

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620071151990

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

TR3 依赖于 TRAP γ 的新功能
——调节内质网应激反应

A novel function of TR3 dependent on TRAP γ
in regulation of ER-Stress response

温 泉

指导教师姓名: 吴 乔 教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2010 年 5 月 日

论文答辩时间: 2010 年 6 月 日

学位授予日期:

答辩委员会主席:

评 阅 人:

2010 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_____教授课题组的研究成果,获得_____教授课题组经费的资助,并在_____教授实验室完成所有的工作。

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2012年7月31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

中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
前 言.....	3
1 孤儿受体 TR3.....	3
1.1 TR3 的发现.....	4
1.2 TR3 的结构和功能区域.....	4
1.3 TR3 的生物学功能.....	6
2 内质网与内质网应激.....	11
2.1 内质网的组分和功能.....	11
2.2 内质网应激.....	13
3 TRAP 蛋白复合体与 TRAP γ 亚基.....	21
4 本文研究的目的和科学意义.....	25
材料和方法	27
1 材料.....	27
1.1 细胞株.....	27
1.2 主要试剂.....	27
1.3 主要仪器.....	28
2 实验方法	29
2.1 细胞培养.....	29
2.2 药物处理.....	30
2.3 串联亲和纯化.....	31
2.4 免疫荧光染色和观察.....	31
2.5 核浆分离.....	32
2.6 蛋白提取与 Western-blotting.....	32
2.7 Co-IP 免疫共沉淀.....	33
2.8 目的蛋白体外诱导和纯化.....	34

2.9 GST-Pull down 实验.....	35
2.10 瞬时转染.....	36
2.11 稳定转染 (脂质体转染).....	37
2.12 RNA 干扰实验.....	37
2.13 细胞凋亡分析.....	38
2.14 mRNA 的提取 (Qiagen 试剂盒) 与反转录.....	38
2.15 RNA 检测实验.....	39
2.16 钙离子浓度活细胞测定.....	40
2.17 目的基因克隆与质粒构建.....	40
结果与分析	42
1 TR3 与 TRAP γ 的相互作用.....	42
2 部分 TR3 与 TRAP γ 共定位于内质网.....	46
3 TR3 与 TRAP γ 相互作用区段分析.....	49
4 TR3 以 TRAP γ 依赖的方式诱发细胞钙库外释.....	53
5 TR3 通过与 TRAP γ 结合上调促凋亡应激蛋白 CHOP 表达.....	58
6 TR3 以 TRAP γ 依赖方式参与内质网应激相关凋亡.....	65
讨论与结论	67
参考文献.....	72
致 谢.....	82

Table of Content

Abstract in Chinese	1
Abstract.....	2
Chapter I Introduction	
1 Nuclear orphan receptor TR3.....	3
1.1 The discovery of TR3	4
1.2 The structure and functional domains of TR3.....	4
1.3 The biological function of TR3.....	6
2 Endoplasmic reticulum and ER-Stress.....	11
2.1 The components and functions of ER	11
2.2 ER-Stress.....	13
3 TRAP complex and TRAP γ subunit.....	21
4 Aim and scientific significance of this study.....	25
Chapter II Materials and Methods	
1 Materials.....	27
1.1 Cell line.....	27
1.2 Main instruments.....	27
1.3 Main reagents.....	28
2 Methods.....	29
2.1 Cell culture.....	29
2.2 Drug treatment.....	30
2.3 Tandem affinity purification.....	31
2.4 Immunofluorescent staining and microscopic observation.....	31
2.5 Preparation of cytosolic and nuclear fractions.....	32
2.6 Protein preparation and Western blotting.....	32
2.7 Co-immunoprecipitation.....	33
2.8 Expression and purification of target protein in vitro.....	34

2.9 GST-Pull down assay.....	35
2.10 Transient transfection.....	36
2.11 Stable transfection.....	37
2.12 RNAi Assay.....	37
2.13 Cell apoptosis analysis.....	38
2.14 Total mRNA extraction and RT-PCR.....	38
2.15 Measurement of cellular RNA level.....	39
2.16 Measurement of Free $[Ca^{2+}]_i$	40
2.17 Target gene cloning and plasmid construction.....	40
Chapter III Results and Analysis	
1 Interaction of TR3 with TRAP γ	42
2 Partly-colocalization of TR3 with TRAP γ	46
3 Analysis of domains for interaction of TR3 with TRAP γ	49
4 Induction of calcium pool leakage by TR3 dependent on TRAP γ	53
5 Increase of CHOP level by TR3 through interaction with TRAP γ	58
6 TR3 involves in ER-Stress related apoptosis.....	65
Chapter IV Discussion and Conclusion.....	67
Reference	72
Acknowledgement	82

摘 要

核受体蛋白 TR3 具有核浆穿梭的功能，TR3 的不同亚细胞定位决定了其发挥不同的生理功能。TR3 转运出核至线粒体启动细胞凋亡的结论，已被广泛地研究报道。然而，最新研究表明在神经母瘤细胞及食道癌细胞系中，凋亡诱导剂 CD437 也能够诱导 TR3 转运至内质网上，诱发钙库耗竭并启动内质网应激相关的细胞凋亡。内质网跨膜蛋白 TRAP 是内质网膜上蛋白转位子的组成部分，与蛋白转运有关；并且能够参与内质网应激引起的未折叠蛋白反应 UPR (Unfolded Protein Response) 中非正常折叠蛋白的输出。尽管两种蛋白都与内质网应激具有一定关联，然而目前并没有文章报导它们之间的相关性。

本文研究中，我们首次发现了 TR3 能够与内质网上的跨膜蛋白 TRAP 复合物的 γ 亚基相互作用。进一步的相互作用区段分析显示，TR3 完整的 LBD 区段以及 TRAP γ C 端的第四跨膜区域和突出胞质区域是二者蛋白结合所必需的。蛋白定位分析表明，凋亡诱导剂 TPA 或 CD437 均能够在 HepG2 细胞中诱导 TR3 转运出核部分定位在内质网，并同时与 TRAP γ 蛋白形成共定位。当转运至内质网后，TR3 不仅能诱导细胞钙库 Ca^{2+} 外释，还能引起内质网应激状态下细胞 CHOP 水平上调，由此增加细胞凋亡的敏感性，并且这些过程都依赖于 TRAP γ 的参与。这些研究结果提示，TR3 促进内质网应激反应并增加肿瘤细胞凋亡敏感性的功能可能通过其转运至内质网与 TRAP γ 结合来实现。

关键词：TRAP γ ；核受体 TR3；CD437；TPA；转运；内质网应激

Abstract

TR3, an orphan receptor, exerts distinct biological functions in cells dependent on its subcellular localization. It has been widely reported that translocation of TR3 to the mitochondria triggers cell apoptosis. However, the latest research shows that upon CD437 treatment, TR3 translocates from the nucleus to the endoplasmic reticulum (ER) in Human neuroblastoma cells and human esophageal squamous carcinoma cells, and then triggers depletion of calcium pool, thereby initiating ER-stress related apoptosis. ER transmembrane proteins TRAPs, which relate with protein translocation, are parts of translocon on ER membrane. They are also involved in the exportation of unfolded or misfolded proteins from ER during UPR (Unfolded Protein Response) induced by ER-stress. Although these two proteins are both involved in ER-stress, whether there has relationship between these two proteins has not been addressed.

In the current study, we identified the interaction between TR3 and the TRAP complex γ subunit. Further analysis showed that an intact LBD of TR3 and the fourth transmembrane domain (TMD4), C terminal cytoplasmic domain of TRAP γ were required for their interaction. We then showed that TR3 partly translocated to the ER when treated with CD437 or TPA in HepG2 cell, where TR3 colocalized with TRAP γ . When TR3 translocated to the ER under ER-stress, Ca^{2+} released from calcium store in the ER and the mRNA levels of CHOP (the ERS protein) were induced, which increased the cellular susceptibility to apoptosis. Interestingly, all of these processes depended on the participant of TRAP γ . Taken together, these results demonstrate that, when translocating to the ER, TR3 would promote the ER-Stress-related response via binding with TRAP γ , thus enhancing the susceptibility of tumor cells to apoptosis under ER-stress.

Key words: TRAP γ , Nuclear receptor TR3, CD437, TPA, Translocation, ER-Stress

前 言

1 孤儿受体 TR3

TR3 (亦称 Nur77, NGFI-B 和 NAK1) 是由定位于人体 12 号染色体长臂上的 13 号基因编码的孤儿受体^[1], 其特异性配体至今尚未发现。作为立早基因 *NR4A1* 编码的产物, TR3 能够以细胞特异的方式被促有丝分裂药物如血清、EGF 或促凋亡药物如 TPA、VP-16 诱导表达^[2], 对调控细胞增殖、分化、凋亡和发育等生理过程起着重要作用。

TR3在结构上具有核受体的典型特征, 属于核受体超家族的成员。核受体超家族成员分为六个亚类^[3]: (1) 能与视黄素X受体 (retinoid X receptor, RXR) 形成异源二聚体的一大类核受体, 包括维生素D受体 (vitamin D receptor, VDR)、甲状腺激素受体(thyroid hormone receptor, TR)、视黄酸受体(retinoic acid receptor, RAR)和过氧化物酶体增殖体激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)等; (2) 形成同源二聚体的核受体, 如RXRs、COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor)和HNF4等; (3) 经典的类固醇受体, 如雄激素受体 (androgen receptor, AR)、雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR)、盐皮质激素受体 (mineralocorticoid receptor, MR) 和雌激素受体相关受体 (estrogenreceptor-related receptors, ERRs) 等; (4) 由TR3 (NR4A1)、Nurr1 (NR4A2) 和NOR1 (NA4A3) 这三个成员组成的可被神经生长因子诱导的NR4A亚族; (5) FTZ-F1 (*Drosophila* Fushi Tarazu Factor-1) 和哺乳动物类固醇因子受体 (steroidogenic factor 1, NR5A1); (6) 上述几组之外的胚胎细胞核因子 (GCNF1 receptor, NR6A1)。

1.1 TR3的发现

1985年 Lau 等在利用血清及血小板衍生生长因子 (PDGF) 处理静止期小鼠纤维母细胞并使其发生 G₀/G₁ 期转换的过程中, 克隆了一系列在短期内被诱导表达的基因^[4]。这些基因由于转录不依赖于新蛋白合成而被称为立早基因 (immediate-early gene), 并且与生长因子引起的细胞增殖密切相关^[5]。1988年, 他们从这些立早基因中克隆鉴定出具核受体典型序列特征的 3CH77 基因, 定名为 Nur77^[1]。

1989年, Chang 等人利用类固醇/甲状腺激素受体超家族成员共有的 DNA 结合序列的寡核苷酸为探针, 从人前列腺癌细胞 cDNA 文库中首次成功克隆出含有 598 个氨基酸残基的 TR3^[6]。与小鼠的 Nur77 相比, 人的 TR3 有 86% 核苷酸序列和 91% 的氨基酸序列与其同源。此后, 其他研究人员相继发现了大鼠同源物 (NGFI-B)^[7] 以及 NOR-1、Nurr1、NOT 等其它同源物^[8,9]。

1.2 TR3 的结构和功能区域

TR3 家族成员的结构都具有类固醇/甲状腺受体超家族的典型特征: A/B 区 (N 端的转录激活区 AF1), C 区 (高度保守的 DNA 结合区 (DBD)), D 区 (绞链区), E/F 区 (C 端配体结合区 (LBD), 含有转录激活区 AF2) (图 1)^[10,11]。

氨基末端转录激活区 (amino-terminal transaction domain, TAD) 位于 N 端的 A/B 区, 它的氨基酸序列在 TR3 家族成员中变化较大, Nurr1、Nor1 的 A/B 区与 TR3 的同源性仅分别有 28%、26%。该区是发挥 TR3 转录激活功能最重要作用的区域, 因为它含有配体非依赖的 AF-1 (activation function-1) 结构域。切除 TR3 的 N 端转录激活区可以得到抑制 TR3 对下游基因转录激活的 TR3 负显性突变体^[12]。

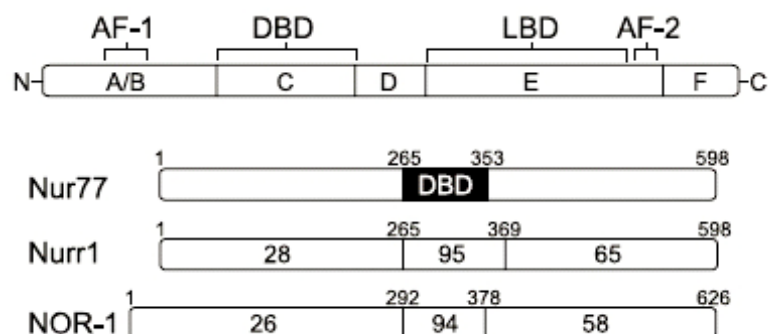


图 1 TR3 结构与功能区域示意图，引自^[11]

Fig. 1 The schematic picture of the structure and functional domains of TR3

位于中部C区的是氨基酸序列高度保守的DNA结合结构域（DNA binding domain, DBD），它含有2个富含半胱氨酸的锌指结构域以及四个高度保守的模式序列：P-box、D-box、T-box和A-box。Yasuhiro发现DBD区等包含两个核定位信号序列NLS（nuclear localization signal）^[13]，该区域缺失将导致TR3无法入核而定位于细胞浆^[14]。因此，DBD区除与DNA结合有关外，还能够影响TR3的入核。

位于D区的绞链区连接DBD和LBD两区域，允许TR3可以采取更多的构象。

配体结合结构域（ligand binding domain, LBD）、配体依赖的AF-2结构域以及3个核输出信号序列NES（nuclear export signal）都位于TR3 C端的E/F区。该区发挥着调控TR3转录激活活性、亚细胞定位和二聚化形成等多项重要功能^[11,13]。其中，AF-2转录激活活性较AF-1低，LBD是与配体直接结合的区域。之前许多研究提示^[15,16]，TR3很可能没有特异性体内配体，其活性的调控并不依赖于配体的存在。但最近我们实验室关于植物内生真菌酮cytosporone B作为TR3体外激动剂的研究工作，提示TR3的体内配体有可能存在。不过，确切结论还有待于更深入的研究。

1.3 TR3 的生物学功能

1.3.1 TR3 的转录激活功能

TR3 在核内不仅能够以单体形式结合到 DNA “半位点” 结合元件 NBRE (Nur77/NGFI-B binding responsive element) (序列特征为: 5'-AAAGGTCA) 上^[17], 还可以自身形成同源二聚体或与 TR3 家族成员或其它核受体形成异源二聚体而结合到回文 DNA 应答元件 NurRE (序列特征为: 5'-TGATATTTX₆AAATGCCA^[18]) 上, 进而发挥其转录激活功能。在视黄酸 9-cisRA 作用下, TR3 与 RXR 形成异源二聚体, 通过结合到视黄酸应答元件 RARE 上而激活转录活性^[19]。许多外界信号, 如各种生长因子、钙离子载体、KCl、佛波酯、视黄酸衍生物、Tax 蛋白等都能够刺激细胞, 并以完全不同的途径调节 TR3 的表达^[20,21]。如在 T 细胞中, ATRA 和 9-cisRA 抑制 AICD (activation-induced cell death) 活性的同时, 也抑制 TR3 转录活性; 而在肺癌细胞 H460 和 A549 中, AHPN/CD437 (视黄酸衍生物) 却诱导 TR3 表达并抑制细胞生长和诱导细胞凋亡^[22]。此外, TR3 易被磷酸化, 其转录活性也受磷酸化的调控^[13,23,24]。

1.3.2 TR3 的表达与细胞增殖

TR3 在肺癌、前列腺癌等多种肿瘤细胞中均为高表达, 如前列腺癌细胞中的 TR3 表达水平高于周围正常组织和肥大组织^[25]。TR3 的表达能够促进肿瘤细胞增殖。Kolluri 研究发现, 表皮生长因子 EGF 和血清诱导 TR3 在肺癌细胞 H460 和 Calu-6 中过表达, 并促进了肺癌细胞周期进程和增殖; 而利用 TR3 siRNA 抑制内源性 TR3 表达后, H460 的生长和 EGF、血清诱导的细胞增殖被抑制^[26]。另有研究表明, TR3 能够和 RXR 形成异源二聚体以调控视黄素应答元件, 进而调

节人肺癌细胞对视黄酸的敏感性，促进肿瘤细胞增殖^[27]。

1.3.3 TR3 的核浆定位与细胞凋亡

TR3拥有相当复杂甚至是截然相反的生物学功能，它不仅能促进细胞增殖，也能在一定条件下促进细胞凋亡（图2）。为什么TR3在肿瘤细胞中能够发挥两种截然相反的作用呢？一是归因于细胞类型和细胞受不同刺激因子的作用；二是由于TR3不同的亚细胞定位调控其发挥不同的功能。当TR3位于核内时，主要发挥促进肿瘤细胞增殖的功能；当TR3转运出核定位于胞浆时，其主要功能是促进肿瘤细胞凋亡。也有研究报道，TR3也可通过在核内调控某些蛋白及其蛋白修饰来诱导细胞死亡，但此种情况较少。

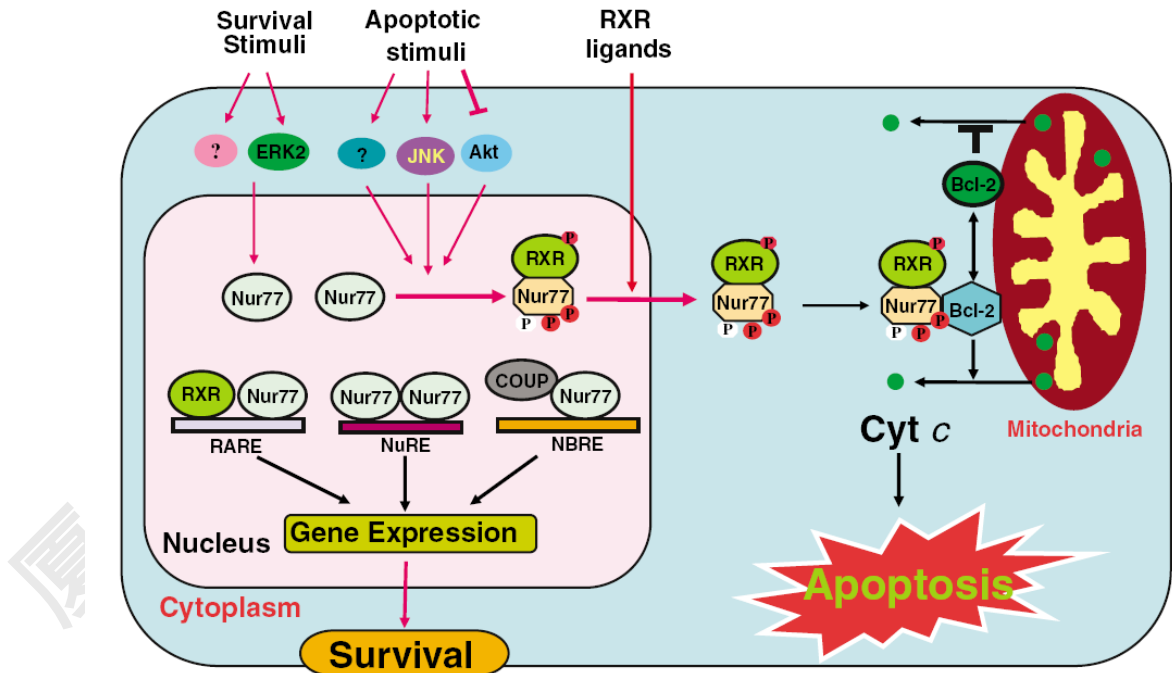


图2 TR3(Nur77)信号通路^[28]

Fig. 2 The signalling pathways of TR3 (Nur77)

1.3.3.1 TR3 的核浆穿梭机制

TR3 的亚细胞定位即核浆分布的情况决定其发挥不同的功能。与所有转运蛋白一样，TR3 的出核和入核都有特定的机制。作为核受体的 TR3，它的核浆转运主要通过核膜上的核孔复合体，依靠运输载体 Importins 和 Exportins 介导以及 Ran-GDP 提供能量。

离子及一些小分子物质通过自由扩散的方式进出真核细胞的核孔复合体，大于 60KD 的分子必须依赖主动运输方式入核。主动运输入核必须具备核定位信号 (nuclear localization signal, NLS)，根据核定位信号的不同至少分为两种：(1) 入核蛋白依赖其自身的经典 NLS 序列先与 importin α 或其同源蛋白结合，采用常见的 importin 依赖途径入核^[29]；(2) 少部分蛋白通过与 transportin 结合引导蛋白入核^[29]而不依赖于 importin 途径，目前这一机制仍有待于研究。

蛋白质转运出核通常需要核输出载体介导，目前发现的几种核输出载体包括 CRM1^[30,31]、钙网蛋白 Calreticulin^[32,33]、KNS (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K shuttling domain sequence) 和 HNS (HuR Nucleocytoplasmic Shuttling sequence)^[34,35]。载体蛋白通过结合转运蛋白上特定的核输出信号序列 (nuclear export signal, NES)，介导蛋白质通过核孔复合体转运至胞浆，其中，CRM1 介导的蛋白质核输出专门识别 NES 上富含亮氨酸的氨基酸序列。核受体 TR3 正是通过 CRM1 依赖的出核途径转运至胞浆^[36]。LMB 是 CRM1 通路的特异性抑制剂^[37,38]，能阻断由 CRM1 介导的蛋白质核输出过程，因而 LMB 常用于阻断 TR3 出核的研究^[39]。

1.3.3.2 TR3 转运出核促进细胞凋亡

TR3 作为立早基因被发现的, 后续许多研究进一步揭示了它也参与诱导细胞凋亡: 如 TR3 在 T 细胞杂交瘤和胸腺细胞中被 T 细胞受体信号诱导, 参与细胞凋亡^[12,40]; Li 等用 AHPN/CD437 处理肺癌 A549 和 H460 细胞, 使 TR3 表达增强并诱导细胞凋亡^[41]。而 TR3 作为核转录因子能够诱导细胞凋亡, 在早期研究中被认为是与其在细胞核中的转录激活功能有关。但 Li 等对前列腺癌 (LNCaP) 等细胞的研究发现, TR3 介导的细胞凋亡并非在核内通过调控凋亡相关基因表达的途径^[2]: 用 EGF 刺激细胞, TR3 表达和转录活性提高, 但细胞不发生凋亡; 凋亡诱导剂刺激细胞, TR3 表达和转录活性没有提高, 却发生了细胞凋亡。随后的研究发现, 凋亡诱导剂 TPA 能够刺激 TR3 转运出核, 并与线粒体外膜结合, 触发细胞色素 C 的释放, 从而启动细胞凋亡。因此, TR3 不同的亚细胞定位决定其不同的功能状态, 在核内发挥核转录因子的作用调控下游基因, 转运至线粒体后则诱导细胞凋亡。近年来 Lin 等人的研究进一步证实, TR3 在促凋亡因子佛波脂 TPA 或 3-Cl-AHPC 诱导下转运出核后, 是通过自身 LBD 区域与 Bcl-2 结合使其由胞浆定位至线粒体上, 诱导细胞色素 C 释放并启动凋亡。同时, TR3 与 Bcl-2 结合改变了 Bcl-2 的构象, Bcl-2 的 BH3 区域暴露, 由抗凋亡蛋白变为促凋亡蛋白^[14]。此外, 依托泊甙 (etoposide, VP-16)、9-顺式视黄酸 (9-cisRA, 9-cis retinoic acid) 及 AHPN/CD437 等药物都被报道能诱导 TR3 转运至线粒体, 诱导细胞凋亡^[39,42]。TR3 通过线粒体通路诱导肿瘤细胞凋亡的机制得到了广泛的研究和认可。

Marchetti 等^[43]在对人类骨髓瘤细胞 RPMI-8226 研究中首次提出线粒体是 CD437 作用的靶点, 并提示 CD437 的凋亡诱导作用与线粒体的呼吸功能相关联,

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.

廈門大學博碩士論文摘要庫