

学校编码: 10384
学 号: 21620100153931

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

锌指蛋白 ZFP106 调控肿瘤抑制蛋白 p53 的
稳定性和功能

The Zinc Finger Protein 106 is a Novel Positive Regulator of the
p53 Tumor Suppressor

谢青青

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: 年 月

论文答辩时间: 年 月

学位授予日期: 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2013 年 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

第一章 前言	1
1.1 肿瘤抑制因子 p53	1
1.1.1 p53 研究历史	1
1.1.2 p53 的生物学功能	1
1.2 p53 的激活	6
1.2.1 p53 活化模型的提出	6
1.2.2 p53 的稳定	7
1.2.3 p53 结合特异的 DNA 序列	9
1.2.4 转录后修饰调节 p53 的转录功能	9
1.3 p53 结合蛋白	13
1.4 p53-MDM2 负反馈回路	15
1.4.1 Mdm2 与 p53 形成负反馈调节回路	15
1.4.2 Mdm2 受到转录后修饰的调控	16
1.4.3 一些肿瘤抑制因子和癌基因调控 Mdm2 和 p53 的结合	18
1.4.4 HAUSP 动态调节 Mdm2-p53 通路	20
1.4.5 核糖体蛋白-Mdm2-p53 通路	21
1.5 核仁蛋白 ZFP106	24
1.5.1 核仁在细胞胁迫下的动态变化	24
1.5.2 核仁 p53 信号	25
1.5.3 zinc finger protein 106	27
1.6 研究目的和意义	28
第二章 材料与amp;方法	30
2.1 实验材料	30
2.1.1 细胞系	30
2.1.2 酵母菌 AH109 人骨髓 cDNA 文库 大肠杆菌 DH5 α 和 BL21	30

2.1.3 质粒载体	30
2.1.4 主要试剂和材料	35
2.1.5 主要试剂的配制	37
2.2 实验仪器	39
2.3 试验方法	40
2.3.1 分子克隆	40
2.3.2 酵母双杂交	42
2.3.3 细胞培养	43
2.3.4 免疫共沉淀	43
2.3.5 western blot	43
2.3.6 荧光实时定量 PCR	43
2.3.7 GST-Pulldown	44
2.3.8 RNA 干扰	45
2.3.9 流式细胞术	45
2.3.10 克隆形成能力	46
2.3.11 免疫荧光	46
第三章 结果与分析	47
3.1 ZFP106 特异性结合 p53	47
3.1.1 酵母双杂交结果显示 ZFP106 与 p53 相互结合	47
3.1.2 克隆人源 ZFP106 全长	48
3.1.3 过表达的 ZFP106 与 p53 在 293 细胞中相互结合	49
3.1.4 GST-Pulldown 实验证明 ZFP106 与 p53 直接结合	50
3.2 ZFP106 与 p53 相互结合区域的鉴定	51
3.3 ZFP106 促进 p53 的转录活性	53
3.4 ZFP106 增强 p53 的蛋白稳定性	54
3.4.1 过表达 ZFP106 使 p53 的蛋白水平升高	54
3.4.2 ZFP106 能够延长 p53 的半衰期	56
3.5 ZFP106 抑制 MDM2 介导的 p53 泛素化降解	57
3.5.1 ZFP106 与 Mdm2 相互结合	57

3.5.2 ZFP106 抑制 Mdm2 介导的 p53 泛素化	58
3.5.3 ZFP106 调节内源 p53 的泛素化水平	60
3.6 ZFP106 增强 p53 诱导肿瘤细胞凋亡的功能	61
3.6.1 VP16 处理后内源 ZFP106 结合 p53	61
3.6.2 VP16 处理后 ZFP106 增强 p53 诱导细胞凋亡的功能	62
3.6.3 敲低 ZFP106 减弱 p53 的诱导	64
3.6.4 敲低 ZFP106 减弱 p53 诱导细胞凋亡的功能	64
3.6.5 过表达 ZFP106 抑制肿瘤细胞的生长	65
3.7 ZFP106 在受到 DNA 损伤时的定位变化	66
3.7.1 ZFP106 定位于核仁	66
3.7.2 VP16 处理后 ZFP106 从核仁转运到核质	67
第四章 讨论	71
参考文献	74
缩略语	86
致谢	88

TABLE OF CONTENTS

CHAPTER 1 Introduction	1
1.1 The tumor suppressor p53	1
1.1.1 The history of p53 research	1
1.1.2 Biological functions of p53	1
1.2 The activation of p53	6
1.2.1 The model of p53 activation	6
1.2.2 p53 Stabilization	7
1.2.3 p53 binds to specific sequence of DNA	9
1.2.4 post-transcriptional modification of p53	9
1.3 p53 regulation by cofactors	13
1.4 The Mdm2-p53 regulatory pathway	15
1.4.1 The MDM2-p53 feedback loop	15
1.4.2 posttranslational modifications of Mdm2	16
1.4.3 Modulators of the Mdm2-p53 pathway	18
1.4.4 A dynamic role of HAUSP in the p53-Mdm2 pathway	21
1.4.5 The ribosomal protein-Mdm2-p53 pathway	21
1.5 zinc finger protein ZFP106	24
1.5.1 Nucleolar dynamics under stress conditions	24
1.5.2 Nucleolar p53 signaling in the stress response	25
1.5.3 Zinc finger protein ZFP106	27
1.6 Objectives	28
CHAPTER 2 Materials and methods	30
2.1 Materials	30
2.1.1 Cell lines	30
2.1.2 yeast strain AH109, cDNA library, DH5 α , BL21	30

2.1.3 plasmids	30
2.1.4 Chemicals and reagents	35
2.1.5 Preparation of reagents	37
2.2 Equipments	39
2.3 Methods	40
2.3.1 Plasmids	40
2.3.2 Yeast two hybrid	42
2.3.3 Cell culture, treatments and DNA transfection	43
2.3.4 Immunoprecipitation (IP)	43
2.3.5 Western Blot	43
2.3.6 Realtime quantitative PCR	43
2.3.7 GST pull down	44
2.3.8 RNA interference	45
2.3.9 Flow cytometry	45
2.3.10 Colony-formation assay	46
2.3.11 Immunofluorescence	46
CHAPTER 3 Results	47
3.1 ZFP106 interacts with p53	47
3.1.1 ZFP106 interacts with p53 in a yeast two-hybrid assay	47
3.1.2 Cloning of ZFP106 gene	48
3.1.3 Overexpressed ZFP106 and p53 interacts with each other in HEK293 cells	49
3.1.4 ZFP106 interacts with p53 directly in a GST-Pulldown assay	50
3.2 Mapping the region of p53 that interacts with ZFP106	51
3.3 ZFP106 modulates p53 transcriptional activities	53
3.4 ZFP106 stabilizes and activates p53	54
3.4.1 Overexpression of ZFP106 stabilizes p53	54
3.4.2 The half-life of p53 was increased in U2OS-ZFP106 cells	56
3.5 ZFP106 inhibits Mdm2-mediated p53 ubiquitination	57

TABLE OF CONTENTS

3.5.1 Overexpressed ZFP106 and Mdm2 interacts with each other in HEK293T cells	57
3.5.2 Overexpression of ZFP106 inhibits Mdm2-mediated p53 ubiquitination and degradation	58
3.5.3 Knockdown of ZFP106 increases p53 ubiquitination	60
3.6 ZFN106 promotes the apoptosis function of p53	61
3.6.1 Endogenous ZFN106 interacts with p53 after VP16 treatments	61
3.6.2 Overexpression of ZFN106 promotes the apoptosis function of p53 ..	62
3.6.3 Knockdown of ZFN106 inhibits the induction of p53 after VP16 treatments	64
3.6.4 Knockdown of ZFN106 inhibits apoptosis after VP16 treatments	64
3.6.5 Overexpression of ZFN106 inhibits cell proliferation	65
3.7 ZFN106 translocates from nucleolus to nucleoplasm after VP16 treatments	66
3.7.1 ZFN106 is a nucleolar protein	66
3.7.2 ZFN106 co-localizes with p53 to the nucleoplasm after VP16 treatments	67
CHAPTER 4 Discussion	71
REFERENCES	74
ABBREVIATIONS	86
ACKNOWLEDGEMENT	88

摘要

肿瘤抑制因子 p53 能够感知并应答各种细胞胁迫，包括 DNA 损伤、原癌基因激活、缺氧以及其他刺激。在正常生长条件下 E3 泛素连接酶 Mdm2 泛素化降解 p53 使 p53 维持在非常低的水平。当细胞受到胁迫时 p53 被大量诱导并活化。活化的 p53 通过诱导细胞周期阻滞、衰老或凋亡抑制损伤细胞的分裂和增殖。越来越多的研究表明各种细胞胁迫能够通过活化不同的信号通路抑制 Mdm2 的 E3 泛素连接酶活性从而活化 p53。许多蛋白能够作用于 Mdm2-p53 调节通路增强或者抑制 Mdm2 的 E3 泛素连接酶的活性。

本文发现含 WD40 结构域的锌指蛋白 ZFP106 (zinc finger protein 106) 能够结合 p53 并通过抑制 Mdm2 介导的泛素化提高 p53 的蛋白稳定性和转录活性。ZFP106 作为次要组织相容性抗原 H3a 的多态基因被发现，然而 ZFP106 的生物学功能还一直很不清楚。在本文中我们发现 ZFP106 在体内和体外都能够结合 p53。酵母双杂交和 GST-pulldown 实验证明两者为直接结合。在骨肉瘤细胞系 U2OS 细胞中过表达 ZFP106 能够明显提高 p53 的蛋白水平。过表达 ZFP106 能够抑制 Mdm2 介导的 p53 泛素化从而增强 p53 蛋白的稳定性，并且促进 p53 下游靶基因的转录，如 bax 和 p21 等。在稳定表达 ZFP106 的 U2OS 细胞中 p53 的半衰期从半小时延长到 1.6 小时。此外，敲低 ZFP106 抑制依托泊苷 (etoposide/VP16) 引起的 p53 诱导和细胞凋亡。我们还发现细胞受到 DNA 损伤时 ZFP106 的定位发生变化。依托泊苷 (etoposide/VP16) 处理促使部分 ZFP106 在核质中积累，并且引发内源 ZFP106 与 p53 相互结合。

总之，我们的工作发现核仁蛋白 ZFP106 是一个新的 p53 结合蛋白，在受到 DNA 损伤时 ZFP106 从核仁转运到核质中结合并稳定 p53。我们的工作发现了一条新的应答 DNA 损伤的信号通路。

关键词： p53; ZFP106; regulation

Abstract

The tumor suppressor p53 serves as a cellular stress sentinel, responding to diverse cellular stresses, including DNA damage, oncogenic stress, hypoxia, and other stimuli. p53 is kept at very low levels in normal cells by mouse double minute 2(Mdm2), which functions primarily as an E3 ubiquitin ligase and promotes proteasomal-dependent degradation of p53. p53 is stabilized and activated in response to myriad stresses. On activation, p53 restricts cellular expansion by inducing cell cycle arrest, senescence, or apoptosis. Several lines of evidence suggest that a variety of stresses can activate different types of cellular signaling pathway leading to the suppression of Mdm2 activity and activation of p53. Many proteins regulate on the ubiquitination and proteasomal degradation of p53 by Mdm2, either enhancing or inhibiting its activity.

In this study we identify a novel p53 binding protein the WD40 repeats containing zinc finger protein 106(ZFP106), which acts to stabilize and activate p53 by preventing Mdm2-mediated ubiquitination of p53. ZFP106 is a nucleolar protein, which was initially cloned as the polymorphic gene encoding the nine amino acid H3a minor histocompatibility transplantation antigen. However, the biological function of ZFP106 is largely unknown. Here we demonstrate that ZFP106 interacts with p53 both in vivo and in vitro. Yeast two-hybrid and GST-pulldown assays suggest a direct interaction between ZFP106 and p53. To determine the functional importance of the ZFP106-p53 interaction, we overexpressed ZFP106 in U2OS cells and observed a significant increase in the p53 protein level. Overexpression of ZFP106 inhibits Mdm2-mediated ubiquitination of p53 and enhances the protein stability and activities of p53, resulting in up-regulation of p53 target genes, such as bax and p21. The half-life of endogenous p53 in the U2OS-ZFP106 cells is increased markedly from 0.5 to 1.6 h. In addition, knockdown of ZFP106 inhibits p53 induction and apoptosis after VP16 treatments. Of interest, DNA damage appears to induce

ZFP106 accumulation in the nucleoplasm where it interacts with and stabilizes p53. Thus our work identified a novel p53 binding protein ZFP106, which positively regulates p53 stability and activity.

Key words: p53; ZFP106; regulation

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 前言

1.1 肿瘤抑制因子 p53

1.1.1 p53 研究历史

1979 年 p53 在研究病毒致癌蛋白的大背景下被发现。David Lane 等人将猴空泡病毒 SV40 (simian virus 40) 感染动物致癌, 将动物血清与 SV40 大 T 抗原进行免疫共沉淀反应, 结果发现除了大 T 抗原, 还有一个分子量约 53KD 的非病毒蛋白^[1]。当时 p53 被认为是 SV40 大 T 抗原的分子伴侣。当时由于分子克隆技术的局限, 几个实验组用肿瘤细胞的 mRNA 为模板克隆 p53 基因。这决定了前 10 年 p53 研究的方向和结论。John Jenkins、Moshe Oren、Rotter 和 Robert Weinberg 等研究组一系列的研究证实了过表达 p53 能够体外转化原代细胞^[2-4]。p53 一直被认为是癌基因直到 Levine 研究组克隆到小鼠正常组织来源的 p53 基因。经过序列比对发现以前研究的 p53 是基因突变的。野生型的 p53 无法重复以前的结论, 反而能够抑制 HRAS 和 myc 癌蛋白引起的细胞转化^[5, 6]。此时 p53 被认为是在人癌细胞中突变率非常高的抑癌蛋白。p53 研究的第二个十年揭示了 p53 是一个能被各种胁迫诱导的转录因子, 能引起细胞的周期阻滞、衰老和凋亡。接下来的第三个十年, 发现了 p53 更多的功能, 包括对代谢通路的调节以及对胚胎植入所需的细胞因子的调节。现阶段有部分研究投入到基于 p53 的肿瘤药物开发上。对 p53 的研究还将继续, 从 p53 研究中获得的知识能够更广泛地应用到其他生物学和生物化学领域^[7]。

1.1.2 p53 的生物学功能

TP53 是与人类肿瘤相关性最高的基因之一。超过一半的人类肿瘤 *TP53* 基因发生突变, 而剩余的肿瘤中大多数 p53 通路处于抑制状态, 例如通过过表达负调控 p53 的 E₃ 连接酶 Mdm2 而使 p53 处于较低水平^[8]。基因敲除 p53 小鼠具有发生肿瘤的倾向性, 平均患病年龄 4.5 个月, 而到了 10 个月, 所有的 *TP53*^{-/-} 小鼠都会死于癌症^[9]。仅以上两点就奠定了 p53 在肿瘤抑制中的重要作用。

肿瘤抑制基因保证细胞的生长受到调控。适当功能的肿瘤抑制基因就像刹车，控制细胞的生长、DNA 复制和分裂。当这些基因功能不正常时，肿瘤的特征-细胞不受控制的增殖-紧接着发生^[10]。1979 年首次被发现的 *TP53* 基因，是第一个确定的肿瘤抑制基因。其编码的蛋白 p53 是一个转录因子，正调或负调一系列与细胞周期阻滞、衰老、分化和凋亡相关的靶基因的表达。一旦被激活，p53 主要引发两条反应，一方面通过细胞周期阻滞、衰老以及分化抑制细胞增殖；另一方面，p53 可诱导细胞凋亡^[11, 12]。因为 p53 在抑制细胞增殖及引起细胞凋亡方面的功能，在正常情况下，p53 的水平保持得很低。只有当细胞受到 DNA 损伤刺激、原癌基因激活或其他刺激时，p53 的蛋白水平和活性才会急剧地提高。相比于正常细胞，这些受到各种胁迫的细胞对机体产生威胁，它们有更大的几率携带突变，表现出不正常的细胞周期调控，有更大的发生癌变的风险。此时 p53 通过诱导细胞周期阻滞抑制受胁迫细胞的增殖。在有些情况下，甚至启动程序性死亡清除无法修复的细胞。在肿瘤发生过程中 p53 就像个刹车，这也解释了为什么肿瘤细胞中 p53 会有如此高的突变率或者失活。p53 整合大量控制细胞生存和死亡的信号，处于众多信号通路的节点位置（图 1-1）。如果 p53 功能失调，将会导致严重的后果^[10]。

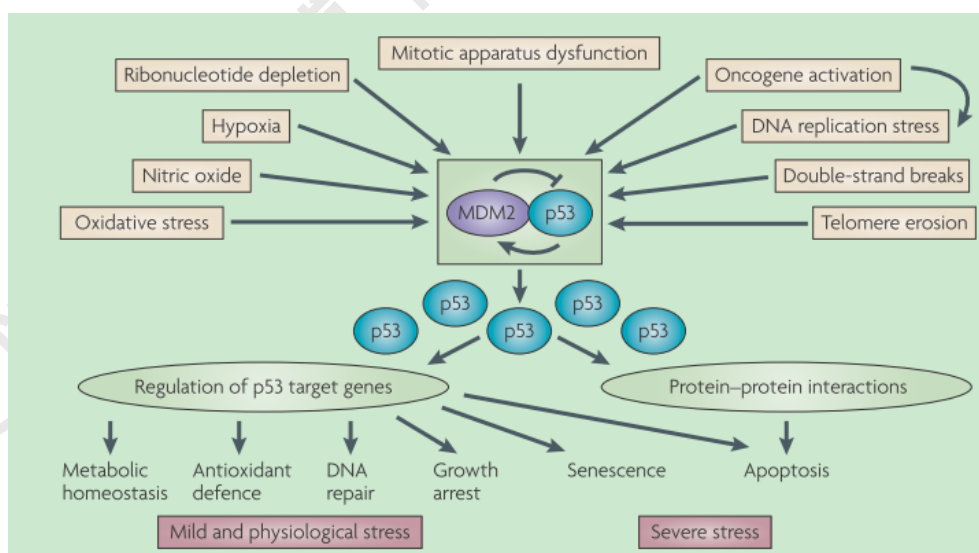


图 1-1.p53 信号通路

Figure 1-1.Simplified scheme of the p53 pathway

注：本图引自 Arnold J. Levine, Moshe Oren: The first 30 years of p53: growing ever more complex

p53 主要是作为一个转录因子发挥作用的，相应地 p53 的结构呈现典型的转录因子的特点（图 1-2）。N 端是较为松弛的转录激活结构域，目前知道其实含两个亚结构域，20-40 位氨基酸构成一个转录激活结构域 TAD-I,40-60 位氨基酸构成第二个转录激活结构域 TAD-II；63-97 位氨基酸是富含脯氨酸区域；100-300 位氨基酸构成进化上保守的 DNA 结合结构域 DBD，由一系列的环和短的螺旋线构成三明治结构^[13]；紧接着 301-323 位氨基酸为一段连接区域；324-355 位氨基酸是 p53 四聚化的结构域；最后 C 端 360-393 位氨基酸是一个结构松散的结构域。肿瘤细胞中 p53 的突变超过 80% 发生在 DNA 的结合结构域^[14]，这充分说明了 p53 主要是作为一个与特异 DNA 序列结合的蛋白起作用的。这在 20 多年前就已经被发现^[15]。继这个发现之后，p53 介导的转录调节这个领域开始了火热的研究。目前已证实 p53 调控几百个 RNA 聚合酶 II 转录的基因，最近的研究表明一些 microRNAs, 如 miR-34 家族成员的转录也受到 p53 的调控^[16-19]。

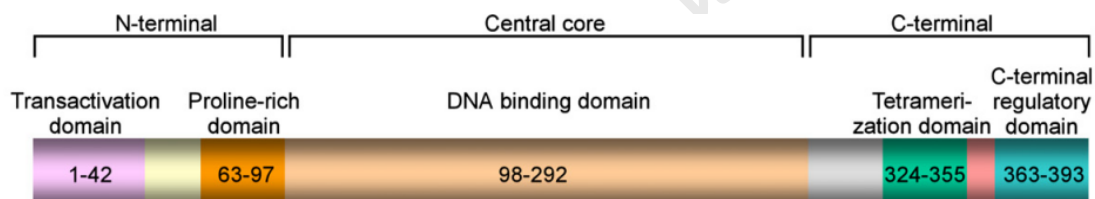


图 1-2.p53 结构图

Figure 1-2.The structure of p53.

注：本图引自 Tang,Y.,W.Zhao,Y.Chen,et al: Acetylation Is Indispensable for p53 Activation. Cell,2008.133(4);612-26.

p53 转录的靶基因按功能大致可分为 4 类（图 1-3）。第一类靶基因能引起细胞周期阻滞，在所有哺乳动物细胞中表现为细胞分裂周期的停滞，这是 p53 稳定之后对细胞造成的早期效应之一。细胞周期蛋白依赖的激酶（cyclin-dependent kinases，CDKs）和细胞周期蛋白（cyclin）复合物能磷酸化 Rb，保证细胞顺利地从 G1 期过渡到 S 期。p53 直接激活 p21^{WAF1/CIP1} 的表达，后者是多种 CDK 的抑制剂，既能抑制 G1 期到 S 期的过渡，也能抑制 G2 期到 S 期的过渡。在上皮细胞中 p53 还能刺激 14-3-3- σ 的表达，而 14-3-3- σ 能够把 cyclin B1 和 CDK1 复合物隔离在细胞核之外，使得细胞停滞在 G2 期。第二类靶基因能够引起细胞凋

亡。有些细胞 p53 激活之后走向凋亡^[20]。p53 诱导的凋亡是由若干蛋白来介导完成的,其中典型的例子如 Bcl-2 家族促凋亡蛋白 Bax。人类细胞中 Bax 基因的转录调节区域存在 p53 结合位点, p53 能够直接激活 Bax 的转录^[21]。p53 的靶基因 NOXA 和 P53AIP1 与 Bax 一样都定位于线粒体, 也能诱导细胞凋亡。其他介导凋亡的蛋白还有 TNF(tumour necrosis factor) receptor、Fas 和 PIDD 等^[22]。另外 p53 也能直接刺激线粒体产生过多有毒的氧自由基引起细胞的死亡。第三类靶基因能够保持细胞基因组的稳定。DNA 损伤修复相关的基因被抑制间接地导致肿瘤的发生。这是因为这些基因负责 DNA 错配等的纠正, 如果被抑制将会导致细胞基因组的不稳定, 所有基因都有可能发生突变并且积累。如果突变发生在控制细胞生长的基因上, 则很可能间接地导致细胞癌变。p53 对维持细胞基因组稳定起着重要作用^[23, 24]。第四类靶基因具有抑制血管形成的作用。肿瘤为达到一定的体积需要在其附近形成血管为其输送营养。而野生型 p53 能够激活抑制血管生成的基因的表达^[25, 26]。p53 突变失活的细胞更有可能募集到血管, 为肿瘤后期的发展提供重要的便利条件。对其他肿瘤抑制因子的研究也证实了抑制新血管的生成是肿瘤抑制因子的重要功能之一^[27]。

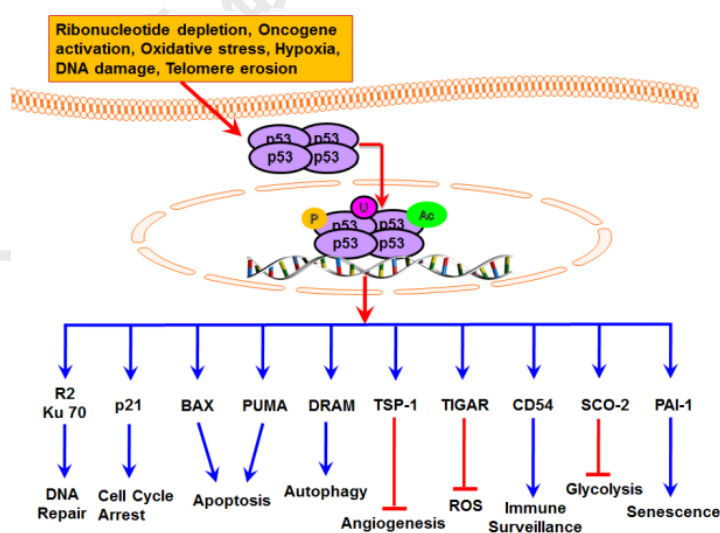


图 1-3. p53 靶基因

Figure 1-3. The targets of p53.

注: 本图引自 Subhasree Nag, et al: The MDM2-p53 pathway revisited.

p53 转录下游靶基因具有组织和细胞特异性。例如 p53 大量诱导之后有些细

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