

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 21620141152564

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

2-HG 通过上调 RIP3 启动子的 DNA 甲基化水  
平从而抑制细胞坏死

2-HG Inhibits Necroptosis by Stimulating  
DNMT1-Dependent Hypermethylation of the RIP3  
Promoter

王 燕

指导教师姓名: 韩家准 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

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

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

## 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

异柠檬酸脱氢酶 IDH1 第 132 位的突变高发于神经胶质瘤和急性髓性白血病等疾病中，突变型的 IDH1 可以产生一种新的代谢产物 2-HG，已有研究证明，2-HG 会抑制  $\alpha$ -酮戊二酸依赖型的双加氧酶 TET2 的活性，这种抑制现象会导致 IDH1 突变细胞中 DNA 甲基化水平的上升。

然而，在本论文中，我们发现了一种新的 2-HG 调控细胞内 DNA 甲基化水平的方式——通过调节 DNA 甲基转移酶 DNMT1。2-HG 的处理会促进 DNMT1 与 RIP3 启动子区域的结合，导致 RIP3 启动子上 DNA 甲基化水平的提升及 RIP3 表达量的下调，最终抑制细胞坏死的发生。除此之外，在本论文中，我们还证明了 2-HG 对 RIP3 表达量和对细胞坏死的抑制作用会增强细胞的成瘤性，进一步证明了 RIP3 蛋白是重要的抑癌分子。我们的研究提出一种新的由 2-HG 介导的生理机制方面的调控，这种由 IDH1 突变所引起的对细胞坏死的抵御会提升初期癌细胞的存活概率，最终会导致肿瘤的形成。

综上所述，本论文发现了一种新的 2-HG 调控 DNA 甲基化的方式，并且发现了由 2-HG 引起的细胞坏死的抑制能促进突变型 IDH1 导致的成瘤过程。

关键词：IDH1 突变；2-HG；RIP3

## Abstract

The mutation in isocitrate dehydrogenases 1 (IDH1) at R132 confers a new function to this enzyme, which can produce a new metabolite named 2-hydroxyglutarate (2-HG). It has been proved that 2-HG can inhibit the activity of  $\alpha$ -KG-dependent ten eleven translocation dioxygenases (TET2) due to the similar structure between 2-HG and  $\alpha$ -KG. And this kind of inhibition will lead to DNA hypermethylation in cells expressing mutant IDH1.

Here we found that DNA methyltransferase 1 (DNMT1) is a new target of 2-HG. 2-HG produced by mutant IDH1 resulted in hypermethylation of the RIP3 promoter, which can consequently reduce protein level of RIP3 and thus suppress the necroptosis. And we discovered that the hypermethylation of the RIP3 promoter is mediated by DNMT1. 2-HG can enhance the interaction between DNMT1 and RIP3 promoter, and then reduce the expression level of RIP3.

In addition, the inhibition of RIP3 protein level had a good correlation with IDH1 mutant status in human glioma samples. And ectopic expression of RIP3 in transformed IDH1-mutated MEF inhibited the growth of tumors. In conclusion, our research sheds light on a previously unknown mechanism of 2-HG-induced DNA hypermethylation, and suggests that impaired necroptosis contributes to the tumorigenesis driven by IDH1 mutations.

Key Words: IDH1 mutation; 2-HG; RIP3.

# 目 录

摘要.....	I
Abstract.....	II
<b>第一章 前言</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 细胞坏死</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 细胞坏死概述.....	1
1.1.2 细胞坏死的信号转导.....	1
1.1.2.1 RIP3 是细胞坏死过程中的关键蛋白.....	2
1.1.2.2 MLKL 是 RIP3 下游的关键蛋白.....	3
1.1.3 细胞坏死的生理意义.....	3
<b>1.2 DNA 甲基化概述</b> .....	<b>4</b>
1.2.1 DNMT1.....	5
1.2.2 DNMT3.....	6
1.2.3 DNA 去甲基化.....	6
<b>1.3 异柠檬酸脱氢酶</b> .....	<b>7</b>
1.3.1 IDH 突变的发现.....	8
1.3.2 IDH 突变的功能.....	9
<b>1.4 立题背景</b> .....	<b>10</b>
<b>第二章 材料与方法</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1 实验材料</b> .....	<b>12</b>
<b>2.2 实验仪器</b> .....	<b>12</b>
<b>2.3 分子克隆相关实验方法</b> .....	<b>13</b>
2.3.1 表达载体.....	13
2.3.2 RNA 干扰载体.....	14
2.3.3 聚合酶链式反应 PCR.....	16
2.3.4 DNA 电泳及片段回收.....	16
2.3.5 DNA 连接反应.....	17
2.3.6 连接酶非依赖性克隆 (Ligase Independent Clone, LIC).....	17

2.3.7 小量提取质粒 .....	18
2.3.8 中量提取质粒 .....	18
2.3.9 基因组的提取 .....	19
2.3.10 RNA 提取和实时荧光定量 PCR .....	19
<b>2.4 细胞实验相关方法 .....</b>	<b>21</b>
2.4.1 细胞培养 .....	21
2.4.2 细胞的冻存和复苏 .....	22
2.4.3 磷酸钙转染 DNA .....	22
2.4.4 电穿孔转染 DNA .....	23
2.4.5 慢病毒的包装和感染 .....	23
2.4.6 流式细胞术检测细胞存活率 .....	24
<b>2.5 蛋白纯化及蛋白质相关实验 .....</b>	<b>24</b>
2.5.1 原核细胞中融合蛋白的纯化 .....	24
2.5.2 免疫共沉淀 .....	25
2.5.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和蛋白质免疫印迹 .....	26
2.5.4 药物亲和反应的靶点稳定性(DARTS) .....	26
<b>2.6 表观遗传相关实验 .....</b>	<b>27</b>
2.6.1 DNA 甲基化水平的检测 .....	27
2.6.2 染色质免疫沉淀 (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP) .....	27
<b>2.7 肿瘤形成实验 .....</b>	<b>28</b>
<b>2.8 体外 DNMT1 活性实验 .....</b>	<b>28</b>
<b>2.9 双重荧光素报告系统 .....</b>	<b>29</b>
2.9.1 荧光素酶载体 .....	30
2.9.2 Gal4-DNMT1 质粒的构建 .....	31
2.9.3 双重荧光素报告系统 .....	31
<b>第三章 结果与讨论 .....</b>	<b>32</b>
3.1 IDH1 第 132 位突变会抑制 MEF 细胞中的细胞坏死 .....	32
3.2 2-HG 会抑制 TNF 引起的细胞坏死 .....	34
3.3 2-HG 通过下调 RIP3 的表达量来抑制细胞坏死 .....	36
3.4 IDH1 R132 突变会增强 RIP3 启动子的甲基化水平 .....	39

<b>3.5 DNMT1 是 2-HG 下调 RIP3 表达量所必须的关键蛋白.....</b>	<b>41</b>
3.5.1 TET2 不参与 2-HG 对 RIP3 表达量的调节过程.....	41
3.5.2 KDM2A、KDM2B 不参与 2-HG 对 RIP3 表达量的调节过程.....	42
3.5.3 KDM4C 不参与 2-HG 对 RIP3 表达量的调节过程.....	45
3.5.4 5-AD 会抑制 2-HG 对 RIP3 表达量的下调作用.....	46
3.5.5 DNMT1 参与 2-HG 对 RIP3 表达量的调节过程.....	47
3.5.6 DNMT3a 不参与 2-HG 对 RIP3 表达量的调节过程.....	49
3.5.7 DNMT3b 不参与 2-HG 对 RIP3 表达量的调节过程.....	50
<b>3.6 2-HG 促进 DNMT1 与 RIP3 启动子的结合.....</b>	<b>51</b>
3.6.1 2-HG 不影响 DNMT1 的蛋白量.....	51
3.6.2 2-HG 能够结合 DNMT1.....	51
3.6.3 2-HG 不影响 DNMT1 的活性.....	52
3.6.4 2-HG 不影响 DNMT1 对 RIP3 启动子区域的甲基化能力.....	52
3.6.5 IDH1 突变会促进 DNMT1 与 RIP3 启动子的结合.....	54
3.6.6 2-HG 会促进 DNMT1 与 RIP3 启动子的结合.....	55
<b>3.7 RIP3 的下调有助于 IDH1 突变导致的成瘤.....</b>	<b>56</b>
3.7.1 神经胶质瘤中 IDH1 突变和 RIP3 下调具有相关性.....	56
3.7.2 细胞坏死的抑制可以促进 IDH1 突变导致的成瘤.....	57
3.7.2.1 IDH1 突变的细胞成瘤性更强.....	57
3.7.2.2 RIP3 会抑制细胞的成瘤性.....	58
3.7.2.3 细胞坏死的抑制会促进细胞的成瘤性.....	60
<b>3.8 小结与讨论.....</b>	<b>62</b>
<b>参考文献.....</b>	<b>64</b>



# Contents

<b>Abstract in Chinese</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract in English</b> .....	<b>II</b>
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Programmed cell death</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 The overview about Necroptosis.....	1
1.1.2 The signaling pathway of Necroptosis .....	1
1.1.2.1 RIP3 is an important component in Necroptosis .....	2
1.1.2.2 MLKL is in the downstream of RIP3.....	3
1.1.3 The physiological significance of Necroptosis .....	3
<b>1.2 The overview about DNA methylation</b> .....	<b>4</b>
1.2.1 DNMT1 .....	5
1.2.2 DNMT3 .....	6
1.2.3 DNA demethylation.....	6
<b>1.3 Isocitrate dehydrogenase</b> .....	<b>7</b>
1.3.1 The discovery of mutant IDH.....	8
1.3.2 The function of mutant IDH .....	9
<b>1.4 Background</b> .....	<b>10</b>
<b>Chapter 2 Materials and methods</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1 Experimental materials</b> .....	<b>12</b>
<b>2.2 Experimental apparatus</b> .....	<b>12</b>
<b>2.3 Methods for DNA cloning</b> .....	<b>13</b>
2.3.1 Plasmid vector .....	13
2.3.2 RNA interference vector .....	14
2.3.3 Polymerase chain reaction (PCR).....	16
2.3.4 Agarose gel electrophoresis.....	16
2.3.5 DNA ligation .....	17
2.3.6 Ligase Independent Clone (LIC).....	17

2.3.7 Mini-prep of plasmid DNA .....	18
2.3.8 Midi-prep of plasmid DNA .....	18
2.3.9 Genome isolation .....	19
2.3.10 RNA isolation and Real-time PCR.....	19
<b>2.4 Methods for cell culture.....</b>	<b>21</b>
2.4.1 Cell culture.....	21
2.4.2 Cell cryopreservation and cell recovery.....	22
2.4.3 Calcium phosphate transfection .....	22
2.4.4 Electro-transfection.....	23
2.4.5 Lentivirus infection.....	23
2.4.6 Detection of survival rate by flow cytometer.....	24
<b>2.5 Methods for protein .....</b>	<b>24</b>
2.5.1 Purification of fusion protein from <i>E.coli</i> .....	24
2.5.2 Co-immunoprecipitation .....	25
2.5.3 Western blot.....	26
2.5.4 Drug affinity responsive target stability assays (DARTS) .....	26
<b>2.6 Experiments about epigenetics .....</b>	<b>27</b>
2.6.1 Detection of DNA methylation level.....	27
2.6.2 Chromatin Immunoprecipitation (ChIP).....	27
<b>2.7 Allograft tumors.....</b>	<b>28</b>
<b>2.8 DNMT1 activity assay.....</b>	<b>28</b>
<b>2.9 Dual-luciferase Reporter Assay System.....</b>	<b>29</b>
2.9.1 Luciferase vector.....	30
2.9.2 The construct of Gal4-DNMT1.....	31
2.9.3 Dual-luciferase Reporter Assay System.....	31
<b>Chapter 3 Result and discussion .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1 IDH1 R132 mutations can inhibit TNF-induced Necroptosis.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2 2-HG inhibits TNF-induced necroptosis.....</b>	<b>34</b>
<b>3.3 2-HG inhibits TNF-induced necroptosis by suppressing RIP3 Expression....</b>	<b>36</b>
<b>3.4 IDH1 R132 mutation enhances the methylation of RIP3 promoter .....</b>	<b>39</b>

<b>3.5 DNMT1 Is essential for 2-HG-Mediated RIP3 Downregulation .....</b>	<b>41</b>
3.5.1 TET2 is not required in the regulation between 2-HG and RIP3 .....	41
3.5.2 KDM2A、KDM2B do not join in the regulation between 2-HG and RIP3 .....	42
3.5.3 KDM4C does not join in the regulation between 2-HG and RIP3 .....	45
3.5.4 5-AD can suppress the function of 2-HG .....	46
3.5.5 DNMT1 participates in the regulation between 2-HG and RIP3 .....	47
3.5.6 DNMT3a does not join in the regulation between 2-HG and RIP3 .....	49
3.5.7 DNMT3b does not join in the regulation between 2-HG and RIP3 .....	50
<b>3.6 2-HG enhances the binding between DNMT1 and RIP3 promoter .....</b>	<b>51</b>
3.6.1 2-HG has no effect on the expression of DNMT1 .....	51
3.6.2 2-HG can interact with DNMT1 .....	51
3.6.3 2-HG has no effect on the activity of DNMT1 .....	52
3.6.4 2-HG has no effect on the activity of DNMT1 binding RIP3 promoter....	52
3.6.5 IDH1 enhances the binding between DNMT1 and RIP3 promoter .....	54
3.6.6 2-HG enhances the binding between DNMT1 and RIP3 promoter.....	55
<b>3.7 The downregulation of RIP3 contributes to the tumorigenic ability of mutant IDH1 .....</b>	<b>56</b>
3.7.1 The correlation between mutant IDH1 and the downregulation of RIP3....	56
3.7.2 The inhibition of necroptosis contributes to the tumorigenic ability of mutant IDH1 .....	57
3.7.2.1 mutant IDH1 has higher tumorigenic ability .....	57
3.7.2.2 RIP3 inhibits tumorigenic ability of mutant IDH1 .....	58
3.7.2.3 The inhibition of necroptosis suppresses tumorigenic ability .....	60
<b>3.8 Discussion.....</b>	<b>62</b>
<b>References .....</b>	<b>64</b>

## 第一章 前言

### 1.1 细胞坏死

#### 1.1.1 细胞坏死概述

细胞程序性死亡是一种由细胞内一系列遗传机制决定并调控的自主有序的细胞死亡方式,细胞程序性死亡对免疫系统的稳态和免疫系统对各种刺激的应对都有很重要的作用。一般根据细胞死亡形态学上的差异可以将其分为细胞凋亡(Apoptosis)和细胞坏死(Necroptosis)两种死亡方式。

细胞凋亡的主要特征有:(1)细胞质皱缩,细胞体积变小,结构更加紧密;(2)核染色质断裂、凝集,核酸片段化,细胞内核酸内切酶被活化,将染色质DNA切割为核小体大小整数倍的片段,产生不同长度的寡聚核小体片段;(3)细胞以出芽方式形成凋亡小体,凋亡小体可迅速被周围专职或非专职吞噬细胞吞噬;(5)整个细胞凋亡过程中细胞膜保持完整,不释放内容物,不引起炎症反应。

细胞坏死的主要特征有:(1)细胞器膨胀破裂(2)细胞核固缩,染色质DNA降解;(3)细胞膜通透性增大,细胞结构完全消失,细胞肿胀直至最后破裂;(5)细胞质膜破裂,释放内含物,引起周围组织的炎症反应。

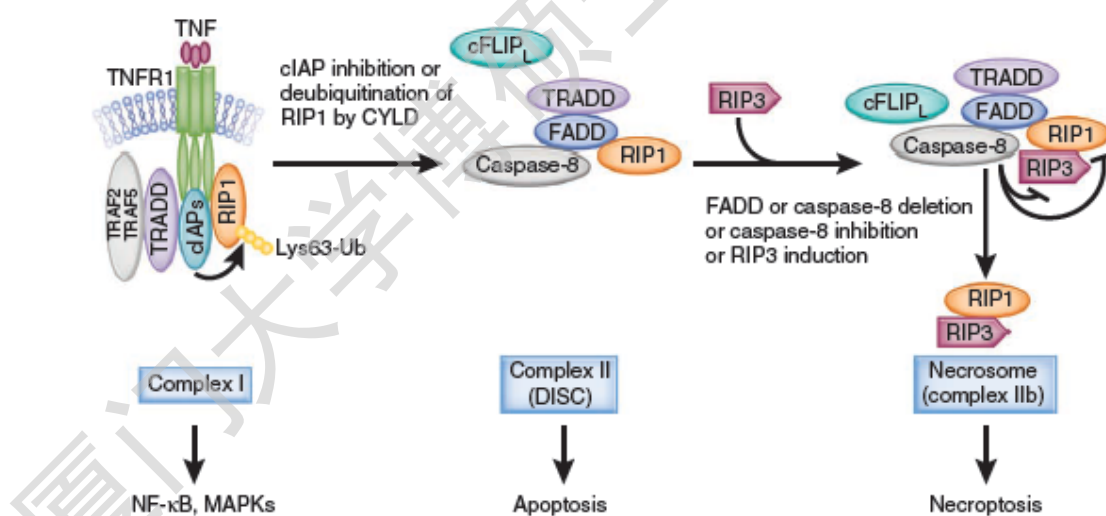
长久以来,对细胞凋亡的一系列研究表明,细胞凋亡是由细胞内一连串的精确定调的有序的死亡方式。相反,细胞坏死却被认为是由一类由化学因素、物理因素或生物因素等引起的被动的细胞死亡方式。然而最近的一系列研究揭示,细胞坏死也受细胞内特定分子的调控,属于细胞程序性死亡的一种。

#### 1.1.2 细胞坏死的信号转导

目前已知的可以感知细胞坏死信号的受体有肿瘤坏死因子受体 TNFR、Fas、Toll 样受体 TLRs (Toll-like receptors) 以及病毒 DNA 和 RNA 的受体等,其相应的配体,如肿瘤坏死因子 TNF (Tumor necrosis factor- $\alpha$ )、FasL、脂多糖 LPS (Lipopolysaccharide) 及病毒 RNA 等可以和相应受体结合,诱导细胞坏死。在引起细胞坏死的众多机制中, TNF 引起的细胞坏死是目前使用最多且研究得最透彻的细胞坏死模型,本文也将使用 TNF 诱导的细胞坏死为模型进行研究。

细胞坏死的具体机制为：TNF 与其受体 TNFR 结合，引起 TNFR 发生寡聚化而形成同源三聚体，同时 TNFR 的胞内结构域变化，募集一系列蛋白共同组成复合体 I（complex I）。复合体 I 包括肿瘤坏死因子 1 型受体相关的死亡结构域蛋白（TNFR1 associated death domain protein, TRADD）、RIP1(Receptor interacting protein 1)、TRAF2(tumor necrosis factor receptor-associated factor)、cIAP(cellular inhibitor of apoptosis proteins)等蛋白。之后复合体 I 会从细胞膜上脱落，TRADD 和 RIP1 会募集 Caspase-8 和 FADD 形成新的复合体 II，复合体 II 包括去泛素化的 RIP1、Caspase-8、TRADD 和 FADD，复合体 II 可以通过被激活的 Caspase-8 诱导细胞凋亡。Caspase-8 会抑制 RIP1 和 RIP3，因此当细胞内存在 RIP3 且 Caspase-8 受抑制的情况下，FADD 和 RIP1 会募集 RIP3，从而形成复合体 IIb（complex IIb）调控细胞坏死<sup>[1]</sup>。执行细胞死亡的几个关键复合体的转换见图 1.1.1。

图 1.1.1 TNF 诱导下形成的复合体 I、复合体 II 和复合体 IIb



(Jiahuai Han, Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system,

2011)

### 1.1.2.1 RIP3 是细胞坏死过程中的关键蛋白

在细胞死亡领域中之前一直存在着一个问题，即同种刺激在不同细胞中可以引起不同的死亡方式。例如，D.W. Zhang 等人发现，TNF 会引起两株不同来源

的 NIH-3T3 细胞发生不同方式的细胞死亡。不表达 RIP3 的 A 细胞只能发生细胞凋亡，而表达 RIP3 的 N 细胞却能发生细胞坏死。此外在敲低了 RIP3 表达量的 N 细胞中，细胞坏死的现象会被抑制。同时，在不表达 RIP3 的 A 细胞中回补 RIP3 蛋白，则细胞坏死可以发生。因此，RIP3 是细胞坏死中的关键分子，并且也是决定细胞的死亡方式走向细胞凋亡还是细胞坏死的关键分子开关<sup>[2]</sup>。

### 1.1.2.2 MLKL 是 RIP3 下游的关键蛋白

在 2012 年，Sun 和 Zhao 等人共同发现 MLKL(Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein)是 RIP3 下游介导细胞坏死的关键效应蛋白。Sun 等人通过大规模的药物筛选找到了一种可以有效抑制细胞坏死的药物 NSA，并通过免疫共沉淀和质谱鉴定的方法找到了 NSA 的作用靶点——MLKL<sup>[3]</sup>。缺失 MLKL 的细胞无法执行细胞坏死，但 RIP1 和 RIP3 依然可以相互作用，因此证明了 MLKL 位于 RIP3 的下游。在细胞坏死的过程中，RIP3 可以募集 MLKL，并通过磷酸化 MLKL 的 T357 和 S358 位点激活 MLKL，赋予 MLKL 介导细胞坏死的能力。

虽然 MLKL 作为 RIP3 下游的关键分子参与细胞坏死的功能已被证实，但关于 MLKL 下游如何执行细胞坏死的机制还存在很大的争议。Chen<sup>[4]</sup>等人认为，MLKL 被激活后会发生四聚化并转移至细胞膜，引起钠离子大量内流、细胞渗透压增高，细胞大量吸水，直至最后细胞膜膨胀破裂。Cai 等人<sup>[5]</sup>认为，MLKL 被激活之后会与细胞膜上的钙离子通道蛋白 TRPM7 相互作用，引起钙离子的大量内流，导致细胞坏死现象的发生。Wang 等人<sup>[6]</sup>也认为 MLKL 的多聚化和在细胞膜上的定位对细胞坏死是必须的，但是具体机制是被激活的 MLKL 与磷脂酰肌醇脂质和双磷脂酰甘油相互结合并转移到细胞膜上，该复合物可以直接破坏细胞膜的结构，最终导致细胞膜破裂。

### 1.1.3 细胞坏死的生理意义

细胞坏死在很多病理过程中都有很重要的作用，如缺血再灌注损伤、器官移植的免疫排斥、动脉粥样硬化等。此外，细胞坏死也被认为是一种抵御肿瘤形成的屏障，因为一些化疗药物可以通过诱导不能发生细胞凋亡的细胞发生细胞坏死而达到杀死癌细胞的效果。然而，G.B Koo 等人研究发现，很多肿瘤细胞中 RIP3 常常呈现低表达状态，导致细胞坏死无法发生，从而抵御化疗药物的杀伤作用。

但是通过表观遗传的手段提高肿瘤细胞中 RIP3 的表达量，可以提高细胞对坏死的敏感性，从而提升化疗药物的治疗效果<sup>[7]</sup>。

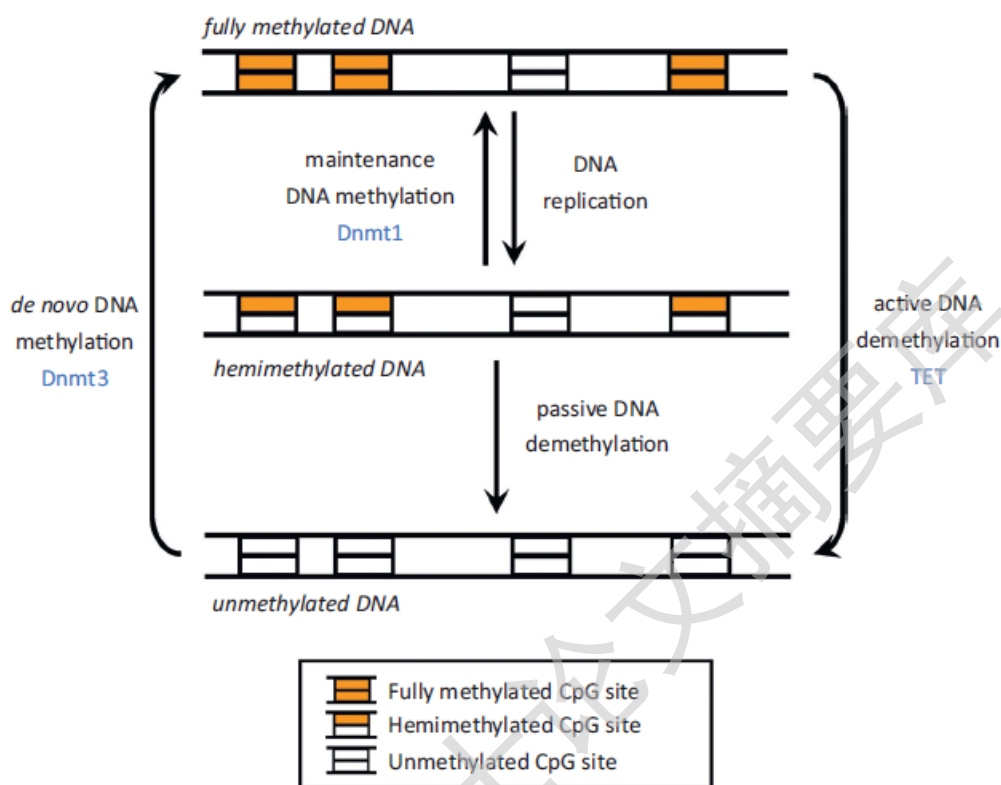
## 1.2 DNA 甲基化概述

DNA 甲基化是一种重要的表观遗传修饰方式，涉及碱基的共价修饰，但并不改变碱基之间的配对方式和 DNA 所携带的遗传信息。但 DNA 甲基化可以通过修饰碱基而改变 DNA 的功能，如：影响 DNA 与转录因子等蛋白的结合能力，因此 DNA 甲基化有调节基因表达水平的功能。

真核生物的 DNA 甲基化修饰形式有且只有 5-甲基胞嘧啶（5-meC）一种，主要发生在位于基因 5'端的 CpG 岛上，该区通常有 1~2kbp 大小，序列富含 GC，且有大量的 5'-CpG-3'二核苷基序。CpG 岛的位置决定了 DNA 甲基化的发生会抑制 5'端启动子的功能，当位于启动子附近的 CpG 岛发生甲基化的时候，会通过抑制特定的转录因子的结合或募集甲基化的 DNA 结合蛋白等途径起到抑制相关基因转录和表达的功能。

真核细胞内主要负责 DNA 甲基化的酶是 DNA 甲基转移酶（DNA methyltransferase, DNMT）家族蛋白，包括：DNMT1, DNMT3a, DNMT3b。其中 DNMT1 主要负责维持 DNA 链上的甲基化状态，将复制产生的未甲基化的 DNA 子链上加上甲基。DNMT3 家族主要负责产生新的甲基化位点。除了形成和维持 DNA 甲基化之外，真核细胞中也会发生 DNA 的去甲基化，去甲基化功能主要由双加氧酶 TET 家族的蛋白（ten eleven translocation dioxygenases, TET）负责调控<sup>[8]</sup>。真核细胞内 DNA 甲基化和去甲基化的示意图见图 1.2.1。

图 1.2.1 DNA 甲基化和去甲基化示意图



(Jeltsch A, New concepts in DNA methylation, 2014)

DNA 的甲基化是细胞中的一种重要的表观遗传调节方式，因为 DNA 甲基化的异常会导致细胞内多种基因的表达沉默，最终造成各种疾病的发生。而抑制 DNMT1 的活性会使细胞中的一些由于 DNA 高甲基化导致表达沉默的抑癌基因重新表达，因此很多 DNMT 的抑制剂作为抗癌药物的潜能也正在被开发。

### 1.2.1 DNMT1

DNMT1 主要负责维持细胞内的甲基化水平，在未甲基化的子链上维持原有的甲基化位点。维持性的甲基化作用（maintenance of genomic methylation）在反转录转座子的转录沉默、X 染色体的失活等过程中都有很重要的作用。

甲基转移酶 DNMT1 由 RFD 结构域(replication foci-targeting domain)、CXXC 结构域、BAH 结构域 (bromo-adjacent homology) 和 C 端具有甲基转移活性的结构域 (Methyltransferase domain) 组成 (图 1.2.2)。在 2011 年，Jikui Song 等人分析了 DNMT1 的蛋白结构，研究发现 DNMT1 的 CXXC 结构域可以和未发生甲基化的 CpG 二核苷基序结合，且 BAH2 结构域会形成环状结构和 TRD 结构



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.

厦门大学博硕士学位论文摘要库