

应用酵母双杂交系统筛选 LKB1 相互作用蛋白

徐卿^{1,2} 李洪涛² 林峰² 姚阳²

摘要 目的 应用酵母双杂交技术研究与抑癌基因 LKB1 发生相互作用的蛋白。方法 应用酵母双杂交系统,以人 LKB1 为诱饵,筛选人类全基因组开放阅读框酵母双杂交文库,寻找能与之相互作用的蛋白,并且通过免疫共沉淀和 GST-Pull down 实验证实其之间的相互作用。结果 经过酵母双杂交共获得 17 个克隆,经过验证分析,最终确定 1 个无重复阳性克隆。结论 获得的 1 个基因编码的蛋白可能揭示 LKB1 新的作用机制。

关键词 LKB1; HERC3; 酵母双杂交; 泛素化

中图分类号 R 730.3; Q 816

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)02-0232-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.02.023

LKB1 (liver kinase B1) 即 STK11 (serine/threonine protein kinase 11),首次是在黑斑息肉综合征研究中被报道的^[1],其在胰腺、肝脏等机体器官组织中广泛表达。LKB1 基因可编码一个由 436 位氨基酸组成的蛋白质,属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,其 N 端第 38~43 位氨基酸残基是其核定位信号序列,第 50~319 位氨基酸为其激酶催化域。LKB1 通过核定位信号序列主要定位于细胞核内,在胞质中表达相对较少,然而 LKB1 的功能主要与其胞质内的部分有关^[2-3]。研究^[4-5]显示, LKB1 通过磷酸化其底物腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP activated protein kinase, AMPK),从而激活 AMPK,负向调节 mTOR 的活性,在控制和调节细胞能量代谢、细胞增殖、细胞周期、细胞凋亡和细胞极性中发挥着重要作用。为更清楚了解 LKB1 在体内的作用机制,揭示 LKB1 可能存在的新功能,该研究利用酵母双杂交系统,以 LKB1 为诱饵,筛选人类全基因组开放阅读框酵母双杂交文库,寻找能与之相互作用的蛋白。

2017-11-08 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金 (编号: 81102038)

作者单位: ¹ 苏州大学附属第三医院肿瘤科 苏州 215006

² 上海交通大学附属第六人民医院肿瘤内科,上海 200233

作者简介: 徐卿,男,主治医师,博士研究生;

姚阳,男,主任医师,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: yangyao_6@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 试剂与材料 GAL4 酵母双杂交系统与 human ORFeome Y2H library 文库、转染试剂 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司; Yeast Nitrogen Base、Bacto-yeast extract、Bacto-Peptone 购自美国 BD 公司; PEG50、葡萄糖、醋酸锂、谷胱甘肽硫转移酶 (glutathione-S-transferase, GST) 及 GST 融合蛋白、各种氨基酸购自上海拜科生物科技有限公司; 3-氨基-4,2,4-三唑、玻璃珠购自美国 Sigma 公司; Glutathione Sepharose 4B beads 购自上海联沅生物科技有限公司; 质粒小量提取试剂盒购自美国 Promega 公司; 酵母质粒提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; Tag 酶、DNA 限制性内切酶购自美国 NEB 公司; T4DNA 连接酶购自北京全式金生物技术有限公司; XgaI、DMEM 高糖培养基与胎牛血清购自美国 Gibco 公司; 增强化学发光显色试剂盒购自美国 Pierce 公司; Mav203 细菌感受态为实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 构建 Bait 质粒 LKB1 全长克隆到 pDONR221 载体,通过 Gateway cloning reaction (美国 Invitrogen 公司) 转移到含有 GAL4 DNA binding domain 的 pDEST32 载体,构建 Bait 载体 pDEST32-LKB1,用 LiAc 转化法将 pDEST32-LKB1 转化入 Mav203 酵母菌株,转化成功的菌株通过 SD-Leu 的培养基选择性筛选阳性克隆,将转化了 pDEST32-LKB1 的酵母菌株制成感受态细胞。

1.2.2 自激活检测 用 LiAc 转化法将含有 GAL4 activating domain 的 prey 质粒空载 (pDEST22) 转化含有 Bait 基因的感受态细胞,转化后同时涂布二缺板 SD-2 (SD-Leu-Trp) 和 4 缺板 SD-4 (SD-Leu-Trp-His-Ura) 的营养缺陷板,如果能在 SD-4 上生长说明有自激活效应,该 Bait 蛋白能与 GAL4 activating domain 相互作用。没有自激活效应再进行下一步筛选。

1.2.3 文库筛选 用 LiAc 转化法将 prey 质粒 (human ORFeome Y2H library) 转化该菌株,转化后同时涂布 SD-2 和 SD-4 的营养缺陷板,SD-Leu-Trp 的培

养板可以用于转化效率的评估,阳性克隆可以在 SD-4 的培养板上生长并且使 X-Gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside,美国 Sigma 公司)显蓝色,抽取酵母阳性克隆质粒转化大肠杆菌,抽质粒测序,确定阳性克隆基因。

1.2.4 克隆验证 将 Bait 和 Prey 载体共同转化酵母菌株 Mav203 并分别涂布 SD-2 和 SD-4 酵母培养板, X-Gal 显色反应验证相互作用。将回转阳性的质粒送上海铂尚生物技术有限公司测序。测序结果在美国国立生物技术信息中心网站上进行序列比对分析。

1.2.5 HERC3 真核表达载体构建 以含 HERC3 全长 cDNA 为模板通过下游带有 HA 标签的引物,运用 PCR 方法扩增 HERC3 全长序列(正向引物: 5'-CGGAATTCATGTTATGTTGGGATATTG-3'; 反向引物: 5'-ATGAAGGGTTTAGTTTGGCCTACCCAT-ACGACGTCCCAGACTACGCTTAAGTCGAGCGG-3')。PCR 产物经过 EcoR I、Xho I 双酶切,与 pcDNA3.1 (+) 载体用 T4 DNA 连接酶在 16 °C 的条件下连接过夜。然后将连接的产物转化摇菌,用小抽试剂盒抽提质粒,PCR 鉴定正确后送至上海铂尚生物技术有限公司测序。

1.2.6 细胞培养及转染 HEK293FT 细胞在含 10% 胎牛血清、0.1% 青霉素和链霉素的 DMEM 高糖培养基中培养。待细胞生长状况良好时,胰酶消化并接种培养皿中,当细胞密度生长至 70% ~ 80% 时,换成无双抗的 Opti-DMEM 培养基培养,并用 Opti-DMEM 培养基将 Lipofectamine2000 以及质粒以 1:1 的比例混匀,室温孵育 20 min,再均匀加入相应培养皿中,转染 4 ~ 6 h 后换为含 10% 胎牛血清、0.1% 青霉素和链霉素的 DMEM 高糖培养基继续培养。

1.2.7 免疫共沉淀 ① 收集细胞,加 500 μ l 细胞裂解液 RIPA buffer (添加 PMSF) 裂解细胞。② 裂解细胞于 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,取上清液。其中需另外留取 50 μ l 上清液,加入 5 $\times$ SDS 样品缓冲液,煮沸 10 min, -20 °C 保存留作 Input 的样品。③ 免疫共沉淀: 加入 1 μ g 抗体,4 °C 充分混匀 4 h 或者过夜。再加入 20 μ l 用细胞裂解液平衡过的 protein G beads,4 °C 充分混匀 4 h。1 000 r/min 离心 3 min,弃上清液。加 1 ml 细胞裂解液,4 °C 轮转 10 min,1 000 r/min 离心 3 min,弃上清液,重复洗涤 3 次。④ Western blot 检测: 吸尽上清液,加 60 μ l 1 $\times$ SDS 样品缓冲液,煮沸 10 min,12 000 r/min

离心 5 min,取上清液电泳,Western blot 检测沉淀及共沉淀蛋白质。

1.2.8 GST-Pull down 按照实验组别分别加入 GST-LKB1 融合蛋白(对照组用 GST 蛋白)和过表达 HERC3 的细胞裂解液,然后分别加入等量 Glutathione Sepharose 4B beads,并补充 GST-Pull down buffer 到总体积 500 μ l。4 °C 充分混匀 4 h 后,GST-Pull down buffer 漂洗 3 次,煮样,Western blot 检测沉淀蛋白。

1.3 统计学处理 数据采用 SPSS 16.0 软件进行分析,两组间实验数据的比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 E3 连接酶 HERC3 能够与 LKB1 蛋白相互作用 利用已有的 cDNA 文库,采用酵母双杂交方法筛选到 HERC3 能与 LKB1 相互作用。HERC3 属于 E3 连接酶,含有染色体浓缩调节因子 1 相似结构域和同源 E6-AP 羧基末端结构域。HERC3 与 LKB1 的相互作用能够使酵母在 4 缺板 SD-4(SD-Leu-Trp-His-Ura) 上生长,并能够激活 β -galactosidase 活性。见图 1。

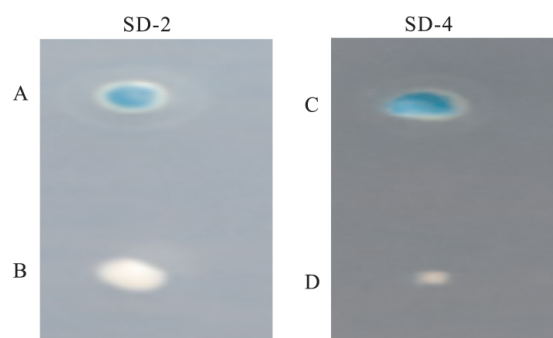


图1 酵母双杂交系统检测 LKB1 与 HERC3 有相互作用

A: HERC3 + LKB1 共转并在 SD-2 上生长; B: Blank + LKB1 共转并在 SD-2 上生长; C: HERC3 + LKB1 共转并在 SD-4 上生长; D: Blank + LKB1 共转并在 SD-4 上生长; 蓝色为阳性克隆

2.2 pcDNA3.1-HERC3-HA 真核表达载体的构建及鉴定 构建成功的重组质粒 pcDNA3.1-HERC3-HA 经过 PCR 检测鉴定,经过 DNA Marker 比对后,显示与目的片段条带位置一致,证明连接是成功的。然后送测序,序列与基因库序列一致,质粒构建成功。见图 2。

2.3 HERC3 与 LKB1 在细胞内的相互作用 采用免疫共沉淀的实验方法,将带有 Flag 标签的 LKB1 和带有 HA 标签的 HERC3 质粒共转染

HEK293FT 细胞,同时分别设置 pcDNA3.1-Flag + pcDNA3.1-HERC3-HA 和 IP: IgG 作为阴性对照。结果表明,HERC3 和 LKB1 结合,而不与 Flag 标签结合,说明 HERC3 和 LKB1 蛋白在细胞内存在特异性的相互作用。见图 3。

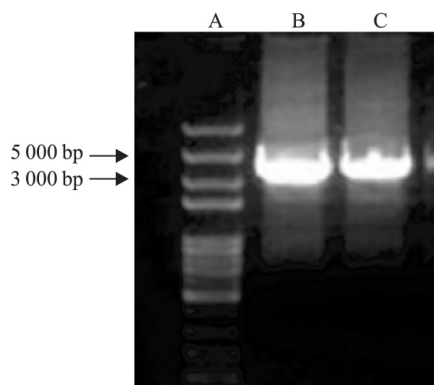


图2 重组质粒 pcDNA3.1-HERC3-HA PCR 鉴定电泳图

A: DNA Marker; B: 以 cDNA 文库为模板 PCR 方法扩增 HERC3; C: 重组质粒 PCR 鉴定 HERC3 条带

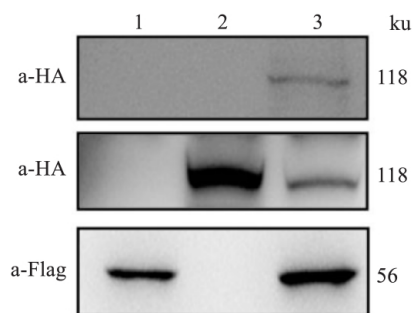


图3 HERC3 与 LKB1 在 HEK293FT 细胞内的相互作用

1: LKB1-Flag; 2: HERC3-HA + pcDNA3-Flag 共转; 3: HERC3-HA + LKB1-Flag 共转

2.4 GST-Pull down 验证 HERC3 与 LKB1 的相互作用 以 GST-LKB1 融合蛋白为诱饵蛋白,过表达 HERC3 的细胞总蛋白为捕获蛋白,分别设置 HERC3-HA + GST 蛋白组、HERC3-HA + GST-LKB1 融合蛋白组,进行 Pull-down 实验,最后收集到的样品进行 Western blot 检测沉淀蛋白。结果表明,GST-LKB1 能够特异性结合 HERC3,而 GST 蛋白不能够沉淀 HERC3。见图 4。

3 讨论

目前研究^[6]表明,LKB1 参与体内多种生物学过程:① LKB1 能够抑制肿瘤细胞的增殖,阻滞细胞周期在 G1 期;② LKB1 能够抑制 mTOR 通路的活

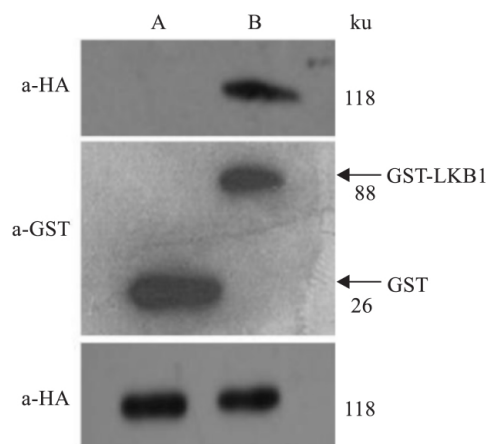


图4 GST-Pull down 验证 HERC3 与 LKB1 的相互作用

A: HERC3-HA + GST 蛋白; B: HERC3-HA + GST-LKB1 融合蛋白

性,减少细胞内蛋白合成;③ LKB1 在细胞的极性调控中发挥着关键性作用。Wilkinson et al^[7-8]发现,LKB1 通过和 STRAD 蛋白形成复合物而活化后,能够在没有细胞间连接和其他极性诱导因素的条件下,使单个的小肠上皮细胞自发性形成顶-基极性。

近年来有大量研究^[9-10]表明,LKB1 不仅仅是 PJS 的致病基因,也是多种肿瘤发生的重要基因,如肺癌、乳腺癌、胃癌等,LKB1 在肿瘤的发生、分化、转移中发挥至关重要的作用,在前列腺癌中 LKB1 通过 AMPK 通路发挥其抑癌作用;在乳腺癌中,LKB1-AMPK 通过作用于 mTOR 发挥其抑癌作用。

HERC3 作为同源 E6-AP 羧基末端结构域家族的泛素连接酶 E3,可以直接催化靶蛋白的泛素化。已有研究^[11]显示,在胃癌、结肠癌中 HERC3 存在突变。HERC3 与 hPLIC-1 和 hPLIC-2 相互作用并定位于晚期内涵体和溶酶体^[12]。HERC3 通过其 E3 连接酶功能泛素化并促进 NF- κ B RelA 降解,进而负调 NF- κ B 信号通路^[13]。

泛素化修饰属于蛋白质翻译后修饰的一种,通过泛素-蛋白酶系统介导参与的调节蛋白质降解的过程,普遍存在于真核细胞中。泛素化修饰对于蛋白质的稳定性、亚细胞定位及信号转导过程等具有重要的调节功能。其中泛素连接酶 E3 决定了底物识别的特异性并最终催化底物蛋白的泛素化过程。HERC3 属于膜转运所涉及的 E3 泛素连接酶家族,主要分布在胞质。该家族一般包含一个同源 E6-AP 羧基末端结构域和一个或多个染色体浓缩调节因子 1 相似结构域(RCC1-like 结构域),LKB1 在胞质也有分布,而且 LKB1 的主要功能也与其胞质部分相

关^[14]。

对于 LKB1 在疾病中的确切分子机制目前仍未明确,本研究采用酵母双杂交方法成功筛选出 HERC3 与 LKB1 在体内存在相关作用,同时利用免疫共沉淀实验以及 GST-Pull down 实验分别在体内外对二者的相互作用进行进一步验证。结果显示 LKB1 在体内外均可以有效地结合 HERC3,说明了其相互作用的可靠性。提示 HERC3 有可能通过与 LKB1 特异性的结合进而影响 LKB1 所参与体内多种生物学过程。对于 HERC3 可能涉及或参与调控 LKB1 作用的方式还有待于进一步的研究与探索,可能对肿瘤的诊断治疗、为药物开发提供靶点及理论指导具有一定的意义。

参考文献

- [1] Korse S E , Van Leerdam M E , Dekker E. Gastrointestinal diseases and their oro-dental manifestations: Part 4: Peutz-Jeghers syndrome[J]. Br Dent J 2017 , 222(3) : 214 - 7.
- [2] Chen C , Zhang X , Wang D , et al. Genetic screening and analysis of LKB1 gene in Chinese patients with peutz-jeghers syndrome [J]. Med Sci Monit , 2016 , 22: 3628 - 40.
- [3] Liemburg-Apers D C , Wagenaars J A , Smeitink J A , et al. Acute stimulation of glucose influx upon mitochondrial dysfunction requires LKB1 , AMPK , Sirt2 and mTOR-RAPTOR[J]. J Cell Sci , 2016 , 129(23) : 4411 - 23.
- [4] Han J , Liang H , Tian D , et al. mTOR remains unchanged in diet-resistant (DR) rats despite impaired LKB1/AMPK cascade in adipose tissue[J]. Biochem Biophys Res Commun , 2016 , 476(4) : 333 - 9.
- [5] Sundararaman A , Amirtham U , Rangarajan A. Calcium-oxidant signaling network regulates amp-activated protein kinase (AMPK) activation upon matrix deprivation [J]. J Biol Chem , 2016 , 291(28) : 14410 - 29.
- [6] Shan T , Xu Z , Liu J , et al. Lkb1 regulation of skeletal muscle development , metabolism and muscle progenitor cell homeostasis [J]. J Cell Physiol , 2017 , 232(10) : 2653 - 6.
- [7] Wilkinson S , Hou Y , Zoine J T , et al. Coordinated cell motility is regulated by a combination of LKB1 farnesylation and kinase activity [J]. Sci Rep , 2017 , 7: 40929.
- [8] Rungsung I , Ramaswamy A. Insights into the structural dynamics of liver kinase B1 (LKB1) by the binding of STe20 related adapter α (STRAD α) and mouse protein 25 α (MO25 α) co-activators [J]. J Biomol Struct Dyn , 2017 , 35(5) : 1138 - 52.
- [9] Strazisar M , Mlakar V , Rott T , et al. Somatic alterations of the serine/threonine kinase LKB1 gene in squamous cell (SCC) and large cell (LCC) lung carcinoma [J]. Cancer Invest , 2009 , 27(4) : 407 - 16.
- [10] Sun A , Li C , Chen R , et al. GSK-3 β controls autophagy by modulating LKB1-AMPK pathway in prostate cancer cells [J]. Prostate , 2016 , 76(2) : 172 - 83.
- [11] Yoo N J , Park S W , Lee S H. Frameshift mutations of ubiquitin-related genes HERC2 , HERC3 , TRIP12 , UBE2Q1 and UBE4B in gastric and colorectal carcinomas with microsatellite instability [J]. Pathology , 2011 , 43(7) : 753 - 5.
- [12] Hochrainer K , Kroismayr R , Baranyi U , et al. Highly homologous HERC proteins localize to endosomes and exhibit specific interactions with hPLIC and Nm23B [J]. Cell Mol Life Sci , 2008 , 65(13) : 2105 - 17.
- [13] Hochrainer K , Pejanovic N , Olaseun V A , et al. The ubiquitin-ligase HERC3 attenuates NF- κ B-dependent transcription independently of its enzymatic activity by delivering the RelA subunit for degradation [J]. Nucleic Acids Res , 2015 , 43(20) : 9889 - 904.
- [14] Russo G L , Russo M , Ungaro P. AMP-activated protein kinase: a target for old drugs against diabetes and cancer [J]. Biochem Pharmacol 2013 , 86(3) : 339 - 50.

Screening proteins interacting with human LKB1 by yeast two hybrid system

Xu Qing^{1,2} , Li Hongtao² , Lin Feng² , et al

(¹Dept of Oncology , The Third Affiliated Hospital of Soochow University , Suzhou 215006;

²Dept of Oncology , Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University , Shanghai 200233)

Abstract Objective To study interaction proteins of LKB1 by yeast two-hybrid system. **Methods** Using LKB1 as bait , human ORFeome Y2H library was screened and the proteins interacting with LKB1 were searched and confirmed by immunoprecipitation and GST-Pull down experiments. **Results** One true positive clones from yeast clones were obtained after verification. The results of Co-IP and GST-Pull down illustrated that HERC3 interacted with LKB1. **Conclusion** The encoding proteins we obtained may play important roles in finding the new function of LKB1.

Key words LKB1; HERC3; yeast two-hybrid; ubiquitination