

乳腺癌靶标蛋白 KDM5B 的表达及纯化

王少杰¹, 王春喜^{2*}, 韩伟^{1*}

(1. 华东理工大学药学院, 中国上海 200237; 2. 中国科学院上海有机化学研究所 生命有机化学国家重点实验室, 中国上海 200032)

摘要: 组蛋白修饰是表观遗传重要的调控机制之一, 在基因表达调控、异染色质形成等生命过程中起着重要作用。组蛋白去甲基化酶 lysine demethylation 5B (KDM5B) 是参与组蛋白修饰的一种重要蛋白质, Jumonji C (JmjC) 是其催化结构域, 且与乳腺癌密切相关。现以 *kdm5b* 基因为模板, 通过 PCR 分别扩增 Jumonji N (JmjN)、JmjC 结构域片段, 用 5× GS linker 连接, 插入到原核表达载体 pGEX-6p-1, 转化至 Rosetta (DE3) 感受态细胞并表达, 重组蛋白经亲和柱 GSTrap、分子筛 superdex G75 和阴离子交换柱 Resource Q 纯化后, 再进行圆二色谱和体外酶活实验。SDS-PAGE、圆二色谱和 MALDI-TOF 质谱分析结果表明, 成功获得纯度较高的重组蛋白, 且具有去甲基化的活性。以上结果为进一步基于 JmjC 结构域进行小分子抑制剂筛选奠定了基础。

关键词: 表观遗传; 组蛋白修饰; 去甲基化酶; 乳腺癌; KDM5B; 表达纯化

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2016)06-0502-08

Expression and Purification of Breast Cancer Target Protein KDM5B

WANG Shao-jie¹, WANG Chun-xi^{2*}, HAN Wei^{1*}

(1. School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. State Key Lab of Bio-Organic and Natural Products Chemistry, Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: Histone modification as one of the key epigenetic regulation mechanisms plays a critical role in various biological processes, such as gene expression regulation and heterochromatin formation. Histone demethylase lysine demethylation 5B (KDM5B) is a significant protein involved in histone modification by catalytic domain Jumonji C (JmjC) and closely related with breast cancer. Here, DNA fragments of Jumonji N (JmjN) and JmjC domains were amplified by PCR respectively using *kdm5b* gene as template, connected with 5× GS linker, and cloned into the prokaryotic expression vector pGEX-6p-1. The constructed plasmid was transformed into competent cell Rosetta (DE3) and expressed. Then, the recombinant fusion protein was purified by affinity chromatography GSTrap, molecular exclusion chromatography superdex G75 and anion exchange chromatography Resource Q, followed by circular dichroism (CD) and demethylation activity analysis *in vitro*. Results of SDS-PAGE, CD and MALDI-TOF showed that the recombinant protein was obtained successfully with high purity and possessed demethylation activity. These results will be the foundation for further study of small molecule inhibitor screening based on JmjC domain.

Key words: epigenetics; histone modification; demethylase; breast cancer; KDM5B; expression and purification
(*Life Science Research*, 2016, 20(6): 502~509)

收稿日期: 2015-12-31; 修回日期: 2016-05-18

基金项目: 上海市科学技术委员会科研计划项目(15ZR1449300)

作者简介: 王少杰(1991-), 男, 湖北荆门人, 硕士研究生, 主要从事靶标蛋白抑制剂筛选研究, E-mail: wsj843876090@163.com; * 通讯作者: 王春喜(1978-), 女, 江苏徐州人, 博士, 助理研究员, 主要从事细胞生物学研究, Tel: 021-54925464, E-mail: wangchunxi@sioec.ac.cn; 韩伟(1968-), 男, 江苏扬州人, 博士, 华东理工大学药学院教授, 主要从事天然产物提取分离研究, Tel: 021-64253705, E-mail: whan@ecust.edu.cn.

表观遗传可以在不涉及 DNA 碱基序列变化的情况下影响表型,而且还可以遗传^[1]。表观遗传学研究内容主要包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑和非编码 RNA 等^[2,3],其中组蛋白修饰包含磷酸化、甲基化、乙酰化、泛素化、ADP 核糖化等^[4],在基因组的维持和转录调控中起着重要作用^[5,6]。从 1956 年科学家发现组蛋白甲基化现象以来,人们一直认为组蛋白的甲基化是一种非可逆修饰^[7]。然而 2004 年,Shi 等^[8]首次发现赖氨酸特异性去甲基化酶可以催化 H3K4me1/2 形成非甲基化的赖氨酸,使人们认识到甲基化修饰也是可逆过程。2006 年,Tsukada 等^[9]发现含有 Jumonji C (JmjC)结构域的蛋白质也具有组蛋白去甲基化的功能。目前,已发现的去甲基化酶分为两个家族: LSD1 和含有 JmjC 结构域的蛋白质 (JmjC domain-containing proteins)。

Lysine demethylation 5/jumonji AT-rich inter-active domain 1 (KDM5/JARID1)是含有 JmjC 结构域的去甲基化蛋白质家族,包括 KDM5A/JARID1A/RBP2、KDM5B/JARID1B/PLU-1、KDM5C/JARID1C/SMCX 和 KDM5D/JARID1D/SMCY,只针对 H3K4 去甲基化。KDM5B 最初在乳腺癌细胞中被鉴定,人源 KDM5B 蛋白有 1 544 个氨基酸,包含 Jumonji N (JmjN)结构域、JmjC 催化结构域、ARID/BRIGHT DNA 结合区、C5HC2 锌指和 PHD 结构域^[10]。其中, JmjC 结构域高度保守,是关键的催化中心^[9],且必须在辅因子 Fe²⁺和 α -酮戊二酸存在下才能进行去甲基化^[10]; JmjN 结构域只在含有 JmjC 结构域的酶中存在,主要维持蛋白质结构和功能的完整性; ARID 结构域能与 DNA 结合; C5HC2 锌指结构域与 DNA 相互作用; PHD 结构域能使蛋白质与 H3K4me3 有更高的亲和性^[11]。

研究发现, KDM5B 在很多癌症中表达量上调,例如前列腺癌和乳腺癌,并且其表达水平与前列腺癌的恶化程度相关^[12,13]。Yamane 等^[6]证明 KDM5B 通过抑制 *BRCA1*、*CAV1* 和 *HOXA5* 等基因的表达,促进乳腺癌细胞的增殖。此外,相关研究显示 KDM5B 的负调控能够减少由 E2 诱导的无胸腺裸鼠肿瘤的生长^[14],但是 KDM5B 对维持黑色素瘤细胞的持续增值又必不可少^[15]。总的来说, KDM5B 蛋白是非常有吸引力的癌症治疗的靶标^[16]。

据报道,针对 KDM5B (aa 1~769)的高通量筛选获得的抑制剂 2, 4-pyridinedicarboxylic acid (2, 4-PDCA)能在体外和细胞水平抑制 KDM5B 活性,

而且以 KDM4A/C 与 KDM5B 结构为基础的序列比对预测 2, 4-PDCA 与 JmjC 存在相互作用^[17]。此外,针对全长 KDM5B 的高通量筛选获得的对 KDM5 家族蛋白特异性抑制的抑制剂 PBIT 也被发现^[18]。基于上述研究,为了增加小分子抑制剂的特异性,本实验考虑选取 JmjC 结构域截短体作为小分子抑制剂筛选的对象,但由于蛋白质表达可溶性问题,最终将 JmjC 和 JmjN 用 GSGSGSGS-GS (5× GS linker)连接,并将其插入原核表达载体 pGEX-6p-1,该载体带有 GST 标签,有助于蛋白质在原核细胞中的可溶性表达,并有利于后续亲和纯化,此外 GST 与多克隆位点之间有 PreScission Protease 识别切割的氨基酸序列,便于 GST 标签切除。将连接后的载体转化到 Rosetta (DE3)进行表达和纯化,得到含有 JmjN 和 JmjC 结构域的重组蛋白,SDS-PAGE、圆二色谱和 MALDI-TOF 分析表明重组蛋白成功表达、纯度较高、有去甲基化的活性,可被用于小分子抑制剂的筛选。

1 材料与方法

1.1 载体和感受态细胞

载体: pGEX-6p-1 (图 1); 感受态细胞: DH5 α , Rosetta (DE3); 均由本实验室-80 °C 保存。

1.2 主要实验试剂和设备

Prime STAR Max DNA Polymerase, *Bam*H I 和 *Xho* I 限制性内切酶, T4 连接酶, PreScission Protease (日本 TaKaRa 公司); DNA 凝胶回收试剂盒和质粒小量制备试剂盒(上海捷瑞生物工程有限公司); GSTrap 亲和柱, Resource Q 阴离子交换柱, superdex G75 分子筛, AKTA 蛋白纯化仪(美国通用电器公司); JASCO J-810 圆二色谱仪(日本分光株式会社); AB Sciex 5800 TOF/TOF 质谱仪(美国应用生物系统公司)。组蛋白 H3K4Me2 (aa 1~26)肽由上海生工生物工程有限公司合成,氨基酸序列为 ARTK(Me2)QTARKSTGGKAPRKQLATKVAR。

1.3 引物的设计和合成

JmjN 上游引物: 5'-CGCGGATCCCCGGCGC-TGCCCTC-3' (下划线为 *Bam*H I 位点); JmjN 下游引物: 3'-GTTTGAGCACATTTTCCAAGTCCAAGT-CCTAGTCCTAGTCCTAGT-5'。JmjC 上游引物: 5'-GGTTCAGGTTTCAGGATCAGGATCAGGATCAGA-AGCATTTGGCTTT-3'; JmjC 下游引物: 3'-CGAC-TCCGACAATTGACTGAGCTCCGC-5' (下划线为 *Xho* I 位点)。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

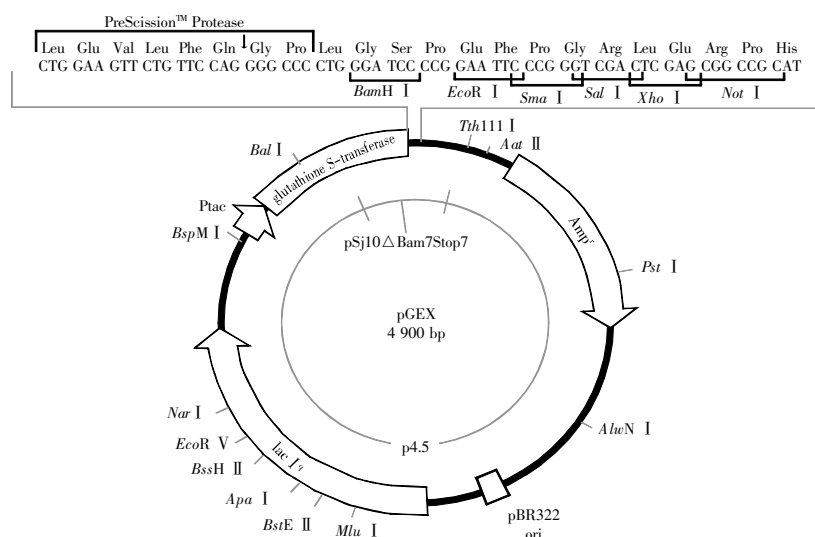


图1 载体 pGEX-6p-1 的图谱

Fig.1 The map of vector pGEX-6p-1

1.4 目的基因片段获取

以人源 *kdm5b* 基因为模板, 分别对 JmjN (aa 13~100) 和 JmjC (aa 366~601) 两个片段进行 PCR 扩增。反应体系(50 μ L): 引物各 1 μ L, 模板 1 μ L, 22 μ L 灭菌水, 25 μ L Prime STAR Max DNA Polymerase。反应条件: 98 $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 5 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 s, 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳纯化后, 由 DNA 凝胶回收试剂盒获得。然后, 以 JmjN、JmjC 两个 PCR 片段为模版, 采用 JmjN 上游引物和 JmjC 下游引物, 按照上述反应条件进行融合 PCR, 反应体系为 50 μ L: JmjN、JmjC 两个 PCR 片段各 1 μ L, JmjN 上游引物 1 μ L, JmjC 下游引物 1 μ L, 21 μ L 灭菌水, 25 μ L Prime STAR Max DNA Polymerase。产物经琼脂糖凝胶电泳纯化后, 由 DNA 凝胶回收试剂盒获得。DNA 凝胶回收程序按照 DNA 凝胶回收试剂盒说明书进行。

1.5 质粒构建及测序

将融合 PCR 产物进行双酶切 (*Bam*H I 和 *Xho* I), 共 30 μ L 体系: 25 μ L 融合 PCR 产物; 1 μ L *Bam*H I; 1 μ L *Xho* I; 3 μ L 10 \times K buffer, 酶切 4 h。同时, 将 pGEX-6p-1 载体也进行双酶切 (*Bam*H I 和 *Xho* I), 方法同上。目的基因片段和载体在 T4 连接酶作用下, 16 $^{\circ}$ C 连接 6 h, 10 μ L 体系: 载体 1 μ L, 片段 3 μ L, 1 μ L T4 ligase, 1 μ L 10 \times T4 ligase buffer, 4 μ L 灭菌水。将连接产物转化感受态细胞 DH5 α , 接种至 LB 固体培养平板上, 用酶切后的空载体做阴性对照, 挑取单克隆扩增培养

后抽提质粒, 送至铂尚生物技术(上海)有限公司测序。

1.6 质粒转化至表达菌株

将-80 $^{\circ}$ C 保存的 Rosetta (DE3) 感受态细胞融化, 加入测序正确的质粒 1 μ L, 冰上孵育 30 min, 42 $^{\circ}$ C 热激 1 min, 冰上再孵育 3 min。涂布于加入氨苄和氯霉素的固体 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养大约 12 h, 挑选 3 个单一的、体积较大的单克隆至液体 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 摇床培养。

1.7 小量表达测试

在不同的 OD_{600} 值、IPTG 浓度、温度下, 将感受态细胞诱导一定时间, 例如当单克隆菌液生长到 OD_{600} 为 1.5 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L, 诱导 16 h, 收集菌液, 不添加 IPTG 做阴性对照。取未诱导、诱导菌液各 3 mL 离心, 弃上清, 加 300 μ L PBS buffer, 重悬混匀, 用 Sonics 超声波破碎机破碎细胞。取未诱导样品离心上清液、诱导菌液、诱导菌液离心上清液进行 SDS-PAGE 电泳。

1.8 重组蛋白的鉴定和纯化

取 IPTG 诱导后低温培养过夜的菌液 1 L, 离心并弃上清培养基, 加 25 mL PBS buffer (140 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 1.8 mmol/L KH₂PO₄, pH 7.5)、20 μ L 1 mol/L MgCl₂、25 μ L DNase、50 μ L 10 mmol/L PMSF 异丙醇溶液, 1 000 bar 高压破菌。12 000 r/min 离心 1 h, 取上清液。50 mL PBS buffer 平衡 GSTrap 亲和柱, 25 mL 蛋白质混合液上样, 100 mL PBS buffer 清洗柱上非特异性结合的杂蛋白, 50 mL cleavage buffer (50 mmol/L

Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA, pH 7.5) 平衡 GSTrap, 将 cleavage buffer 与 PreScission Protease 混合液上样 1 个柱体积(5 mL), 封闭柱子, 4 °C 酶切 12 h, 再用 30 mL cleavage buffer 洗脱切除 GST 标签的重组蛋白, 最后用 25 mL elution buffer (50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L reduced glutathione, pH 8.0) 清洗与 GSTrap 柱结合的蛋白质, 使层析柱再生以便下次使用。将 cleavage buffer 洗脱的蛋白质溶液浓缩至 1 mL, 4 °C 离心, 上样至已用 130 mL buffer A (50 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 平衡的 superdex G75 分子筛, 用 buffer A 洗脱 1 个分子筛柱体积(130 mL)。将正确出峰位置的蛋白质收集液上样 Resource Q 阴离子交换柱, 再用 buffer A、buffer B (1 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 梯度洗脱 50 mL (0%~100%)。

1.9 蛋白质二级结构表征

圆二色谱 190~250 nm 的吸收值可以表征蛋白质的二级结构。考虑到 Tris 和 NaCl 的缓冲液在 190~250 nm 范围有很大的吸收, 因此通过浓缩换液的方法将蛋白质置换到 pH 为 7.0 的 20 mmol/L PO_4^{3-} 缓冲溶液。通过缓慢稀释将蛋白质浓度调整为 0.2 g/L (通过 NanoDrop 2000C 测试)。用注射器缓慢将 300 μ L 样品加入圆形比色皿, 防止产生气泡。用 190~250 nm 波长扫描, 获得原始数据并作图。

1.10 蛋白质体外活性测试

酶活反应所需各组份溶液都是现配现用。反应体系(100 μ L): 20 μ L 含有 10 μ g JmjN-5 \times GS-JmjC 的重组蛋白溶液(缓冲体系: 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl), 20 μ L 2 mmol/L 维生素 C, 10 μ L 1 mmol/L α -酮戊二酸, 35 μ L 50 μ mol/L $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$, 5 μ L 1 mmol/L PMSF, 10 μ L 50 μ mol/L 组蛋白 H3K4Me2 (aa 1~26) 肽。37 °C 水浴 2 h, 酶活反应结束后, 将 EP 管放置冰上送至分析测试中心质谱平台, 用 MALDI-TOF 质谱检测组蛋白 H3K4Me2 肽的相对分子质量是否发生变化。

2 结果

2.1 JmjN-5 \times GS-JmjC 重组质粒的构建

以人源 *kdm5b* 基因(Gene ID: 10765)为模板, PCR 扩增得到 JmjN (图 2A)和 JmjC (图 2B)。琼脂糖凝胶电泳结果显示, PCR 产物片段大小分别为 264 bp 和 708 bp, 与理论值相一致。进一步以分

别扩增的 JmjN 和 JmjC PCR 产物为模板, 进行融合 PCR 扩增, 其琼脂糖凝胶电泳检测到一条清楚的大小约为 1 002 bp 的条带(图 2C)。随后将融合扩增后的 PCR 产物经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切并克隆到 pGEX-6p-1 质粒中。质粒 DNA 的测序结果证实插入序列为 JmjN-5 \times GS-JmjC 重组蛋白对应的 DNA 片段。

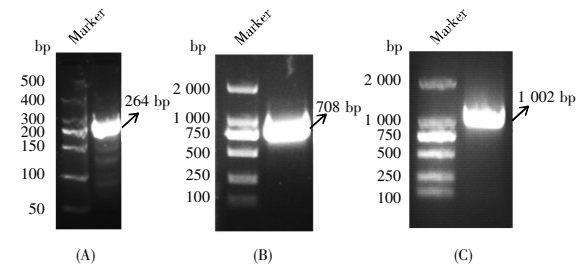


图 2 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果

(A) JmjN 第 13~100 氨基酸对应 DNA 片段的电泳图; (B) JmjC 第 366~601 氨基酸对应 DNA 片段的电泳图; (C) JmjN-5 \times GS-JmjC 重组蛋白对应 DNA 片段的电泳图。

Fig.2 Results of DNA agarose gel electrophoresis

(A) Electropherogram of DNA fragment of JmjN (aa 13~100); (B) Electropherogram of DNA fragment of JmjC (aa 366~601); (C) Electropherogram of DNA fragment of JmjN-5 \times GS-JmjC recombinant protein.

2.2 GST-JmjN-5 \times GS-JmjC 原核表达测试

将未诱导的菌液经细胞破碎离心后获得的上清液做阴性对照, SDS-PAGE 结果如图 3 所示。SDS-PAGE 结果显示经诱导后 3 个单克隆在 60 kD 区域均有明显的蛋白质条带, 而且与 GST 融合的 JmjN-5 \times GS-JmjC 蛋白大小相一致, 说明重组蛋白被成功诱导表达, 并且挑选的 3 个单克隆在相同条件下表达量无明显区别。同时我们还发现, 诱导后菌液在经破菌、离心获得的上清液中的重组蛋白条带变弱, 表明细胞破碎后离心获得的上清液样品比未离心分离的样品含有的重组蛋白减少, 说明目标蛋白部分以包涵体形式存在, 部分呈正常的可溶性表达。

2.3 目的蛋白鉴定及纯化

2.3.1 重组蛋白的鉴定

在不酶切 GST 标签的情况下, elution buffer 洗脱下来的即为带 GST 标签的蛋白质, 根据氨基酸序列预测其相对分子质量约 60 kD。图 4 中的泳道 5 即为洗脱下来的目的蛋白, 条带位置与预测的相对分子质量大小吻合。

2.3.2 GSTrap 亲和柱纯化

诱导表达的蛋白质带有 GST 融合标签, 因此可以利用 GSTrap 亲和柱纯化目的蛋白, 且根据

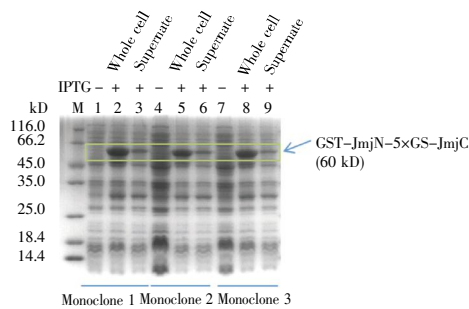


图3 小量表达测试结果

M: 蛋白质相对分子质量标准; 1、4、7: 未经诱导的上清液; 2、5、8: 诱导过的全菌液; 3、6、9: 诱导过的破菌上清液。

Fig.3 Results of expression test in small amounts

M: Protein marker; 1, 4 and 7: Supernatant of non-induced cells; 2, 5 and 8: Mixture of induced whole cells; 3, 6 and 9: Supernatant of induced cells.

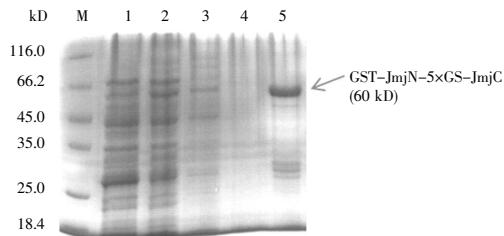


图4 GSTrap亲和纯化鉴定结果

M: 蛋白质相对分子质量标准; 1: 流穿的蛋白质; 2~4: PBS清洗; 5: 洗脱的蛋白质。

Fig.4 Results of GSTrap affinity purification and identification

M: Protein marker; 1: Flow-through protein; 2~4: PBS washing; 5: Elution protein.

GST 标签与目的蛋白片段之间的 3C 酶切位点, 经过 PreScission Protease 酶切可以得到没有 GST 的 JmjN-5xGS-JmjC。蛋白质裂解液经 GST 亲和柱分离并柱上酶切后, 收集每一步的样品, 进行 SDS-PAGE 电泳分析(图 5)。泳道 9~13 为 PreScission Protease 酶切后的洗脱液, 虽然在 34 kD 处可见一条清楚的蛋白质条带, 但是仍然包括部分未酶切的重组蛋白和 GST。

2.3.3 Superdex G75 分子筛纯化

由于 GSTrap 纯化得到的 JmjN-5xGS-JmjC (34 kD) 纯度不够, 通过图 5 可以看出主要杂蛋白条带为未酶切完全的带 GST 标签的重组蛋白 (60 kD) 和 GST (26 kD)。为了使蛋白质纯度更高, 根据目标蛋白条带与杂蛋白条带相对分子质量的差异, 选择基于相对分子质量不同的分离原理的色谱柱 superdex G75 继续纯化。分子筛纯化曲线如图 6A 所示, 色谱曲线出现了两个峰, 同时相应洗脱组分的 SDS-PAGE 结果(图 6B)显示: 第 4、5 泳道条带纯度高, 对应的洗脱体积为 48~54 mL; 7、

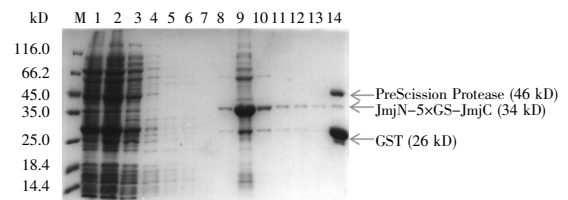


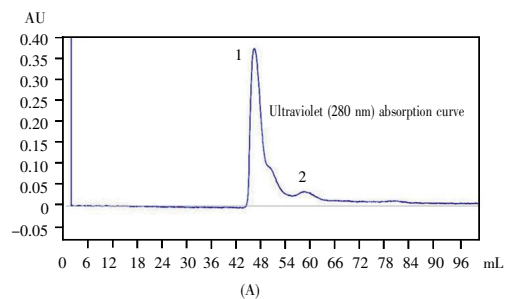
图5 GSTrap亲和纯化结果

M: 蛋白质相对分子质量标准; 1: 流穿的蛋白质; 2~6: PBS清洗; 7: Cleavage buffer 柱平衡; 8: PreScission Protease 和 cleavage buffer 的混合液柱平衡; 9~13: Cleavage buffer 洗脱的蛋白质; 14: Elution buffer 洗脱的蛋白质。

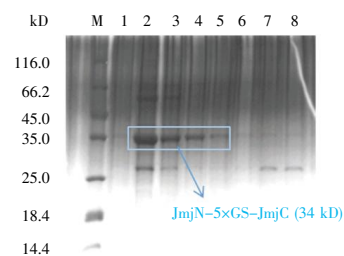
Fig.5 Results of GSTrap affinity purification

M: Protein marker; 1: Flow-through protein; 2~6: PBS washing; 7: Column balancing by cleavage buffer; 8: Column balancing by mixture of PreScission Protease and cleavage buffer; 9~13: Elution protein by cleavage buffer; 14: Elution protein by elution buffer.

8 泳道条带对应色谱曲线第 2 个小峰, 洗脱体积为 57~63 mL, 即 GST 标签蛋白; 第 2、3 泳道杂条带主要为 GST, 洗脱体积为 42~48 mL; 泳道 1 为洗脱体积 39~42 mL, 即基线位置。第 4 和 5 泳道条带无杂蛋白, 可能是杂蛋白太少而达不到检测限的原因, 因此将其收集, 浓缩, 再次进行 SDS-PAGE, 结果如图 7 所示, 杂蛋白确实很少。



(A)



(B)

图6 Superdex G75 纯化结果

(A) Superdex G75 纯化曲线; (B) 洗脱组分的 SDS-PAGE。M: 蛋白质相对分子质量标准; 1: 39~42 mL 洗脱组分; 2 和 3: 42~48 mL 洗脱组分; 4 和 5: 48~54 mL 洗脱组分; 6: 54~57 mL 洗脱组分; 7 和 8: 57~63 mL 洗脱组分。

Fig.6 Results of superdex G75 purification

(A) Purification curve of superdex G75; (B) SDS-PAGE of elution components. M: Protein marker; 1: 39~42 mL elution components; 2 and 3: 42~48 mL elution components; 4 and 5: 48~54 mL elution components; 6: 54~57 mL elution components; 7 and 8: 57~63 mL elution components.

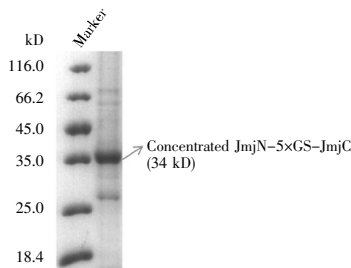


图 7 第 4 和 5 泳道蛋白质合并浓缩后的 SDS-PAGE
Fig.7 SDS-PAGE of concentrated protein from the mixture of the fourth and fifth lanes

2.3.4 Resource Q 阴离子交换柱纯化

将 superdex G75 纯化获得的较纯洗脱组分混合并浓缩后分析,发现仍然有少量杂蛋白条带(图 7)。为了进一步提高重组蛋白的纯度,选择基于不同蛋白质带电荷不同的分离原理的色谱柱 Resource Q 继续纯化。缓冲液 pH 大于重组蛋白的等电点,使得重组蛋白带负电荷,能与 Resource Q 填料的配基结合,不同蛋白质的带电荷差异导致其与 Resource Q 结合强度不同,通过提高流动相的电导率,可以对结合到配基的蛋白质进行梯度洗脱。Resource Q 纯化曲线如图 8A 所示;SDS-PAGE 中的蛋白质条带对应洗脱体积 48~57 mL(图 8B),说明最终纯化获得的重组蛋白 JmjN-5xGS-JmjC 纯度大于 90%。

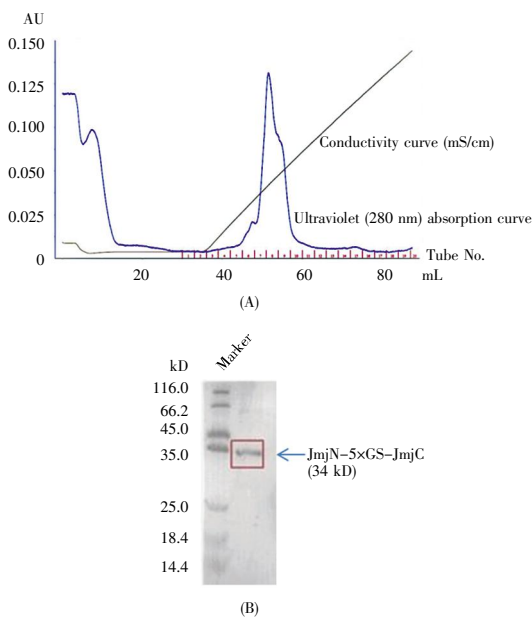


图 8 Resource Q 纯化结果
(A) Resource Q 纯化曲线;(B) 48~57 mL 洗脱组分的 SDS-PAGE。

Fig.8 Results of Resource Q purification

(A) Purification curve of Resource Q; (B) SDS-PAGE of 48~57 mL elution components.

2.4 目的蛋白二级结构表征

蛋白质分子的固有不对称性决定了其光学活性,蛋白质二级结构的不同表现出圆二色性特征差异,通过圆二色谱可以判断蛋白质是否具有二级结构。如图 9 所示,圆二色谱图可以说明目的蛋白具有二级结构。

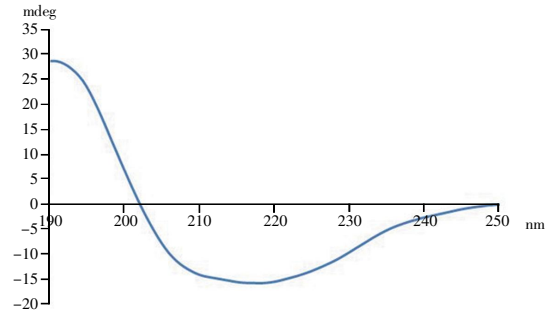


图 9 JmjN-5xGS-JmjC 的圆二色谱分析
Fig.9 Circular dichroism analysis of JmjN-5xGS-JmjC

2.5 重组蛋白体外活性测试

如果后期要以重组蛋白为靶标进行小分子抑制剂筛选,分离纯化获得的重组蛋白必须具有生物活性,在实验中我们以重组蛋白能否去甲基化来判断其是否具有生物活性,主要通过去甲基化反应和质谱检测来验证。体外合成底物组蛋白修饰多肽 H3K4Me2 (aa 1~26),其氨基酸序列为 AR-TK(Me2)QTARKSTGGKAPRQLATKVAR,相对分子质量为 2 838.3。如果失去 1 个甲基基团(-CH₃),其相对分子质量减去 14;失去两个甲基基团,其相对分子质量减去 28,两种情况都能说明重组蛋白具有去甲基化活性。本实验中去甲基化酶活反应后的 MALDI-TOF 质谱分析(正离子模式)结果显示,底物相对分子质量为 2 809.6(图 10)(ExPASy ProtParam tool 预测理论相对分子质量为 2 810.3),比反应前减少了 28,说明重组蛋白具有去甲基化的活性。这些数据说明成功获得具有生物活性的重组蛋白,后续实验中能进行以重组蛋白为靶标的小分子抑制剂筛选。

3 讨论

KDM5B 在肿瘤细胞和正常组织中的表达量有明显差异,在乳腺癌细胞中过量表达并促进其生长^[14]。此外也有文献报道 KDM5B 与前列腺癌^[12]、黑色素瘤^[15]等癌症密切相关,是肿瘤的生物标志物,是非常具有潜力的药物作用靶点。Blair 等^[16]研究发现抑制 KDM5B 可以抑制肿瘤发生,针对 KDM5B 进行抑制剂开发有利于癌症治疗。目前有

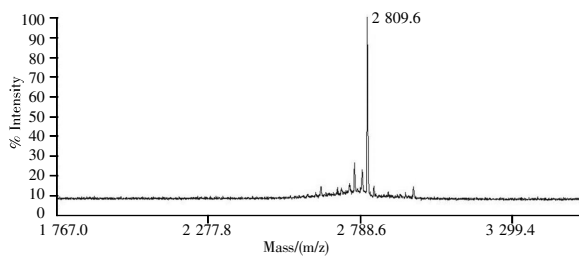


图 10 JmjN-5×GS-JmjC 的去甲基化活性质谱分析结果酶活反应后底物多肽的质谱图。

Fig.10 Result of demethylation activity analysis of JmjN-5×GS-JmjC by mass spectrometry

Mass spectrogram of substrate peptide after enzyme activity reaction.

团队开展了针对 KDM5B (aa 1~769)和全长KDM5B 的抑制剂筛选实验,发现了小分子化合物 2, 4-PDCA 和 PBIT^[17, 18], 但是他们的筛选靶标并非关键的催化活性中心 JmjC 结构域。为了提高抑制剂筛选的特异性,使得获取 JmjC 结构域的蛋白质并进行特异性的小分子抑制剂筛选变得有意义,可以表达纯化 JmjC 结构域,获得纯度高、具有生物活性的蛋白质,然后以其为靶标进行小分子抑制剂筛选。这些工作对药物开发和临床治疗的研究具有非常重要的意义。

KDM5B 结构域如图 11 所示,以 JmjC 为靶靶进行抑制剂筛选首先需要获得 JmjC 蛋白质,因此选择催化结构域 JmjC 作为研究对象进行可溶表达实验。通过截取不同 JmjC 截短体、更换表达载体(pET-28a、pSMT3、pGEX-6p-1)重新构建质粒、转化至不同感受态细胞 BL21 (DE3)和 Rosetta (DE3)、改变诱导条件,进行小量表达测试,发现这些尝试最终均不能使 JmjC 结构域可溶性表达。研究中通过文献分析了解到 JmjN 和 JmjC 结构域存在相互作用,且 JmjN 具有稳定蛋白质的功能^[19]。通过 NCBI protein-protein BLAST 在线对 KDM5B

蛋白进行序列比对发现, KDM5B (NP_006609)第 13~100 氨基酸和第 366~601 氨基酸片段,与来源于水稻且已有结构报道的 JMJ703 蛋白 N 端序列相似性很高^[20],且序列相似性区域正好对应 KDM5B 蛋白的 JmjN 和 JmjC 结构域(图 12)。进一步对 JMJ703 蛋白 N 端序列与 KDM5B 蛋白的 JmjN 和 JmjC 结构域氨基酸序列进行比对分析,发现氨基酸序列同源性很高(图 13),截取同源性高的这部分氨基酸序列可能有利于重组蛋白表达。因此对 KDM5B 蛋白第 13~100 氨基酸片段和第 366~601 氨基酸片段对应的 DNA 序列通过 PCR 进行重新截取,用 5×GS linker 将 JmjN 和 JmjC 结构域对应的 DNA 片段连接,导入 pGEX-6p-1 原核表达载体,构建重组蛋白表达质粒,转化至感受态细胞 Rosetta (DE3)中,通过这种方法尝试最终成功将 JmjN-5×GS-JmjC 重组蛋白可溶性表达。重组蛋白分析结果表明截短后的重组蛋白仍具有组蛋白去甲基化酶的活性,这样使得制备的蛋白质样品能够进行后续的小分子抑制剂筛选。

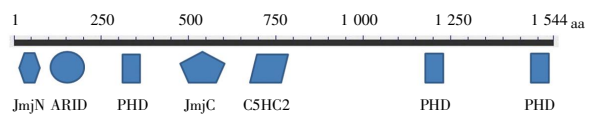


图 11 KDM5B (JARID1B, PLU-1)结构域示意图
Fig.11 Domain schematic of KDM5B (JARID1B, PLU-1)

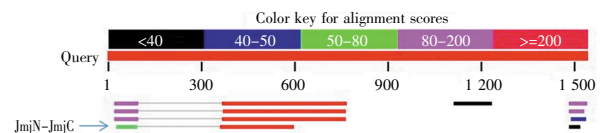


图 12 蛋白质-蛋白质比对结果(数据库:蛋白质数据库)颜色:序列比对打分;Query:KDM5B 氨基酸序列。

Fig.12 Protein-protein BLAST (database: Protein Data Bank)

Color: Alignment scores; Query: KDM5B amino acid sequence.

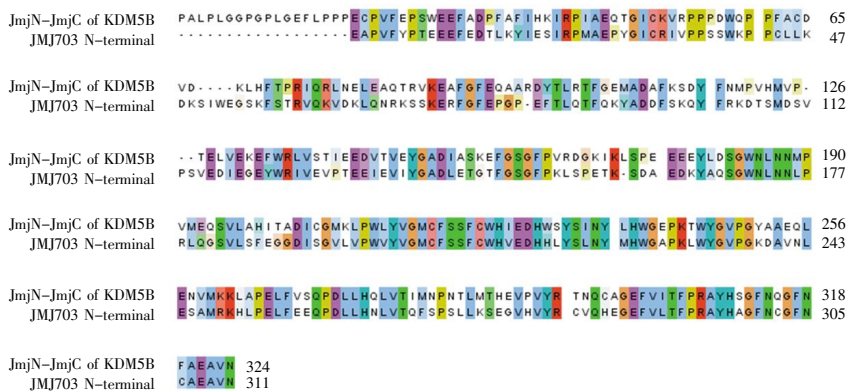


图 13 KDM5B 的 JmjN-JmjC 与 JMJ703 N 端序列的比对结果
Fig.13 Sequence alignment of JmjN-JmjC of KDM5B and JMJ703 N-terminal

虽然研究中的 PCR 实验未设置阴性对照组,但由于重组蛋白 SDS-PAGE 条带位置正确且具有去甲基化酶活性,因此反过来验证了 PCR 实验不会是假阳性。此外,虽然重组蛋白实现了可溶性表达(图 3),但 1 L 液体培养基最终获得的重组蛋白量很少(图 8),这将增加后期小分子抑制剂筛选中重组蛋白样品制备的工作量。

针对 JmjC 结构域,通过 NMR 手段进行基于片段的小分子抑制剂筛选^[21],获得能与 JmjC 具有较强相互作用的小分子化合物,然后通过重组蛋白与小分子化合物晶体筛选获得高分辨率复合物晶体结构,了解其相互作用结构信息,再对小分子化合物进行结构优化,并在细胞水平评价小分子化合物对肿瘤细胞的抑制作用,这是后续工作的目标。随着对 KDM5B 结构、功能研究的不断深入,开发新的 KDM5B 的抑制剂将会成为未来的研发热点。我们利用原核表达系统成功制备了具有生物活性的含有 JmjN 和 JmjC 结构域的重组蛋白,为后期抑制剂的筛选工作奠定了基础。

参考文献(References):

- [1] GOLDBERG A D, ALLIS C D, BERNSTEIN E. Epigenetics: a landscape takes shape[J]. *Cell*, 2007, 128(4): 635-638.
- [2] COSTA F F. Non-coding RNAs, epigenetics and complexity[J]. *Gene*, 2008, 410(1): 9-17.
- [3] KORNBERG R D, LORCH Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome[J]. *Cell*, 1999, 98(3): 285-294.
- [4] SHILATIFARD A. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2006, 75: 243-269.
- [5] MARTIN C, ZHANG Y. The diverse functions of histone lysine methylation[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2005, 6(11): 838-849.
- [6] YAMANE K, TATEISHI K, KLOSE R J, *et al.* PLU-1 is an H3K4 demethylase involved in transcriptional repression and breast cancer cell proliferation[J]. *Molecular Cell*, 2007, 25(6): 801-812.
- [7] BANNISTER A J, SCHNEIDER R, KOUZARIDES T. Histone methylation: dynamic or static[J]. *Cell*, 2002, 109(7): 801-806.
- [8] SHI Y, LAN F, MATSON C, *et al.* Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1[J]. *Cell*, 2004, 119(7): 941-953.
- [9] TSUKADA Y, FANG J, ERDJUMENT-BROMAGE H, *et al.* Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins[J]. *Nature*, 2006, 439(7078): 811-816.
- [10] KLOSE R J, KALLIN E M, ZHANG Y. JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2006, 7(9): 715-727.
- [11] WYSOCKA J, SWIGUT T, XIAO H, *et al.* A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodeling[J]. *Nature*, 2006, 442(7098): 86-90.
- [12] XIANG Y, ZHU Z Q, HAN G, *et al.* JARID1B is a histone H3 lysine 4 demethylase up-regulated in prostate cancer[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2007, 104(49): 19226-19231.
- [13] LU P J, SUNDQUIST K, BAECKSTROM D, *et al.* A novel gene (PLU-1) containing highly conserved putative DNA/chromatin binding motifs is specifically up-regulated in breast cancer[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(22): 15633-15645.
- [14] CATCHPOLE S, SPENCER-DENE B, HALL D, *et al.* PLU-1/JARID1B/KDM5B is required for embryonic survival and contributes to cell proliferation in the mammary gland and in ER⁺ breast cancer cells[J]. *International Journal of Oncology*, 2011, 38(5): 1267-1277.
- [15] ROESCH A, FUKUNAGA-KALABIS M, SCHMIDT E C, *et al.* A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth[J]. *Cell*, 2010, 141(4): 583-594.
- [16] BLAIR L P, CAO J, ZOU M R, *et al.* Epigenetic regulation by lysine demethylase 5 (KDM5) enzymes in cancer[J]. *Cancers*, 2011, 3(1): 1383-1404.
- [17] KRISTENSEN L H, NIELSEN A L, HELGSTRAND C, *et al.* Studies of H3K4me3 demethylation by KDM5B/Jarid1B/PLU1 reveals strong substrate recognition *in vitro* and identifies 2, 4-pyridine-dicarboxylic acid as an *in vitro* and *in cell* inhibitor[J]. *The FEBS Journal*, 2011, 279(11): 1905-1914.
- [18] SAYEGH J, CAO J, ZOU M R, *et al.* Identification of small molecule inhibitors of jumonji AT-rich interactive domain 1B (JARID1B) histone demethylase by a sensitive high throughput screen[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(13): 9408-9417.
- [19] HUANG F, CHANDRASEKHARAN M B, CHEN Y C, *et al.* The JmjN domain of Jhd2 is important for its protein stability, and the plant homeodomain (PHD) finger mediates its chromatin association independent of H3K4 methylation[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(32): 24548-24561.
- [20] CHEN Q F, CHEN X S, WANG Q, *et al.* Structural basis of a histone H3 lysine 4 demethylase required for stem elongation in rice[J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9(1): e1003239.
- [21] GAO J, MA R S, WANG W, *et al.* Automated NMR fragment based screening identified a novel interface blocker to the LARG/RhoA complex[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88098.