

SNT1 与 RET 之间相互作用的酵母双杂交研究

矫力, 张勇, 刘翔, 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 *sucl*-binding neurotrophic target (SNT1) 与 RET 之间的相互作用, 寻找 RET 受体下游的结合蛋白, 以深入认识 RET 下游信号转导机制。 **方法:** 将 RET 胞内域与 LexA 蛋白融合作为 DNA 结合蛋白, 分别将 SNT1、SNT1PTB 及 SNT1 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:** SNT1 及 SNT1PTB 与 RET 之间在酵母中存在结合, 而 SNT1 Δ PTB 不与 RET 结合。 **结论:** 证实 RET 与 SNT1 之间具有相互作用, SNT1 的 PTB 结构域在介导此相互作用的过程中非常重要。

[关键词] RET; SNT1; PTB; 酵母双杂交; 蛋白相互作用

[中图分类号] Q 51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)06-0617-03

Study on interaction between *sucl*-binding neurotrophic target 1 and RET by yeast two-hybrid method

JIAO Li, ZHANG Yong, LIU Xuan, 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 RET (GDNF receptor) with *sucl*-binding neurotrophic target (SNT1) and search for the possible downstream substrates or regulatory proteins of RET, so as to reveal the mechanism of downstream signal transduction of RET. **Methods:** The RET^{IC} (intracellular domain of RET) was fused to LexA and the product was used as a DNA-binding domain protein. SNT1, SNT1PTB or SNT1 Δ PTB (SNT1 without PTB) was separately fused to B42AD and their products were used as an activation domain protein. The cotransformants were tested by β -galactosidase activity analysis and leucine medium growth analysis was used to study the interaction between SNT1 and RET. **Results:** Interaction between RET and SNT1 or SNT1PTB was found in yeast, but that between SNT1 Δ PTB and RET was not observed. **Conclusion:** It is confirmed that RET can interact with SNT1 in yeast, and the interaction may be mediated by PTB domain of SNT1.

[KEY WORDS] RET; SNT1; PTB; yeast two-hybrid; interaction

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(6):617-619]

神经营养因子是一类由神经元、神经支配的靶组织或胶质细胞等产生的能促进中枢和外周神经细胞存活、生长和分化的活性蛋白质。神经营养因子以其化学组成和受体的特性等可以分为多个家族, 其中一类重要的家族为胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF) 家族, 其成员目前包括 GDNF、NRTN (neurturin)、ARTN (artemin)、PSPN (persephin) 等 4 个成员。它们既可以支持中枢神经系统内如中脑多巴胺能神经元与运动神经元等多种神经元的存活和发育, 还可以支持许多外周神经元的存活并调节其分化, 如交感、副交感、感觉与肠道神经元等^[1~3]。GDNF 是目前发现的最强的胆碱能运动神经元营养因子, 其作用是 BDNF 和 CNTF 的几十至几百倍。除神经系统外, GDNF 在肾脏发育中还可作为一种重要的形态形成因子, 并且在精原细胞分化、毛发生长控制等生理活动中起重要调节作用^[1,2]。

神经营养因子通过结合并激活各自特异性受体, 引起胞内信号通路转导后, 才能产生重要的生物

学效应。而 GDNF 家族受体激活系统较特殊, 其家族成员不能直接与受体结合, 而是先分别与糖基磷脂酰肌醇锚合的共受体 GFR α 1-4 结合, 形成 GDNF-GFR α 复合物, 然后在此共受体亚基的帮助下, 才可与跨膜受体酪氨酸激酶家族成员 RET 结合, 使 RET 发生二聚化、自磷酸化, 进一步通过结合下游信号分子介导发生一系列信号级联反应, 激活 MAPK、PI3K 或 PLC γ 等信号转导通路, 最终产生不同的细胞生物学效应^[1,2]。

[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] 矫力, 硕士。

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

然而迄今发现的这些常见信号转导途径,尚无法完全解释神经营养因子家族不同成员的特异作用。例如,GDNF、神经生长因子调节神经母细胞瘤的细胞分化作用并不一致^[4];GDNF、NRTN和ARTN均可引起来自大鼠背根神经节的原代培养神经元细胞发生轴突生长,而PSPN却不能产生类似效应^[5]。以往关于RET下游信号分子的功能研究多集中于肿瘤生物学,寻找介导RET信号转导的新分子并探讨其在神经系统生长与分化作用的研究鲜有报道。因此,研究神经营养因子受体的具体信号机制,将有助于深入认识神经营养因子作用的多样性与特异性。而寻找胞质内神经营养因子受体的新底物蛋白或调控蛋白等信号分子,将不仅有助于认识受体下游的具体信号转导通路,还将为今后特异性针对神经损伤修复或神经系统疾病的药物靶点的选择和设计提供新思路。

因此,为了探索GDNF作用于细胞膜受体RET后的胞内下游信号转导,我们拟通过酵母双杂交的方法,寻找胞质内RET受体下游的结合蛋白,从而为深入认识和研究受体酪氨酸激酶下游信号通路打下较好的工作基础。

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T₄DNA连接酶等购自GibcoBRL公司。ExTaq酶购自TaKaRa公司。PfuUltra酶购自Merck公司。X-gal、IPTG购自Promega公司。蛋白胨(tryptone)、酵母提取物(yeast extract)、酵母氮源(yeast nitrogen base)、不含氨基酸的酵母氮源(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^[6,7]及Clontech LexA Two-hybrid文库手册。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^[7]来研究SNT1与RET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RET的胞内域基因编码区克隆到pGilda多克隆位点中,构建成pGilda-RET^{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SNT1、SNT1PTB(SNT1中的PTB结构域)及SNT1 Δ PTB(SNT1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-SNT1、SNT1PTB及SNT1 Δ PTB融合蛋白的酵母表达质粒,经酶切及测序后确定。

2.2 RET与SNT1在酵母中的相互作用 将pGilda-RET^{IC}质粒与pB42AD或pB42AD-SNT1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RET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SNT1能够与RET^{IC}结合。

2.3 RET与SNT1PTB结构域在酵母中的相互作用 将pGilda-RET^{IC}质粒与pB42AD-SNT1PTB或pB42AD-SNT1 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SNT1可通过PTB结构域与RET^{IC}结合;当SNT1缺失PTB结构域后则不能与RET^{IC}发生相互作用,从而进一步从反面证实SNT1可经PTB结构域与RET^{IC}结合(图1)。

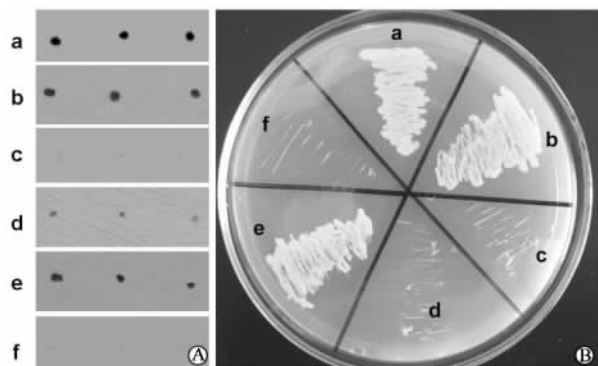


图1 β -半乳糖苷酶活性分析(A)和Leu⁻生长实验分析(B)

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

a: pGilda-Pos + pB42AD; b: pGilda-RET^{IC} + pB42AD-SNT1PTB; c: pGilda-RET^{IC} + pB42AD-SNT1 Δ PTB; d: pGilda + pB42AD; e: pGilda-RET^{IC} + pB42AD-SNT1; f: pGilda-RET^{IC} + pB42AD

3 讨论

近年来人们逐渐发现,GDNF家族成员对于中枢神经系统内的多种类型的神经元具有很重要的神经营养和调制效应。尽管GDNF家族成员存在其他的受体如NCAM等,但是迄今发现其神经营养效应仍然主要是经由RET受体介导^[8,9]。因此,探寻RET下游信号通路有助于深入了解神经营养效应的具体机制。

SNT1作为一种链接于胞膜上的胞质锚合蛋白,在神经生长因子刺激细胞后可发生酪氨酸磷酸化,并可介导神经生长因子受体下游信号通路和细胞学效应。目前已知SNT1的N端含有定位于胞膜的肉豆蔻酰基化位点,以及磷酸化酪氨酸结合(PTB)区域;其中央和C端含有数个酪氨酸残基,当它们磷酸化后可以结合接头蛋白Grb2和酪氨酸磷酸酶Shp2,并进而激活MAPK通路;另外,SNT1还可以激活PI3K和泛素连接酶cbl^[10,11]。

鉴于SNT1蛋白的分布非常广泛,我们推测其可能不仅仅作为神经生长因子受体下游的接头蛋白,还可能在GDNF家族成员的受体RET下游信号通路中具有重要作用。我们在酵母中的实验结果初步证实了我们的推测,并发现RET与SNT1的结合可能是经由PTB结构域所介导,若SNT1缺失PTB结构域,二者则不能结合。

下一步的工作将努力证实RET与SNT1体内确实存在结合,并积极探索此结合在RET下游信号通路中具有什么功能和具体生理意义。

[参考文献]

- [1] Lin LF, Doherty DH, Lile JD, et al. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons [J]. *Science*,1993,260:1130-1132.
- [2] Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2002,3:383-394.
- [3] Baloh RH, Enomoto H, Johnson EM Jr, et al. The GDNF family ligands and receptors implications for neural development[J]. *Curr Opin Neurobiol*,2000,10:103-110.
- [4] Peterson S, Bogenmann E. The RET and TRKA pathways collaborate to regulate neuroblastoma differentiation[J]. *Oncogene*,2004,23:213-225.
- [5] Paveliev M, Airaksinen MS, Saarma M. GDNF family ligands activate multiple events during axonal growth in mature sensory neurons[J]. *Mol Cell Neurosci*,2004,25: 453-459.
- [6] 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.
- [7] Zhang Y, Yan Z, Farooq A, et al. Molecular basis of distinct interactions between Dok1 PTB domain and tyrosine-phosphorylated EGF receptor[J]. *J Mol Biol*,2004, 343:1147-1155.
- [8] Paratcha G, Ledda F, Ibanez CF. The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands[J]. *Cell*,2003,113: 867-879.
- [9] Enomoto H, Hughes I, Golden J, et al. GFR α 1 expression in cells lacking RET is dispensable for organogenesis and nerve regeneration[J]. *Neuron*,2004,44:623-636.
- [10] Rabin SJ, Cleghon V, Kaplan DR. SNT, a differentiation-specific target of neurotrophic factor-induced tyrosine kinase activity in neurons and PC12 cells[J]. *Mol Cell Biol*,1993,13:2203-2213.
- [11] Ong SH, Hadari YR, Gotoh N, et al. Stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by fibroblast growth factor receptors is mediated by coordinated recruitment of multiple docking proteins[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2001,98:6074-6079.

[收稿日期] 2005-10-10

[修回日期] 2006-03-16

[本文编辑] 尹 茶