

• 研究论文 •

以 nNOS 和 PSD-95 相互作用为靶标的解耦联剂筛选模型的建立

张 蕾, 周鹤鸣, 李晓芸, 张 楚, 张雅卓, 周 苗, 陈立娜, 张 宇*

(南京医科大学药学院, 江苏 南京 211166)

摘要: 复合物神经型一氧化氮合酶 (neuronal nitric oxide synthase, nNOS)-突触后密度蛋白-95 (postsynaptic density protein-95, PSD-95) 形成的增加在缺血性卒中引发的神经损伤中起着重要作用, 本研究以 nNOS 和 PSD-95 相互作用为靶点, 建立 nNOS-PSD-95 解耦联剂筛选模型。模型采用转染的方式将质粒 pCDH-Flag-nNOS 和 pcDNA3.1-PSD-95 分别转染入人胚胎肾-293T (human embryonic kidney-293T, HEK-293T) 细胞, 通过真核表达的方式富集 Flag-nNOS 和 PSD-95。随后, 通过 nNOS 和 PSD-95 体外共孵育获得 nNOS-PSD-95 复合物, 以 ZL006 为阳性药干预 nNOS-PSD-95 的结合, 考察 ZL006 在该系统的解耦联效率, 并对解耦联模型进行优化。结果表明, 在该模型中, ZL006 显示出较明显的解耦联效果, 并通过戊二醛法获得抗体耦联磁珠, 从而优化筛选模型, 提高了筛选效率, 降低了成本。最后运用该模型对另一个已知的 nNOS-PSD-95 解耦联化合物 IC87201 及候选 ZL006 结构类似物进行了解耦联活性评价, 发现 IC87201 在该模型中同样具有解耦联活性, 并且在候选化合物中也筛选出了潜在的解耦联化合物。

关键词: nNOS-PSD-95; 解耦联剂; ZL006; 筛选模型

中图分类号: R965.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)04-0638-07

Establishment of a screening model for compounds uncoupling the interaction of nNOS with PSD-95

ZHANG Lei, ZHOU He-ming, LI Xiao-yun, ZHANG Chu, ZHANG Ya-zhuo, ZHOU Miao, CHEN Li-na, ZHANG Yu*

(School of Pharmacy, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China)

Abstract: In ischemic stroke, increased level of neuronal complex of nitric oxide synthase (nNOS)-postsynaptic density protein-95 (PSD-95) plays an important role in neuronal damage. We aimed to establish a screening model to identify compounds capable of uncoupling nNOS interaction with PSD-95. In this model, human embryonic kidney-293T (HEK-293T) cells were transfected with either pCDH-Flag-nNOS or pcDNA3.1-PSD-95 plasmid to obtain the protein of Flag-nNOS or PSD-95. Incubating Flag-nNOS with PSD-95 causes formation of the nNOS-PSD-95 complex. ZL006, a known uncoupler of nNOS-PSD-95 interaction, can disturb the interaction between Flag-nNOS and PSD-95, serving as a positive control. The method coupling antibodies to magnetic beads with glutaraldehyde was used to decrease the cost and increase the efficiency. To establish that our model is suitable for selecting nNOS-PSD-95 uncouplers, we evaluated the ability of IC87201, another reported uncoupler of nNOS-PSD-95 interaction, and structural analogs of ZL006. IC87201 and one structure analog of ZL006 showed uncoupling effect, supporting that our model can be used to select different types uncoupler blocking nNOS-PSD-95 interaction.

Key words: nNOS-PSD-95; uncoupler; ZL006; screening model

收稿日期: 2018-10-16; 修回日期: 2018-11-17.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81373895); 江苏省高等学校大学生创新创业训练计划项目 (201610312048Y).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-25-86868480, E-mail: zhangyu@njmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0935

脑卒中是临床上危害中老年健康与生命的常见脑血管疾病, 具有高致病率、高死亡率的特点, 严重危害公共健康, 其中缺血性脑卒中占据了很大比例^[1-4]。研究表明, 在脑缺血发生时脑内释放大量谷氨酸, 导致神经元 *N*-甲基-*D*-天门冬氨酸受体 (*N*-methyl-*D*-aspartic acid receptor, NMDAR) 持续激活, 进而促进 nNOS-PSD-95 复合物的形成。复合物形成及其介导的异常下游信号是造成神经元损伤甚至死亡的重要因素之一^[5-10]。

nNOS 和 PSD-95 相互作用是通过非经典的 PDZ-PDZ 结构域所介导, 即 nNOS 的 PDZ 结构域延伸出的 β -折叠被 PSD-95 的 PDZ1 或 PDZ2 结构域的多肽结合口袋所识别, 其中位于 nNOS β -折叠区域的 62 位天冬氨酸 (aspartic acid, Asp) 与位于 nNOS-PDZ 区域的 121 位精氨酸 (arginine, Arg) 构成的盐桥是 nNOS-PSD-95 形成的重要因素; ZL006 的设计思路正是通过 ZL006 上的羧基与 Arg121 结合, 破坏 Arg121-Asp62 盐桥, 进而阻断 nNOS 和 PSD-95 相互作用^[11]。由于 ZL006 亲脂性较差, 不易透过血脑屏障, 开发成药较为困难^[12], 而天然植物中化合物含量丰富, 所以从中筛选 ZL006 类似物用于缺血性脑卒中治疗具有一定的研究意义。

目前常用的以 nNOS 和 PSD-95 相互作用为靶点的抗脑卒中药物筛选模型主要有神经元模型和动脉栓塞模型^[13-15], 但是这两种模型的操作过程复杂, 在高通量筛选过程中不具有优势, 并且荧光能量共振转移^[16]、等温滴定量热法^[17]等测定蛋白相互作用的方法对仪器有较高的依赖。谷胱甘肽巯基转移酶 (glutathione S-transferase, GST) pull-down 和免疫共沉淀 (co-immunoprecipitation, Co-IP) 实验同样是研究蛋白质相互作用行之有效的检测方法, 本研究结合 GST-pull-down 和 Co-IP 的基本原理, 利用真核蛋白质表达体系, 通过共孵育方式获取 nNOS-PSD-95 复合物, 再给予解耦联剂 ZL006 或候选化合物, 构建无细胞体外筛选模型, 用于 nNOS-PSD-95 解耦联化合物的筛选。

材料与方 法

材料 Lipo6000 转染试剂、RIPA 中效裂解液购自碧云天生物技术有限公司; UNIQ-500 柱式质粒 DNA 大量抽提试剂盒、考马斯亮蓝 G-250、小鼠抗 Flag 抗体购自上海生工生物工程有限公司; GST 亲和层析介质、高亲和 Ni-NTA 纯化介质购自南京金斯瑞生物科技有限公司; Protein A/G 免疫沉淀磁珠购自南京福麦斯生物技术有限公司; 含有 pCDH-Flag-nNOS、pcDNA3.1-PSD-95、pcDNA3.1-(His)₆-nNOS₁₋₁₃₃ 质粒、pGEX-4T-1-nNOS₁₋₁₃₃ 质粒和 PSD-95-PDZ2-GFP 质粒的大肠杆菌菌种为本实验室保存; HEK-293T 细胞株

购自上海中国科学院细胞所; 兔抗 PSD-95 (D27E11) XP[®]、鼠抗 His-Tag (27E8) 抗体购自美国 Cell Signal Technology 公司; 双抗、高糖 DMEM 培养基购自上海源培生物技术有限公司; ECL 发光液购自上海天能科技有限公司; HRP 标记山羊抗小鼠、兔抗体购自杭州联科生物。0.22 μ m 硝酸纤维素膜购自颇尔公司。戊二醛购自美国 Sigma-Aldrich 公司。其他试剂分别为国产及进口分析纯或以上级别试剂。

乳糖诱导 GST-nNOS₁₋₁₃₃、PSD-95-PDZ2-GFP 重组蛋白的表达及提取 含有 pGEX-4T-1-nNOS₁₋₁₃₃ 质粒和含有 PSD-95-PDZ2-GFP 质粒的大肠杆菌甘油菌按 1:1 000 加入到 5 mL 含有 50 μ g \cdot mL⁻¹ 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C 摇床中 180 r \cdot min⁻¹ 摇菌过夜。次日将菌液按 1:100 加入到 300 mL 含有 50 μ g \cdot mL⁻¹ 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中继续培养 2.5 h, 加入乳糖诱导剂 (终浓度为 5 mmol \cdot L⁻¹), 进行蛋白诱导表达。5 h 后 GST-nNOS₁₋₁₃₃ 重组蛋白表达进入平台期, 1 500 r \cdot min⁻¹ 离心收集细菌, 每 10 g 菌体重悬于 100 mL 菌体裂解缓冲液 [(50 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0, 60 μ g \cdot mL⁻¹ 溶菌酶, 0.5% Triton X-100, 10 U \cdot mL⁻¹ DNA 酶 I, 1 mmol \cdot L⁻¹ 苯甲基磺酰氟 (PMSF)] 中, 反复冻融 2 次。4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min, 收集上清用于后续实验。

真核细胞培养、质粒转染及 Flag-nNOS、PSD-95、(His)₆-nNOS₁₋₁₃₃ 蛋白的提取 HEK-293T 细胞常规培养采用含有 1% 青霉素和链霉素及 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 置于 37 $^{\circ}$ C 恒温孵箱中, 通入含有 5% CO₂ 和 95% O₂ 的混合气。待细胞于 10 cm 大皿中汇合度达到 70%~80% 时, 利用 Lipo6000 转染试剂将 pCDH-Flag-nNOS、pcDNA3.1-PSD-95、(His)₆-nNOS₁₋₁₃₃ 质粒分别转染到 HEK-293T 细胞中, 6 h 后更换新鲜培养基。24 h 后取出培养皿, 弃尽培养基, 用预冷的 PBS 清洗 3 次, 细胞刮下细胞, 加入 3 mL RIPA 裂解液重悬细胞沉淀, 置冰上裂解 30 min, 12 000 r \cdot min⁻¹、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min 后收集富含重组蛋白的上清, 用于后续实验。

GST-pull-down 取 120 μ L 谷胱甘肽树脂混悬液, 用预冷 PBS 清洗 3 遍, 与 6 mL GST-nNOS₁₋₁₃₃ 细菌裂解液于 4 $^{\circ}$ C 颠倒混合孵育 6 h, 弃上清, 加入 3 mL PSD-95-PDZ2-GFP 细菌裂解液于 4 $^{\circ}$ C 颠倒混合孵育过夜。次日, 弃上清, 用预冷 PBS 清洗 3 遍树脂后, 均分至 4 个 1.5 mL EP 管中, 弃尽上清, 200 μ L 预冷 PBS 重悬树脂, 分别加入 ZL006, 使之终浓度分别为 30、60、90 μ mol \cdot L⁻¹, 4 $^{\circ}$ C 颠倒混合孵育 8 h。

考马斯亮蓝染色 上述孵育 8 h 的树脂, 于 4 $^{\circ}$ C 下

4 000 r·min⁻¹ 离心 3 min, 小心移取 190 μL 上清至干净 EP 管中, 加入 50 μL 5×蛋白上样缓冲液, 涡旋仪上涡旋 30 s 后 100 °C 煮沸 10 min, 使蛋白质充分变性, 然后进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳结束后用考马斯亮蓝染液染色过夜, 次日脱色液脱色后, 拍照。

(His)₆-nNOS₁₋₁₃₃ 蛋白的镍柱纯化及体外解耦联实验 取 (His)₆-nNOS₁₋₁₃₃ 蛋白 1 mL 与清洗后的 120 μL 高亲和 Ni-NTA 纯化介质共孵育 6 h 后, 4 000 r·min⁻¹ 离心, 弃上清, 预冷 PBS 清洗树脂 3 遍, 1 mL PBS 重悬树脂, 均分至 4 个 1.5 mL EP 管中, 4 000 r·min⁻¹ 离心, 弃尽上清, 200 μL 预冷 PBS 重悬树脂, 分别加入 ZL006, 使之终浓度分别为 30、60、90 μmol·L⁻¹, 4 °C 颠倒混合孵育过夜。次日, 4 000 r·min⁻¹ 离心, 弃上清, 耦联树脂用预冷 PBS 清洗 3 遍, 用 1×蛋白上样缓冲液洗脱蛋白, 用于蛋白分子免疫印迹实验。

基于 Co-IP 原理的体外解耦联实验 按 1:50 将 Flag 抗体与 Flag-nNOS 蛋白溶液混合 (总体积 200 μL), 4 °C 颠倒混合 1 h, 加入 200 μL 免疫磁珠共孵, 4 °C 颠倒混合孵育过夜。预冷 PBS 清洗磁珠 3 遍, 加入 200 μL PSD-95 蛋白溶液, 4 °C 颠倒混合孵育 8 h, 弃上清, 预冷 PBS 清洗磁珠 3 遍, 然后将免疫磁珠复合物均分到 4 个 1.5 mL 低吸附离心管中, 200 μL PBS 重悬磁珠, 加入 ZL006, 使之终浓度分别为 30、60、90 μmol·L⁻¹, 4 °C 颠倒混合孵育过夜。

蛋白质免疫印迹 孵育过夜的磁珠, 弃去上清, 预冷 PBS 清洗 3 遍, 加入 40 μL 甘氨酸溶液 (100 mmol·L⁻¹, pH=2.3) 洗脱, 立即加入 4 μL Tris 溶液 (1 mol·L⁻¹, pH=8.0) 中和, 移取上清, 加入 10 μL 5×蛋白上样缓冲液, 涡旋仪上涡旋 30 s 后 100 °C 煮沸 10 min, 使蛋白质充分变性, 进行 SDS-PAGE 分离后, 转膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 抗 nNOS 抗体 (1:500) 和抗 PSD-95 抗体 (1:500) 4 °C 孵育过夜, PBST 缓冲液洗膜 5 次, 加入 HRP 标记山羊抗小鼠抗体 (1:500) 37 °C 孵育 2 h, PBST 缓冲液洗膜 5 次, ECL 化学发光法显影。

Flag 标签纯化磁珠的制备与保存 戊二醛是一种常用的同型双功能交联剂, 它的两个醛基可通过形成 Schiff 碱将 HRP 与抗体以五碳桥连接起来^[18]。本研究将 Flag 抗体与 10% 磁珠混悬液按照 1:50 的比例于 4 °C 孵育 8 h, 使 Flag 抗体饱和磁珠上抗体结合位点, 随后将 2.5% 戊二醛分 10 次加入饱和了 Flag 抗体的磁珠混悬液中, 每次 10 μL, 整个过程持续 2 h, 之后将磁珠转移至 pH=8.0 的 Tris-HCl 缓冲盐中中和 30 min, 预冷 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 短期保存在 PBS 溶液中, 长期保存置于 20% 乙醇溶液中。

数据处理 所有实验重复 3 次以上, 蛋白质免疫印

迹采用 Image J 进行数据收集, 数据分析采用 Student's *t* test。

结果

1 以 nNOS 和 PSD-95 结构域相互作用为靶标的筛选模型

研究表明, nNOS 的 N 端 133 个氨基酸和 PSD-95 的 PDZ2 被认为是 nNOS 与 PSD-95 结合的位点^[19-21] (图 1A), 由于 nNOS 和 PSD-95 均为较长的真核蛋白, 因此在本研究初始阶段拟采用原核表达的 GST-nNOS₁₋₁₃₃ 和 PSD-95 结构域片段蛋白 PDZ2-GFP 作为研究对象, 利用 GST-pulldown 技术建立解耦联剂筛选模型。图 1B 和 C 表明已成功表达了 GST-nNOS₁₋₁₃₃ 和 PDZ2-GFP 重组蛋白, 因为重组蛋白 GST-nNOS₁₋₁₃₃ (约 43 kDa) 与 GFP-PDZ2 (约 45 kDa) 分子质量接近, SDS-PAGE 电泳很难将两者分开, 所以本研究通过考察解耦联后上清中游离 PDZ2-GFP 蛋白的量来评价解耦联效率, 图 1D 为在 ZL006 干扰下, 不能与 GST-nNOS₁₋₁₃₃ 结合的上清中游离的 PDZ2-GFP 蛋白量。结果显示 GST-nNOS₁₋₁₃₃ 和 PDZ2-GFP 间存在蛋白质相互作用, 但是加入不同浓度的 ZL006 并不能有效地阻断 GST-nNOS₁₋₁₃₃ 和 PDZ2-GFP 的耦联。

在排除实验操作可能造成的偏差后, 考虑是否因为 GST 标签 (26 kDa) 较大, 导致 nNOS₁₋₁₃₃ 结构域的形成发生差异, 失去 ZL006 结合位点, 使得 ZL006 不能发挥解耦联效果。而组氨酸 (His) 标签仅有 6 个氨基酸组成, 影响较小, 因此本研究尝试使用组氨酸标签来作为融合蛋白。

2 HEK-293T 共表达 (His)₆-nNOS₁₋₁₃₃ 和 PSD-95 的体外细胞筛选模型

在后续实验中, 将 GST 标签更换为较小的 His 标签, 同时为了避免原核表达蛋白折叠方式与真核表达蛋白可能存在的差异, 利用真核细胞表达的 (His)₆-nNOS₁₋₁₃₃ 进行模型建立。由于 HEK-293T 中基本没有 nNOS 的表达而存在 PSD-95 的表达, 因此本研究利用转染方式将 (His)₆-nNOS₁₋₁₃₃ 质粒转入 HEK-293T 细胞中过表达, 并提取总蛋白, 采用镍柱纯化 (His)₆-nNOS₁₋₁₃₃ 的同时将 PSD-95 捕捉到镍柱上。随后给予不同浓度的 ZL006 处理转染细胞 12 h, 但是仍然无法阻断 (His)₆-nNOS₁₋₁₃₃ 和 PSD-95 的相互作用 (图 2A)。

猜测是否为细胞代谢等过程影响了 ZL006 的解耦联作用, 因此本研究在细胞裂解液中直接加入不同浓度的 ZL006 体外处理 8 h, 随后用镍柱分离 (His)₆-nNOS₁₋₁₃₃, 结果显示各组中 (His)₆-nNOS₁₋₁₃₃ 和 PSD-95 的耦联率仍没有显著性差异 (图 2B)。

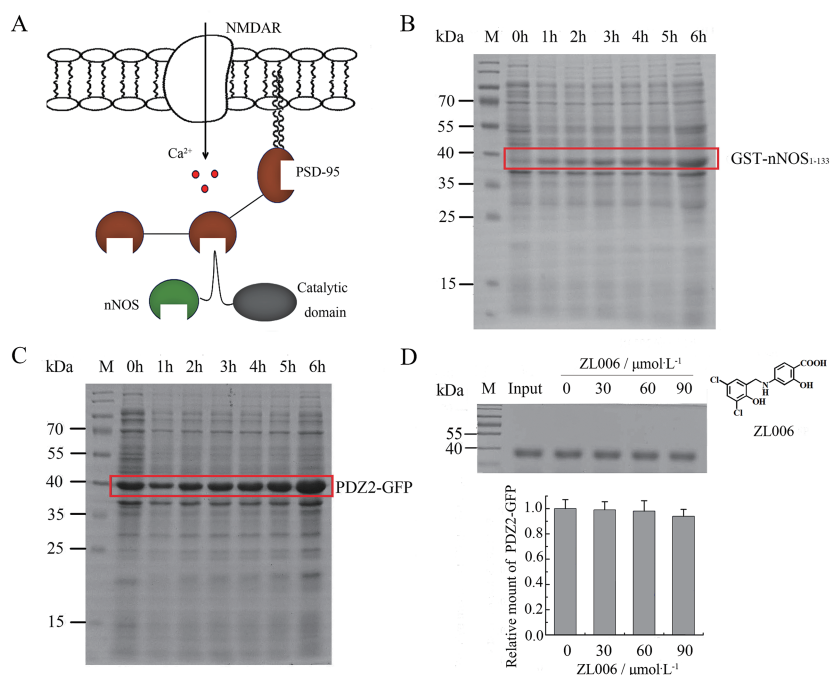


Figure 1 Establishment of screen model targeting the domain interaction between nNOS and PSD-95. A: Mechanism of the interaction between nNOS and PSD-95; B: Induced expression of GST-nNOS₁₋₁₃₃ in BL21(DE3) containing pGEX-4T-1-nNOS₁₋₁₃₃; C: Induced expression of PSD-95-PDZ2-GFP in BL21(DE3) containing pET-28a-PSD-95-PDZ2-GFP; D: Uncoupling efficiency of ZL006 in the protein interaction model of GST-nNOS₁₋₁₃₃-PDZ2-GFP. $n = 3, \bar{x} \pm s$. nNOS: Neuronal nitric oxide synthase; PSD-95: Postsynaptic density protein-95

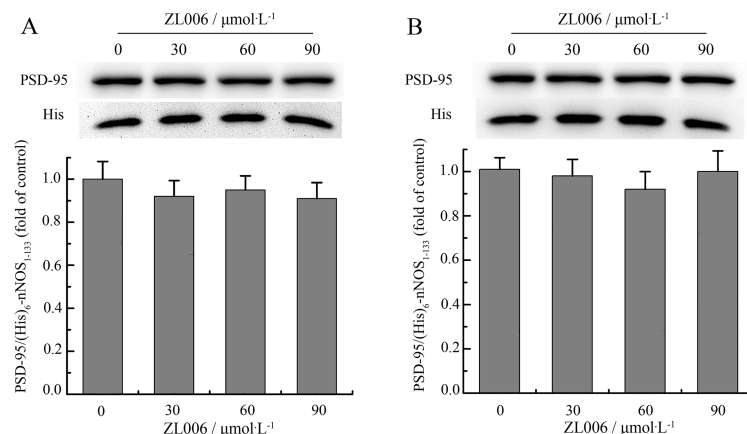


Figure 2 Uncoupling efficiency of ZL006 targeting interaction of (His)₆-nNOS₁₋₁₃₃ and PSD-95. A: Uncoupling efficiency of ZL006 in HEK-293T which co-expresses (His)₆-nNOS₁₋₁₃₃ and PSD-95; B: Uncoupling efficiency of ZL006 in protein interaction model of eukaryotic expressed (His)₆-nNOS₁₋₁₃₃ and PSD-95. $n = 3, \bar{x} \pm s$

3 基于全长 nNOS 和全长 PSD-95 相互作用的体外筛选模型的建立

以上两种体外模型的失败使得课题组猜测, 仅仅表达 nNOS 与 PSD-95 相互作用相关的结构域虽然保留了相互作用的能力, 但可能会影响 ZL006 的结合位点。Bach 等^[22]也提出 nNOS 与 PSD-95 的相互作用虽然基于 nNOS 的 N 端片段及 PSD-95 的 PDZ2 结构域, 但是可能需要两个蛋白完整结构的共同参与, 因此本研究尝试采用真核表达的全长 nNOS 和全长 PSD-95

进行模型的建立。

Co-IP 结果表明, 在 HEK-293T 细胞中 Flag-nNOS 能与内源性 PSD-95 发生蛋白质相互作用, 且 ZL006 能够浓度依赖地解开两者的耦联 (图 3), 说明 ZL006 能阻断全长 nNOS 和全长 PSD-95 间的相互作用, 也进一步佐证了结果 1、2 中两种体外模型失败的原因。

由于在对候选化合物进行筛选过程中细胞持续培养和过表达较为繁琐, 并且存在扩大培养需要与候选化合物检测相配合的问题, 因此本研究尝试建立不直

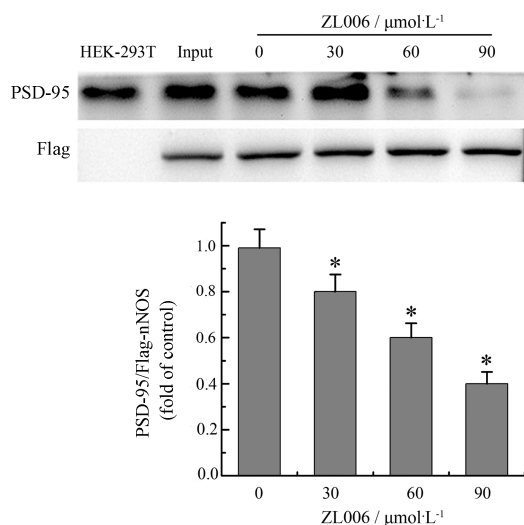


Figure 3 Uncoupling efficiency of ZL006 in HEK-293T which co-expresses nNOS and PSD-95. $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs control

接依赖于真核细胞的筛选体系。通过转染,在HEK-293T细胞中分别过表达Flag-nNOS和PSD-95,将细胞裂解后分别获得富含Flag-nNOS和PSD-95的蛋白质溶液,通过体外共孵育方式,获得耦联复合物。采用戊二醛化学耦联法将Flag抗体耦联在Protein A/G磁珠上,进而实现磁珠的重复使用。

结果表明,戊二醛耦联Flag抗体后的磁珠能够很好地识别Flag-nNOS-PSD-95复合物,并且ZL006在一定浓度范围内能够浓度依赖地阻断nNOS和PSD-95相互作用(图4A)。Flag标签纯化磁珠在经过pH 8.0 Tris-HCl中和、PBS清洗后,再次用于实验,仍然能结合Flag-nNOS,并且过饱和结合量与回收前相近,经过四次使用后仍具有较高的结合率(图4B)。

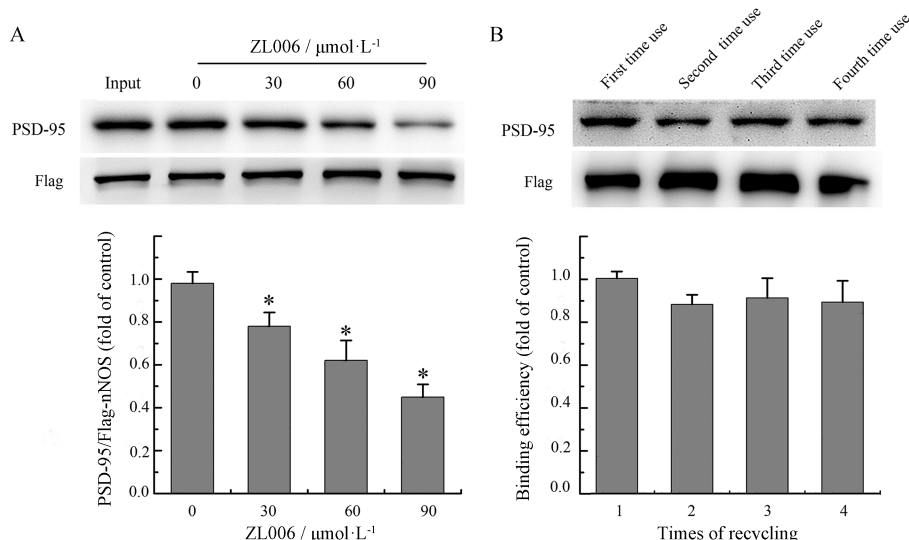


Figure 4 Improvement of screen model. A: Uncoupling efficiency of ZL006 targeting interaction of full-length nNOS and full-length PSD-95 *in vitro*; B: The binding efficiency of antibody magnetic beads during recycling. $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs control

4 IC87201的解耦联验证及候选nNOS-PSD-95解耦联剂的活性评价

IC87201为ZL006的结构类似物,已有文献^[23,24]报道,其通过阻断nNOS和PSD-95的相互作用发挥神经保护作用。结果如图5A所示,在本研究建立的模型中,IC87201也能发挥类似ZL006的解耦联作用,进一步佐证了模型的相对专一性。并且本实验室采用分子印迹法从中药中筛选出了4个与ZL006结构相似的化合物,分别为巴马亭(palmatine)、脱氢紫堇碱(dehydrocorydaline)、橙皮苷(hesperidin)、白屈菜红碱(chelerythrine)。根据ZL006解耦联的浓度依赖性,将4个化合物的工作浓度设为 $90 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 进行解耦联活性评价,结果显示白屈菜红碱具有较好的解耦联效率(图5B)。

以上结果表明,该模型能用于nNOS-PSD-95解耦联剂的筛选。

讨论

nNOS和PSD-95的相互作用在脑卒中的发生发展中扮演着重要角色,自发现以来,就受到科研工作者的重视。研究表明,干扰nNOS和PSD-95的相互作用能够很好地改善脑卒中引起的神经损伤,并且不会因为影响两蛋白的正常生理功能而产生不良反应^[25],因此研究者将目光转向新型小分子解耦联化合物,如IC87201^[23,24]、ZL006^[11,26]。但两种药物具有亲水性较大,不易透过血脑屏障的缺点,需要通过结构改造或寻找其他化合物等方法获得具有临床意义的解耦联化合物。

蛋白质的结构域是研究蛋白质相互作用的重要位点,并且全长蛋白质不同结构域之间存在着相互影响,

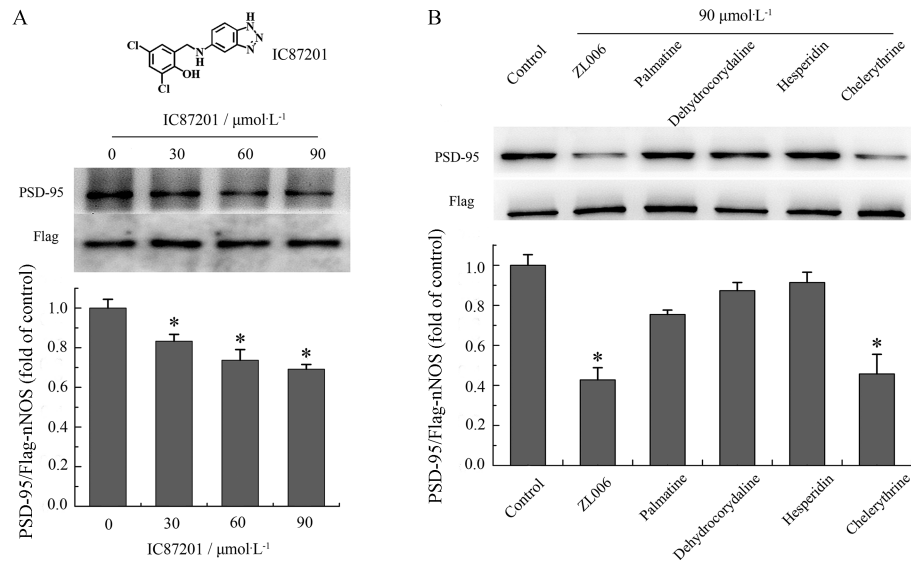


Figure 5 Uncoupling ability of IC87201 and candidate compounds. A: Uncoupling efficiency assay of IC87201. B: Uncoupling efficiency assay of candidate analogs of ZL006. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs control

而片段化后的结构域则缺少这种影响。因此, 结果 1 和 2 中模型的失败可能由于 ZL006 的结合位点虽然位于 nNOS 的 PDZ 结构域, 但是在缺少其他结构域的情况下不能很好地暴露或形成; 也有可能 ZL006 的结合位点在 PDZ 结构域以外, 通过变构效应影响 PDZ 结构域的构象, 从而影响了 nNOS 和 PSD-95 的相互作用。由于现阶段缺少完整 nNOS 的晶体结构数据或核磁的结构数据, 难以确定 ZL006 的结合模式, 还需要结合更多的结构生物学结果才能更好地解释 ZL006 的作用机制及研究候选化合物的干预机制。

本研究基于 nNOS 和 PSD-95 相互作用建立解耦联剂筛选体系 (图 6), 初始设计思路是以经典的 GST-pulldown 实验为基础, 希望通过 GST-nNOS₁₋₁₃₃ 与固相介质结合, 考察解耦联剂对 GST-nNOS₁₋₁₃₃-PDZ2-GFP

复合物的解耦联效率, 但后续由于蛋白结构域完整性、大蛋白原核表达构象改变等原因, 本研究采用了与 Co-IP 相似的实验方案, 即通过结合在免疫磁珠上的抗体识别 Flag-nNOS, 进而识别 PSD-95, 获得体外耦联复合物, 再检测耦联剂共孵育后的解耦联效率。最后采用化学耦联的方法将抗体固化在磁珠上, 因此实验原理更接近于 pull-down。

在实验中, 为了减少批次间的差异, 应在实验开始前大批量过表达 nNOS 和 PSD-95 蛋白, 对每一批次蛋白溶液进行蛋白定量; 通过控制 nNOS 与 PSD-95 比例以及免疫磁珠的使用量, 使 nNOS-PSD-95 的结合量接近于生理条件或病理条件, 从而更好地评价解耦联效果; 在每次筛选过程中, 应加入 ZL006 作为阳性解耦联剂, 有利于评价解耦联体系的稳定性。另外, 采用戊二

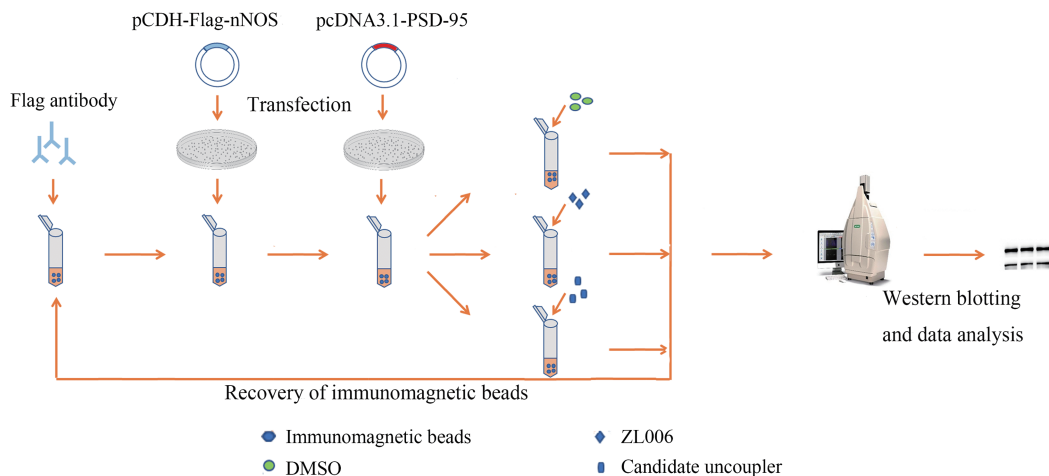


Figure 6 Schematic representation of the screening model. The nNOS-PSD-95 complex were formed by co-incubation *in vivo*, then ZL006 candidate uncouplers were added to disturb the interaction, and Western blotting technology was used to evaluate the uncoupling efficiency

醛耦联法获得的抗体耦联免疫磁珠重复利用率较高,相较于传统的免疫共沉淀、神经元细胞模型和MACO模型,具有省时、经济的特点。

本研究建立了nNOS-PSD-95解耦联剂筛选模型,有助于从天然植物中初步筛选nNOS-PSD-95潜在解耦联剂,也有助于降低成本、增加候选化合物的检出,为后续动物实验的再次验证提供了理论和实验基础。

References

- [1] Mendis S, Davis S, Norrving B. Organizational update: the world health organization global status report on noncommunicable diseases 2014; one more landmark step in the combat against stroke and vascular disease [J]. *Stroke*, 2015, 46: 121-122.
- [2] Flynn RW, Macwalter RS, Doney AS. The cost of cerebral ischaemia [J]. *Neuropharmacology*, 2008, 55: 250-256.
- [3] Gállego J, Muñoz R, Martínezvila E. Emergent cerebrovascular disease risk factor weighting: is transient ischemic attack an imminent threat? [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2010, 27: 88-96.
- [4] Sevick LK, Ghali S, Hill MD, et al. Systematic review of the cost and cost-effectiveness of rapid endovascular therapy for acute ischemic stroke [J]. *Stroke*, 2017, 48: 2519-2526.
- [5] Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61: 657-668.
- [6] Aarts M, Liu YT, Liu LD, et al. Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor-PSD-95 protein interactions [J]. *Science*, 2002, 298: 846-850.
- [7] Cui H, Hayashi A, Sun HS, et al. PDZ protein interactions underlying NMDA receptor-mediated excitotoxicity and neuroprotection by PSD-95 inhibitors [J]. *J Neurosci*, 2007, 27: 9901-9915.
- [8] Cao J, Viholainen JI, Dart C, et al. The PSD-95-nNOS interface: a target for inhibition of excitotoxic p38 stress-activated protein kinase activation and cell death [J]. *J Cell Biol*, 2005, 168: 117-126.
- [9] Courtney MJ, Li LL, Lai YY. Mechanisms of NOS1AP action on NMDA receptor-nNOS signaling [J]. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8: 252.
- [10] Takagi N, Logan R, Teves L, et al. Altered interaction between PSD-95 and the NMDA receptor following transient global ischemia [J]. *J Neurochem*, 2010, 74: 169-178.
- [11] Zhou L, Li F, Xu HB, et al. Treatment of cerebral ischemia by disrupting ischemia-induced interaction of nNOS with PSD-95 [J]. *Nat Med*, 2010, 16: 1439-1443.
- [12] Chen D, Zhao T, Ni K, et al. Metabolic investigation on ZL006 for the discovery of a potent prodrug for the treatment of cerebral ischemia [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26: 2152-2155.
- [13] Wu S, Yue Y, Tian H, et al. Tramiprosate protects neurons against ischemic stroke by disrupting the interaction between PSD-95 and nNOS [J]. *Neuropharmacology*, 2014, 83: 107-117.
- [14] Yu CZ, Li C, Pei DS, et al. Neuroprotection against transient focal cerebral ischemia and oxygen-glucose deprivation by interference with GluR6-PSD-95 protein interaction [J]. *Neurochem Res*, 2009, 34: 2008-2021.
- [15] Yang S, He R, Zhang FY, et al. Application of cell co-culture techniques in central nervous system diseases [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 338-346.
- [16] Lohse MJ, Susanne N, Carsten H. Fluorescence/bioluminescence resonance energy transfer techniques to study G-protein-coupled receptor activation and signaling [J]. *Pharmacol Rev*, 2012, 64: 299-336.
- [17] Drackowski P, Matosiuk D, Jozwiak K. Isothermal titration calorimetry in membrane protein research [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 87: 313-325.
- [18] Wang CQ. Basics of Molecular Immunology (分子免疫学基础) [M]. Beijing: Peking University Press, 1997: 13-15.
- [19] Tochio H, Mok YK, Zhang Q, et al. Formation of nNOS/PSD-95 PDZ dimer requires a preformed β -finger structure from the nNOS PDZ domain 1 [J]. *J Mol Biol*, 2000, 303: 359-370.
- [20] Christopherson KS, Hillier BJ, Lim WA, et al. PSD-95 assembles a ternary complex with the *N*-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 27467-27473.
- [21] Zhou L, Zhu DY. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications [J]. *Nitric Oxide*, 2009, 20: 223-230.
- [22] Bach A, Pedersen SW, Dorr LA, et al. Biochemical investigations of the mechanism of action of small molecules ZL006 and IC87201 as potential inhibitors of the nNOS-PDZ/PSD-95-PDZ interactions [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 12157.
- [23] Doucet MV, Levine H, Dev KK, et al. Small-molecule inhibitors at the PSD-95/nNOS interface have antidepressant-like properties in mice [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2013, 38: 1575-1584.
- [24] Lee WH, Xu Z, Ashpole NM, et al. Small molecule inhibitors of PSD-95-nNOS protein-protein interactions as novel analgesics [J]. *Neuropharmacology*, 2015, 97: 464-475.
- [25] Sattler R, Xiong Z, Lu WY, et al. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein [J]. *Science*, 1999, 284: 1845-1848.
- [26] Hu W, Guan LS, Dang XB, et al. Small-molecule inhibitors at the PSD-95/nNOS interface attenuate MPP⁺-induced neuronal injury through Sirt3 mediated inhibition of mitochondrial dysfunction [J]. *Neurochem Int*, 2014, 79: 57-64.