

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21620141152498

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

无糖刺激条件下核受体 Nur77 发生磷酸化
促进黑色素瘤细胞存活

Phosphorylated nuclear receptor Nur77 protects melanoma
cells from glucose starvation-induced cell death

王志静

指导教师姓名: 陈航姿 副教授

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2017 年 4 月 14 日

论文答辩时间: 2017 年 5 月 16 日

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

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

摘要	1
Abstract	2
第一章 前言	3
1 孤儿核受体 Nur77	3
1.1 Nu77 概述.....	3
1.2 Nur77 的结构	3
1.3 Nur77 的调控方式	4
1.3.1 通过基因转录方式调控.....	4
1.3.2 通过蛋白相互作用方式调控.....	6
1.3.3 通过 Nur77 亚细胞定位方式调控	6
1.4 Nur77 的蛋白修饰	6
1.4.1 Nur77 的磷酸化修饰	7
1.4.2 Nur77 的其他类型的蛋白修饰	8
1.5 Nur77 的生物学功能	9
1.5.1 Nur77 与细胞凋亡	9
1.5.2 Nur77 与细胞代谢	9
1.5.3 Nur77 与细胞自噬	10
2 ERK1/2 信号通路	11
2.1 ERK1/2 概述	11
2.2 ERK1/2 信号通路	11
2.3 ERK1/2 信号通路的调控方式	12
2.3.1 信号的持续时间与强度.....	13
2.3.2 支架蛋白.....	15
2.3.3 亚细胞定位.....	17
2.3.4 ERK 级联各层相互影响以及与其他信号通路的共同调控.....	17
2.3.5 ERK 级联各层激酶亚型.....	18
2.4 ERK1/2 信号通路的生物学功能	19

2.4.1 ERK1/2 参与细胞增殖和分化	19
2.4.2 ERK1/2 信号通路参与细胞迁移	19
2.4.3 ERK1/2 信号通路参与细胞凋亡	19
2.4.4 ERK1/2 信号通路参与溶酶体介导的细胞死亡与细胞自噬	20
2.4.5 ERK1/2 信号通路与细胞衰老	21
2.4.6 ERK1/2 信号通路与 ROS.....	21
3 研究目的及意义	21
第二章 材料与方法	23
1 实验材料	23
1.1 主要试剂和药品.....	23
1.2 主要仪器.....	24
1.3 细胞株.....	25
1.4 实验小鼠.....	26
1.5 质粒载体及菌株.....	26
2 实验方法	26
2.1 大肠杆菌感受态的制备.....	26
2.2 质粒转化.....	27
2.3 质粒提取.....	27
2.3.1 小规模质粒提取-碱裂解法	27
2.3.2 小提中量质粒提取.....	28
2.4 质粒的构建.....	28
2.5 细胞培养.....	29
2.6 细胞转染.....	30
2.6.1 磷酸钙转染法.....	30
2.6.2 Entranster™-D-4000 转染.....	30
2.6.3 慢病毒感染.....	30
2.7 His 标签融合蛋白的表达与纯化	31
2.8 蛋白提取和 Western Blotting	31

2.9 免疫沉淀.....	33
2.10 不完全体外磷酸化.....	33
2.11 线粒体分离.....	34
2.12 细胞免疫荧光观察.....	35
2.13 荧光素酶活性检测.....	35
2.14 流式细胞术测定细胞存活率.....	36
2.15 细胞总 ROS 和线粒体 ROS 检测.....	37
2.16 NADP ⁺ /NADPH 检测.....	37
2.17 GSSG/GSH 检测.....	38
2.18 细胞内 ATP 含量测定.....	39
2.19 小鼠模型.....	39
2.19.1 小鼠肺转移模型.....	39
2.19.2 小鼠 CTC (Circulating Tumor Cell) 模型.....	40
2.20 HE 染色.....	40
第三章 结果与分析.....	41
3.1 Nur77 对无糖刺激引发的黑色素瘤细胞死亡具有保护作用.....	41
3.1.1 敲低 Nur77 增强黑色素瘤细胞对无糖刺激的敏感性.....	41
3.1.2 Nur77 对黑色素瘤细胞应对无谷氨酰胺/血清刺激无作用.....	43
3.2 Nur77 在无糖刺激条件下的应答机制.....	46
3.2.1 Nur77 增加细胞内的还原力.....	46
3.2.2 Nur77 降低细胞内的 ROS.....	48
3.3 Nur77 在无糖刺激条件下的调控方式.....	51
3.3.1 Nur77 不依赖转录激活能力调控黑色素瘤细胞在无糖刺激条件下的应激.....	51
3.3.2 无糖刺激诱导 Nur77 磷酸化.....	52
3.3.2.1 无糖刺激激活 MAPK 信号通路中蛋白激酶 ERK.....	53
3.3.2.2 无糖条件下 ERK2 磷酸化 Nur77.....	55
3.3.2.3 ERK2 磷酸化 Nur77 的 S237.....	58

3.3.3 无糖刺激诱导 Nur77 的亚细胞定位	60
3.3.3.1 无糖刺激诱导 Nur77 定位线粒体	60
3.3.3.2 ERK2 磷酸化 Nur77 是其进入线粒体的前提条件	62
3.4 无糖条件下 Nur77 磷酸化并定位线粒体进而保护黑色素瘤细胞	65
3.5 Nur77 在黑色素瘤中的生物学功能	66
第四章 讨论与展望	69
参考文献	71
致谢	81

Abstract (in Chinese)	1
Abstract (in English)	2
Chapter 1 Introduction	3
1 Orphan nuclear receptor Nur77	3
1.1 Overview of Nur77.....	3
1.2 Structure of Nur77	3
1.3 Regulation of Nur77	4
1.3.1 Regulation through transcription	4
1.3.2 Regulation through interaction with other protein.....	6
1.3.3 Regulation through its subcellular localization.....	6
1.4 Modification of Nur77	6
1.4.1 Phosphorylation of Nur77	7
1.4.2 Other modification of Nur77	8
1.5 Biological function of Nur77	9
1.5.1 Nur77 and apoptosis	9
1.5.2 Nur77 and metabolism.....	9
1.5.3 Nur77 and autophagy	10
2 ERK1/2 signaling cascade	11
2.1 Overview of ERK1/2	11
2.2 ERK1/2 signaling pathways.....	11
2.3 Specificity determination of ERK1/2 signaling pathways	12
2.3.1 Duration and strength of signals	13
2.3.2 Scaffold	15
2.3.3 Subcellular localization.....	17
2.3.4 Cross-talk with other pathways.....	17
2.3.5 Multiple isoforms.....	18
2.4 Biological function of ERK1/2 signaling pathways	19

2.4.1 ERK1/2 participate in proliferation and differentiation.....	19
2.4.2 ERK1/2 participate in migration.....	19
2.4.3 ERK1/2 participate in apoptosis.....	19
2.4.4 ERK1/2 participate in lysosomal cell death and autophage.....	20
2.4.5 ERK1/2 signaling pathways and senescence.....	21
2.4.6 ERK1/2 signaling pathways and ROS.....	21
3 Purpose and signification.....	21
Chapter 2 Materials and Methods.....	23
1 Materials.....	23
1.1 Chemicals and reagents.....	23
1.2 Equipments.....	24
1.3 Cell lines.....	25
1.4 Mice.....	26
1.5 Plasmids and bacterial strains.....	26
2 Methods.....	26
2.1 Competent cell.....	26
2.2 Transformation.....	27
2.3 Plasmids extract.....	27
2.3.1 Mini-extract.....	27
2.3.2 Midium extract.....	28
2.4 Contruction of plasmids.....	28
2.5 Cell culture.....	29
2.6 Transfection.....	30
2.6.1 Transfection by calcium phosphate.....	30
2.6.2 Transfection by Entranster™-D-4000.....	30
2.6.3 Transfection by lentivirus system.....	30
2.7 Expression and purification of His-fusion proteins.....	31
2.8 Protein preparation and Western Blotting.....	31

2.9 Co-immunoprecipitation	33
2.10 In vitro phosphorylation assay	33
2.11 Mitochondria isolation	34
2.12 Immunofluorescence.....	35
2.13 Luciferase assay	35
2.14 Cell viability analysis by Flow Cytomete	36
2.15 ROS level measurement.....	37
2.16 NADP ⁺ /NADPH measurement	37
2.17 GSSG/GSH measurement.....	38
2.18 ATP level measurement.....	39
2.19 Amino Acid Models.....	39
2.19.1 The model of lung metastasis	39
2.19.2 The model of Circulating Tumor Cell	40
2.20 H&E staining	40
Chapter 3 Results and Analysis	41
3.1 Nur77 protects melanoma cells from glucose starvation-induced cell death .41	
3.1.1 Knockdown Nur77 sensitized to glucose starvation-induced cell death	41
3.1.2 Nur77 has no function on cell survival under glutamine or serum starvation	43
3.2 Nur77's response mechanism in glucose starvation condition	46
3.2.1 Nur77 enhances reducing power.....	46
3.2.2 Nur77 eliminates ROS	48
3.3 Regulation of Nur77 in glucose starvation.....	51
3.3.1 Glucose starvation did not influence Nur77 transcriptional activity	51
3.3.2 Glucose starvation induced Nur77 phosphorylation.....	52
3.3.2.1 RAS-MEK-ERK pathway activated in glucose starvation condition	53
3.3.2.2 ERK2 as an upstream kinase for Nur77 in glucose starvation condition	55
3.3.2.3 Ser237 of Nur77 is the ERK2 phosphorylation sites	58
3.3.3 Glucose starvation induce Nur77 mitochondria localization.....	60

3.3.3.1 Glucose strvation targeting Nur77 to mitochondria.....	60
3.3.3.2 ERK2 phosphorylation initiates Nur77 mitochondrial targeting	62
3.4 Phosphorylated Nur77 transferred to mitochondrial and then protected cell from glucose starvation-inducd cell death.....	65
3.5 The biological function of Nur77 in glucose starvation condition.....	66
Chapter 4 Discussion and Prospects	69
References	71
Ackowkdedgement.....	81

厦门大学博硕士学位论文摘要

摘要

孤儿核受体 Nur77 是立早基因 NR4A1 编码的产物，是一个转录因子。它可以通过依赖转录活性或不依赖转率活性的方式参与调控细胞的许多生命活动过程。

本文首次阐明，在无糖培养的情况下，Nur77 通过磷酸化修饰靶向线粒体，进而帮助黑色素瘤细胞应对代谢压力。在无葡萄糖的情况下，黑色素瘤细胞中的 ERK2 被激活，发挥其激酶的磷酸化作用，通过磷酸化 Nur77，促进 Nur77 转运并定位到线粒体内部。线粒体是细胞能量代谢的重要场所。Nur77 的线粒体定位会影响黑色素瘤细胞的能量代谢，从而应对葡萄糖饥饿产生的能量压力。因此，Nur77 可以一定程度地维持黑色素瘤细胞在应激状态下的还原力水平，即 NADPH 和 GSH 水平，随之抑制 ROS，以帮助黑色素瘤细胞抵抗无糖刺激产生的活性氧，促进细胞存活。我们通过循环肿瘤细胞模型，进一步在体内验证了 Nur77 有助于循环肿瘤细胞在外周血的存活，进而促进肿瘤细胞转移的结论。

总之，该研究证明了 Nur77 在黑色素瘤细胞应对代谢压力过程中起了正调控作用。

关键词：核孤儿受体 Nur77；ERK；无糖刺激；磷酸化；线粒体定位

Abstract

Orphan nuclear receptor Nur77 is translated by an immediate-early gene encoded by NR4A1. At the same time, it's a transcription factor. Nur77 participates in various fundamental cellular processes such as growth, proliferation, differentiation, migration and apoptosis through several mechanisms, including: (i) via a transcriptional dependent pathway; (ii) interaction with various proteins; (iii) subcellular localization and others.

In our study, we newly discover a novel function of Nur77 in melanoma cells. In the absence of glucose, ERK2 is activated and phosphorylate Nur77. Phosphorylated Nur77 transferred to mitochondria. And then, Nur77 help to maintain NADPH and GSH levels and eliminate ROS to protect cells from glucose deprivation-induced cell death. We further demonstrated *in vivo* that Nur77 contributes to the survival of circulating tumor cells in peripheral blood and further promotes tumor cell metastasis.

In conclusion, this study demonstrates that Nur77 plays a positive role in melanoma cells when they are responded to metabolic stress.

Key words: Orphan receptor Nur77; ERK; glucose starvation/deprivation; phosphorylation; mitochondrial location

第一章 前言

1 孤儿核受体 Nur77

1.1 Nur77 概述

核受体是一类配体依赖性转录因子超家族，可以与相应的配体以及众多调节因子相互作用进而调控机体的生理过程，包括生长、发育、衰老、死亡等很多生命活动^[1, 2]。Nur77 是核受体家族中孤儿核受体一类，虽然具备核受体典型的结构特征，但迄今为止，还没有发现其体内特异性配体。Nur77 可以以细胞或组织特异性的方式被不同的外界信号诱导表达，并在细胞增殖、凋亡、能量代谢等过程中发挥重要的调控作用^[3, 4]。

1.2 Nur77 的结构

Nur77 具有类固醇/甲状腺受体超家族的典型结构，通常划分为五个部分：A/B, C, D, E 和 F 区，如图 1.1 所示^[5, 6]。A/B 区是氨基末端转录激活区（amino-terminal transactivation domain, TAD），位于 N 端。当 Nur77 缺失 A/B 区部分氨基酸时，转录活性显著降低，甚至失去转录激活能力^[6, 7]，切除 Nur77 的 N 端转录激活区可以得到显性负作用的 Nur77 突变体^[8]。同时这一区域含有较多的潜在磷酸化位点，丝氨酸、苏氨酸所占比例达到 30%。很多激酶可以直接调控 Nur77 的这一区域，包括：ERK1/2（extracellular signal-regulated kinases 1/2）^[9]、JNK（c-Jun NH2-terminal Kinase）^[10]、Akt（protein kinase B, PKB）^[11]、Chk2（checkpoint kinase 2）^[12]、DNA-PK（DNA-dependent protein kinase）^[13]和 p38 MAPK（mitogen-activated protein kinase）^[14]等。此外，TAD 区与 Nur77 的线粒体定位关系密切。有报道指出 N 端部分氨基酸缺失后，Nur77 不能被转运到线粒体^[3]。C 区是 DNA 结合结构域（DNA binding domain, DBD），序列上有很高的保守性，含有两个锌指结构域，帮助 Nur77 与 DNA 的结合。D 区是可变的铰链区，可以一定程度

上旋转，使 Nur77 呈现不同的构象。位于 C 端的 E/F 区是配体结合域（ligand binding domain, LBD），该区域也具有转录激活活性^[6,7]。2003 年，Wang 等发现 Nur77 位于 LBD 区的配体结合口袋位置被一些疏水氨基酸占用，因而不具备核受体常见的配体结合口袋，这就从结构方面解释了 Nur77 是孤儿受体的原因。

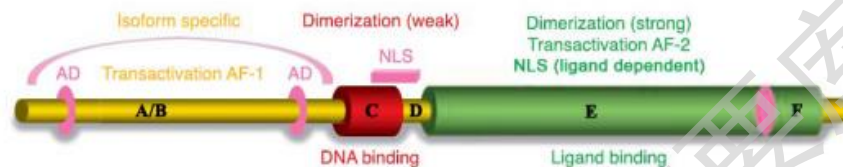


图 1.1 Nur77 的结构与功能区域，引自^[15]

Figure 1.1 Schematic representation of Nur77

1.3 Nur77 的调控方式

1.3.1 通过基因转录方式调控

作为转录因子，Nur77 最基本的功能就是通过靶向 DNA 应答元件，调控下游基因的转录与表达。Nur77 能够以单体、同源或异源二聚体的形式与应答元件结合，发挥转录激活活性。图 1.2 详细表述 Nur77 与 DNA 序列的结合形式。

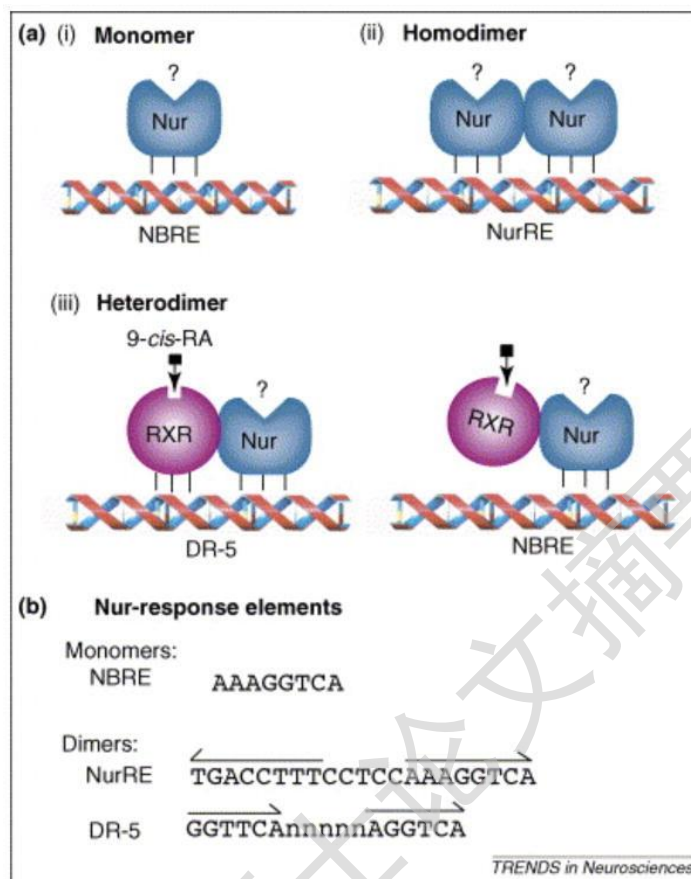


图 1.2 Nur77 及其应答元件，引自^[16]

Figure 1.2 Nur77 and its response elements

Nur77 在转录方面的调控主要通过三方面完成的。

1、Nur77 的表达水平。在机体水平上，Nur77 在大部分组织器官中都有表达，且在各组织器官中的表达有差异^[17]。同时还发现 Nur77 在肿瘤组织或细胞中表达很高。在前列腺组织中，癌组织的表达强度远高于癌旁组织或良性肿瘤组织^[18]。同时在肺癌、结肠癌、胃癌中 Nur77 也是高表达^[19-22]。其次是外界刺激影响 Nur77 表达水平。Nur77 最初被发现就是在生长因子刺激下诱导表达的^[23]。有研究报道，在血管平滑肌细胞中 Nur77 的 mRNA 水平可以通过血清诱导快速提高^[24]。肺癌细胞中，血清和表皮生长因子都能显著提高 Nur77 的蛋白水平^[25]。

2、Nur77 与应答元件的结合能力。虽然 Nur77 作为孤儿受体，在没有体内配体情况下也能够影响其转录激活活性，但体外因子可以显著影响其与 DNA 应答元件的结合能力。在小鼠垂体瘤细胞中，促肾上腺皮质激素释放激素提高 Nur77 与应答元件 NurRE 的结合，激活下游基因的转录^[7]。

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