

学校编码: 10384

分类号_____密级

学号: 21620141152487

UDC

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

核受体与核输入受体 IMP α 之间相互作用的
研究

Study of the interaction between nuclear receptors and IMP α

指导教师姓名: 李勇

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2017 年 3 月

论文答辩时间: 2017 年 5 月

学位授予日期: 2017 年 6 月

答辩委员会主席: 韩爱东

评 阅 人:

2017 年 5 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈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其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外，该学位论文为()课题(组)的研究成果，获得()课题(组)经费或实验室的资助，在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。)

声明人(签名)：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

() 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

() 2.不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人 (签名)：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录	
摘 要	I
Abstract	II
1 前言	1
1.1 核受体	1
1.1.1 核受体的分类	1
1.1.2 核受体的功能结构域	2
1.1.3 核受体与疾病	4
1.2 核输入受体 IMP α	7
1.2.1 核质转运过程	7
1.2.2 核输入受体 IMP α 的亚型与功能结构域	8
1.2.3 核定位信号 NLS	10
1.3 蛋白质结构生物学	11
1.3.1 结构生物学	11
1.3.2 蛋白质晶体结构	12
1.3.3 蛋白质结构解析	12
1.4 本研究的目的是与实验设计思路	13
2 材料与方法	16
2.1 常用试剂、耗材与仪器	16
2.1.1 常用试剂与耗材	16
2.1.2 主要仪器	18
2.2 分子克隆	19
2.2.1 质粒载体	19
2.2.2 蛋白表达质粒构建	19
2.3 His 标签蛋白沉淀实验	23
2.4 重组蛋白的表达与纯化	24
2.4.1 融合蛋白的表达	24
2.4.2 融合蛋白的纯化	24

2.4.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳.....	25
2.5 结晶	26
2.5.1 结晶前的准备.....	26
2.5.2 蛋白质结晶.....	27
2.6 免疫共沉淀 Co-IP 与蛋白质印迹 WB	28
2.6.1 免疫共沉淀 Co-IP.....	28
2.6.2 蛋白质印迹 WB	29
3 结果与分析	31
3.1 核受体 NLS 序列预测及核受体与 IMP α 片段截取	31
3.2 His 标签蛋白沉淀实验检测核受体与 IMP α 相互作用	33
3.2.1 FXR、THR α 1 与 IMP α 相互作用的检测.....	33
3.2.2 ER α 与 IMP α 相互作用的检测	34
3.2.3 His 标签蛋白沉淀实验检测结果	35
3.3 Co-IP 实验验证核受体与 IMP α 相互作用	36
3.3.1 细胞内验证 ER α 、THR α 1 与 IMP α 亚型的相互作用	37
3.3.2 Co-IP 验证的结果	38
3.4 共表达纯化实验验证核受体与 IMP α 相互作用	38
3.4.1 核受体 FXR 与 IMP α 相互作用的验证.....	38
3.4.2 核受体 ER α 与 IMP α 相互作用的验证	42
3.4.3 核受体 THR α 1 与 IMP α 相互作用的验证	49
3.4.4 共表达纯化验证的结果.....	58
3.5 蛋白复合物的结晶	59
3.5.1 晶体的初步筛选.....	59
4 总结与讨论	61
参考文献	64
致谢	70

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Nuclear receptors	1
1.1.1 Classification of nuclear receptor	1
1.1.2 The functional domains of nuclear receptor	2
1.1.3 Nuclear receptors and human disease	4
1.2 Importin α	7
1.2.1 The process of nucleocytoplasmic transportation.....	7
1.2.2 The subtypes and functional domains of importin α	8
1.2.3 Nuclear localization signals (NLSs)	10
1.3 Protein structural biology	11
1.3.1 Structural biology.....	11
1.3.2 Protein crystallography	12
1.3.3 Protein structure determination.....	12
1.4 The objectives and rationales of this project	13
Chapter 2 Materials and methods	16
2.1 Materials	16
2.1.1 Drugs and reagents.....	16
2.1.2 The main s	18
2.2 Molecular clone	19
2.2.1 Plasmids and vectors.....	19
2.2.2 Vectors construction.....	19
2.3 His-tag pull-down analysis	23
2.4 Recombinant protein expression and purification	24
2.4.1 Fusion protein expression	24
2.4.2 Fusion protein purification.....	24

2.4.3 SDS-PAGE.....	25
2.5 Crystallization	26
2.5.1 Preparation for crystalization.....	26
2.5.2 Protein crystalization	27
2.6 Co-Immunoprecipitation and Western Blot	28
2.6.1 Co-Immunoprecipitation.....	28
2.6.2 Western Blot.....	29
Chapter 3 Results and Discussion	31
3.1 Predict NLS of NRs and select the fragments of IMP αs and NRs.....	31
3.2 Detect the interaction between NRs and IMP αs by His-tag pull-down analysis	33
3.2.1 Detect the interaction between FXR/THR α 1 and IMP α s	33
3.2.2 Detect the interaction between ER α and IMP α s	34
3.2.3 The result of His-tag pull-down analysis	35
3.3 Validate the interaction between NRs and IMP αs by Co-IP	36
3.3.1 Validate the interaction between ER α /THR α 1 and IMP α s	37
3.3.2 The result of Co-IP.....	38
3.4 Validate the interaction between NRs and IMP αs by purify Co-expression protein	38
3.4.1 Validate the interaction between FXR and IMP α s	38
3.4.2 Validate the interaction between ER α and IMP α s.....	42
3.4.3 Validate the interaction between THR α 1 and IMP α s.....	49
3.4.4 The result of Co-expression protein purification	58
3.5 Crystallization of protein complexes	59
3.5.1 Screening of protein complex crystals.....	59
Chapter 4 Conclusion and discussion	61
References.....	64
Aknowledgements	70

摘要

核受体超家族是一类受小分子配体调控的转录因子，能够调节下游靶基因的表达，从而在细胞生长分化、机体发育代谢等生理过程中发挥重要的功能。这些基因调控更与一系列重大疾病，如糖尿病、肿瘤、炎症、心血管疾病等密切相关。因此，核受体已成为重要的药物研发的靶标。鉴于核受体的重要功能，而这些功能的作用场所又是在细胞核内，转录翻译后的核受体如何从细胞质运输至细胞核，是核受体功能调控信号通路中尤为重要的一环。目前，对核受体的功能及其调控机理有了越来越多的研究，但是核受体的调节其活性的机理还存在很多未解之谜，其中也包括核受体的入核机制。核蛋白大部分通过 IMP α /IMP β 介导的经典核质转运途径入核，其中核输入受体 IMP α 相当于连接器，两边分别连接核蛋白 NLS 和 IMP β (或 IMP β 的同系物)。为研究核受体是否是以 NLS 与 IMP α 结合的方式而入核，我们通过分子克隆方法构建了 IMP α 和核受体片段的表达载体，并通过 His 标签蛋白沉淀实验从生化水平探索 IMP α 和核受体之间的相互作用。我们发现了核受体 ER α 、THR α 1、FXR 能和核输入蛋白 IMP α 之间发生相互作用，且能结合不同亚型的 IMP α ，说明了 IMP α 各亚型在转运核受体入核上的可替代性，也进一步暗示了核受体 ER α 、THR α 1、FXR 借助了核质蛋白转运系统进行转运。通过免疫共沉淀实验和分子筛层析技术分别从细胞和体外水平验证了 ER α 、THR α 1 能与 IMP α 相互作用，得到了用于蛋白结晶的高纯度和浓度的蛋白质复合物；同时也检验出 FXR 和 IMP α 之间的相互作用较弱。我们对表达情况好且结合能力强的 ER α 、THR α 1 与 IMP α 亚型进行共结晶，并得到了 ER α 与 IMP α 的初步晶体。总之，本文发现并验证了核受体 ER α 、THR α 1 与 IMP α 的相互作用，并对复合体进行了共结晶，对进一步探究两种蛋白之间相互作用的分子机制具有指导意义，同时也为探究核受体入核机制研究提供了新的思路，为以核受体功能调控为基础的非配体调控药物开发提供新的设计思路及科学依据。

关键词：核受体；核输入受体；相互作用；核质转运

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

Nuclear receptor superfamily is a kind of transcription factors regulated by the small molecule ligands, which can regulate the expression of downstream target genes, thus plays an important role in cell growth and differentiation, development and metabolism. These gene regulations have a close relationship with a series of diseases, such as diabetes, cancer, inflammation, and cardiovascular disease, etc. As a result, the nuclear receptors have already become key targets in drug discovery. Since the importance of nuclear receptors and their functional activities in the nucleus, it is a very significant cycle for the regulation of signaling pathway for their transport from cytoplasm to nucleus after synthesized in cytoplasm. Although much more researches have been performed in the functional and regulation mechanism of nuclear receptor recently, it still remains unknown for the mechanism of their nuclear import pathway. The entry into the nucleus of nucleoprotein is regulated mainly by the classical nuclear transport pathway mediated by IMP α/β , while the nuclear import receptor IMP α serves as a connector with the NLS of nucleoprotein and IMP β (or IMP beta homologues) via its different ends, respectively. In order to figure out that if the nuclear receptor enters into nucleus by binding of its NLS and IMP α , we constructed the expression plasmids which contains fragments of IMP α s or nuclear receptors by cloning method, and detected the interaction between IMP α and nuclear receptors by His-tag pull-down analysis. As a result, we found that the nuclear receptor ER α , THR $\alpha 1$, and FXR interacted with different subtypes of IMP α , which suggests that the subtypes of IMP α are interchangeable when they transport the nuclear receptors into the nucleus. By Co-Immunoprecipitation assay *in vivo* and molecular sieve chromatography assay *in vitro*, we have validated the interaction of ER α and THR $\alpha 1$ with IMP α , respectively, and obtained their complex with high quality for further crystallization. At the same time, FXR and IMP α showed a weak interaction. We choose the ER α /IMP α s and THR $\alpha 1$ /IMP α s to crystallize because of their high expression level and strong binding capacity, and got the initial crystals of ER α and IMP α s. In a word, we discovered and verified the interaction of ER α and THR $\alpha 1$

with IMP α , and crystallized the complexes. Our findings have a great guiding significance for the molecular mechanism of interaction between nuclear receptors and IMP α , and provide a unique perspective of exploring the mechanism of nuclear receptors into the nucleus and also a scientific basis for non-ligand medicine research targeting nuclear receptors.

Key words: Nuclear receptors; Input nuclear receptor; Interacion; Nucleocytoplasmic transportation

1. 前言

1.1 核受体

核受体是一类重要蛋白质超家族^[1-2]，是一组受小分子配体所调控的转录因子^[3]。核受体的作用机理是通过与配体 (ligand) 相互作用而改变构象，从而与众多不同辅调节因子 (辅激活因子或辅抑制因子) 选择性结合来调控基因的表达。在应答反应中，核受体受激素类、胆固醇类、维生素类等众多配体调节，并与其他相关蛋白一起来调控特定基因的表达，进而调控机体的生长发育与新陈代谢等生理活动^[4-5]。这些调控更与系列重大疾病，如糖尿病、肿瘤、炎症、心血管疾病等密切相关。因此，核受体也是药物研发的重要靶点，目前属于核受体配体的临床药物占比超过 10%^[6]，如以核受体雌激素受体 (ER) 作为靶标的药物：用于冠心病治疗的倍美力 (Premarin) 和抗癌药他莫昔芬 (Tamoxifen)；以核受体过氧化物酶体增植物激活受体 (PPAR γ) 作为靶标的配体药物：用于糖尿病的药物文迪雅 (Avandia)。这些充分说明了核受体的生理功能与人类的疾病与健康息息相关。

1.1.1 核受体的分类

系统发育学研究表明，核受体超家族是广泛存在于后生动物 (Metazoan) 中的一类古老的受体家族^[7-9]，在原核生物、真菌、藻类生物及植物中都未发现它的存在^[8]。人类完整的基因组包含 48 个核受体，大鼠有 47 种，小鼠有 49 种^[10]，线虫则多达 270 多种^[11]。

人类核受体被分为经典受体，“被领养的”孤儿受体和孤儿受体三类 (表 1-1)。受内分泌调节的经典受体已被广泛地研究，如类固醇激素受体、维生素 D 受体，维甲酸受体和甲状腺素受体；那些已被克隆，但并未发现其配体的核受体，被称为孤儿受体^[12-13]。由于核受体重要的生理功能，近几年将孤儿受体作为药物靶标的研究热点。利用“反向内分泌学”的方法，发现了一些能与天然或人工合成的配体结合的孤儿核受体，被称为“被领养”的孤儿受体^[14]。

表 1-1 人核受体分类^[15]

经典核受体	“被领养的”孤儿核受体	孤儿核受体
AR	CAR	COUP-TF (I , II , III)
ER (α, β)	ERR (α, β, γ)	DAX-1
GR	FXR	ROR γ
MR	HNF4 (α, γ)	GCNF
PR	LXR (α, β)	NGFI-B (α, β, γ)
RAR (α, β, γ)	PPAR (α, β, γ)	PNR
THR (α, β)	PXR	RevErbA
VDR	ROR	SHP
	RXR (α, β, γ)	TLX
	LHR	TR2, TR4
	SF1	

1.1.2 核受体的功能结构域

所有的核受体都享有高度一致的氨基酸序列和保守的结构域。上百种不同的核受体晶体结构揭示了结构域形成的一般机制。一个典型的核受体通常包含以下五个功能区域 (图 1-1) : 包含 AF-1 的 N 端 A/B 区域; 包含一个 DBD 的中央 C 区域, 包含一个 LBD 的 C 端 E 区域, 和连接 DBD 和 LBD 的铰链 D 区域。

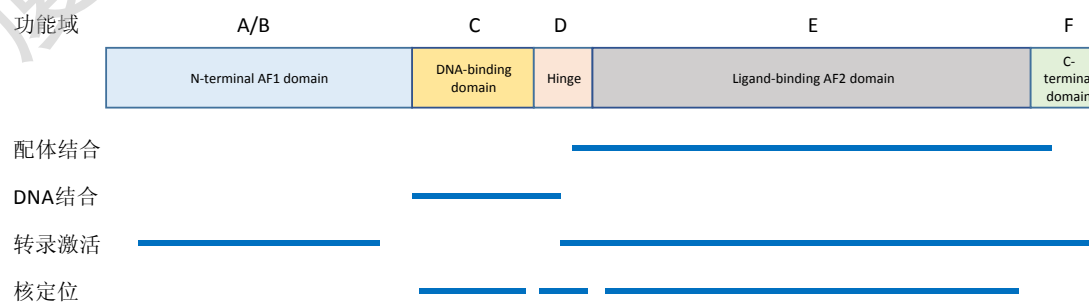
图 1-1 经典核受体的基本结构^[16]

Figure 1-1 The basic structure of a classic nuclear receptor

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.

厦门大学博硕士论文摘要库