

文章编号: 1004-7220(2023)02-0228-08

# 基于 FRET 成像探究棕榈酰化修饰调节 Fyn 激酶活性

张鑫<sup>a,b,#</sup>, 郭佳<sup>a#</sup>, 姚辉<sup>a,b</sup>, 邓林红<sup>a\*</sup>, 欧阳明星<sup>a\*</sup>

(常州大学 a. 医学与健康工程学院, 生物医学工程与健康科学研究院; b. 药学院 生物与食品工程学院, 江苏 常州 213164)

**摘要:** **目的** 探讨棕榈酰化修饰调节非受体酪氨酸激酶 Fyn 活性的分子机制。 **方法** 利用荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 技术实时检测细胞中的 Fyn 活性, 并结合棕榈酰化位点缺失和共转染蛋白质酪氨酸激酶 (C-terminal Src kinase, CSK) 表达质粒研究其分子机制。 **结果** 实验发现, (C3, C6) 任一位点的棕榈酰化缺失能引起 Fyn 的高活性表达, 且 C6 位点影响更显著。已知 CSK 激活后发生膜转移, FRET 检测证实其对细胞中的 Fyn 活性有下调作用, 但不能有效调控 (C3, C6) 棕榈酰化位点缺失的 Fyn (GSS) 活性。 **结论** 本文结果初步支持了 Fyn 活性受细胞内的物理空间定位分布的一种调控机制假设, 即棕榈酰化缺失的 Fyn (GSS) 受细胞膜上 CSK 抑制性的调节作用被减弱, 从而促进了组成性的高活性表达。

**关键词:** Fyn 激酶; 棕榈酰化修饰; 荧光共振能量转移; CSK 激酶

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2023.02.004

## Palmitoylation in Regulating Fyn Kinase Activity Based on FRET Imaging

ZHANG Xin<sup>a,b,#</sup>, GUO Jia<sup>a#</sup>, YAO Hui<sup>a,b</sup>, DENG Linhong<sup>a\*</sup>, OUYANG Mingxing<sup>a\*</sup>

(a. Institute of Biomedical Engineering and Health Sciences, School of Medical and Health Engineering; b. School of Pharmacy & School of Biological and Food Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, Jiangsu, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the molecular mechanism of palmitoylation modification in regulating the activity of non-receptor tyrosine kinase Fyn. **Methods** The intracellular Fyn activity was detected by applying fluorescence resonance energy transfer (FRET) technology, and the mechanism was investigated by combining with Fyn palmitoylation deficiency and C-terminal Src kinase (CSK) plasmid co-expression. **Results** Experimental data showed that single loss of either of (C3, C6) palmitoylation sites resulted in higher Fyn activity, and C6 seemed more significant. It is known that CSK membrane translocation occurred after activation. FRET assay confirmed that CSK could down-regulate the activity of Fyn in cells, but could not effectively regulate the activity of Fyn (GSS) with the loss of palmitoylation sites. **Conclusions** The results in this study support the hypothesis on Fyn regulation by spatial localization, namely, non-palmitoylated Fyn (GSS) is less effective in the inhibitory regulation by CSK on cell membrane, thus promoting constitutive high activity expression.

**Key words:** Fyn kinase; palmitoylation; fluorescence resonance energy transfer (FRET); CSK kinase

收稿日期: 2022-10-23; 修回日期: 2022-11-27

基金项目: 江苏省科技厅自然科学基金项目 (BK20181464), 国家自然科学基金项目 (11872129, 11532003)

通信作者: 邓林红, 教授, E-mail: dlh@cczu.edu.cn; 欧阳明星, 教授, E-mail: mxouyang@cczu.edu.cn

#为并列第一作者, \*为共同通信作者

Fyn 是非受体酪氨酸激酶 Src 家族的重要成员之一,参与调控 T 细胞免疫反应、神经系统的发育、细胞黏附等生理活动<sup>[1-2]</sup>。Fyn 结构与 Src 家族其他成员相似,依次含有 1 个 N-端区、SH3、SH2、中间连接肽、SH1 激酶活性结构域以及起抑制性调节作用的尾肽链,其 Y528 磷酸化位点通过结合 SH2 调控 Fyn 的构象和活性<sup>[3-6]</sup>。Fyn 功能的发挥涉及到其在质膜的定位、胞内的转运以及蛋白翻译后修饰等,如 N-端含有两个棕榈酰化修饰位点(C3, C6)<sup>[7-8]</sup>。同时,蛋白质酪氨酸激酶(C-terminal Src kinase, CSK)磷酸化 Src 和其家族成员的尾肽链酪氨酸残基,从而抑制性调节 Src 家族激酶(如 Src、Fyn 和 Lyn)的活性,而 CSK 自身激活后从胞质转移到质膜上发挥该作用<sup>[9-10]</sup>。内质网细胞器中存在的蛋白酪氨酸磷酸酶 α (protein tyrosine phosphatase alpha, PTPα) 能调节尾肽链酪氨酸的去磷酸化而激活 Src, 同样机制也可能调控 Fyn 的激活<sup>[11-12]</sup>。研究表明,Fyn 参与调节纤维细胞对表面黏附强度(纤连蛋白包被浓度)的响应<sup>[13]</sup>和间充质干细胞在机械拉伸作用下向脂肪细胞的分化<sup>[14]</sup>。

蛋白质的棕榈酰化修饰(palmitoylation)是常见的一种翻译后修饰,其特征是通过肽链中半胱氨酸残基上的巯基连接 1 个 16 碳脂肪棕榈酸,棕榈酰基转移酶(palmitoyltransferases, PATs)催化蛋白的棕榈酰化过程,而棕榈酰基硫酯酶(palmitoyl-protein thioesterases, PPTs)帮助去棕榈酰化<sup>[15-16]</sup>。作为其一个显著特性,细胞内蛋白质的棕榈酰化修饰是一个快速而可逆的动态过程,与蛋白质磷酸化、泛素化修饰等都具有重要的生理功能<sup>[17-18]</sup>。Fyn 的棕榈酰化修饰调控其质膜脂筏区定位和胞内转运<sup>[19]</sup>。本课题组近期发现,棕榈酰化修饰(C3, C6 两位点)对 Fyn 活性有强烈影响,而其分子机制有待进一步探索<sup>[20]</sup>。

研究棕榈酰化修饰对 Fyn 活性的调控机制,需要观测激酶在细胞内的动态活性甚至分布,荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)分子探针技术提供这种可能性<sup>[21-23]</sup>。本研究利用基因编码的 Fyn FRET 探针实时观察大鼠气道平滑肌中 Fyn 活性的变化<sup>[20]</sup>,通过在活细胞中表达棕榈酰化缺失的 Fyn(C3S, C6S),并检测两位点(C3, C6)各自的作用<sup>[19]</sup>,根据 Fyn 信号通路了解棕榈酰化影响其活性的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞种类与来源** 大鼠气道平滑肌(airway smooth muscle, ASM)细胞采购自北纳创联生物科技有限公司,培养在含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的低糖 DMEM 培养基中,置于 37 °C 恒温且含 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱中进行培养<sup>[24-25]</sup>。

**1.1.2 主要试剂和仪器** 质粒中、小提试剂盒购自德国 QIAGEN 公司,低糖 DMEM 培养基、Opti-MEM 培养基、胎牛血清 FBS、0.25% 胰蛋白酶、细胞贴壁消化液 Accutase、细胞转染试剂 Lipofectamine 3000、血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;纤连蛋白购自美国 Corning 公司和北京索莱宝科技有限公司;激光共聚焦培养皿(直径 15 mm)购自无锡 NEST 公司;FRET 活细胞显微镜成像平台和倒置显微镜 Primo Vert 购自德国 Zeiss 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 质粒提取** 将含有目标质粒的 *E. coli* DH5α 接种于含 100 μg/mL 氨苄青霉素(Amp)的 LB 液体培养基中,于 37 °C 摇菌扩增。使用中提试剂盒(QIAGEN 公司,德国)提取和纯化质粒,用 NanoDrop(TECAN 公司,瑞士)测定 DNA 浓度,置于 -20 °C 保存。质粒可用于细胞转染实验<sup>[26]</sup>。

**1.2.2 细胞转染** ASM 细胞培养在六孔的细胞培养板中,转染或共转染 Fyn FRET 探针(版本为 Fyn-tagged FRET biosensor)<sup>[20]</sup>、Fyn 质粒<sup>[20]</sup>、CSK 质粒<sup>[19]</sup>。实验操作流程如下:ASM 细胞培养在含 10% FBS 的 DMEM 低糖培养基中,实验中使用的细胞一般传代不超过 10 次;根据 Lipofectamine 3000 脂质体转染方法,转染前一天将细胞接种在 12 孔板中,转染时细胞密度 60%~80%,每个孔共转染 1 μg Fyn FRET 质粒 DNA,0.3 μg Fyn 质粒,或 0.3 μg CSK 质粒,操作时先充分混匀不同的 DNA 质粒,然后加入脂质体转染试剂;8~12 h 后用 PBS 清洗细胞 1 次,更换成含 10% FBS 和不含抗生素的 DMEM 低糖培养基;转染后 24 h,用 Accutase 消化细胞,将细胞转移到包被 Fibronectin(10 μg/mL)的共聚焦皿里,并换成含 1% FBS 的 DMEM 低糖培养基进行饥饿处理,待细胞贴壁 24 h 后开始活细

胞成像。

**1.2.3 FRET 显微镜成像** 在 FRET 显微镜成像系统中, ECFP 成像通道的荧光滤片参数为激发(436±10) nm, 分光 455 nm, 发射(480±20) nm; FRET 成像通道的荧光滤片参数为激发(436±10) nm, 分光 455 nm, 发射(535±15) nm。FRET 成像时使用 100 倍油镜, 通过 Zeiss 软件系统控制 ECFP 和 FRET 成像通道的快速切换, 确保同时采集两个通道的图像数据。通过多点定位功能, 每个小皿中同时选取 15~20 个细胞的位置进行 FRET 图像采集, 每轮采集相隔约 2 min。实验拍摄过程中, 在 10~12 min 时通过外接导管给细胞样品加入 1 mL 含 PDGF(终浓度 50 ng/mL) 的 DMEM 低糖培养基(1% FBS)。

**1.2.4 FRET 图像数据定量和统计分析** 通过 MATLAB 软件平台开发的 FRET 图像分析软件 FluoCell 6.0.0(MathWorks 公司, 美国)进行数据定量分析<sup>[27]</sup>, 实验数据以平均值±方差表示。使用统计分析软件 GraphPad Prism 6.0(GraphPad Software 公司, 美国)进行分析, 采用 *t* 检验分析数据之间的差异,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 N-端两个棕榈酰化修饰位点对 Fyn 激酶活性的影响

鉴于棕榈酰化修饰(含 C3, C6 两个修饰位点)对 Fyn 活性也有强烈的影响, 本文首先研究单个棕榈酰化位点对 Fyn 活性调控的贡献。通过分子生物学技术获得单位点突变的 Fyn(GSC)和 Fyn(GCS)表达质粒, 并和野生型 Fyn(GCC)、双位点突变的 Fyn(GSS)、三位点突变的 Fyn(SSS)进行活性比较。野生型和突变型的 Fyn 激酶 N-端序列如下:

Fyn(GCC): MGCVQCKDK...

Fyn(GSS): MGSVQSKDK...

Fyn(GCS): MGCVQSKDK...

Fyn(GSC): MGSVQCKDK...

Fyn(SSS): MSSVQSKDK...

将这些质粒分别与 Fyn FRET 探针共转染进入 ASM 细胞中表达, 通过检测 FRET 反应比较 Fyn 激酶活性的变化。实验中, 在 PDGF(50 ng/mL)刺激前后, 显微镜延时成像记录 ASM 细胞的 Fyn FRET 探针信号变化, 通过 FluoCell 软件分析得到代表荧

光比值(FRET/ECFP)的细胞彩图以及定量曲线。结果表明, PDGF 作用有效激活了共表达 Fyn 质粒的 ASM 细胞中 Fyn 激酶活性, 细胞中颜色从蓝到红显示 Fyn 激酶活性从低到高的分布或变化[见图 1(a)]。通过 FRET 定量分析, 进一步比较共表达不同 Fyn 突变体的条件下, 各组细胞中 FRET 比值的平均曲线变化趋势(平均值±方差)。结果发现, 与野生型 Fyn(GCC)相比, 单个棕榈酰化位点突变的 Fyn(GCS)或 Fyn(GSC)活性均有显著提高, 并且印证了此前报道的双位点突变 Fyn(GSS)活性明显增高[见图 1(b)], 表明缺失棕榈酰化位点修饰会导致 Fyn 的高活性表达。分别统计 PDGF 作用前后(0, 20 min)的各组细胞 FRET 比值, 证实缺失单个或两个棕榈酰化修饰位点均导致 Fyn 激酶活性的显著提高[见图 1(c)]。ASM 细胞中 3 位点缺失的 Fyn(SSS)显示低活性, 与本课题组先前在成纤维细胞(MEF)中报道的结果相似<sup>[20]</sup>。本文发现, C6 修饰位点缺失的 Fyn(GCS)所引起的活性提升又高于 C3 位点缺失的 Fyn(GSC), 故 N-端两个棕榈酰化修饰位点对维持细胞中的 Fyn 活性都有关键作用, 而 C6 位的作用更显著。

### 2.2 CSK 信号参与调节 Fyn 激酶活性

CSK 通过磷酸化 Src 家族成员的尾肽链参与调节其活性<sup>[28]</sup>。为了验证 CSK 是否参与棕榈酰化修饰对 Fyn 活性的调控, 本文在 ASM 细胞中共转染表达野生型 CSK(WT)、SH2 失活的 CSK(R107E)、缺失 SH3 结构域的 CSK( $\Delta$ SH3)质粒<sup>[19]</sup>。通过 Fyn FRET 信号检测 CSK 的作用, 将 Fyn FRET 探针与 CSK 质粒共转进 ASM 细胞, 通过 PDGF 快速激活细胞中的 Fyn。结果表明, 代表 FRET 比值的细胞颜色从蓝到红反映了 Fyn 活性从低到高的变化, 定量分析得到的细胞群体 FRET 比值曲线从 0.2~0.4 区间升高到 0.5~0.7 区间[见图 2(a)、(b)]。分析 PDGF 作用前后不同 CSK 质粒对 Fyn 活性的影响, 结果显示, 无论在细胞本底还是激活水平, CSK(WT)和 CSK( $\Delta$ SH3)都抑制了细胞内 Fyn 的活性, 而 SH2 失活的 CSK(R107E)则失去了这种抑制效果[见图 2(c)]。Yaqub 等<sup>[29]</sup>研究认为, SH3 对维持 CSK 活性很关键, 本文数据尚未验证该结论。综上所述, CSK 能抑制 Fyn 的活性, 而 CSK 的 SH2 结构域是发挥该作用所不能或缺的。

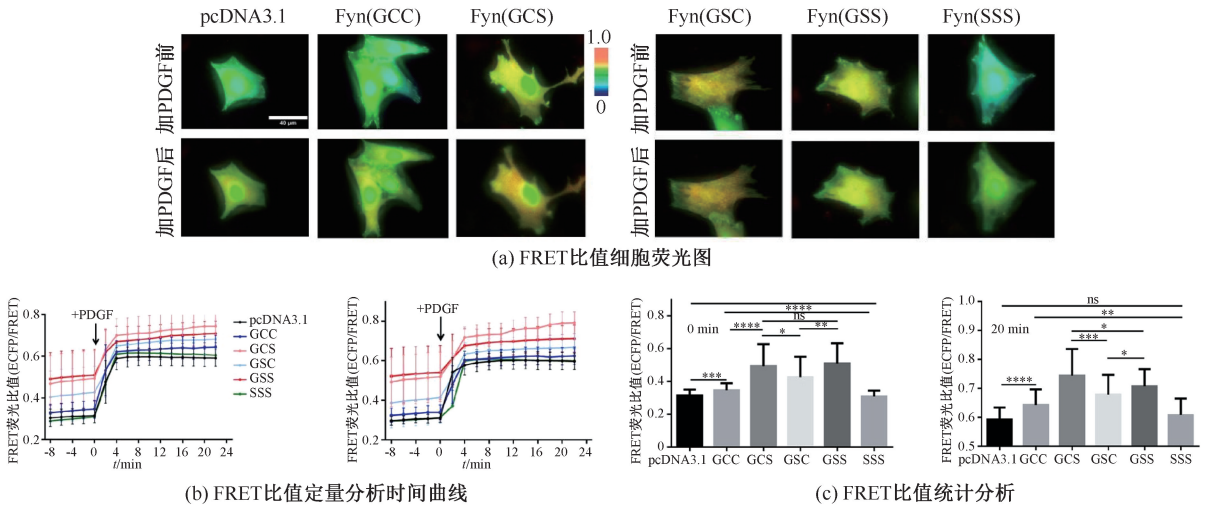


图1 通过FRET信号检测棕榈酰化修饰位点突变对Fyn激酶活性的影响

**Fig. 1** Effects of palmitoylation site mutations on the activity of Fyn kinase by FRET detection (a) FRET ratiometric images of cells, (b) Quantitative time-course curves of FRET ratio, (c) Statistical analysis of FRET ratio under the indicated conditions  
注: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; ns,  $P > 0.05$ 。下同。

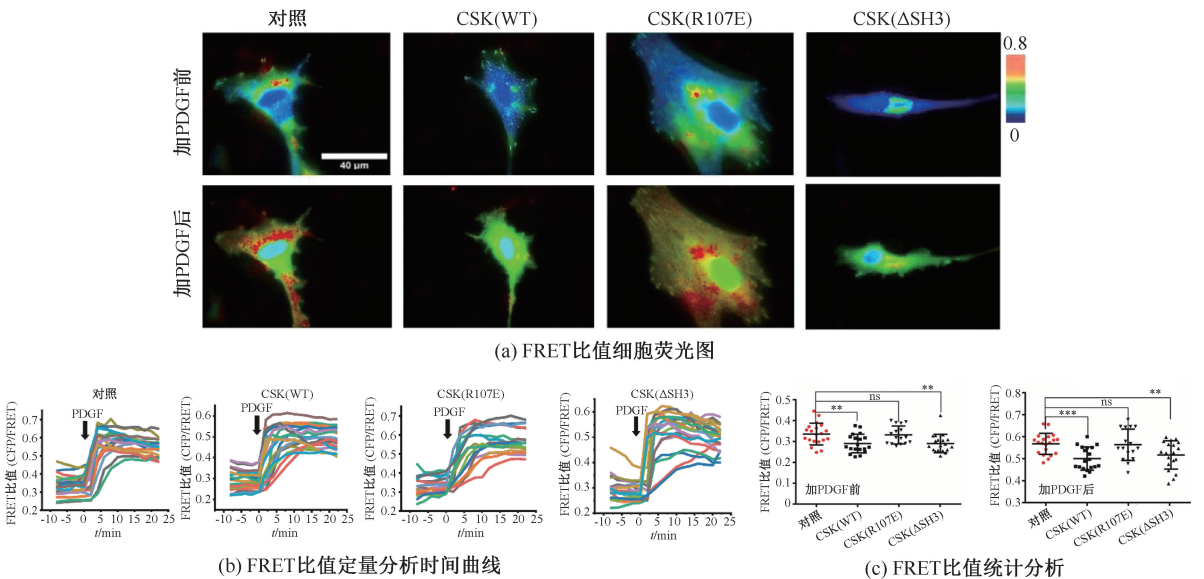


图2 通过FRET反应分析CSK激酶对Fyn活性的影响

**Fig. 2** Effect of CSK kinase on Fyn activity was analyzed by FRET reaction (a) FRET ratiometric images of cells, (b) Quantitative time-course curves of FRET ratio, (c) Statistical analysis of FRET ratio under the indicated conditions

### 2.3 棕榈酰化修饰在CSK调节Fyn活性过程中的作用

研究表明,CSK激活后从细胞质转移到细胞膜上,和支架蛋白CBP/PAG(CSK-binding protein/phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains)结合,调节膜上Src家族成员的

活性<sup>[30]</sup>。N-端棕榈酰化修饰参与调节Fyn的质膜定位<sup>[31-32]</sup>,故本文进一步检测Fyn本身的棕榈酰化修饰是否成为CSK调控Fyn激酶活性的一个必要条件。将棕榈酰化缺失的Fyn(GSS)与上述的CSK 3种质粒分别共同转染进ASM细胞中,利用FRET信号反应定量分析PDGF(50 ng/mL)作用前后的

Fyn 活性。结果表明,PDGF 极大激活了细胞中的 Fyn 激酶,同一组 ASM 细胞在 PDGF 作用后,Fyn 活性几乎同步地发生不同程度的升高[见图 3(a)、(b)]。对 PDGF 加入前后的 Fyn 活性变化做定量对比,结果显示野生型 CSK(WT)、SH3 缺失的 CSK( $\Delta$ SH3)、SH2 失活的 CSK(R107E)都未能非常有

效地下调 Fyn(GSS)的活性,其中 CSK(WT)显示了轻微的抑制性作用[见图 3(c)]。对比图 2 的结果可见,野生型 CSK(WT)、CSK( $\Delta$ SH3)两个质粒的表达可明显抑制细胞内的 Fyn 活性,故初步得出 Fyn 棕榈酰化修饰是 CSK 发挥高效调节 Fyn 活性作用的一个必要条件。

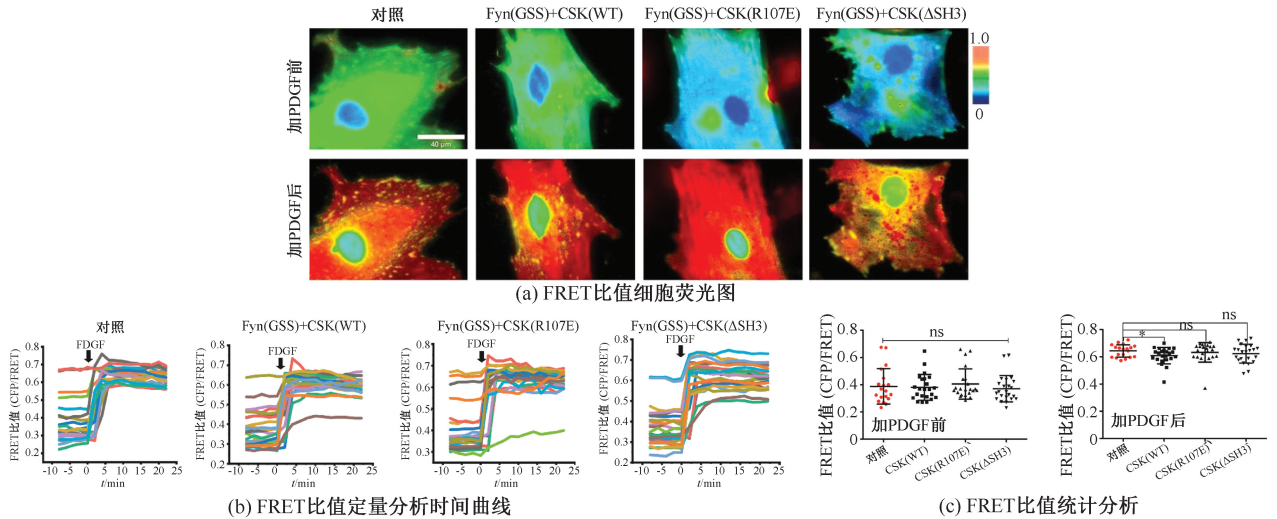


图3 Fyn 的 N-端棕榈酰化修饰对 CSK 激酶调控 Fyn 活性的影响

Fig. 3 Fyn N-terminal palmitoylation in CSK regulation of Fyn activity (a) FRET ratiometric images of cells, (b) Quantitative time-course curves of FRET ratio, (c) Statistical analysis of FRET ratio under the indicated conditions

## 2.4 Fyn 激酶活性在细胞内的定位

考虑 CSK 激活后主要定位在细胞膜上调节 Src 家族成员包括 Fyn<sup>[10]</sup>,故对 Fyn 激酶及活性的空间分布进行检测。在纤维细胞 MEF 中表达 mCherry 荧光蛋白标记的 Fyn,与共转的 Fyn FRET 同时成像,发现 Fyn-mCherry 蛋白在细胞核周存在高浓度分布,与核周的高 FRET 活性相一致[见图 4(a)]。通过活细胞的内质网染色(ER-Track Red),观测到 Fyn FRET 高活性区与核周的内质网膜结构存在空间重叠的分布[见图 4(b)]。通过细胞转染 CSK 的 3 种质粒和免疫荧光染色检测胞内分布,证实野生型 CSK(WT)的定位和 SH2 失活的 CSK(R107E)、SH3 缺失的 CSK( $\Delta$ SH3)存在差异,后者在细胞中呈弥散分布并出现在细胞核中[见图 4(c)],一定程度上印证了图 2 中所观察的结果,即 CSK(R107E)缺失了下调 Fyn 活性的功能。上述结果支持了 Fyn 激酶活性的膜定位以及 CSK 的调控作用。

## 3 讨论

Fyn 激酶在多种组织中具有重要的生理或病理作用。研究发现,其作为重要激酶分子参与 T 细胞激活、大脑的发育如髓鞘形成和少突细胞的成熟等生理功能,同时,Fyn 的活性变化与许多重要疾病的病理机制密切相关,包括前列腺癌、乳腺癌等癌症病变,以及阿兹海默病、帕金森病等退行性神经系统病变<sup>[33-35]</sup>。本课题组近期研究了棕榈酰化双位点(C3, C6)缺失的 Fyn(GSS)质粒以及膜定位缺失的 Fyn(SSS)质粒,发现 Fyn(GSS)在细胞中呈现组成性的高活性表达,显著高于野生型的 Fyn(GCC)活性,Fyn(SSS)则显示失活状态<sup>[20]</sup>。本研究显示,棕榈酰化修饰参与调节 Fyn 激酶的正常生理活性,膜定位是维持 Fyn 活性的必要条件,而棕榈酰化修饰调控 Fyn 活性的细胞分子机制尚有待探索。

本文进一步构建棕榈酰化单位点缺失的 Fyn

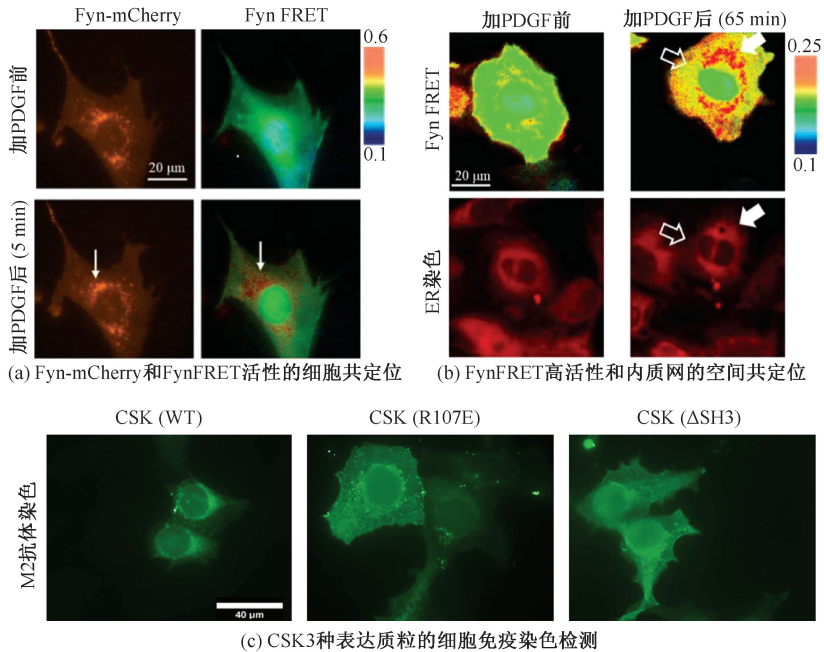


图4 Fyn 激酶活性的细胞内定位

**Fig. 4 Intracellular localization of Fyn kinase activity** (a) Cellular co-localization of Fyn-mCherry and Fyn FRET activity, (b) Spatial co-localization of high Fyn FRET activity and endoplasmic reticulum, (c) Cellular immunostaining of three CSK plasmids' expressions in 293T cells

注:图4(a)中箭头所指示区域为 PDGF 作用前后,纤维细胞中表达的 Fyn-mCherry 和 Fyn FRET 探针反应活性的共定位分布。图4(b)中实箭头指示高 FRET 活性和内质网的空间共定位分布,空箭头指示低 FRET 活性和缺少内质网的区域。本图中使用的是 Lyn 信号肽定位的 Fyn FRET 探针。图4(c)293T 细胞中转染表达 Flag 肽标记的 CSK 3 种质粒后,通过 M2 抗体免疫染色检测所表达 CSK 的细胞内定位。

(GCS)和 Fyn(GSC)质粒,检测发现任何一个位点的棕榈酰化突变都能导致 ASM 细胞中 Fyn 的高活性表达,而定量统计显示 6 号位点缺失的 Fyn (GCS)影响大于 3 号位点的 Fyn(GSC)(见图 1)。CSK 激酶能磷酸化 Src 成员的尾肽链而起到抑制作用,CSK 定位于质膜上发挥功能,故本文检测其是否参与棕榈酰化对 Fyn 活性的调节。通过 Fyn FRET 探针的检测,野生型 CSK(WT)和缺失 SH3 的 CSK(ΔSH3)均一定程度上抑制了细胞中 Fyn 的活性,缺失 SH2 结合活性的 CSK(R107E)抑制效果不显著(见图 2)。相比之下,这 3 种 CSK 质粒均不能抑制棕榈酰化缺失的 Fyn(GSS)活性(见图 3),显示 Fyn 的棕榈酰化修饰是 CSK 调节 Fyn 生理活性的一个必要条件。通过细胞内定位检测,实验结果也支持了 Fyn 激酶活性的膜定位,而非呈现胞质扩散分布,以及胞内空间分布影响 CSK 调节 Fyn 活性的可能性。

在蛋白翻译后修饰调控活性方面,Fyn 的 N-端豆蔻酰化和棕榈酰化修饰调控其激酶活性,C-端的酪氨酸磷酸化下调 Fyn 活性,而 SH1 激酶活性区的磷酸化上调其活性<sup>[36]</sup>。此外,髓磷脂碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)翻译后修饰引起的膜负表面电荷变化也可以影响 Fyn 的 SH3 结构域与膜上 MBP 的结合,从而调节 Fyn 在少突胶质细胞膜上的活性<sup>[37]</sup>。

结合此前的研究<sup>[20,38]</sup>,本文结果初步支持了细胞中 Fyn 活性调节机制的一种假设,即棕榈酰化修饰调节 Fyn 激酶活性的胞内空间分布机制假说:棕榈酰化修饰调节 Fyn 的胞内转运和细胞膜定位,CSK 激活后结合到膜上的支架蛋白 CBP/PAG,下调膜上的 Fyn 活性,而缺失棕榈酰化修饰的 Fyn 激酶不易受 CSK 的下调作用,呈现高活性表达(见图 5)。对棕榈酰化修饰调控 Fyn 激酶活性更全面的机制研究,包括 CSK 和 PTPα

如何协同作用调节 Fyn 的生理活性,或达到上游激活与下调信号通路之间的平衡,需要进一步的探索。

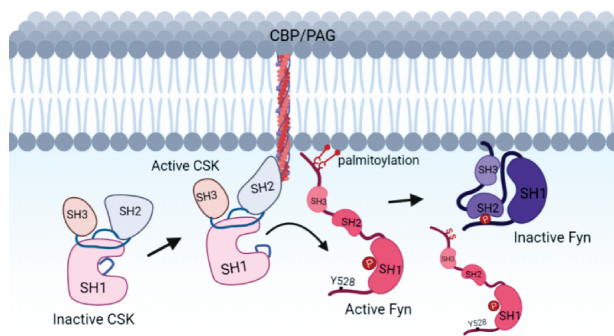


图 5 棕榈酰化修饰调节 Fyn 激酶活性的膜空间定位机制假设

Fig. 5 Hypothetic mechanism for palmitoylation regulating Fyn kinase activity by membrane localization

## 参考文献:

- [ 1 ] GUGLIETTI B, SIVASANKAR S, MUSTAFA S, *et al.* Fyn kinase activity and its role in neurodegenerative disease pathology: A potential universal target? [ J ]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(11): 5986-6005.
- [ 2 ] MAO LM, WANG JQ. Linkage of non-receptor tyrosine kinase Fyn to mGlu5 receptors in striatal neurons in a depression model [ J ]. *Neuroscience*, 2020, 433(5): 11-20.
- [ 3 ] HUANG Z, OUYANG M, LU S, *et al.* Optogenetic control for investigating subcellular localization of Fyn kinase activity in single live cells [ J ]. *J Mol Biol*, 2020, 432(7): 1901-9.
- [ 4 ] ZHENG XM. Mitotic activation of protein-tyrosine phosphatase alpha and regulation of its Src-mediated transforming activity by its sites of protein kinase C phosphorylation [ J ]. *J Biol Chem*, 2002, 277(24): 21922-21929.
- [ 5 ] LI S, ZOU Y, ZHAO D, *et al.* Revisiting the phosphotyrosine binding pocket of Fyn SH2 domain led to the identification of novel SH2 superbinders [ J ]. *Protein Sci*, 2021, 30(3): 558-570.
- [ 6 ] 李子通, 闫旭, 张守敏, 等. Src/RUNX2 参与调控周期性高张应变诱导的血管平滑肌细胞迁移 [ J ]. *医用生物力学*, 2022, 37(3): 395-402.  
LI ZT, YAN X, ZHANG SM, *et al.* Src/RUNX2 modulates the migration of vascular smooth muscle cells induced by cyclic stretch [ J ]. *J Med Biomech*, 2022, 37(3): 395-402.
- [ 7 ] SANDILANDS E, BRUNTON VG, FRAME MC. The membrane targeting and spatial activation of Src, Yes and Fyn is influenced by palmitoylation and distinct RhoB/RhoD endosome requirements [ J ]. *J Cell Sci*, 2007, 120(15): 2555-2564.
- [ 8 ] ALLAND L, PESECKIS SM, ATHERTON RE, *et al.* Dual myristylation and palmitoylation of Src family member p59fyn affects subcellular localization [ J ]. *J Biol Chem*, 1994, 269(24): 16701-16705.
- [ 9 ] NAGY Z, MORI J, IVANOVA VS, *et al.* Interplay between the tyrosine kinases Chk, Csk and phosphatase PTPRJ is critical for regulating platelets in mice [ J ]. *Blood*, 2020, 135(18): 1574-1587.
- [ 10 ] LUCIE P, LUBICA D, IVANA H, *et al.* Positive and negative regulatory roles of C-terminal src kinase (CSK) in FcεRI-mediated mast cell activation, independent of the transmembrane adaptor PAG/CSK-binding protein [ J ]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1771.
- [ 11 ] JING S, MURANJAN M, SAP J. Receptor protein tyrosine phosphatase alpha activates Src-family kinases and controls integrin-mediated responses in fibroblasts [ J ]. *Curr Biol*, 1999, 9(10): 505-511.
- [ 12 ] BARASHDI M, ALI A, MCMULLIN MF, *et al.* Protein tyrosine phosphatase receptor type C (PTPRC or CD45) [ J ]. *Am J Clin Pathol*, 2021, 74(9): 548-552.
- [ 13 ] KOSTIC A, SHEETZ MP. Fibronectin rigidity response through Fyn and p130Cas recruitment to the leading edge [ J ]. *Mol Biol Cell*, 2006, 17(6): 2684-2695.
- [ 14 ] THOMPSON WR, CHRISTOPHE G, ZHIHUI X, *et al.* Mechanically activated Fyn utilizes mTORC2 to regulate RhoA and adipogenesis in mesenchymal stem cells [ J ]. *Stem Cells*, 31(11): 2528-2537.
- [ 15 ] HERNANDEZ JL, MAJMUDAR JD, MARTIN BR. Profiling and inhibiting reversible palmitoylation [ J ]. *Curr Opin Chem Biol*, 2013, 17(1): 20-26.
- [ 16 ] GLOBAL AK, BAMJI SX. Protein palmitoylation in the development and plasticity of neuronal connections [ J ]. *Curr Opin Neurobiol*, 2017, 45(10): 210-220.
- [ 17 ] HUNDT M, TABATA H, JEON MS, *et al.* Impaired activation and localization of lat in anergic T cells as a consequence of a selective palmitoylation defect [ J ]. *Immunity*, 2006, 24(5): 513-522.
- [ 18 ] TORTOSA E, ADOLFS Y, FUKATA M, *et al.* Dynamic palmitoylation targets MAP6 to the axon to promote microtubule stabilization during neuronal polarization [ J ]. *Neuron*, 2017, 94(4): 809-825.
- [ 19 ] KAZI JU, VAAPIL M, AGARWAL S, *et al.* The tyrosine kinase CSK associates with FLT3 and c-Kit receptors and regulates downstream signaling [ J ]. *Cell Signal*, 2013, 25(9): 1852-1860.

- [20] OUYANG M, WAN R, QIN Q, *et al.* Sensitive FRET biosensor reveals Fyn kinase regulation by submembrane localization [J]. *ACS Sens*, 2019, 4(1): 76-86.
- [21] CHIEN S, ENGLER AJ, WANG PY. Perspectives of FRET imaging to study epigenetics and mechanobiology in the nucleus [J]. *Mol Cell Biol*, 2016, 3(7): 143-161.
- [22] TSIEN RY. Indicators based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2009, 10(12): 5239-5256.
- [23] 王英晓. 力传导中亚细胞水平的分子 FRET 成像[J]. *医用生物力学*, 2016, 31(4): 308-318.  
WANG YX. FRET imaging of molecular hierarchy at subcellular levels in mechanotransduction [J]. *J Med Biomech*, 2016, 31(4): 308-318.
- [24] 龙皎月. 哮喘易感基因 ADAM33 对气道平滑肌细胞力学行为的影响 [D]. 重庆: 重庆大学, 2012.
- [25] 邓林红. 气道平滑肌生物力学与哮喘病理机制的研究进展 [J]. *医用生物力学*, 2009, 24(4): 237-245.  
DENG LH. Progress of biomechanics of airway smooth muscle and its implication to asthma pathobiology [J]. *J Med Biomech*, 2009, 24(4): 237-245.
- [26] TRIVEDI RN, AKHTAR P, MEADE J, *et al.* High-level production of plasmid DNA by *Escherichia coli* DH5 $\alpha$   $\Omega$ sacB by introducing *inc* mutations [J]. *Appl Environ Microb*, 2014, 80(23): 7154-7160.
- [27] HJERRILD JM, CHRISTENSEN MG. MATLAB code and dataset for the string, fret and plucking estimator paper [J]. *ICASSP*, 2019(5): 22-24.
- [28] ZHANG L, REN Z, YANG Q, *et al.* Csk regulates angiotensin II-induced podocyte apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2016, 21(7): 846-855.
- [29] YAQUB S, ABRAHAMSEN H, ZIMMERMAN B, *et al.* Activation of C-terminal Src kinase (Csk) by phosphorylation at serine-364 depends on the Csk-Src homology 3 domain [J]. *Biochem J*, 2003, 372(1): 271-278.
- [30] CONG BB, GAO MH, LI B, *et al.* Overexpression of Csk-binding protein/phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains induces cluster of differentiation 59-mediated apoptosis in Jurkat cells [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(5): 4139-4148.
- [31] VAN'T HOF W, RESH MD. Rapid plasma membrane anchoring of newly synthesized p59<sup>fyn</sup>: Selective requirement for NH<sub>2</sub>-terminal myristoylation and palmitoylation at cysteine-3 [J]. *J Cell Biol*, 1997, 136(5): 1023-1035.
- [32] WOLVEN A, OKAMURA H, ROSENBLATT Y, *et al.* Palmitoylation of p59<sup>fyn</sup> is reversible and sufficient for plasma membrane association [J]. *Mol Biol Cell*, 1997, 8(6): 1159-73.
- [33] ANGELOPOULOU E, PAUDEL YN, JULIAN T, *et al.* Pivotal role of Fyn kinase in Parkinson's disease and levodopa-induced dyskinesia: A novel therapeutic target? [J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(8): 1372-1391.
- [34] ELIAS D, DITZEL HJ. Fyn is an important molecule in cancer pathogenesis and drug resistance [J]. *Pharmacol Res*, 2015, 100(10): 250-254.
- [35] ZHONG MC, VEILLETTE A. The adaptor molecule signaling lymphocytic activation molecule (SLAM)-associated protein (SAP) is essential in mechanisms involving the Fyn tyrosine kinase for induction and progression of collagen-induced arthritis [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(44): 31423-31436.
- [36] GOTTLIEB-ABRAHAM E, GUTMAN O, PAI GM, *et al.* The residue at position 5 of the N-terminal region of Src and Fyn modulates their myristoylation, palmitoylation, and membrane interactions [J]. *Mol Biol Cell*, 2016, 27(24): 3926-3936.
- [37] HOMCHAUDHURI L, POLVERINI E, GAO W, *et al.* Influence of membrane surface charge and post-translational modifications to myelin basic protein on its ability to tether the Fyn-SH3 domain to a membrane *in vitro* [J]. *Biochemistry*, 2009, 48(11): 2385-2393.
- [38] SANDILANDS E, BRUNTON VG, FRAME MC. The membrane targeting and spatial activation of Src, Yes and Fyn is influenced by palmitoylation and distinct RhoB/RhoD endosome requirements [J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 15): 2555-2564.