DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.15.018
第25卷第15期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 15
1352 2003年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)15-1352-03

利用酵母双杂合系统筛选与 hERRα1 相互作用的蛋白质

李渝萍,陈 敏,陈 彬,陈 健,李 强,周度金 (第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 利用酵母双杂合系统筛选乳腺组织中与人雌激素受体相关受体α1(Human estrogen receptor related-receptorα1, hERRα1)相互作用的蛋白质,特别是新的核受体辅助活化因子,以进一步研究核受体辅助活化因子在乳腺癌发生、发展中如何参与 ERR1 调控基因的表达。方法 以质粒 pGBT9-hERRα1/LBD 为"诱饵",筛选人乳腺组织 cDNA 文库。结果 筛得有阳性相互作用的克隆共 17 个。除 3 种为已知核受体辅助调节因子外,其他为功能已经明确的蛋白,其中有 3 种与 hERRα1 有明显相互作用。结论 核受体辅助活化因子 SRC-1, RIP140, TRIP 及数种已知蛋白能与孤儿核受体 hERRα1 在乳腺组织中相互作用。

关键词:人雌激素受体相关受体α1;核受体辅助活化因子;酵母双杂合系统;乳腺癌
中图法分类号:Q51;Q71;R392.11 文献标识码:A

Identification of ERRα1-interacting proteins by yeast two-hybrid screening

LI Yu-ping, CHEN Min, CHEN Bin, CHEN Jian, LI Qiang, ZHOU Du-jin (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To understand the role and the regulatory mechanism of hERRα1 in breast cancer development by means of cloning the genes which encode the hERRα1-interacting proteins by screening a mammary gland cDNA expression library using yeast two-hybrid approach. Methods hERRα1/LBD was used as the bait to screen a human mammary gland cDNA expression library by yeast two-hybrid approach. Results A total of 17 positive clones were obtained and analyzed. Except 3 known nuclear receptor coregulators, the rest were known proteins and 3 of them interacted with hERRα1 strongly. Conclusion Nuclear receptor coregulators SRC-1, RIP140, TRIP and some known proteins can interact with orphan nuclear receptor hERRα1 in human mammary gland tissue.

Key words: human estrogen receptor-related receptor α1 (hERRα1); nuclear receptor coactivator; yeast two-hybrid system; breast cancer

雌激素受体相关受体(Estrogen receptor-related receptors, ERRs)是核受体超家族中尚未发现相应配体的孤儿受体亚家族的一员。hERRα1 是 ERRs 在人乳腺癌组织中表达的主要异构体形式。本实验室前期研究表明,约 80%的乳腺癌组织有 ERRα1 表达,且表达水平高于正常组织 3~4 倍[1]。ERRα1 与雌激素的生物合成有密切的关系,本身的表达受雌激素的调节[2],对雌激素受体(Estrogen receptor, ER)阳性或阴性乳腺癌细胞的生长均有抑制。鉴于雌激素及雌激素受体在乳腺癌的发展中的重要作用[3],我们推测 ERRα1 可能是除 ERα 之外又一个对乳腺癌发展起关键作用的受体。为进一步探讨 ERRα1 在乳腺癌发生、发展中的可能作用途径与机制,并重点研究新近发现的核受体辅助活化因子在其间的作用,我们采用酵母双杂合系统来研究乳腺组织中与 ERRα1 有相互作用的蛋白质,并初步确定了能与 ERRα1 相互作用的一些蛋白质序列。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 酵母菌株及大肠杆菌菌株 CG1945 酵母菌株,Y187 酵母菌株来自 CLONTECH 公司 MATCHMAKER 试剂盒,大肠杆菌 HB101 菌株由本室保存。

1.1.2 质粒及 cDNA 文库 pGBT9, pACT2 及各种对照质粒来自 CLONTECH 公司 MATCHMAKER 试剂盒。"诱饵"蛋白质粒 pGBT9-hERRα1/LBD 由本室自行构建[4]。正常人乳腺组织 pACT2-cDNA 文库质粒由美国加州 Beckmann 癌症研究中心陈暄教授惠赠。

基金项目:国家自然科学基金"两个基地建设"专项资助项目(9910761946);国家自然科学基金资助项目(30070359)

作者简介:李渝萍(1969-),女,重庆市人,博士研究生,讲师,主要从事核受体及辅助调节蛋白在表达调控中作用方面的研究。电话:(023)68752261
通信作者:周度金,电话:(023)68752261

收稿日期:2002-09-07;修回日期:2002-12-13

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.1.3　培养基及其他生物化学及分子生物学试剂　　各种酵母选择培养基及 YPD 培养基购自 CLONTECH 公司。细菌 LB、M9 培养基为自行配制。

酵母转化试剂盒购自 BIO101(USA)公司, ONPG、X-gal, 3-AT(3 氨基-1, 2, 4-三唑)分别购自 SIGMA 和 BRL 公司, 其他试剂为国产分析纯。

1.2　方法

1.2.1　cDNA 文库的扩增及质粒的抽提　　按常规方法鉴定人乳腺组织 pACT2-cDNA 文库的滴度并扩增。在氨苄抗性 LB 琼脂平板上以足够的密度直接涂铺文库(35 块直径为 150 mm 平板), 37 ℃过夜培养。每板生长约 2.4×10^4 个菌落。从平板中将菌落刮入 1~2 L 的氨苄/LB 的肉汤培养基中 37 ℃振荡培养 2~4 h, 按常规方法进行大量高纯度的质粒纯化。

1.2.2　酵母感受态细胞的制备及质粒转化　　参照 BIO101 公司试剂盒说明书制备酵母 CG1945 感受态细胞, 将 pGBT9-hERR1/HBD 质粒和文库质粒依次转化酵母 CG1945 菌株。各组对照质粒同时共转化入 CG1945 的感受态细胞。转化产物铺于 SD/-Trp/-Leu/-His 培养基上。

1.2.3　Lac Z 报告基因活性的测定

1.2.3.1　β-半乳糖苷酶活性定性分析-菌落影印滤膜分析　　将 SD/-Leu/-Trp/-His 平板上新鲜生长的菌落按常规方法影印到消毒滤膜上。30 ℃培养 1~2 d 后, 液氮冻融破菌, 用 Z 缓冲液/X-gal 溶液(100 ml Z 缓冲液中加入 0.27 ml β 巯基乙醇和 1.67 ml 20 mg/ml 的 X-gal)显色, 记录菌落显蓝色的时间。以 30 min~8 h 显色为阳性结果, 超过 8 h 为假阳性(Z 缓冲液的配制见说明书)。

1.2.3.2　β-半乳糖苷酶活性定量分析-以 ONPG 为底物进行液体分析　　取 0.5 ml SD/-Leu/-Trp 的酵母液体过夜饱和培养物转接至 3 ml YPD 培养基中继续培养至对数生长期, 参照试剂盒的说明以 ONPG 为底物定量测定菌株β-半乳糖苷酶活性。

1.2.4　酵母质粒的抽提及转化入 *E. coli* 细胞　　将已分离好的 CG1945 酵母转化菌落接种入 5 ml SD/-Leu/-Trp/-His/+ 3-AT 培养基中(5 mmol/L 3-AT), 30 ℃振荡培养 24 h 至培养物饱和。收集细胞, 按说明书的方法抽提酵母质粒, 重悬于 20 μl 1× TE 缓冲液中。

取 0.5 μl 质粒转化 *E. coli* HB101 感受态细胞, 铺在含 50 μg/ml 氨苄青霉素, 40 μg/ml 脯氨酸, 1 mmol/L 盐酸硫胺素的 M9 琼脂培养基上。从 Leu^+, Amp^r HB101 转化克隆中扩增并提纯质粒。

1.2.5　DNA 序列的测定　　纯化的质粒用 DNA 自动测序仪进行序列测定, 并用 BLAST 程序进行基因比对。

2　结果

2.1　酵母双杂合试验结果

2.1.1　用 HIS 3 报告基因的表达来筛选可能的阳性相互作用菌株　　pGBT9-hERR1/HBD 和 pACT2-文库质粒共转化产物在 SD/-Trp/-Leu/-His/3-AT 培养基上共生长直径超过 1 mm 酵母克隆 24 个。

2.1.2　用 Lac Z 报告基因的表达去除可能的假阳性菌株　　用菌落影印滤膜法分析 Trp^+, Leu^+, His^+ 的酵母菌落, 得到蓝色阳性菌落 17 个, 见表 1。

表 1　酵母双杂合及序列分析结果

Tab 1　Results of yeast two-hybrid and sequence analysis

No.	Clone number	HIS acivity	β-gal activity	Sequence	No.	Clone number	HIS acivity	β-gal activity	Sequence
1*	E1-3	+	+	SRC-1	13*	E14-1	+	+	P2
2	E2-2	+	-	-	14*	E15-3	+	+	P3
3*	E2-5	+	+	SRC-1	15*	E17-2	+	+	P4
4*	E4-1	+	+	RIP-140	16	E17-3	+	-	-
5*	E8-1	+	+	P1	17*	E18-1	+	+	RIP-140
6*	E9-3	+	+	P2	18	E18-2	+	-	-
7*	E10-2	+	+	P2	19	E18-3	+	-	-
8*	E11-3	+	+	TRIP-1	20*	E20-5	+	+	P2
9	E11-4	+	-	-	21	E21-3	+	-	-
10*	E12-1	+	+	P2	22*	E21-10	+	+	P5
11*	E13-1	+	+	P2	23*	E22-5	+	+	P6
12	E13-2	+	-	-	24*	E23-2	+	+	P2

*: Positive clones screened by clony lifting

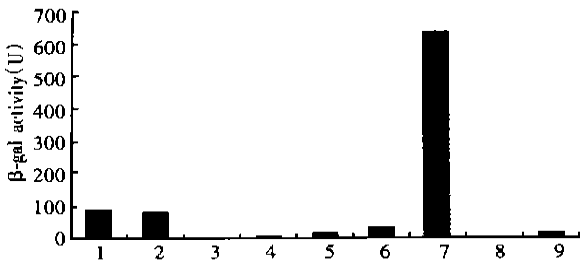
2.2　克隆的序列分析结果

抽提酵母质粒转化入大肠杆菌 HB101 感受态细胞后, 筛选出文库质粒。自动测序分析后查明, 17 个克隆中共有 9 种蛋白质。有 5 个为 3 种已知的核受体辅助调节因子 SRC-1(Steroid receptor coactivator 1), RIP140(Nuclear receptor interaction protein 140), TRIP7(Thyroid receptor interaction protein 7)的克隆, 其他 12 个克隆分属 6 种已知功能的蛋白(P1-P6), 以前未见这些蛋白有能与核受体相互作用功能的报道, 见表 1。

2.3　阳性克隆与诱饵蛋白在 Y187 中的相互作用

将筛选得到的 9 种与 hERRα1 有阳性相互作用的质粒分别与 pGBT9-hERRα1/LBD 一对一回转入酵母 Y187 细胞, 以 ONPG 为底物定量分析 Lac Z 报告基因的活性, 除 3 种已知的核受体辅助调节因子外, 还有 P3、P4 和 P6 3 种蛋白质与 hERRα1 有明显相互作用, 见图 1。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



1: ERR1/HBD+SRC-1; 2: ERR1/HBD+RIP140; 3: ERR1/HBD+P1; 4: ERR1/HBD+PS; 5: ERR1/HBD+TRIP-1; 6: ERR1/HBD+P3; 7: ERR1/HBD+P4; 8: ERR1/HBD+P5; 9: ERR1/HBD+P6

图1 hERRα1/LBD与阳性克隆在Y187中的相互作用

Fig 1 Interaction of ERRα1/LBD and positive clones in Y187

3 讨论

hERRα1是用人雌激素受体(ER)DNA结合域的编码序列为探针筛选cDNA文库而克隆的,在配体结合域和DNA结合域的锌指结构上与雌激素受体α(ERα)的序列有高度的一致性,除了能促进雌激素的生物合成,并与雌激素受体竞争靶基因上的激素反应元件外,还可以通过与ER竞争对核受体辅助活化因子的募集来调节由雌激素及其受体介导的基因的转录激活[5],参与多种基因的表达调控。除本实验室的前期研究结果外,尚有多篇文献报道了ERRα1与乳腺癌的关系,实验结果提示了除雌激素受体和孕激素受体外,雌激素受体相关受体可能是与乳腺癌有密切关系的另一核受体。

hERRα1同其他的核受体一样,与其识别的特定DNA元件(与雌激素受体反应元件相同)结合后,还要通过募集辅助活化因子(Coactivator),以使所调控基因区的核小体组蛋白乙酰化,同时募集基本转录复合物到转录起始区,参与对所调控基因的调节。而各种辅助活化因子还能与其他转录因子相互作用,使它们相互联系,形成多层次、网络状的基因表达调控系统。在此网络中多种转录因子和辅助调节因子既协同又竞争,从而使得细胞中特定基因转录的调控更加精密和准确[6]。寻找参与核受体调控基因表达过程中的辅助活化因子并弄清它们在调控基因表达中的作用,对理解核受体的作用机制及进一步进行药物开发,有着重要的意义。

本实验采用了酵母双杂合系统来筛选hERRα1的辅助活化因子。该系统以酵母转录因子GAL4为基础,用于探测酵母细胞中特异的蛋白-蛋白间相互作用[7]。诱饵蛋白hERRα1与GAL4的DNA结合域(DBD)融合表达,cDNA文库与GAL4的激活域(AD)融合表达。当两种蛋白在酵母中能够相互作用时,GAL4的DBD和AD被"栓"在一起,通过结合在上游的激活序列来激活下游报告基因的表达,从而能使我们通过酵母表型的改变来观察到这种相互作用关系。

实验结果显示,我们筛选到了多种能与ERRα1相互作用的蛋白质,其中有3种是已知的转录作用辅助调节因子SRC-1,RIP140,TRIP-1,证明它们在ERRα1的转录活化过程中发挥作用。另外还有6种其他蛋白质也显示出能与hERR1相互作用。回转实验证实,至少有3种蛋白质(P3,P4,P6)与hERRα1有较强的相互作用,与ER也有明显的配体依赖的相互作用。至今尚未见报道这些蛋白质具有与核受体相互作用的辅助调节功能,提示这3种蛋白很有可能是潜在的核受体辅助活化因子。特别是其中的P4,与ERRα1的相互作用强度远远超过了几种已知的核受体辅助活化因子,是我们今后工作的研究重点。

通过酵母双杂合筛选到与ERRα1有相互作用的多种蛋白质,为我们进一步的工作打下了良好的基础,也证明酵母双杂合系统是研究蛋白质-蛋白质相互作用的一个切实可行的实验技术。

参考文献:

[1] 陈 健,陈 敏,陈 彬,等. ERRα-1在乳腺癌中的表达及其对芳香族化酶表达的调控[J]. 第三军医大学学报,2002,24(10):1233-1235.

[2] 周度金,杨 春,周长保,等. 核受体及核受体辅活化子对芳香族化酶基因转录调控的研究[J]. 第三军医大学学报,2001,23(12):1421-1424.

[3] Castagnetta L, Traina A, Agostara B, *et al*. Ligand binding and cytochemical analysis of estrogen and progesterone receptors in relation to follow-up in patients with breast cancer[J]. Ann N Y Acad Sci, 2002,963:98-103.

[4] 陈 敏,李渝萍,陈 健 等. hERR1/HBD酵母表达质粒的构建及初步鉴定[J]. 第三军医大学学报,2003,25(1):51-53.

[5] Zhang Z, Teng C T. Estrogen receptor alpha and estrogen receptor-related receptor alpha1 compete for binding and coactivator[J]. Mol Cell Endocrinol, 2001,172(1-2):223-233.

[6] 陈 彬,陈 敏,陈 健,等. 核受体辅活化子PNRC与孤儿核受体SF1相互作用位点的鉴定[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2002,18(1):38-43.

[7] Nagpal S, Ghosn C R, Chandraratna R A. Identification of nuclear receptor interacting proteins using yeast two-hybrid technology. Applications to drug discovery[J]. Methods Mol Biol, 2001,176:359-376.

(编辑 王 红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net