

## Dok1 与表皮生长因子受体之间相互作用的酵母双杂交研究

张 勇, 刘秀杰, 张 骐, 阎志勇, 矫 力, 刘 翀, 路长林, 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 kinases(dok1)与表皮生长因子受体(EGFR)之间的相互作用, 寻找EGFR的可能底物或调控蛋白, 以深入认识EGFR下游信号转导机制。方法: 将EGFR胞内域与LexA蛋白融合作为DNA结合蛋白, 分别将dok1、dok1PTB及dok1ΔPTB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、生长实验以及免疫共沉淀实验分析它们之间的相互作用。结果: dok1及dok1PTB与EGFR之间在酵母中存在结合, 而dok1ΔPTB不与EGFR结合。结论: 首次证实EGFR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]** 表皮生长因子受体; dok1; PTB; 酵母双杂交

**[中图分类号]** R 338 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)07-0755-04

### Interaction between epidermal growth factor receptor with dok1 by yeast two-hybrid method

ZHANG Yong, LU Xiu-Jie, ZHANG Qi, YAN Zhi-Yong, JIAO Li, LU Xuan, LU Chang-Lin, HE Cheng\* (Department of Neurobiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To study the interaction between epidermal growth factor receptor (EGFR) with downstream of kinases (dok1) and to search for the possible intracellular substrates or regulatory proteins of EGFR, so as to deeply understand the mechanisms of receptor downstream signal transduction. **Methods:** The EGFR<sup>C</sup> (intracellular part of EGFR) was fused to LexA as a DNA-binding domain protein, while dok1, dok1PTB and dok1ΔPTB (dok1 without PTB) were respectively fused to B42AD as an activation domain protein. Co-transformants were tested by βgalactosidase activity analysis, leucine medium growth analysis and co-immunoprecipitation assay. **Results:** Dok1 and dok1PTB interacted with EGFR in yeast, while dok1ΔPTB did not. **Conclusion:** It is firstly confirmed that EGFR can interact with dok1, and the interaction may be mediated by PTB domain of dok1.

**[KEY WORDS]** epidermal growth factor receptor; dok1; PTB; yeast two-hybrid

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(7): 755-758]

表皮生长因子(EGF)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。EGF通过与体内细胞表面的相应受体即表皮生长因子受体(EGFR)结合,由EGFR受体介导胞内信号转导而发挥其生物学效应。目前已知EGFR是一种跨膜糖蛋白,含胞外域、跨膜段和胞内域3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一样,依赖于EGFR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。由于EGFR在发育和生理方面均具有重要的作用,故人们常将其作为研究受体酪氨酸激酶的经典范例。为了探索EGF作用于细胞膜受体后的胞内信号转导,我们拟通过酵母双杂交等方法,寻找胞质内EGFR受体下游的可能新底物蛋白或调控蛋白,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、DH5α以及酵母菌株HL Y819均为本实验室保存菌株。限制性内切酶、碱性磷酸酯酶CIP和T<sub>4</sub>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。Protein G agarose购自Roche公司。BenchMARK™ Prestained Protein Ladder购自Gibco BRL公司。Western印迹检测用ECL试剂购自Pierce公司。Anti-HA小鼠单抗、anti-LexA小鼠单抗、山羊抗鼠的HRP偶联二抗均购自Santa Cruz

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30070167, 30028003);上海市科技发展基金(01JC14004);全军医药卫生科研“十五”规划课题(01J011)。

**[作者简介]** 张 勇(1975-),男(汉族),讲师

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

公司。Dithiothreitol (DTT)、benzamide, phenylmethylsulfonyl fluoride (PM SF)、pepstatin A、leupeptin、antipain 及 nonidet P40 (NP-40) 等均购自 Sigma 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[1, 2]及 Clontech LexA Two-hybrid 文库手册。以 100 ng 质粒 DNA 为模板, 在 pfuTurbo 酶的作用下进行 PCR 反应(条件为 95 °C 5 min, 55 °C 1 min, 68 °C 16 min, 共 18 个循环), 将 PCR 产物进行 *Dpn*I 酶切 1 h, 取 10  $\mu$ 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  $\beta$ -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 °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, 室温放置; 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  $\beta$ -巯基乙醇; Z buffer 含 60 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 40 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mmol/L KCl, 1 mmol/L  $\text{MgSO}_4$ ) 预湿的滤纸上, 30 °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  $\beta$ -半乳糖苷酶活性为阳性, 未显色的为假阳性。

1.4 *Leu*<sup>-</sup> 生长实验 用灭菌接种环从选择性 SD (*Ura*<sup>-</sup>, *His*<sup>-</sup>, *Trp*<sup>-</sup>) 培养基平板上挑取酵母转化子菌落, 转接于 Gal SD (*Ura*<sup>-</sup>, *His*<sup>-</sup>, *Trp*<sup>-</sup>, *Leu*<sup>-</sup>) 培养基上, 30 °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。

1.5 酵母细胞抽提物的制备 挑取阳性菌落转接于 Gal SD (*Ura*<sup>-</sup>, *His*<sup>-</sup>, *Trp*<sup>-</sup>, *Leu*<sup>-</sup>) 培养基中, 生长至  $D_{600}$  为 1.0~1.5。200 ml 培养物离心收集, 10 ml 无菌水洗 1 次。以下步骤均在 4 °C 进行。酵母细胞重悬于 0.7 ml 酵母细胞裂解液(200 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 400 mmol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 1 mmol/L EDTA, 10% Glycerol, 7 mmol/L  $\beta$ -mercaptoethanol, 2 mmol/L Benzamir-

dine, 1 mmol/L PM SF, 2  $\mu$ g/ml pepstatin A, 2  $\mu$ g/ml leupeptin, 4  $\mu$ g/ml antipain), 加入 1.2 g 酸洗玻璃珠(425~600  $\mu$ m, Sigma), 剧烈振荡 10 次, 每次 30 s, 间隔冰浴 30 s。裂解液 14 000 r/min 离心 15 min, 上清再离心 15 min, 测上清总蛋白浓度, -20 °C 保存。

1.6 免疫共沉淀和 Western 印迹检测 取 200  $\mu$ l 酵母细胞裂解物, 加 IP 抗体(每反应 1  $\mu$ g), 在 4 °C 振荡 1 h。12 000 r/min 离心 2 min, 在上清中加入 30  $\mu$ l 用酵母细胞裂解液平衡的 50% protein G-agarose, 4 °C 振荡 2 h。免疫沉淀物用 IP buffer(20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 2 mmol/L EGTA, 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 1 mmol/L DTT) 洗 3 次。然后重悬在 1 $\times$  蛋白质电泳上样缓冲液中, 进行 12% 的 SDS-PAGE 电泳。用湿法将蛋白条带转移到硝酸纤维素膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBS-T(10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.1% 吐温-20) 溶液封闭膜 3 h, 加入一抗(抗体稀释度为 1:1 000) 4 °C 结合过夜, 用 TBS-T 室温洗膜 4 次, 每次 15 min。用二抗于室温结合 2 h, 再用 TBS-T 洗膜 4 次, 每次 15 min。用吸水纸吸尽多余的液体, 以 SuperSignal ECL 试剂显色。

## 2 结果

2.1 双杂交质粒的构建 选用 LexA Two-hybrid 系统<sup>[2]</sup>来研究 dok1 与 EGFR 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 EGFR 的胞内域基因编码区克隆到 pGilda 多克隆位点中, 构建成 pGilda-EGFR<sup>C</sup> 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, dok1PTB 及 dok1 $\Delta$ PTB(dok1 缺失 PTB) 的基因编码区克隆到 pB42AD 多克隆位点中, 构建成 pB42AD-dok1, dok1PTB 及 dok1 $\Delta$ PTB 融合蛋白的酵母表达质粒, 经酶切(图 1) 及测序后确定。

2.2 EGFR 与 dok1 在酵母中的相互作用 将 pGilda-EGFR<sup>C</sup> 质粒与 pB42AD 或 pB42AD-dok1 质粒分别共转化 HL Y819 宿主菌, 对共转化子进行  $\beta$ -半乳糖苷酶活力检测, 结果表明 EGFR 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; 而在酵母中 dok1 能够与 EGFR<sup>C</sup> 结合(图 2)。

2.3 EGFR 与 dok1PTB 结构域在酵母中的相互作用 将 pGilda-EGFR<sup>C</sup> 质粒与 pB42AD-dok1PTB 或 pB42AD-dok1 $\Delta$ PTB 质粒分别共转化 HL Y819 宿主菌, 对共转化子进行  $\beta$ -半乳糖苷酶活力检测以

及SD Gal U<sup>ra</sup> His<sup>-</sup> Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> 平板生长实验,结果表明dok1可通过PTB结构域与EGFR<sup>C</sup>结合;当dok1缺失PTB结构域后则不能与EGFR<sup>C</sup>发生相互作用,从而进一步从反面证实dok1可经PTB结构域与EGFR<sup>C</sup>结合(图3)。



图1 诱饵蛋白pGilda-EGFR<sup>C</sup>质粒以及靶蛋白pB42AD-dok1, dok1PTB及dok1ΔPTB质粒的酶切图谱  
Fig 1 pGilda-EGFR<sup>C</sup> plasmid and pB42AD-dok1, dok1PTB, dok1ΔPTB digested by Xho I  
M: DL2000 marker; 1: pB42AD-dok1PTB; 2: pB42AD-dok1; 3: pB42AD-dok1ΔPTB; 4: pGilda-EGFR<sup>C</sup>

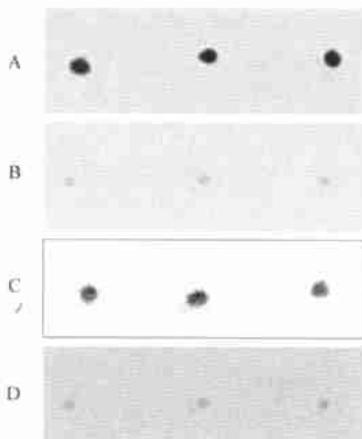


图2 β-半乳糖苷酶活性分析EGFR<sup>C</sup>与dok1之间的相互作用  
Fig 2 Assay of interaction between EGFR<sup>C</sup> and dok1 using β-galactosidase activity analysis  
A: pGilda-Pos+ pB42AD; B: pGilda-EGFR<sup>C</sup>+ pB42AD;  
C: pGilda-EGFR<sup>C</sup>+ pB42AD-dok1; D: pGilda+ pB42AD

进一步通过免疫共沉淀的方法以验证EGFR与dok1的结合。由于pGilda和pB42AD分别为LexA和HA融合的质粒,因此可以分别用anti-LexA及anti-HA抗体免疫沉淀或检验两者的表达产物。我们分别提取pGilda-EGFR<sup>C</sup>与pB42AD-dok1, pB42AD-dok1PTB以及pB42AD-dok1ΔPTB共转化子的酵母总蛋白。用anti-HA抗体沉淀酵母

总蛋白,并用anti-LexA抗体对沉淀物进行Western检测。结果显示,转化了pB42AD-dok1或pB42AD-dok1PTB的酵母总蛋白中能检测到LexA-EGFR<sup>C</sup>条带,表明LexA-EGFR<sup>C</sup>和HA-dok1或HA-dok1PTB能够被免疫共沉淀;而转化了pB42AD-dok1ΔPTB的酵母总蛋白中不能检测到LexA-EGFR<sup>C</sup>条带,表明LexA-EGFR<sup>C</sup>和HA-dok1ΔPTB不能被免疫共沉淀(图4)。上述实验结果表明,在酵母中dok1可经PTB结构域与EGFR<sup>C</sup>之间相互作用。

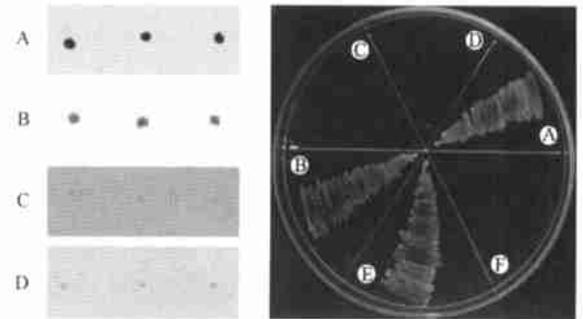


图3 β-半乳糖苷酶活性分析(左)和Leu<sup>-</sup>生长实验分析(右)  
Fig 3 β-galactosidase activity analysis (left) and Leu<sup>-</sup> medium growth analysis (right)  
A: pGilda-Pos+ pB42AD; B: pGilda-EGFR<sup>C</sup>+ pB42AD-dok1PTB;  
C: pGilda-EGFR<sup>C</sup>+ pB42AD-dok1ΔPTB; D: pGilda+ pB42AD;  
E: pGilda-EGFR<sup>C</sup>+ pB42AD-dok1; F: pGilda-EGFR<sup>C</sup>+ pB42AD

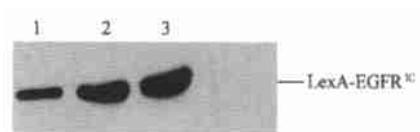


图4 LexA-EGFR<sup>C</sup>与HA-dok1的免疫共沉淀结合Western印迹分析  
Fig 4 Co-immunoprecipitation and Western blot analysis of LexA-EGFR<sup>C</sup> and HA-dok1 (immunoblot with anti-LexA)  
1: pGilda-EGFR<sup>C</sup>+ pB42AD;  
2: pGilda-EGFR<sup>C</sup>+ pB42AD-dok1PTB;  
3: pGilda-EGFR<sup>C</sup>+ pB42AD-dok1;  
4: pGilda-EGFR<sup>C</sup>+ pB42AD-dok1ΔPTB

### 3 讨论

近年来人们逐渐发现,EGF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。通过直接刺激的作用,或者间接经非神经元如胶质细胞等的介导,EGFR家族可参与神经营养、神经发育以及脑损伤后修复等多种重要的神经生物学效应<sup>[3,4]</sup>。激活后EGFR家族成员内部特异性酪

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 Src、PLC $\gamma$  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、Grb2、Grb7 和 Nck 等<sup>[5]</sup>。

随着对受体酪氨酸激酶信号转导特异性的深入研究,已知几种受体可以共同拥有某些特异性底物<sup>[6]</sup>。人们陆续发现,许多受体酪氨酸激酶的下游存在一类特异性的所谓入坞蛋白(docking protein)。这些蛋白一般均含有 2 种结构域,一是 N 端的膜定位元件,如 PH 结构域或肉豆蔻酰化位点;二是受体结合序列,如 PTB 或 PTB 样结构域。另外,入坞蛋白内还可停靠多种内含 SH2 和 SH3 结构域的信号分子。dok (downstream of kinases) 家族成员即属于入坞蛋白,它们也具有上述典型特征,如它们内含膜定位序列(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<sup>[7,8]</sup>。dok1 不仅可以是某些非受体酪氨酸激酶如 Src、Lyn、Tec、p21bcr-abl 等的底物<sup>[9]</sup>,还可以是某些受体酪氨酸激酶如胰岛素和胰岛素样生长因子 I 等的底物<sup>[10]</sup>。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<sup>[11,12]</sup>。

本研究通过  $\beta$ 半乳糖苷酶活力检测,Leu<sup>-</sup> 营养互补生长实验以及免疫共沉淀等方法,验证了 dok1 或 dok1PTB 与 EGFR 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 EGFR 结合。上述结果表明 dok1PTB 结构域介导了 EGFR 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 EGFR 介导的信号传递亦具有一定的抑制作用。这一研究使得我们不仅可能发现胞质内新的 EGFR 结合蛋白或调控蛋白,从而深入研究 EGF 作用于细胞后的胞内信号转导机制,并探讨其在 EGFR 引起神经元分化功能调控中的可能作用,而且丰富对于 PTB 结构域的认识,将有助于今后开发识别针对此靶位点的

特异性药物。

进一步的工作将努力证实 EGFR 与 dok1 体内确实存在结合,若在发育或肿瘤发生时 EGFR 介导的信号通路中,dok1 可作为一种信号通路的负性调节蛋白,那么寻求对此信号转导的干预方法将具有十分重要的生理或病理学上的意义。

#### [参考文献]

- [1] 奥斯伯,金斯顿,塞德曼,等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社,1998 1-80
- [2] 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(6): 586-589.  
Zhang Y, Huang AJ, Cao L, et al. Screening for new protein binding with nerve growth factor receptor TrkA using yeast two-hybrid method [J]. *Di'er Junyi Daxue Xuebao (Acad J Sed Mil Med Univ)*, 2002, 23(6): 586-589.
- [3] Erlich S, Goldshmit Y, Lupowitz Z, et al. ErbB-4 activation inhibits apoptosis in PC12 cells[J]. *Neuroscience*, 2001, 107(2): 353-362
- [4] Cha YK, Kim YH, Ahn YH, et al. Epidermal growth factor induces oxidative neuronal injury in cortical culture [J]. *J Neurochem*, 2000, 75(1): 298-303
- [5] Rommel C, Hafen E. Ras-a versatile cellular switch[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 1998, 8(4): 412-418
- [6] van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways[J]. *Annu Rev Cell Biol*, 1994, 10: 251-337.
- [7] 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(2): 197-204
- [8] Yananashi Y, Baltimore D. Identification of the Abl<sup>-</sup> and rasGAP-associated 62 kDa protein as a docking protein, Dok [J]. *Cell*, 1997, 88(2): 205-211.
- [9] Kashige N, Carpino N, Kobayashi R. Tyrosine phosphorylation of p62dok by p210 bcr-abl inhibits RasGAP activity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(5): 2093-2098
- [10] Wick MJ, Dong LQ, Hu D, et al. Insulin receptor-mediated p62 dok tyrosine phosphorylation at residues 362 and 398 plays distinct roles for binding GTPase-activating protein and Nck and is essential for inhibiting insulin-stimulated activation of Ras and Akt [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(46): 42843-42850
- [11] Suzu S, Tanaka-Douzon M, Nomaguchi K, et al. p56(dok-2) as a cytokine-inducible inhibitor of cell proliferation and signal transduction [J]. *EMBO J*, 2000, 19(19): 5114-5122
- [12] Tamir I, Stolpa JC, Helgason CD, et al. The RasGAP-binding protein p62dok is a mediator of inhibitory Fc $\gamma$ maR IIb signals in B cells [J]. *Immunity*, 2000, 12(3): 347-358

[收稿日期] 2003-12-11

[修回日期] 2004-03-26

[本文编辑] 尹茶