

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 21620131152531

UDC\_\_\_\_\_

廈門大學

硕士学位论文

Itch 介导的 PPAR $\gamma$  泛素化修饰在脂肪  
细胞分化过程中的作用

The role of Itch-mediated PPAR $\gamma$  ubiquitination in  
adipocyte differentiation

何旺

指导教师姓名: 王洪睿 教授

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2016 年 10 月

论文答辩时间: 2016 年 11 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2016 年 11 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）：

年 月 日

## 目录

中文摘要 .....	I
英文摘要 .....	II
<b>1 前言 .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 PPAR<math>\gamma</math> .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 PPARs 超家族 .....	1
1.1.1.1 PPARs 的结构域 .....	1
1.1.1.2 PPARs 的作用机制 .....	1
1.1.1.3 PPARs 的组织表达分布及其生物学功能 .....	3
1.1.2 PPAR $\gamma$ 的结构、在脂肪组织中的作用 .....	4
1.1.2.1 PPAR $\gamma$ 亚型间的差异 .....	4
1.1.2.2 PPAR $\gamma$ 在脂肪组织中的生物学功能 .....	5
<b>1.2 蛋白质的泛素化修饰 .....</b>	<b>7</b>
1.2.1 泛素化机制概述 .....	7
1.2.1.1 泛素化修饰的具体过程 .....	7
1.2.1.2 蛋白质泛素化的生物学功能 .....	8
1.2.2 C2-WW-HECT E3 泛素连接酶 .....	9
1.2.2.1 E3 泛素连接酶的分类 .....	9
1.2.2.2 C2-WW-HECT E3 泛素连接酶的结构 .....	10
1.2.2.3 C2-WW-HECT E3 泛素连接酶的生物学功能 .....	11
1.2.2.4 Itch 泛素连接酶的生物学功能 .....	12
<b>1.3 本课题研究的目的是、内容和意义 .....</b>	<b>13</b>
<b>2 材料与方法 .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 常用的实验材料 .....</b>	<b>15</b>
2.1.1 实验药品 .....	15
2.1.2 酶 .....	17
2.1.3 抗体 .....	17
2.1.4 材料及仪器 .....	17

2.1.5 质粒.....	19
2.1.6 菌株.....	19
2.1.7 细胞株.....	19
<b>2.2 实验方法</b> .....	<b>19</b>
2.2.1 分子克隆实验.....	19
2.2.1.1 感受态的制备.....	19
2.2.1.2 PCR 反应.....	20
2.2.1.3 琼脂糖胶回收 DNA 片段 (DNA 纯化通用试剂盒) .....	21
2.2.1.4 线性化载体、片段的制备及 DNA 样品琼脂糖凝胶电泳.....	21
2.2.1.5 DNA 连接反应.....	22
2.2.1.6 DNA 转化.....	22
2.2.1.7 牙签法小量制备质粒提取.....	22
2.2.1.8 SDS 碱裂解法中量制备质粒 DNA .....	23
2.2.1.9 DNA 的限制性内切酶消化.....	25
2.2.2 蛋白质实验相关方法.....	25
2.2.2.1 细胞表达蛋白样品的制备.....	25
2.2.2.2 蛋白质的 SDS-PAGE 电泳与蛋白质印迹分析.....	25
2.2.2.3 免疫共沉淀实验.....	28
2.2.3 细胞实验相关方法.....	28
2.2.3.1 细胞的传代、接种、冻存及复苏.....	28
2.2.3.2 细胞转染.....	29
2.2.3.3 荧光素酶活性测定实验.....	31
2.2.3.4 3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化实验 .....	32
2.2.3.5 油红 O 染色实验.....	33
<b>3 结果与分析</b> .....	<b>34</b>
<b>3.1 Itch 可以增强 PPAR<math>\gamma</math> 的转录活性</b> .....	<b>34</b>
<b>3.2 Itch 和 PPAR<math>\gamma</math> 相互作用</b> .....	<b>36</b>
<b>3.3 Itch 作为 E3 泛素连接酶泛素化 PPAR<math>\gamma</math></b> .....	<b>40</b>
<b>3.4 Itch 不影响 PPAR<math>\gamma</math> 的蛋白稳定性</b> .....	<b>41</b>

3.5 Itch 促进 3T3-L1 细胞的脂肪分化.....	42
4 讨论 .....	45
参考文献 .....	47
致谢.....	54

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>1 Introduction</b> .....	1
<b>1.1 PPAR<math>\gamma</math></b> .....	1
1.1.1 The PPARs superfamily .....	1
1.1.1.1 Structure of PPARs .....	1
1.1.1.2 Mechanism of PPARs.....	1
1.1.1.3 Distribution and function of PPARs.....	3
1.1.2 Structure and function of PPAR $\gamma$ .....	4
1.1.2.1 Differences between subtypes of PPAR $\gamma$ .....	4
1.1.2.2 Biological functions of PPAR $\gamma$ in adipose tissue .....	5
<b>1.2 Protein ubiquitination</b> .....	7
1.2.1 Mechanism of ubiquitination .....	7
1.2.1.1 Detailed process of ubiquitination .....	7
1.2.1.2 Biological functions of protein ubiquitination .....	8
1.2.2 C2-WW-HECT Ubiquitin-protein ligases (E3s).....	9
1.2.2.1 Classification of E3 ubiquitin ligase .....	9
1.2.2.2 Structure of C2-WW-HECT Ubiquitin-protein ligases.....	10
1.2.2.3 Biological functions of C2-WW-HECT E3s.....	11
1.2.2.4 Biological functions of Itch ubiquitin ligase.....	12
<b>1.3 Conetents and significance about this research</b> .....	13
<b>2 Materials and methods</b> .....	15
<b>2.1 Materials</b> .....	15
2.1.1 Experimental Drugs .....	15
2.1.2 Enzymes.....	17
2.1.3 Atibodies .....	17
2.1.4 Materials and Apparatus .....	17

## Table of content

---

2.1.5 Plasmids .....	19
2.1.6 Strains .....	19
2.1.7 Cell lines .....	19
<b>2.2 Methods</b> .....	<b>19</b>
2.2.1 Molecular cloning experiments.....	19
2.2.1.1 Competent cells.....	19
2.2.1.2 PCR.....	20
2.2.1.3 Gel extraction.....	21
2.2.1.4 Agarose gel electrophoresis .....	21
2.2.1.5 DNA ligation.....	22
2.2.1.6 Transformation.....	22
2.2.1.7 Plasmid mini Preparation.....	22
2.2.1.8 Plasmid maxi Preparation.....	23
2.2.1.9 Enzyme digestion.....	25
2.2.2 Protein experiments .....	25
2.2.2.1 Preparation of cell lysate.....	25
2.2.2.2 SDS-PAGE and Western blotting.....	25
2.2.2.3 Co-immunoprecipitation .....	28
2.2.3 Cell experiments .....	28
2.2.3.1 Cell culture.....	28
2.2.3.2 Transfection .....	29
2.2.3.3 Luciferase activity determination experiment .....	31
2.2.3.4 3T3-L1 cells adipocyte differentiation.....	32
2.2.3.5 Oil red o stain.....	33
<b>3 Result and analysis</b> .....	<b>34</b>
<b>3.1 Itch increases transcriptional activity of PPAR<math>\gamma</math></b> .....	<b>34</b>
<b>3.2 Itch interacts with PPAR<math>\gamma</math></b> .....	<b>36</b>
<b>3.3 Itch targets PPAR<math>\gamma</math> for ubiquitination</b> .....	<b>40</b>
<b>3.4 Itch does not affect protein stability of PPAR<math>\gamma</math></b> .....	<b>41</b>



<b>3.5 Itch promotes 3T3-L1 cells adipocyte differentiation</b> .....	42
<b>4 Discussion</b> .....	45
<b>References</b> .....	47
<b>Acknowledgement</b> .....	54

厦门大学博硕士论文摘要库

## 摘要

脂质过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) 属于 II 型核受体超家族成员，在脂肪及小肠组织中高表达。作为重要的核转录因子，PPAR $\gamma$  与视黄醇类 X 受体  $\alpha$  (retinoid X receptor  $\alpha$ ) 形成异二聚体，随后结合在过氧化物酶体增殖物反应元件 (PPRE) 上，从而调控与脂肪分化、脂质代谢、炎症应答相关的靶基因表达，其功能的异常与糖尿病、肥胖等代谢疾病密切相关。临床上，PPAR $\gamma$  也被作为重要的药物靶点用于相关疾病的治疗。

PPAR $\gamma$  的翻译后修饰对其生物学功能有重要影响。我们发现 C2-WW-HECT E3 泛素连接酶家族成员 Itch 可以和 PPAR $\gamma$  相互结合并对其非典型泛素化修饰。这种非典型的泛素化修饰可以增强 PPAR $\gamma$  的转录活性却不影响其蛋白质的稳定性。此外，在 3T3-L1 细胞中过表达 Itch 可以促进细胞的脂肪分化。反之，干涉内源 Itch 的蛋白水平可以抑制脂肪形成。

本论文的实验结果证明 Itch 可以作为 PPAR $\gamma$  的 E3 泛素连接酶，通过对其进行泛素化修饰并调控其生物学活性，这表明 Itch 可以作为针对相关代谢疾病的药物研发和疾病治疗的分子靶点。

**关键词：** E3 泛素连接酶； PPAR $\gamma$ ； Itch； 脂肪分化

## Abstract

The peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) belongs to type II nuclear receptor superfamily, which is highly expressed in adipose tissue and intestine. As a crucial transcriptional factor, PPAR $\gamma$  forms a heterodimer with retinoid X receptor  $\alpha$  and subsequently binds to PPAR-responsive regulatory elements to regulate its target genes which involved in adipogenesis, lipid metabolism, inflammation and metabolic homeostasis. Dysfunction of PPAR $\gamma$  is linked to diabetes, obesity and other metabolic diseases. Clinically, PPAR $\gamma$  is also a critical drug target for treating related diseases.

Posttranslational modification of PPAR $\gamma$  has a profound effect on its biological function. We found that Itch, a member of C2-WW-HECT E3 ligase family, could interact with PPAR $\gamma$  and target it for atypical ubiquitination. This modification could enhance its transcriptional activity, instead of affecting its protein stability. Moreover, overexpression of Itch in 3T3-L1 cells could promote adipocyte differentiation and knockdown Itch could hinder this process.

Altogether, our data demonstrate that Itch can act as an E3 ligase of PPAR $\gamma$  and regulate its transcriptional activity by targeting it for atypical ubiquitination, suggesting a potential of Itch in drug discoveries and therapy for metabolic disease.

**Key words:** E3 ubiquitin ligase; PPAR $\gamma$ ; Itch; adipocyte differentiation

## 1 前言

### 1.1 PPAR $\gamma$

#### 1.1.1 PPARs 超家族

PPARs 是由配体可诱导的转录因子组成的核受体超家族成员。在哺乳类动物中，PPARs 超家族有三个成员：PPAR $\alpha$ （又称为 NR1C1），PPAR $\beta/\delta$ （又称为 NR1C2），PPAR $\gamma$ （又称为 NR1C3）<sup>[1]</sup>。通过结合在过氧化物酶体增殖物反应元件（PPRE）上，PPARs 控制了大量涉及脂肪分化、脂质代谢、炎症和维持代谢稳态等过程的基因表达<sup>[2]</sup>。

##### 1.1.1.1 PPARs 的结构域

与各种典型的核受体一样，PPARs 是由几个独特的功能结构域所组成：一个 N 端转录激活结构域（AF1），一个高度保守的 DNA 结合结构域（DBD），一个 C 端包含配体依赖性转录激活功能域（AF2）的配体结合结构域（LBD）（图 1.1）。在这些结构域上都含有调控 PPAR 信号传递的潜在靶点。除了已知常见的膳食性脂肪类配体（油酸，亚麻油酸，亚麻酸）外，PPARs 还可以结合并响应多种脂质代谢产物，包括：前列腺素 J2，8S-羟基二十碳四烯酸，一些氧化磷脂类等<sup>[4-6]</sup>。



图 1.1 PPARs 的结构域<sup>[3]</sup>

##### 1.1.1.2 PPARs 的作用机制

配体的结合可以诱导 PPARs 转录因子发生构象改变，从而促进了它募集了特异的辅因子以及随后对其自身活性的调控（图 1.2）。PPARs 转录因子是通过自身 DNA 结合

结构域 (DBD) 上的两个锌指结构结合到 DNA 上, 而感应配体需要在它们配体结合结构域(LBD)上的配体结合口袋。PPARs 结合 DNA 的过程还需要与视黄醇类 X 受体(RXR) 家族的成员形成二聚化作用。在 PPARs 和 RXR 之间的异源二聚化作用不依赖于和配体结合, 而是通过在两个蛋白上的 LBDs 和 DBDs 形成异源二聚化的相互作用<sup>[7,8]</sup>。

对 PPARs 的反式激活是由配体依赖性的转录激活功能域 (AF2) 和配体非依赖性的转录激活功能域 (AF1) 所介导的。当在 PPARs 的配体结合口袋存在某个激动剂时会导致 LBD 结构域发生一个构象上的改变, 这种改变会使 LBD 结构域的 C 末端螺旋 (helix 12) 锁定在“打开”的状态, 从而形成一个可以与许多含有 LXXLL 序列的辅激活因子相互作用的疏水性空腔。通过这个疏水性空腔, LBD 结构域可以直接与许多辅激活因子复合体产生相互作用, 这些复合体包括: 组蛋白乙酰基转移酶 (HAT) 复合体, 组蛋白甲基转移酶 (HMT) 复合体等。假如在缺少配体存在的情况下, LBD 结构域的 C 末端螺旋 (helix 12) 会锁定在“关闭”的状态, 从而使得 PPARs 会与许多含有 CoRNR-box 基序的辅抑制因子复合体产生相互作用, 进而抑制其自身的转录活性<sup>[9-12]</sup>。

当 PPARs 被配体激活并形成了 PPAR:RXR 转录复合体后, 它可以结合在过氧化酶体增强体反应元件(PPRE)上。纵观整个基因组大约有 50% 的 PPREs 定位在内含子上, 而仅仅只有 10% 的 PPREs 是定位在近侧启动子区域<sup>[13,14]</sup>。PPAR:RXR 结合基序是一个 DR1 元件, 它是由两段一致的碱基重复序列 (5'-AGGTCA-3') 组成, 而在重复序列的中间被一个任意的核苷酸碱基所隔开<sup>[13-17]</sup>。PPAR:RXR 转录复合体上的 PPAR 占有 DR1 的 5'端的一半位点, 而 RXR 占有 DR1 的 3'端的一半位点<sup>[15]</sup>。造成这种极性的主要决定因素是由于在 DR1 稍微保守的 5'端旁侧序列可以与 PPAR 的铰链区形成显著的相互作用。全基因组结合位点分析数据表明 PPAR:RXR 异源二聚体还可以结合许多高度简化的 DR1 元件<sup>[13,17]</sup>, 这意味着在基因组中 PPARs 还有许多潜在的结合位点。

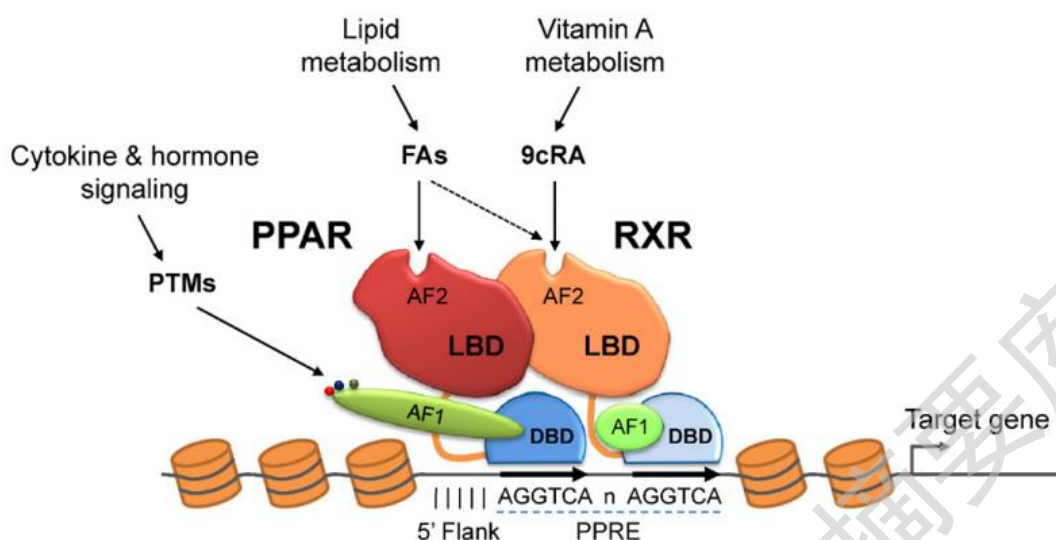


图 1.2 PPARs 的作用机制<sup>[3]</sup>

### 1.1.1.3 PPARs 的组织表达分布及其生物学功能

尽管 PPAR 亚型之间存在许多相似处，但在体内每个 PPAR 亚型都有独特的生物学功能。造成 PPAR 亚型之间功能差异性的原因很可能是 PPARs 特异的组织分布(图 1.3)，这种分布差异可以导致 PPARs 回应独特的配体信号以及获得先天的生化特性<sup>[1,3,18]</sup>。

PPAR $\alpha$  是首先被确认的 PPARs 超家族成员，它主要在肝脏、心脏以及棕色脂肪组织中表达，在这些组织中 PPAR $\alpha$  是脂肪酸氧化信号通路的主要激活剂，而且它还被作为许多降血脂药物的靶点之一<sup>[1,3,18]</sup>。虽然 PPAR $\beta/\delta$  与 PPAR $\alpha$  共有相似的生物学功能，但是 PPAR $\beta/\delta$  更加普遍地在各组织中表达。而且在关键的代谢组织中，例如：骨骼肌，PPAR $\beta/\delta$  在这些组织的脂肪酸氧化过程中也发挥着至关重要的作用<sup>[2,3]</sup>。PPAR $\gamma$  在白色脂肪组织和棕色脂肪组织中表达得最多，它是脂肪分化主要的调节因子，同时它还作为全身脂质代谢和胰岛素敏感性有效调节因子之一<sup>[18,19]</sup>。

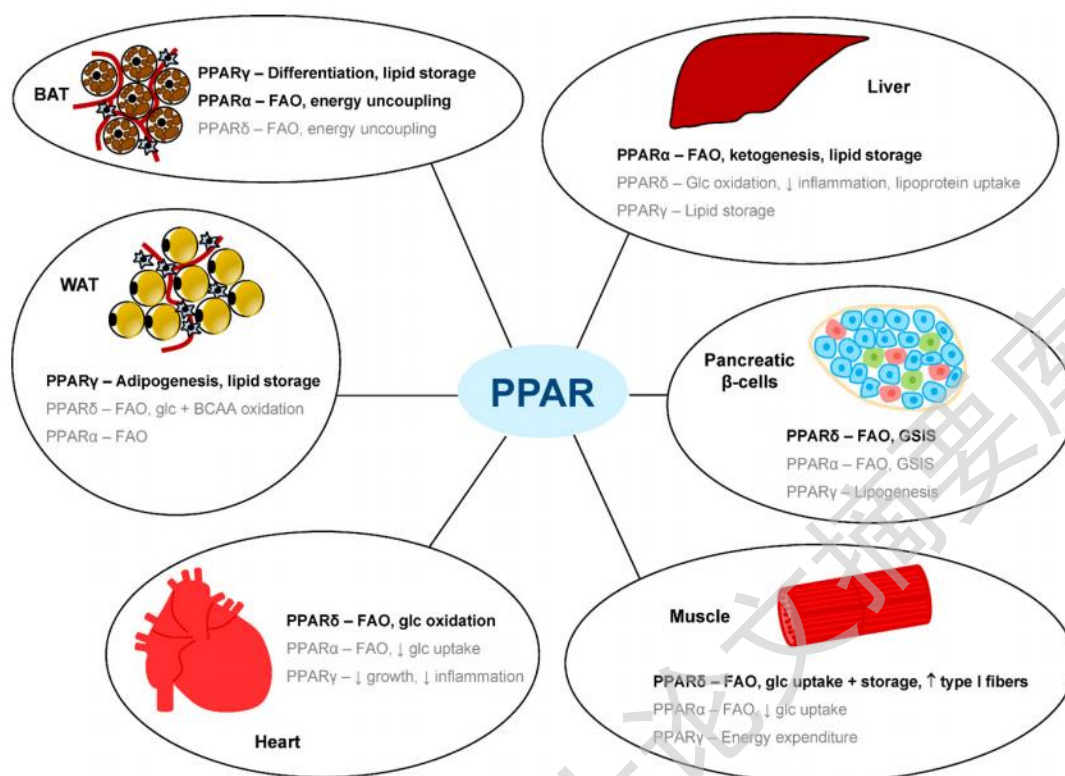
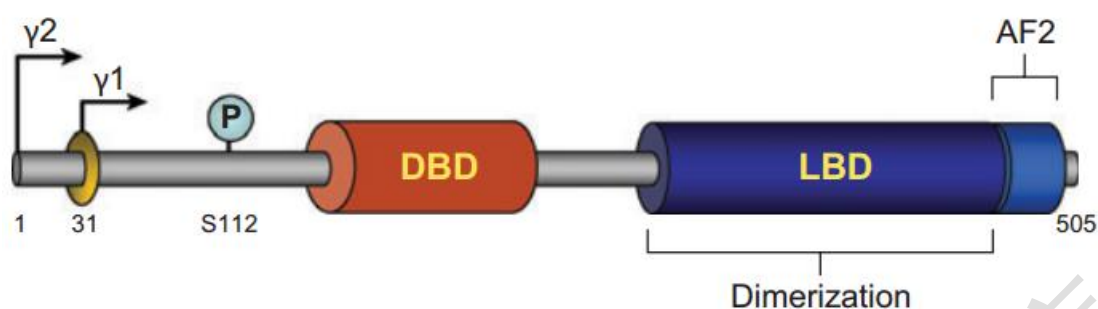


图 1.3 PPARs 的组织表达分布及其生物学功能<sup>[3]</sup>

## 1.1.2 PPAR $\gamma$ 的结构、在脂肪组织中的作用

### 1.1.2.1 PPAR $\gamma$ 亚型间的差异

由于选择性剪接和特异的启动子的作用，在哺乳动物体内 PPAR $\gamma$  存在两种亚型：PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 2 (图 1.4)，后者在 N 末端含有额外的 30 个氨基酸<sup>[19,20]</sup>。PPAR $\gamma$ 1 在多种组织中广泛表达，然而 PPAR $\gamma$ 2 在生理条件下仅限于在脂肪组织中表达；但是在高脂饮食的诱导条件下，PPAR $\gamma$ 2 同样可以在其它组织中表达<sup>[20,21]</sup>。

图 1.4 PPAR $\gamma$  的结构域<sup>[19]</sup>

### 1.1.2.2 PPAR $\gamma$ 在脂肪组织中的生物学功能

PPAR $\gamma$  最初是被描述作为一个在脂肪分化期间被诱导产生的转录因子<sup>[19,22,23]</sup>，而且它最显著的作用就是调控与脂肪分化、生长相关的信号通路（图 1.5）。和对照组的小鼠相比，PPAR $\gamma$  基因的敲除小鼠具有明显的生理表型：完全缺失脂肪组织，于是进一步地确认了 PPAR $\gamma$  作为脂肪分化过程中核心的调控因子<sup>[24]</sup>。PPAR $\gamma$  同样也在成熟的脂肪细胞中发挥重要作用，有文献报道在小鼠的成熟脂肪组织中敲除 PPAR $\gamma$  基因后，脂肪细胞仅能存活一段时间<sup>[25,26]</sup>。

除了在脂肪分化和脂质代谢过程中发挥作用外，PPAR $\gamma$  同样也在控制葡萄糖稳态的基因表达网络中起至关重要的作用，其控制表达的基因包括：葡萄糖载体型-4 (Glut4)，c-Cbl 相关蛋白 (CAP)。此外 PPAR $\gamma$  还控制了大量脂肪细胞分泌因子的表达，例如：脂联素，抵抗素，瘦素，肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )，以上分泌因子虽各有不同的生理功能但却都可以影响胰岛素敏感性<sup>[27-30]</sup>。由于这些分泌因子是在不同的信号通路中发挥作用，而且作用的组织靶点也有不同，这说明它们也许在实现胰岛素敏化这一效应的过程中存在不同的生物学机制。

正因为 PPAR $\gamma$  在脂肪形成和胰岛素敏感性的关键作用，所以自身含有 PPAR $\gamma$  等位基因上显性负突变的患者会存在局部的脂质代谢障碍和胰岛素抵抗性<sup>[31-33]</sup>。TZDs 药物是 PPAR $\gamma$  的激动剂，在体内能有效的促进脂肪形成和具有抗糖尿病的效果，这个发现进一步的证实 PPAR $\gamma$  在胰岛素敏感性的重要作用以及促进了大量与这个核受体相关的科学研究<sup>[6,19,34]</sup>。尽管仍然存在很多问题，但是 PPAR $\gamma$  本身仍然被看作治疗许多代谢疾病至关重要的靶点之一。



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.