

学校编码：10384

分类号_____密级_____

学 号：21720091152180

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

去泛素化酶 USP7 与 ULF、ARF 蛋白相互
作用的研究

The Ubiquitin Specific Protease USP7 Regulates the
Stability of ULF and ARF Proteins

孙丽

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：2012 年 05 月

论文答辩时间：2012 年 06 月

学位授予日期：2012 年 月

答辩委员会主席：_____

评 阅 人：_____

2012 年 05 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

摘要

肿瘤抑制蛋白ARF由*INK4a-ARF*基因座所编码，在抑制肿瘤发生方面发挥着重要的作用。ARF蛋白主要通过激活p53信号通路，引起细胞周期阻滞或凋亡，从而抑制肿瘤的发生。另外，ARF蛋白还可以通过非p53依赖性途径发挥其肿瘤抑制功能。

由于ARF在肿瘤抑制方面的重要作用，细胞中存在多种方式对ARF的表达进行严格、精细的调控。其中由ULF介导的泛素化是从转录后水平对ARF蛋白进行调控的重要方式。

蛋白的泛素化是一个可逆的过程。去泛素化作用对许多重要蛋白的水平和功能发挥着关键性的调控。参与蛋白去泛素化的特异性水解酶（去泛素化酶）是一类蛋白酶超家族，USP7则是其中一个重要的成员。

我们的工作在前人研究基础上，利用免疫共沉淀技术，证实了去泛素化酶USP7与ARF的泛素连接酶ULF在细胞内的特异性结合。在此基础上，初步探讨了这种特异性结合对USP7和ULF蛋白稳定性的影响。我们发现，二者结合对USP7的蛋白稳定性没有影响，但是却能增强ULF的蛋白稳定性。经过进一步的研究发现，USP7对ULF的稳定效应与USP7的去泛素化酶效应相关，说明USP7很有可能去泛素化ULF。另一方面，我们利用免疫共沉淀和GST pull down 技术，发现USP7还可以和细胞中重要的肿瘤抑制蛋白ARF结合，相关的研究仍在进行中。该研究对于探索细胞中调控由ULF介导的ARF泛素化降解这一过程有一定的意义，也为后续的进一步深入研究打下了基础。

关键词：ARF, ULF, USP7。

Abstract

The ARF protein is a product of *INK4a-ARF* locus, it plays a crucial role in tumor suppression. ARF stabilizes p53. This results in activated the p53 signaling pathway and mediated cell cycle arrest or apoptosis. ARF-mediated tumor suppression can also occur in a p53-independent pathway.

Stabilization of ARF is specifically required for its tumor suppressor function. There are many regulatory mechanisms involved in the control of ARF. Among the regulations, ULF-mediated ubiquitination as an important pattern is involved in the post-transcriptional regulations.

Similar to other reversible post-translational regulations, ubiquitination is reversible. The specific hydrolases (deubiquitinating enzymes, DUBs) accomplishing the process of deubiquitination are a superfamily of proteases. Among the DUBs, USP7 is one of the most prominent members.

Our work first discovered USP7 could bind to ULF by Co-immunoprecipitation assay. Subsequently we investigated the influence of such interaction toward the stabilization of USP7 and ULF. We have discovered that the interaction has no effects on the protein levels of USP7, but stabilizes ULF. Moreover, we demonstrated that the deubiquitinating enzyme activity of USP7 is required for its mediated stabilization of ULF. In conclusion, USP7 maybe deubiquitinate ULF. Additionally, USP7 could interact with the tumour suppressor ARF. The obtained conclusions is significant for clarifying the regulation of ULF-mediated ubiquitination, providing fundamental support for further investigation.

Key words: ARF, ULF, USP7.

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	II
目 录.....	IV
Table of contents	V
1. 前 言.....	1
1.1 ARF 蛋白综述.....	1
1.2 泛素化与去泛素化.....	12
1.3 ULF 蛋白综述.....	19
1.4 USP7 蛋白综述	24
1.5 研究内容和意义.....	33
2. 材料与方 法	34
2.1 实验材料.....	34
2.2 实验仪器.....	38
2.3 实验方法.....	39
3. 结果与分析	49
3.1 USP7 与 ULF 的结合	49
3.2 USP7 对 ULF 的蛋白水平的影响	54
3.3 USP7 与 ARF 结合	59
4. 讨 论.....	62
5. 结论与展望	65
6. 参考文献	66
致 谢.....	77

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
1. Introduction	1
1.1 The Tumour Suppressor ARF	1
1.2 Ubiquitination and Deubiquitination	12
1.3 Ubiquitin Ligase ULF	19
1.4 Deubiquitinating Enzyme USP7	22
1.5 Objectives	33
2. Materials and Methods	34
2.1 Materials	34
2.2 Equipments	38
2.3 Methods	39
3. Results	49
3.1 The Interaction of USP7 and ULF	49
3.2 Influence of USP7 Toward the Protein Levels of ULF	54
3.3 The Interaction of USP7 and ARF	59
4. Discussion	62
5. Prospectives	65
6. References	66
Acknowledgements	77

1 前言

1.1 ARF蛋白综述

1.1.1 ARF蛋白

*INK4a-ARF*基因座由于阅读框架的移位，从而可以编码两个不同的蛋白质p16^{INK4a}和ARF^[1,2]。p16^{INK4a}是一个16 KD的小蛋白，属于INK4家族的一员，对细胞周期蛋白依赖性激酶CDK4和CDK6的激酶活性起负性调控作用^[3]。ARF是alternative reading frame的简称，中文名为选择性框架蛋白，在小鼠体内分子量为19 KD (p19^{ARF})，而在人体内则为14 KD (p14^{ARF})。

p16^{INK4a}和ARF都是重要的肿瘤抑制因子，分别通过p16^{INK4a}-CDK4/6-pRb-E2F和ARF-MDM2/ARF-BP1-p53信号途径来调控细胞周期、抑制肿瘤发生^[4-6]。ARF普遍存在于真核生物，目前的研究主要集中于人类和小鼠体内的ARF。

1.1.2 ARF的基因结构

*INK4a-ARF*基因座位于人类基因组第9号染色体短臂2区1带(9p21)，而小鼠的同源基因则位于第4号染色体。以人类的*INK4a-ARF*基因座为例，其DNA长度约30 kb，包含1 α 、1 β 、2和3四个外显子。p16^{INK4a}由外显子1 α 、2和3编码，p14^{ARF}则由外显子1 β 、2和3编码，外显子2和3为二者共享。p14^{ARF}的阅读框开始于第一个外显子1 β (距p16^{INK4a}的第一个外显子1 α 约20 kb)，终止于外显子2，外显子3为3'端非翻译区。虽然p16^{INK4a}和p14^{ARF}拥有相同的外显子，但其阅读框架不同，所编码的蛋白质氨基酸序列完全不同^[7]。

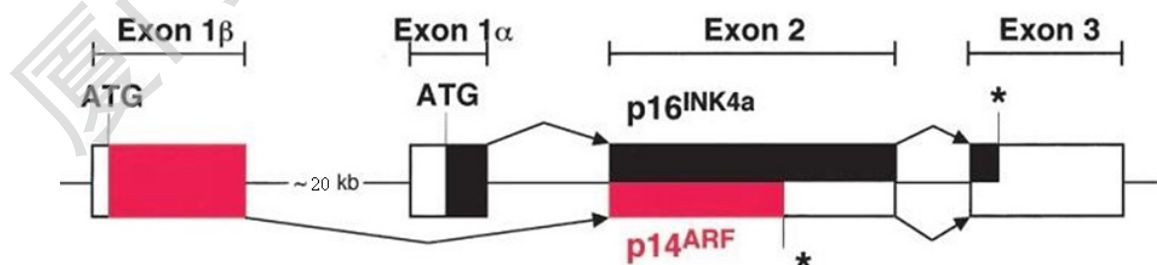


图1.1 人类中*INK4a-ARF*基因座结构图

Fig 1.1 The *INK4a-ARF* locus in human

注：本图引自Charles J. Sherr: Divorcing ARF and p53: an unsettled case. Nature Reviews Cancer, 2006 6: 663-673.

1.1.3 ARF的蛋白结构

小鼠的 p19^{ARF} 含有 169 个氨基酸，其分子量为 19238 Da，人的 p14^{ARF} 则含有 132 个氨基酸，分子量为 13902 Da。二者均为疏水性蛋白，富含精氨酸 (Arg)，其含量高达 20%。

p19^{ARF} 和 p14^{ARF} 转录和翻译的起始位点都相同，所产生的两个蛋白之间的同源性为 50%，前 14 个氨基酸中有 11 个相同，这一区域拥有 ARF 的许多功能，包括核定位、MDM2 结合等^[8,9]。

p14^{ARF} 蛋白根据结构和功能上的不同，可以简单的分为以下几个区域：

(1) N 端区域 (1-64aa)，由外显子 1 β 编码，几乎集中体现了 ARF 的功能。其中 1-14aa 为 MDM2 结合位点和核定位序列^[8,9]；

(2) C 端区域 (65-132aa)，由外显子 2 编码，其中 83-101aa 为核定位序列^[8]。

绝大多数的 ARF 结合蛋白都是与 ARF 的 N 端区域结合，但也有例外，拓扑异构酶 I 和线粒体蛋白 p32/C1QBP 就与 ARF 的 C 端区域结合^[10]。

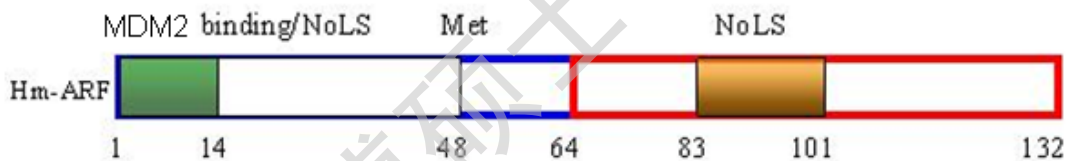


图1.2 人类ARF蛋白的结构示意图

Fig 1.2 A diagrammatic show of ARF protein in human

2006年，研究者首次发现，在 p19^{ARF} 和 p14^{ARF} 中除了起始氨基酸为甲硫氨酸 (Met) 外，在内部还含有一个甲硫氨酸 (分别为 Met45和 Met48)，这是其它物种的 ARF 蛋白所没有的。当小鼠或人类的 ARF 蛋白从内部 Met 起始翻译时，将会产生截短了的 ARF 蛋白。免疫定位与生化分离研究结果表明，这种截断了的 ARF 蛋白分布于线粒体，被称为 smARF (short mitochondria ARF) ^[11,12]。

1.1.4 ARF 蛋白的生物功能及分子机制

1.1.4.1 ARF 在肿瘤抑制中的作用

(1) ARF 抑制肿瘤的发生

从 1995 年被发现起，多项实验证据证明 ARF 引起细胞周期阻滞、诱导凋亡，抑制肿瘤的发生^[13]。细胞中 p19^{ARF} 的过表达，细胞周期将阻滞在 G₁/S 期和 G₂/M

期^[1]。Abelson 鼠白血病病毒(Ab-mlv)介导转化的前 B 细胞中, p19^{ARF} 过表达时, 表现出凋亡症状, 而在 *ARF* 缺失的细胞中则相反^[14]。*INK4a-ARF* 基因在急性淋巴细胞白血病、胆管癌、鼻咽癌、间皮细胞癌、星型胶质母细胞瘤、多发性神经胶质母细胞瘤等恶性肿瘤中频发缺失, 而且纯合缺失 *INK4a-ARF* 基因的细胞容易发生恶性转化^[13]。

(2) ARF 通过 p53 途径抑制肿瘤的发生

肿瘤抑制功能主要体现在激活 p53 信号通路, 介导细胞周期阻滞或凋亡^[15]。ARF 可以调节 p53 的两个 E3(泛素连接酶), 属于 Ring 类 E3 的 MDM2 (mouse double minute 2, 小鼠双微体蛋白 2, 人类中同源物为 HDM2) 和属于 HECT 类 E3 的 ARF-BP1/Mule (ARF-binding protein 1/Mcl-1 ubiquitin ligase E3, ARF 结合蛋白 1/ Mcl-1 的泛素连接酶 E3)。MDM2、ARF-BP1/Mule 在各种类型的肿瘤细胞中高表达, 削弱 p53 的肿瘤抑制功能。

大多数正常组织中, ARF、MDM2 以及 p53 的蛋白水平都很低。MDM2 与 p53 结合, 促进其泛素化降解, 抑制其相关功能。在异常的促有丝分裂信号如原癌基因 *ras* 过表达的作用下, *INK4a-ARF* 基因的表达被激活, ARF 的蛋白水平上调。

ARF 以两种方式通过 MDM2 激活 p53。一方面, ARF 募集 MDM2 进入核仁, 将 MDM2 限制在核仁内, 核质中的 p53 就从 MDM2-p53 调控的降解中释放出来^[16]。另一方面, ARF 与 MDM2 结合, 直接抑制 MDM2 的泛素连接酶活性, 阻碍 p53 的泛素化、核输出和随后的降解, 从而激活 p53^[17]。研究表明, ARF 与 MDM2 的 C 端结合, 而 p53 与 MDM2 的 N 端结合, 即 ARF 和 p53 以非竞争性的方式分别结合 MDM2 的两个不同区域。

除了 MDM2, ARF 还可以通过 ARF-BP1/Mule 调节 p53 信号通路^[18]。应用 siRNA 敲低 ARF-BP1/Mule, p53 的半衰期明显延长, 其下游靶基因表达增强, 依赖于 p53 的凋亡应答被激活。同 ARF 抑制 MDM2 的机制一样, ARF 与 ARF-BP1/Mule 结合, 抑制后者的 E3 活性, 激活 p53。

当 ARF 通过抑制 MDM2 和 ARF-BP1 激活 p53 后, p53 作为转录因子促进下游靶基因转录表达 p21、BAX、PUMA、NOXA 等^[19,20]。这些蛋白通过相关信号通路诱导细胞周期阻滞或凋亡, 从而抑制肿瘤的发生。

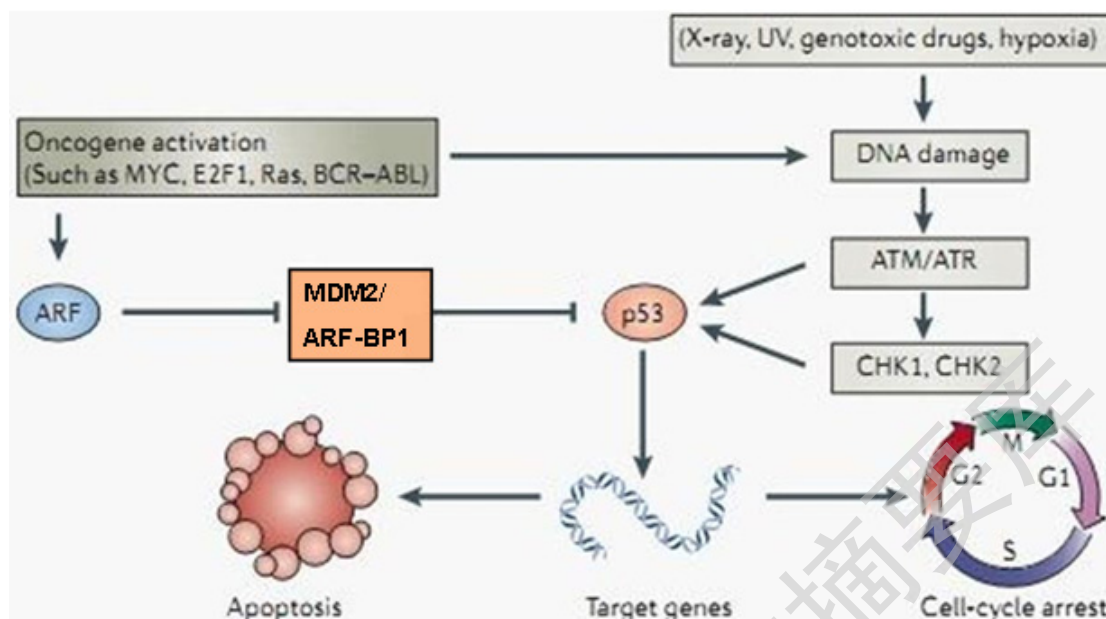


图1.3 ARF-MDM2/ARF-BP1-p53信号通路

Fig 1.3 The ARF-MDM2/ARF-BP1-p53 signaling pathway

注：本图引自Charles J. Sherr: Divorcing ARF and p53: an unsettled case. Nature Reviews Cancer, 2006 6: 663-673.

(3) ARF 通过非 p53 途径抑制肿瘤的发生

进一步研究发现，ARF 也可以通过非 p53 途径发挥肿瘤抑制功能^[21]。在 p53 缺失的细胞中，过表达 p19^{ARF} 会抑制细胞增殖，尽管效果没有在 p53 野生的细胞中明显^[22]。ARF 和 p53 双敲除 (DKO) 的原代小鼠成纤维细胞和 B 淋巴细胞比 ARF 或 p53 单敲除的细胞生长速率快^[23]。ARF、p53、MDM2 三敲除(TKO)的小鼠比 p53、MDM2 双敲除(DKO)的小鼠更容易患癌症^[24]。

过去近二十年的研究中，研究者发现了大量 ARF 结合蛋白，包括转录因子如 E2F-1、c-Myc、N-Myc、NF-κB、DP-1、FOXO1b 和核仁蛋白如 NPM、核仁素以及其他各种蛋白^[25,26]。ARF 正是通过与这些蛋白相互作用，以非 p53 途径调控细胞增殖和凋亡，抑制肿瘤发生。

E2F-1 是细胞中重要的转录因子 E2Fs 的一员，其主要功能是促进靶基因转录表达与 DNA 合成相关的酶类（如 DNA 聚合酶、胸苷激酶），使细胞周期由 G₁ 向 S 期转化^[27-29]。研究表明，p53 缺失的细胞中，过表达 p19^{ARF} 会加速 E2F-1 的降解，引起细胞周期阻滞^[30, 31]。

原癌基因 Myc 所编码的 Myc 蛋白也是细胞中重要的转录因子。以 c-Myc 为例，其主要功能是调控细胞增殖、促进转化和诱导凋亡，其蛋白水平的上升会导

致肿瘤产生^[32]。不管 p53 是否存在, ARF 均可以和 c-Myc-MAX 复合物直接结合, 选择性地调控 c-Myc 的功能。c-Myc 激活 *hert*、*cull* 等相关基因转录、引起细胞过度增殖和转化的功能被抑制, 而对其阻抑 *gadd45*、*pdgfr* 等相关基因转录、诱导凋亡的活性却没有影响^[33]。另一项的研究也证实, 非 p53 条件下, ARF 也可以选择性调控 Myc 家族另外一个成员 N-Myc 的相关功能^[34]。

细胞中另外一种转录因子 NF- κ B 的活化, 可以引起细胞凋亡的抑制。ARF 通过两种方式抑制 NF- κ B 的转录活性, 使细胞对 TNF- α 所诱导的凋亡更加敏感^[35]。一方面, ARF 促进 NF- κ B 家族成员 RelA(p65)与 HDAC1 (组蛋白去乙酰化酶)的结合, 抑制 RelA 的活性^[35]。另一方面, ARF 通过 ATR (ATM 相关激酶)和 ChkI (细胞周期检测点激酶 I) 磷酸化 RelA 转录激活区域内的 Thr505 位点, 磷酸化后其相关转录活性被抑制^[36]。

p19^{ARF} 可以通过减缓 47S/45S 前体的分裂和阻止 32S 前体形成 28S 和 5.8SrRNA 来影响 rRNA 加工过程, 这些效应不依赖于 p53, 但是却与另外一种蛋白质 NPM 相关^[37]。NPM 是 nucleophosmin 的简称, 中文名为核磷蛋白。该蛋白定位于核仁, 在肿瘤细胞中高表达, 其功能多样如参与核糖体生物合成、控制中心体复制^[38]。核仁内 NPM 和 ARF 相互作用, 结合核糖体 60S 前体以影响核糖体形成, 进而抑制细胞生长^[39]。研究表明, ARF 与 NPM 的结合, 介导后者的降解^[40]。

尽管细胞中 ARF 通过非 p53 途径抑制肿瘤发生的具体机制尚未明确, 但有研究表明, 人体细胞中过表达 p14^{ARF}, 会促进某些相关蛋白如 HDM2、WRN、E2F-1、NPM 的 SUMO 化修饰, 而且与 p53 的转录活性无关^[25]。

SUMO 化修饰是指底物蛋白通过一系列酶促反应, 共价连接上一个类泛素蛋白 SUMO (small ubiquitin related modifier)。SUMO 化修饰的效应是多样性的, 能够影响蛋白转运、基因表达调节 (通常会引起表达下行调节, 但并不绝对)、泛素化、DNA 修复、着丝粒染色质粘着。因此研究者认为, 促使靶蛋白 SUMO 化修饰是 ARF 行使其非 p53 依赖性功能的一种普遍机制^[25]。但是, ARF 是如何启动 SUMO 化这一过程, 仍然是一个未解之谜。

1.1.4.2 ARF 能够促进某些肿瘤的产生

令人意外的是, ARF 作为肿瘤抑制因子, 却在一部分肿瘤如 50%的 Burkitt's

淋巴瘤的细胞中高水平表达^[41]。在 Ras 引起的肿瘤中，ARF 基因沉默可抑制肿瘤发生^[42]。以上现象均暗示，ARF 可以促进某些肿瘤的发生。

(1) 自噬作用与肿瘤

自噬作用是普遍存在于大部分真核细胞中的一种现象，是溶酶体对自身结构的吞噬降解，它是细胞内的再循环系统。自噬作用主要是清除降解细胞内受损伤的细胞结构、衰老的细胞器、以及不再需要的生物大分子等。自噬作用在消化的同时，也为细胞内细胞器的构建提供原料，即细胞结构的再循环。

自噬作用是一种进化上高度保守的细胞自我平衡过程。这一过程对于细胞生存是必需的，尤其是在营养饥饿时，自噬作用能够明显地提高细胞生存的能力。敲除自噬作用相关基因的小鼠在母体内发育正常，出生后，短时间的营养饥饿就会引起死亡^[43]。

由于自噬作用可提高细胞的生存能力，所以也会被肿瘤细胞所利用。遗传学研究表明，自噬作用参与肿瘤形成和生长阶段，并且扮演着不同的角色。自噬作用抑制肿瘤的形成，敲除自噬作用相关基因如 *Beclin-1* 的小鼠易于形成多种肿瘤，包括淋巴瘤和肝癌。但是肿瘤一旦形成，自噬作用则可以促进肿瘤的生长，使用自噬作用的抑制剂如氯喹宁、3-甲基嘌呤，可有效地对抗 Burkitt's 淋巴瘤和慢性骨髓淋巴瘤^[43]。

对于上述现象，该领域通用的观点认为，自噬作用可清除细胞中损坏的线粒体、错误折叠的蛋白质，从而降低 ROS 水平和基因损伤，最终抑制肿瘤的形成。而对于已经形成的肿瘤，面对周围环境压力，自噬作用可以提高其生存能力^[42]。

(2) smARF 和全长的 ARF 促进自噬作用及其分子机制

科学家最近发现 ARF 参与细胞自噬作用，营养缺失条件下，ARF 蛋白水平显著上升^[44-46]。而进一步的研究发现，smARF 和全长的 ARF 均能调节自噬作用^[45-47]。

从 ARF 内部 Met (人类为 Met48，小鼠为 Met45) 为起始点翻译的蛋白质定位于线粒体，被称为 smARF。smARF 的半衰期很短，在体内很快就会被蛋白酶体所降解，所以 smARF 在 ARF 总蛋白量中占得比例非常小，只有 5% 左右。实验证明，过表达 smARF 会促进自噬作用从而引起线粒体膜电位异常。通过瞬时转染而导致的 smARF 的高水平表达，最终会导致细胞在自噬作用的指示下走向

死亡，而这一过程是非 p53 依赖的，也与 caspase 途径无关^[48]。

关于全长的 ARF 蛋白是否也会诱导自噬作用，至今的研究结论并不一致。一项研究证明，在细胞中转染 ARF 的突变体(内部 Met 被突变为另一个氨基酸)，仍然会诱导自噬作用的发生^[44]。与此相反，另一个研究小组所公布的数据则认为，核仁中全长的 ARF 是无法诱导自噬作用的，只有当 ARF 得蛋白量处于非生理水平，在核仁外区间也能观察到的时候，全长的 ARF 才能诱导自噬作用的发生^[49]。

利用二维双向电泳技术，人们发现 ARF 与线粒体蛋白 Bcl-x1 相互结合^[47]。Bcl-x1 是 Bcl2 家族成员之一，在体内与 Beclin-1 相结合，负性调节 Vps34/Beclin-1 复合体的激酶活性，从而抑制自噬作用。ARF 则抑制了 Bcl-x1 与 beclin-1 的结合，最终诱导自噬作用的发生。由于与 Bcl-x1 结合的 ARF 只占其总量的一小部分，所以毫无疑问除了通过调节 Bcl-x1 和 Beclin-1 的结合外，ARF 还可以通过其它未知的机制诱导自噬作用。

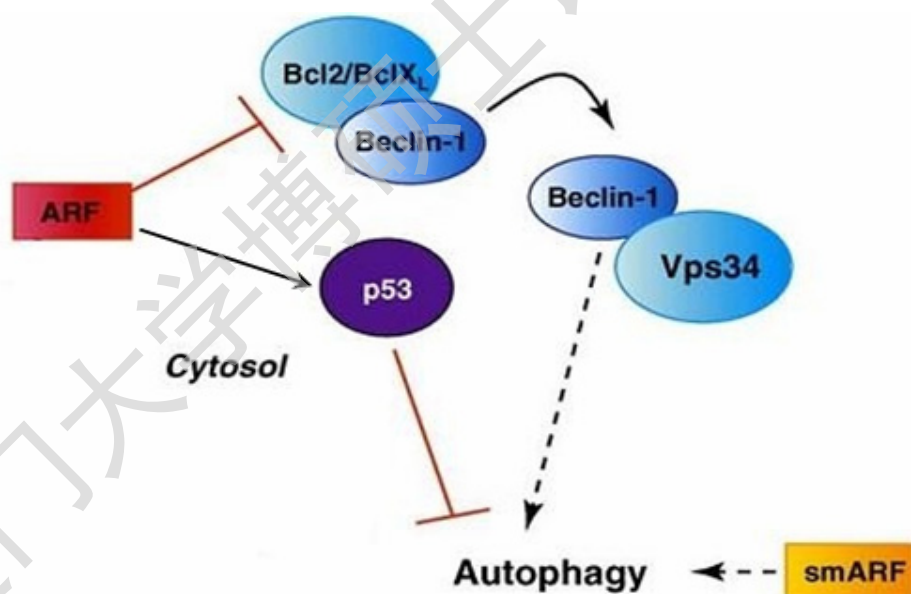


图1.4 ARF和smARF对自噬作用的调节

Fig 1.4 The regulation of autophagy by ARF and smARF

注：本图引自Balaburski,G.M, R.D. Hontz: p53 and ARF: unexpected players in autophagy. Trends Cell Biol, 2010 20: 363-369.

ARF 可以稳定 p53，而研究发现细胞质基质的 p53 对自噬作用也有调节作用。其具体机制比较复杂，这里不加以赘述。

(3) ARF 通过促进自噬作用促进某些肿瘤的发生

有实验小组研究发现，B 淋巴瘤细胞（该细胞 *p53* 缺失，*ARF* 高表达）中 *ARF* 敲除后，不仅细胞的自噬作用下降，在体内肿瘤形成能力也受到了抑制，该结果也与 *ARF* 和自噬作用对细胞有保护作用这一论点相契合^[43]。该实验小组随后的实验结果也是对这一论点的有力支持，营养缺失条件下，*ARF* 敲除的淋巴瘤细胞和小鼠胚胎成纤维细胞的生存能力也下降。以上这些数据也许能够解释在很大一部分 *p53* 突变的肿瘤细胞中 *ARF* 高表达的原因。

正常情况下，*ARF* 敲除会加剧肿瘤发生，当然其中的部分原因是因为 *ARF* 对 *p53* 的稳定作用^[26]。而一项在动物模型中的实验结果表明，*ARF* 促进某些肿瘤的形成^[50]。肿瘤抑制因子 *PTEN* 可以通过抑制 *AKT* 的活性从而抑制自噬作用的负性调节者—*mTOR*，最终激活自噬作用。在小鼠中 *PTEN* 单敲除，最终会导致前列腺癌的发生。*PTEN* 和 *ARF* 双敲除后，则抑制前列腺癌的发生。其中一种假说认为，由 *PTEN* 缺失而引起的自噬作用抑制因为 *ARF* 的缺失更加严重，肿瘤细胞中自噬作用水平太低而无法生存。

令人惊奇的是，直至近几年人们才开始认识到 *ARF* 能够促进某些肿瘤的产生。这可能是因为 *ARF* 和自噬作用对细胞的保护作用只局限于某些特定的肿瘤和组织类型。例如在原代淋巴瘤细胞中，*ARF* 敲除后，细胞生存能力和肿瘤形成能力均下降。与此相反，在 *p53* 缺失的肉瘤细胞中，敲除 *ARF* 后，尽管自噬作用明显的得到了抑制，但肿瘤形成能力却上升^[51]。在某些肿瘤细胞中，敲除与自噬作用相关的基因如 *Beclin-1*，细胞生长能力受到限制，但在另外一些肿瘤细胞中结果却相反^[42]。

1.1.4.3 *ARF* 调控眼部 HVS 的发育

随着对 *ARF* 的深入研究，科学家发现，*ARF* 在小鼠的个体发育过程中对眼睛的发育起调控作用。*ARF* 失活的小鼠中，HVS（hyaloid vascular system，玻璃体血管系统）内血管周细胞异常聚集，阻碍其退化，最终导致失明。

内皮细胞分泌的 PDGF（porcine platelet-derived growth factor，血小板衍生生长因子）和毛细血管外膜样细胞表面的 *Pdgfrβ*（PDGF receptor β ，PDGF 受体 β ）结合，诱导细胞增殖，促使毛细血管外膜样细胞聚集。*p19^{ARF}* 抑制 *Pdgfrβ* 基因转录，减少 *Pdgfrβ* 的含量，调节 HVS 的退化。而后续的研究证明，此过程不依赖 *MDM2* 和 *p53*^[52,53]。

1.1.5 对ARF的调控

1.1.5.1 从转录前水平对ARF的调控

*ARF*作为重要的抑癌基因,在许多人类肿瘤细胞(如肺癌细胞、皮肤癌细胞、神经胶质瘤、黑色素瘤、鼻咽癌、乳腺癌、白血病等)中常常是失活的。其失活机制主要是基因缺失、内部基因突变、启动子甲基化三种^[13]。

(1) 基因缺失 包括两个等位基因纯合缺失和一个等位基因缺失而另一个等位基因突变这两种方式。*INK4a-ARF*基因失活的主要方式是纯合缺失,在人类肿瘤细胞中高达14%,普遍发生于宫颈癌、神经胶质瘤、肺癌、白血病。细胞中缺失常常发生在整个*INK4a-ARF*基因座位点,伴有 $p16^{INK4a}$ 和邻近的 $p15^{INK4b}$ 的缺失^[54,55]。

(2) 内部基因突变 突变点通常发生在外显子2,直接影响 $p16^{INK4a}$ 和ARF蛋白的氨基酸序列,也有一部分发生在外显子1 α ,只影响 $p16^{INK4a}$ 的编码区,目前还没有检测到关于外显子1 β 的突变。研究表明,除家族性黑色素瘤、胆总管癌(63%)和胰腺癌(41%)以外,人类原发肿瘤的*INK4a-ARF*基因的突变发生率非常低,只有5%左右^[56]。

(3) 启动子甲基化 *INK4a-ARF*基因座5'端启动子中的cpG岛(又称HTF岛)富含GC,此区高度甲基化可影响启动子功能,导致基因转录受阻^[57]。在一些不发生或少发生*INK4a-ARF*基因纯合缺失和突变的肿瘤如结肠癌中,甲基化频率通常很高^[58]。

值得一提的是,同一种肿瘤中*INK4a-ARF*基因失活的方式并不是单一的,有时候会几种方式同时作用。

1.1.5.2 从转录水平对ARF的调控

(1) 对ARF的转录激活的调控

正常细胞和组织中(小鼠卵黄囊、胚胎的眼睛除外),ARF的表达水平很低。但是异常的促有丝分裂信号(如原癌基因持续活化,原癌蛋白过度表达)会引起*INK4a-ARF*的启动子改型,诱导其表达^[59]。与p53不同,DNA损伤并不直接诱导ARF的表达,且ARF的诱导缓慢、不可逆^[60]。

研究表明,细胞中E2F1、Myc、Ras、DMP1、E1A、JunB、V-ab1均可以激活*INK4a-ARF*的表达,从转录水平调节ARF。

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