学校代码：10063 专业代码：100706

**二○一三届硕士研究生毕业暨学位论文**

**基于 SPOP（MATH）蛋白结构的小分子抑制剂筛 选与活性验证**

**Screen and Evaluation of Small Molecular Inhibitor based on Protein Structure of SPOP(MATH)**

**专** **业：药理学 学位类型：科学学位 研 究 生：黎** 莉

**指导教师：杨财广** **教授**

天 津 中 医 药 大 学 二○一三年五月

致 谢

研究生的生活已接近尾声，两年多来的学习和生活点点滴滴呈现眼前。每一次的失败或者成功对于对我而言不仅仅是学会某种科研技能，而更多地是一次次成长的过程。在这两年中

首先真挚的感谢我的指导教师杨财广研究员，本论文是在他的指导之下，在中国科学院上海药物研究所顺利完成的。科研上，他培养我们严谨的治学态度和活跃的研究思维，对我今后的工作和生活都会有比较大的影响。感谢杨老师的教导和药物所的培养。

感谢我的家人一如既往的支持和理解。感谢我的母校天津中医药大学和中国药科大学锻炼我的实验操作基础，教会我勇于

坚强内心。

感谢课题合作研究者中国科学院北京基因研究所的刘江课题组和中国科学院上海药物研究所DDDC部门的大力支持。

感谢中国科学院上海药物研究所杨财广课题组的陈报恩、刘幸、刘洪川、张婕、刘桂杰、李家飞等。感谢他们在我的论文完成过程中给予的友爱、关心与无私帮助，在实验过程中提供的指导和关照，在实验设计策略及具体操作上对我的启发和指导。

感谢上海光源同步辐射中心在晶体衍射过程中提供的支持。感谢所有帮助和关心过我的同学、朋友。最后，感谢各位评审老师对本论文的指导和帮助！

目 录

[中文摘要](#_Toc68665905) 3

[Abstract](#_Toc68665906) 3

[英文缩略词表](#_Toc68665907) 3

[综述](#_Toc68665908) 4

[1 SPOP蛋白的发现及其地位](#_Toc68665909) 4

[2 SPOP蛋白的生理学研究进展](#_Toc68665910) 5

[3 总结与展望](#_Toc68665911) 6

[综述参考文献](#_Toc68665912) 6

[第一章 ：SPOP蛋白表达构建及结构生物学研究](#_Toc68665913) 7

[2 实验材料及方法](#_Toc68665914) 7

[3 实验结果](#_Toc68665915) 14

[4 讨论](#_Toc68665916) 16

[第二章 ：小分子抑制剂的活性验证](#_Toc68665917) 17

[1 前言](#_Toc68665918) 17

[2 实验材料及方法](#_Toc68665919) 17

[3 实验结果](#_Toc68665920) 22

[4 讨论](#_Toc68665921) 25

[结 论](#_Toc68665922) 26

[参考文献](#_Toc68665923) 26

[附录：溶液配方](#_Toc68665924) 27

# 中文摘要

SPOP蛋白是SCF(Skp1、Cul1和F-box) E3连接酶家族的一员，通过泛素化修饰调节多种蛋白的稳定性及信号通路的转导，并参与调控了多种细胞生理进程。SPOP蛋白在多种癌细胞系中过表达。尤其是，高达85%的肾癌细胞中都发现SPOP高表达。生物信息学和流行病学研究均提示SPOP很可能作为以后新药研发的靶点或疾病检测的生物标志物。本文详细的介绍了目前SPOP蛋白的研究现况，构建SPOP(MATH)的原核表达系统，得到高纯度蛋白及高衍射分辨率的蛋白晶体，并在此基础上利用计算机虚拟对接（DOCK）技术从化合物库筛选出SPOP(MATH)蛋白的小分子化合物抑制剂。随后通过体外分子水平的SPR和FP实验验证计算机虚拟筛选出的化合物小分子化合物对SPOP（MATH）的抑制活性，并经过细胞CellTiter-Blue实验进一步验证小分子化合物对肾癌细胞生长的影响。最后得到一个作用于透明肾癌细胞768-O细胞的IC50大约为50 M的一个小分子化合物，经过进一步改造优化，有可能成为SPOP蛋白抑制剂的先导化合物。另外，本文从蛋白质结构出发，经过计算机虚拟对接，体外及细胞内活性筛选，建立了一个有效可行的E3类抑制剂的筛选方案。

关键词：SPOP；晶体结构；虚拟筛选；小分子抑制剂

Abstract

The SPOP protein belongs to SCF(Skp1、Cul1和F-box) E3 ligease enzyme family o, which regulate a variety of protein stability and signal pathways of conduction, and a variety of cell physiological processes involved in the regulation by ubiquitination. Over-expression of the SPOP protein in a variety of cancer cell lines was observed, Especially for clean renal

Cancer cells, up to 85% of renal cancer cells were found high expression of SPOP protein. Bioinformatics and epidemiological studies strongly suggest that the SPOP is likely to be a future drug development targets or biomarkers for disease detection. This article describes present research details of the SPOP protein, building of SPOP (MATH) prokaryotic expression system obtain high-purity protein and protein crystals of high diffraction resolution as well. On those basis, we use computer docking to screen small molecule inhibitors of SPOP (MATH) protein from compound libraries. Subsequently verified inhibitory activity by in vitro molecular level, SPR and FP, and cells CellTiter-Blue experiment. Finally we got a small molecule compounds which IC50 for 786-

Optimize. In addition, start with the structure, the computer docking, following with in vitro and intracellular activity screening, we established a feasible and effective E3 inhibitors screening plantform.

**KEYWORDS**: SPOP; Protein structure; Docking; small molecule; Inhibitor

# 英文缩略词表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 英文缩写 | 英文全称 | 中文全称 |
| SPOP | Speckle-type POZ | 斑点型锌指结构蛋白 |
| D- SPOP | Drosophila-SPOP | 果蝇中的 SPOP 蛋白 |
| SCF | Skp1,Cul1 and F-box | Skp1,Cul1 和 F-box 复合 酶 |
| FP | Fluorescence Polarization | 荧光偏振 |
| BIA | Bio-molecular Interaction Analysis | 生物大分子相互作用分  析 |
| DTT | Dithiothreitol | 二硫苏糖醇 |
| PUC | Puckered | Puckered 蛋白 |
| IC50 | half maximal (50%) inhibitory  Concentration (IC) of a substance | 半抑制率 |
| FBS | Fetal bovine serum | 胎牛血清 |
| FITC | Fluorescein isothiocyanate | 异硫氰酸荧光素 |
| PBS | Phosphate buffer saline | 磷酸缓冲盐水溶液 |
| SD | Standard deviation | 标准差 |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate | 十二烷基磺酸钠 |
| SPR | Surface plasmon resonance | 表面等离子共振 |
| KD | Equilibrium dissociation constant | 平衡解离常数 |
| PPI | Protein-protein interactons | 蛋白-蛋白相互作用 |

# 综述

SPOP蛋白研究进展

前言：蛋白泛素化修饰是调节蛋白稳定性，继而影响蛋白功能发挥的重要生物学事件。SPOP蛋白是SCF E3连接酶家族的一员，通过泛素化修饰调节多种蛋白的稳定性及信号通路的传导，SPOP参与调控了多种细胞生理进程。深入理解SPOP蛋白的结构，将帮助认识其作用方式及在多种生理过程中的角色。我们对近年来有关SPOP蛋白的文献进行整理，总结了SPOP蛋白及SPOP复合物蛋白的结构特征，SPOP/E3复合酶体的一些性质，并以结构为出发点，结合其相互作用的因子和靶点，对SPOP蛋白在参与癌症，H h信号通路，磷酸肌醇信号通路，Daxx蛋白，X染色体沉默以及糖尿病的发生发展中的作用进行了分析，着重讨论了SPOP/Cul3分子水平作用机制以及SPOP蛋白作为药物设计的靶点的潜力。

# 1 SPOP蛋白的发现及其地位

Nagai T.于1997年在一位硬皮病患者的血清中发现并鉴定了SPOP蛋白，由于蛋白序列含有典型的POZ（Poxvirus zinc finger）序列，并且在免疫荧光检测中以斑点状出现在细胞核中，被命名为Speckle-type POZ，简称SPOP[1]. SPOP在进化中高度保守，基因序列比对结果表明，果蝇中SPOP基因和人类相比同源性达到96%，秀丽线虫有94%的同源性。ORF对比表明果蝇与人源SPOP蛋白序列有79%的同源性，而秀丽线虫有63%. SPOP的高度同源性提示SPOP蛋白在细胞功能中的重要作用[2]。

Ftz（Fushi tarazu）和Eve(Even-skipped)是pair-rule基因的一类，人体中与F tz和Eve同源基因的目标蛋白多与癌症相关[3]。果蝇中的D-SPOP蛋白（Drosophila SP OP）是Ftz基因的直接调控目标，此外，D-SPOP也随着Eve的突变几乎沉默。在18种不同组织器官，每种20个癌细胞中均发现SPOP出现过表达。尤其对于正常肾组织细胞来说，高达85%的肾癌细胞中都发现SPOP高表达[4]。另外，SPOP蛋白在直肠癌，胸腺癌，胃癌，前列腺中都存在不正常表达的现象[5-7]。综上所述，SPOP蛋白与包括癌症在内的疾病临床相关，细胞生物学和流行病学研究均提示SPOP很可能作为以后新药研发的靶点或疾病检测的生物标志物[4]。

## 1.1 SPOP蛋白主要的MATH、BTB和BACK三个保守结构域

如图1（A）所示，由374个氨基酸组成的SPOP蛋白含有四个功能区域：N端的MA TH结构域（28-166位残基），主要作用是结合泛素化的底物蛋白；MATH结构域C端的B TB结构域（190-297位残基），能够与Cul3相互作用；在BTB结构域C端之后的BACK结构域（302-359位残基），也与Cul3相互作有关；以及锚定细胞核的C端序列（365- 374位残基）[8, 9]。

图1 SPOP蛋白的结构模型

图1（A）：人源SPOP蛋白的结构域组成。

图1（B）：预测的SPOP BTB BACK结构域的3D模型, 360-374残基包含一个内在的细胞核内定位区域(NLS)

蛋白的一级结构决定其功能，SPOP蛋白中的三个主要结构域分别属于不同的蛋白家族，了解这些保守结构域的性质，有助于帮助我们研究SPOP蛋白的结构和功能特点。MATH结构域具有TRAF（Tumor necrosis factor receptor associated factor）和Meprins金属蛋白酶两大蛋白家族的特征。SPOP蛋白中的MATH与其他TARF家族中的T D（TRAF-Domain）位置功能都不相同，而与其他Meprins家族的蛋白的MATH结构域功

能类似，介导蛋白与蛋白之间的相互作用[10, 11]。

BTB/POZ（Broad Complex, Tramtrack and Bric a brac/ poxvirus and zinc fi nger）结构域的蛋白序列非常保守，由120个左右的氨基酸组成一系列的α-螺旋结构。这种类似的结构也存在于Cul3的其他底物中，已解析的晶体结构表明这种特定的结构

与蛋白之间的相互作用有关，例如与F-box和SOCS-box能够相互作用。可以预测，BTB结构与SPOP蛋白和Cul3蛋白结合有关[12-14]。已知的大部分BTB蛋白都连接另一种能招募其他蛋白的结构域，如MATH、Kelch等。其中与MATH和Kelch结构域相连的BTB蛋白通常是Cul3招募的底物[15]。最新的研究发现，SPOP蛋白中不仅BTB结构域的3-box有类似于F-box和SOCS-box的作用，BTB结构域的C端之后存在的BACK结构域也与Cl u3的结合有关。完整的BACK结构域大概由120个左右的氨基酸组成3-4个α-螺旋。典型的BACK结构域存在于KLHL/KBTBD蛋白中[16]。与KLHL/KBTBD家族的蛋白相比，SPOP蛋白中的BACK结构域是不完整的，借助了BTB序列中的后两个α-螺旋（α5/α6）的参与共同形成的（图1B）。实验证明，BACK结构域对与SPOP蛋白形成寡聚体有重要作用，并且在形成寡聚体的同时有助于提高SPOP/E3复合酶的活性[8]。

## 1.2 SPOP蛋白和SPOP/Cul3复合体

E3连接酶基本可分为N末端规则型、HECT、环指类（Ring-Finger）和U-box四大类，其中环指类的E3又可分为RING家族和由多亚基蛋组成的Cullin家族，Cullin家族蛋白复合体被研究最为透彻[17]。以SCF（Skp1、Cul1和F-box）复合体为例，Cul1提供脚手架结合Skp1、F-box蛋白和指-环蛋白Rbx1。其中F-box蛋白结合泛素化底物并决定其特异性[18]。除Cul1外，人类基因组中还有其他六种Cullin蛋白（2,3,4A, 4B, 5和7），他们都参与形成泛素化E3连接酶复合体[19]。BTB家族蛋白综合了Skp1和F-b ox两个亚基的功能，以既含有MATH又含有BTB结构域的SPOP蛋白为例，它既能够结合泛素化底物，又能结合Cullin蛋白[20]。类泛素蛋白NEDD8共价结合到Cullin蛋白C端的赖氨酸上，这个过程称为Neddylation，是激活SPOP/E3复合酶活性必须的步骤。另外，Rbx1亚基也能够提高SPOP/E3连接酶的活性[21 22]。SPOP蛋白和几种底物片段复合物的晶体结构表明，在SPOP/Cul3复合酶中，MATH结构域决定了底物的序列特异性，PU C、Ci、Daxx和MacroH2A与之结合部位都含有五个极性和疏水性相同的氨基酸，即Φ-π-S-S/T-S/T（Φ非极性，π极性）。这几个位点的突变都会影响底物与SPOP蛋白的结合，说明这是底物与SPOP蛋白结合的必要结构基础[8]。SPOP和Cul3-NTD复合物晶体结构揭示了SPOP和Cul3相互作用的结构基础，BTB结构域中的α3-β4环组成的Φ-x-E

（Φ代表疏水残基，x代表非保守残基，多数为蛋氨酸和亮氨酸，E代表谷氨酸盐）是 C

ul3和SPOP结合的关键部位。已知大多数作为Cul3受体的BTB蛋白都属于BTB-BACK-K elch结构形式，其BTB结构域中都含有长环结构和Φ-x-E模体。因此可判定在BTB蛋白中出现Φ-x-E模体和BACK结构域标志着该蛋白属于Cul3受体[9]。

值得注意的是，SPOP/E3复合酶并非仅仅诱导蛋白泛素化并通过26S蛋白酶降解，例如对于MacroH2A仅仅只有泛素化标记，而没有降解的作用[23]。SPOP/E3复合体这种对细胞内蛋白精细而灵活的调节可能与其多亚基的组成相关。研究发现，寡聚体的形成，NEDD8和UbcH5等亚基的加入都使反应速率很大提高[24]。细胞中存在一些与SPOP类似的蛋白，他们可能也参与了SPOP/E3连接酶在泛素化过程中速率的调节，甚至从多泛素化到单泛素化标记的转变[9]。

# 2 SPOP蛋白的生理学研究进展

SPOP蛋白在人体分布广泛，不同底物蛋白受体使了SPOP具有多种多样的生理学功能。已有的研究表明，SPOP蛋白参与人类的癌症，信号传导，细胞凋亡等等多种生理进程。以便为更好的理解疾病发生发展的过程并为药物设计寻找合适靶点。

SPOP蛋白在癌症中的角色

目前发现的SPOP底物中，BRMS1和SRC-3是与癌症发生和发展直接相关的两种蛋白除此之外。SPOP参与的Hh信号通路调节，Daxx蛋白降解等也与癌症有关。本节主要讨论BRMS1蛋白和SRC-3蛋白和SPOP相互之间的关系。

## 2.1 SPOP蛋白调控BRMS1蛋白

研究证明BRMS1蛋白与SPOP蛋白在体内相互作用，SPOP/Cul3介导BRMS1经泛素化途径降解。BRMS1基因属于抑癌基家族成员，它通过调控基因转移过程中连接蛋白的表达和修复细胞间隙通讯抑制癌基因转移。与正常胸腺细胞相比，胸腺癌细胞中BRMS1蛋白的表达水平显著减少，提示我们BRMS1蛋白稳定性的调控机制对癌症的发生和维持非常重要[25]。酵母双杂交试验证明BRMS1蛋白和HDAC（mSin3-histone decetylase）复合体有相互作用，HDAC通过影响NF-кB结合位点而抑制μPA和OPN的转录（两者都是重要的转移基因）[26]。另外，最近有报道BRMS1能够调控多种转移相关的microRNA[27]. B RMS1的这种抑制癌扩散的作用在胸腺癌，膀胱癌和胆囊癌中都被发现报道过[28]。

在胸腺癌细胞系中敲除SPOP后，BRMS1的稳定性增加，BRMS1抑制一些转移基因（μ

PA或OPN）的转录增强。因此，SPOP对BRMS1蛋白水平的调控在胸腺癌的发展中非常重要，进一步了解这种调控的机制和原因有助于理解BRMS1转移抑制的分子机制，并且有可能发展新的治疗药物[32]。

## 2.2 SPOP蛋白调控SRC-3蛋白

SRC-3是SPOP的另一个重要客户蛋白。SRC-3/AIB1(Steroid receptor coactivato r-3)是一种在多种癌症中扩散并且上调的重要癌基因，它能够上调IGF-1(Insulin-lik e growth factor-1)和细胞周期素D1的表达，这两者的过表达都与癌症密切相关[29]。最近研究还发现SRC-3能增强癌症细胞的侵略和迁移，即增强癌细胞转移[30]。另外，SR C-3和HER-2的过表达是他莫昔芬（一种选择性雌激素受体调节剂）治疗早期胸腺癌病人产生抗性的主要原因，表明SRC-3在癌症的发生和维持过程有重要作用[31]。

已知SRC-3蛋白的稳定性可以通过独立于泛素化或依赖于泛素化两种形式的蛋白水解酶调控。最新研究发现，SRC-3中一个磷酸化降解决定序列通过与E3复合酶的结合调控其降解形式[32]。只有在S101/S102被酪氨酸激酶Iε磷酸化的情况下，SPOP和SRC-3能够相互作用，并使它通过泛素化降解。SPOP基因敲除和SPOP过表达实验都证明了SP OP/Cul3连接酶复合体促进了SRC-3蛋白的翻新，抑制了SRC-3介导的癌信号传递。另外，对SPOP基因位置系统的分析揭示了在胸腺癌中很大一部分的SPOP基因丢失或者发生杂合性丧失（LOH）。总之，SPOP在这里是一种癌症抑制因子。值得一提的是，SRC-3和SPOP的结合区域为SST序列，符合与SPOP结合的底物序列（SBC, SPOP-binding con sensus）φ-π-S-S/T-S/T，并且这一序列也是磷酸化的状态[33]。

## 2.3 SPOP在磷酸肌醇信号中的的作用

磷酸肌醇信号通路调控真核细胞的迁移，细胞分裂以及细胞存活等许多种细胞活动，并被发现与肿瘤的增殖与转移均密切相关[34]。磷脂酰肌醇4, 5-二磷酸(PI-4,5-P2)是真核细胞中最重要的一种磷酸肌醇，它由磷脂酰肌醇磷酸激酶（PIPKs）家族中的Ⅰ型和Ⅱ型两种PIPKs合成，其中PIPKⅡs通过催化PIP5P合成PI-4,5-P2[35]。研究发现PIPKⅡ的一种亚型PIPKⅡβ主要出现在细胞核的核斑点中，并与细胞内的压力应答信号通路相关。PIPKⅡβ中的一段特异性的激酶插入序列和SPOP中的MATH结构域相互作用，共同锚定于细胞核中[36]。SPOP/Cul3可以促使PIPKⅡβ泛素化，却对其在细胞内的含量没有

显著影响。另外，实验证明SPOP/Cul3所介导的泛素化可以被MKK6/p38 MAPK信号刺激加强。值得注意的是，PIPKⅡβ的底物PIP5P通过p38 MAPK途径刺激SPOP/Cul3对其包括Daxx、Pdx1、PIPKⅡβ甚至SPOP本身的泛素化标记。这些实验结果都描述了一个通过磷酸肌醇信号调控泛素连接酶进而修饰其他关键信号蛋白的新机制。因此，PIPKⅡβ更有可能是SPOP/Cul3的活性调控者而非底物，SPOP/Cul3则可能在PIPKⅡβ的调控下参与其他压力答的信号通路调节[45]。

## 2.4 SPOP调控DAXX蛋白

Daxx（Dath domain-associated protein）是一种多功能蛋白，它能够调控转录，细胞周期和凋亡等多种细胞活动。Daxx能够与ASK1(apoptosis signal-regulating ki nase1)相互作用，激活JNK（JunN端激酶）促进Fas-介导细胞凋亡。而另一方面，Dax x也有反凋亡作用，纯合子中敲除Daxx基因导致大量的细胞凋亡和胚胎死亡。Daxx的重要性也体现在它能与多种核蛋白相互作用，调控转录因子。除此之外，Daxx与ETS 1相互作用能够抑制MMPⅠ基因转录；Daxx在p53过表达时依赖p53的压力反应抑制细胞凋亡，是p53的负调节因子[37]。

Daxx通过Spop/ Cul3泛素化而降解。SPOP和Cul3在细胞中的表达明显降低了Dax x的蛋白量。这种降低能够被SPOP独有的shRNA阻止，或被MG132(26S蛋白酶抑制剂)翻转。另外，SPOP和Cul3的表达解除了Daxx对ETS1-和p53-依赖性转录的抑制。总之，SPOP/Cul3泛素化连接酶调控Daxx的稳定性，并间接调控Daxx介导的细胞内加工，包括转录因子的调控和细胞凋亡[38]。

## 2.5 SPOP在X染色体沉默中的作用

X染色体沉默是指成年哺乳动物身体细胞中两个X染色体中的一个失活的现象。雌性胎生哺乳类动物细胞中两条X染色体之一在发育早期随机失活，以确保与只有一条X染色体的雄性个体中染色体剂量相同。在X染色体失活起始于非编码RNA Xist(xi-spe cific transcript)结合到X染色体失活中心，随后，包括DNA复制延迟、组蛋白超乙酰化以及DNA超甲基化等表观遗传水平的改变维持并锁定了这种失活状态。另外，组蛋白MACROH2A参与另一领域的表观遗传沉默调控也对X染色体失活有重要作用[39]。PcG(P olycomb group)蛋白是一类调控表观遗传的蛋白总称，人体中存在PRC2(Initiation c

ore complex)和PRC1（Maintenance core complex）两类，BMI1属于PRC1，并且，早先研究认为BMI1（Polycomb group protein）是癌基因Myc的伴侣蛋白[40]。

研究发现，SPOP/Cul3能够泛素标记BMI1和组蛋白MACROH2A1，并调控它们在维持X染色体沉默的作用。细胞中敲除SPOP/Cul3并不能明显改变这两种蛋白的总含量，但是明显改变了X染色体的失活状态。检测表明，细胞内的MACROH2A1存在多泛素和单泛素化标记两种，而多泛素标记的BMI1被检测到量极少。另外值得注意的是，SPOP/Cul3影响了MACROH2A1在失活的那条染色体上富集，导致X染色体的失活状态的改变。这个发现进一步证实了MACROH2A1在转录沉默中另一层面的表观遗传调控[25]。

## 2.6 SPOP在Hh信号通路中的作用

Hh家族信号通路调控着胚胎细胞正确分化至首尾、左右等不同空间位置以及发育成不同组织，尤其对四肢的指头数和大脑的正常发育非常重要。不正常的Hh信号引发的异常Gi/Gli活动将导致包括癌症在内的多种疾病[41]。果蝇的Hh信号由Ci（Cubitus I nterruptus）转录因子调控，在脊椎动物中，Ci的功能扩展到三种蛋白，单独作为转录激活因子的Gli1,主要作用是转录激活因子的Gli2和主要加工成转录抑制剂的Gli3[42]. Hh信号调控涉及多种蛋白和酶，SPOP在Hh信号诱导下，介导Gli2和Gli3蛋白的泛素化降解，和Sufu一起调节Gli抑制型和激活型的比例。而没有Hh信号的时候，过磷酸化标记的Gli2和Gli3通过Slimb/β-TrCP-Cul1 E3泛素化途径加工成C端截短型的转录抑制因子[43]。

在脊椎动物中，Hh信号出现诱导Gli2和GLi3转变为活性形式，也同时诱导了SPO P在细胞核和细胞质中出现，这是Hh信号的一种自身负反馈调节形式[44]。SPOP和Sufu

（Suppressor of fused）共同调节Gli2和GLi3蛋白的稳定性，这是因为他们竞争性的结合Gli3氮端和碳端的区域以及Gli2的碳端。这种Sufu-Spop-Gli调节回路基本是保守的，但由于Gli1不受Spop影响而与Gli2和Gli3的抑制型多少有关[45]。另外，Sufu和Spop都不能和Gli2和Gli3的C端截短型抑制因子结合，因此Gli3的截短型抑制因子独立抑制Hh信号通路[46]。对Gli蛋白稳定性的调节是控制Hh信号通路的关键步骤，因此进一步研究SPOP和Sufu调节在Hh信号的分子机制不仅帮助理解Hh信号通路，也将对治疗因Gli异常表达引发的肿瘤有重要意义[64]。

## 2.7 SPOP对胰岛素转录因子Pdx1的多重调控

Pdx1（homeodomain transcription factor pancreatic duodenal homeobox 1）调控胰岛素表达和分泌相关基因的转录和β胰岛细胞存活，Pdx1的杂合子突变通常伴随糖尿病的发生, Pdx1在人类的胰腺正常发育过程中必不可少[47]。

研究证明，在成年老鼠的β胰岛细胞中, SPOP/Cul3介导Pdx1泛素化和降解，通过调控β胰岛细胞的数量和功能改变胰岛素的表达[67]。SPOP基因沉默加强了Pdx1基因的转录，增加了Pdx1蛋白在老鼠的β细胞培养基中的含量。尤其明显的是，SPOP杂合子提高了血糖代谢平衡和β细胞的功能并且通过控制细胞存活使β胰岛细胞数量正常[48]。这些发现表明，SPOP调控Pdx1蛋白的稳定性和β胰岛细胞分泌胰岛素的量，而SPOP基因则作用于与β细胞数量及功能相关的基因，影响β细胞的形成和发展。因此，SPO P在基因和蛋白水平多重调控胰腺中Pdx1的发育[49]。

# 3 总结与展望

综上所述，SPOP蛋白不仅是一种结构保守的蛋白，更是与包括癌症在内的一些疾病紧密相关得重要蛋白。随着SPOP蛋白的底物逐渐被人们发现并研究，SPOP/Cul3对多种重要蛋白和信号通路的精密的泛素化调控涉及蛋白翻新、转录调控、细胞凋亡等多种细胞进程，SPOP蛋白在人体内的生物功能也慢慢清晰起来。对SPOP及其底物的更多了解，帮助我们从新的角度的理解许多疾病发生发展的分子机制，并且对泛素化这种调控方式有更深入的认识。对SPOP蛋白及其复合物晶体结构的解析，更是直观的揭示了SPOP/C ul3复合酶的作用机制，为未来以SPOP为靶点设计药物提供基础。目前的研究仍旧存在两个重要的科学问题：第一，SPOP蛋白在信号通路中的是如何被调控的：SPOP在信号通路中不仅是调控者也是被调控者。SPOP受何种信号所调控的研究少之又少，它随不同信号通路不同或存在某种一致性的调控机制还需要进一步的研究。例如，当Hh信号大量出现时，SPOP也随Hh的出现在纤毛中聚集[62]。再如，SRC-3的泛素化修饰之前必须要经过磷酸化S102/S103,而Gli2/Gli3的磷酸化标记则阻止了SPOP对其进行泛素化加工[38, 63]。磷酸化是否为SPOP蛋白开始调控的一种信号。第二，SPOP/Cul3复合酶自身是如何的调节自身活性的：含有多亚基的SPOP/Cul3 E3连接酶，其本身如何装配，提高催化效率是一个值得注意的问题。很有可能，SCF复合酶自身多亚基的装配方式就是

调节自身酶催化活性的重要手段[24, 26]。人体中存在的一些类SPOP蛋白，也有可能参与复合酶的自身调节，帮助多泛素化标记转化至单泛素化标记[9]。这些都是值得未来进一步探讨的问题。

# 综述参考文献

[1] Nagai Y K. T., Muro Y, et al. Identification of a novel nuclear speckle-type protein, SPOP [J]. FEBS Lett., 1997, 418(1-2):23-26.

[2] Potter CJ T. G., Xu T., Drosophila in cancer research. An expanding role[J]. Trends Genet., 2000,16(1):33-39.

[3] Johnson RL R. A., Xie J, et al., Human homolog of patched, a candidate gene for th e basal cell nevus syndrome[J]. Science, 1996, 272(5268):1668-1671.

[4] Liu J G. M., Xue L, et al., Analysis of Drosophila segmentation network identiﬁes a JNK pathway factor overexpressed in kidney cancer [J]. science, 2009, 323(5918): 1218-1222.

[5] Barbieri CE, B. S., Lawrence MS., et al., Exome sequencing identifies recurrent SPO P, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer [J]. nature genetics 2012, 44 (6):685-689.

[6] Brenner JC C. A., Disruptive events in the life of prostate cancer[J]. Cancer Cell., 20 11, 19(3):301-303.

[7] Kim MS J. E., Oh JE, Yoo NJ, Lee SH., Mutational and expressional analyses of S POP, a candidate tumor suppressor gene, in prostate, gastric and colorectal cancer s [J]. APMIS. 2012, 323(918):128-132.

[8] Zhuang M C. M., Liu J, Waddell MB, Nourse A, Hammel M, Miller DJ, Walden H, Duda DM, Seyedin SN, Hoggard T, Harper JW, White KP, Schulman BA., Struc tures of SPOP-substrate complexes: insights into molecular architectures of BTB-C ul3 ubiquitin ligases [J]. Mol Cell., 2009,36(1):39-50.

[9] Errington WJ K. M., Bueler SA, Rubinstein JL, et al., Adaptor protein self-assembly drives the control of a cullin-RING ubiquitin ligase. [J]. Structure., 2012, 20(7):114 1-1153.

[10] Zapata JM P. K., Haas E, Ware CF, et al., A diverse family of proteins containing t

Umor necrosis factor receptor-associated factor domains [J]. J Biol Chem., 2001, 2 76(26):24242-24252.

[11] Xu L., Wei, Y., Reboul, J., et al., Elledge, S. J, BTB proteins are substrate-speciﬁc adaptors in an SCF-like modular ubiquitin ligase containing CUL-3 [J]. nature., 20 03, 425(6955).

[12] Petroski MD D. R., Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases [J]. Nat Rev Mol Cell Biol., 2005, 6(1):9-20.

[13] Pintard L W. J., Willems A, Johnson JL, et al., The BTB protein MEL-26 is a sub strate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase [J]. nature, 2003, 425(6955):31 1-316.

[14] Stogios PJ D. G., Jauhal JJ, Nandra SK, Privé GG., Sequence and structural analys is of BTB domain protein. [J]. Genome Biol., 2005, 6(10):182-183.

[15] Cullinan SB G. J., Jin J, Harper JW, Diehl JA., The Keap1-BTB protein is an ada ptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a C ul3-Keap1 ligase [J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(19):8477-8486.

[16] Stogios PJ P. G., The BACK domain in BTB-kelch proteins [J]. Trends Biochem Sci.

， 2004, 29(12):634-637.

[17] Hershko A C. A., The ubiquitin system [J]. Annu Rev Biochem., 1998, 67:425-479. [18]CM. P., Mechanisms underlying ubiquitination [J]. Annu Rev Biochem., 2001,70:503

-533.

[19] Jin J C. T., Lovering RC, Elledge SJ, Pagano M, Harper JW., Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins [J]. Genes Dev., 2004, 18(21):257 3-2580.

[20] Bennett EJ R. J., Gygi SP, Harper JW., Dynamics of cullin-RING ubiquitin ligase n etwork revealed by systematic quantitative proteomics [J]. cell, 2010,143(6):951 -96 5.

[21] Furukawa M H. Y., Borchers C, Xiong Y., Targeting of protein ubiquitination by B

TB-Cullin 3-Roc1 ubiquitin ligases [J]. Nat Cell Biol., 2003, 5(11):1001-1007. [22]Geyer R W. S., Anderson S, Yates J, Wolf DA., BTB/POZ domain proteins are put

Ative substrate adaptors for cullin 3 ubiquitin ligases [J]. Mol Cell., 2003, 12(3):7 83-790.

[23] Duda DM B. L., Scott DC, Hunt HW, Hammel M, Schulman BA., Structural insig hts into NEDD8 activation of cullin-RING ligases: conformational control of conj ugation [J]. Cell, 2008, 134(6):995-1006.

[24] Saha A D. R., Multimodal activation of the ubiquitin ligase SCF by Nedd8 conjuga tion [J]. Mol Cell., 2008, 32(1):21-31.

[25] Hernández-Muñoz I L. A., van der Stoop P, Boutsma E, et al., Stable X chromoso me inactivation involves the PRC1 Polycomb complex and requires histone MAC ROH2A1 and the CULLIN3/SPOP ubiquitin E3 ligase [J]. Proc Natl Acad Sci U S A., 2005, 102(21):7635-7640.

[26] Duda DM S. D., Calabrese MF, Zimmerman ES, et al., Structural regulation of culli n-RING ubiquitin ligase complexes [J]. Curr Opin Struct Biol., 2011,21(2):257-26 4.

[27] Seraj MJ S. R., Verderame MF, Welch DR., Functional evidence for a novel human breast carcinoma metastasis suppressor, BRMS1, encoded at chromosome 11q13 [J]. Cancer Res., 2000, 60(11):2764-2769.

[28] Saunders MM S. M., Li Z, Zhou Z, Winter CR, et al., Breast cancer metastatic pote ntial correlates with a breakdown in homospecific and heterospecific gap junctiona l intercellular communication [J]. Cancer Res., 2001, 61(5):1765-1767.

[29] Hurst DR M. A., Moore BP, Phadke PA, Meehan WJ, Accavitti MA, Shevde LA, Hopper JE, Xie Y, Welch DR, Samant RS., Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) is stabilized by the Hsp90 chaperone [J]. Biochem Biophys Res Comm un., 2006,348(4):1429-1435.

[30] Edmonds MD H. D., Vaidya KS, Stafford LJ, Chen D, Welch DR., Breast cancer

Metastasis suppressor 1 coordinately regulates metastasis-associated microRNA expr ession [J]. Int J Cancer., 2009, 125(8):1778-1785.

[31] Phadke PA V. K., Nash KT, Hurst DR, Welch DR., BRMS1 suppresses breast canc er experimental metastasis to multiple organs by inhibiting several steps of the m etastatic process [J]. Am J Pathol., 2008, 172(3):809-817.

[32] Kim B N. H., Pyo KE, Jang MJ, Kim IS, Kim D, Boo K, Lee SH, Yoon JB, Bae k SH, Kim JH., Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) is destabilized b y the Cul3-SPOP E3 ubiquitin ligase complex [J]. Biochem Biophys Res Commun.

，2011, 415(4):720-726.

[33] Kuang SQ L. L., Zhang H, Lee AV, O'Malley BW, Xu J., AIB1/SRC-3 deficiency affects insulin-like growth factor I signaling pathway and suppresses v-Ha-ras-indu ced breast cancer initiation and progression in mice[J]. Cancer Res., 2004, 64(5):18 75-1885.

[34] Planas-Silva MD S. Y., Donaher JL, Brown M, Weinberg RA., AIB1 enhances estr ogen-dependent induction of cyclin D1 expression [J]. Cancer Res., 2001, 61(10):3 858-3862.

[35] Kajiro M H. R., Nakajima Y, Kawanowa K, So-ma K, Ito I, Yamaguchi Y, Ohie S H, Kobayashi Y, Seino Y, Kawano M, Kawabe Y, Takei H, Hayashi S, Kurosumi M, Murayama A, Kimura K, Yanagisawa J., The ubiquitin ligase CHIP acts as a n upstream regulator of oncogenic pathways [J]. Nat Cell Biol., 2009, 11(3):312-31 9.

[36] Osborne CK B. V., Hopp TA, Chamness GC, Hilsenbeck SG, Fuqua SA, Wong J, Allred DC, Clark GM, Schiff R., Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer [J]. J Natl Cancer Inst., 2003, 95(5):353-361.

[37] Li C L. Y., Feng XH, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW., Essential phosphatases and a phospho-degron are critical for regulation of SRC-3/AIB1 coactivator function

And turnover [J]. Mol Cell., 2008, 31(6):835-849.

[38] Li C A. J., Fu J, Lee DF, Xu J, Lonard D, O'Malley BW., Tumor-suppressor role for the SPOP ubiquitin ligase in signal-dependent proteolysis of the oncogenic co- activator SRC-3/AIB1 [J]. Oncogene., 2011, 30(42):4340-4364.

[39] Ling K D. R., Firestone AJ, Bunce MW, Anderson RA., Type I gamma phosphatid ylinositol phosphate kinase targets and regulates focal adhesions [J]. Nature, 2002, 420(6911):89-93.

[40] Bunce MW B. K., Anderson RA., Nuclear PI(4,5) P(2): a new place for an old sign al [J]. Biochim Biophys Acta., 2006, 1761(5-6):560-569.

[41] Anderson RA B. I., Doughman SD, Kunz J, Loijens JC., Phosphatidylinositol phosp hate kinases, a multifaceted family of signaling enzymes [J]. J Biol Chem., 1999, 274(15):9907-9910.

[42] Boronenkov IV L. J., Umeda M, Anderson RA., Phosphoinositide signaling pathway s in nuclei are associated with nuclear speckles containing pre-mRNA processing factors [J]. Mol Biol Cell., 1998, 9(12):3547-3560.

[43] Gozani O K. P., Jones DR, Ivanov D, Cha J, Lugovskoy AA, Baird CL, Zhu H, F ield SJ, Lessnick SL, Villasenor J, Mehrotra B, Chen J, Rao VR, Brugge JS, Fer guson CG, Payrastre B, Myszka DG, Cantley LC, Wagner G, Divecha N, Prestwi ch GD, Yuan J., The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functi ons as a nuclear phosphoinositide receptor [J]. Cell, 2003, 114(1):99-111.

[44] Jones DR B. Y., Keune WJ, Halstead JR, Elouarrat D, Mohammed S, Heck AJ, D' Santos CS, Divecha N., Nuclear PtdIns5P as a transducer of stress signaling: an i n vivo role for PIP4Kbeta [J]. Mol Cell., 2006, 23(5):685-695.

[45] Bunce MW B. I., Anderson RA., Coordinated activation of the nuclear ubiquitin lig ase Cul3-SPOP by the generation of phosphatidylinositol 5-phosphate [J]. J Biol C hem., 2008, 283(18):8678-8686.

[46] Yang X K. -F. R., Chang HY, Baltimore D., Daxx, a novel Fas-binding protein that

Activates JNK and apoptosis [J]. Cell, 1997, 89(7):1067-1076.

[47] Li R P. H., Watson DK, Papas TS., EAP1/Daxx interacts with ETS1 and represses transcriptional activation of ETS1 target genes [J]. Oncogene., 2000, 19(6):745-753. [48] Perlman R S. W., Brooks MW, Lodish HF, Weinberg RA., TGF-beta-induced apopto sis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation [J]. Nat

Cell Biol., 2001, 3(8):708-714.

[49] La M K. K., Park J, Won J, Lee JH, Fu YM, Meadows GG, Joe CO., Daxx-medi ated transcriptional repression of MMP1 gene is reversed by SPOP [J]. Biochem B iophys Res Commun., 2004, 320(3):760-765.

# 第一章 ：SPOP蛋白表达构建及结构生物学研究

1前言

SPOP基因与人类的多种生理活动有关，近十几年受到人们越来越多的重视。研究发现SPOP蛋白通过单/多泛素标记底物发挥作用，底物的多样性决定SPOP蛋白在不同生物进程中起着多样的角色。SPOP在生物体内到底有多少种底物尚且未知，但SPOP基因的突变可以导致多种不正常的生理变化，影响了包括信号传导、细胞增殖、代谢通路和胚胎发育等多种生理活动。[1]2009年Jiang Liu等发表在Science上的论文指出，SPO P基因在99%的肾透明癌细胞中高表达。[2]其他研究也指出SPOP蛋白在前列腺、胸腺癌中表达也有明显异常表达。[3]长期以来，癌症防治的主要方法是通过细胞毒剂类化疗药物杀伤肿瘤细胞。目前此类型的化疗药物在临床上的缺点主要是易产生耐药性和毒副作用大，因而使之治疗受到限制或达不到治疗的目的。[4]因此，对于癌症的防治，目前研究主要集中于发现新的抗肿瘤靶点以及合成新内涵的抗肿瘤药物。生物信息学研究和生理功能研究都表明SPOP蛋白可能成为一个全新的潜力抗肿瘤靶点。[5]

近几十年的生物物理技术发展迅猛，借助X射线衍射、二维或多维核磁共振等手段，人们对生物大分子的空间三维构象及其结构的运动变化能够有一个清晰的认识。在结构分子生物学取得重大成就的基础上，人们建立了以蛋白及其他分子结构为平台，虚拟筛选药物的新手段。借助超级计算机的高效运算能力，虚拟筛选药物比传统方法快速、高效并且大规模的筛选可能成为药物的化合物。药物基于受体结构的药物分子设计在方法学上主要有两个发展趋势：一是全新药物分子设计(de novo drug design)，首先映射出受体结合腔穴分子的表面性质，如疏水性、空间性和电性及氢键特征，搜索分子碎片库，在一定程序下通过计算机计算模拟出与受体结合腔穴性质互补的化合物分子，对产生的系列分子，按其与受体相互作用能和结构匹配情况构造先导化合物，这种方法的优势在于有可能构造出完全新型结构的先导化合物，局限性在于设计的分子可能在化学合成方面有较大困难且构建出的化合物与实际实验可能相差很多。[6-10]

另一种比较现实的作法是基于结合位点的数据库搜索(Site-directed Database Searc hing)，利用分子对接技术(DOCK)自动的匹配受体结合腔穴和化合物数据库中的小分子三

维结构，然后利用基于力场项的能量函数或者基于经验性函数对这种分子对接的好坏进行打分，从而选择与受体结合腔穴结合最好的一组化合物进行生物活性测试。在药物设计中，分子对接方法主要用来从小分子数据库中搜寻与受体生物大分子有较好结合性的小分子，进行药理测试，从中发现新的先导化合物。分子对接法的主要优点是：首先，小分子配体基本上来自现有化合物数据库或制药公司自己的法人数据库，合成路线比较成熟，而且其中很大一部分可以向供应商定购。因此，分子对接方法可以大大加快先导化合物的发现进程。[11-14]

研究背景对SPOP蛋白功能及结构的分析告诉我们，SPOP的三个结构域中只有MAT H结构域是决定底物特异性的。因此，针对SPOP蛋白功能的抑制剂设计应集中在MAT H结构域上。综上所述，基于SPOP(MATH)蛋白的结构和虚拟筛选技术，我们可能更有效率的发现SPOP蛋白的专属抑制剂。由此，本部分的主要内容是（1）得到有活性的SP OP(MATH)蛋白及蛋白晶体，确保后续虚拟筛选的准确性以及后续验证试验的可实施性；

（2）基于SPOP（MATH）的结构和分子对接技术，从化合物库中虚拟筛选SPOP蛋白的抑制剂。

# 2 实验材料及方法

## 2.1 实验材料

### 2.1.1 质粒与菌种

DH5α感受态细胞、BL21DE3-(GLOD)感受态细胞等购自Invitrogen（Carlsbad, CA, USA）公司；pGEX6p-1为中科院上海有机化学研究所周家海教授惠赠，目的基因序列为中科院北京基因组研究所刘江教授惠赠。PP（Prescission Protease）蛋白酶表达菌种为中科院上海药物研究所沈旭教授惠赠。

化合物与多肽

表1 实验试剂及公司（一）

| 试剂名称 | 公司 |
| --- | --- |
| 蛋白标准 Marker SM 0671 | 美国 Fermentas 公司 |
| 蛋白胨、酵母粉 | 英国 OXOID 公司 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | NaCl、咪唑、SDS、甘氨酸和过硫酸铵、  Na H2PO4、Na2HPO4 等 | 国药集团化学试剂有限公司 |
|  | IPTG、β -Me、TEMED、30%丙烯酰胺、 硼酸、EDTA、HEPES 等 | 上海生工公司 |
|  | BamHI、XhoI、T4 DNAligase | NEB 公司 |
| 和 Taq mix 酶 | | |
|  | PrimeSTAR HS DNA Polymerase | Takara 公司 |
|  | DNA 质粒提取试剂盒 | 天根生化科技有限公司 |
| DNA 产物凝胶回收试剂盒  DNA 产物纯化试剂盒 | | |
|  | DNA Maker Ⅳ&Ⅰ | 美国 Ferments 公司 |
|  | 10×DNA Loading Buffer | 天根生化科技有限公司 |
|  | Agrose 琼脂糖 | Roche 公司 |
|  | 氨苄青霉素钠 | 上海生工公司 |
|  | 蛋白质结晶池液试剂盒 | 美国 Hampton 公司 |

### 2.1.2 实验仪器

表2 实验仪器、型号及公司（一）

| 仪器名称 | 型号 | 公司 |
| --- | --- | --- |
| 低温超速离心机 | J-26XP | 美国 Beckman 公司 |
| 震荡培养箱 | ZQWY-200 | 上海知楚仪器有限公司 |
| 电热恒温培养箱 | DHP-9162 | 上海泰慧仪器制造有限公司 |
| PCR 仪 | S1000 | Bio-RAD |
| ÄKTApurifier 蛋白纯化系统 | UPC10 | GE Healthcare |
| HisTrap HP | 5ml | GE Healthcare |
| GST Trap FF | 5ml | GE Healthcare |
| Surperdex75 层析柱 | 16/30 | GE Healthcare |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 凝胶成像系统 | Tanon-2500(R) | 上海天能科技有限公司 |
| 恒温水浴锅 | TR1000 | 上海知楚仪器有限公司 |
| 坐式低温离心机 | 5418R | Eppendor,德国 |
| 移液枪 | 5018 | 美国 Running 公司 |
| 蛋白质凝胶电泳系统 | PowerPac | Bio-RAD |
| 细胞超声破碎仪 | JY-92ⅠN | 宁波新芝生物技术有限公司 |
| 超低温冰箱 | Forma900 | Thermo |
| 立式显微镜 | SMZ1500 | 日本 Nikon,公司 |
| 电子天平 | ML1602 | 美国 Meteler Toledo 公司 |
| 超净工作台 | A580 | 苏净安泰科技公司 |

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 重组人源SPOP（MATH）蛋白表达质粒的构建目的片段扩增

○1 SPOP(MATH)模板来自北京基因组研究所所刘江教授提供的SPOP蛋白全长基因序列，P CR引物由Primer Premier 5.0软件设计，克隆的酶切位点为BamHⅠ和XhoⅠ。引物序列如下：

正向TATCGGATCCATGTCAAGGGTTCCAAGTCCTCC

反向GACGCTCGAGTAGTTAGGATTGCTTCAGGCGTTTG

○2 PCR反应体系为50μl，体系中各组分如表3所示

表3 PCR扩增反应体系

| 组分 | 体积（总体积 50μl） |
| --- | --- |
| 5×PrimeSTAR®Buffer（Mg2+ plus） | 10 μl |
| Sample plasmid（10 pg/μl） | 1μl |
| Sample primer （F）（10mmol/μl） | 1μl |
| Sample primer （R）（10mmol/μl） | 1μl |

|  |  |
| --- | --- |
| DNTP Mixture | 4μl |
| PrimeSTAR DNA Polymerase(2.5 U/μl)dH2O | 0.5μl  Up to 50μl |

○3 PCR反应条件

按表4中的条件设定PCR仪的程序

表4 PCR扩增反应条件

| Cycles | Temperature | Reaction Time |
| --- | --- | --- |
| 1 cycles | 95°C | 10min |
|  | 95°C | 10sec |
| 30cycles | 55°C | 5sec |
|  | 72°C | 50sec |

○4扩增结果检测与纯化

PCR反应结束后，加入DNA loading Buffer，上样于1%（w/v）浓度的琼脂糖凝胶，稳定电压120V, 30min左右，分离DNA片段。在紫外检测等下观察PCR扩增的片段大小正确，再将剩余的反应体系用DNA纯化试剂盒除去引物二聚体等。

酶切与连接

目的DNA片段与载体双酶切，目的基因和载体分别用两种限制性内切酶在37℃水浴反应2h，酶切体系如表5所示。反应结束后在65℃加热20min终止反应，上样于1%（w

/v）浓度的琼脂糖凝胶，稳定电压120V，分离40min左右，跑胶检测。在紫外检测等下观察DNA的片段为单一条带，将含有目的片段的琼脂糖凝胶胶仔细切下，凝胶回收试剂盒回收。

表5 双酶切反应体系

| 组分 | 体积（总体积 50 μl） |
| --- | --- |
| 5×NEBuffer 3 | 5 μl |
| Sample DNA/plasmid（2000ng） | 10~20 μl |

|  |  |
| --- | --- |
| BamHI | 1 μl |
| XhoI | 1 μl |
| 100×BSA | 0.5μl |
| dH2O | Up to 50 μl |

纯化回收得到的目的基因和载体以一定比例（通常是目的片段的量大于等于质粒片段的三倍）在T4 DNAligase反应体系中连接，反应体系见表5.22℃水浴反应十分钟反应完成后，立刻加入置于冰上的大肠杆菌DH5α感受态细胞。放置45 min之后，42℃热击70 s，加入1 ml LB液体培养基，37℃，150 rpm扩增50 min之后，1000 rpm离心30 s。将沉淀的细胞均匀涂在LB固体培养基平板中。37℃培养箱中放置过夜。

表6 连接反应体系

| 组分 | 体积（总体系 20μl） |
| --- | --- |
| 10×T4DNAligase Buffer | 2 μl |
| Double digest Sample DNA（200ng） | 1~20 μl |
| Double digest plasmid（50ng） | 1~20μl |
| T4DNAligase | 1μl |
| 10×BSA | 0.2μl |
| dH2O | Up to 20μl |

克隆正确性检测上述的连接产物若长出若干单克隆菌落，进行下一步操作；若没有长出则重复PCR

扩增和酶切连接的步骤。培养过夜的LB固体平板，挑取大小合适，边缘平滑的单克隆菌落至2 ml LB液体培养基中，37℃，230 rpm培养5-6 h之后抽取DNA(100℃煮10 min即可)，再次PCR扩增，PCR反应过程采用Tag酶体系，组分如下表所示。PC R反应结束后，加入DNA Loading Buffer跑胶检测，得到与目的片段大小相同扩增结果为阳性单克隆，抽取质粒，送测序。

表7 Taq酶PCR扩增反应体系

| 组分 | 体积（μl） |
| --- | --- |

|  |  |
| --- | --- |
| Sample plasmid（10 pg/μl） | 1μl |
| Sample primer （F）（10mmol/μl） | 0.5μl |
| Sample primer （R）（10mmol/μl） | 0.5μl |
| 2×Taq mix DNA Polymerase | 10μl |
| Dd H2O | Up to 20μl |

蛋白表达与纯化

##### （1) SPOP（MATH）蛋白在E. coli.中表达

○1表达载体的扩增

测序正确的质粒转入BL21DE3-(GLOD)表达感受态细胞中，挑取正常生长的单克隆菌落至10 ml LB液体培养基，培养基中含有终浓度为50 mg/L的氨苄卡那霉素。37℃、230 rpm摇床过夜培养，次日按1: 100（体积比）的比例接入1 L的LB液体培养基中，同样抗性是Amp50。

○2 SPOP（MATH）蛋白的诱导表达

细菌在37℃，230 rpm条件下培养，大约2 h生长至OD600为0.6左右（10ml培养基接入大瓶后1小时，每隔20分钟取一定量的培养基，紫外分光光度计检测OD600的吸收值），冷却培养基至16℃，加入IPTG至终浓度为0.5 mM到大肠杆菌表达蛋白。2 30 rpm，16℃温和环境诱导蛋白表达。待大肠杆菌生长14-16 h之后，取出培养基，分装至1 L的离心瓶中，5000 rpm的转速离心8 min，弃上清，倒置在吸水纸上吸干残留的液体培养基，几分钟后收集沉降的细胞。

##### （2）SPOP（MATH）蛋白的纯化

○1细胞破碎

收集的细胞转移至干净的50 ml离心管中，称重。加入适量体积的Lysis Buffer（细菌质量占总的10%-20%）混匀，使细胞均匀的悬浮在缓冲液中。超声破碎细胞，35%输出功率，开3 s停5 s，每40 ml细胞混悬液超声20 min左右。以吸出混悬液再滴下时不连成一条直线为标准判断细胞破碎是否彻底。

○2 SPOP（MATH）蛋白纯化

转移裂解液至超速离心管中，离心15000rpm，30min。小心移出上清液。上清液以3 ml/min的流速通过HisTrap HP预装柱，SPOP（MATH）所带有的六个组氨酸蛋白与预装柱中的Ni结合。上样之后的预装柱连接到ÄKTApurifier层析流路中，先用平衡的Buf ferA洗去非特异性结合的杂蛋白，然后用含有咪唑的洗脱BufferB梯度洗脱目的蛋白。根据紫外检测仪显示流出液的吸收值，选取合适的峰高收集流出液。得到粗提取的蛋白样品，跑胶检测蛋白大小约为44 KD附近，此蛋白为N-His-GST-SPOP。

上一步得到的蛋白浓缩至10 mg/ml左右，经过PP（Prescission Protease）蛋白酶酶切之后去除N端的His-GSTtag。在PP酶切的Buffer中，SPOP（MATH）蛋白和PP酶以100: 1的质量比在4℃孵育过夜。次日将酶切混合物再次通过Ni-NTA亲和柱，收集流穿液并浓缩至2 ml以内，上样至SurperDex75分子筛凝胶层析色谱柱中，流动相洗脱一个住体积，得到分离的单一组分蛋白。根据紫外检测器显示的峰值收集蛋白并检测，得到高纯度的SPOP（MATH）蛋白。

○3 Prescission Protease(PP)蛋白的表达与纯化

取少量PP酶的表达菌种，在LB固体培养基上划线活化，37℃培养过夜后，挑取单克隆菌落至10 ml LB液体培养基中，37℃，230 rpm培养5-6 h，接种至1L抗性为A mp50的LB液体培养基中（抗性为Amp50），37℃培养至OD600为0.6左右，加IPTG至终浓度为0.5 mM，接着在30℃条件下诱导4 h。

收集细胞，破碎等参见SPOP（MATH）蛋白的纯化步骤，此蛋白酶为GST tag，用平衡Buffer洗干净杂蛋白之后，用100% BufferB（含有10mM的谷胱甘肽）一次全部洗脱而不采用梯度洗脱策略。

○4 SDS-PAGE蛋白电泳跑胶分析

所有蛋白样品与2×Loading Buffer混匀，100℃煮10 min，根据蛋白量上样以F ermentas 0671蛋白Marker为标准分子量，每泳道上样2-15μl, 150V稳定电压分离50min。浓缩胶及分离胶配方如下表所示。

表8 SDS-PAGE蛋白电泳5%浓缩胶配方

| 组分 | 体积（总体积 20ml） |
| --- | --- |

|  |  |
| --- | --- |
| ddH2O | 4.0ml |
| 1.5MTris-Hcl pH 8.8 | 7.6ml |
| 30%聚丙烯酰胺 | 8.0ml |
| 10%SDS | 0.2ml |
| 10%APS | 0.2ml |
| TEMED | 0.008ml |

考马斯亮蓝染色分析，电泳结束后，凝胶在100 ml的固定液（10%乙酸，40%甲醇）震荡约1 h，更换去离子水漂洗10 min，如此重复三次；加入100 ml 5%胶体考马斯亮蓝R250染液，震荡1 h，回收剩余染料，用去离子水漂洗除去残留染料三次，每次漂洗十五分钟，最后可以清晰的看到蛋白胶上的蛋白条带。SPOP(MATH)蛋白结晶与蛋白晶体解析

○1蒸汽悬滴法蛋白结晶

新鲜的SPOP(MATH)蛋白浓缩至42-50 mg/ml（紫外分光光度计测算，以蛋白保存bu ffer为空白背景），保存于20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM DDT溶液中，冰浴。结晶池液放在22℃至温度恒定后使用。在硅化的显微镜盖玻片上以1 ul:1 ul的比例混合蛋白和结晶池液，尽量使混合的液滴饱满。将盖玻片轻轻倒扣在结晶池上面，结晶池中有约400 ul的结晶池液（以能够覆盖住结晶池底为佳）。然后用硅油把盖玻片和结晶池口密封，使结晶小室形成封闭的空间，注意不要破坏悬滴液的形状。

一块结晶板上的所有结晶池都密封好之后，轻轻将结晶板转移到22℃的恒温箱中，

静置。整个实验过程都在22℃恒温室操作最佳。放入恒温箱之后每隔几天观察结晶板。在立式显微镜下观察悬滴液是否产生沉淀或有晶体出现。

○2晶体的处理及X射线衍射在立式显微镜下选定生长大小合适的晶体，撬开盖玻片放在显微镜下观察是否有开

裂破碎，尽量选择完整无损的晶体。准备好干净的池液和一定浓度的甘油混合的清洗液，以及晶体保护液（甘油终浓度为20%左右）。选用合适大小的Loop环，在显微镜下捞起蛋白晶体先放入清洗液中翻转几次，再次捞起转移至晶体保护液中，随后放入新鲜液氮冻几分钟后保存至晶体罐中。

本实验涉及的晶体衍射数据在上海同步辐射光源采集。原始数据经CCP4软件处理后再经Cook软件优化模拟得到SPOP蛋白的模拟三维立体图。

小分子化合物虚拟筛选（本部分与DDDC合作完成，化合物所有权归属中国科学院上海药物研究所）

○1定义“口袋”，运行DOCK进行打分筛选。以SPOP（MATH）蛋白结合底物的五个关键氨基酸位点及相关表面为基础。采用DOCK4.0程序中的autoMS产生分子表面，确定口袋位置，再用sphgen程序对口袋部位的分子表面的位点进行聚类，确定口袋部位的球集，最后确定grid程序的计算范围，对口袋部位进行grid计算。利用DOCK4.0对化合物和蛋白进行对接，并利用DOCK自带的能量打分函数来得到最低结合能的结合模式，以此对化合物库进行初筛。

○2再次分析其分子结构，由于许多相似结构存在，只需先对其中的代表化合物做深入实验。首先根据聚类分析的方法把分子结构或理化性质类似的化合物分组，即基于药效团和结构母核的分析分类，根据构效关系原理，同时结合了有机化学，药物化学和天然药物化学中的分类方法，终确定几个大类别，其中复杂类型又根据其次要结构再分为若干小类，将不具备代表性的化合物暂时予以剔除，每个类别里面又按照能量由高到低排序，使靠前的化合物即具有化学结构的代表性又具有较高的能量得分。

○3最后对进入考虑范围的化合物进行各种理化数据综合分析筛选，对不合理的化合物剔除。然后根据的一些物理化学和药代动力学将这些化合物又基于药动团和物理性质的分析分类，具有同一基团的化合物具有相似的药代动力学性质，排除类似官能团的小分子化合物，得到最后的小分子化合物。

# 3 实验结果

## 3.1 SPOP（MATH）蛋白表达

利用大肠杆菌原核表达系统建立了一种高效表达可溶性的SPOP（MATH）蛋白表达体系。由于本实验注重蛋白晶体的结构研究，因而要求蛋白纯度高、稳定性强。另外，我们在原核表达体系中引入的His-GST-tag对简化蛋白纯化很有帮助，His-tag具有与凝胶纯化柱亲和力强，但是得到的蛋白纯度差的特点。而GST-tag则得到的蛋白纯度高却亲和较弱，单纯的GST-tag纯化蛋白得到量非常有限。两者结合之后，既提高了蛋白得

率，也提高了蛋白纯化的纯度，是一种相对比较高效的蛋白纯化体系。各步骤的实验结果如下图所示，明显可见。

图2 SPOP蛋白纯化结果图

图2（A）：第一泳道为蛋白Maker，第二泳道为细胞裂解液上清经Ni柱捕获之后得到的N-His-GST-SPOP蛋白，第三泳道为粗纯的蛋白经PP酶切过夜之后切去His-GST-tag的分离结果。

图2（B）：第一泳道为蛋白Maker,第二泳道为蛋白经分子筛GF75纯化之后得到的结果。

## 3.2 SPOP（MATH）蛋白晶体的获得和衍射数据解析

完成了SPOP(MATH)质粒的构建并表达了SPOP（MATH）蛋白，完善了其纯化策略，在此基础上，我们摸索合适的蛋白结晶条件，包括蛋白浓度，结晶池液，结晶温度等条件得到衍射高分辨率的晶体。

### 3.2.1 SPOP（MATH）蛋白晶体的获得

蛋白结晶条件筛选中主要采用悬滴法，将SPOP(MATH)浓缩至42-55 mg/ml，保存在20mM Tris-HCl, 150mMNaCl及5mM DDT中，取等体积的蛋白与池液混合，22℃静置，2

-3天得到晶体。通过Hampton公司的一千多种试剂盒的筛选，多种条件下SPOP（MATH）

蛋白都可以结晶，晶体形状各不相同。最易结晶的有两种类型的池液，一种是硫酸铵为主要沉淀剂，一种是PEG3000为主要沉淀剂。这两种类型的晶体均经过X射线衍射，硫酸铵条件下的晶体衍射数据不佳，最终采用PEG3000为主要沉淀剂的池液中的蛋白晶体衍射分析数据。这一结果与文献报道的结晶条件非常类似，最终得到的晶体结构的三维空间数据也与文献报道吻合，证明本实验条件下得到的蛋白晶体结构稳定，为下一步实验铺垫了坚实的基础。

图 3 为主要的两种蛋白晶体的照片，表10为两种蛋白的结晶池液组成。

表1 0两种蛋白晶体所在的结晶池液

| PEG/Ion2 Screen 26  号条件 | 0.2 M 三水乙酸钠  PH 7.0  20% W/V PEG3350 | 晶体近两个叠放的正四面体，衍射数据 较好 |
| --- | --- | --- |
| Grid Screen 8 号条 件 | 0.1 M Citric acid pH5.0  1.6 M (NH4)2SO4 | 晶体为正四方体，放置时间长后变大， 衍射较差 |

图3 SPOP(MATH)两种蛋白晶体的照片

图3（A）蛋白结晶池液为0.2 M三水乙酸钠，pH 7.0, 20% W/V PEG3350图3（B）蛋白结晶池液为0.1 M Citric acid，pH5.0, 1.6 M (NH4) 2SO4 3.2.2 SPOP（MATH）蛋白晶体的衍射数据与解析

我们所得到的蛋白晶体结构解析数据如表11，SPOP(MATH)的cartoon结构图如图4所示，SPOP(MATH)在溶液中形成稳定的二聚体：

表11 SPOP(MATH)蛋白晶体衍射数据

| Resolution[Å]: | R-Value | R-Free | Space Group |
| --- | --- | --- | --- |
| 1.43 | 0.175 (obs.) | 0.206 | C 2 |

图4 SPOP(MATH）蛋白的3D模拟图及不同角度的3D模型截图

## 3.3 SPOP（MATH）蛋白抑制剂虚拟筛选

SPOP（MATH）蛋白经过计算机从化合物库中虚拟筛选出可能有相互作用的小分子化合物抑制剂，排除相似结构，行各种理化数据综合分析筛选，对不合理的化合物剔除。然后根据的一些物理化学和药代动力学将这些化合物又基于药动团和物理性质的分析分类，得到最后的112个小分子化合物，从美国SPECS化合物库购买。

# 4 讨论

## 4.1 原核表达系统SPOP(MATH)蛋白表达

这一部分的主要目的有两点，一是建立一种高效、大量的表达有活性的SPOP（MATH）蛋白的方法；第二是为了确保在我们的实验条件下得到的SPOP（MATH）蛋白结构和文献报道一致，便于下一步基于蛋白结构的小分子化合物筛选。这两个目的在这一部分的实验中都顺利完成。在本实验的原核表达系统中，1L菌液在经过三个步骤纯化之后得到大约15-20 mg左右的高纯度蛋白，蛋白表达量相对较高。这个结果与蛋白本身序列、质粒载体，细菌寄主细胞，诱导条件、表达条件以及最后纯化条件都有关系。这一点在用原核系统表达其他蛋白的时候很有启发意义，通过对序列优化，表达系统各个环节和最后纯化条件的优化，都可以帮助我们提高蛋白产量和纯度，为之后的一系列实验做好基

础。

## 4.2 蛋白晶体的获得和解析

我们得到蛋白晶体衍射数据与文献基本一致，都是以二聚体形式存在。并且，本实验所得到晶体衍射率较高，有利于SPOP（MATH）和其他化合物或其他蛋白的复合物晶体研究，为直观的研究SPOP（MATH）蛋白和小分子的相互作用奠定基础。

## 4.3 基于SPOP（MATH）蛋白结构的小分子抑制剂虚拟筛选

研究背景中介绍了SPOP蛋白的基本功能，不同于经典的蛋白酶。SPOP是以蛋白-蛋白相互作用（PPI, protein–protein interactions）为基础的蛋白连接酶。虚拟筛选技术中，传统的DOCK理论基础一锁钥理论本身就有缺陷，而比较符合实际的是诱导契合学说。这种理论认为生物大分子的活性中心与配体的结构不是刚性互补而是柔性互补。当生物大分子与配体相互靠近时，配体能够诱导生物大分子的构象发生改变，同时生物大分子又会诱导配体的构象也发生改变，两者的结合时结构互补。因此在应用DOCK时要考虑生物大分子和小分子化合物的构象是互相诱导的结合，而不是刚性对接，这也是D OCK遇到的无法回避的基础性重大问题。因此，传统的DOCK策略不适合以PPI为基础的药物筛选。

蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interaction, 简称PPI)是生物信息调控的主要实现方式，在生物过程中有着非常重要的作用，是决定细胞命运的关键因素。现代药物研发已达到分子设计水平，利用小分子化合物来调控蛋白-蛋白相互作用，进而调控生命现象已成为可能。蛋白-蛋白相互作用为我们展示了一类新的、重要的疾病治疗切入点。[15]与此同时，基于蛋白-蛋白相互作用小分子抑制剂的设计仍也存在一定的挑战性，例如药物化学工作者面临的最大的困难主要有：蛋白-小分子作用的接触面大约为300～1000Å左右，而蛋白-蛋白相互作用的接触面则为1500～3000Å之间；而且，蛋白-蛋白相互接触的表面往往是平坦的，不会存在很多沟槽或者口袋，使得设计的小分子化合物找不到适合的结合位点；其次，大部分的蛋白-蛋白相互作用的接触面含有一些在聚合物链中并不连贯的氨基酸残基等，使得低分子量有机分子难以集中阻止这一实质性高亲和度的相互作用。[16]尽管如此，近年来，关于蛋白-蛋白相互作用小分子抑制剂的研究已经成为药物化学家关注的热点，已有多种蛋白-蛋白相互作用小分子抑制

剂(small molecular protein-protein interaction in- hibitors, 简称SMPIIs)得以报道。

在本实验中，SPOP(MATH)蛋白的表面也呈现相对较为平坦的状态，为我们设计小分子的结合位点增加困难。我们的设计思路以下面两点为基础：（1）已有的SPOP(MATH)的晶体结构；（2）文献中提出的SPOP蛋白的底物必须要有含有五个极性和疏水性相同的氨基酸，即Φ-π-S-S/T-S/T。我们首先利用计算机程序准确测量了已知的SPOP(MAT H)的和底物多肽结合的位点和距离，确定SPOP(MATH)蛋白表面的一些特异疏水性位点，随后再编写程序筛选化合物库中可能和SPOP（MATH）这些热点位置结合的小分子化合物，完成虚拟筛选的工作。

# 第二章 ：小分子抑制剂的活性验证

# 1 前言

现代技术的发展，使药物研发的速度有极大的提高。这种提高不仅只有上半部分内容中提到的基于蛋白质结构而进行的全新化合物设计和小分子化合物的筛选之外，各种新技术，尤其是新方法、新仪器的使用使得上千上万甚至更多的药物高通量筛选成为可能。SPOP蛋白的生物功能确定为E3家族的连接酶，主要作用为识别并连接不同的底物分子。根据SPOP（MATH）的生理功能特性，我们设计了两种在分子水平验证结小分子化合物和SPOP(MATH)蛋白结合活性的的实验。这两种方法分别是FP（Fluorescence Pola rization）和SPR（surface lasmon resonance）。

表面等离子体子共振(surface lasmon resonance, SPR)是一种物理光学现象。在发生全反射的界面涂上一薄层金膜（或其它金属膜）约50 nm厚，由于金膜中有自由电子，它们并不是静止不动而是不停在平衡位置附近振动，并具有一定的频率。当光由另一侧以大于临界角入射有金膜的界面，由于入射光会在界面方向有一分量，当这一分量与金膜中电子振荡频率相同时，两种能量会发生整合，使在某个角度上发射光能量降低，这个能量降低的角度成为SPR角。当紧靠在金属薄膜表面的介质折射率不同时, SPR角的位置将不同，根据SPR角的变化可以推断所发生的变化。BIA是英语“Bio-molecular In teraction Analysis”的缩写，BIA是基于表面等离子体共振（SPR）技术来实时跟踪生物分子间的相互作用，而不用任何标记物的技术。通过它能观察两种分子结合的特异性，能知道两种分子的结合有多强，还能了解生物分子的结合过程共有多少个协同者和参与者。BIA的原理就是利用金属薄膜表面的折射率的改变，引起共振角的变化，来推断金属薄膜表面的变化。实验时先将一种生物分子固定在传感器芯片表面，将与之相互作用的分子溶于溶液流过芯片表面。检测器能跟踪检测溶液中的分子与芯片表面分子的结合、解离整个过程的变化。

FP(Fluorescence Polarization)通常用于高通量筛选药物。FP理论由法国科学家Perrin由1926年提出，主要原理是分子在均相溶液中自由旋转，当一个被荧光标记的分子受到一个平面偏振光激发时，其发射光可发射到一个固定的平面，而该发射光的偏

振水平与分子的旋转速度成反比。一个分子的偏振值与分子的旋转松弛时间或旋转68. 5°所需时间成正比，旋转松弛时间（θ）与溶液黏度（η），绝对温度（T），分子体积

（V），气体常数（R）有关，即θ=3η V/RT。当体系中溶液的黏度和温度固定不变，则F P的值只与溶液中的分子大小成正比。溶液中大的分子在激发状态几乎不旋转，而小分子在激发状态快速旋转偏振值小。分子体积变化可源于两个分子的结合或解离，分子降解，构象改变等。[17]

生物信息学的研究表明，高达99%透明肾癌细胞系中检测到SPOP蛋白高表达，我们猜测，透明肾癌细胞的不正常增殖与SPOP蛋白的高表达存在一定的相关性和必然性。如果小分子化合物抑制了SPOP蛋白的功能，可能就抑制了SPOP蛋白所在的信号通路，影响肾癌细胞的存活。以此为设计思路，小分子化合物如果表现为抑制透明肾癌细胞系正常生长，并且对小分子化合物的量有浓度依赖性，就可以说明小分子化合物对透明肾癌细胞有药理性的杀伤效果，并且很有可能是通过抑制SPOP蛋白的活性来实现的。

从多层次筛选活性化合物的整体策略来看，除了对小分子化合物和SPOP(MATH)在分子水平的活性验证之外，细胞内的活性考察也是检验活性的重要组成部分。分子细胞内的真实环境复杂而精细，体外实验不能完全模拟SPOP蛋白发挥正常生理作用的真实内环境，实验结果常常与实际现象不符合。因此，我们必须关注小分子化合物对癌细胞生长抑制作用和杀死癌细胞的能力。一方面，观察小分子化合物直接与癌细胞作用，能够更为直观的了解小分子化合物的有效性；另一方面，为日后深入研究小分子化合物在细胞中SPOP信号通路中所起到的作用铺垫。[18]

CellTiter-Blue®Cell Viability Assay(Cell Titer-Blue®细胞活力检测)提供了一种均质、荧光的方法来检测细胞活力。检测原理是基于活细胞能将一种氧化还原染料（刃天青，resazurin）转化成一种荧光终产物（试卤灵，resorufin）。由于不具有活力的细胞很快丧失新陈代谢能力，故而不能生成荧光信号。所以，该系统特异性检测活性细胞，应注意激发波段与发射波段不能重叠。刃天青的最大吸收波长为605 nm，试卤灵的最大吸收波长为573nm。实验结果可用荧光计或分光光度计记录。[19]

# 2 实验材料及方法

## 2.1 实验材料及来源

SPOP(MATH)蛋白、PUC蛋白为本实验室自行构建表达纯化。

三个肾癌细胞株caki-2, A498和786-O以及三个非肾癌细胞株HeLa, MDA-MB-2 31, HEK293源肾癌细胞株均由中国科学院北京遗传所刘江教授惠赠，细胞培养于含5% Gibco胎牛血清的α-MEM培养基中。以上细胞均置于37°C含5% CO2的饱和湿度培养箱中，传代培养。

小分子化合物购买与美国SPECS化合物库纯度为95%以上，-20℃干燥密封条件下保存。使用时溶于DMSO配置成5μM的储存液，再用细胞培养液稀释至不同浓度。2.1.1 实验主要试剂

表12 实验试剂及公司（二）

| 试剂 | 公司 |
| --- | --- |
| RPMIMediu-n1640 | Life Technologies,Inc |
| 蛋白标准 Marker SM 0671 | Fermentas |
| Dulbecco's modified Eagle's | Life Technologies,Inc |
| 胰蛋白酶 | GIBCOBRL 公司  GIBCOBRL 公司 |
| 小牛及胎牛血清(NCS/FBS) |
| DMSO | 美国 Sigma 公司 |
| 硼酸钠、SDS、甘氨酸、过硫酸铵、  NaH2PO4 和 Na2HPO4 等 | 国药集团化学试剂有限公司  国药集团化学试剂有限公司 |
| Tween-20 | 国药集团化学试剂有限公司 |
| TEMED、30%丙烯酰胺 | 上海生工生物科技有限公司 |
| HEPES, P20 | Sigma 公司 |
| DTT | 北京新科生物技术有限公司 |
| BSA | 北京新科生物技术有限公司 |
| CellTiter-BlueTM 试剂 | Promega 公司 |

### 2.1.2 实验主要仪器

表13 实验仪器、型号及公司（二）

|  | 仪器 | 型号 | 公司 |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 细胞培养箱 | Forma311 | 美国 Thermo |  |
|  | 超净工作台 | HDL APPA RARUS | 北京东联 |  |
|  | 相差显微镜 | Kx4 | 日本欧林巴斯 |  |
|  | 超纯水系统 | Elix | 美国 Millipore |  |
|  | 台式低速离心机 | PICO17 | 美国 Thermo |  |
|  | 多功能酶标仪 | SynergyH7 | 美国 BIO-TEK |  |
|  | 紫外分光光度计 | Nanophotometer | 德国 Implen |  |
|  | 全自动高压灭菌锅 | MLS-3780/3750 | 日本三洋 |  |
|  | 柜式恒温培养摇床 | ZHWY-100B | 上海智诚 |  |
|  | 超低温冰箱 | Farma700 | 美国 Thermo |  |
|  | BMG POLARstar 酶标仪 | UC200 | Omega |  |
|  | Biacore 生物大分子相互 作用分析仪 | Biacore 3000 | GE Healthcare |  |

## 2.2 实验主要方法

### 2.2.1 FP实验方法如下：

##### （1）测定SPOP(MATH)和PUC\_1的结合常数和饱和结合浓度

构建C端标记荧光FITC的PUC\_1肽段（LACDEVTSTTSSSTA). 由文献可知，PUC

\_1已知与SPOP（MATH）有稳定的结合（KD=3.6μmol/L），不同浓度的SPOP（MATH）与PUC\_1孵育半小时后用酶标仪测定其荧光偏振值，用毫偏振单位（mP）表示，荧光偏振值FP根据公式计算得到：

MP=1000×[(IS) - (ISB)]-[(IP) - (IPB)]/[(IS) - (ISB)]+[(Ip) - (IPB)]

其中，IS为平行的激发光强度值，Ip为垂直的激发光强度值，ISB和IPB是背景的相关值由于荧光偏振方法能够在均相中进行，所以这一方法能够进行高通量筛选。

荧光偏振混合体系组成如表14所示。溶液配好之后，用移液枪小心加入96孔板中，避免产生气泡。常温下避光孵育半小时。使用发射波长为45nm的多功能酶标仪测定其

吸光值。测定三组平行的FP值，取Mean±SD作图，根据软件GrapPad Prisms5作图，纵坐标为荧光偏振值FP，横坐标为SPOP(MATH)蛋白的浓度的lg值。根据曲线拟合算出PUC\_1和SPOP(MATH)蛋白的KD值。

表14 GST-SPOP(MATH)和PUC\_1荧光偏振实验体系

| 组分 | 浓度（总体积 100μl） |
| --- | --- |
| N-GST-SPOP(MATH) | 40nM~40μM |
| FITC-PUC\_SBC1 | 16nM |
| BBS Buffer（pH8.0） | Up to 100μl |

##### （2）排除GST对PUC和N-GST-SPOP(MATH)的结合的干扰

溶液中的蛋白为N-GST-SPOP(MATH)，为了排除GSTtag对实验干扰，设计了GST蛋白单独和PUC-1-FITC的结合试验，实验组分如表15所示，实验操作同上。

表15 GST蛋白和PUC\_1荧光偏振混合体系

| 组分 | 浓度（总体积 100μl） |
| --- | --- |
| N-GST | 40nM~40μM |
| FITC-PUC\_SBC1 | 16nM |
| BBS Buffer（pH8.0） | Up to 100μl |

##### （3）小分子化合物和SPOP(MATH)结合活性初步筛选

在PUC\_1与蛋白结合饱和时，加入一个固定浓度的小分子化合物做竞争性结合实验。如果小分子化合物能够与FITC标记的PUC\_1竞争结合到SPOP(MATH)上，荧光偏振值会明显降低。根据前面第一个实验的数据，N-GST-SPOP(MATH)蛋白浓度设定为5μM，小分子初筛的浓度设为为200μM。实验体系各组分如表16所示，实验方法同上。

表16 小分子化合物和N-GST-SPOP(MATH)蛋白混合体系

| 组分 | 浓度（总体积 100μl） |
| --- | --- |
| N-GST-SPOP(MATH) | 5μM |
| FITC-PUC\_SBC1 | 16nM |

|  |  |
| --- | --- |
| Compound | 200μM |
| BBS Buffer（pH8.0） | Up to 100μl |

##### （4）小分子KD值测算

在上一步初筛的基础上，测算小分子化合物在溶液中和SPOP(MATH)蛋白的结合常数KD值，实验方法同上，小分子、FITC-PUC \_SBC1和N-GST-SPOP(MATH)三种蛋白孵育半个小时之后测定荧光偏振值。用作图软件GrapPad Prisms5.0拟合出抑制曲线，纵坐标为荧光偏振FP值，横坐标为小分子化合物浓度的log值，根据曲线拟合算出小分子的K D值。

表 17 小分子化合物测算KD值的体系组成

| 组分 | 浓度（总体积 100μl） |
| --- | --- |
| N-GST-SPOP(MATH) | 5μM |
| FITC-PUC \_SBC1 | 16nM |
| Compound | 10 、100 nM；1、10、50、100、 500 μM 和 1 mM |
| BBS Buffer（pH8.0） | Up to 100μl |

### 2.2.2 SPR实验方法

##### （1）耦连蛋白到芯片

选取不同pH的缓冲液，将N-GST-SPOP（MATH）蛋白耦联于相互作用仪BIA-core 3 000的传感芯片CM5上，通常以结合相应值3000-5000RU为佳，确保小分子化合物流过时得到合理的相应值。

##### （2）小分子化合物化合物初筛

以流动相PBS配制20nM浓度的小分子化合物溶液，使用前超声脱气处理，30μl进样，流速为10μl/min，温度25°C，用2M NaCl洗脱。PUC\_1、PTEN为阳性对照（文献报道KD值分别为3.5μM、6.5μM），PBS配制的20nM的DMSO为阴性对照。结合响应值

（RU）反映其结合情况。以横坐标为时间，纵坐标为结合响应值。结合响应值大于20RU则认为小分子化合物与芯片上的蛋白有相互作用。以下几个步骤中上样量、流速、温度

以及洗脱条件等与初筛保持一致，但化合物种类和浓度不同。

##### （3）选取初筛中结合响应值较高的几个化合物复筛为了再次确认小分子化合物不仅可以与SPOP(MATH)相互作用，而且能够影响底物 P

UC与SPOP（MATH）的结合活性。将2 nM的小分子与等摩尔量的PUC蛋白孵育一小时后上样，检测混合物与SPOP（MATH）蛋白的结合响应值。实验组的上样样品中含有等量的小分子化合物和PUC蛋白，对照组的上样样品仅有PUC蛋白。若实验组中的两种混合物流过耦连N-GST-SPOP(MATH)蛋白芯片的结合响应值明显低于仅有PCU蛋白和的对照组，说明N-GST-SPOP(MATH)和底物蛋白PUC的结合受到了小分子化合物的干扰（本实验前提是N-GST-SPOP（MATH）和PUC蛋白结合的相应值明显高于小分子和SPOP（MATH）单独的响应值，PUC蛋白的分子量约为34KD，远远大于300-500D的小分子化合物，满足条件）。

##### （4）排除GSTtag的干扰

为了使筛选的信号更强，耦连到芯片上的蛋白为N-GST-SPOP(MATH), GST标签蛋白的作用形成“三明治结构”放大信号值。小分子不仅可以和SPOP(MATH)结构域结合，同样可以和GST结构域结合。为了排除GST的引起的假阳性化合，我们在芯片的另一个通道耦连了GST蛋白，用PBS配制同样20nmol﹒L-1的小分子溶液，与初筛相同的方法检测小分子与GST蛋白的结合情况。

##### （5）小分子化合物和SPOP(MATH)蛋白KD值测定在确定了初筛得到的小分子化合物既能够影响SPOP（MATH）和PUC蛋白结合，又排

除了与GST结合的假阳性之后，我们对小分子化合物与SPOP(MATH)结合活性的需要进一步验证。测算小分子化合物的KD值可以验证小分子和SPOP(MATH)的结合强度是否对小分子浓度依赖，排除因非特异性结合而产生的假阳性。小分子化合物先用PBS稀释至5 nM的最高浓度，以0.7倍比例逐步稀释至3.5、2.45、1.7和1.2 nM，注意所有配制的小分子溶液中，DMSO在终体系的含量保持一致。检测方法同上，30μl进样流过耦连了N-GST-SPOP(MATH)蛋白的芯片通路，流速为10μl/min，温度25°C，用2 M Na Cl洗脱流路。结合响应值（RU）反映其结合情况。利用Biacore 3000控制软件中的动力学分析Wizard进行动力学分析，得到的数据根据Biacore 3000分析软件中的1∶1

Langmuir结合模型或稳态模型进行拟合，最后用GraphPad Prism 5.0绘制模拟曲线。2.2.3细胞活性抑制率实验方法

##### （1）细胞株复活细作胞冻存时遵循“慢冻”原则，并加入二甲亚砜或甘油作保护剂，这两种物质能

提高细胞膜对水的通透性，再加上缓慢冷冻可以使细胞内的水分渗出细胞外，减少细胞内冰晶的形成，避免冰晶对细胞的损伤同理，细胞复苏时采取“快融”原则，使胞外结晶快速融化而不至于渗入细胞内再结晶对细胞造成损伤。具体操作步骤如下：

将细胞株从液氮罐中取出，置于37℃水浴中迅速溶化。乙醇消毒盖子后，吸管吸出细胞悬液注入灭菌之后的离心管，并加入新鲜的10倍体积的细胞培养液轻轻混匀。800 rpm, 4 min离心，除去上清。之后再用新鲜培养液洗细胞一至两次。

在超净台内将离心管内洗了两次的细胞悬液吸出，接种于25cm2培养瓶中，加入含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液，置于37℃体积分数为5%的CO2培养箱中静置培养，注意不同细胞标记清楚。

##### （2）细胞培养与传代

细胞密度达到80%-90%，或细胞贴壁生长铺满培养皿的时候必须进行消化传代，本实验为每2天左右进行一次传代。具体步骤如下：

①吸出或倒掉瓶内的旧培养液。

②向培养瓶中加入1 ml消化液（胰蛋白酶与EDTA的混合液），轻轻摇晃培养瓶，使消化液流遍所有细胞表面，轻轻吸掉或倒掉消化液之后再用消化液洗一遍细胞。要尽可能多的除去大部分消化液，避免后续实验中对细胞伤害。另外，消化最好在37℃或室温下进行，消化25 min之后显微镜观察细胞，发现胞质回缩，细胞间隙增大时，立刻终止消化，向培养基中加入含血清较多的培养液中和胰蛋白酶的作用。

③加入HANKS液数毫升，轻轻移动培养瓶，把残留的EDTA消化液冲洗干净后再加入新鲜的培养基。所有操作过程中都要注意细胞是否已经脱壁，若已脱壁，则不能倒掉消化液，立刻加入培养液终止消化，吹打细胞悬液，800 rpm，离心10 min漂洗彻底去除E DTA。

④用弯头管吸取瓶内培养液，反复轻轻吹打贴在细胞皿上的细胞，吹打过程按一定空间

顺序进行，确保所有的壁都能被吹到。并且，吹打过程一定注意避免气泡的产生，使细胞在温和的条件下形成均一的细胞悬液。

⑤显微镜下对细胞悬液计数，分别接种在新的培养皿内，放于37℃、5%的CO2培养箱中培养。每隔一两天观察细胞生长状况，及时传代。

##### （3）化合物处理

小分子化合物储备液用DMSO溶解配制，母液浓度5 mM。有部分小分子化合物溶解性极差，依然按照5 mM剂量加入DMSO，使用时用力震荡使其成为均一的混悬液，用移液枪吸出需要的量再用细胞培养液稀释。所有的化合物处理肿瘤细胞前，加培养液稀释至所需浓度，DMSO终浓度小于0.01% (w/v)。

##### （4）化合物对正常细胞和透明肾细胞癌细胞系生长影响取处于对数的生长期、状态良好的细胞，吹散成为单细胞悬液，用血球计数板计数

后，调整细胞的密度为1×105个每毫升，以每孔200 ul (2×104个/孔)接种于96孔培养板，每孔的终体积为100μl。培养24 h贴壁后，六个细胞系caki-2、A498、78 6-O、HeLa、MDA-MB-231和HEK293加入20μM的细胞培养液稀释好的小分子化合物，另外在对照组中加入相同的量的DMSO，作用时间为24 h，使用荧光显微镜观察记录死亡诱导情况。此实验为测定小分子化合细胞内毒性，为下步测定小分子化合物对细胞存活率影响的基础。

##### （5）Cell titer blue法测定细胞存活率取处于对数的生长期，状态非常良好的培养细胞培养于96孔板中。将受试化合物（2

0 μM）加入细胞培养体系，每孔加细胞培养液至的终体积为100μl，将培养板置于

37℃环境培养12 h小时。之后取出96孔板，向每100μl培养基中加入20μl的Cel lTiter-Blue TM试剂。细胞再培养4 h左右，向每100μl培养体积内加入5μl 3%的SDS溶液，可终止CellTiter-Blue TM测试反应，并使荧光值稳定。将96孔板拿到酶标仪，选取530-570 nm的激发光滤片和580- 620 nm的发射光滤片测算吸收值。按照公式：

抑制率（%）＝（ODcontrol-ODtreated）/ODcontrol×100%；计算每种小分子化合物对细胞活性的影响。注意每种化合物，每种细胞都有三个平行浓

度，最后取得是三个结果的平均值。

##### （6）化合物IC50测算在上步实验的基础上，选出对透明细胞癌有一定杀伤力的小分子化合物，进一步探

索化合物7杀伤肾癌细胞的能力（测定IC50）。

786-O是透明肾细胞癌细胞系，我们选用化合物7的一系列不同浓度的溶液：0.01，

0.1, 1，10，50，100, 200 uM，采用Cell titer blue方法（步骤与细胞存活率的实验一致）检测细胞活力，最后用Graphpad prism5来计算IC50.以上实验每个浓度梯度都有三个平行数据，分析时取平均值。且IC50测定进行至少两次。

# 3 实验结果

## 3.1 FP实验结果

○1 SPOP(MATH)和PUC\_1的结合常数和饱和结合浓度

结果如图5所示，三次测定FP值，取Mean±SD，KD=1.43±0.11μM，通过对曲线图分析，选取N-GST-SPOP(MATH)浓度为5μM，即在FITC\_PUC为16 nM条件下荧光偏振值刚刚达到饱和的时候蛋白浓度。采用这个浓度在以后竞争结合实验中是为了使抑制曲线的窗口值最大化并且N-GST-SPOP(MATH)蛋白不会过量导致实验偏差过大。

图 5 混合体系的荧光偏振值随SPOP蛋白浓度变化的曲线

图5：横坐标为SPOP(MATH)蛋白浓度的lg值，纵坐标为混合体系的荧光偏振值mP，最高饱和值达到280mP，此时SPOP(MATH)的蛋白浓度约为5μ M

○2 GST蛋白和PUC\_1-FITC的结合试验结果

如图6所示，平行进行三次GST蛋白和PUC\_1-FITC的荧光偏振值测定，平均FP 值

较弱，基本为本底荧光值，且荧光偏振值没有随着PUC\_1-FITC肽段浓度的增加而增加，可以判定GST蛋白和PUC\_1-FITC基本无结合，GST tag的加入对荧光偏振实验无显著影响。

图6 FP测得GST蛋白和PUC\_ 1-FITC结合的数据

图6：FP测得GST蛋白和PUC\_ 1-FITC结合的数据，横坐标为GST蛋白浓度的lg值，纵坐标为混合体系的荧光偏振值，由图可知，GST蛋白的浓度对荧光偏振值并无明显影响，即在实验体系中GST tag的存在对实验结果无影响。

○3小分子化合物和SPOP(MATH)结合活性初步筛选结果

SPOP(MATH)浓度为5μM，小分子浓度为10 nM-200μM条件下进行同样的操作测定混合体系的荧光偏振值并绘制抑制曲线。由图7可知，7、21、36、58、106、115和122号一共七个小分子化合物能够和PUC\_1-FITC竞争结合SPOP（MATH）,具有抑制活性，具体结果如图7所示。

图7 混合体系荧光偏振值随小分子化合物浓度增加而降低

图7：横坐标为加入的小分子浓度的lg值，纵坐标为混合体系的荧光偏振值，由图可见，随着小分子化合物在体系中的浓度增加，体系的荧光偏振值降低，说明PUC\_1-FITC和S POP(MATH)蛋白的结合被小分子化合物竞争性抑制。其中，化合物7对SPOP（MATH）和PUC\_1-FITC的结合抑制作用最明显。

○4小分子化合物KD值测算结果

本实验中，小分子化合物和SPOP(MATH)的KD值不能直接用公式算出，而是通过作图拟合得到，含义是小分子化合物能使SPOP（MATH）蛋白达到饱和结合浓度最小值的一般。结合后面SPR和细胞内活性实验的实验排除了一部分小分子化合物，这里仅列出两个化合物36号化合物和7号化合物的KD值，如图8所示。

图 8 小分子化合物7和36的浓度增加使混合体系荧光偏振值降低

图8（A）小分子化合物7与蛋白结合的KD值为133μM，横坐标为小分子化合物浓度的lg值，纵坐标为荧光偏振的响应值

图8（B）小分子化合物36与蛋白结合的KD值为51.2μM，横坐标为小分子化合物浓度的lg值，纵坐标为荧光偏振的响应值

## 3.2 SPR实验结果

配制小分子化合物浓度为20 nM的样品上样，扣除DMSO阴性对照响得到相应值大于20RU的有11种化合物，其中阳性对照PUC\_1肽段的结合相应值为35 RU左右。但其中有一个化合物结合强度超过理论最大值判断为非特异性结合的假阳性。剩余十个小分子

化合物进一步验证，与PUC蛋白竞争性结合N-GST-SPOP(MATH)蛋白，得到有4个能够很好抑制SPOP(MATH)蛋白与底物结合的小分子化合物，分别为7、21、36和58号化合物。在下一步的排除GST干扰的实验中，21号化合物与GST蛋白结合响应值非常高，认为是假阳性，排除。经过这样三步筛选之后，剩下三个能够结合SPOP（MATH）蛋白，并能竞争性抑制SPOP(MATH)蛋白与其他底物结合的小分子化合物。

结合常数KD的测定进一步验证了这几个小分子和SPOP(MATH)的结合呈浓度依赖性。小分子化合物和蛋白的结合、平衡和解离曲线经利用Biacore 3000控制软件中的动力学分析Wizard进行动力学分析，得到的数据根据Biacore 3000分析软件中的1∶1 La ngmuir结合模型或稳态模型进行拟合，判定该小分子化合物和SPOP(MATH)蛋白之间的结合为一个结合位点的可逆性竞争结合，表18列出了几种小分子化合物经SPR方法测得的KD。

表18 几种小分子化合物的经SPR测得的KD 值

| 化合物 | KD（μM） |
| --- | --- |
| 7 号化合物 | 8.4μM |
| 36 号化合物 | 2.3μM |
| 58 号化合物 | 5.36μM |

图 9 SPR测算7号化合物和36号化合物KD 值

图9（A）化合物7不同浓度流过耦连了N-His-GST-SPOP(MATH)蛋白芯片的SPR响应值随时间变化的曲线图，横坐标为时间单位为s，纵坐标为相应值Ru。

图9（B）化合物36不同浓度流过耦连了N-His-GST-SPOP(MATH)蛋白芯片的SPR响应值随时间变化的曲线图，横坐标为时间单位为s，纵坐标为相应值Ru。

## 3.3 小分子化合物对肾癌细胞活性抑制率影响实验结果

细胞毒性的实验中，加入小分子化合物的细胞株与只加了DMSO的对照组都能够存活。如图10所示，加入了7、37和114号小分子化合物的癌细胞存活率明显比加了同样小分子的正常细胞低。这说明，这些几种小个分子化合物对癌细胞的正常生长有抑制作用。这种抑制作用对于透明肾细胞癌细胞系786-O尤其明显，786-O是高表达SPOP蛋白的癌细胞株，这个实验结果与之前的猜想吻合，我们设计的小分子化合物对癌细胞的杀伤能力很有可能与这种癌细胞中特异性高表达的SPOP蛋白有关。

图10 20μM的小分子化合物对癌细胞生长的影响

图10：横坐标为不同化合物，纵坐标为细胞生长抑制率，不同颜色代表不同种类的细胞。由图可知，7号和37号化合物都对肾癌细胞比较敏感。112号和114号不仅对肾癌细胞敏感，对普通Hela、HEK细胞也有较强作用，考虑为化合物的细胞毒性引起的抑制作用。3.4 7号化合物IC50的测定结果

细胞存活率的实验筛选出7、37和114号三种小分子化合物，之前的体外结合实验也说明7号化合物和SPOP（MATH）蛋白有明确的相互作用，并且能有效抑制SPOP蛋白和底物的结合。7号小分子化合物的分子结构为保密资料，分析其母核和官能团为磺胺类化合物，有关官能团的作用有待于构效关系的进一步研究。7号化合物杀伤肾癌细胞的能力，即IC50的测算结果如图11所示，7号化合物对透明肾细胞癌细胞系786-O的IC50大约是50μM，实验数据重复两遍以上。

图11：横坐标是小分子化合物7的浓度log值，纵坐标是小分子化合物7号786-O细胞的抑制率，附带的表是拟合IC50时的统计学数据。

# 4 讨论

## 4.1 荧光偏振和SPR实验结果讨论

FP的实验步骤简单，可操控性强，重复性佳，因此常用于高通量药物筛选。FP主要模拟的是在溶剂状态下小分子和大分子之间的相互作用，信号受溶剂影响较大，并且信号强弱与小分子化合物在溶剂中的溶解性有极大关系。本实验中，很多化合物的水溶性不佳，无法进行FP实验的筛选。因此，FP实验并不能成为判断小分子化合物的唯一标准。

相比FP而言，SPR对小分子溶解度的要求较低。在芯片上的蛋白耦连值足够大的情况下，即使是nM级别的小分子化合物也能引起足够的相应值。SPR的灵敏性高是这种筛选药物活性方式的一个主要优点；另一个优点是SPR的高效性，一台BIO-core3000一天之内可以全自动完成一百多个小分子化合物的活性筛选。因此，SPR通常用在多层次筛选活性药物策略的第一步，不易遗漏任何有活性的化合物。但是，同样因为灵敏性高，容易得到一些非特异性结合的假阳性实验结果。经典的高通量筛选方式之一是SPR实验和酶学实验相互结合，SPR保证速度的同时用酶学实验确保筛选结果的准确性。

本论文中，SPR和FP方法连用，从112个虚拟筛选得到的化合物种验证处3个有体外结合活性的小分子，分别是7、36和58号化合物。并且分别用两种方法测定了这几个化合物和SPOP(MATH)的结合常数KD值，完成了体外分子水平对小分子活性的验证，为下一步的细胞水平小分子化合物的筛选提供佐证。

## 4.2 小分子化合物细胞活性的验证结果

与MTT, MRT等经典的细胞活性抑制率实验相比，CellTiter-Blue方法有突出的优点：（1）不需要细胞洗涤，去掉培养基及多次吸取步骤，这样的均质方法既适合于手工操作，也适合于细胞活性和细胞毒性的高通量自动化筛选检测。（2）CellTiter-Blue TM细胞活性检测系统在短时间内对细胞几乎没有破坏作用，因而针对同一细胞群进行一种以上的测试是有可能的。然而，CellTiter-Blue方法也难以避免的收到因小分子化合物溶解性差而产生的实验偏差。[20]在本次实验中，36、58号等多个化合物因为无法在细胞培养液中溶解而无法进入细胞内部，最终只能放弃，这一点提醒我们，在第一步虚拟筛选或全新设计小分子化合物的时候一定要考虑后续试验的可操作性，更多关注小分子化合物的官能团、母核和理化性质等。

## 4.3 化合物7的活性分析

FP实验测得化合物7的KD值为133μM, SPR实验测定化合物7的KD值为8.4μM，细胞活性实验测得化合物7的IC50值为50μM左右。之所以三个实验测出的数据差别这么大，除了实验操作的差异之外，很有可能和化合物7的物理性质有关。分析该化合物的结构，其母核为磺胺类结构，官能团的疏水性较强，在实验中表现为难溶于水系溶剂，在DMSO中的溶解度也有限。这应该是FP测得KD值偏大的主要原因。同理，36号和58号较弱的水溶性也可能是它们在细胞活性实验中表现不佳的主要因素。虽然本论文采用的不是传统的药物设计开发，但是新药设计中较为推崇的五个“类药”原则有一定参考价值。7号化合物显然不满足所有“类药”原则，应该参考这些原则适当对化合物加以优化。在实际实验，尤其是细胞内活性验证中，对于一般可能做为药物的小分子化合物，IC50应该在nM甚至pM量级，所以虽然确定了化合物7对SPOP(MATH)蛋白有一定的结合活性，并能够抑制SPOP（MATH）蛋白与底物的结合，可能成为一个具有潜力的研发热点，但是总体来说，对化合物7的优化任重而道远。

结 论

肾细胞癌( renal cell carcinoma, RCC)简称肾癌，是泌尿系统常见的恶性肿瘤之一, 占所有成人恶性肿瘤的2% - 3 %。世界范围内，肾癌的死亡病例每年超过100000例。其中，肾透明细胞癌占肾癌的绝大多数。传统的癌症防治主要通过细胞毒剂类化疗药物杀伤肿瘤细胞，易产生耐药性和毒副作用大，因而使之治疗受到限制或达不到治疗的目的，而新趋势是发现新的抗肿瘤靶点以及合成新内涵的抗肿瘤药物。研究背景中详细介绍了在人类癌症中SPOP蛋白的重要地位，SPOP蛋白可能是癌症，尤其是肾癌中一个新型靶标。本文在此背景之下，对SPOP蛋白的结构，小分子抑制剂的虚拟筛选以及其活性验证进行了一系列研究，得到一个可能以SPOP蛋白为靶标的，具有开发潜力的小分子化合物。除此之外，本实验为E3类连接酶抑制剂的发现及验证建立了一个切实可行的筛选平台，为进一步筛选发现具有开发潜力的小分子或化合物提供了技术基础。在本论文完成之时，已取得以下成果：

1.自行构建了SPOP（MATH）蛋白及其他实验相关蛋白的原核表达系统，优化了某些蛋白的表达序列，完善了这些蛋白各自不同的纯化策略，得到纯度高，稳定强，有活性的蛋白质。

2.得到了SPOP(MATH)蛋白的晶体，并经过X射线衍射、数据处理等步骤得到SPOP(MATH)蛋白的三维结构。有助于清晰明确的理解SPOP(MATH)蛋白的性质，为下一步以结构为基础的小分子化合物抑制剂筛选提供条件，以及为小分子化合物和蛋白质共晶的实验提供经验。

3.与中科院上海药物研究所DDDC部门合作，利用DOCK（分子对接）技术，从数十万的化合物库中，经过虚拟能量打分基初步筛选，以及根据药效团、药动团、实际对接、药学经验等多层次筛选。最后得到112个最具结构代表性的实体化合物。

4.设计了荧光偏振和表面等离子共振两种体外实验验证虚拟筛选出的化合物小分子能够影响SPOP(MATH)和底物的结合，并进一步实验得出有结合活性小分子化合物和SPOP(MATH)蛋白的结合常数。经过这两种体外筛选方法，将虚拟筛选出的小分子化合物由112个减少至2个，这也是高通量筛选过程常用的两种方式，将新药的发现研究过程

大大缩短。

5.与中科院北京基因组研究所合作，采用了常规的CellTiter-Blue方法，检测小分子对肾癌细胞系活力的影响，得到四种可能对癌细胞生长有明显抑制作用的小分子化合物。结合体外活性实验的数据，判定化合物7可能以肾癌细胞中的SPOP蛋白为靶点而抑制癌细胞活性。若想得到化合物7在肾癌细胞中作用的具体机制，还需要得到该小分子与SPOP(MATH)复合物的晶体结构。除此之外，化合物7的抑制能力并不是很强，目前的实验结果仅仅提供了未来可能以SPOP为靶点的小分子药物的设计模板和母核基础。

在得到以上结论的同时，本课题下一步仍需要考虑以下一些问题。1。本论文虽然建立了两种体外分子水平验证小分子化合物抑制活性的实验，但没有

考虑SPOP/E3复合酶的活性实验。这在活性方面上略显不足。我们也试图建立一套体外泛素化的检测体系。但由于这个系统需要NEDD8参与而没有商品化的试剂盒，需要自行表达E1、UbcH5B、NEDD8,、Ub、Cullin3、PUC以及其他工具蛋白酶，尤其是Culli n3和E1这两种蛋白需要真核系统表达。本论文完成之时，仍有Cullin3这个蛋白表达不成功，致使体外泛素化的实验未能实施。

2.如果能够直接得到小分子化合物7和SPOP(MATH)蛋白的复合物晶体，就能够最直接的说明，小分子化合物是如何与蛋白相互作用，抑制它与其他底物的结合。实际上，我们也进行了相关实验，尝试了包括共结晶、Soaking等方法，但最后都以失败告终。究其原因，可能与SPOP（MATH）蛋白和底物结合的表面是平坦而非明显的“口袋”形式有关，在小分子和SPOP(MATH)结合力并不是足够强的情况下，蛋白平坦的表面不利于小分子的稳定结合，稳定的共晶难以形成。这也是基于PPI开发新型小分子化合物的一个重要难点。

3本论文完成之时还有很多问题需要解决，例如，如何解释小分子化合物7的抑制活性的分子机制；这个小分子化合物在SPOP信号传导通路中是何角色；或者至少通过实验确认化合物7对肾癌细胞生长的抑制活性是通过抑制SPOP与底物结合而非其他通路。论文中细胞活性实验部分选取高表达SPOP的透明肾癌细胞786-O和低表达SPOP的HELA细胞分别作为阳性组和阴性对照组，但是受实验条件影响，并没有详细研究小分子化合物影响癌细胞生长时，SPOP蛋白的表达量是否有显著性改变。这些在后续的实验中

应该得到重视。

4．关于小分子结构的改造。在已有的化合物7的母核基础之上，我们可以增加一些亲水性的官能团，增加小分子化合物的水溶性，提高小分子化合物的类药性。除此之外，可以尝试增加不同的官能团，对其进行构效关系的研究。

5. 小分子化合物现在不是唯一的药物来源，随着生物科技的发展，多肽类药物越来有广阔的发展前景。以Staple Peptide为例，经过特殊氨基酸修饰后成为锁定状态的α-螺旋多肽，从2005年开始问世至今已有多种药物上市。Staple Peptide的优点包括生物顺应性好、副作用小以及靶向选择性高。对于以PPI为理论基础设计的小分子化合物，小分子化合物的特性决定了很多局限性，而Staple Peptide是值得尝试的选择。因此，我们用“全新设计”与“筛选PDB数据库中的α-螺旋多肽”这两种方法确定了一些α-螺旋多肽，期望这些多肽能够对SPOP(MATH)蛋白有专一高效的抑制活性。本论文完成之时，仅对这些多肽进行了初步的活性验证，有待于更深入的研究。

参考文献

[1] Kwon JE L. M., Oh KH, Oh YM, BTB domain-containing speckle-type POZ protein (SPOP) serves as an adaptor of Daxx for ubiquitination by Cul3-based ubiquitin ligase [J]. J Biol Chem., 2006, 281(18): 12664-12672.

[2] Csankovszki G N. A., Jaenisch R., Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation [J]. J Cell Biol., 2001, 153(4): 773-784.

[3] Brockdorff N., X-chromosome inactivation: closing in on proteins that bind Xist RN A [J]. Trends Genet., 2002, 18(7): 352-358.

[4] Plath K M. -E. S., Nusinow DA, Panning B., Xist RNA and the mechanism of X ch romosome inactivation [J]. Annu Rev Genet, 2002, 36: 233-278.

[5] Heard E., Recent advances in X-chromosome inactivation [J]. Curr Opin Cell Biol., 2004, 16(3): 247-255.

[6] Lund AH v. L. M., Polycomb complexes and silencing mechanisms [J]. Curr Opin Cell Biol., 2004, 18(19): 239-246.

[7] van Lohuizen M V. S., Scheijen B, Wientjens E, Identification of cooperating oncoge nes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging [J]. Cell, 1991, 65(5): 737-75 2.

[8] Hooper JE S. M., Communicating with Hedgehogs [J]. Nat Rev Mol Cell Biol., 200 5, 6(4): 306-317.

[9] Bai CB S. D., Joyner AL., All mouse ventral spinal cord patterning by hedgehog is Gli dependent and involves an activator function of Gli3 [J]. Dev Cell, 2004, 6 (1): 103-115.

[10] Villavicencio EH W. D., Iannaccone PM., The sonic hedgehog-patched-gli pathway i

N human development and disease [J]. Am J Hum Genet., 2002, 67(5):1047-1054. [11]Pan Y B. C., Joyner AL, Wang B., Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcr

Iptional activity by suppressing its processing and degradation [J]. Mol Cell Biol., 2006,26(9):3365-3377.

[12] Zhang Q Z. L., Wang B, Ou CY, A hedgehog-induced BTB protein modulates hedg ehog signaling by degrading Ci/Gli transcription factor [J]. Dev Cell, 2006, 10(6): 7 19-729.

[13] Chen MH W. C., Li YJ, Law KK, Lu CS, Gacayan R, Zhang X, Hui CC, Chuang PT., Cilium-independent regulation of Gli protein function by Sufu in Hedgehog signaling is evolutionarily conserved [J]. Genes Dev., 2009, 23(16): 1910-1928.

[14] Wang C P. Y., Wang B., Suppressor of fused and Spop regulate the stability, proce ssing and function of Gli2 and Gli3 full-length activators but not their repressors [J]. Development, 2010, 137(12): 2001-2009.

[15] Ruel L T. P., Variations in Hedgehog signaling: divergence and perpetuation in Sufu regulation of Gli [J]. Genes Dev., 2009, 23(16): 1843-1848.

[16] Offield MF J. T., Labosky PA, Ray M, PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum [J]. Development, 1996, 122(3): 983-99 5.

[17] Jonsson J C. L., Edlund T, Edlund H., Insulin-promoter-factor 1 is required for pan creas development in mice [J]. Nature, 1994, 371(6498): 606-609.

[18] Brissova M S. M., Nicholson WE, Gannon M Reduction in pancreatic transcription factor PDX-1 impairs glucose-stimulated insulin secretion [J]. J Biol Chem., 2002, 277(13): 11225-11232.

[19] Liu A D. B., Stoffers DA., Identification of PCIF1, a POZ domain protein that inhi bits PDX-1 (MODY4) transcriptional activity [J]. Mol Cell Biol., 2004, 24(10): 437 2-4378.

[20] Liu A O. -K. J., Stoffers DA., Two conserved domains in PCIF1 mediate interaction with pancreatic transcription factor PDX-1 [J]. FEBS Lett., 2006, 580(28-29): 6701-6 706.

附录：溶液配方

主要参考分子生物学第四版内容，基础溶液配方未一一列出

1. PBS: pH7.4，磷酸二氢钾(KH2PO4) 0.24g，磷酸氢二钠(Na2HPO4) 1.44g，氯化钠(NaCl) 8.0g，氯化钾(KCl) 0.2g，加水至1000mL。

2. SPR流动相，HBS-EP buffer配方：

0.01 M HEPES, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% surfactant（表面活性剂）P20

3.细胞裂解液：50mM Tris-Hcl pH 8.0, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 10%甘油,10mM PMSF

4. Ni-NTA平衡Buffer: 50mM Tris-HCL pH 8.0, 0.15 M NaCl,30mM咪唑

5. Ni-NTA洗脱Buffer: 50mM Tris-Hcl pH 8.0, 0.15 M NaCl, 0.5 M咪唑6。分子筛洗脱Buffer: 50mM Tris-Hcl pH 8.0, 0.15 M NaCl, 0.5mMDTT 7. FP反应Buffer BBS: Tris-Hcl, 20mM; Boric acid, 50mM; pH 8.0.

8. PP酶切Buffer: 20mM Tris-Hcl pH 8.0, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA

## 攻读学位期间发表论文情况

[1]黎莉，杨财广.基于SPOP(MATH)蛋白质结构的小分子抑制剂研究[J]．中国药科大学学报，2013（待发表）

[2]黎莉，杨财广. SPOP蛋白生物学研究进展[J]．中国药理学报，2013（待发表）