

以 MyD88 TIR 二聚化为靶点的抗炎抑制剂筛选模型的建立*

赵岩^{1, 2)} 薛 嫵¹⁾ 姜 雪¹⁾ 曾宪录¹⁾ 巴雪青^{1)**}

(¹⁾ 东北师范大学遗传与细胞研究所, 长春 130024; ²⁾ 吉林省疾病预防控制中心, 长春 130062)

摘要 MyD88 是 IL-1R/TLR 受体超家族向细胞内转导胞外信号时募集到受体胞浆尾部的重要接头蛋白。由 TIR 结构域介导的 MyD88 分子同源二聚化是它招募到受体胞浆尾部的前提, 然后二聚化的 MyD88 再募集下游信号分子, 传递信号, 引发促炎基因的表达。本研究旨在建立一种模型, 以实现活细胞原位的、基于荧光信号变化的 MyD88 二聚化抑制物的高通量筛选。我们分别构建了 MyD88 TIR 与 GFP 和 RFP 的融合蛋白表达质粒, 瞬时转染 HeLa 细胞, 在 488 nm 激发光下, 转染 GFP-MyD88 TIR 和 RFP-MyD88 TIR 细胞, 检测到绿色荧光与红色荧光间的共振能量转移(FRET)。而当细胞转染 GFP-MyD88 TIR 和 RFP 或 RFP-MyD88 TIR 和 GFP, 因 TIR 二聚化不能实现, FRET 效率受到严重影响。实验结果提示, 依赖双阳性表达 GFP-MyD88 TIR 和 RFP-MyD88 TIR 的细胞株, 检测不同化合物对于荧光 FRET 效率的影响, 可以建立 MyD88 TIR 二聚化抑制药物的筛选模型。此外, 我们构建了原核表达质粒, 利用纯化的 His-MyD88 TIR 分别与 GST 或 GST-MyD88 TIR 蛋白进行体外结合实验, 发现 GST-MyD88 TIR(而非 GST)可以与 His-MyD88 TIR 相互结合。结果的差异性提示, 利用 His-MyD88 TIR 和 GST-MyD88 TIR 体外结合实验分析, 可以进一步确定抑制物是否直接阻断了 TIR 的相互作用。结合真核细胞的荧光 FRET 阻断结果和原核表达的重组蛋白相互作用分析, 可确定 MyD88 TIR 二聚化的抑制物。利用这一模型可以对商品化的小分子库、自行制备的天然产物组分进行广泛的筛选, 从中获得有效抑制 MyD88 二聚化的化合物, 参与对 MyD88 信号通路依赖的慢性炎症、自身免疫性疾病的药物治疗。

关键词 MyD88 TIR, 二聚化, 抗炎抑制剂, 筛选模型

学科分类号 Q257, R392.12

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00379

IL-1R 类受体和 Toll-like 受体(TLRs)共属于同一超家族, IL-1R 亚家族包括 IL-1 β 和 IL-18 的受体及其他成员, 介导急性和慢性炎症反应。Toll-like 受体亚家族有 10 个成员, 识别病原微生物或其代谢产物(如内毒素 LPS), 介导天然免疫。当 IL-1R 类受体和 Toll-like 受体与配体结合后, 其胞内的 TIR(Toll/IL-1 receptor homologous region)结构域发生构象改变, 招募存在于胞浆内的也含有 TIR 结构域的接头蛋白分子, 这一过程对信号向胞内的传递至关重要^[1-2]。

接头蛋白分子主要包括 MyD88 (myeloid differentiation primary response protein 88)、Mal (MyD88-adaptor-like) 也称 TIRAP (toll-interlakin 1 receptor domain-containing adaptor protein)、TRIF

(TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β)、TRAM (trif-related adaptor molecule)、SARM (sterile α and HEAT-armadillo motifs)^[3-4], 不同的接头蛋白决定了不同的信号转导途径——MyD88 依赖信号途径和 MyD88 非依赖途径。

接头蛋白分子家族中第一个被鉴定的是 MyD88, 最初发现为骨髓分化时表达的蛋白质^[5], 故而得名。对 MyD88 依赖的信号传导机制目前为

* 吉林省自然科学基金(201015108), 吉林省科技发展计划——国际科技合作基金(20120728)和东北师范大学中央高校基本科研业务基金(10ZDQD001)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0431-85099317, Fax: 431-85098735, E-mail: baxq755@nenu.edu.cn

收稿日期: 2011-08-18, 接受日期: 2011-11-21

止研究得最为成熟, MyD88 可通过自身 C 端的 TIR 结构域相互作用发生二聚化, 在胞外信号配体刺激下, MyD88 以其二聚化的 TIR 结构域和受体复合物的 TIR 结构域发生同源性蛋白质-蛋白质相互作用. MyD88 分子 N 端的死亡结构域(dead domain, DD 结构域)再与 IRAK 家族 DD 结构域发生同源性相互作用, 形成信号转导复合物, 向下传递活化信号, 上调转录因子 AP-1 和 NF- κ B 的活性, 诱导致炎细胞因子, 如 IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、CSF-1 和 TNF- α 等基因的表达^[6]. 接头蛋白 MyD88 是信号转导通路中的关键蛋白, 其 TIR 结构域介导的 MyD88 二聚化是其被招募到受体胞浆尾部的前提条件^[7]. MyD88 作为一种重要的接头蛋白, 一方面传递了 TLRs 介导的先天免疫信号, 另一方面也参与了 IL-18 受体介导的非感染性炎症信号的传递. 类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)^[8]、系统性红斑狼疮(systemic lupus)^[9]、I 型糖尿病(type I diabetes)^[10]及动脉粥样硬化(atherosclerosis)^[11]等慢性炎症和自身免疫性疾病的炎症放大过程, 都与 MyD88 依赖的信号通路相关.

因为 MyD88 被招募到膜受体胞浆尾部是 IL-1R/TLR 受体家族活化后信号传递通路的第一个信号事件, 阻断这一环节就抑制了信号在胞内的继续发散和向下传递, 又因为 MyD88 TIR 的二聚化是 MyD88 与膜受体结合的前提, 所以, MyD88 TIR 二聚化的抑制, 可考虑作为上述慢性非感染性炎症和自身免疫性疾病治疗的一个有效靶点. 目前很多研究根据 MyD88 TIR 结构域氨基酸序列设计合成 TIR 结构类似物, 将其导入哺乳动物细胞, 这些结构类似物竞争性地占据了 MyD88 TIR 二聚化的位点, 从而抑制了 MyD88 依赖的 IL-1 β 和 IL-18 的促炎效应^[12-14]. 这就提示我们, 如果能够建立基于活细胞原位荧光信号分析的抑制剂筛选模型, 就可以快速得到有效抑制 MyD88 TIR 二聚化, 进而影响 MyD88 依赖的信号通路以及最终的生物学效应的化合物. 本研究构建了一系列真核和原核表达的 MyD88 TIR 融合蛋白质粒, 转染真核细胞并检测荧光能量共振转移, 转化大肠杆菌并纯化获得重组蛋白, 进行体外蛋白质-蛋白质相互作用分析. 以期探讨利用 MyD88 TIR 融合蛋白建立筛选 MyD88 二聚化抑制剂药物模型的可行性.

1 材料与方法

1.1 试剂与抗体

细胞转染用脂质体 Lipofectamine 2000 购于 Invitrogen 公司; GST 多克隆抗体、MyD88 多克隆抗体购于 Santa Cruz 公司; 谷胱甘肽琼脂糖凝胶 4B 珠子(GST-Sepharose 4B)购于 Amersham 公司; Ni-NTA 珠子购于 Qiagen 公司; 辣根过氧化物酶偶联的二抗购于 Sigma 公司. 其他分析纯化学试剂购于北京化工厂、生化试剂购于 Amresco 公司或 BBI 公司.

1.2 细胞培养

HeLa 细胞购于上海生物化学与细胞生物研究所, 培养于含 10%小牛血清的 IMDM 培养基(Gibco 公司)中, 并添加 1%的双抗. 培养箱内空气保证一定湿度和 5%的 CO₂ 含量.

1.3 质粒构建

MyD88 TIR 结构域片段通过以人源 cDNA 为模板进行 PCR 扩增获得, PCR 产物长度约 430 bp. 引物设计参照核苷酸序列数据库信息(NCBI 登录号: NM_002468). 将外源片段利用限制酶位点 *Hind* III 和 *Bam* H I 插入 pEGFP-C1 载体, 构建绿色荧光蛋白 GFP-MyD88 TIR 融合蛋白表达重组子; 将外源片段利用限制酶位点 *Hind* III 和 *Bam* H I 插入 pVisionRFP-C 载体, 构建红色荧光蛋白 RFP-MyD88 TIR 融合蛋白表达重组子. 将外源片段利用限制酶位点 *Bam* H I 和 *Eco* R I 插入到 pGEX-6p-1 原核表达载体以及利用限制酶位点 *Bam* H I 和 *Xho* I 插入到 pET-28a 原核表达载体, 转化大肠杆菌 BL21, 可获得 GST-MyD88 TIR 融合重组蛋白和 His-MyD88 TIR 融合重组蛋白.

1.4 GFP 及其融合蛋白质粒、RFP 及其融合蛋白质粒的转染及荧光显微术

按 5×10⁴/孔的细胞密度接种 HeLa 细胞于 48 孔培养板、无抗生素培养基中过夜培养. 转染利用 Invitrogen 公司的转染试剂 Lipofectamine 2000, 按说明书操作进行. 每种质粒的用量为 0.5 μ g. 转染 4~6 h 后更换含抗生素和 10%血清的 IMDM 培养基. 次日, 在倒置荧光显微镜(Nikon TE 2000U)的 488 nm 及 510 nm 激发光下观察各组转染细胞的荧光情况.

1.5 重组蛋白的表达和纯化

原核表达质粒转化大肠杆菌 BL21, 接种于 100 ml 含卡那霉素的 LB 培养基中, 37℃ 培养 3 h. 加入 200 μ l 0.5 mol/L IPTG 继续培养 2~3 h, 诱导表达.

1.5.1 His-MyD88 TIR 的纯化. 离心收集菌体后 800 μ l 缓冲液 A (10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 500 mmol/L NaCl, 10% 甘油, 0.1% Tween-20, 10 mmol/L 咪唑, 0.1% β - 巯基乙醇, 10 μ mol/L ZnSO₄ 与 1 mmol/L PMSF 现用现加)重悬, 超声 10 s, 间歇 10 s, 共 3 min, 功率 300 W. 加入终浓度为 1% Triton X-100 混匀, 4℃ 离心 13 000 r/min, 10 min, 转移上清到新的 EP 管中, 加入 Ni-NTA 珠子, 4℃ 摇 2~3 h. 离心纯化 His 重组蛋白. 缓冲液 A 洗珠子 3~5 次, 再用缓冲液 E (20 mmol/L HEPES-KOH pH (7.5), 20%甘油, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 10 μ mol/L ZnSO₄ 与 1 mmol/L PMSF 现用现加)洗珠子 3 次. 纯化的结合于 Ni-NTA 珠上的 His 重组蛋白可用于 Pull-down 实验.

1.5.2 GST-MyD88 TIR 的纯化. 诱导表达后的菌体通过离心获得, 加入 800 μ l 细菌裂解液 (20 mmol/L HEPES (pH7.5), 120 mmol/L NaCl, 10%甘油, 2 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF), 重悬, 超声 10 s, 间歇 10 s, 超声 6 次, 功率 300 W. 加入终浓度为 0.5%的 NP-40 混匀, 4℃ 离心 13 000 r/min, 10 min. 转移上清到新的 EP 管中, 加入 50%谷胱甘肽琼脂糖凝胶 4B 珠子在 4℃ 摇床上摇动 1~2 h. 离心纯化 GST 重组蛋白. 先用含有 0.5% NP-40 的裂解液洗涤珠子 3 次, 再用不含 0.5% NP-40 的裂解液洗涤珠子 3 次. 纯化的结合于谷胱甘肽琼脂糖凝胶珠上的 GST 重组蛋白可用于 Pull-down 实验.

1.6 重组蛋白与细胞裂解液的 Pull-down 实验

1.6.1 Jurkat 细胞裂解液制备. 收集 2×10^7 个细胞, 800 μ l 细胞裂解液 (50 mmol/L Tris pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1% Nonidet P-40, 2.5 mmol/L 焦磷酸钠, 10 mmol/L 氟化钠, 1 mmol/L 的 β - 磷酸甘油、直肌酸钠、aprotinin、leupeptin 和 PMSF)充分裂解细胞, 冰上静置 20 min, 13 000 r/min 离心 10 min, 上清移至新的离心管, 准备与结合有 His 融合蛋白或 GST 融合蛋白的琼脂糖珠进行 Pull-down 实验.

1.6.2 His 融合蛋白的 Pull-down. His 融合蛋白每个样本 1 μ g, 先用 GBT 缓冲液 (10% 甘油, 50 mmol/L HEPES-NaOH pH 7.5, 135 mmol/L KCl, 7.5 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100, 1 mmol/L DTT)洗 2~3 次, 再用含 0.5%脱脂奶粉和 0.05%牛血清白蛋白的 GBT 缓冲液封闭 1 h. 上述缓冲液再洗 2~3 次后, 加入细胞裂解液中进行 Pull-down 实验, 4℃ 摇床上摇动 1~2 h.

1.6.3 GST 融合蛋白的 Pull-down 实验.

结合有 GST 融合蛋白的琼脂糖珠用 TEN100 缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl)洗 4 次, 并在 4℃ 平衡 1 h. 上述缓冲液再洗 2~3 次后, 加入细胞裂解液中进行 Pull-down 实验, 4℃ 摇床上摇动 1~2 h.

收集与细胞裂解液作用的琼脂糖珠, 用 100 倍珠子体积的 NETN 缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mmol/L EDTA, 300 mmol/L NaCl, 0.5% NP-40)洗 4 次. 洗后的珠子加上样缓冲液沸水煮 5 min, 免疫印迹法检测目的蛋白.

1.7 重组蛋白体外相互作用分析

首先, 将 GST 融合蛋白从琼脂糖珠上洗脱. 取 0.1 μ g GST-MyD88 TIR 离心吸去上清, 加入等体积的谷氨酰胺洗脱缓冲液 (10 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0), 冰上漩涡振荡 30 min, 离心后吸上清至 500 μ l GBT 缓冲液, 再加入 1 μ g 封闭后的 His 融合蛋白 Ni-NTA 珠, 4℃ 摇床上摇动 2~3 h. GBT 缓冲液洗 2 次, 缓冲液 A 洗 1 次, 缓冲液 E 洗 1 次, 每次于冰上摇动约 5 min. 离心后加入 20 μ l 上样缓冲液, 沸水煮 5 min, 免疫印迹检测 GST 融合蛋白.

2 实验结果

2.1 转染哺乳动物细胞的 GFP-MyD88 TIR 和 RFP-MyD88 TIR 可以发生荧光共振能量转移

我们按图 1 中所示的组合, 将构建好的 GFP-MyD88 TIR、RFP-MyD88 TIR、GFP、RFP 质粒共转染到 HeLa 细胞中. 在 488 nm 激发光下, 共转染 GFP-MyD88 TIR 和 RFP-MyD88 TIR 融合蛋白的细胞 (图 1a)发出昏暗的绿色荧光, 甚至有些细胞还发出橘黄色的光——绿光与红光叠加的效果 (箭头所示). 证明了 GFP 发出的绿色荧光是因为 MyD88 TIR 的二聚化将能量传递给 RFP, 实现了 FRET. 而对照组共转染 GFP-MyD88 TIR 融合蛋白

和空载 RFP 的质粒(图 1b), 或反之, 共转染空载 GFP 和 RFP-MyD88 TIR 融合蛋白的质粒(图 1c), 488 nm 激发光下观察, 细胞显示明亮的绿色荧光. 说明了共转染 GFP-MyD88 TIR 和 RFP 或共转染 GFP 和 RFP-MyD88 TIR 的细胞因为无法形成 MyD88 TIR 的二聚化, 荧光共振能量转移无法发生, 证明了一旦 MyD88 TIR 的二聚化受影响,

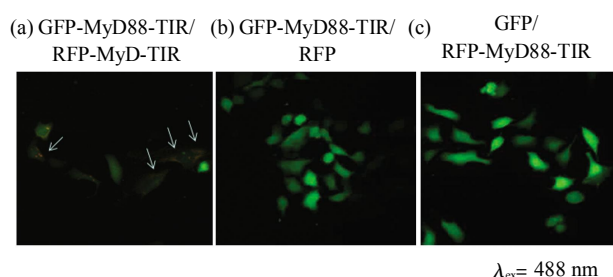


Fig. 1 Dimerization of MyD88 TIR induces the FRET between GFP-MyD88 TIR and RFP-MyD88 TIR

Constructs producing GFP-MyD88 TIR and RFP-MyD88 TIR fusion proteins, or GFP, RFP proteins were transfected into HeLa in the combinations as indicated. Under the excitation at 488 nm, the cells transfected with GFP-MyD88 TIR and RFP-MyD88 TIR plasmids emitted faint green (and even orange) fluorescence (a). Whereas, cells transfected with constructs respectively carrying GFP-MyD88 TIR and RFP (b) or GFP and RFP-MyD88 TIR (c) irradiated bright green fluorescence under the excitation at 488 nm.

488 nm 激发光下 GFP 发射的绿色荧光无法将能量转移给 RFP. 分别转染 GFP-MyD88 TIR 和 RFP 或者是 GFP 和 RFP-MyD88 TIR 的细胞在 488 nm 激发光下发出正常的明亮绿色荧光, 证明了 GFP 和 GFP-MyD88 TIR 绿色荧光的有效性. 所有转染 RFP 或者 RFP-MyD88 TIR 的细胞在 510 nm 激发光下能够发出正常的红色荧光, 进一步证明了 RFP 或者 RFP-MyD88 TIR 红色荧光的有效性(结果图略).

2.2 纯化的 GST-MyD88 TIR 和 His-MyD88 TIR 重组蛋白可以与全细胞裂解物中的内源 MyD88 相互作用

我们又构建了原核表达融合蛋白 GST-MyD88 TIR 和 His-MyD88 TIR 的质粒, 转化大肠杆菌后诱导蛋白质表达(免疫印迹显示重组融合蛋白可以被 MyD88 抗体特异识别, 证明 MyD88 TIR 的正确表达). 再经 GST 珠或 Ni-NTA 琼脂糖珠纯化, 获得与珠子结合的重组融合蛋白, 两种固定的融合蛋白与 Jurkat 细胞的全细胞裂解液作用, 都可以将内源的 MyD88 结合下来(图 2), 说明重组 GST-MD88 TIR 和 His-MyD88 TIR 蛋白保留有野生 MyD88 蛋白 TIR 结构域的二聚化能力, 可用于接下来进行的体外重组 GST-MyD88 TIR 和 His-MyD88 TIR 蛋白的相互作用实验.

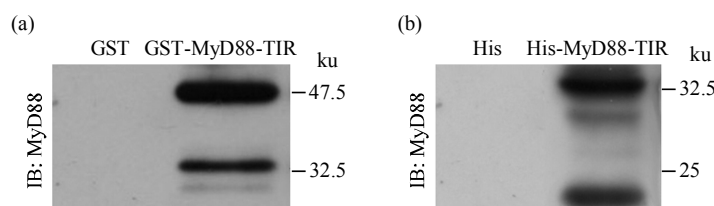


Fig. 2 Recombinant proteins GST-MyD88 TIR and His-MyD88 TIR effectively pull down the endogenous MyD88 from whole cell lysate of Jurkat cells

Recombinant proteins GST-MyD88 TIR and His-MyD88 TIR respectively immobilized on GST beads and Ni-NTA agarose beads were incubated with whole cell lysate of Jurkat cells, the pull-down complexes were subjected to SDS-PAGE and immunoblot with antibody against MyD88. (a) GST-pull-down complex failed to show MyD88 signals, whereas, GST-MyD88 TIR-pull-down complex showed two bands, upper one representing recombinant GST-MyD88 TIR, and lower one representing endogenous MyD88. (b) His-pull-down complex failed to show MyD88 signals, whereas, His-MyD88 TIR-pull-down complex showed two bands, upper one representing endogenous MyD88, and lower one representing recombinant His-MyD88 TIR.

2.3 His-MyD88 TIR 重组蛋白可以与 GST-MD88 TIR 重组蛋白体外相互作用

经纯化结合于 Ni-TNA 珠上的 His-MyD88 TIR

重组蛋白, 与纯化并洗脱后的 GST-MyD88 TIR 重组蛋白或 GST 重组蛋白进行孵育, Ni-NTA 琼脂糖珠结合的蛋白质进行蛋白质电泳和抗 GST 免疫印

迹分析, 结果显示, GST-MD88 TIR 可以被 Ni-NTA 琼脂糖珠结合下来, GST 蛋白却不能, 说明是 MD88 TIR 二聚化介导了 GST-MyD88 TIR 和 His-MyD88 TIR 融合蛋白的体外结合.

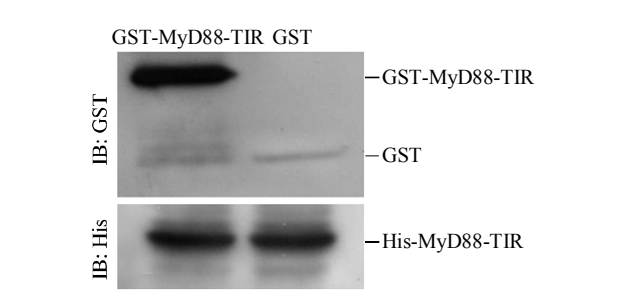


Fig. 3 MyD88 TIR mediated the *in vitro* binding of recombinant proteins GST-MyD88 TIR and His-MyD88 TIR
Immobilized recombinant protein His-MyD88 TIR was incubated with eluate of GST-MyD88 TIR or GST, and the pull-down complexes were subjected to SDS-PAGE and immunol-blot with antibody against GST.

3 讨 论

3.1 基于活细胞原位荧光信号检测筛选模型的建立

荧光共振能量转移(FRET)是一种检测生物大分子间是否存在直接相互作用的实验手段^[15]. 可以外源转染一对目的蛋白基因, 二者分别与一荧光供体和荧光受体蛋白基因(如 GFP/RFP 或 CFP/YFP)融合; 也可以对内源的两种生物大分子进行荧光双

标记, 一种荧光(供体荧光)的发射波长为另一种荧光(受体荧光)的激发波长. 这样, 如果两种生物大分子的距离足够近(一般认为小于 10 nm, 即两种分子直接相互作用的距离), 在供体荧光的激发光照射下可以产生受体荧光的发射光信号. 近年来, FRET 技术常常被用来设计精巧的药物筛选模型, 例如, 荧光蛋白供体 - 受体对(如 CFP-YFP)被构建成融合蛋白质粒, 中间由一段短肽(caspase 酶的作用位点 L/DEVD)连接, 这种质粒转染哺乳动物细胞表达后, caspase 酶如果活化, CFP 和 YFP 分离, FRET 不能实现, caspase 酶活性如被抑制, FRET 可以实现, 从而可以进行 caspase 抑制剂的筛选^[15-18]. 本研究将 MyD88 TIR 分别与 GFP 和 RFP 构建融合蛋白表达质粒, 瞬时转染 HeLa 细胞, 以期检验 MyD88 TIR 的二聚化能否导致 488 nm 激发光诱发的 GFP 绿色荧光实现对 RFP 的能量转移. 结果发现, 很多细胞都能发出橘色荧光(图 1). 这就提示我们, 可以考虑筛选和建立表达强度适当的、双阳性稳定转染细胞株. 没有 MyD88 TIR 二聚化抑制物存在时(图 4a), FRET 可以实现. 在细胞培养基中加入不同的小分子化合物, 如果某些小分子能够阻断 MyD88 TIR 的二聚化, FRET 程度降低或无法实现, 488 nm 激发光下, 发射光就会趋于绿色(图 4b). 荧光供体 / 受体对也可以考虑使用 CFP 和 YFP. 结合高通量筛选设备和相应的计算机函数运算, 可以实现高通量的、活细胞原位荧光信号变化为基础的 MyD88 二聚化抑制剂的筛选.

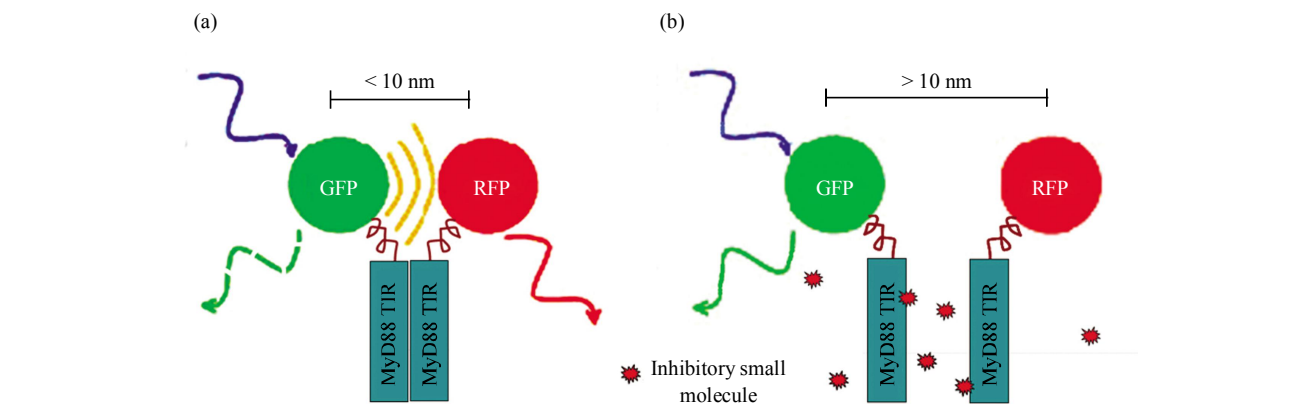


Fig. 4 Schematic interpretation of a FRET-based model for screening anti-inflammation inhibitors acting on the dimerization of MyD88 TIR
Establish the cell line with dual expression of GFP-MyD88 TIR and RFP-MyD88 TIR. (a) In the absence of inhibitors acting on the dimerization of MyD88 TIR, FRET is able to realize. (b) In the presence of inhibitors acting on the dimerization of MyD88 TIR, FRET is impaired.

3.2 基于重组蛋白体外相互作用验证模型的建立

上述活细胞原位荧光模型尚存在一个问题：当 FRET 被某种添加的化合物阻断了，我们还不能得出结论，是这种化合物直接阻断了 MyD88 TIR 的二聚化，还是这种化合物引发了某种胞内信号级联，间接地影响了 MyD88 TIR 的二聚化。针对这一问题，我们设计了一个重组蛋白体外相互作用的验证模型。图 3 所示实验结果提示，利用重组蛋白，进行体外蛋白质-蛋白质相互作用的验证分析具有可行性：在非变性缓冲液中，可以加入上述荧

光筛选模型认为有效阻断 MyD88 二聚化的化合物。如果有抑制物存在时(图 5a)，His-MyD88 TIR 无法凭借 MyD88 TIR 的二聚化将 GST-MyD88 TIR 结合下来，结合物(Pull-down 产物)做 Western blot 分析检测不到 GST 的免疫印迹信号；无抑制物存在时(图 5b)，His-MyD88 TIR 可以凭借 MyD88 TIR 的二聚化将 GST-MyD88 TIR 结合下来，结合物(Pull-down 产物)做 Western blot 分析可以检测到 GST 的免疫印迹信号。

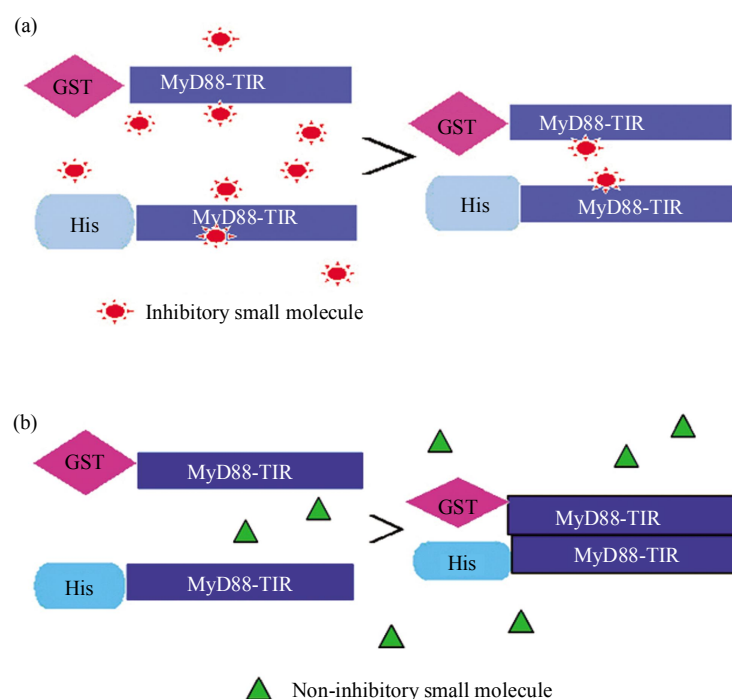


Fig. 5 Schematic interpretation of a recombinant-protein-interaction-based model for verifying the inhibitors directly blocking the interaction of MyD88 TIR

Isolate and purify the immobilized His-MyD88 TIR recombinant protein. Isolate, purify and elude the soluble GST-MyD88 TIR recombinant protein. In a non-denatured condition, if the inhibitor candidates do play the role of blocking the interaction of MyD88 TIR (a). No positive GST signal is being detectable from the complex pulled down by His-MyD88 TIR by Western blot assay; if the inhibitor candidates play no role of blocking the interaction of MyD88 TIR (b). Western blot assay shows the positive GST signal.

经活细胞荧光筛选模型筛选，再经体外重组蛋白验证模型验证，确切的 MyD88 TIR 二聚化抑制剂就可以被确定下来。利用这一模型可以对商品化的小分子库、自行制备的天然产物组分或各种化学合成物、修饰物进行广泛的筛选，从中获得有效的 MyD88 二聚化的抑制性化合物，参与对 MyD88 信号通路依赖的慢性炎症、自身免疫性疾病的药物治疗。

参 考 文 献

- [1] O'Neill L. A. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol Rev*, 2008, **226**(1): 10-18
- [2] 孙 冰, 韩代书. Toll 样受体信号通路的负调控. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(12): 1516-1522
Sun B, Han D S. *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(12): 1516-1522
- [3] O'Neill L A, Bowie A G. The family of five: TIR-domain-

- containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 2007, **7**(5): 353–364
- [4] Watters T M, Kenny E F, O'Neill L A. Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins. *Immunol Cell Biol*, 2007, **85**(6): 411–419
- [5] Lord K A, Hoffman-Liebermann B, Liebermann D A. Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL-6. *Oncogene*, 1990, **5**(7): 1095–1097
- [6] 薛 嫵, 刘琳琳, 贺 芬, 等. IL-18 通过 MyD88 依赖信号途径调控 CSF-1 表达. *生物化学与生物物理进展*, 2011, **38**(4): 311–319
Xue Y, Liu L L, He F, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2011, **38**(4): 311–319
- [7] Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol*, 2004, **16**(1): 3–9
- [8] Leung B P, Culshaw S, Gracie J A, *et al.* A role for IL-18 in neutrophil activation. *J Immunol*, 2001, **167**(5): 2879–2886
- [9] Favilli F, Anzilotti C, Martinelli L, *et al.* IL-18 activity in systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, **1173**: 301–309
- [10] Rothe H, Jenkins N A, Copeland N G, *et al.* Active stage of autoimmune diabetes is associated with the expression of a novel cytokine, IGIF, which is located near Idd2. *J Clin Invest*, 1997, **99**(3): 469–474
- [11] Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res*, 2008, **79**(3): 360–376
- [12] Davis C N, Mann E, Behrens M M, *et al.* MyD88-dependent and -independent signaling by IL-1 in neurons probed by bifunctional Toll/IL-1 receptor domain/BB-loop mimetics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(8): 2953–2958
- [13] Loiarro M, Sette C, Gallo G, *et al.* Peptide-mediated interference of TIR domain dimerization in MyD88 inhibits interleukin-1-dependent activation of NF- κ B. *J Biol Chem*, 2005, **280** (16): 15809–15814
- [14] Loiarro M, Capolunghi F, Fanto N, *et al.* Pivotal Advance: Inhibition of MyD88 dimerization and recruitment of IRAK1 and IRAK4 by a novel peptidomimetic compound. *J Leukoc Biol*, 2007, **82**(4): 801–810
- [15] Mahajan N P, Linder K, Berry G, *et al.* Bcl-2 and Bax interactions in mitochondria probed with green fluorescent protein and fluorescence resonance energy transfer. *Nat Biotechnol*, 1998, **16**(6): 547–552
- [16] Xu X, Gerard A L, Huang B C, *et al.* Detection of programmed cell death using fluorescence energy transfer. *Nucleic Acids Res*, 1998, **26**(8): 2034–2035
- [17] He L, Wu X, Meylan F, *et al.* Monitoring caspase activity in living cells using fluorescent proteins and flow cytometry. *Am J Pathol*, 2004, **164**(6): 1901–1913
- [18] Jones J, Heim R, Hare E, *et al.* Development and application of a GFP-FRET intracellular caspase assay for drug screening. *J Biomol Screen*, 2000, **5**(5): 307–318

Establishment of a Screening Model for The Anti-inflammation Inhibitors Acting on The Dimerization of MyD88 TIR*

ZHAO Yan^{1,2)}, XUE Yan¹⁾, JIANG Xue¹⁾, ZENG Xian-Lu¹⁾, BA Xue-Qing^{1)**}

¹⁾ Institute of Genetics and Cytology, Northeast Normal University, Changchun 130024, China;

²⁾ Jilin Center of Disease Control, Changchun 130062, China)

Abstract MyD88 is an essential adaptor protein that mediates IL-1R/TLR signals. The homogeneous dimerization of MyD88 is required for its recruitment to the membrane receptors and is achieved by the interaction of its C-terminus TIR domain. After binding with the receptor, MyD88 dimer recruits the downstream molecules transmitting the inflammation signals and inducing gene expression. The present study aimed to establish a living-cell-fluorescence-based and high-through-put model for screening the inhibitors against the dimerization of MyD88 TIR. We constructed GFP-MyD88 TIR and RFP-MyD88 TIR plasmids, and transiently transfected them along with GFP or RFP into HeLa cells with different combinations. Under the excitation at 488 nm, the cells transfected with GFP-MyD88 TIR and RFP-MyD88 TIR plasmids showed the energy transfer from GFP to RFP, which is supposed to be mediated by the interaction of MyD88 TIR. Nevertheless, in the cells transfected with GFP-MyD88 TIR and RFP or RFP-MyD88 TIR and GFP plasmids, FRET was obviously impaired due to the absence of MyD88 TIR dimerization. The results suggest a possibility to establish a model for screening the inhibitors against the dimerization of MyD88 TIR: select the cell line that dually expresses GFP-MyD88 TIR and RFP-MyD88 TIR, and monitor the alteration of FRET upon the adding of different compounds in the medium. Additionally, we isolated and purified recombinant proteins His-MyD88 TIR and GST-MyD88 TIR, and performed *in vitro* protein binding assay. This recombinant protein binding assay can be used to verify the inhibitor candidates selected from the fluorescence screening model directly blocking the interaction of MyD88 TIR or not. The fluorescence screening model plus the *in vitro* verifying assay can be broadly used with commercially available compounds banks or lab-made natural products to find effective anti-inflammation inhibitors for therapeutic treatment of MyD88-pathway related chronic inflammation or autoimmune disorders.

Key words MyD88 TIR, dimerization, anti-inflammation inhibitor, screening

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00379

*This work was supported by grants from The Provincial Natural Science Foundation of Jilin (201015108), The Science-Technology Development Project—International Science-Technology Collaboration Foundation (20120728) and The Fundamental Research Funds for Central University (10ZDQD001).

**Corresponding author.

Tel: 86-431-85099317, Fax: 86-431-85098735, E-mail: baxq755@nenu.edu.cn

Received: August 18, 2011 Accepted: November 21, 2011