尊敬的各位老师，各位师弟师妹师兄师姐，大家好，我叫蔡泽蕲，欢迎来参加我的硕士毕业答辩。我的论文题目是Nur77和Dax1相互作用的结构生物学研究，本论文主要研究Nur77和Dax1两个核受体的相互作用。

下面，我将分五个部分介绍我的论文主体内容，第一章我会简单介绍下论文的背景知识，第二章展示一下Nur77和Dax1主要克隆的纯化结果，第三章Dax1核心作用小肽的发现历程，第四章讲述Dax1核心小肽和Nur77 LBD的晶体筛选结果，第五章会对我所做实验做一个总结

**第一章**

我们首先来讲下本文背景。Nur77和Dax1都是核受体超家族的成员，核受体的功能很丰富，在生物的生长、增殖、分化、代谢、免疫、死亡等各个方面都扮演着重要角色。在结构上，不同的核受体也呈现高度的一致性，大多数的核受体一级结构都可以划分为A、B、C、D、E、F六个区段，其中A、B段是一个组成型的转录激活结构域，保守性很低，而且尚未有已知的结构被解析；C段是一个DNA结合结构域DBD，和核受体的二聚化有着密切关系，只有部分核受体的DBD结构域被解析出来；D段是一个铰链区，序列较短，功能较少，主要起到连接DBD和LBD的作用；E段是一个配体结合结构域LBD，是核受体的重要组成部分，也是被研究的最多的部分，不仅是核受体结合配体的地方，也是核受体结合各种辅因子的地方。LBD区在各核受体中最为保守，其三级结构都是有约12个α螺旋组成的三明治状结构。本文研究的两个蛋白Nur77和Dax1就是研究这两个蛋白的LBD区的相互作用。

Nur77是一个很经典的核受体，多年来，已有很多关于Nur77的研究成果被报道，其功能也相当繁杂（如和转录、凋亡、炎症……等很多生理活动有关），我在这里简单地将Nur77的功能分为两部分：一部分是在细胞核中作为转录因子发挥功能，另一部分则是细胞质中发挥其它的功能。本文我们关注的是它在细胞核中作为转录因子发挥的功能。Nur77在细胞核中能调控很多基因的表达，其转录激活活性反过来也受到一些辅因子的调控，如SRC以及本文中我关注的另一个蛋白Dax1.

Dax1作为核受体家族中相对比较另类的一个亚族，只有LBD区和经典核受体比较相似，其N端的其它区域都是NR0亚家族所特有。在功能上，我们仍然可以简单的将Dax1的功能分为两类，一类是作为转录辅因子发挥功能，另一类则是其它功能。作为转录辅因子，Dax1可以很多其它的转录因子相互作用，如SF1、LRH-1、ER、AR、PR、SHP以及Nur77 。Dax1主要发挥其辅因子的活性，调控这些转录因子的转录激活活性。

很多年以前，就有文章报道Dax1 LBD可以和Nur77 LBD相互作用，并直接抑制Nur77的转录激活活性。这篇文章通过免疫共沉淀，酵母双杂交、GST pulldown证明了Dax1和Nur77的直接相互作用，也进行了生理实验使用报告基因验证了Dax1确实抑制了Nur77的转录激活功能。但该文章并未进一步研究两者相互作用的区段，本文尝试以这篇文章为基础进一步研究两者间的相互作用。

**第二章**

首先我简单介绍一下Nur77、Dax1这两个蛋白以及Dax1小肽标签蛋白的纯化过程和结果。

本文中涉及到的蛋白纯化过程都比较简单，都是通过这四步法纯化得到。首先是载体构建，然后是蛋白表达，本文涉及到的蛋白都是采用原核表达，接着通过一步NI柱或者GSTbeads亲和层析初步纯化，再通过Superdex75或者Superdex200的凝胶过滤层析进一步纯化。

Nur77是一个表达量高，又很稳定，又容易纯化的蛋白，我们实验室已有多年的Nur77 LBD的表达纯化经验。本文涉及到的Nur77的克隆主要有两个：一个是pET-22b载体，另一个pGEX-4T-1载体，后面的这个载体表达的蛋白带有GST标签。我在这里简单展示一下pET-22b载体的Nur77的表达情况。从左图中我们可以看到，一步Ni柱亲和层析就能得到相对较纯的蛋白，再通过Superdex75分子筛后，去掉P1、P2两个杂质峰，P3是我们想要的峰，约70左右，得以进一步纯化。

Dax1相较Nur77而言，则很不稳定，到目前为止，我们仍没有拿到单独的无标签的Dax1蛋白。尝试过多种无标签的载体如pET-22b、pET-28a、pCDFDuet等，均不表达。只有在标签载体中才能表达，而且得到的Dax1蛋白在溶液中的稳定性完全依赖于标签的存在。本文使用两种标签载体表达Dax1蛋白，分别是含MBP标签的pET-MBP载体和含GST标签的pGEX-4T-1载体。这里我简单展示一下MBP标签的Dax1（201-470）和Dax1（251-470）的表达纯化情况，从左图中亲和层析的结果我们MBP标签的Dax1蛋白表达情况还是可以的。

而GST标签的Dax1蛋白表达情况相对MBP标签的要差很多，也更不稳定。

需要提及的是带有MBP标签的Dax1蛋白在切掉MBP标签后不能稳定存在也无法单独分离纯化出，所以关于Dax1的研究都是在带有MBP标签的情况下。

另一方面MBP标签的Dax1小肽的表达纯化则非常顺利，表达量很高，得到的融合蛋白也很纯净稳定。涉及到小肽很多，就不列举纯化结果了

**第三章**

我会展示一下Dax1和Nur77相互作用的核心片段的发现历程，我们首先发现Dax1（201 -250）是一个关键片段，进一步截短分析后，发现Dax1（201-225）才是核心片段，最后通过突变分析进一步验证了Dax1（201-225）作为核心片段与Nur77相互作用的非假阳性。

我们来看一下Dax1（201-250）作为一个关键片段的发现，通过使用GST标签的Nur77LBD蛋白pulldown MBP标签的Dax1（201-470）和Dax1（251-470），从结果中我们看到，只有MBP-Dax1（201-470）被少量拉下，说明Dax1（201-250）对Nur77和Dax1间的相互作用起到重要作用。

进一步实验，我们使用GST-Dax1 pulldown Nur77，发现仍是同样的结果，只有GST-Dax1（201-470）能拉下Nur77，而Dax1（251-470）则完全不能拉下Nur77，同时发现GST-Dax1（201-250）也能拉下Nur77，这直接证明Dax1（201-250）是Dax1和Nur77相互作用的关键片段。

为了进一步缩小关键小肽的范围，我设计了多组截短的小肽克隆，分别为（201-215）段，（201-225）段，（201-235）段，（201-250）段。结果表明Dax1（201-215）与GST-Nur77的相互作用明显弱了很多。因此我们判断Dax1（201-225）段是Dax1和Nur77相互作用的关键片段。本实验中使用的对照中，未用GST设置对照，而是使用GST-Nur77 LBD被Thrombin蛋白酶切后的产物代替GST作为对照，这样的对照更为充分，更进一步排除了GST标签对实验结果的影响。排除MBP标签的影响也使用了同样的方法，这里不再展示。

为了进一步验证这种Dax1（201-225）小肽和Nur77相互作用的特异性，我设计了三组突变。比较人和几种亲缘物种的Dax1（201-225）序列差异，我们发现多数位点都是比较保守的。因此我挑取了两个位点，一个保守位点L213和一个不保守位点V216做突变研究。从结果中我们可以看到，保守位点L213突变后，相互作用明显变弱，而不保守的位点V216突变后减弱则不那么明显，两者一起突变后，相互作用几乎消失。这个实验直接证明了Dax1（201-225）与Nur77相互作用的特异性，而不是非特异性。

**第四章**

在确认Dax1（201-225）小肽和Nur77的特异性相互作用后，我们人工合成了Dax1（201-225）小肽，尝试筛选这个小肽和Nur77 LBD的复合物晶体。

很幸运，在20%PEG6K、1.0 M LICl、0.1M Tris，pH8.0的条件下得到了比较漂亮的晶体。这个晶形和已经解析结构的Nur77LBD的晶体晶形大不相同，已有结构的APO状态的Nur77LBD晶体晶形是一个类正八面体状，我们这晶体是针状的，很有可能是复合物晶体（已验证不是盐晶）。不过很可惜，晶体的衍射情况很差，未能得到好的衍射数据以解析结构。

因此我尝试通过分子模拟工具模拟二者的复合物结构。使用的工具是CABSdock，下图展示的是模拟的结果。该结果解释了为什么比Dax1（201-225）短的小肽仍然和Nur77有着较弱的相互作用，可能是一整条小肽和Nur77都有接触。

**第五章**

下面我对我做的东西做一个研究意义分析和总结。

首先，Nur77是核受体中的研究热点，已被发现Nur77作为转录因子和各种癌细胞比如，前列腺癌、肺癌等癌细胞的生长增殖有关。因此我们如何解析出Dax1（201-225）和Nur77复合物结构，就能以此为基础设计出可以抑制Nur77转录激活活性的药物，可能就对治疗癌症具有一定疗效。

另一方面，经研究，我还发现Dax1（201-225）不仅和Nur77有着相互作用，还和另外几个蛋白有相互作用。这几个蛋白都在之前被报道能和Dax1相互作用。这说明了Dax1（201-225）可能也是Dax1和它们相互作用的关键片段。这个结果可能意味着Dax1（201-225）作为的Dax1的关键片段具有一般性。

**展望**

首先，我希望通过对条件的优化得到能衍射的Dax1（201-225）和Nur77 LBD的晶体结构，我觉得还是很有希望的

再者，更进一步验证Dax1（201-225）作为关键片段的一般性，如何SF-1、AR、ER、PR、SHP等

**致谢**

在这个特殊的时刻，我首先要感谢我的导师林天伟教授。。。。感谢任老师。。。。感谢峰伟师兄周萌师姐。。。。感谢苏志明师兄田师姐。。。感谢三位同仁。。。。感谢所有三年来一起做实验的一起生活的每一位师兄师姐师弟师妹。照片。。。。