

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 200326111

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

Myopodin 蛋白在细胞和组织中表达和分布 的研究

Expression and Localization of Myopodin Protein in Cells and Tissues

邱 凯

指导教师姓名: 陶 涛 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2006 年 6 月 28 日

论文答辩日期: 2006 年 7 月 24 日

学位授予日期: 2006 年 月 日

答辩委员会主席: 姚江武 教授

评 阅 人: 王小宁、骆清铭 教授

2006 年 7 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，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的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

中文摘要	1
英文摘要	2
第一章 前言	4
1. Myopodin 蛋白的结构	4
2. Myopodin 蛋白的生物学功能	5
2.1 Myopodin 蛋白的分布	5
2.2 参与细胞的结构	6
2.3 出入核机制的研究	7
3. Myopodin 蛋白在肿瘤研究中的意义	10
3.1 Myopodin 蛋白与前列腺癌	10
3.1 Myopodin 蛋白与膀胱癌	11
4. 本课题研究的目的是和意义	12
第二章 试验材料和方法	14
一、试验材料	14
1. 主要材料和试剂	14
2. 仪器设备	14
3. 溶液配方	15
二、试验方法	18
(一)组织 RNA 提取	18
(二)pGEX4T2-N-Myopodin 重组质粒的构建	18
(三)大肠杆菌转化	19
(四)提取质粒	19
(五)IPTG 诱导目的蛋白的表达	19
(六)目的蛋白的大量表达	20
(七)GST-N-Myopodin 蛋白的纯化	20
(八)蛋白浓度的测定	21

(九) 抗体的制备.....	21
(十) 抗血清中 Anti-GST 的去除.....	22
(十一) Western 印迹法.....	22
(十二) 细胞培养.....	23
(十三) 细胞染色.....	25
(十四) 转染.....	26
(十五) 盖玻片的处理.....	26
(十六) 裂解细胞.....	27
(十七) 组织总蛋白的提取.....	27
(十八) 免疫组化.....	28
(十九) 统计与分析方法.....	29
第三章 试验结果	31
1. RT-PCR 获得人类全长的 Myopodin 基因的 ORF.....	31
2. 构建获得重组质粒 pGEX4T2-N-Myopodin.....	31
3. 表达和纯化 N-Myopodin 蛋白.....	34
4. 抗血清中 GST 抗体的被去除.....	35
5. 去除 GST 抗体后的抗血清有较好的特异性.....	36
6. Myopodin 蛋白在细胞中分布与细胞的类型有关.....	37
7. Myopodin 蛋白在肠、食道和胃组织的癌细胞和正常细胞中都分布在 细胞质中.....	40
8. Myopodin 蛋白在癌变肝组织中比在非癌肝组织中表达量减少.....	41
第四章 讨论	44
第五章 结论	46
致谢	47
参考文献	49

Catalogue

Abstract.....	1
Chapter 1 Foreword.....	4
1. Structure of Myopodin protein.....	4
2. Biological function of Myopodin protein.....	5
2.1 Distribution.....	5
2.2 Participating in cell structure.....	6
2.3 Mechanism of shuttling between nucleus and cytoplasm	7
3. Significance in studying tumour.....	10
3.1 Myopodin protein and bladder cancer.....	10
3.2 Myopodin and prostate cancer.....	11
4. Purpose and Significance.....	12
Chapter 2 Materials and methods.....	14
一、Material.....	14
2. Material and reagent.....	14
2. Apparatus.....	14
3. Buffer.....	15
二、Methods.....	18
(一) Total RNA isolation.....	18
(二) Plasmid construction.....	19
(三) Transformation.....	19
(四) Plasmid extraction.....	19
(五) GST-N-Myopodin protein Expression.....	19
(六) GST-N-Myopodin protein max Expression.....	20
(七) Purification of GST-N-Myopodin protein.....	20
(八) Mensuration concentration.....	21
(九) Preparation of anti-N-Myopodin monoclonal antibody.....	21

(十) Remove anti-GST antibody from antiserum.....	22
(十一) Western blotting.....	22
(十二) Cell culture.....	23
(十三) Immunofluorescence.....	25
(十四) Transfection.....	26
(十五) Coverslip disposal.....	26
(十六) Cell lysate.....	27
(十七) Total protein isolation.....	27
(十八) Immunohistochemistry.....	28
(十九) Statistic and analysis.....	29
Chapter 3 Results.....	31
1. Obtain ORF of Myopodin.....	31
2. Plasmid construction.....	31
3. Expression and purification of N-Myopodin protein.....	34
4. Purification of anti-N-Myopodin antibody	35
5. Good specificity of anti-N-Myopodin antibody.....	36
6. Myopodin distribution is associated with the style of cell.....	37
7. Myopodin is expressed in the cytoplasm of both normal and cancerous gullet, stomach and tharm cells.....	40
8. Myopodin expression significantly decreased in cancerous Liver tissues comparing to the normal ones.....	41
Chapter 4 Discussion.....	44
Chapter 5 Conclusion.....	46
Acknowledgements.....	47
References.....	49

摘要

Myopodin 是最新发现的 synaptopodin 蛋白家族的第二个成员。除了 synaptopodin 蛋白外，它和已知的蛋白没有明显的同源关系。Myopodin 在氨基酸序列的 N 端及 C 端分别具有一个经典的入核信号 (NLS)，同时在氨基酸序列的 410-563 位之间还有一个肌动蛋白 (actin) 结合位点，可以直接与肌动蛋白相互作用，因此它是一种结构蛋白。Myopodin 也是一种细胞核质蛋白，其在细胞核质中的分布受分化和应激的调控。

为了进一步研究 Myopodin 蛋白的功能，我们首先制备其抗体。构建了融合表达载体 pGEX4T2-N-Myopodin。将构建好的表达载体转化大肠杆菌并诱导表达，把表达的 N-Myopodin 蛋白纯化后做抗原，免疫兔子后，得到多克隆抗体。以得到的抗体通过免疫荧光染色，发现 Myopodin 在癌细胞 HeLa 和 T24 主要分布在细胞质中，MG63 在细胞质和细胞核中都有，而在正常的细胞 NIH3T3 和 293T，Myopodin 主要分布在细胞核中；通过免疫组化，发现，在消化系统的食道、胃和肠的正常组织和癌变组织中，Myopodin 蛋白表达的量几乎没有变化，而且在正常组织和癌变组织中，Myopodin 蛋白主要都是分布在细胞质中，细胞核中几乎没有，可能 myopodin 在癌细胞中分布有特异性，这是我们首次观察到的 myopodin 在不同细胞系中的表达分布，并且 myopodin 在细胞核质中的分布与癌症的发生和发展有相关性。通过免疫印迹和免疫组化，发现，已经发生癌变的肝组织中的 Myopodin 比癌旁肝脏组织中的 Myopodin 明显减少，这也是我们首次发现的 Myopodin 蛋白与肝癌的相关性。这些都为一些癌症特别是肝癌的诊断和治疗提供了一种潜在的手段，也为它们的治疗和相关药物的开发提供了积极的线索。

关键词：Myopodin ； 多克隆抗体； 肝癌

Abstract

Myopodin is the second member of the synaptopodin protein family. It shows no significant homology to any known protein except synaptopodin. myopodin contains two classic nuclear localization signals (NLSs), at its N-terminus and C-terminus respectively. There is an actin-binding site at the position of aa 410–563 that can interact with actin directly. Myopodin is a dual compartment protein which redistributes in both the nucleus and the cytoplasm in a differentiation-dependent and stress-induced fashion.

To study the function of Myopodin protein, we develop a anti-Myopodin antibody. A recombinant protein containing 1077bp N-terminal sequence of N-Myopodin fused to a GST tag was expressed in *E. coli*. By immunizing rabbits with the purified recombinant protein, a rabbit anti-N-Myopodin antibody was obtained.

Western blots analysis indicated the specificity for this antibody. the distribution of myopodin was analyzed by immunofluorescence microscopy in HeLa, T24, MG63, NIH3T3 and 293T cells using polyclonal anti-N-Myopodin antibody. Myopodin was found in both the nucleus and cytoplasm of MG63 cells, while only appear in the cytoplasm of T24 and HeLa cells, and strictly distribute in the nucleus of NIH3T3 and 293T cells. By immunohistochemistry, Myopodin was found widely expressed in tissues including gullet, stomach and tharm, where its distribution was found in the cytoplasm of both normal and cancerous cells. It was the first time that the distribution and expression of Myopodin was observed across different cell lines. By immunohistochemistry and Western blot, we found Myopodin is expressed in the cytoplasm of both normal and cancerous liver cells. However, its expression significantly decreased in cancerous Liver

tissues comparing to the normal ones. It was the first time that the relationship between liver cancer progression and Myopodin cell distribution was discovered. This observation can be used as a potential standard of diagnosing some tumors, especially liver cancer. Furthermore, It also provides a positive clue of treating those tumors and developing relative medicine.

Key Words: Myopodin; polyclonal antibody; liver cancer

厦门大学博硕士论文摘要库

Myopodin 蛋白在细胞和组织中表达和分布的研究

第一章 前言

Myopodin 蛋白是突足蛋白(synaptopodin)家族的第二个成员。突足蛋白是一个富含脯氨酸与肌动蛋白微丝偶联的蛋白,在机体内只表达于肾小球的足细胞和后脑的突触内^[1,2],它在足突活动中发挥重要作用。通过序列对比发现,Myopodin 蛋白与突足蛋白约有 47.7%的相似性,特别在 C 端,同源性更高^[3];它们功能也有一些相似性,都可以与肌动蛋白直接结合。并且研究发现 Myopodin 蛋白不仅具有肌动蛋白结合蛋白的功能,它可能还具有信号调控作用,能促进肌动蛋白束的形成;它在细胞中的核质分布情况受到细胞分化情况及应激的影响^[4];同时它的表达与核质分布情况影响到膀胱癌及前列腺癌的分化程度^[5,6]。

1 Myopodin 蛋白的结构

与突足蛋白相似,Myopodin蛋白可以直接与肌动蛋相互作用,它有一个肌动蛋白结合位点,位于氨基酸序列的410-563位之间;而且Myopodin蛋白也富含脯氨酸(~13%),不能形成球形蛋白,而是以线性分子的形式存在。通过序列分析发现,Myopodin蛋白在氨基酸序列的N端及C端分别具有一个经典的入核信号(nuclear localization signal, NLS),分别是 NLS1: 58KKRR61, NLS2: 616KKGK619^[7]。如果缺失NLS1或NLS2或是同时缺失NLS1和NLS2,Myopodin蛋白的入核转运都会受到影响。除入核信号外,Myopodin蛋白上还有两个磷酸化位点,分别是S225, T272,这两个位点的磷酸化直接影响到Myopodin蛋白与另一个蛋白质14-3-3(一个在所有真核细胞中都有表达且保守性强的调节蛋白^[8])的结合,从而影响到它的入核转运。同时,在Myopodin蛋白中还发现有一个能与许多含有WW域^[9]、在信号传导中有重要作用的蛋白质相互作用的PPXY域^[10]。

Myopodin蛋白结果如图 1 所示。

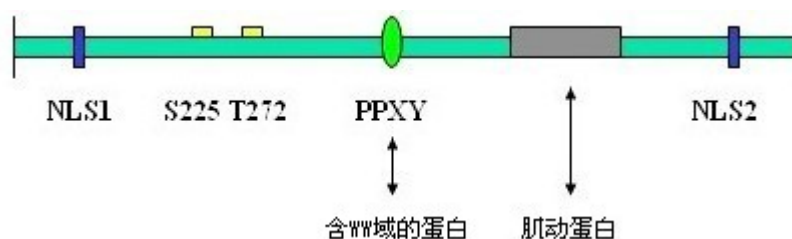


图 1 Myopodin 蛋白结构示意图

WW 域：包含 35~45 个氨基酸长的高度紧密的 WW 域，以出现成对的保守色氨酸（即 W）为特征，识别含脯氨酸的序列。PPXY 域：富含脯氨酸的蛋白—蛋白相互作用基序，它存在于多种蛋白中，与含有 WW 结构域的蛋白相互作用。

Myopodin 蛋白包含有 2 个入核信号 NLS1 和 NLS2、两个磷酸化位点 S225 和 T272、一个肌动蛋白(actin)结合位点和一个 PPXY 域。

2 Myopodin 蛋白的生物学功能

Myopodin 蛋白可与肌动蛋白结合，能促进肌动蛋白束的形成。但是，随着研究的深入，发现 Myopodin 蛋白还可以结合其他的蛋白分子上，包括 14-3-3 蛋白、核输入受体(importin)等，说明其功能不仅仅是结构蛋白，而且有可能参与信号传导过程。

2.1 Myopodin 蛋白的分布

在体内，Myopodin蛋白具有两种形式：在小鼠骨骼肌细胞中分子量为80kD的形式，而在心肌细胞中是95kD的形式^[4]。Myopodin蛋白在骨骼肌中分布最多，在舌、膀胱中也有分布，但在其他器官中则比较少（图2）。

Myopodin蛋白在平滑肌细胞及骨骼肌细胞中有集中的、大量的表达，在一些器官的上皮细胞中表达量也比较多，比如膀胱上皮细胞等。同时，它在细胞的细

胞质和细胞核之间可以穿梭。Astrid Weins^[4]等在有胁迫条件下（如热激）对哺乳动物细胞C2C12进行培养，发现分布在细胞质中的Myopodin蛋白又重新转运至细胞核内；当在细胞中过量表达Myopodin蛋白时，发现过量表达的Myopodin蛋白分布在细胞核内，并且促使肌动蛋白丝成环。这些现象表明Myopodin蛋白可能与机体发育相关，并且其在细胞核中的分布对机体抵抗不良环境起积极作用。

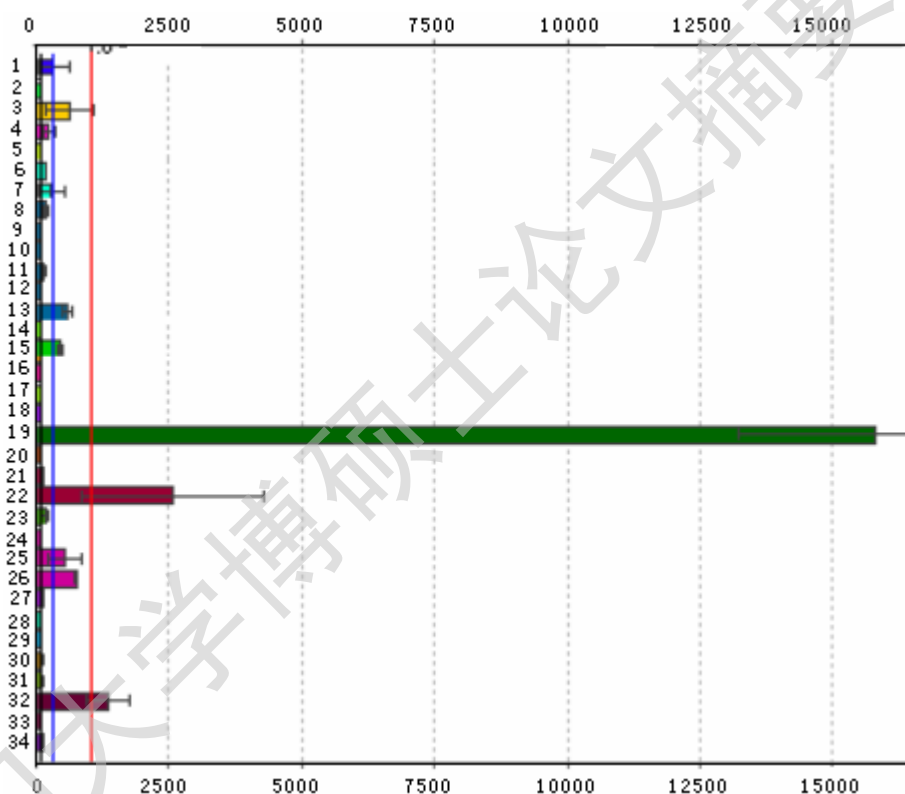


图 2 Myopodin 蛋白在不同器官中的分布^[11]

1 棕脂肪, 2 脂肪, 3 骨, 4 骨髓, 5 扁桃腺, 6 脊髓下部, 7 脊髓上部, 8 乳腺, 9 卵巢, 10 胎盘, 11 前列腺, 12 睾丸, 13 脐带, 14 子宫, 15 心脏, 16 肝脏, 17 肺, 18 淋巴, 19 骨骼肌, 20 犁鼻器, 21 唾液腺, 22 舌, 23 胰腺, 24 垂体, 25 表皮, 26 嘴表皮, 27 脾, 28 胃, 29 胸腺, 30 甲状腺, 31 气管, 32 膀胱, 33 肾, 34 视网膜

2.2 参与细胞的结构

肌动蛋白(actin)是细胞中一种重要的蛋白质，是细胞骨架的主要成分之一，它与其他蛋白质一起在维持细胞形态特征，使细胞能够在运动和收缩方面发挥着

重要的作用。研究发现，Myopodin蛋白可以与肌动蛋白相互作用，通过一个肌动蛋白结合位点和它直接结合。在未分化的小鼠肌肉细胞C2C12中，Myopodin蛋白分布在细胞核内；但在诱导分化6个小时后，Myopodin蛋白就逐渐往细胞质迁移，而且在细胞质中沿着肌动蛋白微丝(actin filament)分布^[3]；在肌管分化过程中，Myopodin蛋白与紧张纤维(stress fibre)结合,整合到Z盘(Z-disc)中。在所有的Z盘构成的单元中，有更多的蛋白参与其中，其中Z盘的蛋白质telethonin^[12]与肌联蛋白的N端结合，而telethonin的N端还同时于 α -辅肌动蛋白的C端结合^[13,14,15]，而且，伴肌动蛋白^[16]也通过它的C端参与Z盘^[17,18]在心肌的Z盘外围，肌动蛋白和肌联蛋白有相互作用，因此表现为这种肌联蛋白域功能性的不能伸展^[19,20]。然而，Z盘外围区域的肌联蛋白能通过其他的蛋白与F-肌动蛋白构成复合结构。而Myopodin就是这种潜在的和肌联蛋白以及肌动蛋白一起构成复合结构的蛋白。这些都说明Myopodin蛋白参与了细胞结构的形成，它也是一种结构蛋白。

2.3 出入核机制的研究

生物大分子的核质分配如亲核蛋白的核输入，RNA分子及RNP颗粒的核输出，主要是受到核孔复合体的调控，并由受体karyopherin- β /importin- β 蛋白家族成员介导完成的。Importin β 家族成员可以使用C端结合底物(cargo)^[21]或接头蛋白(adaptor)^[22]，N端结合RanGTP^[23]，中部结合核孔蛋白(Nups)^[24]，从而将底物带入或带出细胞核。受体importin与exportin同是importin- β 家族成员，它们通过特异识别蛋白质中的入核信号(NLS)或出核信号(NES)分别介导入核转运与出核转运。通过importin与核孔复合体的相互作用，核质转运得以顺利进行。这种受体介导的核质转运受到RanGTP的调控，RanGTP通过调节importin同底物的相互作用使得调控作用得以实现。生物大分子的核质转运过程大体如下：在细胞质中，RanGTP浓度低，importin与底物结合后，与核孔复合体相互作用入核；在核内，RanGTP浓度高，RanGTP与底物竞争结合importin，使importin释放底物，从而完成入核转运。出核转运与入核转运过程相反，在细胞核内高浓度的RanGTP条件下，exportin，RanGTP与底物在细胞核内形成三聚体，通过exportin与核孔复合体的相互作用出核，在低浓度RanGTP的胞质中三聚体解聚释放底物，完成出核转运^[25]。

一般来说,蛋白质的入核转运与出核转运都需要有入核信号(NLS)或是出核信号(nuclear export signal, NES)的介导^[26,27]。经典的入核信号是富含碱性氨基酸残基的序列,如SV40大T抗原的入核信号KK/RXK/R,这类入核信号可以被核输入受体接头蛋白importin- α 蛋白家族成员识别然后结合核输入受体importin- β 蛋白家族成员从而进行入核转运。经典的出核转运信号是富含亮氨酸的氨基酸残基序列,如Rev NES序列LPPLERLTL。核输出受体(exportin)识别这些出核信号介导出核转运。但是,没有经典入核信号的蛋白质或没有经典出核信号的蛋白质也可以分别进行核质转运。目前,发现越来越多样的入核信号,使人们对蛋白质核质转运的分子机制有了更深入的了解^[28]。研究发现,和肌动蛋白结合的蛋白,如CapG^[29,30]丝束蛋白(fimbrins)^[31],抑制蛋白(profilin)^[32,33],胸腺素(thymosin)^[34],supervillin^[35]和Flightless I^[36]等,在真核细胞中都是可以进行核质穿梭的蛋白。而Myopodin做为于肌动蛋白结合的一种蛋白,也发现可以在细胞质和细胞核之间穿梭。

2.3.1 Myopodin 蛋白入核机制

Myopodin蛋白在氨基酸序列的N端及C端分别具有一个经典的入核信号,分别是NLS1: ⁵⁸KKRR⁶¹, NLS2: ⁶¹⁶KKGK⁶¹⁹。研究发现,在C2C12细胞中,无论是把入核信号NLS1或NLS2,还是把两个入核信号同时进行缺失突变,都不能完全阻止Myopodin蛋白入核(~14%的Myopodin蛋白仍在细胞核中)^[7]。虽然它们都对其入核起作用,但这些研究说明Myopodin蛋白的入核可能还有其他的途径。

除了入核信号外,Myopodin蛋白的入核转运机制还跟蛋白质的磷酸化有关。Myopodin蛋白上有两个磷酸化位点,分别是S225, T272,这两个位点是否磷酸化直接影响到Myopodin蛋白的入核转运。进一步的研究发现^[10],Myopodin蛋白的这两个位点磷酸化后可以与14-3-3蛋白相互作用,并且可与核输入受体接头蛋白importin- α 相结合。14-3-3蛋白与核输入受体接头蛋白importin- α 一起介导Myopodin蛋白入核(图3)。14-3-3蛋白通常以二聚体形式大量存在^[37],它在C端有个底物结合位点,在N端有个二聚体结合位点^[38,39]。14-3-3蛋白主要是在细胞质中^[40,41,42],但是在细胞核中^[43,44,45]、高尔基体中^[46]和线粒体中^[47]也有发现。

Myopodin 蛋白有两个 14-3-3 蛋白结合位点,将这两个位点缺失突变后,Myopodin 蛋白不能结合 14-3-3 蛋白,与核输入受体接头蛋白 importin- α 的相互作用也被解除,入核转运受到抑制。同样,若是将 Myopodin 蛋白进行去磷酸化处理,它也不可以结合 14-3-3 蛋白,入核转运同样受到抑制。综上所述,Myopodin 蛋白入核需要入核信号、蛋白质磷酸化以及 14-3-3 蛋白的介导;并且,其他未知的入核机制还有待发现。

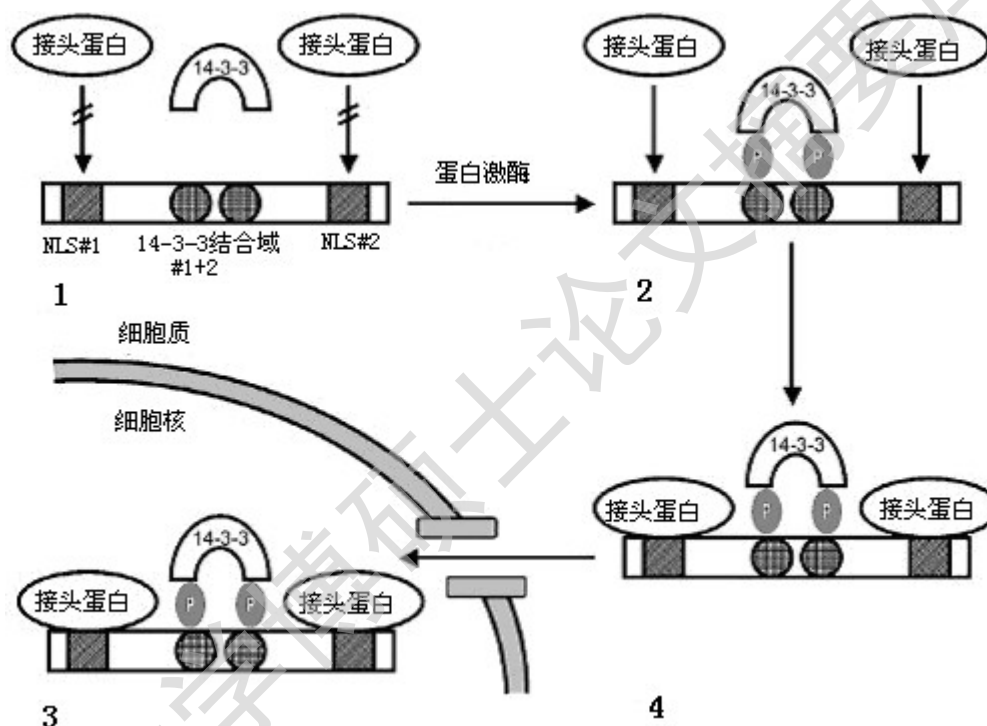


图 3 核输入受体接头蛋白 importin- α 与 14-3-3 蛋白一起介导磷酸化了的足蛋白入核^[10]

(1) 当位于 14-3-3 蛋白结合域 #1 和 #2 中的两个磷酸化位点没有被磷酸化的时候, Myopodin 蛋白就不能与核输入受体接头蛋白 importin- α 结合,同时核输入受体接头蛋白 importin- α 也不能与入核信号 NLS1 和 NLS2 结合,因此, Myopodin 蛋白就进入不到细胞核内。(2) 经过蛋白激酶的磷酸化后, Myopodin 蛋白与 14-3-3 蛋白结合,同时使核输入受体接头蛋白 importin- α 比较容易与 NLSs 结合。(3) 核输入受体接头蛋白 importin- α 结合到两个入核信号 NLS1 和 NLS2 上。(4) 核输入受体接头蛋白 importin- α 与 14-3-3 蛋白一起介导 Myopodin 蛋白进入细胞核内。

2.3.2 Myopodin 蛋白出核机制

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