

学校编码：10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学 号：21720080150419

UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

**Axin/TNKS 复合体与 KIF3A 相互作用参与  
调节胰岛素刺激的 GLUT4 转运**

**The Axin/TNKS complex interacts with KIF3A and is required for  
insulin-stimulated GLUT4 translocation**

郭 慧 玲

指导教师姓名：林 圣 彩 教授

专 业 名 称：生物化学与分子生物学

论文提交日期：2012 年 04 月

论文答辩日期：2012 年 06 月

学位授予时间：2012 年 月

答辩委员会主席：\_\_\_\_\_

评 阅 人：\_\_\_\_\_

2012 年 6 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( 林圣彩 )课题(组)的研究成果,获得( 林圣彩 )课题(组)经费或实验室的资助,在( 林圣彩 )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
摘 要.....	1
第一章 前 言.....	3
1.1 GLUT4 的转运.....	3
1.1.1 引言.....	3
1.1.2 GLUT4 转运的分子机制.....	5
1.1.3 细胞骨架与 GLUT4 转运.....	9
1.2 架构蛋白 Axin.....	10
1.2.1 引言.....	10
1.2.2 Axin 是一个多功能的架构蛋白.....	10
1.3 多聚 ADP-核糖化酶 TNKS.....	17
1.3.1 TNKS 的发现.....	17
1.3.2 多聚 ADP-核糖化修饰及其抑制剂.....	17
1.3.3 TNKS 的结构.....	19
1.3.4 TNKS 的功能.....	19
1.4 动力蛋白 KIF3A.....	24
1.4.1 引言.....	24
1.4.2 KIF3A 的结构.....	24
1.4.2 KIF3A 的功能.....	25
第二章 材料和方法.....	28
2.1 常用药品和试剂.....	28
2.2 DNA 相关实验方法.....	28
2.2.1 质粒载体.....	28
2.2.2 大肠杆菌感受态细胞的制备.....	32

2.2.3 DNA 转化.....	33
2.2.4 质粒 DNA 的提取.....	33
2.2.5 质粒 DNA 的工具酶处理.....	35
2.2.6 DNA 片段的纯化.....	37
2.2.7 DNA 连接反应.....	38
2.2.8 PCR 反应.....	38
2.2.9 哺乳动物细胞表达质粒的构建.....	38
2.2.10 RNA 干扰质粒的构建.....	39
<b>2.3 mRNA 的提取和 RT-PCR.....</b>	<b>39</b>
2.3.1 mRNA 的提取.....	39
2.3.2 逆转录反应.....	40
<b>2.4 细胞实验.....</b>	<b>40</b>
2.4.1 细胞培养.....	40
2.4.2 瞬时转染.....	41
2.4.3 腺病毒的扩增与感染.....	42
2.4.4 葡萄糖吸收实验.....	43
<b>2.5 蛋白质相关实验方法.....</b>	<b>44</b>
2.5.1 免疫共沉淀.....	44
2.5.2 两步法免疫共沉淀.....	45
2.5.3 蛋白质的 SDS-PAGE 电泳与 Western blotting 分析.....	46
2.5.4 细胞免疫荧光实验.....	47
2.5.5 融合蛋白的表达和纯化.....	47
2.5.6 细胞膜分离实验.....	48
2.5.7 多聚核糖化/泛素化实验.....	48
<b>2.6 动物实验.....</b>	<b>48</b>
2.6.1 葡萄糖耐受实验.....	48
2.6.2 胰岛素耐受实验.....	49
<b>第三章 结果和讨论.....</b>	<b>50</b>

<b>3.1 结果</b> .....	<b>50</b>
3.1.1 Axin , TNKS2 , KIF3A 形成复合体 .....	50
3.1.2 Axin , TNKS , KIF3A 在 3T3-L1 脂肪细胞近核区域存在共定位...54	54
3.1.3 Axin , TNKS , KIF3A 参与胰岛素刺激的 GLUT4 转运调节 .....	57
3.1.4 敲低 Axin/TNKS/KIF3A 复合体组分抑制胰岛素刺激的葡萄糖吸收 .....	61
3.1.5 TNKS2 参与胰岛素刺激的葡萄糖处理.....	64
3.1.6 胰岛素刺激抑制 TNKS 的多聚核糖化酶活性 , 稳定 Axin/TNKS/KIF3A 复合体 .....	68
3.1.7 Akt 介导胰岛素诱导的 Axin-TNKS-KIF3A 复合体的积累 .....	73
3.1.8 胰岛素刺激促进 GLUT4 与 TNKS 的结合 , 增加 TNKS 复合体与微 管的相互联系.....	75
<b>3.2 讨论</b> .....	<b>77</b>
<b>致    谢</b> .....	<b>80</b>
<b>参考文献</b> .....	<b>81</b>
<b>图表索引</b> .....	<b>100</b>
<b>在学期间发表论文</b> .....	<b>103</b>

**TABLE OF CONTENTS**

<b>TABLE OF CONTENT</b> .....	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>1</b>
<b>CHAPTER 1 INTRODUCTION</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1 GLUT4 translocation</b> .....	<b>3</b>
1.1.1 Introduction .....	3
1.1.2 The mechanism of GLUT4 translocation regulation .....	5
1.1.3 The cytoskeleton and GLUT4 translocation .....	9
<b>1.2 Scaffold protein Axin</b> .....	<b>10</b>
1.2.1 Introduction .....	10
1.2.2 Axin is a multifunctional scaffold protein.....	10
<b>1.3 Poly-ADP-ribosylase TNKS</b> .....	<b>17</b>
1.3.1 Discovery of TNKS.....	17
1.3.2 Poly-ADP-ribosylation and inhibitor .....	17
1.3.3 Structure of TNKS .....	19
1.3.4 Function of TNKS .....	19
<b>1.4 Motor protein KIF3A</b> .....	<b>24</b>
1.4.1 Introduction .....	24
1.4.2 Structure of KIF3A.....	24
1.4.2 Function of KIF3A .....	25
<b>CHAPTER 2 MATERIALS AND METHODS</b> .....	<b>28</b>
<b>2.1 Chemicals and reagents</b> .....	<b>28</b>
<b>2.2 DNA work</b> .....	<b>28</b>
2.2.1 Vectors.....	28

2.2.2 Preparation of <i>E. coli</i> competent cells.....	32
2.2.3 DNA transformation.....	33
2.2.4 DNA preparation.....	33
2.2.5 Enzymatic manipulation of plasmid DNA.....	35
2.2.6 Purification of DNA fragments.....	37
2.2.7 DNA ligation.....	38
2.2.8 Polymerase chain reaction.....	38
2.2.9 Construction of mammalian expression plasmids.....	38
2.2.10 Construction of plasmids for RNA interference.....	39
<b>2.3 mRNA extractions and RT-PCR.....</b>	<b>39</b>
2.3.1 mRNA extractions.....	39
2.3.2 RT-PCR.....	40
<b>2.4 Cell experimentes.....</b>	<b>40</b>
2.4.1 Cell culture.....	40
2.4.2 Transient transfection.....	41
2.4.3 Amplification and infection of adenovirus.....	42
2.4.4 Glucose uptake assay.....	43
<b>2.5 Protein works.....</b>	<b>44</b>
2.5.1 Immuno co-precipitation.....	44
2.5.2 Two-step immuno-co-precipitation.....	45
2.5.3 SDS-PAGE electrophoresis and western blot analysis.....	46
2.5.4 Cell immuno-fluorescent staining.....	47
2.5.5 Expression and pufication of recombinant protein.....	47
2.5.6 Isolation of plasma membrane.....	48
2.5.7 Poly ADP-ribosylation and ubiquitination test.....	48
<b>2.6 Animal experiments.....</b>	<b>48</b>
2.6.1 Glucose tolerance test.....	48
2.6.2 Insulin tolerance test.....	49



**CHAPTER 3 RESULTS AND DISCUSSION ..... 50**

**3.1 Results .....50**

**3.1.1 Axin, TNKS2 and KIF3A form a complex .....50**

**3.1.2 Axin , TNKS and KIF3A are co-localized in the perinuclear region in  
    3T3-L1 adipocytes ..... 54**

**3.1.3 Axin , TNKS and KIF3A are required in regulation of insulin  
    stimulated GLUT4 translocation ..... 57**

**3.1.4 Knockdown of components of the Axin complex attenuated  
    insulin-stimulated glucose uptake ..... 61**

**3.1.5 TNKS2 is required in insulin-stimulated glucose disposal ..... 64**

**3.1.6 Insulin suppresses TNKS PARsylase activity and stabilizes  
    Axin/TNKS/KIF3A complex ..... 68**

**3.1.7 Akt mediates insulin-induced accumulation of the  
    Axin-TNKS-KIF3A complex ..... 73**

**3.1.8 Insulin stimulation increases the association bwteen GLUT4 and  
    TNKS, and enhances the binding of TNKS complex to tubulin ..... 75**

**3.2 Discussion.....77**

**ACKNOWLEDGEMENT ..... 80**

**REFERNCES.....81**

**LIST OG FIGURES AND TABLES.....100**

**PUBLICATIONS.....103**

## 摘要

胰岛素刺激机体对葡萄糖的吸收，主要由葡萄糖转运蛋白 GLUT4 介导，对机体的糖代谢平衡起着至关重要的作用，这个过程被扰乱，会导致糖尿病。但是，这个信号途径的分子组分和调节机制还很不清楚。在本文，我们阐明了 Axin 与多聚核糖化酶 TNKS 以及动力蛋白 KIF3A 相互作用，形成一个三元复合体，对胰岛素应答的 GLUT4 转运有重要作用。特异性敲低复合体各个组分的表达，减少胰岛素刺激下 GLUT4 向细胞膜上的转移。重要的是，*TNKS2*<sup>-/-</sup>小鼠的胰岛素敏感性降低，饥饿再喂食后的血糖浓度比野生型小鼠相对高。机制方面，我们发现，无胰岛素时，Axin，TNKS 和 KIF3A 与 GLUT4 在高尔基体的反面膜囊有共定位。胰岛素刺激抑制 TNKS 的多聚 ADP-核糖化酶活性，导致 Axin 及其自身的多聚 ADP-核糖化修饰和泛素化修饰减弱，从而使复合体稳定，促进复合体的形成。抑制胰岛素信号途径重要的激酶 Akt，可以减弱胰岛素对复合体形成的促进作用。我们鉴定了一个与动力蛋白 kinesin 直接相关的新蛋白复合体，参与胰岛素刺激的 GLUT4 转运。

关键词：Axin；TNKS；KIF3A；胰岛素；GLUT4 转运

**ABSTRACT**

Insulin-stimulated glucose uptake by the glucose transporter GLUT4 plays a central role in whole-body glucose homeostasis, dysregulation of which leads to type 2 diabetes. However, the molecular components and mechanisms regulating insulin-stimulated glucose uptake remain largely unclear. Here, we demonstrate that Axin interacts with the poly ADP-ribosylase TNKS and the kinesin motor protein KIF3A, forming a ternary complex crucial for GLUT4 translocation in response to insulin. Specific knockdown of the individual components attenuated insulin-stimulated GLUT4 translocation to the plasma membrane. Importantly, TNKS2<sup>-/-</sup> mice exhibit reduced insulin sensitivity and higher blood glucose levels when refed after fasting. Mechanistically, we demonstrate that in the absence of insulin, Axin, TNKS and KIF3A are co-localized with GLUT4 on the trans-Golgi network. Insulin treatment suppresses the poly ADP-ribosylase activity of TNKS, leading to a reduction in ADP-ribosylation and ubiquitination of both Axin and TNKS, and a concurrent stabilization of the complex. Inhibition of Akt, the major effector kinase of insulin signaling, abrogates the insulin-enhanced complex formation. We have thus elucidated a new protein complex that is directly associated with the motor protein kinesin in insulin-stimulated GLUT4 translocation.

Keywords: Axin; TNKS; KIF3A; insulin; GLUT4 translocation

## 第一章 前言

## CHAPTER 1 Introduction

## 1.1 GLUT4 的转运

## 1.1 GLUT4 translocation

## 1.1.1 引言

## 1.1.1 Introduction

葡萄糖是真核生物的基础能源物质。在人体，所有的细胞都利用葡萄糖作为主要的能源物质。在基础状态下，约 80% 的能源物质由脑组织消耗，主要来源于肝脏糖原的降解。全身的能量储备主要从食物中进行补充。食物在消化道分解消化，养分在小肠被吸收，然后通过循环系统输送到全身各处的组织细胞[1, 2]。

在细胞表面，存在一类糖类分子的运输蛋白，称为 GLUTs，它们在细胞膜表面，帮助细胞吸收糖类物质。GLUTs 家族目前鉴定了 13 种成员，它们一般具有 12 次跨膜结构，这些跨膜结构域在膜中形成一个个亲水性通道[1, 3] (图 1.1)，使糖分子顺利通过非极性的磷脂双分子层结构，它们的 N 末端和 C 末端区域位于细胞质。这类转运蛋白家族各个成员，在组织分布类型，动力学性质，以及细胞内的定位方面各有不同[1]。

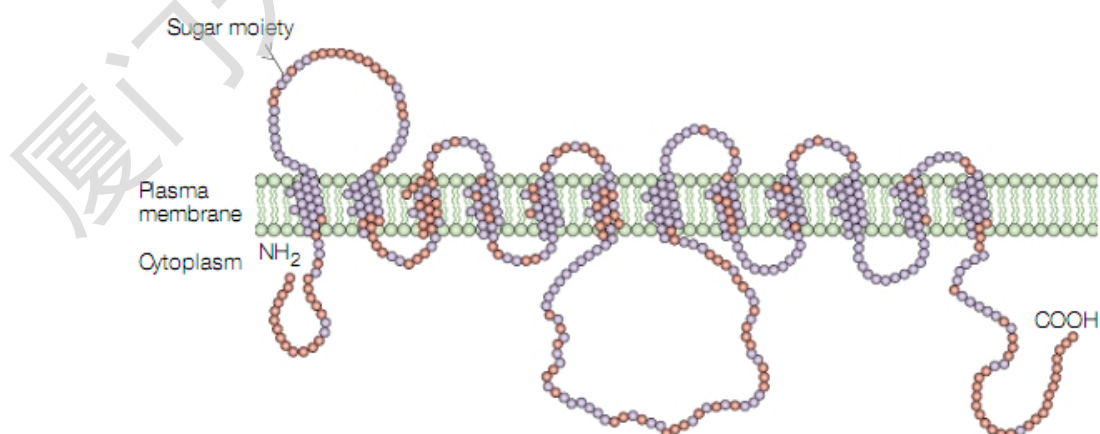


图 1.1 图示 GLUT 蛋白家族 [1]

Fig.1.1 Schematic representation of the GLUT family of proteins [1]

GLUTs 家族根据蛋白的序列同源性和结构相似性，可以划分为三个亚家族。GLUTs1-4 均是葡萄糖转运蛋白，属于 Class I；Class II 包括 GLUTs5, 7, 9, 11，是果糖转运蛋白；GLUTs6, 8, 10, 12 和 HMIT1（myoinositol transporter，肌醇运输蛋白）属于结构非典型性第三类亚家族[1]。

多数哺乳类的脑组织，对葡萄糖有很高的需求量，分布的主要是持续性定位于细胞膜表面的葡萄糖转运蛋白，如 GLUTs1-3。在一些特殊的组织，如肌肉和脂肪组织，存在一类很特殊的葡萄糖转运系统，使组织细胞在一些特殊的刺激如胰岛素信号下，葡萄糖转运速率可以在数分钟内提高 10-40 倍[2]。这个系统在运动状态，如骨骼肌运动收缩时，促进肌肉组织对葡萄糖的吸收和利用；在餐后状态，促进肌肉组织和脂肪组织快速地吸收血液中的葡萄糖，避免血糖浓度过大的波动。

1980 年，发现在大鼠的脂肪细胞中，胰岛素可以引发一类葡萄糖转运蛋白从细胞内转移到细胞膜表面[4]。后来，当葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter 4, GLUT4) 作为这种细胞主要的葡萄糖转运蛋白被鉴定出来，这种胰岛素刺激的转运假说也得到证实。GLUT4 主要在肌肉和脂肪细胞表达，在细胞内存在于微管相关的膜泡系统，与 endosomal-TGN (*trans*-Golgi network，高尔基体反面膜囊) 膜泡系统相联系。无胰岛素时，分布在细胞膜上的 GLUT4 很少；加入胰岛素刺激，或者肌肉收缩，会增加细胞膜上分布的 GLUT4 (图 1.2)。

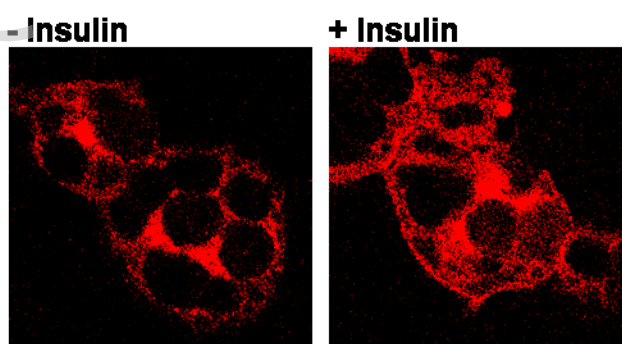


图 1.2 胰岛素刺激脂肪细胞的 GLUT4 从细胞内转移至细胞膜

Fig. 1.2 Insulin triggers the translocation of GLUT4 from an intracellular location to the plasma membrane of adipocytes

很多研究表明，GLUT4 对于全身的糖代谢平衡有至关重要的作用。虽然全

身性敲除 GLUT4 的小鼠因为代偿效应, 没有表现出明显的生理缺陷[5],但是 GLUT4 敲除的杂合型小鼠[6], 血糖和胰岛素的水平比较高, 肌肉对葡萄糖的吸收减少, 表现出胰岛素抵抗, 心脏出现糖尿病样的组织学变化。用转基因的手段, 将肌肉组织特异性表达的 GLUT4 基因导入 GLUT4 敲除的杂合型小鼠, 抑制了该小鼠出现的胰岛素抵抗和糖尿病症状[7]。在 *db/db* 小鼠中过表达 GLUT4, 可以改善 *db/db* 小鼠的糖尿病症状[8]。利用转基因技术在脂肪组织[9]和肌肉组织[10]高表达 GLUT4, 均可增加小鼠的胰岛素敏感性和葡萄糖耐受性。

随着生活水平的不断提高, 人类的饮食结构和生活方式发生改变, 糖尿病患病人数不断攀升, 至 2009 年, 我国糖尿病的患病率达到 9.7%, 患病人数接近一亿, 我国已经成为糖尿病患病率增长最快的地区之一。糖尿病(diabetes mellitus, DM)主要分为 1 型和 2 型 (type 2 diabetes mellitus, T2DM)。1 型是胰岛素依赖型, 2 型糖尿病是胰岛素非依赖型。2 型糖尿病占糖尿病患者的 90%, 主要表现为胰岛素的作用下降, 即机体对胰岛素不敏感, 出现胰岛素抵抗 (insulin resistance)。胰岛素抵抗经常表现为肌肉、脂肪和肝脏组织对胰岛素的敏感性降低, 最终导致血糖浓度过高。长期的高浓度血糖和代谢紊乱会引起各种并发症, 包括眼睛视网膜病变, 神经系统周围神经病变, 肾脏糖尿病肾病等方面的疾病, 其中最为常见的是心血管方面的疾病[1]。糖尿病的慢性并发症是患者致残和致死的重要原因, 不但给患者造成重大的痛苦, 也给国家带来高额的医疗支出。

GLUT4 与糖尿病密切相关, 所以了解整个 GLUT4 转运的分子机制, 不仅可以加深对蛋白质分选和定向运输机制的了解, 而且对于 2 型糖尿病的预防和治疗有明显的指导意义。

### 1.1.2 GLUT4 转运的分子机制

#### 1.1.2 The mechanism of GLUT4 translocation regulation

##### 1.1.2.1 GLUT4 膜泡

GLUT4 在细胞内以膜泡形式运输, 分布于多种亚细胞结构[11](图 1.3), 包括细胞膜, sorting endosomes, recycling endosomes, TGN(高尔基体反面膜囊) 以及在上述结构之间介导 GLUT4 运输的膜泡。这些膜泡主要依赖于细胞骨架系统进行运输。用电镜观察细胞内 GLUT4 膜泡, 有很多膜泡与微管相联系[11]。胰岛

素刺激细胞，使 GLUT4 的分布发生明显的变化。最明显的是，胰岛素刺激使细胞膜上的 GLUT4 显著增加，细胞内 GLUT4 明显减少。无胰岛素时，GLUT4 在脂肪细胞中，向细胞膜运输的速率比持续性循环的 TfR (transferrin receptor) 慢 10 倍[12]。这说明，无胰岛素时，GLUT4 主要分布于一类特殊的膜泡结构中，这种结构不同于 TfR 所在的 recycling endosomes，而是在基础状态下维持在细胞内，不与或极少量与细胞膜融合。GSVs (GLUT4 storage vesicles) 就是一类位于细胞内的 GLUT4 贮存膜泡。它应答于胰岛素信号，才发生向细胞膜定向移动。

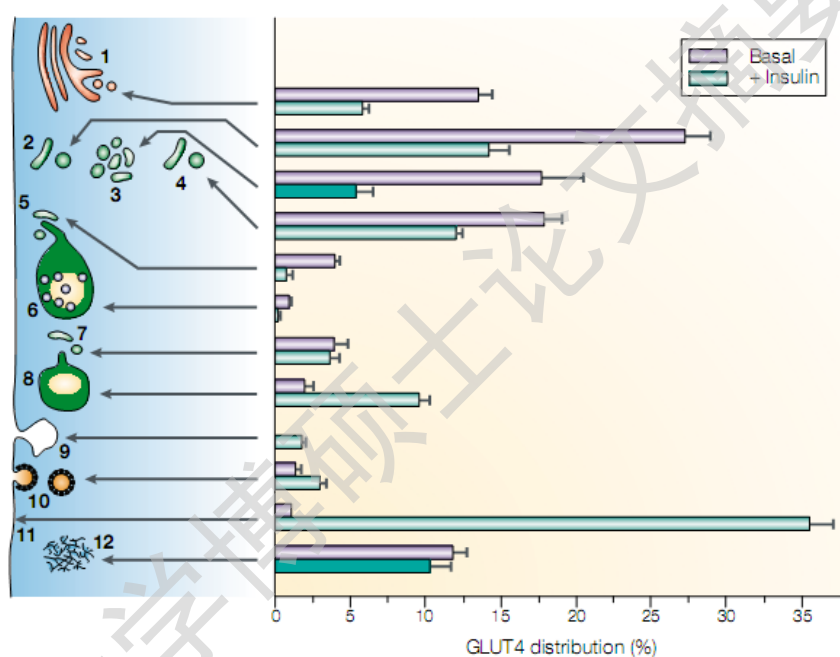


图 1.3 GLUT4 的分布[11]

Fig.1.3 GLUT4 distribution [11]

(1. Golgi region (mainly TGN); 2. T-V elements distributed underneath (within 0.5  $\mu\text{m}$ ) the plasma membrane; 3. Clusters of T-V elements; 4. T-V elements distributed through the cytoplasm; 5. T-V elements connected or close to late endosomal vacuoles; 6. Late endosomal vacuoles; 7. T-V elements connected or close to early endosomal vacuoles; 8. Early endosomal vacuoles; 9. Noncoated invaginations of the plasma membrane; 10. Coated pits and vesicles; 11. Plasma membrane; 12. Cytoplasm.)

通过质谱的方法，在 3T3-L1 脂肪细胞中鉴定出多种位于 GLUT4 膜泡上的

蛋白[13]，这些膜泡蛋白的功能鉴定会为揭示 GLUT4 膜泡转运的具体细节提供线索。如早前被鉴定出来的 IRAP (insulin-responsive aminopeptidase) [14],后来发现对 GLUT4 含量维持以及定向分选运输 (sorting) 有重要作用[15, 16]。膜泡上的各个分子是 GLUT4 膜泡应答分子信号通路的重要元件，近年来研究比较热门的 AS160 (Akt substrate, 160KD) 也在 GLUT4 膜泡蛋白的质谱中被鉴定到 [13]。

### 1.1.2.1 信号通路

胰岛素和运动收缩都可以刺激 GLUT4 快速地向脂肪和肌肉组织的细胞膜表面转移。然而，这两种生理刺激引发的信号通路在两种组织细胞中并不相同。

经典的胰岛素信号作用于 GLUT4 系统 (图 1.4)，首先是胰岛素分子作用于细胞膜表面的胰岛素受体 (insulin receptor, IR) 酪氨酸激酶，使其活化进一步磷酸化胰岛素受体底物 (insulin receptor substrate, IRS) 及其募集的 PI3K (phosphatidylinositol 3 kinase) [17-19]，从而使 PI3K 催化 PIP2 转化成 PIP3，随之通过 PDK1 或 mTOR 激活 Akt[20]。相较于 Akt1 或 Akt3，Akt2 在脂肪和肌肉组织中对于 GLUT4 转运的调节起着更为主要的作用。用 RNAi 的方法同时敲低 Akt1 和 Akt2 可以明显抑制胰岛素刺激的 GLUT4 转运，在这个过程中 Akt2 的作用更为明显[21, 22]。Akt2 敲除小鼠表现出明显的胰岛素抵抗和糖尿病样症状[23]。

在 Akt 下游，AS160 做为 Akt 的底物，参与调节 GLUT4 的转运[24-28]。AS160，是一个 GAP (GTPase activating protein)，抑制 Rab2A, 8A, 10 和 14 的活性[28]。Rab，是一类 GTPase, 对于细胞内的膜泡运输有重要作用，介导膜泡与动力蛋白的联系，膜泡之间的融合等过程[29]。所以 AS160 在信号通路中间，将上游的胰岛素信号通路和下游的膜泡运动最终联系起来。将 AS160 的 Akt 磷酸化位点突变，导入细胞，明显抑制胰岛素刺激的 GLUT4 转移[24]。用 siRNA 敲低 AS160 的表达，可以增加基础状态下细胞膜上 GLUT4 的含量[27]。所以，AS160 是 GLUT4 向细胞膜转运的负调控因子。AS160 被 Akt 磷酸化之后，与 14-3-3 结合[30]，GAP 活性被抑制，对 Rab 蛋白的抑制作用被解除，促进 Rab 介导的膜泡运输。无胰岛素时，维持 GLUT4 膜泡在细胞内依赖于 AS160 与囊泡



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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库