

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 21620110153947

UDC_ _ _

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

核受体 PPARs 家族与新型激动剂的结构与功能研究

Structural and functional analysis of
novel agonists of PPARs

林圣宸

指导教师姓名: 李 勇 教 授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2013 年 11 月

论文答辩时间: 2013 年 11 月

学位授予日期: 2013 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2013 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

厦门大学博

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

摘要

过氧化物酶体增殖体激活受体家族包括 α 、 δ 、 γ 三个成员 (PPAR α 、PPAR δ 、PPAR γ)，它们是配体依赖型转录因子，是核受体超家族的重要成员，能够调节机体新陈代谢平衡，是国际上研发治疗心血管疾病、糖尿病等代谢类疾病药物的热门分子靶标。

心血管疾病与糖尿病是目前人类健康的两大杀手，然而临床上却缺乏安全有效的治疗药物。本文对 PPARs 家族成员进行深入研究，通过前期研究发现化合物伊洛前列素 (iloprost) 是 PPAR α 、PPAR δ 的新型特异性激动剂；米非司酮 (RU-486) 是 PPAR γ 的新型特异性类固醇激动剂。作为诺贝尔奖宠儿的前列腺素，它的衍生物 iloprost，在临床上广泛用于抗凝血与治疗心血管疾病，但治疗心血管疾病的分子机理却依然不明确。RU-486 一直以来都是人们道德舆论关注的焦点药物，主要用于终止妊娠，多年临床发现患者服用 RU-486 后会出现血糖降低的症状，但其分子机制仍不为人知。通过对 PPAR α /iloprost，PPAR δ /iloprost，PPAR γ /RU-486 复合体进行结晶、X 射线衍射，对收集的衍射数据进行解析，我们从结构生物学角度展示了 iloprost 分别与 PPAR α ，PPAR δ ，RU-486 与 PPAR γ 在配体结合域内不同残基间的独特结合模型，进而解释了 iloprost、RU-486 如何通过改变配体结合口袋 (LBP) 的空间位置以达到与配体结合结构域 (LBD) 相结合的目的，再而产生激动作用。并从平行进化的角度上，详尽地解释了 PPARs 家族成员间在氨基酸序列上的差异性导致配体结合的特异性的分子机制及其生理功能上的重要意义。通过细胞实验，我们揭示了 iloprost 与 RU-486 通过调节 PPARs 结构来介导 PPARs 相关信号通路这一重要调节作用，该结果充分地验证了受体和配体相互作用的结构与功能的紧密相关性。综上，本文的研究成果成功阐明了 iloprost 与 RU-486 在治疗心血管疾病与调节血糖方面的分子机理。同时，本文的结构机制可为药物设计提供一个合理、科学的新型模板来设计新颖的化合物，以用于治疗心血管疾病与糖尿病等代谢类疾病。

关键词：PPARs；伊洛前列素；米非司酮

Abstract

The PPARs are members of the nuclear receptor superfamily of ligand-inducible transcription factors. There are three PPAR subtypes: PPAR α , PPAR δ and PPAR γ . PPARs can regulate the expression of networks of genes and maintenance of metabolic homeostasis, and they are hot drug targets for cardiovascular disease, diabetes and so on. However, there are rare safe and useful medicines available in clinics.

Based on sufficient study results, we report here that iloprost was a novel PPAR α /PPAR δ agonist and RU-486 was a novel PPAR γ agonist. As we know, iloprost is a homolog of Prostacyclin, a ‘Nobel star compound’, which has been widely used in clinics. However, we knew little about the mechanisms in cardiovascular disease treatment. RU-486, which is associated with moral concerns, has been universally used for abortion, but no one knows that the target gene of RU-486 and its pathway in reducing the blood glucose level. In order to uncover these undiscovered mechanisms, we constructed the crystals of PPAR α /iloprost, PPAR δ /iloprost and PPAR γ /RU-486 protein complexes. By analyzing the crystal data, we revealed that the unique binding models of PPAR α / δ with iloprost and PPAR γ with RU-486 at the molecular level. And we concluded how the changes in atom space location of ligand binding pockets of PPARs modulate the functions of iloprost and RU-486 as agonists of PPAR α / δ and PPAR γ , respectively. At the same time, we compared the amino acid sequences among PPARs, and revealed that the differences in specific residues could result in the differential ligand selections, which underpinned their evolutionary significance. We also studied the downstream target genes of PPARs and demonstrated their novel signaling routes for these two drugs, which shed light on the relationship between structure and function of iloprost and RU-486.

Our findings together indicated that iloprost and RU-486 could be used as new

models for drug design, and that their derivatives may be potential compounds targeting PPAR α , PPAR δ and PPAR γ in the treatment of cardiovascular disease, insulin resistance and so forth.

Key words: PPARs; Iloprost; RU-486

目录

摘要.....	I
Abstract	II
目录.....	IV
Table of contents.....	VII
第一章 前言	1
1.1 PPARs 分型与结构	1
1.1.1 PPARs 分型.....	1
1.1.2 PPARs 结构.....	1
1.2 PPARs 与配体	5
1.2.1 PPAR α	7
1.2.2 PPAR δ	14
1.2.3 PPAR γ	24
1.3 Iloprost 与 RU-486 研究进展	43
1.3.1 Iloprost.....	43
1.3.2 RU-486.....	49
1.4 立题意义	53
第二章 材料和方法	55
2.1 实验相关药品与试剂	55
2.2 实验室主要仪器	55
2.3 DNA 相关实验和方法	56
2.3.1 质粒载体.....	56
2.3.2 PCR 实验.....	58
2.3.3 PCR 产物回收.....	60
2.3.4 质粒 DNA 的限制性内切酶处理.....	61

2.3.5	DNA 回收和纯化.....	61
2.3.6	DNA 连接反应.....	62
2.3.7	大肠杆菌感受态细胞的制备和转化.....	62
2.3.8	质粒 DNA 的提取.....	64
2.4	细胞相关实验	64
2.4.1	细胞培养基的配制.....	64
2.4.2	细胞的培养和传代.....	64
2.4.3	3T3-L1 细胞的培养及诱导分化	65
2.4.4	油红 O 染色.....	65
2.4.5	Cos7 细胞的瞬时转染	65
2.4.6	细胞总 RNA 的提取	66
2.4.7	荧光素酶报告基因分析实验.....	66
2.4.8	AlphaScreen 分析实验.....	67
2.5	融合蛋白的表达与纯化	68
2.5.1	融合蛋白的表达.....	68
2.5.2	融合蛋白的纯化.....	68
2.5.3	SDS-PAGE 电泳及染色	69
2.6	蛋白结晶	70
2.6.1	结晶前准备.....	70
2.6.2	蛋白质结晶.....	70
2.6.3	晶体收集与冻存.....	71
2.7	蛋白质晶体数据采集	71
2.8	蛋白质晶体结构解析	72
2.8.1	晶体数据初处理.....	72
2.8.2	晶体数据精处理.....	72
第三章	结果与讨论	73
3.1.	PPARs LBD 蛋白质纯化	73
3.1.1.	PPAR α LBD 蛋白质纯化	73
3.1.2.	PPAR δ LBD 蛋白质纯化.....	76

3.1.3. PPAR γ LBD 蛋白质纯化.....	78
3. 2. Iloprost 是 PPARα 和 PPARδ 特异性激动剂.....	80
3.2.1. Iloprost 在细胞外与 PPAR α 和 PPAR δ 及其辅因子相互作用.....	81
3.2.2. Iloprost 在细胞内特异性并剂量依赖性激活 PPAR α 和 PPAR δ	84
3.2.3. Iloprost 与 PPAR α 和 PPAR δ 共结晶.....	86
3.2.4. Iloprost 与 PPAR α 和 PPAR δ 复合物晶体结构.....	87
3.2.5. Iloprost 与 PPAR α 和 PPAR δ 独特的结合方式.....	91
3. 3. RU-486 是 PPARγ 特异性激动剂.....	99
3.3.1. RU-486 与 PPAR γ 及其辅因子相互作用.....	100
3.3.2. RU-486 特异性并剂量依赖性激活 PPAR γ	102
3.3.3. RU-486 与 PPAR γ 共结晶.....	105
3.3.4. RU-486 与 PPAR γ 复合物晶体结构.....	106
3.3.5. RU-486 与 PPAR γ 独特的结合模式.....	109
3.3.6. RU-486 通过 PPAR γ 介导的生理功能.....	115
3. 4. Iloprost, RU-486 对 PPARs 特异性选择分子机制.....	117
3.4.1. Iloprost 对 PPARs 的识别机制.....	118
3.4.2. RU-486 对 PPARs 的选择机制.....	120
3. 5. 讨论.....	123
附录 1 图表索引.....	127
附录 2 缩略语及中英文对照.....	130
参考文献.....	135
致谢.....	154

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Table of Contents in Chinese	IV
Table of Contents in English	VII
Chapter 1 Introduction	1
1.1 PPARs	1
1.1.1 PPARs classification.....	1
1.1.2 PPARs structure.....	1
1.2 PPARs and ligands	5
1.2.1 PPAR α	7
1.2.2 PPAR δ	14
1.2.3 PPAR γ	24
1.3 Iloprost and RU-486	43
1.3.1 Iloprost.....	43
1.3.2 RU-486	49
1.4 Significance of project	53
Chapter 2 Materials and methods	55
2.1 Drugs and reagents	55
2.2 Instruments	55
2.3 Experiments and methods for DNA	56
2.3.1 Plasmid vector	56
2.3.2 PCR.....	58
2.3.3 Method of extracting PCR products	60

Table of Contents

2.3.4	Restriction enzymatic treatments of plasmid DNA	61
2.3.5	Recovery and purification of DNA.....	61
2.3.6	DNA ligation	62
2.3.7	Preparation of E. coli competent cells and transformation.....	62
2.3.8	Plasmid DNA extraction.....	64
2.4	Experiments and methods for cell	64
2.4.1	Preparation of cell culture media.....	64
2.4.2	Cell culture and passage	64
2.4.3	3T3-L1 cell culture and differentiation.....	65
2.4.4	Oil Red O staining	65
2.4.5	Transient transfection of Cos7 cells	65
2.4.6	Total cellular RNA extraction	66
2.4.7	Luciferase reporter assay experiments.....	66
2.4.8	AlphaScreen.....	67
2.5	Expression and purification of fusion proteins	68
2.5.1	Expression of fusion proteins	68
2.5.2	Purification of fusion proteins	68
2.5.3	SDS-PAGE electrophoresis and staining.....	69
2.6	Protein crystallization.....	70
2.6.1	Crystalline preparation	70
2.6.2	Crystallization.....	70
2.6.3	Crystal collection and cryopreservation	71
2.7	Protein crystal data collection.....	71
2.8	Protein crystal structure analysis	72
2.8.1	Crystal data preprocessing.....	72
2.8.2	Crystal data refinement.....	72
Chapter 3	Results and discussion.....	73
3.1.	PPARs LBD protein purification	73
3.1.1.	PPAR α LBD protein purification	73

3.1.2.	PPAR δ LBD protein purification	76
3.1.3.	PPAR γ LBD protein purification.....	78
3.2.	Iloprost is a PPARα and PPARδ dual agonist	80
3.2.1.	Iloprost with PPAR α and PPAR γ and its cofactor interactions.....	81
3.2.2.	Iloprost dose-dependent activation of PPAR α and PPAR δ	84
3.2.3.	Iloprost co-crystallized with PPAR α and PPAR δ	86
3.2.4.	Iloprost with PPAR α and PPAR δ complexes crystal structure	87
3.2.5.	Iloprost with PPAR α and PPAR γ unique binding mode	91
3.3.	RU-486 is a unique PPARγ agonist	99
3.3.1.	RU-486 interaction with PPAR γ and its cofactor.....	100
3.3.2.	RU-486 dose-dependent activation of PPAR γ	102
3.3.3.	RU-486 co-crystallized with PPAR γ	105
3.3.4.	RU-486 and PPAR γ complex crystal structure.....	106
3.3.5.	RU-486 and PPAR γ unique binding mode.....	109
3.3.6.	RU-486 mediates physiological functions through PPAR γ	115
3.4.	The recognition mechanism among iloprost/RU-486 and PPARs.....	117
3.4.1.	The recognition mechanism among iloprost and PPARs	118
3.4.2.	The recognition mechanism among RU-486 and PPARs.....	120
3.5.	Discussion.....	123
Appendix 1 Index of figures and tables		127
Appendix 2 Abbreviations		130
Reference.....		135
Acknowledgement.....		154

第一章 前言

1.1 PPARs 分型与结构

1.1.1 PPARs 分型

过氧化物酶体增值体激活受体 (Peroxisome Proliferator-activated Receptors PPARs) 是核受体家族重要成员, 属于配体依赖型核转录因子^[1], 该家族由三个成员组成, 分别是 PPAR α 、PPAR δ 和 PPAR γ 。1990 年 Issemann 等人在《Nature》首次发现过氧化物酶体增殖的关键分子, 因其能够激活过氧化物酶体增殖而得名。随后分别鉴定出了 PPAR α 、PPAR δ 、PPAR γ 三种 PPARs 三种亚型, 它们具有基本相同的结构, 但功能却有差异^[2]。研究表明 PPARs 家族在调节细胞分化, 生物体生长发育, 新陈代谢等方面发挥重要作用, 并且与肿瘤、糖尿病心血管疾病等重大疾病的发生有着密切联系^[3]。因此, PPARs 家族成员是国际上药物研发的重要靶点。随着对 PPARs 家族的深入研究, 有助于进一步阐明其家族在重大疾病中发生、发展机制, 为预防和治疗提供新途径^[4, 5]。

1.1.2 PPARs 结构

人类 PPAR α 、 δ 和 γ 由特定的单拷贝基因编码, 分别位于 22、6 和 3 号染色体上, 分别含有 468、441 和 479 个氨基酸残基, 如图 1.1 显示, 与其他大部分核受体成员一样, PPARs 结构分为 4 个功能结构域, 为方便研究, 研究者约定俗成将其分为 6 个区域, 用字母 A~F 标记。其中氨基端的结构域由 A/B 两个结构区构成, 在该区域内存在部分丝氨酸残基, 这些残基被丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)磷酸化后 PPAR γ 的活性会受到抑制, 但却可增强 PPAR α 的转录活性。DNA 结合结构域(DNA-binding domain, DBD)由 C 结构区构成, PPARs 通过此区域与 PPARs 的反应元件结合调节下游基因转录。链接 C 和 E/F 区域的 D 区域是转录活性调节结构域, 核内辅因子与此结构域结合能影响 PPARs 的活性。配体结合结构域 (ligand-binding domain, LBD) 由 E/F 结构区构成,

相应的配体与该区域结合后能够激活受体的转录因子功能。

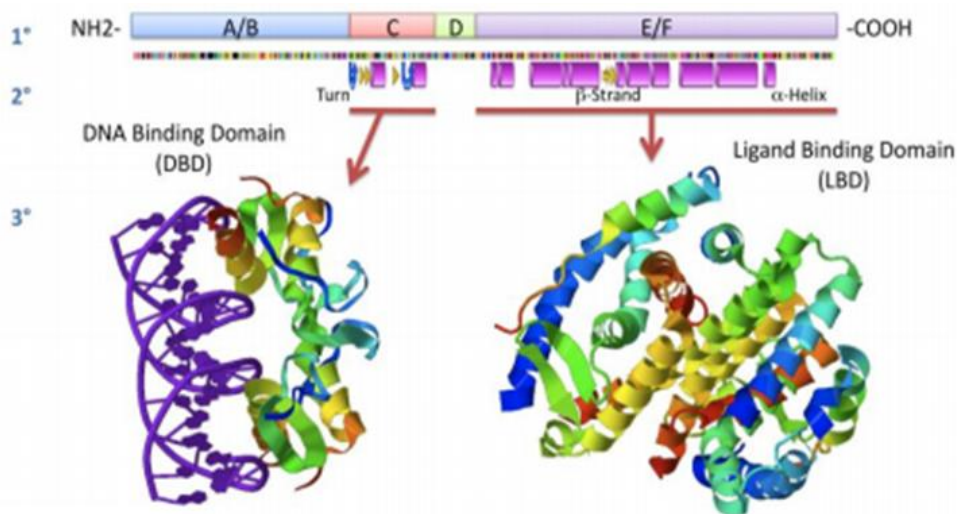


图 1.1 PPARs 的一级结构，二级结构和三级结构

Fig. 1.1 PPARs primary, secondary and tertiary structures

图片来源: http://nrresource.org/_Media/structure_of_nrs.png

1.1.2.1 A/B 结构域

和众多核受体成员一样，PPARs 的 N-末端的 A/B 区具有转录激活功能，因此被称之为转录激活功能区 1 (AF-1)，该区段具有独立的激活能力。同时，在核受体的 C-末端还有另一个激活区段，我们称之为激活功能区 2 (AF-2)，该功能区是在配体结合区。AF-1 结构域在单独存在的情况下，能够独立于配体独自行使其激活功能，但是，在全长结构的情况下，AF-1 的激活功能还是会被配体所调控。直到现在，AF-1 结构域依然没有晶体结构来阐明其机制。在不同的核受体中，AF-1 的长度及序列在平行进化的保守性上是很弱的，具有高度差异性。相关研究报道，AF-1 在翻译后修饰中具有重要作用。例如在维甲酸受体家族 (RARs) 的 AF-1，有多个脯氨酸依赖性激酶的磷酸化位点，这些位点被修饰后具有特定的功能。此外，AF-1 结构域还能与众多辅因子及其他转录因子相结合。这些功能对 AF-1 在识别启动子上具有一定的影响。随着研究的深入，人们发现雄激素受体 (AR)，雌激素受体 (ER) 和孕激素受体 (PR) 的 AF-1 能够与核受体 C-末端的部分结构区相互作用^[6]，但在 PPARs

的 AF-1 区域的结构还未有相关文献报道。

1.1.2.2 DNA 结合结构域

在 PPARs 中央 C 区是负责结合 DNA 的 DNA 结合结构域, 该结构域也是序列上最保守的结构域 (图 1.1)。在细胞外研究表明, 除了 DAX1 和 SHP 这两个没有 DBD 结构域的核受体外, 核受体通过 DBD 这一结构域实现核受体与 DNA 的结合, 与之结合的 DNA 称之为激素反应元件 (HREs)^[7]。与 PPARs DBD 特异性结合的 DNA 被称为 PPARs 反应元件 (PPREs)。通过核磁共振技术 (NMR) 和蛋白质晶体学技术, 揭示了不同核受体 DBD 在结合 DNA 前后的结构上的变化, 第一个被报道的核受体 DBD 结构是糖皮质激素受体 (GR) DBD 未结合及结合 DNA 后的结构, 两年后又报道了雌激素受体 (ER) DBD 与 DNA 结合的结构^[8,9]。他们的研究成果揭示了核受体 DBD 结合 DNA 的分子机制, 在 DBD 中, 包含由一个高度保守的 66 个残基的核心与两个典型的富含半胱氨酸的锌指结构, 两个 α 螺旋, 和一个羧端 (COOH) 延伸。通常将 DBD 划分为四个区段, 分别简称为 P, D, T 和 A。它们对 DBD 特异性识别反应元件、二聚化的接触面的形成、与 DNA 骨架和残基特异性结合, 以及 DNA 核心序列的识别具有重要作用^[10]。其中, 锌指结构在 DBD 中最为重要, 第一个锌指结构即为区段 P, 它是高度保守的, 决定了 DBD 识别相应反应元件的特异性^[11,12], 其保守性与特异性体现在一个单一的氨基酸改变可以互相转换 ER DBD 和 GR DBD 对反应元件的选择。第二个锌指结构是区段 D, 它对二聚化的形成至关重要。除了 AF-1 结构域, DBD 结构域也是蛋白质翻译后修饰的重要位点。此外, DBD 结构域还涉及核受体的核定位, 以及募集共转录因子。

1.1.2.3 D 结构域

PPARs 的 D 结构域保守性低, 不同核受体之间差异性很大, 其主要功能是链接 DBD 和 LBD (图 1.1), 能够通过旋转释放键能从而使得 DBD 与 LBD 在空间位置上不会发生干扰阻碍。D 结构域同时对核受体细胞核内定位, 以及对反应元件的选择上都有一定作用。

1.1.2.4 配体结合结构域

如同众多核受体一样,PPARs 的 LBD 在平行进化上的保守性没有 DBD 强。在功能上 LBD 是配体依赖性的,能够识别配体、结合配体,因此具有相对复杂的结构。LBD 是由 13 个 α 螺旋 (H1, H2a, H2b, H3~H12,) 空间排布组合形成的一个特殊结构,根据结构上的差异性,将 LBD 细分可分为四个区域:第一个是位于 LBD 外部的二聚化表面,能够介导识别二聚化搭档;第二个是位于 LBD 内部的配体结合口袋 (LBP),能够识别配体并与之相结合;第三个是位于 LBD 二聚化表面相反方向的辅因子结合表面,能够与辅因子结合形成转录复合物从而正调节或负调节 PPARs 转录活性;第四个是位于 LBD C-末端的第十二个螺旋结构 (H12),即 AF-1 之后的第二个激活功能结构,称之为 AF-2,它能够受配体调节介导相应的转录功能。在 AF-2 中,有一个保守性较高的 α 螺旋构成,这个螺旋既具有亲水性,又具有亲脂性,是 PPARs 转录激活与辅因子招募的必不可少的元件。此外,有研究报道 LBD 还能够被热休克蛋白识别并结合^[13]。

1.1.2.5 AF-2 结构

PPARs 的转录激活是受 AF-2 即 H12 调控的。通过对比众多核受体未结合配体的 LBD 结构与结合有配体的 LBD 结构,揭示了 AF-2 控制转录激活的机制^[14, 15]。在没有结合配体时,AF-2 是离开 LBD 向外下方延伸。一旦结合配体之后,一系列的分子间相互作用会导致 H10、H11 在空间是发生重新定位,从而引起 H12 的空间摆动发生位移,相关的结构研究突出了 AF-2 构象灵活性是至关重要的,进而影响二聚化表面与辅因子结合表面相关螺旋的空间排布。

1.1.2.6 PPARs 全长结构研究进展

获得核受体全长结构对全面了解核受体结构与功能具有重大意义。由于全长蛋白纯化难度大,AF-1 与 D 结构域均为无规则结构,很大程度上影响全长蛋白结构的解析。目前为止,包括核受体 6 个区段的全长结构依然没有。但是已有部分核受体 CDE 三个区段的结构。在 PPARs 家族中,Franssen Rastinejad 研究组成功解析 PPAR γ CDE、RXR α , 及 DNA 三元复合物结构,引起轰动^[16]。

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.

廈門大學博