

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 21620071152012

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

MED 激活 AMPK 的初步研究

A Preliminary Study On Activating AMPK By MED

杨 梅

指导教师姓名: 张连茹 副教授

专 业 名 称: 微生物学

论文提交日期: 2010 年 5 月 10 日

论文答辩时间: 2010 年 6 月 5 日

学位授予日期:

答辩委员会主席: 黄耀坚 教授

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( )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

摘 要	I
Abstract	II
常用英文缩写词	IV
<b>1.前言</b>	<b>1</b>
<b>1.1 AMPK 简介</b>	<b>1</b>
1.1.1 AMPK 的结构与功能	1
1.1.2 AMPK 的活性调节	6
1.1.3 AMPK 的主要生理学效应	7
1.1.4 AMPK 与代谢综合征的关系	10
<b>1.2 AMPK 激动剂的研究进展</b>	<b>10</b>
1.2.1 AICAR 对 AMPK 的激活	11
1.2.2 A769662	12
1.2.3 PT-1	13
<b>1.3 本课题的研究背景、目的及意义</b>	<b>14</b>
<b>2. 材料与方法</b>	<b>15</b>
<b>2.1 材料</b>	<b>15</b>
2.1.1 化合物 (MED) 来源	15
2.1.2 细胞株和菌株来源	15
2.1.3 质粒来源	15
2.1.4 主要试剂和试剂盒	15
2.1.5 主要耗材和仪器	17
2.1.6 主要试剂的配置	19
<b>2.2 实验方法</b>	<b>22</b>
2.2.1 生化试验筛选 AMPK 的小分子激动剂	22
2.2.2 细胞实验	25
2.2.3 shRNA 的构建和定点突变质粒的构建	28

2.2.4 蛋白电泳和 western blot	33
<b>3. 结果与分析</b>	<b>35</b>
3.1 AMPK 激动剂 MED 的发现	35
3.1.1 MED 对 AMPK 的激活作用	35
3.1.2 Western Blot 实验证明 MED 对 AMPK 的激活作用	36
3.2 MED 对 AMPK 的激活作用及其对脂代谢的影响	38
3.2.1 MED 对 AMPK 的激活作用具有细胞特异性	38
3.2.2 MED 对肝癌细胞 HepG2 脂代谢的影响	41
3.2.3 MED 对胞内 AMPK 的激活不涉及细胞胁迫	42
3.3 MED 与 AMPK 的结合作用	43
3.3.1 RNAi 确定 ME 与 AMPK 的 $\gamma$ 亚基结合	43
3.3.2 MED 与 AMPK $\gamma$ 亚基结合靶点的分析	47
<b>4. 讨论与结论</b>	<b>54</b>
4.1 讨论	54
4.1.1 ELISA 筛选模型的应用	54
4.1.2 MED 对细胞内 AMPK 的激活具有选择性	54
4.1.3 pho-ACC 作为 AMPK 激活的检测指标	54
4.1.3 MED 与 AMPK 可能存在多个结合位点	55
4.1.4 MED 与其他已知的小分子激活剂的结构比较	56
4.2 结论	56
<b>5. 展望</b>	<b>58</b>
5.1 MED 对 AMPK 的激活在动物实验上的应用	58
5.2 MED 与 AMPK 结合位点的确证	58
5.3 改良 MED 结构获得活性更高的衍生物	58
<b>参 考 文 献</b>	<b>59</b>

## Catalogue

<b>Abstract</b> .....	<b>II</b>
<b>Common English Abbreviation</b> .....	<b>IV</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Brief introduction of AMPK</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 structure and function of AMPK.....	1
1.1.2 Regulation of AMPK's activity.....	6
1.1.3 Major Physiology effects of AMPK.....	7
1.1.4 Relationship between AMPK and Metabolic Syndrome.....	10
<b>1.2 Research progress of AMPK's agonist</b> .....	<b>10</b>
1.2.1 AICAR activates AMPK.....	11
1.2.2 A769662.....	12
1.2.3 PT-1.....	13
<b>1.3 BACKGROUND AND SIGNIFICANCE OF THIS STUDY</b> .....	<b>14</b>
<b>2. Materials and Methods</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1 Materials</b> .....	<b>15</b>
2.1.1 compounds.....	15
2.1.2 cell line and bacterial strain.....	15
2.1.3 plasmid.....	15
2.1.4 reagent and kits.....	15
2.1.5 consumables and instruments.....	17
2.1.6 preparing of major solution.....	19
<b>2.2 methods</b> .....	<b>22</b>
2.2.1 screening agonist of AMPK in biochemistry.....	22
2.2.2 cell experiment methods.....	25
2.2.3 construction of plasmid.....	28
2.2.4 protein electrophoresis and Western Blot.....	33
<b>3. Result and analysis</b> .....	<b>35</b>

<b>3.1 finding of MED Activates ampk</b> .....	<b>35</b>
3.1.1 MED activated AMPK .....	35
3.1.2 Western Blot proved MED activated AMPK .....	36
<b>3.2 MED activated AMPK and influenced lipid metabolism</b> .....	<b>38</b>
3.2.1 MED had a selectivity in activating cellular AMPK .....	38
3.2.2 MED influenced lipid metabolism in HepG2 cell .....	41
3.2.3 MED had a low cytotoxicity .....	42
<b>3.3 Interaction between MED and AMPK</b> .....	<b>43</b>
3.3.1 RNA interupt to find out MED binding on AMPK $\gamma$ subunit .....	43
3.3.2 Bindsite between MED and AMPK $\gamma$ subunit .....	47
<b>4. Discussion and Conclusion</b> .....	<b>54</b>
<b>4.1 Discussion</b> .....	<b>54</b>
4.1.1 ELISA modeling .....	54
4.1.2 MED had a selectivity in activating cellular AMPK .....	54
4.1.3 Choose pho-ACC to reflect the activaty of AMPK .....	54
4.1.3 There may be mutible binding site between MED and AMPK .....	55
4.1.4 Compared MED to other small molecular agonist .....	56
<b>4.2 conclusion</b> .....	<b>56</b>
<b>5. prospects</b> .....	<b>58</b>
<b>5.1 Animal experiment</b> .....	<b>58</b>
<b>5.2 Confirmation binding site between MED and AMPK</b> .....	<b>58</b>
<b>5.3 To obtain more active derivatives by modifying MED</b> .....	<b>58</b>
<b>Reference</b> .....	<b>59</b>

## 摘要

依赖于 5'-AMP 激活的蛋白激酶——AMPK 在保持细胞微环境的能量稳态上扮演了至关重要的角色，能够被细胞内 AMP 的增多和 ATP 的减少所激活，作为代谢感受器调节细胞内 ATP 相关的代谢途径。AMPK 除了调节糖代谢，脂代谢，蛋白质合成等很多能量相关的物质代谢途径外，还在细胞凋亡和血管生成途径中起到重要调节作用。如果能量代谢失衡，则会引起代谢综合症等多种疾病，严重影响现代人的生活，威胁人的健康。作为能量代谢过程中的关键酶，AMPK 可以作为代谢综合症的治疗靶点。

AMPK 不仅能够被细胞内 AMP/ATP 的比值上升所激活，也能够被其细胞内的上游激酶所调控，还会响应于缺氧、缺血、氮氧化物等细胞胁迫作用而激活。此外，也发现了一些 AMPK 的小分子激动剂，如 metformin, AICAR 等。AMPK 的小分子激动剂能够调控 AMPK 活性，从而达到调节细胞能量代谢的作用。AMPK 的小分子激活剂可以作为先导化合物研发成药，为代谢综合症的治疗提供有效手段，因此，AMPK 的小分子激活剂一直受到研究人员的重视。由于已知的小分子存在特异性差，用量大等缺点，新颖、高效、高专一性的 AMPK 小分子激动剂仍有待发现。

在本实验中，我们通过 ELISA 模型、细胞实验结合 Western Blot 实验，筛选出了一个 AMPK 的小分子激动剂 MED。实验发现，MED 在生化水平和细胞水平上对 AMPK 均具有激活作用，并且在分子和细胞水平上，MED 对 AMPK 的激活均表现出一定范围内的浓度依赖性。MED 在 HepG2 细胞中激活 AMPK 后，能够通过抑制脂肪酸合成酶 ACC 的活性抑制脂肪合成，表现为细胞内脂肪量减少。实验还发现 MED 使细胞内 AMPK  $\gamma$  亚基表达量上调，细胞转染敲低胞内 AMPK  $\gamma$  亚基表达量的实验会影响 MED 对 AMPK 的激活作用，因此推断 MED 结合在 AMPK 的  $\gamma$  亚基上。通过定点突变实验和细胞转染试验的结果推断 AMPK  $\gamma$  亚基 89 位苏氨酸和 273 位的苯丙氨酸可能是 MED 与 AMPK 的两个结合位点。

我们的实验发现了一个 AMPK 的新的的小分子激动剂 MED，并且对 MED 和 AMPK 的相互作用机理和结合位点进行了初步探讨，为开发以 AMPK 为靶点的药物提供了先导化合物，也为进一步研究 AMPK 的活化机理提供了理论基础。

关键字：AMPK；激动剂；靶点分析



## Abstract

AMP-activated protein kinase plays an important role in keeping a cellular energy homeostasis, which is activated in response to the increasing of intracellular AMP or the decreasing of intracellular ATP, modulating ATP-related metabolism pathway. Besides glucose metabolism, lipid metabolism, and synthesis of protein, AMPK is also very important in cell apoptosis and vein generation. Metabolic Syndrome will be caused by the imbalance of energy metabolism, which affects daily life and imperil human health. As the key enzyme in the metabolism process, AMPK can be a target for the treatment of Metabolic Syndrome.

AMPK can not only be activated by the increasing of intracellular AMP/ATP ratio, but also be activated by its upstream kinase, in addition, AMPK can respond to cell pressure and be activated, such as hypoxia, ischemia and Nitrogen oxides. Scientists also found some small molecular agonists, like metformin, AICAR and so on. These agonists can regulate cellular energy metabolism by controlling AMPK's activity. Small molecular agonist of AMPK can be developed into drug and will provide efficient methods for the treatment of Metabolic Syndrome, thus, small molecular agonist of AMPK is still attracting intensive research efforts. Due to the non-specificity and huge dosage of the known agonist, new agonist with efficiency and specificity remaining to be discovered.

Here we screened out a small molecular MED, which is an agonist of AMPK, by ELISA, cell experiment and Western Blot. We found MED can activate AMPK on biochemistry level and cell biology level with a dose-dependent. In HepG2 cell, MED can reduce cellular lipid through inhibiting the activity of lipid acid synthesis enzyme ACC, after it activated AMPK. We also found out that MED can induce the expression of AMPK  $\gamma$ , the interaction between MED and AMPK will be influenced by knocking-down the expression of AMPK  $\gamma$  subunit. Therefore we can infer that MED and AMPK interact by AMPK  $\gamma$  subunit. Result of site-directed mutation and cell transfection suggests that 89T and 273F might be two binding sites between MED and AMPK  $\gamma$  subunit.

Our experiment has screened out a new small molecular agonist of AMPK—MED, and studied the mechanism of interaction and the binding site between AMPK and MED. These research supplied a promising drug targeting AMPK, also provided theoretical basis for learning the activating mechanism of AMPK.

Key words: AMPK; agnoist; target analysis

厦门大学博硕士论文摘要库

## 常用英文缩写词

- 腺苷酸单磷酸核糖核苷酸 (Adenosine monophosphate, AMP)
- 腺苷酸三磷酸核糖核苷酸 (Adenosine triphosphate, ATP)
- 52-氨基咪唑-2(1H)-羧酰胺核糖核苷酸 (52-aminoimidazole-2(1H)-carboxamide ribonucleoside, ZMP)
- 依赖于 AMP 激活的蛋白激酶 (AMP-activated kinase, AMPK)
- 乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl-coa carboxylase, ACC)
- 真菌环氧二烯 (Mycoepoxydiene, MED)
- 绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP)
- 二甲基亚砷 (Dimethylsulphoxide, DMSO)
- 十二烷基磺酸钠 (Sodium dodecyl sulfonate, SDS)
- 磷酸缓冲液 (Phosphate-buffered saline, PBS)
- 二硫苏糖醇 (DL-Dithioerythritol, DTT)
- 乙二胺四乙酸 (Ethylene diaminetetracetic acid, EDTA)
- 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐  
(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)
- 小牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA)
- 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)
- DMEM 培养基 (Dulbecco's Modified Eagles' Medium, DMEM)
- RNA 干扰试验 (RNA interference, RNAi)
- 小片段发夹结构 RNA (small hairpin RNA)

## 1. 前言

### 1.1 AMPK 简介

#### 1.1.1 AMPK 的结构与功能

依赖于5'-AMP激活的蛋白激酶——AMPK，属于一个高度保守的蛋白激酶超家族，几乎存在于所有的真核细胞中<sup>[1]</sup>。在保持细胞微环境的能量稳态上AMPK扮演了至关重要的角色<sup>[2]</sup>。当胞内AMP/ATP的比率上升时，AMPK被激活。所以，AMPK像一个代谢感受器，或者说是“燃油表”一样，监控着胞内AMP和ATP的水平。一旦被激活，它将关闭ATP的合成代谢途径，转而打开脂肪酸氧化等消耗ATP的分解代谢途径<sup>[2,3]</sup>。

AMPK的发现是多个实验室研究的结果。Berg等人率先于1973年发现了一种与β-羟基-β-甲基戊二酸单酰辅酶 A (HMG-coA) 还原酶活性相关的蛋白激酶<sup>[2]</sup>，后来证明，该蛋白激酶是由AMP激活的<sup>[4]</sup>。Kim等人同时进行的实验发现了一种乙酰辅酶A羧化酶 (ACC) 的激酶，与上述Berg等人发现的蛋白激酶具有相关活性。最终，Hardie等人证明，HMG-coA还原酶的激酶与ACC的激酶是同一种蛋白激酶，即AMPK<sup>[5]</sup>。

AMPK是一个多底物酶，它既能够调节上述的HMG-coA还原酶，乙酰辅酶A羧化酶，也能够磷酸化糖原合成酶和对激素敏感的脂肪酶<sup>[6]</sup>。而AMPK自身也存在多种调节方式，它既能够受激素调节，也能够由运动，低氧或营养缺乏等刺激带来的细胞代谢应激所激活。由于AMPK多底物的特性以及AMPK对糖原、脂肪酸、胆固醇合成酶均有抑制作用，所以AMPK调控着细胞内能量的动态变化，在多个组织或器官中都发挥着重要作用<sup>[7]</sup>。AMPK对组织功能的影响如图1所示。

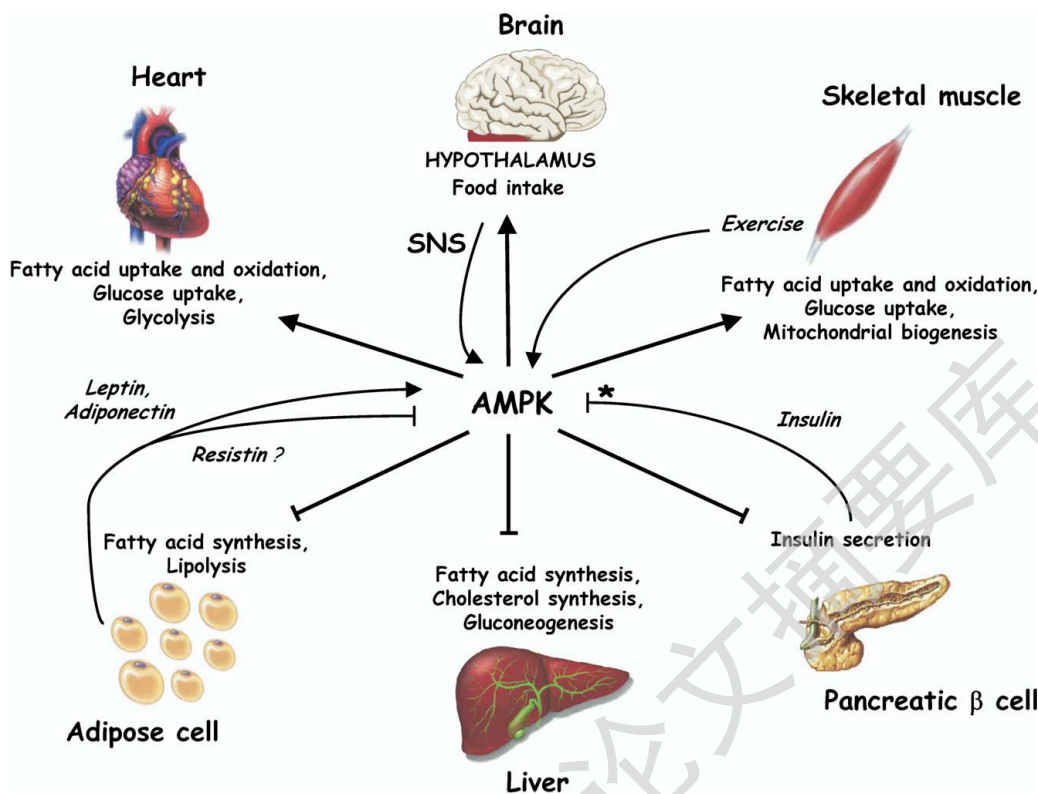


图 1 AMPK对生物体各个组织或器官的影响<sup>[7]</sup>

Fig. 1 Influence on several tissues or organs from AMPK

AMPK是一个异三聚体蛋白，由一个63kD的 $\alpha$ 亚基、一个40kD的 $\beta$ 亚基和一个38kD的 $\gamma$ 亚基组成<sup>[8]</sup>，其中的每个亚基都存在多种异构体，如 $\alpha 1$ ， $\alpha 2$ ， $\beta 1$ ， $\beta 2$ ， $\gamma 1$ ， $\gamma 2$ 和 $\gamma 3$ 等，这些异构体以 $\alpha : \beta : \gamma = 1 : 1 : 1$ 的比例组成AMPK的 $\alpha\beta\gamma$ 三聚体，存在于不同的生物组织中，呈现出组织细胞特异性<sup>[9]</sup>。目前已经重组表达了所有的12种 $\alpha\beta\gamma$ 复合体，并且证明这些重组体是有活性的<sup>[10]</sup>。AMPK的 $\alpha\beta\gamma$ 亚基结构如图2所示<sup>[11]</sup>。

AMPK的 $\alpha$ 亚基包括N端的激酶催化结构域 (Kinase catalytic domain, KCD)，自我抑制区域 (Autoinhibitory sequence, AIS)，和C端的复合物结合区 (complex binding domain, CBD)。AIS区域和CBD由一个柔韧性很强的铰链状肽段连接<sup>[12]</sup>。酿酒酵母和裂殖酵母在结构域上 (Snf1基因) 与哺乳动物的 $\alpha$ 亚基具有同源性。

$\alpha$ 亚基在AMPK复合体中起催化作用<sup>[13]</sup>。 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 亚基序列在N端的KCD区域是高度保守的 (89%的同源性)，但它们的C端序列有较大的不同<sup>[8]</sup>。 $\alpha$ 亚基与Snf1基因的激酶区域大约有60%的同源性，在整个亚基中，同源性大约占46%。 $\alpha$ 亚

基在亚细胞定位和AMP依赖性等方面的作用与它们所连接的 $\beta$ 亚基和 $\gamma$ 亚基的亚型直接相关。一般来说，含有 $\alpha 2$ 亚基的AMPK三聚体往往更容易被AMP激活，并且更倾向于选择定位在细胞核上，尤其是在AMPK处于活性状态下<sup>[14]</sup>。这些近核的包含 $\alpha 2$ 亚基的AMPK复合体可能是负责AMPK介导的转录调控，但在破骨细胞和巨噬细胞中只含有 $\alpha 1$ 的情况下，AMPK复合体也能发挥转录调控作用。

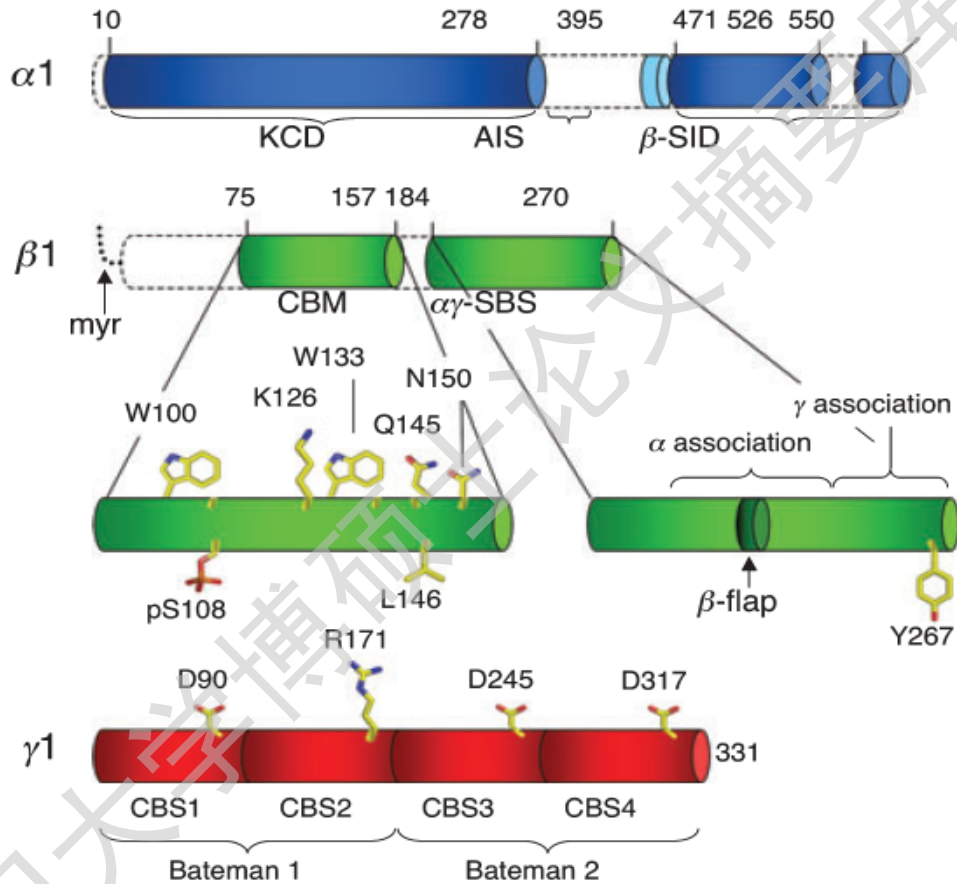


图 2 AMPK三个亚基的域组织示意图<sup>[11]</sup>

Fig. 2 Domain of AMPK subunits

许多蛋白激酶或其他类型的蛋白质会通过自身结构元件来直接或间接的阻断其功能位点或催化位点，从而进行自我调控。Crute等人发现了两种构型的 $\alpha$ 亚基都含有一段从C端到KCD域长80个残基的序列，能够对AMPK进行自我调控<sup>[12]</sup>。通过截断和删除不同的基因序列的实验，发现313-315这段序列对于自我调控功能是必需的<sup>[15]</sup>。AMPK的自我调控功能序列的位置与其他AMPK相关蛋白激酶家族成员（如MARK2）的泛素化区域的位置是对应的，而MARK2的泛素化

区域在该激酶被其上游激酶LKB1磷酸化的过程中起到重要作用<sup>[16]</sup>，提示此区域与AMPK在细胞内被上游的LKB1激酶激活的机理有关。如果KCD的298位缬氨酸和AIS区高度保守的328位亮氨酸发生突变，则AMPK的活性增强，并且不再受自我抑制的控制，该现象表明，如果假定AMPK激酶处于一个开放的非活化的构象，则氢键的形成对于保持它的自我调控功能是必需的。

$\beta$ 亚基能够锚定连接 $\alpha$ 亚基和 $\gamma$ 亚基，同时也负责AMPK蛋白在亚细胞结构水平向糖原和细胞膜上的定位，起到架构弓的作用。哺乳动物两种类型的 $\beta$ 亚基N端的复杂程度较低，只具有39%的同源性，而其余部分具有81%的高度同源性，同源性的程度表明 $\beta$ 亚基N端对调节不同类型亚基的功能起主要作用。 $\beta 1$ 亚基的C端序列高度保守，这段高度保守的序列负责连接 $\alpha$ 亚基和 $\gamma$ 亚基<sup>[17]</sup>。

图1还表明哺乳动物 $\beta 1$ 亚基的第2位甘氨酸酯化后（如豆蔻酰化），如果将2位甘氨酸突变为丙氨酸来除去豆蔻酰化则会引起双重效应。首先，携带突变位点的AMPK复合物在细胞内的定位从细胞膜部分转移到了细胞质部分<sup>[18]</sup>；其次，AMPK活性的本底值增强，且增强的比例与野生型的AMPK被AMP激活的最大程度相类似。现有观点认为，AMPK锚定细胞膜的机理需要豆蔻酰化，可能是由于哺乳动物 $\beta 1$ 的N端通过提供碱性残基与膜表面的电负性相互作用，也有可能是N端直接与某个特定的膜蛋白相互作用。而蛋白质复合物锚定到细胞膜上的机理尚不明确。 $\beta 1$ 亚基N端第2位的甘氨酸被突变成丙氨酸后，仍能够被AMP激活，提示豆蔻酰化调控AMPK活性的方式与AMP激活AMPK相比并不是多余的。 $\beta 1$ 亚基的豆蔻酰化在AMPK三聚体上形成了自我抑制的二级结构调控机制。

每个 $\gamma$ 亚基包含四个重复的胱硫醚- $\beta$ -合成酶（CBS）序列，组成两个Bateman域<sup>[19]</sup>。CBS区域是常见的核苷酸如AMP和ATP等的结合结构<sup>[20]</sup>。在酿酒酵母和裂殖酵母内发现的单独的 $\gamma$ 基因序列，与哺乳动物的 $\gamma 1$ 异构体很相似，相比之下， $\gamma 2$ 和 $\gamma 3$ 这两种亚基的N端有很大的延伸，与常规的Bateman区域有所不同。 $\gamma 1$ 亚基在各种组织中普遍分布，而 $\gamma 2$ 和 $\gamma 3$ 这两种构型则分别在心脏和肌肉中表达量比较高。

研究发现AMPK的变构结合位点在 $\gamma$ 亚基上<sup>[21]</sup>。目前尚未有直接的证据表明酿酒酵母或裂殖酵母的SNF1激酶的活性依赖核苷酸的结合，所以，酵母 $\gamma$ 亚基核苷酸结合区域的功能尚有待阐明。每个 $\gamma$ 亚基的CBS序列具有一个潜在的核苷酸

结合位点，该位点位于Bateman区域，在 $\beta$ 折叠的表面形成的口袋内。由于 $\gamma$ 亚基的CBS序列的差异，使得与结合位点相结合的核苷酸有所不同。如，在已知哺乳动物结构里，CBS1，CBS3，CBS4三个区域上的结合位点都与AMP结合，而在裂殖酵母中，CBS4区域能够与AMP，ZMP，或者ATP结合，而CBS2则与ADP结合。有时，同一结合位点既可与AMP结合，也可与ATP结合。如在哺乳动物 $\gamma$ 1中，CBS4区域上被AMP结合的位点4不能被ATP所取代，而位点1和3是能够被ATP取代的。早期关于结合位点的研究检测到了每个 $\gamma$ 亚基对应两摩尔的ATP或者AMP<sup>[20]</sup>，两个可以自由替换AMP或ATP的位点的出现解释了这一现象。

进一步的研究发现哺乳动物 $\gamma$ 1亚基上三个腺苷结合位点中的4位点结合的AMP是夹在两个 $\alpha$ 螺旋之间的，并且与两侧氨基酸残基形成两个氢键，因而4位上的AMP是不可置换的。

有关 $\gamma$ 亚基核苷酸结合方面的另一个重要特征是，在 $\gamma$ 亚基中心位置，CBS2序列的氨基酸组成中含有大量的碱性残基，而这些碱性残基可以与核苷酸提供的磷酸基团形成静电相互作用。因而，CBS2序列对 $\alpha\beta\gamma$ 三个亚基的相互作用意义重大，进而帮助调节全酶活性<sup>[22]</sup>。

$\gamma$ 2和 $\gamma$ 3亚基上的突变造成了人和猪的糖原贮藏疾病。人 $\gamma$ 2亚基上10个位点的突变与糖原贮藏性心肌病和心室预激有关（即Wolff-Parkinson-White综合症）。哺乳动物 $\gamma$ 亚基的结构中有8个残基与腺苷酸结合位点非常接近，而在这8个位点中，6个是直接作用于核苷酸磷酸化基团的<sup>[23]</sup>。 $\gamma$ 2突变影响AMP与蛋白的亲力度和与ATP的亲力度，并使AMPK活化，172位苏氨酸的磷酸化增强<sup>[20]</sup>。这种突变是有利于进化的<sup>[24]</sup>。

在哺乳动物AMPK中， $\alpha$ 亚基的C端形成由四个反平行的 $\beta$ 折叠和两个 $\alpha$ 螺旋组成的一个有序结构。AMPK $\alpha$ 亚基中的 $\alpha$ 螺旋与AMPK的 $\beta$ 亚基C端三个 $\beta$ 折叠通过大量氢键相连。此外， $\beta$ 亚基上的 $\beta$ 折叠还与 $\gamma$ 亚基的 $\beta$ 折叠形成了一个亚基间的 $\beta$ 结构域。这样，通过一个跨结构域的、八股的 $\beta$ 折叠，三个亚基就形成了稳定的三聚体结构。 $\beta$ 亚基和 $\gamma$ 亚基之间主要由氢键所连接形成稳定的骨架，如果其中形成氢键的关键氨基酸残基，如 $\beta$ 1亚基263位苏氨酸和267位酪氨酸发生突变，则会严重干扰 $\beta$ 亚基和 $\gamma$ 亚基之间的相互作用<sup>[25]</sup>。 $\beta$ 亚基和 $\gamma$ 亚基之间的相互结合是否可逆尚不明确。在敲除 $\beta$ 1亚基的小鼠干细胞中， $\gamma$ 亚基仍然表达，但是 $\alpha$ 1和 $\alpha$ 2



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.