

学校编码: 10384

分类号_____密级

学号: 21620131152523

UDC

廈門大學

硕士学位论文

磷酸次黄嘌呤核苷酸脱氢酶 IMPDH2 通过

SUMO 化促进肿瘤细胞迁移与侵袭

IMPDH2 promotes migration and invasion

in cancer cells by sumoylation

陈军兵

指导教师姓名: 吴乔 教授

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2016 年 11 月

论文答辩时间: 2016 年 12 月

学位授予日期: 2016 年 12 月

答辩委员会主席: 王洪睿

评阅人: 俞春东、李晓彤

2016 年 12 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2018年12月30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	1
Abstract	2
前 言	3
1 核酸代谢酶 IMPDH2	3
1.1 IMPDH2 的表达与分布.....	3
1.2 IMPDH2 的结构与功能.....	4
1.3 IMPDH2 的翻译后修饰.....	5
1.4 IMPDH2 与人类疾病.....	5
2 GTP 与肿瘤细胞的增殖、迁移与侵袭	6
2.1 GTP 与肿瘤细胞的增殖.....	6
2.2 GTP 与肿瘤细胞的迁移与侵袭.....	7
3 肿瘤细胞的抗药性	8
4 本论文研究的目的与意义	9
材料与方法	11
1 实验材料	11
1.1 主要试剂及药品.....	11
1.2 实验器材.....	12
1.3 细胞株.....	13
1.4 质粒载体及菌株.....	13
2 实验方法	13
2.1 质粒转化.....	13
2.2 质粒提取.....	14
2.2.1 小规模质粒提取.....	14
2.2.2 中量质粒提取.....	14
2.3 细胞复苏.....	15
2.4 细胞培养.....	15

2.5	细胞转染.....	15
2.5.1	磷酸钙沉淀法.....	15
2.5.2	脂质体转染.....	16
2.6	慢病毒包装与细胞感染.....	16
2.7	蛋白提取及 western blot.....	16
2.8	提取细胞中的总核苷酸.....	18
2.9	高效液相色谱检测 XMP 和 GTP.....	18
2.10	MTT 实验.....	18
2.11	划痕实验.....	19
2.12	Transwell 实验.....	19
2.13	GST-pulldown 激活的 Rho A.....	19
2.14	免疫沉淀实验.....	19
2.15	RNA 提取及 RT-PCR.....	20
结果与分析.....		21
3.1	SUMO 化影响 IMPDH2 的酶活性.....	21
3.2	IMPDH2 的 SUMO 化不影响细胞增殖.....	22
3.3	IMPDH2 影响细胞迁移.....	23
3.4	IMPDH2 的 SUMO 化影响细胞迁移.....	26
3.5	IMPDH2 的 SUMO 化影响细胞侵袭.....	28
3.6	IMPDH2 的 SUMO 化影响 Rho 蛋白的激活.....	30
3.7	阿霉素不影响 IMPDH2 的蛋白表达水平.....	31
3.8	阿霉素抑制细胞中 IMPDH2 的 SUMO 化.....	32
3.9	阿霉素通过抑制 IMPDH2 的 SUMO 化抑制细胞迁移.....	34
3.10	阿霉素提高 SENP1 的 mRNA 水平.....	34
讨论与总结.....		37
参考文献.....		40
致谢.....		47

Table of content

Abstract in Chinese.....	1
Abstract in English.....	2
Chapter 1 Introduction.....	3
1 Nucleic acid metabolic enzymes IMPDH2.....	3
1.1 Expression and distribution of IMPDH2.....	3
1.2 Structure and function of IMPDH2.....	4
1.3 Post-translational modification of IMPDH2.....	5
1.4 IMPDH2 and human disease.....	5
2 GTP and proliferation, migration and invasion of cancer cells.....	6
2.1 GTP and proliferation of cancer cells.....	6
2.2 GTP and migration and invasion.....	7
3 Drug resistance of cancer cells.....	8
4 Purpose and significance of this thesis.....	9
Chapter 2 Materials and methods.....	11
1 Materials.....	11
1.1 Chemicals and reagents.....	11
1.2 Apparatus.....	12
1.3 Cell lines.....	13
1.4 Plasmids and bacteria strains.....	13
2 Methods.....	13
2.1 Transformation.....	13
2.2 Plasmid extraction.....	14
2.2.1 Plasmid mini preparation.....	14
2.2.2 Plasmid maxi preparation.....	14
2.3 Cell thaw.....	15
2.4 Cell culture.....	15
2.5 Transfection.....	15

2.5.1 Calcium phosphate transfection.....	15
2.5.2 TurboFect transfection.....	16
2.6 Lentivirus packaging and infection.....	16
2.7 Protein extraction western blot.....	16
2.8 Extraction of total nucleotide.....	18
2.9 Detection of XMP and GTP with HPLC.....	18
2.10 MTT assay.....	16
2.11 Wound healing assay.....	19
2.12 Transwell assay.....	19
2.13 GST-pulldown activated RhoA.....	19
2.14 Immunoprecipitation.....	19
2.15 Extraction of total RNA and RT-PCR.....	20
Results.....	21
3.1 IMPDH2 sumoylation affects its enzyme activity.....	21
3.2 IMPDH2 sumoylation does not affect cell proliferation.....	22
3.3 IMPDH2 affects migration.....	23
3.4 IMPDH2 sumoylation affects migration.....	26
3.5 IMPDH2 sumoylation affects invasion.....	28
3.6 IMPDH2 sumoylation affects activation of Rho protein.....	30
3.7 Doxorubicin does not influence the protein level of IMPDH2.....	31
3.8 Doxorubicin inhibits sumoylation of IMPDH2.....	32
3.9 Doxorubicin inhibits migration through inhibition of IMPDH2 sumoylat- -ion.....	34
3.10 Doxorubicin increases the mRNA level of SENP1.....	34
Chapter 4 Discussion.....	37
References.....	40
Acknowledgement.....	47

摘 要

IMPDH2 是 GTP 从头合成代谢的关键酶，在多种肿瘤组织和分生活跃的组织中高表达。IMPDH2 可以通过 SUMO 化修饰调节自身酶活。在癌细胞中，IMPDH2 的 SUMO 化促进酶活并通过调节细胞内 GTP 的含量发挥生物学功能。细胞内含有众多的小 GTP 蛋白 (small GTPase)，这些蛋白通过与 GTP 结合从而处于活化状态。活化的小 GTP 蛋白可以与其下游效应蛋白结合，启动或者传递信号以发挥生物学功能。其中，Rho 蛋白家族的主要成员 RhoA、cdc42 等参与了肌动蛋白的聚合以及与之相关的生物学进程，比如黏附，迁移与侵袭。

本文通过一系列实验发现，SUMO 化的 IMPDH2 可以通过提高自身酶活，在肿瘤细胞内提高 GTP 的含量，进而影响小 GTP 蛋白的活性，并最终调控细胞的迁移与侵袭。抗肿瘤药物阿霉素可以抑制 IMPDH2 的 SUMO 化，其机制是抑制 SUMO1 和 Ubc9 的蛋白水平。同时，阿霉素也可以通过提高 SNEP1 的 mRNA 水平来抑制 IMPDH2 的 SUMO 化，最终抑制癌细胞的迁移与侵袭。

综上所述，本文首次发现了 IMPDH2 的 SUMO 化修饰的生物学功能，并发现抗肿瘤药物阿霉素可以通过抑制 IMPDH2 的 SUMO 化来抑制肿瘤细胞的迁移。

关键词： IMPDH2；SUMO 化；Rho 蛋白；迁移；侵袭

Abstract

IMPDH2 is the rate-limiting enzyme of GTP *de novo* synthesis, which is overexpressed in many kinds of tumor tissues and normal tissues with high proliferation. The enzyme activity of IMPDH2 could be regulated by sumoylation. sumoylated IMPDH2 can regulate the GTP level in cancer cells and exert corresponding biological functions. Small GTPase could be activated through binding with GTP. The activated small GTPase could interact with downstream “effectors” to initiate signals for different biological functions. The Rho family members of small GTPase, such as RhoA and cdc42, participate in actin polymerization and associated biological process, including adhesion, migration and invasion.

In our study, we found that the sumoylated IMPDH2 could increase its enzyme activity to improve the GTP level, and then influence the activity of small GTPase, finally regulate the migration and invasion of cancer cells. Furthermore, doxorubicin (DOX) could inhibit the sumoylation of IMPDH2. The underlay mechanism is that DOX can inhibit the protein level of SUMO1 and Ubc9. Another possible mechanism is that DOX could improve the mRNA level of SENP1 to upregulate de-sumoylation, and finally inhibit the migration and invasion of cancer cells.

Taking together, we, for the first time, found the biological function of IMPDH2 sumoylation in inhibiting the migration and invasion of cancer cells, and further demonstrate that DOX can inhibit migration through suppressing the sumoylation of IMPDH2.

Keywords: IMPDH2; sumoylation; cancer cells; migration; invasion

前言

1. 核酸代谢酶 IMPDH2

核酸代谢酶 IMPDH2是GTP从头合成途径的限速酶，它依赖NAD将IMP氧化成XMP，XMP则可以进一步生成GMP，GMP再经GDP生成GTP，因此IMPDH2控制着细胞内GTP池的规模^[1]。IMPDH2是关系基因组复制与细胞增殖的关键酶，也是抗病毒、抗肿瘤及免疫抑制药的一个重要靶分子^[2,3,4]。除了作为经典的代谢酶之外，IMPDH2还参与别的代谢活动，比如IMPDH2可以结合单链的核酸，这其中包括DNA和RNA；此外IMPDH2还和多聚核糖体有关，表明IMPDH2和转录调节相关^[5,6]。

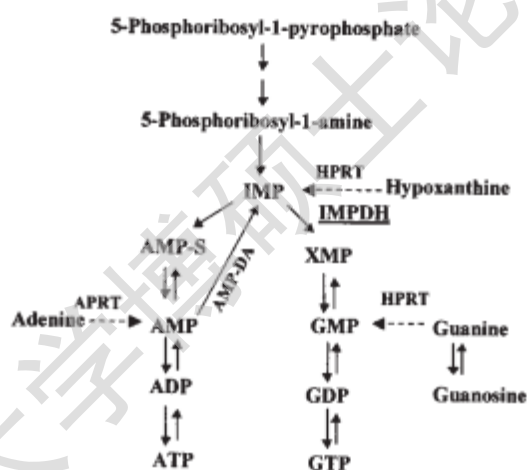


图1. 嘌呤核苷酸的从头合成途径（实线）和补救合成途径（虚线）引自^[1]

Figure 1. Schema illustrating the pathways of de novo (solid lines) and salvage purine nucleotide biosynthesis (dashed lines).

1.1 IMPDH2的表达与分布

IMPDH2虽然与IMPDH1同源性高达84%，但是两者的编码基因并不相同。IMPDH1

通常在正常组织细胞中组成性的低表达，而IMPDH2则在许多肿瘤如肝癌、黑色素瘤及分生活跃的组织如活化的淋巴细胞等当中高表达^[7,8]。在细胞内，IMPDH2主要分布于细胞浆，过氧化物酶体及细胞核内也有少量分布，此外，有报道称在细胞外基质也有分布^[9,10]。

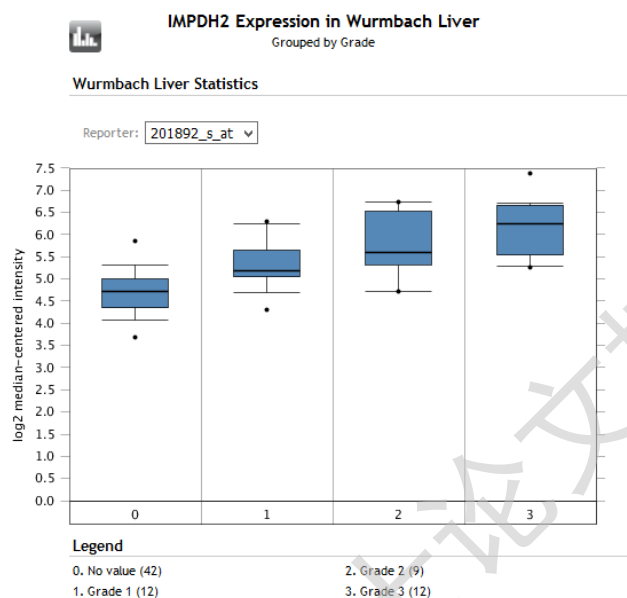


图2. IMPDH2在肝癌组织中高表达, 引自Oncomine 数据库

Figure 2. Samples of Wurbach liver statistics implies increased IMPDH2 is accompanied with elevated malignancy in liver cancer.

1.2 IMPDH2的结构与功能

单体IMPDH2可以划分为两个结构域，即N端的CBS区与C端的酶催化活性区。细菌内IMPDH的晶体结构显示，IMPDH2在体内主要以同源四聚体的形式存在，四聚体的四个酶催化活性区共同构成一个催化中心，而CBS区分布于外侧。相关研究表明，四聚体可能有利于其催化中心的稳定性^[11]。最近的研究表明，IMPDH2在体内存在八聚体乃至更高聚体的形式^[12]。

IMPDH2最主要的功能是其作为代谢酶，在体内催化IMP合成XMP，维持体内GTP池的平衡及代谢稳态。除此之外，IMPDH2还是一个转录因子，它通过入核与DNA单链区域的CT富集序列结合，发挥其转录因子功能，调控组蛋白基因以及E2F基

因的转录^[9]；此外，IMPDH2可能与脂膜的形成与聚集相关^[13,14]。



图3. IMPDH 的结构示意图

Figure3. Structure of IMPDH. CBS dimer domains contain 1-244 amino acid of N-terminal,C-terminal is its catalytic domain.

1.3 IMPDH2的翻译后修饰

目前已知的 IMPDH2 翻译后修饰包括磷酸化，乙酰化和泛素化。其磷酸化位点主要有 Ser122, Ser160, Tyr400 和 Ser416;乙酰化位点有 Ser511, 而其泛素化位点较多, 包括 Lys 134, Lys 195, Lys 208, Lys 293, Lys 311, Lys 349, Lys 450, Lys 455, Lys 474, 和 Lys 489, 虽然已知 IMPDH2 有众多的翻译后修饰及修饰位点, 但是目前尚且没有研究 IMPDH2 翻译后修饰相关功能的报道。SUMO 化 (Small ubiquitin-like modifier) 是常见的蛋白质翻译后修饰之一。类似泛素化, SUMO 化是 SUMO 分子 C 端的甘氨酸共价连接到底物蛋白分子的赖氨酸上, 以发挥相关的生物学功能^[15]。目前发现的 SUMO 分子共有四种, 分别是 SUMO1, SUMO2, SUMO3 和 SUMO4。SUMO2 和 SUMO3 同源性很高且功能基本相同, 故而通常写 SUMO2/3, 其修饰主要以寡聚或多聚形式存在^[16,17]; SUMO1 通常以单分子修饰或者终止 SUMO2/3 链的形式出现^[15]; SUMO4 并无修饰功能, 目前功能未知^[18]。SUMO 化修饰参与诸多与蛋白质相关的生物学功能, 比如核质转运, 转录调节, 凋亡, 蛋白稳定性, 细胞应激, 细胞周期等活动^[19]。

1.4 IMPDH2与人类疾病

IMPDH2在许多肿瘤组织中呈现高表达,提示IMPDH2可以作为潜在的治疗靶点用于癌症治疗。Penuelas发现在对抗肿瘤药物MTX产生抗性的肠癌HT29细胞中,IMPDH2的表达上调^[20]。Fellenberg J等人发现,对药物不敏感的晚期骨肉瘤病人,其癌细胞内IMPDH2的表达上调^[21]。He Y 等人用蛋白组学的方法发现,IMPDH2在肠癌中是与肿瘤相关的抗原^[22]。这些研究成果提示我们,IMPDH2有潜力成为研制化疗药物的一个靶点。肾脏、胰腺以及肝脏移植的病人会对异体器官产生排异反应,人们发现IMPDH2的抑制剂MPA可以有效抑制排异反应,提示IMPDH2作为代谢酶可能参与相关的免疫反应^[23,24]。

2. GTP 与肿瘤细胞的增殖、迁移与侵袭

肿瘤细胞不同于已分化的正常体细胞,它可以通过改变自身的信号通路,进而改变能量与物质代谢,从而维持自身的长期持续快速增殖,促进迁移与侵袭,并最终实现肿瘤的转移^[25]。GTP作为生命活动调节的重要分子,一方面可以作为DNA合成的原料直接参与DNA合成,或者作为RNA合成的原料或能量来源影响RNA合成,最终影响细胞增殖^[26];另一方面GTP可以结合并激活细胞内众多的GTP蛋白,这其中包括G蛋白偶联受体和众多的小GTP蛋白,通过调控这些蛋白参与的信号转导,物质与能量代谢,肿瘤细胞实现自身的增殖、迁移与侵袭^[27]。肿瘤细胞可以通过调控相关蛋白的含量,翻译后修饰以及基因突变等许多方式提高自身的增殖、迁移与侵袭能力。

2.1 GTP与肿瘤细胞的增殖

肿瘤细胞的特性之一就是可以无限增殖^[28]。失去了增殖抑制的肿瘤细胞需要不断合成DNA和RNA以完成转录、翻译和有丝分裂等生命活动。GTP可以直接为DNA与RNA合成提供原料;在核糖体翻译mRNA的过程中,GTP同样可以为翻译过程提供能量。另一方面,GTP作为体内众多GTP蛋白激活的必要条件,其含量变化同样关系着这些蛋白的激活水平。

与细胞增殖关系最为密切的小GTP蛋白是Ras家族^[29]。Ras家族包括KRas, HRas和NRas三个成员。目前的研究表明,许多癌症中都含有Ras蛋白的突变^[30]。HRas可以直接促进G0期的细胞进入细胞周期。激活的Ras可以直接上调诸多生长因子的转录活性,比如HBEGF, TGF α , AREG^[31, 32, 33]。RAS同样可以上调与细胞周期相关的转录因子,如FOS, SRF, JUN, ELK1, ATF2, NF- κ B等。而这些转录因子又会促进细胞周期蛋白cyclin D1的表达^[34, 35, 36, 37, 38, 39]。

另一类与细胞增殖密切相关的小GTP蛋白是Rho蛋白。Rho蛋白家族也属于小GTP蛋白中的Ras超家族的成员。Rho蛋白可以调控诸多与肌动蛋白动态变化相关的细胞功能,比如细胞极性,膜泡转运,细胞周期,细胞运动等等。目前研究较多的Rho家族蛋白包括RhoA, RhoC, Rac1和cdc42^[40, 41]。一方面它们都可以通过调控细胞周期,促进细胞增殖^[37];另一方面Rho蛋白可以抑制细胞周期阻遏蛋白p21^{Waf1/Cip1}的表达并激活ERK,促进细胞增殖^[42, 43]。细胞增殖需要有丝分裂,这其中需要肌动蛋白和肌球蛋白驱动收缩环的形成。而抑制Rho蛋白可以阻止收缩环的组装^[44]。这些数据都表明Rho蛋白参与细胞增殖的调控。

2.2 GTP 与肿瘤细胞的迁移与侵袭

迁移与侵袭同样是肿瘤细胞的标志,也是肿瘤患者病发与死亡的主要原因。肿瘤细胞的迁移是肿瘤侵袭扩散的前提条件。肿瘤细胞通过协调细胞与环境的相互作用,影响细胞与基质、细胞与细胞之间的粘附,细胞骨架的动态变化以及细胞外基质的重塑,实现迁移^[45]。肿瘤细胞迁移的方式大致分三种:间充质迁移、变形单细胞迁移和总体迁移。间充质迁移是通过整合素介导的细胞-基质相互作用及蛋白水解作用参与的细胞外基质重塑实现^[46, 47]。变形单细胞迁移是粘着能力降低或缺失的细胞,通过形变实现自身迁移^[48]。总体型迁移是多个细胞成团集体实现迁移^[49]。而迁移发生过程中涉及的细胞形变都是通过骨架肌动蛋白介导实现的。小GTP蛋白Rho家族成员cdc42和Rac1可以诱导肌动蛋白聚合从而形成细胞突起,包括片状伪足和丝状伪足,从而引导细胞迁移与侵袭^[50, 51]。同时RhoA会控制肌球蛋白收缩,从而介导黏着斑成熟与细胞收缩^[52, 53]。cdc42与RhoA可以通过调控侵袭性伪足的形成并调控MT1-MMP介导细胞外基质的降解,最终实现肿瘤细胞

的侵袭^[54]。相关研究发现，生长因子与细胞因子，包括EGF, HGF, TGF- β 及TNF可以激活CDC42和Rac1，从而诱导一系列肿瘤细胞发生迁移，如乳腺癌，胶质瘤，上皮癌及前列腺癌细胞等^[55, 56, 57, 58]。

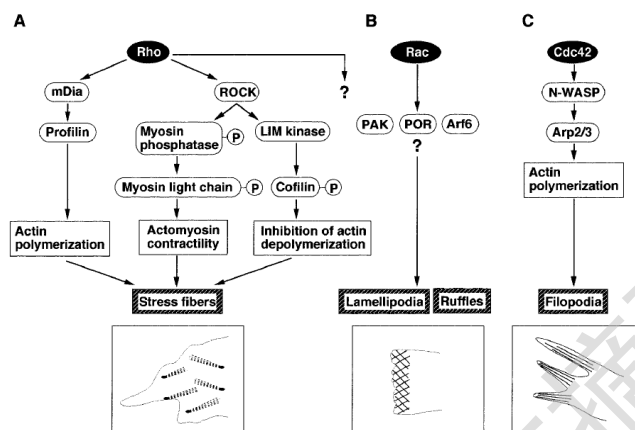


图4. Rho 蛋白与迁移侵袭相关的信号通路 引自^[54]

Figure 4. signaling pathway associated with Rho protein and migration and invasion.

3 肿瘤细胞的抗药性

抗肿瘤药物在使用过程中会逐渐出现药效降低的情况，即为抗药性。癌症，尤其是晚期癌症的患者，特别容易出现抗药性，但是抗药性可能在细胞完全转化之初就已产生^[59]。

出现抗药性的原因多种多样，这些原因可以分为两大类：第一类是药理与生理因素，比如药物代谢与排泄，药物使用不当，药物摄取速度或给药方式不当等^[60, 61]；第二类是细胞或组织特异性的因素，肿瘤对化疗及分子靶向治疗的抵抗限制了药物疗效；药物对正常组织的毒性限制了给药剂量以及到达病灶的有效药物浓度；在肿瘤层面，药物流出增加，药物靶点突变，DNA损伤修复，额外信号通路的激活以及逃逸细胞死亡都会导致肿瘤细胞的抗药性^[62]。

药物靶点的改变会导致抗药性。胸苷酸合酶抑制剂5-FU及培美曲塞 (pemetrexed) 因为抑制了原有的负反馈调节而导致胸苷酸合酶在转录后水平

上调^[63]。肿瘤细胞的DNA损伤修复能力关系其抗药性的产生^[64]。p53调控着DNA损伤修复过程中众多的细胞周期检验点，因此p53突变会打断DNA损伤后的细胞周期阻滞，从而导致抗药性的产生^[65, 66]。凋亡通路的失调也会导致抗药性产生。针对抗凋亡蛋白BCL-2的抗肿瘤药物ABT-737^[63, 64]因为和BCL-2家族的促凋亡蛋白MCL1也结合从而导致药效降低，而在对ABT-737出现抗药性的肿瘤细胞中，MCL1的表达上调^[67, 68, 59]。

抗药性也伴随着某些适应性反应的产生。比如促存活信号的激活，信号通路绕过药物靶点，上皮-间质细胞转分化（EMT）等等。对EGFR的抑制可以使肿瘤细胞对5-FU，紫杉醇等化疗药物更敏感^[70, 71, 72]，但是在KRas突变的肿瘤细胞中，EGFR抑制剂则失去作用^[73]。EMT涉及细胞极化，细胞间连接，细胞骨架改变及细胞外基质降解等有利于肿瘤细胞迁移与侵袭的进程。研究发现，发生EMT的肿瘤细胞会对EGFR抑制剂产生抗药性^[74, 75]。

目前，越来越多有关抗药性的生物分子标记被发现，并尝试应用于肿瘤治疗，深入探究抗药性产生的分子机制必将可以指导临床用药以应对肿瘤细胞的抗药性。

4 本论文研究的目的与意义

IMPDH在多种肿瘤组织中呈现高表达，并且与肿瘤细胞的抗药性密切相关。目前对IMPDH2的研究不多，关于IMPDH2参与调控的肿瘤细胞相关生物学功能及底层分子机制尚没有深入的研究。SUMO化与肿瘤及肿瘤的抗药性密切相关，而目前有关SUMO化调控代谢酶的研究还鲜有报道。

在本实验室前期的研究中，我们发现IMPDH2可以发生SUMO1参与的SUMO化，并找到了IMPDH2发生SUMO化的关键位点K62，以及SUMO化可能影响IMPDH2的酶活性，同时我们也发现多种化疗药物会影响不同肿瘤细胞中IMPDH2的SUMO化水平。

本文通过在肿瘤细胞HeLa和Huh7中敲低IMPDH2和过表达IMPDH2及其相关突变体发现，IMPDH2的SUMO化可以通过影响IMPDH2的酶活性来调控肿瘤细

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.