

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 21620110153969

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

# GABP作为Hippo信号通路新成员在促生长和 抗氧化功能方面的机理研究

## Mechanism of GABP, a Novel Component of the Hippo Pathway, in Growth and Antioxidant Defense

吴贇坦

指导教师姓名: 周大旺 教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2014年 10月

论文答辩时间: 2014年 月

学位授予日期: 2014年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2014年 10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

Hippo 信号通路是一条在进化上高度保守的激酶级联的信号转导通路，它能够负调控转录共激活因子 YAP 及其同源物 TAZ。Hippo 信号通路中任意成员的缺失均能造成 YAP 的激活并导致细胞增殖的增加，细胞凋亡的减少，器官变大以及肿瘤的发生。YAP 是一个原癌基因，在许多人类癌症疾病中，YAP 的蛋白水平及其细胞核定位都是增加的。研究表明，YAP 的蛋白水平是其行使其原癌基因功能的一个非常重要的方面。尽管已经有许多文章探讨了 YAP 磷酸化修饰，降解及其细胞核定位调控的具体机制，但关于 YAP 基因的表达是如何被调控的仍有待阐明。

在研究中我们发现了 Ets 转录因子家族成员 GABP 能够和 YAP 基因的启动子结合并激活 YAP 的转录。敲除 GABP 能够下调 YAP 基因的表达，从而导致细胞阻滞在 G1/S 期以及凋亡细胞数目的增加，然而，这一现象在过表达 YAP 后就得到了缓解。已有相关报道指出，氧化应激能够抑制 GABP 的转录活性，而我们的研究则揭示了醋氨酚能够清除谷胱甘肽，导致氧化性的环境，进而抑制 GABP 的转录活性，最终造成 YAP 基因表达的下调。相反，Mst1/Mst2 缺失导致的 YAP 的激活则能够抵抗醋氨酚所诱导的肝损伤。在机理研究方面，我们发现，与 Hippo 信号通路对 YAP 的调控方式类似，Hippo 信号通路能够通过磷酸化修饰以及蛋白与蛋白间相互作用来抑制 GABP 的转录活性。通过对人类肝癌样品的分析，我们进一步揭示了 YAP 基因的表达与 GABP 的相关性，阐明了 GABP 在肝癌发生发展过程中的重要作用。

综上所述，我们的研究结果表明，GABP 作为调控 YAP 基因表达的一个重要的转录因子，参与了人类肝癌的发生与发展过程。并且，与 YAP 相类似，GABP 也能够被 Hippo 信号通路所负调控。因此，GABP 就成为人类肝癌以及其它由 YAP 驱动的一个潜在的治疗靶点。

**关键词：**Yes 相关蛋白；Ets 家族；GABP；肝癌





## Abstract

The Hippo pathway is an evolutionarily conserved protein kinase cascade that negatively regulates the transcriptional coactivator Yes-associated protein (YAP) and its paralog, TAZ. The loss of any component of this pathway results in a YAP-dependent increase in proliferation, resistance to apoptosis, massive organ overgrowth and tumorigenesis. YAP is a candidate oncogene in humans because YAP protein expression and/or nuclear localization levels are elevated in many human cancers. This and other findings indicate that regulation of YAP's protein level is a very important aspect of its oncogenic function. Although numerous studies have investigated YAP phosphorylation, degradation, and nuclear localization, how Yap gene expression is regulated remains unknown.

In this study, we demonstrate that the Ets family member GABP binds to the Yap promoter and activates YAP transcription. The depletion of GABP downregulates YAP, resulting in a G1/S cell-cycle block and increased cell death, both of which are substantially rescued by reconstituting YAP. GABP can be inactivated by oxidative mechanisms, and we show that acetaminophen-induced glutathione depletion inhibits GABP transcriptional activity and depletes YAP. In contrast, activating YAP by deleting Mst1/Mst2 strongly protects against acetaminophen-induced liver injury. Similar to its effects on YAP, Hippo signaling inhibits GABP transcriptional activity through both phosphorylation and direct protein-protein interaction. In human liver cancers, we demonstrate that enhanced YAP expression is correlated with increased nuclear expression of GABP, which is important in the progress of human hepatocellular carcinoma.

Taken together, these results suggest that GABP is a central regulator of Yap gene transcription and is involved in the development of human hepatocellular carcinoma. And similarly to YAP, GABP is negatively regulated by the Hippo kinase pathway. Thus, GABP emerges as a potential therapeutic target in human HCCs and

in other cancers driven by YAP.

**Key word:** Yes-associated protein(YAP); Ets family; GABP; Hepatocellular Carcinoma

厦门大学博硕士学位论文摘要库

# 目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	II
目 录.....	IV
Table of Contents.....	VI
第一章 前言.....	1
1.1 Hippo 信号通路概述.....	1
1.2 Hippo 信号通路的发现.....	1
1.3 Hippo 信号通路的组成.....	3
1.3.1 Mst1/2.....	3
1.3.2 WW45.....	5
1.3.3 Lats1/2.....	5
1.3.4 Mob1.....	6
1.3.5 YAP.....	7
1.3.6 TAZ.....	9
1.3.7 TEAD.....	10
1.4 Hippo 信号通路的上下游调控因子.....	11
1.4.1 Hippo 信号通路的上游调控因子.....	11
1.4.2 Hippo 的下游靶基因.....	12
1.4.2.1 Cyclin E.....	12
1.4.2.2 DIAP1.....	13
1.4.2.3 Ki67.....	13
1.4.2.4 c-myc.....	13

1.4.2.5 CCN2/CTGF .....	13
<b>1.5 Hippo 信号通路与肿瘤的相关性 .....</b>	<b>13</b>
<b>1.6 Ets 转录因子家族与 GABP .....</b>	<b>15</b>
1.6.1 Ets 转录因子家族 .....	15
1.6.2 GABP .....	16
<b>1.7 研究目的和意义 .....</b>	<b>17</b>
<b>第二章 实验材料与方法 .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 实验材料 .....</b>	<b>18</b>
2.1.1 细胞株、菌株和质粒资源 .....	18
2.1.2 实验小鼠 .....	18
2.1.3 人类肝癌组织样品 .....	18
<b>2.2 实验相关药品与试剂 .....</b>	<b>19</b>
<b>2.3 实验所需的主要仪器与耗材 .....</b>	<b>20</b>
<b>2.4 DNA 相关实验和方法 .....</b>	<b>22</b>
<b>2.4.1 大肠杆菌感受态细胞的制备和质粒转化 .....</b>	<b>22</b>
2.4.1.1 感受态细胞的制备 .....	22
2.4.1.2 质粒转化感受态细胞 .....	22
<b>2.4.2 质粒 DNA 的制备 .....</b>	<b>23</b>
2.4.2.1 小量提取质粒 DNA (STET 煮沸法) .....	23
2.4.2.2 中量提取质粒 DNA (碱裂解法) .....	23
2.4.2.3 大量提取质粒 DNA (CsCl 密度梯度离心法) .....	24
<b>2.4.3 质粒 DNA 的工具酶处理 .....</b>	<b>25</b>
2.4.3.1 DNA 的限制性内切酶消化 .....	25
2.4.3.2 线性 DNA 5'末端磷酸基团的移除 .....	25
<b>2.4.4 DNA 的回收和纯化 .....</b>	<b>25</b>
2.4.4.1 DNA 琼脂糖凝胶电泳 .....	25

2.4.4.2 从琼脂糖凝胶中回收 DNA.....	26
2.4.5 DNA 连接反应 .....	27
<b>2.5 PCR 相关实验.....</b>	<b>27</b>
<b>2.5.1 普通 PCR 反应.....</b>	<b>27</b>
<b>2.5.2 突变 PCR 反应.....</b>	<b>28</b>
<b>2.5.3 Real-Time PCR 反应.....</b>	<b>28</b>
2.5.3.1 细胞总 RNA 提取 .....	30
2.5.3.2 逆转录合成 cDNA .....	30
2.5.3.3 实时荧光定量 PCR.....	31
<b>2.6 细胞相关实验与方法 .....</b>	<b>32</b>
<b>2.6.1 细胞培养.....</b>	<b>32</b>
2.6.1.1 细胞培养基及相关溶液配制.....	32
2.6.1.2 细胞的培养和传代.....	33
<b>2.6.2 细胞转染.....</b>	<b>33</b>
<b>2.6.3 慢病毒的包装.....</b>	<b>34</b>
2.6.3.1 慢病毒的包装.....	34
2.6.3.2 慢病毒感染目的细胞.....	34
<b>2.6.4 腺病毒的包装.....</b>	<b>35</b>
2.6.4.1 腺病毒的包装.....	35
2.6.4.2 腺病毒感染目的细胞.....	36
<b>2.6.5 GSH 和 GSSG 的检测.....</b>	<b>36</b>
<b>2.6.6 MTT 法检测细胞存活率.....</b>	<b>38</b>
<b>2.6.7 平板克隆形成实验.....</b>	<b>39</b>
<b>2.6.8 Luciferase 转录活性分析.....</b>	<b>39</b>
<b>2.7 蛋白质相关实验与方法 .....</b>	<b>39</b>
<b>2.7.1 SDS-PAGE 蛋白电泳 .....</b>	<b>39</b>
<b>2.7.2 免疫共沉淀.....</b>	<b>41</b>
<b>2.7.3 重组蛋白提取和纯化.....</b>	<b>41</b>
<b>2.7.4 体外激酶实验.....</b>	<b>42</b>
<b>2.8 小鼠相关实验 .....</b>	<b>42</b>

2.8.1 小鼠基因型鉴定.....	42
2.8.2 对乙酰氨基酚 (APAP) 诱导的肝损伤小鼠模型.....	42
2.8.3 肝再生小鼠模型.....	43
2.8.4 谷草转氨酶 (AST/GOT) 和谷丙转氨酶 (ALT/GPT) 测定.....	44
2.8.5 小鼠肝细胞的分离与培养.....	44
2.8.6 小鼠组织全细胞裂解液的制备方法.....	44
2.8.7 免疫组化相关实验.....	45
2.8.7.1 组织包埋.....	45
2.8.7.2 组织切片.....	45
2.8.7.3 石蜡切片 HE 染色.....	45
2.8.7.4 免疫组织化学.....	46
<b>2.9 LivaK 法分析目的基因表达量.....</b>	<b>47</b>
<b>第三章 结果与分析.....</b>	<b>48</b>
<b>3.1 GABP 能够调控 YAP 基因的表达, YAP 是 GABP 下游的一个重 要的效应分子.....</b>	<b>48</b>
3.1.1 YAP 基因的表达受 GABP 调控.....	48
3.1.2 YAP 参与 GABP 对细胞周期及细胞存活的调控作用.....	49
3.1.3 在小鼠肝再生过程中, GABP 和 YAP 的表达呈现出一致性.....	50
3.1.4 GABP 的过表达能够上调 YAP 的蛋白水平并促进小鼠肝脏变大.....	52
<b>3.2 氧化还原反应对依赖于 GABP 的 YAP 基因的表达的调控作用</b>	<b>53</b>
3.2.1 氧化剂 DEM 处理能够下调抑制 GSH/GSSG 的比值, 并抑制 GABP 所介 导的 YAP 的转录激活.....	53
3.2.2 氧化剂 DEM 处理能够下调 YAP 及其靶基因的蛋白及 mRNA 水平.....	55
3.2.3 过表达 YAP 能挽救氧化剂 DEM 处理导致的细胞凋亡, 细胞周期阻滞以 及细胞增殖被抑制的现象.....	57
<b>3.3 在 Mst1/Mst2 双敲小鼠的肝脏中, YAP 基因表达增强, GABP 转 录活性增加.....</b>	<b>58</b>
3.3.1 Mst1/Mst2 双敲小鼠肝脏中 YAP 的 mRNA 水平上调.....	58

3.3.2 Mst1/Mst2 的缺失能导致小鼠肝脏中 GABP 的激活以及 YAP 蛋白水平的上调 .....	59
3.3.3 在 Mst1/Mst2 缺失的 HCC 细胞系中重新表达 Mst1 能够抑制 YAP 的表达, 但对 GABP 却没有影响 .....	61
3.4 Lats1 能够结合 GABP $\beta$ 并促进其磷酸化, 进而抑制 GABP $\beta$ 的二聚化及其细胞核定位 .....	62
3.4.1 Lats1 和 GABP $\beta$ 1 相互作用 .....	62
3.4.2 Mst2/Lats1 的过表达能够促进 GABP $\alpha$ 或者 $\beta$ 1 定位在细胞质中 .....	62
3.4.3 过表达 Mst2/Lats1 能够抑制 GABP $\beta$ 1L 同源二聚体的形成 .....	65
3.4.4 Lats1 通过 GABP $\beta$ 1 的核定位序列与其相互作用 .....	65
3.4.5 Lats1 在体外直接磷酸化 GABP $\beta$ 1 .....	66
3.4.6 Lats1 能够促进 GABP $\beta$ 第 170 位丝氨酸的磷酸化 .....	67
3.4.7 Lats1 通过磷酸化 GABP $\beta$ 第 170 位丝氨酸, 促进其与 14-3-3 蛋白的相互作用, 并抑制其转录活性 .....	67
3.5 对乙酰氨基酚诱导肝损伤的原因: GABP 的失活以及 YAP 基因表达的减少 .....	70
3.5.1 Mst1/Mst2 的缺失能导致小鼠肝脏处于一个相对还原的环境 .....	70
3.5.2 对乙酰氨基酚 (APAP) 处理能够抑制 YAP 基因的表达 .....	71
3.5.3 过表达 YAP 能够抑制 APAP 所诱导的肝损伤 .....	72
3.5.4 YAP 与抗氧化功能相关 .....	76
3.5.5 过表达 YAP 或者 GABP 能够提高 APAP 处理后小鼠的存活率 .....	77
3.6 人类肝癌中 Hippo 信号通路失调和 GABP 及 YAP 的细胞核定位增加相关 .....	79
第四章 讨论与展望 .....	81
参 考 文 献 .....	84
致 谢 .....	99





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.

廈門大學博碩士論文摘要庫