PARP蛋白家族成员抑制剂选择性特征分析

人多ADP核糖聚合酶家族成员PARP1的抑制剂目前正被应用于癌症治疗的临床试验阶段。本研究使用Biacore T200 (GE Healthcare) 对RARP酶与一组来自特定化合物库的低分子量潜在抑制剂之间的相互作用进行研究，根据结合的选择性和亲和力首先进行筛选、鉴定及hits排序。随后在Biacore T200上对选出的先导样品进行详尽的动力学分析来解释亲和性差异并提供关于结合机制的信息，所得到的数据与同样用来鉴定相互作用的差示荧光扫描（DFS）分析结果进行比较，差示荧光扫描常用于分析低分子量化合物与蛋白质的相互作用。在使用Biacore T200进行的分析中，可以根据分子之间相互作用特征来区分各种靶蛋白的潜在抑制剂，尽管它们所结合的活性位点高度相似。此外，还可以轻松地鉴定出特定靶蛋白的弱结合物。而DSF虽然适用于高亲和力化合物的鉴定，却不能可靠地鉴别出弱结合物，或准确根据亲和力对化合物进行分级。

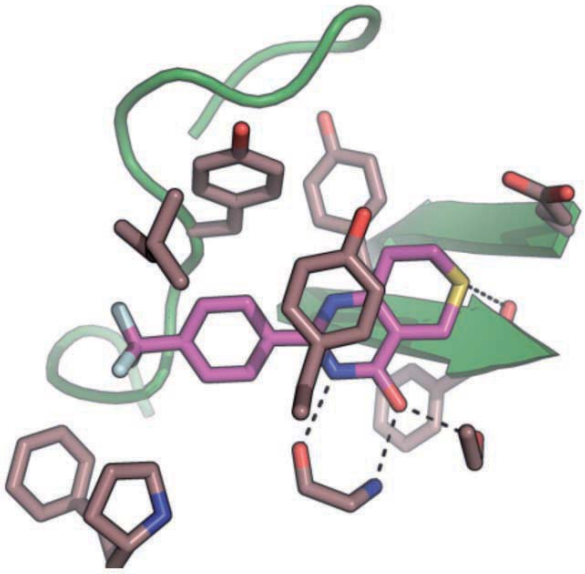

图1.TNKS2酶的催化位点与其抑制剂XAv939（此处标为化合物1）之间相互作用的模型。通过Biacore T200对亲和力及动力学相互作用详细进行了表征。

简介

PARP蛋白家族由17种酶组成。这个蛋白家族中被研究最为深入全面的成员PARP1被证明通过多ADP核糖基化作用参与细胞对DNA损伤的反应。尽管对于PARP家族的其他成员了解较少，但是它们的重要性也引起了关注。例如tankyrases (TNKS1/2，也称作RARP5a/5b) 最近被发现在Wnt信号传导途径中起到正向调节的作用，并且有证据表明对tankyrase的抑制在人肿瘤抑制基因BRCA编码蛋白缺失的情况下可以诱发细胞凋亡。因此，PARP1、ankyrases及RARP家族中的其他某些成员可以作为抗癌药物的潜在靶点（图1）。全面深入研究配体选择性的分子基础可以大大加速RARP酶抑制剂的研制。一个旨在对医药领域的蛋白质进行三维结构测定的加拿大、瑞典和英国的公私合作合作组织——结构基因组协会（SGC）对整个PARP蛋白家族的结构进行了系统的测定，并且迄今为止已经测定了9个不同催化结构域的结构。

PARP酶与一组来自特定化合物库的配体之间相互作用通过DSF和表面等离子共振（SPR）进行测定。

在从筛选直至对最有潜力的候选物进行详细动力学表征过程的每一个步骤中，Biacore T200以其高度的灵敏性确保能够根据相关信息得出可靠的结论。该仪器在实践中高度灵敏，再小的分子也可以被检测到，因此可以实现对最简单的有机化合物的可靠动力学分析。

材料与方法

对根据专利文献（PARP1）和结构（PARP1及PARP3）所选出的184种化合物组成的库进行检测。已知25%的化合物为PARP的抑制剂或类似物，而其余的则是通过基于结构的虚拟筛选而选出来的。对初次筛选之后选出来的化合物进行深入的动力学表征，使用SPR 或 DSF进行筛选阶段各个步骤及最终的动力学分析。

采用重组DNA技术在SGC中表达靶蛋白（1）。

在使用Biacore T200进行筛选之前，用量热法对蛋白的质量进行评估。对于TNKS1 和TNKS2，这一步可使用MicroCal™ VP-ITC等温滴定微量热仪（GE Healthcare）用已知抑制剂进行一系列等温量热滴定来完成。

用强抑制剂化合物XAV939 (2)对TNKS1和TNKS2蛋白进行滴定。两种蛋白均被证实几乎能够100%的与配体结合。

由于几种已知的抑制剂的低亲和力和低溶解性，因此无法测定有意义的PARP15蛋白的ITC数据。改用MicroCal VP-DSC进行差示扫描微量热分析，即可根据PARP15的热稳定性评估常规PARP抑制剂氨基苯甲酰胺(3-AB)的结合效应，结果发现该蛋白具有热稳定性并且可以在10倍过量的抑制剂存在的条件下变得更加稳定。

Biacore 分析

GE Healthcare提供一种将组氨酸标记的蛋白质TNKS1，TNKS2或PARP15通过Ni^{2+}-介导形式固定在传感器芯片NTA表面上的改进方法对所有化合物进行初级扫描，并可对筛选出的化合物进行首次动力学分析。

此芯片的优点是被固定靶蛋白的定位可受控制并且可标准化。

将库里的化合物注入到准备好的芯片表面上，在25℃条件下使用Biacore T200进行实验。分析缓冲液为20mM PBS，0.05% 表面活性剂P20和4%DMSO， pH7.4。

对限制性库的筛选

PARP15和TNKS1（5μg/ml， 在不含DMSO的分析缓冲液中）通过Ni^{2+}组氨酸标记相互作用被捕获到传感器芯片NTA上，并且进一步通过胺基偶联稳定从而达到约为5000响应单位（RU）的水平上（图2）。

这一实验设计的目的是要确保被固定蛋白的正确定位，并且可使制备的传感器界面足够稳定以满足多次重复分析，同时避免靶蛋白的不必要的消耗。

184种测试化合物均用分析缓冲液稀释到30μM，注入到制备好的反应界面上反应60秒之后进行10分钟的分离。在各样品测定之间用阳性对照化合物测定来确证蛋白质在运行期间的活性。

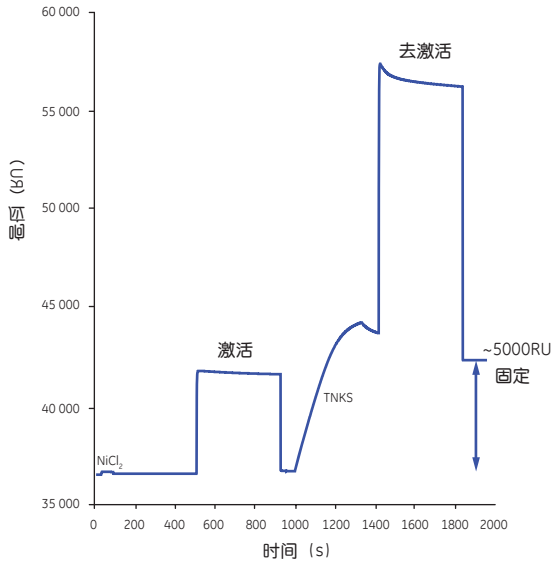

图2:进行初级筛选扫描和动力学分析之前，首先将500 μM NiCl2注入以便对组氨酸标签进行捕获来确保蛋白质正确定位。

动力学和稳态鉴定

固定化后进行初级筛选，对从初级筛选中选出的38种化合物的结合动力学进行分析。化合物同时注入到固定的PARP15 和 TNKS1的界面上60秒，之后进行10分钟分离。所有的化合物（未显示）都采用相似的浓度系列（0.78到200μM）。

在低的、稳定的捕获水平下的动力学分析

TNKS1和TNKS2被低密度地捕获到传感器芯片NTA上，不用胺联反应进行增强。在进行动力学分析之前，蛋白质用分析缓冲液稀释到5μg/ml并且分别注射30，60，90，120，及 180s（图3）。这样做是为了建立能够将蛋白质稳定结合到传感器表面上所需的适当捕获水平。必要时，可简单地通过注入 EDTA去除镍离子而对传感器芯片NTA的表面进行再生。

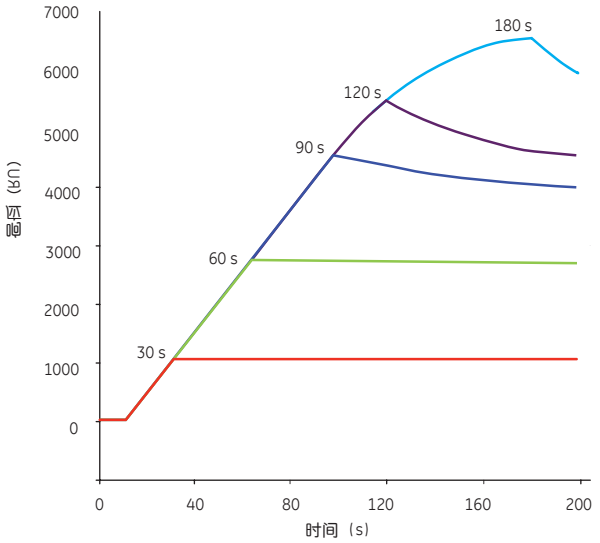

图3：注入TNKS1（5μg/ml)30秒，1000RU或更低的响应水平可以实现蛋白质稳定结合至传感器芯片NTA上。这一捕获水平Rmax理论值的计算结果为10RU（与相对分子量为[Mr] 300的化合物以1：1结合）。

如果稳定结合蛋白约为1000RU，则注入时间选择为30秒。每一个新的相互作用分析都用新鲜的蛋白进行捕获。用单循环动力学分析方法进行动力学鉴定，显著节约获取结果时间。蛋白捕获及样品注入都采用相同的流速（15 μl/min）以维持稳定的捕获。在单循环动力学分析中，在同一个分析循环中连续注入浓度递增的样品。对于捕获分析来说，这样通常可以减少2到4成的试剂消耗，从而降低费用。化合物被稀释成0.06 到5 μM范围内五种不同的浓度，注入30秒，并在最后一次注入之后进行10分钟解离。结果可以拟合为1：1结合模型或者是稳态亲和模式。

DSF分析

DSF是一种用来测定低分子量化合物与蛋白质相互作用的基于荧光的结合分析法。当温度升高时，蛋白质去折叠，暴露出疏水区使之可以与荧光染色剂相互作用。存在或不存在化合物的条件下达到蛋白质去折叠过程中间点所需要的温度之差（ΔTm）与化合物的结合亲和力相关。

在潜在相互作用化合物存在的条件下，含有蛋白质的溶液加入96孔板中进行分析。蛋白质（0.2mg/ml）与浓度50μM的化合物在含有2% DMSO，pH 7.4的PBS中混合。在相同的缓冲液但是却没有化合物存在的情况下对蛋白质进行的分析被用作对照。荧光染色剂为SYPRO™ Orange(Invitrogen)(500倍浓缩于DMSO的染色剂在孔中进行1:1000稀释)。从20°C到90°C范围内对96孔板进行扫描。

结果

Biacore T200 分析

限制性库的筛选

通过同时将每一种相同浓度的化合物注入 TNKS1 和 PARP15芯片表面对所有化合物进行筛选。结合响应（图4）及感应图的形状可被用于鉴定选择性结合物及高亲和力结合物。在这一苗头化合物筛选中，38种化合物被选出进行进一步的动力学鉴定。

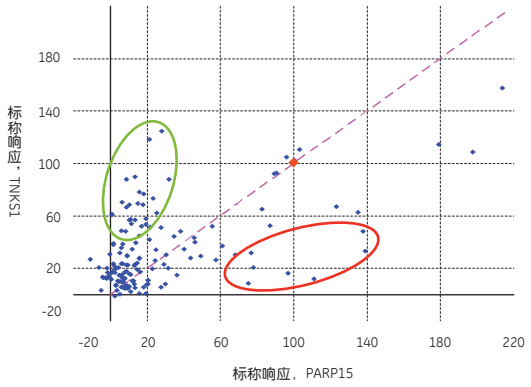

图4：显示苗头化合物筛选扫描中的结合响应。根据分子量对响应进行调整并且用设定为100的阳性对照（红）对其进行校正。PARP15 或 TNKS1 的选择性结合化合物分别用红色和绿色的圈标标示。

动力学及稳态鉴定

38种被选出的化合物逐一与固定在同一传感器表面两个流动池中的PARP15 和 TNKS1 进行相互作用，并进行了动力学分析，其中化合物的标准化浓度系列为0 to 200 μM。数据拟合采用1：1结合模型（未显示），计算出的动力学速率常数不确定性小于15%的化合物被选出用于更进一步的结合鉴定。

在低的、稳定的捕获水平下的动力学分析

最终选取八种化合物进行更为深入的动力学和选择性鉴定。对其中四种化合物与TNKS1 和 TNKS2的结合特性进行比较。Biacore T200 的高灵敏性可帮助实现在被捕获蛋白密度非常低（假定结合稳定）的条件下获取精确的动力学和亲和力数据（图5） 。

尽管TNKS1 和 TNKS2的活性位点几乎完全相同，但是可以观察到TNKS2具有更高的化合物亲和力。这是由于几个化合物与之的结合具有明显较低的解离率，由于药物研制通常要求缓慢的解离率，因此这一特性对于先导药物开发具有特别的意义。

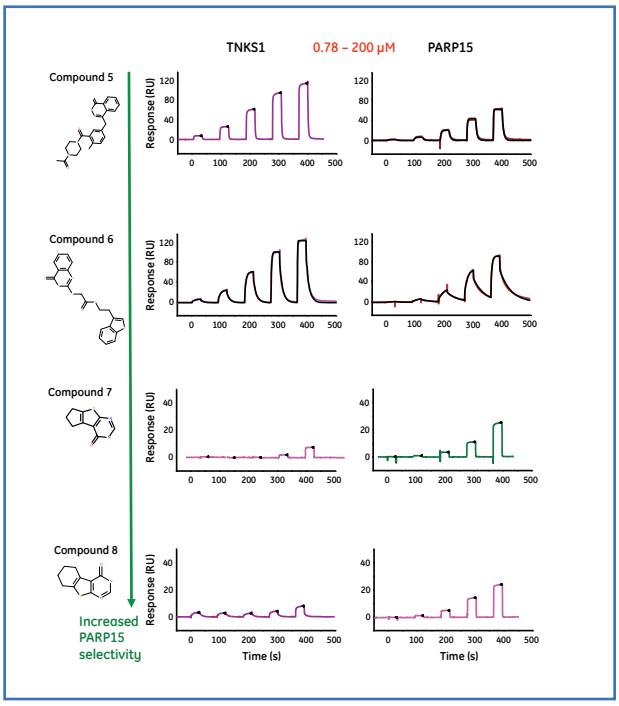

图5.八个选出的化合物中的四种与TNKS1 和 TNKS2相互作用的特性比较。一系列浓度（0.06 至 5 μM）的样品被注入到制备好的传感器芯片表面。Biacore T200的卓越灵敏度可帮助实现在极低蛋白质捕获水平上（假定是中性条件下的稳定结合）获取动力学和亲和力数据。在这些实验中观察到由于较缓慢的解离率，化合物对TNKS2具有较高亲和力。

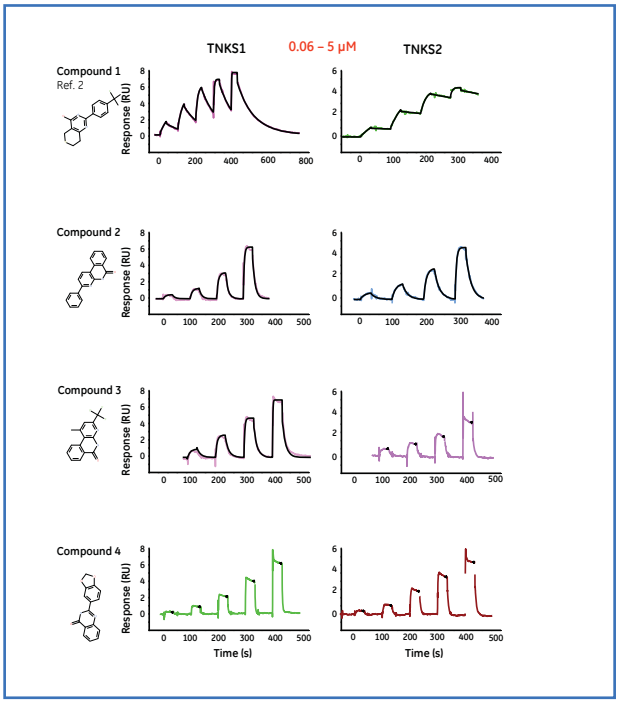

图6.化合物的选择性。一系列浓度(0.78 – 200 μM*)的四种化合物被同时注入固定TNKS1和PARP15的芯片表面。对PARP15有选择性的弱配体被鉴定出来。
*化合物8的注入浓度高达300 μM。

4种化合物被按一系列浓度依次注入到固定化TNKS1和PARP15的芯片表面进行选择性分析。图6显示相互作用特性，并且相对于TNKS1鉴定出对PARP15有选择性的的弱结合配体。例如，在相对较低的浓度下，化合物7与8对 PARP15的结合可被检测出来。尽管化合物5和6都对TNKS1具有较高的亲和力，但是他们从PARP15上的解离却有着较低的解离率。本次试验中所使用化合的供应商在表一中列出。

表1.本研究中所使用化合物的供应商及产品编号。

化合物编号	化合物名称	生产商	产品编号
化合物1	XAV939	Maybridge	RF03920
化合物2		ENAMINE	T5974626
化合物3		ENAMINE	T5989689
化合物4		INTERBIOSCREEN	STOCK5S-79756
化合物5	Olaparib ('AZD2281, KU-0059436)	JS Research Chemicals Trading	
化合物6		INTERBIOSCREEN	STOCK6S-43755
化合物7		ENAMINE	T0514-1628
化合物8		Chemdiv	1306-0033

DSF分析

尽管使用DSF可以鉴定△T_m 值高于 1.2℃的TNKS1高亲和性结合物，但是却无法对亲和性进行可靠的分级。此外，用SPR鉴定的四种弱PARP15结合物中只有一个经DSF鉴定出有结合（图7）。

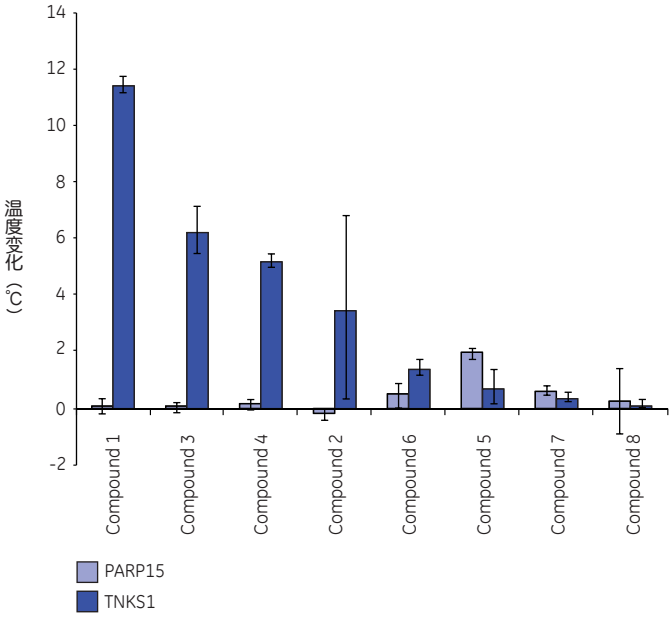

图7. 来自PARP15和TNKS1的温度变化数据的重叠图。两种蛋白的浓度均为0.2mg/ml。化合物浓度为50 μM。在两个筛选中， 1.2℃的温度变化认为是统计学cut-off。

讨论

Biacore T200

本研究中所述的工作为根据结合选择性和亲和力对小分子样品的筛选、鉴定和分级，并且随后对筛选出的先导药物进行深入的动力学和选择性分析。使用Biacore T200可以成功地完成这一过程中的所有目标。

Biacore T200的高度灵敏性可以实现在各个不同阶段根据相关数据得出可靠结论。其灵敏度可以达到无论多么小的分子都可以检测到的水平，因而可以用于检测最简单的有机化合物。

当任何分析方法或设备接近检测极限时，分析的准确性，也就是数据的可靠性就被降低了。Biacore T200增强了灵敏度，扩大了精确测定动力学速率常数的范围，因而之前的临界数据如今也可以得到精确测定。

精确检测与靶蛋白相互作用微弱的小分子对所使用的生物传感器系统提出了很高的要求。当检测的灵敏度提高时，固定在传感器表面上的靶蛋白量以及溶液中相互作用物的浓度就可以降低。这样既可提高结果的质量，也可以降低由于化合物聚集等现象引起的假象。在早期筛选期间，高质量的数据可为合理决定选择哪一个样品进行进一步研究提供坚实的根据。

尽管拥有几乎完全相同的活性位点，但是比较所筛选出与TNKS1和 TNKS2相互作用的五种化合物的结合特性时，发现TNKS2由于在几个相互作用中解离率明显缓慢而因此具有更高的亲和性。在苗头化合物验证分析中，从低达6-8RU的最大结合响应就可得到精确动力学速率常数，实现了相比于TNKS1对PARP15具有选择性的的弱配体的鉴定。除了只需要固定少量的靶蛋白，Biacore T200分析系统对注入溶液中化合物的消耗量也很低。

DSF

尽管DSF在对TNKS1的苗头化合物分析中命中率很高，但是对于PARP15的命中率却相当低（图7和图8）。其中一部分原因是化合物库对PARP1及如端粒酶等类似物有偏差。

在这一研究中，DSF不足以对限制性化合物库中的化合物和PARP蛋白之间的相互作用进行对比性筛选。DSF对于低亲和力结合物（在本研究中K_D > 50 μM）检测的局限性以及与部分或全部去折叠的蛋白之间相互作用带来的干扰都使得结合化合物的检测变得复杂。此外，尽管被Biacore T200分析鉴定为弱相互作用的结合物（K_D > 50μM）会影响在

DSF分析中PARP15 和 TNKS1蛋白的T_m值，然而这些T_m值的变化没有统计学意义或者为负（图8）。甚至对于那些与靶蛋白结合KD值接近1 μM的化合物来说，Tm值差异的幅度也是相当高的（从1.5°C 到 6.6°C）。

DSF是一种通用的相互作用分析手段，特别适用于鉴别能够防止蛋白质热感应去折叠，相反使蛋白质稳定的低分子量配体。然而在使用这一方法按照亲和力对化合物进行分级或在几个蛋白之间比较结合特性的时候，必须要多加小心。这是因为DSF数据针对的是高温条件下的相互作用，而ΔTm的数值和生理温度下的亲和性之间并不是简单的对应关系。相互作用中亲和力、焓和热容改变的不同组合可以造成相同的温度漂移。因此需要在Biacore T200中进行更加直接和灵敏的结合分析以获取能够进行准确进行亲和力分级或不同蛋白之间对比的可靠数据。

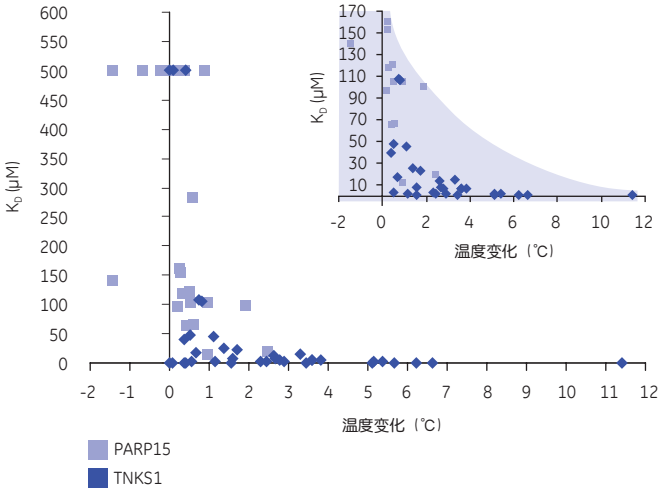

图8：使用 Biacore T200 和 DSF 进行实验获取的数据之间的相关性。注意无法用DSF分析测定的几种结合物在Biacore T200分析中显示对PARP15的结合具有约50到150 μM之间的亲和力。

结论

- 尽管具有几乎完全相同的活性位点，但是化合物对TNKS1和TNKS2表现出了不同的亲和力。
- 对PARP15有选择性弱亲和力结合物可容易地被Biacore T200检测出来。
- 使用Biacore T200测定的结合率和解离率有助于解释亲和力和/或结合机制方面的差异
- DSF尽管适用于鉴定高亲和力化合物，但在此研究中却不能可靠地鉴定弱结合物，也无法根据亲和力对化合物进行分级。
- Biacore T200的高灵敏性可实现在中性条件下将蛋白稳定地捕获到传感器芯片NTA上，可获得可靠的动力学数据。

参 考 文 献

References

[1] http://www.thesgc.org

[2] Shih-Min A. *et al.* Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signaling. *Nature* 461, 614-620 (2009).