

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21720091152177

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

***hEphB4* 过量表达果蝇模型的构建及其在
筛药中的初步应用**

**Construction of the *Drosophila* with overexpression of
kinase domain of *hEphB4* and its application in drug screen**

指导教师姓名: 韩家淮 教授

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2012 年 05 月

论文答辩时间: 2012 年 06 月

学位授予日期: 2012 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012 年 06 月

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

摘要

hEphB4 是体内最大的受体酪氨酸激酶家族 hEph 中的一员，它在体内正常情况下，与它的配体 ephrin 一起，参与胚胎期血管生成和血管再生。它的缺失会造成老鼠在胚胎期死亡。近几年的研究证明，hEphB4 的过表达与肿瘤的发展有密切的关系。它参与到肿瘤血管的生成，促进了肿瘤组织获得营养。它的激酶结构域参与了相关信号通路的转导，导致细胞的无限增殖。因此，很多研究都在尝试去得到 hEphB4 的激酶抑制剂。在这方面，已经取得了很大进展，但是目前所得到的抑制剂存在一个共同的问题。对激酶活性的抑制是有效的，但是特异性很差，同时抑制了其他激酶的活性。

为了获得特异性更高的 hEphB4 的激酶抑制剂，我们将建立一个果蝇模型，在这个模型里 hEphB4 的激酶结构域过量表达。首先，我们将 hEphB4 的激酶结构域克隆出来，连进果蝇专用显微注射载体 pUAST 中。然后，将其显微注射进果蝇胚胎，得到转基因果蝇。接下来，将转基因果蝇与许多 GAL4 品系的果蝇杂交，观察出现的表型。本实验中发现，转基因果蝇与 GMR-GAL4 品系的果蝇杂交后，出现了 rough eye 的表型。最终选择使用这个表型进行果蝇筛药。并建立了相应的果蝇模型。

在对 52 种新的潜在的 hEphB4 的激酶抑制剂和一个已知的激酶抑制剂 NVP-BHG712 进行了重复的筛选后，观察到 rough eye 的表型没有任何变化。

关键词：hEphB4；GMR-GAL4；转基因果蝇；基因过量表达；Rough eye

Abstract

hEphB4, a member of Eph receptors which are the largest family of receptor tyrosine kinases. hEphB4 and its ligand Ephrin-B2 is necessary in the maturation of the vessel of the embryo and the regeneration of new vessels. Loss of hEphB4 cause the death of mouse in the embryo. Recent years it is reported that up-regulation of hEphB4 is correlated to the progression of the tumor. In fact hEphB4 play this role via promoting the growth of blood vessel and activating the invasive proliferation. Thus, a lot of research focused on obtaining the kinase inhibitors of hEphB4. Unfortunately, so far we still have not attained an inhibitor with high selectivity and activity.

In order to get more selective inhibitors, we developed a Drosophila model in which the kinase domain of hEphB4 is overexpressed. First, clone the kinase domain of EphB4 from cDNA and inserted in pUAST. Second, microinjected the plasmid pUAST-hEphB4KD into the embryo of the Drosophila and fortunately we get a transgenic fly. Third, cross the transgenic fly with GMR-GAL4 and we observed a rough eye phenotype. Because of the convenience in screen of drug, we choose this phenotype as a reporter.

Unfortunately, we failed to find a chemical compound that can alter rough eye after adding 52 kinase inhibitors and an known hEphB4 kinase inhibitor NVP-BHG712.

Keywords: EphB4; GMR-GAL4; Transgenic Fly; Overexpression; Rough eye

目 录

中文摘要	I
英文摘要	II
中文目录	III
英文目录	VII
第一章 前言	1
1.1 Eph 受体酪氨酸激酶家族.....	1
1.1.1 Eph 受体酪氨酸激酶家族简介	1
1.1.2 Eph 受体酪氨酸激酶生理作用	3
1.1.3 Eph 受体酪氨酸激酶病理作用	4
1.1.4 Eph 受体酪氨酸激酶作用方式	4
1.2 EphB4 受体酪氨酸激酶.....	5
1.2.1 hEphB4 受体酪氨酸激酶生理作用	5
1.2.2 hEphB4 受体酪氨酸激酶病理作用	5
1.2.3 hEphB4 激酶抑制剂研究进展	7
1.3 模式生物果蝇.....	8
1.3.1 果蝇筛药的可行性	8
1.3.2 果蝇筛药的研究进展	11
1.3.3 果蝇简介及筛药的优势劣势	错误! 未定义书签。
1.3.4 果蝇中的 UAS/GAL4 表达系统.....	11
1.3.5 果蝇中表达受体酪氨酸激酶	13
第二章 材料与方法	15
2.1 实验材料.....	15
2.1.1 实验用果蝇株	15
2.1.2 实验相关药品和试剂	15
2.1.2.1 分子生物学相关试剂	15

2.1.2.2	果蝇食物成分	15
2.1.2.2	显微注射相关试剂	16
2.1.2.3	药物筛选相关试剂	16
2.1.3	实验室主要仪器	16
2.2	分子生物学相关实验方法	16
2.2.1.	质粒载体介绍	16
2.2.2	质粒载体改造	18
2.2.3	pUASTM-hEphB4KD 质粒的构建	18
2.2.3.1	引物设计及 PCR 反应	18
2.2.3.2	限制性内切酶消化质粒载体	19
2.2.3.3	DNA 的胶回收	20
2.2.3.4	LIC (Ligase Independent Clone)	21
2.2.3.5	DNA 的连接反应	21
2.2.3.6	PCR 产物的克隆	21
2.2.4	大肠杆菌感受态细胞的制备和转化	22
2.2.4.1	感受态细胞的制备	22
2.2.4.2	感受态细胞的转化	23
2.2.5	质粒 DNA 的提取	23
2.2.5.1	少量提取质粒 DNA (STET 煮沸法)	23
2.2.5.2	中量提取质粒 DNA (碱裂解法)	24
2.3	果蝇相关实验方法	24
2.3.1	果蝇饲养条件	24
2.3.2	果蝇食物配制方法 (1 L)	24
2.3.3	果蝇 DNA 提取方法	25
2.3.4	显微注射方法	26
2.3.4.1	显微注射用质粒的准备	26
2.3.4.2	注射针的准备	26
2.3.4.3	果蝇的扩增	26
2.3.4.4	果蝇胚胎的收集和预处理	26
2.3.4.5	显微注射	27

2.3.4.6 注射后的饲养和杂交	28
2.3.5 果蝇的杂交	28
2.3.5.1 处女蝇的收集	28
2.3.5.2 果蝇的杂交	29
2.3.6 建立的果蝇疾病模型筛选 hEphB4 的激酶抑制剂	29
2.3.6.1 筛药的材料	29
2.3.6.2 筛药的具体流程	29
2.4 电镜相关实验步骤	30
2.3.6.1 取材	30
2.3.6.2 样品的清洗	30
2.3.6.3 样品的固定	30
2.3.6.4 样品的脱水	30
2.3.6.4 样品的干燥	31
2.3.6.5 样品的干燥导电处理	31
2.3.6.6 电镜观察样品	32
第三章 结果与分析	33
3.1 过量表达 hEphB4 果蝇的构建	33
3.1.1 <i>hEphB4</i> 转基因果蝇的构建	33
3.1.2 基因重组染色体的确定	34
3.1.3 <i>hEphB4KD</i> 果蝇与带有 <i>Actin-gal4</i> 、 <i>GMR-gal4</i> 基因的果蝇品系杂交	35
3.1.4 其它品系蝇 <i>hEphB4KD</i> 果蝇的获取及其与 <i>GMR-gal4</i> 果蝇品系的杂交	38
3.1.5 <i>GMR-gal4-hEphB4</i> 稳定过量表达株的杂交构建	39
3.2 用不同浓度的药品饲喂果蝇	41
3.2.1 用 DMSO 饲喂果蝇	41
3.2.2 加药后的结果	421
3.2.3 NVP-BHG712 的给药	42
3.3 总结与讨论	45

参考文献	46
附录 1 图表索引	52
附录 2 缩略语及中英文对照	53
致谢.....	54

厦门大学博硕士论文摘要库

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Contents in Chinese	III
Contents in English	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Eph receptor tyrosine kinase	1
1.1.1 Brief introduction of <i>Eph</i> receptor.....	1
1.1.2 Biological significances of <i>Eph</i> receptor	3
1.1.3 The role of <i>Eph</i> in pathology	4
1.1.4 Mechanisms of <i>Eph</i> receptor	4
1.2 EphB4 receptor tyrosine kinase	5
1.2.1 Biological significances of <i>EphB4</i> receptor.....	5
1.2.2 The role of hEphB4 in pathology	5
1.2.3 The progress in the development of the inhibitors of hEphB4	7
1.3 <i>Drosophila</i>	8
1.3.1 The possibility of drug screen in <i>drosophila</i>	8
1.3.2 The progress of drug screen in <i>drosophila</i>	11
1.3.3 Brief introduction of <i>drosophila</i> and the advantage and disadvantage of drug screen in <i>drosophila</i>	错误! 未定义书签。
1.3.4 UAS/GAL4 system in <i>drosophila</i>	11
1.3.5 Expression of receptor tyrosine kinase in <i>drosophila</i> efficiently	13
Chapter 2 Materials and methods	15
2.1 Experimental materials	15
2.1.1 The lines of <i>drosophila</i> used in this thesis.....	15

2.1.2	Drugs and reagents.....	15
2.1.2.1	Molecular related reagents.....	15
2.1.2.2	The composition of the food of <i>drosophila</i>	15
2.1.2.2	Reagents in the microinjection of <i>drosophila</i>	16
2.1.2.3	Compounds in the drug screen in <i>drosophila</i>	16
2.1.3	Instruments used in this thesis	16
2.2	Experiments and methods for DNA.....	16
2.2.1.	Introduction of plasmid vectors	16
2.2.2	Modification of pUAST	18
2.2.3	Construction of <i>pUASTM-hEphB4KD</i>	18
2.2.3.1	Primers design and PCR	18
2.2.3.2	Digestion of plasmid DNA with restriction enzymes	19
2.2.3.3	Gel extraction.....	20
2.2.3.4	LIC (Ligase Independent Clone)	21
2.2.3.5	Ligation reaction.....	21
2.2.3.6	Cloning of PCR product	21
2.2.4	Preparation of competent cell and transformation.....	22
2.2.4.1	Preparation of competent cell	22
2.2.4.2	Transformation of DNA into competent cell	23
2.2.5	Preparation of plasmid DNA	23
2.2.5.1	Mini-preparation od plasmid DNA.....	23
2.2.5.2	Midi-preparation od plasmid DNA.....	24
2.3	Experiments and methods for <i>Drosophila</i>	24
2.3.1	Fly keeping.....	24
2.3.2	Fly food (1L).....	24
2.3.3	Preparation of fly genome DNA.....	25
2.3.4	Methods for transgenic flies.....	26
2.3.4.1	Preparation of the plasmid	26
2.3.4.2	Preparation of the needle	26
2.3.4.3	Preparation of the fly	26

2.3.4.4	Collection of the embryo of <i>drosophila</i> and preparation for microinjection	26
2.3.4.5	Microinjection.....	27
2.3.4.6	Fly keeping and cross after microinjection.....	28
2.3.5	Fly cross	28
2.3.5.1	Collection of virgin flies	28
2.3.5.2	Fly cross.....	29
2.3.6	Inhibitor screen in drosophila model	29
2.3.6.1	Materials in the inhibitor screen	29
2.3.6.2	The procedure of the inhibitor screen.....	29
2.4	The procedure about SEM	30
2.3.6.1	Prepare specimens.....	30
2.3.6.2	Sample clean	30
2.3.6.3	Specimens are fixed with fixative.....	30
2.3.6.4	Specimens are taken through a graded alcohol dehydration series	30
2.3.6.4	Freeze drying	31
2.3.6.5	Gold coating.....	31
2.3.6.6	Observation on the SEM.....	32
	CHAPTER 3 Results and Discussion.....	33
3.1	Obtain the fly of overexpression of <i>hEphB4KD</i>.....	33
3.1.1	<i>hEphB4KD</i> transgenic fly	33
3.1.2	Identification of the chromosome in which <i>hEphB4KD</i> had been inserted in.....	34
3.1.3	Cross the <i>hEphB4KD</i> transgenic fly with the lines of fly with different <i>gal4</i>	35
3.1.4	Cross the other lines of <i>hEphB4KD</i> fly with the 9146	38
3.1.5	Cross to obtain a stable line that can express <i>hEphB4KD</i> steadily ..	39
3.2	Treat the drosophila with compounds	41

3.2.1	Treat the drosophila with DMSO.....	41
3.2.2	Treat the drosophila with 52 compounds.....	421
3.2.3	Treat the drosophila with NVP-BHG712	42
3.3	Conclusions and discussion.....	45
	Reference.....	46
	Appendix 1 Index of figures and tables	52
	Appendix 2 Abbreviation	53
	Acknowledge.....	54

第一章 前言

1.1 Eph 受体酪氨酸激酶家族

1.1.1 Eph 受体酪氨酸激酶家族简介

Eph 受体最初是在 1987 年在一项研究酪氨酸激酶在肿瘤中的作用时被发现的，也因此得名 Eph，随后在肝癌细胞系中它们的 cDNA 被克隆出来^[1]。这些跨膜受体最初被归类为孤儿受体，没有配体，没有功能^[2]。当发现在 Eph 受体在发育的不同时期在不同部位以不同浓度表达时，Eph 受体的细胞定位的作用便被提出来，这也开创了 Eph 受体和 ephrin 配体家族作为脊椎和无脊椎动物发育中主要的细胞定位系统^[3]。

Eph 受体和它的配体 ephrin 组成了一个重要的细胞交流信息的系统，这个系统在正常的生理上和病原学上有重广泛的作用^[4]。Eph 家族是受体酪氨酸家族最大的一族，它包括 14 个受体及与之相对应的 8 个同族配体^[5]。

Eph 受体有一个模序结构，这个结构包括一个唯一的 N 端 ephrin 配体结合结构域，紧随其后是一个富含半胱氨酸的连接位点和细胞外区域的两个纤连蛋白 III 型重复结构。细胞内结构域是由一个保守的酪氨酸激酶结构域，C 端的一个 α 结构域和一个 PDZ 结合基序。Eph 受体 N 端的 180 个残基的球形结构域对于 ephrin 结合的高亲和力是足够的^[6-8]。虽然相同亚族的 Eph 受体和 ephrin 配体之间的相互作用还不是太清楚，但亚族之间的相互作用是比较少的。细胞内，Eph 受体在细胞膜旁边有几个保守的酪氨酸残基，这是酪氨酸激酶结构域，一个 SAM 蛋白与蛋白相互作用结构域，一个 C 端的 PDZ 结合基序。ephrin 配体与 Eph 受体结合胞外球形结构域结合之后，Eph 受体膜旁边的酪氨酸和丝氨酸残基被磷酸化^[9]。这样，细胞内的酪氨酸激酶转化为活性形式，可以磷酸化受体酪氨酸激酶底物的酪氨酸，接着激活或者抑制下游信号级联反应^[10]。

整个信号转导的过程是在细胞膜附近完成的，配体的与受体的结合会导致 Eph 受体的二聚化，接着 Eph 受体彼此磷酸化对方的酪氨酸残基，磷酸化的酪氨酸残基可以结合 Src 同源结构域 2 或者包含磷酸化酪氨酸结合区域的蛋白^[11]。结

合在受体上的这两个蛋白的磷酸化和激活可以起始信号转导的途径。其它与活化受体结合的相互作用的蛋白质被称为接头蛋白，本身没有酶的活性。这些蛋白的作用主要是把活化的受体酪氨酸激酶与下游信号通路联系起来，如 MAP 激酶信号级联反应^[12]。

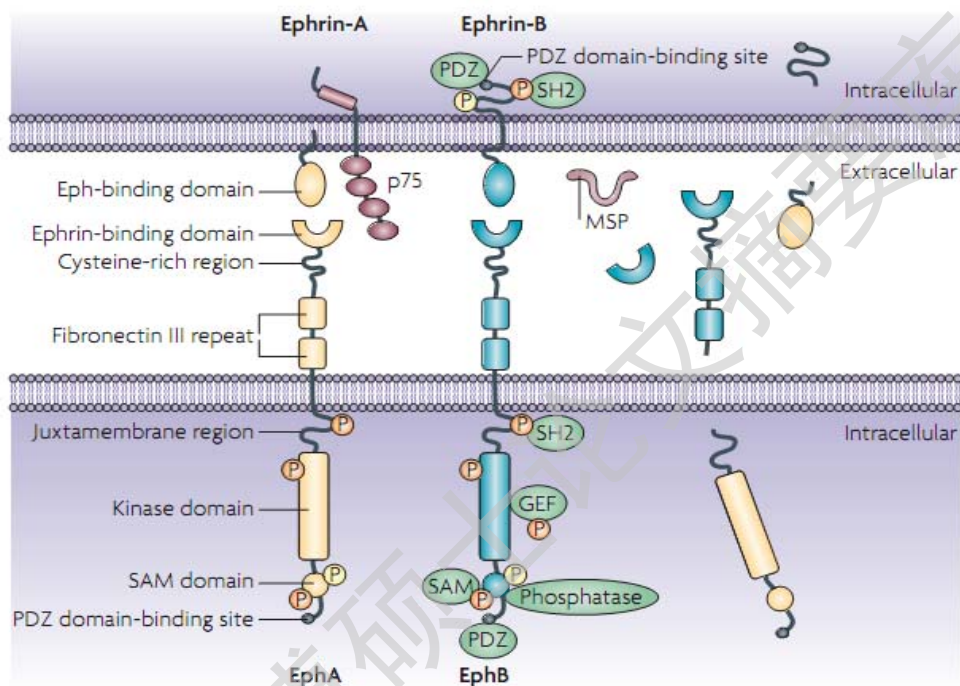


图 1.1 Eph 受体和 ephrin 配体的结构域结构及信号转导

Fig.1.1 Eph receptor and ephrin domain structure and signalling interactions.

(by Elena B. Pasquale., 2010)

与其它经典的跨膜受体及其相应的分泌性配体所组成的信号通路相比，Eph 受体及其 ephrin 配体都是固定在膜上的。EphrinA 是借助糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 分子固定在膜上, EphrinB 则是跨膜蛋白。根据 Eph 的序列特异性以及与 EphrinA、EphrinB 结合的关系, Eph 可以分为 EphA 和 EphB 两个亚家族^[13]。虽然相同亚族的 Eph 受体和 ephrin 配体之间的相互作用还不是太清楚, 但亚族之间的相互作用是比较少的。在人体基因组里有 9 个 EphA 受体杂乱地与 5 个 EphrinA 配体结合, 5 个 EphB 受体杂乱地与 3 个 EphrinB 配体相结合。EphrinB 配体有一个短的胞质区域, 包含 Src 同源结构域 2 和 PDZ 结构域结合基序^[14, 15]。有个例外, EphA4 和 EphB2 既可以与 3 个 EphrinB 配体相结合也可以与 EphrinA5 相结合。

而 EphB4 则专一的优先与 EphrinB2 相结合。这种结合都是在细胞与细胞相互接触的地方，而受体和配体与细胞膜相连，这是 Eph 家族中典型的受体与配体之间的相互作用。除此之外，也有细胞表面释放可溶性的 EphrinA，它有能力激活 EphA2^[16, 17]。

1.1.2 Eph 受体酪氨酸激酶生理作用

Eph 受体酪氨酸激酶及其配体在胚胎发育中的图式形成和形态发生中有着关键的作用^[18-20]。此外，Eph 受体和 ephrin 配体调节细胞的迁移、轴突的伸长及血管的形成^[21, 22]。Eph 受体和 ephrin 配体在骨的重塑、免疫功能、血液凝集、和干细胞等方面的作用正在研究当中。在这个信号系统中，受体和配体结合在细胞膜中，这样可以限制信号转导在细胞与细胞相互接触的地方^[5]。虽然这个家族的配体和受体配对有些混乱，但是家族成员各自的表达模式确保了信号转导的特异性^[23]。

在许多情况下，Eph/ephrin 信号通路会产生排斥信号，这样的话可以帮助生长中的神经元的轴突和迁移细胞到达他们的靶部位^[24, 25]。在这种情况下，细胞会绕开以避免 Eph/ephrin 之间的相互作用^[26-28]。以至于细胞表面表达 Eph 和表达 ephrin 的细胞最后分开在不同的组织结构中^[29, 30]。

分节是大多数无脊椎动物和所有脊椎动物胚胎发育中一个基本的过程，通过分节，生物体开始分成了有功能的单位。在胚胎的分节区域，细胞开始呈现生化和形态边界，边界处细胞的行为有很大不同，对于未来的分化和功能来说非常重要^[19]。在后脑，分节是一个精确的过程。然而，在轴旁中胚层，发育是一个动态的适应的过程，这个过程随着后部身体的生长而变化。通过功能分析，不同 Eph 受体和 ephrin 配体在这些区域表达，据测定 Eph 受体信号是正常发育和分节边界维持的关键^[19]。在斑马鱼中进行的相似的研究表明，在这些区域相似的分节过程，包括一条带状的 Eph 和 ephrin 配体受体表达带，这对于正常的分节是必需的，打破这种表达会导致边界的错位和消失^[31]。

在神经系统发育中，Eph 受体和 ephrin 配体信号通路通过降低轴突生长尖的存活以及排斥迁移的轴突远离 Eph 受体和 ephrin 配体激活的部位，调节轴突的迁移到他们的靶部位^[32, 33]。Eph 受体和 ephrin 配体还参与到把运动神经元导向到脊髓。虽然有几个 Eph 受体和 ephrin 配体参与到运动神经元的导向，但是

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