

厦门大学硕士学位论文

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21720081152605

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

Tip60蛋白多克隆抗体制备与鉴定

Preparation and Characterization of Tip60 Polyclonal Antibody

张巍

指导教师姓名: 张四清 教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2011年5月

论文答辩时间: 2011年6月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2011 年 5 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(肿瘤分子细胞生物学)课题(组)的研究成果,获得(张四清 教授)课题(组)经费或实验室的资助,在(肿瘤分子细胞生物学)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

目 录

摘 要.....	III
Abstract.....	IV
1. 前 言.....	1
1.1 DNA损伤反应.....	1
1.2 肿瘤抑制因子P53.....	5
1.3 乙酰转移酶Tip60.....	9
2. 材料与amp;方法.....	15
2.1 实验材料.....	15
2.2 实验仪器.....	18
2.3 实验方法.....	19
3. 结果与分析.....	27
3.1 GST-Tip60蛋白的表达和纯化.....	27
3.2 Tip60抗体的纯化和检测.....	29
4. 讨论.....	32
5. 参考文献.....	33

Table of Contents

Abstract in Chinese	III
Abstract in English.....	IV
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 DNA Damage Response.....	1
1.2 P53.....	5
1.3 Tip60	9
2. MATERIALS AND METHODS	15
2.1 Materials.....	15
2.2 Equipments	18
2.3 Methods	19
3. RESULTS	27
3.1 Expression and purification of GST-Tip60 protein.....	27
3.2 Purification and characterization of Tip60 antibody	29
4. DISCUSSION	32
5. REFERENCES.....	33

摘要

Tip60 (Tat interactive protein, 60kD) 是重要的乙酰转移酶, 在细胞周期阻滞、细胞凋亡、DNA损伤修复过程中都不可或缺, 在肿瘤发生中起到关键作用。当细胞发生DNA损伤时, Tip60参与DNA损伤的感受、信号转导和修复的过程。

DNA损伤对细胞及机体会造成程度不同的破坏和损害。因而细胞内存在一个复杂的信号网络来感知DNA损伤, 以便进行修复, 在损伤无法修复时使细胞发生周期阻滞, 细胞凋亡或细胞衰老等生物学反应。研究发现P53蛋白居于这个网络中的关键位置, 它被DNA损伤信号通路中的一系列激酶磷酸化而活化, 转录下游靶基因, 从而决定细胞的存亡。

P53是一个转录因子, 是细胞生长过程中主要的调控因子, 在保持细胞基因组的完整性, 抑制恶性肿瘤增殖中起到至关重要的作用。当细胞遭受不同程度的损伤时, P53选择性地转录激活调控细胞周期的基因或促凋亡基因, 使细胞周期暂停, 允许细胞进行自我修复; 或当损伤无法被修复时启动细胞程序性死亡, 从而阻止有恶性肿瘤倾向的突变细胞的生成。

P53可被磷酸化、泛素化和乙酰化修饰, 以影响其稳定性。而Tip60就可以通过对P53进行乙酰化修饰, 或者独立于P53, 参与细胞DNA损伤网络的调控。为了更好的研究Tip60的生物学功能, 我表达了GST-Tip60融合蛋白, 并用其免疫新西兰家兔, 收集血清。然后我将抗血清进行了纯化和浓缩, 最终获得了较高纯度与浓度的Tip60多克隆抗体。这将帮助我们实验室对Tip60蛋白在DNA损伤中的功能进行进一步的研究, 完善我们对肿瘤发生的理论认识, 为深入研究癌症发生机理提供研究基础。

关键词: Tip60; P53; 多克隆抗体

Abstract

Tip60 (Tat intercalative protein, 60kD) is a HAT enzyme. It plays an important role in cell cycle regulation, DNA damage response and apoptotic cell death.

DNA damage is harmful to cell and organ. There is a complex signaling network (the DNA damage response network) which coordinates cell responses to the DNA damage, resulting in cell cycle arrest, apoptosis, and senescence. P53 plays a key role in this network. P53 can be phosphorylated by a series of protein kinases that start with DNA damage response and can transactivate its downstream target genes, thus controlling the destiny of cells.

P53 is a transcription factor. It is a key regulator in the process of cell growth, playing an important role in maintaining the fidelity of the genome. When DNA damage occurs to different extent, P53 selectively transactivates genes, participates in cell cycle arrest, apoptosis, and other cellular reactions. Then it results in the cell cycle arrest in G1 phase to allow self-repair, or leads to the programmed cell death to inhibit the formation of mutated cells with the tumorigenesis tendency.

Tip60 can regulate the DNA damage response network by P53-dependent or P53-independent ways. To further study the biological function of Tip60, we expressed the GST-Tip60 fusion protein, and use it as the antigen to immune the New Zealand rabbit, and then we collected the antiserum for purification. We characterize the anti-Tip60 serum with western blotting and immunoprecipitation techniques. That will help us further our research on the function of Tip60 protein.

Key words: Tip60; P53; polyclonal antibody

1. 前言

1.1 DNA损伤反应

机体存在于自然环境中，时常会受到DNA损伤刺激，例如阳光中的紫外线就会对裸露的皮肤细胞造成DNA损伤。因此机体细胞必须具备感知DNA损伤，阻滞细胞周期直至细胞完成损伤修复，并且通过诱导凋亡消除无法完成修复的细胞的能力。

1.1.1 对DNA损伤的感知

机体进化出一套完备而有效的系统来感知各种各样的DNA损伤刺激。这些刺激包括细胞内源的损伤如水解(hydrolysis)，氧化作用(oxidation)，烷基化作用(alkylation)和DNA碱基错配等，以及各种外源的损伤如离子照射(ionizing radiation)，紫外线照射(ultraviolet radiation)，及各种化学刺激^[1]。在DNA损伤信号通路的起点，ATM(ataxia-telangiectasia, mutated)和ATR(ATM and Rad3-related)^[2]是感知损伤刺激的两个很重要的蛋白激酶。

激酶ATM主要调节DNA双链损伤(Double Strand Breaks, DSBs)，而激酶ATR除参与DSBs的调节之外，同样也参与紫外照射损伤和复制叉阻滞的应答^[2]。当检测到DNA发生双链断裂的时候，一个调节蛋白复合体MRE11/RAD50/NBS1(MRN)迅速与损伤的DNA结合，并且结合ATM，促进处于二聚体状态无活性的ATM解离成为单体，并发生自磷酸化^[1,3]。同时MRN也可以为ATM所活化，传递损伤信号^[4,5]。此外，组蛋白乙酰转移酶TIP60，PP5磷酸酶和Forkhead转录因子家族蛋白FOXO3a也被证明与ATM的活化有关^[6,7]。

ATR主要感知由紫外辐射和一切能造成DNA复制叉阻滞的化学药物诱导的DNA损伤，在识别损伤的过程中，含有单链DNA被认为是必需的条件^[8,9]。在正常的细胞周期中，ATR也起着重要的作用。ATR通常与它的调节蛋白ATRIP相互结合。在DNA复制过程中，当DNA聚合酶停止作用时，MCM(Minichromosome Maintenance Protein)复制解旋酶(Replicative Helicase)仍然继续解旋双螺旋DNA，形

成裸露的DNA单链^[10]，单链DNA很快被复制蛋白A(Replication Protein A, RPA)结合^[11]。ATR-ATRIP复合体可以迅速与DNA单链上的RPA结合，同时结合的还有TopBP1^[12]，Rad17 clamp loader以及PCNA-related 911复合体(Rad9-Rad1-Hus1)。继而ATR磷酸化下游的Rad17，911复合体以及TopBP1，从而活化下游信号通路。Rad17，911复合体以及TopBP1同时也能调节ATR的活性^[13]。

感知DNA损伤而活化的ATM及ATR，通过磷酸化它们的底物将损伤信号传递放大，引起周期阻滞，损伤修复或细胞凋亡等生理过程^[8]。

1.1.2 DNA损伤后的可能引起的周期阻滞和损伤修复

为了完成损伤的修复以重新回归正常的细胞周期并继续存活，受到DNA损伤的细胞会暂停正在进行的细胞周期^[1]。激酶ATM和ATR的底物Chk1和Chk2是调控DNA损伤引起的细胞周期阻滞的主要调节因子^[2]。ATM磷酸化Chk2，磷酸化的Chk2和ATM共同稳定并活化P53^[14]，而P53转录下游靶基因p21，引起G1/S期阻断。Chk1则被ATR活化，然后通过磷酸化下游底物Cdc25和Cdk1调节细胞周期G1/S阻滞和G2/M阻滞^[15-17]。

DNA损伤修复大概可以分为六种：DNA损伤的直接逆转，核苷酸剪切修复，碱基剪切修复，错配修复，非同源末端连接和同源末端重组^[1]。发生周期阻滞的细胞，需要在DNA损伤得到修复之后才能回到正常的细胞周期，重新启动细胞分裂进程，完成整个分裂周期。经过修复，基因组恢复完整性，细胞周期阻滞解除，细胞可以继续生长完成整个分裂周期。

1.1.3 DNA损伤引起的细胞凋亡

如果DNA损伤持续发生，以致细胞不能完成自身修复的时候，机体会将这类细胞清除。这个过程通常是通过细胞凋亡完成的。持续的DNA双链损伤会引起细胞内P53积聚，这时候P53下游凋亡相关基因的表达会被活化，如Bcl-2家族促凋亡蛋白Puma，Noxa，Bax以及外部凋亡途径相关的蛋白FAS^[18]，活化的凋亡相关基因启动细胞凋亡程序。

虽然依赖P53的途径非常重要,但是当细胞没有可活化的P53时,仍然可以通过其它的通路来诱导细胞凋亡。紫外照射以及顺铂(cisplatin)等DNA损伤刺激可以活化蛋白激酶JNK和p38途径:顺铂引起JNK和p38长时间的活化,通过AP-1诱导FAS ligand的表达,引导细胞凋亡^[19];紫外线照射引起的活化的JNK则通过c-jun诱导FAS ligand表达,引起凋亡^[20]。Etoposide或camptotghecin造成的DNA损伤中,转录因子E2F可以得到活化,E2F可以诱导p73的表达^[21]。P73通过诱导转录相关凋亡蛋白Puma, Noxa以及Bax促进细胞凋亡^[22]。E2F的另一个转录底物FOXO3a也对有凋亡调节的功能^[23],FOXO3a可以被离子照射所活化,它转录的靶蛋白Bim, Puma, FAS ligand等是线粒体细胞凋亡途径及死亡受体细胞凋亡途径的重要调节蛋白^[24,25]。除此之外,E2F本身也可以转录Noxa及Puma以促进凋亡的发生^[26]。

1.1.4 细胞凋亡的分子机制

细胞凋亡是一个复杂调控的基因程序,由一系列的精确控制的基因表达程序和信号转导通路所组成。细胞凋亡的分子机制首先在线虫中得到研究。起初在线虫发育过程中发生的细胞凋亡中,人们发现Ced-3和Ced-4是两个不可缺少的基因^[28],随后又发现另一个凋亡相关的基因Ced-9,Ced-9通过抑制Ced-4活性来抑制细胞凋亡^[29]保护细胞,而Egl-1则感知凋亡信号,抑制Ced-9从而活化Ced-4以及Ced-3使细胞走向凋亡^[30](图1-1)。后来人们在哺乳动物细胞中发现了许多凋亡相关的蛋白家族,其中很多都可以在线虫的凋亡相关基因中找到同源祖先。哺乳动物Bcl-2家族的很多成员是线虫Egl-1以及Ced-9的同源物,哺乳动物细胞中的Apaf-1相当于线虫的Ced-4而哺乳动物细胞中的Caspase家族则是线虫中Ced-3的同源物。

在哺乳动物细胞中,细胞凋亡是一个更加复杂精确的过程,可以分为外部凋亡途径(死亡受体途径)和内部凋亡途径(线粒体细胞凋亡途径)两种(图1-1)。外部凋亡途径主要通过细胞外部来源的死亡信号分子如TNF和FAS ligand与细胞膜上的死亡受体如TNFR和FAS结合将胞外的信号传递到胞内,活化下游Caspases,引发细胞凋亡,因此又称作死亡受体途径,该凋亡信号途径的主要功

能在于维持组织稳态，尤其在维持免疫系统稳态中发挥作用^[31]。内部细胞

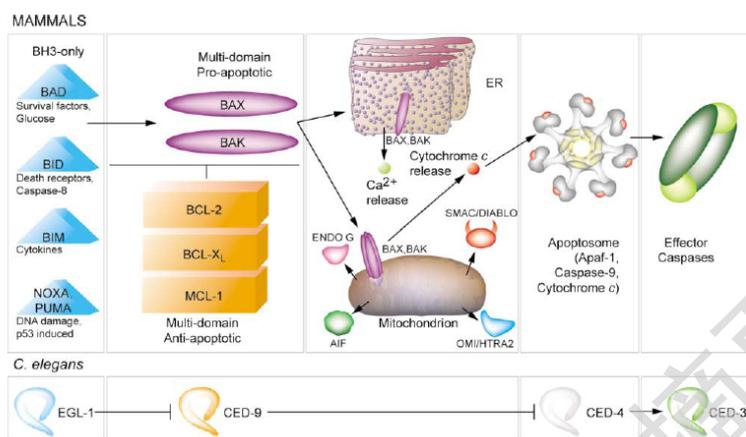


Figure 1. Intrinsic Apoptotic Pathway
See text for details.

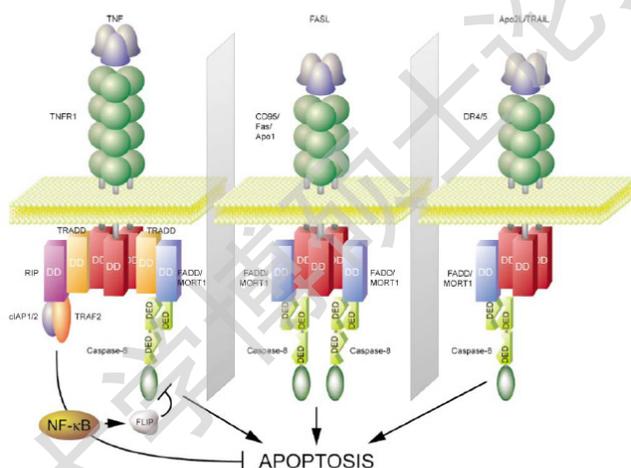


Figure 4. Extrinsic Death Receptor Pathways
The distinct composition of the Death-Inducing Signaling Complex (DISC) downstream of the various death receptors TNFR1, CD95, and DR4/5 is illustrated.

图1-1 细胞凋亡的内部途径和外部途径

Fig. 1-1 The intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis

注：本图引自Nika N. Danial and Stanley J. Korsmeyer, 2004

凋亡通路主要是由一些毒性因素如DNA损伤刺激，细胞氧化胁迫等造成的细胞压力所引发，通过细胞内的信号转导引起线粒体外膜通透性改变，进而活化 Caspases，引发不可逆转的细胞凋亡^[32]。在线粒体细胞凋亡途径中，Bcl-2家族感知凋亡信号，调节线粒体外膜通透性，线粒体膜间物质如细胞色素C，Apaf-1等释放到胞浆中，与Caspase-9结合形成凋亡复合体（apoptosome），在这一过程中

Caspase-9得到活化, 并进一步活化下游的Caspase-3等细胞凋亡的執行者, 切割细胞中的关键蛋白底物, 最终引发细胞核内遗传物质的解体和细胞的凋亡^[33]。在某些情况下, 死亡受体途径激活的Caspase-8可以切割Bcl-2家族BH3-only促凋亡蛋白Bid, tBid通过结合并活化促凋亡蛋白Bax/Bak引发线粒体膜间的凋亡因子外泄, 造成外部凋亡途径和内部凋亡途径的相互交联与合作^[34]。

1.1.5 细胞凋亡和肿瘤发生

细胞凋亡程序的失调同恶性肿瘤的发生有千丝万缕的联系。肿瘤发生的一个重要步骤就是细胞凋亡相关基因发生突变使得肿瘤细胞具备了逃避凋亡的能力^[42]。细胞膜上的死亡受体减少或突变是肿瘤细胞逃避凋亡的策略之一。这种突变会降低肿瘤细胞对外部凋亡途径的敏感性, 逃避NK细胞及T细胞对癌变细胞的消除作用^[40,43]。有些化疗药物就是通过诱导表达FAS ligand, FAS或其它TNF家族的配体及受体, 活化死亡受体细胞凋亡途径, 诱导肿瘤细胞凋亡从而达到抑制并消除肿瘤细胞的目的^[44]。

肿瘤抑制因子P53在大约一半的人类肿瘤中都发生了缺失或者突变, 而且P53突变往往会造成肿瘤的恶化发展及产生抗药性^[45]。作为一个重要的肿瘤抑制因子, P53应答于DNA损伤, 原癌基因活化等细胞压力, 启动DNA损伤修复, 细胞周期阻滞以及细胞凋亡等生理过程。作为一个转录因子, P53的靶基因包括Bcl-2家族促凋亡基因^[46]。因此P53功能的缺失很大程度上削弱了机体消除受损细胞的能力, 成为肿瘤发生和恶化发展的诱因。

1.2 肿瘤抑制因子P53

1.2.1 简介

P53蛋白是一种转录因子, 可以与DNA上的特异序列结合, 促进相应基因的转录及蛋白的表达, 是细胞生长过程中主要的调控因子。它在维持细胞正常生长, 抑制恶性肿瘤增殖方面起到至关重要的作用, 是一个被广泛深入研究的肿瘤抑制

蛋白。

1.2.2 P53的蛋白结构

p53基因位于人类17号染色体短臂上，包含11个外显子，转录翻译的野生型P53蛋白由393个氨基酸组成，蛋白分子量为53kD。P53蛋白结构的复杂性暗示了其功能上的复杂性。有活性的P53蛋白在体内以四聚体形式存在。两个P53蛋白可以利用单体间的反向 β -折叠和反向 α -螺旋间的相互作用形成二聚体，两个二聚体借助平行的螺旋-螺旋接触面形成四聚体。P53蛋白寡聚化是其具备转录活性所必需，并参与P53在细胞内的定位过程。

P53由氨基端的转录激活结构域（transactivating domain, TAD），一个脯氨酸富集结构域（proline-rich domain, PRD），一个大的DNA结合结构域（DNA-binding domain, DBD），一个四聚体化结构域（tetramerization domain, 4D）和一个碱性的羧基端结构域（C-terminal domain, CTD）。

1.2.3 P53的功能

人们在50%的人类癌症中发现编码肿瘤抑制因子P53蛋白的TP53基因的缺失或突变。P53基因敲除小鼠能正常发育，但是却明显的易发肿瘤^[59, 60]。P53被我们研究的最多的功能是防止肿瘤的发生，但与同家族的另外两个蛋白P63和P73相似，P53在发育上也具有一定的功能。P53在发育初期会通过淘汰包含错误遗传信息的细胞来负责监督基因组信息的保真性^[61-63]。P53在几种恶性胁迫信号的刺激下被激活，从而抑制肿瘤细胞的生长。细胞周期阻滞，衰老，分化，凋亡等反应都可以由P53引发，具体选择哪种途径则决定于细胞内外的多种因素。此外，P53也参与了对基因损伤的修复，它能使修复的细胞重新进入增殖的状态。

在细胞遭受严重，不可修复的损伤情况下，P53通过大量转录促凋亡基因如FAS, BAX, BBC3, BIRC5等促使细胞进行凋亡或衰老，使细胞生命完结。外部的损伤信号传导到P53蛋白，通过P53的转录因子功能使P53蛋白和DNA中的P53响应元件（P53 response element, P53RE）结合以启动相应的转录程序。P53作为转录因子在细胞内是无法稳定存在的，受到MDM2等E3连接酶的作用，通常保持一个较低的水平。然而，DNA损伤的产生能有效地稳定P53的蛋白水平。当细胞

遭受到有限的DNA损伤后，P53蛋白水平稳定上升，并且被DNA损伤诱导激活的一系列激酶如ATM,ATR等磷酸化，成为活化形式，导致其特异性地转录激活抑制细胞生长的基因，如p21CIP/WAF1，行使其细胞检验点（checkpoint）的功能，调控细胞于G1及G2期发生周期静止，并参与DNA修复。当受损的DNA修复后，细胞内P53水平下降，p21CIP/WAF1也下降，允许细胞进入S期，进行正常分裂。

1.2.4 调控P53的方式

P53可以被多种刺激类型激活，包括DNA损伤，氧化胁迫，渗透压胁迫，核糖核酸缺乏和失控的癌基因表达等等。细胞也可以通过不同的信号通路感知这些刺激信号并最终通过各种方式传导到P53。P53的激活主要通过两类方式，其一是通过延长P53的半衰期以提高细胞内P53的蛋白水平；另一方面，通过各种翻译后修饰以改变P53的构象。已经发现在P53蛋白全序列上有超过36个不同的氨基酸位点能进行各种翻译后修饰，翻译后修饰在P53蛋白的稳定和激活上起着至关重要的作用。其中磷酸化，乙酰化，泛素化是最重要的三种方式。

磷酸化

人源的P53有23个磷酸化/去磷酸化位点。因此通过磷酸化/去磷酸化对P53功能的调控可能是通过许多位点的共同作用。在DNA损伤的情况下，DNA损伤反应通路中的激酶会磷酸化P53的15和20位丝氨酸。这两个基团处于TAD结构域附近，是最重要的P53泛素化连接酶MDM2（mice double-deleted mutant）的重要结合位置^[47]。此外，18位苏氨酸的磷酸化能改变与MDM2相互作用的 α 螺旋的构象，而在脯氨酸富集结构域（PRD）对苏氨酸-脯氨酸序列的磷酸化也会导致脯氨酰异构酶（prolyl isomerase）PIN1引导在PRD的脯氨酰正反异构^[48]。这些修饰和相伴的构象改变被认为能降低MDM2对P53的亲合力（affinity）以及增加P53与转录共激活因子如组蛋白乙酰转移酶p300和CBP的联系^[49]。此外，33位，37位，46位丝氨酸和55位，81位苏氨酸的磷酸化被认为与稳定P53并促进P53的转录活性以使其调控细胞周期阻滞和细胞凋亡相关。149位丝氨酸，150位和155位的苏氨酸的磷酸化被认为与促进P53降解相关。351位丝氨酸的磷酸化也认为可以

激活 P53来调控凋亡和细胞周期。376位和378位丝氨酸在非胁迫状态下就处于磷酸化状态，而离子辐射会导致其去磷酸化。392位丝氨酸的磷酸化则被认为能序列特异性的促进P53和DNA的结合^[50]。

泛素化和类泛素化

P53 是个半衰期只有6分钟到0.5小时的极不稳定的蛋白。MDM2, Arf-BP1, COP1和Pirh2 都被认为能直接介导P53 的多聚泛素化 (polyubiquitination) 并导致P53蛋白的降解^[47]。对P53的单泛素化 (monoubiquitination) 则会导致P53 转移出核。HAUSP 则可以对P53去泛素化并通过MDM2和MDMX去泛素化来调控P53^[55]。P53被 PIAS类泛素(SUMO)化修饰导致对P53功能的影响还不清楚^[56]。FBXO11对P53的neddylation修饰被认为能抑制P53的转录活性^[57]。需要注意的是，泛素化和乙酰化对P53的修饰是互相排斥的，对这两种修饰的竞争影响了P53蛋白总体的稳定性。Tang^[58]等人最新的研究还发现P53蛋白上8个不同位点的乙酰化能阻止P53与MDM2的结合。因此乙酰化和磷酸化一样，对P53蛋白修饰的最终结果都是增强P53的蛋白稳定性。

乙酰化

除了磷酸化，人们对P53上的赖氨酸基团的乙酰化也进行了深入研究，P53也是第一个发现能被乙酰化修饰的非组蛋白蛋白。P53羧基端的六个赖氨酸基团 (K370, K372, K373, K381, K382 和 K386) 的磷酸化水平会显著地随着胁迫而增强，与P53地稳定化和活化相呼应^[51]。120位赖氨酸在DNA受损时会被组蛋白乙酰转移酶 Tip60和hMOF乙酰化，以使得P53能够通过Bcl-2家族成员 BAX和PUMA来引起凋亡^[52,53]。组蛋白乙酰转移酶CBP/300对P53赖氨酸残基373和382位乙酰化，同时P53能迅速募集其他共转录因子，转录激活P53靶基因。当结合到基因启动子区域时，CBP/300能乙酰化靶基因附近的组蛋白，构建合适转录的DNA构象，并能帮助转录因子与RNA聚合酶II的结合，增强转录激活的功能。PCAF (P300/CBP associated factor) 能乙酰化P53蛋白赖氨酸残基320位，影响P53和DNA结合能力与其转录活性^[54]。

1.3 乙酰转移酶Tip60

1.3.1 Tip60简介

Tip60 (Tat interactive protein, 60kD) 是Kamine等1996年通过酵母双杂交系统发现的, 与HIV病毒相互作用的蛋白^[64]。Tip60有三种不同的异构体, 即异构体1 (Tip60 β), 异构体2 (Tip60 α), 异构体3 (Tip60 γ)^[65-67]。其中Tip60异构体2 (Tip60 α) 被研究的最多也最细致的, 本文和大多数文献所指的Tip60也就是这个异构体。Tip60是MYST家族 (MOZ, Ybf/Sas3, Sas2和Tip60) 的乙酰化转移酶, 与人体许多病理过程密切相关。其主要功能集中于转录调控和DNA损伤反应的应答上。在对参与肿瘤发生, 细胞凋亡, 基因转录调控, DNA损伤反应等过程的关键蛋白P53的研究中发现, Tip60蛋白在P53蛋白的稳定性调节中非常重要。并且研究发现Tip60不但可以通过调控P53发挥作用, 也可以脱离P53独立发挥作用参与细胞凋亡, 肿瘤发生等过程的调控。

1.3.2 Tip60的结构

如图1-2所示, Tip60含有一个N端的染色质结构域 (chromodomain), 和一个C端的MYST结构域。MYST结构域是乙酰化转移酶的催化区域, 包含一小段HAT功能域, 负责和乙酰辅酶A和底物结合。MYST结构域还包含一个Cys-Cys-His-Cys的锌指结构, 其功能与蛋白质间相互作用相关。Tip60在羧基末端还有一个短的核受体相互作用区 (Nuclear Receptor (NR) -interaction box)^[68]。

正常情况下, Tip60在细胞内存在于至少有18个亚基组成的稳定的核蛋白复合物中, 他们承担着Tip60的转录调节功能和DNA损伤的应答。TRRAP和p400/Domino是两个受到比较多关注的中心组分。



图1-2 人源Tip60的蛋白结构
Fig.1-2 Structure of human Tip60 protein

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 for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库