



基于Nanoluc技术和荧光分析技术建立蛋白质水解靶向嵌合体筛选方法及评价*

刘明秋^{1,2)} 吴波²⁾ 吴正升¹⁾ 张令强^{1,2)**} 崔春萍^{1,2)**}

(¹⁾ 安徽医科大学基础医学院, 合肥 230032; (²⁾ 军事科学院军事医学研究院生命组学研究所, 国家蛋白质科学中心(北京), 北京 102200)

摘要 **目的** 为了从一系列旨在降解靶蛋白的化合物中筛选出高效的蛋白质水解靶向嵌合体 (PROTAC), 本文建立了一个稳定的高通量 PROTAC 筛选方法。**方法** Nanoluc 荧光素酶有 LgBiT 和 HiBiT 两个亚基组成, 通过将 HiBiT 标签与 mCherry (红色荧光蛋白)、目的蛋白、Halo 标签融合表达, LgBiT 与 GFP (绿色荧光蛋白) 融合表达, 利用 GFP 与 mCherry 的共定位情况可直观评价 Nanoluc 荧光素酶的组装情况, 而通过监测 Nanoluc 的活性可以指示目的蛋白的含量。利用慢病毒包装系统构建稳定过表达 GFP-LgBiT 和 HiBiT-mCherry-Target-Halo 的细胞系, 使用可募集 Halo 标签融合蛋白被 Cul2-Rbx1-EloBC-VHL 复合体降解的 HaloPROTAC3 诱导 HiBiT-mCherry-Target-Halo 降解, 进一步利用蛋白质免疫印迹 (Western blot)、Nanoluc 荧光素酶活性分析系统和流式细胞术分别评价 HaloPROTAC3 诱导底物降解的效率。**结果** HaloPROTAC3 高效降解 HiBiT-mCherry-Target-Halo, 并呈现浓度和时间依赖性。**结论** 本文建立了一种联合 Nanoluc 技术和荧光分析的 PROTAC 筛选策略, 用 HaloPROTAC3 作为阳性对照, 可以快速评价 PROTAC 分子使底物蛋白被降解的效率, 实现对 PROTAC 的“优化选择”或者“优中选优”, 为最终 PROTAC 的开发应用提供保障。

关键词 蛋白质水解靶向嵌合体, 降解剂, 筛选, Nanoluc

中图分类号 Q2-33

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0564

蛋白质水解靶向嵌合体 (PROTAC) 是人工构建的一个大分子复合物工具, 它一端是结合泛素连接酶的配体, 另一端是让细胞内目的蛋白 (target) 结合的配体, 中间通过连接链 (linker) 连接。PROTAC 能够诱导目的蛋白被泛素化标记, 后经泛素-蛋白酶体途径降解。该技术利用细胞自身的降解机制使致病蛋白质发生降解, 可作为癌症、自身免疫疾病和神经系统疾病等的一种新型治疗方法, 拥有巨大的应用前景^[1-6]。传统小分子化合物通过占据目的蛋白活性区域, 抑制蛋白质的功能, 而不含有蛋白质结合活性区域的蛋白质靶点被认为是“不可成药的靶点”或“难成药靶点”, 如转录因子、支架蛋白等^[7-10]。与传统小分子药物不同的是, PROTAC 药物不需要与致病靶点紧密、长时间结合, 具有降解“不可成药”靶点的优势。据 Arvinas 公司估计, 目前的“不可成药”靶点中有 80% 的靶点可以被 PROTAC 分子靶向。此外, PROTAC 这一技术具有底物选择性、组织特异性和

克服耐药性等一系列优点, 受到了学术界和工业界的广泛关注^[8, 11-12]。但是, 目前 PROTAC 的反复迭代与优化主要基于经验进行, 针对新靶点开发 PROTAC 很大程度上依赖于大量的化合物合成与高通量的筛选策略, 因此稳定、高通量的筛选策略是 PROTAC 开发成功的必要条件。

Nanoluc 是一个经过基因工程改造的生物发光报告基因, 其蛋白质产物 (Nanoluc® 萤光素酶) 能够与新型底物——furimazine 作用, 产生高强度、辉光型发光信号。该类生物发光反应不依赖 ATP, 自发光背景低, 光信号更强, 同时抑制背景发光以获得最高检测灵敏度^[13-14]。NanoBiT (Nanoluc

* 国家重点研发计划 (2021YFA1300200) 和国家自然科学基金 (82192884) 资助项目。

** 通讯联系人。

崔春萍 Tel: 13671215785, E-mail: cui_chunping2000@aliyun.com

张令强 Tel: 18611681275, E-mail: zhanglq@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2022-12-13, 接受日期: 2023-03-06

binary technology) 技术将 Nanoluc 萤光素酶重组表达成两部分肽段,一部分为 LgBiT (18 ku),另一部分为 1.3 ku 的肽段 (SmBiT)。在对小肽段研究过程中,发现不同序列的 1.3 ku 肽段对于 LgBiT 的亲合力存在差别。与 LgBiT 具有极强亲和作用的肽段,被命名为 HiBiT (11 aa 的小亚基)。HiBiT 标签可以方便构建到目的蛋白的 N 端、C 端或者中间的任何位置。如果将融合 HiBiT 标签的靶蛋白与 LgBiT 共表达,由于 HiBiT 与 LgBiT 具有很强的亲合力,可自发互补结合,形成具有催化活性的 Nanoluc® 萤光素酶,在底物存在的情况下,可产生明亮的发光信号。发光信号强度与 HiBiT 标签结合蛋白在细胞中的含量成正比,线性范围超过 7 个数量级,在数小时内均可产生稳定的辉光型信号。如果在产生发光信号的细胞中加入靶蛋白的 PROTAC,就可以诱导靶蛋白的降解,并利用萤光素酶系统检测到化学发光信号的降低^[15-16]。

由于 Nanoluc® 萤光素酶的活性依赖于 HiBiT 融合蛋白与 LgBiT 的组装效率,如果采用瞬时转染的方法,质粒的质量、转染条件(转染比例和转染试剂)、实验批次都会影响细胞内 Nanoluc® 萤光素酶的活性,进而对筛选平台的建立及后续的筛选产生很大的影响。由于 Nanoluc® 萤光素酶的活性非常高,初始筛选过程中,如果 PROTAC 的活性不足够高,可能会漏掉一些具有潜力的 PROTAC 分子。另外,以往建立的基于 HiBiT 标签筛选技术往往缺少评价标准,不能很好指示新筛选 PROTAC 的降解效率。

为了建立更为稳定可靠的基于 HiBiT 标签的高通量蛋白质降解筛选技术,本文将 LgBiT 融合绿色荧光蛋白 GFP,将 HiBiT 融合红色荧光蛋白 mCherry 和 Target,然后构建了稳定过表达 GFP-LgBiT 和 HiBiT-mCherry-Target-Halo 的细胞系,建立了一种联合 Nanoluc 和荧光分析的降解剂筛选平台。通过观测 GFP 与 mCherry 的共定位情况,可以直观评价 Nanoluc® 萤光素酶的组装情况,后期还可通过流式细胞术评价 PROTAC 诱导底物降解的效率。HaloPROTAC3 是 Promega 公司推出的一个可募集 HaloTag® 标签融合蛋白与 Cul2-Rbx1-EloBC-VHL 复合体的 PROTAC 分子,可诱导 HaloTag® 标签融合蛋白被细胞内源 VHL (von Hippel-Lindau) 泛素连接酶降解^[17]。通过使用 HaloPROTAC3 诱导靶蛋白降解,进一步利用蛋白质免疫印迹 (Western blot) 和报告基因分析系统分别评价

HaloPROTAC3 诱导底物降解的效率。综合分析,本文初步建立了 PROTAC 的筛选平台,通过以 HaloPROTAC3 作为阳性对照,可以预期从针对靶蛋白的化合物库中筛选到高效降解底物蛋白的降解剂。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与耗材

氨苄西林、二甲基亚砷、二硫苏糖醇 (1,4-dithiothreitol, DTT) 购自 Aladdin 公司;白色 96 孔细胞培养板购自碧云天公司;青霉素-链霉素双抗购自 Hyclone 公司;Opti-MEM®I 低血清培养基、0.05% 胰蛋白酶/EDTA、嘌呤霉素 (puromycin)、潮霉素 (hygromycin) B 溶液、1640 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶购自 Gibco 公司;蛋白胨、琼脂粉、酵母粉购自 Oxide 公司;Nano-Glo® Endurazine™ Live Cell Substrate (N2570), HaloPROTAC3 (GA3110) 购自 Promega 公司。

感受态 DH5α、PCR mix、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、同源重组试剂盒购自擎科生物;细胞培养用 DMSO 购自 Sigma Aldrich 公司。

1.1.2 仪器

GloMax® Discover System, 型号: GM3000;超高分辨率共聚焦显微镜:德国 Carl Zeiss 公司;超净工作台:北京德天佑科技发展有限公司;台式高速离心机:德国 Eppendorf 公司;台式低温高速离心机:德国 Heraeus 公司;PCR 仪:美国 BIO-RAD 公司;pH 计:美国 ORION 公司;SDS-PAGE 电泳仪:美国 Bio-RAD 公司;X 射线摄影暗盒:广东粤华医疗器械有限公司;CO₂ 培养箱:德国 Heraeus 公司;倒置显微镜:日本 OLYMPUS 公司;凝胶电转移装置:美国 Bio-RAD 公司;报告基因检测仪:Turner biosystems 公司;FACS Calibur 流式细胞仪:美国 Becton-Dickinson 公司;图像分析仪 (desitometer GS710):美国 Bio-RAD 公司。

1.2 方法

1.2.1 载体构建

LgBiT 序列由擎科公司合成,通过同源重组的方式连接入 eGFP-N1 载体,LgBiT-eGFP 进一步通过同源重组的方式连接入 pQCXI 慢病毒载体 (Invitrogen);HiBiT 序列为 GTGAGCGGCTGGCG-GCTGTTCAAGAAGATTAGC,Flag 标签分别被设计到 PCR 的引物中,与 mCherry 序列同源重组的方

式连接入pCDH-MCS-T2A-Puro-MSCV (CD522A-1) 载体 (Invitrogen), 构建表达 HiBiT-mCherry 的慢病毒载体, Halo 序列克隆自 pFN18a-His-HALO, 与 Target 序列进一步同源重组构建入上述载体, 构建表达 HiBiT-mCherry-Target-Halo 的慢病毒载体, HiBiT-mCherry-Target-Halo 载体突变缺失 HiBiT 后获得 mCherry-Target-Halo 慢病毒载体, 各引物序列如表 1 所示。

Table 1 Primer sequence

Name	Sequence
LgBiT	Forward: CAGATCTCGAGCTCAAGCTTATGGTCTTCACACTCGAA Reverse: GGATCCCGGGCCCGCGGTACCGTGTGTGATGGTTACTC
LgBiT-GFP	Forward: GTACGCTTAATTAACGGATCCATGGTCTTCACACTCGA Reverse: GGGGGGCGGAATCCGGATCCTTACTTGTACAGCTCGT
Flag-HiBiT	Forward: GATACTAGAGCTAGAGCTAGCATGGACTACAAAGACGATGACG ACAAGCTTGTGAGCGGCTGGCG Reverse: CTCCTCGCCCTTGCTCACAGAATTCGCGCTAATCTTCTTGAACA GCCGCCAGCCGCTCAC
mCherry	Forward: GCTGTTCAGAAGATTAGCGCAATTCTGTGAGCAAGGGCGAGG Reverse: ACTTCCTCTGCCCTCAGCGGCCGCTTGTACAGCTCGTCCAT
Halo	Forward: TGGACGAGCTGTACAAGGCGCCGCTATGATGAAGAAGAACAAT Reverse: ACTTCCTCTGCCCTCAGCGGCCGCGGAAATCTCCAGAGTA
ΔHiBiT	Forward: AGACGATGACGACAAGCTTGCGAATTCTGTGAGCAAGGGC Reverse: GCCCTTGCTCACAGAATTCGCAAGCTTGTGTCATCGTCTTT

1.2.2 慢病毒包装与细胞稳定株筛选

- a. 将目的基因构建到相应的慢病毒载体上;
- b. 将构建好的慢病毒载体与病毒包装载体 psPAX2 (Addgene, 12260), pMD2.G (Addgene, 12259) 按照 4 : 3 : 1 比例转染过夜贴壁培养的 HEK293T 细胞;
- c. 转染 24 h 和 48 h 后各收集一次病毒上清作为病毒液。0.45 μm 滤器过滤后测定感染复数 (multiplicity of infection, MOI), 超滤管浓缩后储存;
- d. 使用 LgBiT-GFP 病毒液, 感染 HEK293T 细胞 24 h, 加入 hygromycin 筛选 1 周, 荧光显微镜下观测到细胞表达绿色荧光蛋白, 维持 hygromycin 浓度为 250 mg/L 继续培养;
- e. 进一步使用 Flag-HiBiT-mcherry/Flag-HiBiT-mcherry-Target-Halo 病毒液, 感染 24 h 后加入 puromycin (1 mg/L) 筛选 1 周, 通过荧光显微镜和 Western blot 实验验证目的蛋白表达。

1.2.3 Western blot

- a. 以恒压 160 V 进行 SDS 凝胶电泳约 1 h, 电泳后将凝胶取下;
- b. 将凝胶上的蛋白质电转至硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上 (150 mA, 根据目的蛋白的大小不同, 电转时间也不同);

- c. 将 NC 膜转移至封闭液 (50 g/L 的脱脂牛奶 TBST 溶液) 室温封闭 1 h;
- d. 加入 HRP 标记的小鼠二抗体 (抗体稀释比例为 1 : 4 000), 温室孵育 1 h;
- e. 1×TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min;
- f. 采用化学发光法检测, 利用显影液和定影液显示胶片上的蛋白质印记。

1.2.4 共聚焦分析定位

- a. 稳定转染细胞系使用 Hoechst 33342 (10 mg/L) 染色 15 min, PBS 洗 5 min, 重复 1 次;
- b. 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗 5 min, 重复 2 次;
- c. 共聚焦显微镜下拍照。

1.2.5 Endurazine™ Live Cell Substrate处理和检测

- a. 在白色 96 孔组织培养板 (碧云天, FCP968) 中将表达 NanoBiT® 萤光素酶的细胞铺板;
- b. 将含有细胞的孔板放入 37℃、5% CO₂ 培养箱, 过夜孵育;
- c. 将 Endurazine™ 在细胞培养基中稀释 100 倍, 通过换液的方式加入到细胞, 在 37℃ 下孵育 1~2 h, 以在培养基中积累底物 (furimazine), 添加测试化合物并使用 GloMax® Discover System 设置不同时间点进行跟踪检测;
- d. 实验中设置溶剂对照用于归一化或比较。

1.2.6 流式细胞术分析

a. 细胞重悬：细胞处理计数后，用细胞洗液（含2% BSA的PBS）重悬细胞；

b. 对照设置：空白对照（未加 HaloPROTAC3）、同型对照（加 HaloPROTAC3 的 GFP-LgBiT+HiBiT-mCherry）、待测样本（加 HaloPROTAC3 的 GFP-LgBiT+HiBiT-mCherry-Target-Halo）每管取 100 μ l 上述重悬的细胞；

c. 上机检测：先测空白管和同型对照管，再测待测管；

d. 流式细胞术分析结果使用 Flowjo_v10.8.1 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 慢病毒过表达载体的构建

为了构建联合 Nanoluc 和荧光分析筛选靶蛋白

降解剂的细胞系，将 GFP 与 LgBiT 融合表达，构建入具有 hygromycin 筛选标记的 pQCXIH 慢病毒载体，将 HiBiT 与 mCherry-Target-Halo 融合表达构建入具有 puromycin 筛选标记的 pCDH-MCS-T2A-Puro-MSCV 慢病毒载体，同时构建了分别表达 HiBiT-mCherry 和 mCherry-Target-Halo 的慢病毒载体作为平行对照（图 1）。通过转染在 HEK293T 中将慢病毒载体瞬时过表达，激光共聚焦分析蛋白质表达的定位情况，发现 HiBiT-mCherry-Target-Halo 在细胞膜上特异性表达，LgBiT-GFP 呈现出较好的膜聚集情况，且与 HiBiT-mCherry-Target-Halo 呈现共定位；缺失 HiBiT 的 mCherry-Target-Halo 仍然在细胞膜上特异性表达，但 LgBiT-GFP 不能被募集，且不与 HiBiT-mCherry-Target-Halo 呈现共定位（图 2）。说明融合 HiBiT 的 mCherry-Target-Halo 可以很好地与 LgBiT-GFP 共定位。

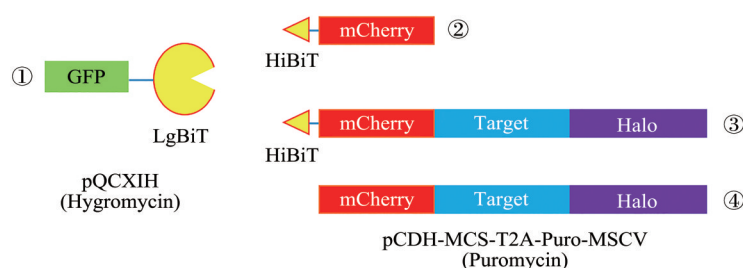


Fig. 1 Schematic diagram of the vector

① The pQCXIH vector with GFP and LgBiT; ② the pCDH-MCS-T2A-Puro-MSCV vector with mCherry and HiBiT; ③ the pCDH-MCS-T2A-Puro-MSCV vector with mCherry-Target-Halo and HiBiT; ④ the pCDH-MCS-T2A-Puro-MSCV vector with mCherry-Target-Halo.

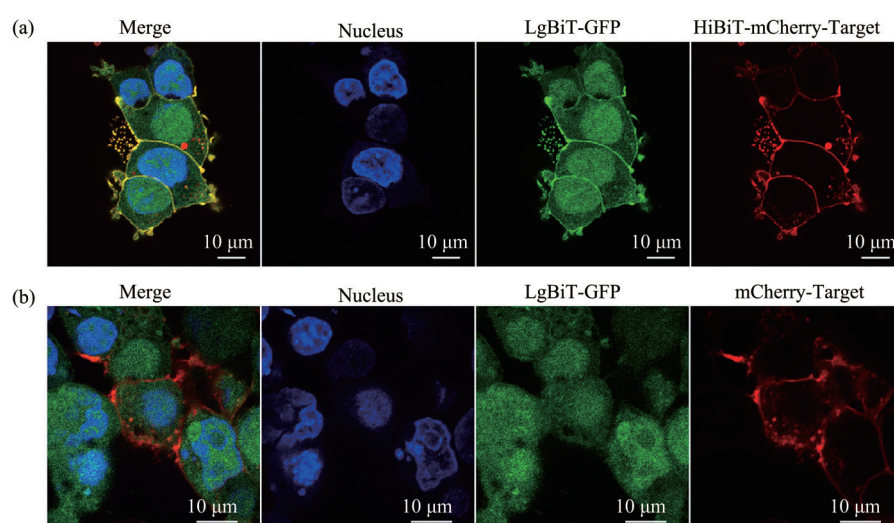


Fig. 2 Co-localization analysis of HiBiT-mCherry-Target-Halo and LgBiT-GFP

(a) Co-localization of HiBiT-mCherry-Target-Halo and LgBiT-GFP. (b) Without HiBiT tag, mCherry-Target-Halo no longer recruits LgBiT-GFP.

随后, 为了检测所构建的双载体表达系统能否在细胞内组装成具有活性 Nanoluc® 萤光素酶, 将 LgBiT-GFP 或/和融合 HiBiT 的不同载体转染入 HEK293T 细胞, 通过添加 Endurazine™ 底物检测所转染细胞的萤光素酶活性, 发现共转 LgBiT-GFP 和融合 HiBiT 标签载体的细胞能够产生百万级别的信号值 (Luminescence), 而单转 LgBiT-GFP 载体或融合 HiBiT 标签载体, 以及共转 LgBiT-GFP 和缺失

HiBiT 标签载体的细胞所产生的信号值非常低 (信号值 100 左右) (图 3a)。进一步检测不同时间点、LgBiT-GFP 和 HiBiT-mCherry-Target-Halo 共表达细胞的萤光素酶活性, 发现 Endurazine™ 底物可以稳定持续检测细胞内萤光素酶活性长达 36 h (图 3b)。以上结果说明, 利用双表达载体成功建立了含有双荧光标签且具有 Nanoluc 萤光素酶活性的细胞。

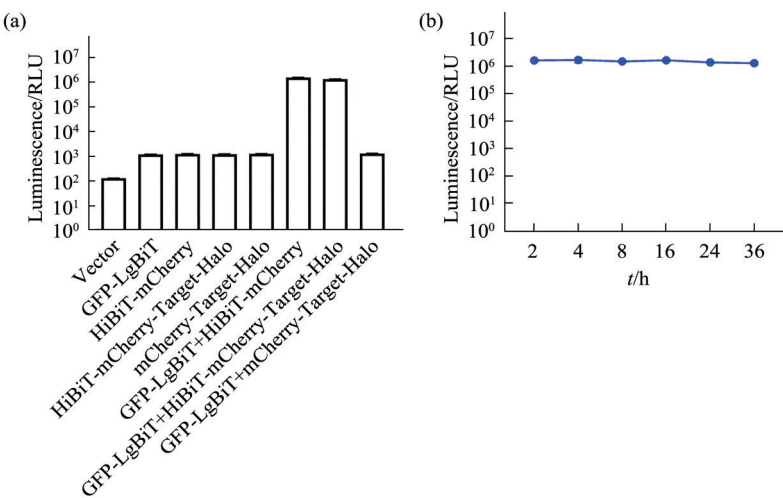


Fig. 3 Luciferase activity detected by reporter gene analysis system

(a) The plasmid was transfected into HEK293T cells for 24 h, and Endurazine™ substrate was added to detect chemiluminescence. (b) The chemiluminescence of LgBiT-GFP and HiBiT-mCherry-Target-Halo co-transfected cells was detected at different time points.

2.2 稳定细胞系的构建

Nanoluc 分析系统具有敏感度高的优点, 发光信号强度与 HiBiT 标签结合蛋白在细胞中的含量成正比。稳定的起始 HiBiT 标签结合蛋白浓度是大容量化合物库中筛选高效降解剂的前提, 但是通过质粒瞬时转染细胞的方式, 难以控制不同批次间的蛋白质表达情况, 对于降解剂的筛选非常不利。因此本文采取慢病毒感染的方式首先构建了稳定过表达 GFP-LgBiT 的细胞株 (图 4); 随后在该细胞株中进一步感染稳定过表达 HiBiT-mCherry-Target-Halo 的病毒, 最终建立了同时稳定过表达 GFP-LgBiT 和 HiBiT-mCherry、GFP-LgBiT 和 HiBiT-mCherry-Target-Halo 的细胞株, 并通过测定萤光素酶活性和 Western blot 验证了细胞系的构建情况 (图 5)。

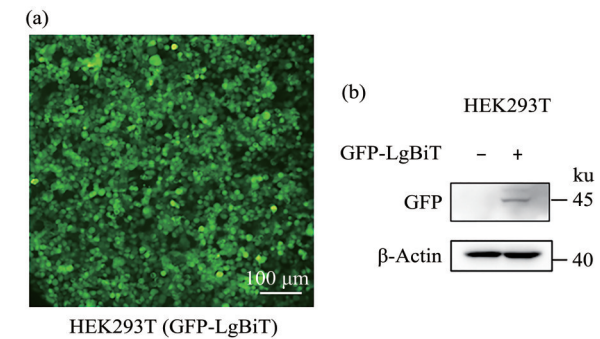


Fig. 4 Construction and expression verification of GFP-LgBiT stable transfer cell lines

(a) The green fluorescence of stable GFP-LgBiT in HEK293T was observed under the fluorescence microscope. (b) Western blot analysis was performed to verify the expression of GFP-LgBiT in HEK293T (GFP-LgBiT) stable cell lines.

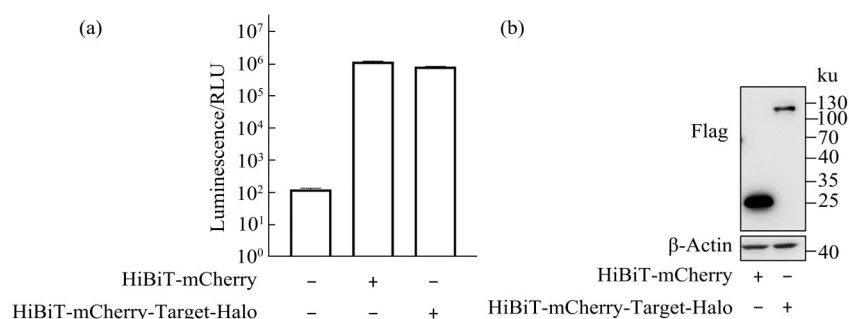


Fig. 5 Expression verification of Target proteins in GFP-LgBiT+HiBiT-mCherry, GFP-LgBiT+ HiBiT-Mcherry-Target-Halo stable cell lines

(a) Chemiluminescence detection; (b) Western blot analysis was performed to verify the expression of Target proteins in HEK293T (GFP-LgBiT+ HiBiT-mCherry) and HEK293T (GFP-LgBiT+ HiBiT-mCherry-Target-Halo) stable cell lines.

2.3 HaloPROTAC3诱导底物降解/筛选平台的检测

为了检测所构建的细胞系能否用来筛选降解剂,使用成熟的HaloPROTAC3分子对所构建的细胞株进行检测。HaloPROTAC3一端识别VHL,一端识别Halo标签,可以通过介导内源性VHL E3连接酶组分泛素化HaloTag融合蛋白,通过泛素化-蛋白酶体途径降解^[17]。结果发现,HaloPROTAC3呈

现浓度和时间依赖地高效降解HiBiT-mCherry-Target-Halo,但并不降解HiBiT-mCherry(图6)。通过化学发光检测细胞内的荧光素酶活性进一步证实了HaloPROTAC3呈现浓度和时间依赖地高效降解HiBiT-mCherry-Target-Halo(图7)。随后,使用流式细胞术检测了HaloPROTAC3处理前后的HEK293T(GFP-LgBiT+HiBiT-mCherry)和HEK293T(GFP-LgBiT+HiBiT-mCherry-Target-Halo)细胞系,结果

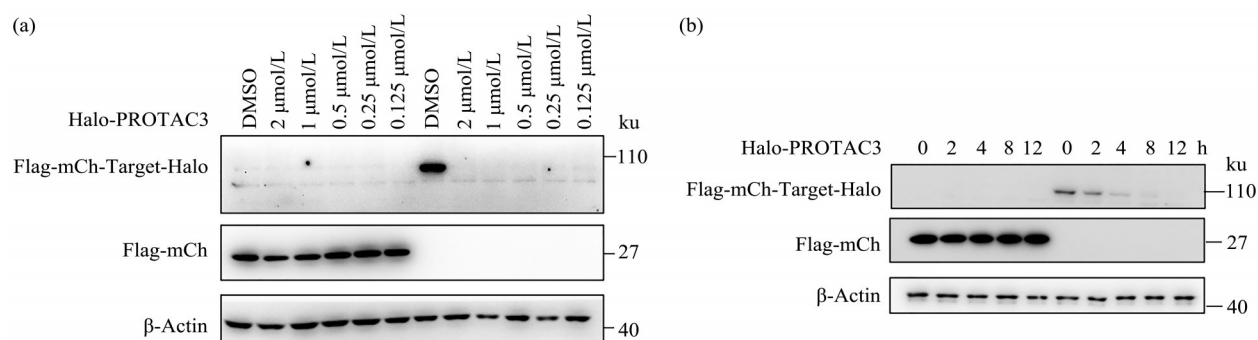


Fig. 6 Western blot analysis of HaloPROTAC3 induced degradation of HiBiT-mCherry-Target-Halo

(a) HaloPROTAC3 specifically induces the degradation of HiBiT-mCherry-Target-Halo protein in a concentration-dependent manner; (b) HaloPROTAC3 specifically induces the degradation of HiBiT-mCherry-Target-Halo protein in a time-dependent manner.

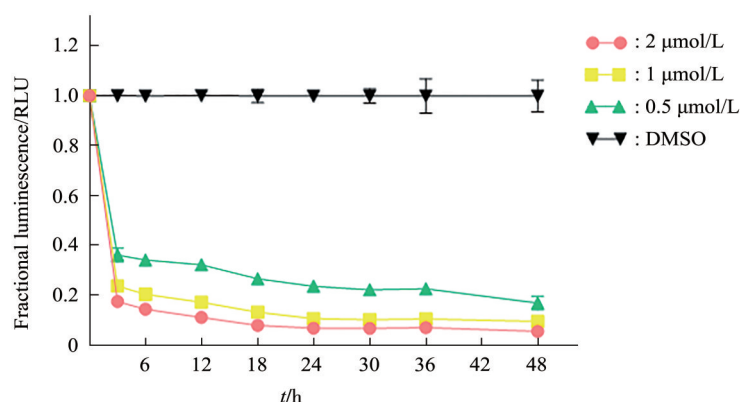


Fig. 7 Chemiluminescence detection of HaloPROTAC3-induced degradation of HiBiT-mCherry-Target-Halo

发现, HaloPROTAC3 处理不影响两株细胞绿色荧光的平均荧光强度, 也不影响 HEK293T (GFP-LgBiT+HiBiT-mCherry) 红色荧光的平均荧光强度

度, 而是特异性地下调 HEK293T (GFP-LgBiT+HiBiT-mCherry-Target-Halo) 细胞红色荧光的平均荧光强度 (图8)。

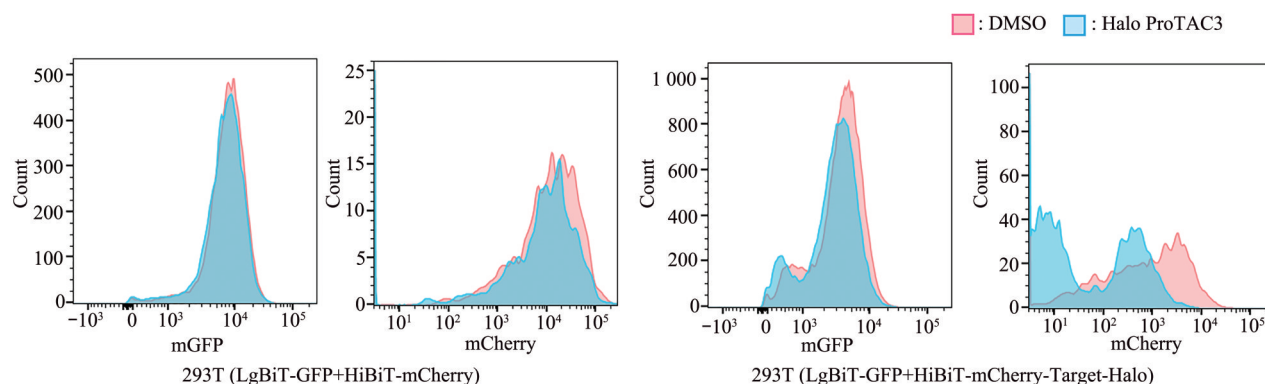


Fig. 8 HaloPROTAC3-induced degradation of HiBiT-mCherry-Target-Halo was detected by flow cytometry

3 讨 论

近年来, 小分子化合物的研发受到蛋白质靶点的限制, 而 PROTAC 技术作为革命性的药物开发手段倍受青睐^[2, 5-6, 8, 11]。随着蛋白质组学、测序技术、组合化学等技术的发展, PROTAC 的发现标准流程也必将产生深远的变化^[18]。目前 E3 连接酶及其配体的发现远远落后于 PROTAC 分子的开发进度, 当前仅 VHL 和 脑苷脂 (cereblon, CRBN) 得以广泛使用。PROTAC 活性中间体三元复合物的形成需要与靶蛋白结合力强的小分子抑制剂, 而由于难成药靶点 (如转录因子、支架蛋白) 缺乏高亲和力配体, 开发降解此类靶点的 PROTAC 也十分困难。因此现今开发成熟并处于临床 II 期的 PROTAC ARV-110 和 ARV-471 都是基于成熟的靶点进行的开发, 尚未发挥出 PROTAC 靶向的优势^[19]。

目前, PROTAC 的设计与筛选是开发 PROTAC 药物的两大瓶颈。PROTAC 的前期设计方面, 计算机模拟如 AlphaFold、ProsettaC、动力学模拟等发展迅速, 而结构生物学技术 (X-Ray、冷冻电镜等) 将为三元复合物的结构与 PROTAC 的前期设计提供更多的理解^[18, 20-21]。PROTAC 的筛选方面, 由于针对新靶点开发的 PROTAC 很大程度上依赖于大量的化合物合成, 而目前公认的金标准是蛋白质免疫印迹 (Western blot) 技术。该策略耗时费力, 难以应用到大容量化合物库的筛选过程。其他的筛选策略还包括基于亲和力的策略 (如表面等离

子共振技术 (SPR)、荧光极化亲和力筛选技术 (FP) 等), 以及基于三元复合物形成的筛选策略 (如 Alpha screen), 但是这些策略依赖于蛋白质的体外表达纯化, 操作比较麻烦, 而且 PROTAC 本身分子质量比较大, 经过体外筛选阳性的化合物未必能够很好的进入细胞发挥降解作用^[14, 22]。而基于 HiBiT 标签的蛋白质降解筛选技术以蛋白质降解为终点检测指标, 操作简单, 灵敏度高, 且该方法支持在同一细胞系中进行筛选和蛋白质降解动力学研究, 易于后期的数据整理和比较, 是高通量 PROTAC 筛选的理想策略。

4 结 论

本研究构建了稳定过表达 GFP-LgBiT 和 HiBiT-mCherry-Target-Halo 的细胞系, 建立了一种联合 Nanoluc 和荧光分析的降解剂筛选策略。利用 HaloPROTAC3 诱导靶蛋白降解, 进而使用 Western blot、报告基因分析系统和流式细胞术分别评价 HaloPROTAC3 诱导底物降解的效率。通过以 HaloPROTAC3 为阳性对照, 可以快速甄别化合物库中 PROTAC 诱导底物蛋白降解的效率, 实现“优化选择”或者“优中选优”, 为最终 PROTAC 的开发应用提供保障。后期还可以根据需求替换 Target 的序列, 建立相应的 PROTAC 筛选平台, 通过以 HaloPROTAC3 作为阳性对照, 可以预期从针对靶蛋白的化合物库中筛选到高效降解底物蛋白的降解剂。

参 考 文 献

- [1] Lai A C, Crews C M. Induced protein degradation: an emerging drug discovery paradigm. *Nat Rev Drug Discovery*, 2017, **16**(2): 101-114
- [2] Cromm P M, Crews C M. Targeted protein degradation: from chemical biology to drug discovery. *Cell Chem Biol*, 2017, **24**(9): 1181-1190
- [3] Bekes M, Langley D R, Crews C M. PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue. *Nat Rev Drug Discovery*, 2022, **21**(3): 181-200
- [4] Cao C, He M, Wang L, *et al.* Chemistries of bifunctional PROTAC degraders. *Chem Soc Rev*, 2022, **51**(16): 7066-7114
- [5] He M, Cao C, Ni Z, *et al.* PROTACs: great opportunities for academia and industry (an update from 2020 to 2021). *Signal Transduction Targeted Ther*, 2022, **7**(1): 181
- [6] Sun X, Gao H, Yang Y, *et al.* PROTACs: great opportunities for academia and industry. *Signal Transduction Targeted Ther*, 2019, **4**: 64
- [7] Imming P, Sinning C, Meyer A. Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. *Nat Rev Drug Discovery*, 2006, **5**(10): 821-834
- [8] Samarasinghe K T G, Crews C M. Targeted protein degradation: a promise for undruggable proteins. *Cell Chem Biol*, 2021, **28**(7): 934-951
- [9] Henley M J, Koehler A N. Advances in targeting ‘undruggable’ transcription factors with small molecules. *Nat Rev Drug Discovery*, 2021, **20**(9): 669-688
- [10] Cromm P M, Samarasinghe K T G, Hines J, *et al.* Addressing kinase-independent functions of fak *via* PROTAC-mediated degradation. *J Am Chem Soc*, 2018, **140**(49): 17019-17026
- [11] Pettersson M, Crews C M. Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) - past, present and future. *Drug Discovery Today Technol*, 2019, **31**: 15-27
- [12] Zeng S, Huang W, Zheng X, *et al.* Proteolysis targeting chimera (PROTAC) in drug discovery paradigm: recent progress and future challenges. *Eur J Med Chem*, 2021, **210**: 112981
- [13] Hall M P, Unch J, Binkowski B F, *et al.* Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS Chem Biol*, 2012, **7**(11): 1848-1857
- [14] Liu X, Zhang X, Lv D, *et al.* Assays and technologies for developing proteolysis targeting chimera degraders. *Future Med Chem*, 2020, **12**(12): 1155-1179
- [15] Riching K M, Mahan S, Corona C R, *et al.* Quantitative live-cell kinetic degradation and mechanistic profiling of PROTAC mode of action. *ACS Chem Biol*, 2018, **13**(9): 2758-2770
- [16] Schwinn M K, Machleidt T, Zimmerman K, *et al.* CRISPR-mediated tagging of endogenous proteins with a luminescent peptide. *ACS Chem Biol*, 2018, **13**(2): 467-474
- [17] Buckley D L, Raina K, Darricarrere N, *et al.* HaloPROTACS: use of small molecule PROTACs to induce degradation of HaloTag fusion proteins. *ACS Chem Biol*, 2015, **10**(8): 1831-1837
- [18] Bond M J, Crews C M. Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) come of age: entering the third decade of targeted protein degradation. *RSC Chem Biol*, 2021, **2**(3): 725-742
- [19] Schneider M, Radoux C J, Hercules A, *et al.* The PROTACtable genome. *Nat Rev Drug Discovery*, 2021, **20**(10): 789-797
- [20] Weng G, Shen C, Cao D, *et al.* PROTAC-DB: an online database of PROTACs. *Nucleic Acids Res*, 2021, **49**(D1): D1381-D1387
- [21] Paiva S L, Crews C M. Targeted protein degradation: elements of PROTAC design. *Curr Opin Chem Biol*, 2019, **50**: 111-119
- [22] Zorba A, Nguyen C, Xu Y, *et al.* Delineating the role of cooperativity in the design of potent PROTACs for BTK. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, **115**(31): E7285-E7292

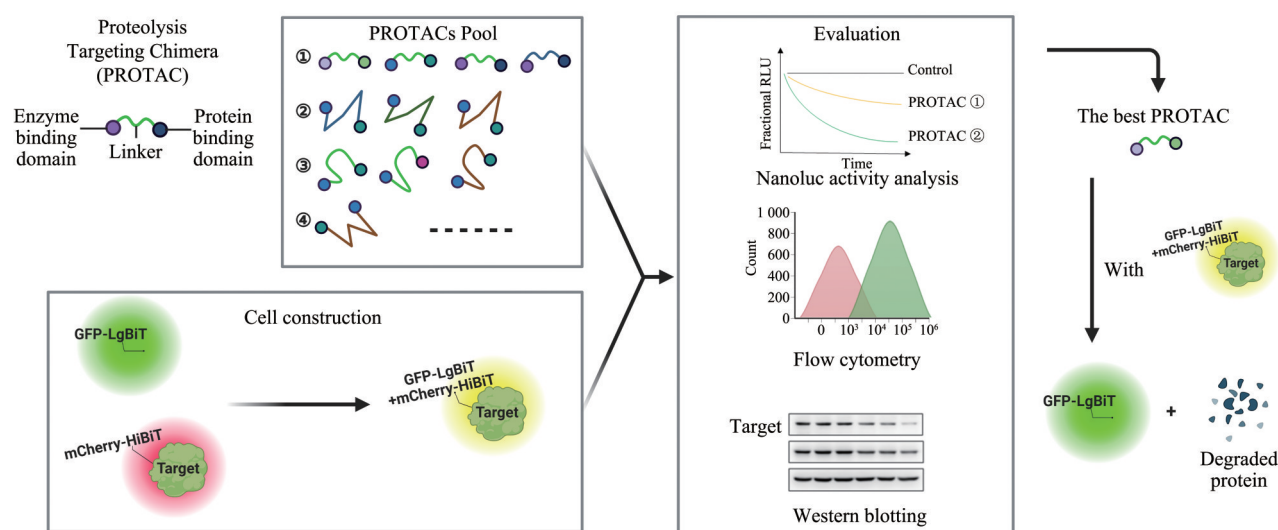
PROTAC Screening Method and Evaluation Based on Nanoluc and Fluorescence Analysis Techniques*

LIU Ming-Qiu^{1,2)}, WU Bo²⁾, WU Zheng-Sheng¹⁾, ZHANG Ling-Qiang^{1,2)**}, CUI Chun-Ping^{1,2)**}

¹⁾School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032, China;

²⁾Institute of Biomimetics, Academy of Military Medicine, Academy of Military Sciences, National Center for Protein Science (Beijing), Beijing 102200, China)

Graphical abstract



Abstract Objective To screen efficient PROTAC from a bound of compounds designed to degrade a specific target, we established a stable and high-throughput screening system. **Methods** The two subunits of Nanoluc, HiBiT and LgBiT, was fused with mCherry-target-Halo and GFP, respectively. Colocalization of mCherry and GFP indicates the well-assembly of Nanoluc, and the activity of Nanoluc reflects the amount of target protein directly. Stable cell lines overexpressing HiBiT-mCherry-Target-Halo and GFP-LgBiT were constructed using lentivirus packaging systems. HaloPROTAC3, which recruits Halo tagged protein to Cul2-Rbx1-EloBC-VHL Ubiquitin Ligase Complex, was used to induce the degradation of Halo tag fused target protein. Western blot, Nanoluc activity analysis, and flow cytometry were used to evaluate the degradation efficiency of HaloPROTAC3. **Results** HaloPROTAC3 induce the degradation of HiBiT-mCherry-Target-Halo effectively in a time and concentration dependent manner. **Conclusion** A novel strategy combined with Nanoluc and fluorescence analysis for PROTAC screening was developed. With HaloPROTAC3 as a positive control, the strategy provides a guarantee for the optimal development and application of PROTAC.

Key words PROTAC, degrader, screen, Nanoluc

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0564

* This work was supported by grants from National Key Research and Development Project of China (2021YFA1300200) and The National Natural Science Foundation of China (82192884).

** Corresponding author.

CUI Chun-Ping Tel: 86-13671215785, E-mail: cui_chunping2000@aliyun.com

ZHANG Ling-Qiang Tel: 86-18611681275, E-mail: zhanglq@nic.bmi.ac.cn

Received: December 13, 2022 Accepted: March 6, 2023