

校编码: 10384 分类号 _____ 密级 _____

学号: 21620120153809UDC _____

厦 门 大 学

博士学位论文

SEC 的不同亚类对 Pol II 的暂停释放以
及 3'端 mRNA cleavage 的调控

Regulation of Pol II pausing release and 3'-end mRNA
cleavage by different subtypes of SEC

朱鑫星

指导教师姓名: 陈瑞川教授

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2015 年 06 月

论文答辩时间: 2015 年 08 月

学位授予日期: 2015 年月

答辩委员会主席: 王洪睿

评阅人:

2015 年 8 月

**Regulation of Pol II pausing release and 3'-end
mRNA cleavage by different subtypes of
SEC**

Dissertation Submitted to

Xiamen University

in Partial Fulfilment of the Requirement

for the Degree of

Doctor of Philosophy

By

Xinxing, Zhu

(Cell Biology)

Dissertation Supervisors: Prof. Ruichuan Chen

Aug, 2015

Xiamen, China

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(陈瑞川)课题(组)的研究成果,获得(陈瑞川)课题(组)经费或实验室的资助,在(陈瑞川)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): 朱鑫星

2015 年 08 月 29 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

英文缩略对照.....	I
摘要.....	IV
Abstract.....	VI
第一章前言.....	1
1.1 真核生物基因的转录调控	2
1.1.1 RNA Pol II 的结构.....	2
1.1.2 真核细胞基因的转录循环.....	3
1.1.3 RNA Pol II 的活性调控.....	5
1.2 RNA Pol II 启动子附近区域的暂停 (promoter-proximal pausing) 及转录延伸激活机制	9
1.2.1 RNA Pol II 在启动子附近区域暂停的发现.....	9
1.2.2 RNA Pol II 在启动子附近暂停的分子机制.....	9
1.2.3 RNA Pol II 转录延伸激活的调控机制.....	11
1.3 P-TEFb 的活性调控	13
1.3.1 P-TEFb 的结构及功能.....	13
1.3.2 P-TEFb 的活性调控机制.....	14
1.3.3 调控 P-TEFb 活化的信号和分子机制.....	16
1.4 P-TEFb 募集到染色体上的信号通道	17
1.4.1 依赖于 Brd4 的 P-TEFb 募集通道.....	18
1.4.2 依赖于 SEC 的 P-TEFb 的募集通道.....	23
1.5 3'端 mRNA 的转录终止	27
1.6 研究内容和意义	29
1.6.1 研究内容.....	29
1.6.2 研究意义.....	30

第二章实验材料和方法	32
2.1 实验药品、试剂与仪器	32
2.1.1 细胞株、菌株和质粒资源.....	32
2.1.2 主要试剂和材料.....	33
2.1.3 主要实验仪器和耗材.....	35
2.2 常用溶液配方	36
2.2.1 大肠杆菌感受态细胞的制备及质粒转化相关溶液.....	36
2.2.2 质粒 DNA 制备相关溶液.....	37
2.2.3 质粒 DNA 亚克隆相关溶液.....	38
2.2.4 细胞培养、转染及感染相关溶液.....	38
2.2.5 Chip 相关溶液.....	39
2.2.6 生化试验相关溶液.....	40
2.2.7 Western blot 相关溶液:	40
2.3 实验方法	41
2.3.1 大肠杆菌感受态细胞的制备.....	41
2.3.2 质粒转化.....	42
2.3.3 质粒 DNA 小量提取 (碱裂解法)	42
2.3.4 质粒中量提取.....	43
2.3.5 DNA 限制性内切酶酶切.....	44
2.3.6 DNA 样品琼脂糖凝胶电泳.....	45
2.3.7 琼脂糖胶回收 DNA 片段 (实验室自制 glass milk 回收法)	46
2.3.8 DNA 的连接.....	47
2.3.9 普通 PCR 反应.....	47
2.3.10 PCR 反应 (改进型 QuikChange 方案)	48
2.3.11 特异性 shRNA 的构建.....	50
2.3.12 细胞培养.....	51
2.3.13 细胞瞬时转染.....	52
2.3.14 病毒包装感染.....	53

2.3.15 细胞的药物处理.....	53
2.3.16 核分级分离(Nucleic fractionation).....	54
2.3.17 免疫共沉淀.....	54
2.3.18 SDS-PAGE 蛋白电泳.....	55
2.3.19 免疫印记实验 (Western blot).....	56
2.3.20 HCT116 细胞增殖实验.....	56
2.3.21 HCT116 流式细胞实验.....	57
2.3.22 MNase chip 及 exo-chip.....	57
2.3.23 Luciferase 转录活性分析 (Promega).....	60
2.3.24 总 RNA 的提取.....	60
2.3.25 逆转录 PCR(qRT-PCR).....	61
第三章结果与讨论.....	64
3.1 HMBA 诱导的 Pol II 暂停释放(PolII Pausing release)模型的建立.....	64
3.2 研究 PolII 暂停释放的核抽提方法的建立.....	66
3.3 SEC 调控了 NELF 复合物的解离.....	69
3.4 启动子区域 NELF 复合物的解离依赖于 AFF1, 而不是 AFF4.....	73
3.4.1 Med26 所募集的 P-TEFb 负责 NELF-E 的解离, 而 Paf1 所募集的 P-TEFb 负责 NELF-A 的解离.....	73
3.4.2 AFF1 和 AFF4 在 P-TEFb 到 NELF-E 的传递上具有功能上的互补替代性, 而 P-TEFb 到 NELF-A 的传递上则依赖于 AFF1.....	76
3.5 负责 Pol II Ser2 磷酸化的 P-TEFb 的募集依赖于(AFF4)SEC. 80	80
3.5.1 沉默 Spt5 会促使 Pol II 直接进入转录延伸.....	80
3.5.2 Pol II Ser2 的磷酸化依赖于 (AFF4) SEC.....	83
3.6 Pol II Ser2 的磷酸化对转录延伸是非必须的.....	85

3.7 Pol II Ser2 的磷酸化对 3' 端 mRNA 的 Cleavage 是必须的	88
3.8 讨论和展望	92
参考文献	95
致谢	102

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Abbreviation	I
Abstract in Chinese	IV
Abstract in English.....	VI
Chapter I Forewords	1
1.1 Transcription regulation of eukaryotic organism.....	2
1.1.1 Structure of RNA polymerase II.....	2
1.1.2 transcription cycle of eukaryotic cells gene.....	3
1.1.3 Activity regulation of RNA Pol II	5
1.2 Promoter-proximal pausing and transcriptional elongation stimulation mechanism of RNA Pol II.....	9
1.2.1 The discovery of RNA PolII Promoter-proximal pausing.....	9
1.2.2 The molecular mechanism of RNA PolII Promoter-proximal pausing ...	9
1.2.3 The regulation mechanism of RNA PolII transcription elongation stimulation.....	11
1.3 Activity regulation of P-TEFb	13
1.3.1 Structure and function of P-TEFb.....	13
1.3.2 Activity regulation mechanism of P-TEFb.....	14
1.3.3 Signal and molecular mechanisms of P-TEFb activation.....	16
1.4 Signalling pathway of P-TEFb recruitment to chromatin.....	17
1.4.1 P-TEFb recruitment pathway of Brd4 dependent	18
1.4.2 P-TEFb recruitment pathway of SEC dependent.....	23
1.5 3' end mRNA transcription termination	27
1.6 Content and significance of the project	29
1.5.1 Content of the project.....	29
1.5.2 Significance of the project	30

Chapter II Materials and methods.....	32
2.1 Reagents and instruments.....	32
2.1.1 Cell lines、 E.coli and plasmids.....	32
2.1.2 Reagents and materials	33
2.1.3 Instruments and expendable supplies.....	35
2.2 Solution recipe.....	36
2.2.1 The solutions for preparation of competent E.coli cells.....	36
2.2.2 The solutions for preparation of DNA.....	37
2.2.3 The solutions for subclone.....	38
2.2.4 The solutions for cell culture, transfection and infection.....	38
2.2.5 The solutions for ChIP.....	39
2.2.6 The solutions for bichemistry experiment.....	40
2.2.7 The solutions for Western Blot.....	40
2.3 Protocols and recipes.....	41
2.3.1 Preparation of competent E.coli cells.....	41
2.3.2 Plasmids transformation.....	42
2.3.3 Small-scale plasmid DNA extraction.....	42
2.3.4 Medium -scale plasmid DNA extraction.....	43
2.3.5 DNA Restriction endonuclease digestion of DNA.....	44
2.3.6 DNA agarose gel electrophoresis.....	45
2.3.7 DNA Extraction from agarose gel (homemade by lab).....	46
2.3.8 DNA ligation.....	47
2.3.9 Polymerase chain reaction.....	47
2.3.10 PCR mutagenesis (by modified QuikChange Site-Directed Mutagenesis)	48
2.3.11 Construction of the specific shRNA.....	50
2.3.12 Cell culture.....	51
2.3.13 Cell transient transfection.....	52

2.3.14 Lenti-Virus infection.....	53
2.3.15 Pharmacological treatment.....	53
2.3.16 Modified Nucleic fractionation.....	54
2.3.17 Co-Immunoprecipitation.....	54
2.3.18 SDS-PAGE	55
2.3.19 Western blot.....	56
2.3.20 HCT116 Cell proliferation assay	56
2.3.21 HCT116 Flow cytometry	57
2.3.22 MNase ChIP and exo-ChIP.....	57
2.3.23 Luciferase assay	60
2.3.24 Total RNA isolation.....	60
2.3.25 qRT-PCR.....	61
Chapter III Results and Discussion.....	64
3.1 Establishment of the model on HMBA- induced PolII pausing release.....	64
3.2 Establishment of the method which is used to research PolII pausing release	66
3.3 SEC mediates the dissociation of NELF.....	70
3.4 The dissociation of NELF on promoter region depends on AFF1, but not AFF4.....	73
3.4.1 P-TEFb recruited by Med26is responsible for the dissociation of NELF-E, whereas the P-TEFb from Paf1 is responsible for the dissociation of NELF-A	73
3.4.2 AFF1 and AFF4 are functionally redundant for recruiting P-TEFb to NELF-E, whereas only AFF1 works for delivering P-TEFb to NELF-A.....	76

3.5 The recruitment of P-TEFb responsible for Pol II Ser2 phosphorylation depends on (AFF4)SEC.....	80
3.5.1 Silencing Spt5 will promote Pol II enter transcription elongation directly	80
3.5.2 The phosphorylation of Pol II Ser2 depends on (AFF4)SEC	83
3.6 The Phosphorylation of Pol II Ser2 is dispensable for transcription elongation	85
3.7 The Phosphorylation of Pol II Ser2 is indispensable for 3' end mRNA cleavage	88
3.8 Discussion and Future work	92
References	95
Acknowledgement.....	102

英文缩略对照

Abbreviation	Full Name
7SK snRNP	7SK small nuclear ribonucleoprotein, HEXIM1/7SK/ LARP7/BINCD3/P-TEFb
BCDIN3	Bicoid-interacting protein-3
BET	Bromodomains and extraterminal
BPV	Bovine Papilloma Virus
Brd4	Bromodomain-containing protein 4
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation
ChIP-seq	Chromatin Immunoprecipitation sequencing
Cal A	Calyculin A
CaM	calmodulin
CaMK	calmodulin dependent kinase
CaMKK	calmodulin-dependent protein kinase kinase
CBP	CREB-binding protein
CDKs	Cyclin-dependent kinases
CsA	Cyclosporine A
CTD	C-terminal domain
DRB	5,6-dichloro-1-b-D-ribofuranosyl-benzimidazole
DSIF	DRB-sensitivity inducing factor
EAF	ELL-associated factor
ELL	eleven-nineteen lysine-rich protein
GRO-seq	Global Run-On Sequencing
GTF	General transcription factor
HDAC	Histone deacetylase
HIV-1	Human immunodeficiency virus type 1
HMBA	Hexamethylene bisacetamide

Abbreviation

HPV	Human papillomavirus
HSEN	High Salt Extracted Nucleic
HSF	High salt fraction
JNK	C-Jun N-terminal kinase
LSEN	Low Salt Extracted Nucleic
LSF	Low salt fraction
LTCC	L-type calcium channels
LTR	Long terminal repeats
Med1	Mediator subunit1
Med23	Mediator subunit23
Med26	Mediator subunit26
MLR	Microcystin LR
MePCE	Methylphosphate Capping Enzyme
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NELF	Negative elongation factor
NFAT	Nuclear factor of activated T cells
NLS	Nuclear localization signal
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
pA site	PolyA site
PI	Propidium Iodide
PI3K	Phosphoinositide-3 kinase
PIC	Preinitiation complex
PKA	cAMP-dependent protein kinase
PKB	Protein kinase B
PKC	Protein kinase C
Pol II	RNA polymerase II
Pol IIpausing	RNA polymerase II pausing

Abbreviation

PP1 α	Protein phosphatase 1 α
PP2B / CaN	Protein phosphatase 2B /Calcineurin
PRGS	Primary response genes
P-TEFb	Positive transcription elongation factor b
Paf1	Polymerase II associate factor -1
RNA-seq	RNA Sequencing
S6K1	S6 kinase-1
SKIP	Splicing-associated c-Ski-interacting protein
snRNP	Small nuclear ribonucleoprotein particle
SEC	Super elongation complex
SRGs	Secondary response genes
TAR	Transacting-response
TBP	TATA box-binding protein
TEC	Transcription elongation complex
TF II (D, B, E, F, & H)	General transcription factor II (D, B, E, F, & H)

摘要

编码蛋白的真核细胞基因的转录是由 RNA Polymerase II 通过一系列的高度复杂有序的调控机制完成的，整个转录的循环主要分为起始、延伸以及终止三个基本环节，其中延伸是 mRNA 转录中至关重要的一步，它决定了 mRNA 在基因转录中的合成速率。mRNA 的转录延伸是由正性和负性转录延伸因子共同参与调控的，当 mRNA 转录出了大概 20-30nt 的时候，负性转录延伸因子 NELF 和 DRB 敏感因子 DSIF 通过跟 RNA polymerase II(Pol II)的结合，使得 Pol II 先暂停下来，正性转录延伸因子 P-TEFb 通过磷酸化 NELF 和 DSIF，使得 NELF 从 Pol II 上解离下来，而 DSIF 被磷酸化后则从一个负性转录延伸因子转变为正性转录延伸因子，同时 Pol II 的最大的亚基 RPB1 的 CTD 的七肽重复序列的第二位的丝氨酸 Ser2 被 P-TEFb 磷酸化，这时候 Pol II 便从暂停状态进入到了转录延伸的状态。在转录延伸被激活的过程中，NELF 复合物的解离是至关重要的一环，然而目前对于 NELF 解离的分子机制尚不清楚。我们通过使用 HMBA 诱导 HeLa 细胞的模型，在体内运用分子和生化的技术方法发现了：1) Med26 所调控的 NELF-E 的解离和 Paf1 所调控的 NELF-A 的解离对 Pol II pausing 的释放都是必须的。2) 并且，我们还发现了 SEC 的亚类 (AFF1)SEC 和 (AFF4)SEC 对 NELF 解离的功能的不同，NELF 的解离是依赖于(AFF1)SEC，而不是(AFF4)SEC。3) 以往前人的体外实验模型研究都认为 P-TEFb 对 Ser2 的磷酸化是转录延伸的激活所必须的，而我们的体内实验研究很惊喜的发现 P-TEFb 对 Ser2 的磷酸化对转录延伸并非必须的，而对于 3'端 mRNA 的 Cleavage 则是必须的。4) 不仅如此，我们还发现了磷酸化 Ser2 的 P-TEFb 是由(AFF4)SEC 所募集的，而跟(AFF1)SEC 则无关。以上我们的这些研究成果将对我们这个领域的研究有着深远的意义，首先在基础研究方面进一步深化了人们对于 NELF 转录调控机制的认识，很清晰的向人们揭示了 NELF 解离的分子机制。更让人惊喜的是我们弄清楚了 Ser2 磷酸化后的功能到底是什么，从而纠正了几十年来人们对这一问题认识上的错误。此外我们还发现了不同的 SEC 亚类在基因的转录调控过程中它们功能靶点的不同。而在临床应用方面，我们知道基因的转录延伸跟癌症，心肌肥大等疾病都密切相关，因而我们对于 NELF 解离的信号通路的发现，将很可能会为我们治疗这些疾

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 for delivery details.