

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 200226077

UDC _____

厦 门 大 学
硕 士 学 位 论 文

酵母双杂交法筛选与 β -淀粉样前体蛋白胞
内端有相互作用的蛋白

Finding New Proteins Interacting with the Intracellular
Domain of β -amyloid Precursor Protein by Yeast-two
Hybrid

王 蔚 蔚

指导教师姓名: 刘润中 副教授

许华曦 教授、博导

专业名称: 生化与分子生物学

论文提交日期: 2005年6月20日

论文答辩时间: 2005年7月12日

学位授予日期: 2005年 月 日

答辩委员会主席: 陶涛 教授、博导

评 阅 人: _____

2005年6月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

学位论文作者签名：

日期： 年 月 日

声明人（签名）：

年 月 日

摘 要

β -淀粉样前体蛋白APP (β -amyloid precursor protein) 是一种与阿尔茨海默氏症 (Alzheimer Disease, AD) 密切相关的蛋白, 它经 γ -分泌酶切割后生成的胞内端AICD (APP intracellular domain) 是近年来阿尔茨海默氏症研究的热点之一。人们发现AICD可以与某些蛋白发生相互作用并共同调节基因的转录。另外, 也有报道AICD能诱导细胞凋亡; 人们还发现它通过诱导GSK3 β (glycogen synthase kinase-3 β) 表达水平上升发挥神经毒性作用。但是, 这些了解还不足以充分阐明它在生理活动中的功能及其作用机制。为了更好地认识和理解AICD在阿尔茨海默氏症病理过程中的作用, 我们用酵母双杂交法筛选与它有相互作用的蛋白。

以 AICD 为诱饵蛋白筛选人胎脑文库后, 我们得到 48 个阳性克隆。经测序和序列比对, 我们选择 No.277 和 No.652 克隆进行深入研究。No.277 与人不均一核蛋白 D 类似蛋白 JKTBP2 (JKT41 Binding Protein 2) 的 90~204 位氨基酸序列同源性高达 100%; No.652 与人 SCG10 (Superior cervical ganglion-10) 蛋白的 44~179 位氨基酸序列同源性为 99%。 β -半乳糖苷酶活性测定说明 No.277 和 No.652 在酵母 AH109 中可以与 AICD 发生相互作用。

在进一步的研究中, 我们证明外源性 AICD 和 No.277 蛋白在 293T 细胞表达后可以发生相互作用。免疫共沉淀结果显示外源性的全长 JKTBP2 蛋白可以与 293T 细胞中内源性的 APP 或 AICD 发生相互作用。但是, 利用同样的实验方法, 我们无法检测到 AICD 与 No.652 蛋白 (即 SCG10 蛋白的片断) 存在相互作用。

通过以上实验, 我们认为筛选得到的 JKTBP2 蛋白可以与 AICD 或 APP

发生相互作用。由于 JKTBP2 蛋白在神经系统中表达具有特异性，并且，它的功能可能涉及 mRNA 的代谢以及转录的调控，因此，AICD 与它存在相互作用这一发现为进一步了解 AICD 的生理功能打下基础。但是，它们是通过怎样的模式发生相互作用还需要进一步的研究来阐明。

本文的创新点：

1. 我们设计酵母双杂交实验所用的诱饵质粒时，在 AICD 和 Gal4 之间插入了一个 spacer。它表达的 15 个氨基酸的序列可以将 AICD 充分暴露出来，避免在生成融合蛋白时被 Gal4-BD 遮盖某些功能区和重要位点。这一设计在前人对 AICD 的研究中时未见报道。

2. 我们利用酵母双杂交法筛选得到了 JKTBP2 蛋白的片断后，首次证明它可以在酵母 AH109 和哺乳动物细胞 293T 中都能够与 AICD 发生相互作用。

3. 外源性 JKTBP2 全长蛋白在 293T 细胞中表达后，免疫共沉淀实验显示它可以与内源性的 APP 或 AICD 发生相互作用。我们首次发现了 JKTBP2 蛋白与 AICD 间存在相互作用这一现象。

关键词：酵母双杂交； AICD； JKTBP2

Abstract

β -amyloid precursor protein (APP) plays an important role in the pathogenesis of Alzheimer's Disease (AD). Its proteolytic product cleaved by γ - or ϵ -secretase, AICD (APP intracellular domain), has attracted much scrutiny only until recently. Several AICD interaction proteins have been identified and indicated to mediate transcription. Recently, it has also been demonstrated that AICD can exert neurotoxicity on differentiated PC 12 cells and rat primary cortical neurons by inducing the expression of glycogen synthase kinase 3 β , forming a ternary complex with Fe65 and CP2/LSF/LBP1 in the nucleus. However, much of pathophysiological functions of AICD and the underlying mechanisms still remain elusive.

To further understand the function of AICD in the pathology of AD, we utilized AICD as the bait to screen fetal brain cDNA library using the yeast two-hybrid system. From the 48 positive clones we obtained, we chose No.277 and No.652 for further characterization. The No.277 clone encodes a fragment corresponding to amino acids 90-204 of JKTBP2, which belongs to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) family. The No. 652 clone possesses 99% homology to amino acids 44~179 of SCG10 protein, Superior Cervical Ganglion-10. The β -galactosidase activity assay demonstrated that both No.277 and 652 can interact with AICD in yeast strain AH109. Further, we confirmed the interaction between No.277 and AICD or endogenous APP by co-immunoprecipitation in the mammalian 293T cells. Unfortunately, we failed to confirm the interaction between No. 652 and AICD in the mammalian 293T cells.

Considering the specific expression of JKBTP2 in the brain and its possible biological functions in mRNA metabolism and transcriptional regulation, we speculate that JKTBP2, together with AICD, may have an important function in physiological and pathological processes including AD pathogenesis. Our research may contribute to further understanding of the function of APP/AID as well as to developing a novel invention for the therapy of Alzheimer's Disease.

The significance and the novelty of our study are:

1. The bait plasmid used in yeast two-hybrid screening contains a spacer inserted between AICD and Gal4 DNA-binding domain, which encodes a 15 amino acids residue peptide. This spacer helps to extend AICD and protect it from being covered by Gal4 DNA-BD when a fusion protein is encoded. This novel design has not appeared in any previously published AICD research.
2. By screening the fetal brain cDNA library, we first identified a new AICD binding protein, JKTBP2⁹⁰⁻²⁰⁴, and confirmed its interaction with AICD both in yeast strain AH109 and in the mammalian 293T cells.
3. We demonstrated that the full-length JKTBP2 is able to interact with endogenous APP or AICD in the mammalian 293T cells, a finding that has not been reported by other research groups.

Keywords: Yeast two-hybrid; AICD; JKTBP2

英文缩写注解

AD	Alzheimer's disease
A β	β -amyloid
AICD	APP Intracellular Domain β
ALID	APLPs Intracellular Domain
APLPs	Amyloid Precursor-like Proteins
APP	β -Amyloid Precursor Protein
APOE	Apolipoprotein E
BACE	β -amyloid cleaving enzyme
CP2/LSF/LBP-1	poly(C)-binding Protein 2/ Leader Binding Protein 1/ Late SV40 Factor
DNA-BD	DNA-binding domain
FAD	familial AD
GSK3 β	Glycogen Synthase Kinase 3 β
JIP-1	JNK Interaction Protein 1
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
NICD	Notch intracellular domain
NFTs	Neurofibrillar tangles
PS	Presenilin
PTB	Phosphotyrosine Binding
SP	senile plaques
TACE	tumor necrosis factor- α -converting enzyme

目 录

前言	1
第一部分 淀粉样前体蛋白胞内端与阿尔茨海默氏症	1
一、阿尔茨海默氏症概述	1
二、APP 与阿尔茨海默氏症	2
三、APP 胞内端 AICD 的研究进展	6
第二部分 酵母双杂交系统的基本原理及应用	10
一、酵母双杂交的理论基础	10
二、MATCHMAKER Gal4 Two-Hybrid System ³ 作用原理	11
三、酵母双杂交的应用	14
四、酵母双杂交的局限性	15
第三部分 本课题研究的目的是和意义	16
材料与方法	17
一、材料	17
二、方法	23
结果与分析	35
一、酵母双杂交部分	35
1. 诱饵质粒的表达	35
2. 检测诱饵质粒的自激活活性与 3-AT 的合适浓度	36

3. 筛选人胎脑 cDNA 文库并验证阳性克隆·····	37
4. 排除重复及假阳性克隆·····	37
5. 测序、序列比对·····	38
6. β -半乳糖苷酶活性测试·····	41
二、利用哺乳动物细胞验证蛋白间的相互作用 ·····	43
1. 构建在哺乳动物细胞表达的文库质粒和 AICD 质粒·····	43
2. 在 293T 细胞中验证蛋白间的相互作用·····	45
3. 全长 JKTBP2 质粒的构建·····	46
4. JKTBP2 与内源性 APP/AICD 间的相互作用·····	46
讨论与总结 ·····	49
一、JKTBP 蛋白与 AICD 的相互作用·····	49
二、SCG10 与 AICD 的相互作用·····	52
三、结论与展望·····	54
参考文献 ·····	56
附录 ·····	65

Table of Contents

Introduction	1
Part I β-amyloid precursor protein and Alzheimer's Disease	1
I. Alzheimer's Disease overview	1
II. APP involved in Alzheimer's Disease	2
III. APP intracellular domain (AICD) progress	6
Part II Theory and application of Yeast Two-Hybrid.....	10
I. Introduction of Yeast Two-Hybrid.....	10
II. Principle of MATCHMAKER Gal4 Two-Hybrid System.....	11
III. Application of Yeast Two-Hybrid.....	14
IV. Insufficiency of Yeast Two-Hybrid	15
Part III Purposes and significance of our research.....	16
Materials and Methods.....	17
I. Materials.....	17
II. Methods.....	23
Results and analysis.....	35
I. Yeast two-hybrid screen.....	35
1. Expression of bait plasmid in AH109.....	35
2. Test for autonomous activation.....	36
3. Screening fetal brain cDNA library.....	37
4. Sort colonies to eliminate duplicates.....	37
5. Sequencing inserts and comparing them in GenBank.....	38
6. β -galactosidase assay	41
II. Verify proteins interactions in mammalian cells.....	43
1. Constructing plasmids expressed in mammalian cells.....	43
2. Verifying proteins interactions in 293T cells.....	45
3. Constructing full-length JKTBP2 plasmid.....	46
4. Interaction between JKTBP2 and endogenous APP/ AICD.....	46
Discussion and summarization	49

I. Interaction between JKTBP and AICD.....	49
II. Interaction between SCG10 and AICD.....	52
III. Conclusion and prospects.....	54
Reference.....	56
Appendices.....	65

厦门大学博硕士学位论文摘要库

前 言

阿尔茨海默氏症(Alzheimer's Disease, AD)是一种在老年人中发病率较高的中枢神经系统退行性疾病,以记忆减退、认知障碍和人格改变为主要临床特征。随着老龄化人口的增加,AD已成为现代社会的主要健康问题之一。 β 淀粉样前体蛋白APP (β -Amyloid Precursor Protein) 与该病密切相关,越来越多的证据表明它的胞内端AICD (APP Intracellular Domain)可以结合多种蛋白并有可能调控基因的转录。

目前人们对 AICD 的了解还很不充分。酵母双杂交法作为筛选有相互作用蛋白的一种非常有效的方法,可以帮助我们找到新的、可以与 AICD 发生相互作用的蛋白,帮助我们更好地了解 AICD 的生理功能和作用机制。

第一部分 淀粉样前体蛋白胞内端与阿尔茨海默氏症

一、阿尔茨海默氏症概述

阿尔茨海默氏症(AD)最早是在1907年由Alois Alzheimer发现和报道,是一种伴有神经病理学和神经化学特性的原发性、退行性中枢神经系统疾病,认知功能进行性且不可逆转的丧失。阿尔茨海默氏症在老年人痴呆病例中占有很大比重(约65%)^[1],因此这一疾病又被称为老年痴呆。

AD早期阶段的特征是近事记忆的丧失,不能学习并保留新的信息,病人的抽象思维或正确的判断可能有减退。在中期阶段,病人不能学习并回忆新的信息,远事记忆亦受到影响,丧失时间与地点定向感觉。在严重阶段,病人日常生活能力丧失,近事和远事记忆完全消失,很容易发生营养不良,肺炎(特别是吸入性肺炎)等。阿尔茨海默病的末期阶段是昏迷和死亡,通

常是死于感染。

临床研究表明AD可分为多见的、散发的AD (sporadic AD, SAD) 及少数有家族遗传史的家族性AD (familial AD, FAD)。早年发病的类型只占2%~7%的病例, 通常是由遗传性基因突变所引起^[2]; 常见的类型影响65岁以上的老年人, 其发病率随年龄的增长而增高。在分析了7个有关AD的流行病学调查后, Jorm等发现65岁以上人群中AD发病率每隔4年半就要加倍^[3]。女性发病率约为男性的一倍, 这可能是由于女性的寿命比男性长, 但女性性别也可能是一个危险因素^[4-5]。目前全世界的AD患者至少有2500万以上。这一疾病不仅给患者带来巨大的痛苦, 也给家人、社会造成较大的精神和经济负担。

AD患者的病理改变主要发生在前脑基底、海马和大脑皮层。神经纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NTFs) 和细胞外的老年斑 (senile plaques, SP) 是患者脑内的两大主要异常结构。其它病理特征还包括脑皮质普遍萎缩、突触及神经元的丢失、神经细胞内颗粒空泡样变性、淀粉样物质在脑血管沉积等^[6]。

研究认为AD的发生与多种因素有关, 遗传因素是其中较为重要的一个方面^[7]。迟发性AD由一些易感基因或遗传修饰基因决定其发病风险, 如载脂蛋白E (ApoE) ϵ 4 等位基因和 α 2 巨球蛋白 (A2M) 等; 早发性、家族性AD可由淀粉样前体蛋白APP基因和早老素 (Presenilins, PSs) 基因的突变所致^[8-9]。本文将着重介绍APP的基本特征及其胞内端AICD的研究进展。

二、APP 与阿尔茨海默氏症

1. APP 概述

目前, 人们对于阿尔茨海默氏症的发病机制还不清楚。但相当多的研究

表明：细胞外老年斑主要由 β -淀粉样蛋白 (β -Amyloid, $A\beta$) 聚合形成的不可溶淀粉蛋白纤维所组成。 $A\beta$ 具有细胞毒性，在体外用 $A\beta$ 处理细胞以及将 $A\beta$ 注射到老鼠的大脑中都会引起细胞死亡，因此 $A\beta$ 的过量生成被认为是导致AD的一个主要原因^[10-12]。

1987年，Kang等发现一个含有 $A\beta$ 的全部密码的基因，将这个基因编码的蛋白质称为 β 淀粉样前体蛋白APP^[13]。APP基因位于第21号染色体的长臂上(21q21.1-21.3)，是第一个被发现与家族性AD (FAD) 相关的基因。该基因长约2.3Kb，包含19个外显子：即外显子1-13、13a和14-18，转录后通过不同剪接方式可以产生6个转录产物：APP770、APP751、APP714、APP695、APP563、APP365等。APP365和APP563不含 $A\beta$ 的编码区，APP714仅能指导合成微量的 $A\beta$ 。另外3种，即APP695、APP751和APP770是主要的存在形式。三者的差别在于：APP770可以编码Kunitz蛋白酶抑制功能区 (Kunitz protease inhibitors, KPI) 和OX-2抗原功能区 (OX2 antigen domain)；APP751只具有Kunitz蛋白酶抑制功能区；而APP695既没有Kunitz蛋白酶抑制功能区也没有OX-2抗原功能区^[14]。

APP蛋白相对分子量约为110~135 kD，膜受体样结构，主要分布于细胞质和细胞外^[15]。它是典型的I型跨膜蛋白：含有N端信号肽、一个大的胞外结构域、单个跨膜螺旋区和一个短的胞内区域。图1.A所示为APP770。

APP广泛表达于大多数细胞，在神经元中主要以APP695存在。它的生理功能尚不确定，一些研究结果显示它可能通过与细胞膜外基质相互作用来介导神经细胞之间的粘附、增加神经突触之间的联系及突触可塑性。另外，它也可能参与信号转导和钙代谢调节、甚至与神经元中蛋白沿微管向轴突末端的运输有关^[16]。

与FAD相关的APP突变主要位于 β -分泌酶和 γ -分泌酶的水解位点，如：Swedish家系中的APP第670位赖氨酸被天冬氨酸替代及第671位甲硫氨酸

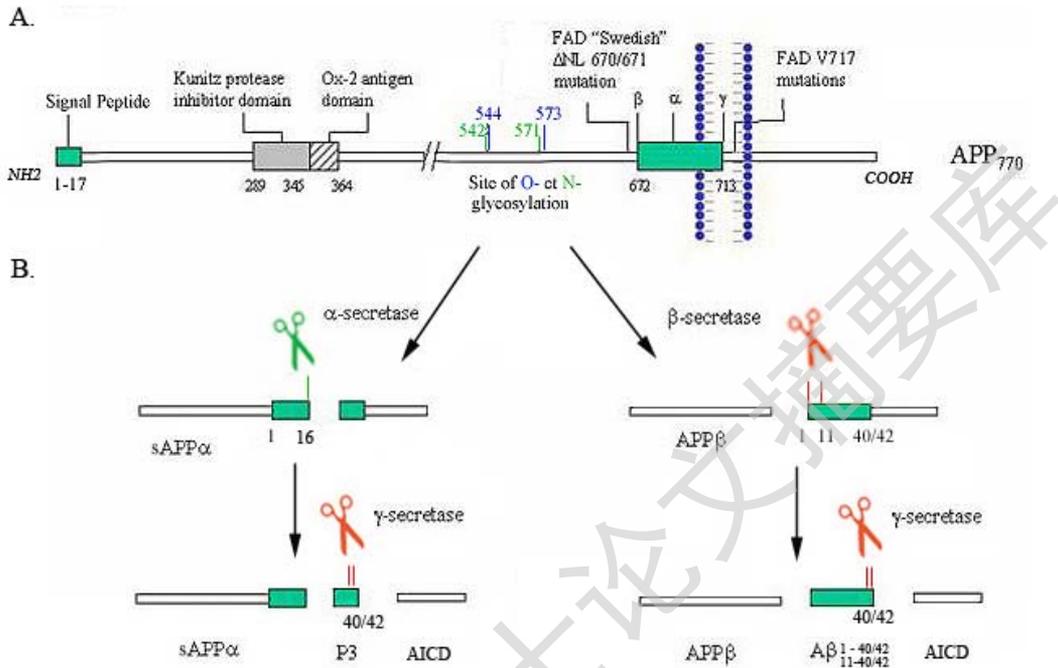


图 1. APP770 蛋白结构及其两种主要水解途径示意图

Figure1. Structure of APP770 and its proteolytic processing

被亮氨酸替代，London家系中第 717 位缬氨酸残基被异亮氨酸、苯丙氨酸或丙氨酸置换，等。这些突变可能影响了酶水解的动力学，使得A β 的产生增加^[17]。

2. α -分泌酶、 β -分泌酶、 γ -分泌酶与 APP 的代谢

A β 是由APP在其细胞分泌途径中被蛋白酶水解产生的。研究显示，至少有三种蛋白水解酶参与了APP蛋白的代谢，即 α -分泌酶、 β -分泌酶和 γ -分泌酶^[18]。其中 β -分泌酶、 γ -分泌酶的作用与A β 的形成直接相关^[19-22]。如图 1.B 所示，在三种酶的作用下APP存在两条代谢途径。

α -分泌酶的切割位点位于A β 的 16 和 17 氨基酸之间。APP在细胞膜上被 α -分泌酶水解后，其胞外可溶性片段sAPP α （soluble N-terminal fragments of

APP cleaved by α -secretase) 直接分泌到细胞外间质, 留下 α CTF (α -secretase cleaved Carboxyl-Terminal Fragment) 在细胞膜上^[18]。sAPP α 具有神经保护的功能。由于 α -分泌酶的切割位点位于A β 的内部, 因此进一步被 γ -分泌酶水解所生成的p3 片段不具有致病性。这是APP的第一条代谢途径。

ADAM (Adamalysin) 蛋白家族的几个成员, 如 α 肿瘤坏死因子转化酶 (tumor necrosis factor- α -converting enzyme, TACE或ADAM17)、ADAM10 和ADAM9 等, 都具有 α -分泌酶的特性。最近的研究提示 α -分泌酶的活性可能不仅是来自于单个蛋白, 而且来自于几个蛋白的共同作用^[23-24]。

β -分泌酶, 也被称为BACE (β -amyloid cleaving enzyme), 是I型跨膜天冬氨酸蛋白酶。在它位于细胞器腔内的部分上有两个活性位点, 每个都包括天冬氨酸蛋白酶的标记序列DT/SGT/S^[25]。 β -分泌酶作用于A β 的N端或者A β 内部第10-11位氨基酸, 生成99或89个氨基酸残基的 β CTF (β -secretase cleaved Carboxyl-Terminal Fragment)。 β CTF进一步被 γ -分泌酶在A β 的40或42位氨基酸位点水解, 生成不同种类的A β (A β 1-40/42, A β 11-40/42)^[26-27]。这是APP的第二条代谢途径。当过量的A β 被分泌到细胞外发生聚合堆积, 就会形成老年斑 (SP)。A β 包括A β 40和A β 42。它的C端最后几个是疏水性氨基酸, C端越长越易沉积, 因此A β 42更易聚合, 也更具有致病性。

在一些自发性AD中, 有发现BACE活性的增加。最近在转基因小鼠研究中发现, 将BACE完全敲除后, 这些转基因小鼠没有A β 产生, 但小鼠仍然健康存活, 表型正常^[27]。这一结果为通过抑制BACE的活性来降低A β ^[28, 29], 从而治疗AD提供了直接的动物模型证据。

γ -分泌酶是APP胞内端AICD从膜上释放所必需的一个酶。在APP被 α -或 β -分泌酶切割后, α CTF和 β CTF仍旧留在膜上。 γ -分泌酶作用于它们靠近细胞内表面的跨膜区, 可以释放出 57-59 个氨基酸残基的胞内端AICD到细胞内^[17, 30, 31]。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫