

学校编码: 10384
学号: 21620141152569

分类号__密级__
UDC__

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

NBA1 与 PHGDH 相互作用并促进乳腺癌的生长

**NBA1 Interacts with PHGDH and Promotes Breast Cancer
Growth**

吴筠梅

指导教师姓名: 林圣彩

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2017 年 月 日

论文答辩时间: 2017 年 月 日

学位授予日期: 2017 年 月 日

答辩委员会主席: 李勤喜 教授
评阅人:

2017 年 5 月

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

目录

目录.....	I
TABLE OF CONTENT.....	IV
摘要.....	VII
Abstract.....	VIII
第一章 前言	1
1.1 PHGDH 相关研究进展	1
1.1.1 PHGDH 简介	1
1.1.2 PHGDH 的分子结构	2
1.1.3 PHGDH 的调节	8
1.1.4 PHGDH 与癌症	9
1.1.5 PHGDH 与疾病	12
1.2 NBA1 相关研究进展	13
1.2.1 NBA1 简介.....	13
1.2.2 NBA1 的结构.....	14
1.2.3 NBA1 的功能.....	15
1.2.4 NBA1 与乳腺癌.....	18
第二章 材料和方法	20
2.1 常用试剂与耗材	20
2.2 实验仪器	21
2.3 DNA 相关实验方法	21
2.3.1 质粒载体	21
2.3.2 大肠杆菌感受态细胞的制备	24
2.3.3 DNA 转化.....	25
2.3.4 质粒 DNA 的提取.....	26
2.3.5 克隆方法及策略	29

2.3.6 哺乳动物细胞表达质粒的构建	33
2.4 基因型鉴定	36
2.5 蛋白质相关实验方法	37
2.5.1 免疫共沉淀	37
2.5.2 蛋白质的浓度的测定 (Bradford 法)	38
2.5.3 蛋白质的 SDS-PAGE 电泳与 Western blotting 分析	39
2.5.4 蛋白质 LC-MS 样品的制备	40
2.5.5 蛋白凝胶层析 Superdex G200 size exclusion chromatography	40
2.5.6 PHGDH Thr57 磷酸化多克隆抗体的制备	41
2.6 细胞相关实验和方法	41
2.6.1 细胞培养	41
2.6.2 瞬时转染	42
2.6.3 慢病毒感染	43
2.6.4 细胞免疫荧光实验	43
2.6.5 细胞生长曲线的测定	44
2.7 LC-MS 测定代谢物含量的样品制备	44
2.8 小鼠肿瘤体积测量	45
第三章 结果与讨论	46
3.1 结果	46
3.1.1 NBA1 是一个新的与 PHGDH 相互作用的蛋白	46
3.1.2 葡萄糖饥饿刺激增强 NBA1 与 PHGDH 的相互作用	48
3.1.3 NBA1 与 PHGDH 结合区域的定位	51
3.1.4 NBA1 不影响 PHGDH 复合体的形成	54
3.1.5 葡萄糖饥饿刺激使 3PG 水平降低导致 NBA1 与 PHGDH 相互作用增强	55
3.1.6 NBA1 抑制 PKC ζ 对 PHGDH 的磷酸化	57
3.1.7 NBA1 促进乳腺癌细胞的生长	60
3.1.8 NBA1 促进 MMTV- <i>Wnt</i> -1 小鼠原发性乳腺癌肿瘤的生长	61
3.2 讨论	63

附录一：图表索引	65
附录二：缩略语及中英文对照	67
参考文献	72
致谢	78

厦门大学博硕士论文摘要库

TABLE OF CONTENT

TABLE OF CONTENT(IN CHINESE)	I
TABLE OF CONTENT(IN ENGLISH)	IV
ABSTRACT(IN CHINESE)	V
ABSTRACT(IN ENGLISH)	VI
CHAPTER 1 INTRODUCTION	1
1.1 REVIEW ON PHGDH	1
1.1.1 Introduction of PHGDH	1
1.1.2 Molecular structure of PHGDH.....	3
1.1.3 Regulation of PHGDH.....	2
1.1.4 PHGDH and cancer	9
1.1.5 PHGDH and disease	11
1.2 REVIEW ON NBA1	12
1.2.1 Introduction of NBA1.....	12
1.2.2 Structure of NBA1	13
1.2.3 Function of NBA1	15
1.2.4 NBA1 and breast cancer	18
CHAPTER 2 MATERIALS AND METHODS	20
2.1 CHEMICALS AND REAGENTS	20
2.2 INSTRUMENTS	21
2.3 DNA WORK	21
2.3.1 Plasmid vectors.....	21
2.3.2 Preparation of E.coli competent cells	24
2.3.3 DNA transformation	25
2.3.4 DNA preparation	26
2.3.5 Strategy for cloning	29

2.3.6 Construction of mammalian cell expressing plasmid.....	33
2.4 GENOMTYPING.....	36
2.5 PROTEIN WORK.....	37
2.5.1 Immunoprecipitation	37
2.5.2 Measurement of protein concentration by Bradford method.....	38
2.5.3 Electrophoresis of protein by SDS-PAGE gel and Western blotting	39
2.5.4 Preparation of protein sample for LC-MS.....	40
2.5.5 Superdex G200 size exclusion chromatography	40
2.5.6 Preparation of PHGDH Thr57 phosphorylation polyclonal antibody.....	41
2.6 CELL CULTURE, TRANSFECTION AND VIRUS PACKAGING.....	41
2.6.1 Cell culture	41
2.6.2 Transient transfection	42
2.6.3 Lentivirus packaging and infection	43
2.6.4 Cyto-immunofluorescence staining.....	43
2.6.5 Measurement of cell growth curve	44
2.7 PREPARATION OF SAMPLE FOR INTERMEDIATES MEASUREMENT BY LC-MS	44
2.8 MEASUREMENT OF MICE TUMOR VOLUMN.....	45
CHAPTER 3 RESULTS AND DISCUSSION	46
3.1 RESULTS.....	46
3.1.1 NBA is a novel PHGDH-interacting protein.....	46
3.1.2 Glucose deprivation increases the interaction of NBA1 and PHGDH.....	48
3.1.3 Mapping of binding region between NBA1 and PHGDH.....	51
3.1.4 NBA1 has no effect on PHGDH complex formation.....	54
3.1.5 Decreased 3-PG level by glucose deprivation enhances NBA1 and PHGDH interaction	55
3.1.6 NBA1 blocks PHGDH phosphorylation by PKC ζ	57
3.1.7 NBA1 promotes the growth of breast cancer cell.....	60
3.1.8 NBA1 promotes primary breast tumor growth of MMTV- <i>Wnt-1</i> mice	61
3.2 DISCUSSION	64

APPENDIX I : LIST OF FIGURES AND TABLES.....65

APPENDIX II : ABBREVIATION IN CHINESE AND ENGLISH .67

REFERENCE.....65

ACKNOWLEDGEMENT.....71

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

NBA1 是 BRCA1 复合体中重要的接头蛋白，对整个 BRCA1 复合体的构架以及复合体成员蛋白的稳定性十分重要，它参与 DNA 损伤复合体的组成并且介导 DNA 的损伤修复。为了探究 NBA1 新的功能，我们以 NBA1 为饵进行了蛋白相互作用的筛查，发现 PHGDH 与 NBA1 存在着相互作用。PHGDH 作为糖酵解通路的旁支——丝氨酸合成通路的第一个分支酶，是下游一系列反应的重要限速因素。此外，在许多乳腺癌的发生发展过程中 PHGDH 都扮演了重要的角色。

本文的研究中我们通过一系列实验首次发现 NBA 与 PHGDH 存在相互作用并且葡萄糖饥饿刺激增强这种相互作用，而糖酵解中间代谢物 3-磷酸甘油酸对这两个蛋白的相互作用有直接影响。一方面，我们鉴定出了 NBA1 与 PHGDH 发生相互作用的位置，另一方面，我们发现 NBA1 不会影响 PHGDH 四聚体的形成，但是会减弱 PKC ζ 对 PHGDH 的磷酸化。最后，我们通过细胞和小鼠乳腺癌模型看到了 NBA1 对乳腺癌生长具有促进作用。我们对 NBA1 和 PHGDH 的联系进行的初步探究，提供了一个 NBA1 通过 PHGDH 影响肿瘤生长的潜在机制，可能成为乳腺癌治疗的一个新的药物靶点。

关键词：乳腺癌；NBA1；PHGDH

Abstract

NBA1 is an important adaptor protein in breast cancer type 1 susceptibility protein (BRCA1) complex. It is vital to the structure of BRCA1 complex, as well as the protein stability of the other members in this complex. Functionally, it is involved in the assembling of DNA damage repair complex and required for DNA damage repair. To study novel functions of NBA1, we performed protein interaction screening using NBA1 as a bait and found that PHGDH is an NBA1 interacting protein. PHGDH is the initial and rate-limiting enzyme of serine biosynthesis pathway (SSP), which branches from glycolysis. Moreover, PHGDH plays an important role in the onset and development of many types of breast cancers.

In our study, we found that NBA and PHGDH have reciprocal interaction which is enhanced under glucose deprived condition. Moreover, the glycolytic intermediate 3-phosphoglycerate (3-PG) has a direct impact on the interaction of these two proteins. The domains required for interaction between NBA1 and PHGDH was also identified. Importantly, we found that NBA1 does not affect PHGDH tetramer formation but reduces its phosphorylation level by PKC ζ . Finally, we found that NBA1 promotes the growth of breast cancer cells by using cell and mice models. In all, we have conducted a preliminary assessment of the linkage between NBA1 and PHGDH, providing a potential mechanism of the regulation of tumor growth by NBA1 through its interaction with PHGDH, which could provide a new drug target to treat breast cancers.

Key Words: Breast Cancer; NBA1; PHGDH.

第一章 前言

1.1 PHGDH 相关研究进展

1.1.1 PHGDH 简介

磷酸甘油酸脱氢酶（phosphoglycerate dehydrogenase, PHGDH）是糖酵解-丝氨酸生物合成途径中的第一个分支酶。PHGDH 催化 3-磷酸甘油酸（3-phosphoglycerate, 3-PG）和 3-磷酸羟基丙酮酸（3-hydroxypyruvate phosphate, PHP）的相互转化，前者是糖酵解的中间产物，后者是丝氨酸合成的前体物质，后通过一系列酶的作用最终合成丝氨酸^[1, 2]（图 1.1）。因此，PHGDH 对于丝氨酸、甘氨酸以及与之相关的衍生物的合成十分重要。由它介导的丝氨酸合成通路，是大多数有机体赖以合成丝氨酸的唯一途径。PHGDH 作为丝氨酸合成途径的第一步反应的催化酶，其功能和活性对这一途径的活跃程度有着决定性影响，是下游一系列反应的重要限速因素^[1, 2]。因此，对于磷酸甘油酸脱氢酶的功能、调控方面的研究成为近几年来癌症代谢研究领域的一大热点。

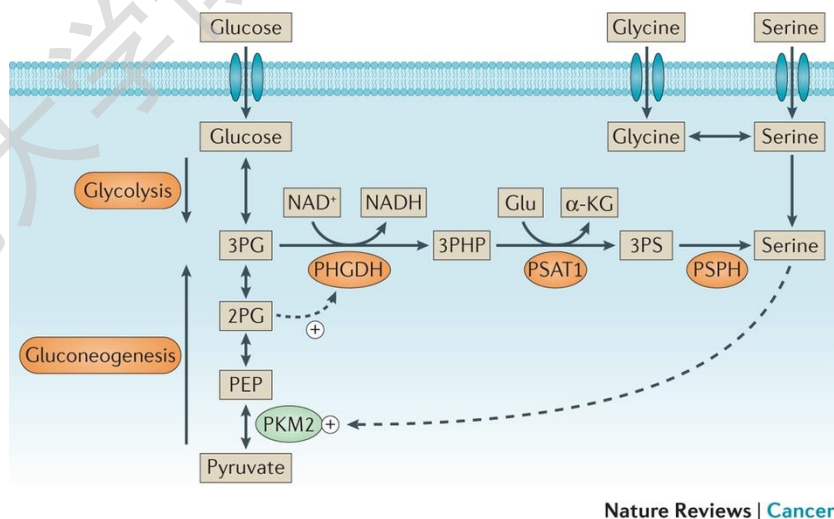


图 1.1 丝氨酸合成通路

Figure 1.1 The serine synthesis pathway

(引自 Ming Yang & Karen H. Vousden. Serine and one-carbon metabolism in cancer^[3], 2016.)

PHGDH 在大脑正常功能的行使、脑部发育以及脑部相关疾病方面也扮演了重要角色。丝氨酸对脑部脂类包括鞘脂和神经节苷脂的合成十分关键^[4]，然而血液中的丝氨酸无法穿过血脑屏障^[5]，所以 PHGDH 参与的丝氨酸合成通路是大脑丝氨酸的主要来源，因而神经胶质细胞具有完整的丝氨酸合成及分解通路^[6, 7]。

编码 PHGDH 的基因由 12 个外显子构成，定位于 1 号染色体 12 上^[8, 9]，可以编码 533 个氨基酸的单链蛋白，分子量 56.8 kDa，预测形成同源四聚体行使功能^[10]。在人体组织中具有两种不同 PHGDH 转录子，其大小分别为 2.1 kb 和 710 bp。这两个转录子的表达具有组织特异性：2.1 kb 的占大多数，主要在前列腺、睾丸、卵巢、脑、肝脏、肾脏和胰脏中表达，而 710 bp 的表达则比较弱，在心脏与骨骼肌中含量较多^[11]。在组织型纤溶酶原激活剂（tissue plasminogen activator, TPA）诱导的组织淋巴细胞系 U937 分化和去分化过程中这两种 PHGDH 的 mRNA 的表达比例会发生变化，说明 PHGDH 可以在转录水平上受到调控以适应细胞增殖状态^[11]。

1.1.2 PHGDH 的分子结构

PHGDH 与乙酸脱氢酶、D-乳酸脱氢酶、D-甘油酸脱氢酶一起，是早年发现的氧化还原酶的同源家族成员^[12]。PHGDH 每个亚基基本由 3 个不同的结构域组成：核酸结合域、底物结合域和调控域^[13]（图 1.2）。PHGDH 调控域是 ACT 结构域家族成员之一，许多细菌参与氨基酸代谢或氨基酸生物合成转录调控的蛋白具有 ACT 结构域^[14]。人源 PHGDH 与其他物种的序列比对显示（图 1.3），大部分同源性位于蛋白质的氮端，特别是核酸结合域，而碳端的保守性较低^[9, 15]。

位于 PHGDH 氮端的核苷酸结合域高度保守，包含有 Gly - Xaa - Gly - Xaa - Xaa - Gly - Xaa¹⁷ - Asp 的保守序列，与烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺）的结合有关^[16]。PHGDH 在物种间的不同之处主要体现在碳端的调控域，特别是它的长度上。哺乳动物和结核分歧杆菌有大约 200 个氨基酸，比酵母和其它细菌多大约 120 个氨基酸。线虫的 PHGDH 碳端较短，不具有调控域。结合分歧杆菌和大肠杆菌的酶活受到丝氨酸变构调控，而动物的并没有这样的机制，可见碳端的长度与丝氨酸的变构调控无关^[17, 18]。

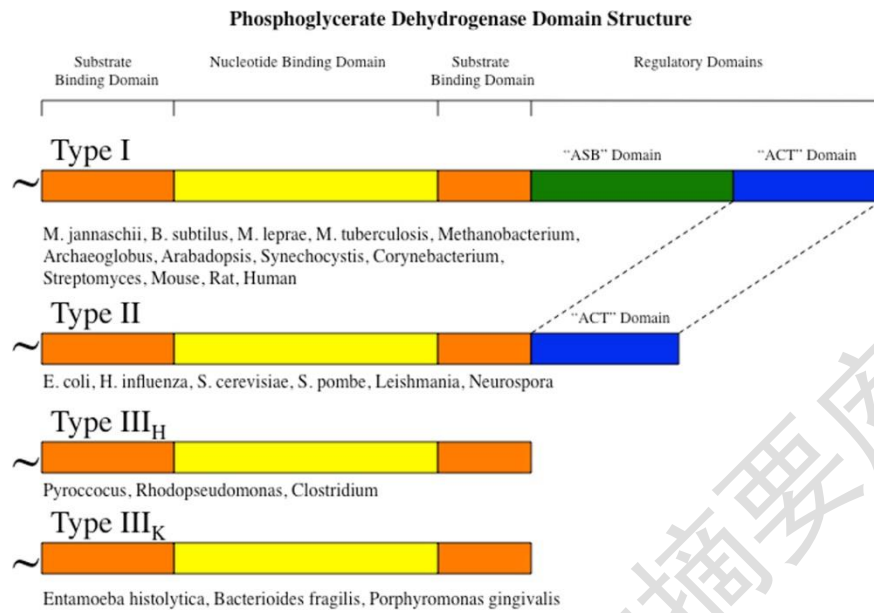


图 1.2 PHGDH 的功能域结构

Figure 1.2 The domain structure of D-3-phosphoglycerate dehydrogenases

(引自 Gregory A. Grant. Contrasting Catalytic and Allosteric Mechanisms for Phosphoglycerate Dehydrogenases^[19], 2011.)

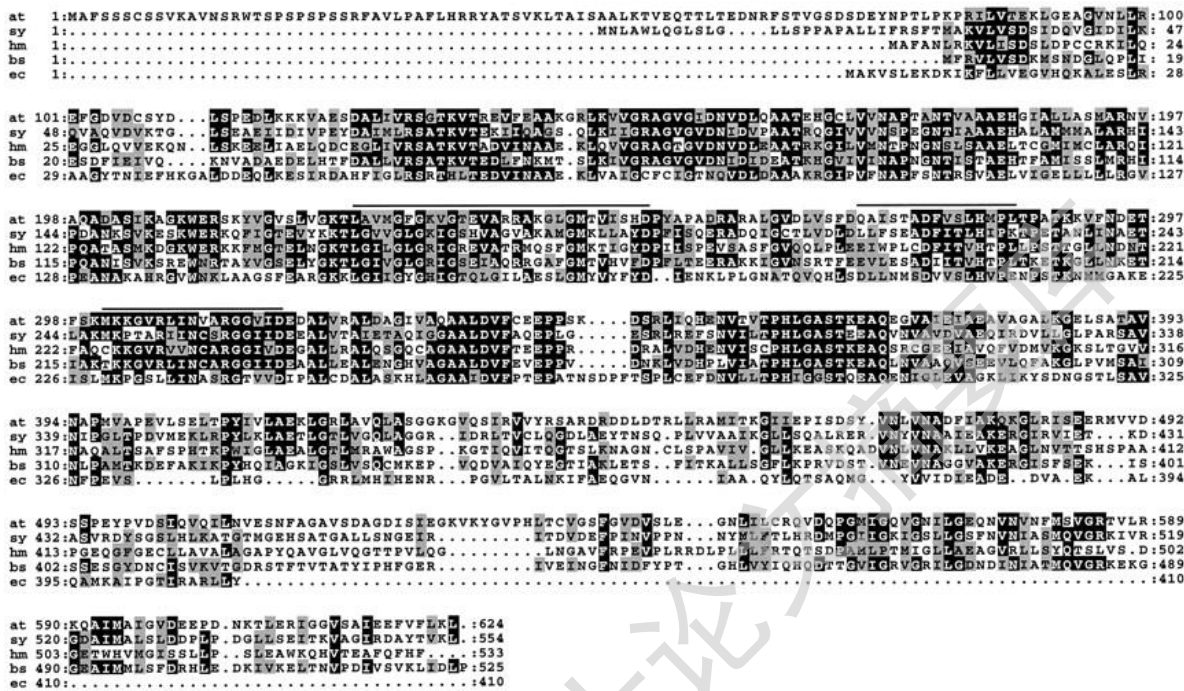


图 1.3 物种间 PHGDH 氨基酸序列比对

Figure 1.3 Comparison of amino acid sequences of 3-PHGDH from different species

(ec-大肠杆菌、bs-枯草芽胞杆菌、sy-集胞藻、hm-人类、at-拟南芥，黑色阴影表示相同氨基酸，灰色阴影表示相似氨基酸，点表示序列缺口，线表示相对保守的 NAD 结合区域)

(引自 Regulation of Serine Biosynthesis in Arabidopsis CRUCIAL ROLE OF PLASTIDIC

3-PHOSPHOGLYCERATE DEHYDROGENASE IN NON-PHOTOSYNTHETIC TISSUES^[15], 1999.)

来自不同物种的 PHGDH 根据可能参与调控的碳端的不同被分为三类: 类型 I, II 和 III^[19]。(图 1.2) 类型 III 只具有前两个功能域而缺少碳端, 只能形成二聚体且缺少变构位点, 存在于单细胞生物中。尽管类型 III 的 PHGDH 仍保留有催化功能, 但是所有植物和动物中被发现的 PHGDH 都属于类型 I^[10], 说明碳端的调控域对于 PHGDH 在这些细胞中的功能十分重要^[20]。

类型 I 和 II 的 PHGDH, 包括大肠杆菌^[21]、结核分歧杆菌^[22]、鸡^[23]、大鼠^[13]和家兔^[24]的, 都形成四聚体; 它们亚基之间的连接由位于碳端的调控域参与。被研究得最多的大肠杆菌中的 PHGDH 属于类型 II, 结构已经被解析出来, 它形

成一个对称的二聚体结构,而每个单体推测采取相同的构象。大肠杆菌的 PHGDH 中,其中一个二聚体的接触面是由两个相邻的两个核酸结合域构成的,而另一个则是由碳端的调控域构成的^[21]。它具有能与丝氨酸结合的位点,受到下游代谢终产物丝氨酸的变构抑制。丝氨酸的结合影响反应速率但不影响 PHGDH 与底物的亲和力。与丝氨酸的共结晶显示至少存在两个丝氨酸结合位点,存在于相邻单体调控域的结合部分。结合一半的丝氨酸就能抑制 85% 的酶活^[25]。

结核分歧杆菌的 PHGDH 作为类型 I 的 PHGDH 的代表,与大肠杆菌不同的是,它形成一个四聚体,每个单体的氨基酸序列一致但是采取两种不同的构象。在两个单体构象中,调控域旋转了 180 度,这导致了两个单体间与大肠杆菌相比更复杂的接触面。类型 I 的 PHGDH 含有丝氨酸和底物的变构结合位点,存在于结核分歧杆菌和哺乳动物当中。^[19] 结核分歧杆菌的 PHGDH 和大肠杆菌的一样能被 L-丝氨酸抑制, L-丝氨酸能够结合到相邻的调控域组成的表面上^[10, 26]。

而人类的 PHGDH 属于类型 I,表明其结构应与结核分歧杆菌的更为相似^[22],也以四聚体形式行使功能。然而只有人源的 PHGDH 的晶体结构是缺少碳端截短的,所以只被结晶成了二聚体^[27]。了解人类的 PHGDH 功能经常参照结核分歧杆菌的 PHGDH 结构(图 1.4),每个亚基由四个不同的结构域组成:核酸结合域、底物结合域、中间域和调控域。1-99 以及 283-319 氨基酸残基形成底物结合域,而 100-282 残基形成核酸结合域。中间域由 320-454 残基构成,而 455-529 则构成调控域。构象的旋转发生在连接底物结合域和中间域的那段氨基酸上^[22]。

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.

厦门大学博硕士学位论文摘要库