

## 人 Sef 基因重组腺病毒载体的构建与鉴定

李智勇, 任永明, 荣知立, 李颖华, 程龙, 王银银, 常智杰

清华大学医学院, 清华大学生物科学与技术系, 生物膜与膜生物技术国家重点实验室, 北京 100084

**摘要:** 构建人 Sef-L 和 Sef-S 基因的复制缺陷型重组腺病毒表达载体, 为研究 Sef 的功能和作用机制以及 Sef 的基因治疗奠定基础。通过 PCR 方法以 hSef 的表达质粒为模板扩增得到 hSef 的编码序列, 亚克隆到穿梭载体 pAdTrack-CMV 中, 经测序验证之后, 将穿梭载体使用 Pme I 酶切线性化, 然后与腺病毒基因组质粒 pAdEasy-1 共转化大肠杆菌 BJ5183, 得到重组的 Ad-hSef-L 和 Ad-hSef-S 质粒, 最后将 Ad-hSef-L 和 Ad-hSef-S 质粒使用 Pac I 线性化, 转染到 HEK293 细胞中, 包装收获病毒颗粒, 免疫印迹实验鉴定表达, 荧光素酶报告实验验证其功能。成功构建了人 Sef 基因的复制缺陷型重组腺病毒表达载体, 获得了有功能的 Ad-hSef-L 和 Ad-hSef-S 病毒重组子。

**关键词:** Sef, 腺病毒, FGF, MAPK, PI3K

## Construction and Characterization of hSef Recombinant Adenoviral Vectors

Zhiyong Li, Yongming Ren, Zhili Rong, Yinghua Li, Long Cheng, Yingyin Wang, and Zhijie Chang

School of Medicine, Department of Biological Sciences and Biotechnology, State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Tsinghua University, Beijing, China

**Abstract:** Sef (similar expression to fgf genes) was identified as a feedback antagonist of FGF signaling in zebrafish, mouse and human. To construct recombinant adenoviral vectors expressing hSef-L and hSef-S, the coding sequences of the two isoforms were amplified and ligated into pAdTrack-CMV, forming shuttle vectors pAdTrack-CMV/hSef-L-Myc and pAdTrack-CMV/hSef-S-Myc. After sequence confirmation, these two shuttle vector plasmids were linearized by Pme I and then co-transformed respectively with the adenoviral genome vector pAdEasy-1 into *E. coli* BJ5183. The successful recombinants were selected by Kanamycin and confirmed by Pac I digestion. The recombinant vectors Ad-hSef-L-Myc and Ad-hSef-S-Myc were finally digested with Pac I and transfected into HEK293 cells to pack into viral particles. The virus were amplified in 293 cells and used to infect MEF cells. Western blotting analysis was used to demonstrate the expression of hSef-L-Myc and hSef-S-Myc proteins. The inhibitory effects of the adenovirus mediated Sef expression on FGF signaling was further evaluated by Elk luciferase reporter assay. Our results indicated the constructed virus could produce effectively the proteins and then inhibit FGF signaling in MEF cells.

**Keywords:** FGF, MAPK, PI3K, Sef, adenovirus

**Received:** May 23, 2007; **Accepted:** July 3, 2007

**Supported by:** 985 Program of Tsinghua University, Tsinghua-Yue-Yuen Medical Sciences Fund and grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 30530420, 30470888 and 30470703), 973 Project (Nos. 2001CB510006, 2002CB513007 and 2006CB910100), and Beijing Science Research Funding (No. H020220020310).

**Corresponding author:** Zhijie Chang. Tel: +86-10-62785076; Fax: +86-10-62773624; E-mail: zhijiec@tsinghua.edu.cn

清华大学 985 项目, 清华大学-裕元医学基金资助项目及国家自然科学基金项目(Nos. 30530420, 30470888, 30470703), 国家重点基础研究发展规划项目(973)(Nos. 2001CB510006, 2002CB513007, 2006CB910100), 北京市科学研究基金项目(No. H020220020310)。

成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor)是一类具有多种生物学功能的细胞因子。FGF 在乙酰肝素硫酸盐化的蛋白多糖<sup>[1]</sup>或者其他的辅助因子如 klotho<sup>[2]</sup>的辅助下与细胞膜上的 FGF 受体(FGFR)结合,使其形成二聚体并发生自体磷酸化,活化后的 FGFR 通过募集接头蛋白 FRS2<sup>[3]</sup>和 Shc<sup>[4]</sup>激活 PI3K 和 Ras/MAPK 系列激酶<sup>[5]</sup>,或者直接活化其他的下游底物如 PLC- $\gamma$ <sup>[6]</sup>,最终通过改变一系列下游基因的表达从而调控细胞的增殖、分化、迁移和凋亡。FGF 信号通路在体内受到严密的调控<sup>[7]</sup>,这一信号通路的紊乱通常会导致严重的疾病诸如致死性侏儒症,颅缝早闭或者前列腺癌<sup>[8]</sup>。

Sef(similar expression to fgf genes)是近年新发现的一个 FGF 信号通路的负调控因子<sup>[9,10]</sup>。我们前期的研究发现,Sef 可以通过和 FGFR<sup>[11]</sup>或者 Ras<sup>[12]</sup>相结合来下调 FGF 对 MAPK 的活化,hSef 的过表达可以抑制 FGF 和 NGF 诱导引起的大鼠神经瘤细胞 PC-12 的分化<sup>[11]</sup>。同时我们还发现,在小鼠和人体中,Sef 基因还存在着另一种短的剪切形式(Sef-S)。hSef-S 的过表达可以通过某种不依赖于 Ras/MAPK 的途径抑制 FGF 引起的 NIH3T3 细胞的增殖<sup>[13]</sup>。为了进一步了解 Sef 的功能,本实验中我们构建了 hSef 基因的重组腺病毒载体,利用腺病毒载体的高侵染特性研究了 Sef 基因对 FGF 下游转录因子 Elk1 的转录活性的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 限制性内切酶、质粒、引物、菌种、抗体和细胞系

各种细胞系,质粒 pcDNA3.1/hSef-L-Myc<sup>[11]</sup>、pcDNA3.1/hSef-S-Myc<sup>[13]</sup>、pAdTrack-CMV、pAdEasy-1<sup>[14]</sup>,大肠杆菌 BJ5183、DH5 $\alpha$ 均由本实验室保存。限制性内切酶 *Pac* I 和 *Pme* I 购自 NEB 公司,*Kpn* I 和 *EcoR* V 购自 TaKaRa 公司。HEK293 和 MEF 等细胞系用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基在 37 $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。本实验中所用到的引物由上海生物工程合成。

### 1.2 重组腺病毒载体的构建

首先通过 PCR 方法以质粒 pcDNA3.1/hSef-L-Myc、pcDNA3.1/hSef-S-Myc 为模板,扩增得到 hSef-L-Myc 和 hSef-S-Myc 的编码序列,将其亚克隆

到穿梭载体 pAdTrack-CMV 中,然后将穿梭载体使用限制性内切酶 *Pme* I 消化处理使其线性化,与病毒基因组质粒 pAdEasy-1 共同转化大肠杆菌 BJ5183,重组得到 Ad-hSef-L-Myc 和 Ad-hSef-S-Myc 质粒。PCR 反应使用如下的一对引物:

PAD31U: 5'-TACGGTACCAAGCTGGCTAGTT AAG-3'

PAD31D: 5'-CGTGATATCAAACCTCAATGGTG ATG-3'

### 1.3 病毒颗粒的包装、扩增与滴定

将重组得到的病毒质粒使用限制性内切酶 *Pac* I 消化处理,乙醇沉淀线性化的 DNA,使用 ddH<sub>2</sub>O 溶解并放置于-84 $^{\circ}$ C 冷冻过夜灭菌。然后使用 1.4 描述的方法将其转染到 HEK293 细胞中,培养 10 d,此时大部分细胞已经变圆并与培养皿脱离接触。将细胞用枪头吹下,500 r/min 室温离心 5 min,去除培养基,使用 3 mL/10 cm 培养皿的 PBS 溶液重悬细胞,然后在液氮和 37 $^{\circ}$ C 水浴中反复冻融细胞悬液 4 次,4 6000 g 离心 6 min,将上清保存至-84 $^{\circ}$ C 冰箱或者取少量体积上清侵染 HEK293 细胞进行扩增。

由于 AdEasy 系统中包含有一个绿色荧光蛋白(GFP)的表达框,我们可以通过直接在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达来确定病毒的滴度。将 Ad-hSef-L-Myc 和 Ad-hSef-S-Myc 以及对照的病毒颗粒分别以 2 的倍数做 5 个梯度的稀释,按照 1.5 描述的方法侵染 MEF 细胞,24 h 后检查各个梯度稀释的病毒的侵染效率,然后选择可以达到较高的侵染效率(70%~80%)所需要的最大稀释倍数,作为后续使用的病毒滴度。

### 1.4 细胞转染

采用威格拉斯(Vigorus)公司的 Vigofect 转染试剂转染 HEK293 和 MEF 细胞。转染前 1 h,当细胞生长到 60%~70%时,更换新鲜培养基。同时将 DNA 和 Vigofect 转染试剂分别用 0.9%生理盐水溶解,静置 5 分钟后,将转染试剂稀释液逐滴加入到 DNA 溶液中轻微震荡混匀。室温静置 15 min 后,将混合液逐滴加入到细胞培养液中。3 h 后为细胞更换全新的培养基。

### 1.5 病毒侵染

当细胞生长到 60%~70%时,去除培养皿中含有血清的培养基,换上含有病毒颗粒的无血清培养基,37 $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub> 条件下培养,每半小时轻微摇晃数次。1.5 h 后更换含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基继

续培养。

### 1.6 免疫印迹

等量的 MEF 细胞培养在 6 孔板中, 在病毒侵染 24 h 后, 去除培养基, 用冰冷的 PBS 溶液润洗 1 遍, 使用细胞刮刀收获细胞。每孔细胞使用 40  $\mu$ L 细胞裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 1  $\mu$ g/mL leupeptin, 2  $\mu$ g/mL aprotinin, 1.4  $\mu$ g/mL pepstatin A and 0.5% (V/V) NP-40)在冰上裂解 30 min, 4 16000 g 离心 10 min。取适量体积的细胞裂解液经过 SDS-PAGE 胶分离后进行免疫印迹实验, 具体的操作参照文献 [12,13]进行。

### 1.7 荧光素酶报告分析(luciferase reporter assay)

依照 1.4 描述的方法, 将能够响应 FGF 信号刺激的报告质粒 pFR-Luc、pFA-Elk1 和内参质粒 pRL-TK-Luc 转染 24 孔板 MEF 细胞。转染 12 h 后, 依照 1.5 描述的方法分别用 Ad-GFP, Ad-hSef-L-Myc, Ad-hSef-S-Myc 病毒侵染不同组别的细胞。侵染 24 h 后, 使用含有 0.1% 胎牛血清的 DMEM 培养基饥饿细胞 18 h。然后依照实验设计, 每组细胞使用含有或者不含有 10ng/mL 的 bFGF 的无血清培养基继续培养 6 h 后收获细胞。每孔细胞加入 100  $\mu$ L 的裂解液, 室温轻微震荡 15 min。在荧光素酶报告分析仪 (Top Count) 专用检测板的每个孔中加入 30  $\mu$ L 荧光素酶催化底物, 再加入 30  $\mu$ L 的上述细胞裂解液, 混匀, 测定荧光素酶活性。每次实验都重复 3 次, 并经过 Promega 双报告系统的内参(pRL-TK-Luc)校正后

进行统计学分析。

## 2 结果

### 2.1 Ad-hSef-L-Myc 和 Ad-hSef-S-Myc 质粒的构建

PCR 扩增产物大小分别为 2.3 kb、1.8 kb 的 hSef-L-Myc 和 hSef-S-Myc 融合基因片段, 克隆到穿梭载体中, 得到重组质粒 pAdTrack-CMV/hSef-L-Myc 和 pAdTrack-CMV/hSef-S-Myc。经限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Eco*R V 消化处理后得到预期大小分别为 2.3 kb 和 1.8 kb 的片段(图 1-A)。进一步测序证实以后, 将穿梭载体与病毒基因组质粒 pAdEasy-1 在大肠杆菌中同源重组。挑选阳性菌落, 小提质粒后依据质粒大小初步鉴定, 然后各取两个可能正确的克隆转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌, 小提质粒后经 *Pac* I 酶切消化鉴定确认, 成功重组的病毒质粒出现两个条带, 一条大小为 30 kb, 另一条取决于重组的方式, 大小为 4.5 kb 或者 3 kb(图 1-B)。

### 2.2 病毒颗粒的包装, 扩增和滴定。

Ad-hSef-L-Myc 和 Ad-hSef-S-Myc 经过 *Pac* I 线性化之后, 转染 HEK293 细胞, 培养 10 d 后, 收获病毒, 进行两轮扩增。将每个 10CM 培养皿的细胞所产生的病毒用 3mL 的 PBS 悬浮, 分装保存于 -84 冰箱。使用无血清的 DMEM 培养基分别将原始病毒悬液稀释 25、50、100、200、400 倍, 然后分别加入到 12 孔板的各个孔中侵染 MEF 细胞。24 h 后荧光显微镜下观测 GFP 的表达, 发现使用稀释 50 倍的病毒悬液侵染已经可以达到较高的侵染效率

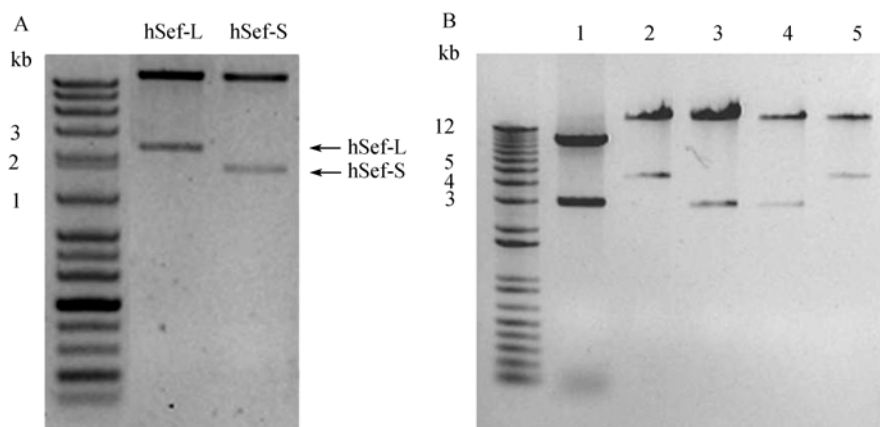


图 1 Ad-hSef-L-Myc 和 Ad-hSef-S-Myc 质粒的构建

Fig. 1 Construction of Ad-hSef-L-Myc and Ad-hSef-S-Myc

Panel A: *Eco*R V and *Kpn* I digestion of the shuttle plasmids pAdTrack-CMV/hSef-L-Myc (hSef-L) and pAdTrack-CMV/hSef-S-Myc (hSef-S) as indicated; Panel B: *Pac* I digestion of Ad-hSef-L-Myc and Ad-hSef-S-Myc plasmids as indicated, 1 pAdTrack-CMV, 2 Ad-hSef-L-Myc-1, 3 Ad-hSef-L-Myc-2, 4 Ad-hSef-S-Myc-1, 5 Ad-hSef-S-Myc-2

(图 2)。所得到的病毒分别记为 Ad-hSef-L-Myc 和 Ad-hSef-S-Myc。

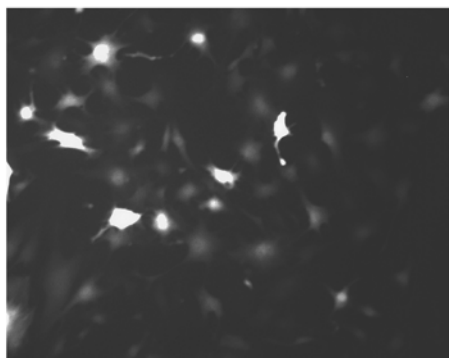


图 2 荧光显微镜下观察 Ad-hSef-L-Myc 感染的 MEF 细胞  
Fig. 2 Photograph of Ad-hSef-L-Myc infected MEF cells  
Color picture was converted to white-black style. White area stands for the expression of GFP, and its brightness stands for the expression level of this protein

### 2.3 hSef 表达的免疫印迹检测

用 Ad-hSef-L-Myc 和 Ad-hSef-S-Myc 病毒分别感染 MEF 细胞, 免疫印迹实验显示, 细胞裂解液中出现了针对 Myc 的特异性条带, 对应的分子量分别为大约 100 和 78 kD(图 3), 其为 hSef-L-Myc 和 hSef-S-Myc 蛋白, 和以前的文献报道<sup>[13,15]</sup>相符合。以上荧光照相和免疫印迹实验显示, 腺病毒载体介导的 hSef 可以在 MEF 细胞中很好的表达, 并有较高的感染效率。

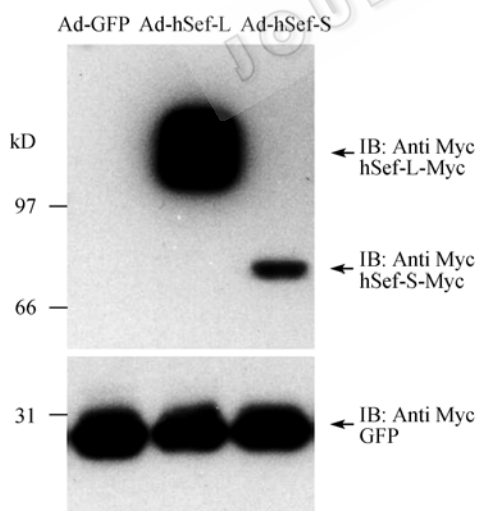


图 3 免疫印迹实验验证 Ad-hSef 的表达  
Fig. 3 Expression of hSef-L-Myc and hSef-S-Myc demonstrated by western-blotting assay  
Upper panel: Expression of hSef-L-Myc and hSef-S-Myc, detected by mono-clone antibody against Myc epitope  
Lower panel: Expression of the GFP, detected by poly-clone antibody against full length GFP protein

### 2.4 hSef 过表达对 FGF 刺激诱导的 Elk1 转录活性的影响

前期研究发现, 在 HEK293T 等细胞系中过量表达 hSef-L 可以影响 FGF 下游基因的表达<sup>[16]</sup>。为了证明腺病毒介导的 hSef-L-Myc 和 hSef-S-Myc 的活性, 我们用所产生的病毒感染 MEF 细胞, 然后观测 FGF 下游转录因子的转录活性。我们选用 Elk1 依赖的荧光素酶报告质粒, 在过量表达 hSef 的条件下观察 FGF 所诱导的 Elk1 的转录活性的变化。图 4 结果显示, 在 Ad-GFP 感染的条件下, FGF 可以明显地开启下游荧光素酶基因的表达, 活性较对照组提高了约 200 倍, 而在 Ad-hSef-L-Myc 感染的条件下, FGF 对下游荧光素酶基因的激活效应明显降低(仅约 70 倍), Ad-hSef-S-Myc 的感染则具有比较微弱的抑制作用(150 倍)。此结果说明了 hSef-L 对 FGF/MAPK 信号通路具有明显的抑制作用。

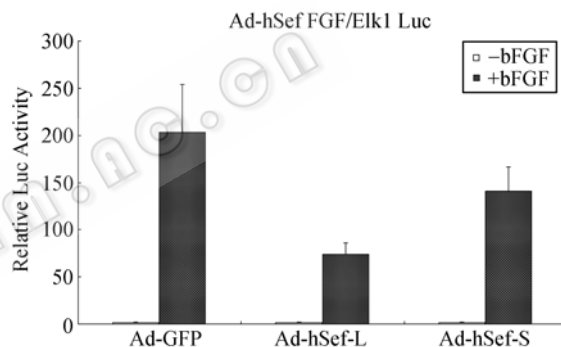


图 4 Ad-hSef 的表达对 FGF 下游转录因子 Elk1 转录活性的影响

Fig. 4 Adenoviral vector mediated overexpression of hSef inhibits bFGF induced Elk1 dependent transcription

## 3 讨论

近年来, 重组腺病毒载体被广泛的应用于动物基因的转染<sup>[17]</sup>。腺病毒感染细胞范围广, 可以感染原代细胞以及那些处于静止期的细胞, 与逆转录病毒等其他病毒载体不同, 腺病毒载体感染之后并不会整合到宿主细胞的基因组中, 从而可以避免引发新的基因突变等风险。此外, 腺病毒载体可以承载较长的外源基因片段, 容易通过体外扩增得到很高的滴度等特点都使得它与其他基因转染工具相比具有独特的优势<sup>[18]</sup>。基于以上的考虑, 我们构建了人 Sef 的两个腺病毒载体, 以进一步研究其在体内和体外的功能和作用机制。

Sef 自 2002 被报道以来, 包括我们实验室在内

的研究人员对其进行了广泛的研究。目前的研究主要集中在 Sef 对 FGF/MAPK 信号通路的调节及其分子机制, 采用的实验手段主要是瞬时转染 HEK293T 等细胞或者稳定表达 Sef 的 NIH3T3 细胞系。原代培养的小鼠胚胎成纤维细胞 MEF 作为一个经典的细胞模型, 广泛地应用于对 FGF 信号通路的各个信号传递或者调节分子如 FRS2<sup>[19]</sup>, Gab1<sup>[20]</sup>和 Sprouty<sup>[21]</sup>等的研究中。在这一细胞模型中, FGF 因子的刺激除了可以激活 MAPK 信号之外, 还可以很好地激活其他的下游信号通路如 PI3K<sup>[20]</sup>。但是到目前为此, 这一细胞模型还没有应用到对 Sef 的研究之中。我们构建的 Sef 重组腺病毒载体被实验验证可以以较高的效率侵染 MEF 细胞(图 2, 3)并在其中表达有功能的 Sef 蛋白(图 4)。我们的工作为下一步在 MEF 细胞中深入研究 Sef 对 FGF/PI3k 信号通路的调节作用及其机制奠定了基础。

此外, 有报道 Sef 表达水平的降低可能和某些疾病的发生或者恶化有关<sup>[22,23]</sup>。FGF 信号在体内可以促进大多数细胞的增殖和分化, 因此受到了严格的调控。Sef 作为一个 FGF 信号通路的负调控因子, 其表达水平的降低被认为有可能会致某些疾病如前列腺癌等的发生, 目前的研究结果证实了这一推测。接下来的想法就是通过恢复 Sef 的表达来抑制这些肿瘤和癌症的进一步恶化。Sef 重组腺病毒载体的构建为我们下一步利用 Sef 进行基因治疗方面的研究工作奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] Loo BM, Salmivirta M. Heparin/heparan sulfate domains in binding and signaling of fibroblast growth factor 8b. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 32616–32623.
- [2] Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature*, 2006, **444**: 770–774.
- [3] Kouhara H, Hadari YR, Spivak-Kroizman T, et al. A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell*, 1997, **89**: 693–702.
- [4] Klint P, Kanda S and Claesson-Welsh L. Shc and a novel 89-kD component couple to the Grb2-Sos complex in fibroblast growth factor-2-stimulated cells. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 23337–23344.
- [5] Eswarakumar VP, Lax I and Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2005, **16**: 139–149.
- [6] Mohammadi M, Honegger AM, Rotin D, et al. A tyrosine-phosphorylated carboxy-terminal peptide of the fibroblast growth factor receptor (Flg) is a binding site for the SH2 domain of phospholipase C-gamma 1. *Mol Cell Biol*, 1991, **11**: 5068–5078.
- [7] Tsang M, Dawid IB. Promotion and attenuation of FGF signaling through the Ras-MAPK pathway. *Sci STKE* 2004, 2004.
- [8] Wilkie AO. Bad bones, absent smell, selfish testes: The pleiotropic consequences of human FGF receptor mutations. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005, **16**: 187–203.
- [9] Tsang M, Friesel R, Kudoh T, et al. Identification of Sef, a novel modulator of FGF signalling. *Nature Cell Biology*, 2002, **4**: 165–169.
- [10] Furthauer M, Lin W, Ang SL, et al. Sef is a feed back-induced antagonist of Ras/MAPK-mediated FGF signalling. *Nature Cell Biology*, 2002, **4**: 170–174.
- [11] Xiong SQ, Zhao QH, Rong ZL, et al. hSef inhibits PC-12 cell differentiation by interfering with Ras-mitogen-activated protein kinase MAPK signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**: 50273–50282.
- [12] Ren YM, Cheng L, Rong ZL, et al. hSef co-localizes and interacts with Ras in the inhibition of Ras/MAPK signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, **347**: 988–993.
- [13] Rong ZL, Ren YM, Cheng L, et al. Sef-S, an alternative splice isoform of sef gene, inhibits NIH3T3 cell proliferation via a mitogen-activated protein kinases p42 and p44 (ERK1/2)-independent mechanism. *Cellular Signalling*, 2007, **19**: 93–102.
- [14] He TC, Zhou SB, da Costa LT, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, **95**: 2509–2514.
- [15] Yang RB, Ng CKD, Wasserman SM, et al. A novel interleukin-17 receptor-like protein identified in human umbilical vein endothelial cells antagonizes basic fibroblast growth factor-induced signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**: 33232–33238.
- [16] Torii S, Kusakabe M, Yamamoto T, et al. Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling. *Developmental Cell*, 2004, **7**: 33–44.
- [17] Breyer B, Jiang W, Cheng H, et al. Adenoviral Vector-mediated gene transfer for human gene therapy. *Current Gene Therapy*, 2001, **1**: 149–162.
- [18] Mc Connell MJ, Imperiale MJ. Biology of Adenovirus and Its Use as a Vector for Gene Therapy. *Human Gene Therapy*, 2004, **15**: 1022–1033.
- [19] Hadari YR, Gotoh N, Kouhara H, et al. Critical role for the docking-protein FRS2alpha in FGF receptor-mediated signal transduction pathways. *PNAS*, 2001, **98**: 8578–8583.
- [20] Lamothe B, Yamada M, Schaeper U, et al. The docking protein gab1 is an essential component of an indirect mechanism for fibroblast growth factor stimulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/akt antiapoptotic pathway. *Mol Cell Biol*, 2004, **24**: 5657–5666.
- [21] Shim K, Minowada G, Coling D E, et al. Sprouty2, a mouse deafness gene, regulates cell fate decisions in the auditory sensory epithelium by antagonizing FGF signaling. *Dev Cell*, 2005, **8**: 553–564.
- [22] Darby S, Sahadevan K, Khan MM, et al. Loss of Sef (similar expression to FGF) expression is associated with high grade and metastatic prostate cancer. *Oncogene*, 2006, **25**: 4122–4127.
- [23] Zisman-Rozen S, Fink D, Ben-Izhak O, et al. Downregulation of Sef, an inhibitor of receptor tyrosine kinase signaling, is common to a variety of human carcinomas. *Oncogene*, 2007, **26**: 6093–6098.