

学校编码: 10384

分类号__密级__

学号:

UDC__

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

Mst1/2 激酶特异性抑制剂的筛选

**A high-throughput screening assay for Mst1 and Mst2
kinase inhibitors**

叶金金

指导教师姓名: 陈兰芬教授

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2017年4月

论文答辩时间: 2017年5月

学位授予日期: 2017年

答辩委员会主席: ____

评 阅 人: ____

2017 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

厦门大学博硕士学位论文摘要库

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

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目录

摘要.....	I
ABSTRACT.....	III
1 前言.....	1
1.1 Hippo 信号通路概述.....	1
1.2 Hippo 信号通路的组成.....	1
1.3 Mst1 和 Mst2.....	3
1.3.1 Mst1 和 Mst2 的活性调控.....	4
1.3.2 Mst1/2 激酶的底物.....	7
1.4 Hippo 信号通路与组织再生.....	11
1.4.1 Hippo 信号通路和干细胞.....	12
1.4.2 Hippo 信号通路与肝再生.....	12
1.4.3 Hippo 信号通路与肠道再生.....	13
1.4.4 Hippo 信号通路与心脏再生.....	14
1.5 研究目的和意义.....	14
2.实验材料与方法.....	17
2.1 实验材料.....	17
2.1.1 细胞和菌株.....	17
2.1.2 实验仪器与耗材.....	17
2.1.3 实验药品和试剂.....	18
2.2 实验方法.....	20
2.2.1 细胞相关实验方法.....	20
2.2.2 分子克隆.....	21
2.2.3 蛋白质相关实验与方法.....	27
2.2.4 荧光定量 PCR.....	32

2.2.5 小鼠肝原代细胞的分离与培养.....	34
3 结果与分析.....	37
3.1 高通量筛选系统的构建和优化.....	37
3.1.1 底物 GST-Mob1 的浓度确定.....	38
3.1.2 激酶浓度和反应时间的确定.....	38
3.1.3 ATP 浓度的确定.....	39
3.1.4 Z-factor 的计算.....	40
3.2 小分子化合物的筛选.....	40
3.3 体外激酶实验验证 XMU-MP-1 对 Mst1/2 的抑制效果.....	42
3.3.1 XMU-MP-1 对 Mst1/2 的抑制是剂量依赖性的.....	42
3.3.2 XMU-MP-1 对 Mst1/2 的抑制是 ATP 竞争性的.....	43
3.4 不同细胞系中检测 XMU-MP-1 对 Mst1/2 激酶活性的抑制.....	44
3.4.1 肝脏细胞中 XMU-MP-1 对 Mst1/2 激酶活性的抑制.....	44
3.4.2 在各种细胞系中 XMU-MP-1 对 Mst1/2 的抑制.....	45
4 结论和展望.....	47
参考文献.....	49
致谢.....	59

Table of contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
1 Introduction	1
1.1 the overview of the Hippo signal pathway	1
1.2 The composition of the Hippo pathway	1
1.3 Mst1 and Mst2	3
1.3.1 Regulation of Mst1/2 kinase activity.....	4
1.3.2 Mst1/2 substrates.....	7
1.4 The Hippo pathway in tissue regeneration	11
1.4.1 The Hippo pathway in stem cell self-renew.....	12
1.4.2 The Hippo pathway in liver regeneration.....	12
1.4.3 The Hippo pathway in intestine regeneration.....	13
1.4.4 The Hippo pathway in heart regeneration.....	14
1.5 Purpose and Significance of this thesis	14
2 Materials and Methods	17
2.1 Materials	17
2.1.1 Cell line and bacteria.....	17
2.1.2 Equipments and materials.....	17
2.1.3 Chemicals and reagents.....	18
2.2 Methods	20
2.2.1 Experiments and methods for cell.....	20
2.2.2 Molecular Cloning.....	21
2.2.3 Digestion of plasmid DNA with restriction enzymes.....	27
2.2.4 Real-Time PCR.....	32
2.2.5 Isolation and culture of mouse primary hepatocytes.....	34
3 Results and Analysis	37

3.1 Construction and optimization of high-throughput screening system.....	37
3.1.1 The concentration of substrate GST-Mob1.....	38
3.1.2 Kinase concentration and reaction time.....	38
3.1.3 ATP concentration.....	39
3.1.4 Z-factor calculation.....	40
3.2 Screening of small molecular compounds.....	40
3.3 Inhibition effect of XMU-MP-1 on Mst1/2 by in vitro kinase assay.....	42
3.3.1 The inhibition of XMU-MP-1 on Mst1/2 was dose dependent.....	42
3.3.2 XMU-MP-1 targets Mst1/2 kinase as an ATP competitive inhibitor.....	43
3.4 Inhibitor of Mst1/2 by XMU-MP-1 in various cell lines.....	44
3.4.1 Inhibition of Mst1/2 kinase activity in liver cells by XMU-MP-1.....	44
3.4.2 Inhibition of Mst1/2 by XMU-MP-1 in various cell lines.....	45
4 Discussion and prospect.....	47
Reference.....	49
Acknowledgement.....	59

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

Hippo 信号通路是一条在进化上高度保守的激酶级联信号通路，主要通过调节细胞凋亡和细胞增殖控制器官大小、组织稳态和组织再生。丝/苏氨酸蛋白激酶 Mst1/2 是 Hippo 信号通路的重要组成成员，在生物体内广泛表达，能诱导细胞凋亡，在细胞增殖、存活、形态建成和运动方面都具有重要作用。在一定的刺激下 Mst1/2 发生自磷酸化而活化，活化的 Mst1/2 磷酸化 Mob1 以及在 WW45 的协助下磷酸化 Lats1/2 而使其活化，活化的 Lats1/2 进一步磷酸化转录共激活因子 YAP 使其与 14-3-3 蛋白结合而滞留在细胞质中。在 Hippo 信号通路失活的情况下，YAP 不能被磷酸化而入核与转录因子 TEAD 结合促进下游与细胞增殖和细胞存活相关基因的转录从而促进细胞增殖，抑制细胞凋亡。Hippo 信号通路受到组织损伤信号刺激时会及时动员组织祖细胞及损伤组织的再生，因此筛选 Mst1/2 的激酶特异性抑制剂对于损伤组织修复和再生治疗具有重要意义。本文以 GST-Mob1 作为反应底物，以 Mob1 的磷酸化水平作为指标，构建了一个以 ELISA 为基础的高通量筛选系统，旨在从已有的靶向 Mst1/2 的 ATP 结合位点的小分子化合物库中筛选出能特异性抑制 Mst1/2 激酶活性的小分子化合物。最终经过对 3000 多种小分子化合物的筛选和进一步改造得到了 XMU-MP-1，体外激酶实验证明 XMU-MP-1 对 Mst1/2 的抑制是剂量依赖性和 ATP 竞争性的。接下来我们进一步在许多不同的细胞系中验证 XMU-MP-1 对 Mst1/2 的激酶活性均具有很好的抑制效果。综上所述，我们筛选到了 MST1/2 激酶的特异性抑制剂 XMU-MP-1，其通过对 Hippo 信号通路的调控，而具有潜在的临床应用前景。

关键词：Hippo 信号通路；Mst1/2 激酶；抑制剂；筛选；XMU-MP-1

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

The Hippo signaling pathway plays an important role in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. The Ste20-like kinases Mst1 and 2 (Mst1/2), the mammalian Hippo orthologs, are key components of the Hippo signaling pathway along with a scaffolding protein Salvador/WW45 (Sav), NDR family kinases NDR1/2 and LATS1/2, and an adaptor protein MOB1. Mst1/2 phosphorylate and activate LATS1/2-MOB1, which then phosphorylate their downstream effectors YAP and TAZ. Phospho-YAP/TAZ is either degraded or sequestered in the cytoplasm by 14-3-3 protein. When the Hippo pathway is switched off, YAP/TAZ translocates to the nucleus and forms a functional hybrid transcriptional complex with TEA domain family transcription factors (TEAD1-4) to turn on pro-proliferative and pro-survival genes, thereby enabling cell proliferation. Therefore, Mst1/2 inhibitors would be promising drug candidate for tissue repair and regeneration. In this paper we constructed an ELISA-based high-throughput screening system by using GST-Mob1 as the substrate of Mst1/2, and the phosphorylation level of Mob1 as the indicator, aiming at screening out a small compound that specifically inhibits Mst1/2 kinase activity. After screening an in-house compound library (~3000 compounds) designed to target the adenosine triphosphate (ATP) – binding site of the kinases MST1/2, we obtained XMU-MP-1. In vitro kinase assay demonstrated that the inhibition of Mst1/2 by XMU-MP-1 was dose-dependent and ATP competitive. Next, we further verified that XMU-MP-1 can effectively inhibits Mst1/2 in a variety of cell lines. In conclusion, we found a specific Mst1/2 inhibitor XMU-MP-1. By modulating Hippo pathway activity, it shows a promising prospect in clinical application.

Keywords: the Hippo pathway; Mst1/2 kinase; inhibitor; screening; XMU-MP-1

厦门大学博硕士学位论文摘要库

1 前言

1.1 Hippo 信号通路概述

器官大小的控制机制是发育生物学上困扰人们已久的一个问题。经典的胚胎学研究认为器官的大小有一个固定的比例，比如当小鼠的肝脏被切除三分之二之后，剩下的那三分之一肝脏会在7-10天恢复到它原来的重量然后就停止增殖^[1]。器官可以在适当的临界点停止继续增殖的分子机制目前还不清楚，Hippo信号通路的发现对于解决这个问题提供了一个非常重要的入口。Hippo信号通路是一条在进化上高度保守的激酶级联信号通路^[2]，近十年的研究证明Hippo信号通路对于调节器官大小具有非常重要的作用，Hippo信号通路的失调会导致组织的大量增生，甚至导致肿瘤的发生^[3]。最近新的研究发现Hippo信号通路在维持组织稳态和再生的过程中也有非常关键的作用^[4]。因此，对哺乳动物细胞中Hippo信号通路的生理功能及其调控机制进行探索和研究非常重要，并能够为肿瘤的诊断、治疗和预防以及组织的损伤修复和再生提供新的途径^[5]。

1.2 Hippo 信号通路的组成

Hippo信号通路最先在果蝇中发现，Hippo信号的核心成分最初是通过果蝇遗传嵌合体筛选技术鉴定出来的^[6]，这些组分都是肿瘤抑制基因，包括warts (wts)，Hippo (Hpo) 和salvador (Sav)，这些基因的突变导致组织的过度增生。生化研究表明Hpo可以直接和SAV结合进而磷酸化和激活信号通路的另一个组分Mats^[7]。Hippo信号通路对器官大小的调控部分是通过细胞周期蛋白CyclinE和抗凋亡因子Diap1的转录调控实现的^[8,9]。为了进一步探究Hippo信号通路的下游组成，即找到CyclinE和Diap1的调控因子。2005年，Huang等人所在的Duoqia Pan研究小组利用酵母双杂交的筛选方法发现了一个能够和Wts/Lats相结合的蛋白，并将其命名为Yorki (Yki)^[9,10]。Yki是一个转录调控因子，在其结构上有两个WW结构域，并能够和含有PPxY序列的蛋白结合。Yki蛋白的过表达能够促进细胞的增殖并抑制细胞的凋亡，同时，细胞周期蛋白Cyclin E和抗凋亡因子Diap1的表达增加，这与Hpo，Sav，Wts以及Mats突变后所观察到的表型是相同的，这些结果说明了Yki可能作为Hippo信号通路的下游的一个转录调控因子，随后的生化研究证明Wts可以直接磷酸化Yki和抑制Yki

的活性。至此，在多方研究人员的共同努力下，一条完整的Hippo信号通路得以呈现在人们眼前。在果蝇中，Hippo信号通路的核心成员主要包括：Hpo，Sav，Wts，Mts和Yki。后来研究发现，Hippo信号通路的核心成员在哺乳动物体基因组内是高度保守的，他们对应的同源蛋白依次为Mst1/2，WW45，Lats1/2，Mob1A/B，YAP。在Hippo信号通路中，Hpo/Mst活化后与SAV/WW45结合并磷酸化Wts/Lats，同时，活化的Hpo/Mst也能磷酸化Mts/Mob,磷酸化的Wts/Lats和磷酸化的Mts/Mob结合并磷酸化Yki/YAP，抑制Yki/YAP的转录调控活性，进而调控Yki/YAP下游靶基因所介导的对细胞增殖和细胞凋亡的影响，最终达到调控器官尺寸和大的目的。Hippo信号通路如图1.1^[1]所示：

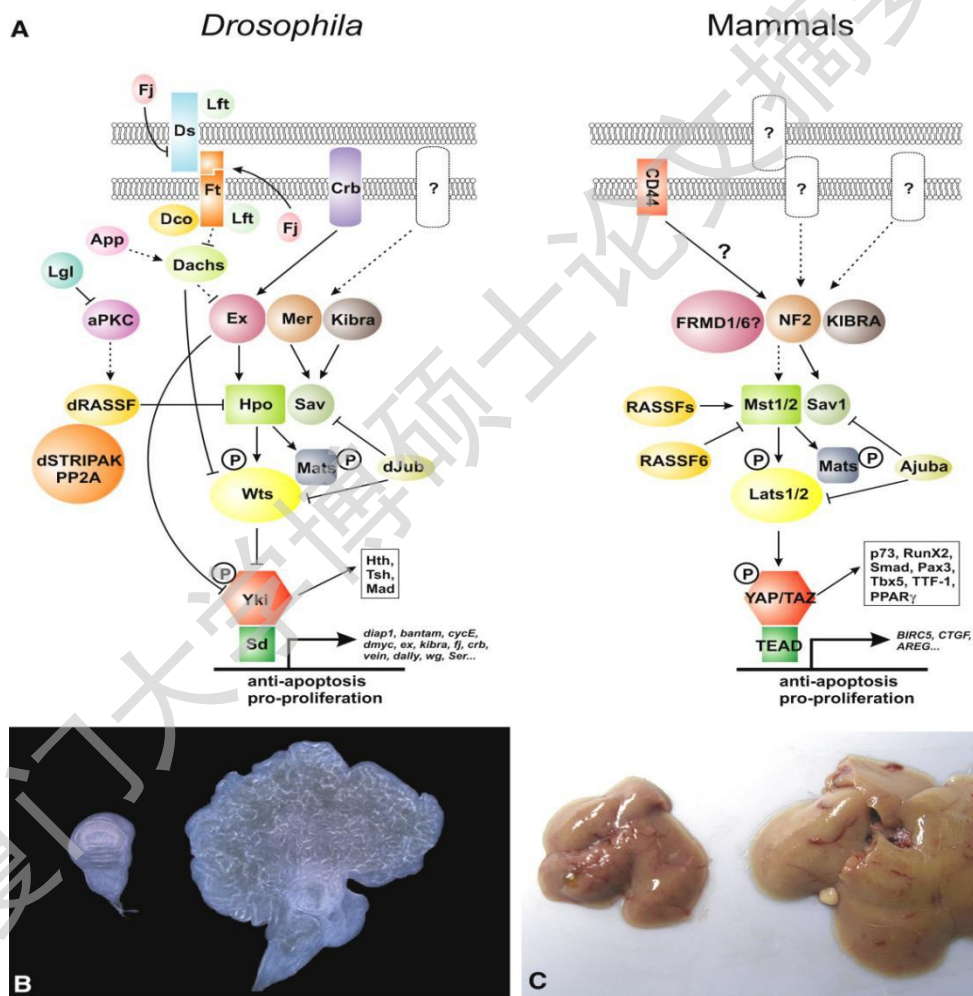


图 1.1 果蝇和哺乳动物中 Hippo 信号通路的组成及主要功能

Fig.1.1. The components and main functions of the Hippo pathway in *Drosophila* and mammals

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 for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库