

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620121152403

UDC_____

廈門大學

硕士学位论文

**E3 泛素连接酶 Smurf1 在 AKT 活化中
作用的研究**

**The role of E3 ubiquitin ligase Smurf1 in the activation of
AKT**

范宇希

指导教师姓名: 王洪睿 教授

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2015年04月

论文答辩时间: 2015年05月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评阅人: _____

2015年04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

摘要.....	I
Abstract.....	II
1 前言.....	1
1.1 AKT	1
1.1.1 AKT 的结构.....	2
1.1.2 AKT 的功能及其下游信号通路.....	2
1.1.3 AKT 的活化.....	4
1.2 E3 泛素连接酶 Smurf1	6
1.2.1 Smurf1 的结构.....	7
1.2.2 Smurf1 的功能.....	7
1.2.3 Smurf1 的调控.....	8
1.3 蛋白质的泛素化修饰	9
1.3.1 泛素与泛素化参与者.....	9
1.3.2 泛素化机制.....	11
2 材料与方法.....	14
2.1 实验材料	14
2.1.1 实验药品、试剂.....	14
2.1.2 酶.....	16
2.1.3 抗体.....	16
2.1.4 材料及仪器.....	17
2.1.5 质粒.....	19
2.1.6 菌株.....	19
2.1.7 细胞株.....	19
2.2 实验方法	19
2.2.1 分子克隆相关实验.....	19

2.2.1.1 感受态的制备.....	19
2.2.1.2 PCR.....	20
2.2.1.3 DNA 样品琼脂糖凝胶电泳.....	21
2.2.1.4 琼脂糖胶回收 DNA 片段 (DNA 纯化通用试剂盒)	21
2.2.1.5 线性化载体、片段的制备.....	21
2.2.1.6 DNA 连接反应.....	22
2.2.1.7 DNA 转化.....	23
2.2.1.8 小量质粒提取.....	23
2.2.1.9 SDS 碱裂解法中量提取质粒 DNA.....	24
2.2.2 蛋白质实验相关方法.....	25
2.2.2.1 GST 标签蛋白的纯化.....	25
2.2.2.2 蛋白质体外 GST-pull down 实验.....	28
2.2.2.3 细胞表达蛋白样品的制备.....	28
2.2.2.4 Western-Blot.....	28
2.2.2.5 免疫共沉淀实验.....	30
2.2.2.6 免疫荧光实验.....	31
2.2.3 细胞实验相关方法.....	32
2.2.3.1 细胞的传代、接种、冻存及复苏.....	32
2.2.3.2 细胞的 DNA 转染.....	33
2.2.3.3 慢病毒 (Lenti-Virus) 的包装和感染.....	34
2.2.3.4 细胞增值曲线的获得.....	35
3 结果与分析.....	36
3.1 Smurf1 的敲低导致结肠癌细胞增殖放缓	36
3.2 Smurf1 的敲低阻碍 AKT 的活化	37
3.3 Smurf1 直接与 AKT 结合	41
3.4 Smurf1 可能通过非典型性泛素化促进 AKT 活化	47
4 讨论与展望.....	50
参考文献.....	52

致 谢..... 58

厦门大学博硕士论文摘要库

Table of content

Abstract in Chinese	I
Abstract in English.....	II
1 Introduction.....	1
1.1 AKT	1
1.1.1 The structure of AKT	2
1.1.2 Functions of AKT and its signaling pathway.....	3
1.1.3 Activation of AKT.....	4
1.2 E3 ubiquitin-protein ligase SMURF1	7
1.2.1 The structure of Smurf1	7
1.2.2 Functions of Smurf1	7
1.2.3 Regulation of Smurf1.....	9
1.3 Protein ubiquitination	9
1.3.1 Ubiquitination and its players	10
1.3.2 Mechanism of ubiquitination.....	11
2 Materials and methods	14
2.1 Materials	14
2.1.1 Experimental drugs	14
2.1.2 Enzymes.....	16
2.1.3 Antibodies	16
2.1.4 Materials and apparatus	17
2.1.5 Plasmids	19
2.1.6 Strains	19
2.1.7 Cell lines	19
2.2 Methods	19
2.2.1 Molecular cloning experiments.....	19
2.2.1.1 Comperent cells	19
2.2.1.2 PCR.....	20

Table of content

2.2.1.3 Agarose gel electrophoresis	21
2.2.1.4 Gel extraction.....	21
2.2.1.5 Vectors linearisation and DNA fragments.....	21
2.2.1.6 DNA ligation	22
2.2.1.7 Transformation	23
2.2.1.8 Plasmid mini Preparation	23
2.2.1.9 Plasmid maxi Preparation	24
2.2.2 Protein experiments	25
2.2.2.1 Purification of GST-tagged proteins.....	25
2.2.2.2 GST-pull down assays	28
2.2.2.3 Preparation of cell lysate.....	28
2.2.2.4 Western-Blot	28
2.2.2.5 Co-immunoprecipitation	30
2.2.2.6 Immunofluorescence.....	31
2.2.3 Cell experiments	32
2.2.3.1 Cell culture.....	32
2.2.3.2 Transfection	33
2.2.3.3 Lentivirus transfection	34
2.2.3.4 Cells reproduction curve.....	35
3 Result and analysis.....	36
3.1 Smurf1's knock-down slows down cells proliferation.....	36
3.2 Smurf1's knock-down impairs AKT's activation	37
3.3 Smurf1 binds to AKT.....	41
3.4 Smurf1 may promote AKT'S activation by atypical ubiquitination.....	47
4 Discussion and prosrects.....	50
References.....	52
Acknowledgement	58

摘要

作为一个既汇聚多种上游信号，同时又作用于多个下游效应分子的中心代谢调控分子，AKT 对于细胞行使正常生物学功能及其调控，以及对于大量癌症的发生都具有不可或缺的作用。正常情况下，AKT 活性的有无及强弱被严格控制以使其能够适度的压制细胞凋亡、刺激细胞增长和增值。然而在肿瘤环境中，AKT 的过度活化现象被频繁发现于绝大部分肿瘤细胞，几乎所有人类癌症细胞都存在 AKT 过活现象。由于在正常生理及癌症环境中都起到如此重要的作用，大量研究专注于 AKT 的活化机制及其过度活化的诱因，越来越多的蛋白被证明参与到 AKT 的特异性活化过程中。

本课题通过内源敲低实验发现 E3 泛素连接酶 SMURF1 的缺失会导致细胞增殖速度的下调，进一步研究发现 Smurf1 的存在有利于 AKT 的磷酸化活化，后又确定了 Smurf1 能够直接结合 AKT1 并促进其上膜。最后通过体内泛素化实验，我们认为 Smurf1 可能具备通过非典型性泛素化修饰 AKT 从而促进其活化的能力。

本课题表明 Smurf1 是众多特异性促进 AKT 活化因子中的一员，因此，Smurf1 也许可以作为一个潜在的新抗癌药物靶标，配合其他现存治疗方案提高癌症治疗效果。

关键词：AKT；Smurf1；泛素化；

Abstract

AKT, a central metabolic controller which not only gathers multiple upstream signals, but also acts on a series of downstream effectors. For this reason, AKT plays an indispensable role in both normal biological function realizations and tumorigenesis. In normal physiological environment, whether or not the AKT can be activated, and the level at which it be activated to express at are strictly controlled, so the AKT can properly suppress apoptosis, stimulate cell growth and proliferation. However, in cancer environment, the overactivated AKT are observed frequently in almost all kinds of cancer cells. It is precisely because AKT are so important in both normal and cancer cell environment, much effort has been focused on the activation mechanism of AKT and the causes resulting in their overactivation. More and more protein have been proved to take part in the activation of AKT.

This project confirm the E3 ubiquitin-protein ligase SMURF1 play a positive role in cell proliferation by knocking down the endogenous Smurf1. Following that, we confirmed the existence of Smurf1 is good for the phosphorylation activation of AKT. Further experiments showed that the Smurf1 directly bond AKT1 and promote it translocate to plasma membrane. After that, base on some ubiquitination research in vivo, we put forward a speculation that Smurf1 may promote the activation of AKT by atypical ubiquitination.

At last, we get a conclusion that Smurf1 is one of the players who specifically activate AKT. We think that Smurf1 may work as a potential new drug target, which helps to improve the therapeutic effect in cooperation with the existing therapy plan.

Key words: AKT; Smurf1; ubiquitination;

1 前言

1.1 AKT

AKT, 又名 PKB, 由来自 Bellacosa 等人于 1991 年在小鼠白血病病毒 AT8 中发现的一个癌基因 v-akt, 将其原癌基因 c-akt 的蛋白编码产物命名为 AKT。v-akt 癌基因编码一个 105 KDa 的磷酸蛋白序列, 对该蛋白生化特点的分析揭示了其是一种类似于蛋白激酶 C 的丝氨酸/苏氨酸激酶, 故又将其命名为蛋白激酶 B (PKB)^[1]。

AKT 总共有三个亚型, 分别为 AKT1, AKT2 和 AKT3, 三个亚型高度同源但它们的基因分别位于不同染色体位置上 (表 1.1)。三个亚型在不同组织中均有广泛表达, 但它们的表达程度具有组织特异性 (表 1.2)。

	Akt1	Reference	Akt2	Reference	Akt3*	Reference
Human	14q32	333	19q13.1-13.2	142	ND*	—
Mouse	12F1-2	330	7B1	332	1H4-5	***
Rat	6q32	330	1q22	332	ND*	—
<i>Drosophila</i>	89BC or 89B4-10	334, 335	NA**	—	NA**	—
<i>C. elegans</i>	V-between mec-9 and bP1	268	X-between unc-84 and unc-3	268	NA**	—

*ND, not done **NA, nonapplicable ***J Testa, A Tosolini, SS Murthy, personal communication

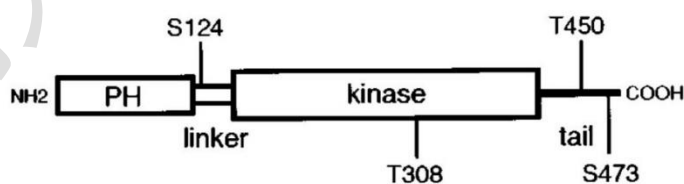
表 1.1 三个同源的 AKT 亚型的染色体分布位置^[65]

	High expression levels	Low/moderate expression levels	Reference
Akt1	Brain, heart, testis, thymus	Kidney, liver, spleen	329, 330
Akt2	Brown fat, cerebellum (Purkinje cells), heart, skeletal muscle	Brain, kidney, lung, spleen, testis	330, 331
Akt3	Brain, testis	Heart, kidney, liver, lung, skeletal muscle, spleen	143

表 1.2 三个同源的 AKT 亚型的组织表达分布^[65]

1.1.1 AKT 的结构

AKT 主要由 2 个功能域构成，分别是 N 段的 PH 结构域和靠近 C 段的 STKc 结构域（图 1.1）。其中 PH 结构域在 AKT 应答第二信使及其活化中起重要作用，关于 AKT 的活化详见下文。STKc 结构域是 AKT 发挥丝氨酸/苏氨酸激酶的重要功能域，它使得活化的 AKT 能够磷酸化下游不同底物，从而激活或抑制下游信号通路。

图 1.1 AKT 的结构域^[15]

1.1.2 AKT 的功能及其下游信号通路

作为一个信号通路中心分子，AKT 接受包括生长因子和其他细胞信号刺激在内的多

种上游信号刺激。通过作用于一系列下游效应物，AKT 能在细胞存活，生长，增殖，血管形成，代谢，迁移等多种生物过程中扮演重要角色（图 1.2）。AKT 的异常失活，缺失或则过活是导致多种复杂疾病的病理生理因素，比如 2 型糖尿病和多种癌症。^[2]

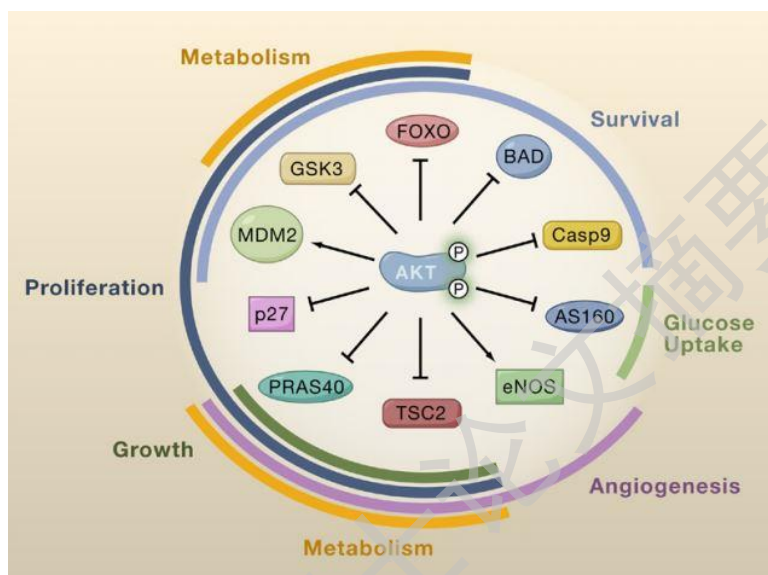


图 1.2 AKT 的参与众多的生理功能^[2]

在细胞存活方面，AKT 通过磷酸化一系列下游底物促进细胞存活。如通过直接磷酸化 BAD 蛋白 S136 位，AKT 得以抑制该蛋白的促凋亡功能^[3]。AKT 还能通过磷酸化 FOXO 转录因子^[4]，抑制其促进靶基因转录的活性，从而阻止促凋亡蛋白、细胞周期停滞蛋白等蛋白的表达。通过磷酸化 MDM2 的 S166 与 S186 位点，AKT 促进其行使泛素化降解 P53 的功能^[5]，从而抑制 P53 激活的凋亡。

在细胞生长方面，AKT 通过磷酸化多种底物蛋白促进细胞生长，如磷酸化 TSC2^[6, 7]^[8]的 S939 与 T1462 位点，以及磷酸化与 TSC2 功能类似的蛋白 PRAS40 的 T246 位点^[9]。这些磷酸化使得这些蛋白失去了对 MTORC1 的抑制作用，从而间接促进 MTORC1 这一重要促细胞生长蛋白的活化。

除促进细胞存活与生长这 2 个最为人熟知的功能，AKT 还通过作用其他下游效应物参与到细胞其他方面的生理功能。如 AKT 能通过磷酸化周期蛋白依赖激酶（CDK）的抑制蛋白 p27 的 T157 位^[10-12]促进细胞增殖。还能通过磷酸化内皮细胞 NO 合成酶 eNOS 的 S1177 位^[13, 14]促进其合成释放 NO，从而促进血管生成。

1.1.3 AKT 的活化

细胞质中刚刚合成的 AKT 是没有生物学功能的，需要经过一些列加工修饰才能发挥功能。

AKT 的活化具体涉及到磷脂结合，膜转移和磷酸化分子开关等机制。Alfonso Bellacosa 等人于 1998 年提出了“AKT 的三步活化模型^[15]”：（1）AKT 活化的第一步为 PH 结构域依赖性，生长因子非依赖性，标志是其 T450 位的持续磷酸化，该磷酸化使得 AKT 蛋白能够应答后续活化步骤；（2）第二步是生长因子激发的 PI3K 依赖性 AKT 膜转移过程；（3）第三步同样是 PI3K 依赖性的，发生于细胞膜上，这里也是 AKT 最终活化的位置，标志是 AKT T308 位和 S473 位被磷酸化。AKT 的三步活化步骤的最终目的即是对其 T308 位与 S473 位的磷酸化（图 1.3）。

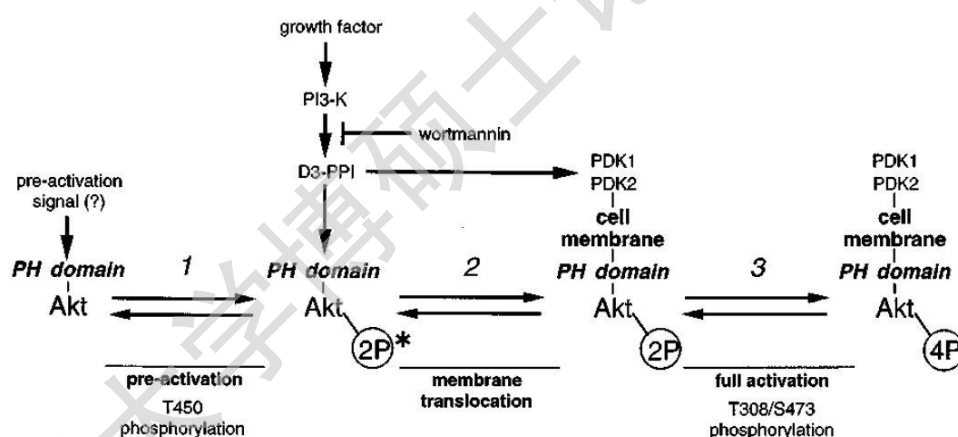


图 1.3 AKT 的活化模型^[15]

需详细描述 AKT 的活化步骤及细节。

首先 AKT 的 mRNA 在翻译过程中需要经历一次 T450 位点的磷酸化，该磷酸化由 mTORc2 催化，经由一个“共翻译磷酸化”（cotranslational phosphorylation）的机制^[16]。即 T450 位的磷酸化与 AKT 的肽链翻译同时进行。虽然 mTORc2 兼具有磷酸化 AKT 的 T450^[17]位与 S473^[18]位的能力，但由于时间的先后关系，翻译过程中的 AKT 肽链的 T450 位会先于靠近 C 段 S473 位被翻译完成而暴露于核糖体外，从而被 mTORc2 接触并磷酸化。T450 位未被成功磷酸化的 AKT 结构不稳定，细胞会通过“共翻译泛素化

“(cotranslational ubiquitination) 机制将其降解清除。T450 的磷酸化使 AKT 获得适合后续活化与功能的构象，需强调的是该过程并不会因为生长因子缺乏而被削弱，因为一旦 AKT 的 T450 位被磷酸化后则生理上不可逆（图 1.4）。

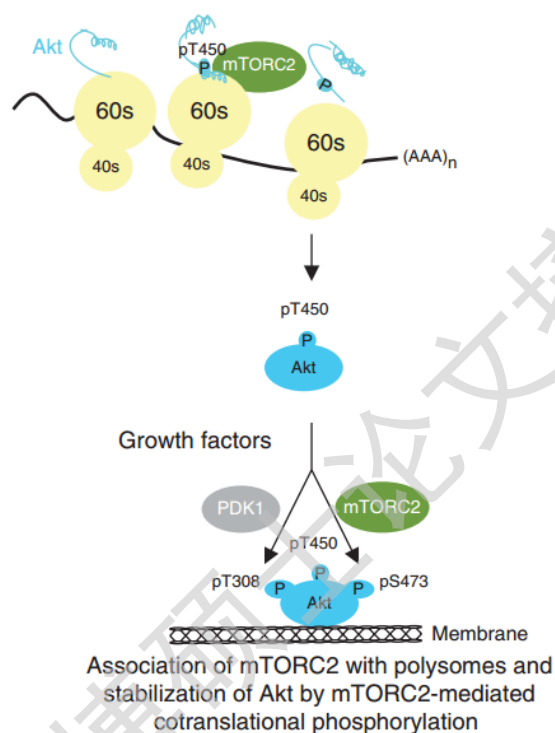


图 1.4 AKT T450 位点的磷酸化^[16]

再经生长因子如胰岛素，PDGF 等信号的刺激后，胞质中的 AKT 进而向细胞膜转移，该过程借助于 PI3K/AKT 信号通路（图 1.5）。

生长因子激活细胞膜上的受体酪氨酸激酶 RTKs 后，活化的 RTKs 通过活化一型磷脂酰肌醇 3 激酶 PI3K 催化磷脂酰肌醇 4,5 磷酸双脂 PIP₂ 磷酸化形成磷脂酰肌醇 3,4,5 三磷酸 PIP₃，该过程能够被 PIP₃ 磷酸酶 PTEN 逆转。由于 AKT 的 PH 结构域与 PIP₃ 具有高度亲和性，从而使其能够将细胞质中的 AKT 募集到细胞膜完成后续活化步骤^[15]。

AKT 最终能够获得完全活性得益于 PDK1 与 mTORc2 分别对其 T308^[19]位与 S473^[18]位的磷酸化。PDK1 通过自身 PH 结构域结合 PIP₃ 从而使自身结合于细胞膜上，当 AKT 转移至细胞膜后对其活化环（activation loop）上 T308 位进行磷酸化。AKT 的 T308 位的磷酸化为 AKT 获得活性的必要条件。

RTK 激活后还会通过某个途径活化 rictor-mTOR 复合物，即 mTORc2，活化的 mTORc2 磷酸化 AKT 的疏水基元 S473 位，该磷酸化过程可以被磷酸酶 PHLPP 去磷酸化逆转。rictor-mTOR 复合物对 AKT S473 位的磷酸化会促进 PDK1 对 AKT T308 位的磷酸化。AKT S473 位的磷酸化可以使 AKT 达到最大活性^[18]。

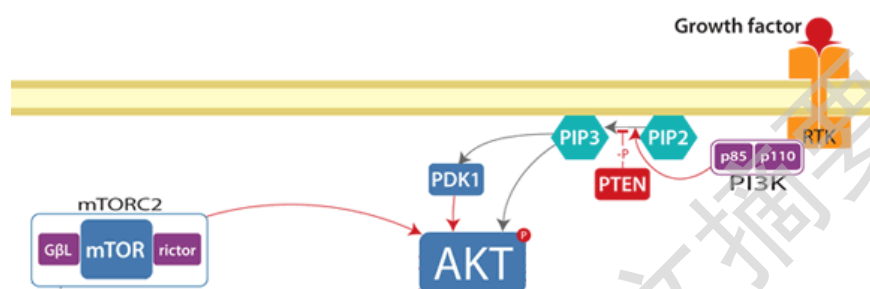


图 1.5 活化 AKT 的 PI3K 信号通路^[21]

综上，经过一系列翻译水平与翻译后水平修饰，AKT 最终成为在 T450 位，T308 位和 S473 位全部被磷酸化的完全活化态的 AKT。普遍认为 T450 的磷酸化标志着 AKT 翻译后的正确折叠，但生化上并非 AKT 后续活化所必须，T308 位的磷酸化开启了 AKT 的活性，S473 位的磷酸化使得 AKT 活化状态达到最高值，但并非 AKT 获得活性的强制条件。需要强调的是，以上活化步骤只是 AKT 活化的一般共同步骤，作为细胞内最为重要的管家基因之一，AKT 的活化及其活性的大小时刻都受到更为精确细致的调控，以使其在恰当的时间和空间下表现出恰当的活性。如，TRAF6 能在 IGF-1 的刺激下催化 AKT 发生 K63 型泛素化修饰，促进其膜转移活化^[20]。在 EGF 的刺激下则由 Skp2 催化 AKT 发生泛素化修饰^[21]。在 insulin 刺激下，NEDD4-1 通过催化 AKT 发生 K63 型泛素化修饰，从而帮助其入核行使功能^[22]。

1.2 E3 泛素连接酶 Smurf1

Smurf1 (Smad ubiquitylation regulatory factor-1) 属于 C2-WW-HECT 家族 (Nedd4 家族)，是 E3 泛素连接酶 HECT 家族的一个亚家族。该家族成员结构上具有共同的特点，即位于 N 端的 C2 结构域，C 端的 HECT 结构域及两者之间的 WW 结构域。Smurf1 最早发现于以 Smad1 为诱饵在非洲爪蟾细胞中进行的酵母双杂交实验^[23]。

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 for delivery details.