

· 论 著 ·

靶向转化生长因子- β II 型受体核酸适配子 结合位点预测及相关验证研究*

王 薇¹, 黄阳玉², 朱晓燕¹, 陈 侠¹, 许 多¹, 肖 奕², 谢 琳^{1△}(1. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所眼科, 重庆 400042; 2. 华中科技大学
物理学院生物分子物理与建模小组, 武汉 430074)

摘要:目的 预测转化生长因子- β II 型受体(TR β II)胞外段蛋白与靶向适配子 S58 的结合位点,并在体外进行验证,证实 S58 的结构稳定性。方法 通过适配子 ssDNA 序列建立其三维结构,在蛋白质数据库搜索受体蛋白 TR β II 胞外段的晶体结构,运用计算机辅助技术对两个分子进行对接实验,根据结果指导剪切优化适配子结构,分别用生物传感器技术及蛋白免疫印迹法验证其亲和力。结果 核酸适配子 ssDNA S58 与 TR β II 胞外段蛋白结合的可信位点包括位点 I (T4、T5、G6、C7)、位点 II (G13、A14、T15、C16、G17、C18)、位点 III (T31、G32、T33、C34)及位点 IV (G40、A41、T42、T43、T44、G45、G46)。S58 与 TR β II 胞外段蛋白的亲和力高,S58 的 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达明显较 DMEM 对照降低($P < 0.05$),根据结果剪切适配子 S58 后得到优化后的 ssDNA 亲和力、 α -SMA 表达均不如 S58。结论 核酸适配子 S58 为受体蛋白 T β R II 的高特异性分子,具有一定稳定性,任何结构的改变均会降低与 T β R II 的亲和力。计算机辅助的分子对接技术成为一项探索分子间作用的重要手段,为医学基础研究提供了良好的理论依据。

关键词:转化生长因子- β II;寡核苷酸类;分子对接;结合位点;生物传感器

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.09.004

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)09-1034-04

Targeting transforming growth factor- β receptor II aptamer binding sites prediction and validation studies*

Wang Wei¹, Huang Yangyu², Zhu Xiaoyan¹, Chen Xia², Xu Duo¹, Xiao Yi², Xie Lin^{1△}(1. Department of Ophthalmology, Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, the Third Military
Medical University, Chongqing 400042, China; 2. Biomolecular Physics and Modeling Group,
School of Physics, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China)

Abstract: Objective To predict the binding sites of transforming growth factor- β receptor II (T β R II) ectodomain and the aptamer S58 specifically targeted T β R II, and to confirm the structure stability of the aptamer S58 in vitro. **Methods** We created three-dimensional structure by utilizing ssDNA aptamer sequences, the crystal structure of the T β R II was searched by protein data bank database. According to the results of the molecular docking experiments on aptamer S58 and T β R II ectodomain, we sheared the aptamer sequences, then verified its affinity respectively by biosensor technology and Western blot. **Results** Binding sites of aptamers S58 and TR β II ectodomain included site I (T4, T5, G6, C7), site II (G13, A14, T15, C16, G17, C18), site III (T31, G32, T33, C34) and site IV (G40, A41, T42, T43, T44, G45, G46). We validated the high affinity between aptamer S58 and TR β II ectodomain. The expression of α -smooth muscle actin(α -SMA) protein in the human tenon's capsule fibroblasts was descended obviously after the experiment of the aptamer S58 in comparing with the control of DMEM ($P < 0.05$). But the new ssDNA by shear the aptamer ssDNA S58 according to the results were poor than aptamers S58. **Conclusion** The aptamer S58 targeted T β R II was highly specific with a certain stability, any changing of structure will reduce the affinity of T β R II. Computer-aided molecular docking technology has become an important means of an exploratory intermolecular interaction, and can provides a good theoretical basis on medical research.

Key words: transforming growth factor beta 2; oligonucleotides; molecular docking; binding sites; biosensor

抗青光眼滤过手术是治疗原发性青光眼的主要方法之一,而滤过术后手术区的滤过通道瘢痕化是手术失败的主要原因^[1]。因此,临床上常使用 5-氟尿嘧啶、丝裂霉素等抗代谢药物来抑制术后疤痕形成,提高手术成功率,但其无法完全避免诸如滤过泡渗漏、低眼压、眼内炎、角膜损伤等并发症的发生。所以,寻求一种更为安全、有效、毒性小的药物作用于抗青光眼

术后抑制瘢痕形成仍然是目前的研究方向。瘢痕的形成与转化生长因子- β (TGF- β)的活性有着密切关系^[2-3],其中 TGF- β 与其 II 型受体(T β R II)的结合是导致组织瘢痕化的始动环节。因此,拮抗或者抑制 TGF- β 与 T β R II 的结合,可为青光眼滤过术后抗瘢痕提供新的方法。本课题组前期应用指数富集的配基系统进化技术(SELEX)筛选出 T β R II 的单链核酸适配子

S58,并验证了 S58 可对 TGF- β 介导的人 Tenon 囊成纤维细胞 (HTFs) 分化产生抑制作用^[4]。适配子作用药物从基础转向临床必须在稳定性上进行优化验证,甚至需要对基因修饰。而核酸适配子能够识别靶分子并结合紧密是基于其三维结构,单链核酸适配子结构灵活多变,能在溶液根据靶分子结构发生适用性折叠重构,形成几何构象匹配、热力学稳定的空间结构,比如与靶分子形成口袋、假结等结构^[5]。因此,研究适配子 S58 的三维结构是有必要的,本研究建立 S58 的三维模型,旨在预测 S58 与 T β R II 的结合部位,并进一步验证 S58 的高亲和力及特异靶向性,从而明确 S58 的结构稳定性及特异性。

1 材料与方 法

1.1 材料 本研究中所用细胞由本课题组前期原代培养的 HTFs 传代而来^[6],取第 4~10 代对数生长期的细胞用于实验。

1.2 主要试剂及仪器 DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、双抗、Hanks 平衡盐溶液(美国 Hyclone 公司);人重组 TGF- β_2 蛋白(美国 Peptotech 公司);鼠抗人 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)单克隆抗体(美国 Abcam 公司);鼠抗人单克隆 β -actin 抗体、辣根标记山羊抗兔 IgG、辣根标记山羊抗鼠 IgG(北京中杉公司);T β R II 胞外段蛋白(美国 Rapidbio 公司),核酸适配子 S58(5'-ACA TTG CTG CGT GAT CGC CTC ACA TGG GTT TGT CTG GTC GAT TTG GAG GTG GTG GGT GGC-3')及各剪切序列均由上海生工生物工程公司进行 DNA 合成。生物传感器(美国 Thermo 公司);蛋白电泳及转膜设备(美国 Bio-Rad 公司);光学倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.3 方 法

1.3.1 三维建模 目前没有直接的软件可用于预测单链 DNA 的三级结构,本研究采用 3dRNA^[7] 先建立 RNA 的三级结构,3dRNA 是一个基于 RNA 序列和二级结构的预测方法,再通过计算机测算翻译突变为 DNA 的三级结构。首先应用 DNA 序列转录成 RNA 序列,应用 mfold^[8] 软件进行 RNA 的二级结构预测,再通过输入 RNA 序列和二级结构,3dRNA 可以预测 RNA 的三级结构。得到 RNA 的三级结构之后,需要将其转化成对应的 DNA 结构。这个过程分为两步:(1)核苷酸突变,对于 RNA 结构中的每一个核糖核苷酸分子,用对应的脱氧核糖核苷酸分子进行取代,即进行重叠操作,重叠的原子只包括碱基。通过上述的重叠操作,得到的 DNA 分子可能有部分共价键断裂或者原子重叠,所以需要进行结构的优化^[9],本研究采用 amber 对其进行了优化。T β R II 胞外段蛋白可以直接通过蛋白质数据库搜索得到晶体结构。

1.3.2 分子对接预测结合位点 得到 2 个分子的三维结构后采用 HexServer 程序^[10] 对 2 个分子进行对接。HexServer 是一个基于图像处理的进行蛋白质与蛋白质、DNA、RNA 的对接服务器。HexServer 经过运行测算给出最有可能对接后的 20 个相互作用能量最低的复合物构象。在此基础上使用软件 BindN^[11] 预测受体蛋白可能的结合位点,BindN 是一个基于网络的根据氨基酸序列来有效预测蛋白质的 DNA、RNA 结合位点工具。其预测 DNA 的结合残基灵敏度为 69.40%,特异度为 70.47%,根据支持向量机大于 0.372 5 预测出 24 个与 DNA 的结合残基位点,这样又进一步缩小了结合位点的范围。

最后进一步采用分子动力学模拟方法进行进一步细致的分子对接。

1.3.3 适配子 ssDNA 与 T β R II 的亲合力检测 采用第三军医大学附属西南医院中心实验室建立的生物传感器技术检测 S58 及各剪切的 DNA 与 T β R II 的亲合力大小。按照已经建立的方法包被 T β R II,S58 及剪切的 DNA 各组均采用杜氏磷酸盐缓冲液溶解成 200 mg/L,取 5 μ L 上样,检测与 T β R II 的亲合力^[12]。

1.3.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)法检测人 HTFs 中 α -SMA 的表达 培养 8 瓶 HTFs 待贴壁并长至 70%左右融合,将培养基换为无血清培养基再培养 24 h,分别加以 DMEM (DMEM 对照组)、TGF- β_2 、TGF- β_2 + S58、TGF- β_2 + S58(3'-5 bp)、TGF- β_2 + S58(3'-10 bp)、TGF- β_2 + S58(5'-5 bp)、TGF- β_2 + S58(5'-10 bp)、TGF- β_2 + S58(5'-15 bp)诱导 HTFs 24 h,并以此分为不同的组别。各组 TGF- β_2 浓度均为 2 ng/mL,DNA 浓度均为 50 nmol/L;中止刺激后 PBS 清洗细胞 3 次,每次 10 min,每瓶加入 180 μ L 含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液,提取细胞总蛋白,考马斯亮蓝 G-2250 法测定每个样本中的蛋白浓度。根据蛋白浓度取 30 μ L 样品上样,质量分数 10%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行电泳。蛋白质转膜 180 min。质量分数 5%脱脂牛奶室温封闭膜 2 h。鼠抗人 α -SMA 单克隆抗体按 1:200 比例加入到 2 mL 5%脱脂牛奶中 4 $^{\circ}$ C 孵育膜过夜。TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,辣根标记山羊抗鼠 IgG 按 1:5 000 比例加入到 2 mL 5%脱脂牛奶中室温孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次。发光液作用于膜上,暗室内曝光,观察 X 线片上的条带,扫描后保存,Quantity One 4.6.2 软件(美国 Bio Rad 公司)计算出胶片上各蛋白条带灰度值,计算出 α -SMA 相对表达量,并作出柱状图。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 适配子 ssDNA S58 及 T β R II 胞外段的三维模型 RNA 预测为一个带发卡结构的 RNA,转换成单链 DNA 时,DNA 自身适应性互补形成局部双螺旋结构。蛋白质数据库中搜索得到 TR β II 胞外段蛋白 1PLO,由 122 个氨基酸组成,有 10 种自然态结构,并且是以二聚体结构存在。比对 TGF- β 与其受体的复合晶体结构,找到 10 种自然态中最接近与配体结合时的结合态结构 1PLO-3,其结构紧密,包括了 9 个 β 折叠。见图 1。

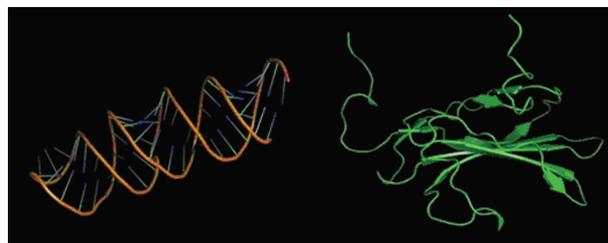


图 1 适配子 ssDNA S58(左)及 T β R II 胞外段(右)的三维结构

2.2 适配子 ssDNA S58 及 T β R II 胞外段蛋白的分子对接 人为去掉 DNA 3'端游离的 5 个碱基及受体蛋白两端游离氨基酸部位,将优化后的 S58 结构与 T β R II 胞外段蛋白进行分子对

接,得到 10 个相互作用能量最低的对接构象,相互作用能量包括 2 个分子之间的静电力和范德华力,可以间接反映适配子 DNA 与 T β R II 胞外段蛋白的结合情况,相互作用的能量越低,结合则越稳定。因此选择最低能量 -502.65 kJ/mol 的对接构象,见图 2。对接位置位于 DNA 的中间部位,运用 Cocomaps 软件分析,使用 8 Å 作为定义结合残基的距离阈值,即对于复合物中核酸的某个氨基酸残基,如果其包含的至少一个原子与复合物中核酸序列的任何一个原子间的距离小于 8 Å,那么这个氨基酸残基为核苷酸-结合残基。相对应的核酸结合位点分别包括位点 I (T4、T5、G6、C7)、位点 II (G13、A14、T15、C16、G17、C18)、位点 III (T31、G32、T33、C34) 及位点 IV (G40、A41、T42、T43、T44、G45、G46)。

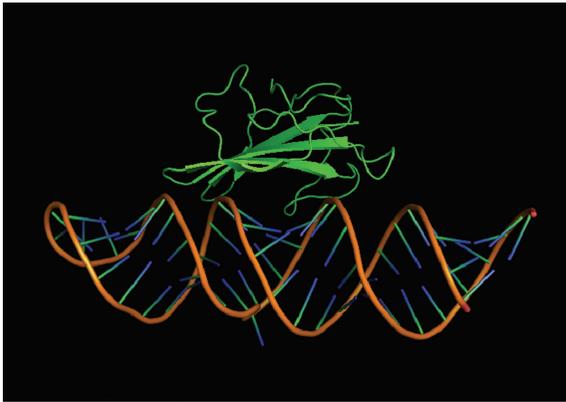
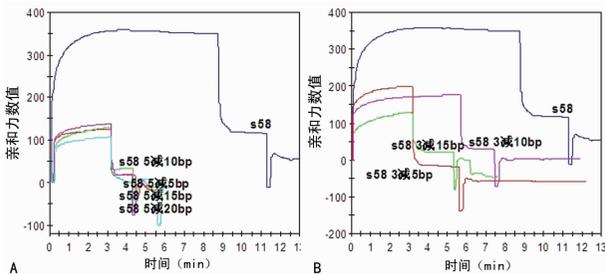


图 2 适配子 ssDNA S58 与 T β R II 胞外段对接位点

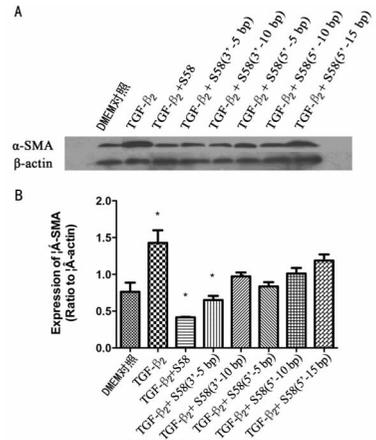
2.3 剪切 S58 与亲和力检测 根据 S58 与 T β R II 胞外段的结合位于 DNA 中间部位,采取分别从 DNA 两端逐步剪切碱基,每次剪切 5 bp。S58 与 T β R II 胞外段的结合力最强,其次为 S58-5 即 3' 端剪切 5 bp,但不论从 5' 端还是 3' 端开始剪切 DNA S58,得到的结构修饰后 DNA 亲和力与 S58 相比均没有明显增加,反而有所下降。见图 3。



A: 5' 端; B: 3' 端。

图 3 S58-1~7 与 T β R II 胞外段的结合力检测

2.4 结构优化后 DNA 作用下细胞 α -SMA 的表达变化 α -SMA 是肌成纤维细胞的标志性蛋白,是瘢痕收缩的物质基础。TGF- β_2 组刺激 HTFs 后 α -SMA 表达较 DMEM 对照组明显增加 ($P < 0.001$), TGF- β_2 + S58 组刺激 HTFs 后 α -SMA 表达较 TGF- β_2 组明显降低 ($P < 0.001$), 所有结构优化后的 DNA 中只有 TGF- β_2 + S58 (3'-5 bp) 组较 TGF- β_2 组 α -SMA 表达有明显降低 ($P < 0.001$), 但其降低程度不如 TGF- β_2 + S58 组, 其他组与 TGF- β_2 组比较 α -SMA 表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 4。



A: 电泳图; B: 柱状图。

图 4 各实验组刺激下 HTFs 表达 α -SMA 的变化

3 讨论

适配子在眼科方面已经有很大进展,目前许多研究显示适配子如贝伐单抗、寡聚核 RNA-寡聚核苷酸、培加尼布等能通过抑制血管内皮生长因子作用从而明显降低眼部的血管形成。哌加他尼钠是第一个通过美国食品与药品管理局认证用于治疗年龄相关性黄斑变性的核酸适配子药物^[13], 还有其他治疗眼部新生血管的适配子药物在临床实验中。因此,能封阻 T β R II 降低青光眼术后滤过区纤维化形成的适配子 S58 成为新的研究切入点。适配子应用于临床治疗的优点在于其亲和力高、稳定性好、易人工合成。所有的适配子能发挥高效、特异的作用,基于其特殊的、稳定的三维结构,与靶分子特异的作用位点结合,且具有较高的亲和力^[14], 所以,研究适配子与靶分子的结合位点及结合力是解释适配子发挥生物效应的理论根据,并且进一步验证适配子的稳定性可为适配子运用于临床药物提供理论依据。

随着计算机技术的飞速发展,计算机技术辅助研究蛋白质和核酸的相互作用成为当下的热点,特别是在药物分子的筛选和设计方面已经有很大进展^[15]。其中分子对接是针对研究配体与受体分子之间的相互作用,基于结合的复合物构象,预测其结合模式与亲和力的一种重要理论方法。Luscombe 等^[16]利用氨基酸序列的保守性构建计算机算法来预测蛋白质/DNA 复合物中 DNA 的结合位点。研究 2 个分子的结合位点,首先需要建立 2 个分子的三维结构。寡核苷酸适配子在溶液中可以形成假结、发夹、凸环、G-四分体等三维空间结构,通过氢键、范德华力、疏水堆积作用等与靶分子紧密结合。有研究表明,适配子与靶分子的结合是相互诱导的适应性识别,当靶分子存在时,单链 DNA 或 RNA 发生适应性折叠,与靶分子相互识别^[17]。本实验中适配子 S58 即为 60 个碱基的寡核苷酸,与靶受体蛋白作用时遵循“锁钥原理”,发生适应性自身碱基互补情况,且 DNA 带负电荷,在与靶受体蛋白结合时会向带正电荷的碱性氨基酸靠近, DNA 分子的灵活性使其能够形成的结构千变万化,单链 DNA 有局部自互补的情况,由于适配子的结构特殊性,其三维结构预测往往需要从二级结构着手,因此 DNA 的三维结构预测有一定难度。蛋白质的结构可以通过蛋白质晶体学得到或者从蛋白质数据库中找到其已知的结构,正如本实验中的 T β R II 胞外段蛋白结构。分子对接的结果表明, DNA 与 T β R II 胞外段蛋白的结合位点均在空间结构上

与受体相靠近或与受体存在氢键相互作用,这些位点在配体与受体结合、定位和水解过程中可能发挥重要作用,实验从适配子 S58 的三维建模研究切入,合理地运用大量目前广泛得到认可成功率较高的建模、分子对接软件,在理论上较为准确地预测到适配子 S58 与 T β R II 胞外段蛋白的结合位点,极大地减少可能的结合位点数量,为进一步实验提供指导。

生物传感器是从分子水平检测生物分子活性力的技术手段,其检测快速、灵敏度高、选择性强,近年来在医学领域应用越来越广泛,特别是针对核酸与蛋白质的作用检测,McCauley 等^[18]研制了基于蛋白芯片基础的适体生物传感器来对蛋白进行分析鉴定,这种传感器可以固定着针对不同蛋白质的 DNA 和 RNA 适体。本实验也运用生物传感性针对 T β R II 胞外段蛋白,根据计算机预测的核酸适配子与 T β R II 胞外段蛋白的结合位点提示 5'端剪切掉 5 bp 会影响到结合位点 I (T4、T5、G6、C7),故 5'端剪切进一步验证剪切后 DNA S58~4 与 T β R II 胞外段蛋白的亲合力是下降的,细胞水平上也对 TGF- β_2 刺激后的 HTFs 表达 α -SMA 无明显抑制作用,这与计算机预测的结果相符。又因为 SELEX 技术在筛选过程中是必须应用大容量的随机寡核苷酸文库,大约在 1 010 个随机 RNA 序列中才有一个序列与靶分子特异结合^[18],且核酸文库中是由中间为一定长度的随机序列和 5'、3'端的固定序列构成,固定序列是多聚酶链式反应及其他酶学反应相关引物的结合位点。因此,推测剪切掉的 5'端序列是带有限制性内切酶位点的固定序列。但当同时选择剪切 3'端序列时,当剪切掉 5 bp 时, DNA 与 T β R II 胞外段蛋白亲合力有所下降,尽管能抑制 TGF- β_2 刺激后 HTFs α -SMA 的表达,但实验组 α -SMA 的表达仍较 S58 组强,抑制 TGF- β_2 介导的 HTFS 转分化作用是较 S58 减弱的,并且在剪切 3'端非预测的结合位点后,适配子与 T β R II 胞外段蛋白亲合力同样也下降。推测因单链核苷酸在不同的溶液、pH、温度等因素下易形成多种空间构象,特别在剪切掉适配子序列后极有可能改变核苷酸局部的结构,从而无法与靶向 T β R II 胞外段蛋白质的关键作用位点结合。因此,进一步论证了 S58 为靶向 T β R II 的特异性分子,结构上具有高度稳定性,任何结构的改变均会降低与 T β R II 的亲合力,为 S58 的体内实验提供了明确的理论基础。

参考文献:

- [1] Yu DY, Morgan WH, Sun X, et al. The critical role of the conjunctiva in glaucoma filtration surgery [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2009, 28(5): 303-328.
- [2] Cordeiro MF. Role of transforming growth factor beta in conjunctival scarring [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2003, 104(2): 181-187.
- [3] Zhu X, Li L, Zou L, et al. A novel aptamer targeting TGF- β receptor II inhibits transdifferentiation of human tenon's fibroblasts into myofibroblast [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(11): 6897-6903.
- [4] Zhan LS, Zhuo HL, Wang HZ, et al. Screening and characterization of aptamers of hepatitis C virus NS3 helicase [J]. *Progr Biochem Biophys*, 2005, 32(3): 245-250.
- [5] 朱晓燕,李磊,鲜光军,等.人眼 Tenon 囊成纤维细胞体外培养及生长特性的比较 [J]. *局解手术学杂志*, 2012, 21(3): 233-235.
- [6] Zhao Y, Huang Y, Gong Z, et al. Automated and fast building of three-dimensional RNA structures [J]. *Sci Rep*, 2012, 2(2012): 734.
- [7] Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(13): 3406-3415.
- [8] Wang JM, Wolf RM, Caldwell JW, et al. Development and testing of a general amber force field. [J]. *J Comput Chem*, 2004, 25(9): 1157-1174.
- [9] Macindoe G, Mavridis L, Venkatraman V, et al. HexServer: an FFT-based protein docking server powered by graphics processors [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(Web Server issue): W445-449.
- [10] Wang L, Brown SJ. BindN: a web-based tool for efficient prediction of DNA and RNA binding sites in amino acid sequences [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(Web Server issue): W243-248.
- [11] Genfa L, Jiang Z, Hong Z, et al. The screening and isolation of an effective anti-endotoxin monomer from radix paeoniae rubra using affinity biosensor technology [J]. *Int Immunopharmacol*, 2005, 5(6): 1007-1017.
- [12] Ng EW, Shima DT, Calias P, et al. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(2): 123-132.
- [13] Navani NK, Li Y. Nucleic acid aptamers and enzymes as sensors [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2006, 10(3): 272-281.
- [14] Rohs R, Bloch I, Sklenar H, et al. Molecular flexibility in ab initio drug docking to DNA: binding-site and binding-mode transitions in all-atom monte carlo simulations [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(22): 7048-7057.
- [15] Barbault F, Ren B, Rebehmed J, et al. Flexible computational docking studies of new aminoglycosides targeting RNA 16S bacterial ribosome site [J]. *Eur J Med Chem*, 2008, 43(8): 1648-1656.
- [16] Luscombe NM, Thornton JM. Protein-DNA interactions: amino acid conservation and the effects of mutations on binding specificity [J]. *J Mol Biol*, 2002, 320(5): 991-1009.
- [17] Hermann T, Patel DJ. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers [J]. *Science*, 2000, 287(5454): 820-825.
- [18] McCauley TG, Hamaguchi N, Stanton M. Aptamer-based biosensor arrays for detection and quantification of biological macromolecules [J]. *Anal Biochem*, 2003, 19(2): 244-250.