

学校编码: 10384
学号: 21620060153322

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学
博 士 学 位 论 文

***Fused*小鼠自然突变体 Axin^{Fu-NT}影响野生型
Axin 功能的分子机理**

**The Molecular Mechanisms that Axin^{Fu-NT} Encoded by
Axin^{Fu} Allele Affects on Function of Wildtype Axin**

卢再恋

指导教师姓名: 林圣彩 教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2009 年 月 日

论文答辩日期: 2009 年 月 日

学位授予时间: 2009 年 月 日

答辩委员会主席: 王志新 院士
评 阅 人:

2009 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

| | |
|---|----|
| 中文目录 | I |
| 英文目录 | V |
| 中文摘要 | 1 |
| 英文摘要 | 3 |
| 第一章 前 言 | 5 |
| 1.1 Axin 的研究进展 | 5 |
| 1.1.1 引言 | 5 |
| 1.1.2 Axin 生物学特性 | 5 |
| 1.1.3 Axin ^{Fu} 小鼠的研究进展 | 5 |
| 1.1.4 Axin 在信号转导通路中的作用 | 8 |
| 1.1.4.1 Axin 在 Wnt 信号通路中的作用 | 8 |
| 1.1.4.2 Axin 在 JNK 信号通路中的作用 | 15 |
| 1.1.4.3 Axin 在 JNK 信号通路和 Wnt 信号通路之间转换调节 | 19 |
| 1.1.4.4 Axin 对 p53 的调节 | 19 |
| 1.1.4.5 Axin 对 TGF- β 信号通路的调节 | 22 |
| 1.1.4.6 Axin 在其他信号通路中的作用 | 24 |
| 1.1.6 结语 | 24 |
| 1.2. Wnt 信号通路的研究进展 | 24 |
| 1.2.1 引言 | 24 |
| 1.2.2 Wnt 基因家族 | 25 |
| 1.2.3 Wnt 信号的转导 | 26 |
| 1.2.4 Wnt 信号通路的生物学功能 | 27 |
| 1.2.4.1 Wnt 信号通路在胚胎发育中的作用 | 27 |
| 1.2.4.2 Wnt 信号通路在生殖系统发育中的作用 | 28 |
| 1.2.4.3 Wnt 信号通路在组织更新中的作用 | 29 |
| 1.2.4.4 Wnt 信号通路在肿瘤发生中的作用 | 29 |
| 1.2.5 结语 | 30 |
| 1.3. JNK 信号通路 | 31 |
| 1.3.1 引言 | 31 |
| 1.3.2 JNK 基因 | 31 |
| 1.3.3 JNK 的信号转导 | 31 |
| 1.3.4 JNK 信号通路的作用 | 32 |
| 1.3.4.1 JNK 信号通路在细胞凋亡中的作用 | 32 |
| 1.3.4.2 JNK 信号通路在抗凋亡中的作用 | 33 |
| 1.3.4.3 JNK 在肿瘤发生中的作用 | 34 |
| 1.3.4.4 JNK 信号通路在胚胎形态发生中的作用 | 35 |
| 1.3.5 结语 | 36 |
| 1.4 p53 信号通路 | 36 |
| 1.4.1 引言 | 36 |

| | |
|--|-----------|
| 1.4.2 p53 基因 | 36 |
| 1.4.3 p53 的生物学功能 | 38 |
| 1.4.3.1 p53 对细胞周期的调节 | 38 |
| 1.4.3.2 p53 与细胞凋亡的关系 | 39 |
| 1.4.3.3 p53 与肿瘤的关系 | 40 |
| 1.4.4 结语 | 41 |
| 第二章 材料和方法 | 42 |
| 2.1 常用的药品和试剂 | 42 |
| 2.2 DNA 相关实验方法 | 42 |
| 2.2.1 质粒载体 | 42 |
| 2.2.1.1 pBluescript SK(-) | 42 |
| 2.2.1.2 pCMV5 | 43 |
| 2.2.1.3 pGEX | 43 |
| 2.2.2 大肠杆菌感受态细胞的制备 | 44 |
| 2.2.3 DNA 转化 | 44 |
| 2.2.4 质粒 DNA 的提取 | 45 |
| 2.2.4.1 小规模质粒 DNA 的提取(STET 煮沸法) | 45 |
| 2.2.4.2 中等规模质粒 DNA 的提取 | 45 |
| 2.2.4.3 大规模质粒 DNA 的提取 | 46 |
| 2.2.5 质粒 DNA 的工具酶处理 | 47 |
| 2.2.5.1 DNA 的限制性内切酶消化 | 47 |
| 2.2.5.2 线性 DNA 末端平滑化 | 47 |
| 2.2.5.3 线性 DNA 5' 端磷酸化 | 47 |
| 2.2.5.4 线性 DNA 5' 端磷酸基团的去除 | 47 |
| 2.2.6 DNA 片段的纯化 | 48 |
| 2.2.6.1 琼脂糖电泳分离 DNA | 48 |
| 2.2.6.2 DNA 的回收 | 48 |
| 2.2.7 DNA 连接反应 | 49 |
| 2.2.8 PCR 反应 | 49 |
| 2.2.9 哺乳动物细胞表达载体的构建 | 49 |
| 2.2.9.1 Axin ^{Fu-NT} 和 Axin ^{Fu-CT} 表达载体的构建 | 49 |
| 2.2.9.2 Axin 全长及缺失突变体表达质粒的构建 | 50 |
| 2.2.9.3 APC、 β -catenin、Wnt-1、GSK-3 β 、CKI α 、MEKK1-CT、MEKK4-CT 和 FLAG-JNK 的表达载体的构建 | 50 |
| 2.2.10 细菌表达质粒的构建 | 50 |
| 2.2.10.1 GST-AxinNT400 细菌表达质粒的构建 | 50 |
| 2.2.10.2 GST-C2b 和 GST-CT36 细菌表达质粒的构建 | 51 |
| 2.3 细胞培养及转染 | 51 |
| 2.3.1 细胞培养 | 51 |
| 2.3.1.1 细胞培养液的配制 | 51 |
| 2.3.1.2 细胞的传代和接种 | 51 |
| 2.3.2 瞬时转染 | 52 |
| 2.4 蛋白质相关实验方法 | 52 |

| | | |
|--------------------|---|-----------|
| 2.4.1 | 免疫沉淀 | 52 |
| 2.4.2 | 蛋白质的 SDS-PAGE 电泳与 Western blotting 分析 | 53 |
| 2.4.3 | 免疫激酶反应实验 | 54 |
| 2.4.4 | 体内泛素化实验 | 55 |
| 2.4.5 | 融合蛋白的纯化和多克隆抗体制备 | 55 |
| 2.4.5.1 | 融合蛋白的表达和纯化 | 55 |
| 2.4.5.2 | 多克隆抗体的制备 | 56 |
| 2.5 | Axin^{Fu} 小鼠的相关实验 | 57 |
| 2.5.1 | Axin ^{Fu} 小鼠基因组 DNA 的提取 | 57 |
| 2.5.2 | Axin ^{Fu} 小鼠基因型的鉴定 | 57 |
| 2.5.3 | Axin ^{Fu} 小鼠大脑提取物的抽提 | 57 |
| 2.5.4 | Axin ^{Fu} 小鼠大脑提取物的免疫沉淀 | 58 |
| 2.5.5 | Axin ^{Fu} 小鼠大脑提取物的 GST pull-down | 58 |
| 2.6 | 斑马鱼的相关实验 | 58 |
| 2.6.1 | 体外合成 mRNA | 58 |
| 2.6.2 | 显微注射 | 59 |
| 2.6.3 | 整胚原位杂交 | 60 |
| 2.6.3.1 | 标记探针 | 60 |
| 2.6.3.2 | 斑马鱼的整胚原位杂交 | 60 |
| 2.7 | 荧光素酶报告基因分析 | 62 |
| 2.8 | Hoechst 核染色计数实验 | 63 |
| 第三章 实验结果与讨论 | | 64 |
| 3.1 | Axin^{Fu} 小鼠体内存在 Axin C 端缺失的突变体 Axin^{Fu-NT} | 64 |
| 3.1.1 | IAP 插入可能出现的 Axin 突变的蛋白产物 | 64 |
| 3.1.2 | Axin 抗体 C2b 和 CT36 的检测 | 65 |
| 3.1.3 | 在 Axin ^{Fu} 小鼠体内存在 Axin ^{Fu-NT} 蛋白 | 66 |
| 3.2 | Axin^{Fu-NT} 能类似于 Axin 下调 Wnt 信号 | 67 |
| 3.2.1 | Axin ^{Fu-NT} 抑制 TOPFLASH 和 LEF-1 的转录活性 | 67 |
| 3.2.2 | Axin ^{Fu-NT} 与 Wnt 信号通路的重要调节因子相互作用 | 68 |
| 3.2.3 | Axin ^{Fu-NT} 抑制母源 β -catenin 靶向基因的表达 | 70 |
| 3.3 | Axin 在近 N 端处存在形成同源二聚体的结构域 | 71 |
| 3.3.1 | Axin ^{Fu-NT} 与 Axin 相互作用 | 71 |
| 3.3.2 | Axin ^{Fu-NT} 能形成同源二聚体 | 72 |
| 3.3.3 | Axin 形成同源二聚体结构域的定位 | 73 |
| 3.3.4 | GST-AxinNT400 融合蛋白 pull-down 野生型 Axin 和 Axin ^{Fu-NT} | 74 |
| 3.4 | Axin^{Fu-NT} 对 Axin 激活 JNK 具有显性负调控作用 | 74 |
| 3.4.1 | Axin ^{Fu-NT} 显性负调控 Axin 诱导的 JNK 活化 | 74 |
| 3.4.2 | Axin ^{Fu-NT} 通过破坏 Axin 形成二聚体抑制 Axin 激活 JNK | 75 |
| 3.4.3 | Axin ^{Fu-NT} 和 MEKK1 相互作用 | 76 |
| 3.4.4 | Axin ^{Fu-NT} 竞争 Axin 与 MEKK1 相结合 | 76 |
| 3.4.5 | Axin ^{Fu-NT} 和 MEKK4 相互作用 | 77 |
| 3.4.6 | Axin ^{Fu-NT} 竞争 Axin 与 MEKK4 相结合 | 78 |
| 3.5 | Axin^{Fu-NT} 能引起腹部化的表型 | 79 |

| | |
|---|-----|
| 3.6 Axin^{Fu-NT}抑制 Axin 上调 p53 第 46 位丝氨酸的磷酸化 | 81 |
| 3.6.1 Axin ^{Fu-NT} 抑制 Axin 激活 p53-luc 的转录活性 | 81 |
| 3.6.2 Axin ^{Fu-NT} 抑制 Axin 增强 p53 第 46 位丝氨酸的磷酸化 | 82 |
| 3.6.3 Axin ^{Fu-NT} 能与 p53 相互作用但不与 HIPK2 相作用 | 82 |
| 3.6.4 Axin ^{Fu-NT} ΔMID 不影响 Axin 增强 p53 Ser46 的磷酸化 | 83 |
| 3.6.5 Axin ^{Fu-NT} 能抑制 Axin 诱导的细胞凋亡 | 84 |
| 3.8 讨论与小结 | 86 |
| 参考文献 | 89 |
| 图表索引 | 108 |
| 缩略语及中英文对照 | 110 |
| 在学期间发表的论文 | 113 |
| 致 谢 | 114 |

TABLE OF CONTENT

| | |
|--|-----------|
| Table of content (In Chinese) | I |
| Table of content (In English)..... | V |
| Abstract (In Chinese)..... | 1 |
| Abstract (In English) | 3 |
| Chapter 1 Introduction | 5 |
| 1.1 Review on Axin | 5 |
| 1.1.1 Introduction | 5 |
| 1.1.2 Characterization of Axin..... | 5 |
| 1.1.3 Review on Axin ^{Fu} mice..... | 5 |
| 1.1.4 Roles of Axin in signaling pathways | 8 |
| 1.1.4.1 Role in Wnt signaling pathway..... | 8 |
| 1.1.4.2 Role in JNK pathway..... | 15 |
| 1.1.4.3 Switch roles between Wnt pathway and JNK pathway | 19 |
| 1.1.4.4 Role in p53 pathway | 19 |
| 1.1.4.5 Role in TGF- β signaling pathway..... | 22 |
| 1.1.4.6 Roles in other pathways..... | 24 |
| 1.1.6 Concluding remark | 24 |
| 1.2. Review on Wnt signaling pathway | 24 |
| 1.2.1 Introduction | 24 |
| 1.2.2 Wnt gene | 25 |
| 1.2.3 Transduction of Wnt signaling..... | 26 |
| 1.2.4 Biological function of Wnt signaling pathway..... | 27 |
| 1.2.4.1 Role in embryonic development | 27 |
| 1.2.4.2 Role in reproductive system..... | 28 |
| 1.2.4.3 Role in tissue regeneration..... | 29 |
| 1.2.4.4 Role in tumor suppression | 29 |
| 1.2.5 Concluding remark | 30 |
| 1.3. Review on JNK pathway | 31 |
| 1.3.1 Introduction | 31 |
| 1.3.2 JNK gene..... | 31 |
| 1.3.3 Transduction of JNK pathway | 31 |
| 1.3.4 Biological function of JNK pathway..... | 32 |
| 1.3.4.1 Role in cell apoptosis | 32 |
| 1.3.4.2 Role in anti-apoptosis | 33 |
| 1.3.4.3 Role in tumor suppression | 34 |
| 1.3.4.4 Role in embryonic development | 35 |
| 1.3.5 Concluding remark | 36 |
| 1.4 Review on p53 | 36 |
| 1.4.1 Introduction | 36 |

| | |
|--|-----------|
| 1.4.2 p53 gene | 36 |
| 1.4.3 Biological function of p53 | 38 |
| 1.4.3.1 Role in cell cycle | 38 |
| 1.4.3.2 Role in cell apoptosis | 39 |
| 1.4.3.3 Role in tumor suppression | 40 |
| 1.4.4 Concluding remark | 41 |
| Chapter 2 Materials and methods | 42 |
| 2.1 Chemicals and reagents | 42 |
| 2.2 Work on DNA | 42 |
| 2.2.1 Vector | 42 |
| 2.2.1.1 pBluescript SK(-) | 42 |
| 2.2.1.2 pCMV5 | 43 |
| 2.2.1.3 pGEX | 43 |
| 2.2.2 Preparation of <i>E.coli</i> competent cell | 44 |
| 2.2.3 DNA transformation | 44 |
| 2.2.4 DNA preparation | 45 |
| 2.2.4.1 Small-scale preparation of plasmid DNA | 45 |
| 2.2.4.2 Medium-scale preparation of plasmid DNA | 45 |
| 2.2.4.3 Large-scale preparation of plasmid DNA | 46 |
| 2.2.5 Enzymatic manipulation of plasmid DNA | 47 |
| 2.2.5.1 Restriction endonuclease digestion of DNA | 47 |
| 2.2.5.2 Generation of blunt ended linear DNA | 47 |
| 2.2.5.3 Phosphorylation of DNA 5' end | 47 |
| 2.2.5.4 Removal of 5' phosphate group from linear DNA | 47 |
| 2.2.6 Purification of DNA fragment | 48 |
| 2.2.6.1 Separation of DNA by electrophoresis in agarose gel | 48 |
| 2.2.6.2 Recovery of DNA | 48 |
| 2.2.7 DNA ligation | 49 |
| 2.2.8 Polymerase chain reaction | 49 |
| 2.2.9 Construction of plasmid expressed in mamalian cells | 49 |
| 2.2.9.1 Full length of Axin ^{Fu-NT} and Axin ^{Fu-CT} | 49 |
| 2.2.9.2 Full length of Axin and deletion mutant | 50 |
| 2.2.9.3 Full length of APC、 β -catenin、Wnt-1、GSK-3 β 、CKI α 、 MEKK1-CT、MEKK4-CT and FLAG-JNK | 50 |
| 2.2.10 Construction of plasmid expressed in bacterial cells | 50 |
| 2.2.10.1 Construction of GST-AxinNT400 | 50 |
| 2.2.10.2 Construction of GST-C2b and GST-CT36 | 51 |
| 2.3 Cell culture and DNA transfection | 51 |
| 2.3.1 Cell culture | 51 |
| 2.3.1.1 Preparation of cell culture medium | 51 |
| 2.3.1.2 Subculture and inoculture | 51 |
| 2.3.2 Transient transfection | 52 |
| 2.4 Protein work | 52 |

| | |
|--|----|
| 2.4.1 Immunoprecipitation | 52 |
| 2.4.2 Electrophoresis of protein in SDS-PAGE gel and Western blotting | 53 |
| 2.4.3 Immuno-kinase assay | 54 |
| 2.4.4 Ubiquitination assay <i>in vivo</i> | 55 |
| 2.4.5 Generation of polyclonal antibodies | 55 |
| 2.4.5.1 Expression and purification of fusion proteins | 55 |
| 2.4.5.2 Preparation of polyclonal antibodies | 56 |
| 2.5 Axin^{Fu} mice work | 57 |
| 2.5.1 Preparation of genomic DNA from Axin ^{Fu} mice | 57 |
| 2.5.2 Identification genotypes of Axin ^{Fu} mice | 57 |
| 2.5.3 Preparation of brain extraction from Axin ^{Fu} mice | 57 |
| 2.5.4 Immunoprecipitation from the Axin ^{Fu} mouse brain extraction | 58 |
| 2.5.5 GST pull-down from the Axin ^{Fu} mouse brain extraction | 58 |
| 2.6 Zebrafish work | 58 |
| 2.6.1 Synthesis mRNA <i>in vitro</i> | 58 |
| 2.6.2 Microinjection | 59 |
| 2.6.3 Whole amount in situ hybridization | 60 |
| 2.6.3.1 Probe label | 60 |
| 2.6.3.2 Whole amount in situ hybridization | 60 |
| 2.7 Transcriptional reporter assay | 62 |
| 2.8 Hoechst calculation | 63 |
| Chapter 3 Results and Discussion | 64 |
| 3.1 Detection of Axin^{Fu-NT} from Axin^{Fu} mice | 64 |
| 3.1.1 Putative Axin mutant protein product(s) resulted from IAP insertion | 64 |
| 3.1.2 Characterization of Axin specific antibodies C2b and CT36 | 65 |
| 3.1.3 Identification of Axin ^{Fu-NT} from Axin ^{Fu} mice | 66 |
| 3.2 Axin^{Fu-NT} effectively down-regulates Wnt signaling as wildtype Axin | 67 |
| 3.2.1 Axin ^{Fu-NT} inhibits transcriptional activities of TOPFLASH and LEF-1 | 67 |
| 3.2.2 Axin ^{Fu-NT} interacts with key regulators in Wnt pathway | 68 |
| 3.2.3 Axin ^{Fu-NT} inhibits expression of target genes of maternal β -catenin | 70 |
| 3.3 Identification new dimerization domains of Axin | 71 |
| 3.3.1 Axin ^{Fu-NT} interacts with Axin | 71 |
| 3.3.2 Axin ^{Fu-NT} forms homodimer | 72 |
| 3.3.3 Identification new domains of Axin to form homodimer | 73 |
| 3.3.4 GST-AxinNT400 fusion protein pull-downs Axin and Axin ^{Fu-NT} | 74 |
| 3.4 Axin^{Fu-NT} exerts dominant negative effect on JNK activation | 74 |
| 3.4.1 Axin ^{Fu-NT} down-regulates Axin-induced JNK activation | 74 |
| 3.4.2 Axin ^{Fu-NT} inhibits JNK activation by disrupting Axin forming homodimer | 75 |
| 3.4.3 Axin ^{Fu-NT} interacts with MEKK1 | 76 |
| 3.4.4 Axin ^{Fu-NT} competes with Axin for MEKK1 binding | 76 |
| 3.4.5 Axin ^{Fu-NT} interacts with MEKK4 | 77 |

| | |
|--|------------|
| 3.4.6 Axin ^{Fu-NT} competes with Axin for MEKK4 binding | 78 |
| 3.5 Axin^{Fu-NT} causes ventrilized phenotype in zebrafish | 79 |
| 3.6 Axin^{Fu-NT} blocks Axin-mediated phosphorylation of p53 at Ser46 | 81 |
| 3.6.1 Axin ^{Fu-NT} inhibits Axin-activated transcriptional activity of p53-luc | 81 |
| 3.6.2 Axin ^{Fu-NT} inhibits Axin-mediated phosphorylation of p53 at Ser46 | 82 |
| 3.6.3 Axin ^{Fu-NT} interacts with p53, but not HIPK2 | 82 |
| 3.6.4 Axin ^{Fu-NT} Δ MID with no affect on Axin-mediated phosphorylation of p53 at Ser46 | 83 |
| 3.6.5 Axin ^{Fu-NT} inhibits Axin-induced cell apoptosis | 84 |
| 3.8 Discussion and conclusion | 86 |
| References | 89 |
| Lists of figures and tables | 108 |
| Abbreviations | 110 |
| Publication | 113 |
| Acknowledgement | 114 |

摘要

Axin是一个多结构域的构架蛋白,它通过与不同蛋白的相互作用调节不同的信号通路,其中包括Axin能通过促进 β -catenin的降解下调Wnt信号;同源二聚化的Axin能通过MEKK1或MEKK4激活JNK磷酸化;Axin也能通过HIPK2激活p53第46位丝氨酸的磷酸化;最近的研究发现Axin还能通过Arkadia增加Smad7的降解增强TGF- β 信号等。Axin通过对不同信号的调节参与调控生物个体发育、抑制肿瘤发生、参与细胞骨架重排等过程。鼠源Axin是由鼠的Fused (Fu) 基因编码;Axin^{Fu}等位基因是由转座子IAP的插入产生的。Axin^{Fu/Fu}小鼠会出现胚胎致死、神经管分叉和不同程度尾巴卷曲等各种表型。目前的研究在Axin^{Fu}小鼠体内检测到了截短的Axin mRNA,但并没有相关突变蛋白的报道。Axin^{Fu}小鼠体内是不是真实存在Axin的突变蛋白,Axin^{Fu}小鼠的表型是不是由于Axin突变的蛋白的存在引起的,如果是,又是通过怎样的途径引起的,这些问题目前还不清楚。本论文通过生物化学和分子生物学的方法,系统地阐明了Axin突变蛋白的存在及其在生物体内的重要功能。本论文首先用免疫沉淀的方法证明Axin^{Fu}小鼠体内确实存在Axin截短的突变体。该突变体只包含Axin第1-596个氨基酸,将其命名为Axin^{Fu-NT}。实验的研究发现Axin^{Fu-NT}能够像野生型Axin一样下调LEF-1和TOPFLASH的转录活性;与Wnt信号的主要调节因子的免疫共沉淀实验显示,Axin^{Fu-NT}能有效形成 β -catenin的降解复合体;通过Axin和Axin^{Fu-NT} mRNA的斑马鱼胚胎注射实验也观察到 β -catenin的靶向基因*boz*和*tbx6*都受到了类似程度的下调。这些说明Axin^{Fu-NT}对Wnt信号的调节与Axin没有明显的差异。本论文在研究过程中还发现Axin^{Fu-NT}不但不能激活JNK(这可能与Axin^{Fu-NT}缺失了Axin的C端有关),还能强烈抑制Axin激活JNK。进一步的研究发现Axin^{Fu-NT}存在形成同源二聚化的结构域,Axin^{Fu-NT}通过该结构域能破坏Axin形成同源二聚体,从而起到抑制Axin激活JNK的作用;而且Axin^{Fu-NT}能竞争Axin与MEKK1或MEKK4结合,这可能是Axin^{Fu-NT}抑制Axin激活JNK的另一分子机制。在斑马鱼体内检测Axin^{Fu-NT}的生物学功能的实验也证明了Axin^{Fu-NT}能抑制 β -catenin和JNK信号,从而获得了腹部化的表型。本论文还检测了Axin^{Fu-NT}对p53磷酸化的影响。实验的研究发现Axin^{Fu-NT}不影响p53-luc的转录活性但能强烈抑制Axin增强的p53-luc的转录活性;p53磷酸化的实验也证明了Axin^{Fu-NT}不能增强p53第46位丝氨酸的磷酸化(这可能

与Axin^{Fu-NT}缺失了HIPK2的结合域有关) 但能强烈抑制Axin促进p53第46位丝氨酸的磷酸化。Axin^{Fu-NT}缺失p53结合区域的突变体Axin^{Fu-NT}ΔMID不干扰Axin促进p53第46位丝氨酸的磷酸化作用。因此, Axin^{Fu-NT}不能与HIPK2相互作用但能竞争Axin与p53结合可能是Axin^{Fu-NT}抑制Axin促进p53第46位丝氨酸的磷酸化作用的分子机制。与此相一致的是, Axin^{Fu-NT}能抑制Axin通过促进p53磷酸化引起的细胞凋亡。总之, Axin^{Fu-NT}影响了Axin在多条信号通路中的重要调节作用, Axin^{Fu}小鼠的表型可能是Axin对多条信号通路调节受到影响共同作用的结果。

关键词: Axin; Axin^{Fu-NT}; Wnt; JNK; p53;

Abstract

Axin is a multidomain scaffold protein, regulating many signaling pathways through interacting with different regulators. Axin can promote degradation of β -catenin to down-regulate Wnt signaling; homodimeric Axin can induce JNK activation through MEKK1 or MEKK4; Axin can also up-regulate HIPK2-mediated phosphorylation of p53 at Ser46. Through regulating multiple signaling pathways, Axin plays important roles in development, suppression of tumorigenesis, cytoskeleton rearrangement and so on. Axin was originally identified from the characterization of the mouse Fused (Fu) locus; the Axin^{Fu} allele is caused by the insertion of an IAP transposon. Axin^{Fu/Fu} mice display varying phenotypes ranging from embryonic lethality to relatively normal adulthood with kinky tails. Aberrant mRNA species of Axin from Axin^{Fu} mouse was previously identified; however, the mutant protein product(s) had not been characterized. In particular, it was unclear how the phenotypes of Axin^{Fu} mouse are caused by the mutant protein products. In this thesis, the Axin mutant protein was identified by immunoprecipitation using brain extracts from Axin^{Fu} mice with specific antibodies. The mutant protein is a truncated Axin containing amino acids 1-596, which is designated as Axin^{Fu-NT}. When tested for function, Axin^{Fu-NT} exhibits no difference in the inhibition of Wnt signaling compared with wild type Axin as determined by LEF or TOPFLASH reporter gene assay, interaction with key Wnt regulators or detection of β -catenin target genes in zebrafish embryos. However, Axin^{Fu-NT} was found to abolish Axin-mediated activation of JNK, which plays a critical role in dorsoventral patterning. Together with GST pull-down assay, it was found that Axin^{Fu-NT} contains a previously uncharacterized dimerization domain and can form a heterodimeric interaction with wildtype Axin; it was also found that Axin^{Fu-NT} can compete with Axin in binding to MEKK1 or MEKK4. Consistently, Axin^{Fu-NT} can ventralize zebrafish embryos by antagonizing JNK activation. In the same study, it was found that Axin^{Fu-NT}, which can interact with p53 but not HIPK2, can inhibit Axin-induced phosphorylation of p53 at Ser46, but Axin^{Fu-NT} Δ MID, which was deleted of its p53 binding domain, has no

effect on Axin-induced phosphorylation of p53 Ser46. It's suggested that Axin^{Fu-NT} can attenuate p53 activation by sequestering p53. Consistently, Axin^{Fu-NT} can abolish Axin-mediated cell apoptosis. In summary, Axin^{Fu-NT} can dominant negatively affect the function of Axin in many signaling pathways, and the phenotypes of Axin^{Fu} mice may be caused by perturbation of more than one signaling pathway.

Key words: Axin; Axin^{Fu-NT}; Wnt; JNK; p53;

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 前言

1.1 Axin的研究进展

1.1.1 引言

Axin最早是做为鼠的fused基因产物被鉴定。在蛙的胚胎中过量表达Axin可以抑制背部体轴的形成^[1]，而fused基因突变的纯合子小鼠在胚胎发育过程中会出现双体轴的现象，这些研究发现说明Axin在胚胎发育过程中对体轴的形成至关重要。目前的研究发现Axin是通过调节细胞中 β -catenin的蛋白水平影响Wnt信号通路从而对体轴发育起负调控的作用。鉴于这些认识，同时也为了避免与之不相关的果蝇的“fused”基因相混淆，人们将哺乳动物的fused基因改名为Axin (axis inhibition)。随着研究的深入，发现Axin至少在Wnt信号、TGF- β 信号、JNK通路和p53等信号通路中起这重要的作用。

1.1.2 Axin基因

目前的研究认为Axin家族有两个同源蛋白Axin1(也称Axin)^[2]和Axin2(或称Axil、Conductin)^[3]。人类这两个编码基因分别位于染色体16q13-3和17q23-24，cDNA都含10个外显子；Axin基因又可以编码Axin a和Axin b两种蛋白质，Axin a比Axin b在第8外显子编码部分的N端多出了36个氨基酸，但其功能现在还不清楚。Axin在果蝇、非洲爪蟾、鸡、小鼠、大鼠和人的进化上是高度保守的^[1,4,5]。最近在秀丽线虫又发现Axin的同源基因PRY-1，研究证明它与Axin在功能上具相似性。Axin在组织中的广泛表达与它在发育和肿瘤发生中重要的调控作用是相对应的。目前的研究已经很清楚Axin是一个多结构域的蛋白，它可以和很多蛋白相互作用。对正常的表皮细胞染色发现Axin是分布在细胞质中的，但在腺癌和很多肿瘤细胞中Axin是分布于细胞核中或细胞核中和细胞膜上^[6]。而Axin2在正常的组织中绝大部分是分布于细胞核中，但在息肉和癌组织中Axin2会部分转移到细胞质中^[7]。Axin1和Axin2两分子很相似，但它们在细胞内的分布的不一致性说明它们可能执行着不同的生物学功能。

1.1.3 Axin^{Fu}小鼠的研究进展

小鼠fused基因由于在发育过程的重要作用和该基因突变常常表现出来的异

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.

厦门大学博硕士论文摘要库