

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 21620120153771

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

赖氨酸乙酰转移酶 KAT8 的入核转运及与  
细胞核输入蛋白 IMP $\alpha$  相互作用的结构机理  
研究

Structural and mechanistical studies of the  
nuclear import of KAT8 by importin  $\alpha$

王 瑞

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: 2015 年 7 月

论文答辩时间: 2015 年 8 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2015 年 8 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(李勇)课题(组)的研究成果,获得(李勇)课题(组)经费或实验室的资助,在(李勇)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

## 摘要

作为真核细胞的显著特征,核膜包裹的细胞核将核内的遗传物质和转录单元与细胞质内的翻译单元和代谢单元分割了开来,这种分割方便了细胞对包括基因表达、信号传导和细胞周期等众多细胞生理活动的调控。特定组分在细胞质和细胞核间的选择性双向运输就是这种调控的一项关键特征,大分子货物蛋白从细胞质向细胞核定向运输需要货物蛋白的核定位信号 NLS、识别并结合 NLS 的接头蛋白细胞核输入蛋白 IMP $\alpha$  及载体分子细胞核输入蛋白 IMP $\beta$  三方的协调作用。目前多种货物蛋白 NLSs 与细胞核输入蛋白 IMP $\alpha$  的相互作用和结构生物学研究极大的帮助了我们对核质蛋白转运机理的研究。

细胞核输入蛋白 IMP $\alpha$ 1, 作为细胞核输入蛋白 IMP $\alpha$  家族的一员, 通常充当通用入核载体而能与细胞内许多蛋白结合。赖氨酸乙酰转移酶 KAT8, 是组蛋白乙酰转移酶类 HATs 中 MYST 家族一员, 参与了细胞众多最重要的生理与遗传过程, 包括基因转录调控、染色质组装、细胞周期调控、核仁结构的维持、DNA 损伤修复和细胞凋亡等。目前已经证明一部分功能是通过 H4 K16 的乙酰化实现的, 另一部分则可能通过修饰其他的底物。研究证实 KAT8 的这些功能的发挥都是在细胞核内进行的, 不过它的合成却是在核外核糖体上完成的, 因此弄清楚 KAT8 的入核转运机理可能有助于我们理解 KAT8 发挥上述重要功能的作用机理, 从而可以为细胞周期调控、DNA 损伤应答、细胞凋亡等活动的靶向药物设计提供新的思路和潜在的药物靶点。

在本文中, 我们通过免疫共沉淀实验首次发现 KAT8 能和货物蛋白的通用入核载体 IMP $\alpha$ 1 间发生相互作用而揭示出赖氨酸乙酰转移酶 KAT8 可能借助核质蛋白转运系统进行转运。随后我们纯化、结晶并解析出了 2.3Å 条件下 His-IMP $\alpha$ 1(70-499) & IMP $\alpha$ 1 (121-169)复合物的晶体结构。晶体结构显示 KAT8 以两段 NLS 多肽序列分别结合到了 IMP $\alpha$ 1 上的主要结合位点 Major site 和次要结合位点 Minor site 上。结合在次要结合位点 Minor site 上的 KAT8 NLS 采取了类似于核内 RNA 解螺旋酶 Gu $\alpha$  NLS 等的结构模式, 即其 C 末端的氨基酸残基形成了一个单圈  $\alpha$  螺旋, 不过这个  $\alpha$  螺旋的稳定却是依靠了内部的氢键作用及作

用力更强的 KAT8 NLS 与 IMP $\alpha$ 1 上带相反电荷的氨基酸残基的离子键作用。在细胞水平上的突变实验一方面揭示了 KAT8 NLS 上一些氨基酸残基对于介导 KAT8 与 IMP $\alpha$ 1 的结合发挥了重要作用，在另一方面也验证了所得结构的合理性。由于 KAT8 与 IMP $\alpha$ 1 间不同寻常的结合方式，KAT8 & IMP $\alpha$ 1 复合物的当前结构将方便我们设计一些特异干扰 KAT8 入核转运，却不会影响其他货物蛋白入核转运的小分子抑制剂。这项研究也为我们针对细胞周期调控、DNA 损伤应答、细胞凋亡等活动的靶向药物设计提供了新的思路和潜在的药物靶点！

**关键词：**核质转运；KAT8；晶体结构

## Abstract

As a notable characteristic of eukaryotic cells, the nuclear envelope separates the genetic materials and the transcriptional factory of the nucleus from the translation factory and the metabolic factory in the cytoplasm. This separation facilitates the regulation of many cellular physiological events, such as gene expression, signal transduction and cell cycle. The selective bidirectional transportation of some specific things is one of key aspects of this regulation. The nuclear import of macromolecular cargo-proteins needs the coordination of a nuclear location signal (NLS), an adaptor named importin  $\alpha$  that can recognize and bind NLS, and the real carrier importin  $\beta$ . At present, many structural biological cases of the NLSs bound with importin  $\alpha$  helps us greatly to understand the system and the mechanisms of nucleocytoplasmic transport.

IMP $\alpha$ 1 is a typical member of importin  $\alpha$  and act as a usual adaptor that interacts with many proteins. Lysine acetyltransferase KAT8 is a histone acetyltransferase belonging to the MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 and Tip60 (MYST) family. KAT8 involves in many important physiological and genetic events of cells, such as regulation of transcription, chromatic organization, controlling of cell cycle, maintenance of nuclear structure, repairment of DNA damage and cell apoptosis. It has been shown that one part of these functions of KAT8 was played by the acetylation of H4 K16, and the other maybe played by modifying other substrates. Now that these roles are worked in the nucleus, but its synthesis was carrying on ribosomes in the cytoplasm, it will be very useful for us to understand the mechanism of nuclear import.

In this paper, by using co-immunoprecipitation, we revealed that KAT8 interacts with the usual adaptor IMP $\alpha$ 1 from the cellular and biochemical tests. Then we purified and solved the crystal structure of the protein complex of His-IMP $\alpha$ 1 (70-499) & His-KAT8(121-169) at the resolution of 2.3Å. The crystal structure displays that KAT8 bound to the Major site and the Minor site of IMP $\alpha$ 1 by two different NLSs. At the Minor site, KAT8 uses the same conformation as nuclear RNA helicase Gu $\alpha$  bind to the site, it has a  $\alpha$ -helix at the end of C terminal. As for the interactions that

stabilize this  $\alpha$ -helix, it uses the internal H-bond and more powerful ionic bond that from the charged atoms between KAT8 NLS and IMP $\alpha$ 1. The site-directed mutagenesis experiments of KAT8 at the cellular level not only unveil the importance of several amino acid residues of KAT8 NLS in affecting the binding of KAT8 and IMP $\alpha$ 1, but also verified the rationality of the structure model. The unique binding mode of KAT8 & IMP $\alpha$ 1 will lead us to design some small molecular inhibitors that interfere the nuclear import of KAT8 with high specificity and selectivity. This study will also provide new ideal and potent drug targets for the target-based pharmaceutical design for controlling cell cycle, repairment of DNA damage and cell apoptosis.

**Keywords:** nucleocytoplasmic transport; KAT8; crystal structure

## 目录

<b>摘要</b> .....	I
<b>关键词</b> .....	I
<b>Abstract</b> .....	III
<b>Keywords</b> .....	IV
<b>第一章 前言</b> .....	1
<b>1.1 核质转运</b> .....	1
1.1.1 核质转运的过程 .....	1
1.1.2 细胞核输入蛋白 IMP $\alpha$ 的亚型 .....	3
1.1.3 细胞核输入蛋白 IMP $\alpha$ 的功能域 .....	6
1.1.4 细胞核输入蛋白 IMP $\alpha$ 与多种 NLSs 的结构生物学研究 .....	9
<b>1.2 赖氨酸乙酰转移酶 KAT8 概述</b> .....	17
1.2.1 赖氨酸乙酰转移酶 KAT8 .....	18
1.2.2 KAT8 参与细胞多种生理功能的调控 .....	20
<b>1.3 本论文的研究思路和意义</b> .....	24
<b>第二章 材料与方法</b> .....	26
<b>2.1 实验材料</b> .....	26
2.1.1 常用药品、试剂 .....	26
2.1.2 基因和引物 .....	30
2.1.3 实验所用的菌株和细胞 .....	30
2.1.4 相关载体 .....	30
2.1.5 主要仪器 .....	33
2.1.6 软件和数据库 .....	35
<b>2.2 分子生物学相关的实验与方法</b> .....	35



2.2.1 感受态细胞的制作.....	35
2.2.2 常规的目的基因克隆.....	36
2.2.1.1 目的基因片段的引物设计与订购.....	36
2.2.1.2 聚合酶链式反应.....	36
2.2.1.3 PCR 产物回收.....	37
2.2.1.4 目的片段（PCR 产物）和载体的酶切.....	37
2.2.1.5 酶切产物的回收.....	38
2.2.1.6 目的片段与载体的连接反应.....	39
2.2.1.7 转化.....	39
2.2.1.8 质粒的提取与鉴定.....	39
2.2.3 目的基因的定点突变.....	40
2.2.3.1 目的基因的定点突变的原理.....	40
2.2.3.2 定点突变的引物设计.....	42
2.2.3.3 定点突变的 PCR 过程.....	42
<b>2.3 蛋白相关的实验方法.....</b>	<b>43</b>
2.3.1 融合蛋白的表达.....	43
2.3.2 蛋白的分离纯化.....	43
2.3.2.1 蛋白分离纯化的原理.....	43
2.3.2.2 菌体细胞的破碎.....	45
2.3.2.3 亲和层析.....	46
2.3.2.4 离子交换层析.....	47
2.3.2.5 凝胶过滤层析.....	47
2.3.2.6 SDS-PAGE 电泳.....	47
2.3.3 检测蛋白质相互作用的 polyHis 标签蛋白沉淀实验.....	49
2.3.4 蛋白复合物的结晶与晶体收集.....	50
2.3.5 X-射线晶体衍射与数据采集.....	51
2.3.6 蛋白复合物结构解析与精修.....	51
2.3.6.1 衍射数据的处理.....	51
2.3.6.2 结构解析.....	52

<b>2.4 常规细胞生物学实验方法</b> .....	<b>53</b>
2.4.1 哺乳动物细胞常规培养.....	53
2.4.1.1 细胞复苏.....	53
2.4.1.2 细胞的换液与传代.....	53
2.4.1.3 细胞冻存.....	53
2.4.2 哺乳动物细胞的聚乙烯亚胺 PEI 转染.....	54
2.4.3 免疫共沉淀 Co-IP 与蛋白质印迹 WB.....	55
2.4.3.1 免疫共沉淀 Co-IP.....	55
2.4.3.2 蛋白质印迹 WB.....	56
 <b>第三章 结果与分析</b> .....	 <b>58</b>
<b>3.1 KAT8 与细胞核输入蛋白 IMP <math>\alpha</math> 相互作用的确定</b> .....	<b>58</b>
<b>3.2 IMP <math>\alpha</math> 1 与 KAT8 蛋白相互作用的分析</b> .....	<b>59</b>
3.2.1 IMP $\alpha$ 1 (70-499)的纯化.....	59
3.2.2 His-KAT8(49-169)蛋白的纯化.....	61
3.2.3 His-KAT8(121-169)蛋白的纯化.....	63
3.2.4 His-IMP $\alpha$ 1 (70-499)蛋白与 His-KAT8(49-169)蛋白的分子筛层析.....	64
3.2.5 His-IMP $\alpha$ 1 (70-499)蛋白与 His-KAT8(121-169)蛋白的分子筛层析.....	66
3.2.6 His-KAT8(49-169) & IMP $\alpha$ 1 (70-499)蛋白的共表达与纯化鉴定.....	68
3.2.7 His-KAT8(121-169) & IMP $\alpha$ 1 (70-499)蛋白的共表达与纯化鉴定.....	72
<b>3.3 KAT8 &amp; IMP <math>\alpha</math> 1 蛋白复合物的结晶</b> .....	<b>75</b>
3.3.1 KAT8 & IMP $\alpha$ 1 晶体的初步筛选.....	75
3.3.2 KAT8 & IMP $\alpha$ 1 晶体的优化.....	76
<b>3.4 X-射线晶体衍射与 KAT8 &amp; IMP<math>\alpha</math>1 复合物结构解析</b> .....	<b>78</b>
3.4.1 KAT8 & IMP $\alpha$ 1 复合物晶体收集.....	78
3.4.2 晶体衍射与数据的处理.....	79
3.4.3 KAT8 & IMP $\alpha$ 1 复合物结构解析.....	81
<b>3.5 IMP<math>\alpha</math>1 与 KAT8 相互作用的结构生物学分析</b> .....	<b>82</b>
3.5.1 IMP $\alpha$ 1 & KAT8 复合物的整体结构.....	82

---

3.5.2 IMP $\alpha$ 1 与 KAT8 相互作用的结构生物学分析 .....	84
3.6 IMP $\alpha$ 1 与 KAT8 相互作用的功能分析 .....	88
<b>第四章 讨论 .....</b>	<b>92</b>
<b>第五章 总结与展望 .....</b>	<b>96</b>
<b>附录 1 图表索引 .....</b>	<b>98</b>
<b>附录 2 缩略语及中英文对照 .....</b>	<b>101</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>102</b>
<b>在学期间发表论文 .....</b>	<b>111</b>
<b>致谢 .....</b>	<b>112</b>

## Contents

<b>Abstract in Chinese</b> .....	I
<b>Keywords in Chinese</b> .....	I
<b>Abstract</b> .....	III
<b>Keywords</b> .....	IV
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	1
<b>1.1 The system of nucleocytoplasmic transportation</b> .....	1
1.1.1 The process of nucleocytoplasmic transportation .....	1
1.1.2 The subtypes of importin $\alpha$ .....	3
1.1.3 The function domains of importin $\alpha$ .....	6
1.1.4 The structural researches of importin $\alpha$ with NLSs .....	9
<b>1.2 Lysine acetyltransferase KAT8</b> .....	17
1.2.1 Lysine acetyltransferase KAT8 .....	18
1.2.2 Physiological roles of Lysine acetyltransferase KAT8 .....	20
<b>1.3 The research thoughts and significance</b> .....	24
<b>Chapter 2 Materials and methods</b> .....	26
<b>2.1 Materials</b> .....	26
2.1.1 Drugs and reagents .....	26
2.1.2 Genes and primers.....	30
2.1.3 Cultures and cells .....	30
2.1.4 Vectors.....	30
2.1.5 Instruments.....	33
2.1.6 Software and databases .....	35
<b>2.2 Methods about molecular biology</b> .....	35

2.2.1 Preparations of Competent cells .....	35
2.2.2 Normal target gene cloning.....	36
2.2.1.1 Design and order of the primers .....	36
2.2.1.2 Polymerase chain reaction .....	36
2.2.1.3 Recycle of the PCR products.....	36
2.2.1.4 Enzymatic cut.....	36
2.2.1.5 Recycle of the enzymatic cut.....	38
2.2.1.6 Ligation of the target gene and vector .....	39
2.2.1.7 Transformation.....	39
2.2.1.8 Extraction of plasmids and identification.....	39
2.2.3 Site-directed mutagenesis .....	40
2.2.3.1 The theory of site-directed mutagenesis .....	40
2.2.3.2 The primers design and order.....	42
2.2.3.3 The procedures of site-directed mutagenesis.....	42
<b>2.3 Methods about protein biology .....</b>	<b>43</b>
2.3.1 The expression of fusion protein .....	43
2.3.2 Purification of fusion protein.....	43
2.3.2.1 Theory for the purification of fusion protein .....	43
2.3.2.2 Broken of the culture cells.....	45
2.3.2.3 The affinity chromatography.....	46
2.3.2.4 The ion exchange chromatography.....	47
2.3.2.5 The gel filtration chromatography.....	47
2.3.2.6 The SDS-PAGE .....	47
2.3.3 PolyHis-tag pull-down assays.....	49
2.3.4 Crystallization and crystal collection .....	50
2.3.5 X-ray diffraction and data collection.....	51
2.3.6 Structure determination .....	51
2.3.6.1 Processing of the diffraction data.....	51
2.3.6.2 Structure determination.....	52

<b>2.4 Methods about cell biology</b> .....	<b>53</b>
2.4.1 mammalian cell culture .....	53
2.4.1.1 Cell Thawing .....	53
2.4.1.2 Medium changing and cell passaging .....	53
2.4.1.3 Cell cryopreserving.....	53
2.4.2 Cotransfection .....	54
2.4.3 Co-Immunoprecipitation and Western Blot .....	55
2.4.1.3 Co-Immunoprecipitation.....	55
2.4.1.3 Western Blot.....	56
 <b>Chapter 3 Results and analysis</b> .....	 <b>58</b>
<b>3.1 Revealing of the interactions between KAT8 and importin <math>\alpha</math></b> .....	<b>58</b>
<b>3.2 Interaction evaluation of KAT8 and IMP<math>\alpha</math>1 proteins</b> .....	<b>59</b>
3.2.1 Purification of His- IMP $\alpha$ 1 (70-499) .....	59
3.2.2 Purification of His-KAT8(49-169).....	61
3.2.3 Purification of His-KAT8(121-169) .....	63
3.2.4 Size column of His- IMP $\alpha$ 1 (70-499) & His-KAT8(49-169).....	64
3.2.5 Size column of His- IMP $\alpha$ 1 (70-499) & His-KAT8(121-169) .....	66
3.2.6 Coexpression and purification of His-KAT8(49-169) & IMP $\alpha$ 1 (70-499).....	68
3.2.7 Coexpression and purification of His-KAT8(121-169) & IMP $\alpha$ 1 (70-499) .....	72
<b>3.3 Crystallization of KAT8 &amp; IMP<math>\alpha</math>1 protein complexes</b> .....	<b>75</b>
3.3.1 Screening of KAT8 & IMP $\alpha$ 1 crystals.....	75
3.3.2 Optimization of KAT8 & IMP $\alpha$ 1 crystals.....	76
<b>3.4 X-ray diffraction and structure determination</b> .....	<b>78</b>
3.4.1 Collections of KAT8 & IMP $\alpha$ 1 crystals.....	78
3.4.2 Crystal diffraction and data processing.....	79
3.4.3 Structure determination of KAT8 & IMP $\alpha$ 1 complex.....	81
<b>3.5 Structural biology of KAT8 &amp; IMP<math>\alpha</math>1 complex</b> .....	<b>82</b>
3.5.1 Whole structure of KAT8 & IMP $\alpha$ 1 complex.....	82

3.5.2 Structural analysis of KAT8 & IMP $\alpha$ 1 complex.....	84
<b>3.6 Functional analysis of KAT8 &amp; IMP<math>\alpha</math>1 complex.....</b>	<b>88</b>
<b>Chapter 4 Discussion .....</b>	<b>92</b>
<b>Chapter 5 Conclusion .....</b>	<b>96</b>
<b>Supplement 1 Index of pictures.....</b>	<b>98</b>
<b>Supplement 2 Abbreviation .....</b>	<b>101</b>
<b>References.....</b>	<b>102</b>
<b>Publications .....</b>	<b>111</b>
<b>Aknowledgements.....</b>	<b>112</b>

## 第一章 前言

### 1.1 核质转运概述

#### 1.1.1 核质转运的过程

作为真核细胞的显著特征,核膜包裹的细胞核将核内的遗传物质和转录机器与细胞质内翻译机器和代谢机器分割了开来,这种分割方便了细胞对包括基因表达、信号传导和细胞周期等众多细胞生理活动的调控<sup>[1-4]</sup>。特定组分在细胞质和细胞核间的选择性双向运输就是这种调控的一项关键特征,而核膜上专门介导这类转运的是称为核孔复合物(nuclear pore complexes, NPCs)的膜状结构<sup>[5]</sup>。这种结构允许离子和分子量小于 40 kDa 的蛋白质分子以不耗能的方式自由扩散过去,但限制性转运那些含有特定靶向信号的大分子,而且这些大分子的转运还需要一些可溶性的转录因子或者载体分子的协助<sup>[6,7]</sup>。

核转运途径主要受到小分子的鸟苷三磷酸酶家族(GTPase)Ran 蛋白的调控。Ran 蛋白主要在 GDP 结合或 GTP 结合的状态间转换,而这两种状态的转换主要是受到一些调控蛋白的调节,最重要的两种分别是 Ran 蛋白鸟苷酸交换因子(Ran guanine nucleotide exchange factor, RanGEF)或染色质凝缩调控因子 1(regulator of chromosome condensation 1, RCC1)和 Ran 蛋白鸟苷三磷酸酶激活蛋白(Ran GTPase-activating protein, RanGAP)<sup>[8,9]</sup>。由于 RanGEF 主要位于细胞核内而 RanGAP 则位于细胞质内,这导致了结合不同核苷酸状态的 Ran 蛋白在核膜两侧的不对称分布。而正是这种从细胞质到细胞核 RanGDP 至 RanGTP 的浓度梯度指示了核质转运途径的方向。正常情况下,入核转运受体在细胞质一侧结合货物分子,待进入核内结合 RanGTP 时释放货物;另一方面,出核转运受体在核内结合 RanGTP 和货物分子,待出核后 RanGTP 水解时引发货物分子的释放。

大分子货物蛋白在细胞质与细胞核间的运输需要一些可溶的载体蛋白的协助。这些载体蛋白统称为核质转运蛋白(karyopherins)<sup>[10]</sup>,其中协助货物蛋白由细胞质进入细胞核的为细胞核输入蛋白(importins)<sup>[11,12]</sup>,出核的为细胞核输出蛋白(exportins)<sup>[13]</sup>。许多转运蛋白都属于细胞核输入蛋白 $\beta$ (importin  $\beta$ , 简称



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.