

遗传编码荧光激酶生物传感器的发展和應用

张超 姜斌

摘要 遗传编码荧光激酶生物传感器 (genetically - encoded fluorescent kinase biosensors), 又被称为激酶活性报告探针 (kinase activity reporters, KARs)。它是由串联的嵌合蛋白组成的 FRET 生物传感器, 属于分子内的 FRET 荧光探针, 它主要对活细胞内的特定蛋白激酶进行实时监测, 在探索酪氨酸激酶和丝/苏氨酸激酶活性研究中的应用广泛。本文收集当前已报道的遗传编码荧光激酶生物传感器并对其发展和应用进行综述。

关键词 遗传编码荧光激酶生物传感器 酪氨酸激酶 丝/苏氨酸激酶

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.04.048

蛋白激酶是通过将 ATP 或 GTP 提供的磷酸基团转移到特定底物蛋白质的丝/苏氨酸或酪氨酸的氨基酸残基上激活底物的活性, 在细胞内生理反应的信号转导过程中起到重要作用。蛋白激酶的这一特性, 使它与细胞的代谢、增殖、分化等功能有着密不可分的关系, 无论是蛋白激酶的定位异常还是激活异常都可能导致许多疾病的发生。因此, 对活细胞内蛋白激酶的实时监测有着重要的现实意义。以往检测蛋白激酶活性是用特定抗体, 通过 Western blot 法和免疫组化技术检测某个蛋白激酶底物的磷酸化水平, 间接反映蛋白激酶的活性。这些检测手段的主要缺点是不能够在活细胞内实时监测特定蛋白激酶的活性, 因此不能够精确反映蛋白激酶在细胞内相关生物事件中的作用。近年来, 随着荧光显微镜与分子生物学技术的发展, 研究人员已开发出基于荧光共振能量转移 (FRET) 技术检测活细胞内蛋白激酶活性的遗传编码荧光激酶生物传感器^[1]。

一、遗传编码荧光激酶生物传感器

遗传编码荧光激酶生物传感器 (genetically - encoded fluorescent kinase biosensors), 通常又被称为激酶活性报告探针 (kinase activity reporters, KARs)^[2]。它是由串联的嵌合蛋白组成的 FRET 生物传感器, 属于分子内的 FRET 荧光探针。KARs 的两端是自发荧光蛋白 (autofluorescent proteins, AFPs)^[3], 分别为供体荧光蛋白 (donor) 和受体荧光蛋白 (acceptor); 中间为底物 (substrate) 磷酸化位点和与之配对的磷酸化氨基酸结合域 (phosphoamino acid binding domain, PAABD)。AFPs 属于 KARs 中的报告

基团, substrate 和 PAABD 被共同称为特异的激酶底物序列, substrate 被特定蛋白激酶磷酸化后与 PAABD 结合, 使得这条单链生物传感器的空间结构发生了折叠, 两端的 AFPs 被拉近到空间距离小于 10nm, 将识别的生物相关信号以 FRET 的形式报告出来^[4]。

遗传编码荧光激酶生物传感器, 可以在活细胞内实时检测特定蛋白激酶活性, 具有广阔的应用前景, 当前发展较为迅速。本文收集当前已报道的遗传编码荧光激酶生物传感器, 对这些文献进行分类、概括与归纳, 并对这些设计出来的基因编码的荧光激酶生物传感器的应用进行评述。

二、酪氨酸蛋白激酶的遗传编码荧光激酶生物传感器

1. EGFR; Picchu 生物传感器 (CFP - Crk II - YFP) 可以用来研究表皮生长因子 (EGF) 刺激活细胞时, 发生在细胞内的磷酸化活动是如何产生和传播的, 它主要是由 CrkII 及夹在两边的报告荧光基团 CFP - YFP 构成。即主要来检测活细胞被 EGF 刺激后 Crk II 蛋白的活动, 同时为了能够定向在细胞膜检测, 在探针的 C 端融合了一段 CAAX box, 可以观察到由 EGF 促发的一系列磷酸化活动是由细胞边缘往细胞中心传播移动的。

SH2 功能区与磷酸化的酪氨酸结合特异性高, 不会与未磷酸化的酪氨酸和磷酸化的丝/苏氨酸结合, SH2 这一特性使其筛选成为活性报告探针中的酪氨酸磷酸化结合域。连接蛋白 Crk II 参与了许多种信号转导通路, 例如在细胞增殖、迁移和凋亡, 是由 SH2、SH3 结构域构成的, 在两个 SH3 结构域中间 221 位上有一个酪氨酸残基, 这个磷酸化的酪氨酸 221 可以被 Crk II 的 SH2 在分子内识别而相结合, 从而实现了从 CFP 到 YFP 的荧光共振能量转移, 由此报告出

作者单位: 200127 上海交通大学医学院附属第三人民医院肿瘤科
通讯作者: 姜斌, 电子信箱: Dr.jiang@yeah. com

的荧光可用于监测 Crk II 被 EGF 磷酸化时的活动。相同的原理,另外一个监测 EGFR 的生物传感器(CFP-SH2-Tyr338-YFP),同样能观察到在 EGF 的刺激下的细胞内磷酸化的活动是由细胞膜向细胞质扩散的。

2. Src:Src 的遗传编码荧光生物传感器(CFP-SH2-Tyr347-YFP),与 EGFR 的 SH2 来源不同。EGFR 的 SH2 来源于 Shc,而 Src 的 SH2 来源于 Src,其中底物磷酸化位点也不同。但是这一生物传感器不够特异,同样对 Abl、Lck 和 EGFR 发生反应,将其底物序列中的 Tyr 突变成 Phe 并没有使 FRET 现象消失,于是他们专门从 c-Src 中提取出 Src 的特有底物序列(WMEDYDYVHLQG)来取代原来的底物序列(EIYGEF),提高了对 Src 反应的特异性^[5]。改造后的 Src 生物传感器,成功应用在人脐带静脉内皮细胞用来监测动力传导的过程中 Src 激活的特性。

3. Bcr-Abl:遗传编码的 Abl 生物传感器(CFP-Crk-YFP)最早设计出来是在 PDGF 的刺激下,检测到 Abl 的活动主要集中在肌动蛋白丰富的膜附近,说明酪氨酸在调节细胞形态方面起着一定的作用。在人类的慢性粒细胞白血病(CML)中是 BCR-ABL 的一个主要的酪氨酸激酶底物识别域,Mizutani 等^[6]利用 CrkL 作为特异的激酶底物序列,设计了用来监测 BCR-ABL 的生物传感器(Venus-CrkL-ECFP)。这是一种酪氨酸激酶传感器应用在临床上,对慢性粒细胞白血病人目前以及未来的治疗及其耐药反应预测是一种十分有前景的工具。与此同时,Tunceroglu 等^[7]则是运用 BCR-ABL 是以 Crk II 为特异的激酶底物序列的 Picchu 生物传感器来对 CML 进行耐药的监测。

4. 其他:局部黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)也是一种酪氨酸激酶,在整合素介导的信号通路中起到重要作用,也调节细胞对生长因子刺激产生的细胞迁移和增殖,与肿瘤侵袭转移的高度相关性也在一些研究中得到证实。Seong 等^[8]开发了 FAK 的激酶活性探针,根据 SH2 对酪氨酸磷酸化的特异性,设计了 FAK 的底物序列(ETDDYAEIIDE),对其在膜微区的激活进行了探测。随后又和 Src 激酶活性探针一起运用到人骨髓间充质干细胞(HMSCs)中,监测到了当干细胞向骨细胞的诱导分化过程中,FAK 的活性持续升高 20~27 天,而 Src 的活性持续降低了 27 天,揭示了两者的特异区别,并为我们对骨修复和组织再造过程提供了新的理解^[9]。

ZAP-70 激酶对于 T 细胞受体介导的信号转导中起着很关键的作用,Randriamampita 等^[10]建造了

ROZA 探针,活细胞内 ZAP-70 的活性进行了实时检测,这个探针也是通过 SH2 与 LAT 肽链中的 171~178 序列中酪氨酸磷酸化结合发生 FRET 报告信号的,从而使得 ZAP-70 的活动在免疫突触中可视化。

三、丝/苏氨酸蛋白激酶的遗传编码荧光激酶生物传感器

1. PKA:ART(RGFR-KID-BGFP)是第 1 个 PKA 激酶活性生物传感器,氨基酸激酶诱导域(kinase-inducible domain, KID)作为这个生物传感器主要的一部分具有多个磷酸化位点,其中 Ser133 是 PKA 对其磷酸化的作用位点,磷酸化后会发生构象的改变。然而 ART 用蓝色荧光蛋白作为报告基因效率较低,随后研制出了 AKAR(CFP-14-3-3 τ -substrate-YFP),以 14-3-3 τ 作为磷酸化氨基酸结合域可以与磷酸化的丝/苏氨酸相结合调节信号转导的过程,但是由于 14-3-3 τ 分子对磷酸化的氨基酸结合紧密,使得它对细胞内磷酸酯酶阻碍逆转后的 FRET 反应灵敏度低,限制了 AKAR 生理研究的应用。FHA1(the forkhead associated domain 1)结构域能够识别磷酸化 Thr13 的肽段,于是设计了相应的底物序列(LRRATLD),将此命名为 AKAR2(ECFP-FHA1-Substrate-Citrine),并成功得用这个探针评估了 PKA 激活状态下慢性高表达胰岛素水平的效应。为了更好地监测 PKA 活动的细微变化,在没有改变其特异的激酶底物序列的情况下,利用了拥有更强信号的荧光蛋白突变体来改善这一探针,得到了 AKAR3 和 AKAR4,它们是分别用 eCFP-cpVenus、Cerulean-cpVenus 这两对供受体荧光基团的^[11,12]。AKAR3 对 PKA 在细胞膜、细胞质、细胞核以及线粒体的活动监测效率有了明显改善,并且说明了 PKA 在线粒体的活动不同于细胞质的。随后改进的 AKAR4 又比 AKAR3 有更精确的报告效率,在不同的细胞膜微区中的膜筏和非膜筏区对 PKA 的动态活性进行了监测,发现膜筏对 PKA 在细胞膜上的活性起到了重要的调节作用,这个探针的发现和应用为进一步对质膜上调节的信号转导的研究奠定了好的基础。

2. AKT/PKB:Akt 又称为蛋白激酶 B(PKB)在磷酸肌醇 3 激酶介导的信号转导过程中起着重要的作用。起初人们为了研究 Akt 在细胞内构造的改变,直接以 Akt 作为特异的激酶底物序列,两端融合了 GFP-YFP 作为供受体荧光蛋白,在没有任何处理的情况下,这个探针在细胞中是处于 FRET 激活状态,而在 PDGF 刺激后,FRET 在细胞膜出消失,说明了在酪氨酸的作用下 Akt 的空间结构发生了改变。Sasaki 等建造的 Aktus 探针,是以 14-3-3 η 作为 PAABD

的,为了能定向研究 Akt 的活性,在 CFP 端又分别串联了 eNOS 和 Tom20 可以靶向高尔基体和线粒体。Tsien 等同样将 14 - 3 - 3 η 替换为 FHA2 作为 PAABD 建造了 BKAR,检测到了 PKB 的在细胞内磷酸化以及去磷酸化的活动。

3. PKC、PKD、CKAR,用来检测蛋白激酶 C 的活性,发现特异的 PKC 信号转导取决于局部第二信使的控制,是激酶与磷脂酶活动平衡调节的结果^[13]。为了能使 CKAR 能够在细胞内定位研究 PKC 的活动,在 CKAR 的 NH₂ 或者 COOH 末端连接对应靶向序列,分别建造了 PMCKAR (MyrPalm - CKAR)、GolgiCKAR、MitoCKAR、CytoCKAR、NucCKAR,证实了 PKC 信号的强度和长短具有位置特异性,并且每个位置都受到磷脂酶活性水平和 DAG 持续的控制。检测蛋白激酶 D 的 DKAR 与 AKAR、BKAR、CKAR 有着相似结构,证明了通过甘油二酯产生的正反馈调节抑制 PKD 信号通路中 Ca²⁺ 离子是一个重要的因素,揭示了 PKD 激活过程中的一个新的机制^[14]。

4. 其他:EKAR 生物传感器 (mRFP1 - WW - substrate - EGFP),底物是从 CDC25C 中提取的一段可以被 MAPK 磷酸化的序列 (PRTP),WW 磷酸化结合域主要定位于核周围,在传感器的 C 端融合了一段核输出序列可以使其在细胞质中表达,在用 EGF 刺激 HEK293 细胞后检测出来 ERK 的活性情况^[15]。JNK 激酶生物传感器 JNKAR1 (ECFP - FHA1 - substrate - Citrine),以及 AMPK 激酶生物传感器 AMPKAR (ECFP - FHA1 - substrate - Venus)都成功应用在活细胞内检测激酶的活性^[16,17]。c - Raf 包括两种构象形式:开放状态的激活形式和闭合状态的失活形式,根据这种构象特点有了 c - Raf 的生物传感器 (YFP - c - Raf - CFP),并以此可监测活细胞内质膜处由 RAS 到 RAF 的信号转变过程。Gavet 等为了能更精确、详尽地了解 CyclinB1 - Cdk1 在哺乳动物细胞有丝分裂中是何时如何激活的,构造了其生物传感器 [YPet - PBD (Plk1) - Substrate (CRS) - mCerulean]。以上这些都是蛋白激酶生物传感器应用的成功例子。

四、展 望

综上所述,遗传编码荧光激酶生物传感器在活细胞内实时监测酪氨酸激酶和丝/苏氨酸激酶活性方面已有广泛和多样的应用,使得对特定信号分子在细胞内的时空调节有了深入研究,鼓励我们运用 FRET 成像技术应用在各个领域的疾病机制研究。然而这门技术还是新兴的技术,虽然已经发展了十几年,但是在医学科研方面的实际应用还远远不够,需要优化探针和呈像系统,从而提高从活细胞中获得信息的能力。

参考文献

- Sun Y, Wallrabe H, Seo SA, *et al*. FRET microscopy in 2010: the legacy of Theodor Förster on the 100th anniversary of his birth [J]. *Chemphyschem*, 2011, 12(3): 462 - 474
- Morris MC. Fluorescent biosensors—probing protein kinase function in cancer and drug discovery [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2013, 1834(7): 1387 - 1395
- Wang Y, Shyy JYJ, Chien S. Fluorescence proteins, live - cell imaging, and mechanobiology: seeing is believing [J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2008, 10: 1 - 38
- Malkani N, Schmid JA. Some secrets of fluorescent proteins: distinct bleaching in various mounting fluids and photoactivation of cyan fluorescent proteins at YFP - excitation [J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e18586
- Wang Y, Botvinick EL, Zhao Y, *et al*. Visualizing the mechanical activation of Src [J]. *Nature*, 2005, 434(7036): 1040 - 1045
- Mizutani T, Kondo T, Darmanin S, *et al*. A novel FRET - based biosensor for the measurement of BCR - ABL activity and its response to drugs in living cells [J]. *Clinical Cancer Research*, 2010, 16(15): 3964 - 3975
- Tunceroglu A, Matsuda M, Birge RB. Real - time fluorescent resonance energy transfer analysis to monitor drug resistance in chronic myelogenous leukemia [J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2010, 9(11): 3065 - 3073
- Seong J, Ouyang M, Kim T, *et al*. Detection of focal adhesion kinase activation at membrane microdomains by fluorescence resonance energy transfer [J]. *Nature Communications*, 2011, 2: 406
- Liao X, Lu S, Zhuo Y, *et al*. Visualization of Src and FAK activity during the differentiation process from HMSCs to osteoblasts [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42709
- Randriamampita C, Mouchacca P, Malissen B, *et al*. A novel ZAP - 70 dependent FRET based biosensor reveals kinase activity at both the immunological synapse and the antisynapse [J]. *PLoS One*, 2008, 3(1): e1521
- Allen MD, Zhang J. Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET - based reporters [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 348(2): 716 - 721
- Depry C, Allen MD, Zhang J. Visualization of PKA activity in plasma membrane microdomains [J]. *Molecular Bio Systems*, 2011, 7(1): 52 - 58
- Kunkel MT, Newton AC. *Imaging oscillations of protein kinase C activity in cells* [M] // *Protein kinase technologies*. New York: Humana Press, 2012: 251 - 257
- Eisler SA, Fuchs YF, Pfizenmaier K, *et al*. G - PKDrep - live, a genetically encoded FRET reporter to measure PKD activity at the trans - Golgi - network [J]. *Biotechnology Journal*, 2012, 7(1): 148 - 154
- Harvey CD, Ehrhardt AG, Cellurale C, *et al*. A genetically encoded fluorescent sensor of ERK activity [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(49): 19264 - 19269
- Fosbrink M, Aye - Han NN, Cheong R, *et al*. Visualization of JNK activity dynamics with a genetically encoded fluorescent biosensor [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(12): 5459 - 5464
- Tsou P, Zheng B, Hsu CH, *et al*. A fluorescent reporter of AMPK activity and cellular energy stress [J]. *Cell Metabolism*, 2011, 13(4): 476 - 486

(收稿日期:2014 - 10 - 11)

(修回日期:2014 - 10 - 20)