

行酶学分析、免疫沉淀、质谱分析、GST pull down 验证,从而找到未知底物。

【材料】 大肠杆菌 pNPP 分子筛 PCR 试剂 浓缩柱 酶标板 多肽底物等。

【可行性】 (1)已探索出一种 PPM1A 的突变体,对底物的特异性和亲和力不变,但催化活性很弱。(2)已表达纯化出 PPM1D 和 PPM1G 的部分突变体,并进行了酶学分析。

【创新性】 (1)揭示 PPM1A 最基本的催化机制与酶学特性;(2)首次在丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶家族中提出底物陷阱分子技术,在未来科研与临床应用中拥有广阔的前景。

关键词: 底物陷阱技术;催化机制;PPM1A;PPM1D;PPM1G

B-S2-31

虚拟筛选淋巴酪氨酸磷酸酶抑制剂

王闯博¹,李康帅²,潘畅³;指导教师:于晓

1. 山东大学 2010 级临床医学七年制

2. 山东大学 2010 级齐鲁医学班

3. 山东大学 2006 级齐鲁医学班

【立论依据】 淋巴酪氨酸磷酸酶(LYP)是经典 PTP 家族的非受体成员之一,在免疫细胞的信号调控中发挥关键作用。研究显示,LYP 的单核苷酸多态 C1858T 与多种自身免疫性疾病相关,该单核苷酸多态使 LYP 产生功能增强型的 R620W 突变,因此,发展 LYP 抑制剂是治疗自身免疫性疾病的一种潜在方法。

【设计思路】 我们的目的是快速、高通量地从化合物库中筛选 LYP 抑制剂,进行生化研究,筛选出潜在的抑制剂,并排除假阳性结果、筛选对 LYP 具有选择性的抑制剂,并利用晶体结构分析、构建点突变等方法探究抑制剂与 LYP 作用的分子机制,同时研究抑制剂在体内的作用效果,为加快临床抗自身免疫药物的研究做贡献。

【实验内容】 我们应用了靶点结合基础上的虚拟筛选方法来确定 LYP 的抑制剂,并把筛选方法和酶活测定结合在一起。主要的研究内容如下:(a)运用虚拟筛选方法从化合物库中选择 LYP 的潜在抑制剂。(b)初筛,测定抑制剂浓度为 $10\mu\text{M}$ 时 LYP 对 pNPP 的水解能力,选择使 LYP 活力降低的化合物进一步研究。(c)测定抑制剂的 IC₅₀,排除初筛时的假阳性。(d)测定抑制剂对其他 PTP 的 IC₅₀,检测抑制剂的选择性。(e)测定抑制剂对 LYP 的林-贝双倒数曲线,确定结合方式。(f)将 Jurkat T 细胞与抑制剂孵育,给予 anti-CD3 刺激,检测 TCR 信号通路中 ERK、LCK 的磷酸化水平。

【材料】 大肠杆菌 pNPP 分子筛 PCR 试剂 浓缩柱 酶标板等。

【可行性】 我们根据晶体结构筛选到了 23 种可能的新型抑制剂,其中 9 个在体外酶活实验中对 LYP 蛋白有较好的抑制结果,这些抑制剂的 K_i 均小于 $30\mu\text{mol/L}$ 。其中,抑制效果最好的 4 个(M1、M2、M3 和 M4)抑制剂对其它磷酸酶具有一定的选择性。进一步结果显示这些化合物是 LYP 的竞争性抑制剂,抑制效果最好的是 M1,其 K_i 是 $2.87\mu\text{mol/L}$ 。细胞实验显示 M1 和 M2 能够上调 TCR 介导的信号途径。

【创新性】 (1)利用虚拟筛选的方法筛选 LYP 的抑制剂;(2)通过寻找蛋白磷酸酶的抑制剂来探索自身免疫疾病的治疗靶点。

关键词: 虚拟筛选;LYP;抑制剂