

胰腺癌抗原递呈的细胞周期性调控机制探究

生命科学学院 李嘉杰

指导教师 于肖飞

摘要: 细胞周期是细胞内一系列高度协调的事件的总和, 涉及细胞衰老、恶性转化等多种生物学过程。越来越多的研究表明, 细胞周期调控通路与癌症的非增殖特征, 如代谢重塑和免疫逃逸密切相关, 然而, 关于主要组织相容性复合物 (Major Histocompatibility Complex, 简称 MHC) 介导的肿瘤自身抗原提呈能力与细胞周期之间的关系, 迄今为止仍缺乏深入研究。本课题参考文献中 FUCCI 系统构建方式, 在小鼠胰腺导管腺癌 (PDAC) 细胞系 (HT 细胞系) 基础上建立携带 FUCCI 系统的细胞系并对其 FUCCI 系统功能加以验证, 其后利用膜蛋白抗体荧光标记技术结合流式分析术证明 MHC I 类分子的表达与细胞周期的相关性, 并尝试采用 RNA-seq 等技术寻找关键的调控因子。实验结果显示, HT 细胞系表面 MHC-I 类分子 (H-2Kb) 表达与细胞周期相关, 且在 G1/S 期表达较低, 在 G2/M 期表达较高。本课题拓展了 FUCCI 系统在其他细胞系中的使用, 同时证明了肿瘤细胞表面 MHC I 类分子的表达与细胞周期的相关性, 对于研究肿瘤细胞的抗原提呈能力与细胞周期之间的联系具有启发作用。

关键词: 细胞周期, MHC 分子, 抗原提呈, FUCCI。

Abstract: The cell cycle is a tightly coordinated process involving cell senescence and malignant transformation. Emerging evidence links cell cycle regulatory pathways to non-proliferative cancer traits, such as metabolic reprogramming and immune evasion. However, the connection between tumor antigen presentation via Major Histocompatibility Complex (MHC) and the cell cycle remains unclear. Here, we established a FUCCI system-equipped mouse pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) HT cell line following literature-described methods and validated its function. Using membrane protein antibody labeling and flow cytometry, we found that MHC-I (H-2Kb) expression fluctuates within the cell cycle, being lower in the G1/S phase and higher in the G2/M phase. RNA-seq and further analyses were adopted to identify key regulatory factors. This study extends FUCCI system applications to new cell lines and reveals a cell cycle-dependent regulation of MHC-I expression in tumor cells, shedding light on the interplay between antigen presentation and cell cycle dynamics.

Keywords: cell cycle, MHC molecule, antigen presentation, FUCCI.

引言（前言）

细胞周期包含一系列严格控制的事件，这些事件导致基因组 DNA 的忠实复制和两个子细胞的繁殖^[1]。简而言之，细胞周期可以分为四个主要阶段：间期 1（G1）、DNA 合成期（S）、间期 2（G2）和有丝分裂期（M）。DNA 复制的保真度和完整性以及姐妹染色单体的及时准确分离是由各种细胞周期检查点质量控制的，主要包括：G1/S 检查点、G2/M 检查点、纺锤体组装检查点（SAC）。

FUCCI（The fluorescence ubiquitination cell-cycle indicator）系统用以在活细胞内精确指示细胞周期阶段，其将细胞周期相关蛋白基因与荧光蛋白基因串联表达，形成融合蛋白，同时受到细胞周期性降解调控，由此，根据串联的细胞周期相关蛋白的周期性表达特性，可以根据荧光的强弱判断单个细胞所处细胞周期的具体阶段^[2]。FUCCI 系统的构建具备可靠的分子生物学基础，且其功能性可被多项实验有力验证^[2, 3]，被广泛应用于细胞周期相关研究中^[4-8]。

细胞分裂过程在癌症的发展中起着至关重要的作用^[9]，越来越多的证据表明细胞周期调控途径与癌症的非增殖特征相关，包括代谢重塑和免疫逃逸^[10]。大量的转录组学研究表明，免疫检查点阻断（ICB）反应性肿瘤与 ICB 抗性肿瘤在细胞周期相关基因上存在显著表达差异，包括关键的 G2/M 检查点和 E2F 靶基因^[11]。此外，细胞周期蛋白 D1 和 CDK4 的基因扩增与人类实体瘤的 ICB 反应呈负相关^[12]。

在抗肿瘤免疫反应中，抗原提呈在两个步骤中起到关键作用：其一，肿瘤抗原必须被树突状细胞（DC）吸收，且交叉呈递用于 CD8⁺T 细胞启动；其二，抗原必须由肿瘤直接呈现，以便被启动的 CD8⁺T 细胞识别和杀伤。肿瘤在这两个步骤中发展多种机制来减少抗原呈递并逃避免疫识别，包括释放高水平的 PGE₂ 作为抑制性 DAMP 阻止 APC 的激活^[13]、减少肿瘤细胞上 HLA-I 的表达等^[14]。有研究证明，CDK4/6 抑制剂能够促进肿瘤抗原提呈，并且促进免疫细胞的浸润，CDK4/6 抑制剂能通过抑制 E2F 介导的 DNA 甲基转移酶 1（DNMT1）的转录，进一步抑制 DNMT1 介导的内源性逆转录病毒元件（ERV）启动子区域甲基化，增加 ERV 的表达，从而触发以增加干扰素 λ （IFN γ ）和 MHC I/II 类抗原为特征的转录组^[15]。这些肿瘤衍生的抗原募集更多的免疫细胞浸润到肿瘤部位，以抑制肿瘤生长并促进肿瘤细胞的清除。

我们由这些研究获得启发，期望在无药物处理的情况下探索肿瘤细胞抗原提

呈能力与其所处细胞周期特定阶段的相关性。我们首先参考文献中 FUCCI 系统构建方式，在 HT 细胞系基础上建立了携带完整 FUCCI 系统的 HT-FUCCI 细胞系；接下来，我们通过一系列实验（如共聚焦延时成像技术、流式分析术、RT-qPCR 等）验证了 HT-FUCCI 细胞系的功能性，即确定 FUCCI 系统可以正确指示细胞的细胞周期；在获得能够正确指示细胞周期的肿瘤细胞系后，我们利用膜蛋白抗体荧光标记技术结合流式分析术证明了 MHC I 类分子的表达与细胞周期的相关性，发现 HT 细胞系表面 MHC-I 分子（H-2Kb）表达与细胞周期相关，且在 G1/S 期表达较低，在 G2/M 期表达较高。后续我们进行了 RNA-seq 实验，但遗憾的是我们难以解读所获得的实验结果，且发现在转录水平上 H-2Kb 分子的表达与我们此前在流式分析中所得恰恰相反。我们在未来计划进行 CRISPR 筛选实验来寻找导致 MHC-I 膜表达细胞周期性变化的调控基因。

1 实验流程与框架

本课题的实验内容主要包含两部分：第一部分为证明 MHC-I 表达与细胞周期的相关性，该部分应在项目的中期报告前完成，为该项目主体部分；第二部分为探究此前所证 MHC-I 表达细胞周期性的可能调控基因，为项目的探索部分。

在第一部分实验中，我们尝试证明肿瘤细胞抗原提呈能力与其所处细胞周期特定阶段的相关性，我们着眼于 MHC-I 在肿瘤细胞表面的表达水平在整个细胞周期中的变化。在预实验中，我们使用 DAPI 对细胞核 DNA 染色或细胞周期阻滞剂处理来确认细胞周期信息，并通过免疫荧光技术使用荧光抗体标记细胞表面的 MHC-I 分子（H-2Kb），发现处于 G1 期细胞的膜表面 H-2Kb 的表达量显著低于 G2/M 期细胞。但考虑到 DAPI 以及细胞周期阻滞剂具有细胞毒性，无法在活细胞中动态指示细胞周期，且处理后的细胞不适用于后续分选培养，我们考虑在正式实验中采用内源性荧光依赖的细胞周期指示系统——FUCCI 系统。在正式实验中，首先应参考文献中 FUCCI 系统构建方式，在 HT 细胞系基础上建立携带完整 FUCCI 系统的 HT-FUCCI 细胞系。接下来，需要验证 HT-FUCCI 细胞系的功能性，即确定 FUCCI 系统可以正确指示细胞的细胞周期，分为三个步骤进行：其一结合文献报道，判断流式分析下表达不同荧光的细胞分群是否明显、双阴性细胞是否较少；其二，使用共聚焦延时成像技术，观察细胞在完整细胞周

期内的荧光特性的变化；其三，根据荧光特性，对细胞进行分选获得理论上处于 G1、S、G2/M 期的三群细胞，通过 RT-qPCR 实验检测三群细胞中细胞周期标志性基因的表达水平，由此判断所得分群是否准确代表了处于不同时期的细胞。最后，利用膜蛋白抗体荧光标记技术结合流式分析术尝试证明 MHC I 类分子的表达与细胞周期的相关性。（图 1）

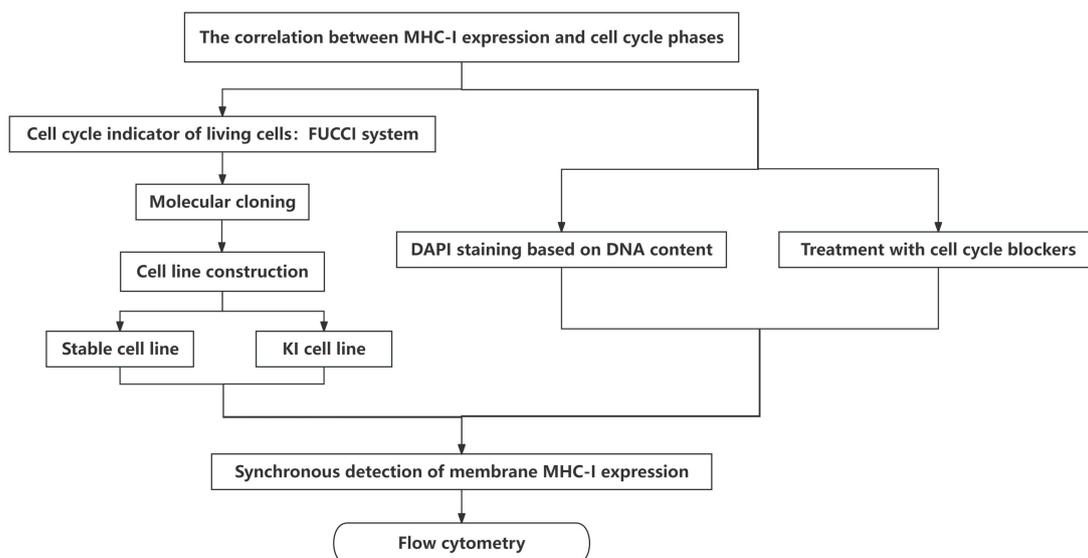


图 1. 实验流程与框架 (Part 1)

在第二部分实验中，我们对所得的 FUCCI-HT 细胞系根据荧光进行分选，获得处于三个细胞周期（G1、S、G2/M 期）的细胞，用于 RNA-seq，在 RNA-seq 结果中重点关注 H-2Kb 分子的表达水平，以及随细胞周期呈现特定表达水平波动的基因（如在 G1/S 期表达较低，在 G2/M 期表达较高）。同时我们构建了 sgRNA 文库，期望通过 CRISPR 筛选来寻找调控 MHC-I 分子细胞周期性表达的基因。

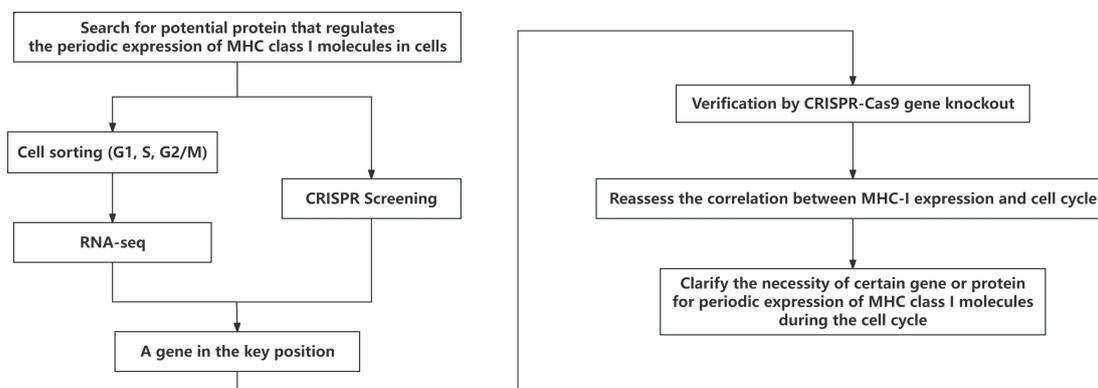


图 2. 实验流程与框架 (Part 2)

2 前期发现与预实验

利用 HT 细胞系，对细胞基因组 DNA 进行 DAPI 染色，同时对细胞膜上的 H-2Kb 蛋白（该品系小鼠中稳定表达的一类 MHC-I 分子）使用流式荧光抗体染色，通过流式分析，根据 DAPI 荧光强度并通过 Flowjo 软件拟合细胞周期，对处于 G0/G1、S、G2/M 期的细胞进行分群，检测不同细胞周期细胞 H-2Kb 阳性细胞比例与平均荧光强度（MFI），结果如下图所示（图 3）。由结果可知，G2/M 期细胞的 MHC I 类分子表达量显著高于 G0/G1 期细胞。对于经过不同细胞周期阻滞剂处理（OH-Urea 将细胞阻滞在 G1/S 期，RO-3306 将细胞阻滞在 G2 期）的 HT 细胞，同样处理后用流式细胞仪检测相同项目，结果如下图所示（图 4）。由结果可知，被阻滞在 G2 期细胞的 MHC I 类分子表达量显著高于被阻滞在 G1/S 期的细胞。

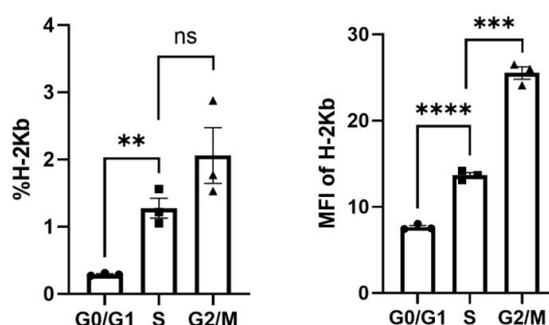


图 3. 处于不同细胞周期的 HT 细胞的 H-2Kb 定量检测

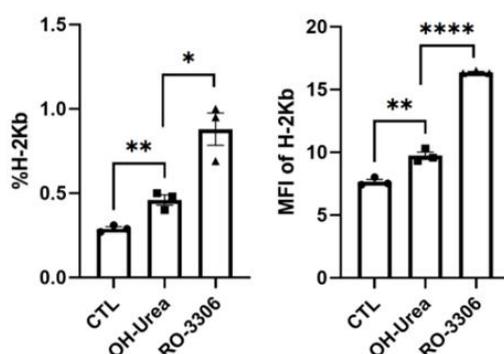


图 4. 经不同细胞周期阻滞剂处理的 HT 细胞的 H-2Kb 定量检测

综合以上发现，我们初步认为，HT 细胞表面的 MHC-I 分子与其所处的细胞周期时期具有一定的相关性，具体体现在处于 G1 期细胞的膜表面 H-2Kb 的表达量显著低于 G2/M 期细胞。考虑到 DAPI 染料的细胞毒性及后续实验要求，我们仍需要 FUCCI 系统来获知细胞周期信息并进行后续实验。

3 FUCCI 系统的构建

在该项目中，我们需要构建插入完整 FUCCI 系统的 HT 细胞系，该细胞系能通过内源性荧光指示细胞周期。细胞系构建一般通过两种方式进行：慢病毒转导方式获得稳转细胞系、目的质粒以阳离子脂质体转导方式在 Rosa26 位点同源重组获得 Knock-in 细胞系。在该项目中，我们同时采用这两种方式构建了稳转 FUCCI-HT 细胞系与 KI FUCCI-HT 细胞系。

3.1 FUCCI 质粒构建

选用实验室已有的 pXYH1 与 XYU486 质粒为背景质粒，前者含慢病毒转导所需的关键元件，如 5'LTR、3'LTR、HIV-1 Ψ 等，用于构建稳转细胞系；后者含 Rosa25 位点两侧 800bp 同源臂，用于构建 KI 细胞系。在背景质粒基础上插入参考的 FUCCI(CA)2.1 模板序列（来自于 Sakaue-Sawano, A., et al. (2017)），其内包含 hCdt1-mCherry probe 和 AmCyan1-Gem1 probe，两个 probe 之间根据文献中 FastFUCCI^[16] 的构造使用 P2A 元件相连。在实际质粒构建过程中，考虑到实验室现有可用质粒或片段，我们将 AmCyan1 换为 mVenus，并使用 CMV 启动子（图 5）。最终获得目的质粒 pXYU846-FUCCI in pXYH1 background 和 pXYU847-Rosa26 donor-FUCCI and puro（图 6）。

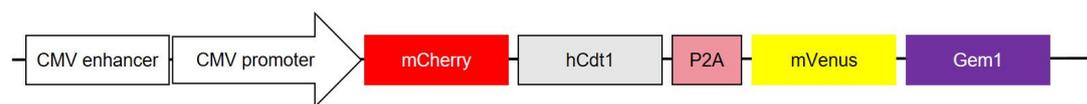


图 5. FUCCI(CA)2.1 的核心元件

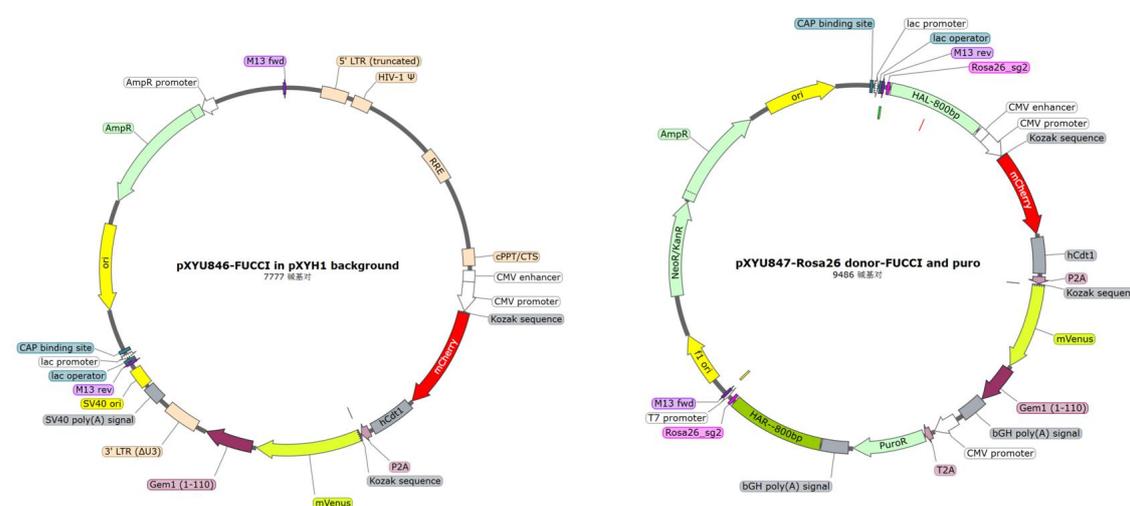


图 6. pXYU846-FUCCI in pXYH1 background 与 pXYU847-Rosa26 donor-FUCCI and puro

3.2 FUCCI-HT 细胞系构建

对于稳转细胞系，采用阳离子脂质体转染方式包毒，其后收取含包装入目的质粒的病毒上清液对 HT 细胞进行共两次转导。对于 KI 细胞系，直接将目的质粒与 Rosa26 sgRNA 质粒转染入 HT 细胞。对于转导转染后所得的稳转细胞与 KI 细胞，前者使用流式细胞分选仪进行两轮分选，后者在经历两轮 Puro 药筛后直接分选出单克隆细胞。对于 FUCCI 稳转细胞系，第一轮分选前，双阴性细胞占绝大多数 (~60%)，细胞分群不明显，与文献中的结果相距甚远。第一次分选出 mCherry 或 mVenus 表达的细胞；第二轮分选出单克隆细胞 96 个，均为 mVenus 和 mCherry 双阳性细胞；最终，我们选定 A03 单克隆作为实验细胞株（图 7）。对于 FUCCI Knock-in 细胞系，由于导入质粒中含有 PuroR，因此我们使用抗生素 Puromycin 进行两轮筛选；药筛后，与稳转细胞系相似，我们进行了单克隆的分选，最终选定 1D2 细胞株作为实验细胞株（图 8）。

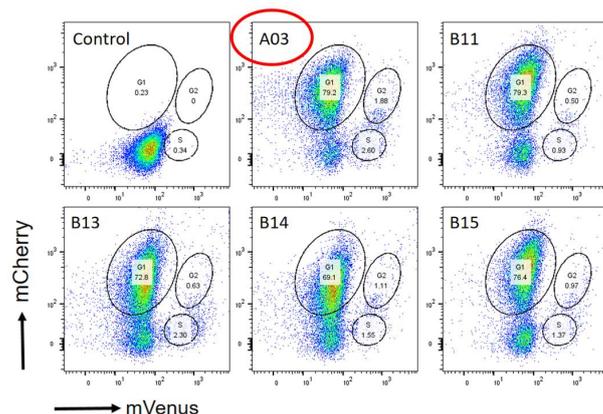


图 7. 稳转细胞系 5 株单克隆中选定 A03 细胞株（红）

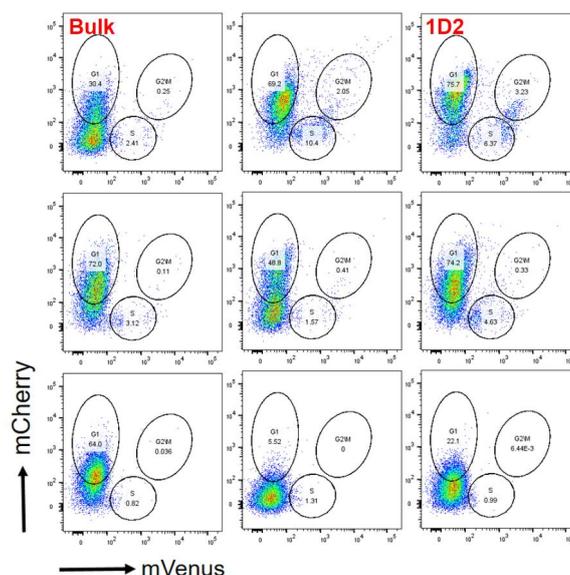


图 8. KI 细胞系 8 株单克隆中选定 1D2 细胞株（红）

4 FUCCI 系统功能验证

在获得 FUCCI-HT 细胞株后，我们希望从多个角度验证 FUCCI 正确指示细胞周期的能力。根据 FUCCI 系统的分子机理，mCherry+mVenus-的细胞应处于细胞周期的 G1 期，mCherry-mVenus+的细胞应处于 S 期，而 mCherry+mVenus+的细胞应处于 G2/M 期(图 9)。我们使用长时程延时共聚焦摄影技术和 RT-qPCR 尝试证明 FUCCI 系统能够正确指示细胞周期。

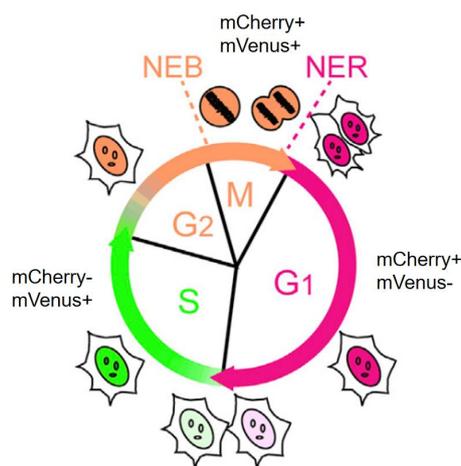


图 9. FUCCI 系统中荧光表达与细胞周期的对应关系^[2]

4.1 A03 细胞株在流式分析下的荧光表达模式

对 A03 细胞进行流式分析并与未导入 FUCCI 系统的 HT 细胞进行比较，可见 A03 细胞在 mCherry 和 mVenus 荧光表达上分群十分明显，分为三群，其中 mCherry+mVenus- 细胞约占 28%，mCherry-mVenus+ 细胞约占 37%，mCherry+mVenus+ 细胞约占 11%，荧光表达模式与文献报道相近(图 10)。

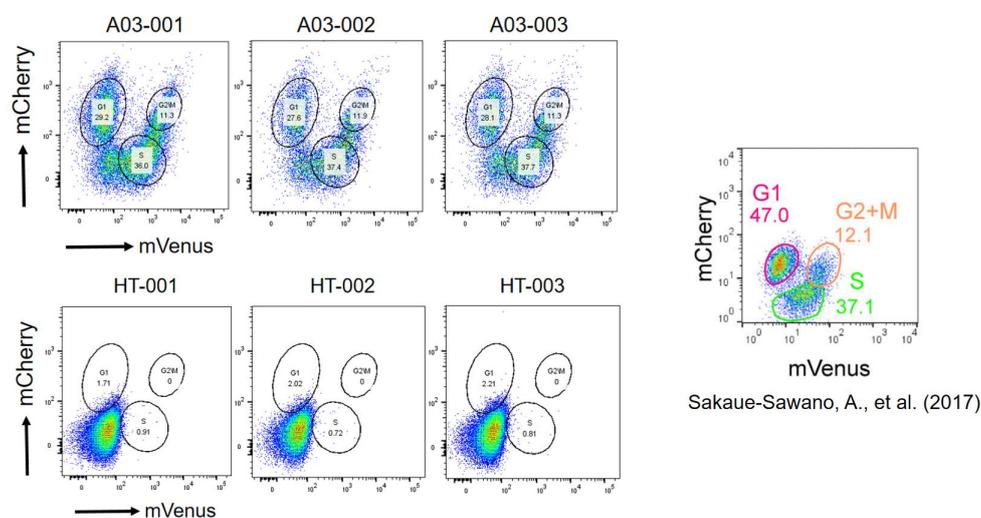


图 10. A03 细胞的荧光表达模式(左)与文献报道的 FUCCI-HeLa 细胞荧光表达模式(右)

4.2 WB 验证 P2A 元件的充分自切割

考虑到在 FastFUCCI 构建中 P2A 元件可能存在未能自切割的情况，由此会影响荧光表达模式，我们尝试用 WB 实验检测细胞内是否含有两个 probe 串联表达的大融合蛋白。实验结果可见基本不存在 80kDa 的大融合蛋白，说明 P2A 元件自切割充分，不会影响后续实验。（图 11）

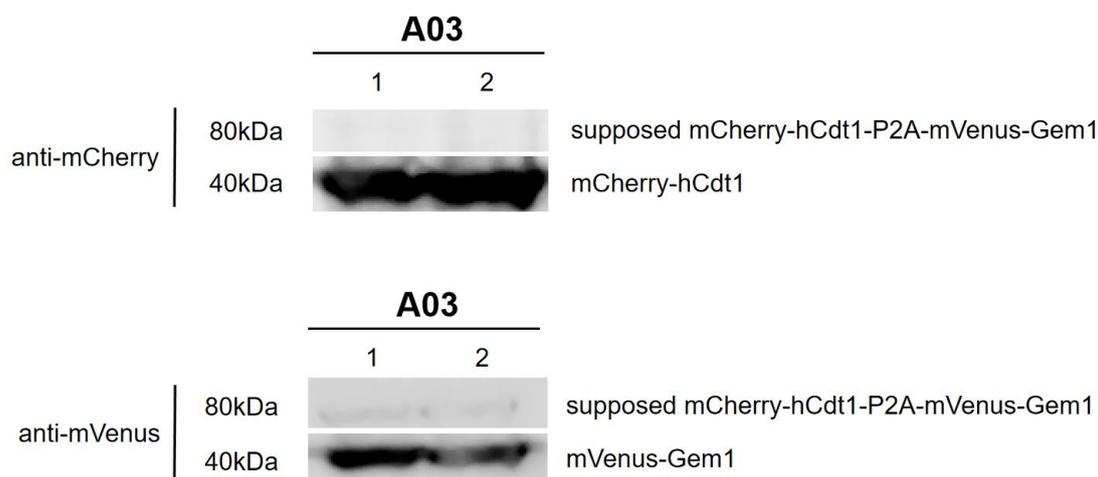


图 11. WB 实验检测由 P2A 元件未能自切割形成的融合蛋白

40kDa 是两个 probe 分别表达的正常小融合蛋白大小，80kDa 则是对应可能存在的大融合蛋白大小；分别使用 anti-mCherry 抗体与 anti-mVenus 标记结合并可视化

4.3 长时程延时共聚焦成像技术检测 A03 活细胞的荧光表达模式

我们通过长时程延时共聚焦成像技术对细胞进行拍摄，观察细胞在完整细胞周期内的荧光特性的变化，结合显著节点（如以核膜破裂和重建为标志的 M 期起始与结束）判断 FUCCI 系统是否能够正确指示不同的细胞周期时期（图 12）。

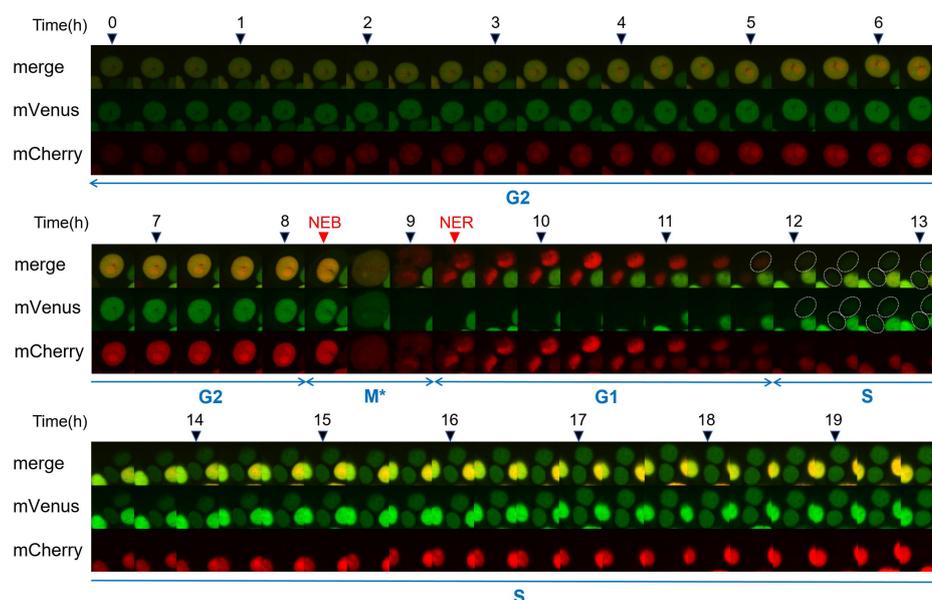


图 12. A03 细胞长时程延时共聚焦成像结果图（20h）

由拍摄结果，易确认核膜破裂（NEB）与核膜重建（NER）的节点，由此确定 M 期；M 期前为 G2 期，其后为下一次分裂的 G1 期及 S 期，在图中可见细胞的荧光表达模式完全符合预期，即在 G1 期表达 mCherry，在 S 期表达 mVenus，在 G2/M 期同时表达 mCherry 和 mVenus。

4.4 RT-qPCR 检测细胞周期相关基因在不同细胞群中的表达水平

我们根据荧光表达模式将细胞分选为三群，分别假定它们对应于 G1 期、S 期、G2/M 期，尽快提取 RNA 后进行反转录获得细胞 cDNA，用于使用 RT-qPCR 检测这三群细胞的细胞周期相关基因表达差异（图 13）。理论上，Cdkn2b 基因在 G1 期表达最高，Cdc6 与 Mcm6 基因在 S 期表达最高，Aurka 与 Ccna2 基因在 S/G2/M 期表达最高^[17]。

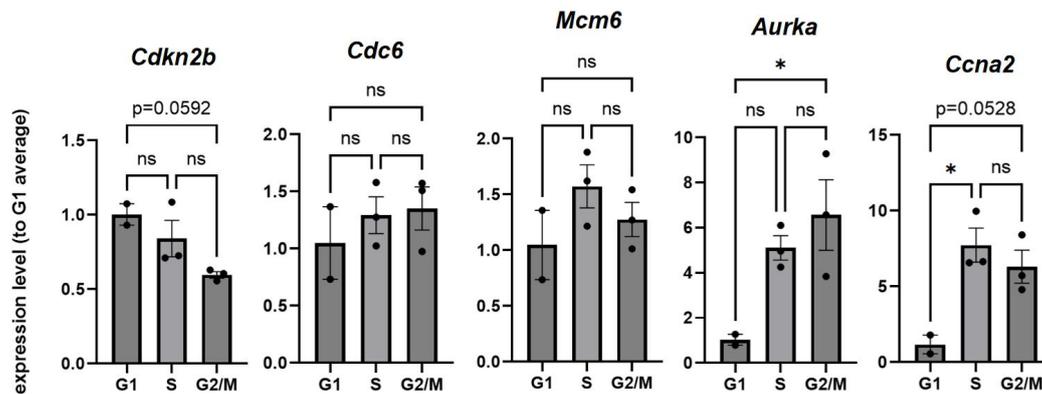


图 13. RT-qPCR 检测细胞周期相关基因在不同细胞群中的表达水平

(n = 3 (G1 期 n=2); 数据采用 means ± SEM 展示; ns. P ≥ 0.05 ; *. P < 0.05; ordinary one-way ANOVA)

由实验结果可知，大多数细胞周期相关基因的表达符合预期，部分基因表达在各个时期无明显差异，但整体上可以看出符合预期的趋势。

综合上述实验结果，我们所构建的 HT-FUCCI A03 细胞株能够通过 FUCCI 系统的内源性荧光稳定且准确地指示细胞周期。

5 MHC-I 表达与细胞周期相关性验证

使用免疫荧光技术，以 α-H-2Kb-APC 抗体标记细胞表面 H-2Kb 分子，结合流式分析术检测 APC、mCherry、mVenus 荧光来探究细胞周期（由 FUCCI 系统内源性 mCherry 与 mVenus 荧光表征）与 MHC-I 分子表达水平（由 APC 荧光表征）的相关性。

5.1 A03 细胞株 MHC-I 表达与细胞周期相关性

A03 细胞株的流式分析结果如下图所示（图 14）。可见无论是 H-2Kb 分子的阳性率或者是 MFI，G2/M 期细胞表面 H-2Kb 分子的表达最高，且显著高于 G1 期细胞。

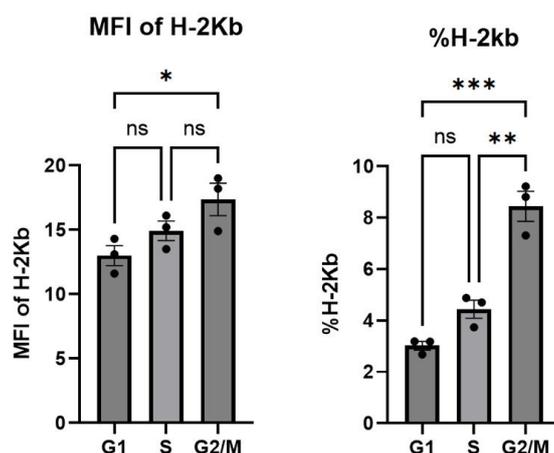


图 14. A03 细胞株 MHC-I 表达与细胞周期相关性

(n = 3; 数据采用 means \pm SEM 展示; ns. $P \geq 0.05$; *. $P < 0.05$; **. $P < 0.01$; ***. $P < 0.001$; ordinary one-way ANOVA)

5.2 1D2 细胞株 MHC-I 表达与细胞周期相关性

1D2 细胞株的流式分析结果如下图所示（图 15）。结论与 A03 细胞株所得相同，无论是 H-2Kb 分子的阳性率或者是 MFI，G2/M 期细胞表面 H-2Kb 分子的表达最高，且显著高于 G1 期细胞。

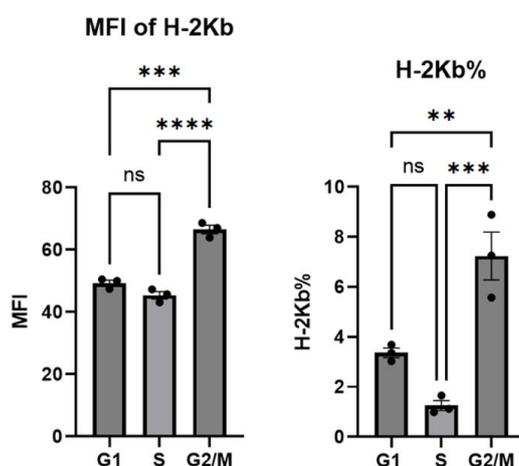


图 15. 1D2 细胞株 MHC-I 表达与细胞周期相关性

(n = 3; 数据采用 means \pm SEM 展示; ns. $P \geq 0.05$; **. $P < 0.01$; ***. $P < 0.001$; ****. $P < 0.0001$; ordinary one-way ANOVA)

6 RNA-seq 检测不同细胞周期差异表达基因

为获知具有细胞周期性表达特征且表达模式与 MHC-I 分子相近的基因，我们对分选所得处于 G1、S、G2/M 期的细胞提取 RNA 后进行 RNA-seq，采用多种生物信息学手段分析数据。

6.1 细胞周期相关基因的表达模式

选取在此前 RT-qPCR 实验中检测的基因 *Cdc6*、*Aurka*、*Ccna2*，可见在 RNA-seq 中其表达模式完全符合预期，即 *Cdc6* 在 S 期表达最高，*Aurka* 与 *Ccna2* 基因在 G2/M 期表达最高，证明 FUCCI 系统能够可靠指示细胞周期。（图 16）

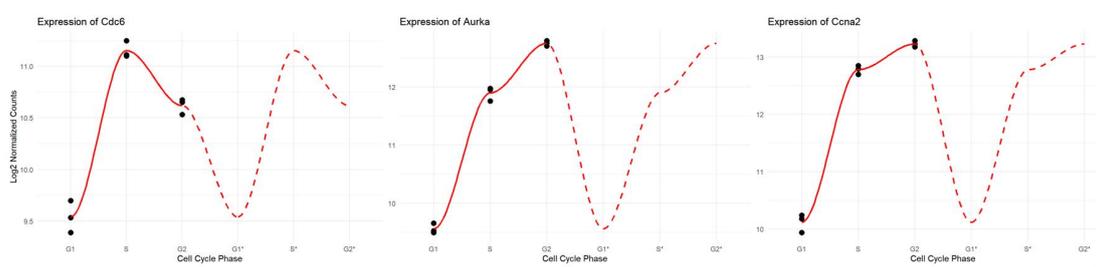


图 16. 细胞周期相关基因的表达模式

6.2 MHC-I 基因的表达模式

选取 H2-K1 和 H2-D1 作为典型的 MHC-I 基因检测其在细胞周期中转录水平的表达变化，发现 MHC-I 基因的表达模式与预期并不相同。流式分析检测可知细胞在 G2/M 期表面 MHC-I 分子表达最高，而在转录水平却是在 G1 期达到峰值。我们认为，细胞表面 MHC-I 分子的表达模式可能与 MHC-I 分子的翻译水平调控、翻译后水平调控相关（如 MHC-I 分子的积累、泛素化降解等），而与其转录水平调控无直接联系。（图 17）

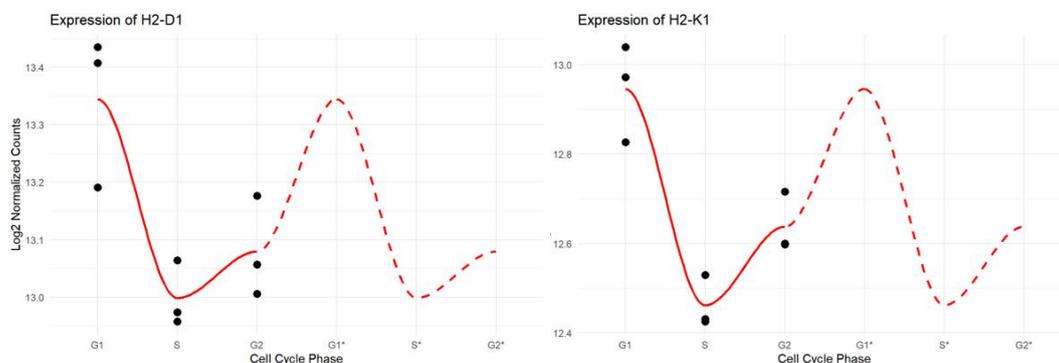


图 17. MHC-I 基因的表达模式

6.3 MHC-I 相关调控因子的表达模式

为进一步探究 MHC-I 分子表达模式的影响因素，我们选取了文献中报道的 MHC-I 基因转录因子 *Nrc5*^[18]、*Yy1*^[19]，以及可通过自噬途径降解 MHC-I 分子的 *Irgq*^[20]。结果显示这些基因的表达都具有明显的细胞周期性特征，特别是 *Irgq* 在 G1 期的表达显著较 G2/M 期高，可能能够促进 G1 期 MHC-I 蛋白的自噬降解，从而导致 G1 期 MHC-I 膜蛋白表达降低。（图 18）

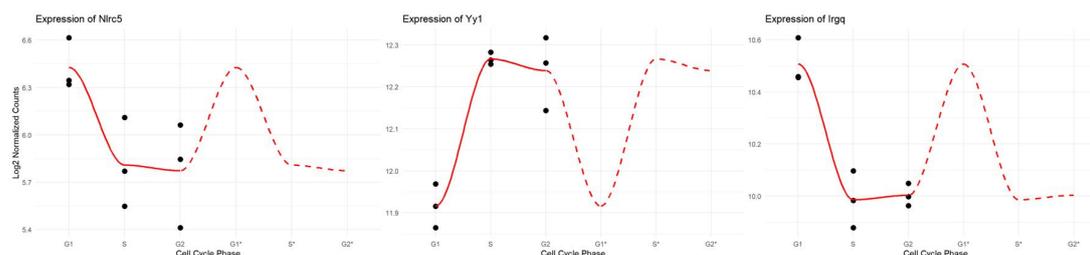


图 18. MHC-I 相关调控因子的表达模式

6.4 K-means 聚类与 GO 富集分析

将 RNA-seq 所得基因按照细胞周期内的表达模式进行 K-means 聚类得到如下图所示 10 个簇（图 19）；再进行 GO 富集分析，未发现与抗原加工与提呈显著相关的基因簇，说明抗原提呈相关基因在细胞周期内的表达模式并不是完全统一的（图 20），可能是由个别基因的独特表达模式引起了 MHC-I 类分子表达的细胞周期特性。

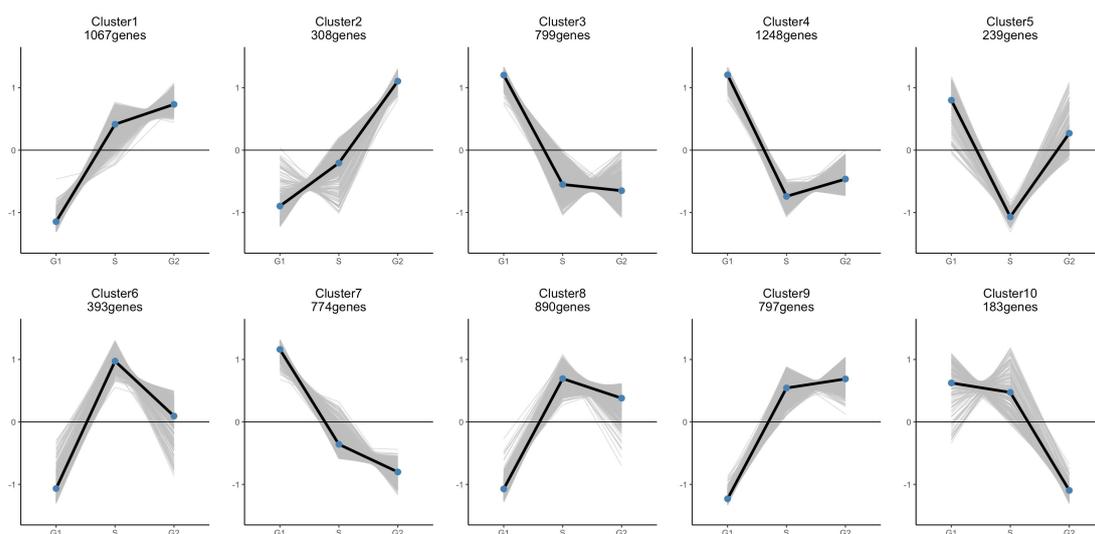


图 19. K-means 聚类得到 10 个基因簇

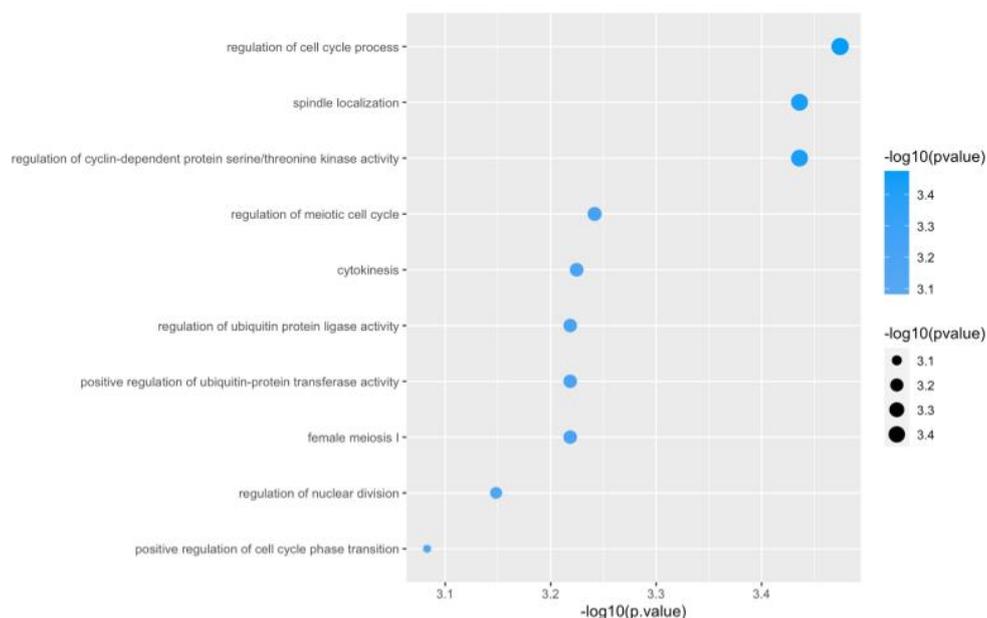


图 20. GO 富集分析结果（以 Cluster2 为例）

7 讨论

在本课题中，我们将 FUCCI 系统应用于小鼠胰腺导管癌细胞系，成功构建 HT-FUCCI 稳转与敲入细胞系，并进行了一系列严格的功能性证明，所得细胞株有望被广泛应用于探索细胞周期与胰腺导管癌发生发展的相关性。我们利用膜蛋白抗体荧光标记技术结合流式分析术证明了 MHC I 类分子的表达与细胞周期的相关性，发现 HT 细胞系表面 MHC-I 分子(H-2Kb)在 G1/S 期表达较低，在 G2/M 期表达较高。后续 RNA-seq 结合生信分析发现，MHC-I 基因的表达模式与预期并不相同，这可能意味着 MHC-I 分子的细胞周期性表达与其翻译水平调控、翻译后水平调控相关（如 MHC-I 分子的积累、泛素化降解等），而与其转录水平调控无直接联系。

值得注意的是，有研究报道^[18]，大型肿瘤中，呈现 FUCCI 绿色和黄色的（即处于 S 期或 G2/M 期）增殖性癌细胞位于表面或血管附近，而呈现 FUCCI 红色的静止性癌细胞则位于肿瘤的中心区域（在那里它们因营养匮乏和缺氧而进入静默状态）。由于化疗主要对分裂的癌细胞起杀伤作用，因此无法杀伤处于肿瘤核心区域的细胞，导致化疗后肿瘤的复发。与此相似，我们认为处于核心区域的 G1 期肿瘤细胞抗原提呈能力下降，导致其不能有效地被效应 T 细胞杀伤，由此促进肿瘤的免疫逃逸。因此，我们的发现能够部分解释实体肿瘤难以依赖自身免疫系统完全清除的现象，同时对于临床上细胞周期相关激酶抑制剂（CDKi）及

细胞周期阻滞剂的使用具有重要的指导意义,有助于进一步评估这些药物对于肿瘤增殖能力与免疫特性的多重影响,并优化其在联合免疫治疗中的应用策略。

参考文献

- [1] Nurse, P. (2000) A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* 100, 71–78
- [2] Sakaue-Sawano A, Yo M, Komatsu N, Hiratsuka T, Kogure T, Hoshida T, Goshima N, Matsuda M, Miyoshi H, Miyawaki A. Genetically Encoded Tools for Optical Dissection of the Mammalian Cell Cycle. *Mol Cell*. 2017 Nov 2;68(3):626-640.e5.
- [3] Sakaue-Sawano, A., Kurokawa, H., Morimura, T., Hanyu, A., Hama, H., Osawa, H., Kashiwagi, S., Fukami, K., Miyata, T., Miyoshi, H., Imamura, T., Ogawa, M., Masai, H., & Miyawaki, A. (2008). Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell*, 132(3), 487–498.
- [4] Duerr, T. J., Jeon, E. K., Wells, K. M., Villanueva, A., Seifert, A. W., McCusker, C. D., & Monaghan, J. R. (2022). A constitutively expressed fluorescent ubiquitination-based cell-cycle indicator (FUCCI) in axolotls for studying tissue regeneration. *Development (Cambridge, England)*, 149(6), dev199637.
- [5] Lu, Y., Massicano, A. V. F., Gallegos, C. A., Heinzman, K. A., Parish, S. W., Warram, J. M., & Sorace, A. G. (2022). Evaluating the Accuracy of FUCCI Cell Cycle In Vivo Fluorescent Imaging to Assess Tumor Proliferation in Preclinical Oncology Models. *Molecular imaging and biology*, 24(6), 898–908.
- [6] Genet, G., Genet, N., Paila, U., Cain, S. R., Cwiek, A., Chavkin, N. W., Serbulea, V., Figueras, A., Cerdà, P., McDonnell, S. P., Sankaranarayanan, D., Huba, M., Nelson, E. A., Riera-Mestre, A., & Hirschi, K. K. (2024). Induced Endothelial Cell Cycle Arrest Prevents Arteriovenous Malformations in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Circulation*, 149(12), 944–962.
- [7] Zhang, L., Yang, Y. Y., Xie, L., Zhou, Y., Zhong, Z., Ding, J., Wang, Z. H., Wang, Y. L., Liu, X. P., Yu, F. X., & Wu, J. (2024). JCAD deficiency delayed liver regenerative repair through the Hippo-YAP signalling pathway. *Clinical and translational medicine*, 14(3), e1630.
- [8] Cuitiño, M. C., Pécot, T., Sun, D., Kladney, R., Okano-Uchida, T., Shinde, N., Saeed, R., Perez-Castro, A. J., Webb, A., Liu, T., Bae, S. I., Clijsters, L., Selner, N., Coppola, V., Timmers, C., Ostrowski, M. C., Pagano, M., & Leone, G. (2019). Two Distinct E2F Transcriptional Modules Drive Cell Cycles and Differentiation. *Cell reports*, 27(12), 3547–3560.e5.
- [9] Jamasbi E, Hamelian M, Hossain MA, Varmira K. The cell cycle, cancer development and therapy. *Mol Biol Rep*. 2022 Nov;49(11):10875-10883.
- [10] Liu J, Peng Y, Wei W. Cell cycle on the crossroad of tumorigenesis and cancer therapy. *Trends Cell Biol*. 2022 Jan;32(1):30-44.
- [11] Peng, J. et al. (2019) Single-cell RNA-seq highlights intra-tumoral heterogeneity and malignant progression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Res*. 29, 725–738
- [12] Miao, D. et al. (2018) Genomic correlates of response to immune checkpoint blockade in microsatellite-stable solid tumors. *Nat. Genet*. 50, 1271–1281
- [13] Hangai, S. et al. (2016). PGE2 induced in and released by dying cells functions as an inhibitory DAMP. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 113, 3844–3849.
- [14] Jhunjhunwala, S., Hammer, C. & Delamarre, L. (2021). Antigen presentation in cancer:

insights into tumour immunogenicity and immune evasion. *Nat Rev Cancer* 21, 298–312.

[15] Goel, S. et al. (2017) CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity. *Nature* 548, 471–475

[16] Yano S, Tazawa H, Kagawa S, Fujiwara T, Hoffman RM. FUCCI Real-Time Cell-Cycle Imaging as a Guide for Designing Improved Cancer Therapy: A Review of Innovative Strategies to Target Quiescent Chemo-Resistant Cancer Cells. *Cancers (Basel)*. 2020 Sep 17;12(9):2655.

[17] Raja R, Khanum S, Aboulmouna L, Maurya MR, Gupta S, Subramaniam S, Ramkrishna D. Modeling transcriptional regulation of the cell cycle using a novel cybernetic-inspired approach. *Biophys J*. 2024 Jan 16;123(2):221-234.

[18] Meissner TB, Li A, Biswas A, Lee KH, Liu YJ, Bayir E, Iliopoulos D, van den Elsen PJ, Kobayashi KS. NLR family member NLRC5 is a transcriptional regulator of MHC class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug 3;107(31):13794-9.

[19] Li X, Yi H, Jin Z, Jiang K, Xue K, Wang J, Qian Y, Xiang Q, Zhu S, Yan R, Yang Y, Sun S, Li K, Zhou Z, Yu W, Jiang N, Ding C, Lin X, Zhong J, Dong Y, Liu Y, Yu X. MCRC1 sensitizes T cell-dependent immunotherapy by augmenting MHC-I expression in solid tumors. *J Exp Med*. 2024 Dec 2;221(12):e20240959.

[20] Herhaus L, Gestal-Mato U, Eapen VV, Mačinković I, Bailey HJ, Prieto-Garcia C, Misra M, Jacomin AC, Ammanath AV, Bagarić I, Michaelis J, Vollrath J, Bhaskara RM, Bündgen G, Covarrubias-Pinto A, Husnjak K, Zöller J, Gikandi A, Ribičić S, Bopp T, van der Heden van Noort GJ, Langer JD, Weigert A, Harper JW, Mancias JD, Dikic I. IRGQ-mediated autophagy in MHC class I quality control promotes tumor immune evasion. *Cell*. 2024 Dec 12;187(25):7285-7302.e29.

后记（致谢）：

首先，衷心感谢复旦大学生命科学学院于肖飞教授在本项目立题和研究框架设计过程中给予的悉心指导和宝贵建议，为本研究的顺利开展奠定了坚实的基础。于老师敏锐的科学洞察力和严谨的治学态度让我受益良多。

同时，感谢依含师姐在实验操作和数据分析过程中给予的耐心指导和无私帮助。从实验设计到技术细节，师姐始终给予我细致入微的指点，帮助我不断克服困难并完善实验方案。她对科研的执着与热忱也时刻激励我不断追求卓越。

此外，感谢课题组全体成员在实验过程中提供的帮助和鼓励，正是这种合作与支持的科研氛围让我在学术探索的道路上不断成长。

指导教师评语

该课题通过建立新型细胞报告体系，对抗原递呈的细胞周期调控进行了初步研究，并取得了较好的进展。在此过程中，李嘉杰同学勤奋好学，勤于思考，能够主动提出问题并积极进行文献搜索和讨论；实验过程中认真严谨，表现出良好的科研素养，并出色地完成本课题的研究计划。