

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.02.001

· 基础研究 ·

蛋白酪氨酸激酶 NOK/STYK1 胞内区的表达与纯化*

李蕊 王琛 吴放 姜清波 丁雪 张淑平[△]

(生物膜与膜生物工程国家重点实验室 清华大学生命科学学院 北京 100084)

摘要 目的:酪氨酸蛋白激酶 NOK/STYK1 具有很强的促肿瘤形成和转移能力,被认为是很有前途的肿瘤治疗靶点。由于 NOK 含有一个跨膜区,且富含疏水性氨基酸,其表达和纯化非常困难,直接影响了对其功能及相关分子机理的深入研究。本研究目的是获得可溶的且纯度较高的 NOK 胞内区融合蛋白 Δ NOK (AA:49-422),为后续抗体的制备和功能研究奠定重要基础。**方法:**含有 Δ NOK 基因的原核表达载体,转入 *E.coli* BL21 中, IPTG 诱导蛋白表达,通过亲和层析获得可溶的 Δ NOK 融合蛋白。融合蛋白经凝血酶酶切后,凝胶过滤层析分离标签蛋白获得 Δ NOK 蛋白。同时,我们还通过 Bac-to-Bac 系统获得含有 Δ NOK 基因的杆状病毒,感染 sf9 细胞,尝试在真核细胞中表达目的蛋白。**结果:**通过在 sf9 昆虫细胞和大肠杆菌表达系统中盐浓度等各种条件的摸索,首次获得了可溶的且纯度较高的 NOK 胞内区融合蛋白(Δ NOK-GST)和一定量去除标签的 Δ NOK 蛋白。本研究与大肠杆菌相比,昆虫细胞并不适合 Δ NOK 的纯化。**结论:**我们建立了一套优化的 NOK 蛋白表达和纯化体系,从而为后续抗体制备和各种体内生化实验等功能研究奠定基础,为研究 NOK 在肿瘤中的作用和药物筛选创造条件。同时丰富了整个 RTKs 家族作用机制的探索,进一步促进了以 RTKs 为靶点的治疗手段在临床上的应用。

关键词: NOK/STYK1; 蛋白表达和纯化; 凝胶过滤层析

中图分类号: Q786, Q51 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)02-201-05

Expression and Purification of the Intracellular Domain of Protein Tyrosine Kinase NOK/STYK1*

LI Rui, WANG Chen, WU Fang, JIANG Qing-bo, DING Xue, ZHANG Shu-ping[△]

(State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing, 100084, China)

ABSTRACT Objective: NOK/STYK1, a novel oncogene with kinase-domain, plays important roles in many kinds of tumors and is considered to be a promising target for cancer therapy. Since it contains a single transmembrane domain and is rich of hydrophobic amino acids, its soluble expression and purification are extremely difficult. Here we tried multiple expression systems to lay an important foundation for its further study, such as preparation of specific antibody and structure analysis. **Methods:** The recombinant NOK expression plasmid was transformed into the *E.coli* BL21. After induction of IPTG, soluble recombinant protein was lysed and then purified through affinity chromatography. GST tag was cut with thrombin then separated by gel-filtration chromatography. Besides, we attempted to get soluble NOK protein in sf9 cells by infection with recombinant baculovirus which was got through Bac-to-Bac system. **Results:** The soluble recombinant protein Δ NOK-GST (AA: 49-422) as well as Δ NOK without tag was firstly successfully purified by optimization of affecting factors in insect cell and *E.coli*. Also, it seems that sf9 cells were not suitable for NOK purification compared with *E.coli* in our research. **Conclusion:** We established a set of procedures to get soluble recombinant intracellular domain of NOK protein (Δ NOK-GST) for the preparation of antibodies and in vitro biochemical function studies. This method can be useful for the study on the role of NOK in tumor development and drug screening. Furthermore, this study can extend our understanding on the function mechanisms of RTKs family and promote their clinical applications.

Key words: NOK/STYK1; Protein expression and purification; Gel-filtration chromatography

Chinese Library Classification (CLC): Q786, Q51 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)02-201-05

前言

蛋白酪氨酸激酶(PTKs)家族是人类激酶组上最重要的一个家族,在细胞周期、细胞增殖、细胞代谢和细胞衰老死亡等众

多过程中扮演着重要角色,其异常的表达调控会导致很多疾病发生^[1-4]。根据结构上的不同,PTKs 分为受体型酪氨酸激酶(Receptor Tyrosine Kinases, RTKs)和非受体型酪氨酸激酶(Nonreceptor Tyrosine Kinases, NRTKs)两大类。其中 RTKs

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81072167);拜尔-清华联合项目

作者简介:李蕊(1988-),女,硕士,主要研究方向:分子生物学,细胞生物学,电话:13716412646, E-mail: liruicomeon@126.com

Δ 通讯作者:张淑平,教授, E-mail: shpzhang@biomed.tsinghua.edu.cn

(收稿日期:2013-06-07 接受日期:2013-07-19)

的典型结构包括三个结构域:一个多样化的胞外区、一个单跨膜区和细胞内部的酪氨酸激酶区。胞外区特异性地与配体结合,而含有保守酪氨酸激酶结构的胞内区域则负责向下游传递信号。RTKs 又分为包括 EGFR 家族和 FGFR 家族在内的 20 个亚家族^[5]。值得一提的是,在各种表皮癌的临床治疗中,很多针对 RTKs 家族的靶标药物治疗已经获得了很大的成功,比如 Gleevec 以及 Herceptin 均已经应用到了临床^[6,7]。

NOK(Novel Oncogene with Kinase-domain) / STYK1 (Serine Threonine Tyrosine Kinase 1) 是一个具有 RTK 类似结构的蛋白,和 FGF/PDGF 受体有 30% 同源性。在乳腺癌、前列腺癌等很多癌症中均发现有高表达,并且体内实验表明高表达 NOK 基因的 BaF3 稳定细胞株注入裸鼠体内可以使小鼠成瘤^[8-11]。细胞和分子水平的研究显示 NOK 可以和 JAK, STATs 以及 GSK-3 β 等信号通路重要分子有直接或间接的互作^[12-14]。对 NOK 特殊位点的研究发现,其 327 和 356 位的酪氨酸位点对下游信号传递发挥重要作用,417 位酪氨酸扮演自抑制的角色,它的突变会促进 NOK 介导的信号传递^[15, 16]。另外,147 位酪氨酸被预测是其 ATP 结合位点^[17]。但现在关于 NOK 功能具体机制的研究还远远不够,其中一个重要的限制性因素就是它的高疏水性使其很难被纯化,进而导致制备的抗体特异性差,灵敏度低。在已有的方法学报道中,仅获得了含有 111(AA: 49-159)个氨基酸的可溶的 NOK 片段,而包含激酶活性区的胞内区域的蛋白片段(Δ NOK AA:49-422)因强烈的疏水性基本都残留在细胞沉淀中^[18]。为获得包含完整激酶区域并且具有可溶性的 NOK 胞内区片段(AA:49-422),本研究中我们选择 sf9 昆虫细胞和大肠杆菌表达系统来摸索适合 NOK 纯化的条件,为后续抗体制备奠定了基础,为体内生化实验,了解 NOK 性质创造了条件,为研究 NOK 在肿瘤中的作用和药物筛选提供了可能。同时,作为 RTKs 一个新的亚族,NOK 的研究还丰富了对整个 RTK 家族作用机制的研究探索。

1 材料与方法

1.1 主要试剂,材料和仪器

所有的限制性内切酶均购自大连宝生物工程有限公司;连接酶购自美国 New England Biolabs (北京)有限公司;Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统购自美国 Invitrogen 公司;感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司;STYK1 抗体购自南京金斯瑞生物科技有限公司;山羊抗兔辣根过氧化物酶标记二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;蛋白 Marker 购自美国 Thermo 公司;thrombin 购自美国 Sigma 公司;Superdex 200 HR 美国 GE Healthcare;LTQ Orbitrap velos 质谱仪和 EASY-nLC 液相色谱仪 美国 Thermo 公司。

1.2 方法

1.2.1 Δ NOK 重组杆状病毒的制备 选择合适的酶切位点将 Δ NOK 从 pEGFP-N3- Δ NOK(实验室原有)切下,连入 pFast-Bac-Sumo 质粒。然后将重组质粒转化至 DH10BacTM 感受态细胞中,含有整合 Bacmid 的菌斑通过蓝白斑筛选后扩大培养,提取质粒进行琼脂糖凝胶电泳和 PCR 鉴定。鉴定正确的 Bacmid DNA 转染处于对数期生长的 sf9 细胞,大约 10 天后收集上清,即为 P0 代杆状病毒。P0 代病毒继续感染 sf9 细胞,3-4

天后获得的上清为 P1 代病毒,相同的方法可获得 P2 代病毒。所有步骤都根据生产商的说明进行(Bac-to-BacTM, Invitrogen)。

1.2.2 Δ NOK 在 sf9 细胞中的表达和纯化 重组病毒感染处于对数期生长的 sf9 细胞(V/V: 1/100)。48-72 h 后收细胞,4 $^{\circ}$ C, 2500 rpm 离心 10 min, 弃上清,细胞以裂解液(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40)重悬,超声破裂 5 min。裂解液在 4 $^{\circ}$ C, 12000 rpm, 离心 10 min, 上清加入到 Ni-NTA 亲和柱中,部分杂蛋白使用 20 mM 咪唑去除,最后使用 100 mM 或梯度浓度咪唑洗脱目的蛋白。以上过程均在冰上或冷室中完成,每步均留样进行考马斯亮蓝染色检测。

1.2.3 Δ NOK 在大肠杆菌中的表达和纯化 已构建表达载体 pGEX-4T-3- Δ NOK 转入 BL21 (DE3)菌株,挑取单克隆,37 $^{\circ}$ C, 220 rpm 过夜培养。第二天菌液按 1:100(V/V)转至大瓶中相同条件培养至 OD 值达到 0.6-0.8,加入 IPTG(终浓度:1 mM)后在 16 $^{\circ}$ C 摇床中诱导表达 16 h。4 $^{\circ}$ C, 2500 rpm 离心 10 min 收取菌液,每升菌液离心所得沉淀加入约 25 mL 裂解液(25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM PMSF)超声 8-10 min 破碎。4 $^{\circ}$ C, 12000 $\times$ g 离心 50 min 收取上清上样于提前用裂解液平衡过的 GST 亲和柱,洗涤液(25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl)漂洗部分杂蛋白后,洗脱液(25 mM GSH, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl)洗脱目的蛋白。

1.2.4 凝胶过滤层析 将获得的融合蛋白凝血酶过夜切去 GST 后,浓缩至 1 mL,上样到预先平衡好的 Superdex 200 HR 10 柱(平衡液:50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl),流速设定为 0.5 mL/min,每管收集溶液 500 μ L。保留蛋白峰对应的样品,并取部分用于考马斯亮蓝和 Western blot 检测。

1.2.5 蛋白考马斯亮蓝和 Western blot 检测 所获蛋白分别加入 SDS 上样缓冲液处理后,10%-12% 的 SDS-PAGE 胶分离,R250 染色。Western blot 检测的蛋白则在跑胶后转移到尼龙膜上,5% 牛奶进行封闭,然后 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育一抗标记,TBST 洗去非特异性结合,再加入辣根过氧化物酶标记二抗室温孵育 1.5 h,TBST 洗膜 5 次,每次 5 min,最后曝光显影。

1.2.6 LC-MS 分析 SDS-PAGE 胶分离的目的蛋白切下后用胰酶酶解,酶解产物于真空干燥仪中冻干,0.1% TFA 复溶后 12500 rpm 离心 15 min,上清进行 LC-MS 分析。LC 条件:流动相:A 为 0.1% 甲酸水,B 为 0.1% 甲酸乙腈,梯度洗脱程序见表 1:

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution program

Time	Flow(ml/min)	%B
0:00	300	5
2:00	300	5
26:00	300	50
36:00	300	95
41:00	300	95

质谱主要参数设置:离子极性:ESI (+) 一级质谱在 Orbi-

trap 里扫描,扫描范围 m/z :300-2000 D,二级质谱在 LTQ 里用 CID 碰撞模式完成,标准化碰撞能量为 35%,活化 q 值为 0.25,活化时间为 10 ms。所得信息用 Proteome Discoverer 软件进行分析。

2 结果

2.1 NOK 氨基酸组成和结构分析

疏水性氨基酸在 NOK 结构组成中所占比例非常高,大于

50%(图 1 A <http://web.expasy.org/protscale/>)。结构上 NOK 是单跨膜蛋白,包括一段胞外区域(AA:1-26),一段跨膜区(AA:27-48)和一个胞内区(AA:49-422),其中 AA:118-372 是预测的激酶活性区。由图 1 A 疏水性分析图也可以看出,其跨膜区具有强烈的疏水性。所以,为了不破坏 NOK 的激酶活性并且考虑其疏水性质,研究中构建的真核表达载体均选择去除胞外区和跨膜区的片段即包含整个胞内区的片段 AA:49-422 (图 1 B)。

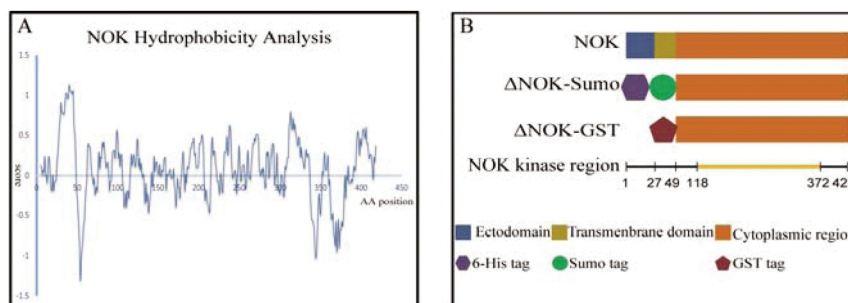


图 1 NOK 蛋白疏水性分析(A)和构建融合蛋白示意图(B)

Fig.1 A The analysis of NOK hydrophobicity B. The schematic representation of NOK constructs used in the purification

2.2 Δ NOK 在昆虫细胞和大肠杆菌中融合蛋白的纯化及比较

昆虫细胞不同于细菌和酵母,它能像哺乳动物细胞一样,对蛋白翻译后进行糖基化等修饰,更适于表达激酶等真核蛋白,所以我们首先尝试在昆虫细胞中的表达。 Δ NOK-Sumo-His 融合蛋白大小预测约为 65 KD,图 2 SDS-PAGE 的检测结果显示在相应的位置有明显条带,且 Western blot 中该条带可以被 NOK 抗体所识别(结果未展示),这说明 Δ NOK-Sumo-His 融合蛋白可以正常表达。但第 7 道 Ni 柱结合后的目的蛋白洗脱液,基本检测不到 Δ NOK,而上样量仅为总细胞沉淀极少一部分的第 3 道中有很多目的蛋白存在,这说明大部分的融合蛋白都以沉淀的形式留在了细胞碎片中。我们改变盐浓度、去垢剂浓度,调整蛋白表达时间,使用 147 位 Δ NOK 突变体,结果都没有明显改进(图 2:Lane2,4,6,8 为 Δ NOK 147 位突变体),所以我们转而选择在大肠杆菌中表达。经过很多不同盐浓度、去垢剂浓度的摸索,在使用高浓度的 Tris-HCl,NaCl 和 NP-40 时(见方法 1.2.3),得到了大量可溶蛋白。图 3 结果显示第 2 道 IPTG 诱导后和第 1 道 IPTG 诱导前样品相比在 70 KD 附近的位置有明显条带,大小和预测的 NOK-GST 融合蛋白一致。第 5 道 - 第 9 道目的蛋白洗脱液中为可溶形式的 NOK-GST 融合蛋白,随着洗脱体积的增大,得到的蛋白纯度越来越高,并且所得蛋白总量也很可观(图 3 中 5-9 道洗脱体积分别为 5 mL,检测量仅为 15 μ L)。

2.3 凝胶过滤层析获得去除标签的 Δ NOK 蛋白

考虑到某些特定的实验要求,标签可能会影响目标蛋白的构象或功能。为进一步摸索 NOK 的纯化条件,方便后续试验,我们尝试获得去除融合标签后的 Δ NOK。凝血酶过夜酶切融合蛋白,SDS-PAGE 检测保证 GST 完全切除后,浓缩蛋白进行凝胶过滤层析。图 4 紫外吸收峰和图 5 对应的 SDS-PAGE 结果显示,绝大多数 GST 和 NOK 能够很好的分开,分别在第一峰和第二峰出现,但 GST 也残留很小一部分在第一峰中。NOK

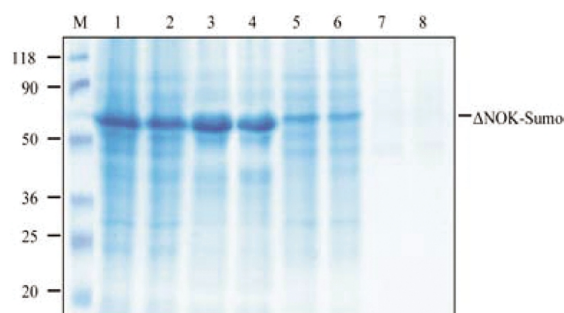


图 2 Δ NOK (WT/K147R) 在昆虫细胞中的表达检测

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of Δ NOK (WT/K147R) -Sumo expression and purification in insect cell

Note: Lane1: Δ NOK (WT) lysis solution; Lane2: Δ NOK (K147R) lysis solution; Lane3: Δ NOK (WT) cell sediment; Lane4: Δ NOK (K147R) cell sediment; Lane5: Δ NOK (WT) transmission fluid; Lane6: Δ NOK (K147R) transmission fluid; Lane7: Δ NOK (WT) eluted fraction; Lane8: Δ NOK (K147R) eluted fraction.

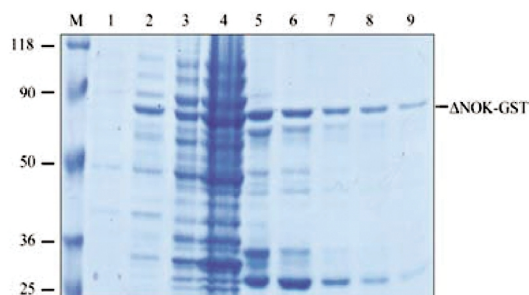


图 3 Δ NOK 在大肠杆菌中的表达检测

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of Δ NOK (WT)-GST expression and purification in E.coli

Note: Lane 1: cell culture medium in the absence of IPTG; Lane 2: cell culture medium after induction with 1mM IPTG; Lane 3: Δ NOK-GST lysis solution; Lane 4: Δ NOK-GST transmission fluid; Lane 5-9: Δ NOK-GST eluted fractions.

出峰时间早,发生了多聚化,并且整个 A 峰中在 60 KD 处始终有一条带,经质谱鉴定为伴侣蛋白。

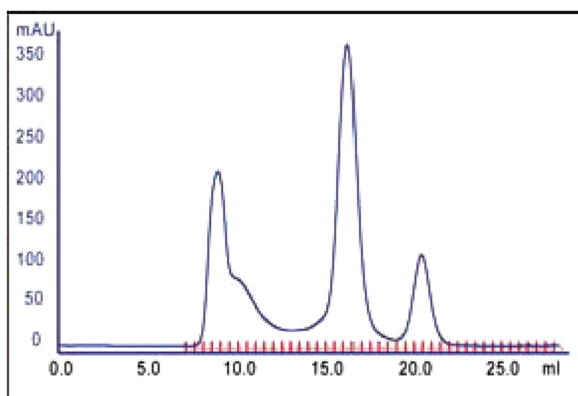


图4 Δ NOK 凝胶过滤层析紫外吸收曲线

Fig. 4 The peak illustration of gel-filtration chromatography result

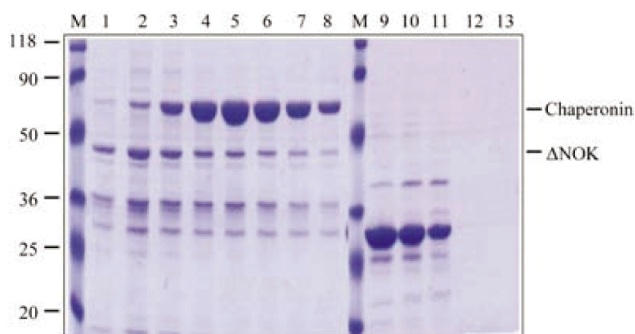


图5 Δ NOK 凝胶过滤层析 SDS-PAGE 检测结果

Fig. 5 SDS-PAGE detection of Δ NOK purification through gel-filtration chromatography

Note: Lane 1: A3; Lane 2: A4; Lane 3: A5; Lane 4: A6; Lane 5: A7; Lane 6: A8; Lane 7: A9; Lane 8: A10; Lane 9: B6; Lane 10: B5; Lane 11: B4; Lane 12: C3; Lane 13: C4.

36 KD 附近的两条带,经过 Western blot 鉴定可以被 NOK 抗体识别(图 6)(样品为图 5 中 A3),蛋白质谱鉴定结果也表明两条带是 NOK 片段(图 7),我们推测可能是 NOK 的不完全表达或纯化过程中的断裂造成的,而不是其他杂蛋白。

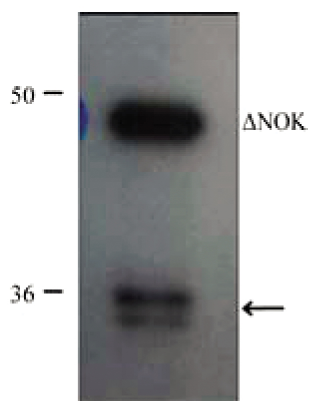


图6 凝胶过滤层析纯化 Δ NOK 的 Western blot 检测分析

Fig. 6 Western blot analysis of Δ NOK purification through gel-filtration chromatography

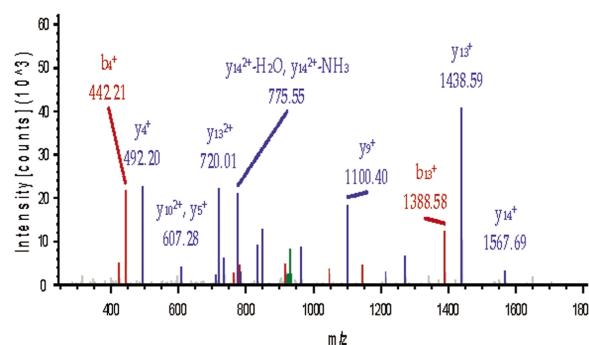


图7 NOK 片段鉴定部分二级质谱图

Fig. 7 Mass spectrum of NOK identification

3 讨论

在已知的人类基因组编码的 500 多种蛋白激酶中, 大约 60 种属于 RTKs 家族, 并且该家族的每一个成员均已被发现在成体动物的器官发生或组织内环境稳定中起作用, 超过一半的 RTKs 的不正确调控和突变与人类糖尿病、癌症等各种疾病相关^[9]。现在, 相关癌症病理学研究已经取得了很大成功, 获得了一些特异性针对 RTKs, 比如 EGFR, HER2 等的治疗药物。但是对 RTKs 生物学功能的研究存在一个很大的难点, 即受体和配体表达的复杂性, 临床上很多耐药性与此相关, 但同时这种复杂性和多样性也为药物的开发提供了更多的可能。NOK 作为新发现的 RTKs 家族的一员, 具有明显的激酶活性区, 对其系统发育进行分析表明, NOK 与 FGFR/PDGFR 同源性最高但也只有不到 30%, 结构上与其他 RTKs 家族成员相比具有一个明显短的胞外区, 被划分为一个新的亚家族。结构上的特殊性可能预示着 NOK 在功能上也具有不同于其他 RTKs 家族成员的一些特性。现在已有的研究表明, 和其他 RTKs 一样, NOK 与多种癌症相关, 在乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌等中均有高表达, 并且裸鼠体内注射成瘤检测到 NOK 很强的诱导成瘤能力。提示 NOK 很可能是多种肿瘤治疗的一个分子靶点, 所以针对 NOK 的研究对于寻找癌症治疗的药物和丰富 RTKs 家族调节机制的研究都具有非常重要的意义。但是自 2001 年发现 NOK 至今, 关于它的研究进展还未取得重大突破, 这很大程度上归因于 NOK 强疏水性导致的纯化难, 抗体特异性差。因此获得纯度高的可溶蛋白成为一大难点和亟待解决的问题。

NOK 具有典型的跨膜区, 属于膜蛋白。膜蛋白具有非常重要的生物功能, 但由于疏水结构域的存在, 导致其纯化和结晶非常困难。膜蛋白基因数占原核和真核生物基因总数 20% -30%, 但得到较好纯化和晶体的仅占国际数据库的 1% 左右^[20]。膜蛋白在水相中容易聚合, 这是其纯化的最主要的瓶颈之一。同样对于如何维持纯化过程中 NOK 在水相环境中构象的稳定是本研究中需要解决的关键问题也是最大难题。根据近年膜蛋白纯化的经验, 在众多影响蛋白溶解性、稳定性的因素中, 去垢剂和盐离子浓度至关重要^[21]。综合 NOK 疏水性和不稳定性分析, 我们选择了非离子型去垢剂 NP-40, 其性质比较温和, 对蛋白质结构和功能影响较小。对于盐离子浓度的选择, 经过不断尝试, 最后发现在 300 mM 时获得可溶蛋白较多, 这两个因素也是较之前实验主要改进之处, 是最后获得高纯度可溶蛋白的

关键所在。此外,低温可以稳定蛋白的构象,在蛋白纯化尤其是膜蛋白纯化中需特别注意。本实验过程中,当酶切或浓缩蛋白时如果不注意低温,常发现管底有沉淀状物质,所以操作过程要保证严谨,尽可能在冰上或4℃冷室进行。另外,考虑每个表达系统各有优劣,大肠杆菌遗传背景清楚,培养操作简单,且外源基因产物的水平一般高于其他表达系统等,但涉及蛋白转录,基因翻译后加工等过程时,原核表达系统常常不完善,有些来自高等生物的外源蛋白不能在原核系统中顺利表达。与之相较,昆虫细胞的优点即可以对表达产物进行糖基化等修饰^[22]。所以除大肠杆菌外,我们还尝试了NOK在昆虫细胞中的表达,但大部分目的蛋白都残留在细胞沉淀中,改变盐浓度和去垢剂浓度等没有得到大的改善,难以获得可溶的融合蛋白。在利用凝胶过滤层析对融合蛋白标签的去除过程中,NOK易发生聚集,这可能还是由于NOK的高疏水性所致。最后值得注意的是在整个纯化过程中一直伴随有伴侣蛋白,其作用可能是帮助NOK的正确折叠,这也提示我们在以后的纯化和部分功能研究中,可以尝试共表达分子伴侣来获得更多正确折叠的NOK蛋白。

本研究对NOK在大肠杆菌和昆虫细胞中的表达进行了一系列探索,并获得了纯度较高的NOK融合蛋白。在后续试验中,我们准备用纯化的NOK蛋白进行体外激酶实验的测定等一系列功能实验并制备抗体用于肿瘤组织内NOK表达水平以及和其他分子相互关系的检测,从而为之后NOK作为靶点筛选小分子药物奠定基础。NOK作为RTKs一个新的亚家族,本研究也将在一定程度上丰富对整个RTK家族作用机制的探索,促进针对RTKs靶标药物的开发,相信随着这些研究的不断推进,会有更多具有疗效的新药物问世。

致谢:该项研究得到拜尔-清华联合项目以及国家自然科学基金项目(No. 81072167)的资助。我们诚挚感谢德国拜耳医药公司(Bayer Schering Pharma)Anette Sommer博士给予的建议,并衷心感谢清华大学生命科学学院王新泉教授在整个实验过程中给予的指导和帮助!

参考文献(References)

- [1] Robinson D R, Wu Y M, Lin F S. The protein tyrosine kinase family of the human genome[J]. *Oncogene*, 2000, 19(49): 5548-5557
- [2] Prenzel N, Fischer O M, Streit S, et al. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification[J]. *Endocrine-Related Cancer*, 2001, 8(1): 11-31
- [3] Vlahovic G, Crawford J. Activation of tyrosine kinases in cancer[J]. *The Oncologist*, 2003, 8(6): 531-538
- [4] Lemmon M A, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases[J]. *Cell*, 2010, 141(7): 1117-1134
- [5] Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signaling [J]. *Nature*, 2001, 411(6835): 355-365
- [6] Shawver L K., Slamon D, Ullrich A. Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy[J]. *Cancer Cell*, 2002, 1(2): 117-123
- [7] Fishman M C, Porter J A. Pharmaceuticals: a new grammar for drug discovery[J]. *Nature*, 2005, 437(7058): 491-493
- [8] Liu L, Yu X Z, Li T S, et al. A novel protein tyrosine kinase NOK that

shares homology with platelet- derived growth factor/fibroblast growth factor receptors induces tumorigenesis and metastasis in nude mice[J]. *Cancer Research*, 2004, 64(10): 3491-3499

- [9] Jackson K A, Oprea G, Handy J, et al. Aberrant STYK1 expression in ovarian cancer tissues and cell lines [J]. *Journal of Ovarian Research*, 2009, 2(1): 15
- [10] Amachika T, Kobayashi D, Moriai R, et al. Diagnostic relevance of overexpressed mRNA of novel oncogene with kinase-domain (NOK) in lung cancers[J]. *Lung Cancer*, 2007, 56(3): 337-340
- [11] Kimbro K S, Duschene K, Willard M, et al. A novel gene STYK1/NOK is upregulated in estrogen receptor-alpha negative estrogen receptor-beta positive breast cancer cells following estrogen treatment [J]. *Molecular Biology Reports*, 2008, 35(1): 23-27
- [12] Li Y H, Chang Z J, Liu L. NOK/STYK1 interacts with Akt and enhances its activation[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2008, 35(1): 29-34
- [13] Li Y H, Yu R, Chang Z J, et al. NOK activates STAT3 signaling by a JAK2-dependent mechanism [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2008, 35(2): 143-150
- [14] Li J, Wu F, Sheng F, et al. NOK/STYK1 interacts with GSK-3beta and mediates Ser9 phosphorylation through activated Akt [J]. *FEBS Letters*, 2012, 586(21): 3787-3792
- [15] Chen Y, Li Y H, Chen X P, et al. Point mutation at single tyrosine residue of novel oncogene NOK abrogates tumorigenesis in nude mice[J]. *Cancer Research*, 2005, 65(23): 10838-10846
- [16] Li Y H, Wang Y Y, Zhong S, et al. Transmembrane helix of novel oncogene with kinase-domain (NOK) influences its oligomerization and limits the activation of RAS/MAPK signaling [J]. *Molecules and Cells*, 2009, 27(1): 39-45
- [17] Chung S, Tamura K, Furihata M, et al. Overexpression of the potential kinase serine/threonine/tyrosine kinase 1 (STYK1) in castration-resistant prostate cancer[J]. *Cancer Science*, 2009, 100(11): 2109-2114
- [18] 徐方, 李颖华, 王银银, 等. hNOK抗体的制备及肺癌组织中NOK的表达检测[J]. *生物工程*, 2008, 24(3): 480-484
- Xu Fang, Li Ying-hua, Wang Yin-yin, et al. Preparation of Anti-hNOK antibodies and expression of NOK in the lung cancer tissues [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2008, 24(3): 480-484
- [19] Kellar K A, Lorenzi M V, Ho C P, et al. Constitutively active receptor tyrosine kinases as oncogenes in preclinical models for cancer therapeutics[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2006, 5(6): 1571-1576
- [20] Berman H, Henrick K, Nakamura H. Announcing the worldwide Protein Data Bank [J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2003, 10(12): 980
- [21] Seddon A M, Curnow P, Booth P J. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1666(1-2): 105-117
- [22] Bernaudat F, Barrand A F, Pochon N, et al. Heterologous expression of membrane proteins: choosing the appropriate host [J]. *Plos One*, 2011, 6(12): e29191