

Dok1 与 TrkA 之间相互作用的酵母双杂交研究

刘 翔,张 勇,矫 力,刘秀杰,张照环,王永刚,朱 伟,何 成*

(第二军医大学基础医学部神经生物学教研室,上海 200433)

[摘要] **目的:**研究 downstream of kinases1(dok1)与 TrkA 之间的相互作用,寻找 TrkA 的可能底物或调控蛋白,以深入认识 TrkA 下游信号转导机制。**方法:**将 TrkA 胞内域与 LexA 蛋白融合作为 DNA 结合蛋白,分别将 dok1、dok1PTB 及 dok1 Δ PTB 与 B42AD 蛋白融合作为激活域蛋白,共转化酵母菌后,通过 β -半乳糖苷酶活性检测以及氨基酸营养缺陷生长实验分析它们之间的相互作用。**结果:**dok1 及 dok1PTB 与 TrkA 之间在酵母中存在结合,而 dok1 Δ PTB 不与 TrkA 结合。**结论:**证实 TrkA 与 dok1 之间具有相互作用,dok1 的 PTB 结构域在介导此相互作用的过程中非常重要。

[关键词] TrkA;Dok1;酵母双杂交

[中图分类号] Q 257 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)05-0497-03

Interaction between downstream of kinases 1 and TrkA: a yeast two-hybrid approach

LIU Xuan, ZHANG Yong, JIAO Li, LIU Xiu-jie, ZHANG Zhao-huan, WANG Yong-gang, ZHU Wei, HE Cheng* (Department of Neurobiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the interaction between TrkA and downstream of kinases 1(dok 1) and search for the possible intracellular substrates or regulatory proteins of TrkA, so as to better understand the mechanism of downstream signal transduction of TrkA. **Methods:** The TrkA^{IC} (intracellular domain of TrkA) was fused with LexA and the product was used as a DNA-binding domain protein; dok1, dok1PTB and dok1 Δ PTB (dok1 without PTB) were separately fused with B42AD and their products were used as activation domain protein. Cotransformants were subjected to β -galactosidase activity analysis and leucine medium growth analysis for understanding of their interaction. **Results:** Dok1 and dok1PTB interacted with TrkA in yeast, while dok1 Δ PTB did not. **Conclusion:** It is confirmed that TrkA can interact with dok1 in yeast, and the interaction may be mediated by PTB domain of dok1.

[KEY WORDS] TrkA;Dok1;yeast two-hybrid

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(5): 497-499]

神经生长因子(NGF)是最早发现的神经营养因子,也是神经生长因子家族的典型代表。NGF 不仅在胚胎期及成熟发育期对神经细胞的存活、生长及分化具有明显的调节作用,而且还参与神经损伤后的再生和功能修复^[1]。NGF 通过与体内细胞表面的相应受体结合,由受体介导胞内信号转导而发挥其生物学效应。目前已知神经生长因子受体依其结合能力强弱分为高亲和力受体 TrkA 和低亲和力受体 p75NTR 两种,而 NGF 生物学效应主要由 TrkA 介导。

TrkA 受体相对分子质量为 140 000,其本质是一种跨膜糖蛋白,含胞外域、跨膜段和胞内域三个部分,其中胞内域具有酪氨酸激酶活性,与许多其他的受体酪氨酸激酶类似,依赖于 TrkA 的信号通路以配体结合受体后受体形成稳定的二聚体作为起始。当 TrkA 受体被 NGF 激活后,受体胞内域中酪氨酸激酶区呈现活性,胞内域中特定的酪氨酸位点将发生自磷酸化,进一步通过下游结合分子的介导发生

一系列信号级联反应,从而激活磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)、有丝分裂原活化的蛋白激酶(MAPK)和磷脂酶 C γ (PLC γ)等,最终引起神经细胞的分化和存活等生物学效应^[1]。

然而,这些经典的信号转导途径,无法完全解释这一家族不同成员的特异作用。例如,NGF、NT-3 对 cAMP 引起的脊髓神经元生长锥导向转化作用截然不同^[2];BDNF 能够快速激活 Na(V)1.9 亚基参与的钠通道,而 NGF 却没有类似的效应^[3]。因此,寻找胞质内神经营养素的受体的新底物蛋白或调

[基金项目] 国家自然科学基金(30400123,30325022,30570939);上海市青年科技启明星计划基金(05QMX1469);上海市科技发展基金(04XD14004,04DZ14005)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30400123,30325022,30570939), Shanghai Rising Star Program (05QMX1469) and Foundation for Science and Technology Development of Shanghai Municipal Government (04XD14004,04DZ14005)。

[作者简介] 刘 翔,硕士。

* Corresponding author. E-mail:chenghe@online.sh.cn

控蛋白,进而研究其功能及作用机制,将有助于深入认识神经营养素作用的多样性与特异性。

为了探索 NGF 作用于细胞膜受体后的胞内信号转导,我们曾通过酵母双杂交筛选的方法^[4],发现 dok1 的片段可以与 TrkA 在酵母中结合。本实验拟通过酵母双杂交的方法证实 dok1 与 TrkA 在酵母中的相互作用,同时进一步明确 dok1 蛋白中可能是何结构域介导此结合。本研究旨在寻找胞质内 TrkA 受体下游的可能新底物蛋白或调控蛋白,以期深入认识 NGF 作用于神经元后的胞内信号转导机制,并探讨此相互作用在 TrkA 引起神经元分化功能调控中的可能作用。

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌 XL1-Blue、DH5 α 以及酵母菌株 EGY48 均为本实验室保存菌株。限制性内切酶、碱性磷酸酯酶 CIP 和 T₄ DNA 连接酶等购自 Gibco BRL 公司。ExTaq 酶购自 TaKaRa 公司。Pfu-Turbo 酶购自 Merck 公司。X-gal、IPTG 购自 Promega 公司。Tryptone、yeast extract、yeast nitrogen base、yeast nitrogen base w/o amino acids 等均购自 Difco 公司。各种氨基酸、糖类购自上海东风试剂公司。

1.2 分子克隆和基因突变 DNA 限制性内切酶解、大肠杆菌转化条件、大肠杆菌与酵母菌的培养、转化以及质粒抽提、感受态酵母的制备及转化等参照文献^[4,5]及 Clontech LexA Two-hybrid 文库手册^[1]。以 100 ng 质粒 DNA 为模板,在 *pfuUltra* 酶的作用下进行 PCR 反应(条件为 95 $^{\circ}$ C 0.5 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 68 $^{\circ}$ C 16 min, 共 18 个循环),将 PCR 产物进行 *Dpn* I 酶切 1 h,取 10 μ l 酶切产物进行转化,挑菌抽质粒,送上海联众生物公司测序。

1.3 酵母转化子 β -半乳糖苷酶活力的测定 取一张 Whatman 滤纸,覆盖于相应的选择性培养基上(碳源为半乳糖),用灭菌牙签从选择性培养基平板上挑取酵母转化子菌落(直径 1~2 mm)点到滤纸上,30 $^{\circ}$ C 培养 2 d;然后取出小心浸入液氮中(菌落面朝上),约 0.5 min 后取出,置室温几分钟;将滤纸(菌落面朝上)放于用 Z buffer/X-gal 溶液(100 ml Z buffer 中加入 1.67 ml 20 g/L 的 X-gal, 0.27 ml β -巯基乙醇;Z buffer 含 60 mmol/L Na₂HPO₄, 40 mmol/L NaH₂PO₄, 10 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgSO₄)预湿的滤纸上,30 $^{\circ}$ C 培养 0.5~8 h, 检验菌

落是否显蓝色。8 h 内显蓝色的菌落其 β -半乳糖苷酶活性为阳性,未显色的为假阳性。

1.4 Leu⁻生长实验 用灭菌接种环从选择性 SD (Ura⁻, His⁻, Trp⁻)培养基平板上挑取酵母转化子菌落,转接于 Gal SD(Ura⁻, His⁻, Trp⁻, Leu⁻)培养基上,30 $^{\circ}$ C 培养 3~5 d,检验菌落生长状况。菌落能够生长表明酵母转化子内的共转质粒表达蛋白可以相互作用,菌落不能生长表明共转质粒表达蛋白之间没有相互作用。

2 结果

2.1 双杂交质粒的构建 选用 LexA Two-hybrid 系统来研究 dok1 与 TrkA 胞内域之间的相互作用。pGilda 质粒是含有 LexA 的 DNA 结合结构域的穿梭质粒,将 TrkA 的胞内域基因编码区克隆到 pGilda 多克隆位点中,构建成 pGilda-TrkA^{IC}融合蛋白的酵母表达质粒;pB42AD 质粒是含有 B42 的激活结构域的穿梭质粒,将相应 dok1、dok1 PTB(dok1 中的 PTB 结构域)及 dok1 Δ PTB(dok1 缺失 PTB 结构域)的基因编码区克隆到 pB42AD 多克隆位点中,构建成 pB42AD-dok1、dok1 PTB 及 dok1 Δ PTB 融合蛋白的酵母表达质粒,经酶切及测序后确定。

2.2 TrkA 与 dok1 在酵母中的相互作用 将 pGilda-TrkA^{IC}质粒与 pB42AD 或 pB42AD-dok1 质粒分别共转化 EGY48 宿主菌,对共转化子进行 β -半乳糖苷酶活力检测,结果表明 TrkA 胞内域编码区蛋白没有自激活作用,可以用作双杂交反应的诱饵;而且在酵母中 dok1 能够与 TrkA^{IC}结合。

2.3 TrkA 与 dok1 PTB 结构域在酵母中的相互作用 将 pGilda-TrkA^{IC}质粒与 pB42AD-dok1 PTB 或 pB42AD-dok1 Δ PTB 质粒分别共转化 EGY48 宿主菌,对共转化子进行 β -半乳糖苷酶活力检测,以及 SD Gal Ura⁻ His⁻ Trp⁻ Leu⁻ 平板氨基酸缺陷生长实验,结果均表明 dok1 可通过 PTB 结构域与 TrkA^{IC}结合;当 dok1 缺失 PTB 结构域后则不能与 TrkA^{IC}发生相互作用,从而进一步从反面证实 dok1 可经 PTB 结构域与 TrkA^{IC}结合(图 1)。

3 讨论

NGF 对神经细胞的存活、生长及分化具有明显的调节作用,而且还能够参与神经损伤后再生和功能修复^[1]。上述效应大多由 NGF 激活其受体 TrkA 后介导。TrkA 受体单次跨膜,属于受体酪氨酸

激酶家族,其胞内酪氨酸激酶区内含很多重要的酪氨酸磷酸化位点。这些特异性酪氨酸残基的磷酸化,提供了许多可与含有 SH2 和 PTB 结构域的信号蛋白进行结合的位点。这些信号蛋白中,有些本身也是激活后可发生酪氨酸磷酸化的激酶,如 PLC γ 和 PI3K,而有些蛋白则是链接受体酪氨酸激酶与下游信号通路之间的接头蛋白,如 Shc 等^[6,7]。

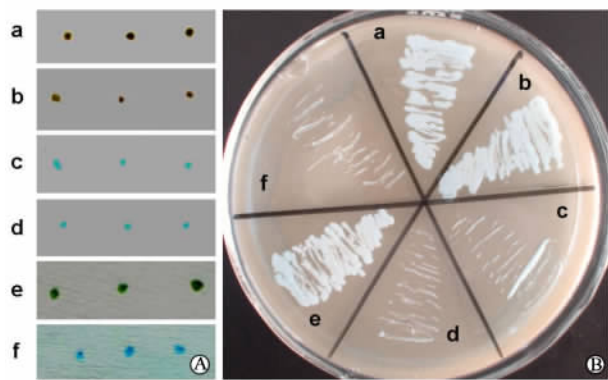


图 1 β -半乳糖苷酶活性分析(A)及 Leu⁻ 生长实验分析(B)

Fig 1 β -galactosidase activity analysis(A) and Leu⁻ medium growth analysis(B)

a: pGilda-Pos + pB42AD; b: pGilda-TrkA^{IC} + pB42AD-dok1 PTB; c: pGilda-TrkA^{IC} + pB42AD-dok1 Δ PTB; d: pGilda + pB42AD; e: pGilda-TrkA^{IC} + pB42AD-dok1; f: pGilda-TrkA^{IC} + pB42AD

我们曾通过酵母双杂交筛选的方法^[1],寻找胞质内 TrkA 受体下游的可能新底物蛋白或调控蛋白,我们发现 dok1 蛋白可以与 TrkA 在酵母中结合。

dok1 系 dok(downstream of kinases)家族成员,属于入坞蛋白,内含膜定位序列(PH 结构域)、受体结合区域(PTB 结构域)以及数个下游底物的可能结合位点(磷酸化酪氨酸和 PXXP 基序)等^[8,9]。由于 dok 家族成员结构上含 PH 和 PTB 结构域以及多个 SH2 和 SH3 结合位点,因此在酪氨酸激酶激活后,它们可以聚集许多相关的信号分子蛋白。dok1 和 dok2 可结合并聚集 rasGAP,即一种 ras 信号通路的负性调节蛋白,而参与负性调节激酶的下游信号,通过抑制 MAPK 信号通路,继而导致对细胞的增殖和细胞的转化等生物学效应的负性调控^[10,11]。

本研究通过 β -半乳糖苷酶活力检测以及 Leu⁻ 营养互补生长实验,验证了 dok1 或 dok1 PTB 与 TrkA 蛋白在酵母中确实存在结合,当 dok1 缺失

PTB 结构域后则不能与 TrkA 结合。上述结果表明 dok1 PTB 结构域介导了 TrkA 与 dok1 之间的相互作用。因此我们推测,dok1 可能作为一种信号通路的负性调节蛋白,对于 TrkA 介导的信号传递具有一定的抑制作用。

进一步的工作将努力证实 TrkA 与 dok1 体内存在结合,若此结合确实参与 TrkA 介导的神经元分化或发育的信号通路,而且 dok1 对于此信号通路具有负性调节作用,那么寻求对此信号转导的干预方法将无疑具有重要的生理或病理学上的意义。

[参考文献]

- [1] Zweifel LS, Kuruvilla R, Ginty DD. Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signalling[J]. Nat Rev Neurosci, 2005, 6: 615-625.
- [2] Song HJ, Poo MM. Signal transduction underlying growth cone guidance by diffusible factors[J]. Curr Opin Neurobiol, 1999, 9: 355-363.
- [3] Blum R, Kafitz KW, Konnerth A. Neurotrophin-evoked depolarization requires the sodium channel Na(V)1.9[J]. Nature, 2002, 419: 687-693.
- [4] 张 勇,黄爱军,曹 莉,等. 酵母双杂交方法筛选与 NGF 受体 TrkA 相互作用的新蛋白质[J]. 第二军医大学学报, 2002, 23: 586-589.
- [5] 奥斯伯 F, 金斯顿 RE, 塞德曼 JG, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 王海林 译, 金冬雁 校. 北京: 科学出版社, 1998: 1-80.
- [6] Uhlik MT, Temple B, Bencharit S, et al. Structural and evolutionary division of phosphotyrosine binding (PTB) domains [J]. J Mol Biol, 2005, 345: 1-20.
- [7] Bache KG, Slagsvold T, Stenmark H. Defective downregulation of receptor tyrosine kinases in cancer[J]. EMBO J, 2004, 23: 2707-2712.
- [8] Carpino N, Wisniewski D, Strife A, et al. p62(dok): a constitutively tyrosine-phosphorylated, GAP-associated protein in chronic myelogenous leukemia progenitor cells[J]. Cell, 1997, 88: 197-204.
- [9] Boulay I, Nemorin JG, Duplay P. Phosphotyrosine binding-mediated oligomerization of downstream of tyrosine kinase (Dok)-1 and Dok-2 is involved in CD2-induced Dok phosphorylation[J]. J Immunol, 2005, 175: 4483-4489.
- [10] Suzu S, Tanaka-Douazono M, Nomaguchi K, et al. p56(dok-2) as a cytokine-inducible inhibitor of cell proliferation and signal transduction[J]. EMBO J, 2000, 19: 5114-5122.
- [11] Zhao M, Janas JA, Niki M, et al. Dok-1 independently attenuates Ras/mitogen-activated protein kinase and Src/c-myc pathways to inhibit platelet-derived growth factor-induced mitogenesis[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26: 2479-2489.

[收稿日期] 2005-10-10

[修回日期] 2006-03-16

[本文编辑] 尹 茶