

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 21620121152406

UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**p32 调控 ULK1 的蛋白稳定性与细胞自噬**

**p32 regulates ULK1 stability and autophagy**

焦海峰

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: 2015年05月

论文答辩日期: 2015年05月

学位授予日期:

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2015年05月

p32 调控 ULK1 的蛋白稳定性与细胞自噬

焦海峰

指导教师：尤涵 教授

厦门大学

## 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.....	V
摘要.....	IX
Abstract.....	X
<b>第一章 前言 .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 细胞自噬.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 细胞自噬的分类.....	1
1.1.2 细胞自噬的过程与分子机制.....	3
1.1.2.1 酵母细胞自噬的主要步骤与分子机制.....	3
1.1.2.1.1 自噬的诱导与调控.....	3
1.1.2.1.2 自噬的底物选择与包裹.....	4
1.1.2.1.3 包裹小泡的成核.....	4
1.1.2.1.4 包裹小泡的扩张与完成.....	5
1.1.2.1.5 自噬相关蛋白的再利用.....	5
1.1.2.1.6 包裹小泡的定位于融合.....	6
1.1.2.1.7 包裹小泡的分解.....	6
1.1.2.2 哺乳类细胞自噬核心通路及主要因子.....	6
1.1.2.2.1 隔离膜的形成.....	6
1.1.2.2.2 ULK1-Atg13 复合物.....	7
1.1.2.2.3 Beclin1-Vps34 复合物.....	9
1.1.2.2.4 Atg9-VMP-1 复合物.....	10
1.1.2.2.5 膜泡结合与融合相关蛋白复合物.....	10
<b>1.2 自噬蛋白 ULK1 .....</b>	<b>12</b>
1.2.1 ULK1 的概述 .....	12
1.2.2 ULK1 的结构和修饰 .....	13

1.2.2.1 ULK1 的结构 .....	13
1.2.2.2 ULK1 的翻译后修饰 .....	15
1.2.2.2.1 ULK1 的磷酸化修饰 .....	16
1.2.2.2.2 ULK1 的乙酰化修饰 .....	18
1.2.2.2.3 ULK1 的泛素化修饰 .....	19
<b>1.3 蛋白质的泛素化修饰 .....</b>	<b>21</b>
1.3.1 经典的泛素化途径 .....	24
1.3.2 非经典的泛素化途径 .....	26
1.3.2.1 K6 位泛素化修饰 .....	26
1.3.2.2 K11 位泛素化修饰 .....	27
1.3.2.3 K27 位泛素化修饰 .....	28
1.3.2.4 K29 位泛素化修饰 .....	29
1.3.2.5 K33 位泛素化修饰 .....	30
<b>1.4 p32 蛋白 .....</b>	<b>32</b>
1.4.1 p32 蛋白的简介 .....	32
1.4.2 p32 蛋白的功能与研究进展 .....	34
1.4.2.1 p32 蛋白的多功能性 .....	34
1.4.2.2 p32 调控线粒体的代谢供能 .....	34
1.4.2.3 p32 调控线粒体的形态与运动 .....	36
1.4.2.4 p32 调控细胞的增殖与迁移 .....	37
1.4.2.5 p32 作为分子伴侣蛋白调控细胞凋亡 .....	37
<b>1.5 立体背景、内容及意义 .....</b>	<b>39</b>
<b>第二章 实验材料与方法 .....</b>	<b>41</b>
<b>2.1 实验材料 .....</b>	<b>41</b>
2.1.1 菌株 .....	41
2.1.2 细胞株 .....	41
2.1.3 质粒载体 .....	41
2.1.3.1 pLV-H1-EF1 $\alpha$ -puromycin/Blasticidin .....	41
2.1.3.2 pLVX-IRES-Neo .....	42
2.1.3.3 pGEX-4T-1 .....	42
2.1.3.4 pET-21b .....	43

2.1.4 主要试剂与药品.....	44
2.1.5 主要仪器.....	45
<b>2.2 实验方法.....</b>	<b>47</b>
2.2.1 分子克隆相关实验方法.....	47
2.2.1.1 大肠杆菌感受态的制备.....	47
2.2.1.2 PCR 反应.....	48
2.2.1.3 DNA 的琼脂糖凝胶电泳以及回收.....	49
2.2.1.4 目的片段的酶切、连接与转化.....	49
2.2.1.5 质粒的扩增与提取.....	50
2.2.1.5.1 小规模质粒扩增与提取.....	50
2.2.1.5.1 大规模质粒扩增与提取.....	51
2.2.1.6 质粒的酶切与测序鉴定.....	51
2.2.2 RNA 的相关实验.....	51
2.2.2.1 RNA 的提取及逆转录.....	52
2.2.2.2 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR).....	52
2.2.2.3 RNA 干扰载体的构建.....	53
2.2.3 蛋白相关实验方法.....	53
2.2.3.1 全细胞蛋白样品的制备.....	53
2.2.3.2 蛋白浓度测定 (BCA 法).....	54
2.2.3.3 蛋白质的 SD-PAGE 电泳与 Western blotting 分析.....	54
2.2.3.4 免疫共沉淀相关实验.....	56
2.2.3.5 免疫荧光相关实验.....	57
2.2.3.6 蛋白的体外相互作用实验.....	58
2.2.3.6.1 融合蛋白的原核表达.....	58
2.2.3.6.2 GST pull down 实验.....	59
2.2.3.7 泛素化相关实验.....	60
2.2.3.8 银染相关实验.....	61
2.2.4 细胞相关实验方法.....	61
2.2.4.1 细胞的培养.....	62
2.2.4.2 细胞的传代与接种.....	62
2.2.4.3 细胞转染以及病毒感染.....	63
2.2.4.3.1 细胞的瞬时转染.....	63

2.2.4.3.2 病毒的包装与感染.....	64
2.2.4.4 Annexin V/PI 双染色法及细胞的流式分析 .....	65
2.2.4.5 胞浆与线粒体的分离实验.....	65
2.2.4.6 透射电镜相关实验.....	66
<b>第三章 实验结果与讨论 .....</b>	<b>68</b>
<b>3.1 结果 .....</b>	<b>68</b>
3.1.1 p32 与 ULK1 相互作用 .....	68
3.1.2 p32 调控 ULK1 的蛋白稳定性与激酶活性 .....	75
3.1.3 p32 参与 ULK1 的泛素化调控 .....	78
3.1.4 p32 调控饥饿诱导的细胞自噬.....	83
3.1.5 p32 参与线粒体自噬的调控.....	88
3.1.6 p32 通过与 ULK1 结合调控细胞自噬与线粒体自噬 .....	93
<b>3.2 讨论 .....</b>	<b>98</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>101</b>
<b>致谢.....</b>	<b>101</b>



## Table of Content

<b>Table of Content in Chinese</b> .....	<b>I</b>
<b>Table of Content</b> .....	<b>V</b>
<b>Abstract in Chinese</b> .....	<b>IX</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>X</b>
<b>Chapter 1 Intruduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Autophagy</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Classification of Autophagy .....	1
1.1.2 Mechanisms and the Major Steps of Autophagy .....	3
1.1.2.1 The Molecular Machinery of Autophagy in Yeast .....	3
1.1.2.1.1 Induction .....	3
1.1.2.1.2 Cargo Selection and Packaging .....	4
1.1.2.1.3 Vesicle Nucleation .....	4
1.1.2.1.4 Vesicle Expansion and Completion .....	5
1.1.2.1.5 Retrieve Certain Components for Reutilization .....	5
1.1.2.1.6 Vesicle Targeting, Docking, and Fusion .....	6
1.1.2.1.7 Vesicle Breakdown .....	6
1.1.2.2 The Core Pathway and Major Components of Mammalian Autophagy .....	6
1.1.2.2.1 Origin of the Isolation Membrane .....	6
1.1.2.2.2 The ULK1-Atg13 Complex .....	7
1.1.2.2.3 The Beclin1-Vps34 Complex .....	9
1.1.2.2.4 The Atg9-VMP-1 Complex .....	10
1.1.2.2.5 Conjugation Systems .....	10
<b>1.2 Autophagic Protein ULK1</b> .....	<b>12</b>
1.2.1 Introduction of ULK1 .....	12
1.2.2 The Structure and Modifications of ULK1 .....	13

1.2.2.1 ULK1 Structure.....	13
1.2.2.2 Posttranslational Modifications on ULK1 .....	15
1.2.2.2.1 Ulk1 Phosphorylation .....	16
1.2.2.2.2 Ulk1 Acacetylation.....	18
1.2.2.2.3 Ulk1 Ubiquitination .....	19
<b>1.3 Protein Ubiquitination .....</b>	<b>21</b>
1.3.1 Typical Ubiquitination .....	24
1.3.2 Atypical Ubiquitination.....	26
1.3.2.1 K6 Ubiquitination .....	26
1.3.2.2 K11 Ubiquitination .....	27
1.3.2.3 K27 Ubiquitination .....	28
1.3.2.4 K29 Ubiquitination .....	29
1.3.2.5 K33 Ubiquitination .....	30
<b>1.4 p32.....</b>	<b>32</b>
1.4.1 General introduction of p32 .....	32
1.4.2 Functions and Research Progress of p32 .....	34
1.4.2.1 Multifunctional p32 .....	34
1.4.2.2 p32 Regulates Mitochondrial Metabolism.....	34
1.4.2.3 p32 Regulates Mitochondrial Morphology and Dynamics.....	36
1.4.2.4 p32 Regulates Cell Proliferation and Migration .....	37
1.4.2.5 p32 as Chaperone Protein Regulates Apoptosis .....	37
<b>1.5 Project Background.....</b>	<b>39</b>
<b>Chapter 2 Materials and Methods .....</b>	<b>41</b>
<b>2.1 Materials.....</b>	<b>41</b>
2.1.1 Strains .....	41
2.1.2 Cell Lines .....	41
2.1.3 Vectors.....	41
2.1.3.1 pLV-H1-EF1 $\alpha$ -puromycin/Blasticidin.....	41
2.1.3.2 pLVX-IRES-Neo.....	42
2.1.3.3 pGEX-4T-1.....	42
2.1.3.4 pET-21b.....	43

---

2.1.4 Main Reagents and Drugs .....	44
2.1.5 Main Instruments .....	45
<b>2.2 Methods .....</b>	<b>47</b>
2.2.1 Molecular Cloning Experiments .....	47
2.2.1.1 Preparation of Competent Cells .....	47
2.2.1.2 PCR .....	48
2.2.1.3 Agarose Gel Electrophoresis and Purification of DNA .....	49
2.2.1.4 DNA Enzymatic Manipulation, Ligation and Transformation .....	49
2.2.1.5 Plasmid DNA Preparation .....	50
2.2.1.5.1 Mini-preparation of Plasmid DNA .....	50
2.2.1.5.1 Preparation of Large Amount DNA by the CsCl-Density Gradient Centrifugation .....	51
2.2.1.6 Plasmid DNA Identification by Enzymatic Manipulation and Sequencing .....	51
2.2.2 RNA Experiments .....	51
2.2.2.1 RNA Extraction and RT-PCR .....	52
2.2.2.2 Real Time Quantitative PCR (qRT-PCR) .....	52
2.2.2.3 Construction of RNA Interference Vectors .....	53
2.2.3 Protein Experiments .....	53
2.2.3.1 Preparation of Total Protein Sample .....	53
2.2.3.2 Measurement of Protein Concentration by BCA Method .....	54
2.2.3.3 SDS-PAGE Electrophoresis and Immunoblot Analysis .....	54
2.2.3.4 Immunoprecipitation .....	56
2.2.3.5 Immunofluorescence .....	57
2.2.3.6 Protein In Vitro Interaction Experiments .....	58
2.2.3.6.1 Expression of Fusion Protein in E.coli .....	58
2.2.3.6.2 GST pull down .....	59
2.2.3.7 Ubiquitination Assay .....	60
2.2.3.8 Silver Staining .....	61
2.2.4 Cell Experiments .....	61
2.2.4.1 Cell Culture .....	62
2.2.4.2 Subculture and Inoculture .....	62
2.2.4.3 Transfection and Infection .....	63

2.2.4.3.1 Transient Transfection.....	63
2.2.4.3.2 Virus Packaging and Infection .....	64
2.2.4.4 Annexin V/PI Staining and Flow Cytometry .....	65
2.2.4.5 Cytoplasmic and Mitochondrial Fractionation .....	65
2.2.4.6 TEM .....	66
<b>Chapter 3 Results and Discussion .....</b>	<b>68</b>
<b>3.1 Results.....</b>	<b>68</b>
3.1.1 p32 Interacts with ULK1 .....	68
3.1.2 p32 Regulates ULK1 Stability and Kinase Activity .....	75
3.1.3 p32 Interferes with the Polyubiquitination of ULK1 .....	78
3.1.4 p32 Regulates Starvation-induced Autophagy .....	83
3.1.5 p32 Regulates Mitophagy .....	88
3.1.6 p32 Regulates Autophagy and Mitophagy via Interacting with ULK1 .....	93
<b>3.2 Discussion .....</b>	<b>98</b>
<b>References .....</b>	<b>101</b>
<b>Acknowledgement .....</b>	<b>101</b>

## 摘要

细胞自噬是细胞在营养匮乏条件下,降解细胞内成分以维持细胞必要活动与生命的一种细胞进程。线粒体自噬是一种选择性的细胞自噬,功能紊乱的线粒体可以通过这种方式被自噬体降解。并且线粒体自噬代表了线粒体质量控制的一种方式,而这种方式对维持最佳的线粒体生物能学水平很重要。大量的研究都表明了,ULK1 在诱导细胞自噬与线粒体自噬中的关键作用,但是关于 ULK1 自身调节的报道却很少。p32 是一个具有分子伴侣功能的蛋白,在维持线粒体膜电位差以及氧化磷酸化中起到非常重要的作用。但是 p32 与线粒体稳态控制的关系却没有被研究清楚。我们的研究发现了, p32 通过与 ULK1 形成复合物调控其稳定性与激酶活性。敲低 p32 会促进 ULK1 的 K48 位泛素化,而抑制 ULK1 的 K63 位泛素化,最终导致了 ULK1 的蛋白酶体途径降解。进一步的研究发现,敲低 p32 会明显抑制饥饿诱导的细胞自噬以及解偶联剂诱导的线粒体自噬。在 p32 敲低的细胞中回补外源 ULK1,细胞自噬与线粒体自噬明显得到恢复。本论文的亮点是,在饥饿条件下, p32 通过调控 ULK1 的稳定性正向调控自噬,从而发挥促细胞存活的作用。本论文揭示了 p32-ULK1-细胞自噬通路在协调压力应答、细胞存活以及线粒体稳态中的关键作用。

**关键词:** p32; ULK1; 自噬; 线粒体清除

## Abstract

Autophagy is a process by which components of the cell are degraded to maintain essential activity and viability in response to nutrient limitation. Mitophagy is a selective form of autophagy by which dysfunctional mitochondria are degraded in autolysosomes, and mitophagy represents one type of mitochondrial quality control, which is essential for optimal mitochondrial bioenergetics. Despite extensive studies have shown that ULK1 has an essential role in autophagy and mitophagy induction, little is known as how ULK1 itself is regulated. p32, a chaperone-like protein, is crucial for maintaining mitochondrial membrane potential and oxidative phosphorylation. However, the relationship between p32 and mitochondrial homeostasis has not been addressed. Here, we identified p32 as a key regulator of ULK1 stability and activity by forming complex with ULK1. p32 depletion potentiated K48-linked but impaired K63-linked polyubiquitination of ULK1, leading to proteasome-mediated degradation of ULK1. As a result, silencing p32 profoundly impaired starvation-induced autophagic flux and the clearance of damaged mitochondria caused by mitochondrial uncoupler. Importantly, restoring ULK1 expression in p32-depleted cells rescued autophagy and mitophagy defects. Our findings highlight a cytoprotective role of p32 under starvation conditions by regulating ULK1 stability, and uncover a crucial role of the p32-ULK1-autophagy axis in coordinating stress response, cell survival and mitochondrial homeostasis.

**Key Words:** p32; ULK1; autophagy; mitochondrial clearance

## 第一章 前言

### 1.1 细胞自噬

20 世纪 50 年代, 比利时科学家 Christian de Duve 通过电镜观察到自噬体结构, 并且在 1963 年溶酶体国际会议上首先提出了细胞自噬的生物学概念: 细胞在缺乏营养和能量供应时, 部分细胞质与细胞器被包裹进一种特异性的双层膜或者多层膜结构的自噬体中, 形成的自噬体再与溶酶体融合形成自噬溶酶体, 胞质和细胞器成分在这里被降解为核苷酸、氨基酸、游离脂肪酸等小分子物质, 这些小分子物质可以被重新利用合成大分子或者合成 ATP<sup>[1]</sup>。20 世纪 90 年代, 通过遗传学研究, 在酵母中发现了一系列与细胞自噬相关的基因即 ATG 家族<sup>[2, 3]</sup>。进入 21 世纪后, 随着科学家对自噬研究的深入, 细胞自噬的分子机制、生物学功能以及与疾病的关系逐渐被发现。

真核细胞内存在两种主要的降解途径, 分别是泛素-蛋白酶体降解途径与溶酶体降解途径。泛素-蛋白酶体降解的底物大多是细胞内半衰期比较短的蛋白, 并且这些蛋白在被蛋白酶体识别前, 会被特异性的泛素化修饰。溶酶体降解途径主要是通过细胞自噬完成的, 而细胞自噬主要参与细胞内一些半衰期较长的蛋白以及细胞器的降解。细胞自噬既可以发生在外界刺激下(例如营养不足, 缺氧, 密度过高及高温), 也会被细胞内部压力所诱导(例如细胞器的损伤积累)。因此自噬这一过程广泛发生在真核生物在应对外界刺激、组织重塑与死亡的各种细胞内<sup>[4]</sup>。动物模型实验结合人类遗传学研究, 为细胞自噬的缺失或过度激活所引起的相关疾病的发病机理提供了线索<sup>[5, 6]</sup>。

#### 1.1.1 细胞自噬的分类

根据发生的过程不同, 细胞自噬可分为三类, 分别是巨自噬, 小自噬与分子伴侣介导的自噬(图 1.1.1)<sup>[5, 7, 8]</sup>。

巨自噬的发生起源于, 一部分包括细胞器以及可溶性物质在内的细胞质被非溶酶体来源的吞噬泡所分离, 并逐步形成自噬体。这种具有双层膜结构的自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体。自噬溶酶体会将其包裹的物质分解掉, 以实现物

质的重新利用。巨自噬的发生主要受到外界的调控，比如细胞在受到饥饿以及其他刺激都会引发巨自噬。正是因为巨自噬是受到明显调控，并且是主要的自噬类型，所以科学家对其研究较多。我们也将下文提及的巨自噬简称自噬。

小自噬不同于巨自噬的形成，是由溶酶体或者晚期内体直接内陷，并将胞浆的底质包裹并分解<sup>[9]</sup>。小自噬根据是否具有选择性分为两种，分别是传统小自噬与类小自噬。传统小自噬是一个持续发生的过程，细胞即使没有受到外界刺激，也会不间断的发生溶酶体直接内吞底物的小自噬。类小自噬又称为内体小自噬，发生在多泡体（multivesicular bodies, MVBs）形成的过程，并依赖于 ESCRT I 与 III 系统。类小自噬的底物选择，是依赖分子伴侣蛋白 HSC70，并且需要 HSC70 的阳离子结构域与内体的膜形成静电相互作用<sup>[10]</sup>。

分子伴侣介导的自噬，是由分子伴侣蛋白 HSC70 与溶酶体膜受体蛋白 LAMP-2A 共同完成的自噬。HSC70 首先特异性的识别含有 KFERQ 肽段的底物蛋白并与其结合，该复合物继而与溶酶体膜蛋白 LAMP-2A 相互作用。底物蛋白去折叠后，在 LAMP-2A 与其他伴侣蛋白帮助下直接进入溶酶体腔。溶酶体内的蛋白最终被分解再利用<sup>[11]</sup>。

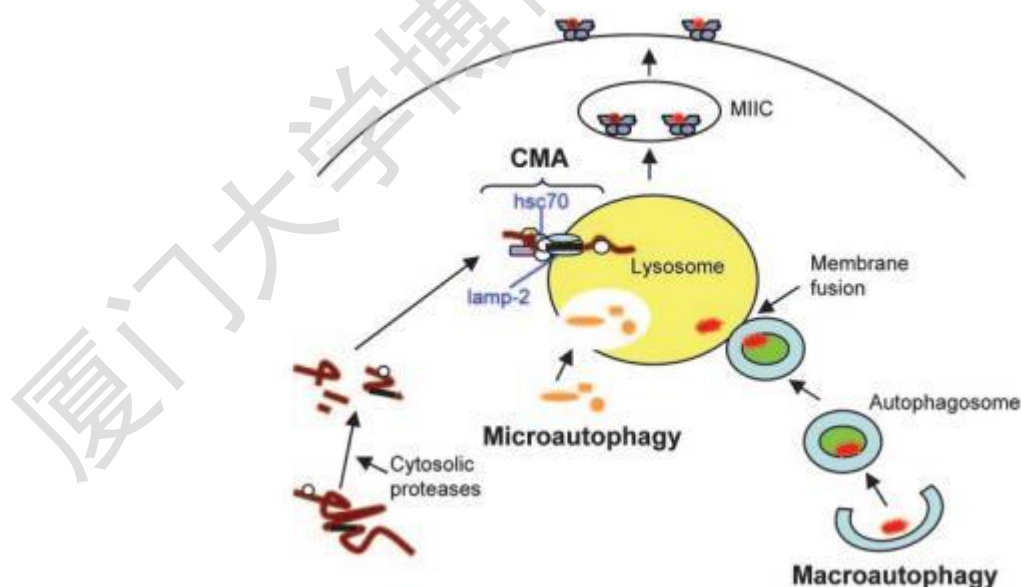


图 1.1.1 细胞自噬的分类

Fig. 1.1.1 Classification of autophagy

注：本图引自 Crotzer, V.L. et al. Autophagy and intracellular surveillance: Modulating MHC class II antigen presentation with stress[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(22): 7779-80.



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.