

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 21620100153902

UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

**Pelota 及 p53 上调凋亡控制因子的结构生物学研究**

**Structural Studies of Pelota and p53 Upregulated Modulator  
of Apoptosis**

张兰君

指导教师姓名: 林天伟教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2014 年 11 月

论文答辩时间: 2014 年 12 月

学位授予日期: 2015 年 月

答辩委员会主席: 滕脉坤 教授

评 阅 人:

2014 年 12 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

目录.....	IV
content.....	IX
摘要.....	1
Abstract.....	4
<b>1 生物大分子 X 射线晶体学 .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 结构生物学简介 .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2 X 射线晶体学的发展及主要流程 .....</b>	<b>4</b>
1.2.1 X 射线.....	4
1.2.2 X 射线晶体学的发展.....	9
1.2.3 X 射线晶体学原理.....	10
1.2.4 X 射线晶体学流程.....	11
<b>1.3 蛋白质的结晶 .....</b>	<b>11</b>
1.3.1 蛋白质结晶原理.....	11
1.3.2 蛋白质结晶方法.....	13
1.3.2.1 蒸汽扩散法 .....	13
1.3.2.2 透析结晶 .....	14
1.3.2.3 批量微处理法 .....	14
1.3.2.4 液/液扩散结晶法 .....	15
1.3.3 影响蛋白质结晶的因素.....	15
1.3.4 获得高分辨率蛋白晶体的方法.....	16
<b>1.4 衍射数据的收集和处理 .....</b>	<b>17</b>
<b>1.5 相位的获得 .....</b>	<b>14</b>
1.6.1 分子置换法.....	14
1.6.2 单对或多对同晶置换法.....	20
1.6.3 多波长和单波长反常散射法.....	20

1.6.4 直接法.....	21
1.6.5 单对同晶置换及反常散射法.....	21
1.6.6 新型卤素快速浸泡法.....	21
<b>1.7 相位改善和扩展 .....</b>	<b>22</b>
<b>1.8 模型构建和结构修正 .....</b>	<b>22</b>
<b>1.9 参考文献 .....</b>	<b>23</b>
<b>2 人源 Pelota 蛋白的结构生物学研究 .....</b>	<b>26</b>
<b>2.1 前言 .....</b>	<b>26</b>
2.1.1 Pelota 的发现和结构.....	26
2.1.2 Pelota 的功能.....	29
2.1.2.1 Pelota 监控 mRNA 的质量.....	29
2.1.2.2 Pelota 与细胞周期 .....	33
2.1.2.3 Pelota 控制生殖干细胞的自我更新.....	35
2.1.2.4 Pelota 参与 80S 空核糖体的循环利用 .....	37
2.1.3 HAX1 的发现和结构.....	40
2.1.4 HAX1 的功能.....	42
2.1.4.1 HAX1 参与细胞凋亡.....	42
2.1.4.2 HAX1 参与 mRNA 3'端非翻译区功能.....	42
2.1.4.3 HAX1 与细胞迁移.....	33
2.1.4.4 HAX1 与病毒蛋白结合.....	35
2.1.4.5 HAX1 与疾病发生.....	37
2.1.5 研究目的和意义.....	40
<b>2.2 材料与方法 .....</b>	<b>42</b>
2.2.1 实验材料.....	42
2.2.1.1 目的基因序列 .....	42
2.2.1.2 实验质粒及菌种 .....	42
2.2.1.3 主要试剂和仪器 .....	43
2.2.1.4 常用试剂和缓冲液的配置.....	45
2.2.2 实验方法.....	50

2.2.2.1 目的蛋白重组质粒的构建.....	50
2.2.2.2 重组蛋白的表达 .....	57
2.2.2.3 重组蛋白的纯化 .....	58
2.2.2.4 重组蛋白的结晶 .....	60
<b>2.3 实验结果 .....</b>	<b>63</b>
2.3.1 Pelota fl 重组质粒的构建和预表达 .....	63
2.3.1.1 Pelota fl 重组质粒的构建.....	63
2.3.1.2 Pelota fl 的预表达.....	64
2.3.1.3 Pelota fl 表达纯化与结晶条件初筛.....	65
2.3.2 Pelota fl 突变的表达纯化和结晶条件初筛 .....	72
2.3.2.1 Pelota fl 的定点突变.....	72
2.3.2.2 Pelota fl Cys258Ser 的纯化及结晶.....	74
2.3.3 Pelota N 端结构域的结晶.....	75
2.3.3.1 Pelota N domain 的表达纯化.....	75
2.3.3.2 Pelota N domain 稳定性及均一性检测.....	76
2.3.3.3 Pelota N domain 的结晶.....	78
2.3.4 Pelota C domain/AT 的表达纯化和结晶.....	78
2.3.4.1 Pelota C domain/AT 的表达纯化.....	78
2.3.4.2 Pelota C domain/AT 稳定性及均一性检测.....	79
2.3.4.3 Pelota C domain/AT 的结晶.....	80
2.3.4.4 Pelota C domain/AT 晶体衍射数据的收集.....	83
2.3.4.5 Pelota C domain/AT 晶体结构.....	85
2.3.4.6 Pelota C domain/AT 晶体结构与 NMR 结构对比.....	89
2.3.4.7 Pelota C domain/AT 晶体结构与 eRF1 domain3 结构对比 .....	91
2.3.5 HAX1 相关实验.....	93
2.3.5.1 HAX1 与 Pelota 作用.....	93
2.3.5.2 HAX1 重组质粒的构建.....	93
2.3.5.2 HAX1 预表达.....	95
2.3.5.3 HAX1 与 Pelota C domain/AT 的共纯化 .....	95

2.5 分析与讨论 .....	97
2.6 小结 .....	99
2.7 参考文献 .....	103
<b>3 p53 上调凋亡调控因子的结构生物学研究.....</b>	<b>110</b>
<b>3.1 前言 .....</b>	<b>110</b>
3.1.1 细胞凋亡.....	110
3.1.1.1 线粒体凋亡途径 .....	111
3.1.1.2 BCL-2 家族蛋白 .....	112
3.1.2 p53 上调凋亡调控因子.....	113
3.1.2.1 PUMA 的发现.....	113
3.1.2.2 PUMA 结构特点.....	114
3.1.2.3 PUMA 转录调节.....	116
3.1.2.4 PUMA 促凋亡机制.....	117
3.1.2.5 PUMA 与癌症治疗.....	120
3.1.3 热休克蛋白.....	121
3.1.3.1 热休克蛋白介绍 .....	121
3.1.3.2 热休克蛋白 70 家族 .....	122
3.1.4 Hsc70 蛋白 .....	122
3.1.4.1 Hsc70 细胞定位 .....	124
3.1.4.2 Hsc70 功能 .....	124
3.1.4.3 Hsc70 结构 .....	125
3.1.4.4 Hsc70 与 HSP70 差异.....	130
3.1.5 研究目的与意义.....	131
<b>3.2 材料与方法 .....</b>	<b>132</b>
3.2.1 实验材料.....	132
3.2.1.1 目的基因序列 .....	132
3.2.1.2 质粒及菌种 .....	132
3.2.1.3 主要试剂和仪器 .....	132
3.2.1.4 常用试剂和缓冲液的配置.....	132

3.2.2 实验方法.....	134
<b>3.3 实验结果 .....</b>	<b>142</b>
3.3.1 PUMA 与 Hsc70 的相互作用研究.....	142
3.3.2 PUMA 的表达纯化及结晶 .....	144
3.3.2.1 PUMA 基因优化.....	144
3.3.2.2 PUMA 全长蛋白的构建和表达.....	145
3.3.2.3 PUMA 模拟磷酸化的表达.....	146
3.3.2.4 截短蛋白的表达 .....	147
3.3.2.5 PUMA 多肽合成.....	154
3.3.3 Hsc70 的表达纯化及结晶 .....	154
3.3.3.1 Hsc70fl 的表达.....	154
3.3.3.2 Hsc70 与 PUMA 相互作用结构域的确定.....	156
3.3.3.3 Hsc70 ATPase 的纯化及结晶 .....	157
3.3.3.4 Hsc70 C $\Delta$ 10 kDa 的表达.....	166
<b>3.4 分析和讨论 .....</b>	<b>180</b>
<b>3.5 小结 .....</b>	<b>183</b>
<b>3.6 参考文献 .....</b>	<b>185</b>
<b>致谢.....</b>	<b>200</b>



## content

<b>content</b> .....	<b>IV</b>
<b>content</b> .....	<b>IX</b>
<b>Absract in Chinese</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract in English</b> .....	<b>4</b>
<b>1 Introduction to macromolecular X-ray crystallography</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1 Sructural biology and the main techniques</b> .....	<b>7</b>
<b>1.2 Development and main process of X-ray crystallography</b> .....	<b>8</b>
1.2.1 X-ray .....	8
1.2.2 Development of X-ray crystallography .....	9
1.2.3 Principle of X-ray Crystallography.....	10
1.2.4 Procedure of X-ray crystallography .....	11
<b>1.3 Protein crystallization</b> .....	<b>11</b>
1.3.1 Principle of crystallization .....	11
1.3.2 Protein crystallization methods.....	13
1.3.2.1 Vapor Diffusion.....	13
1.3.2.2 Dialysis method .....	14
1.3.2.3 Batch method .....	14
1.3.2.4 Interface diffusion.....	15
1.3.3 Factors affect protein crystallization.....	15
1.3.4 Methods to obtain high resolution protein crysal .....	16
<b>1.4 Fraction data collection and processing</b> .....	<b>17</b>
<b>1.5 Phase cacuation</b> .....	<b>18</b>
1.6.1 Molecular replacement.....	18
1.6.2 Single/multiple isomorphous replacement.....	20
1.6.3 Multiple/single wavelenth anomalous diffraction .....	20

1.6.4 Direct Method .....	21
1.6.5 Single isomorphous replacement plus anomalous diffraction .....	21
1.6.6 Fast soaking with halogen .....	21
<b>1.7 Phase improvement .....</b>	<b>22</b>
<b>1.8 Modeling and refinement .....</b>	<b>22</b>
<b>1.9 Reference .....</b>	<b>23</b>
<b>2 Structural studies of Anthropogenic Pelota .....</b>	<b>26</b>
<b>2.1 Introduction .....</b>	<b>26</b>
2.1.1 The discovery and the structure of Pelota .....	26
2.1.2 Physiological function of Pelota .....	29
2.1.2.1 Pelota monitor mRNA quality .....	29
2.1.2.2 Cell cycle .....	33
2.1.2.3 GSCs self-renewal .....	35
2.1.2.4 80S empty ribosome recycling .....	37
2.1.3 The discovery of HAX1 .....	40
<b>2.2 Materials and methods .....</b>	<b>42</b>
2.2.1 Materials .....	42
2.2.1.1 Gene sequence .....	42
2.2.1.2 Plasmid and strain .....	42
2.2.1.3 Reagents and instruments .....	43
2.2.1.4 The allocation of buffer solution .....	45
2.2.2 Methods .....	50
2.2.2.1 The construction of recombinant plasmid .....	50
2.2.2.2 Expression of recombinant protein .....	57
2.2.2.3 Purification of recombinant protein .....	58
2.2.2.4 Crystallization of recombinant protein .....	60
<b>2.3 Results .....</b>	<b>63</b>
2.3.1 Construction and pre-expression of Pelota full length .....	63
2.3.1.1 Construction of Pelota fl recombinant plasmid .....	63

2.3.1.2 Pre-expression of Pelota fl .....	64
2.3.1.3 Purification and Crystallization of Pelota fl.....	65
2.3.2 Expression, purification and crystallization of Pelota mutats.....	72
2.3.2.1 Site mutant of Pelota fl .....	72
2.3.2.2 Purification and Crystallization of Pelota fl Cys258Ser .....	74
2.3.3 Crystallization of Pelota N-terminal domain .....	75
2.3.3.1 Purification of Pelota N domain .....	75
2.3.3.2 Stability and uniformity detection of Pelota N domain .....	76
2.3.3.3 Crystallization of Pelota N domain.....	78
2.3.4 Crystallization of Pelota C-terminal domain and acid tail.....	78
2.3.4.1 Purification of Pelota C domain/AT.....	78
2.3.4.2 Stability and uniformity detection of Pelota C domain/AT.....	79
2.3.4.3 Crystallization of Pelota C domain/AT .....	80
2.3.4.4 Fraction data collection of Pelota C domain/AT .....	83
2.3.4.5 The crystal structure of Pelota C domain/AT.....	85
2.3.4.6 Superposition with NMR structure .....	89
2.3.4.7 Superposition with eRF1 domain3structure.....	914
2.3.5 The experiments of HAX1 .....	93
2.3.5.1 The interaction between HAX1 and Pelota.....	93
2.3.5.2 Construction of HAX1 recombinant plasmid .....	93
2.3.5.2 The expression of HAX1 .....	95
2.3.5.3 Co-purification of HAX1 and Pelota C domain/AT.....	95
<b>2.5 Analysis and discussion .....</b>	<b>97</b>
<b>2.6 Summary.....</b>	<b>99</b>
<b>2.7 Reference .....</b>	<b>103</b>
<b>3 Structural studies of p53-Upregulated Modulator of Apoptosis</b>	
.....	<b>110</b>
<b>3.1 Introduction.....</b>	<b>110</b>
3.1.1 Cell apoptosis.....	110

3.1.1.1 Mechanism of mitochondria apoptosis .....	111
3.1.1.2 BCL-2 family .....	111
3.1.2 Introduction of PUMA .....	113
3.1.2.1 The discovery of PUMA .....	113
3.1.2.2 The characteristics of PUMA structure .....	114
3.1.2.3 Regulation of PUMA by transcription .....	116
3.1.2.4 Mechanism of apoptosis mediate by PUMA .....	117
3.1.2.5 PUMA and cancer therapy .....	120
3.1.3 Heat shock protein .....	121
3.1.3.1 The introduction of heat shock protein .....	121
3.1.3.2 Heat shock protein 70 family .....	122
3.1.4 Heat shock cognate70 .....	122
3.1.4.1 The structure of Hsc70 .....	124
3.1.4.2 Cellular localization of Hsc70 .....	124
3.1.4.3 Physiological function of Hsc70 .....	125
3.1.4.4 Difference between Hsc70 and HSP70 .....	130
3.1.5 Purpose and significance .....	131
<b>3.2 Materials and methods .....</b>	<b>132</b>
3.2.1 Materials .....	132
3.2.1.1 Gene sequence .....	132
3.2.1.2 Plasmid and strain .....	132
3.2.1.3 Reagents and instruments .....	132
3.2.1.4 The allocation of buffer solution .....	132
3.2.2 Methods .....	134
<b>3.3 Methods .....</b>	<b>142</b>
3.3.1 Interactions between PUMA and Hsc70 .....	142
3.3.2 Expression, purification and crystallization of PUMA .....	144
3.3.2.1 Genetic optimization of PUMA .....	144
3.3.2.2 Construction and expression of PUMAfl .....	145
3.3.2.3 Expression of phosphorylated PUMA .....	146

3.3.2.4 Expression of truncated PUMA .....	147
3.3.2.5 PUMA peptides.....	154
3.3.3 Expression, purification and crystallization of Hsc70 .....	154
3.3.3.1 Expression of Hsc70fl.....	154
3.3.3.2 Determination of interact domain between Hsc70 and PUMA.....	156
3.3.3.3 Crystallization of Hsc70 ATPase .....	157
3.3.3.4 Crystallization of Hsc70 C $\Delta$ 10 kDa .....	157
<b>3.4 Analysis and discussion .....</b>	<b>180</b>
<b>3.5 Summary.....</b>	<b>183</b>
<b>3.6 Reference .....</b>	<b>186</b>
<b>Acknowledgements .....</b>	<b>200</b>

## 摘要

### 1 生物大分子 X 射线晶体学

结构生物学通过对生物大分子的结构和功能进行研究，解释生命的分子机制。X 射线晶体学、核磁共振技术(NMR)和冷冻电镜(cryo-EM)三维重构是当今结构生物学的主要研究手段。这三种方法各有独到之处，又各有局限和不足。作为最早发展起来的结构生物学研究手段，X 射线晶体学是目前解析蛋白质结构的主要手段。目前 PDB (Protein Data Bank) 中收录的蛋白结构中，大约有 85% 是利用 X 射线晶体学方法获得的。

本章对本论文重点使用的技术手段——X 射线晶体学进行以下几方面的介绍：X 射线晶体学的基本原理、蛋白晶体的培养、衍射数据的收集处理、相位获取的方法原理、模型构建及修正等。对于本论文所采用的分子置换法和相关软件我们将做重点介绍。

**关键词：**结构生物学；X 射线晶体学；分子置换法

## 2 人源 Pelota 的结构生物学研究

Pelota 在进化上是非常保守的 RNA 结合蛋白。在古细菌、酵母、果蝇、小鼠以及人类中，都存在 Pelota 蛋白。人类和小鼠的 Pelota 同源性高达到 95%。Pelota 是由三个结构域组成的，含有保守核定位信号 (PRKRK) 的 N 端结构域、与 eEF1 结构相似的中间结构域和 C 端酸性结构域。Pelota 蛋白参与细胞周期的调控，影响生殖细胞的形成。它的敲除会引发不育症。Pelota 也参与蛋白翻译过程的调控，保证蛋白正确地翻译。Pelota 在 mRNA 的监控机制中和核糖体的循环利用也起到很重要的作用。Pelota 是很有潜力的药物靶点，它的研究为新药开发奠定了基础。

本章采用结构生物学方法人源 Pelota 研究进行研究。我们得到了 2.6Å Pelota C 端结构域/酸性尾巴的蛋白晶体，其结构与 eRF1 C domain 结构基本上一致，但是不含 minidomain，所以 Pelota 无法识别终止密码子和招募水解酶，所以只能参与 mRNA 的质量控制。这里得到的结果为 Pelota 相关功能和疾病研究奠定了结构基础。

**关键词：**pelota 蛋白；结构生物学；人类

### 3 p53 上调凋亡调控因子的结构生物学研究

p53 上调凋亡调控因子(PUMA)是 BCL-2 家族中 BH3-only 亚家族成员, 是 p53 促凋亡途径的必需因子。PUMA 可以通过 p53 依赖途径及非依赖途径激活 Bax/Bak 寡聚化, 增加线粒体外膜的通透性, 从而导致细胞色素 C 释放、促进细胞凋亡。但 PUMA 的作用与 p53 状态无关, 相比 p53 能够更直接的促凋亡, 是癌症治疗中具有很大潜力的药物靶点。

Hsc70 是哺乳动物细胞内的组成型表达热休克蛋白, 在细胞的蛋白质代谢及调控过程中有着重要的作用。Hsc70 与 PUMA 相互作用, 可能参与 PUMA 蛋白折叠或者降解途径, 解析 PUMA 或 PUMA 与 Hsc70 蛋白复合结构, 有助于了解 PUMA 促凋亡的分子机制。

本章实验尝试多种方法都没有得到 PUMA 蛋白晶体, 我们发现 PUMA 的第 134-165 位氨基酸会形成 coiled coil 结构, 促使蛋白多聚, 所以最后尝试进行 PUMA 多肽与 Hsc70 共结晶。同时我们还鉴定了 PUMA 59-177 与 Hsc70 ATPase 相互作用, ATPase 和 Hsc70C $\Delta$  10kDa 的结晶实验表明, Hsc70 C $\Delta$  10 kDa 蛋白极容易断裂为 Hsc70 ATPase 和 SBD $\beta$ , 在结晶过程中 ATPase 形成蛋白晶体, 最终我们得到两种不同结合状态的 ATPase 结构。一个结合有 ATP 分子, 另一个则没有, ATP 结合会诱导 ATPase 结构域的活性部位空间变小, 改变 ATPase 结构域的构象。我们尝试了 PUMA 多肽与 Hsc70 ATPase 复合物的共结晶, 而在解析的结构中并没有 PUMA 的多肽。

**关键词:** PUMA; Hsc70; 促凋亡



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.