

学校编码: 10384

类号__密级

学号: B200426020

UDC

厦 门 大 学

博士学位论文

γ -分泌酶组分基因 *APH-1A* 和 *PEN-2* 的转录调控

Transcriptional Regulation of *APH-1A* and *PEN-2*, Two Key Components of γ -secretase Complex

王 瑞 山

指导教师姓名: 许华曦 教授、博导

申请学位级别: 博 士

学科专业名称: 细 胞 生 物 学

论文提交日期: 2007 年 4 月

论文答辩日期: 2007 年 4 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: 陶涛 教授、博导

评阅人:

2007 年 4 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文- 创性声明

兹呈交的学位论文，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产生的权利和责任。

声明人（签名）：

2007年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1. 保密（ ），在年解密后适用本授权书。
2. 不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期： 年 月 日

导师签名：

日期： 年 月 日

摘 要

PS/ γ -分泌酶负责老年痴呆症相关蛋白 β 淀粉样蛋白前体蛋白 (APP)、信号转导受体 Notch 和其他 I 型跨膜蛋白的剪切, 其组成单位至少有四种: presenilins (PS, 包括 PS1 和 PS2)、nicastrin (NCT)、APH-1 和 PEN-2。尽管人们对这四种组分在蛋白质水平上的有机的相互调解作用已经有所了解, 但是, 关于它们的转录调控却只知之甚少。在这项研究中, 我们克隆了 *PEN-2* 和 *APH-1A* 两种基因启动子区, 并通过荧光素酶活性分析鉴定了这两种基因启动活性必需的最小启动子区。序列分析表明, 在这些区域存在许多潜在的转录因子的结合位点。点突变和胶迁移实验揭示 AP4 和 HIF-1 结合到 *APH-1A* 启动子上, 而 CREB 结合到 *PEN-2* 启动子上。进一步的研究表明, 由 forskolin 激活的 CREB 显著地促进 *PEN-2* mRNA 和蛋白质的表达, 而对 γ -分泌酶的其他组分没有影响。通过 NiCl_2 处理 (一种模拟缺氧的化学条件) 激活 HIF-1, *APH-1A* mRNA 和蛋白质的水平显著增加, 而 *PEN-2* 和 PS1 的蛋白水平只是在长时间的 NiCl_2 处理条件下才会增加。更为重要的是, APP 蛋白酶解的各种代谢产物的水平在 forskolin 或者 NiCl_2 处理的条件下也发生了改变。总之, 我们的结果表明, *APH-1A* 和 *PEN-2* 的转录分别受 HIF-1 和 CREB 的特异性调控, 并且这种调控的特异性可能赋予 APH-1 和 PEN-2 其他特有的生理功能。

关键词: γ -分泌酶; *APH-1A*; *PEN-2*; 转录调控; HIF-1; CREB

ABSTRACT

The intramembrane proteolytic cleavages of Alzheimer's β -amyloid precursor protein (APP) and signaling receptor Notch are mediated by the PS/ γ -secretase complex, which comprises of presenilins (PS, including PS1 and PS2), nicastrin (NCT), APH-1 and PEN-2. Although the four components have been shown to coordinately regulate each other at the protein level, information regarding their transcriptional regulation is scarce. In the present study, we characterized upstream regions of the human *PEN-2* and *APH-1A* genes and identified sequences critical for their promoter activity. Sequence analysis of these regions revealed several potential transcription factor binding sites. Site mutations and gel shift assays showed that CREB binds to *PEN-2* promoter, whereas AP4 and HIF-1 bind to *APH-1A* promoter. Furthermore, activation of CREB by forskolin treatment dramatically promoted the expression of *PEN-2* mRNA and protein, but not the expression of the other three γ -secretase components. Activation of HIF-1 by nickel (chemical hypoxia) significantly promoted the expression of *APH-1A* mRNA and protein; whereas increased protein levels of PEN-2 and PS1 were only observed after chronic nickel treatment. Importantly, the levels of various proteolytic metabolites of APP were also altered by forskolin or nickel treatment. Together, our results demonstrate the differential transcriptional regulation of PEN-2 and APH-1A expression, and suggest additional physiological functions uniquely assigned to PEN-2 and APH-1A.

Key words: γ -secretase, *APH-1A*, *PEN-2*, transcriptional regulation, HIF-1, CREB

目 录

| | |
|--|----|
| 前言 | 1 |
| 1. 老年痴呆症 | 1 |
| 2. A β 假说 | 1 |
| 3. 三种分泌酶 | 5 |
| 4. γ -分泌酶组分基因表达的调控 | 10 |
| 5. 主要内容和目的 | 13 |
| 材料与方法 | 13 |
| 1. 生物信息学分析 | 13 |
| 2. 肝脏组织总 RNA 的提取 | 13 |
| 3. 5'-RACE | 13 |
| 4. 细胞培养 | 15 |
| 5. <i>APH-1A</i> 和 <i>PEN-2</i> 启动子的克隆及荧光素酶报告基因载体的构建 | 16 |
| 6. 瞬时转染和荧光素酶的活性分析 | 16 |
| 7. NiCl ₂ 和 forskolin 处理 | 19 |
| 8. 细胞核抽提物的制备 | 19 |
| 9. 胶迁移分析 | 20 |
| 10. CHIP 分析 | 21 |
| 11. Northern blot | 22 |
| 12. Western blot 和抗体 | 22 |
| 13. A β 的检测 | 23 |
| 14. Pulse-chase 分析 | 23 |
| 结果 | 24 |
| 1. <i>APH-1A</i> 和 <i>PEN-2</i> 基因转录起始位点的定位 | 24 |
| 2. <i>APH-1A</i> 和 <i>PEN-2</i> 基因启动子的克隆与功能性分析 | 25 |
| 2.1 启动子预测分析 | 25 |
| 2.2 <i>APH-1A</i> 基因启动子的克隆与功能性分析 | 25 |

| | |
|--|----|
| 2.3 <i>PEN-2</i> 基因启动子的克隆与功能性分析..... | 30 |
| 3. <i>APH-1A</i> 启动子含有转录因子 AP4 和 HIF-1 的结合位点..... | 33 |
| 4. HIF-1 调控 <i>APH-1A</i> 基因的表达, 缺氧处理增加 γ -分泌酶介导的 A β 和 NICD 的形成..... | 40 |
| 5. <i>PEN-2</i> 启动子含有转录因子 CREB 的结合位点..... | 43 |
| 6. CREB 上调 <i>PEN-2</i> 的表达..... | 49 |
| 讨论..... | 52 |
| 参考文献..... | 55 |

CONTENTS

| | |
|--|----|
| INTRODUCTION | 1 |
| 1. Alzheimer's disease..... | 1 |
| 2. A β hypothesis..... | 1 |
| 3. Three kinds of secretases..... | 5 |
| 4. Transcriptional regulation of γ -secretase components..... | 10 |
| 5. The aim and contents..... | 13 |
| MATERIALS AND METHODS | 13 |
| 1. Bioinformatic analysis..... | 13 |
| 2. Extraction of total liver RNA..... | 13 |
| 3. 5'-RACE..... | 13 |
| 4. Cell culture..... | 15 |
| 5. Cloning of <i>APH-1A</i> and <i>PEN-2</i> promoter, and construction of luciferase report constructs..... | 16 |
| 6. Transient transfection and luciferase activity assay..... | 16 |
| 7. Treatment with NiCl ₂ and forskolin..... | 19 |
| 8. Preparation of nuclear extract..... | 19 |
| 9. Gel shift assay..... | 20 |
| 10. CHIP assay..... | 21 |
| 11. Northern blot..... | 22 |
| 12. Western blot and antibodies..... | 22 |
| 13. A β assay..... | 23 |
| 14. Pulse-chase assay..... | 23 |
| RESULTS | 24 |
| 1. Identification of the transcription start site of <i>APH-1A</i> and <i>PEN-2</i> | 24 |
| 2. Cloning of <i>APH-1A</i> and <i>PEN-2</i> promoter, and functional assay..... | 25 |
| a. Prediction of promoter..... | 25 |

| | |
|--|-----------|
| b. Cloning of <i>APH-1A</i> promoter, and functional assay | 25 |
| c. Cloning of <i>PEN-2</i> promoter, and functional assay | 30 |
| 3. APH-1A promoter contains AP4 and HIF-1 binding sites | 33 |
| 4. HIF-1 regulates the expression of APH-1A, and hypoxia treatment increases the formation of γ-secretase-mediated Aβ and NICD | 40 |
| 5. PEN-2 promoter contains CREB binding site | 43 |
| 6. CREB upregulates the expression of PEN-2 | 49 |
| DISCUSSION | 52 |
| REFERENCE | 55 |

图目录

| 图的序号 | 页数 |
|--|----|
| 1.1 APP 代谢途径..... | 3 |
| 1.2 γ -分泌酶组分的示意图..... | 8 |
| 2.1 5'-RACE 反应原理..... | 14 |
| 2.2 <i>APH-1A</i> 和 <i>PEN-2</i> 基因 5'侧翼序列的生物信息学分析(I)..... | 25 |
| 2.3 5'-RACE 定位 <i>APH-1A</i> 和 <i>PEN-2</i> 基因的转录起始位点..... | 26 |
| 2.4 <i>APH-1A</i> 和 <i>PEN-2</i> 基因 5'侧翼序列的生物信息学分析(II)..... | 27 |
| 2.5 <i>APH-1A</i> 启动子荧光素酶报告基因载体的构建..... | 28 |
| 2.6 <i>APH-1A</i> 基因启动子的荧光素酶活性功能性分析..... | 29 |
| 2.7 <i>PEN-2</i> 启动子荧光素酶报告基因载体的构建..... | 31 |
| 2.8 <i>PEN-2</i> 基因启动子的荧光素酶活性功能性分析..... | 32 |
| 2.9 人类 <i>APH-1A</i> 基因启动子的特征..... | 34 |
| 2.10 <i>APH-1A</i> 启动子实突变体的测序结果..... | 35 |
| 2.11 人 <i>APH-1A</i> 基因启动子突变体的荧光素酶活性分析..... | 36 |
| 2.12 <i>APH-1A</i> 基因启动子与 HIF-1 结合的胶迁移分析..... | 38 |
| 2.13 <i>APH-1A</i> 基因启动子与 AP4 结合的胶迁移分析..... | 39 |
| 2.14 Northern blot 分析在 HIF-1 激活条件下 <i>APH-1A</i> 基因 RNA 水平的变化...41 | |
| 2.15 HIF-1 对 γ -分泌酶组分的表达以及对 APP 和 Notch 剪切的作用.....42 | |
| 2.16 <i>PEN-2</i> 基因启动子的特征..... | 44 |
| 2.17 <i>PEN-2</i> 基因启动子突变体的测序结果..... | 45 |
| 2.18 人 <i>PEN-2</i> 基因启动子突变体的荧光素酶活性分析..... | 46 |
| 2.19 <i>PEN-2</i> 基因启动子的胶迁移分析..... | 47 |
| 2.20 CHIP 分析 CREB 结合到 <i>PEN-2</i> 启动子上..... | 48 |
| 2.21 Forskolin 激活 CREB, 进而刺激 <i>PEN-2</i> 基因的转录和蛋白表达.....50 | |
| 2.22 Forskolin 增加 <i>PEN-2</i> 蛋白的表达和 sAPP α 与 A β 的分泌, 但是并不影响 γ -分泌酶的其他组分的蛋白水平表达和 Notch 剪切.....51 | |

表目录

| 表的序号 | 页数 |
|--|----|
| 2.1 <i>APH-1A</i> 和 <i>PEN-2</i> 基因 5' 侧翼区序列的生物信息分析····· | 15 |
| 2.2 <i>APH-1A</i> 启动子报告基因载体的构建过程中使用的引物····· | 17 |
| 2.3 <i>PEN-2</i> 启动子报告基因载体的构建过程中使用的引物····· | 17 |
| 2.4 构建 <i>APH-1A</i> 基因突变体所用的引物····· | 18 |
| 2.5 构建 <i>PEN-2</i> 基因突变体所用的引物····· | 19 |
| 2.6 用于 GSA 的寡聚核苷酸····· | 21 |

英文缩略词

| 英文缩写 | 英文全名 | 中文名称 |
|-----------|---|----------------------------|
| AD | Alzheimer's disease | 老年痴呆症; 阿尔茨海默症 |
| AICD | APP intracellular domain | |
| AP1 | activator protein 1 | |
| AP4 | activator protein 4 | |
| APH-1 | anterior <i>pharynx</i> -defective 1 | |
| APP | beta-amyloid precursor protein | β -淀粉蛋白前体蛋白 |
| ATF6 | Activating transcription factor 6 | |
| A β | beta-amyloid | β -淀粉样蛋白 |
| Asp2 | aspartyl protease 2 | |
| BACE | beta-site APP cleaving enzyme | |
| CTF | C-terminal fragments | |
| cDNA | complementary DNA | 互补脱氧核糖核酸 |
| CREB | cAMP-responsive element binding protein | |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium | Dulbecco's 的改良 Eagle's 培养基 |
| gDNA | genome DNA | 基因组脱氧核糖核酸 |
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetic acid | 乙二胺四乙酸 |
| ER | Endoplasmic Reticulum | 内质网 |
| GSA | gel Shift Assays | 胶迁移分析 |
| HIF-1 | hypoxia inducible factor-1 | |
| memapsin2 | membrane anchored protease of the pepsin family | |
| mRNA | Messenger RNA | 信使 RNA |
| NCT | nicastrin | |
| NFAT | nuclear factor of activated T-cells | |
| NFT | neurofibrillar tangles | 神经元纤维缠结 |
| NICD | Notch intracellular domain | |
| NTF | N-terminal fragments | |
| PBS | Phosphate-buffered saline | 磷酸盐缓冲液 |
| PCR | Polymerase Chain Reaction | 聚合酶链式反应 |
| PEN-2 | presenilin <i>enhancer</i> 2 | |
| PHF | paired-helical filament | |
| RACE | Rapid Amplification of cDNA Ends | |
| rRNA | Ribosome RNA | 核糖体 RNA |
| siRNA | Small interference RNA | |
| UTR | untranslation region | 非翻译区 |
| TACE | tumor necrosis factor- α converting enzyme | |
| TGN | trans Golgi network | 高尔基体反面的网状结构 |
| wt | Wide type | 野生型 |

厦门大学博硕士学位论文摘要库

前 言

1、老年痴呆症(Alzheimer's disease, AD)

AD 是一种与年龄相关的、进行性的、神经退行性的痴呆性疾病^[1]。AD 患者表现为记忆力的逐渐衰退，认知能力、推理判断能力的下降，这些功能的紊乱表现出不可逆转性。AD 患者多发生在 65 岁以上的人群中，据统计在该年龄段的人体中有约 10% 的人，85 岁以上的人群中有约 50% 的人患有此病；不过也有一些阿尔茨海默病，65 岁以前发病，所以又称早发性老年痴呆症，发病率不高 (<2%)。尽管大多数的 AD 病例是“散发性的”，也就是说，AD 的发生没有明显地遗传特征，但是，也存在具有明显遗传特征的“家族性的”AD (Familial form of AD, FAD)，常常表现为早发性老年痴呆症。虽然 FAD 病例比较少见，但是它们为探讨 AD 的病理学机制提供了宝贵的材料。

1907 年，Dr. Alzheimer 即报道了一位 51 岁女性痴呆患者表现出神经元的丢失、神经元细胞内神经元纤维缠结(neurofibrillar tangles, NFT)和细胞外淀粉样斑 (amyloid plaques)。后来，神经元纤维缠结和淀粉样斑成为诊断阿尔茨海默病的两个重要的神经病理学特征^[2-4]。NFT 是细胞内蛋白质的病理性聚积形成的，可见于神经元细胞体。NFT 基本的单位是配对螺旋纤维 (paired-helical filament, PHF)，由高度磷酸化的微管相关蛋白 tau 组成^[2, 5]。Tau 的高度磷酸化作用使 tau 从微管上解离，造成非结合态的 tau 增加，并引发 PHF 和 NFT 的形成。淀粉样斑是细胞外多种蛋白质的非溶性集结物，主要成分是 beta-amyloid (A β)^[1-4, 6]。

2、A β 假说

AD 的发病机制至今仍不清楚。有许多假说对其机制进行阐述，其中有两种假说为多数学术界人士认可： neuronal cytoskeletal degeneration hypothesis 和 amyloid cascade hypothesis^[1, 3-5]。前者认为高度磷酸化的 tau 蛋白引起微管蛋白

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