

学校编码：10384
学号：21620110153941

分类号____密级____
UDC____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

核受体 Nur77 二聚化的结构生物学研究

Structural Studies of
Nuclear Receptor Nur77 Dimerization

李安忠

指导教师姓名：林天伟 教授，吴乔 教授

专业名称：细胞生物学

论文提交日期：2015 年 12 月

论文答辩时间：2015 年 11 月

学位授予日期：2015 年 12 月

答辩委员会主席：_____

评 阅 人：_____

年 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

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

厦门大学博硕士学位论文摘要库

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 2025 年 4 月 23 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

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

核受体超家族是一类进化上相关并且能够与特定的 DNA 片段相互结合的转录因子。隶属于这一超家族的孤儿核受体 Nur77, 在各种不同刺激的诱导下, 调控细胞生长、分化、凋亡, 并在生物体发育的过程中发挥重要的作用, 近年来已经成为一个重要的潜在药物靶点被广泛地研究。典型的核受体在受到特定的刺激下, 若与相应配体结合, 会以其配体结合结构域(LBD)为主发生同源或异源二聚化, 并通过与 DNA 上被称之为应答元件的特定序列结合, 发挥转录激活的生理功能。Nur77 能够以单体、同源二聚体、异源二聚体三种方式分别与相应的应答元件结合, 然而其具体的二聚化机理尚未被揭示。

第一个部分的研究中, 我们研究已经被本实验室解析、具有高分辨率的 Nur77LBD 结构域晶体结构, 发现其呈现出一种特殊的二聚化形式, 即以 H11-H12 区域为相互作用面的二聚化。这种全新的二聚化形式与典型的核受体二聚化形式截然不同, 与之前发现的一些非典型的核受体二聚化形式也不相同。通过软件分析, 我们认为这种二聚化形式能够在溶液状态下稳定存在, 但由于作用面面积较小而在某些条件下也容易解聚。随后的 X 射线小角散射实验以及凝胶过滤柱层析实验中, 我们进一步证实了以上的推断, 而对 LBD 的突变实验也显示 H11-H12 区域对于其溶液中状态的维持极为重要。

第二个部分的研究中, 我们试图解析二聚化的 Nur77 DNA 结合结构域(DBD)与其同源二聚体应答元件 NurRE 复合物的晶体结构, 进而从另一个方面揭示 Nur77 的二聚化机理, 同时也从侧面研究 LBD 二聚化在 Nur77 与 DNA 结合时的形式和作用。我们克隆并表达了 Nur77 DBD 的蛋白, 并与 NurRE 共同纯化后进行了晶体生长条件的筛选和优化, 最终得到了晶体类似物, 为解析 DBD 与 NurRE 复合物晶体结构奠定了基础。

本论文通过对 Nur77 不同结构域二聚化及其与同源二聚应答元件 NurRE 复合物结构的研究, 揭示了 Nur77 二聚化的特殊形式, 并推测其在细胞内可能存在不同的二聚化形式。这对于揭示核受体特别是孤儿核受体, 在细胞内结合或不结合 DNA 时发挥不同生理功能的机理, 具有重要的意义。

关键词：Nur77 二聚化 LBD DBD

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

Nuclear receptor superfamily consists of transcription factors that are evolutionarily related and can interact with specific DNA fragments. As a member of this super family, orphan nuclear receptor Nur77 participates in regulation of cell growth, differentiation and apoptosis under various stimuli and plays an important role in development process. In recent years, Nur77 becomes a widely studied potential drug target. Under specific stimuli such as binding with the corresponding ligand, classic nuclear receptors form homo- or heterodimers mainly by their ligand binding domains (LBDs), and interact with specific DNA sequences called response element (RE) for their function of transcriptional activation. Nur77 monomers, homodimers and heterodimers can combine with different response elements, respectively. However, the exact mechanism of the dimerization is yet to be revealed.

During the analysis of prior study on Nur77 in the LBD high-resolution crystal three-dimensional structure, we found a special form of dimerization by H11-H12 dimeric interface of LBD. This new form of dimerization was different from that of classic nuclear receptors dimerization or some nonclassic nuclear receptors reported before. Through the software analysis, we believed that this form of dimerization can exist stably in solution, but de-dimerization might occur under certain conditions due to the small surface area. We further confirmed the above results from small angle X ray scattering as well as gel filtration column chromatography experiments, and the LBD mutation test showed that the H11-H12 motif was very important for the dimer's maintenance in solution.

In the second part of the study, we tried to get the complex crystal structure of Nur77 DNA binding domain (DBD) dimer and the dimeric response element, NurRE, and then showed the dimerization mechanism of Nur77 and its LBD when Nur77 bind with DNA. We cloned and expressed Nur77 DBD, and purified the protein with NurRE oligo, and then optimized the crystallization conditions. Finally, we got the

crystal analogues, which laid the foundation for the crystal structure of NurRE and DBD complex.

Through revealing a special form of dimerization by Nur77 LBD crystal structure and structure research of DBD complex with response element NurRE, we speculated that Nur77 had different form of dimerization in vivo. It is significant contribution to revealing the mechanism of different functions of nuclear receptors, especially the orphan nuclear receptors.

Key words: Nur77; Dimerization; LBD; DBD

目 录

摘 要	I
Abstract	I
目 录	i
Table of Contents.....	i
前言	1
1. 核受体超家族概述.....	1
2. 孤儿核受体 Nur77.....	3
2.1. Nur77 各结构域的三维结构及其功能的研究	3
2.1.1. A/B 区——N 端结构域.....	4
2.1.2. C 区——DNA 结合结构域.....	4
2.1.3. D 区——铰链区	5
2.1.4. E 区——配体结合结构域.....	5
2.2. Nur77 的分布、表达及转录后修饰	6
2.3. Nur77 对下游基因的转录调控	8
2.3.1. Nur77 与 DNA 的结合	8
2.3.2. Nur77 对下游基因的调节	10
2.4. Nur77 依赖蛋白间相互作用的生理功能	11
2.4.1. 与其他转录因子相互作用而影响它们的转录活性	11
2.4.2. 通过相互作用对多种酶活性的抑制	11
2.4.3. 定位至胞浆和线粒体而触发细胞凋亡	12
2.4.4. 调控糖代谢、炎症反应等	12
3. 核受体的二聚化研究	13
3.1. 核受体 LBD 的典型二聚化位点.....	13
3.2. 核受体 LBD 的非典型二聚化位点.....	14
3.3. Nur77 家族及其它物种同源受体 LBD 的二聚化	16

4. 结构生物学和蛋白质结晶	18
4.1. 结构生物学.....	18
4.2. 结构生物学研究方法.....	19
4.3. X 射线小角散射技术.....	20
4.3.1. X 射线小角散射的原理.....	20
4.3.2. X 射线小角散射的应用.....	20
4.4. 蛋白质的结晶原理及方法.....	21
5. 本论文的研究意义和目的	23
材料与方法	25
1. 材料	25
1.1. 主要试剂.....	25
1.2. 主要仪器.....	26
1.3. 质粒与菌株.....	27
2. 常用试剂及培养基的制备	27
2.1. 分子克隆相关试剂.....	27
2.2. 感受态制备相关试剂.....	28
2.3. 大肠杆菌培养基及相关试剂.....	28
2.4. SDS-PAGE 相关试剂.....	29
2.5. 蛋白纯化相关试剂.....	29
3. 实验方法	30
3.1. 原核表达质粒的构建.....	30
3.1.1. PCR 引物的设计.....	30
3.1.2. PCR 基因扩增.....	30
3.1.3. 小量回收 DNA 扩增产物.....	31
3.1.4. 质粒载体双酶切.....	32
3.1.5. LIC 法构建重组质粒.....	32
3.1.6. 大肠杆菌超级感受态的制备.....	33
3.1.7. 转化.....	33
3.1.8. 小量提取质粒.....	34
3.2. 重组蛋白的原核表达.....	34
3.2.1. 小量表达实验.....	34

3.2.2. 重组蛋白的大量表达	34
3.3. 蛋白的纯化.....	35
3.3.1. Ni-NTA 亲和柱层析.....	35
3.3.2. 凝胶过滤柱层析	35
3.4. 寡核苷酸的纯化.....	35
3.5. 重组蛋白的结晶实验.....	36
3.5.1. 结晶条件的初步筛选	36
3.5.2. 结晶条件的优化	36
结果与分析	37
1. Nur77 LBD 的二聚化研究	37
1.1. 从晶体结构中看到的 LBD 二聚化位点.....	37
1.2. 用 PDBePISA 分析晶体结构中的相互作用	39
1.3. X 射线小角散射分析溶液中 LBD 的聚合态.....	43
1.4. 凝胶过滤柱层析分析 LBD 的聚合态.....	48
1.5. LBD 二聚体与 DBD 二聚体的对接	49
2. Nur77 DBD 与同源二聚应答元件 NurRE 复合物的晶体学研究	50
2.1. Nur77 DBD 重组克隆的构建.....	50
2.2. M9、M10 蛋白的试表达与初步纯化	52
2.3. M9 DBD 与 M10 DBD 蛋白的表达与纯化.....	54
2.4. NurRE 寡核苷酸的设计与纯化	59
2.5. 复合物的纯化.....	61
2.6. 复合物的晶体的筛选.....	63
总结与讨论	66
参 考 文 献	69
致 谢	84

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Table of Contents

Abstract (Chinese)	I
Abstract (English)	I
Table of Contents (Chinese)	i
Table of Contents (English)	i
Preface	1
1. Introduction of nuclear receptor superfamily	1
2. Introduction of orphan nuclear receptor Nur77	3
2.1. Domain structure and function of Nur77	3
2.1.1. A/B region—N terminal domain	4
2.1.2. C region—DNA binding domain	4
2.1.3. D region—hinge domain	5
2.1.4. E region—ligand binding domain	5
2.2. Distribution, expression and posttranscriptional modification of nuclear receptor Nur77	6
2.3. Transcriptional regulation by Nur77	8
2.3.1. Interaction of Nur77 and DNA	8
2.3.2. Regulation of downstream genes by Nur77	10
2.4. Nur77 function by protein-protein interaction	11
2.4.1. Interaction with other transcription factors	11
2.4.2. Interaction with enzymes.....	11
2.4.3. Induce apoptosis	12
2.4.4. Regulation glucose metabolism and inflammation reactions.....	12
3. Study of nuclear receptor dimerization	13
3.1. Classic dimeric interface of nuclear receptor LBD.....	13
3.2. Nonclassic dimeric interface of nuclear receptor LBD.....	14

3.3. LBD dimeric interface of Nur77 family and other homo-receptors	16
4. Structural biology and protein crystallization	18
4.1. Introduction of structural biology	18
4.2. Technology of structural biology	19
4.3. Introduction of X-ray small angle scattering (SAXS)	20
4.3.1. Principle of SAXS	20
4.3.2. Application of SAXS	20
4.4. Principle and methods of protein crystallization	21
5. Background	23
Material and methods	25
1. Material	25
1.1. Primary reagents	25
1.2. The main instruments	26
1.3. Plasmids and strains	27
2. Preparation of reagents	27
2.1. Reagents for molecular cloning	27
2.2. Reagents for competent cell	28
2.3. Reagents for bacterial fermentation	28
2.4. Reagents for SDS-PAGE	29
2.5. Reagents for protein purification	29
3. Methods	30
3.1. Construction of plasmids for bacterial expression	30
3.1.1. PCR primer design	30
3.1.2. PCR	30
3.1.3. DNA gel extraction	31
3.1.4. Double enzyme digestion of carrier plasmids	32
3.1.5. Ligase independent cloning	32
3.1.6. Preparation of competent cell	33
3.1.7. Transformation	34
3.1.8. Plasmids extraction	34
3.2. Expression of recombinant protein	34

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.