文章编号:1000-5404(2006)11-1141-04

论著

应用酵母双杂交系统筛选FGFR3相互作用的蛋白质

宋瑞华,王建民,苏 楠,黄留红,陈 林 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所创伤实验室,重庆 400042)

提 要:目的 通过酵母双杂交系统从小鼠17.5 d全胚胎cDNA质粒文库中筛选与成纤维细胞生长因子受体3(FGFR3)相互作用的蛋白质,为研究FGFR3信号通路提供新的线索。**方法** 构建FGFR3胞内区的真核表达载体R3-PI,转化酵母菌AH109。毒性实验及自激活实验证实FGFR3胞内区蛋白对酵母细胞无毒性,不存在自激活现象。将小鼠17.5 d全胚胎cDNA质粒文库转入AH109/R3-PI酵母菌中,能够与FGFR3胞内区相互作用的蛋白质。**结果** 通过初步筛选得到3种能够与FGFR3胞内区相互作用的蛋白质,经回复性实验进一步验证CLK4与FGFR3胞内区之间存在相互作用。**结论** 通过筛选发现CLK4与FGFR3胞内区之间存在相互作用,提示FGFR3可能通过CLK4参与能量代谢调节,而CLK4可能通过对FGFR3的磷酸化或去磷酸化调节FGFR3的活性。

关键词: FGFR3;酵母双杂交系统;蛋白间相互作用
中图法分类号: R341; R394-33; R394.2 **文献标识码:** A

Screening for protein interacting with FGFR3 in mouse 17.5-day embryo cDNA library by yeast two-hybrid system

SONG Rui-hua, WANG Jian-min, SU Nan, HUANG Liu-hong, CHEN Lin (Trauma Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective FGFR3 is important to bone development and some epithelial carcinoma. To screen proteins interacting with FGFR3 by the yeast two-hybrid system. **Methods** The intracellular domain of FGFR3 was fused to a DNA-binding domain as "BAIT" and the yeast strain AH109 was transformed with FGFR3. Then the yeast strain AH109/R3-PI was transformed with mouse 17.5-day embryo cDNA library. **Results** FGFR3 had no self-activation and toxicity to the yeast strain AH109. CLK4 was identified interacted with FGFR3. **Conclusion** The interaction between CLK4 and FGFR3 suggests that FGFR3 can accommodate energy metabolism through CLK4. The activation of FGFR3 may be regulated by CLK4 through phosphorylation and dephosphorylation.

Key words: FGFR3; yeast two-hybrid system; interacting protein

成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptors, FGFRs)属于酪氨酸激酶家族。这类受体在细胞的生长、分化、迁移、血管发生以及伤口愈合等的生理、病理过程中发挥重要作用[1]。成纤维细胞生长因子受体3(FGFR3)在骨骼发育过程中发挥负性调节作用[2]。敲除小鼠FGFR3可因软骨内成骨增强导致严重的进行性骨骼发育不良[3]。在人类,FGFR3突变可直接引起侏儒症,其中包括季肋发育不全、软骨发育不全、致死性发育不良[4]。另外,FGFR3的异常激活还与膀胱癌等癌症的发生有关[5]。

成纤维细胞生长因子(FGFs)与FGFR结合后,引起FGFRs二聚化以及酪氨酸残基的磷酸化。激活的FGFRs可通过其磷酸化的酪氨酸与含有SH2(Src homology 2)结构域或可结合磷酸化酪氨酸结构域的信号

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(2005CB522604);国家自然科学基金杰出青年基金资助项目(30425023);重庆市科技计划资助项目(2004BA5016)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" projects, 2005CB522604), the National Science Fund for Young Distinguished Scholars(30425023) and the Sci & Tech Project Foundation of Chongqing(2004BA5016)

作者简介: 宋瑞华(1977-),女,浙江省绍兴市人,硕士研究生,实习研究员,主要从事细胞生物学方面的研究。电话:(023)68757572,E-mail:wephone@sohu.com
通讯作者: 陈 林,电话:(023)68757572,E-mail:linchen70@163.com

收稿日期: 2005-11-16;**修回日期:** 2006-03-18

蛋白分子相结合把信号向下传递[6]。除 PLC-γ 和 FRS2 外，目前对能够直接与 FGFRs 相互作用从而引起生物学效应的信号分子还知之甚少[7]。

鉴于 FGFR3 在发育过程中发挥的重要作用，本研究利用酵母双杂交技术，从小鼠 17.5 d 全胚胎 cDNA 文库中筛选与 FGFR3 胞内段相互作用的蛋白质分子，以期为进一步明确 FGFR3 在发育过程中所发挥作用的机制提供新的研究方向。

1 材料与方法

1.1 双杂交系统、cDNA 文库

双杂交系统 MATCHMAKER Two-Hybrid System 3、小鼠 17.5 d 全胚胎 cDNA 质粒文库购于 Clontech 公司。

1.2 菌种、质粒

HB101、$DH_{5\alpha}$、FGFR3 表达质粒(SK-R3 质粒)由本实验室保存。

1.3 生化试剂

酵母培养基 YPD、SD、各种缺陷培养基为 Clontech 公司产品；乙酸锂、PEG4000 上海生工生物技术公司产品；5-溴-4-氯-3-吲哚-α-D-半乳糖苷酶(X-gal)为 Sigma 公司产品；鱼精 DNA 为 Stratagene 公司产品；各种限制性内切酶、胶回收试剂盒为大连宝生物公司产品。质粒抽提试剂盒为 Promega 公司产品。测序试剂盒 Big Dye V 3.1 为 ABI 公司产品。

1.4 诱饵载体的构建与鉴定

引物设计与 PCR 扩增：根据已知的小鼠 FGFR3 胞内段 cDNA(1 232 bp)序列设计。①上游引物(R3-IS)：5′-CCGGAATTCCGCCTGCGCAGTCCCCCAAAG-3′；②下游引物(R3-IA)：5′-GTCGTCGACTCACGTCCGAGGTCCCCCGTT-3′。以 SK-R3 为模板，PCR 扩增 FGFR3 胞内段 cDNA。PCR 产物经电泳鉴定扩增片段大小后进行琼脂糖凝胶回收。用 *Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切，同样双酶切表达载体 pGBKT7。取 *Eco*R Ⅰ/*Sal* Ⅰ双酶切的 PCR 产物与 *Eco*R Ⅰ/*Sal* Ⅰ双酶切的表达载体 pGBKT7 进行连接。用 R3-IS 和 R3-IA 进行 PCR 筛选阳性菌落，提取质粒并进行测序。测序引物为 T3 和 R3-IA。将含有正确插入片段的克隆命名为 R3-PI。

1.5 AD 文库质粒的扩增及质粒提取

按照 Clontech 公司提供的酵母双杂交系统说明书测定文库滴度，根据文库的滴度和文库的独立克隆数目决定扩增的文库培养物和铺皿的数量。用 SDS 碱裂解法提取质粒 DNA 并测定浓度和纯度。

1.6 穿梭表达质粒 R3-PI 自主激活情况检测

按照操作说明书，采用醋酸锂法将 R3-PI 质粒转入感受态 AH109，将 pCL-1 质粒转染感受态 AH109 作为阳性对照，将 pGBKT7-Lams 质粒转染感受态 AH109 作为阴性对照，转化后的酵母菌涂布于 SD/-Trp 平板上，对生长克隆用 β-半乳糖苷酶滤膜影印法检测 R3-PI 质粒在 AH109 酵母细胞内的转录激活活性。

1.7 酵母双杂交筛选

将已转入 R3-PI 的酵母细胞制备成感受态，将小鼠 cDNA 文库依次共转化至 AH109 酵母菌株中，测定转化效率以确保筛选文库的规模。在 SD-Leu/Trp/His 培养基上，30 ℃培养 3～5 d 后，挑选灰白色、直径大于 2 mm，生长旺盛的 His^+ 转化子，重复在 SD-Leu/Trp/His/Ade 培养基上培养并挑取单个菌落进行菌落转移法 β-gal 检测，收集 His^+ 和 Lac Z^+ 菌落。

1.8 Lac Z 基因活性的测定

将单个 His^+ 克隆分别挑取少量至滤纸上，没入液氮中 10 s 后取出，重复 3～4 次使细胞裂解。沾有克隆的一面朝上置于浸有 Z 缓冲液(含 X-gal)的滤纸上，室温下观察颜色变化，8 h 内变蓝的克隆为 Lac Z^+ 克隆。

1.9 酵母质粒的提取和电转化大肠杆菌

以 SD/-Trp 培养基过夜培养 His^+、Lac Z^+ 克隆，按照 Clontech 公司说明书提取酵母中质粒。所提质粒电击转化 HB101 电感受态大肠杆菌。转化后的细菌涂布于 SOB-Amp^+ 培养基，37 ℃倒置培养 20 h。只含有诱饵质粒的菌株不能在 SOB-Amp^+ 培养基上生长，故从阳性克隆提取得到靶质粒。

1.10 回交实验确定蛋白质之间特异相互作用

为排除假阳性，取 AD 质粒和 BD 质粒共转染感受态 AH109，以实现一对一回复性杂交，进一步确认阳性 AD 质粒与 BD 质粒之间的相互作用。

1.11 蓝色阳性克隆的测序

取纯化的 His^+ 和 Lac Z^+ 菌落中含有的 AD 质粒，以 GAL4-F 为引物，在 ABI310 型基因 DNA 分析仪上测定该质粒的插入片段序列。

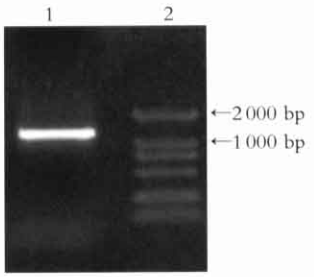
1.12 核酸同源性分析

进入 GenBank，通过 Blast 软件，查找阳性蛋白为何种蛋白。

2 结果

2.1 编码小鼠 FGFR3 胞内段 cDNA 的 PCR 扩增

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳得到 1 条 DNA 带(图 1)，大小介于 2 000 bp 和 1 000 bp 之间，与根据序列推测的值 1 251 bp相符。

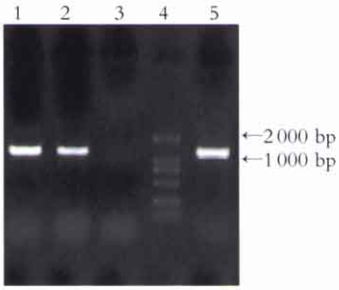


1：FGFR3 胞内段 cDNA PCR 产物；2：DL2000 标准

图 1 PCR 扩增 FGFR3 胞内段 cDNA

2.2 转化的 PCR 初步筛选

PCR 扩增后电泳筛选发现有 3 个转化子含插入片段(图 2)。



1,2：含有 FGFR3 胞内段 cDNA 的转化子；3：阴性对照；4：DL2000 标准；5：阳性对照

图 2　转化子的 PCR 筛选

2.3　重组小鼠 FGFR3 胞内段 cDNA 质粒的测序

测序结果表明，获得了与插入片段阅读框一致的 BD 质粒。

2.4　质粒文库的扩增

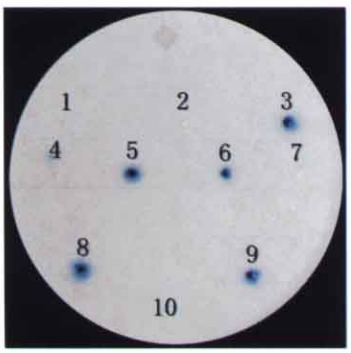
经有限稀释法测定使用的全胚胎文库的滴度为 2.1×10^{8}。文库的独立克隆数为 3.5×10^{6} 个，一次扩增 2～3 倍的独立克隆才能保证文库的完整性。我们使用 240 个直径为 150 mm 的平皿扩增了 7.2×10^{6} 个(30 μl 母液)，抽提质粒 DNA。

2.5　R3-PI 对报告基因自主激活活性的检测

经 R3-PI 转染的酵母 AH109 在 SD/-Trp 平板上可长出克隆，经 β-半乳糖苷酶滤膜影印法分析为阴性，在 SD/-His 平板上没有克隆生长，说明 R3-PI 对酵母菌株 AH109 无毒性且无自主激活活性。

2.6　酵母双杂交筛选及鉴定

酵母双杂交筛选结果见图 3，结合阴性和阳性对照，实验组中所筛选的文库 cDNA 有 3 个菌落在-Leu/-Trp/-His/-Ade 可以生长，并且 Lac Z Pheno 为阳性，可初步认为 FGFR3 胞内段蛋白和小鼠 17.5 d cDNA 文库表达的某几种蛋白质之间可能存在相互作用。将所得阳性克隆中的质粒提纯后进行测序，通过 Blast 得知 3 个阳性克隆中其中 1 个所含的质粒为 CDC2/CDC28-like kinases 4 (CLK4)。

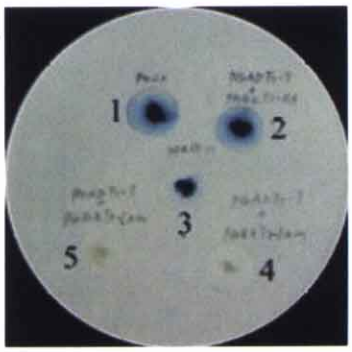


1－7：在-Leu/-Trp/-His/-Ade 培养基上生长的克隆；8：pCL-1(阳性对照 1)；9：pGBKT7-53 + pGADT7-T(阳性对照 2)；10：阴性对照：pGBKT7-Lams + pGADT7-T

图 3　X-gal 实验筛选阳性克隆

2.7　一对一回复性杂交实验

一对一回复性杂交实验结果见图 4。结合阴性和阳性对照，实验中所筛选的单一 AD 质粒(CLK4)和 BD 质粒(R3-PI)在-Leu/-Trp/-His/-Ade 可以生长，且 Lac Z Pheno 为蓝色，可进一步确认 R3-PI 和 CLK4 两者之间确实存在相互作用。



1：PCL-1(阳性对照 1)；2：pGBKT7-53 + pGADT7-T(阳性对照 2)；3：实验组：R3-PI + CLK4；4,5：阴性对照：pGBKT7-Lams + pGADT7-T

图 4　一对一回复性杂交实验结果

3　讨论

FGFR3 不同结构功能区域的突变可以引起不同的骨骼发育不良疾病，如软骨发育不良、致死性侏儒症、严重的软骨发育不全伴黑棘皮病。另外，多发性骨髓瘤、膀胱癌的发生也与 FGFR3 激活性突变有关[8]。目前的研究认为突变的 FGFR3 主要通过活化转录激活因子 Stats 等调节细胞生长周期，从而导致骨骼发育异常。而对于 FGFR3 在上皮肿瘤中的具体作用机制尚不清楚。目前的研究结果表明除 PLC-γ 和 FRS2 外，对其他能够直接与 FGFRs 相互作用从而引起有生物学效应的信号蛋白还缺乏深入的了解。

酵母双杂交系统作为研究蛋白质之间相互作用的一种有效技术，目前已被广泛的应用于生物学研究的各个领域。通过双杂交方法筛选与已知蛋白相互作用的蛋白，它们往往功能密切相关，彼此相互调节，共同参与某些生理、病理过程，这样可以加深对各种生物分子机制的理解，特别是对疾病相关基因的作用机制的了解。

本实验将编码 DNA-BD 的基因与 FGFR3 的胞内段 cDNA 融合，构建成 BD-DNA 质粒载体；而 Clontech 公司提供的小鼠 17.5 d 胚胎预置文库已与编码 DNA-AD 的基因融合。将两个质粒载体转化至酿酒酵母体内，表达出相应的蛋白质，使得酵母菌可以在相应的营养缺陷型的人工培养基上生长；同时因 Lac Z 基因的

表达,可以在底物 X-gal 的诱导下筛选出蓝色的阳性克隆。阳性克隆中所含的单个文库质粒重新与 BD 质粒一对一转化至 AH109 中进行一对一回复性杂交实验,进一步确证相互作用蛋白的特异性,再对阳性菌落进行下一步分析。本次实验筛选出 CLK4 与 FGFR3 之间存在相互作用。CLKs 属于"LAMMER"激酶家族,包括 CLK1、CLK2、CLK3、CLK4 4 个成员。该激酶具有双重激酶特异性,它们可以使靶蛋白的丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基发生磷酸化或去磷酸化[9]。体外磷酸化实验以及共表达实验证明 CLK1 和 CLK2 在体内能够使 PTP1B 磷酸化并激活 PTP1B,而 PTP1B 是胰岛素和 Leptin 的负性调节因子,PTP1B 敲除小鼠对胰岛素和 Leptin 的敏感性增强。Jowett 等[10]发现 CLK4 和 Beacon 之间存在相互作用,而 Beacon 与糖尿病的发生和能量代谢之间有密切的联系,这提示 FGFR3 和 CLK4 可能作为调节因子共同调节血糖和能量代谢。

另外,Katsu 等[11]通过酵母双杂交实验发现 CLK4 能够与 SR-蛋白 Clasp 相互作用,CLKs 通过自身激酶活性调节 SR-蛋白的分布,激活的 CLKs 使 SR-蛋白发生磷酸化,磷酸化的 SR-蛋白调节 CLKs 转录后的剪切,形成没有活性的 CLKs 剪切体,以此进行反馈性调节。当 CLKs 的活性或分布情况发生异常导致 SR-蛋白功能异常最终引起大量基因转录后剪切体形成以及蛋白表达异常。但目前对 CLKs 的下游信号传导以及激酶活性调节的具体机制还不清楚。

我们研究发现 FGFR3 和 CLK4 之间存在着相互作用,鉴于 CLK4 的上述作用,推测它可通过调节 FGFR3 活性(如酪氨酸残基磷酸化或去磷酸化)来参与调控和 FGFR3 功能有关的病理生理过程,如调控骨骼与组织器官发育。发现 CLK4 能够与 FGFR3 发生相互作用,为深入研究 FGFR3 在各种生理、病理过程中的作用提供了一个新的方向。

参考文献:

[1] ORNITZ D M, ITOH N. Fibroblast growth factors[J]. Genome Biol, 2001, 2(3):1-12.

[2] 杨启红,陈 林,朱京慈. 小鼠胫骨骨折愈合中 FGFR3 基因表达的原位定位[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(12): 1220-1222.

[3] MUENKE, SCHELL U. Fibroblast-growth-factor receptor mutations in human skeletal disorders[J]. Trends Genet, 1995, 11(8):308-313.

[4] CHEN L, ADAR R, YANG X, *et al*. Gly369Cys mutation in mouse FGFR3 causes achondroplasia by affecting both chondrogenesis and osteogenesis[J]. J Clin Invest, 1999, 104(11):1517-1525.

[5] FRANCOMANO C A, BELLUS G A, SZABO J, *et al*. A new skeletal dysplasia with severe tibial bowing, profound developmental delay and acanthosis nigricans is caused by a Lys 650 Met mutation in fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3)[J]. Am J Hum Genet, 1996, 59 (Suppl): A25.

[6] HADARI Y R, GOTOH N, KOUHARA H, *et al*. Critical role for the docking-protein FRS2 alpha in FGF receptor-mediated signal transduction pathways[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98 (15): 8578-8583.

[7] MOHAMMADI M, HONEGGER A M, ROTIN D, *et al*. A tyrosine-phosphorylated carboxy-terminal peptide of the fibroblast growth factor receptor (Flg) is a binding site for the SH2 domain of phospholipase C-gamma 1[J]. Mol Cell Biol, 1991, 11(10): 5068-5078.

[8] CHESI M, BRENTS L A, ELY S A, *et al*. Activated fibroblast growth factor receptor 3 is an oncogene that contributes to tumor progression in multiple myeloma[J]. Blood, 2001, 97(3): 729-736.

[9] NAYLER O, STAMM S, ULLRICH A. Characterization and comparison of four serine- and arginine-rich (SR) protein kinases[J]. Biochem J, 1997, 326(Pt 3): 693-700.

[10] JOWETT J B, ELLIOTT K S, CURRAN J E, *et al*. Genetic variation in BEACON influences quantitative variation in metabolic syndrome - related phenotypes[J]. Diabetes, 2004, 53(9): 2467-2472.

[11] KATSU R, ONOGI H, WADA K, *et al*. Novel SR-rich-related protein clasp specifically interacts with inactivated Clk4 and induces the exon EB inclusion of Clk[J]. J Biol Chem, 2002, 277(46): 44220-44228.

(编辑 龙 亮)

作者书写数字须知

根据《关于出版物上数字用法的规定》,本刊实行三位分节法(即从小数点算起,向左向右每3位分1节,节间留出一定空隙),废除千分撇分节法(如2,431改为2 431)。但年份、页数、部队编号、仪表型号、标准号不用三位分节法。中文出现的数字,凡属计数数值,一律用阿拉伯数字表示。

本刊编辑部