

学校编码：10384

分类号__密级__

学号：30520100153943

UDC__

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

Rab29 的定位和功能研究

The Localization and Function of Rab29

王世聪

指导教师姓名：洪万进 教授

王团老 教授

专 业 名 称：化学生物学

论文提交日期：2013 年 7 月

论文答辩时间：2013 年 9 月

学位授予日期：2013 年 月

答辩委员会主席：_____

评 阅 人：_____

2013 年 9 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

摘 要	1
ABSTRACT	2
缩略词及中英文对照表	3
第一章 前言	6
1.1 Rab 蛋白背景及研究现状	6
1.1.1 小 GTPase	6
1.1.2 Rab 蛋白家族背景	7
1.1.3 Rab 蛋白的功能	13
1.2 Rab 蛋白与内吞途径	17
1.3 甘露糖 6 磷酸受体与组织蛋白酶 D 简介	20
1.4 Rab29 蛋白研究进展	23
1.4.1 Rab29 可以被 GtgE 剪切	24
1.4.2 Rab29 通过与 LRRK2 相互作用影响神经细胞内的蛋白分选以及帕金森疾病	24
1.5 立题依据	24
1.6 研究目的和研究思路	24
第二章 材料与方法	26
2.1 材料	26
2.2 实验方法	33
第三章 实验结果	45
3.1 hRab29 组织表达谱分析	45
3.2 hRab29 相关载体的构建	47
3.2.1 pEGFP-C1-Rab29 WT 质粒的构建	47

3.2.2	pEGFP-C1-Rab29 T21N 和 Q67L 质粒的构建	48
3.2.3	pEGFP-C1-Rab29 真核表达载体的表达鉴定	49
3.2.4	pDMyc-Rab29WT、T21N、Q67L 质粒的构建	51
3.2.5	pDMyc-Rab29 真核表达载体的表达鉴定	51
3.2.6	Rab29 原核表达载体构建和鉴定	52
3.2.7	Rab29 ShRNA 载体的构建	52
3.3	Rab29 的亚细胞定位	54
3.3.1	内源性 Rab29 在细胞内的定位情况检测	54
3.3.2	Rab29 是一个高尔基体相关蛋白	55
3.3.3	Rab29 与 PKD 的关系	59
3.3.4	Rab29 与 Rab32 以及 Rab38 共定位明显	61
3.3.5	Rab29 与 M6PR 以及 sortilin 共定位明显	62
3.4	Rab29 的功能	63
3.4.1	Rab29 对维持高尔基体的完整性起重要作用	63
3.4.2	Rab29 异常表达对 ER 到 PM 的正向蛋白转运途径影响不显著	66
3.4.3	Rab29 异常表达对内吞途径影响显著	71
3.4.4	Rab29 影响 Myc-CTSD 的分泌	80
3.4.5	免疫印迹检测 Rab29 对内源的 CTSH 的量没有影响	81
第四章	讨论	83
4.1	Rab29 是一个高尔基体相关蛋白并在各组织中广泛表达	83
4.2	Rab29 的对于维持高尔基体的完整性起到重要作用	84
4.3	Rab29 不影响 VSVG 的正向转运途径	85
4.4	Rab29 影响 M6PR 内吞	85
第五章	结论	86
	参考文献	87
	附录	97
	致谢	98

Table of Contents

Abstract in Chinese	1
Abstract in English	2
Abbreviation in English	3
Chapter 1 Preface	6
1.1 The background and the research of Rab protein	6
1.1.1 The small GTPase	6
1.1.2 The background of Rab family	7
1.1.3 The function of Rab proteins	13
1.2 Rab protein and endocytosis	17
1.3 The introduction of M6PR and CTSD	20
1.4 The research of Rab29	23
1.4.1 Proteolytic targeting of Rab29 by an effector protein GtgE	24
1.4.2 RAB7L1 Interacts with LRRK2 to Modify Intraneuronal Protein Sorting	24
1.5 The significance of the study	24
1.6 The objectives of research	24
Chapter 2 Materials and methods	26
2.1 Materials	26
2.2 Methods	33
Chapter 3 Results	45
3.1 The expression profile of Rab29	45
3.2 The construction of Rab29	47
3.2.1 The construction of pEGFP-C1-Rab29 WT	47
3.2.2 The construction of pEGFP-C1-Rab29 TN and QL	48

3.2.3	The expression of pEGFP-C1-Rab29	49
3.2.4	The construction of pDMyc-Rab29	51
3.2.5	The expression of pDMyc-Rab	52
3.2.6	The construction of pGEX-4T-1-Rab29	53
3.2.7	The construction of Rab29shRNA	53
3.3	Detect the colocalization of Rab29	55
3.3.1	The endogenous colocalizes with GS15	55
3.3.2	Rab29 associates with the trans-Golgi network (TGN)	56
3.3.3	Rab29 is colocalizes with PKD	60
3.3.4	Rab29 is colocalizes with Rab32/Rab	62
3.3.5	Rab29 is partly colocalizes with M6PR/Sortilin	63
3.4	The function of Rab29	64
3.4.1	Rab29 is essential to keep the integrity of the trans-Golgi network ..	64
3.4.2	Inhibition of the activity of Rab29 has no effects on VSVG Trafficking	67
3.4.3	Rab29 mediates the retrograde trafficking of mannose-6-phosphate receptor	71
3.4.4	Rab29 affects the secretion of CTSD-Myc	80
3.4.5	Rab29 has no effects on the secretion of endogenous CTSH	81
Chapter 4	Discussion	83
4.1	Rab29 associates with the trans-Golgi network (TGN)	83
4.2	Rab29 is essential to keep the integrity of the trans-Golgi network	84
4.3	Inhibition of the activity of Rab29 has no effects on VSVG trafficking	85
4.4	Rab29 mediates the retrograde trafficking of mannose-6-phosphate receptor	85
Chapter 5	Conclusion	86
Reference	87
Appendix	96

Acknowledgement97

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

Rab/Ypt/Sec4 家族是 RasGTP 酶超家族中最大的一个亚家族。Rab 蛋白是调控分泌和内吞途径的关键调控因子，通过结合 GTP 或 GDP 的转换发挥分子开关的作用，目前已知的大约有 66 种人的 Rab 蛋白以及酵母中的 11 种 Rab 相关的 Ypt 蛋白。并且 Rab 蛋白的功能异常与很多疾病的发生相关。Rab29 是一种新近发现的 Rab 蛋白，目前哺乳动物小分子 GTPase Rab29 的性质和功能还未被详细研究。本文拟探讨 Rab29 在细胞中的定位及其细胞生物学功能。

研究表明，Rab29 在人类组织中广泛表达。细胞免疫荧光实验结果显示过表达的 Rab29 主要分布在高尔基体，并与晚期内体标志性蛋白 M6PR 有部分共定位。并且过表达 Rab29T21N 影响高尔基体反面网状结构标记蛋白 TGN46 的分布，破坏其结构使其片段化且分散。进一步研究发现过表达 Rab29T21N 或者 knockdown Rab29 同样可以影响 M6PR 的分布。我们通过检测 CD8 标记的 ciM6PR/cdM6PR 的内吞实验，发现 Rab29 阻碍 M6PR 的内吞，结果表明其在逆向蛋白转运途径发挥调控作用。而 GFP-VSVG 的实验结果说明，Rab29 不影响内质网到高尔基体的正向蛋白转运途径。

我们的研究结果揭示了 Rab29 是一种与高尔基体有关的新型 Rab 蛋白，Rab29 在维持高尔基体的完整性和调节 M6PR 逆向蛋白转运的过程中起到了重要的调控作用。我们的工作为更深入的研究其生物学功能和分子机制奠定了基础，也为进一步研究 Rab29 的功能提供了理论依据。

关键词：Rab29; M6PR; TGN46

Abstract

Rab/Ypt/Sec4 proteins comprise the largest branch of the RAS superfamily. We now know that there are about 66 human Rab proteins and 11 yeast Rab-related Ypt proteins which function as molecule switch through the transformation between GTP-Rab and GDP-Rab and play essential roles in regulating the secretory and endocytic pathways. Besides their dysfunction is related to many diseases. Rab29 is a novel Rab protein, which function has not been expounded. This study prefers to explore the localization and biology function of Rab29 in cells.

Our results show that Rab29 express widely in human tissues and immunofluorescence data shows Rab29 mainly co-localizes with golgi marker TGN46 and partly co-localizes with late endosome protein M6PR. Further study shows express myc tagged Rab29T21N or shRNA-Rab29 leads to the dispersing of TGN46. Further examinations demonstrated that the expression of the dominant negative form Rab29T21N or shRNA-Rab29 also alters the distribution of mannose-6-phosphate receptor (M6PR), and interrupts the retrograde trafficking of M6PR through monitoring the endocytosis of CD8-tagged calcium dependent M6PR (cdM6PR) or calcium independent M6PR (ciM6PR), but without significant effects on the anterograde trafficking of GFP tagged vesicular stomatitis virus G protein (VSVG).

In a word, our results indicate that Rab29 locates on golgi apparatus. Dysfunction of Rab29 affects TGN46 and M6PR's distribution in Hela cell. And Rab29 is essential to keep the integrity of the trans-Golgi network and mediates the retrograde trafficking. Our work lays a good foundation for studying the biological function of Rab29.

Keywords: Rab29; M6PR; TGN46

缩略词及中英文对照表

英文缩写	英文全名	中文名称
ATP	adenosine 5-triphosphate	三磷酸腺苷
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
cDNA	complementary DNA	互补 DNA
CDS	coding sequence	编码区序列
CD-M6PR	cation-dependent mannose-6-phosphate receptor	阳离子依赖型的甘露糖-6-磷酸受体
CI-M6PR	cation-independent mannose-6-phosphate receptor	阳离子非依赖的甘露糖-6-磷酸受体
c-myc	myelocytomatosis oncogene	髓细胞组织增生癌基因
CTSH	cathepsin H	组织蛋白酶 H
CTSD	cathepsin D	组织蛋白酶 D
DMEM	Dulbecco's modified of Eagle's medium	DMEM 培养基
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亚砜
DTT	DL-Dithiothreitol	二硫苏糖醇
EB	ethidium bromide	溴化乙锭
ECL	enhanced chemiluminescence	增强型化学发光试剂
E.coli	Escherichia coli	大肠杆菌
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	乙二胺四乙酸
EEA1	Marker of early endosome and recycling endosome	早期内体和循环内体标记物
ER	endoplasmic reticulum	内质网
FITC	fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
GAP	GTPase-activating protein	GTPase 激活蛋白
GAPDH	lyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase	3-磷酸甘油醛脱氢酶

GDI	GDP dissociation inhibitor	GDP 解离抑制因子
GEF	guanine nucleotide exchange factor	鸟嘌呤核苷酸交换因子
GFP	green fluorescent protein	绿色荧光蛋白
GM130	a 130 kDa cis- Golgi matrix protein	高尔基体顺面标记蛋白
GST	glutathion S-transferase	谷胱甘肽 S 转移酶
GS15	Golgi SNARE with a size of 15 kilodaltons	高尔基体中间膜囊标记物
HOPs	homotypic vacuole fusion and vacuole protein sorting	HOPs 复合体
HRP	horse radish peroxidase	辣根过氧化物酶
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside	异丙基硫代半乳糖苷
Lamp1/Lamp3	Lysosome associated membrane protein 1 and 3	晚期内体和溶酶体标记物
LBPA	Lysobiphosphatic acid	晚期内体标记物
LRRK2	Leucine-rich repeat kinase 2	富含亮氨酸重复激酶 2
M6PR	mannose-6-phosphate receptor	甘露糖-6-磷酸受体
ManII	Mannosidase II	高尔基体中间膜囊标记物
NCBI	National Center for Biotechnology Information	美国国家生物技术信息中心
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
PFA	Polyoxymethylene	多聚甲醛
PI	phosp hatidylinositol	磷脂酰肌醇
PKD	protein kinase D	蛋白激酶 D
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
REP	Rab Escort Protein	Rab 护送蛋白
RER	rough endoplasmic reticulum	糙面内质网

RILP	Rab7-interacting lysosomal protein	与 rab7 相作用的溶酶体蛋白
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基磺酸钠
siRNA	small interference RNA	小干扰 RNA
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors	可溶性 NSF 附着蛋白受体 (SNAP 受体)
SOE-PCR	gene splicing by overlap extension	重叠延伸基因扩增技术
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	N,N,N',N'-四甲基二乙胺
TGN	trans-Golgi network	反面高尔基体管网状结构
TGN38/TGN46	Trans golgi network intergral membrane protein38/46,marker of TGN	反面高尔基体膜囊标记蛋白
Tip47	tail-interacting protein of 47KDa	47KDa 的尾连蛋白
T-SNARE	target-SNARE	位于靶膜上的 SNAP 受体
V-SNARE	vesicle-SNARE	位于囊泡膜上的 SNAP 受体
TAE	Tris/EDTA buffer	Tris/EDTA 缓冲液
WT	wild-type	野生型

第一章 前言

细胞必须依赖精密而有效的机制,确保在糙面内质网合成的各种蛋白,加工后在高尔基体的 TGN 区通过形成不同的转运膜泡以不同的途径被分选、运输,各就各位,在特定的时间和位点发挥其特定功能。真核细胞进化出内膜系统,胞内高度区室化,形成各种细胞器,这些细胞器在结构功能乃至发生上是彼此关联的动态整体,从而大大提高了细胞内各项生命活动的效率。细胞的生长、发育、分裂、生物合成、分泌等各种生命活动都伴随着蛋白质在各细胞器之间的运输。细胞器之间各项物质的有序运输和信息传递是保证细胞生命活动的基础。合成的蛋白质正确抵达其作用的位置才能发挥正常功能,细胞才能正常完成其生理过程。膜泡运输是蛋白质分选的一种特有方式[1],膜泡运输包括囊泡的形成、转运、粘附、锚定、融合等过程,由许多因子的相互作用形成一个网络进行复杂精准的调控,而 Rab 蛋白在调控膜泡运输中起到分子开关的作用[1]。

1.1 Rab 蛋白背景及研究现状

1.1.1 小 GTPase

小 GTPase (small GTPase family)是普遍以单体形式存在于真核细胞中的一类与 GTP 结合的蛋白家族,与异源三聚体 G 蛋白中的 α 亚基具有高度同源性,但是可以独立地行使功能,不需要三个亚基协同发挥作用。小 GTPase 调控着细胞内许多生理功能,包括细胞生长、分化、运动以及膜泡运输等[2-4]。

最先发现的小 GTPase 是在大鼠肉瘤病毒 Ras(Rat sarcoma, Ras),因为其最早被发现而广为人知,因此人们习惯把 Ras 超家族当做小分子 GTPase 的代名词。Ras 超家族成员已发现的超过 150 个,都是由一条多肽链组成,分子量大约在 20~30KD 之间,根据结构、序列和功能的不同,Ras 超家族可以分为 5 个主要的亚家族(如图 1-1): Ras、Rho、Rab、Arf 和 Ran,此外 Rap、Rheb、Rad、Rit 和 Miro 的归类尚存争议[5]。每个亚家族具有共同的 G 结构域,提供基本的 GTPase 和核酸交换活性,它们都遵循着相同的调控机制模式,基本上都作为分子开关来调控细胞的生理活动。但是各家族翻译后修饰各不相同,具有独特的调

节因子和效应因子，因此家族成员的功能也不尽相同。Ras 超家族蛋白通过 GTP 结合形式和 GDP 结合形式的转换而作为分子开关，控制信号转导、细胞生长、转化、运输、运动和黏附等事件。每个家族的功能又有更明确而交叉的分工：其中 Ras 亚家族主要负责调节细胞分化增值过程，Rho 家族调控细胞骨架重组、细胞壁合成、细胞周期进程以及 MAP 激酶信号途径的转导[6-10]。Rab 家族和 Sar/Arf 家族调控细胞内膜泡运输，Ran 家族调控核质运输、微管形成、有丝分裂的纺锤体形成及细胞分裂后核膜的组装[11]。

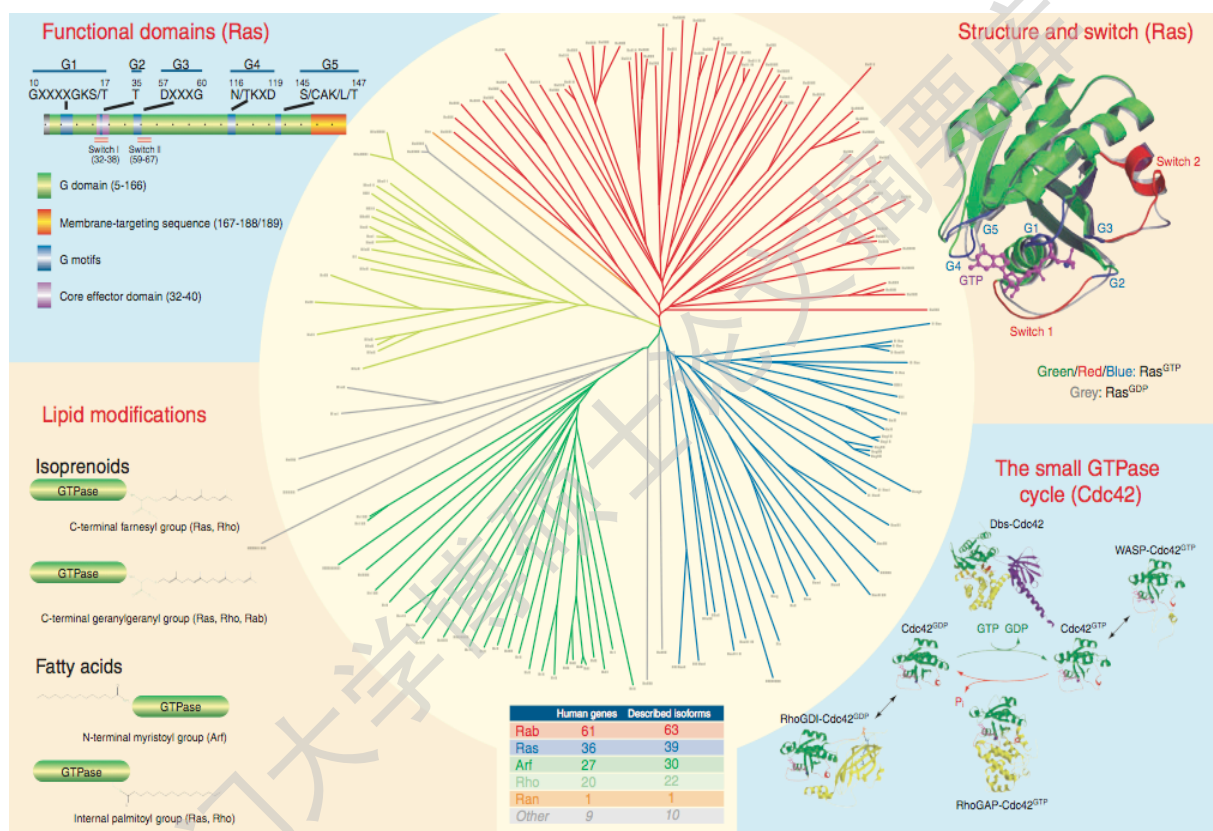


图 1-1 Ras超家族概况[12]

Figure1-1 The Ras superfamily at a glance

(注：摘自Wennerberg, K等, 2005) [12]

1.1.2 Rab 蛋白家族背景

Rab 是 Ras 超家族中最大的亚家族。目前已知的 Rab 蛋白和 Rab 相似蛋白已超 70 种[13]。关于 Rab 蛋白的研究最早是由 Novick 等在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中进行的，从酵母中分离出许多细胞分泌必需的基因，命名为 SEC 系列 (如 SEC1 等)；后来 Gallwitz 等在肌球蛋白基因和微管蛋

白基因之间发现 YPT1 基因,后来酵母中的 Rab 蛋白称为 Ypt 蛋白 (Yeast protein transport)[14,15]。1987 年 Touchot 等报道从大鼠 (*Rattus norvegicus*) 大脑 cDNA 文库中克隆出与 SEC4/YPT1 基因功能类似的同源物,命名为 Rab (ras-like in rat brain) [16]。

Rab 蛋白分布遍及细胞内各类细胞器及运输囊泡,不同的 Rab 蛋白调节囊泡特定的运输途径。Rab 蛋白作为是膜泡运输的分子开关,通过与上游调控因子和下游效应因子相互作用,精细调控囊泡的形成、转运、粘附、锚定、融合等过程 [13]。

除此之外, Rab 蛋白还参与细胞许多生命活动,包括胞内信号转导[18]、细胞迁移、胞质分裂、纤毛形成、细胞凋亡以及自噬等[19-22]。Rab 蛋白功能的异常,会导致一系列疾病,如癌症、神经退行性疾病、病原体感染有关疾病等等。

1.1.2.1 Rab 蛋白的进化

对不同物种 Rab 蛋白基因序列分析表明, Rab 蛋白在真核生物的进化过程中高度保守,但在不同物种表现出数量的多样性和功能上的分化。

酵母中的 Rab 蛋白称为 Ypt 蛋白 (Yeast protein transport)。在已报道的基因组序列中,裂殖酵母 (*S. pombe*) Rab 蛋白基因最少,仅编码 7 个 Rab 蛋白,酿酒酵母编码 11 个 Rab 蛋白,线虫和果蝇各编码 29 种 Rab 蛋白,但是线虫仅有 1000 个左右的细胞,而果蝇有 30 亿个细胞,因此 Rab 蛋白的数量并不与细胞数量成正比 [8]。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 基因组编码 57 种 Rab 蛋白 [8]。人体一经发现大约有 70 多种 Rab 蛋白,形成 41 个亚家族,大多数 Rab 是在各种组织广谱表达,也有一些 Rab 蛋白是在特定组织表达,完成特定的功能 [5,8,12,13]。

Rab 在进化中高度保守。一些证据显示在酵母和哺乳动物中 Rab 蛋白功能可以相互替代。如 Rab1a 可以在功能上补救酿酒酵母中 Ypt1p 的缺失,这两个蛋白调节 ER 到高尔基体的运输; Rab8 可以补救裂殖酵母的 Ypt2p 的突变 [23,24]; Rab5 的同源物 Ypt51p 在哺乳动物细胞不仅定位至早期内体,而且能够促进内吞 [25]。研究发现, Rab 蛋白特定的分子开关及周围区域 (RabF)、决定与其效应子连接的特定区域 (RabsF) 及 Rab 蛋白与调控子和效应子之间的识别机制都是保守的。而且在 Rab 蛋白功能系统发育树中,共分离的 Rab 蛋白表现出相似的功能或定位。Rab 家族成员中氨基酸序列的相似性可达 35%-80%,甚至大于 80%。相似性高于 75%

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