

论著·基础研究

人源 THOC1-THOC2-THOC3 亚复合物的电镜结构研究

刘永湄, 谭明[#], 雷鸣[#]

上海交通大学医学院附属第九人民医院上海精准医学研究院, 上海 200125

[摘要] **目的**·利用负染电镜技术分析人源 THO 亚复合物结构。**方法**·采用共表达方式在培养的昆虫细胞里表达重组蛋白质组分, 利用 Ni-NTA 亲和层析、Strep-Tactin 亲和层析纯化和 Superose 凝胶过滤层析分离目的蛋白质复合物; 通过负染电镜技术和单颗粒重构技术研究 THO 亚复合物的空间结构。**结果**·利用两步亲和层析纯化及一步凝胶过滤层析分离获得高纯度的、均一性良好的重组人源 THOC1-THOC2-THOC3 亚复合物; 采用甲酸双氧铀负染后利用电镜技术初步分析了目的复合物的空间结构。**结论**·利用单颗粒重构技术构建了人源 THOC1-THOC2-THOC3 复合物的低分辨率模型。

[关键词] mRNA 出核转运; TREX 复合物; THO 复合物; 负染电镜

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2020.01.001 **[中图分类号]** Q518.3 **[文献标志码]** A

Electron microscopic study of the human THOC1-THOC2-THOC3 subcomplex

LIU Yong-mei, TAN Ming[#], LEI Ming[#]

Shanghai Institute of Precision Medicine, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200125, China

[Abstract] **Objective**·To study the structure of the human THOC1-THOC2-THOC3 subcomplex by negative-staining electron microscopy. **Methods**·The recombinant protein components were co-expressed in cultured insect cells, and the protein complex was isolated via sequential Ni-NTA and Strep-Tactin affinity purification followed by Superose gel filtration chromatography. The purified protein sample was then subjected to negative-staining electron microscopy and single particle image analysis. **Results**·The recombinant human THOC1-THOC2-THOC3 complex with high purity and good homogeneity was obtained by using a tandem affinity purification scheme with Ni-NTA and streptavidin-based chromatography. Preliminary study on the structure of human THOC1-THOC2-THOC3 subcomplex was achieved by electron microscopy using negative staining with uranium formate. **Conclusion**·A low resolution model of human THOC1-THOC2-THOC3 subcomplex was achieved by single particle reconstruction. **[Key words]** mRNA nuclear transport; TREX complex; THO complex; negative-staining electron microscopy

mRNA 从细胞核到细胞质的转运是真核基因表达的重要调控步骤之一, 该过程与 mRNA 生物合成的多个步骤相联合, 以确保只有加工成熟的 mRNA 能被运送到细胞质中翻译^[1-4]。TREX (transcription-export) 复合物是一种进化上高度保守的多蛋白亚基复合物, 位于这种功能联合的中心; 顾名思义, 该复合物包含了转录和出核的相关调控因子, 参与了 mRNA 的转录、5'端加帽、剪切、3'端加工以及出核等一系列过程, 是实现 mRNA 生物合成和质量监控的关键复合物^[5-7]。

TREX 复合物由核心的 THO 复合物以及 RNA 解旋

酶 UAP56 (U2AF65-associated protein 56) 和 mRNA 结合蛋白质 Aly (Aly/REF export factor) 组成。不同的物种中, THO 复合物的组分也有所差异; 在哺乳动物中 THO 复合物由 6 个蛋白质亚基组成 (THOC 1 ~ 3, 5 ~ 7), 其中 THOC1、THOC2、THOC3 在酵母中存在同源物蛋白质^[8-9]。作为 THO 复合物的高度保守的亚基, THOC1、THOC2、THOC3 中任何一个组分的缺失, 都会不同程度地影响细胞 mRNA 的出核转运^[10-11]。此外有文献报道, 许多遗传疾病和肿瘤的发生与这 3 个 THO 复合物亚基的功能异常有关。例如, THOC1 在原发性卵巢癌、结肠癌、

[基金项目] 国家自然科学基金 (31525007)。

[作者简介] 刘永湄 (1995—), 女, 硕士生; 电子信箱: liuyongmei@sjtu.edu.cn。

[通信作者] 雷鸣, 电子信箱: leim@shsmu.edu.cn。谭明, 电子信箱: tanming@sibcb.ac.cn。[#] 为共同通信作者。

[Funding Information] National Natural Science Foundation of China (31525007).

[Corresponding Author] LEI Ming, E-mail: leim@shsmu.edu.cn. TAN Ming, E-mail: tanming@sibcb.ac.cn. [#]Co-corresponding authors.



乳腺癌和肺癌细胞内的表达水平异常升高;而在睾丸癌和皮肤癌的细胞中 THOC1 的表达量却很低^[12-13]。THOC2 的突变与神经系统发育障碍有关,会导致不同程度的智力残疾并表现出包括言语延迟、身材矮小、癫痫发作、步态紊乱和震颤等特征^[14-15]。THOC3 含有多个重复的 WD40 序列,用于介导蛋白质之间的相互作用^[6, 16]。目前 THO 复合物的组装过程尚不清楚,但是 THO 亚复合物是作为一个整体,参与 TREX 的功能。UAP56 具有 ATP 水解酶的活性^[17-18],然而,其所具有的 ATP 水解酶和 RNA 解旋酶活性在 mRNA 出核过程的作用并不明确。Aly 作为 mRNA 的出核配基(adaptor),通过与下游出核受体 NXF1/NXT1 (nuclear RNA export factor 1/nuclear transport factor 2 like export factor 1) 结合,引导信使核糖核蛋白体(messenger ribonucleoprotein, mRNP)的正常出核^[19-20]。

尽管 TREX 复合物在 mRNA 出核转运过程中发挥着十分重要的作用,相关的结构生物学研究却进展缓慢,仅有 UAP56 及 Aly 的高分辨率晶体结构以及酵母 THO 复合物的低分辨率晶体及负染电镜结构被报道^[21-23],这极大地限制了对 TREX 复合物组装、招募、参与 mRNA 出核运输的分子机制的研究。人源 THO 复合物与酵母 THO 复合物在组分上存在较大差异,并且招募机制也有所不同^[8]。解析人源 THO 复合物的结构,对于揭示其功能和招募机制具有重要的意义,同时能为 TREX 复合物调控异常引起的疾病提供新的诊疗依据。本研究通过建立完善的昆虫细胞表达和蛋白质体外纯化体系,获得人源 THO 复合物中由 THOC1、THOC2、THOC3 形成的亚复合物的高质量蛋白样品,借助透射电子显微镜(电镜)和单颗粒重构技术,得到了该亚复合物的三维结构模型,从而为后续解析完整的 THO 复合物及 TREX 复合物的高分辨率结构奠定了坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂和仪器 限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶(TaKaRa), HEPES、PMSF、咪唑、生物素(Sigma), 杆状病毒(Baculovirus) gp64 抗体(AcV5) PE (phycoerytherin) (Santa Cruz, sc-65499PE), Ni-NTA 琼脂糖凝胶(QIAGEN), Strep-Tactin®XT Superflow 凝胶(IBA), Superose 6 Increase 10/300 GL、AKTA FPLC 快速纯化液相色谱系统(GE Healthcare), 超高压均质机(上海励途机械设备工程有限公司), 立式离心机(Beckman Coulter), 冷冻离心机(Eppendorf), 电泳仪与电泳槽

(Bio-Rad), 细胞计数仪(Invitrogen, Countess II), 细胞流式分析仪(BD, FACSCalibur Flow Cytometer), 高分辨轨道阱质谱仪(Thermo Scientific, Q-Exactive HF), 碳膜铜网(北京中镜科仪技术有限公司, 普通碳支持膜), 透射电子显微镜(FEI, Talos L120C)。

1.1.2 载体、菌株和细胞 pFastBac Dual 载体、*E.coli* DH10Bac 菌种、Sf9 昆虫细胞、High Five 昆虫细胞均由本实验室保存。

1.2 实验方法

1.2.1 引物合成和 DNA 序列测定 均由上海铂尚生物技术有限公司完成。

1.2.2 重组质粒的构建 利用 PCR 获得人源 THOC1 全长(氨基酸残基: 1 ~ 657)、THOC3 全长(氨基酸残基: 1 ~ 351)的编码序列, 先后插入 pFastBac Dual 载体, 并在 THOC1 的 C 端加入 Strep 纯化标签, 获得 pFastBac Dual-THOC1-Strep-THOC3 重组质粒; 利用 PCR 获得人源 THOC2 的 N 端(氨基酸残基: 1 ~ 1 190) 编码序列, 插入 pFastBac Dual 载体, 并在其 N 端加入 10×His 纯化标签, 获得 pFastBac Dual-10×His-THOC2 重组质粒。

1.2.3 重组蛋白质表达 按照 Invitrogen 公司 Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System 说明书进行, 将 pFastBac Dual-THOC1-Strep-THOC3 重组质粒与 pFastBac Dual-10×His-THOC2 重组质粒分别转化 DH10Bac 感受态菌株, 制备重组杆状病毒质粒(Baculovirus plasmid), 转染昆虫细胞 Sf9, 获得相应的初代杆状病毒; 初代病毒经过 2 代扩增后, 收集含病毒的细胞培养液, 4℃低温短暂存储; 经免疫法测定病毒滴度后, 将 2 种病毒按 1 : 1 的滴度混合, 以 MOI (multiplicity of infection, 病毒与细胞的比例) 等于 10 的比例侵染新鲜的、密度为 3×10^6 个/mL 的 High Five 昆虫细胞。侵染后的 High Five 昆虫细胞在 27℃条件下低速振荡培养 72 h, 后收取细胞进行蛋白纯化。

1.2.4 免疫法测定病毒滴度 取新鲜的 High Five 昆虫细胞, 计数后, 按一定的稀释倍数加入待测病毒; 16 h 后, 收集细胞, 用 PBS 清洗 3 次后, 取约 1×10^6 个细胞于 100 μL PBS, 加入 2 μL gp64 抗体, 室温孵育 1 h; 加入 400 μL PBS, 进行细胞流式分析, 统计携带红色荧光的细胞占总细胞的比率; 得到的比率乘以起始细胞数目及病毒液的稀释倍数, 计算出病毒的滴度。

1.2.5 THO 蛋白质复合物纯化 表达目的蛋白质复合物的 High Five 细胞 $2\ 000 \times g$ 离心 15 min, 弃上清, 用 lysis buffer (20 mmol/L pH 7.5 的 HEPES、200 mmol/L NaCl、10% 甘油) 重悬, 采用超高压均质机 600 bar 高压

裂解细胞;细胞裂解后经 $39\,000\times g$ 高速离心 30 min, 取上清与 Ni-NTA 琼脂糖凝胶在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低速旋转混合 2 h, 柱料用含 20 mmol/L 咪唑的 wash buffer (20 mmol/L pH 7.5 的 HEPES、200 mmol/L NaCl) 洗去杂蛋白质, 再用含 25 mmol/L 咪唑的 wash buffer 洗脱目的蛋白质。得到的目的蛋白质溶液与 Strep 凝胶在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低速旋转混合至少 6 h, 用 wash buffer 洗去杂蛋白质, 用含 50 mmol/L 生物素的 wash buffer 洗脱目的蛋白质。将蛋白质样品浓缩至 1 mL, 通过 Superose 6 Increase 10/300 GL (用 wash buffer 平衡柱子), 分开收集流出组分, 经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析鉴定后, 合并目的蛋白质溶液。

1.2.6 蛋白质组分的质谱鉴定 取约 20 μg 蛋白质, 经三 (2-羧乙基) 膦还原和碘乙酸胺烷基化处理后, 加入胰蛋白酶过夜酶解; 酶解肽段利用 C18 柱子除盐后, 通过液相色谱-串联质谱法 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 进行分析; 质谱原始数据提交到 Proteome Discoverer 2.3 软件中, 使用 UniProt 数据库中的人 (*Homo sapiens*) 和粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 蛋白质数据库进行检索。

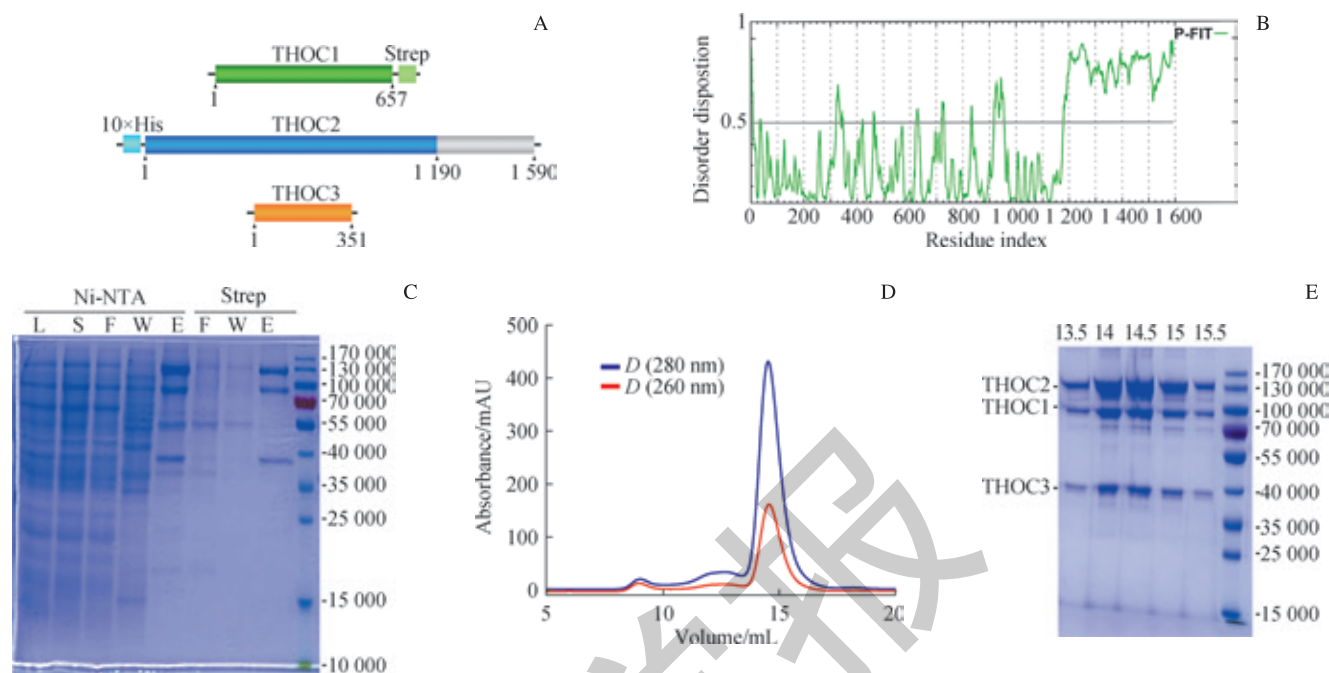
1.2.7 负染样品制备、数据收集及模型构建 因甲酸双氧铀 (uranyl formate, UF) 溶液较细腻的颗粒度及其较高的浸透能力, 故选择其作为样品的负染色液。负染电镜实验步骤如下: 对碳膜铜网进行亲水化处理后, 取 3.5 μL 蛋白质 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 溶液滴于碳膜铜网, 吸附 1 min; 用滤纸从碳膜铜网边缘轻轻吸去多余的溶液, 滴加 15 μL 0.75% (质量体积比) UF 负染色液, 染色 1 min; 用滤纸吸去多余液体, 室温晾干; 晾干后将样品置于 120 kV 透射电镜中观察, 放大倍数设置为 73 000 倍, 欠焦值设置为 $-1\sim-2\text{ }\mu\text{m}$, 选择样品颗粒分散性和均一性较好的区域进行数据收集。随后利用数据处理软件 EMAN2^[24] 和 RELION3^[25] 对所收集的图像进行处理并产生一个三维模型。

1.2.8 THOC3 蛋白结构预测 I-TASSER (Iterative Threading ASSEmbly Refinement) 是由密歇根大学开发的在线蛋白质结构与功能预测的工具, 它能从 PDB (Protein Data Bank) 数据库里识别结构模板, 通过基于迭代模板的片段组装模拟来构建完整的结构模型。根据网站提示, 提交 THOC3 蛋白质序列, 获得相应的蛋白质三级结构预测数据。

2 结果

2.1 THOC1-THOC2-THOC3 亚复合物表达及纯化

THOC1、THOC2、THOC3 亚基在哺乳动物和酵母中均非常保守, 但是组分之间的相互作用尚不清楚 (图 1A); 人源 THOC2 全长为 1 593 个氨基酸, 在进行全长蛋白的外源表达过程中, 未能检测到蛋白表达 (数据未显示)。通过在线软件 FoldIndex^[26] 对 THOC2 折叠倾向性进行分析发现, 在 THOC2 的 C 端存在一段很大的无序区域 (氨基酸残基: 1 191 ~ 1 593) (图 1B), 因此截取 THOC2 (氨基酸残基: 1 ~ 1 190) 进行外源表达; THOC1 和 THOC3 则选择全长进行表达。THOC2 的 N 端带有 $10\times$ His 标签, THOC1 的 C 端带有 Strep 标签, 用于两步亲和层析。第一步通过 Ni-NTA 亲和层析获得的目的蛋白质带有少量的杂蛋白质, 经过第二步 Strep-Tactin 亲和层析后得到纯度较高的目的蛋白质样品 (图 1C)。为了提高样品的均一性, 目的蛋白质样品通过 Superose 6 Increase 10/300 GL 进一步分离提纯 (图 1D), 收集所有的流出组分, 经 SDS-PAGE 鉴定 (图 1E), 合并含有目的蛋白质复合物的组分。纯化的样品经过 LC-MS/MS 鉴定, 结果表明纯化所得的样品是 THOC1-THOC2-THOC3 亚复合物 (表 1)。经过整个分离纯化步骤, 从 300 mL 的 High Five 细胞里可纯化出约 1 mg 的目的蛋白质复合物。



Note: A. Schematic representation of THOC1, THOC2 and THOC3. Gray region in THOC2 was deleted in our work. B. Prediction of disordered regions in THOC2 using FoldIndex. P-FIT (PONDR-FIT)—a meta-predictor of intrinsically disordered amino acids. Residues above the threshold of 0.5 were predicted to be disordered. C. SDS-PAGE showing purified recombinant THOC1-THOC2-THOC3 subcomplex. L—cell lysis; S—supernatant; F—flow through; W—buffer wash; E—elution. D. Gel filtration chromatography profile of the THOC1-THOC2-THOC3 subcomplex on Superose[®] 6 Increase 10/300 GL column. E. SDS-PAGE analysis of fractions across the major peak shown in D. The numbers shown on the top of the gel indicated the elution volumes (mL).

图 1 重组人源 THOC1-THOC2-THOC3 亚复合物的表达及纯化

Fig 1 Expression and purification of the recombinant human THOC1-THOC2-THOC3 subcomplex

表 1 纯化的 THOC1-THOC2-THOC3 样品蛋白质组质谱分析结果

Tab 1 Analysis of protein components in purified THOC1-THOC2-THOC3 subcomplex by LC-MS/MS

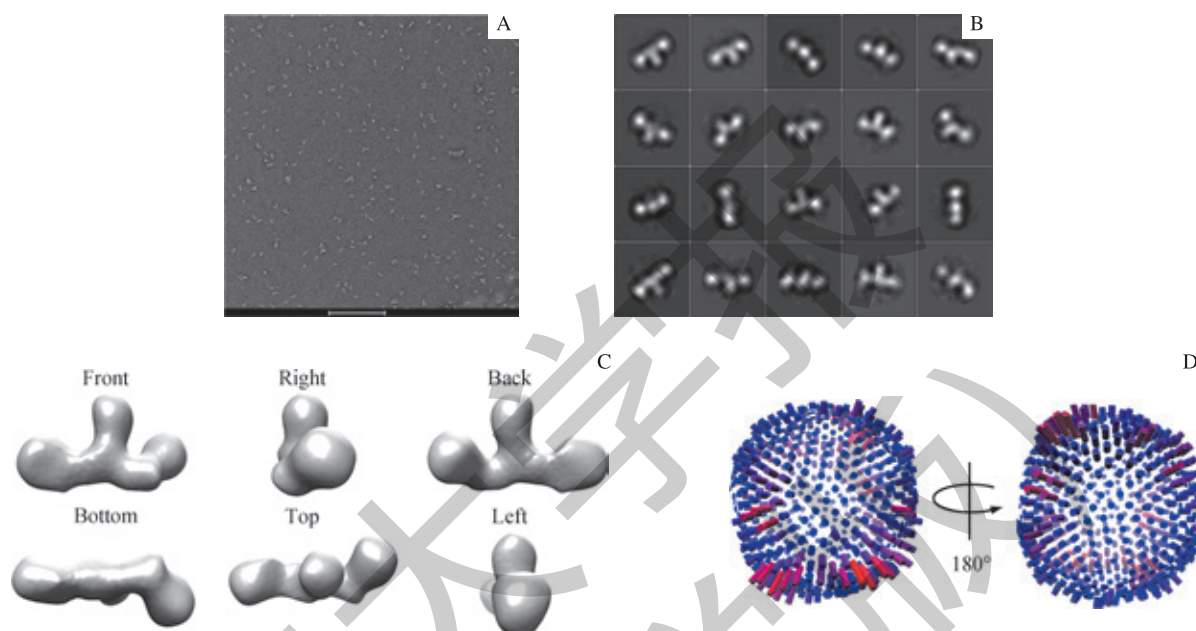
Description		Coverage	Peptides	PSMs	Unique peptides	AAs				
Protein	OS						OX	GN	PE	SV
THO complex subunit 2	<i>Homo sapiens</i>	9 606	<i>THOC2</i>	1	2	60	95	532	95	1 593
THO complex subunit 1	<i>Homo sapiens</i>	9 606	<i>THOC1</i>	1	1	78	68	381	68	657
THO complex subunit 3	<i>Homo sapiens</i>	9 606	<i>THOC3</i>	1	1	61	21	179	21	351
Heat shock 70 kDa protein	<i>Trichoplusia ni</i>	7 111	N/A	2	1	29	13	15	11	654
Elongation factor 1- α	<i>Trichoplusia ni</i>	7 111	N/A	2	1	8	3	5	3	463
Tubulin α chain	<i>Trichoplusia ni</i>	7 111	N/A	2	1	9	3	3	3	450
Heat shock cognate 70 protein	<i>Trichoplusia ni</i>	7 111	N/A	3	1	6	3	3	1	659
Retinoblastoma-associated protein	<i>Homo sapiens</i>	9 606	<i>RB1</i>	1	2	4	3	3	3	928
Ras suppressor protein 1	<i>Trichoplusia ni</i>	7 111	<i>RSU-1</i>	2	1	14	3	3	3	285
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 21	<i>Homo sapiens</i>	9 606	<i>MAP3K21</i>	1	3	1	1	2	1	1 036
Heat shock protein HSP 90- α	<i>Homo sapiens</i>	9 606	<i>HSP90AA1</i>	1	5	2	1	2	1	732
Probable E3 ubiquitin-protein ligase IRF2BPL	<i>Homo sapiens</i>	9 606	<i>IRF2BPL</i>	1	1	1	1	1	1	796
G patch domain-containing protein 1	<i>Homo sapiens</i>	9 606	<i>GPATCH1</i>	1	1	2	1	1	1	931
α -aminoadipic semialdehyde dehydrogenase	<i>Homo sapiens</i>	9 606	<i>ALDH7A1</i>	1	5	7	1	1	1	539
Band 4.1-like protein 5	<i>Homo sapiens</i>	9 606	<i>EPB41L5</i>	1	3	3	1	1	1	733
RNA-binding protein 43	<i>Homo sapiens</i>	9 606	<i>RBM43</i>	2	1	3	1	1	1	357
Histone acetyltransferase KAT2A	<i>Homo sapiens</i>	9 606	<i>KAT2A</i>	1	3	5	1	1	1	837

Note: OS—organism; OX—organism identifier; GN—gene name (N/A, not available); PE—protein existence (1—Experimental evidence at protein level; 2—Experimental evidence at transcript level; 3—Protein inferred from homology); SV—sequence version; Coverage—the percentage of the protein sequence covered by identified peptides; Peptides—the number of distinct peptide sequences in the protein group; PSMs—the total number of identified peptide sequences for the protein; Unique peptides—the number of peptide sequences unique to a protein group; AAs—the length of the amino acid sequence of the protein.

2.2 THOC1-THOC2-THOC3 亚复合物负染电镜数据收集和三维模型的建立

在获得高纯度且均一性较好的 THOC1-THOC2-THOC3 亚复合物后, 采用负染电镜技术和单颗粒重构技术分析目的复合物的三维模型。样品吸附到碳膜铜网后, 经重金属 UF 染色处理过后, 在 120 kV 透射电镜下观察, 结果表明样品在负染条件下颗粒完整, 大小均一,

且分散性好, 长度约为 2.2 nm, 和预期相对分子质量 (约 250 000) 大小相符合 (图 2A)。在同样条件下收集负染照片 129 张。利用 EMAN2^[24] 软件手工挑选 11 762 个颗粒, 之后使用 RELION3^[25] 软件进行二维分类平均和三维分类计算。分类结果表明复合物结构特征明显 (图 2B), 整体呈现长条形状 (图 2C), 在不同的区域有不同的优势取向, 角度分布较为均匀 (图 2D)。



Note: A. A representative negative-staining electron micrograph image of the THOC1-THOC2-THOC3 subcomplex. Bar, 200 nm. B. Selected reference-free two-dimensional class averages of the THOC1-THOC2-THOC3 particles. C. Reconstruction of the THOC1-THOC2-THOC3 subcomplex shown in six orthogonal views as indicated. D. Angular distribution of the particles used for the final reconstruction of the THOC1-THOC2-THOC3 subcomplex.

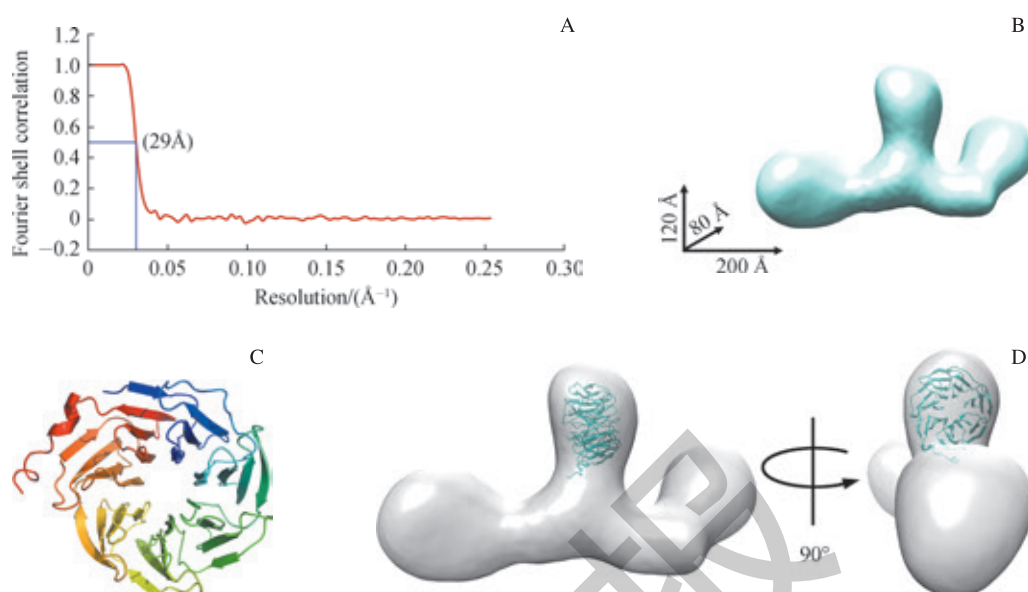
图 2 负染电镜分析 THOC1-THOC2-THOC3 亚复合物

Fig 2 Negative-staining electron microscopy analysis of the THOC1-THOC2-THOC3 subcomplex

2.3 THOC1-THOC2-THOC3 亚复合物初步结构分析

三维分类计算结果经过进一步优化, 最终得到分辨率为 29 Å 的人源 THOC1-THOC2-THOC3 亚复合物的负染三维模型 (图 3A); 图像中颗粒棱角更加清晰, 复合物整体结构延展, 呈 “F” 型, 整个复合物的尺度为 200 Å × 120 Å × 80 Å (图 3B)。由于目前尚未有 THOC1、THOC2、THOC3 任何一个组分的高分辨率数据, 因此, 低分辨率的负染结构并不能确定各组分的相互位置。已有的研究^[27] 预测 THOC3 含有若干个 WD40 重复序列, 所有

的 WD40 重复序列组成一个 β 螺旋桨结构。我们借助结构预测软件 I-TASSER^[28] 模拟产生了一个 THOC3 (氨基酸残基: 46 ~ 351) 的原子结构模型 (图 3C) (THOC3 N 端 1 ~ 45 位氨基酸未发现任何已知的同源结构域); 通过软件 UCSF Chimera^[29] 自动匹配, 确认了 THOC3 在亚复合物里的位置 (图 3D)。发现人源 THOC3 在 THOC1-THOC2-THOC3 亚复合物中的位置和已报道的低分辨率酵母 THO 复合物电镜结构中 THOC3 的定位相同^[30], 这表明在人和酵母中 THOC1-THOC2-THOC3 亚复合物的结构保守。



Note: A. Gold standard Fourier shell correlation (FSC) curve of the final reconstructed electron micrograph map of the THOC1-THOC2-THOC3 subcomplex. B. Surface view of the electron density map of the THOC1-THOC2-THOC3 subcomplex. C. Predicted atomic model of the β -propeller domain of THOC3 (amino acids: 46–351). D. Docking of the predicted atomic model of THOC3 into the corresponding mass of the THOC1-THOC2-THOC3 subcomplex shown in two orthogonal views.

图 3 THOC1-THOC2-THOC3 亚复合物负染三维模型和 THOC3 的定位

Fig 3 Three-dimensional reconstruction of the THOC1-THOC2-THOC3 subcomplex and localization of THOC3

3 讨论

自从首次在酵母和人细胞中被发现, THO/TREX 复合物一直是 mRNA 的加工和出核转运研究领域的一个重要靶标^[19]。相对于已报道的 THO/TREX 复合物功能研究, 与之相关的结构生物学研究则进展缓慢, 严重限制了对该复合物在发挥生物学活性分子机制的理解^[31]。在 2012 年有研究者^[30]发表了酵母中 THO 复合物 (Hpr1/Tho1、Tho2、Tex1/Tho3、Mft1、Thp2) 的低分辨率结构, 但是至今尚无关于人源 THO 复合物结构的报道。与酵母不同的是, 人源 THO 复合物含有 6 个亚基 (THOC 1 ~ 3, 5 ~ 7), 其中 THOC5、THOC6、THOC7 在酵母中并没有同源物, 只有 THOC1、THOC2、THOC3 在酵母中有高度保守的同源物^[8-9]。此外有研究^[8]表明 THO/TREX 复合物在酵母和人细胞里的招募机制有所不同, 因此解析人源 THO/TREX 复合物的结构也势在必行。我们尝试在体外表达重组完整的人源 THO 复合物, 但并未得到稳定的复合物。因此, 我们首先研究保守性较高的人源 THOC1-THOC2-THOC3 亚复合物的结构。与酵母的 Tho2 类似, 人源的 THOC2 的 C 端包含一段高度无序的序列^[30], 不参与 THOC1、THOC2、THOC3 之间的相互作用, 所以只截取 THOC2 亚基 1 ~ 1 190 的序列用于表达纯化。

我们采用两步亲和层析和一步凝胶过滤层析分离提纯目标复合物, 对纯化的样品进行质谱分析鉴定, 确定其中的主要成分是 THOC1-THOC2-THOC3 亚复合物, 只有极少量的 70 kDa 热休克蛋白 (heat shock 70 kDa protein) 等杂蛋白质的污染 (表 1); 此外, 凝胶过滤层析保证实验获得的是整体的目标复合物, 而不是分散的各个组分 (图 1D), 可直接用于电镜分析。通过单颗粒重构技术, 获得了 THOC1-THOC2-THOC3 亚复合的低分辨率结构。除了有报道^[27]表明 THOC3 含有典型的由 WD40 重复序列组成的 β 螺旋桨结构以外, THOC1 和 THOC2 没有任何结构信息, 因此我们借助分子对接的方式, 确定了 THOC3 在整个亚复合物的位置。

我们的研究首次获得了人源 THOC1-THOC2-THOC3 亚复合物的负染三维模型, 朝着阐明人源 TREX 复合物的组装和招募的分子机制的方向踏出了关键的一步。与已报道的酵母的低分辨率 THO 复合物进行对比^[30], 该亚复合物呈 “F” 型, 且 THOC3/Tex1 位于亚复合物的中间部位。下一步我们将优化样品的制备条件, 尝试冷冻电镜分析, 以期获得 THOC1-THOC2-THOC3 亚复合物的高分辨冷冻电镜结构。同时, 我们将优化纯化条件, 制备完整 THO 复合物并解析其冷冻电镜结构, 全面地解释 THO 复合物组装过程以及内部的相互作用。

参·考·文·献

- [1] Köhler A, Hurt E. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(10): 761-773.
- [2] Stewart M. Ratcheting mRNA out of the nucleus[J]. Mol Cell, 2007, 25(3): 327-330.
- [3] Carmody SR, Wente SR. mRNA nuclear export at a glance[J]. J Cell Sci, 2009, 122(Pt 12): 1933-1937.
- [4] Kelly SM, Corbett AH. Messenger RNA export from the nucleus: a series of molecular wardrobe changes[J]. Traffic, 2009, 10(9): 1199-1208.
- [5] Cheng H, Dufu K, Lee CS, et al. Human mRNA export machinery recruited to the 5' end of mRNA[J]. Cell, 2006, 127(7): 1389-1400.
- [6] Chi B, Wang Q, Wu G, et al. Aly and THO are required for assembly of the human TREX complex and association of TREX components with the spliced mRNA[J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(2): 1294-1306.
- [7] Gromadzka AM, Steckelberg AL, Singh KK, et al. A short conserved motif in ALYREF directs cap- and EJC-dependent assembly of export complexes on spliced mRNAs[J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44(5): 2348-2361.
- [8] Reed R, Cheng H. TREX, SR proteins and export of mRNA[J]. Curr Opin Cell Biol, 2005, 17(3): 269-273.
- [9] Katahira J. mRNA export and the TREX complex[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1819(6): 507-513.
- [10] Libri D, Dower K, Boulay J, et al. Interactions between mRNA export commitment, 3'-end quality control, and nuclear degradation[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(23): 8254-8266.
- [11] Jimeno S, Rondón AG, Luna R, et al. The yeast THO complex and mRNA export factors link RNA metabolism with transcription and genome instability[J]. EMBO J, 2002, 21(13): 3526-3535.
- [12] Yang J, Li Y, Khoury T, et al. Relationships of hHpr1/p84/Thoc1 expression to clinicopathologic characteristics and prognosis in non-small cell lung cancer[J]. Ann Clin Lab Sci, 2008, 38(2): 105-112.
- [13] Domínguez-Sánchez MS, Sáez C, Japón MA, et al. Differential expression of THOC1 and ALY mRNA biogenesis/export factors in human cancers[J]. BMC Cancer, 2011, 11: 77.
- [14] Di Gregorio E, Bianchi FT, Schiavi A, et al. A *de novo* X;8 translocation creates a *PTK2-THOC2* gene fusion with *THOC2* expression knockdown in a patient with psychomotor retardation and congenital cerebellar hypoplasia[J]. J Med Genet, 2013, 50(8): 543-551.
- [15] Kumar R, Corbett MA, van Bón BW, et al. THOC2 mutations implicate mRNA-export pathway in X-linked intellectual disability[J]. Am J Hum Genet, 2015, 97(2): 302-310.
- [16] Masuda S, Das R, Cheng H, et al. Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing[J]. Genes Dev, 2005, 19(13): 1512-1517.
- [17] Shen J, Zhang L, Zhao R. Biochemical characterization of the ATPase and helicase activity of UAP56, an essential pre-mRNA splicing and mRNA export factor[J]. J Biol Chem, 2007, 282(31): 22544-22550.
- [18] Shen H, Zheng X, Shen J, et al. Distinct activities of the DEXD/H-box splicing factor hUAP56 facilitate stepwise assembly of the spliceosome[J]. Genes Dev, 2008, 22(13): 1796-1803.
- [19] Strässer K, Hurt E. Yra1p, a conserved nuclear RNA-binding protein, interacts directly with Mex67p and is required for mRNA export[J]. EMBO J, 2000, 19(3): 410-420.
- [20] Rodrigues JP, Rode M, Gatfield D, et al. REF proteins mediate the export of spliced and unspliced mRNAs from the nucleus[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(3): 1030-1035.
- [21] Shi H, Cordin O, Minder CM, et al. Crystal structure of the human ATP-dependent splicing and export factor UAP56[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(51): 17628-17633.
- [22] Zhao R, Shen J, Green MR, et al. Crystal structure of UAP56, a DEXD/H-box protein involved in pre-mRNA splicing and mRNA export[J]. Structure, 2004, 12(8): 1373-1381.
- [23] Tunneli RB, Hautbergue GM, Kalra P, et al. Structural basis for the recognition of cellular mRNA export factor REF by herpes viral proteins HSV-1 ICP27 and HVS ORF57[J]. PLoS Pathog, 2011, 7(1): e1001244.
- [24] Tang G, Peng L, Baldwin PR, et al. EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy[J]. J Struct Biol, 2007, 157(1): 38-46.
- [25] Scheres SH. RELION: implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination[J]. J Struct Biol, 2012, 180(3): 519-530.
- [26] Prilusky J, Felder CE, Zeev-Ben-Mordehai T, et al. FoldIndex: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded[J]. Bioinformatics, 2005, 21(16): 3435-3438.
- [27] Rehwinkel J, Herold A, Gari K, et al. Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the THO complex in *Drosophila melanogaster*[J]. Nat Struct Mol Biol, 2004, 11(6): 558-566.
- [28] Yang J, Zhang Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(W1): W174-W181.
- [29] Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, et al. UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis[J]. J Comput Chem, 2004, 25(13): 1605-1612.
- [30] Peña A, Gewartowski K, Mroczek S, et al. Architecture and nucleic acids recognition mechanism of the THO complex, an mRNP assembly factor[J]. EMBO J, 2012, 31(6): 1605-1616.
- [31] Heath CG, Vipakone N, Wilson SA. The role of TREX in gene expression and disease[J]. Biochem J, 2016, 473(19): 2911-2935.

[收稿日期] 2019-10-10

[本文编辑] 崔黎明

抗疫小知识

新型冠状病毒肺炎临床鉴别

主要与流感病毒、副流感病毒、腺病毒、呼吸道合胞病毒、鼻病毒、人偏肺病毒、SARS 冠状病毒等其他已知病毒性肺炎鉴别，与肺炎支原体、衣原体肺炎及细菌性肺炎等鉴别。此外，还要与非感染性疾病，如血管炎、皮炎和机化性肺炎等鉴别。

——摘自《新型冠状病毒肺炎诊疗方案（试行第五版修正版）》





特约创新团队介绍



创新团队名称

面向临床应用的精准医学分析与精准医学设计

团队主要成员

团队负责人介绍

雷鸣 LEI Ming

博士、研究员、博士生导师

Ph.D, Principle Investigator, Doctoral Supervisor

ORCID ID: 0000-0002-1153-4791

雷鸣 (1971—), 中组部“千人计划”特聘专家。2001 年博士毕业于美国哈佛大学。2001 至 2004 年在美国科罗拉多大学波尔德分校从事博士后研究。2004 至 2011 年在美国密西根大学医学院生物化学系工作, 历任助理教授、副教授。2011 年 6 月至 2017 年 8 月, 担任国家蛋白质科学中心 (上海) 主任, 中科院生化细胞所副所长。2017 年 9 月至今, 担任上海交通大学医学院附属第九人民医院上海精准医学研究院执行院长。现任亚太蛋白质协会执行委员、中国生物物理学会副理事长。目前担任 *Biological Chemistry* 杂志副主编、*Science Bulletin* 杂志执行编委。

雷鸣研究员长期致力于蛋白质复合体为主的生物大分子的结构和分子机制及其在癌症和衰老中的作用等科研工作, 取得了多项突破性的研究成果。自回国以来, 承担多项国家级和省部级科研任务, 作为首席科学家主持国家科技部“973”重大研究计划项目 1 项, 主持国家基金委重点项目 2 项, 主持国家基金委大科学装置联合基金项目 1 项, 参与中科院战略性先导技术专项 (B 类) 1 项, 参与国家科技部重大新药创制专项计划 1 项, 参与国家科技部蛋白质科学重大研究计划项目 2 项, 并得到 2015 年度国家杰出青年科学基金、2016 年度上海市优秀学科带头人等人才项目支持。

雷鸣 (研究员 / 博士) 匡延平 (主任医师 / 博士) 曹禹 (研究员 / 博士)

卞迁 (研究员 / 博士) 武健 (研究员 / 博士) 张家毓 (研究员 / 博士)

邓玮 (副研究员 / 博士) 廖日晶 (副研究员 / 博士)

LEI Ming (1971—), distinguished expert of the Recruitment Program of Global Experts by the Organization Department of the CPC Central Committee. Dr. LEI received a doctor degree of Biophysics from Harvard University in 2001. During 2001 and 2004, he received the postdoctoral training at University of Colorado at Boulder. From 2004, he began the academic career at the University of Michigan as an assistant professor and became tenured associate professor at 2010. From 2011 to 2017, he was the Deputy Director of Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences and Director of National Center for Protein Science Shanghai, China. From 2017 to present, he has been the Executive Director of Shanghai Institute of Precision Medicine, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine. He is the Executive Committee member of Asia Pacific Protein Association and the Deputy Secretary of Biophysical Society of China. He is also the Associate Editor of *Biological Chemistry* and the Executive Editor of *Science Bulletin*.

Dr. LEI is focusing on understanding the organization and dynamics of macromolecular assemblies important for genome regulation and stability and have made significant progress in this field. He had the experience of leading the Ministry of Science and Technology 973 Program of China and the National Natural Science Foundation Key Program and Joint Funds of Key Program of China, and participating in the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences and the National Science and Technology Major Project 'Key New Drug Creation and Manufacturing Program' of China. He was supported by the National Natural Science Foundation for Distinguished Young Scholars of China in 2015 and by the Outstanding Academic Leader Program of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality in 2016.

主要研究方向

综合应用结构生物学、生物化学以及细胞生物学等多种技术手段，雷鸣研究员领导的团队深入探讨了以蛋白质复合物为主的生物大分子的结构和分子机制及其在癌症和衰老中的作用。在染色体研究特别是端粒、长链非编码 RNA 以及表观遗传学等领域做出了多项突破性的工作，取得了丰硕的研究成果，受到了国际同行的广泛关注与认可。在 *Cell*、*Nature*、*Science*、*Mol Cell*、*Nat Struct Mol Biol* 等国际顶级学术期刊上发表论文 70 余篇，论文他引次数达 3 000 次以上。上述成果为我们更好地理解这些蛋白质复合物相关的生理进程奠定了重要的基础，并为相关的疾病机制探索及新型药物研发提供了理论依据。

The goal of Dr. LEI's group is to understand the organization and dynamics of macromolecular assemblies important for genome regulation and stability. With combination of structural analyses, such as X-ray crystallography, nuclear magnetic resonance and electron microscopy, coupled with biophysical, biochemical and cellular approaches, Dr. LEI's group has made important progress on telomeres, long noncoding RNAs (lncRNAs) and epigenetics among others. During the last five years, this group has published more than 70 SCI-indexed papers in *Cell*, *Nature*, *Science*, *Mol Cell*, *Nat Struct Mol Biol*, et al, with a total citation number of more than 3 000. These studies provide a solid foundation for our understanding of the molecular basis associated with the important protein complexes and open a new horizon on novel drug development.

近 2 年代表性成果

- 1) Chen H, Xue J, Churikov D, et al. Structural insights into yeast telomerase recruitment to telomeres[J]. *Cell*, 2018, 172(1/2): 331-343.
- 2) Lan P, Tan M, Zhang Y, et al. Structural insight into precursor tRNA processing by yeast ribonuclease P[J]. *Science*, 2018, 362(6415). DOI: 10.1126/science.aat6678.
- 3) Wu J, Niu S, Tan M, et al. Cryo-EM structure of human ribonuclease P holoenzyme[J]. *Cell*, 2018, 175(5): 1393-1404.
- 4) Wang Y, Chen Y, Chen J, et al. The meiotic TERB1-TERB2-MAJIN complex tethers telomeres to the nuclear envelope[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 564.
- 5) Wan F, Wang Q, Tan J, et al. Cryo-electron microscopy structure of an archaeal ribonuclease P holoenzyme[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2617.
- 6) Wan B, Wu J, Meng X, et al. Molecular basis for control of diverse genome stability factors by the multi-BRCT scaffold Rtt107[J]. *Mol Cell*, 2019, 75(2): 238-251.