

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学 号: 32320141153402

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

# Rab39 对细胞自噬影响的研究

Effect of Rab39 on Autophagy

张家明

指导教师姓名: 王团老教授

洪万进教授

专业名称: 化学生物学

论文提交日期: 2017 年 4 月

论文答辩时间: 2017 年 5 月

学位授予日期: 2017 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2017 年 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

## 摘要

Rab 蛋白属于 Ras 超家族，是其中最大的一个家族。在哺乳动物细胞中已经发现 70 种以上的 Rab 蛋白。Rab 蛋白通过结合 GTP 或 GDP 的转换来发挥其分子开关的作用，进而调控细胞囊泡的形成、靶向、黏附和融合，在细胞内蛋白质运输过程中扮演非常重要的角色，Rab 功能异常与很多疾病的发生密切相关。Rab39 是一种新发现的 Rab 蛋白，Rab39 有两个成员：Rab39a 和 Rab39b。人类 Rab39a 基因定位于常染色体 11q22.3 上，而 Rab39b 基因定位于性染色体 Xq28 上。不管是对于 Rab39a 亦或是 Rab39b，关于它们的研究都甚少。

本文通过对 Rab39 的定位研究发现，Rab39a 和 Rab39b 都定位于溶酶体，并且 Rab39a 和 Rab39b 与 Rab7 的效应因子 RILP 有着很好的共定位。通过 GST-Pulldown 实验我们进一步发现 Rab39a 与 RILP 存在相互作用，而 Rab39b 与 RILP 却没有相互作用，RILP 有可能是 Rab39a 的效应因子，进而我们发现，过表达 Rab39a 会抑制 Hela 细胞的迁移。此外，根据 Rab39 的定位分析，我们发现 Rab39a 和 Rab39b 都参与了细胞自噬的过程。过表达 Rab39a 或者 Rab39b 都会使饥饿条件诱导的细胞自噬增强，并且过表达 Rab39a 或者 Rab39b 都促进细胞内自噬小泡的形成，而敲低内源性的 Rab39a 或者 Rab39b 则会抑制自噬小泡的形成。我们还发现，Rab39a 或者 Rab39b 促进自噬小泡的形成依赖于其 GTPase 活性。研究发现，RILP 作为 Rab7 的效应因子也参与了细胞自噬的过程，过表达 RILP 会促进细胞自噬的增强，促进自噬小泡的形成，敲低内源性的 RILP 则会抑制自噬小泡的形成。

我们的实验研究表明 Rab39a 以及 Rab39b 都定位于晚期内体和溶酶体，Rab39a 与 RILP 存在相互作用，Rab39a 和 Rab39b 都参与细胞自噬的过程，能够促进自噬小泡的形成。我们的工作为进一步探索 Rab39 参与细胞自噬的具体机制打下了基础。

关键词：Rab39; RILP; 自噬

## Abstract

Rab protein belongs to the Ras superfamily and is one of the largest family. More than 70 Rab proteins have been found in mammalian cells. Rab protein plays a very important role in the process of intracellular protein transport by regulating the formation, targeting, adhesion and fusion of cell vesicles by combining the effects of GTP or GDP conversion, The disease is closely related. Rab39 is a newly discovered Rab protein, Rab39 has two members: Rab39a and Rab39b. The human Rab39a gene is located on the autosomal 11q22.3 and the Rab39b gene is located on the sex chromosome Xq28. Whether it is for Rab39a or Rab39b, there are few studies about them.

Rab39a and Rab39b are located in the lysosome, and Rab39a and Rab39b have a good co-localization with the effector RILP of Rab7. We further found that Rab39a interacts with RILP by GST-Pulldown experiment, whereas Rab39b does not interact with RILP, and RILP may be an effector of Rab39a, and we find that overexpression of Rab39a promotes Hela cell migration. In addition, according to the positioning analysis of Rab39, we found that both Rab39a and Rab39b were involved in autophagy. Overexpression of Rab39a or Rab39b promotes the autophagy of cells induced by starvation conditions, and overexpression of Rab39a or Rab39b promotes the formation of intracellular autophagic vesicles, whereas knockdown of endogenous Rab39a or Rab39b inhibits autophagic vesicles Formation. We also found that Rab39a or Rab39b promotes the formation of autophagic vesicles depending on its GTPase activity. It has been found that RILP is also involved in the process of autophagy in cells. RILP promotes the enhancement of autophagy and promotes the formation of autophagic vesicles. Knockdown endogenous RILP inhibits autophagy The formation of small bubbles.

Our studies show that both Rab39a and Rab39b are located in late endosomes and lysosomes. Rab39a interacts with RILP. Both Rab39a and Rab39b are involved in the process of autophagy, which can promote the formation of autophagic vesicles. Our work has laid the foundations for further exploring the specific mechanisms by which

Rab39 participates in cell autophagy.

**Keyword:**Rab39; RILP; autophagy

厦门大学博硕士学位论文摘要库

---

## 目录

摘要.....	i
Abstract.....	ii
<b>第一章 前言</b> .....	<b>1</b>
1.1 Ras 超家族.....	1
1.2 Rab 蛋白家族 .....	2
1.2.1 Rab 蛋白家族的进化 .....	2
1.2.2 Rab 蛋白家族的结构 .....	3
1.2.3 Rab 蛋白家族的循环机制 .....	4
1.2.4 Rab 蛋白家族的亚细胞定位 .....	6
1.2.5 Rab 蛋白家族的功能 .....	8
1.2.6 Rab 蛋白在自噬过程中的作用 .....	10
1.2.7 Rab 蛋白与疾病 .....	12
1.3 RILP 蛋白简介 .....	12
1.3.1 RILP 的结构 .....	12
1.3.2 RILP 的功能 .....	13
1.4 Rab39 的研究进展 .....	14
1.5 立题依据.....	15
1.6 研究目的以及思路.....	15
<b>第二章 材料与方法</b> .....	<b>16</b>
2.1 材料.....	16
2.1.1 实验菌株、细胞、质粒以及引物.....	16
2.1.2 抗体.....	18
2.1.3 主要试剂.....	18
2.1.4 常用溶液及组分.....	20
2.1.5 主要仪器设备.....	21
2.2 实验方法.....	22

---

2.2.1 常用表达载体的构建.....	22
2.2.2 RNAi 真核细胞表达载体的构建.....	26
2.2.3 原核蛋白的表达以及纯化.....	26
2.2.4 细胞培养.....	28
2.2.5 免疫荧光.....	30
2.2.6 GST-Pulldown.....	31
2.2.7 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳.....	31
2.2.8 免疫印迹.....	32
2.2.9 细胞计数.....	33
2.2.10 细胞划痕.....	33
2.2.11 Transwell 小室实验.....	33
<b>第三章 实验结果</b> .....	<b>35</b>
3.1 Rab39a/b 载体的构建.....	35
3.1.1 Rab39a/b WT 质粒的构建.....	35
3.1.2 SOE-PCR 定点突变扩增 Rab39a/b 突变体.....	37
3.1.3 Rab39a/b shRNA 载体的构建.....	38
3.2 Rab39a/b 表达质粒的鉴定.....	39
3.2.1 激光共聚焦显微镜鉴定 Rab39a/b 载体的表达.....	39
3.2.1 western blot 鉴定 Rab39a/b 载体的表达.....	40
3.3 Rab39a/b 的亚细胞定位.....	41
3.4 Rab39a/b 与 RILP.....	44
3.5 Rab39a 与细胞迁移.....	46
3.5.1 过表达 Rab39a 会抑制癌细胞的迁移.....	46
3.5.2 Knock down Rab39a 会促进癌细胞的迁移.....	49
3.6 Rab39a/b 与细胞自噬.....	51
3.6.1 过表达 Rab39 会促进细胞自噬.....	51
3.6.2 饥饿条件下引起 Rab39 囊泡数量增多.....	52
3.6.3 过表达 Rab39 会促进自噬小泡的生成.....	54
3.6.4 Rab39 促进自噬小泡的形成依赖于 GTPase 活性.....	55



---

3.6.5 Knock down Rab39 抑制自噬小泡的形成.....	58
3.6.6 Rab39 对自噬过程中溶酶体的影响 .....	59
3.7 RILP 与细胞自噬.....	62
3.7.1 过表达 RILP 会促进细胞自噬.....	62
3.7.2 过表达 RILP 促进自噬小泡的形成.....	63
第四章 讨论 .....	65
第五章 结论 .....	70
参考文献 .....	71
致谢.....	79

厦门大学博硕士学位论文摘要库

---

## Table of Contents

<b>Abstract in Chinese</b> .....	i
<b>Abstract in English</b> .....	ii
<b>Chapter1 Preface</b> .....	1
1.1 Ras Superfamily protein .....	1
1.2 Rab family protein .....	2
1.2.1 Evolution of Rab family protein .....	2
1.2.2 Structure of Rab family protein .....	3
1.2.3 Cycle of Rab family protein.....	4
1.2.4 Subcellular localization of Rab family protein .....	6
1.2.5 Function of Rab family protein.....	8
1.2.6 Rab protein in autophagy .....	10
1.2.7 Rab protein and disease .....	12
1.3 Introduction of RILP Protein .....	12
1.3.1 Structure of RILP .....	12
1.3.2 Function of RILP .....	13
1.4 Research of Rab39 .....	14
1.5The significance of the study .....	15
1.6 Purpose an plan of the research .....	15
<b>Chapter2 Materials and Methods</b> .....	16
2.1 Materials .....	16
2.1.1The stains,cells,plasmids and primers.....	16
2.1.2 Antibodies .....	18
2.1.3 Reagents.....	18
2.1.4 Components of buffers.....	20
2.1.5 Instruments and equipments .....	21
2.2 Methods.....	22

---

2.2.1 Construction of tagged protein encoding plasmids.....	22
2.2.2 Construction of shRNA encoding plasmids.....	26
2.2.3 The expression and purification of proteins in E. coli .....	26
2.2.4 Cell culture.....	28
2.2.5 Immunofluorescence assay .....	30
2.2.6 GST-Pulldown.....	31
2.2.7 SDS-PAGE.....	31
2.2.8 Western Blot.....	32
2.2.9 Cell count.....	33
2.2.10 Wound healing .....	33
2.2.11 Transwell chamber assay .....	33
<b>Chapter3 Results .....</b>	<b>35</b>
3.1 Construction of Rab39a/b .....	35
3.1.1 Construction of Rab39a/b WT.....	35
3.1.2 Construction of Rab39a/b mutants by SOE-PCR.....	37
3.1.3 Construction of Rab39a/b shRNA.....	38
3.2 Identification of Rab39a / b Plasmid .....	39
3.2.1 Identification of Rab39a / b plasmids by laser confocal microscopy ...	39
3.2.1 Identification of Rab39a / b plasmids by western blot .....	40
3.3 Subcellular localization of Rab39a / b.....	41
3.4 Rab39a/b and RILP.....	44
3.5 Rab39a and migration.....	46
3.5.1 Overexpression of Rab39a inhibits the migration of cancer cells .....	46
3.5.2 Knock down Rab39a promotes the migration of cancer cells .....	49
3.6 Rab39a/b and autophagy.....	51
3.6.1 Overexpression of Rab39 promotes cell autophagy .....	51
3.6.2 Starvation increases the number of Rab39 vesicles.....	52
3.6.3 Overexpression of Rab39 promotes the production of autophagic vesicles.....	54

---

3.6.4 Rab39 promotes the formation of autophagic vesicles dependent on GTPase activity .....	55
3.6.5 Knock down Rab39 inhibits the formation of autophagic vesicles .....	58
3.6.6 Effects of Rab39 on Lysosomes during Autophagy .....	59
3.7 RILP and autophagy .....	62
3.7.1 Overexpression of RILP promotes cell autophagy .....	62
3.7.2 Overexpression of RILP promotes the formation of autophagic vesicles .....	63
Chapter4 Discussion .....	65
Chapter5 Conclusion .....	70
Reference .....	71
Acknowledgement .....	79

厦门大学博硕士学位论文摘要

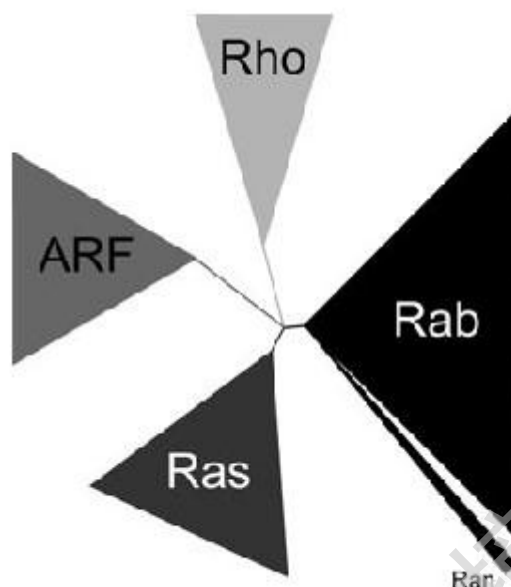
## 第一章 前言

在生物进化的历史进程中，真核生物衍生出了复杂的细胞内膜系统，胞内高度区室化，进而形成了各式各样的细胞器，这些细胞器的精确分工协作，为细胞的正常生命活动打下了基础。细胞内合成的蛋白质需要正确抵达其作用的位置才能发挥其正常的功能，细胞才能够完成其正常的生理过程。因此，当真核生物的蛋白质合成之后，需要一个运输载体使其能够被运送到正确的位置以行使正常的功能；而囊泡运输则是细胞内蛋白运输的主要形式之一。囊泡运输包括了供体膜区域内货物蛋白的分选、囊泡的形成、转运、粘附、锚定以及囊泡与受体膜之间的融合过程，其中Rab家族蛋白则在囊泡运输的过程中起着非常重要的调控作用<sup>[1]</sup>。

### 1.1 Ras 超家族

Ras 超家族蛋白属于单体小分子 GTP 酶，与异源三聚体 G 蛋白中的  $\alpha$  亚基具有相当高的同源性，但是它却不需要三个亚基共同协调作用，便可以独立地行使自己的功能。Ras 蛋白最早被发现于大鼠肉瘤病毒 (Rat Sarcoma)，并冠以首字母的缩写作为小 GTP 酶的代名词。单细胞真核生物裂殖酵母基因组编码的 Ras 超家族蛋白成员只有 22 个，而人类基因组编码的 Ras 超家族蛋白成员有 165 个<sup>[2]</sup>，这说明了随着生物体的复杂程度越来越高，就需要更为精细的信号转导体系以及蛋白运输网络，来支撑这种信号以及结构上的复杂性。

根据其结构、序列和功能的不同，Ras 超家族蛋白主要可以分为 5 个亚家族，分别是 Ras、Rab、Rho、Ran 和 Arf<sup>[3]</sup> (图 1-1)。这 5 个亚家族的功能有所不同，Ras 亚家族负责调节控制基因表达的胞质信号网络、调节细胞的增殖、分化以及生存<sup>[4]</sup>；Rho 亚家族主要负责调节微丝的组织结构、细胞周期的进程以及基因表达<sup>[5]</sup>；Ran 亚家族调控细胞核与细胞质之间的物质穿梭<sup>[6]</sup>；而 Rab 和 Arf 亚家族则调节细胞内的蛋白质囊泡运输过程<sup>[7]</sup>。

图 1-1 Ras 超家族的分类<sup>[3]</sup>Figure 1-1 the category of Ras Superfamilies<sup>[3]</sup>

Ras 超家族蛋白都是由大约 180-200 个氨基酸组成，分子量一般是在 20-30KDa 之间，它们都具有保守的 G domain。这些小 GTP 酶共同拥有了一系列保守的 GDP-GTP binding motif，从 N 端起分别为：G1-GXXXXGKS/T；G2-T；G3-DXXGQ/H/T；G4-T/NKXD 和 G5- C/SAK/L/T<sup>[8]</sup>。

Ras 超家族蛋白是一种分子量比较低的 G 蛋白，不管是对 GDP 还是 GTP，都具有相当高的亲和力，但是它们自身的 GTP 酶活力以及 GDP/GTP 交换活性却并不是很高<sup>[9]</sup>。Ras 超家族蛋白主要存在两种构象：GTP 结合的构象以及 GDP 结合的构象，这两种构象在一定条件下可以发生互相转变<sup>[10]</sup>。

## 1.2 Rab 蛋白家族

### 1.2.1 Rab 蛋白家族的进化

Rab 家族蛋白是 Ras 超家族里面最大的一个分支<sup>[11]</sup>，几乎所有的真核生物中都存在 Rab 蛋白，已知的人类基因组编码的 Rab 蛋白一共有 70 种<sup>[12]</sup>。Rab 蛋白家族在从最后的真核共同祖先（LECA）到哺乳动物的所有真核生物细胞内膜运输系统中的特定运输途径中起重要作用<sup>[13]</sup>。在 LECA 中，有至少 20 个原型 Rabs 形成六组，例如组 I 中的 Rab1 / Ypt1 和 Rab8 / Sec4，组 II 中的 Rab5 / Ypt51，组

III 中的 Rab7 / Ypt7 和 Rab9 / Ypt9, 组 IV 中的 Rab11 / Ypt31 和 Rab4 / Ypt4, 组 V 中的 Rab6 / Ypt6 和组 VI 中的 Rab28<sup>[14]</sup>。经研究发现, Rab 在生物的进化过程中是高度保守的,但是在不同的生物中表现出数量的多样性和功能上的有所不同<sup>[15]</sup>。细胞的各种生命过程往往都伴随着蛋白质在各细胞器之间的运输。蛋白质的运输主要以囊泡运输的形式完成。Rab 蛋白的分布遍及细胞内各种细胞器以及运输囊泡,它可以调节囊泡特定的运输途径。Rab 蛋白是囊泡运输的分子开关,它能够与上游调控因子以及下游效应因子相互作用,在囊泡的形成、转运、粘附、锚定、融合等过程中发挥非常重要的作用<sup>[17-19]</sup>。

### 1.2.2 Rab 蛋白家族的结构

与 Ras 蛋白家族相比, Rab 蛋白家族在它们的结构上具有一些共同的特征,即由保守程度很高的 G 结构和长度各不相同的 N 端和 C 端序列组成<sup>[16-19]</sup>。其中, G 结构域是 GTP 的结合部位,它包含了 5 个  $\alpha$  螺旋( $\alpha 1-\alpha 5$ )、6 个  $\beta$  片层( $\beta 1-\beta 6$ ) 结构和多肽环。6 个  $\beta$  片层围绕在一起形成了疏水核心,被亲水的  $\alpha$  螺旋( $\alpha 1-\alpha 5$ ) 包围,并通过多肽环相连接<sup>[17]</sup>。G 结构域还具有只有 Rab 家族才特有的保守序列 (RabF1-RabF5), 以及 4 个用来区别 Rab 亚家族的序列 (RabSF1-RabSF4) <sup>[18-21]</sup> (图 1-2)。G 结构域中构象发生变化的区域被称为 switch I 和 switch II。switch I、switch II 与 3 个 RabSF 序列 (RabSF1、RabSF3 和 RabSF4) 分布于蛋白的最外层,是 Rab 蛋白与其相互作用的因子如鸟嘌呤核苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange factor, GEF)、GTPase 活蛋白 (GTPase-activating protein, GAP) 以及其效应因子如 RILP(Rab7-interacting lysosomal protein)等相互作用的关键位点。不同 Rab 蛋白的 switch 区域具有相似性,它们的活性形式结构特点也几乎相同,而且 switch II 的构象则相对保守得多<sup>[19]</sup>。两个 switch 区域和 GTP 的  $\gamma$  磷酸基团会发生结合。GDP 形式的 switch 区域倾向于混乱的无序性,结合 GTP 后, switch 区域结构发生剧烈变化成为比较有序状态<sup>[19]</sup>。Rab 蛋白家族的 C 端序列通常以形式各异的、富含半胱氨酸残基的 motif (CC、CXC、CCX、CCXX、CCXXX 等) 结束<sup>[20]</sup>, 这些半胱氨酸可以被 geranylgeranyltransferase type II 所修饰<sup>[21]</sup>, 进而偶联上类异戊二烯基团,从而使 Rab 蛋白能够结合到膜上面,行使它们正常的功能。

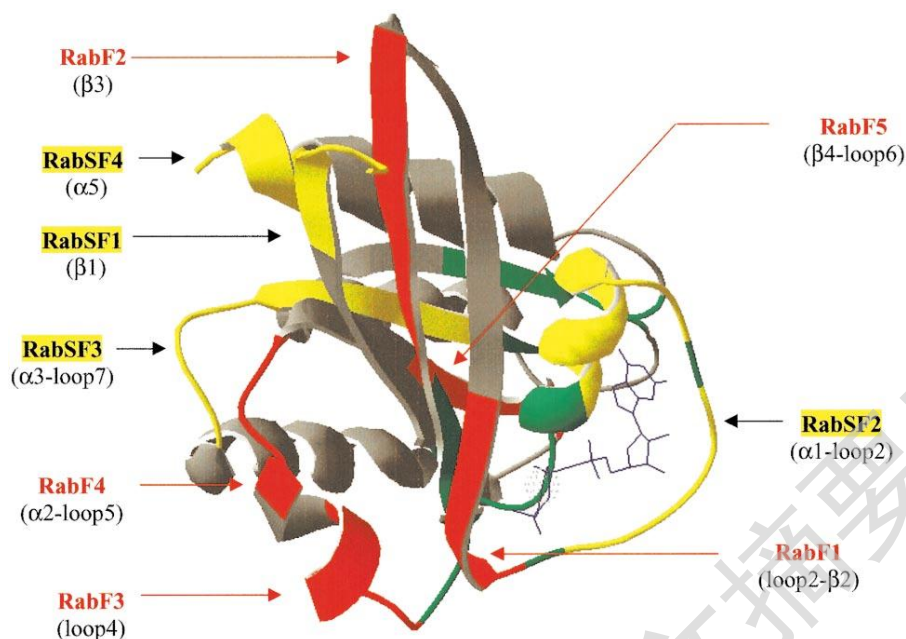


图 1-2 Rab 蛋白的 3D 结构域 (Rab3a) <sup>[21]</sup>

Figure1-2 Cartoon representing the Rab3a-GTP 3D structure <sup>[21]</sup>

### 1.2.3 Rab 蛋白家族的循环机制

Rab 蛋白作为小分子 GTP 酶，其最主要的功能就是通过与 GTP 结合并催化 GTP 分解成 GDP 释放能量，完成构象的变化从而能够与相关作用因子结合或解离，起到一个分子开关的作用<sup>[22]</sup>。Rab 蛋白主要以两种构象形式存在于在细胞体内：结合了 GTP 的活化形式，定位于胞膜；结合 GDP 的失活形式，定位于胞浆（图 1-3）。刚刚合成的 Rab 蛋白以结合了 GDP 的失活形式与 REP (Rab escorting protein) 结合。然后 REP 将 Rab 传递给 RabGGT II，在 Rab 的 C 端半胱氨酸残基加上异戊二烯基基团<sup>[23-27]</sup>，使 Rab 蛋白 C 端具有疏水性，从而插入膜的脂双层当中<sup>[24-27]</sup>。催化完成后，REP 使异戊二烯基化的 Rab 蛋白与 RabGGT II 解离，最后运输到膜上<sup>[25]</sup>。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts 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.

厦门大学博硕士论文摘要库