

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 21720080150416

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

信号诱导 Brd4 从染色质解离是调控 P-TEFb 募集及基因转录延伸的重要机制

The signal-induced release of Brd4 from chromatin is essential for the functional transition of Brd4 to transcriptional regulation

艾南平

指导教师姓名: 陈瑞川 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2011 年 4 月

论文答辩时间: 2011 年 6 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2011 年 4 月

**The signal-induced release of Brd4 from chromatin is  
essential for the functional transition of Brd4 to  
transcriptional regulation**

Dissertation Submitted to

**Xiamen University**

in Partial Fulfilment of the Requirement

for the Degree of

**Doctor of Philosophy**

By

Nanping Ai

(Biochemistry and Molecular Biology)

**Dissertation Supervisors:**

**Prof. Ruichuan Chen**

April, 2011

Xiamen, China

## 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.....	V
Catalogue .....	V
英文缩略语对照表 .....	IX
摘 要.....	XII
Abstract.....	XIV
<b>第一章 前言 .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 真核基因转录概述 .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 真核生物 RNA 聚合酶 .....	1
1.1.2 真核生物 RNA 聚合酶 II (RNA Pol II) 的结构.....	2
1.1.3 RNA Pol II CTD 的磷酸化循环 .....	2
1.1.4 RNA 聚合酶 II 参与的基因转录.....	4
<b>1.2 正性转录延伸因子 b (positive transcription elongation factor b) .....</b>	<b>7</b>
1.2.1 P-TEFb 复合体的组成及生物学功能.....	7
1.2.2 P-TEFb 转录活性调控机制 .....	8
1.2.3 P-TEFb 复合体在正常生理及病理状态下的功能.....	16
<b>1.3 含溴结构域蛋白 4 (Bromodomain-containing protein 4, Brd4) .....</b>	<b>20</b>
1.3.1 Brd4 与 BET 家族蛋白 .....	20
1.3.2 Brd4 蛋白的结构特征.....	21
1.3.3 由溴结构域, ET 和 CTM 结构域调节的蛋白与蛋白相互作用 .....	23
1.3.4 Brd4 在细胞周期中的作用.....	25
1.3.5 Brd4 参与病毒基因组分离.....	25
1.3.6 Brd4 介导基因转录调控.....	26
<b>1.4 研究内容和意义.....</b>	<b>29</b>
1.4.1 研究内容 .....	29
1.4.2 研究意义 .....	30
<b>第二章 实验材料与方法 .....</b>	<b>32</b>
<b>2.1 实验药品、试剂与仪器.....</b>	<b>32</b>
2.1.1 细胞株、菌株和质粒资源.....	32
2.1.2 主要试剂和材料.....	32
2.1.3 主要实验仪器和耗材.....	34
<b>2.2 常用溶液配方.....</b>	<b>35</b>
2.2.1 大肠杆菌感受态细胞的制备及质粒转化相关溶液.....	35
2.2.2 质粒 DNA 制备相关溶液.....	36

2.2.3 质粒 DNA 亚克隆相关操作.....	37
2.2.4 细胞培养、转染及感染相关溶液.....	37
2.2.5 生化试验相关溶液.....	38
2.2.6 Western blot 相关溶液: .....	40
<b>2.3 实验方法 .....</b>	<b>41</b>
2.3.1 大肠杆菌感受态细胞的制备.....	41
2.3.2 质粒转化 .....	41
2.3.3 质粒 DNA 的制备.....	42
2.3.4 DNA 限制性内切酶酶切.....	43
2.3.5 DNA 样品琼脂糖凝胶电泳.....	44
2.3.6 琼脂糖胶回收 DNA 片段 (QIAGEN 试剂盒) .....	44
2.3.7 DNA 连接 .....	45
2.3.8 普通 PCR 反应.....	45
2.3.9 突变 PCR 反应 (改进型 QuikChange 方案) .....	46
2.3.10 实时定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR).....	48
2.3.11 细胞培养 .....	49
2.3.12 细胞瞬时转染.....	49
2.3.13 慢病毒包装感染.....	50
2.3.14 细胞的药物处理.....	50
2.3.15 全细胞裂解液.....	51
2.3.16 核抽提物的制备(NE).....	51
2.3.17 核分级分离 (Nuclear fractionation) .....	51
2.3.18 盐浓度梯度抽提 (salt-titrate extraction) .....	52
2.3.19 免疫共沉淀.....	52
2.3.20 SDS-PAGE 蛋白电泳.....	53
2.3.21 免疫印记实验 (Western blot) .....	53
2.3.22 Luciferase 转录活性分析 (Promega) .....	54
2.3.23 染色体免疫共沉淀实验(ChIP assay).....	54
<b>第三章 结果与讨论 .....</b>	<b>57</b>
<b>3.1 静息状态下细胞内绝大部分 Brd4 都与染色质结合 .....</b>	<b>57</b>
3.1.1 利用改进的核分级抽提方法可有效地将有活性与无活性的 P-TEFb 分离 .....	57
3.1.2 静息态的细胞几乎所有的 Brd4 都结合在染色质上.....	60
<b>3.2 信号刺激可诱导 Brd4 从染色质解离并促进 P-TEFb 与染色质的结合 ....</b>	<b>64</b>
3.2.1 信号刺激使 Brd4 与染色质的结合减弱从而导致其从染色质上解离....	64
3.2.2 信号诱导的 Brd4 从染色质上释放可能与 P-TEFb 的募集有关.....	65
3.2.3 外界信号刺激解除后, 解离的 Brd4 重新回到染色质上.....	66
<b>3.3 Brd4 选择性募集有转录活性的 P-TEFb 到染色质上 .....</b>	<b>67</b>
3.3.1 募集到染色质的 P-TEFb 已经被重新磷酸化.....	67
3.3.2 Brd4 选择性募集有转录活性的 P-TEFb 到染色质上.....	68
<b>3.4 抑制去乙酰化酶 (HDAC) 活性阻断 Brd4 从染色质解离及对 P-TEFb 的募集作用 .....</b>	<b>70</b>
3.4.1 抑制 HDAC 活性可增强 Brd4 与染色质结合并阻断 Brd4 从染色质上释	

放 .....	70
3.4.2 抑制 Brd4 从染色质的释放, Brd4 对 P-TEFb 的募集作用也就被阻断	72
3.4.3 HDAC 抑制剂对 Brd4/P-TEFb 复合物的形成、7SK snRNP 的解离或细胞内蛋白水平均无影响.....	73
3.4.4 抑制 HDAC 活性可以减弱信号诱导的组蛋白 H4K5/8Ac 去乙酰化.....	75
<b>3.5 抑制去乙酰化酶 (HDAC) 活性通过阻断 Brd4 对 P-TEFb 的募集作用而抑制 HMBA 对 HIV-1 转录的激活 .....</b>	<b>76</b>
3.5.1 抑制 HDAC 活性可抑制 HMBA 对 HIV-1 基因表达的激活 .....	76
3.5.2 抑制 HDAC 活性可阻断 HMBA 对 HIV-1 基因转录的延伸的激活 .....	77
3.5.3 HDAC 抑制剂处理抑制 HMBA 诱导的 P-TEFb 在启动子区的募集.....	79
<b>3.6 过表达<math>\Delta</math>C-mutant Brd4 可使内源 Brd4 从染色质上释放并促进 HIV-1 的转录 .....</b>	<b>80</b>
<b>3.7 补充数据 .....</b>	<b>83</b>
<b>3.8 讨论 .....</b>	<b>83</b>
<b>3.9 小结和展望.....</b>	<b>88</b>
3.9.1 小结 .....	88
3.9.2 展望 .....	88
<b>参考文献.....</b>	<b>90</b>
<b>致谢.....</b>	<b>100</b>
<b>个人简历.....</b>	<b>101</b>

## Catalogue

<b>Catalogue in Chinese</b> .....	<b>I</b>
<b>Catalogue in English</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abbreviation</b> .....	<b>X</b>
<b>Abstract in Chinese</b> .....	<b>XIII</b>
<b>Abstract in English</b> .....	<b>XV</b>
<b>Chapter I Forewords</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Profiles of transcription in eukaryotes</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Profiles of RNA polymerase in eukaryotes .....	1
1.1.2 Structure of the core RNA Pol II .....	2
1.1.3 Phosphorylation cycle of the Pol II CTD .....	2
1.1.4 Transcription mediated by RNA Pol II in eukaryotes .....	4
<b>1.2 Positive transcription elongation factor b (P-TEFb)</b> .....	<b>7</b>
1.2.1 Composition and function of P-TEFb .....	7
1.2.2 The regulation mechanism of P-TEFb transcriptional activity .....	8
1.2.3 Multi-functional P-TEFb complex in pathologic and physiologic .....	16
<b>1.3 Bromodomain-containing protein 4 (Brd4)</b> .....	<b>20</b>
1.3.1 Brd4 and BET family proteins .....	20
1.3.2 Structure of Brd4 .....	21
1.3.3 Protein-Protein interactions mediated by Bromodomains, ET, and CTM .....	23
1.3.4 Role of Brd4 in cell cycle progression .....	25
1.3.5 Brd4 in Viral genome segregation and beyond .....	25
1.3.6 Brd4 mediate genes transcription .....	26
1.4 Content and Significance .....	29
1.4.1 Contents .....	29
1.4.2 Significance .....	30



<b>Chapter II Materials and methods</b> .....	<b>32</b>
<b>2.1 Reagents and instruments</b> .....	<b>32</b>
2.1.1 Cell lines, <i>E.coli</i> and plasmids .....	32
2.1.2 Reagents and materials .....	32
2.1.3 Instruments and expendable supplies .....	34
<b>2.2 Instruments and solutions</b> .....	<b>35</b>
2.2.1 The solutions for preparation of competent <i>E.coli</i> cells .....	35
2.2.2 The solutions for preparation of DNA .....	36
2.2.3 The solutions for subclone .....	37
2.2.4 The solutions for biochemistry experiment .....	37
2.2.5 The solutions for cell culture, transfection and infection .....	38
2.2.6 The solutions for Western blot .....	40
<b>2.3 Methods</b> .....	<b>41</b>
2.3.1 Preparation of competent <i>E.coli</i> cells .....	41
2.3.2 Plasmids transformation .....	41
2.3.3 Plasmid DNA extraction and purification .....	42
2.3.4 Restriction endonuclease digestion of DNA .....	43
2.3.5 Agarose gel electrophoresis of DNA sample .....	44
2.3.6 DNA extraction from agarose gel (by QIAquick Gel Extraction Kits) .....	44
2.3.7 DNA ligation .....	45
2.3.8 Polymerase chain reaction (PCR) .....	45
2.3.9 PCR mutagenesis (by our modified QuikChange Site-Directed Mutagenesis) .....	46
2.3.10 Quantitative real-time PCR .....	48
2.3.11 Cell culture .....	49
2.3.12 Transient transfection of HeLa cells .....	49
2.3.13 Lentivirus package and infection .....	50
2.3.14 Pharmacological induction .....	50
2.3.15 Whole cells lysate .....	51

2.3.16 Nuclear extract preparation	51
2.3.17 Nuclear fractionation	51
2.3.18 Salt-titrate extraction	52
2.3.19 Co-Immunoprecipitation purification	52
2.3.20 SDS-PAGE protein electrophoresis	53
2.3.21 Western blot	53
2.3.22 Luciferase assay (Promega)	54
2.3.23 Chromatin immunoprecipitation purification (ChIP assay)	54
<b>Chapter III Results and Discussion</b>	<b>57</b>
<b>3.1 Almost all of Brd4 associate with chromatin in the unchallenged cells</b>	<b>57</b>
3.1.1 Nuclear fractionation procedure designed specifically for separating transcriptionally active and transcriptionally inactive P-TEFb	57
3.1.2 Almost all of Brd4 associate with chromatin in the unchallenged cells	60
<b>3.2 Signal challenges induce the release of Brd4 from chromatin and promote the association of P-TEFb with chromatin</b>	<b>64</b>
3.2.1 Signal challenging induces the release of Brd4 from chromatin	64
3.2.2 The signal-released Brd4 may play a role in recruiting P-TEFb	65
3.2.3 The signal-released Brd4 re-target chromatin after the removal of stimuli	66
<b>3.3 Brd4 only recruit transcriptionally active P-TEFb to chromatin</b>	<b>67</b>
3.3.1 The Cdk9 of chromatin-bound P-TEFb (in HSF) have phosphorylated T186	67
3.3.2 Brd4 only associate with the P-TEFb that have T-loop fully phosphorylated Cdk9	68
<b>3.4 Inhibiting HDAC blocks signal-induced release of Brd4 from chromatin and Brd4-mediated recruitment of P-TEFb</b>	<b>70</b>
3.4.1 Inhibiting HDAC blocks signal-induced release of Brd4 from chromatin	70
3.4.2 Inhibiting the release of Brd4 blocks the recruitment of P-TEFb	72

3.4.3 HDAC inhibitor does not impact the interaction between Brd4 and P-TEFb, and the signal-induced disruption of inactive 7SK snRNP, as well as the expression levels of tested components.....	73
3.4.4 Inhibiting HDAC attenuates signal-induced deacetylation of histone H4 K5/8Ac .....	75
<b>3.5 Inhibiting HDAC prevents HMBA from stimulating HIV-1 transcription through blocked the recruitment of P-TEFb by Brd4.....</b>	<b>76</b>
3.5.1 Inhibiting HDAC prevents HMBA from stimulating HIV-1 transcription	76
3.5.2 Inhibiting HDAC prevents transcription elongation.....	77
3.5.3 HDAC inhibitor prevents HMBA-induced recruitment of P-TEFb onto HIV-1 promoter .....	79
<b>3.6 Ectopic expression of <math>\Delta</math>C-mutant of Brd4 releases endogenous Brd4 from chromatin and stimulates HIV-1 transcription.....</b>	<b>80</b>
<b>3.7 Supplement.....</b>	<b>83</b>
<b>3.8 Discussion .....</b>	<b>83</b>
<b>3.9 Conclusion and prospect .....</b>	<b>88</b>
3.9.1 Conclusion.....	88
3.9.2 Prospect.....	88
<b>References .....</b>	<b>90</b>
<b>Acknowledgement.....</b>	<b>100</b>
<b>CV .....</b>	<b>101</b>

## 英文缩略语对照表

Abbreviation	Full Name
Act D	Actinomycin D
7SK snRNP	7SK small nuclear ribonucleoprotein, HEXIM1/7SK/ LARP7/BINCD3/P-TEFb
BD (I, II)	Bromodomain (I, II)
BET	Bromodomains and extraterminal
BPV	Bovine Papilloma Virus
Brd4	Bromodomain-containing protein 4
CAK	CDK-activating kinase
Cal A	Calyculin A
CaM	calmodulin
CaMK	calmodulin dependent kinase
CaMKK	calmodulin-dependent protein kinase kinase
CBP	CREB-binding protein
CDKs	Cyclin-dependent kinases
CIP	Calf intestinal alkaline phosphatase
CLP-1	Cardiac lineage protein-1
CnB	Calcineurin B
CREB	cAMP response element binding protein
CTD	C-terminal domain
CTM	C-terminal motif
BCDIN3	Bicoid-interacting protein-3
DFO	Desferrioxamine
DRB	5,6-dichloro-1-b-D-ribofuranosyl-benzimidazole
DSIF	DRB-sensitivity inducing factor
ER $\alpha$	Estrogen receptor alpha

## 英文缩略语对照表

ET	Extraterminal
GTF	General transcription factor
H (1, 2a,2b, 3, 4)	Histone(1, 2a,2b, 3, 4)
HDAC	Histone deacetylase
HIV-1	Human immunodeficiency virus type 1
HMBA	Hexamethylene bisacetamide
HPV	Human papillomavirus
HU	Hydroxyurea
IGF-I	Insulin-like growth factor-I
JNK	C-Jun N-terminal kinase
LTCC	L-type calcium channels
LTR	Long terminal repeats
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAT1	Ménage a trois
MCLR	Microcystin LR
MEF2	Myocyte enhancer binding factor 2
MELC	Murine erythroleukemia cell
MLR	Microcystin-LR
MePCE	Methylphosphate Capping Enzyme
Myr-AKT	Myristoylation signal-attached Akt
NCS	Neocarzinostatin
NELF	Negative elongation factor
NFAT	Nuclear factor of activated T cells
NRF-1	Nuclear respiratory factor 1
NTEF	Negative transcription elongation factor
NLS	Nuclear localization signal
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCV	Packed cell volume

## 英文缩略语对照表

PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PI3K	Phosphoinositide-3 kinase
PIC	Preinitiation complex
PKA	cAMP-dependent protein kinase
PKB	Protein kinase B
PKC	Protein kinase C
Pol (I, II, III)	RNA polymerase (I, II, III)
PP1 $\alpha$	Protein phosphatase 1 $\alpha$
PP2B/CaN	Calcineurin
PPM1A	Protein phosphatase 1A
PRGS	Primary response genes
P-TEFb	Positive transcription elongation factor b
S6K1	S6 kinase-1
SKIP	Splicing-associated c-Ski-interacting protein
SBHA	Suberic bishydroxamate acid
snRNP	Small nuclear ribonucleoprotein particle
SRGs	Secondary response genes
TAR	Transacting-response
TBP	TATA box-binding protein
TEC	Transcript elongation complex
TF II (D, B, E, F, & H)	Transcription factor II (D, B, E, F, & H)
TFAM	Transcription factors-mitochondrial transcription factor A
TSA	Trichostatin A

## 摘 要

在真核细胞中，编码蛋白基因的转录均由RNA聚合酶II (RNA Pol II)来完成，其转录表达调控是通过一系列复杂而精致的机制而完成的。过去，人们均认为基因转录前起始复合物 (Pre-initiation Complex, PIC) 的组装和转录起始 (Initiation) 是调控基因转录表达，应对细胞内外信号的唯一调控平台。但近年来，越来越多的证据表明，在诸如细胞生长、细胞分化和应对环境变化等多种过程中，基因转录的延伸阶段在调控基因表达过程中也扮演了极其重要的角色。P-TEFb复合体是由Cdk9及Cyclin T1组成的异二聚体激酶，在转录延伸过程中可磷酸化RNA Pol II大亚基CTD上第2位丝氨酸、负性转录延伸因子DSIF和NELF以及组蛋白H1，克服转录延伸过程中负性延伸因子的阻抑作用，刺激全长mRNA的转录。除了作为细胞内绝大多数基因转录所必须的基本转录因子，P-TEFb还是HIV-1转录复制过程中必不可少的宿主细胞因子之一，并且与心肌肥大、癌症等疾病的发病机理相关。本实验室前期研究已揭示了P-TEFb复合物活性调控的分子机制，即信号诱导可同时激活细胞内Ca<sup>2+</sup>—calmodulin—PP2B和PP1a信号通路，通过协同作用使Cdk9-T186位点去磷酸，导致P-TEFb从无转录活性的7SK snRNP复合物中释放。释放的P-TEFb经Cdk9-T186位点的重磷酸化和募集至启动子区，才能有效地促进基因转录延伸的进行。因此，除解离释放与重磷酸化之外，P-TEFb在启动子区的募集可能也决定着整个转录延伸的进行。目前，在细胞内已经发现了两类的转录因子参与了P-TEFb募集工作，第一类是一些基因特异性的转录因子，如p53, NF- $\kappa$ B, TIF1 $\gamma$ 等。第二类是通用型基本转录因子，现阶段认为Brd4是唯一的募集P-TEFb通用型转录因子。最近研究发现Brd4控制的P-TEFb募集在调控信号诱导基因转录延伸中扮演关键角色，但是其具体机制还不是很清楚。

本文通过大量的文献调研和实验摸索对已报道的核抽提方法进行有目的的改进，建立一种新的核分级抽提方法，使其可以有效地将细胞内可溶蛋白（以游离形式存在于细胞的胞质或者核质中）与不可溶蛋白（在细胞内与染色质直接或者间接结合的蛋白）分离开。利用此方法研究发现，静息状态下绝大部分的Brd4都“停泊”在染色质上，并证明该现象普遍存在于哺乳动物细胞。采用UV和HMBA这两种经典的处理方式对细胞进行刺激，发现信号刺激会激活乙酰化酶

(HDAC) 依赖性的信号途径, 使组蛋白H4 K5/8Ac去乙酰化。那些原本与染色质结合紧密的Brd4变得松动, 部分从染色质上解离。解离的游离态Brd4选择性地结合Cdk9-T186已被重新磷酸化的游离P-TEFb, 通过调控有转录活性的P-TEFb在启动子区的募集来控制可诱导基因的转录延伸。用组蛋白去乙酰化酶抑制剂 (HDACi) 抑制组蛋白的去乙酰化可以使Brd4与染色质相互作用加强, 抑制Brd4从染色质上的解离, 从而抑制Brd4对P-TEFb的募集作用, 进而阻滞HMBA对转录延伸的激活。这表明, 在应激条件下, 细胞通过调节组蛋白乙酰化水平来控制Brd4从染色质上的解离及其对P-TEFb的募集, 是调控应激基因转录表达的重要机制。结合前文报道, 我们提出相应的分子模型, 解释外界信号诱导P-TEFb从无活性复合物释放和诱导Brd4从染色质解离的双重作用, 阐述了解离的Brd4介导P-TEFb在启动子区的应激募集, 从而刺激应激性基因转录表达的信号和分子机制。

**关键词:** Brd4; 转录延伸; P-TEFb; 组蛋白修饰; 转录募集; 组蛋白去乙酰化; HDAC 抑制剂; RNA 聚合酶 II; HIV-1; 细胞周期



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.

厦门大学博硕士学位论文摘要库