

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620100153928

UDC_____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

FOXO1/3/4 通过转录调控 PDGFRA 的表达参与调节神经母细胞瘤细胞分化

Regulation of neuroblastoma differentiation by forkhead transcription factors FOXO1/3/4 through the receptor tyrosine kinase PDGFRA

梅杨

指导教师姓名: 尤涵 教授

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2013 年 5 月

论文答辩时间: 2013 年 6 月

学位授予日期: 2013 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2013 年 6 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

目录

目录	I
TABLE OF CONTENT	VI
摘要	XII
Abstract	XIII
第一章 前言	1
1.1 神经母细胞瘤	1
1.1.1 神经母细胞瘤的起源.....	1
1.1.2 神经母细胞瘤的体外分化模型	2
1.1.2.1 神经营养因子及其受体表达与 NB 细胞分化.....	3
1.1.2.2 基因过表达诱导 NB 细胞神经突触形成	4
1.1.2.3 血清饥饿诱导 NB 细胞分化.....	5
1.1.2.4 视黄醇类化合物 (Retinoids) 诱导 NB 细胞分化.....	6
1.1.2.5 弗波酯 TPA 诱导 NB 细胞分化.....	10
1.1.3 参与调控神经母细胞瘤细胞分化的信号通路	12
1.2 血小板衍生生长因子受体-PDGFR	13
1.2.1 血小板衍生生长因子-PDGF 的发现、类型及结构	13
1.2.2 PDGF 受体 (PDFGR) 的类型、结构及其与配体的结合	14
1.2.3 PDGF-PDGFR 参与的信号通路及表达调控研究	16
1.2.4 PDGFR 与神经母细胞瘤细胞分化的研究进展.....	18
1.3 转录因子 FOXO 研究进展	20

1.3.1 概述.....	20
1.3.2 FOXO 转录因子的蛋白结构.....	21
1.3.3 FOXO 蛋白表达及转录活性的调控.....	22
1.3.3.1 调控 FOXO 转录的相关研究.....	22
1.3.3.2 FOXO 蛋白的翻译后修饰.....	22
1.3.3.2.1 FOXO 的磷酸化.....	23
1.3.3.2.2 FOXO 的乙酰化.....	25
1.3.3.2.3 FOXO 的泛素化.....	26
1.3.3.2.4 FOXO 的糖基化.....	28
1.3.3.2.5 FOXO 的甲基化.....	29
1.3.3.3 microRNA 调控 FOXO 表达.....	30
1.3.4 FOXO 的生物学功能.....	34
1.3.4.1 细胞周期调控.....	34
1.3.4.2 细胞增殖、凋亡与分化.....	36
1.3.4.3 DNA 损伤修复.....	38
1.3.4.4 抗氧化应激.....	38
1.3.4.5 代谢调控.....	39
1.3.4.6 干细胞的干性及稳态维持.....	40
1.3.4.7 细胞自噬.....	41
1.3.5 FOXO 参与神经系统发育的研究概况.....	42
1.4 立题背景、内容及意义.....	43
第二章 材料和方法.....	44
2.1 材料.....	44
2.1.1.菌株.....	44
2.1.2 细胞株.....	44

2.1.3 主要试剂.....	44
2.1.4 主要仪器.....	47
2.1.5 质粒载体.....	49
2.1.5.1 pLV-H1-EF1 α -puromycin/Blasticidin	49
2.1.5.2 pGL3 basic.....	49
2.1.5.3 pBabe Puro.....	50
2.1.5.4 pLVX-IRES-Neo	51
2.1.5.5 pGEX-4T-1.....	52
2.1.5.6 pBluescript II KS.....	52
2.2 DNA 相关试验方法.....	54
2.2.1 大肠杆菌感受态细胞的制备	54
2.2.2 DNA 样品琼脂糖凝胶电泳	55
2.2.3 琼脂糖凝胶中 DNA 片段的回收.....	56
2.2.4 目的片段的连接与转化.....	56
2.2.5 质粒 DNA 的提取.....	57
2.2.5.1 小规模质粒 DNA 的提取.....	57
2.2.5.2 大规模质粒 DNA 的提取 (CsCl 密度梯度离心纯化 DNA)	57
2.2.6 基因组 DNA 的提取.....	58
2.2.7 PCR 反应.....	59
2.2.8 RNA 的提取及逆转录.....	61
2.2.9 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)	62
2.2.10 RNA 干扰载体的构建	62

2.3 细胞培养及相关实验	65
2.3.1 细胞的培养	65
2.3.2 细胞传代.....	66
2.3.3 细胞转染及病毒感染.....	66
2.3.3.1 磷酸钙瞬时转染.....	66
2.3.3.2 脂质体转染.....	67
2.3.3.3 病毒包装及感染.....	67
2.3.4 BrdU 染色及流式细胞术分析	68
2.4 蛋白相关实验方法	70
2.4.1 全细胞裂解物的制备.....	70
2.4.2 蛋白浓度测定 (BCA 法)	70
2.4.3 蛋白质的 SD-PAGE 电泳与 Western blotting 分析.....	71
2.4.4 荧光素酶活性检测.....	73
2.4.5 染色质免疫共沉淀.....	75
2.4.6 融合蛋白的表达和纯化.....	78
2.4.7 谷光苷肽巯基转移酶沉淀试验	78
2.4.8 细胞分化形态观察及神经突触长度测量统计分析.....	79
2.4.9 数据统计分析及图片处理	79
第三章 实验结果与讨论	80
3.1 结果	80
3.1.1 FOXO 家族成员参与调控 PDGFRA 基因的表达.....	80
3.1.2 FOXO 与 PDGFRA 基因的启动子区域直接结合.....	88

3.1.3 PDGFRA 参与调控神经母细胞瘤细胞的分化.....	91
3.1.4 FOXO 参与调节神经母细胞瘤细胞的分化.....	94
3.1.5 PDGFRA 介导 FOXO 对神经母细胞瘤细胞分化的调节	99
3.2 讨论.....	101
参考文献.....	108
致谢.....	134

厦门大学博硕士学位论文摘要

TABLE OF CONTENT

Table of Content(In Chinese)	I
Table of Content(In English)	VI
Abstract(In Chinese)	XII
Abstract(In English)	XIII
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Neuroblastoma	1
1.1.1 The origin of neuroblastoma	1
1.1.2 The differentiation model of neuroblastoma <i>in vitro</i>	2
1.1.2.1 The expression of neurotrophins and the receptors in neuroblastoma differentiation	3
1.1.2.2 Neurite formation of neuroblastoma induced by gene overexpression.....	4
1.1.2.3 Serum starvation promotes the differentiation of neuroblastoma.....	5
1.1.2.4 Retinoids induce the differentiation of neuroblastoma.....	6
1.1.2.5 Induction of neuroblastoma differentiation by phorbol ester (TPA)	10
1.1.3 The signaling pathways involved in the differentiation of neuroblastoma.....	12
1.2 Platelet-derived growth factor receptor-PDGFR	13

1.2.1 The discovery , types and structure of PDGF	13
1.2.2 The types and structure of PDGFR and its interaction with the ligand.....	14
1.2.3 The PDGF-PDGFR signaling pathway and the expression regulation of PDGFR.....	16
1.2.4 The research progress of PDGFR in neuroblastoma differentiation	18
1.3 Advances in the FOXO class of transcription factors.....	20
1.3.1 Overview	20
1.3.2 The structure of FOXO protein.....	21
1.3.3 Regulation of the expression and the transcriptional activity of FOXOs.....	22
1.3.3.1 Study on the transcriptional regulation of FOXOs.....	22
1.3.3.2 Post-translational regulations of FOXO	22
1.3.3.2.1 Phosphorylation of FOXO	23
1.3.3.2.2 Acetylation of FOXO	25
1.3.3.2.3 Ubiquitination of FOXO	26
1.3.3.2.4 Glycosylation of FOXO	28
1.3.3.2.5 Methylation of FOXO.....	29
1.3.3.3 Regulation of FOXO expression by microRNAs	30
1.3.4 Biological functions of FOXO.....	34
1.3.4.1 Cell cycle regulation by FOXO.....	34

1.3.4.2 FOXO in cell proliferation, apoptosis and differentiation.....	36
1.3.4.3 FOXOs regulate DNA damage response	38
1.3.4.4 Anti-oxidative stress of FOXO.....	38
1.3.4.5 Metabolism regulation by FOXO.....	39
1.3.4.6 FOXO-dependant regulation of stem cell pluripotency and homeostasis.....	40
1.3.4.7 FOXO in autophagy.....	41
1.3.5 Current research of FOXO in the development of nerves system.....	42
1.4 Project background , content and significance	43
CHAPTER 2 Materials and methods	44
2.1 Materials	44
2.1.1 Bacterial strains.....	44
2.1.2 Cell lines	44
2.1.3 Chemicals and reagents.....	44
2.1.4 Equipments.....	47
2.1.5 Plasmids vectors	49
2.1.5.1 pLV-H1-EF1 α -puromycin/Blasticidin	49
2.1.5.2 pGL3 basic	49
2.1.5.3 pBabe Puro.....	50
2.1.5.4 pLVX-IRES-Neo	51
2.1.5.5 pGEX-4T-1	52

2.1.5.6 pBluescript II KS	52
2.2 DNA work	54
2.2.1 Preparation of <i>E.coli</i> competent cells.....	54
2.2.2 Agarose gel electrophoresis.....	55
2.2.3 Purification of DNA fragments form agarose gel.....	56
2.2.4 DNA Ligation and transformation.....	56
2.2.5 Plasmid DNA preparation	57
2.2.5.1 Mini-preparation of plasmid DNA	57
2.2.5.2 Purification of large amount DNA by the CsCl-Density Gradient Centrifugation.....	57
2.2.6 Genomic DNA extraction	58
2.2.7 PCR reactions.....	59
2.2.8 RNA extraction and reverse-transcription (RT).....	61
2.2.9 Real Time Quantitative PCR.....	62
2.2.10 Consturction of RNA interference vectors	62
2.3 Cell culture work	65
2.3.1 Cell culture.....	65
2.3.2 Cell passage	66
2.3.3 Transfection and infection.....	66
2.3.3.1 Transient transfection with calcium phosphate	66
2.3.3.2 Lipofectin transfection	67
2.3.3.3 Virus packaging and infection	67

2.3.4 BrdU staining and FACS analysis	68
2.4 Experiments and methods for protein work	70
2.4.1 Preparation of total cell lysates.....	70
2.4.2 Measurement of protein concentration by BCA method ...	70
2.4.3 SDS-PAGE electrophoresis and Immunoblot Analysis	71
2.4.4 Luciferase activity analysis	73
2.4.5 Chromatin immunoprecipitation	75
2.4.6 Expression and purification of GST fusion proteins.....	78
2.4.7 GST-Pull Down	78
2.4.8 Morphology observation of cell differentiation and neurite length measurements	79
2.4.9 Statistics analysis and photograph processing	79
CHAPTER 3 Results and discussion.....	80
3.1 Results	80
3.1.1 Transcriptional regulation of PDGFRA by FOXO family members.....	80
3.1.2 FOXOs direct PDGFRA expression by physically acting on its promoter.....	88
3.1.3 PDGFRA is required for neuroblastoma cell differentiation	91
3.1.4 FOXOs regulate the differentiation of neuroblastoma	94
3.1.5 FOXO deficiency attenuates neuroblastoma differentiation	

via PDGFRA	99
3.2 Discussion	101
References	108
Acknowledgement.....	134

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

神经母细胞瘤(Neuroblastoma, NB)是起源于交感肾上腺链的恶性实体瘤,在神经母细胞瘤的发病过程中一个关键的早期事件就是成神经细胞分化停滞在不同阶段。TPA 和 PDGF-BB 可诱导神经母细胞瘤细胞发生终末分化,然而参与调控这一分化过程的信号通路和具体分子机制目前并不十分清楚。本研究论文发现敲低细胞内 FOXO 的表达能够削弱 TPA 和 PDGF-BB 诱导的神经母细胞瘤细胞的分化;活化的 FOXO 能够在生理条件和应激刺激条件(如血清饥饿)下,通过与 PDGFRA 基因的启动子结合转录调控 PDGFRA 的表达; PDGFRA 表达缺失能够显著抑制 TPA 和 PDGF-BB 所诱导的神经母细胞瘤细胞的神经突触的形成;外源表达的 PDGFRA 能够“逆转”FOXO 表达缺失所导致的细胞分化缺陷。本研究论文的结果表明在 TPA 和 PDGF-BB 诱导神经母细胞瘤细胞分化的过程中,FOXO-PDGFRA 通路对神经母细胞瘤细胞分化起重要作用, PDGFRA 是 FOXO 调控神经母细胞瘤细胞分化的关键下游靶分子。

关键词:神经母细胞瘤;FOXO1/3/4;PDGFRA;分化

Abstract

Neuroblastoma is a common childhood malignant tumor originated from the neural crest-derived sympathetic nervous system. A crucial early event in neuroblastoma pathogenesis is arrested differentiation of neuroblasts at various stages. Treatment of neuroblastoma with TPA and PDGF-BB leads to terminal differentiation of neuroblastoma cells. However, the signaling pathways that are involved in this process remain largely unknown. Here, we report that inhibition of endogenous FOXO proteins attenuated TPA/PDGF-BB mediated differentiation of neuroblastoma cells. Activated FOXO transcription factors acted on PDGFRA promoter to direct its basal mRNA expression as well as its induction upon serum deprivation. Depletion of endogenous PDGFRA in neuroblastoma cells significantly diminished neurite formation and extension under TPA/PDGF-BB treatment. Furthermore, ectopic expression of PDGFRA abolished the blockage of neuroblastoma differentiation by FOXOs inhibition. These findings define the FOXO–PDGFRA axis as crucial mechanistic components that govern TPA-induced neuroblastoma differentiation.

Key words: Neuroblastoma; FOXO1/3/4; PDGFRA; differentiation

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.

廈門大學博碩士論文摘要庫