

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21620070153819

UDC _____

廈門大學

博 士 学 位 论 文

同源异型蛋白 (homeoprotein) 细胞核定位的分子机理研究

Mechanisms of nuclear localization of homeoproteins

作者姓名: 林文波

指导教师姓名: 陶涛 教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2010 年 06 月

论文答辩时间: 2010 年 07 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2010 年 07 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）：

摘要

同源异型蛋白是重要的转录因子，在胚胎发育过程中调节细胞增殖与分化，器官系统发生与发育等生理过程。这类蛋白质都含有同源异型结构域，该结构域组成 α 螺旋-转角- α 螺旋结构，结合 DNA，启动或抑制下游基因的表达。

同源异型蛋白需要定位在细胞核内才能发挥其调控转录的能力。蛋白质入核是细胞重要的生命活动之一，这一过程需要核质转运体系的参与，包括核质转运受体，Ran 蛋白循环体系以及能量供应体系。核质转运受体结合底物上的核定位信号(NLS)，将底物转运到细胞核内。同源异型结构域可以作为核定位信号，介导同源异型蛋白质在细胞核内定位。

本研究系统研究了小鼠同源异型蛋白Arx (Aristaless-related Homeobox) 和Nkx2.2 细胞核定位的分子机理。Arx蛋白是paired-like同源异型蛋白质成员之一，调节胰腺、端脑等组织结构的发育过程。Arx蛋白含有两个核定位信号，分别位于氨基酸 82-89 位(NLS1)和氨基酸 327-388 位(NLS2)。在体外，Arx的第一个核定位信号可以结合 importin $\alpha 3$ 和importin $\alpha 5$ (之后importin简称为 imp)。体外入核试验中，纯化的His₆- Δ NLS2-Arx-EGFP蛋白可以通过imp α/β 途径定位到细胞核，这一过程依赖imp $\alpha 3$ 和imp $\alpha 5$ ，不依赖imp $\alpha 1$ 。用imp α/β 途径抑制物Bimax2 和 Δ NLS2-Arx-EGFP的表达质粒共转染NIH3T3 细胞， Δ NLS2-Arx-EGFP蛋白在细胞内的定位从细胞核转移到细胞质。这些实验结果证明Arx的第一个核定位信号是经典类型的核定位信号。Arx的NLS1 的活性主要依赖于其上的碱性氨基酸K84 和R87；R86 对NLS1 的活性只有微弱的影响。

Δ NLS1-Arx 突变蛋白在体内与体外都可以结合 imp $\beta 1$ 、imp 9 和 imp 13，但与 imp $\beta 1$ 的结合能力最强，而且这种结合会被 RanGTP 阻止，说明 Arx 蛋白确实是 imp $\beta 1$ 、imp 9 和 imp 13 的转运底物。体外入核实验中，imp $\beta 1$ 、imp 9 和 imp 13 都可以通过 Arx 的第二个核定位信号转运 Δ NLS1-Arx 蛋白进入 HeLa 细胞的细胞核，其中 imp $\beta 1$ 的转运活性最高。在 Arx 的 NLS2 上，R382 是其中关键的位点， Δ NLS1/R382A-Arx 突变蛋白主要定位在细胞质，它与 imp $\beta 1$ 、imp 9 和 imp 13 的结合能力也明显减弱。利用 RNAi 技术降低细胞内 imp $\beta 1$ 的表达量，会造成 Δ NLS1-Arx-EGFP 蛋白错误的定位在细胞质。

这些结果证明 Arx 的第二个核定位信号主要通过 imp β 1 来行使功能。

Nkx2.2 属于 NK2 同源异型蛋白亚家族，它可以调节胰腺以及神经管的发育过程。Nkx2.2 的同源异型结构域两端各有一个碱性氨基酸簇，分别命名为 nBC1 和 nBC2，它们互相依赖行使完整的核定位功能，单独缺失任意一个片段都会影响 Nkx2.2 蛋白的核定位效率。在体外 nBC1 与 nBC2 都可以识别 imp α ，nBC1 识别 imp α 1、imp α 3、imp α 5；nBC2 识别 imp α 3。把 nBC1 或 nBC2 片段分别融合 β -gal-EGFP 蛋白，表达在 NIH3T3 细胞内，可以使 β -gal-EGFP 蛋白的细胞定位从细胞质转移到细胞核，这个核定位过程被 Bimax2 蛋白抑制，说明其依赖 imp α/β 途径，但野生型 Nkx2.2 融合 β -gal-EGFP 构建的蛋白的核定位不受 Bimax2 影响，说明在细胞内，Nkx2.2 主要通过 imp β 途径来实现核定位。野生型 Nkx2.2 可以通过同源异型结构域结合 imp β 1、imp 4、imp 13，这些核质转运受体可以介导 GST-Nkx2.2-EGFP 蛋白进入 HeLa 细胞的细胞核。

以上结果不仅揭示了不同亚家族的同源异型蛋白 Arx 与 Nkx2.2 通过不同的核质转运途径实现细胞核定位，而且证明同源异型结构域同时需要两端的碱性氨基酸簇行使完整的核定位能力；完整的同源异型结构域通过多条 imp β s 介导的途径实现细胞核定位。

关键词：核质转运受体；同源异型结构域；核定位信号；

Abstract

Homeoproteins are important transcription factors for axis pattern, organogenesis, cell proliferation, differentiation and so on. They all contain a homeodomain, which can form HTH (Helix-turn-Helix) motif to bind to DNA, then regulated gene transcription activity. The nucleocytoplasmic shuttle of transcription factors is a conserved mechanism to fine-tune their activity. It is a complex process for nuclear translocation of macromolecules, which need the participation of transport receptors, cargos and other components, and it is energy dependent.

Arx, belonging to the paired-like homeoproteins, is required for the development of pancreas and central nervous system (CNS). It has two functional nuclear localization signals (NLSs), NLS1 is located at amino acid 82-89, and NLS2 at 327-388, the latter one is overlapping with homeodomain. NLS1 is a classical NLS, its nuclear localization activity is blocked by Bimax2, a specific inhibitor for import α/β pathway. Moreover, NLS1 is recognized by import $\alpha 3$, import $\alpha 5$ but not import $\alpha 1$ *in vitro*, and import $\alpha 3/\beta 1$ or import $\alpha 5/\beta 1$ heterodimer is responsible for nuclear translocation of Arx via NLS1 in nuclear import assay. It is further demonstrated that K84 and R87 are important for the activity of NLS1.

Import of Arx via NLS2 is mediated by several pathways. Using an *in vitro* nuclear import assay, we show that import of Arx via NLS2 can be mediated by import $\beta 1$, import 9, or import 13, with binding being strongest to import $\beta 1$. All binding is sensitive to RanGTP. Experiments based on precise domain deletions indicate that NLS2 binds import $\beta 1$, import 9, and import 13 and includes both an importin binding subdomain and a regulatory subdomain with arginine residues being important for function. Moreover, Arx can be co-precipitated with these importins when NLS2 is present. Although nuclear import of Arx can be mediated by these three importin β s, import $\beta 1$ seems to play the major role judging from *in vivo*. small interfering RNA ablations and

the *in vitro* import assay. This is the first evidence to show the role of imp β 1 in nuclear import of paired-type homeodomain proteins. We propose a novel and possibly quite general mechanism for nuclear import of paired-type homeodomain proteins which is critical for development.

Nkx2.2, belonging to the NK2 homeodomain transcription factors, is also critical for the development of CNS and pancreas. There are two basic amino acid clusters located at each terminus of homeodomain, named nBC1 and nBC2. In this study, it is demonstrated that either nBC1 or nBC2 is able to interact with imp α isoforms, nBC1 is recognized by imp α 1, imp α 3 and imp α 5, and nBC2 recognized by imp α 3 only *in vitro*. When fused with β -gal-EGFP, respectively, they both induced the nuclear accumulation of chimeras proteins, and this process is dependent on imp α/β heterodimer, because it is blocked by Bimax2. Nevertheless, the nuclear import of wild type nkx2.2- β -gal-EGFP is not affected by Bimax2. It suggested that members of imp β were required, but not classical imp α/β pathway. Moreover, it is proved that imp β 1, imp 4, imp 13 can interact with Nkx2.2 via homeodomain and mediate its accumulation in nucleus in nuclear import assay.

The results shown that nuclear translocation of different homeoproteins are mediated by multiple but different imp β s pathway, and need the present of an intact homeodomain.

Key Words: Importin; NLS; Homeodomain;

目录

第一部分 前言

一、 文献综述

1.1 同源异型蛋白	1
1.2 蛋白质入核的分子机理	2
1.3 同源异型蛋白的核定位研究进展	4
1.4.1 Arx (Aristaless-Related homeobox) 蛋白	6
1.4.2 Arx 在胰腺发育中的功能	7
1.4.3 Arx 在肌肉发育中的功能	7
1.4.4 Arx 在脑发育中的功能	8
1.4.5 Arx 与疾病	8
1.5.1 Nkx2.2 蛋白质	9
1.5.2 Nkx2.2 在神经系统发育中的功能	9
1.5.3 Nkx2.2 在胰腺发育中的功能	10
1.6 Imp 13 蛋白研究进展	11

第二部分 材料与方法

二、 实验材料

2.1 实验材料与试剂

2.1.1 抗体列表	13
2.1.2 细胞列表	13
2.1.3 药品与试剂列表	13

2.2 仪器设备

2.2 仪器设备	14
----------------	----

2.3 实验方法

2.3.1 突变载体构建	15
2.3.2 Western blotting (免疫印迹分析)	16
2.3.3 GST标签蛋白的表达纯化	16
2.3.4 His标签蛋白的纯化	17

2.3.5 细胞培养与转染	18
2.3.6 细胞染色	19
2.3.7 体外入核实验	20
2.3.8 入核动力学实验	21
2.3.9 细胞裂解	21
2.3.10 GST pull down 实验	22
2.3.11 免疫共沉淀	22
2.3.12 RanGTP 抑制结合实验	23
2.3.13 酵母双杂交	23
2.4 质粒总结表	26

第三部分 结果

第一章 酵母双杂交结果

3.1 c-imp 13 结合 Arx 与 Nkx2.2	30
------------------------------	----

第二章 Arx 核定位机理研究

3.2.1 Arx 上有两个核定位信号(NLS)	31
3.2.2 Arx NLS2 结合 imp β s, 与 imp β 1 结合能力最强	34
3.2.3 在体外 Imp β s 介导 Arx 通过 NLS2 入核的过程	35
3.2.4 Arx 在体外入核过程中主要依赖 imp β 1	36
3.2.5 Arx BC2 上的 R382 是 NLS2 活性的关键位点	42

第三章 Arx NLS1 的入核机制

3.3.1 Arx 通过 NLS1 的入核过程主要由 imp α/β 二聚体介导	46
3.3.2 Arx 的 NLS1 可以被 imp α 3, imp α 5 识别	49
3.3.3 Imp α 3/ β 1 和 imp α 5/ β 1 可以介导 Δ NLS2-Arx 蛋白入核	51
3.3.4 Arx 的 NLS1 上碱性氨基酸的功能研究	52

第四章 Nkx2.2 的入核研究

3.4.1 Nkx2.2 同源异型结构域两端各有一个核定位信号	54
3.4.2 Nkx2.2 的核定位信号可以被不同的 imp α s 识别	55
3.4.3 Nkx2.2 核定位信号上碱性氨基酸突变对蛋白核定位效率的影响	60

3. 4. 4 Nkx2.2 同源异型结构域由不同 $\text{imp } \beta$ 识别并携带入核..... 63

第四部分 讨论

4 讨论..... 66

参考文献

致谢

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Table of Content

The First Part: Review

1 Introduction

1.1 The homeodomain proteins	1
1.2 The overview of nuclear transport of macromolecules	2
1.3 The overview of nuclear translocation of homeoproteins	4
1.4.1 Arx (Aristaless-Related homeobox) protein.....	6
1.4.2 The function of Arx during pancreas development.....	7
1.4.3 The function of Arx during muscle development	7
1.4.4 The function of Arx during CNS development	8
1.4.5 Arx and Diseases	8
1.5.1 Nkx2.2 protein	9
1.5.2 The function of Nkx2.2 during CNS development	9
1.5.3 The function of Nkx2.2 during pancreas development.....	10
1.6 The overview of imp 13 protein	11

The Second Part: Materials and Methods

2 Materials

2.1 Reagent

2.1.1 The list of antibodies.....	13
2.1.2 The list of cell lines.....	13
2.1.3 The list of Reagents	13

2.2 Apparatuses

2.2 Apparatuses.....	14
----------------------	----

2.3 Methods

2.3.1 Construct of mutant proteins	15
2.3.2 Western blotting	16
2.3.3 Expression and purification of GST tag proteins in E.coli.....	16
2.3.4 Expression and purification of His tag proteins in E.coli	17

2.3.5 Cell culture and transfection	18
2.3.6 Indirect immunofluorescence staining	19
2.3.7 Nuclear import assay	20
2.3.8 Kinetic Assay	21
2.3.9 Preparation of Cell Lysates	21
2.3.10 GST pull down	22
2.3.11 Co-immunoprecipitation	22
2.3.12 RanGTP Binding Assay	23
2.3.13 Yeast two Hybrid	23
2.4 The list of plasmids	26

The Third Part:Results

Chapter I The Result of Yeast Two Hybrid

3.1 The interaction of c-imp 13 with Arx and Nkx2.2	30
---	----

Chapter II The mechanism of Arx nuclear transport via NLS2

3.2.1 Arx has two functional NLSs	31
3.2.2 Arx binding to imp β s ,strongest to imp β 1 via NLS2	34
3.2.3 Imp β s mediate Arx accumulation in nucleus via NLS2	35
3.2.4 The nuclear import of Arx mainly depends on imp β 1	36
3.2.5 R382 of Arx is critical for activity of NLS2	42

Chapter III The mechanism of Arx nuclear transport via NLS1

3.3.1 Nuclear import of Arx via NLS1 depends on imp α/β Heterodimer	46
3.3.2 Arx interact with imp α 3 and imp α 5 via NLS1	49
3.3.3 Imp α 3/ β 1 and imp α 5/ β 1 are responsible for nuclear import of Δ NLS2-Arx	51
3.3.4 The function of basic amino acid in NLS1	52

Chapter IV The mechanism of Nkx2.2 nuclear accmulation

3.4.1 Nkx2.2 has NLSs at both terminus of its homeodomain	54
3.4.2 Nkx2.2 can bind to imp α isoforms	55

3.4.3 The Function of Basic amino acid in nBC1 and nBC260

3.4.4 Imp β s recognizes the homeodomain of Nkx2.2 and induced Nuclear accumulation in permeabilized HeLa cell63

The Fouth Part Discussion and Conclusion

4.1 Discussion66

Reference

Acknowledgements

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第一部分 前言

1.1 同源异型蛋白

同源异型蛋白是重要的转录因子，调节胚胎发育的各个生理过程 [1-4]。同源异型蛋白都含有同源异型结构域，该结构域由 60 个左右的氨基酸残基构成，氨基端形成臂结构，羧基端形成三个 α 螺旋，其中 α 螺旋 I 与 α 螺旋 II 呈反平行排列， α 螺旋 III 几乎垂直横向置于 α 螺旋 I 与 α 螺旋 II 之上。 α 螺旋 II 与 α 螺旋 III 及其连接片段构成 α 螺旋-转角- α 螺旋结构 [5, 6]（图 1）。根据同源异型结构域序列的同源性与蛋白上存在的其他特异性结构，可以将同源异型蛋白分成 Prd, Pou, Lim, HOX 等亚家族 [7]。

同源异型结构域分别通过氨基端臂与 α 螺旋 III 识别 DNA 的小沟与大沟，大部分同源异型蛋白的识别序列都包含 5'TAAT'3 的核心区 [8-10]；它与 DNA 的识别能力受到多个水平的调节：①同源异型结构域的氨基酸特异性可以调节识别的 DNA 序列，当同源异型蛋白 *Engrailed* 的同源异型结构域的第 50 位氨基酸为谷氨酰胺时，它识别 5'TAATTA'3 的 DNA 序列；突变成赖氨酸后，识别序列变成 5'TAATTC'3 [11]；②当同源异型蛋白结合共调节因子 PBX 时，同源二聚体可以识别更长的 DNA 序列，包括一个 5'TGATTGAT'3 核心区 [12, 13]；③磷酸化修饰可以改变同源异型结构域与 DNA 的亲合力，HOXA9 丝氨酸 204 位被 PKC 激酶磷酸化会减弱它与 DNA 的结合 [14]；Nkx2.5 丝氨酸 163 位被 CKII 激酶磷酸化会增强它与 DNA 的结合 [15]；PRH（Proline-rich homeodomain）丝氨酸 163 位与 177 位两个位点的磷酸化状态可以作为分子开关调控它是否与 DNA 结合 [16]。

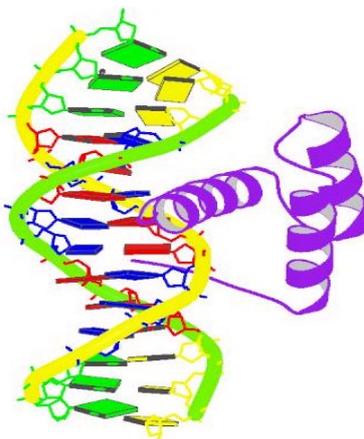


图 1 Aristaless 蛋白同源异型结构域与 DNA 复合体的晶体结构

Fig 1 Crystal Structure of Aristaless Homeodomain in complex with DNA

Miyazono et al., EMBO J,2010.

1.2 蛋白质入核的分子机理

真核细胞存在核膜，将细胞分成细胞质与细胞核两个部位，蛋白质合成与基因转录分别在两个部位进行，这提高了细胞调控生理过程的能力，但同时带来了 mRNA 与蛋白质组分核质穿梭的问题。研究证明，在核膜上存在核孔复合体(NPC)，它由几十种蛋白组合成庞大的复合体锚定在核膜上，形成贯穿核膜的孔径结构，是细胞内成分进出细胞核的通道 [17]。细胞内成分通过两种运输方式穿越核孔复合体，一种为自由扩散：无机离子，小分子蛋白质通过这一方式出入核，能自由穿越 NPC 的物质的分子量上限大约为 60kD [18]；另一种为主动运输：是大分子物质出入细胞核的方式，需要核质转运受体 (importin)，Ran 蛋白循环体系以及能量供应 [19]。

核质转运受体包括 importin α 家族与 importin β 家族，其中 importin β 家族根据转运底物的方向可以分成入核转运受体 (importin) 和出核转运受体 (exportin) [20]。Importin α 家族蛋白可以分成三个结构单元：结合 imp β 的氨基端结构域 (importin β binding domain, IBB)；结合出核转运受体 CAS 的羧基端酸性结构域；和一个 NLS 结合结构域，该结构域由十个串联重复基序 (tandem armadillo repeats, ARM) 构成，形成一个右手超螺旋的结构，可以结合经典类型的核定位信号 [21-26]，但是 importin α 蛋白需要通过 importin β

才能将底物转运入核。Importin β 家族蛋白是直接的核质转运受体，在大分子物质出入核过程中发挥着重要的功能，它们的蛋白结构都有氨基端的 Ran 蛋白结合结构域；羧基端的底物结合结构域，该结构域由 18-21 个左右的 HEAT repeat 组成，具有良好的延展性，可以通过构象变化来识别不同的底物；此外 importin β 蛋白上还存在氨基酸序列可以结合富含 FG-repeat 的核孔蛋白 [27-32]。

蛋白质入核需要核定位信号介导。核定位信号可以分为两种，一种为经典类型的核定位信号，又可以细分成两类，第一类的代表是SV40 large T抗原上的核定位信号，由 4-6 个连续的碱性氨基酸构成，序列为PKKKRKV [33]，另一类的代表是nucleoplasmin上的核定位信号，其特点是两个碱性氨基酸簇间插入 10-12 个的氨基酸片段，序列为KRPAATKKAGQAKKKKLDK [34]。在细胞质中，imp α 、imp β 和转运底物形成异源三聚体，通过imp β 锚定到核孔复合体上 [32]，并从核孔复合体的细胞质面进入细胞核面。在细胞核内，RanGTP 蛋白结合imp β ，诱导imp β 蛋白的构象变化 [35]，使转运底物与imp α 从复合体上解离。细胞核内的imp α 通过结合CAS-RanGTP返回细胞质 [26]；imp β -RanGTP可以直接结合核孔复合体蛋白并返回细胞质，在细胞质内，imp β -RanGTP和CAS-RanGTP上结合的RanGTP被RanGAP1 水解成RanGDP；RanGDP通过结合NTF2 蛋白返回细胞核，在细胞核内，RanGDP被RanGEF 催化形成RanGTP [36]，开始新一轮的运载过程（图 2）。

除了经典的核定位信号外，也发现了许多不符合经典核定位信号规律的入核信号，例如 BIB 结构域，M9 序列[37, 38]，它们可以直接被 imp β 蛋白识别并转运入核。通过非经典入核信号实现核定位的蛋白有很多，比如 imp β 1 转运 Cdc7, SRY, imp 7 可以转运 ERK2 (extracellular signal-regulated kinase)，imp 4 转运 VDR (Vitamin D receptor) 和 TP2 (Transition Protein 2)，imp 11 识别 UbcM2；imp 9 可以转运多个底物入核，包括 rPL18a, rPL6, rPL4；同一个蛋白也可以被多个 importin β 蛋白家族成员识别，例如组蛋白(histone)，可以同时被 imp β 1、imp 5、imp 7、transportin 识别，并转运入核。Imp13 是一个特殊的 importin β 蛋白，它既可以介导 NF-YB/NF-YC 二聚体、Pax6、Ubc9、GR 等蛋白质入核，也可以介导 eIF1A 蛋白质出核。除 imp 13 外，目前还发

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