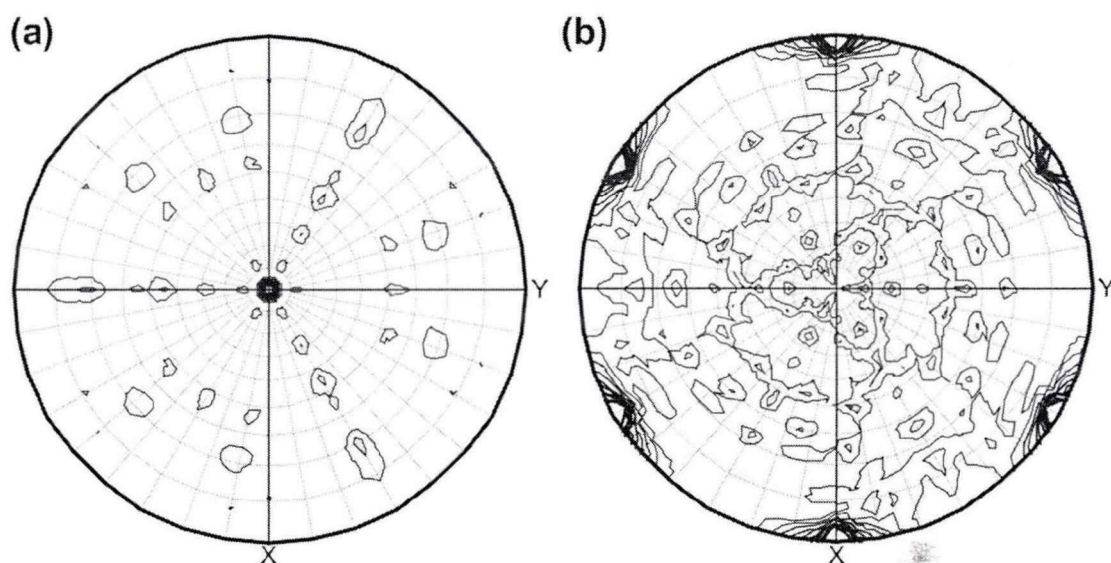


图 II. $\kappa = 120^\circ$ (左) 和 $\kappa = 180^\circ$ (右) 断面上的自我回转函数图。

表 I. Tks4 蛋白质的 C-端的 SH3 结构域的晶体的晶体学参数

Space group	$P3_121$ (or $P3_221$)
Cell-parameters (\AA ; degree)	$a = 83.87$, $b = 83.87$, $c = 108.44$; $\alpha = \beta = 90$, $\gamma = 120$
No. of molecules per asymmetric unit	6 (or 7, or 8)
V_M ($\text{\AA}^3\text{Da}^{-1}$)	2.71 (or 2.32, or 2.03)
Solvent content (%)	55 (or 47, or 39)
Resolution range (\AA)	50-2.30
Total reflections	162,331
Total unique reflections	20,187 (974)*
Completeness (%)	100 (100)*
R_{sym} (%)	7.2 (35.4)*
Average Redundancy	8.0 (8.0)*
$I/\sigma(I)$	31.8 (4.3)*

* 括号内的数值为最大分辨率范围 (2.34 -2.30 \AA) 内的衍射数据的计算结果。

由于非对称单位内的蛋白质分子数较多, 利用分子置换法未能成功解决相位问题。非对称单位内的 C-端 SH3 结构域的相互作用方式是细胞内 Tks4 蛋白质相互

作用方式的一种,为了获得晶体结构,利用同晶置换法的晶体结构研究正在开展。

参考文献

- [1] Hishida T, Eguchi T, Osada S, et al. A novel gene, fad49, plays a crucial role in the immediate early stage of adipocyte differentiation via involvement in mitotic clonal expansion [J]. *The FEBS journal*, 2008; 275(22): 5576-5588.
- [2] Buschman MD, Bromann PA, Cejudo-Martin P, et al. The novel adaptor protein Tks4 (SH3PXD2B) is required for functional podosome formation [J]. *Molecular biology of the cell*, 2009; 20(5): 1302-1311.
- [3] Gianni D, Diaz B, Taplet N, et al. Novel p47(phox)-related organizers regulate localized NADPH oxidase 1 (Nox1) activity [J]. *Science signaling*, 2009; 2(88): ra54.
- [4] Gianni D, Taplet N, DerMardirossian C, et al. c-Src-mediated phosphorylation of NoxA1 and Tks4 induces the reactive oxygen species (ROS)-dependent formation of functional invadopodia in human colon cancer cells [J]. *Molecular biology of the cell*. 2010; 21(23): 4287-4298.
- [5] Gianni D, DerMardirossian C, Bokoch GM. Direct interaction between Tks proteins and the N-terminal proline-rich region (PRR) of NoxA1 mediates Nox1-dependent ROS generation [J]. *European journal of cell biology*, 2011; 90(2-3): 164-171.
- [6] Hishida T, Eguchi T, Osada S, et al. A novel gene, fad49, plays a crucial role in the immediate early stage of adipocyte differentiation via involvement in mitotic clonal expansion [J]. *The FEBS journal*, 2008; 275(22): 5576-5588.
- [7] Iqbal Z, Cejudo-Martin P, de Brouwer A, et al. Disruption of the podosome adaptor protein TKS4 (SH3PXD2B) causes the skeletal dysplasia, eye, and cardiac abnormalities of Frank-Ter Haar Syndrome [J]. *American journal of human genetics*, 2010; 86(2): 254-261.
- [8] Bogel G, Gujdar A, Geiszt M, et al. Frank-ter Haar syndrome protein Tks4 regulates epidermal growth factor-dependent cell migration [J]. *J Biol Chem*, 2012; 287(37): 31321-31329.
- [9] Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway [J]. *Science*, 2002; 296(5573): 1655-1657.
- [10] Cicchetti P, Mayer BJ, Thiel G, et al. Identification of a protein that binds to the SH3 region of Abl and is similar to Bcr and GAP-rho [J]. *Science*, 1992; 257(5071): 803-806.
- [11] Ren R, Mayer BJ, Cicchetti P, Baltimore D. Identification of a tyrosine-rich SH3 binding site [J]. *Science*, 1993; 259(5098): 1157-1161.
- [12] Mayer BJ. SH3 domains: complexity in moderation [J]. *J Cell Sci*, 2001; 114(Pt 7): 1253-1263.
- [13] Yu H, Rosen MK, Shin TB, et al. Solution structure of the SH3 domain of Src and identification of its ligand-binding site [J]. *Science*, 1992; 258(5088): 1665-1668.
- [14] Whisstock JC, Lesk AM. SH3 domains in prokaryotes [J]. *Trends in biochemical sciences*, 1999; 24(4): 132-133.
- [15] Martin-Garcia JM, Luque I, Ruiz-Sanz J, et al. The promiscuous binding of the Fyn SH3 domain to a peptide from the NS5A protein [J]. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*, 2012;

68(Pt 8): 1030-1040.

- [16] Xiao R, Xi XD, Chen Z, et al. Structural framework of c-Src activation by integrin beta3[J]. *Blood*, 2013; 121(4): 700-706.
- [17] Yuzawa S, Suzuki NN, Fujioka Y, et al. A molecular mechanism for autoinhibition of the tandem SH3 domains of p47phox, the regulatory subunit of the phagocyte NADPH oxidase [J]. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular Mechanisms*, 2004; 9(5): 443-456.
- [18] Groemping Y, Lapouge K, Smerdon SJ, et al. Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase [J]. *Cell*, 2003; 113(3): 343-355.
- [19] Adams PD, Afonine PV, Bunkoczi G, et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution [J]. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* 2010; 66(2): 213-221.
- [20] Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, et al. Overview of the CCP4 suite and current developments [J]. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* 2011; 67(4): 235-242.
- [21] Vagin A, Teplyakov A. Molecular replacement with MOLREP [J]. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* 2010; 66(1): 22-25.

附录

1. 常用培养基的配制

LB 液体培养基(1 L): 配制每升培养基, 应在 950 mL 去离子水中加入胰化蛋白胨(tryptone)10 g, 酵母提取物(yeast extract)5 g, 氯化钠 10 g, 摇动容器直至完全溶解, 调节 pH 至 7.0, 定容至总体积为 1 L, 394 K 高压灭菌 20 min。

LB 固体培养基(1 L): 每升 LB 液体培养基中加入 15 g 琼脂粉, 394 K 高压灭菌 20 min。

3. 抗生素的配制

氨苄青霉素(Amp)50 mg/mL: 500 mg Amp 溶于 10 mL ddH₂O 中, 用 0.22 μm 滤器过滤除菌后, 253 K 保存。

4. 常用溶液的配制

0.5 M Tris-HCl(pH 8.0): 30.3 g Tris 碱溶于 400 mL 无菌水中, 加入浓盐酸调节溶液至 pH 8.0, (配 0.5 M Tris-HCl 约需浓盐酸 21 mL, 使溶液冷却到室温后方可最后调定 pH 值), 然后定容至 500 mL, 分装后在 394 K 高压灭菌 20 min, 277 K 冰箱保存。

50 X TAE 贮存液: 242 g Tris 碱, 51.7 mL 冰乙酸, 100 mL 0.5 M EDTA(pH 8.0), 加水定容至 1 L, 室温保存, 使用时以 ddH₂O 稀释。

TE 缓冲液(pH 8.0): 含 10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 mM EDTA(pH 8.0), 在 394 K 高压灭菌 20 min, 277 K 冰箱保存。

1 M IPTG: IPTG 2.38 g 溶于 10 mL ddH₂O 中, 用 0.22 μm 滤器过滤除菌后, 分装 1.5 mL 离心管中, 253 K 保存。

0.1 M CaCl₂ 溶液: 称取 0.28 g 无水 CaCl₂(分析纯), 溶于 50 mL ddH₂O 中, 定容至 100 mL, 在 15 psi(1.05 kg/cm²)高压灭菌 15 min, 277 K 冰箱保存。

15% (v/v)甘油的 0.1 M CaCl₂: 称取 0.28 g 无水 CaCl₂(分析纯), 溶于 50 mL ddH₂O 中, 加入 15 mL 甘油, 定容至 100 mL, 在 15 psi(1.05 kg/cm²)高压灭菌 15 min, 277 K 冰箱保存。

5. SDS-PAGE 电泳所用溶液

1.5 M Tris-HCl(pH 8.8): Tris 碱 18.17 g, 加入 ddH₂O 80 mL, 溶解后用浓盐酸调节至 pH 8.8, 定容到 100 mL, 277 K 冰箱保存。

1.0 M Tris-HCl pH 6.8: Tris 碱 12.11 g, 加入 ddH₂O 80 mL, 溶解后用浓盐酸调节至 pH 6.8, 定容到 100 mL, 277 K 冰箱保存。

10%过硫酸铵: 1 g 过硫酸铵加入 10 mL ddH₂O, 277 K 冰箱保存, 用 2-3 周应更换。

10% SDS: 10 g SDS 加入 80 mL ddH₂O, 温浴溶解, 定容到 100 mL, 室温保存。

30%聚丙烯酰胺溶液:

丙烯酰胺 (Arc)	29.0 g
N, N'-亚甲双丙烯酰胺 (Bis)	1.0 g
ddH ₂ O	100 mL

5 X Tris-甘氨酸缓冲液:

Tris 碱	15.1 g
甘氨酸(电泳级) (pH 8.3)	94.0 g
10% SDS	50 mL

ddH₂O

1000 mL

表1 配制 Tris-甘氨酸 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 12%分离胶所用溶液

成分	配制不同体积和浓度凝胶所需各成分的体积/mL							
	5	10	15	20	25	30	40	50
12% 胶								
H ₂ O	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
30% 丙烯酰胺	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	16.0	20.0
Tris-HCl(pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% 过硫酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

表2 配制 Tris-甘氨酸 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳浓缩胶所用溶液

成分	配制不同体积和浓度凝胶所需各成分的体积/mL							
	1	2	3	4	5	6	8	10
ddH ₂ O	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
30% 丙烯酰胺	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0	1.3	1.7
Tris-HCl(pH6.8)	0.13	0.25	0.38	0.50	0.63	0.75	1.0	1.25
10% SDS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
10% 过硫酸铵	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

考马斯亮蓝染色液: 考马斯亮蓝 G-250

1.0 g

甲醇

450 mL

冰醋酸

100 mL

ddH₂O

450 mL

考马斯亮蓝脱色液:

甲醇

100 mL

冰酸

100 mL

ddH₂O

800 mL

2×SDS 凝胶加样缓冲液: Tris-HCl (pH 6.8)

100 mM

β-巯基乙醇

200 mM

SDS (电泳级)

4.0%

溴酚蓝

0.2 %

甘油

20.0 μL

致 谢

在本论文完成之际，谨向曾给予我指导和帮助的人们表示最诚挚的感谢！

感谢国家自然科学基金面上项目 (No. 81273432)和中华人民共和国教育部“新世纪优秀人才支持计划”项目给予的资金支持。

衷心感谢导师谢勇老师。师者，传道授业解惑也。三年来，在课题设计、实验操作、结果分析等各个方面，导师给予了我悉心和无私的帮助；从论文的主题、内容、到整体的结构都给予了细致、有效的指导。他严谨的科学思路、实事求是的治学态度，认真勤奋的工作作风及和蔼宽容的待人之道，永远值得我学习。

感谢任吉霞师姐、钱火连师姐、李瑶师妹、郜昭慧同学在实验和生活上提供的各种帮助。

感谢研究生处的彭勇老师、林佳老师和刘俭老师，感谢他们不厌其烦的帮我解决生活和工作上的各种问题。

最后，特别感谢我的父母和男友，你们的支持和不离不弃是我最宝贵的财富。

