

学校编码: 10384

分类号\_\_密级\_\_

学号:30520101152485

UDC\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**SNX27 调节 Wnt/ $\beta$ -Catenin 信号通路**

**SNX27 regulates Wnt/ $\beta$ -Catenin pathway**

贺 威

指导教师姓名: 王 团 老 教授

洪 万 进 教授

专 业 名 称: 化 学 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: 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）：



# 目 录

摘 要.....	i
Abstract.....	ii
<b>第一章 前言</b> .....	1
1.1 Wnt 信号通路.....	1
1.1.1 Wnt 蛋白及其分泌.....	2
1.1.2 Wnt 信号通路的细胞表面受体.....	4
1.1.3 Wnt 信号在细胞质中的传递.....	5
1.1.4 Wnt 信号通路在细胞核中的调控.....	7
1.1.5 Wnt 信号通路的靶基因.....	9
1.1.6 Wnt 信号通路与健康以及治疗对策.....	11
<b>1.2 SNX27 及 SNX 家族蛋白研究进展</b> .....	12
1.2.1 SNX 家族蛋白的结构与分类.....	12
1.2.2 SNX 家族蛋白的定位.....	15
1.2.3 SNX 家族蛋白的功能.....	16
1.2.4 SNX 家族蛋白与疾病.....	18
1.2.5 SNX27 的结构与功能.....	19
<b>1.3 本论文的研究目的与意义</b> .....	20
<b>第二章 材料与方法</b> .....	21
<b>2.1 材料</b> .....	21
2.1.1 实验菌株、细胞和质粒.....	21
2.1.2 抗体.....	23
2.1.3 主要试剂.....	23
2.1.4 常用溶液组分.....	25
2.1.5 主要仪器设备.....	26
<b>2.2 试验方法</b> .....	28

2.2.1 GFP 融合 SNX27 及其缺失表达载体的构建 .....	28
2.2.2 细胞培养 .....	31
2.2.3 DNA 转染 .....	32
2.2.4 免疫荧光 .....	32
2.2.5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 .....	33
2.2.6 免疫印迹 .....	34
2.2.7 报告基因检测 .....	34
2.2.8 细胞核与细胞质分离 .....	34
2.2.9 伤愈和实验 .....	36
<b>第三章 结果与分析 .....</b>	<b>37</b>
3.1 SNX27a, 其缺失突变体以及 pSuper. neo-GFP-SNX27 载体的构建 .....	37
3.2 免疫印迹(Western blot)检测 SNX27 的表达以及 shSNX27 的干扰效率 .....	38
3.3 SNX27 主要定位在早期胞内体而不定位在晚期内体 .....	39
3.4 Wnt3A 刺激时, SNX27 能够降低 $\beta$ -Catenin 入核 .....	41
3.5 Wnt3a 刺激时, SNX27 通过 $\beta$ - Catenin 来抑制 Wnt/ $\beta$ -Catenin 信号通路 靶基因的活性 .....	43
3.6 SNX27 能够抑制 GSK3- $\beta$ 的磷酸化 .....	44
3.7 SNX27 能够抑制 Wnt/ $\beta$ -Catenin 信号通路诱导的细胞迁移 .....	46
<b>第四章 讨论 .....</b>	<b>48</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>50</b>
<b>附录 .....</b>	<b>57</b>
<b>致谢 .....</b>	<b>58</b>



# Table of Contents

<b>Abstract in Chinese</b> .....	i
<b>Abstract</b> .....	ii
<b>Chapter I Introduction</b> .....	1
<b>1.1 Introduction of Wnt signaling pathway</b> .....	1
1.1.1 Wnt Protein Secretion .....	2
1.1.2 The receptor of Wnt signaling pathway .....	4
1.1.3 Cytoplasmic events of Wnt signaling pathway .....	5
1.1.4 Nuclear events of Wnt signaling pathway .....	7
1.1.5 Wnt target genes of Wnt signaling pathway .....	9
1.1.6 Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Diseases and Potential therapeutics .....	11
<b>1.2 Advances in SNX12 and SNX family proteins research</b> .....	12
1.2.1 Structures and classification of SNX family proteins .....	12
1.2.2 Localizations of SNX family proteins .....	15
1.2.3 Functions of SNX family proteins .....	16
1.2.4 SNX proteins and disease .....	18
1.2.5 Structure and function of SNX27 .....	19
<b>1.3 Purposes and Contents of This Thesis</b> .....	20
<b>Chapter II Materials and Methods</b> .....	21
<b>2.1 Materials</b> .....	21
2.1.1 Bacterium,cells and plasmids.....	21
2.1.2 Antibodies .....	23
2.1.3 Reagents and Medicines .....	23
2.1.4 Buffers.....	25
2.1.5 Instruments and equipments .....	26

<b>2.2</b>	<b>Methods</b> .....	28
2.2.1	Construction of GFP-SNX27 and its mutants .....	28
2.2.2	Cell culture.....	31
2.2.3	DNA transfect .....	32
2.2.4	Immunofluorescent .....	32
2.2.5	SDS-PAGE.....	33
2.2.6	Western Blot.....	34
2.2.7	Luciferase reporter assay .....	34
2.2.8	Nuclear and cytoplasmic extraction assay .....	34
2.2.9	Wound-healing assay .....	36
<b>Chapter III</b>	<b>Results and Analyses</b> .....	37
3.1	Construction of GFP-SNX27 , its mutants and pSuper.neo-GFP-SNX27	37
3.2	Check the expression of SNX27 and interference efficiency of sh SNX27 by Western blotting .....	38
3.3	SNX12 is mainly localized in early endosome but not in late endosome...	39
3.4	SNX27 may reduce $\beta$ -catenin into the nucleus in Wnt3a stimulation.....	41
3.5	SNX27 may decline the teaget genes' activity of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway .....	43
3.6	SNX27 may weakly lower phosphorylation of the GSK-3 $\beta$ .....	44
3.7	SNX27 may decrease cell migration by inhibiting Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway .....	46
<b>Chapter IV</b>	<b>Discussion</b> .....	48
<b>Reference</b>	.....	50
<b>Appendix</b>	.....	57
<b>Acknowledgement</b>	.....	58

## 摘要

Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在进化过程中是高度保守的,其能通过调节靶基因的表达控制细胞的分化、增殖和凋亡等。通常是 Wnt 蛋白结合到 Frizzled 和 LRP 上来激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路而发挥作用。Frizzleds (FZDs) 是 7 跨膜蛋白受体,其 N 端上含有赖氨酸富集区 (CRD),它能够与受体共轭的配体相结合,其 C 端上含有 PDZ 结合基序,它为 FZDs 受体提供了一个与蛋白质接触接口。

分选连接蛋白 Sorting Nexin(SNXs)是一类含有 Phox homology(PX)结构域的蛋白大家族,它们参与调节胞内膜运输和蛋白分选。SNX27 非常特殊,它是 SNX 家族中唯一一个含有 PDZ 结构域的成员。虽然 SNX 家族中一些成员的功能已经有详细的报道,但是 SNX27 的功能仍不是很清楚,特别是对 SNX27 在调节信号通路方面的功能我们所知的更少,在之前,我们实验室证明了 SNX27 能够与 Frizzleds (FZDs) 受体相互作用,因此,我们通过免疫荧光、荧光素酶报告基因等实验探讨了 SNX27 对 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的影响,研究结果如下:

免疫荧光实验证明,SNX27 主要定位在早期胞内体上,这与以前的研究结果相符。当过表达 SNX27 时,在没有 Wnt3a 刺激时,SNX27 对  $\beta$ -catenin 没有影响,并且对 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的靶基因活性无影响,但在 Wnt3a 刺激时,SNX27 能够降低  $\beta$ -catenin 的入核,且能够降低 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的靶基因活性,降低细胞的迁移性,以及能够微弱降低 GSK-3 $\beta$  的磷酸化。用 RNAi 干扰技术将 SNX27 干扰后,在没有 Wnt3a 刺激时,则能够增加  $\beta$ -catenin 的稳定性阻止其降解,并且能增强 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的靶基因活性。但是在 Wnt3a 刺激时,此二者的现象更明显,并且能够增加 GSK-3 $\beta$  的磷酸化以及促进细胞的迁移性。

本研究证明 SNX27 对 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的影响。这一结论丰富了 SNX27 介导的蛋白运输和分选途径在信号通路中的作用,也为分选蛋白在信号通路方面的研究提供理论依据。

**关键词:** SNX27; Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路;  $\beta$ -catenin



## Abstract

The Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway is highly conserved during evolution, and it controls cell proliferation, differentiation and cell fate determination by regulating its target genes. When interacting with target cells, Wnt proteins bind a heterodimeric receptor complex, consisting of a Frizzled (Fz) and an LRP5/6 protein, and this can activate the The Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. The Frizzled(Fz) are seven-trans-membrane-spanning receptors(7TMR), its N- terminus includes a cysteine-rich domain (CRD), necessary for binding with its ligands, and its C-terminus has a motif "Ser/Thr-Xxx-Val" which constitutes a binding motif for proteins with a PDZ domain, this provides a platform for Frizzled (Fz) to bind with other proteins.

The SNXs are a large family of proteins that are defined by the presence of a SNX pho homology (PX) domain (SNX-PX), and SNX27 is unique among the SNXs, containing an N-terminal PDZdomain upstream of the PX domain. Although the functions of some SNXs have been studied, so far the function of SNX27 is unclear, especially, the function of SNX27 regulating the signaling pathway. Our laboratory had proved SNX27 can interact with the Frizzleds (Fz), so we investigate SNX27 to affect the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway by Fluorescence microscope, Luciferase reporter assay and so on.

SNX27 mainly localizes in early endosome by Fluorescence microscope, which is consistent with previous findings. In the absence of Wnt3a stimulation, overexpression of SNX27 has no effect on  $\beta$ -catenin and the target genes' activity of the Wnt/  $\beta$ -catenin signaling pathway, but in Wnt3a stimulation, overexpression of SNX27 can reduce  $\beta$ -catenin into the nucleus, decline the target genes' activity of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, decrease cell migration as well as weakly lower phosphorylation of the GSK-3 $\beta$ . In the absence of Wnt3a stimulation, Knock down SNX27 may increase the stability of  $\beta$ -catenin to inhibit its degradation, enhance the teaget genes' activity of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, but in Wnt3a stimulation, knock down SNX27 makes those phenomenons more obvious, may promote cell migration and increase the phosphorylation of GSK-3 $\beta$ .

This study demonstrates that SNX27 may affect the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. This conclusion enriched the SNX27-mediated protein transport and sorting to affect the signaling pathway and also provide a theoretical basis for protein sorting in affect the signaling pathway.

**Key words:** SNX27; the Wnt/  $\beta$ -catenin signaling pathway;  $\beta$ -catenin

## 第一章 前言

### 1.1 Wnt 信号通路

Wnt(Wingless and Int)蛋白是一种分泌型糖蛋白,通过自分泌或旁分泌的方式分泌到细胞外,在所有后生动物中是保守的。Wnt 通过与胞外受体结合经过一系列的信号调控途径发挥其生物学功能。Wnt 信号通路通过调控细胞增殖、细胞极化和细胞分化在胚胎发育以及组织内稳态平衡中发挥重要作用<sup>[1]</sup>。Wnt 信号通路的突变常常与人类缺陷性疾病、癌症以及其他疾病有联系<sup>[2]</sup>。

1982 年, Nusse 和 Varmus 等在研究小鼠乳腺癌病毒与基因组整合现象时发现了 *Wnt1*(最初命名为 *Int1*)。该基因能在细胞间传递增殖和分化信息,与小鼠乳腺癌病毒的基因组整合会诱发乳腺癌,是一种癌基因。随后发现它与果蝇的无翅基因(*Wingless*)属于同源基因(Orthologous gene),而无翅基因(*Wingless*)编码的蛋白(wg)的主要功能是在发育过程中调节体节的形成<sup>[3]</sup>。Wg 基因的突变将导致果蝇体节发育不正常,而果蝇 *porcupine*, *dishevelled*, 以及 *armadillo* 等基因的突变也将导致同样的表型<sup>[4]</sup>。随着研究的不断深入人们发现 Wnt 基因家族非常庞大,为多基因家族,其基因结构从低等的无脊椎动物到脊椎动物乃至人类具有高度保守性,其同源序列达 27-83%,对动物的生长发育起着至关重要的作用。Wnt 基因编码的 Wnt 蛋白,可以启动细胞内信号传递途径,参与不同的发育机制。因为启动蛋白为 Wnt 蛋白,故命名为 Wnt 信号通路。

到目前为止, Wnt 信号通路至少可以分为三个分支:(1)平面细胞极性通路(planar cell polarity pathway)或 PCP 信号通路(如图 4-1a),该通路与 JNK 以及细胞骨架重排有关。在此通路中,卷曲蛋白(Frizzled, FZDs)激活 JNK,调节不对称细胞骨架组织以及在上皮细胞层平面协调细胞极性。这条通路涉及到钙黏蛋白相关的跨膜蛋白 Fmi,蛋白多糖 Kny, PDZ 分子 Stbm 以及分支在来自 Wnt 经典信号通路中的 Dsh 的水平。Dsh 蛋白通过 Daam1 与下游效应因子如小分子 GTP 酶 Rho 和 Rho 相连的激酶(ROCK)相连接而启动此信号通路靶基因的活性;(2)经典 Wnt 信号通路(canonical Wnt pathway)或 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路(如图 4-1b),该途径通过  $\beta$ -catenin 激活靶基因的转录,经典的 Wnt 信号通路研究的最为深入,本文也主要探讨经典 Wnt 信号通路;(3)Wnt/钙离子通路(如图 4-1c),此通路可能

通过 G 蛋白导致细胞内钙离子的释放，此通路涉及磷脂酶 C(PLC)和蛋白激酶 C(PKC)的活性，钙离子浓度增加激活钙调磷酸酶，此酶能使转录因子 NF-AT 去磷酸化而使此因子在细胞核内积累，在非洲爪蟾属胚胎中，NF-AT 的活性能够抑制经典的 Wnt 信号通路。

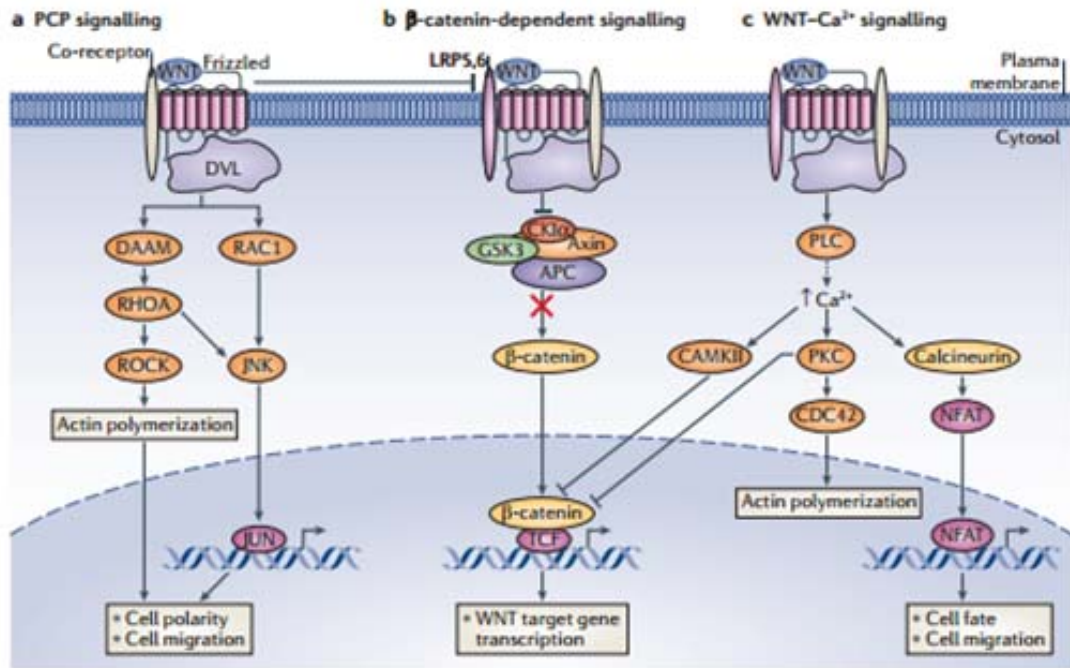


图 1-1, Wnt 信号通路

Figure1-1, Wnt signalling pathway

注：摘自Christof Niehrs,2012<sup>[5]</sup>

### 1.1.1 Wnt 蛋白及其分泌

在哺乳动物基因组（人类基因组在内）中含有 19 *Wnt* 基因，这些 *Wnt* 基因被分为 12 个保守的 *Wnt* 亚家族。其中，至少有 11 个 *Wnt* 基因存在于刺胞动物的基因组中，这说明 *Wnt* 蛋白在生物体中发挥重要的作用<sup>[6]</sup>。有研究表明，在海绵动物中也含有一些 *Wnt* 基因，但是在单细胞有机体中则没有，这又说明 *Wnt* 信号通路在多细胞动物的进化中起着重要作用<sup>[7]</sup>。

*Wnt* 蛋白的分子量约为 40KD，富含保守的半胱氨酸残基。其中，*Wnt1*、*Wnt3a* 和 *Wnt8* 等等一般认为与经典的 *Wnt* 信号通路有关，而 *Wnt5A* 和 *Wnt11* 则和其他两个 *Wnt* 信号通路有关。尽管从发现 *Wnt* 蛋白到现在已经过了 30 多年了，但是 *Wnt* 蛋白的有效提取以及阐述其生物化学特征仍然是一个挑战。有活性鼠的 *Wnt3A* 是第一个成功纯化出来的 *Wnt* 蛋白，其揭示了 *Wnt* 蛋白是被酯修



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