

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 21720090153557

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

**MK2 磷酸化 IscU 及其功能的影响**

**MK2 phosphorylates IscU and affects its function**

田 丽 丽

指导教师姓名: 韩 家 淮 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 时 间: 2012 年 06 月

学 位 授 予 日 期:        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( 韩家淮 )课题(组)的研究成果,获得( 韩家淮 )课题(组)经费或实验室的资助,在( 韩家淮 )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.....	11
<b>第一章 前言</b> .....	1
<b>1.1 MK2 蛋白激酶</b> .....	1
1.1.1 p38 蛋白激酶家族简介.....	1
1.1.2 MK2 蛋白激酶.....	4
1.1.3 p38 信号通路在果蝇中的研究.....	9
<b>1.2 铁硫中心簇</b> .....	9
1.2.1 铁硫中心簇简介.....	9
1.2.2 铁硫中心簇的生物合成.....	10
1.2.3 IscU 功能研究.....	11
<b>1.3 线粒体在果蝇寿命中的功能</b> .....	13
1.3.1 线粒体功能在衰老过程中的变化.....	14
1.3.2 线粒体氧化压力和长寿的关系.....	14
1.3.3 适当的敲低电子传递链 (electron transport chain ETC) 基因 能够延长果蝇的寿命.....	15
1.3.4 饮食, 线粒体呼吸链活性和长寿.....	15
1.3.5 小结.....	16
<b>第二章 材料和方法</b> .....	17
<b>2.1 实验相关药品和试剂</b> .....	17
<b>2.2 实验室主要仪器</b> .....	17
<b>2.3 DNA 相关实验和方法</b> .....	18
2.3.1 质粒载体.....	18
2.3.2 大肠杆菌感受态细胞的制备和质粒转化.....	24
2.3.3 质粒 DNA 的提取.....	25

2.3.4 质粒 DNA 的工具酶处理.....	26
2.3.5 DNA 的回收和纯化.....	27
2.3.6 DNA 连接反应.....	28
2.3.7 PCR 相关实验.....	28
2.3.8 mRNA 表达水平的检测.....	31
<b>2.4 细胞相关实验</b> .....	<b>32</b>
2.4.1 细胞培养.....	32
2.4.2 瞬时转染.....	33
2.4.3 病毒包装、感染及稳定细胞系的筛选.....	34
<b>2.5 蛋白质相关实验方法</b> .....	<b>35</b>
2.5.1 免疫共沉淀.....	35
2.5.2 免疫印迹.....	35
2.5.3 CIAP 处理实验.....	37
2.5.4 大肠杆菌蛋白表达系统.....	37
2.5.5 蛋白激酶测定实验.....	38
2.5.6 等电聚焦和免疫印记.....	39
<b>2.6 果蝇相关技术</b> .....	<b>39</b>
2.6.1 果蝇饲养及果蝇基因型.....	39
2.6.2 果蝇食物配制方法 (1 L) .....	40
2.6.3 果蝇基因组 DNA 的提取.....	40
2.6.4 反向 PCR (Inverse PCR) .....	40
2.6.5 果蝇 RNA 提取.....	41
2.6.6 突变果蝇株的建立.....	42
2.6.7 转基因果蝇株的建立.....	43
2.6.8 果蝇线粒体的提取.....	44
2.6.9 果蝇寿命的计量.....	44
<b>第三章 结果与讨论</b> .....	<b>45</b>
3.1 dMK2 可以与 discU 相互作用, 并且能够在体外磷酸化 discU 的第 20	

<b>位丝氨酸</b> .....	45
3.1.1 dMK2 可以与 dIscU 相互作用.....	45
3.1.2 dMK2 可以在体外磷酸化 dIscU 的第 20 位丝氨酸.....	45
3.1.3 dMK2 能够在体内磷酸化 dIscU.....	48
<b>3.2 dMK2 与 dIscU 突变果蝇株的构建, 以及相关的恢复突变转基因果蝇株的建立</b> .....	49
3.2.1 dMK2 与 dIscU 突变果蝇株的构建.....	49
3.2.2 dMK2 恢复突变转基因果蝇株的建立.....	50
3.2.3 dIscU 相关恢复突变转基因果蝇株的建立.....	51
<b>3.3 dMK2 突变和 dIscU-S20A 突变能够影响线粒体呼吸链中 complex I 的活性, 而非 aconitase 活性</b> .....	52
3.3.1 dMK2 突变和 dIscU-S20A 突变不会影响 aconitase 的活性.....	52
3.3.2 dMK2 突变和 dIscU-S20A 突变能够提高 complex I 的活性.....	54
3.3.3 过表达 dMK2 不会降低 complex I 的活性.....	55
3.3.4 热激不会引起 dMK2 突变果蝇株中 complex I 活性的变化.....	56
<b>3.4 dMK2 突变果蝇株与 dIscU-S20A 果蝇株寿命较野生型果蝇短</b> .....	58
<b>3.5 dIscU-S20A 突变对氧化压力没有贡献</b> .....	59
3.5.1 dMK2 突变株对 paraquat 敏感, dIscU-S20A 恢复突变果蝇株无表型.....	60
3.5.2 dMK2 突变株和 dIscU-S20A 恢复突变果蝇株对 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 引起的氧化压力均无表型.....	61
<b>3.6 哺乳动物中 MK2 和 IscU 的关系</b> .....	63
3.6.1 hMK2 能够与 hIscU2 相互作用.....	63
3.6.2 p-mIscU 磷酸化抗体的检测.....	64
3.6.3 hMK2 能够磷酸化 hIscU2.....	65
3.6.4 mMK2 的缺失能够影响 MEF 细胞中 complex I 的活性, 但不会影响 aconitase 的活性.....	69
<b>3.7 讨论</b> .....	70

参考文献.....	72
图表索引.....	84
缩略语及中英文对照.....	87
致 谢.....	91

厦门大学博硕士论文摘要库

## TABLE OF CONTENT

<b>ABSTRACT (IN CHINESE)</b> .....	I
<b>ABSTRACT (IN ENGLISH)</b> .....	II
<b>CHAPTER 1 Introduction</b> .....	1
<b>1.1 MK2 Protein Kinase</b> .....	1
1.1.1 Introduction of p38 protein kinase family .....	1
1.1.2 MK2 protein kinase.....	4
1.1.3 The study of p38 signal pathway in <i>Drosophila</i> .....	9
<b>1.2 Iron-Sulfur Cluster</b> .....	9
1.2.1 Introduction of Iron-Sulfur Cluster .....	9
1.2.2 Biosynthesis of Iron-Sulfur Cluster .....	10
1.2.3 The function of IscU .....	11
<b>1.3 The Function Of Mitochondrial In <i>Drosophila</i> Lifespan</b> .....	13
1.3.1 The change of mitochondrial function in aging .....	14
1.3.2 The relationship between oxidative stress and lifespan .....	14
1.3.3 Knock down the gene of electron transport chain (ETC) can extend <i>Drosophila</i> lifespan.....	15
1.3.4 Diet, mitochondrial electron transport chain activity and lifespan .....	15
1.3.5 Summary .....	16
<b>CHAPTER 2 Materials and Methods</b> .....	17
<b>2.1 Chemicals and reagents</b> .....	17
<b>2.2 Instruments</b> .....	17
<b>2.3 Experiments and methods for DNA</b> .....	18
2.3.1 Plasmids vector .....	18
2.3.2 Preparation of competent cells and transformation .....	24
2.3.3 Preparation of plasmid DNA .....	25
2.3.4 Enzymatic treatments of plasmid DNA .....	26
2.3.5 Recovery and purification of DNA.....	27



2.3.6 Ligation .....	28
2.3.7 PCR experiments .....	28
2.3.8 Detection of miRNA expression level .....	31
<b>2.4 Experiments and methods for cell .....</b>	<b>32</b>
2.4.1 Cell culture.....	32
2.4.2 Transient transfection.....	33
2.4.3 Virus packaging ,infection and stable line establishment .....	34
<b>2.5 Experiments and methods for protein .....</b>	<b>35</b>
2.5.1 Co-Immunoprecipitation.....	35
2.5.2 Western blot .....	35
2.5.3 CIAP treated experiments .....	37
2.5.4 <i>E.coli</i> expression system.....	37
2.5.5 <i>In vitro</i> kinase assay .....	38
2.5.6 Isoelectric focusing and immunoblotting.....	39
<b>2.6 Experiments and methods for <i>Drosophila</i> .....</b>	<b>39</b>
2.6.1 Fly keeping and fly stocks .....	39
2.6.2 Fly food (1L).....	40
2.6.3 Preparation of fly genome DNA .....	40
2.6.4 Inverse PCR .....	40
2.6.5 Preparation of fly RNA.....	41
2.6.6 Methods for mutant fly lines.....	42
2.6.7 Methods for transgenic flies.....	43
2.6.8 Preparation of fly mitochondrial protein samples.....	44
2.6.9 Fly lifespan.....	44
<b>CHAPTER 3 Results and Discussion.....</b>	<b>45</b>
<b>3.1 dMK2 can interact with dIscU, and phosphorylate dIscU at Ser20.....</b>	<b>45</b>
3.1.1 dMK2 can interact with dIscU .....	45
3.1.2 dMK2 can phosphorylate dIscU at Ser20 <i>in vitro</i> .....	45

3.1.3 dMK2 can phosphorylate dIscU <i>in vivo</i> .....	48
<b>3.2 Preparation of dMK2 and dIscU related mutant and transgenic flies....</b>	<b>49</b>
3.2.1 Preparation of dMK2 and dIscU mutant flies .....	49
3.2.2 Preparation of dMK2 rescue transgenic flies.....	50
3.2.3 Preparation of dIscU related transgenic flies .....	51
<b>3.3 dMK2 mutant flies and dIscU-S20A transgenic flies can impact mitochondrial complex I activity but not aconitase activity .....</b>	<b>52</b>
3.3.1 dMK2 mutant and dIscU-S20A mutant can not impact aconitase activity.....	52
3.3.2 dMK2 mutant and dIscU-S20A mutant can enhance the mitochondrial complex I activity .....	54
3.3.3 dMK2 overexpression can not decrease complex I activity .....	55
3.3.4 The complex I activity of dMK2 mutant flies can not be induced by heatshock at 37°C .....	56
<b>3.4 dMK2 mutant and dIscU-S20A mutant flies have a shorter lifespan compared to WT and rescue flies.....</b>	<b>58</b>
<b>3.5 dIscU-S20A mutant has no contribution to oxidative stress .....</b>	<b>59</b>
3.5.1 dMK2 mutant but not IscU-S20A mutant flies are sentivite to paraquat treatment compared to WT and rescue flies.....	60
3.5.2 Both dMK2 mutant and dIscU-S20A mutant flies have no phenotype under H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> treatment compared to WT and rescue flies .....	61
<b>3.6 The relationship between MK2 and IscU in mammlian cells .....</b>	<b>63</b>
3.6.1 hMK2 can interact with hIscU2 after overexpression .....	63
3.6.2 Evaluation of p-mIscU antibody .....	64
3.6.3 hMK2 can phosphorylate hIscU2 .....	65
3.6.4 Knock out of mMK2 in MEF cell can enhance the complex I activity but not aconitase activity .....	69
<b>3.7 Discussion.....</b>	<b>70</b>

<b>Reference</b> .....	72
<b>Index of figures and tables</b> .....	84
<b>Abbreviations</b> .....	87
<b>Acknowledgement</b> .....	91

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 摘要

p38信号通路在调控细胞应激反应过程中的作用是无法代替的，在哺乳动物中已经有相当大量的研究来揭示其作用机理，而在果蝇中这一通路的研究尚不透彻。本论文着重研究了果蝇中p38的下游激酶dMK2，前人的研究认为MK2在细胞迁移、细胞因子的产生、转录调控、细胞周期调控中都有很重要的功能。而我们的研究发现了一个全新的底物IscU，我们证实了在果蝇中dMK2能够与dIscU相互作用，并且在体外能够磷酸化dIscU的第二十位丝氨酸位点，在体内对dIscU的磷酸化也有一定程度的影响。虽然我们发现dMK2不是能够磷酸化dIscU的唯一激酶，但是我们仍然证明了dMK2缺失突变株果蝇与dIscU磷酸化位点突变株果蝇有着相同的生物学功能和表型，在哺乳动物细胞中我们也看到了相同的表型，这说明MK2对IscU的磷酸化是有功能的。

最后通过我们的实验结果论证，我们认为dMK2作为激酶，能够磷酸化dIscU的第二十位丝氨酸位点，进而可能影响铁硫中心簇的组装或者转运，进一步影响了线粒体呼吸链中complex I的活性，最终可能影响了果蝇的寿命。哺乳动物中的相应实验也得到了相一致的结果，说明MK2对IscU的磷酸化是一个比较保守的生物学过程，不只存在于果蝇中。

关键词：p38；MK2；IscU；磷酸化

## Abstract

The p38 signaling pathway is one of the most important pathways in intracellular signaling transduction. It is well studied in mammalian cell, but not so clear in *Drosophila*, here we try to know more about the p38 signaling pathway in *Drosophila*. We focused on the downstream kinase of p38, dMK2. As we already known, MK2 regulates gene expression at the transcriptional and post-transcriptional level, control cytoskeletal architecture and cell-cycle progression, and are implicated in inflammation and cancer.

Here, We found a new substrate dIscU, which can interacted with dMK2 after overexpression, and can also be phosphorylated by dMK2 at Ser20 *in vitro* and *in vivo*. IscU is one of the scaffold proteins of Iron-sulfur (Fe-S) clusters biosynthesis. Iron-sulfur (Fe-S) clusters are present in more than 200 different types of enzymes or proteins and constitute one of the most ancient, ubiquitous and structurally diverse classes of biological prosthetic groups. Three distinct types of Fe-S cluster assembly machinery have been established in bacteria, termed the NIF, ISC and SUF systems. Along with a few additional components, the ISC system constitutes the eukaryotic mitochondrial machinery for Fe-S cluster biogenesis. IscU is the scaffold protein of ISC system.

We found that even dMK2 was not the only kinase that can phosphorylate dIscU, dMK2 mutant flies had the same biological function and phenotypes as dIscU-S20A mutant flies, such as higher complex I activity and shorter lifespan. The results indicated that dMK2 affected the complex I activity and lifespan may go through the phosphorylation of dIscU at Ser20. Farther more, we found that MK2 can also phosphorylate IscU in mammalian cell, indicated this phosphorylation regulation was a conserved process, not only happened in *Drosophila*.

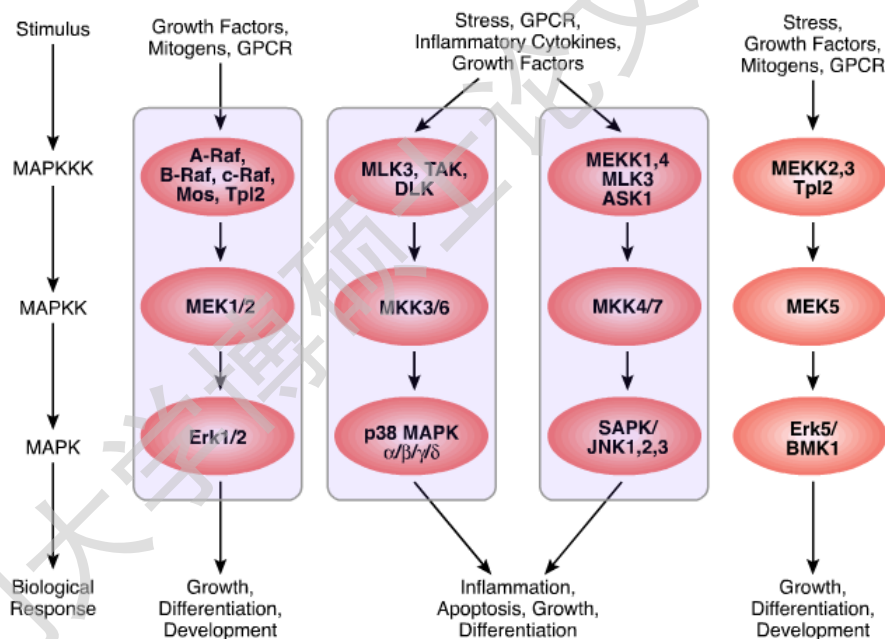
Key words: p38; MK2; IscU; phosphorylation

## 第一章 前言

### 1.1 MK2 蛋白激酶

#### 1.1.1 p38 蛋白激酶家族简介

细胞外信号刺激激活的细胞反应可以由许多条信号通路介导，其中丝裂素活化蛋白激酶（MAPK）家族便是其中之一。MAPK 家族成员都属于丝氨酸/苏氨酸激酶，这个家族的蛋白激酶介导了广泛的胞外信号刺激激活的细胞反应<sup>[1]</sup>，家族中的成员主要分为四个亚族（如图 1.1）：p38 蛋白激酶家族、JNK/SAPK（c-jun N-terminal or stress-activated protein kinases）蛋白激酶家族、ERK（extracellular signal-regulated kinases）蛋白激酶家族和 BMK1（big MAP kinase 1，也称 ERK5）蛋白激酶家族。



(from www.cellsignal.com)

图 1.1: 丝裂素活化蛋白激酶家族级联途径

Fig 1.1: Mitogen-activated protein kinase cascades

#### 1.1.1.1 p38 蛋白激酶家族的结构特征

丝裂素活化蛋白激酶家族都有一个共同的特点，它们的激活都是通过接近激活位点的“T 环结构”(T-loop 或 Loop-12 structure)上的三肽残基“TXY”来完成的，其中的苏氨酸(T)和酪氨酸(Y)磷酸化起着重要的作用。“T 环结构”是决定各种

MAPK 多种蛋白激酶活性的关键结构。其中，X 为隔开两磷酸化位点的任意一种氨基酸，不同 MAPK 亚族间 X 会有所不同，T 环的长度也不完全同。p38 家族的所有成员都具有相同的“TGY”双位点磷酸化模块。

### 1.1.1.2 p38 蛋白激酶的激活

#### (1) 细胞外刺激

p38 信号通路比较保守，从低等到高等的真核生物，p38 的同源基因大多数都已经被确认并克隆出来<sup>[1-4]</sup>。其中芽殖酵母中的 Hog1<sup>[5]</sup>和裂殖酵母中的 Spc1/Sty1<sup>[6]</sup>被认为是 p38 家族的祖先基因，它们在细胞外信号应激反应、渗透压调节和细胞周期调控过程中发挥功能<sup>[7]</sup>。哺乳动物的 p38 也可以被外界环境压力信号激活<sup>[8]</sup>。

自从哺乳动物 p38 被发现在炎症反应中发挥作用后，p38 在免疫系统中的功能被广泛关注。p38 在很多炎症反应中都能够被激活，包括在 LPS 刺激的巨噬细胞中、在 IL-17 刺激的软骨细胞中、在 TNF 刺激的内皮细胞中<sup>[9]</sup>、IL-18 刺激的 U1 单核细胞株中<sup>[10]</sup>、趋化多肽 fMLP (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine) 或 PMA (phorbol myristate acetate) 激活的人嗜中性粒细胞中<sup>[12, 13]</sup> 和被凝血酶刺激的人血小板细胞<sup>[11]</sup>。

在过去的研究中，大量的工作证明了在许多其他系统中 p38 $\alpha$  也能够被激活。生长因子如 GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor)<sup>[14]</sup>、FGF (fibroblast growth factor)<sup>[15]</sup>、促红细胞生长素<sup>[16]</sup>、IL-3、IL-2、IL-17<sup>[17]</sup>、神经生长因子 (nerve growth factor, NGF)<sup>[18, 19]</sup>、类胰岛素生长因子 (insulin-like growth factor, IGF)<sup>[20]</sup>、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)<sup>[21]</sup>、血小板趋化因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)<sup>[22]</sup> 都可以在特定的细胞中激活 p38 $\alpha$  的活性。另外，一些其它刺激也能够激活 p38 $\alpha$ ，包括：转化生长因子  $\beta$  (TGF $\beta$ )<sup>[23]</sup>、G 蛋白偶联受体激活物<sup>[24, 25]</sup>、毒蕈硷激活物<sup>[26]</sup>、血管紧张肽<sup>[27, 28]</sup>、缩胆囊素<sup>[29]</sup>、热激活刺激<sup>[30]</sup>和细胞拉伸<sup>[31]</sup>等。

可见，有很多信号都可以激活 p38 信号通路，但是 p38 信号通路的激活不仅依赖于激活物而且受到细胞类型影响。比如，胰岛素可以在 3T3-L1 脂肪细胞中激活 p38，但是在鸡前脑神经细胞中却能够下调 p38 的活性<sup>[32]</sup>，可见，在这两种细胞中 p38 信号通路发挥着不同的功能。

## (2) p38 蛋白激酶的激活

与所有的 MAPK 家族激酶相同, p38 激酶家族也能够被二级激酶(称为 MAP kinase kinases, MKKs)激活。两种已知的激活 p38 家族激酶的二级激酶是 MKK3 和 MKK6。虽然 p38 的不同亚型间有保守的双磷酸化位点, 但是也存在特定的二级激酶选择性激活现象: MKK3 优先激活 p38 $\alpha$ 、p38 $\gamma$  和 p38 $\delta$ , 而 MKK6 可以激活所有的 p38 四个亚型。除此之外, 也有报道认为 JNK 的上游二级激酶 MKK4 能够在特定的细胞型中辅助激活 p38 $\alpha$  和 p38 $\delta$ <sup>[7]</sup>。

除了通过上游二级激酶的激活, p38 家族激酶还能以二级激酶非依赖的形式, 通过 TAB-1 (transforming growth factor- $\beta$ -activated protein kinase 1 (TAK1)-binding protein) 激活<sup>[33]</sup>, 这种激活是通过 p38 $\alpha$  与 TAB-1 结合后 p38 $\alpha$  的自磷酸化完成的。虽然在 p38 信号传导的途径研究方面取得了一些研究成果(如图 1.2), 但是由于 p38 亚型之间的功能存在交叉而且同源性高, 各个亚型的准确功能还不是很清楚。

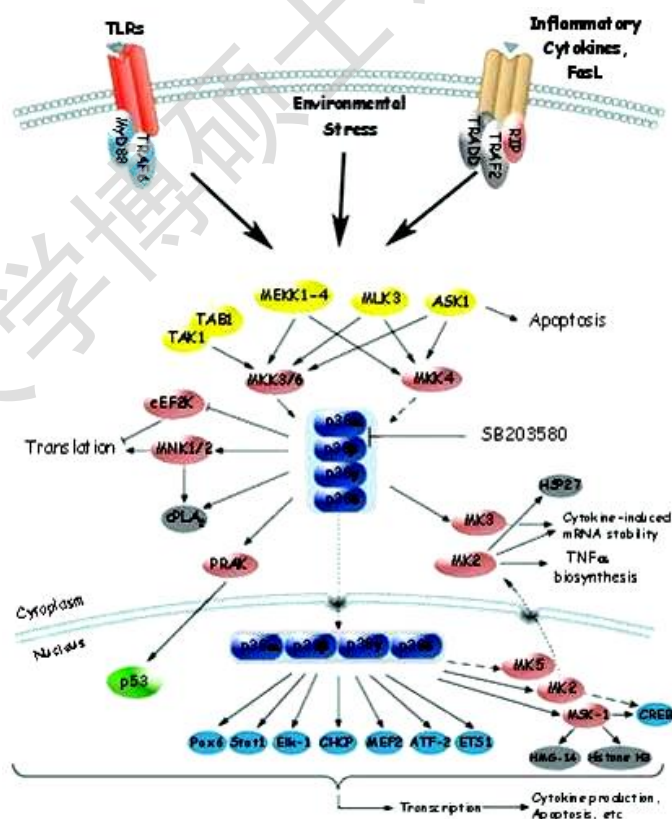


图 1.2: p38 信号通路

Fig 1.2: p38 signaling pathway.



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