

学校编码: 10384  
学 号: B200326022

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_  
UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

Axin1 与 Axin2 激活 JNK 的分子机制

Molecular Mechanism for Axin1 and Axin2-mediated JNK  
Activation

邹海鹰

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: 2006 年 06 月 30 日

论文答辩日期: 2006 年 09 月 16 日

学位授予日期: 2006 年 月 日

答辩委员会主席: 吴 乔

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2006 年 06 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，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的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

中文目录.....	i
英文目录.....	iv
中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
<b>第一章 前 言</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1 Axin 一种在多个信号通路中起着调节作用的构架蛋白</b> .....	<b>5</b>
1.1.1 概述.....	5
1.1.2 Axin 的发现.....	5
1.1.3 Axin1 与 Axin2 相比较.....	6
1.1.4 Axin 是一种多功能的构架蛋白.....	7
1.1.5 Axin 的生物学功能.....	11
1.1.6 结束语.....	12
<b>1.2 JNK MAPKs 信号传导途径</b> .....	<b>12</b>
1.2.1 简介.....	12
1.2.2 JNK MAPKs 家族.....	13
1.2.3 JNK 的发现.....	13
1.2.4 JNK 的分子结构.....	13
1.2.5 JNK 信号通路的传导模式及机制.....	14
1.2.6 JNK 的二级激酶 MKK4 和 MKK7.....	14
1.2.7 JNK 的作用底物.....	16
1.2.8 JNK 信号通路中的构架蛋白.....	17
1.2.9 JNK 家族中的新成员.....	19
1.2.10 JNK 的生物学功能.....	19
<b>1.3 立题背景和立题意义</b> .....	<b>21</b>
1.3.1 Axin1 能激活 JNK.....	21
1.3.2 Axin1 激活 JNK 所需要的条件.....	21
1.3.3 立题意义.....	23
<b>第二章 材料和方法</b> .....	<b>24</b>
<b>2.1 常用药品和试剂</b> .....	<b>24</b>
<b>2.2 DNA 相关实验方法</b> .....	<b>24</b>
2.2.1 质粒载体.....	24
2.2.1.1 pBluescript SK(-).....	24
2.2.1.2 pCMV5.....	25
2.2.1.3 pSUPER.....	25
2.2.1.4 pGEX.....	26
2.2.2 大肠杆菌( <i>E.coli</i> )感受态细胞的制备和 DNA 转化.....	26
2.2.2.1 感受态细胞的制备.....	26
2.2.2.2 DNA 转化.....	27
2.2.3 质粒 DNA 的提取.....	27
2.2.3.1 小规模质粒 DNA 的提取(STET 煮沸法).....	27

2.2.3.2 中等规模质粒 DNA 的提取.....	28
2.2.3.3 大规模质粒 DNA 的提取(CsCl 超速离心法).....	29
2.2.4 质粒 DNA 的工具酶处理.....	30
2.2.4.1 DNA 的限制性内切酶消化.....	30
2.2.4.2 线性 DNA 的末端平滑化.....	31
2.2.4.3 线性 DNA 5'端的磷酸化.....	31
2.2.4.4 线性 DNA 5'端磷酸基团的去除.....	31
2.2.5 纯化 DNA 片段.....	31
2.2.5.1 DNA 的琼脂糖电泳.....	32
2.2.5.2 从琼脂糖凝胶中回收 DNA.....	32
2.2.5.3 从溶液中回收 DNA.....	33
2.2.6 DNA 连接反应.....	33
2.2.7 PCR 相关实验.....	33
2.2.7.1 PCR 反应.....	33
2.2.7.2 PCR 产物的克隆.....	34
2.2.8 哺乳动物细胞表达质粒的构建.....	34
2.2.8.1 Axin1 全长及 D19 和 M8 缺失突变体表达质粒的构建.....	34
2.2.8.2 Axin2 全长及各种缺失突变体表达质粒的构建.....	35
2.2.8.3 MKK4 和 MKK7 全长表达质粒的构建.....	37
2.2.8.4 MEKK2、MEKK3 全长表达质粒的构建.....	37
2.2.8.5 MEKK1、MEKK4 C 端表达质粒的构建.....	37
<b>2.3 细胞培养及转染.....</b>	<b>37</b>
2.3.1 细胞培养.....	37
2.3.1.1 细胞培养及相关溶液的配制.....	37
2.3.1.2 细胞的传代和接种.....	38
2.3.2 瞬时转染.....	38
2.3.2.1 磷酸钙转染.....	38
2.3.2.2 Lipofectamine 2000 转染试剂转染.....	39
<b>2.4 蛋白质相关实验方法.....</b>	<b>40</b>
2.4.1 免疫共沉淀反应实验.....	40
2.4.2 蛋白质的 SDS-PAGE 电泳与 Western blotting 分析.....	41
2.4.3 免疫激酶反应实验.....	43
2.4.4 GST-c-Jun 融合蛋白的表达和纯化.....	44
<b>2.5 RNA 干扰实验.....</b>	<b>45</b>
2.5.1 MKK4 和 MKK7 RNA 干扰试验所用表达质粒的构建.....	45
2.5.2 RNA 干扰试验.....	45
<b>2.6 细胞凋亡分析.....</b>	<b>45</b>
<b>第三章 结果和讨论.....</b>	<b>47</b>
<b>3.1 MKK4 和 MKK7 都参与了 Axin1 激活 JNK 信号通路.....</b>	<b>47</b>
3.1.1 Axin1 不与 MKK4 和 MKK7 直接相互结合.....	47
3.1.2 利用 pSUPER-MKK4 和 pSUPER-MKK7 特异而有效地干 MKK4 和 MKK7 的表达.....	48
3.1.3 MKK4 和 MKK7 都参与了 Axin1 激活 JNK.....	49

3.1.4 Axin1 主要通过 MKK7 激活 JNK.....	52
3.1.5 在激活 JNK 的过程中, Axin1 对 MKK7 的依赖性不同于 LMP-1, Sorbitol 和 Dishevelled.....	55
3.1.6 Axin1 激活 JNK 诱导细胞凋亡主要是通过 MKK7.....	60
3.1.7 小结.....	64
<b>3.2 Axin2(Conductin)激活 JNK 的分子机制.....</b>	<b>67</b>
3.2.1 Axin2 具有与 Axin1 相类似的分子结构.....	67
3.2.2 Axin2 也能激活 JNK.....	68
3.2.3 Axin2 分别能与 MEKK1 和 MEKK4 相互结合.....	68
3.2.4 Axin2 激活 JNK 可以被 MEKK1 和 MEKK4 显性负作用的突变体所抑 制.....	69
3.2.5 Axin2 结合 MEKK1 区域的定位.....	70
3.2.6 缺失 MEKK1 结合区域的 Axin2 突变体仍能与 MEKK4 结合.....	72
3.2.7 未来的工作.....	73
致谢.....	74
参考文献.....	75
图表索引.....	95
缩略语及中英文对照.....	97
在学期间发表论文.....	101

## TABLE OF CONTENT

TABLE OF CONTENT (IN CHINESE).....	i
TABLE OF CONTENT (IN ENGLISH).....	iv
ABSTRACT (IN CHINESE).....	1
ABSTRACT (IN ENGLISH).....	3
<b>CHAPTER 1 Introduction</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1 Axin: a multifunction scaffold for several signaling pathways</b> .....	<b>5</b>
1.1.1 General introduction.....	5
1.1.2 Identification of Axin.....	5
1.1.3 Axin1 and Axin2.....	6
1.1.4 Axin is a masterscaffold protein.....	7
1.1.5 Biological functions of Aixin.....	11
1.1.6 Concluding remarks.....	12
<b>1.2 Review on JNK MAPK</b> .....	<b>12</b>
1.2.1 General introduction.....	12
1.2.2 JNK MAPK family members.....	13
1.2.3 Identification of JNK.....	13
1.2.4 Struction of JNK.....	13
1.2.5 Model for signal transduction of JNK.....	14
1.2.6 MKK4 and MKK7.....	14
1.2.7 Substrates of JNK.....	16
1.2.8 Scaffold proteins in JNK signaling pathway.....	17
1.2.9 New members of JNK family.....	19
1.2.10 Biological function of JNK.....	19
<b>1.3 Background for Axin-mediated JNK activation</b> .....	<b>21</b>
1.3.1 Axin1 activates JNK.....	21
1.3.2 Elements of Axin1 need to activate JNK.....	21
1.3.3 Objective.....	23
<b>CHAPTER 2 Materials and Methods</b> .....	<b>24</b>
<b>2.1 Chemicals and reagents</b> .....	<b>24</b>
<b>2.2 DNA work</b> .....	<b>24</b>
2.2.1 Vectors.....	24
2.2.1.1 pBluescript SK(-).....	24
2.2.1.2 pCMV5.....	25
2.2.1.3 pSUPER.....	25
2.2.1.4 pGEX.....	26
2.2.2 <i>E. coli</i> competent cells and DNA transformation.....	26
2.2.2.1 Competent cells.....	26
2.2.2.2 DNA transformation.....	27
2.2.3 DNA preparation.....	27
2.2.3.1 Small-scale preparation of plasmid DNA.....	27

2.2.3.2 Medium-scale preparation of plasmid DNA.....	28
2.2.3.3 Large-scale preparation of plasmid DNA.....	29
2.2.4 Enzymatic manipulation of plasmid DNA.....	30
2.2.4.1 Restriction endonuclease digestion of DNA.....	30
2.2.4.2 Generation of blunt ended linear DNA.....	31
2.2.4.3 Phosphorylation of DNA 5' end.....	31
2.2.4.4 Removal of 5' phosphate from linear DNA.....	31
2.2.5 Purification of DNA fragment.....	31
2.2.5.1 Electrophoresis of DNA in agarose gel.....	32
2.2.5.2 Recovery of DNA from agarose gel.....	32
2.2.5.3 Recovery of DNA from solution.....	33
2.2.6 DNA ligation.....	33
2.2.7 Polymerase chain reaction.....	33
2.2.7.1 PCR.....	33
2.2.7.2 Cloning of PCR products.....	34
2.2.8 Construction of plasmids expressed in mammalian cells.....	34
2.2.8.1 Full-length Axin1 and Axin1 D19, Axin1 M8 mutants.....	34
2.2.8.2 Full-length and deletion mutants of Axin2.....	35
2.2.8.3 Full-length MKK4 and MKK7.....	37
2.2.8.4 Full-length MEKK2 and MEKK3.....	37
2.2.8.5 C terminal of MEKK1 and MEKK4.....	37
<b>2.3 Cell culture and DNA transfection.....</b>	<b>37</b>
2.3.1 Cell culture.....	37
2.3.1.1 Preparation of cell culture medium.....	37
2.3.1.2 Subculture and inoculation.....	38
2.3.2 Transient transfection.....	38
2.3.2.1 Calcium Phosphate Transfection.....	38
2.3.2.2 Lipofectamine 2000.....	39
<b>2.4 Protein work.....</b>	<b>40</b>
2.4.1 Co-Immunoprecipitation.....	40
2.4.2 Electrophoresis of protein in SDS-PAGE gel.....	41
2.4.3 Immuno-kinase assay.....	43
2.4.4 Purification of GST-c-Jun protein.....	44
<b>2.5 RNA interference.....</b>	<b>45</b>
2.5.1 Construction of plasmids for MKK4 and MKK7 RNA interference.....	45
2.5.2 RNA interference.....	45
<b>2.6 Apoptosis assay.....</b>	<b>45</b>
<b>CHAPTER 3 Results and Discussion.....</b>	<b>47</b>
<b>3.1 MKK4 and MKK7 are involved in Axin1-mediated JNK activation.....</b>	<b>47</b>
3.1.1 Axin1 fails to interact with MKK4 and MKK7.....	47
3.1.2 pSUPER-MKK4 and pSUPER-MKK7 efficiently inhibit the expression of MKK4 and MKK7 respectively.....	48
3.1.3 MKK4 and MKK7 are involved in Axin1-mediated JNK activity.....	49

3.1.4 MKK7 plays a key role in Axin1-mediated JNK activation.....	52
3.1.5 Different extent of dependence on MKK7 between Axin and Sorbitol, LMP-1, Dishevelled mediated JNK activity.....	55
3.1.6 MKK7 contributes to cell death though Axin1-mediated JNK activation more than MKK4.....	60
3.1.7 Conclusions.....	64
<b>3.2 mechanism for Axin2-induced JNK activation.....</b>	<b>67</b>
3.2.1 Alignment of the protein sequences of mouse Axin2 and Axin1.....	67
3.2.2 Axin2 can activate JNK.....	68
3.2.3 Axin2 interacts with MEKK1 and MEKK4 separately.....	68
3.2.4 Dominant negative mutants of MEKK1 and MEKK4 can inhibit JNK activity by Axin2.....	69
3.2.5 Mapping of MEKK1-binding domain.....	70
3.2.6 Axin2 $\Delta$ MEKK1 can interact with MEKK4.....	72
3.2.7 Future work.....	73
<b>ACKNOWLEDGEMENTS.....</b>	<b>74</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>75</b>
<b>LIST OF FIGURES AND TABLES.....</b>	<b>95</b>
<b>ABBREVIATIONS.....</b>	<b>97</b>
<b>PUBLICATIONS.....</b>	<b>101</b>

## 摘要

*Axin* 是一种抑癌基因，在胚胎发育过程中控制体轴的形成。*Axin* 是一种多功能的构架蛋白，在许多重要的信号传导途径中扮演着重要的角色：在 Wnt 信号通路中，*Axin* 作为负调控因子与 APC (adenomatous polyposis coli), GSK-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ ),  $\beta$ -catenin 形成蛋白复合体下调  $\beta$ -catenin 的水平；在 JNK 信号通路中，*Axin* 与 MEKK1 或 MEKK4 相互结合，激活 JNK，诱导细胞凋亡；在 TGF- $\beta$  信号通路中，*Axin* 通过与 Smad3 调节 TGF- $\beta$  的转录活性；在 p53 信号通路中，*Axin* 与 p53, HIPK2 (homeodomain-interacting protein kinase-2) 形成三聚体复合物，调节 p53 的转录活性。这些信号途径对细胞的各种生理过程如细胞的生长，增殖，分化，癌变，凋亡及细胞周期起着重要的调控作用。

目前我们对 *Axin* 与 JNK 的三级激酶 MEKK1 或 MEKK4 形成复合物继而激活 JNK 的分子机制有了清楚的认识，但对 *Axin* 与 JNK 的二级激酶 MKK4 和 MKK7 的关系还不清楚。因此，本论文采用生物化学，分子生物学和细胞生物学的方法对 *Axin* 与 JNK 的二级激酶 MKK4 和 MKK7 的关系进行研究和阐述，进一步揭示 *Axin* 激活 JNK 的完整分子机制。本论文发现：(1) *Axin* 不能与 MKK4 和 MKK7 直接相互结合。(2) 在 293T 细胞中采用 RNA 干扰的方法特异性地分别抑制 MKK4 和 MKK7 表达后，*Axin* 激活 JNK 的程度有明显的差异。当 MKK4 和 MKK7 的表达同时被抑制，*Axin* 基本不激活 JNK。而在 MKK7 的表达被抑制时，*Axin* 对 JNK 的激活程度明显小于当 MKK4 的表达被抑制时。也就是说，*Axin* 需要 MKK4 和 MKK7 对 JNK 最大程度的激活，但 MKK7 在这一过程中起关键作用。(3) 利用鼠胚胎成纤维野生型细胞、缺失 *MKK4* 基因的鼠胚胎成纤维细胞和缺失 *MKK4* 和 *MKK7* 基因的鼠胚胎成纤维细胞证明了 *Axin* 在激活 JNK 的过程中对 MKK7 具有强烈的依赖性。(4) 在上述野生型和基因敲除型细胞中，我们对比了 *Axin* 与 Dishevelled, LMP-1 及山梨醇 (Sorbitol) 激活 JNK 的程度，进一步证实了 MKK7 在 *Axin* 激活 JNK 过程中的重要性。(5) 采用荧光染色技术，对 *Axin* 诱导上述细胞凋亡率的统计，证明 *Axin* 主要通过 MKK7 来激活 JNK 而诱导细胞凋亡。

本论文还对 *Axin2* 激活 JNK 的分子机制进行了初步的研究和阐述。*Axin2* 与 *Axin* (*Axin1*) 具有较强的同源性，在生物学功能上也类似。本论文发现：*Axin2*

能较强程度地激活 JNK; Axin2 也能与 MEKK1 及 MEKK4 直接相互结合; MEKK1 和 MEKK4 的显性负作用突变体能有效地抑制 Axin2 对 JNK 的激活; 通过对 MEKK1 在 Axin2 上激活区域的初步定位, 发现 MEKK1 在 Axin2 上的结合区域在 C 末端, 不同于 Axin1 (在 N 末端)。

综上所述, 本论文发现 Axin 在激活 JNK 的过程中, 二级激酶 MKK7 起了关键作用, 完善了 Axin 活化 JNK 的分子机制, 揭示了 Axin 激活 JNK 的复杂性。另外, 本论文还就 Axin2 激活 JNK 的分子机理进行了初步探索, 丰富了 Axin/JNK 信号通路的相关知识, 对充分认识 Axin 作为多功能构架蛋白在多种信号传导途径中的整合作用及其生物学效应具有重要意义。

关键词: Axin; MKK4; MKK7; JNK;

## Abstract

*Axin* is a tumor suppressor gene, which plays a critical role in controlling axis formation during embryonic development. Axin serves as a scaffold protein in at least four different signaling pathways: Wnt, JNK (c-Jun NH<sub>2</sub> terminal MAPK), TGF- $\beta$  (transforming growth factor $\beta$ ) and p53 signaling pathways. In the Wnt signaling pathway, Axin negatively regulates  $\beta$ -catenin by forming a large multimeric protein complex with APC (adenomatous polyposis coli), GSK-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ ),  $\beta$ -catenin. In JNK signaling, Axin activates JNK by directly binding to MEKK1 or MEKK4. In TGF- $\beta$  signaling, Axin enhances the transcriptional activity of Smad3. In addition, Axin regulates the transcriptional activity of p53 by forming a protein complex with p53 and HIPK2 (homeodomain-interacting protein kinase-2). These different signaling pathways control a spectrum of cellular processes, including cell proliferation, differentiation, transformation, apoptosis, and cell cycle arrest.

Axin employs different regions to bind to MEKK1 or MEKK4 to activate JNK. Both MEKK1 and MEKK4 are JNK MAPK kinase kinase. The relation between Axin and JNK MAPK kinases (e.g. MKK4 and MKK7) is unclear. In this study, I have shown that (1) Axin can not bind to MKK4 and MKK7 directly. (2) In 293T cells, knockdown of MKK4 and MKK7 by using RNA interference has differential effect on Axin-mediated JNK activation. Axin requires both MKK4 and MKK7 for maximum activation of JNK. Depletion of MKK7 by pSUPER-directed siRNA dramatically diminishes activation of JNK by Axin, indicating that MKK7 contributes more to Axin-mediated JNK activity than MKK4 does. (3) I also found that Axin depends on MKK7 in MEF (murine embryonic fibroblast) wild type cells, MEF MKK4<sup>-/-</sup> cells and MEF MKK4/7<sup>-/-</sup> cells. (4) In MEF MKK4<sup>-/-</sup> cells, the extent of JNK activation mediated by Axin is greater than LMP-1 (Latent Membrane Protein 1), sorbitol and Dishevelled. In other words, MKK7 plays a key role in Axin-mediated JNK activity. (5) MKK7 contributes more to Axin-mediated cell death through activation of JNK than MKK4 does.

Upon completion of the studies on MKK4 and MKK7 function in the Axin/JNK signalling pathway, I studied another Axin family member, Axin2. Axin2 has similar biochemical and cell biological properties to Axin. In this study, Axin2 activates JNK also by forming a complex with MEKK1 or MEKK4. Dominant negative mutants of MEKK1 or MEKK4 effectively attenuate Axin2-mediated JNK activation separately. Despite the fact that Axin2 and Axin share 45% amino acid identity, the region of

Axin2 for binding to MEKK1 is not similar to Axin.

In conclusion, my studies have enriched our understanding of the mechanism of Axin-mediated JNK activation which provides important molecular basis for the ultimate understanding of the biological function of Axin-mediated JNK activation.

Key words: Axin; MKK4; MKK7; JNK

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 第一章 前言

### 1.1 Axin: 一种在多个信号通路中起着调节作用的构架蛋白

#### 1.1.1 概述

Axin (**A**xis **f**ormation **i**nhibitor) 即体轴发育抑制因子, 在胚胎发育过程中控制着体轴的形成<sup>[1]</sup>, 它的突变会导致显性胚胎的尾部卷曲和缩短, 和隐性胚胎致死效应, 纯合子还会出现胚胎产生双向体轴, 神经外胚层缺陷及泌尿系统缺陷<sup>[2,3,4]</sup>。Axin 自 1997 年被发现以来一直成为人们关注的焦点, 通过对它的深入研究人们发现: Axin 是一个重要的抑癌基因, Axin 蛋白含有多个功能结构域, 能与多种蛋白质相互结合, 参与多个重要信号传导系统中 (目前的研究表明 Axin 至少参与了四个信号传导途径: Wnt, JNK/SAPK, TGF- $\beta$ 和 p53 信号传导通路。) 的调控, 从而对个体发育、细胞的生长与分化、增殖与凋亡以及癌变等过程起着非常重要的作用。迄今, 人们还发现了与 Axin 同源的蛋白, 被称为 Conductin (又称 Axil 和 Axin2), 在生物功能上有着与 Axin 相似和等同性<sup>[5]</sup>。为了以示区别人们将 Axin 称为 Axin1, 而 Conductin 称为 Axin2。现将 Axin1 和 Axin2 综述如下。

#### 1.1.2 Axin 的发现

在 1997 年报道, F.Constantini 及其同事克隆出小鼠 *Fused* (*Fu*) 基因, 为了避免与果蝇 (*Drosophila*) *Fused* 基因混淆, 又因该基因与抑制体轴形成相关故重新命名为 *Axin* (Axis formation inhibitor) 基因<sup>[1]</sup>, 即 *Axin1* 基因。通过对 Axin1 基因的基因组结构分析, Axin1 由 10 个外显子组成, 编码 868 个氨基酸 (a 型) 或 832 个氨基酸 (b 型) 两种异型体 (取决于 mRNA 不同的剪接方式)<sup>[1]</sup>。按其 cDNA 完整的阅读框编码 956 或 992 个氨基酸序列的蛋白, 但实际上没有发现这样长度的蛋白, 而 Axin1 蛋白的起始编码位于原序列的第 125 位甲硫氨酸 (Met-125)<sup>[1]</sup>。通过对不同物种的蛋白序列比较分析, Axin1 具有两个非常保守的结构域: 在 N 末端与 G 蛋白信号调节因子 RGS (Regulator of G-protein Signaling) 同源, 这一区域是 G 蛋白信号调控因子家族中高度保守的区域<sup>[6-7]</sup>, 所以称为 RGS 结构域; 在 C 末端与 Axin 形成二聚体相关并与 Dishevelled 蛋白同源称为 DIX 结构域<sup>[8]</sup>。

Axin1 广泛存在于无脊椎动物和脊椎动物体内, 通过不同的生物化学方法证实了 *Axin* 基因在线虫, 果蝇, 斑马鱼, 爪蟾, 鸡, 小鼠, 大鼠, 人都非常保守<sup>[1,9,10,11]</sup>。Axin1 普遍表达于不同的组织, 包括脑、胸腺、心脏、肺、肝、脾和肾等等<sup>[4,12]</sup>。人的 Axin1 蛋白序列与小鼠相比约 87% 的相似, 其基因定位于第 16 条染色体长臂上(16q13-3), 其编码区由 10 个外显子组成, 编码 862 个氨基酸 (a 型) 或 826 个氨基酸 (b 型) 两种异型体, 其中 b 型缺少第 8 个外显子, 编码 36 个氨基酸<sup>[13]</sup>。

1998 年报道, Birchmeier 及其同事通过酵母双杂交 (Yeast two-hybrid screens) 以  $\beta$ -catenin 作为诱饵蛋白, 在小鼠胚胎 cDNA 文库中筛选出 Conductin 即 Axin2<sup>[5]</sup>。小鼠 Axin2 蛋白由 840 个氨基酸组成, 与小鼠 Axin1 相比较, Axin2 在整体氨基酸序列上有 45% 的相同性和 58% 的相似性<sup>[5]</sup>。同年, Kikuchi 及其同事通过酵母双杂交以 GSK-3 $\beta$  为诱饵蛋白在大鼠脑 cDNA 文库分离出 Axil 蛋白, 因其功能与 Axin1 相似, 能抑制体轴形成, 命名为 Axil (Axin like)<sup>[14]</sup>。Axil 蛋白由 838 个氨基酸组成, 与大鼠 Axin1 相比较, 具有 44% 的同源性。在这之后将 Conductin 和 Axil 统称为 Axin2。Axin2 与 Axin1 一样具有 N 末端的 RGS 结构域和 C 末端 DIX 结构域。

目前还不清楚 Axin2 是否象 Axin1 那样在各种动物物种普遍存在, 但对人的 Axin2 有了比较充分的认识。人的 Axin2 蛋白序列与小鼠相比约 89% 的同源, 人的 *Axin2* 基因定位于第 17 条染色体长臂上(17q23-24), 其 cDNA 约 2.5kb 长, 由 10 外显子组成, 编码 843 个氨基酸 (a 型) 或 778 个氨基酸 (b 型) 两种异型体, 其中 b 型缺少第 6 个外显子, 编码 65 个氨基酸<sup>[15,16]</sup>。

### 1.1.3 Axin1 与 Axin2 相比较

从小鼠 Axin1 与 Axin2 的基因和蛋白序列分析比较, 发现 Axin1 与 Axin2 有着非常相似之处。尽管 Axin2 没有象 Axin1 那样被广泛深入地研究, 不过大量的研究表明 Axin1 与 Axin2 在 Wnt 信号通路中执行着相同的功能: 与 APC, GSK-3 $\beta$  和  $\beta$ -catenin 形成蛋白复合体促进  $\beta$ -catenin 的磷酸化及随后的降解<sup>[5]</sup>, 并且二者在爪蟾胚胎发育过程中抑制双体轴的形成<sup>[1,5,14,17]</sup>。此外, Axin2 与 Axin1 都能与 Diversin, Smad3 和 Smad7 相互结合<sup>[18,19, 64]</sup>。最近有报道证实, 小鼠胚胎

发育过程 Axin2 可以取代 Axin1 的功能<sup>[20]</sup>。即使是这样, Axin2 相对 Axin1 并非是多余的。首先, 各个组织分布来看, Axin1 在各个组织中均有分布, 而 Axin2 因组织特异性、胚胎发育阶段而表达不同<sup>[22]</sup>, 因此在小鼠胚胎中 Axin2 不能弥补 Axin1 的缺失可以简单解释为: 并不是所有细胞都表达 Axin2<sup>[20]</sup>。其次, 有研究表明 Axin2 的转录能被 Wnt 信号所上调<sup>[21-23]</sup>, 而 Axin1 无明显变化, 因此 Axin2 可以被看作是对 Wnt 信号持续性的负反馈调节因子<sup>[22-25]</sup>。再次, 人们已找到 Axin2 基因突变或缺失的表现型: 人的 Axin2 基因突变的杂合体导致牙齿发育不全的家族遗传病<sup>[26]</sup>; 人们发现 Axin2 基因被敲除的小鼠头骨畸形, 头盖骨的缝合过早愈合, 导致头骨缩短<sup>[26]</sup>。而 Axin1 基因突变或缺失导致显性胚胎的尾部卷曲和缩短, 和隐性胚胎致死<sup>[3]</sup>。另外在一些肿瘤组织(包括结肠癌和肝癌)中检测 Axin1 和 Axin2 的突变情况说明: 虽然 Axin1 和 Axin2 都是抑癌基因, 但彼此不可能替代对方的功能<sup>[28]</sup>。这就说明 Axin1 与 Axin2 在生物学功能上有着各自的特异性。最后, Axin 与 Axin2 的亚细胞定位不同, 通过免疫组织化学方法发现: Axin1 弥散在细胞核内, 细胞膜内侧及胞浆中  $\beta$ -catenin 所处的位置; 而 Axin2 主要位于细胞核中。尽管 Axin1 和 Axin2 蛋白分子是如此相似, 但有研究表明在同一细胞中它们并不同时存在, 再次说明 Axin1 和 Axin2 有着炯乎不同的功能<sup>[13]</sup>。

#### 1.1.4 Axin 是一种多功能的构架蛋白

大量生物化学研究表明 Axin1 和 Axin2 作为一种多功能结构域的构架蛋白, 通过与其它蛋白分子相互结合来行使其生物学功能的, 下面以小鼠 Axin1 (aa 832) 为例来简要介绍与 Axin 相互作用的蛋白及其相应的功能。

$\beta$ -catenin ( $\beta$  连环蛋白)<sup>[29-31]</sup>: Axin 的第 437-506 位氨基酸区域与  $\beta$ -catenin 的第 2-7 个 armadillo 重复区域直接结合<sup>[9]</sup>。GSK-3 $\beta$  与  $\beta$ -catenin 能同时与 Axin 结合形成三聚体。这一复合体的形成便于 GSK-3 $\beta$  和 CKI $\alpha$  对  $\beta$ -catenin 的磷酸化<sup>[9,32]</sup>。磷酸化的  $\beta$ -catenin 被 E3 泛素连接酶  $\beta$ -TrCP 识别, 通过泛素介导的蛋白酶复合体途径被降解<sup>[33]</sup>。当 Wnt 信号通路被激活后, 由 Axin、GSK-3 $\beta$ 、APC 等分子组成的  $\beta$ -catenin 降解复合物在 Dishevelled 的作用下转移到细胞膜上, 在膜上 Dishevelled 抑制 GSK-3 $\beta$  对 Axin 的磷酸化作用, 使 Axin 稳定性下降而降解, 从而使降解复合体解体, 细胞质内的  $\beta$ -catenin 不断积累并进入细胞核, 在核内与多

种转录因子/协同因子结合，从而调控一系列的细胞生长/分化相关基因包括 Siamois<sup>[34]</sup>、Twin<sup>[35]</sup>、Xnr-3<sup>[36]</sup>、Ubx<sup>[37]</sup>、cyclin D1<sup>[38]</sup>和 c-MYC<sup>[39]</sup>。

**GSK-3 $\beta$**  (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , 糖原合成酶激酶 3): GSK-3 $\beta$ 结合在 Axin 的第 353-437 位氨基酸区域，而 Axin 在 GSK-3 $\beta$ 上的结合区域是由一个 $\alpha$ 螺旋(aa 262-273)和一个伸展的环(aa 285-299)组成<sup>[40]</sup>。在 Wnt 信号通路中它使  $\beta$ -catenin 磷酸化并更易被降解。Axin 可能作为方便 GSK-3 $\beta$ 磷酸化 $\beta$ -catenin 的构架蛋白而参与调节 $\beta$ -catenin 的稳定性。如果 GSK-3 $\beta$ 不能结合 $\beta$ -catenin 将导致  $\beta$ -catenin 水平的失调并诱发癌症。最近对 Wnt 信号通路的深入研究发现，该通路的中心事件可能是 GSK-3 $\beta$ 对 Axin 的磷酸化，而不是对 $\beta$ -catenin 的磷酸化<sup>[41]</sup>。

**APC** (adenomatous polyposis coli, 肠腺息肉瘤蛋白): Axin 通过 RGS 结构域 (aa 89-216) 与 APC 结合<sup>[42]</sup>。在 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路中，Axin 与 APC, GSK-3 $\beta$ 及  $\beta$ -catenin 形成蛋白复合体对  $\beta$ -catenin 进行磷酸化从而促进  $\beta$ -catenin 的降解<sup>[43]</sup>。APC 需要与 Axin 相互结合才能负调控 $\beta$ -catenin, APC 在 Axin 上相互结合的区域为 20 个氨基酸的重复区域<sup>[5,44]</sup>。一旦这一区域被破坏，APC 就失去了促进 $\beta$ -catenin 降解的能力<sup>[45]</sup>。实验证明 APC 与 Axin 形成复合体能促进 GSK-3 $\beta$ 对 $\beta$ -catenin 的磷酸化及随后 $\beta$ -catenin 的降解<sup>[46]</sup>。

**PP2A** (protein phosphatase 2A, 蛋白磷酸酶 2A): PP2A 与 Axin 的第 298-506 氨基酸区域有相互结合。目前已发现三个不相关的 PP2A B 亚基家族，它们是 B, B56 和 PR72。PP2A 的 B56 亚基在 Axin-GSK-3 $\beta$ - $\beta$ -catenin 复合物中与 APC 和 Dvl 结合<sup>[46-49]</sup>，而 C 亚基与 Axin 相互作用。B56 亚基表达的增加会降低 $\beta$ -catenin 的水平，减弱 $\beta$ -catenin 信号。

**CK I** (Casein Kinases I, 酪蛋白激酶 I): Axin 的 C 末端第 217-352 氨基酸区域对 CK I  $\alpha$ 和 CK I  $\epsilon$ 的结合十分重要。在 Wnt 信号通路中，因 CKI $\epsilon$ 能模拟 Wnt 诱导爪蟾的体轴复制，而 CKI $\alpha$ 则不能，因而 CKI $\epsilon$ 是 Wnt 信号通路的正调控因子<sup>[50,51]</sup>。与 CKI $\epsilon$ 不同，CKI $\alpha$ 作为引发激酶将 $\beta$ -catenin 的 C 端丝氨酸磷酸化，促进 $\beta$ -catenin N 端的丝氨酸 (Ser) /苏氨酸 (Thr) 残基被 GSK-3 $\beta$ 磷酸化，从而促进 $\beta$ -catenin 的降解<sup>[32]</sup>。

**Dishevelled (Dvl 或 Dsh)**: Axin 通过 DIX 结构域 (aa 757-820) 形成同源聚合体<sup>[12]</sup>。这些同源聚合体包括 Axin1, Axin2, Dishevelled 和 Ccd1 (Coiled-coil-DIX

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.

厦门大学博硕士论文摘要库