

### SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY

# 学士学位论文

BACHELOR'S THESIS



论文题目: <u>在体监测神经肽的高时空分辨率红</u> 色探针的开发与优化

学生姓名:_	杨雨晴
学生学号:	517111910141
专业:	生物工程
指导教师:	李毓龙
学院(系):	生命科学技术学院

## 上海交通大学 学位论文原创性声明

本人郑重声明:所呈交的学位论文《基因编码的神经肽类红色荧 光探针开发与应用》,是本人在导师的指导下,独立进行研究工作所 取得的成果。除文中已经注明引用的内容外,本论文不包含任何其他 个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡 献的个人和集体,均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声 明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名: 杨雨晴

### 日期: 2021年 6月 2日

### 上海交通大学

### 学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定, 同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子 版,允许论文被查阅和借阅。本人授权上海交通大学可以将本学位 论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索,可以采用影印、 缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

**保密**□,在 1 年解密后适用本授权书。

本学位论文属于

不保密□。

(请在以上方框内打"√")

指导教师签名: 考察化 学位论文作者签名:杨雨晴

日期: 2021 年 6 月 2 日 日期: 2021 年 6 月 2 日



#### 摘要

神经元通讯依赖于化学突触传递,其中神经化学物质从突触前神经元释放,并作用于靶 细胞。除了经典的小分子神经递质外,还有一类重要的神经化学物质是神经肽。神经肽是一 种分泌性多肽,通常含有 3-50 个氨基酸,在许多生理和病理过程中起着至关重要的神经调 节作用。神经降压素 (neurotensin, NTS) 和催产素 (oxytocin, OXT) 是两种重要的神经肽。 神经降压素在中枢神经系统中表现出强大的低温和镇痛功能,并参与睡眠调节;催产素在中枢神经系统中与社会相关行为的调节和情感联系的建立有关。尽管它们很重要,但神经降压 素和催产素在大脑中释放的时空间特性在很大程度上是未知的,也不清楚如何调节它们的释 放。回答这些问题需要能够实现具有高时间和空间分辨率、分子特异性和灵敏度的体内神经 肽检测的方法。在本论文中,通过利用 G 蛋白偶联受体和循环排列的红色荧光蛋白 cpmApple,我开发了可以分别检测神经降压素和催产素的红色荧光传感器。红色神经降压素 探针 rNTS0.5 在体外培养的人胚胎肾细胞和大鼠原代皮层神经元上对外源加入的神经降压 素均显示超过 400%的最大荧光响应和 10-20 nM 的亲和力;红色催产素探针 rOXT0.3 在体外培养的人胚胎肾细胞上对外源加入的催产素显示约 100%的最大荧光响应和约 35 nM 的亲 和力。这些红色 NTS 和 OXT 传感器为检测生理和病理过程中 NTS 和 OXT 的动态提供 了有前景的探针。

关键词:神经肽,荧光探针,G蛋白偶联受体,神经降压素,催产素



## DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF RED SENSORS FOR *IN VIVO* NEUROPEPTIDE DETECTION WITH HIGH SPATIAL AND TEMPORAL RESOLUTION

#### ABSTRACT

Neuronal communication relies on chemical synaptic transmission, where neurochemicals are discharged from presynaptic neurons and act on targeted cells. In addition to classic small molecule neurotransmitters, there is also an important class of neurochemicals called neuropeptides. Neuropeptides are secretory polypeptides typically with 3-50 amino acids, playing crucial neuromodulation roles in many physiological and pathological processes. Neurotensin (NTS) and oxytocin (OXT) are two important neuropeptides. NTS exhibits powerful hypothermia and analgesic functions in the central nervous system, and is involved in sleep regulation; OXT is implicated in regulation of social-related behaviors and the establishment of emotional connections in the central nervous system. In spite of their importance, when and where NTS and OXT are released in the brain is largely unknown, nor is it clear how their release might be regulated. Answering those questions requires methods that could enable in vivo neuropeptide detection with high temporal and spatial resolution, molecular specificity and sensitivity. In this thesis, by tapping into G protein-coupled receptors and circularly permutated red fluorescent protein cpmApple, I have developed red fluorescent sensors that can detect NTS and OXT, respectively. The red NTS sensor rNTS0.5 shows more than 400% maximal fluorescent changes in response to exogenous NTS application and an apparent affinity of 10-20 nM when expressed in both cultured human embryonic kidney (HEK) cells and rat primary cortical neurons in vitro. The red OXT sensor rOXT0.3 shows a maximal fluorescence response of ~ 100% and an affinity of ~ 35 nM on HEK cells. These red color NTS and OXT sensors provide promising probes for detecting the dynamics of NTS and OXT in physiological and pathological processes.

Key words: neuropeptide, fluorescent sensor, GPCR, neurotensin, oxytocin



目	录

第一章 绪论1
1.1 神经系统与神经肽1
1.1.1 神经肽的发现史1
1.1.2 神经肽的合成、转运与释放、感知2
1.1.3 神经肽在生理过程和病理过程中的参与
1.1.4 本文主要涉及的神经肽
1.2 现有的神经肽检测方法4
1.2.1 质谱法
1.2.2 微透析
1.2.3 电生理
1.2.4 抗体微探针
1.2.5 荧光标记方法
1.2.6 TANGO assay5
1.2.7 神经肽报告细胞
1.3 基于 GPCR 的神经肽探针的原理和优势6
1.4 本研究的目的与意义7
第二章 实验材料与方法8
2.1 探针质粒的构建
2.2 细胞培养与转染、神经元培养与病毒侵染8
2.3 培养细胞及神经元荧光成像9
2.4 探针下游信号检测9
2.4.1 Mini-G 蛋白荧光素酶互补实验9
2.4.2 TANGO assay9
第三章 红色神经降压素探针的开发11
3.1 插入位点筛选11
3.2 连接肽段优化11
3.3 红色神经降压素探针的体外刻画12
第四章 红色催产素探针的开发15
4.1 插入荧光模块选择及插入位点筛选15
4.2 连接肽段优化15
4.3 红色催产素探针的体外刻画16
第五章 讨论与展望18
5.1 神经降压素及催产素红色荧光探针的优化方向18
5.2 神经降压素及催产素红色荧光探针的应用前景18
致谢



### 第一章 绪论

#### 1.1 神经系统与神经肽

神经系统对于维持动物体内的动态平衡,感知并快速响应不断变化的环境具有至关重要的进化作用。在哺乳动物的中枢神经系统(Central Nervous System, CNS)中,数十、上百亿个相互连接的神经元控制着广泛的关键生理过程,从基本感觉,运动控制和昼夜节律到更高级的认知功能,例如社交行为,学习记忆,决策和自我意识。神经元之间的通讯主要通过称为突触的特殊结构介导,在化学突触中,神经递质在突触前末端富集于突触小泡中。当动作电位侵入末端时,这些递质被释放到突触间隙中,从而激活或抑制突触后神经元。

经典的神经递质(例如谷氨酸和 GABA)通常通过激活离子型受体来介导快速而空间受限的点对点突触传递。人们通常认为多巴胺和神经肽等神经调节剂通过作用于代谢型 G 蛋白偶联受体来启动下游信号级联反应,从而介导神经传递。神经递质/神经调节剂的确切作用方式非常复杂,因为它们能够激活具有不同亲和力和/或不同细胞内效应子的多种同工型的离子型受体和 GPCR。

在化学突触中起到重要作用的各种分子按照其功能可以大致分为两类,即神经递质和神 经调质。神经递质多通过作用于突触后膜的离子型受体,引发突触后神经元的兴奋或抑制, 起到信息传递的作用。神经调质并不直接传递信息,而是通过调节靶神经元的活性和神经递 质的作用,对神经系统的信息传递起到调控的作用。按照化学性质分类,神经递质和调质又 可以分为生物胺,嘌呤,氨基酸衍生物和肽类,它们以不同的模式发挥功能。谷氨酸和乙酰 胆碱等小分子分别在脊椎动物和无脊椎动物中枢神经系统的兴奋性神经元中起主要作用,而 γ-氨基丁酸(Gamma-aminobutyric Acid, GABA)和腺苷主要介导抑制性神经元的作用。此外, 大多数常规的神经调质属于单胺类,如多巴胺(Dopamine, DA),5-羟色胺(5-Hydroxytryptamine,5-HT),去甲肾上腺素和组胺等。

神经肽是一类重要的神经调质,有 100 余个不同种类,其通过作用于 G 蛋白偶联受体 (G Protein-coupled Receptor, GPCR)参与各类高级神经活动与生理过程,如认知、决策、学习、 记忆和情绪等,并在调节神经元活动的过程中起关键作用。监测体内神经肽的动态变化,对 于理解神经系统在生理和病理状态下的功能和调节有重要意义。中枢神经系统中的神经肽或 可通过长距离的体积传输(Volume Transmission),作用于远距离的受体;亦或通过局部传输, 作用于数微米范围内的细胞。

1.1.1 神经肽的发现史

在 20 世纪初,人们确认了一系列化学物质,包括催产素(Oxytocin,OXT)和血管加压素 (Arginine Vasopressin, AVP),并发现了它们在内分泌系统中作为激素的功能。此后,这些激 素的其中一部分也被发现存在并作用于神经系统,现在称为神经肽(neuropeptide)。直到 20 世纪中叶,这些激素的化学特性才得到阐明。随着从组织中提取、分离化学物质的方法的发 展和优化,从脑中发现了越来越多的肽类物质。激素的传统功能方法是通过血管循环,激素 到达较远的细胞并发挥作用。但是,使神经肽不同于激素的是,神经肽可以从神经元中分泌 出来,并且可以通过神经元的投射结构和功能在神经系统中发挥作用。在 1950 年代,David de Wied 发现了神经肽,例如血管加压素,促黑素细胞激素(Melanocyte-stimulating Hormone, MSH)和促肾上腺皮质激素(Adreno-Cortico-Tropic-Hormone, ACTH)在大脑中行使功能,能够



调节大鼠的学习和记忆行为[1]。

1.1.2 神经肽的合成、转运与释放、感知

小分子神经递质(例如谷氨酸、GABA、5-羟色胺、多巴胺等)往往由前体物质通过酶 促反应生成。与此不同的是,神经肽作为肽链,是由基因编码,并由通过肽键连接的氨基酸 残基组成。编码某些神经肽前体氨基酸序列的特定基因经过翻译和表达,再由前体蛋白生成 神经肽。前体蛋白在 N 端具有信号肽序列, 通常为 20-25 个氨基酸长, 其将新合成的前体蛋 白引导定位于内质网(Endoplasmic Reticulum, ER)内腔。信号肽在转运到 ER 内腔后不久被切 除,并将前体蛋白遗留在在 ER 内腔中。神经肽 ER 及高尔基体中经历一系列修饰,包括蛋 白质的折叠/组装, 酰胺化, N-糖基化, 硫酸化和乙酰化等。在所有这些修饰中, C 端酰胺化 是神经肽中最常见的类型之一,对其发挥生物学功能往往也有重要的意义。肽基氨基转移酶 (PAM)催化 C 端酰胺化, 该酶以甘氨酸作为酰胺供体并将酰胺化的 C 末端添加到肽中。此 后,前体蛋白的特定部分被蛋白水解酶切割成适当大小的功能性神经肽。同一种前体蛋白也 可以经历不同的加工修饰,最终生成不同的神经肽:例如生长抑素(Somatostatin, SST)有包含 14 个氨基酸的 SST-14 和包含 28 个氨基酸的 SST-28 两种变体,前者来自于下丘脑神经元中 的加工,而后者来自于胰腺和肠内分泌细胞中的加工。除大小差异外,一种前体蛋白还可以 包含几种神经肽的氨基酸序列。例如,编码神经原前降压素的神经降压素(Neurotensin, NTS) 基因在切割后产生神经降压素和神经调节素 N(Neuromedin N)。血管加压素基因的翻译产物 为血管加压素原神经营养素 II,该前体蛋白被分裂为血管加压素,神经素 II(Neurophysin II, NP II)和 C 端糖肽(C-terminal glycopeptide, CPP)。这种位点特异性切割由一组内切蛋白酶催 化,其中对神经肽加工最重要的是 PC1 和 PC2。酵母内切蛋白酶 Kex2p 的发现为哺乳动物 内切蛋白酶的鉴定提供了启发[2]。不同的翻译后修饰和切割位点赋予了神经肽系统高度多样 性。

由于转录和翻译的需要,神经肽的生成发生在ER和高尔基体附近的细胞体区域。然而,神经元是结构专门化的细胞,通常具有长且分支的神经突,其远离细胞体延伸并与其他神经 元形成突触结构以进行信号转导。与通过属于溶质载体(Solute-Carrier, SLC)家族的特异性转 运蛋白装载到突触小泡(Synaptic Vesicles, SV)中的快速神经递质相比,神经肽被包装在大的 密集核心囊泡(Large Dense Core Vesicle, LDCV)中,通过细胞骨架被转运至神经突,被储存 并等待刺激释放。对于突触小泡中的小分子神经递质,它们在释放后不久往往就会得到补充, 这可能是由于细胞外间隙重新吸收了神经递质并将其回收,或是由于神经递质在胞内的局部 合成。但是,目前还没有文献报道神经肽类似于小分子递质的释放后回收事件。事实上,神 经肽释放后,LDCV 将会经历内在化并被运回胞体,在此后它们需要被破坏或重新填充。

含有神经肽的 LDCV 一定的刺激下会将神经肽从神经元中通过胞吐作用释放出来,以 调节其他神经元的活性。Bernard Katz 和他的同事在 1952 年首次发现,触发胞吐作用的刺 激往往是胞质钙离子浓度上升<sup>[3]</sup>。在神经元中,胞质钙离子浓度的上升可能来自来自 ER 的 胞内钙离子库存,或是来自电压依赖钙离子通道(Voltage Dependent Ca2<sup>+</sup> Channels, VGCC)的 跨膜电流。神经肽的释放机制与突触小泡类似并在进化上高度保守。囊泡释放复合体结构由 synaptobrevin, syntaxin 和 SNAP-25 组成,称为可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白 受体(Soluble N-ethylmaleimide Sensitive Factor Attachment Protein Receptor, SNARE)复合体。 除 SNARE 外,突触结合蛋白(Synaptotagmin)家族也能起到钙离子传感器的作用,感知钙离 子浓度上升并诱发胞吐事件。不同的突触结合蛋白具有不同的钙离子感应亲和力。发现某些 神经肽与其他小型化学神经递质存在共释放,然而,小的透明 SV 的胞吐作用比大的 LDCV 的胞吐作用更快。与 SV 的释放相比,LDCV 的胞吐作用通常需要更高的激发强度和更高的 钙离子浓度。这些差异表明,钙离子浓度上升引起 LDCV 的胞吐作用存在专门的调节神经 肽机制。大脑中用于突触小泡的钙离子传感器通常为 synaptotagmins-1, synaptotagmins-2 和



synaptotagmins-9<sup>[4]</sup>。对于 LDCV 释放,已确定 synaptotagmins-7 可以调节胰腺细胞中胰岛素 和胰高血糖素的释放<sup>[5-6]</sup>。除了轴突以外,神经肽还可以在神经元的体细胞树突部分释放。这种树突释放通常依赖于不同类型的 VGCC,例如 R 型 VGCC,而不是 PQ 型或 N 型 VGCC 通道<sup>[7]</sup>。

神经肽通过特定的受体被神经元感知,其中大多数是G蛋白偶联受体(GPCR)。神经肽 结合至它们的同源GPCR,并通过酶促反应诱导细胞内信号传导级联。GPCR激活有两个主 要的下游信号传导途径,即G蛋白信号传导途径和β-arrestin 偶联信号传导途径。G蛋白复 合物由Ga,Gβ和Gγ蛋白组成,其中活化的Ga亚基交换GTP代替GDP,从而触发Ga亚 基与Gβγ二聚体和受体的解离。解离的Ga和Gβγ亚基与其他细胞内蛋白相互作用,继续 进行信号转导级联反应,而释放的GPCR能够与其他的异源三聚体Gaβγ蛋白重新结合,形 成一个新的复合物,准备开始下一轮信号转导。Ga蛋白通常分为三类:Gas蛋白的激活将 激活腺苷酸环化酶(Adenylyl Cyclase, AC),导致cAMP水平升高,然后激活蛋白激酶A(Protein Kinase A, PKA)和其他效应器。与Gas蛋白相反,Gai/o蛋白的激活会抑制腺苷酸环化酶的 活性并降低细胞内 cAMP的水平。Gaq/11蛋白的激活诱导胞质钙离子水平升高,然后激活 蛋白激酶 C(Protein Kinase C, PKC)。当高浓度的细胞外配体长时间激活 GPCR 时,通常会触 发 β-arrestin 偶联的信号通路激活。GPCR 的C端尾部磷酸化并招募β-arrestin,然后β-arrestin 通过胞吞作用介导激活的GPCR的内在化(Internalization),从而防止GPCR信号的过度激活。

1.1.3 神经肽在生理过程和病理过程中的参与

长期以来,肽类物质一直被认为是以激素的形式发挥生理作用。例如,下丘脑释放的促肾上腺皮质激素释放因子(Corticotropin-releasing Factor, CRF)刺激垂体前叶的内分泌细胞释放 ACTH,而 ACTH 刺激通过血管循环系统从肾上腺皮质释放糖皮质激素,组成下丘脑-垂体-肾上腺(Hypothalamus-Pituitary-Adrenal, HPA)轴,在压力响应调节中有重要的作用。生长抑素对具有抑制垂体前叶内分泌细胞分泌生长激素(Growth Hormone, GH)的作用。

随着对神经肽的了解的增加,人们发现神经肽在调节中枢神经系统中有着基础而重要的 功能。例如,血管加压素调节社交行为,敲除血管加压素受体 V1bR 的小鼠表现出较低的攻 击性和适度的社交认可度受损<sup>[8]</sup>。促肾上腺皮质激素释放因子除了在下丘脑室旁核 (Paraventricular Nucleus, PVN)区域以外,在其他脑区中也有广泛表达,包括中央杏仁核 (Central Amygdala, CeA),终纹床核(Bed Nucleus of the Stria Terminalis, BST)和中前额叶皮层 (Medial Prefrontal Cortex, mPFC),在疼痛感知和压力反应中起作用。神经肽 Y(Neuropeptide Y, NPY)注射入室旁核可增加进食和饮水。生长抑素,血管活性肠多肽和胆囊收缩素是经常 用来区分脑中 GABA 能中间神经元亚型的标记基因,但是,它们从这些中间神经元的释放 和功能仍知之甚少。

根据大脑中神经肽的这些关键功能,很明显,神经肽系统的功能失调会导致生理和心理 状况受损,进而导致病理现象。例如,已发现降钙素(Orexin)是睡眠觉醒周期的关键调节物 质<sup>[9-10]</sup>。降钙素基因敲除或降钙素的受体突变会在小鼠,狗和人上导致发作性睡病表型,这 表明降钙素是大脑中促进唤醒的分子之一<sup>[11-12]</sup>。催产素基因敲除小鼠显示出社交记忆受损, 并且也与自闭症及类似的行为障碍高度相关。

1.1.4 本文主要涉及的神经肽

(1) 神经降压素

神经降压素为十三肽,其最初在 1973 年由 Robert Carraway 和 Susan Leeman 在牛下丘脑中鉴定,并被发现在外周具有舒张血管、降低血压的作用,因此被命名为神经降压素<sup>[13]</sup>。 1976 年,Garth Bissette 等人首次报道了神经降压素的低温作用:神经降压素的颅内注射会导致当暴露在低温环境下时,小鼠的核心温度(即结肠温度)呈剂量依赖性降低<sup>[14]</sup>。神经降压素是多巴胺传递和垂体前叶激素分泌的神经调节剂,并对多巴胺受体及多巴胺能神经元有



调节作用<sup>[15-17]</sup>。一些证据表明神经降压素参与疼痛感知,并具有镇痛作用<sup>[18-20]</sup>。2019 年, Ma 等人的工作证明杏仁核中的神经降压素能神经元有调节睡眠的作用,当光刺激中部杏仁 核 (central amygdala, CeA)中的神经降压素能神经元时,观察到更长时间的非快速眼动睡眠 (non-rapid eye movement, NREM),而运用 CRISPR-Cas9 敲低这群神经元中的神经降压素表 达后,观察到光刺激诱导的 NREM 上升有显著下降。这提示神经降压素可能在睡眠觉醒调 控中有重要的作用<sup>[21]</sup>。有趣的是,降低的血压和体温正是 NREM 睡眠过程中会发生的现象, 因此这提示了神经降压素在几个不同通路中潜在的广泛效应。

(2) 催产素

催产素是一种九肽。作为激素,催产素在 1906 年首先由 Henry Dale 发现并被鉴定为促进生产和母乳分泌,并且在哺乳动物的繁殖过程中必不可少。1927 年,催产素被成功分离纯化,其氨基酸序列和结构也得到了鉴定。1955 年的诺贝尔化学奖被奖励给 Vincent du Vigneaud,其中就包括奖励他首次成功人工合成催产素。此后的研究证明,在中枢神经系统中,催产素不仅有助于与育婴相关的母性行为的发生以及对婴儿的嗅觉认知<sup>[22]</sup>,而且在亲密关系和社会交往中也起着重要作用<sup>[23]</sup>。

#### 1.2 现有的神经肽检测方法

1.2.1 质谱法

质谱法通过检测离子的荷质比实现分子的鉴定。因为具备速度快、灵敏度高等优势,质 谱法常被应用于肽段和蛋白质的检测,是蛋白质组学和系统生物学中常用的工具。早在 1969 年,液相质谱法就已经用于促甲状腺激素释放激素的检测<sup>[24]</sup>。此后,质谱法在包括无脊椎动 物<sup>[25-27]</sup>和脊椎动物<sup>[28-29]</sup>,以及行为过程中<sup>[30-31]</sup>神经肽释放检测中都得到了应用。但是,如果 想利用质谱法检测获得有生物学意义的结果,则需要对样品制备的条件和方法进行单独的设 计,并且无法实现时空间连续的动态测定。

1.2.2 微透析

微透析目前已经发展为一种成熟的方法,用于检测神经系统内细胞外环境中的神经肽 及其他分子<sup>[32]</sup>。微透析法主要运用一定微孔孔径的半透膜,分子量小于半透膜截留极限的 细胞外分子将扩散并被收集到灌流液中。目前,微透析已经被用于检测大鼠下丘脑室旁核的 催产素 (Oxytocin, OXT)<sup>[33]</sup>,以及大鼠脑垂体前叶的神经肽,包括精氨酸加压素(Arginine Vasopressin, AVP),促肾上腺皮质激素释放因子和胃泌素释放肽(Gastrin-releasing Peptide, GRP)<sup>[34]</sup>。虽然有研究显示透析液中神经肽的含量只占细胞外液中神经肽含量的 5%,但由于 其具有高灵敏度、高特异性,因此不影响其用于神经肽的检测。同时,微透析法可以还运用 于自由运动中的动物,也因此适合于检测各种行为过程中神经肽水平的内源变化。微透析法 的主要限制在于其时空间分辨率和细胞特异性:微透析探针的尖端通常是半透膜长度的 2-4 毫米,因此在亚细胞区域没有很高的空间分辨率;而由于灌注液流速低、取样频率受限,对 于神经肽类,时间分辨率可能超过 10 分钟,甚至有时高达 30 分钟。

1.2.3 电生理

电生理相关的方法在神经科学相关的研究中拥有基础性的地位,被广泛运用于各种神经 系统生理及病理过程的研究中。通过刺激神经元并记录神经活动导致的电信号变化,例如动 作电位等,电生理可以直接获取神经元的活动信息而不需要任何翻译和阐释,同时拥有极高 的信噪比(signal to noise ratio, SNR)以及很好的时间分辨率。由于电生理法并非直接检测神经 肽本身,而是通过记录释放或响应神经肽的神经元活性来间接研究神经肽,而与神经肽共释 放或是共存的其他化学物质往往也能改变神经元的电特性,因此通过电生理法研究神经肽往 往还需要与其他操纵手段联用:例如从药理学上,外源施加特定受体的激动剂或拮抗剂;或 是进行敲除受体基因等遗传学操作。已经发现 CRF 可以增加外侧缰核(Lateral Habenular, LHb)

第4页共25页



神经元的兴奋性,并且这种作用是由 CRF1R 受体介导的,在该研究中应用了 CRF 神经肽及 其受体拮抗剂<sup>[35]</sup>。CRF 还影响苍白球外侧部(External Globus Pallidus, GPe)区域 CRF1R 阳性 神经元的放电率<sup>[36]</sup>。但是,电生理法不可避免地会与生物样品本身发生物理接触,进而对生 物样品的状态造成影响。此外,电生理方法的空间分辨率和通量还受到电极数量和位置的限 制。

#### 1.2.4 抗体微探针

抗体微探针通过将特异性抗体包被在玻璃电极外,并将玻璃电极插入待检测的区域,使 得内源神经肽与抗体微探针结合,此后将探针抽出并与放射性标记的肽段孵育结合剩余抗 体,可以检测该区域存在的神经肽<sup>[37]</sup>。该方法已用于检测 P 物质(Substance P, SP)在猫急性 关节炎发展过程中脊髓内的释放<sup>[38]</sup>和大鼠胸脊髓背角中的空间分布<sup>[39]</sup>。如果有合适的抗体, 抗体微探针具有较高的灵敏度和化学特异性,并且由于微探针尖端尺寸较小而具有相对好 的空间分辨率。但是,这种方法无法观察神经肽的时间变化,因此很难用于体内研究。

1.2.5 荧光标记方法

通过将 GPF 等荧光蛋白与感兴趣的神经肽融合在一起,可以简单的通过光学成像的办法,例如荧光显微镜<sup>[40-41]</sup>或 TIRF<sup>[42]</sup>观察神经肽的转运和释放等过程。但是该方法基于的基本假设,即融合了荧光蛋白的神经肽的表达和转运模式与未经改造的天然神经肽相同,并不一定成立。此外,也可以使用 pH 敏感的 FM 染料<sup>[43-45]</sup>和 pH 敏感的荧光蛋白<sup>[46-47]</sup>标记细胞 膜,利用囊泡在转运和释放过程中所处环境的 pH 变化,以研究神经递质的囊泡释放<sup>[48-52]</sup>。在果蝇中,大鼠心房利钠肽(Atrial Natriuretic Peptide, ANP)和 GFP 的融合体被用于研究在飞行神经肌肉接头(NMJ)处的神经肽运输<sup>[53]</sup>。另一种方法是神经肽释放报告物(Neuropeptide Release Reporters, NPRRs),其中将神经肽前体 C 端结构域的排序结构域与 GCaMP6s 融合,以通过 pH 变化指示神经肽目前所处的区域。然而,NPRRs 的荧光变化实际上表明的是NPRRs 本身,而非天然神经肽,从囊泡释放到细胞外空间的过程。此外,NPRRs 没有化学特性,也因此无法报告释放的报告物对应的神经肽的化学特性。

#### 1.2.6 TANGO assay

神经肽受体通常是 GPCR,在结合神经肽后,激活的 GPCR 将信号转导至下游信号通路。TANGO assay 利用了 β-arrestin 途径并对其进行修饰以创建新的信号传导途径 (Barnea et al., 2008)。该方法对神经元中的靶向受体蛋白和 β-arrestin 进行遗传修饰,当神经肽激活 修饰的 GPCR,将β-arrestin 募集到 GPCR 附近时,β-arrestin 连接的烟草蚀刻病毒 (Tobacco etch virus, TEV)蛋白酶将特异地切割连接遗传修饰的 GPCR 和 tTA 转录因子的连接肽段,因此将 tTA 从细胞膜上释放出来,使其激活细胞核中的报告基因表达。TANGO assay 基于 GPCR 激活诱导的转录激活和报告基因表达,因此具有高灵敏度和特异性,并且可以通过遗传编码 实现细胞特异性。但是,由于转录和翻译过程通常需要超过 12 个小时才能报告信号,因此 该方法缺乏时间分辨率。改进的 TANGO assay,例如 iTango2<sup>[54]</sup>和 SPARK<sup>[55]</sup>,通过光门控 特定时间段内的读出信号,但是信号诱导最短仍需要数分钟。此外,TANGO assay 中的报告 基因还可以替换为神经活动操纵器,例如光遗传或化学遗传元件。TANGO assay 已在果蝇中 用于检测多巴胺信号传导<sup>[56]</sup>,并用于检测交配过程中雌性性器官中的性肽受体(SPR)活性 <sup>[57]</sup>。OXTR-iTango2 已被用于报告小鼠在社交互动期间催产素在中脑腹侧被盖区(Ventral tegmental area, VTA)的释放<sup>[58]</sup>。

#### 1.2.7 神经肽报告细胞

基于细胞的神经递质荧光工程报告器(Cell-based neurotransmitter fluorescent engineered reporters, CNiFERs)以人胚胎肾细胞(human embryo kidney cells, HEK cells)为基础,使其表达与 Gq/11 蛋白偶联的神经递质的受体,并含有基于 FRET 的钙离子探针 TN-XXL,当受体与神经递质结合并激活下游 IP3 通路时,细胞内钙离子浓度上升,引发钙离子探针的反应进而



报告感兴趣的神经递质的存在。使用时,将经改造的 CNiFERs 移植到待检测的大脑区域内, 使其报告神经递质的动态。CNiFERs 已经用于报告活体中的乙酰胆碱,多巴胺和去甲肾上腺 素的动态变化<sup>[59-61]</sup>。类似的设计也被用于检测血管活性肠肽(Vasoactive Intestinal Peptide, VIP)(Jones et al., 2018),其中报告细胞稳定表达 VPAC2R,hGa15(16)蛋白和钙探针 jRCaMP1b, VIP 激活 VPAC2R,然后通过 hGa15(16)蛋白转导为钙信号<sup>[62]</sup>。使用 VIP 报告细胞,在离体 培养的脑切片上离体的视交叉上核(Suprachiasmatic Nucleus, SCN)脑区检测到 VIP 在昼夜节 律中的动态变化。基于细胞的神经递质荧光工程报告器显示出高灵敏度和特异性,并且相对 较高的时间分辨率。但是,该方法缺乏细胞类型特异性,并且由于 HEK 细胞大小的限制而 显示出较低的空间分辨率。此外,由于涉及将外源细胞系引入脑内,该方法具有较强的侵入 性并可能引起免疫排斥。



图 1-1 神经肽的检测方法

微透析具有高灵敏度和分子特异性,但缺乏空间和时间分辨率。抗体微探针有很好的分子 特异性和较高的空间分辨率,但无法观察神经肽在时间序列内的连续变化。TANGO assay 灵敏度高,但报告基因表达需要较长时间。基于 GPCR-FRET 的传感器具有较高的空间和 时间分辨率,但反应较低,因此灵敏度及信噪比不佳。

#### 1.3 基于 GPCR 的神经肽探针的原理和优势

光学成像由于其非侵入性和高通量方法而在神经递质检测中有独特的优势。此外,基因 编码的光学探针可以实现遗传层面的细胞类型特异性表达,这对于在高度复杂的中枢神经系 统中监测特定的神经递质和神经调节剂有至关重要的意义。

神经肽的绝大多数受体属于 GPCR。GPCR 为一类构象保守的七次跨膜蛋白,定位在细胞膜上,能够以高特异性识别胞外特定分子,并通过偶联 G 蛋白或招募 β-arrestin 激活细胞内的下游信号通路,以实现各种生理功能。当结合配体后,GPCR 会发生保守的构象变化,其中以第五和第六跨膜区(Transmembrane Helix 5 and 6, TM 5 and TM 6)及其间的第三胞内环 (Intracellular Loop 3, ICL3)的构象变化最为显著。此前,Vilardaga 及其同事通过在 GPCR 的 ICL3 和 C 端结构域中插入一对可以发生 FRET 的荧光蛋白,生成了一系列比例化荧光探针,



称为 GPCR-cam<sup>[63]</sup>。基于 FRET 的探针能够保留其 GPCR 骨架的特异性和亲和力,并表现出高的空间和时间分辨率,但是荧光强度对配体结合的响应相对较小(<10%),因而限制了其在活体内的应用。

为了克服信噪比低的缺点,基于单个荧光蛋白的策略也被逐渐应用于探针开发,其中最为著名的分子探针是GCaMP系列的钙探针。GCaMP的基础是1998年RogerTsien和Geoffrey Baird 等人构建循环重排的荧光蛋白(circular permutated fluorescence protein, cpFP)的工作<sup>[64-65]</sup>,其中通过将绿色荧光蛋白的第一个和最后一个氨基酸通过肽段连接,并且在适当的位置 将蛋白打断形成新的 N 和 C 端(对 GFP 来说是 144 和 146 位氨基酸)形进而成 cpGFP,此 时将 cpGFP 作为荧光模块插入受体骨架中,在合适的空间位置下 cpGFP 的亮度便会受到构 象变化的调节。事实上,对其后续的结构学研究发现,构建 cpGFP 的过程是将原本 GFP 中 被受到 β-sheet 保护的生色团(chromophore)暴露并朝向 145 和 146 位氨基酸,使生色团的 pH 能够被 cpGFP 新生成的 N 和 C 端两侧的连接肽段(linker)调节,以荧光亮度的变化来表征待 检测底物浓度的变化<sup>[66]</sup>。

首个利用 cpGFP 开发的胞外神经递质探针是谷氨酸探针 iGluSnFR,利用细菌周质结合 蛋白 GltI,将其与 cpEGFP 组合,当谷氨酸结合后,iGluSnFR 的荧光亮度增强,并具有较大 的动态范围:在培养的 HEK293 细胞和神经元中,其最大反应分别为 4.5 倍和 1.0 倍<sup>[67]</sup>,并 在秀丽隐杆线虫,斑马鱼和小鼠等模式生物中,证明了 iGluSnFR 有能力检测活体内的谷氨 酸释放<sup>[68-69]</sup>。此后,iGluSnFR 的光谱也得到了扩展<sup>[70]</sup>。但是,由于神经肽很少有对应的细 菌衍生的周质结合蛋白,并且周质结合蛋白的浓度检测范围可能不在生理浓度范围内,因此 很难以相同的思路进行神经肽的探针开发。

为了同时满足神经肽检测过程中对灵敏度、特异性、时空间分辨率、细胞特异性和低侵入性的要求,李毓龙实验室利用GPCR作为骨架开发了一系列基于GPCR激活的探针(GPCR-Activation Based sensors, GRAB sensors)。将构象敏感的 cpEGFP 整合到不同 GPCR 的 ICL3中。配体结合和 GPCR 激活后,TM 6 的构象变化可能会改变 cpEGFP 的构象,从而产生荧光信号变化。由于探针为基因编码,因此也可以实现目标物质的细胞类型特异性检测,例如通过在某特定细胞类型独有的启动子下表达探针蛋白,实现只在感兴趣的时间段和脑区进行目标物质的检测。使用这种策略,已经针对不同的小分子神经递质开发了 GRAB 探针,包括乙酰胆碱(Acetylcholin, ACh)<sup>[71-72]</sup>,多巴胺<sup>[73-74]</sup>,肾上腺素(Epinephrine, Epi),去甲肾上腺素(Norepinephrine, NE)<sup>[75]</sup>,5-羟色胺<sup>[76]</sup>和腺苷(Adenosine, Ado)<sup>[77]</sup>。这些探针具有高亮度和反应幅度,保留了与其骨架 GPCR 相似的亲和力和特异性,并以亚秒级的时间分辨率响应配体,因此能够在活体内的生理环境中检测内源性神经递质的动态变化。类似的,也基于cpmApple 开发了部分神经递质的红色探针,例如多巴胺<sup>[74]</sup>,5-羟色胺和去甲肾上腺素红色探针。

#### 1.4 本研究的目的与意义

实验室此前已经开发了针对部分神经肽的绿色 GRAB 探针,但是红色荧光探针由于具 有以下所述的优点而也具有重要意义。红色荧光探针与基于 GFP 的绿色荧光探针和蓝光可 激发的通道视紫红质 2(Channelrhodopsin 2, ChR2)的光谱具有明显的分离,因此能够正交读 出不同的神经化学事件,或同时监测神经递质的释放和蓝光介导的神经元活动控制。此外, 红色荧光传感器需要以相对较长的波长激发,同时也拥有更长的发射光波长,从而提供了优 于 GFP 的其他优势,包括降低的光毒性,降低的背景荧光和更深的组织穿透力。本研究开 发的红色神经降压素探针及红色催产素探针为同时成像多种神经递质以研究神经递质间的 相互作用提供了重要的工具,同时对其他神经肽类红色荧光探针的开发也有一定的指导意 义。



### 第二章 实验材料与方法

#### 2.1 探针质粒的构建

探针质粒的骨架为用于在哺乳动物细胞中表达膜蛋白的 pDisplay 载体 (Invitrogen, MA)。其上带有 GPCR 及相应插入 cpmApple 的探针构建体,并在 GPCR 的 N 端带有辅助 膜定位的 IgK 序列。为克服由于质粒转染量不均一导致的不同孔之间荧光信号强度的差异,本文在质粒构建时在待筛选探针之后加入一段 IRES-EGFP-CAAX 的序列,该序列可以独立 于探针进行翻译,CAAX 作为膜定位序将 EGFP 定位限制在细胞膜上,以此作为每一个孔的 内参和细胞膜标记。使用金牌 Mix (green) (Tsingke Biotechnology Co.,Ltd., China) 进行 PCR。 使用 Gibson assembly 进行片段组装 (Gibson et al., 2009)。用于进行连接反应的 Gibson mix 体系在已经发表的配方基础上进行优化(将原体系中的 PEG8000 替换为 1,2-丙二醇,其他 组分保持不变)并由实验自行配制。将构建的质粒载体转化进入实验室自制 DH5α 感受态进 行扩增。引物合成委托北京擎科生物公司和北京睿博生物公司完成。human NTSR1 基因和 human OXTR 基因来自 hORFeome database 8.1 人类 cDNA 文库,bovine OXTR 基因来自购 自超市的食用牛肉,由实验室自行进行基因组提取,并从中克隆获得。基因均经过测序鉴定。

#### 2.2 细胞培养与转染、神经元培养与病毒侵染

本文使用的 HEK293T 细胞来自于美国生物标准品资源中心(American Type Culture Collection, ATCC)。将 HEK293T 在含有 5% FBS (North TZ-Biotech Develop Co., Ltd, Beijing, China)及 1%青霉素及链霉素(PS)双抗的 DMEM (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) 中于恒温培养箱提供的 37°C, 5% CO<sub>2</sub>中培养,并转移到 Perkin Elmer 96 孔板中进行 筛选。在细胞密度约为 60%-80%时,使用 PEI 法(通常用量为 1 μg DNA: 3 μL PEI)转染 HEK293T 细胞,在 4-6 小时后更换培养基,并在转染后 32-40 小时成像。

本文使用的原代皮层神经元来自于 P0 期的 SD 大鼠乳鼠(Vital River, Beijing, China)。 实验前一天,将直径1 cm的玻片浸泡于0.1 mg/mL多聚赖氨酸(Poly-D-lysine hydrobromide, PDL)溶液中,室温1-2h或4℃冰箱过夜。解剖前将玻片放置于24孔板中,用500 µL无菌 蒸馏水清洗 2-3 次后晾干,紫外照射灭菌。对 P0 期乳鼠使用酒精消毒后,快速将大鼠头部 剪下,剪开表皮及头骨后将大脑(除嗅球)取出,置于预先准备的 DMEM+1% PS 双抗溶液 中。在体视镜下分离皮层和海马,并根据血管膜定位取出海马,保留皮层;尽量去除表面血 管膜后置于新的 DMEM+1% PS 双抗溶液中。去除溶液,保留皮层组织,加入 1 mL 胰酶, 吸取所有组织并小心吹打 1-2 次后,置于 37 ℃恒温箱消化 10 min,中途取出一次并缓慢摇 动加速消化。消化完成后,加入4 mL 含有 10% 血清的 DMEM 溶液并转移至 15 mL 离心管 中,缓慢吹打 10-15 次。静置 5 min,尽量吸取上清至 15 mL 新的离心管,300 g 离心 5 min。 弃上清,加入适量含有 10%血清的 DMEM 溶液缓慢混匀。取 10 μL 细胞悬液,在血球计数 板上计数,以每个中格 3-5 个细胞为宜。根据计数结果稀释细胞悬液,每片玻片上点种 100 uL,注意不要将细胞悬液滴在没有玻片覆盖的区域。将种有神经元的 24 孔板放入 37 ℃培 养箱,使神经元贴壁生长。30-60 min 后,加入 400 µL 神经元培养基(Neurobasal (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Shanghai, China) +10% B27+Glutamax (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Shanghai, China)+1% PS)。换液时,每隔三天吸去 200 μL 培养基,加入 300μL 新培养基。



对于神经元的病毒侵染,本文中使用到的 AAV 病毒来自由实验室自行构建含有待包 装基因片段的质粒,并委托山东维真生物公司完成后续病毒包装和纯化,病毒滴度不低于 1 ×10<sup>13</sup>颗粒/毫升。在神经元培养 6-7 天后,对神经元进行换液,同时根据实验需要每孔加入 0.5-2 µL 病毒悬液,之后继续对神经元进行培养,待培养天数大于 14 天后对神经元进行成 像。

#### 2.3 培养细胞及神经元荧光成像

对于培养的 HEK239T 细胞,成像前,将 Perkin Elmer 96 孔板中培养细胞的细胞外环 境更换为 Tyrode 溶液(以 nM 计: 150 NaCl,4 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 Glucose, 调 pH 至 7.3-7.4)。在 Operetta CLS 高通量成像筛选系统(Perkin Elmer)中,用 40×水镜进 行成像。将激动剂配置成相应浓度溶液,并加入 Tyrode 溶液使其作用于探针。在图像分析 程序中,用绿色通道观察表达的 EGFP 以圈选细胞作为待测区域(Region of interest, ROI)。探 针的荧光亮度用红色通道和绿色通道的绝对荧光强度的比值(R/G Ratio)表示,即红色探针相 对 EGFP 的相对亮度。

对于 AAV 病毒侵染表达探针的原代培养神经元,本文采用激光共聚焦系统进行成像, 设备为倒置 Ti-E AI 共聚焦显微镜(Nikon)。显微镜配备 10×及 20×空气镜,40×及 100x 油 镜,561 nm 激光,用 595/50 nm 滤光片采集红色探针的信号。成像时,将细胞外基质换为适 量的 Tyrode 溶液,并加入一定浓度的激动剂溶液。采样频率为每 5 秒一帧。

#### 2.4 探针下游信号检测

#### 2.4.1 Mini-G 蛋白荧光素酶互补实验

G 蛋白信号传导途径是 GPCR 信号传导的主要下游通路之一。在 GPCR 激活时, Ga 蛋 白被招募到接近 GPCR 的位置,并通过激活的 GPCR 催化从结合 GDP 变为结合 GTP。Mini-G 蛋白荧光素酶互补实验可以用于检测 G 蛋白与 GPCR 的相互作用。通过将荧光素酶 nanoluc 分裂为两个部分并分别与 GPCR 和 Ga 蛋白连接,当 GPCR 被激活并招募 Ga 蛋白时,分裂的荧光素酶可以互补并形成具有功能的完整荧光素酶,催化底物发出生物光。

将探针序列构建到 pcDNA3.1(+)载体上,探针的 C 端连接分裂 Nluc 的 SmBit 部分。将 其与含有 mini G protein 与分裂 Nluc 的 LgBit 部分的质粒共转入 HEK293T 细胞中,表达 24-30 h 后加入激动剂和荧光底物,孵育反应 10-15 分钟后在酶标仪(Perkin Elmer 2030)上检测 荧光信号。

#### 2.4.2 TANGO assay

将探针序列构建到 pTANGO 载体上,探针的 C 端通过可被 TEV 蛋白酶特异切割的氨 基酸序列连接转录因子 tTA。将质粒转染到 HTLA (HEK293 的衍生细胞系,其中稳转有 tTA 依赖的荧光素酶报告基因和 β-arrestin2-TEV 融合基因)中,表达 24 h 后加入激动剂,再次使 报告基因表达 12-16 h 后加入荧光底物,孵育反应 10-15 分钟后在酶标仪(Perkin Elmer 2030) 上检测荧光信号。

#### 2.5 数据统计与分析

对于在 Operetta CLS 上进行的细胞上探针筛选实验的成像结果,数据来自软件根据分析程序测量荧光强度并进行计算得到的输出,分析程序圈选 ROI 的标准为用作内参的绿色 通道在细胞膜上有明显表达;之后在 Excel 及 Origin 中进行数据分析和作图。对于激光共聚 焦显微镜对神经元的成像结果,数据来自 NIS-Element AR 软件采集的图像,在 Image J 中 进行分析和计算,ROI 为作者结合明场、红色荧光通道的表达情况及细胞形态特征手动圈 选。部分统计在 GraphPad Prism 软件中进行,统计方法采用 t-test,其中\*\*\*表示 p<0.001,

第9页共25页



 SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY
 在体监测神经肽的高时空分辨率红色探针的开发与优化

 \*\*表示 p<0.01, \*表示 p<0.05, n.s.表示没有显著性差异。</td>



### 第三章 红色神经降压素探针的开发

#### 3.1 插入位点筛选

在人类体内,神经降压素的 GPCR 类天然受共体有 NTSR1 和 NTSR2 两种,其中 NTSR1 对其的亲和力更高, pKd=9.6-9.9, 因此优先选用人源 NTSR1 作为 GRAB 探针的骨架。对 于采用的荧光模块,因为与绿色荧光蛋白相比,红色荧光蛋白包含更多种类,并且其人工进 化并不是像目前的大部分绿色荧光蛋白一样来自于同一祖先,因此不同谱系下的红色荧光蛋 白尽管具有类似的激发和发射光谱,但其生色团的氨基酸组成及所处的化学环境环境并不相 同[78],因此已经尝试应用了数种 RFP,用于开发探针的红色荧光蛋白模块,包括 mApple, mRuby 以及 FusionRed 等<sup>[79-81]</sup>。幸运的是,在实验室前期的工作中已经成功开发了基于 cpmApple 的红色多巴胺探针 rDA1m<sup>[74]</sup>,因此基于该红色多巴胺探针,将其中使用到的荧光 模块(rDA1m cpmApple)及连接肽段移植到人源 NTSR1 的第三胞内环(ICL3)。在第五和第六 跨膜区(TM5, TM6)靠近 ICL3 处的 N 端和 C 端选择各 10 个移植位点并构建含有 100 种可能 性的突变体筛选文库(图 3-1a)。提取质粒并通过 PEI 转染的方式将其表达在 HEK293T 细 胞中,外源添加终浓度为1uM的神经降压素使探针饱和,结合高内涵成像系统对探针蛋白 的细胞膜定位、荧光亮度及对 1 uM 神经降压素的荧光响应幅度进行成像筛选,获得反应幅 度(ΔF/F<sub>0</sub>)约为 50%的候选突变体。通过测序确定位点,对选定的位点及其临近的 6 个位点 构建微调文库,再次进行移植,构建含有49种可能性的突变体筛选文库(图3-1b),并未获 得有进一步提升的候选突变体,因此将此候选突变体命名为rNTS0.1。

#### 3.2 连接肽段优化

对连接荧光模块和 GPCR 的 TM5、TM6 区的蛋白连接肽段进行随机点突变,筛选对提升最大亮度及响应幅度有最大帮助的点突变,并进行组合。在进行四轮点突变并筛选了数百个候选突变体后,获得反应幅度有近 6 倍提升的候选突变体 rNTS0.5 (图 3-1d),其最大亮



第 11 页 共 25 页



度也有约三倍提升。

#### 图 3-1 红色神经降压素探针的开发过程

a. 插入位点筛选文库的位点选择。红色显示 N 端位点, 蓝色显示 C 端位点, 之间的序列由 cpmApple 代替。b. rNTS0.1 的插入位点及微调文库的位点选择。红色、蓝色显示插入位点, 黄色显示文库的位点选择。rNTS0.1 的插入位点为 L252<sup>5.65</sup>, A289<sup>6.21</sup>。c. 红色神经降压素探 针不同版本的序列对比。d. 红色神经降压素探针的筛选过程及相对最大反应。图中的反应 大小为相对于 rNTS0.1 的值, 即认为 rNTS0.1 的相对反应为 1。

#### 3.3 红色神经降压素探针的体外刻画

通过 PEI 转染在 HEK293T 细胞中表达 rNTS0.5 探针。通过外源添加不同浓度的神经降 压素,观察到红通道的探针蛋白和上膜表达的 EGFP 有很好的共定位,因此说明探针在 HEK293T 细胞中有较好的上膜(图 3-2a);同时可以观察到探针的平均最大荧光响应约为 400%-500%(图 3-2b)。对 rNTS0.5 测定药物浓度-反应曲线, 拟合得到神经降压素对 rNTS0.5 的半最大效应浓度(Half Maximal Effective Concentration, EC<sub>50</sub>)约为 11.4 nM (图 3-2c)。



#### 图 3-2 红色神经降压素探针在 HEK293T 细胞中的刻画

a.rNTS0.5 在 HEK239T 中的表达,响应及伪彩图。EGFP-CAAX 为定位在细胞膜上与rNTS0.5 共表达的 EGFP,用于圈选细胞膜。比例尺:20 um。b.rNTS0.5 在 HEK293T 中亮度(左)及反应(右)的统计结果,相对亮度显示为rNTS0.5 的绝对荧光强度与共表达的 膜定位 EGFP 的绝对荧光强度的比值。数据来自 7 个细胞孔。c.rNTS0.5 在 HEK239T 中对神经降压素的亲和力。

类似的,通过病毒侵染在大鼠原代皮层神经元中表达 rNTS0.5 探针,通过外源添加不同浓度的神经降压素,可以观察到加入饱和浓度的神经降压素后可以观察到神经元胞体表面的细胞膜(图 3-3a),说明探针的膜定位状况较好,并且在胞体中有较少的堆积。同时,可以观察到探针的最大荧光响应约为 400-500%(图 3-3b)。类似的,对 rNTS0.5 测定药物浓度反应曲线,拟合得到神经降压素对 rNTS0.5 的半最大效应浓度约为 18 nM(图 3-3c)。以上结果说明 rNTS0.5 具有较好的膜定位、亲和力及反应幅度,有进一步应用的潜力。





a.rNTS0.5 在原代皮层神经元的表达,响应及伪彩图。比例尺:20 μm。b.rNTS0.5 在 神经元中亮度及反应的统计结果,显示的数据来自于3个玻片的共计90个 ROI。c.rNTS0.5 在神经元中对神经降压素的亲和力。

通过 mini G assay 检查探针是否会招募 G 蛋白并激活相关下游信号通路。由于野生型 NTSR1 可以招募 Gs、Gi/o 及 Gq 三种 G 蛋白,因此对三种相关的信号通路均进行了检测。可以观察到,加入不同浓度激动剂后,相比野生型 NTSR1,rNTS0.5 对三种 G 蛋白均不显示可检测到的招募(图 3-4b)。





#### 图 3-4 对 rNTS0.5 招募 G 蛋白的检测

a. mini-G assay 原理示意图。激活的 GPCR 招募 G 蛋白,使得分裂荧光素酶的 N、C 端互 补形成有催化活性的完整荧光素酶。b. rNTS0.5 mini G assay 的统计结果及拟合得到的野生 型 NTSR1 的表征亲和力。rNTS0.5 对三种 G 蛋白均不显示可检测到的招募。

通过 TANGO assay 检查探针是否会招募 β-arrestin 并激活相关下游信号通路。可以观察到,当加入饱和浓度激动剂(1μM NTS)后,相对于野生型 NTSR1, rNTS0.5 对 β-arrestin 几乎不显示可检测到的招募。此外,在同时表达 NTSR1 和 rNTS0.5 的细胞中检测到的信号 强度与只表达 NTSR1 的细胞中的信号强度不显示统计学差异,因此可以认为 rNTS0.5 探针 的表达对 NTSR1 介导的正常信号通路并没有显著的抑制效果(图 3-5b)。





a.TANGO assay 原理示意图。激活的 GPCR 招募 β-arrestin,其上的 TEV 特异性切割 GPCR C 端后的位点并释放转录因子 tTA。tTA 进入细胞核内诱导报告基因表达。 b. rNTS0.5 TANGO assay 实验结果。rNTS0.5 对 β-arrestin 不显示可检测到的招募,同时对 NTSR1 招募 β-arrestin 不显示显著的抑制。



### 第四章 红色催产素探针的开发

#### 4.1 插入荧光模块选择及插入位点筛选

催产素只有一种天然受体,即OXTR。因此对于红色催产素探针,类似的,最初尝试了 将rDA1m cpmApple 插入人源受体 human OXTR 的 ICL3,构建了含有 100 种可能性的文库 并进行筛选,但并未获得可重复且有高于 20%反应的候选突变体(图 4-1a)。在牛源受体 bovine OXTR 中插入 rDA1m 的尝试同样没有获得好的结果(图 4-1b)。这提示我们,构象变 化在从 GPCR 传递到荧光模块的过程可能受到一定阻碍。而在构象传递过程中最为关键的 组分是受体骨架和荧光模块之间的连接肽段,因此为了解决这个问题,对当时实验室已经成 功开发的其他红色探针的受体骨架和 OXTR 进行了同源性分析,注意到腺苷受体 A2AR 和 OXTR 有较高的同源性(图 4-1c)。因此,将红色腺苷受体带有的荧光模块连同附近的连接 肽段(即 RRQL-cpmApple-LQ)整体插入到牛源受体 bovine OXTR 中,通过类似的构建含 有 100 种可能性的文库,筛选获得了反应幅度约在 20%的数个候选突变体(图 4-1c)。基于 这些候选突变体的测序结果,设计了含有 140 种可能性的插入位点微调文库,进一步获得了 有相似反应和最大亮度的一个候选突变体(图 4-1d)。

#### 4.2 连接肽段优化

由于上文获得了四种表现非常相似的候选突变体,而同时对它们进行所有连接肽段的点 突变将会带来巨大的工作量,因此我从其中挑选了反应幅度和最大亮度略好的两种候选突变 体(插入位点分别为<R5.70, I6.26>及<A5.75, I6.26>)(图 4-1e),对临近的 GPCR 上的连接 肽段进行平行的点突变和筛选,结果在以插入位点为<A5.75, I6.26>的候选突变体为模板的 文库中,筛选到反应幅度有一定提升的候选突变体<A5.75, I6.26-A5.74V>,命名为 rOXT0.1。 类似的,以其为模板在连接肽段区域进行随机点突变并筛选对提升反应幅度和最大亮度有益 的点突变,在经历三轮点突变的积累后获得红色催产素探针 rOXT0.3。









a, b. 向 human OXTR(a)和 bovine OXTR(b)中插入 rDA1m cpmApple 的位点选择及重复结果。红色显示 N 端位点,蓝色显示 C 端位点,之间的序列由 cpmApple 代替。虽然可重复的最大反应均未超过 20%,但相对而言 bovine OXTR 能获得较好的突变体,因此后续的尝试基于 bovine OXTR。c. 已有红色探针的 GPCR 骨架与 OXTR 的同源性分析,及向 bovine OXTR 中插入带有来自 rAdo1.0 的连接肽段的 cpmApple 的重复结果。d. 插入位点微调文 库的设计及重复结果。红色、蓝色显示插入位点,黄色显示文库的位点选择。e. 对候选突变体<R5.70, I6.26>和<A5.75, I6.26>进行随机点突变的位点选择与筛选结果。红色和蓝色分别显示 N 端和 C 端进行随机突变的位点。f. 红色催产素探针不同版本的序列对比。g. 红色 催产素探针的筛选过程及相对最大反应。图中的反应大小为相对于 rOXT0.1 的值,即认为 rOXT0.1 的相对反应为 1。

#### 4.3 红色催产素探针的体外刻画

通过 PEI 转染在 HEK293T 细胞中表达 rOXT0.3 探针。通过外源添加不同浓度的催产素,观察到探针在 HEK293T 细胞中有较好的上膜(图 4-2a);同时可以观察到探针的最大荧光响应约为 100%(图 4-2b);对 rOXT0.3 测定药物浓度-反应曲线,拟合得到催产素对 rOXT0.3 的半最大效应浓度约为 35 nM(图 4-2c)。以上结果说明 rOXT0.3 具有较好的膜定

第 16 页 共 25 页



位,但其亲和力、反应幅度及最大亮度还有待进一步提升。



图 4-2 红色催产素探针在 HEK293T 细胞中的刻画

a. rOXT0.3 在 HEK239T 中的表达,响应及伪彩图。EGFP-CAAX 为定位在细胞膜上与 rOXT0.3 共表达的 EGFP,用于圈选细胞膜。比例尺: 20 um。b. rOXT0.3 在 HEK293T 中 亮度(左)及反应(右)的统计结果,相对亮度显示为 rOXT0.3 的绝对荧光强度与共表达 的 EGFP 的绝对荧光强度的比值。数据来自 7 个细胞孔。 c. rOXT0.3 在 HEK239T 中对神 经降压素的亲和力。



### 第五章 讨论与展望

本文中涉及的工作主要是以 GPCR 为基础,分别开发了针对神经降压素和催产素两种 神经肽的基因编码的红色荧光探针,并对两种探针的表达、上膜情况、亮度、反应幅度、亲 和力和下游信号激活在体外培养的细胞和神经元中进行了初步的刻画。

实验结果显示,红色神经降压素探针 rNTS0.5 在 HEK293T 细胞和皮层神经元上均能达 到超过 400%的最大荧光响应,其在两种表达体系下的亲和力均在 10-20 nM 之间,同时对涉 及 Gs、Gi/o、Gq/11 蛋白和 β-arrestin 的下游信号均无显著的激活。红色催产素探针 rOXT0.3 在 HEK293T 细胞上的最大荧光响应约为 100%,亲和力约为 35 nM。本文中所开发的工具 为研究神经肽在中枢神经系统中的释放、传播和作用过程,尤其是基于多色成像同时研究不 同种类的神经递质并阐明其相互作用提供了有力的工具,指明了现有探针进一步优化的方 向,也为更多种类神经肽探针的开发提供了一定指导。

#### 5.1 神经降压素及催产素红色荧光探针的优化方向

对于红色神经降压素探针,从上文所述实验结果,可以认为rNTS0.5 探针的反应幅度、 最大亮度、亲和力和下游通路激活都较为理想,有潜力应用于活体中神经降压素释放的检测; 然而对于高度不可预测且随时处于变化之中的活体环境,通过成像的方式获取信息要求探针 本身具有极高的信噪比,而进一步要求探针具有更大的信号;因此,下一步可以基于 cpmApple 荧光模块本身的优化,进一步提升 rNTS0.5 的荧光响应幅度。在应用于活体中, 如果发现更多的问题,例如亲和力和响应范围不适合于在体检测,也应当进行进一步的优化。 对于 rNTS0.5 探针本身,也有必要刻画更多的性质,例如对不同配体响应的选择性,对不同 种类拮抗剂的响应,配体结合和解离的动力学,探针在单光子和双光子下的光谱特性等。

对于红色催产素探针,除了上文提及的在亲和力、反应幅度和最大亮度上进行进一步优 化并刻画各项药理学、动力学及光谱学性质以外,另一个可能的优化方向是对配体的选择性。 在活体中,野生型 OXTR 除了响应催产素,对另一种具有相似结构的神经肽——精氨加压 素也有一定的应答。事实上,精氨加压素和催产素在功能上也具有许多交互和异同,例如二 者都会促进社交记忆和亲密关系的形成;但对于社交压力,二者则起到相反的作用<sup>[82]</sup>。因此, 探究催产素和精氨加压素在不同生理活动下的释放和作用机制将是十分重要而有趣的科学 问题。由于 rOXT0.3 是基于 OXTR 开发,而探针往往会继承 GPCR 骨架的药理学性质,因 此有理由相信 rOXT0.3 在此阶段对催产素和精氨加压素的选择性并不理想。为了改善红色 催产素探针的配体选择性,可以参考受体与配体结合的结构信息<sup>[83]</sup>,对涉及配体结合袋的位 点进行突变,进一步说,可以在探针的 OXTR 骨架区域对只与精氨加压素有互作而不影响 催产素结合的位点进行随机点突变,以期获得只对催产素有响应而对精氨加压素不响应或只 有极低响应的催产素探针。

#### 5.2 神经降压素及催产素红色荧光探针的应用前景

本文中所开发的基于 GPCR 激活的红色 GRAB 探针拥有亚秒级的时间分辨率和较好的 空间分辨率,使得在活体中以高时空分辨率进行细胞特异性神经肽释放和作用过程的检测 成为可能。除了红色荧光蛋白固有的更低的自发荧光、更低的光毒性和更好的组织穿透性等 优点,扩展荧光探针的光谱也有助于我们进行不同光谱多种光学工具的联用,进而对复杂的

第 18 页 共 25 页



生理过程获得更深入的了解。对于神经降压素,可以利用红色神经降压素探针和绿色多巴胺 探针进行联合成像,观察神经降压素能神经元和多巴胺能神经元之间的相互作用并解析神 经降压素对多巴胺能神经元活性的调控机制;或是研究睡眠觉醒过程中神经降压素和 GABA 等经典神经递质如何共同调控睡眠行为,以及二者之间的关系。对于催产素,除了仅 观察某些生理活动(例如母性行为和哺乳)过程中催产素的释放和作用,如上文所述,可以 通过与绿色精氨加压素探针联用,观察二者在同一生理过程(例如社交压力)的过程中的相 互作用和各自对其他神经元的调控。随着研究工具的开发和优化,我们有希望研究更多复杂 但有趣的生理问题,为解答神经活动中神经肽的参与和作用提供更多证据和线索。



参考文献

[1] De wied D,De wied D. Peptide Hormones and Neuropeptides: Birds of a Feather[J]. Trends in Neurosciences, 2000, 23(3): 113-113.

[2] Moulard M, Achstetter T, Kieny M, et al. Kex2p - a Model for Cellular Endoprotease

Processing Human-immunodeficiency-virus Type-1 Envelope Glycoprotein Precursor[J]. European Journal of Biochemistry, 1994, 225(2): 565-572.

[3] Fatt P,Katz B,Fatt P, et al. Spontaneous Subthreshold Activity at Motor Nerve Endings[J]. Journal of Physiology-london, 1952, 117(1): 109-128.

[4] Islam, MS;. Advances in Experimental Medicine and Biology[C], 2012.

[5] Gustavsson N,Lao Y,Maximov A, et al. Impaired Insulin Secretion and Glucose Intolerance in Synaptotagmin-7 Null Mutant Mice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(10): 3992-3997.

[6] Gustavsson N,Wei S,Hoang D, et al. Synaptotagmin-7 Is a Principal Ca2+ Sensor for Ca2+induced Glucagon Exocytosis in Pancreas[J]. Journal of Physiology-london, 2009, 587(6): 1169-1178.

[7] Vacher H,Mohapatra D,Trimmer J, et al. Localization and Targeting of Voltage-dependent Ion Channels in Mammalian Central Neurons[J]. Physiological Reviews, 2008, 88(4): 1407-1447.

[8] Wersinger S,Ginns E,O'carrol A, et al. Vasopressin V1b Receptor Knockout Reduces Aggressive Behavior in Male Mice[J]. Molecular Psychiatry, 2002, 7(9): 975-984.

[9] De lecea L,Kilduff T,Peyron C, et al. The Hypocretins: Hypothalamus-specific Peptides with Neuroexcitatory Activity[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(1): 322-327.

[10] Sakurai T,Amemiya A,Ishii M, et al. Orexins and Orexin Receptors: a Family of Hypothalamic Neuropeptides and G Protein-coupled Receptors That Regulate Feeding Behavior[J]. Cell, 1998, 92(4): 573-585.

[11] Chemelli R,Willie J,Sinton C, et al. Narcolepsy in Orexin Knockout Mice: Molecular Genetics of Sleep Regulation[J]. Cell, 1999, 98(4): 437-451.

[12] Peyron C,Faraco J,Rogers W, et al. A Mutation in a Case of Early Onset Narcolepsy and a Generalized Absence of Hypocretin Peptides in Human Narcoleptic Brains[J]. Nature Medicine, 2000, 6(9): 991-997.

[13] Carraway R, Leeman S, Carraway R, et al. Isolation of a New Hypotensive Peptide, Neurotensin, From Bovine Hypothalami[J]. Journal of Biological Chemistry, 1973, 248(19): 6854-6861.

[14] Bissette G,Nemeroff C,Loosen P, et al. Hypothermia and Intolerance to Cold Induced By Intracisternal Administration of Hypothalamic Peptide Neurotensin[J]. Nature, 1976, 262(5569): 607-609.

[15] Borroto-escuela D,Ravani A,Tarakanov A, et al. Dopamine D2 Receptor Signaling Dynamics of Dopamine D2-neurotensin 1 Receptor Heteromers[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013, 435(1): 140-146.



[16] Jomphe C, Lemelin P, Okano H, et al. Bidirectional Regulation of Dopamine D2 and Neurotensin Nts1 Receptors in Dopamine Neurons[J]. European Journal of Neuroscience, 2006, 24(10): 2789-2800.

 [17] Piccart E, Courtney N, Branch S, et al. Neurotensin Induces Presynaptic Depression of D-2 Dopamine Autoreceptor-mediated Neurotransmission in Midbrain Dopaminergic Neurons[J].
 Journal of Neuroscience, 2015, 35(31): 11144-11152.

[18] Feng Y, Wang J, Dong Y, et al. The Roles of Neurotensin and Its Analogues in Pain[J]. Current Pharmaceutical Design, 2015, 21(7): 840-848.

[19] Dobner P,Dobner PR. Neurotensin and Pain Modulation[J]. Peptides, 2006, 27(10): 2405-2414.

[20] Smith K,Boules M,Williams K, et al. Nts1 and Nts2 Mediate Analgesia Following Neurotensin Analog Treatment in a Mouse Model for Visceral Pain[J]. Behavioural Brain Research, 2012, 232(1): 93-97.

[21] Ma C,Zhong P,Liu D, et al. Sleep Regulation By Neurotensinergic Neurons in a Thalamoamygdala Circuit[J]. Neuron, 2019, 103(2): 0-323.

[22] Kendrick K,Dacosta A,Broad K, et al. Neural Control of Maternal Behaviour and Olfactory Recognition of Offspring[J]. Brain Research Bulletin, 1997, 44(4): 383-395.

[23] Williams J,Insel T,Harbaugh C, et al. Oxytocin Administered Centrally Facilitates Formation of a Partner Preference in Female Prairie Votes (microtus-ochrogaster)[J]. Journal of Neuroendocrinology, 1994, 6(3): 247-250.

[24] Burgus R,Dunn T,Desiderio D, et al. Molecular Structure of Hypothalamic Hypophysiotropic Trf Factor of Ovine Origin . Mass Spectrometric Evidence of Pca-his-pro-nh2 Sequence[J].

Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences Serie D, 1969, 269(19): 0-1870.

[25] Hummon A,Richmond T,Verleyen P, et al. From the Genome to the Proteome: Uncovering Peptides in the Apis Brain[J]. Science, 2006, 314(5799): 647-649.

[26] Predel R,Wegener C,Russell W, et al. Peptidomics of Cns-associated Neurohemal Systems of Adult Drosophila Melanogaster: a Mass Spectrometric Survey of Peptides From Individual Flies[J]. Journal of Comparative Neurology, 2004, 474(3): 379-392.

[27] Romanova E,Roth M,Rubakhin S, et al. Identification and Characterization of Homologues of Vertebrate Beta-thymosin in the Marine Mollusk Aplysia Californica[J]. Journal of Mass Spectrometry, 2006, 41(8): 1030-1040.

[28] Bora A, Annangudi S, Millet L, et al. Neuropeptidomics of the Supraoptic Rat Nucleus[J]. Journal of Proteome Research, 2008, 7(11): 4992-5003.

[29] Sturm RM, Dowell JA, Li L. 图书题名缺失 [M]: Humana Press, 2010: 217-226.

[30] Brockmann A, Annangudi S, Richmond T, et al. Quantitative Peptidomics Reveal Brain Peptide Signatures of Behavior[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(7): 2383-2388.

[31] Che F,Vathy I,Fricker L, et al. Quantitative Peptidomics in Mice - Effect of Cocaine Treatment[J]. Journal of Molecular Neuroscience, 2006, 28(3): 265-275.

[32] Kendrick K. Microdialysis Measurement of in Vivo Neuropeptide Release[J]. Journal of Neuroscience Methods, 1990, 34(1): 35-46.

[33] Wigger A, Neumann I, Wigger A, et al. Endogenous Opioid Regulation of Stress-induced Oxytocin Release Within the Hypothalamic Paraventricular Nucleus Is Reversed in Late



Pregnancy: a Microdialysis Study[J]. Neuroscience, 2002, 112(1): 121-129.

[34] Merali Z, Hayley S, Kent P, et al. Impact of Repeated Stressor Exposure on the Release of Corticotropin-releasing Hormone, Arginine-vasopressin and Bombesin-like Peptides at the Anterior Pituitary[J]. Behavioural Brain Research, 2009, 198(1): 105-112.

[35] Authement M,Langlois L,Shepard R, et al. A Role for Corticotropin-releasing Factor Signaling in the Lateral Habenula and Its Modulation By Early-life Stress[J]. Science Signaling, 2018, 11(520).

[36] Hunt A,Dasgupta R,Rajamanickam S, et al. Paraventricular Hypothalamic and Amygdalar Crf Neurons Synapse in the External Globus Pallidus[J]. Brain Structure & Function, 2018, 223(6): 2685-2698.

[37] Duggan A, Duggan A. Detection of Neuropeptide Release in the Central-nervous-system with Antibody Microprobes[J]. Journal of Neuroscience Methods, 1990, 34(1): 47-52.

[38] Schaible H,Jarrott B,Hope P, et al. Release of Immunoreactive Substance-p in the Spinal-cord During Development of Acute Arthritis in the Knee-joint of the Cat - a Study with Antibody Microprobes[J]. Brain Research, 1990, 529(1): 214-223.

[39] Steagall R,Sipe A,Williams C, et al. Substance P Release in Response to Cardiac Ischemia From Rat Thoracic Spinal Dorsal Horn Is Mediated By Trpv1[J]. Neuroscience, 2012, 214: 106-119.

[40] Burke N,Han W,Li D, et al. Neuronal Peptide Release Is Limited By Secretory Granule Mobility[J]. Neuron, 1997, 19(5): 1095-1102.

[41] Lang T,Wacker I,Steyer J, et al. Ca2+-triggered Peptide Secretion Neurotechnique in Single Cells Imaged with Green Fluorescent Protein and Evanescent-wave Microscopy[J]. Neuron, 1997, 18(6): 857-863.

[42] Xia X,Lessmann V,Martin T, et al. Imaging of Evoked Dense-core-vesicle Exocytosis in Hippocampal Neurons Reveals Long Latencies and Kiss-and-run Fusion Events[J]. Journal of Cell Science, 2009, 122(1): 75-82.

[43] Gaffield M,Betz W,Gaffield MA, et al. Imaging Synaptic Vesicle Exocytosis and Endocytosis with Fm Dyes[J]. Nature Protocols, 2006, 1(6): 2916-2921.

[44] Gubernator N,Zhang H,Staal R, et al. Fluorescent False Neurotransmitters Visualize Dopamine Release From Individual Presynaptic Terminals[J]. Science, 2009, 324(5933): 1441-1444.

[45] Lee M,Gubernator N,Sulzer D, et al. Development of Ph-responsive Fluorescent False Neurotransmitters[J]. Journal of the American Chemical Society, 2010, 132(26): 0-8828.
[46] Miesenbock G,De angelis D,Rothman J, et al. Visualizing Secretion and Synaptic Transmission with Ph-sensitive Green Fluorescent Proteins[J]. Nature, 1998, 394(6689): 192-195.
[47] Sankaranarayanan S,De angelis D,Rothman J, et al. The Use of Phluorins for Optical Measurements of Presynaptic Activity[J]. Biophysical Journal, 2000, 79(4): 2199-2208.

[48] Li Y,Tsien R,Li Y, et al. Phtomato, a Red, Genetically Encoded Indicator That Enables

Multiplex Interrogation of Synaptic Activity[J]. Nature Neuroscience, 2012, 15(7): 1047-1053.

[49] Mahon MJ. Phluorin2: an Enhanced, Ratiometric, Ph-sensitive Green Florescent Protein.[J]. Advances in Bioscience and Biotechnology (print), 2011, 2(3).

[50] Rodriguez P,Pereira D,Borgkvist A, et al. Fluorescent Dopamine Tracer Resolves Individual Dopaminergic Synapses and Their Activity in the Brain[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(3): 870-875.



[51] Shen Y,Rosendale M,Campbell R, et al. Phuji, a Ph-sensitive Red Fluorescent Protein for Imaging of Exo- and Endocytosis[J]. Journal of Cell Biology, 2014, 207(3): 419-432.
[52] Tantama M,Hung Y,Yellen G, et al. Imaging Intracellular Ph in Live Cells with a Genetically Encoded Red Fluorescent Protein Sensor[J]. Journal of the American Chemical Society, 2011, 133(26): 10034-10037.

[53] Rao S,Lang C,Levitan E, et al. Visualization of Neuropeptide Expression, Transport, and Exocytosis in Drosophila Melanogaster[J]. Journal of Neurobiology, 2001, 49(3): 159-172.

[54] Lee D,Creed M,Jung K, et al. Temporally Precise Labeling and Control of Neuromodulatory Circuits in the Mammalian Brain[J]. Nature Methods, 2017, 14(5): 0-495.

[55] Kim M,Wang W,Sanchez M, et al. Time-gated Detection of Protein-protein Interactions with Transcriptional Readout[J]. Elife, 2017, 6.

[56] Inagaki H,De-leon S,Wong A, et al. Visualizing Neuromodulation in Vivo: Tango-mapping of Dopamine Signaling Reveals Appetite Control of Sugar Sensing[J]. Cell, 2012, 148(3): 583-595.

[57] Katow H,Takahashi T,Saito K, et al. Tango Knock-ins Visualize Endogenous Activity of G
Protein-coupled Receptors in Drosophila[J]. Journal of Neurogenetics, 2019, 33(2): 44-51.
[58] Mignocchi N,Krüssel S,Jung K, et al. Development of a Genetically-encoded Oxytocin
Sensor[J]. Biorxiv, 2020: 2020.

[59] Nguyen Q,Schroeder L,Mank M, et al. An in Vivo Biosensor for Neurotransmitter Release and in Situ Receptor Activity[J]. Nature Neuroscience, 2010, 13(1): 0-127.

[60] Muller A,Joseph V,Slesinger P, et al. Cell-based Reporters Reveal in Vivo Dynamics of Dopamine and Norepinephrine Release in Murine Cortex[J]. Nature Methods, 2014, 11(12): 0-1245.

[61] Lacin E,Muller A,Fernando M, et al. Construction of Cell-based Neurotransmitter Fluorescent Engineered Reporters (cnifers) for Optical Detection of Neurotransmitters in Vivo[J]. Jove-journal of Visualized Experiments, 2016(111).

[62] Offermanns S,Simon M,Offermanns S, et al. G-alpha(15) and G-alpha(16) Couple a Wide Variety of Receptors to Phospholipase-c[J]. Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(25): 15175-15180.

[63] Vilardaga J,Bunemann M,Krasel C, et al. Measurement of the Millisecond Activation Switch of G Protein-coupled Receptors in Living Cells[J]. Nature Biotechnology, 2003, 21(7): 807-812.

[64] Baird G,Zacharias D,Tsien R, et al. Circular Permutation and Receptor Insertion Within Green Fluorescent Proteins[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(20): 11241-11246.

[65] Topell S,Hennecke J,Glockshuber R, et al. Circularly Permuted Variants of the Green Fluorescent Protein[J]. Febs Letters, 1999, 457(2): 283-289.

[66] Akerboom J,Rivera J,Guilbe M, et al. Crystal Structures of the Gcamp Calcium Sensor Reveal the Mechanism of Fluorescence Signal Change and Aid Rational Design[J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(10): 6455-6464.

[67] Marvin J,Borghuis B,Tian L, et al. An Optimized Fluorescent Probe for Visualizing Glutamate Neurotransmission[J]. Nature Methods, 2013, 10(2): 162-170.

[68] Hefendehl J,Ledue J,Ko R, et al. Mapping Synaptic Glutamate Transporter Dysfunction in Vivo to Regions Surrounding Ab Plaques By Iglusnfr Two-photon Imaging[J]. Nature Communications, 2016, 7.

[69] Xie Y, Chan A, Mcgirr A, et al. Resolution of High-frequency Mesoscale Intracortical Maps



Using the Genetically Encoded Glutamate Sensor Iglusnfr[J]. Journal of Neuroscience, 2016, 36(4): 1261-1272.

[70] Wu J,Abdelfattah A,Zhou H, et al. Genetically Encoded Glutamate Indicators with Altered Color and Topology[J]. Acs Chemical Biology, 2018, 13(7): 1832-1837.

[71] Jing M,Zhang P,Wang G, et al. A Genetically Encoded Fluorescent Acetylcholine Indicator for in Vitro and in Vivo Studies[J]. Nature Biotechnology, 2018, 36(8): 0-726.

[72] Jing M,Li Y,Zeng J, et al. An Optimized Acetylcholine Sensor for Monitoring in Vivo Cholinergic Activity[J]. Nature Methods, 2020, 17(11): 0-1139.

[73] Sun F,Zeng J,Jing M, et al. A Genetically Encoded Fluorescent Sensor Enables Rapid and Specific Detection of Dopamine in Flies, Fish, and Mice[J]. Cell, 2018, 174(2): 0-481.

[74] Sun F,Zhou J,Dai B, et al. Next-generation Grab Sensors for Monitoring Dopaminergic Activity in Vivo[J]. Nature Methods, 2020, 17(11): 0-1156.

[75] Feng J,Zhang C,Lischinsky J, et al. A Genetically Encoded Fluorescent Sensor for Rapid and Specific in Vivo Detection of Norepinephrine[J]. Neuron, 2019, 102(4): 0-745.

[76] Wan J,Peng W,Li X, et al. A Genetically Encoded Sensor for Measuring Serotonin Dynamics[J]. Nature Neuroscience, 2021, 24(5): 0-746.

[77] Peng W,Wu Z,Song K, et al. Regulation of Sleep Homeostasis Mediator Adenosine By Basal Forebrain Glutamatergic Neurons[J]. Science, 2020, 369(6508): 0-1208.

[78] Gross L,Baird G,Hoffman R, et al. The Structure of the Chromophore Within Dsred, a Red Fluorescent Protein From Coral[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(22): 11990-11995.

[79] Zhao Y,Araki S,Jiahui W, et al. An Expanded Palette of Genetically Encoded Ca2+ Indicators[J]. Science, 2011, 333(6051): 1888-1891.

[80] Akerboom J,Calderon N,Tian L, et al. Genetically Encoded Calcium Indicators for Multicolor Neural Activity Imaging and Combination with Optogenetics[J]. Frontiers in Molecular Neuroscience, 2013, 6.

[81] Shen Y,Dana H,Abdelfattah A, et al. Additional File 9: of a Genetically Encoded Ca2+ Indicator Based on Circularly Permutated Sea Anemone Red Fluorescent Protein Eqfp578[Z], 2018.

[82] Meyer-lindenberg A,Domes G,Kirsch P, et al. Oxytocin and Vasopressin in the Human Brain: Social Neuropeptides for Translational Medicine[J]. Nature Reviews Neuroscience, 2011, 12(9): 524-538.

[83] Waltenspuehl Y,Schoeppe J,Ehrenmann J, et al. 6tpk: Crystal Structure of the Human Oxytocin Receptor[Z], 2020.



### 致谢

毕业在即,我不久就要结束本科阶段的学习,开始博士阶段的深造。感谢我的所有本科 老师:专业课老师优秀的专业素养使我受益匪浅,我从课堂上获取到的专业知识更是我今后 开展研究工作的基石。选修课老师的授课则极大拓宽了我的视野,在我远离自我的空虚和无 趣的过程中给了我极大的帮助。我也从他们的为人处世中看到了自己未来应成为怎样的人。 赵心清教授和马钢老师对我开展本科阶段的学术研究提供了无可替代的环境,他们的指导和 建议更使我受益匪浅。

对于即将开始的博士生活,我首先要感谢本文的指导教师、我未来的博士生导师李毓龙 教授,是李老师给了我机会使我在一个充满思维活力和研究激情的极其良好的科研环境中从 事我感兴趣的研究。李老师在科研思路上的指导使我的工作不断进步,李老师对科研不容置 疑的全身心投入更是我学习的对象。还要感谢实验室师兄师姐对我的照顾和提携,尤其感谢 带我入门的卓一洲师姐,是她的耐心指导和严格要求使我成为了一个也许勉强合格的博士零 年级学生。在实验过程中,感谢郑宇师兄在分子克隆上分享给我的小技巧;感谢蔡儒仪师兄 教我激光共聚焦成像以及实验数据的处理;感谢武照伐博士教我小鼠大脑解剖以及原代神经 元的培养;感谢王欢师姐,她开发的绿色神经肽探针是本文工作重要的基础;感谢李柏翰同 学、胡艺馨同学和刘灿同学,和他们的讨论不仅使我学习到了许多资源管理和信息获取的技 巧,更使我看到身边的优秀同龄人在科研上的投入和付出。感谢易馨阳同学、王嘉琪同学、 王蕾师姐和鄢羽岐同学,她们的陪伴和帮助是我顺利完成这段时间科研工作的重要条件。也 感谢实验室其他师兄师姐和同学们做出的重要工作和日常的支持,对我的研究顺利进行都有 所帮助。

当然,我还要感谢我的父亲杨红念和母亲王卫宁,是他们教育我成为一个追求优秀、理 智而正直的人,他们对我完全不计条件的物质资助和精神支持是我科研的有力后盾和进步的 永远动力。还要感谢我的朋友们,尤其是我最好的朋友陈雪雁和曾砚清,和她们成为朋友可 能在将来成为我一生的财富。

最后,希望我在未来博士阶段的学习和生活中,能够更加努力、更加专注,在自己喜欢 的方向做出对人类知识真正有益的贡献。



## DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF RED SENSORS FOR *IN VIVO* NEUROPEPTIDE DETECTION WITH HIGH SPATIAL AND TEMPORAL RESOLUTION

The nervous system is evolutionally critical for animals to maintain homeostasis and react rapidly to the fast-changing environment. In the mammalian central nervous system, billions of interconnected neurons control a wide range of key physiological processes, from basic sensation, motor control and circadian rhythm to higher brain cognitive functions such as learning, memory, decision-making, social behavior and self-awareness. Neuronal communication largely relies on chemical synaptic transmission, where neurochemicals are released from presynaptic neurons and act on targeted cells. In addition to classic small molecule neurotransmitters including amino acids and monoamines, there is also an important class of neurochemicals called neuropeptides.

Neuropeptides are secretory polypeptides that play regulatory roles in the nervous system. These peptides are generally composed of 3-50 amino acids, and are stored in dense core vesicles in synaptic terminals. Upon increase in cytosolic calcium, neuropeptides are released through exocytosis into the extracellular space, where they are sensed by membrane receptors that are usually GPCR to exert various effects or act on distant neurons by volume transmission. Classic neurotransmitters usually act on postsynaptic ionotropic channels, while the majority of neuropeptide receptors is constituted of G protein-coupled receptors (GPCRs). Additionally, the mechanism of neuropeptide release and regulation are distinct from those of small molecule neurotransmitters, which are packed in small clear vesicles, but in some cases they are also co-released. Neuropeptides are widely involved in many physiological processes, and their dysregulation could lead to many pathological conditions.

Neurotensin (NTS) and oxytocin (OXT) are two important neuropeptides. NTS has powerful hypothermia and analgesic functions in the central nervous system, and is involved in sleep regulation. OXT is implicated in regulation of social-related behaviors and the establishment of emotional connections in the central nervous system. Despite their importance, when and where NTS and OXT are released in the brain is largely unknown, nor is clear how their release might be regulated. Therefore, in order to specify how the precise regulation of neuropeptides modulates physiological processes, and how neuropeptide disorders can cause pathological symptoms, it is necessary to develop methods for *in vivo* neuropeptide detection with high temporal and spatial resolution, molecular specificity and sensitivity.

Current methods for neuropeptide detection all have their respective limitations regarding the aforementioned aspects. Microdialysis has high sensitivity and molecular specificity, but lacks both spatial and temporal resolution. Antibody microprobes have relative high sensitivity and chemical specificity depending on the antibodies used for detection and have relatively spatial resolution due to the size of the microprobe tip, but this method cannot reveal the temporal and spatial dynamics of neuropeptides and is therefore difficult to be applied for in vivo studies.



TANGO assay shows high sensitivity but lacks temporal resolution since the time needed for reporter gene expression could range from hours to days. GPCR-FRET based sensors have high spatial and temporal resolution but shows relatively low  $\Delta$ F/F0 and signal to noise ratio. Reporter cell assay exhibits high temporal resolution, but lacks cell type specificity and shows low spatial resolution limited by the size of reporter HEK cells, and is highly invasive for *in vivo* imaging because this method requires the exogenous reporter cell line to be transplanted into the brain.

Compared to those methods mentioned above, optical imaging is widely accepted as a noninvasive, high-throughput method for tracking specific molecules, built upon the foundation of fluorescent probes. Moreover, genetically-encoded optical reporters provide cell-specific expression and transmitter detection, which is essential for monitoring specific neurotransmitters and neuromodulators in the context of the highly complex central nervous system.

Previously, based on the principle of GPCR conformational change upon ligand binding, we have developed a series of GPCR-Activation Based sensors (GRAB sensors) that can meet all these criteria for imaging neurotransmitter dynamics *in vivo* by inserting a circularly permutated GFP (cpGFP) that is conformation-sensitive into naturally evolved G protein-coupled receptors. These green sensors have been proven to be capable of detecting the endogenous neurotransmitter dynamics in physiological relevant settings. With green sensors in hand, red fluorescent sensors are still desired due to their unique advantages. The separated spectrum of red fluorescent proteins from blue and green light assures the compatibility of red sensors with blue-light-excitable channelrhodopsins and also enables multiplex imaging with other green indicators. Red light also exhibits better tissue penetration, less background auto-fluorescence and lower phototoxicity because of longer excitation and emission wavelength, rendering red sensors more suitable for *in vivo* imaging.

In this thesis, by tapping into G protein-coupled receptors and circularly permutated red fluorescent protein cpmApple, I have developed red fluorescent sensors that can detect NTS and OXT, respectively.

The red NTS sensor is based on the human NTSR1 receptor with cpmApple from rDA1m, a previously published red dopamine GRAB sensor. After screening ~900 candidates, I developed rNTS0.5. rNTS0.5 shows more than 400% maximal fluorescent changes in response to exogenous NTS application and an apparent affinity of 10-20 nM when expressed in both cultured human embryonic kidney (HEK) cells and rat primary cortical neurons *in vitro*. rNTS0.5 does not exhibit detectable downstream coupling to G proteins or  $\beta$ -arresin by respectively mini-G luciferase complement assay and TANGO assay.

The red OXT sensor is based on the bovine OXTR receptor with cpmApple from rAdo1.0, an unpublished version of red adenosine GRAB sensor. After screening ~1500 candidates, I developed rOXT0.3. rOXT0.3 shows a maximal fluorescence response of ~ 100% and an affinity of ~ 35 nM on HEK cells.

In the future, these sensors still need to be further optimized and characterized for *in vivo* detection of NTS and OXT dynamics. For the red NTS sensor, its response will be further improved by optimizing the cpmApple fluorescent module. Further characterization involves ligand binding and dissociation kinetics, spectrum of one- photon and two- photon excitation and emission, ligand specificity and pharmacological properties among others. The optimized NTS sensor could be used to record the dynamics of NTS during many physiological processes including pain sensation and sleep-wake cycle, as well as simultaneously study the dynamics and interaction of NTS and other



neurotransmitters/ neuromodulators, for example dopamine, which has been implicated to be regulated by NTS release, by multicolor imaging with other sensors. For the red OXT sensors, apart from the above mentioned optimization and characterization, we also want to improve its selectivity from arginine vasopressin (AVP). AVP is another neuropeptide with similar structure and many functional correlations and crosstalk to OXT, and therefore it is important to distinguish these two neuropeptides and demonstrate their respective dynamics during relevant physiological processes. This can be achieved by mutating sites in the OXTR ligand binding pocket, compromising the binding of AVP while minimally affecting the binding of OXT. The optimized OXT sensor could be used for detecting OXT dynamics during related behaviors like pair bonding, and also enables the simultaneous imaging with other chemicals, most notably AVP.

In short, the red color NTS and OXT sensors developed in this thesis provide promising probes for detecting the dynamics of NTS and OXT in physiological and pathological processes.