

从小鼠 11.5d 胚胎 cDNA 文库中筛选 Dishevelled2 相互作用蛋白

黄世思¹ 翟永功² 韩 亮¹ 张新军¹ 王银银¹ 常智杰^{1*}

¹(人类基因组研究所,清华大学生物科学与技术系,清华大学生命科学与医学研究院,北京 100084)

²(北京师范大学,生命科学学院,生物医学研究所,北京 100875)

摘 要 Dishevelled (Dvl) 是个多功能、进化上非常保守的蛋白,在 Wnt 信号传导通路中起着重要的作用。为了研究 Dishevelled 介导 Wnt 信号传递的分子机制,利用 GAL4 酵母双杂交系统筛选了小鼠 11.5d 胚胎 cDNA 文库,发现了 15 个可与小鼠 Dvl2 DEP 结构域和羧基端相互作用的蛋白质。将阳性文库质粒测序并对测序结果做 BLAST 分析,发现其中一个阳性克隆是编码 Gli3 蛋白氨基端(6-122 aa)的 cDNA 片段,从而暗示 Gli3 蛋白可能与 Dishevelled 一起作用并参与某些生物学过程。

关键词 Wnt, Dishevelled, Gli3, 酵母双杂交

中图分类号 Q71 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)05-0750-04

Wnt 信号通路在胚胎发育和肿瘤发生过程中起着非常重要的作用。在胚胎发育过程中,Wnt 途径不但参与了胚胎背腹轴的形成,而且与细胞极性建立、细胞命运决定等多个发育事件有关^[1,2]。此外,学者们也发现,许多肿瘤的发生与 Wnt 途径成员的突变相关。譬如, β -catenin 和 APC 相结合位点的突变^[3]导致了结肠癌的形成, β -catenin 的突变还和黑色素瘤的形成密切相关。这些研究表明 Wnt 信号途径的各种成分在人类疾病和发育中均起了重要的作用。

Dishevelled 是机体组织细胞中广泛存在的胞浆蛋白,具有多功能和进化上高度保守的特点,于 1959 年由 Fahmy *et al* 首次在果蝇可存活的 Dishevelled(Dsh)突变类型中克隆得到^[4]。Dishevelled 蛋白约有 600~700 个氨基酸,有 3 个高度保守的结构域,即氨基末端的 DIX (Dishevelled Axin)结构域、中间的 PDZ (PSD-95 ZO-1 Discs-large)结构域和羧基末端的 DEP (Dishevelled-EGL-10-Pleckstrin)结构域。从低等生物水螅、线虫、爪蟾,到哺乳动物小鼠和人都发现存在 Dishevelled 基因。Dishevelled 蛋白作为 Wnt 信号传导通路的成员之一,不但调节了 Wnt 信号通路,而且通过和其它蛋白的作用成为 Wnt 信

号通路与其他信号之间交叉作用(crosstalk)的桥梁,是 Wnt 信号通路中一个非常关键的调节点。但是,Dishevelled 在 Wnt 信号通路中具体如何发挥作用的分子机制并不清楚。因此,我们利用酵母双杂交实验从小鼠 11.5d 胚胎 cDNA 文库中筛选能与小鼠 Dvl2 蛋白 DEP 结构域和羧基端相互作用的新蛋白,以便为研究 Wnt 信号的传导机制提供新的线索和启示。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和文库:质粒 pCS2+,含有小鼠 Dvl2 全长 cDNA 的质粒 pCS2+/mDvl2 由哈佛医学院贺熹教授提供;小鼠 11.5d 胚胎 cDNA 文库,酵母菌株 AH109, AH109/pCL1 及酵母 BD 表达载体 pGBKT7 购自 CLONTECH 公司,大肠杆菌 HB101 是本所保存。

1.1.2 酶与试剂:限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司;胶回收试剂盒购自 QIAGEN 公司;酵母培养基购自 CLONTECH 公司;3AT, PEG4000, Aprotinin, PMSF 购自 SIGMA 公司;X-gal 购自 Promega 公司。

收稿日期:2004-01-27, 修回日期:2004-04-09。

基金项目:国家杰出青年科学基金海外青年学者合作研究基金(No.30228007)与 863 项目(No.2004AA221060)资助。

* 通讯作者。 Tel:86-10-62785076; Fax:86-10-62773624; E-mail: zhijiec@tsinghua.edu.cn

1.2 方法

1.2.1 诱饵蛋白酵母表达载体的构建:根据 GenBank 中小鼠 Dvl2 序列及酵母表达载体 pGBKT7 的阅读框,设计了针对小鼠 Dvl2 DEP 结构域和羧基端的特异性引物。上下游引物分别引入 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点。上游为:5'-TATAGAATTCGGTCTCTCT-GTCCACATGG-3' 下游为:5'-TATACTCGAGTGGTG-AGAGTCACAGTGGC-3'。引物由上海生工生物技术公司合成,以质粒 pCS2 + /mDvl2 为模板进行 PCR 反应来扩增与 GAL4 BD 阅读框一致的 mDvl2 DEP 结构域和羧基端的 cDNA 片段。反应条件为:首先 95℃ 变性 5min;然后 PCR 循环 94℃ 变性 30s, 55℃ 退火 60s, 72℃ 延伸 60s, 进行 30 个循环;最后 72℃ 延伸 10min。PCR 产物用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切,而酵母表达质粒 pGBKT7 用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切。酶切后分别回收,经 T4 DNA 连接酶作用构建诱饵蛋白表达载体 pGBKT7/mDvl2-DEPC (DEP 结构域和羧基端),并转入大肠杆菌 HB101,扩增后提取质粒,利用 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切鉴定。鉴定得到的阳性克隆由上海基康公司测序,确定无突变位点产生。

1.2.2 酵母双杂交筛选:酵母双杂交筛选步骤参考 MACHMAKER Two-Hybrid System3 User Manual (CLONTECH) 和 Yeast Protocols Handbook (CLONTECH)。简述如下,将诱饵蛋白质粒用 PEG/LiCl 方法转化入酵母菌株 AH109 中,用 β -gal 显色反应检测诱饵蛋白是否有自激活活力的转录活性。用同样的方法将文库质粒转化入已含有诱饵蛋白的酵母菌株中,涂布于 50 个 -Leu/-Trp/-His 的 SD Medium + 30mmol/L 3AT 的平板上。30℃ 培养 7~10d 至菌落长出。用 β -gal 显色反应检测长出的克隆的活性。提取酵母中的质粒进行酶切分类后在上海基康公司测序。测序结果通过国际互联网进行同源性比较分析,以美国国立生物信息中心(NCBI)的 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)作为主要检索工具。

2 结果

2.1 诱饵蛋白质粒的构建

首先构建重组质粒 pGBKT7/mDvl2-DEPC。以质粒 pCS2 + /mDvl2 为模板进行 PCR 反应得到小鼠 Dvl2 基因的 DEP 结构域和羧基端片段。用 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切消化回收后克隆到用 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切回收的 pGBKT7 载体上,用 *EcoR* I 和 *Pst* I 鉴定是否为阳性克隆(图 1)。

2.2 诱饵蛋白在酵母中的自激活活力检测

首先,我们先将诱饵蛋白质粒 pGBKT7/mDvl2-DEPC 转化至酵母菌株 AH109 中,检测了诱饵蛋白在酵母中的 β -半乳糖苷酶活性,结果为阴性(图 2),表明 mDvl2-DEPC 本身没有明显的自激活活力,可以作为诱饵蛋白进行酵母双杂交筛选。

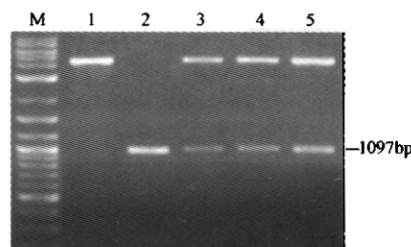


图 1 pGBKT7/Dvl2-DEPC 酶切鉴定图

Fig.1 Restriction analysis of pGBKT7/mDvl2-DEPC

M: DNA marker; 1: vector pGBKT7 (digested with *EcoR* I and *Sal* I); 2: PCR fragment of mDvl2-DEPC (digested with *EcoR* I and *Xho* I); 3~5: pGBKT7/mDvl2-DEPC (digested with *EcoR* I and *Pst* I)

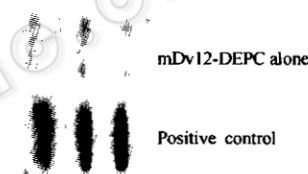


图 2 mDvl2-DEPC 蛋白在 AH109 酵母上的自激活活力

Fig.2 Self-activation of mDvl2-DEPC protein in AH109

2.3 酵母双杂交筛选及鉴定

为了得到可以和 Wnt 相关的 Dvl2 相互作用的蛋白,我们选择了 Wnt 信号通路已经开始发挥重要作用的小鼠 11.5d 胚胎 cDNA 文库进行筛选。经过文库筛选和酶切鉴定分类,在 4.1×10^6 个转化子中筛选到 15 个阳性克隆。

经过测序及到 NCBI 做比对结果发现其中的第 6 号克隆是 Gli3 氨基端 6-122aa 的 cDNA 片段。为了确定 mDvl2-DEPC 和 Gli3(6-122aa)在酵母细胞中的相互作用,我们重新将 pGBKT7/mDvl2-DEPC 和 pACT2/Gli3(6-122aa)共同转化到酵母细胞中。结果显示, mDvl2-DEPC 与一个含无关蛋白的 AD 质粒共同转化或者 Gli3(6-122 aa)与不含有 mDvl2-DEPC 的 pGBKT7 质粒共同转化的酵母细胞在四缺(-Leu/-Trp/-His/-Ade)的平板上都不能生长,而 mDvl2-DEPC 与 Gli3(6-122 aa)共同转化的酵母细胞在四缺(-Leu/-Trp/-His/-Ade)的平板上生长良好。从二缺(-Leu/-Trp)的平板上挑选生长良好的菌落做 β -gal 显色反应,只有 mDvl2-DEPC 与 Gli3(6-122 aa)共同转化的酵母细胞显蓝色(图 3)。说明在酵母细胞中

mDvl2 的 DEP 结构域和羧基端与 Gli3 的氨基端确实存在相互作用。

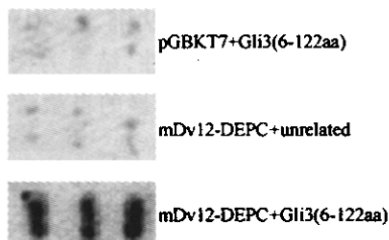


图 3 β -gal 显色反应结果

Fig.3 β -gal filter assay analysis result

3 讨论

已有越来越多的研究表明, Dishevelled 是个高度保守和具有多种功能的蛋白,除了作为 Wnt 信号传导途径中一个非常重要的调节位点,许多蛋白可通过与 Dishevelled 的相互作用来影响 Wnt 信号通路的传导,或是这些蛋白亦是 Wnt 信号通路与其他信号通路的交叉作用的桥梁^[5]。除此之外, Dishevelled 也可通过与其他蛋白的相互结合发挥与 Wnt 信号通路无直接相关的生物学功能。如 Dishevelled 通过与 MuSK 和 PAK1 的相互作用而调节 AchR 在神经肌肉接头(neuromuscular junction, NMJ)处的聚集,进而调节 AchR 的活性,而与 Wnt 信号通路无关^[6]。在本实验中,我们以 pGBKT7/mDvl2-DEPC 为诱饵,应用酵母双杂交系统筛选小鼠 11.5d 胚胎 cDNA 文库得到可与 Dishevelled 相互作用的蛋白 15 种,并在酵母中验证了它们的相互作用。其中一个阳性克隆是在胚胎发育过程中具有重要功能并参与调节 Wnt 信号通路的 Gli3 蛋白。Gli3 蛋白是含锌指结构的转录因子(Zinc finger transcription factor),为 Hedgehog 信号通路中重要的信号分子^[7]。已有研究报道表明, Gli3 蛋白的氨基端具有和羧基端不同的生物学功能。Gli3 蛋白的氨基端含有抑制其转录活性的功能区并与 Gli3 蛋白的核定位相关,而成为通过调节 Gli3 蛋白活性影响 Hedgehog 信号通路的位点^[8,9]。从已有的研究结果显示 Hedgehog 信号通路与 Wnt 信号通路之间存在大量的交叉作用^[10,11,12],其中更有报道表明 Gli2/3 蛋白至少可以诱导 Wnt-8 和 Wnt-11 的表达以介导 Gli2/3 诱导的尾部中胚层的发育。另外在皮肤肿瘤中, wnt 基因受 Gli 蛋白调控是一个

普遍的现象^[13]。而我们的试验结果显示,在酵母中 Dishevelled 蛋白可与 Gli3 蛋白的氨基端(6-122aa)相互作用,暗示了 Gli3 蛋白氨基端与 Dishevelled 蛋白之间的相互作用,可能与两者共同行使的一些生物学功能相关;而且,极有可能与胚胎发育过程中各信号通路之间的调节有关。这有待进一步的研究证实。

致谢 感谢哈佛医学院贺熹博士赠送质粒和对本课题的指导。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev*, 1997, 11: 3286 - 3305
- [2] Adler PN. Planar signaling and morphogenesis in *Drosophila*. *Dev Cell*, 2002, 2: 525 - 535
- [3] Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*, 2000, 14: 1837 - 1851
- [4] Fahmy OG, Fahmy MJ. Complementation among the subgenic mutants in the r-locus of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 1959, 184: 1927 - 1929
- [5] Wharton KA, Jr. Runnin' with the Dvl: proteins that associate with Dsh/Dvl and their significance to Wnt signal transduction. *Dev Biol*, 2003, 253: 1 - 17
- [6] Luo ZG, Wang Q, Zhou J et al. Regulation of AChR clustering by Dishevelled interacting with MuSK and PAK1. *Neuron*, 2002, 35: 489 - 505
- [7] Ruiz i Altaba A. Gli proteins and Hedgehog signaling: development and cancer. *Trends Genet*, 1999, 15: 418 - 425
- [8] Sasaki H, Nishizaki Y, Hui C et al. Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development*, 1999, 126: 3915 - 3924
- [9] Ruiz i Altaba A. Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. *Development*, 1999, 126: 3205 - 3216
- [10] Jiang J, Struhl G. Regulation of the Hedgehog and Wingless signaling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb. *Nature*, 1998, 391: 493 - 496
- [11] Lee CS, Buttitta L, Fan CM. Evidence that the WNT-inducible growth arrest-specific gene 1 encodes an antagonist of sonic hedgehog signaling in the somite. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98: 11347 - 11352
- [12] Hatini V, Bokor P, Goto-Mandeville R et al. Tissue- and stage-specific modulation of Wingless signaling by the segment polarity gene lines. *Genes Dev*, 2000, 14: 1364 - 1376
- [13] Mullor JL, Dahmane N, Sun T et al. Wnt signals are targets and mediators of Gli function. *Curr Biol*, 2001, 11: 769 - 773

Screening of Proteins Interacting with Dishevelled2 in Mouse 11.5dpc Embryo Library

NG Ser-Sue¹ ZHAI Yong-Gong² HAN Liang¹ ZHANG Xin-Jun¹ WANG Yin-Yin¹ CHANG Zhi-Jie^{1*}

¹ (Tsinghua Institute of Genome Research, Department of Biological Sciences and Biotechnology, Institute of Biomedicine, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

² (Biomedical Research Institute, Life Science College, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract Dishevelled proteins are multifunctional and highly conserved. These proteins are also required for the specification of cell fate and polarity by secreted Wnt proteins. To investigate the molecular mechanism of Dishevelled in mediating Wnt signal transduction, a mouse 11.5dpc embryo library was screened by yeast-two-hybrid system to find mouse Dishevelled2 DEP domain and C-terminal interacting proteins. 15 positive clones were identified from 4.1×10^6 transformants. The DNA sequences of the positive AD/library plasmids were determined. The BLAST results revealed that one of the positive clones contained N-terminus cDNA fragments (amino acids 6-122) of Gli3 protein. The interaction between Dvl2 and Gli3 detected by yeast two-hybrid system suggests that Gli3 might play a role in some biological processes with Dishevelled.

Key words Wnt, Dishevelled, Gli3, yeast-two-hybrid

Received: 01-17-2004

This work was supported by Grants from National Science Fund for Distinguished Young Scholars, Joint Research Fund for Overseas Chinese Young Scholars (No. 30228007) and 863 project (No. 2004AA221060).

* Corresponding author. Tel: 86-10-62785076; Fax: 86-10-62773624; E-mail: zhijie@tsinghua.edu.cn

中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>