

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 97195151.9

[51] Int. Cl.

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006年6月21日

[11] 授权公告号 CN 1260360C

[51] Int. Cl. (续)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

[22] 申请日 1997.5.30 [21] 申请号 97195151.9

[30] 优先权

[32] 1996.6.1 [33] GB [31] 9611460.8

[86] 国际申请 PCT/GB1997/001471 1997.5.30

[87] 国际公布 WO1997/046688 英 1997.12.11

[85] 进入国家阶段日期 1998.12.1

[71] 专利权人 路德维希肿瘤研究所

地址 瑞士苏黎士波斯特法沙大街

[72] 发明人 巴特·万汉斯布罗克

迈克尔·德里克·沃特菲尔德

审查员 李 博

[74] 专利代理机构 北京三幸商标专利事务所

代理人 刘激扬

权利要求书 3 页 说明书 48 页 附图 17 页

[54] 发明名称

脂激酶

[57] 摘要

本发明涉及新脂激酶，它是 PI3 激酶家族的一部分。PI3 激酶催化在肌醇中加入磷酸，产生肌醇单磷酸，二磷酸和三磷酸。已经暗示肌醇磷酸在调节细胞内发出信号级联中导致具有表达的变化，这种变化，在其它效应中可以导致细胞骨架的重排和调节细胞移动性。更具体地说，本发明涉及新型人 PI3 激酶，p110 δ ，它与 p85 反应，具有广泛的磷酸肌醇特异性，对与 PI3 激酶 p110 α 相同的激酶抑制剂敏感。但是，与前面鉴定的修饰普遍表达方式的 PI3 激酶相反，p110 δ 选择性地在白细胞中表达。重要的是，p110 δ 在大多数测试的黑素瘤中显示增强的表达，所以在调节黑素瘤展示的移动特性中起重要作用。所以，鉴定增强或减弱 p110 δ 活性的试剂可以阻止癌症的移动。

1. 分离的自身磷酸化多肽，具有序列识别号 1 显示的氨基酸序列代表的 PI3 激酶活性，可选择地通过至少一个氨基酸残基的缺失，替代和附加修饰，特征在于所述多肽是在血液白细胞和/或黑素瘤中选择性表达。

2. 根据权利要求 1 所述的分离多肽，其特征在于所述多肽能够与一个哺乳动物 p85 受体多肽结合。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的分离多肽，其特征在于所述多肽的特征是含有 35~45%的脯氨酸含量的区域。

4. 根据权利要求 3 所述的分离多肽，其特征在于所述的富脯氨酸区域理想地在序列识别号 1 显示的蛋白质序列数据的 292~311 位置，但可以在相当的 PI3 激酶的同源/类似位点。

5. 根据权利要求 1 所述的分离多肽，其特征在于所述多肽是哺乳动物起源和人起源。

6. 编码权利要求 1 所述的多肽的分离核酸分子。

7. 根据权利要求 6 所述的分离核酸分子，其特征在于核酸序列是 cDNA 或基因组 DNA。

8. 根据权利要求 6 所述的分离核酸分子，其特征在于所述分子在克隆重组载体中。

9. 根据权利要求 6 所述的分离核酸分子，其特征在于所述分子适于权利要求 1 所述的多肽的重组表达。

10. 利用权利要求 8 或 9 所述的核酸分子转染或转化的宿主细胞，其特征在于所述核酸分子特异于权利要求 1 所述的多肽的重组合成。

11. 根据权利要求 10 所述的宿主细胞，其特征在于所述细胞是昆虫细胞。

12. 根据权利要求 1 所述的多肽在生产 p110δ 的抗体中的用途。

13. 一种抗体，其与权利要求 1 所述的多肽结合。

14. 根据权利要求 13 所述的抗体，其特征在于所述抗体是单克隆抗体。

15. 根据权利要求 1 所述的多肽的组织特异表达的鉴定方法，包括确定细胞的样品中相关多肽和/或编码它的 mRNA 和/或 cDNA 的存在。

16. 根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于所述方法包括将两个适于与一个本发明的核酸分子的选定部分杂交的核酸分子引物与所述 cDNA 结合。

17. 根据权利要求 15 或 16 所述的方法，其特征在于所述方法包括提供利用所述引物扩增和纯化权利要求 6 所述的核酸分子的一部分的条件。

18. 根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于所述方法包括利用权利要求 13 或 14 所述的抗体检测所述的多肽，其中使用方法包括 ELISA，Western 影印，免疫沉淀或免疫荧光。

19. 体外鉴定有效地调节权利要求 1 所述的多肽的激酶活性的试剂的方法，包括将多肽与具有调节作用的试剂接触，然后观察所述多肽的激酶活性。

20. 根据权利要求 19 所述的方法，其特征在于利用计算机辅助模拟或方便的实验室技术筛选潜在的拮抗剂。

21. 根据权利要求 19 或 20 所述的方法，其特征在于将表达权利要求 1 所述的多肽的细胞与潜在的拮抗物接触，观察所述细胞的移动性。

22. 一种药学/兽医学组合物，包括一种有效地调节权利要求 1 所述多肽活性的抗体。

23. 根据权利要求 22 所述的药学/兽医学组合物, 它可选择地包括稀释剂, 载体或赋形剂和/或是单位剂量形式。

24. 体外控制细胞移动的方法, 包括将细胞群体与权利要求 1 所述的多肽或其拮抗物或拮抗剂接触。

25. 根据权利要求 24 所述的方法, 其特征在于将细胞与本发明的多肽接触增强了细胞的移动性。

26. 有效地阻止权利要求 1 所述的多肽的活性的试剂在体外控制细胞移动中的用途。

27. 根据权利要求 1 所述的多肽在体外增强细胞移动中的用途。

28. 适于与权利要求 6 所述的核酸杂交的反义低聚核苷酸。

29. 根据权利要求 28 所述的反义低聚核苷酸, 其中所述的低聚核苷酸是修饰的低聚核苷酸。

30. 一种含有根据权利要求 28 或 29 所述的反义低聚核苷酸的药学/兽医学组合物。

脂激酶

技术领域

本发明涉及属于 PI3 激酶(PI3K)家族的一部分的新脂激酶,更具体地说,特别涉及新脂激酶各个方面,但不排外地涉及为了诊断或预测细胞的移动或入侵如癌细胞的转移对所述激酶的表达的鉴定;和为了增强、减弱或防止所述的移动或入侵以便分别增强或限制选定细胞的移动;从而干扰所述的表达或抑制所述激酶的试剂。

背景技术

在同时审查中的专利申请 WO93/21328 中公开了酶的 PI3 激酶家族的总结。简言之,这类酶显示磷酸肌醇(下文中称为 PI)3 一激酶活性。根据细胞信息转导和细胞第二信使系统方面知识的主要进展,已知 PI3Ks 在调节细胞功能方面起重要的作用。的确,已知的 PI3Ks 是处于正在增长数目的潜在信号蛋白的成员,这些信号蛋白与配体刺激或细胞转化激活的蛋白质-酪氨酸激酶相关。一旦这种相关成立,它们在细胞信号途径中提供重要的复合物,并朝着得出的结论发展。

PI3 激酶催化在肌醇脂的肌醇环的 3'-OH 位置加入磷酸,产生单磷酸磷脂酰肌醇,二磷酸磷脂酰肌醇和三磷酸磷脂酰肌醇(Whitman 等人,1988,Stephens 等人 1989 和 1991)。在有机物如各种各样的植物,粘质霉菌,酵母,果蝇和哺乳动物中已经鉴定了 PI3 激酶家族(Zvelebil 等人,1996)。

在体内不同的 PI3 激酶产生不同的 3'-磷酸肌醇脂。根据它们体外的脂底物的特异性可以区分三类 PI3 激酶。第一类酶具有广谱底物特异性,并且磷酸化 PtdIns,PtdIns(4)P 和 PtdIns(4,5)P₂。第一类 PI3 激酶包括哺乳动物的 p110 α , p110 β 和 p110 γ (Hiles 等人,1992; Hu 等人,1993; Stephens 等人,1994; Stoyanov 等人,1995)。

p110 α 和 p110 β 是密切相关的 PI3 激酶，它们与 p85 受体蛋白和结合 GTP 的 Ras 反应。

已经克隆了两个 85 千道尔顿(kDa)的亚基， p85 α 和 p85 β (Otsu 等人, 1992)。这些分子含有 N-末端 src 同源-3(SH3)区，与两个富脯氨酸区侧接的断点簇(bcr)同源区和两个 src 同源-2(SH2)区。从 p85 α 基因替代拼接产生或由不同于 p85 α/β 的基因编码的缩短的 p85 蛋白质，都缺乏 SH3 区和 bcr 区，它们似乎是被独特的短 N-末端所替代(Pons 等人, 1995; Inukai 等人, 1996; Antonetti 等人, 1996)。存在于所有 p85 分子中的 SH2 区，提供了具有与各种受体和其它细胞蛋白上的磷酸化酪氨酸残基反应的能力的杂二聚体 p85/p110PI3Ks。与 p110 α 和 β 相反，p110 γ 与 p85 不反应，而与 p101 受体蛋白结合(Stephens 等人, 1996)。p110 γ 的活性受到 G 蛋白亚基的刺激。

第二类 PI3Ks 含有至少在体外磷酸化 PtdIns 和 PtdIns(4)P 而不是 PtdIns(4,5)P₂ 的酶(MacDougall 等人, 1995; Virbasius 等人, 1996, Molz 等人, 1996)。这些 PI3Ks 在 C 末端都含有 C2 区。第二类 PI3Ks 在体内作用仍未知。

第三类 PI3K 具有限制 PtdIns 的底物特异性。这些 PI3Ks 与酵母 Vps34P 同源，Vps34P 在酵母中参与了新形成的蛋白质从高尔基体运输到空泡，哺乳动物溶酶体的等当量(Stack 等人, 1995)。酵母和哺乳动物 Vps34p 存在于与 Vps15p, 150 千道尔顿蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶的复合物中(Stack 等人, 1995; Volinia 等人, 1995; Panaretou 等人, 已提交并公开)。

PtdIns(3)P 作为构成物质存在于细胞中，它的水平在细胞外刺激下，很大程度上不改变。相反，PtdIns(3,4)P₂ 和 PtdIns(3,4,5)P₃ 在休眠细胞中几乎不存在，但在各种生长因子的刺激下快速产生，暗示了很可能有第二信使的功能(Stephens 等人, 1993)。细胞生理中 PI3Ks 和它们的磷酸化脂的作用刚刚开始被理解。这些脂可以完成双重作用：除了发挥物理作用，在脂双层的弯曲部分有传递电荷的作用，它们同时具有与特异结合蛋白反应

和调节它们的定位环境/或活性的能力。其中，这些脂的潜在的靶是蛋白质激酶如蛋白质激酶 C 同工型，蛋白质激酶 N/Rho 激活激酶和 Akt/RAC/蛋白质激酶 B(Toker 等人，1994；Palmer 等，1995；Burgering 和 Coffey,1995；Franke 等人，1995；James 等人，1996；Klippel 等人，1996)。Akt/RAC/蛋白质激酶 B 似乎是在靶如 p70 S6 激酶和糖原合成酶激酶-3 的上游(Chung 等人，1994；Cross 等人，1995)。PI3Ks 同时通过调节核苷酸交换影响小 GTP 结合蛋白如 Rac 和 Rab5 的活性(Hawkins 等人，1995；Li 等人，1996)。最终，这些作用的联合可以引起细胞骨架的重排，DNA 合成/有丝分裂，细胞生存和分化(Vanhaesbroeck 等人，1996)。

发明内容

本发明描述了哺乳动物新第一类 PI3 激酶，已经命名为 p110 δ 。这一新 PI3 激酶是第一类 PI3 激酶家族的典型，因为它与 p85 α , p85 β 和 p85 γ 结合。另外，它也与 GTP-ras 结合，但如 p110 α ，不与 rho 和 rac 结合。它同时拥有与 p110 α 和 p110 β 同样的 GTP 广谱的磷酸肌醇脂底物特异性，它同时展示了蛋白质激酶活性和与 p110 α 相似的药物敏感性。

但是，它的特点是组织分布的选择性。与普遍表达的 p110 α 和 p110 β 相反，p110 δ 在血液中白细胞群体中，如脾，胸腺，特别是外周血白细胞中表达特别高。除这一发现外，同时还发现 p110 δ 在大多数黑素瘤中表达，但不是在任何黑素细胞中，黑素瘤的正常细胞对应物中。已知展示移动或入侵的组织中的 p110 δ 的自然分布和 p110 δ 在癌细胞中的表达，我们认为 p110 δ 在细胞移动或入侵中起作用，所以这一脂激酶在癌细胞中的表达可以解释癌细胞的转移行为。

p110 δ 的另一个特点是它以依赖于 Mn²⁺ 的方式自身磷酸化的能力。确实，已经显示自身磷酸化趋向于妨碍蛋白质脂激酶的活性。另外，p110 δ 含有独特的潜在蛋白：蛋白质反应元件，含有富脯氨酸区(如图 1 所示，位置 292-311，其中 20 个氨基酸中的 8 个是脯氨酸)和亮氨酸拉链状区的碱性区(bZIP)(Ing 等人，

1994 和 Hirai 等人, 1996)。结合 p85 的 PI3 激酶之间的生化和结构的差异表示它们可以在体内完成独特的功能作用和/或受到特异地调节。

本发明公开了有关 p110 δ 的人类起源的核酸分子和相应的氨基酸序列数据。利用这一信息, 可以确定在各种组织类型中 p110 δ 的表达, 特别是确定它在癌组织中的表达, 目的是诊断这样的组织的移动或入侵, 预测潜在的次级肿瘤的发生。另外, 同时可以提供妨碍 p110 δ 的表达或选择性地干扰它的功能的试剂。例如, 考虑本发明提供的序列资料, 可以提供防止 p110 δ 的表达的反义物质。

如上所述, 本发明包括反义低聚核苷酸, 它选择性地与编码 PI3K δ 蛋白质的核酸分子结合, 降低 PI3K δ 基因的转录和/或翻译。在任何医疗条件下, 需要减弱 PI3K δ 基因产物的表达, 包括减弱任何归因于 PI3K δ 基因表达的肿瘤细胞表现型方面。以这种方式, 反义分子可以用于减慢或终止肿瘤细胞表现型的这些方面。

如本发明所用, 术语“反义低聚核苷酸”或“反义”描述了低聚核苷酸, 即低聚核糖核苷酸, 低聚脱氧核糖核苷酸, 修饰的低聚核糖核苷酸, 或修饰的低聚脱氧核糖核苷酸, 它在生理条件下与含有特殊基因的 DNA 或与该基因的 mRNA 转录物杂交, 从而抑制基因的转录和/或 mRNA 的翻译。设计反义分子使它在与靶基因杂交后干扰靶基因的转录或翻译。本领域普通技术人员能够识别反义低聚核苷酸的准确长度和它与靶的互补程度将取决于选定的特异靶, 包括靶的序列和构成该序列的特殊碱基。优选的是反义低聚核苷酸的结构和排列, 使它在生理条件下与靶选择性地结合, 即在生理条件下在靶细胞中与靶序列杂交而不是任何其它序列。在如图 9 所示的 DNA 序列、等位的或同源的基因组的和/或 DNA 序列基础上, 本领域的技术人员可以容易地选择和合成许多用于本发明的适当的反义分子中的任何一个。为了进行有效地选择和强有力地抑制, 应该包括至少 7 个这种反义低聚核苷酸

(Wagner 等人, 《自然生物技术》 14: 840 — 844, 1996), 更优选地, 至少 15 个与靶互补的连续的碱基。最优选地, 反义低聚核苷酸含有 20~30 个碱基的互补序列。虽然可以选择与该基因或 mRNA 转录物的任何区域反义的低聚核苷酸, 但是, 优选的实施例中, 反义低聚核苷酸对应于 N-末端或 5'上游位点如翻译起始, 转录起始或启动子位点。另外, 3'-末翻译区可以是靶。本领域同时可以使用 mRNA 拼接位点, 但如果存在可替代的 mRNA 拼接, 这不是本发明优选的。另外, 优选地, 反义靶击不存在 mRNA 次级结构(参见如 Sainio 等人, 《细胞分子神经生物学》 14(5): 439 — 457, 1994)并且没有结合蛋白质的位点。最后, 虽然图 9 公开了 cDNA 序列, 本领域普通技术人员能够容易地发现对应于图 9 的 cDNA 的基因组 DNA。所以, 本发明同时提供了与对应于图 9 的基因组 DNA 互补的反义低聚核苷酸。同样, 不需要过度实验也可提供等位的或同源的 DNAs 和基因组 DNAs 的反义序列。

在一系列实施例中, 本发明的反义低聚核苷酸可以由“自然”脱氧核糖核苷酸, 核糖核苷酸, 或任何它们的联合组成。因为在自然系统中, 通过核苷酸间磷酸二酯键合, 自然核苷酸的 5'末端和另一个自然核苷酸的 3'末端可以共价连接。通过技术识别的方法可以制备这些低聚核苷酸, 这些方法可以人工或通过自动合成仪进行。它们同时可以通过载体重组地产生。

但是, 在优选的实施例中, 本发明的反义低聚核苷酸也可以包括“修饰”低聚核苷酸。因为低聚核苷酸可以许多方式修饰, 而不阻止它们与靶的杂交, 而增强它们的稳定性或靶击性, 或增强它们的治疗效果。

如本发明所用, 术语“修饰低聚核苷酸”描述了这样的低聚核苷酸, 其中(1)至少两个核苷酸通过合成的核苷酸间键合共价连接(即, 除了核苷酸 5'末端和另一个核苷酸的 3'末端之间的磷酸二酯键外的键)和/或(2)与核酸不正常连接的化学基团已经共价地附着于低聚核苷酸上。优选的合成核苷酸间键是硫代磷酸酯, 烷基磷酸酯, 磷酸二硫代酯, 磷酸酯, 烷基硫代磷酸酯, 磷酸酰胺,

氨基甲酸酯，磷酸三酯，乙酰胺，肽和羧基甲基酯。

术语“修饰的低聚核苷酸”也包括含有共价修饰碱基和/或糖的低聚核苷酸。例如，修饰低聚核苷酸包括含有糖主链的低聚核苷酸，它们共价地附着于除了3'位置的羟基基团和5'位置的磷酸基团以外的低分子量的有机基团。这样修饰的低聚核苷酸可以包括2'-O-烷基化核糖基团。另外，修饰的低聚核苷酸可以包括如阿拉伯糖的糖而不是核糖。修饰低聚核苷酸也可以包括碱基类似物，如C-5丙炔修饰碱基(Wagner等人，《自然生物技术》14: 840-844, 1996)。所以，本发明主要是含有修饰反义分子的药物制剂，它们在生理条件下与编码PI3K δ 蛋白质的核酸互补并杂交，以及药学可接受的载体。

反义低聚核苷酸可以作为部分药学成份给药。这样的药学成份可以包括与本领域已知的生理标准的和/或药学可接受的载体结合的反义低聚核苷酸。该成份应该是灭菌的并含有适于对病人给药的重量或体积单位的治疗有效量的反义核苷酸。术语“药学可接受”指不干扰活性成份的生物学活性的效果的非毒性物质。术语“生理可接受”指与生物学系统如细胞，细胞培养物，组织或有机物相容的非毒性物质。载体的特点将取决于给药的途径。生理和药学可接受的载体包括稀释剂，填充剂，盐，缓冲液，稳定剂，增溶剂，和本领域已知的其它物质。

所以本发明的一个目的是鉴定新PI3激酶，以便提供预测细胞可能的移动或入侵的方法。

本发明的另一个目的是提供增强、减弱或防止p110 δ 的表达的试剂和/或干扰p110 δ 的功能的试剂，目的是分别增强、妨碍或阻止细胞的移动或入侵。

根据本发明的目的，提供了具有PI3激酶活性的分离的自身磷酸化的多肽。

所述多肽起源于血液中白细胞，并且典型地在黑素瘤中表达，所述的多肽更多是起源于人的。

另外，该多肽能够与哺乳动物的PI3激酶的p85亚基结合以

便产生激活复合物。

更优选地是该多肽含有图 1A 显示的氨基酸序列或其同源序列，它的特点是有一个富脯氨酸区。

本发明中术语“同源”是覆盖相似特性或同样遗传特征的物质或具有那些本发明所述的特征的物质，这些特征可以在严格条件下鉴定，相应的核酸分子如图 9 显示的核酸分子杂交的蛋白质或物质。通常杂交条件包括 50%甲酰胺， $5 \times$ SSPE， $5 \times$ Denhardt's 溶液，0.2% SDS，200 微克/毫升变性的超声处理的鲑鱼精子 DNA 和 200 微克/毫升酵母 RNA，温度 60°C (公开专利说明书 WO93/21328 中描述的条件)。

利用重组技术生产多肽，该多肽通常是起源于人的。

根据本发明的目的，提供了至少是本发明的多肽的一部分的抗体，该抗体可以是多克隆或单克隆的。

根据本发明的目的，提供了图 9 所示的核酸分子的全部或一部分，该分子编码具有 PI3 激酶活性的自身磷酸化多肽。

在提供了所述分子部分的情况下，将根据目的选择该部分，例如，选择具有激酶活性的部分用于随后使用的部分或最适于抗体产生的另一部分。

根据本发明的目的，提供了核酸构建体，该构建体含有本发明的核酸分子的全部或部分，其中后来的核酸分子是在控制序列的控制下和适当的读码框架中，以保证相应的蛋白质的表达。

根据本发明的目的，已经提供了利用本发明的构建体转化的宿主细胞，以便含有图 9 所示的核酸分子的全部或一部分，允许表达相应的多肽的全部或有意义部分。

这些宿主细胞是真核生物细胞，例如，昆虫细胞如来自利用杆状病毒病毒系统的 *Spodoptera frugiperda* 种类的细胞。这一表达系统在需要翻译后修饰的情况下是有益的。如果不需要这样的修饰，可以使用原核系统。

根据本发明的目的，提供了诊断细胞移动的方法，包括检测所述细胞的样品中本发明多肽的表达。

进行研究后确定是否对应于本发明的多肽的 mRNA 在所述的细胞中表达，例如，通过利用 PCR 技术或 Northern 影印分析。为了鉴定所述的表达，可以使用任何其它常规技术。

根据本发明的目的，提供了鉴定有效地阻止本发明的多肽的活性的拮抗物的方法，包括利用本发明的多肽或其片断筛选这样活性的候选分子。

筛选可以包括人工技术如计算机辅助技术或常规实验室技术。

通过将已知天然地或通过转染表达本发明的多肽的细胞与适当的拮抗物接触，然后检测细胞的移动进行上面的方法。

本发明的方法可以包括竞争性结合测试，以便鉴定与本发明的多肽选择性地和理想地不可逆地结合的试剂。

根据本发明的目的，提供了有效地增强或阻止本发明的多肽的活性或表达的试剂的药学或兽医学成份，该成份已经配制用于药学或兽医学用途并且可选择地包括稀释剂，载体或赋形剂和/或是单位剂量形式。

根据本发明的目的，提供了控制细胞移动的方法，包括将所述细胞群体与拮抗剂或拮抗物或本发明的多肽接触，或与本发明的反义物质接触。

在所述的方法中，可以将细胞可替代地或另外地与本发明的多肽接触，为了增强多肽的有效水平，因此增加细胞的移动。

所述方法可以在体内或体外进行。

根据本发明的目的，提供了一种可有效地阻止本发明多肽的活性的试剂，用于控制细胞的移动性。

根据本发明的目的，提供了用于增强细胞的移动性多肽。

根据本发明的目的，提供修饰的反义低聚核苷酸，用于与本发明的核酸杂交。

附图说明

下面参照附图，材料和方法，对本发明实施例进行详细描述，其中：

图 1A 显示了人 p110δcDNA 的已翻译的氨基酸序列。分别用

开放和阴影盒表示富脯氨酸区和 bZIP 状区。图 1B p110 δ 与 p110 α 和 p110 β 的全长氨基酸序列的点图比较。将非保守序列基序底下划线。利用 COMPARE 程序进行点图比较 (UWGCG 包装: Devereux 等人, 1984)。图 1C 将与 HR3 侧接的 p110 δ 氨基酸序列与 p110 α 和 p110 β 的同源区比较。氨基酸编号是 p110 δ 。富脯氨酸区: 用星指出了能够在 p110 δ 中形成左旋多聚脯氨酸 II 型螺旋的重要的脯氨酸。bZIP 区: 用箭头指出了亮氨酸拉链区的保留 L/V/I 残基。

图 2 为 p110 δ 与 p85 和 Ras 的反应 (A) 单独用编码 GST - p110 δ 的重组杆状病毒或与编码 p85 α , β 或 γ 的病毒联合感染昆虫细胞。2 天后, 利用谷胱甘肽-琼脂糖从细胞溶菌物中亲和纯化 GST - p110 δ , 洗涤, 通过 SDS - PAGE 分析, 并用考马斯蓝 (Coomassie) 染色。(B) 从 500 微克人嗜中性细胞溶胶中免疫沉淀 p110 δ , 并通过 Western 影印探测不同的 p85 同工型的存在, 从 Sf9 细胞纯化 rec=重组 p85。(C) 将 GST - p110 α /85 α 和 GST - p110 δ /85 α (0.25 微克) 与指定量 (微克) 的 GTP - 或 GDP - 加载的 V12 - Ras 一起温育, 洗涤, 利用所述的 Western 影印探测 Ras 的存在 (Rodriguez-Viciano 等人, 1994, 1996)。

图 3A 为体外 p110 δ 的脂底物特异性。利用指定的底物在存在 Mg²⁺ 时将 GST - p110 δ /p85 α 用于脂激酶测试。起点为同等的 cpm 点。图 3B 通过对 GST - p110 δ /p85 α 产生的 PtdIns 磷酸化产物的 HPLC 分析, 显示了 p110 δ (实线) 的脱酰产物, 甘油磷酸肌醇 - 3P 和甘油磷酸肌醇 - 4P 标准 (点线) 的洗脱时间。箭头指出了 AMP 和 ADP 控制的位置。

图 4 为 p110 δ 的蛋白质激酶活性。(A) 当存在 Mn²⁺ 时, 对在与指定的 p85 亚基的复合物中的 GST - p110 α 或 GST - p110 δ 进行体外蛋白质激酶反应, 通过 SDS - PAGE 进一步分析, 考马斯蓝染色和放射自显影, (B, C) 对在 PDGF 受体磷酸肽珠上与 p85 α 或 β 的复合物中的未标记的 p110 α 和 p110 δ [野生型 (WT) 或激酶缺陷突变体 (p110 α - R916P 和 p110 δ - R894P)] 进行体外

激酶反应和进一步如(A)所述分析。开放和关闭的箭头分别指 p110 和 p85 蛋白质。(B)中右边的组: p85 α 和 p110 δ 的磷酸氨基酸分析。

图 5 为 p110 δ 脂激酶活性对药物的敏感性。在缺乏渥曼青霉素(Wortmannin drug) 时使 p110 δ /p85 α (关闭的圆环) 和 p110 α /p85 α (开放的圆环)对活性的抑制正常化。这些数据点是 3 个实验的平均(\pm SE)。

图 6 为 p110 α , p110 β 和 p110 δ 的表达的 Northern 影印分析。

图 7 为 p110 α 和 p110 δ 蛋白质表达的分析。每道中加载 100 微克总细胞溶菌物。在材料和方法中叙述的溶解缓冲液或含有 2-巯基乙醇的 Laemmli 凝胶加载缓冲液中溶解血小板。PMBC(外周血液单核细胞); PBL(外周血液淋巴细胞)。

图 8 为 p110 α 和 p110 δ 参与细胞因子发出信号。利用指定的细胞因子刺激 Ba/F3(A)和 MC/9(B)细胞系。来自对照未处理细胞的样品用 Con 标记。通过 SDS-PAGE 分离总的细胞溶菌物和 p110 α 和 p110 δ IPs 以便制备重复的影印, 参考是 p110 δ /85 α (组 a,b 和 d)或 p110 α /85 α (组 c 和 e)。利用 4G10(抗-PTyr,组 a)和抗 p110 α (组 c)进行自然影印的免疫影印。影印随后剥离, 用抗 SHP2(A,组 b), 抗 kit(B,组 b), 抗 p110 δ (组 d)和抗 p85 抗体(组 e)再探测。箭头指出了 p170(IRS-2), p100 和 p70(SHP2)(A,组 a), 和 p150(c-kit)和 p100(B,组 b)的位置。

图 9A~图 9C 为人的 p110 δ 的 cDNA 序列。

图 10 表示用 p110 δ 的亲纯化抗体微注射的鼠巨嗜细胞的免疫荧光图像。用鬼笔环肽共轭的若丹明将巨嗜细胞骨架成像。

具体实施方式

材料和方法

克隆 p110 δ

已经描述了小牛 p110 α 和 *S.cerevisiae* Vps34p 之间的同源区基础上, 通过 RT-PCR, 分离部分 PI3 激酶 cDNA 克隆的详细情况(Volinia 等人, 1995; MacDougall 等人, 1996)。通过这一途径从 MOLT4 细胞系产生了部分 p110 δ cDNA 片断, 随后用于筛选低聚(dT)-引物 U937 cDNA 文库(Volinia 等人, 1995)。将互补的 DNA EcoRI-XhoI 克隆进用 EcoRI-XhoI(Stratagene)消化的 λ ZAPII 载体。在 4 百万个筛选的克隆中, 发现 6 个开始时阳性噬菌斑, 其中的 3 个在另外两轮筛选中仍然显示阳性。根据制造商(Stratagene)指导, 通过体外切除制备 pBluescript 中的 cDNA 插入。通过限制图谱和 PCR 鉴定三个代表性的 pBluescript 克隆(0_{5.1}, 0_{9.1} 和 0_{11.1}), 发现含有范围从 4.4kb(0_{11.1})到 5.0kb(0_{5.1}, 0_{9.1})的插入片断。将克隆 0_{9.1} 用于详细的鉴定。从它的插入的选择图谱发现缺乏内部 XhoI 位点, 和存在 2 个内部 EcoRI 位点, 分别在离 EcoRI cDNA 插入位点的 223 和 3862 个核苷酸(核苷酸 1 = 图 9 的下面划线的核苷酸)。结果是, EcoRI 和 XhoI 联合消化并将 0_{9.1} 插入分成 3 个片断, 进一步指出是 EcoRI 片断 I(核苷酸 1 - 222), EcoRI 片断 II(核苷酸 223 - 3861)和 EcoRI-XhoI 片断 III(大约核苷酸 3862 - 5000)。利用 Taq DyeDeoxy 终止子循环测序系统(ABI)对片断 I 和 II 的两条链测序, 图 9 显示了完整的 cDNA 序列。发现了 0_{9.1} 插入中跨越核苷酸 195 到 3330 的开放读码框架。框架中终止密码在位于有利于翻译起始的部分的潜在的起始密码之前(Kozak, 1991)。产生了 196 个核苷酸的 5' 未翻译区(UT)和约 2.2kb 的 3'UT。在测序的 0_{5.1}, 0_{9.1} 和 0_{11.1} 克隆的 5' 末端, 发现 2 个不同但相关的未翻译区, 指出了存在至少两个不完全相同的信使 RNAs。

构建 p110 δ 的表达载体

所用的昆虫细胞转移载体是 pVL1393(在 Vitrogen 中用于未标记的 p110 δ)和 pAcG3X(GST - p110 δ ; Davies 等人, 1993)。在两个步骤中将 p110 δ 的编码区亚克隆进这些载体。首先, 通过

接头将表达载体插入在多克隆位点，以便含有 p110 δ 的 EcoRI 片断的部分序列，跨越起始密码(在核苷酸 197；参见上面)到第二个 EcoRI 位点(核苷酸 223；参见上面)。在后者的 EcoRI 位点中，亚克隆 p110 δ 的 EcoRI 片断 II，接着选择含有准确定向插入的克隆。昆虫细胞载体的第一步是用 BamHI - EcoRI 切割，接着插入下面的接头(接头 I)：

GATCCCCACCATGCCCCCTGGGGTGGACTGCCCCATGG(有意义：5'-3')
(反义：5'-3')AATTCCATGGGGCAGTCCACCCCAGGGGGCATGGTGGG

这一接头含有 ATG 与最适 Kozak 同感序列(Kozak1991)。进而，利用 Vent DNA 聚合酶(新英格兰实验室)，通过 PCR 制备 p110 δ 的衍生物。从此将亚克隆进 pBluescript - SK 的 p110 δ EcoRI 片断 II(进一步表示为 pBluescript-p110 δ -EcoII)用作模板。在这些 PCR 反应中，除去了 EcoRI 片断 II 插入的 3' 未翻译区，用于产生突变 R894P 的低聚核苷酸如下：有意义的突变低聚核苷酸 = PRIMER 1(下面划线的突变残基) =

5'-GTGTGGCCACATATGTGCTGGGCATTGGCGATCCGCACAGCGACA
ACATCATGATCCG,

反义 = PRIMER 2 =

5'-GGCCCGGTGCTCGAGAATTCTACTGCCTGTTGTCTTTGGACACGT
TGTGGGCC

利用引物 2 和有意义引物 (PRIMER 3 = 5'-GTGTGGCCACATATGTGCTGGGCATTGGCG) 进行平行的 PCR，留下完整的野生型 p110 δ 序列。利用 NdeI 和 XhoI 切割所有的 PCR 产物，亚克隆进而打开了 NdeI-XhoI 的 pBluescript-

p110 δ -EcoII 并测序。然后将正确的克隆作为 EcoRI 盒转移进入含有接头 I 的打开 EcoRI 的 pVL1393，接着选择含有准确定向的插入的克隆。

在昆虫细胞中表达 p110 δ

利用 Lipofectin 试剂(Gibco)与 BaculoGold DNA(Pharmingen, 圣迭戈, CA)共转染质粒 DNA。分离重组噬菌斑,用确定的方法鉴定(Summers 和 Smith,1987)。

细胞培养物

将细胞在潮湿的 5% CO₂ 温育器中培养,用 10%小牛胎盘血清, 20 微摩尔/升的 2-巯基乙醇, 100 单位/毫升青霉素/链霉素, 2 毫摩尔/升谷氨酸补充的 PRMI 1640 培养基中。Ba/F3 是依赖于鼠 IL3 的 pre-B 细胞系(Palacios 和 Steinmetz, 1985), MC/9 是依赖于鼠 IL3 的肥大细胞系(Nabel 等人, 1981)。将 Ba/F3 和 MC/9 生长在起源于作为鼠 IL3 的來源的 WEHI3B 的 10%(v/v) 培养基中。FDMAC11/4.6(FD-6)骨髓始祖细胞是 FDMAC11 的原始突变体,它将在应答 IL4 以及 IL3, GM-CSF 和 CSF-1 中生长(Welham 等人, 1994a)。将这些细胞在 3%(v/v)起源于 AgX63/OMIL4 细胞的 IL4 条件培养基(Karasuyama 和 Melchers, 1988)生长。

脂激酶测试

基本上如 Whitman 等人(1985)所述进行脂激酶测试。脂激酶测试缓冲液是 20 毫摩尔/升 Tris HCl,pH7.4,100 毫摩尔/升 NaCl 和 0.5 毫摩尔/升 EGTA。从希格玛购买脂。测试中 ATP 和 Mg²⁺ 的最后浓度通常分别是 0.5 和 3.5 毫摩尔/升。而使用的脂的浓度是 0.2~0.4 毫摩尔/升。除非另有说明,激酶反应在 37 °C 下, 10 分钟。用于反应产物的 TLC 分离的溶剂是丙烷-1-ol/2 摩尔/升乙酸/5 摩尔/升 H₃PO₄(65:35:1)。利用 PtdIns 作为底物,在 40

微摩尔/升 ATP(最后)存在时, 25 °C下, 进行药物对激酶的影响的测试 10 分钟。所有试管含有 1%DMSO。通过对 TLC 分离的脂产物进行磷光成像(分子动力学)分析定量活性。

HPLC 分析

将通过重组 p110 α 磷酸化 PtdIns 制备的 [³²P]-PtdIns3P, 和通过在 0.5% NP-40 存在时用 A431 膜转换 PtdIns 产生的 [³²P]-PtdIns4P 用作标准。通过 PartisphereSAX 柱(Whatman 国际标准)上的离子交换 HPLC, 利用 1 摩尔/升 (NH₄)₂HPO₄ 对水(0~25% B; 60 分钟)的线性梯度, 以 1 毫升/分钟的速度洗脱分离用甲胺脱酰脂产生的甘油磷酸肌醇。通过在线检测器(Reeve Analytical, Glasgow)检测放射活性高峰。通过在 254 纳米的吸光值检测作为内部对照加入的 ADP 和 ATP 核苷酸标准以保证各道之间的一致性。

体外蛋白质磷酸化测试和对脂激酶活性的影响

将沉淀的蛋白质在 37 °C, 在蛋白质激酶测试缓冲液(20 毫摩尔/升 Tris.HCl(pH7.4), 100 毫摩尔/升 NaCl, 0.5 毫摩尔/升 EGTA, 50 微摩尔/升 ATP 和 1 毫摩尔/升 MnCl₂.4H₂O, 5-10 微居里 [γ -³²P]ATP/毫升)中温育 30 分钟。通过加入 SDS - PAGE 样品缓冲液终止反应。通过 SDS - PAGE 和放射自显影分析反应产物。在如所述的(Jelinek 和 Weber, 1993)Hunter 薄层电泳系统(CBS 科学公司, Del Mar, CA)上进行磷酸氨基酸分析。

小 GTP - 结合蛋白与 PI - 3K 的体外反应

如所述(Rodriguez-Viciano 等人, 1995, 1996)进行 ras, rac 和 rho 与 GST - PI3K 的结合。

抗体, 免疫沉淀和免疫影印

已经叙述过小牛 p85 α (U1,U13)和 p85 β (T15)的单克隆抗体

(End 等人, Reif 等人, 1993)。在我们的实验室开发了抗小牛 p85 γ 的单克隆抗体(I2)。伦敦大学学院的 P.Shepherd 博士提供了抗 GST 一人 p85 α (AA 5-321)的兔多克隆抗血清。产生了抗 p110 δ 的 C 末端肽(C)KVNWLAHNVSKDNRQ₁₀₄₄ 和抗人 p110 α 的 N 末端肽(CGG)SVTQEAEEREFFDETRR₈₈的兔多克隆抗血清。为了产生直接抗 p110 δ 的磷酸化形式的抗体, 在肽合成过程中在丝氨酸残基上磷酸化肽序列 1044。Roya Hooshmand-Rad 博士(瑞士, Uppsala,Ludwig 癌症研究院)提供了人 p110 α 的 C 末端(KMDWIFHTIKQHALN)的抗血清。在与 Acti 凝胶(Sterogene Bioseparations, Arcadia, CA)或 AF 一氨基一 ToyoPearl TSK 凝胶(Tosho 公司, 日本)偶联的肽上亲和纯化抗体。发现抗体对它们特异的 PI3K 是有特异性的(对下面在 Sf9 细胞中表达的 PI-3K 的组测试: 小牛 p110 α , 人 p110 β (C.Panaretou 和 R.S.; 未公开的结果), 人 p110 γ (Stoyanov 等人, 1995), p110 δ , PI-3 激酶(Volinia 等人, 1995)。在非可(Ficoll)梯度中纯化外周血液细胞(Lymphoprep; Nycomed, Oslo, 挪威)。通过所述的超声波处理(Wientjes 等人, 1993)制备嗜中性细胞溶胶。溶解缓冲液是 1% Triton-X100, 150 毫摩尔/升 NaCl, 1 毫摩尔/升 EDTA, 1 毫摩尔/升 NaF, 1 毫摩尔/升 NaVO₃, 1 毫摩尔/升 DTT, 1 毫摩尔/升 PMSF, 0.27 TIU/毫升抑酶肽和 10 微摩尔/升的亮抑酶肽。在一些实验中, 加入 1 毫摩尔/升二丙基氟磷酸和 27 毫摩尔/升的 Na-p-甲苯磺酰-L-赖氨酸氯甲基酮(盐酸盐)。用于细胞因子实验的溶解缓冲液是 50 毫摩尔 Tris.HCl, pH7.5, 10%(v/v)甘油, 1%(v/v)NP-40, 150 毫摩尔/升 NaCl, 100 微摩尔/升钼酸钠, 500 微摩尔/升氟化钠, 100 微摩尔/升正钒酸钠, 1 毫摩尔/升 EDTA, 40 微克/毫升 PMSF, 10 微克/毫升抑酶肽, 10 微克/毫升亮抑酶肽, 0.7 微克/毫升抑胃酶肽, 1 毫摩尔/升 DIFP, 1 毫摩尔/升 TLCK。如上所述(Welham 和 Schrader,1992)在 2×10^7 个细胞/毫升时沉淀和溶解细胞因子刺激细胞, 除在进一步分析之前, 使溶菌物在 4 $^{\circ}$ C, 在微量溶化 microfuge 中澄清 5 分钟。

如上所述(Welham 等人, 1994a)进行免疫沉淀,根据制造商的说明, PDGF — 受体肽(YpVPMLG)与 Acti 凝胶偶联。将 p110 δ 的 C 末端抗血清用于免疫沉淀和免疫影印。对于 p110 α , 将 C 和 N 末端抗血清分别用于免疫沉淀和 Western 影印分析。

如上所述(Laemmli,1970;Welham 和 Schrader,1992;Welham 等人, 1994a)进行 SDS — PAGE 和免疫影印。将下面浓度的抗体用于免疫影印: 0.1 微克/毫升的抗磷酸酪氨酸单克隆抗体 4G10; 0.25 微克/毫升的抗 p110 α 和 p110 δ ; 1:4000 的抗 p85; 0.4 微克/毫升的抗 — c-kit(Santa Cruz 生物技术, sc-168), 0.1 微克/毫升的抗 SHP(Santa Cruz 生物技术, sc-280)和 1: 1000 的抗 IRS — 2(M.White 博士, Joslin Diabetes 中心, Boston,MA, 赠送)。

使用 0.05 微克/毫升的山羊和抗鼠和山羊抗兔辣根过氧化物酶共轭抗体(Dako,丹麦)。利用 ECL 系统(Amersham)显影免疫影印。剥离影印,如上所述再探测(Welham 等人, 1994a)。

用 p110 δ 和 p110 α 的抗体注射 CSF — 1 刺激的鼠巨嗜细胞

将鼠巨嗜细胞系 BAC1 用于抗体微注射实验。p110 δ 的肽多克隆抗体是特异于肽 1044 的 C 末端(p17 材料和方法所述), 或肽序列(C)R222KKATVFRQPLVEQPED₂₃₈。在微注射之前亲和纯化多克隆血清, 使用浓度为 0.5-5 毫克/毫升。人的 p110 α 的对照肽多克隆抗血清如材料和方法 p17 所述。在微注射之前, Bac1 细胞远离集落刺激因子 1(CSF)24 小时。然后将抗体注射进入缺乏 CSF1 的细胞, 并在观察用鬼笔环肽共轭若丹明微注射的 Bac1 细胞的细胞骨架之前与 CSF1 接触 10 — 15 分钟,(如 Allen 等人 1997 所述制备和观察细胞)。

细胞刺激

如上所述(Welham 和 Schrader,1992)用不同的生长因子刺激细胞除了将细胞在刺激之前以 2×10^7 个/毫升再悬浮于无血清的

RPMI 中。Ian Clark-Lewis 博士(不列颠哥伦比亚大学, 温哥华)提供了化学合成的鼠 IL3 和 IL4。从 R&D 欧洲系统(Abingdon, Oxon)购买重组鼠 SCF。前面已经使生长因子的浓度和刺激的持久性(SCF 2 分钟, IL3 和 IL4 10 分钟)最佳化, 以便得到受体和细胞底物的最大水平的酪氨酸磷酸化。如下所示, 10 微克/毫升 IL3(Welham 和 Schrader,1992), 10 微克/毫升 IL4 (Welham 等人, 1994a)和 50 微克/毫升 SCF(M.J.W.,未公开的观察结果)。

Northern 影印分析

将人 polyA⁺ RNA(Clontech)的 Northern 影印与 pBluescript 克隆 0_{9.1} 的任意引物标记的 EcoRI 片断 II 杂交。然后进行剥离和利用下面顺序的探针再探测: 来自人 p110 α 的内部 EcoRI-XhoI 2.1kb 片断(Volinia 等人,1994)和人 p110 β 的 EcoRI-XhoI 5kb cDNA(C.Panaretou;未公开的结果)。

利用上面叙述的材料和方法, 能够叙述新脂激酶特别是已经命名为 p110 δ 的 PI3 激酶的数据。现在叙述与这一激酶相关的数据, 目的是将 p110 δ 与 PI3 激酶组的其它成员比较, 以便比较和对照它们有关的特点。

结果

p110 δ 的克隆

将根据小牛 p110 α 和 *S.cerevisiae* Vps34p 的激酶区中的保守氨基酸序列(GDDLQRD 和 FHI/ADFG)基础上的简并引物用于与来自人 MOLT4 T 细胞白血病的 mRNA 的 RT-PCR 反应。得到与其它已知人 PI3K 同源但不同的部分 cDNA。将这一 PCR 片断用作探针筛选 U937 单细胞文库和分离对应的全长克隆(详情参见图 9 所示材料和方法)。序列分析披露了潜在的开放读码框架, 该框架以框架内终止密码开始。还发现潜在的起始密码位于有益于翻译起始的区域(Kozak,1991)。这一 3135 个核苷酸的开放读码

框架预测了一个计算的分子量 119, 471 道尔顿的 1044 个氨基酸的蛋白质(图 1A)。将氨基酸序列与其它 PI3K 的比较表明这一蛋白质与人 p110 β 的关系最近(58%的完全相同性; Hu 等人, 1993), 与人 p110 α (41%的相同性; Volinia 等人, 1994), 人 G-蛋白质调节 p110 γ (35%相同性; Stoyanov 等人, 1995)和人 vps34p 类似物(28%相同性; Volinia 等人, 1995)的差别较大。本发明叙述的新 PI3K 将进一步表示为 p110 δ 。

高度严格的点图比较表示在 p85-结合区(p110 α 的 AA20-140; Dhand 等人, 1994)以及 C-末端 PI-激酶(PIK)区(HR2)和催化核心(p110 α 的 AA529-末端, Zvelebil 等人, 1996)中 p110 α , β 和 δ 同源性很高。在 p85 结合位点和 HR2 之间发现另外一个跨越 p110 δ 的 AA370-470 的高度序列同源的区域。这一区域含有所称的 HR3 特征(WxxxLxxxIxIxDLPR/KxAxL), 它在所有 p85 结合 PI3Ks 和 p110 γ 中是保守的。在 p110 α 和 p110 β/γ 之间不同的序列的 N-末端的大部分区域与 p110 α 中定义的区域交迭, 足够用于 Ras 结合(p110 α 中 AA133-314; Rodriguez-Viciana 等人, 1996)。在 p110 δ 中鉴定了另外两个结构基序。第一个是富脯氨酸区(图 1B, 图 1C), 它的分子模型表明它可以形成左旋多聚脯氨酸 II 型螺旋, 具有与 SH3 区反应的潜力(未显示数据)。在相应的区域中, p110 α 和 p110 β 缺乏重要的脯氨酸允许相同的折叠。第二个基序是碱性区, 亮氨酸拉链状区(bZIP), 紧接着 HR3 的 C 末端(图 1B, 图 1C)。bZIP 区存在于 p110 δ 和 p110 β [也在果蝇 p110(Leevers 等人, 1997)]中, 这一区的碱基成份在 p110 α 中较不明显(图 1C)。p110 δ ZIP 区的模型表明 L/V/I 残基的排列容易接纳螺旋结构的形成, 能形成卷曲螺旋二聚体蛋白拉链复合物(数据未显示)。

p110 δ 与 p85 受体和 Ras 蛋白结合

为了证实对于比较氨基酸序列的预测, 即 p110 δ 可以结合 p85 亚基, 在昆虫细胞中 p110 δ 作为谷胱甘肽-S-转移酶(GST)融

合蛋白,与编码 p85 α , p85 β 和 p85 γ 的重组杆状病毒一起表达[后者是与 p55^{PIK}, p55 α 和 p85/AS53(Pons 等人, 1995; Inukai 等人, 1996; Antonetti 等人, 1996)同源的 55 千道尔顿的小牛 p85 同工型]。正如图 2A 所示,所有 p85 受体亚型与来自共感染细胞的 GST-p110 δ 有效地共纯化。

过去还没有人提出是否不同的 I 类 p110 纯化亚基在体内显示与不同 p85 受体蛋白的优先结合的问题。利用特异于 p110 δ 的抗血清,我们发现 p85 α 和 p85 β 存在于来自不同白血细胞的 p110 δ 免疫沉淀(图 2B 显示了人嗜中性粒细胞的数据;注意 p85 γ 在白细胞中不表达)。p110 α 得到了同样的结果(数据未显示)。在这些免疫复合物中,同时观察到了与 p85 α 抗体反应的 45 千道尔顿的蛋白质(图 2B)。这一蛋白的特性目前仍未清楚,但它可能与前面叙述的 45 千道尔顿的蛋白质一样存在于来自各种组织的 p85 和 p110 IPs 中(Pons 等人, 1995)。

p110 α 和 p110 β 已经显示与 Ras-GTP 反应(Kodaki 等人, 1995; Rodriguez-Viciano 等人, 1994 和 1996)。这一反应需要的区位于这些 PI3Ks 的 AA 133 和 134 之间(Rodriguez-Viciano 等人, 1996)。尽管在这一区, p110 α 和 p110 β 的序列保守性较低(图 1C),如 p110 δ ,某些明显重要的氨基酸是保守的,以依赖于 GTP 的方式在体内与 Ras 反应(图 2C)。

p110 δ 结合 ras,但不结合 rac 或 rho

对 GST-p110 δ /p85 α 的温育发现保留了结合 GTP 的野生型 ras 或致癌性 V12-ras(图 2C)。这与加载 GDP 的 ras,或 A38-ras,功能性死亡 ras 突变体的情况不同。与 p110 α 相似,没有证实 rho 和 rac 的结合(数据未显示)。

p110 δ 的脂激酶活性

当 Mg²⁺ 存在时进行测试,发现 p110 δ 磷酸化 PtdIns, PtdIns4P 和 PtdIns(4,5)P₂(图 3A)。HPLC 分析证实这些脂在 D3 位置磷酸

化(图 3B)。体内的底物优先性是 $\text{PtdIns} > \text{PtdIns}4\text{P} > \text{PtdIns} (4,5) \text{P}_2$ (数据未显示)。在存在 Mn^{2+} 时的脂激酶活性比存在 Mg^{2+} (在浓度范围 0.25 到 16 毫摩尔/升中测试, 数据未显示) 时低。从 Sf9 细胞中分离的 p110 δ 的特异活性比 p110 α 低 2 — 5 个因数(数据未显示)。总结到一起, 从这些数据可以确定 p110 δ 是真正的 I 类 PI3K。

p110 δ 不磷酸化 p85 但自身磷酸化

已经证实 p85 亚基是 p110 α 催化亚基依赖于 Mn^{2+} 的磷酸化底物(Carpenter 等人, 1993; Dhand 等人, 1994)。相反, 在各种体外条件下, GST — p110 δ 不能磷酸化共表达的 p85 α , p85 β 或 p85 γ (图 4A 显示了部分数据; 在存在 Mg^{2+} 或不存在 Mn^{2+} 时没有看到活性)。p85 γ 缺乏 SH3 区, 这一分子没有被 p110 δ 磷酸化引起了对 p85 α/β SH3 区与 p110 δ 富脯氨酸区的分子内反应锁住了 p110 δ 有效地磷酸化 p85 分子的可能性的争论。为了排除昆虫细胞体内共表达过程中, p110 δ 已经完全磷酸化 p85, 在固定的 GST — p110 δ 中加入了外源纯化的 p85 α 。在洗掉过量的 p85 后, 发现结合的 p85 被 p110 α , 而不是 p110 δ 有效地磷酸化(数据未显示)。当存在 Mn^{2+} 时, 对在与 p85 α 或 p85 β 的复合物中的未标记的 p110 δ 进行体外激酶测试时, p110 δ 自身磷酸化[(图 4B), 注意在固定的 GST — p110 δ 中非常缺乏这一活性(图 4B)]。在 p110 α /p85 复合物中没有观察到这样的磷酸化, 其中又一次发现 p85 被磷酸化(图 4B)。磷酸氨基酸分析表明对 p110 δ 的磷酸化发生在丝氨酸上(图 4B)。观察到 p110 α 对 p85 的磷酸化和 p110 δ 的自身磷酸化大大地依赖于 Mn^{2+} , 而存在 Mg^{2+} 时只有非常弱的磷酸化(数据未显示)。p110 δ 的自身磷酸化导致脂激酶活性减弱。

为了排除观察到的 p110 δ 的磷酸化是由于共沉淀的蛋白质激酶引起的可能性, 产生了激酶缺陷 p110 δ 突变体。这是通过将

p110 δ 中的精氨酸 894 转换脯氨酸产生 p110 δ -R894P 完成的。突变的精氨酸残基位于激酶区的保守 DRX₃NX₁₂₋₁₃DFG 基序中，可能是催化环的一部分如在蛋白质激酶中(Taylor 等人, 1992, Zvelebil 等人, 1996)。已经发现在小牛 p110 α (R916P)中的相似的突变完全破坏了催化活性(Dhand 等人, 1994)。正如从图 4C 中可以明了, 在昆虫细胞中表达的 p110 δ -R894P 不再在 p110 δ 的沉淀中磷酸化, 表明后者确实有自身磷酸化能力。同样, 发现 p110 δ -R894P 失去了脂激酶活性(数据未显示)。

我们已经生产了 p110 δ 的磷酸化形式的多克隆抗血清。将 C 末端肽序列 1044 中的丝氨酸残基 1033 磷酸化并用于免疫。特异于磷酸化肽的抗血清使我们能够确定 p110 δ 在体内磷酸化, 并在细胞因子刺激的基础上, 增强这种磷酸化(结果未显示)。

p110 δ 催化活性的药物敏感性

发现 p110 α 和 δ 脂激酶活性展示了对渥曼青霉素和 LY294002 的抑制性的相似的敏感性(图 5), IC₅₀ 为 5 纳摩尔/升(对渥曼青霉素)和 0.5 微摩尔/升(对 LY294002)。同样, 纳摩尔/升范围的渥曼青霉素也抑制 p110 δ 的自身磷酸化活性(数据未显示)。

p110 δ 的组织分布

通过对人组织的 polyA⁺RNA 的 Northern 影印分析研究了 p110 δ 的表达方式, 并与 p110 α 和 p110 β 进行比较。发现在血液白细胞群体即脾, 胸腺, 特别是外周血液白细胞(后者含有所有白细胞, 只有除去大部分红细胞)中约 6kb 的一个信使 mRNA 种类的表达特别高(图 6)。在一些 Northern 影印实验中, 观察到另外一个约 5kb 的 p110 δ 的信使(数据未显示)。在大多数检测的其它组织中发现 p110 δ 信使 RNA 的低水平表达, 虽然难于排除血细胞污染对这一 p110 δ mRNA 信号有影响的可能性。同时发现在大部分检测的组织中表达了 p110 α 和 p110 β (图 6)。

然后将特异于 p110 α 和 δ 的抗体用于在蛋白质水平测试 PI3K 的表达。在测试不同鼠组织时，发现脾和胸腺中 110 千道尔顿的蛋白质与 p110 δ 反应，但在任何其它测试的组织中(图 7)。这一方式很大程度上证明了如上所述的 Northern 影印分析的数据。同时发现 p110 δ 存在于原始的和转化的白细胞中，独立于它们的分化时期(图 7)。在原始血细胞中，淋巴和骨髓细胞群体对 p110 δ 是阳性的，而血小板是阴性(图 7)。T(如 Jurkat, HPB All)和 B(如 Raji, HFB1)细胞系表达 p110 δ (图 7)。在 Rat-1, NIH 3T3 和瑞士 3T3 成纤维细胞中，LS174T 和 COLO 320HSR 结肠腺癌，A431 上皮样癌，ECC-1 子宫内膜癌和 HEp-2 喉癌中没有发现 110 千道尔顿的 p110 δ (图 7)，在 CHO 中国仓鼠卵巢，POC 小细胞肺癌细胞系，猪和牛主动脉内皮细胞，MDA-MB-468 乳腺癌，和原始的人肌肉和成纤维细胞中也没有发现(数据未显示)。总之，p110 δ 似乎是选择性地在白细胞中进行表达。

与 p110 δ 相反，在进行研究的大部分组织和细胞系中，包括白细胞中发现 p110 α 。

将抗 p110 δ 多克隆抗体微注射进 CSF-1 刺激的鼠巨嗜细胞通过鼠巨嗜细胞系，含有 p110 δ 和 p110 α 的抗血清的 Bac1 的一系列微注射实验进一步研究 p110 δ 的可能功能。在微注射之前，剥去 Bac1 细胞的 CSF1 24 小时。CSF1 剥离使细胞准备好在随后与 CSF1 接触时分裂并变得可移动。将亲和纯化的抗 p110 δ 多克隆抗体微注射进剥离 Bac1 细胞的 CSF1，接着与 CSF1 接触 10~15 分钟。

微注射的 Bac1 细胞显示了明显的细胞形态学变化。正常的细胞膜皱褶消失，发生了细胞质收缩。利用鬼笔环肽—若丹明共轭物可见微注射的 Bac1 细胞的细胞骨架，图 10 显示这样的细胞的代表性样品，显示打乱的细胞骨架排列。抗 p110 α 的注射不产生等同的效应。

有意义的是，阴性占优势的小 GTP 结合蛋白 rac, N17RAC 的

表达显示了相似的表现型。这表明 p110 δ 可能是参与细胞骨架形成和细胞移动发出同样的信号级联中的部分。

p110 δ 参与细胞因子发出信号

在白细胞中，已经暗示结合 p85 的 PI3Ks 参与各种发出信号过程包括通过细胞因子和补充的受体，整合蛋白，Fc 受体，B 和 T 细胞抗原受体和它们的辅助分子如 CD28 发出信号 (Stephens 等人, 1993; Fry, 1994)。所以，很明显，大量发出信号过程潜在地与 p110 δ 相关。关键问题是能否同时含有其它 I 类 PI3K 的细胞中发生 p110 δ 与上面提到的发出信号/受体复合物的选择性偶联，给出了不同的 p110s 似乎是与同样的 p85 同工型复合的观察结果 (图 2B)。我们在白细胞的各种类型中可操作的细胞因子信号转导过程中已经提出过这一重要问题。

细胞因子的不同家族通过拥有共同的 gp130, β 或 γ 链的受体的分立的类型或通过含有内在的酪氨酸激酶活性的受体转导信号 (Taga 和 Kishimoto, 1995)。然而还没有报道通过 gp130 发出信号的细胞因子激活 PI3K，已经证实了对应于通过共同的 β 链 (如 IL3)，共同的 γ 链 (如 IL4) 或通过酪氨酸激酶受体 (如 c-kit, 结合干细胞因子 (SCF)) 发出信号的细胞因子激活结合 p85 的 PI3K (Wang 等人, 1992; Gold 等人, 1994)。我们检测了在依赖于细胞因子的白细胞系中 IL3, IL4 和 SCF 与 p110 δ 和 p110 α 的偶联能力。我们发现了特异地用于刺激细胞因子的含有磷酸酪氨酸的蛋白质的相同方式以便与 p110 α 和 p110 δ 抗体共沉淀 (图 8, 组 a)。在 IL3-和 IL4-反应的 Ba/F3 pre-B 和骨髓始祖 FD-6 细胞系 (图 8A; FD-6 的数据未显示) 中，IL-3 处理在 p110 α/δ IPs 中诱导了未知的 100 千道尔顿的蛋白质和 70 千道尔顿的酪氨酸磷酸酶，SHP2 的出现 (图 8A, 组 b)。通过免疫影印表明 IL4 刺激时共沉淀的 170 千道尔顿的蛋白质 (图 8A, 组 a) 是 IRS-2，这些细胞中 IL4-诱导的磷酸化的主要底物 (数据未显示)。图 8B 显示了在 MC/9 肥大细胞中有相似的分析结果。在 SCF 刺激后，p110 α

和 p110 δ IPs 含有未鉴定的 100 千道尔顿酪氨酸磷酸化蛋白质以及鉴定为 c-kit, SCF 受体的 150 千道尔顿的蛋白质(图 8B, 组 a 和 b)。这些数据表明在吸收到各种活化的细胞因子受体复合物中时 p110 α 和 p110 δ 没有显示明显的差异。另外,至少两个结合 p85 的 PI3K 类的成员在细胞因子发信号中的意义暴露了前面没有识别的这些细胞因子受体的下游信号转导途径的复杂性。

在鼠和人黑素瘤细胞系中表达 PI3 激酶 p110 亚基

在各种鼠和人黑素瘤细胞系中进一步研究 p110 δ 的表达。黑素瘤的特征是与这一癌症相关的积极的移动性特征。通过分析在鼠和人细胞系范围内相对丰富的 p110 δ 蛋白质研究了 p110 δ 参与移动的可能性。利用 Western 影印评估 p110 α 和 β 以及 p110 δ 的水平。将 J774, 一个鼠细胞系用作鼠 Western 影印的对照。将新生儿黑素细胞用作人 Western 影印的对照。表 1 表明了鼠和人起源的黑素瘤细胞系两个对照中 p110 α 和 β 是构成性地表达的。有意义的是,当与鼠黑素瘤细胞系相比,鼠对照细胞系 J744 显示明显减弱的 p110 δ 水平。但是,在人新生儿黑素细胞中发现可检测的 p110 δ 水平。这可以通过这些人对照细胞的特性解释。p110 δ 在这些对照细胞中的表达可以通过这些细胞在人皮肤中相对新的移动所以在这些细胞中可以存在残留的 p110 δ 的水平来解释。成人的黑素细胞在皮肤中的停留延长, p110 δ 的水平可以减弱到与它们的最终分化相称的不可检测的水平。

我们已经叙述了新的人 p110 亚基, p110 δ , 它是 PI3 激酶家族的一部分。p110 δ 显示了限制表达的方式,只在白细胞群体,特别是外周血液白细胞中有明显的积累水平。这些细胞的移动特性使我们得出, PI3 激酶家族的这一成员可能通过细胞骨架的再组成参与了调节细胞的移动。有关鼠和人黑素瘤细胞系的数据是有意义的,但关于人黑素瘤缺乏说服力。对人正常黑素细胞和人黑素瘤进行活组织检查将可以解决这一问题。

表 1

鼠黑素瘤中 p110 亚基的表达

细胞系	特征	δ	α	β	参考文献
<u>鼠</u>					
J744	对照	-	+	+	本研究
黑-c	黑素瘤	-	+	+	
黑-pl	黑素瘤	-	+	+	Wilson 等人 1989
黑-a Tu-2d	黑素瘤	-	+	+	Wilson 等人 1989
Mel-ab	黑素瘤	+/-	+	+	Dooley 等人 1988
Mel-ab-LTR-Ras2	黑素瘤	+	+	+	Dooley 等人 1988
Mel-ab-LTR-Ras3	黑素瘤	+	+	+	Dooley 等人 1988
Mel-ab-pMT	黑素瘤	+	+	+	Dooley 等人 1988
B16 F1	黑素瘤(弱移动性)	+	+	+	Fidler 等人 1975
B16 F10	黑素瘤(高移动性)	+	+	+	Fidler 等人 1975

表 1 续

人黑素瘤中 p110 亚基的表达

细胞系	特征	δ	α	β	参考文献
<u>人</u>					
A375P	黑素瘤(弱移动性)	-	+	+	Easty 等人 1995
A375M	黑素瘤(高移动性)	+	+	+	Easty 等人 1995
WM164	黑素瘤	+	+	+	Easty 等人 1995
WM451	黑素瘤	+	+	+	Easty 等人 1995
DX3	黑素瘤(弱移动性)	+	+	+	Ormerod 等人 1986
DX3-LT5.1	黑素瘤(高移动性)	-	+	+	Ormerod 等人 1986
对照(人新生儿黑素细胞)	原始细胞	+	+	+	本研究

参考文献

- Antonetti, D.A., Algenstaedt, P. 和 Kahn, C.R. (1996) 在肌肉和脑中胰岛素受体底物 1 与磷脂酰肌醇 3-激酶的调节亚基的两个新剪接变体结合。《分子细胞生物学》, 16, 2195—2203 (Insulin receptor substrate 1 binds two novel splice variants of the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in muscle and brain. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 2195-2203)。
- Burgering, B.M.T. 和 Coffer, P.J. (1995) 磷脂酰肌醇-3-OH 激酶信号转导中的蛋白质激酶 B(c-Akt)。《自然》, 376, 599—602 (Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*, **376**, 599-602)。
- Carpenter, C.C., Auger, K.R., Duckworth, B.C., Hou, W.-M., Schaffhausen, B. 和 Cantley, L.C. (1993) 一个密切相关的丝氨酸/苏氨酸蛋白质激酶调节磷酸肌醇 3-激酶活性。《分子细胞生物学》, 13, 1657—1665 (A tightly associated serine/threonine protein kinase regulates phosphoinositide 3-kinase activity. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 1657-1665)。
- Chung, J.K., Gammer, T.C., Lemon, K.P., Kazlauskas, A. 和 Blenis, J. (1994) 磷脂酰肌醇-3-OH-激酶传导依赖于 PDGF 和胰岛素 pp70^{SK6} 的活化。《自然》, 370, 71—75 (PDGF- and insulin-dependent pp70^{SK6} activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH-kinase. *Nature*, **370**, 71-75)。
- Clarke, N.G. 和 Dawson R.M.C. (1981) 碱性 O→N-转酰作用。用于磷脂的定量脱酰的新方法。《生物化学杂志》, 195, 301—306 (Alkaline O→N-transacylation. A new method for the quantitative deacylation of phospholipids. *Biochem. J.*, **195**, 301-306)。
- Cross, D.A.E., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M. 和 Hemmings, B.A. (1995) 通过蛋白质激酶 B 传导的胰岛素抑制糖原合成酶激酶-3。《自然》, 378, 785—789 (Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, **378**, 785-789)。
- Davies, A.H., Jowett, J.B.M. 和 Jones, I.A. (1993) 表达谷胱甘肽-S-转移酶融合蛋白的重组杆状病毒载体。《生物技术》, 11, 933—936 (Recombinant baculovirus vectors expressing glutathione-S-transferase fusions proteins. *Biotechnology*, **11**, 933-936)。
- DeCamilli, P., Emr, S.D., McPherson, P.S. 和 Novick, P. (1996) 在膜运输中作为调节剂的磷酸肌醇。《科学》, 271, 1533—1539 (DeCamilli, P., Emr, S.D., McPherson, P.S. and Novick, P. (1996) Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. *Science*, **271**, 1533-1539)。
- Devereux, J., Haeblerli, P. 和 Smithies, O. (1984) 一个综合性的序列分析程序系列 VAX。《核酸研究》, 12, 3897—395 (A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.*, **12**, 3897-395)。
- Dhand, R., Hiles, I., Panayotou, G., Roche, S., Fry, M.J., Totty, N.F., Truong, O., Vicendo, P., Yonezawa, K., Kasuga, M.M., Courtneidge, S. 和 Waterfield, M.D. (1994) PI 3-激酶是双重特异性酶：通过内部蛋白质丝氨酸激酶活性自我调节。《EMBO J.》13, 522-533 (PI 3-kinase is a dual

specificity enzyme: autoregulation by an intrinsic protein-serine kinase activity. *EMBO J.* **13**, 522-533)。

Divecha, N. 和 Irvine, R.F. (1995) 磷脂信号。《细胞》，80, 269—278 (Phospholipid signaling. *Cell*. **80**, 269-278)。

Dooley 等人, (1988) 《致癌基因》，3, 531 页 (Oncogene. **3**, p531)。

Easty 等人, (1995) *Int. J. Cancer*, **60**, 129-136 (*Int. J. Cancer*, **60**, 129-136)。

End, P., Gout, I., Fry, M.J., Panayotou, G., Dhand, R., Yonezawa, K., Kasuga, M. 和 Waterfield, M.D. (1993) 探测磷脂酰肌醇 3-激酶复合物的 p85 α 亚基的结构和功能的生物传感器途径, 《生物化学杂志》，268, 10066—10075 (A biosensor approach to probe the structure and function of the p85 α subunit of the phosphatidylinositol 3-kinase complex. *J. Biol. Chem.*, **268**, 10066-10075)。

Fidler, I. (1975) 《癌症研究》，35, 218—224 (*Cancer Research*, **35**, 218-224)。

Franke, T.F., Yang, S.I., Chan T.O., Dataa, K., Kazlauskas, A., Morrison, D.K., Kaplan, D.R. 和 Tsichlis, P.N. (1995) Akt 原癌基因编码的蛋白质激酶是 PDGF 激活的磷脂酰肌醇 3-激酶的靶。《细胞》，81, 727—736 (The protein kinase encoded by the *Akt* proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell*, **81**, 727-736)。

Fry, M. (1994) 磷酸肌醇 3-激酶的结构, 调节和功能。 *Biochim. Biophys. Acta*. **1226**, 237-268 (Structure, regulation and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim. Biophys. Acta*. **1226**, 237-268)。

Gold, M.R., Duronio, V., Saxena, S.P., Schrade, J.W. 和 Aebbersold, R. (1994) 造血细胞中多重细胞因子激活磷脂酰肌醇 3-激酶。该酶与各种酪氨酸磷酸化蛋白的关系。《生物化学杂志》，269, 5403—5412 (Multiple cytokines activate phosphatidylinositol 3-kinase in hemopoietic cells. Association of the enzyme with various tyrosine-phosphorylated proteins. *J. Biol. Chem.*, **269**, 5403-5412)。

Gout, I., Dhand, R., Hiles, I.D., Fry, M.J., Panayotou, G., Das, P., Truong, O., Totty, N.F., Hsuan, J., Booker, G.W., Campbell, I.D. 和 Waterfield, M.D. (1993) GTP 酶发动蛋白与 SH3 区亚系结合并被激活。《细胞》75, 1—20 (The GTPase dynamin binds to and is activated by a subset of SH3 domains. *Cell*. **75**, 1-20)。

Hartley, D., Meisner, H. 和 Corvera, S. (1995) 磷脂酰肌醇-3-激酶的 p85 亚基的 β 同工型与原癌基因 *c-cbl* 的特异结合。《生物化学杂志》，270, 18260—18263 (Specific association of the β isoform of the p85 subunit of phosphatidylinositol-3 kinase with the proto-oncogene *c-cbl*. *J. Biol. Chem.*, **270**, 18260-18263)。

Hawkins, P.T., Eguinoa, A., Giu, R.-G., Stokoe, D., Cooke, F.T., Walters, R., Wennstrom, S., Claesson-Welsh, L., Evans, T., Symons, M. 和 Stephens, L. (1995) 通过活化磷酸肌醇 3-激酶 PDGF 刺激 GTP-Rac 的增加, 《当代生物学》，5, 393—403 (PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase. *Curr. Biol.*, **5**, 393-403)。

Hiles, I.D., Otsu, M., Volinia, S., Fry, M.J., Gout, I., Dhand, R., Panayotou,

- G., Ruiz-Larrea, F., Thompson, A., Totty, N.F., Hsuan, J.J., Courtneidge, S.A., Parker, P.J. 和 Waterfield, M. (1992) 磷脂酰肌醇 3-激酶: 100 千道尔顿的催化亚基的结构和表达。《细胞》, 419-429 (Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 100 kd catalytic subunit. *Cell*, 419-429)。
- Hirai, S., Izawa, M., Osada, S., Spyrou, G. 和 Ohno S. (1996) 通过明显相关的蛋白质激酶 MEKK 和 MUK 激活 JNK 的途径。《致癌基因》, 12, 641-650 (Activation of the JNK pathway by distantly related protein kinases, MEKK and MUK. *Oncogene*, 12, 641-650)。
- Hu, P., Mondino, A., Skoinik, E.Y. 和 Schlessinger, J. (1993) 新的普遍表达的磷脂酰肌醇 3 激酶的克隆和它在 p85 上的结合位点的鉴定。《分子细胞生物学》, 13, 7677-7688 (Cloning of a novel ubiquitously expressed phosphatidylinositol 3-kinase and identification of its binding site on p85. *Mol. Cell. Biol.* 13, 7677-7688)。
- Hunter, T. (1995) 当脂激酶是蛋白质激酶时, 它不是脂激酶。《细胞》83, 1-4 (When is a lipid kinase not a lipid kinase? When it is a protein kinase. *Cell* 83, 1-4)。
- Ing, Y.L., Lewung, I.W., Heng, H.H., Tsui, L.-C. 和 Lassam, N.J. (1994) MLK-3: 广泛表达的含有 SH3 区和亮氨酸拉链碱性区的蛋白质激酶的鉴定。《致癌基因》, 9, 1745-1750 (MLK-3: identification of a widely-expressed protein kinase bearing an SH3 domain and a leucine zipper-basic region domain. *Oncogene*, 9, 1745-1750)。
- Inukai, K., Anai, M., Van Breda, E., Hosaka, R., Katagiri, H., Funaki, M., Fukushima, Y., Ogihara, T., Yazaki, Y., Kikuchi, M., Oka, Y. 和 Asano, Y. (1996) 通过可替代地拼接 p85 α 基因生产与 p55PIK 结构相同的磷脂酰肌醇 3-激酶的新 55 千道尔顿的调节亚基。《生物化学杂志》, 271, 5317-5320 (A novel 55-kDa regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase structurally similar to p55PIK is generated by alternative splicing of the p85 α gene. *J. Biol. Chem.*, 271, 5317-5320)。
- James, S.R., Downes, C.P., Gigg, R., Grove, S.J.A., Holme, A.B. 和 Alessi, D. (1996) Akt-1 蛋白质激酶与磷脂酰肌醇 3, 4, 5-三磷酸的特异结合, 没有随后的激活。《生物化学杂志》, 315, 709-713 (Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate without subsequent activation. *Biochem. J.* 315, 709-713)。
- Jelinke, T. 和 Weber, M.J. (1993) 一维薄层电泳对磷酸氨基酸的最佳分辨。《生物技术》, 15, 628-630 (Optimization of the resolution of phosphoamino acids by one-dimensional thin-layer electrophoresis. *Biotechniques*. 15, 628-630)。
- Kapeller, R. 和 Cantley, L.C. (1994) 磷脂酰肌醇 3-激酶。《生物测试》, 8, 565-576 (Phosphatidylinositol 3-kinase. *BioEssays*, 8, 565-576)。
- Karasuyama, H., 和 Melchers, F. (1988) 利用修饰的 cDNA 表达载体建立构成性地分泌大量白细胞介素 2, 3, 4 或 5 的鼠细胞系。《Eur. J. Immunol.》, 18, 97-104 (Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA

- expression vectors. *Eur. J. Immunol.*, **18**, 97-104)。
- Klippel, A., Reinhard, C., Kavanaugh, W. M., Apell, G., Escobedo, M. -A. 和 Williams, L. T. (1966) 磷脂酰肌醇 3-激酶的膜定位足以激活多重转导信号的激酶途径。《分子细胞生物学》16, 4117-4127 (Membrane localization of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to activate multiple signal-transducing kinase pathways. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4117-4127)。
- Koadki, T., Woscholski, R., Hallberg, B., Rodriguez-Viciana, R., Downward, J. 和 Parker, P. J. (1994) Ras 激活磷脂酰肌醇 3-激酶。《当代生物学》, 4, 798-806 (The activation of phosphatidylinositol 3-kinase by Ras. *Curr. Biol.* **4**, 798-806)。
- Kozak, M. (1991) 调节翻译起始的真核细胞 mRNAs 中的结构特征, 《生物化学杂志》, 266, 19867-19870 (Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.*, **266**, 19867-19870)。
- Laemmli, U. K. (197) 在噬菌体 T 的头部的组装过程中结构蛋白的切割。《自然》227, 680-685 (Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature* **227**, 680-685)。
- Lam, K., Carpenter, C. L., Ruderman, N. B., Friel, J. C. 和 Kelly, K. L. (1994) 磷脂酰 3-激酶丝氨酸激酶磷酸化 IRS-1。《生物化学杂志》, 269, 24648-24652 (The phosphatidylinositol 3-kinase serine kinase phosphorylates IRS-1. *J. Biol. Chem.*, **269**, 24648-20652)。
- Leevers, S. J., Weinkove, D., MacDougall, L. K., Hafen, E. 和 Waterfield, M. D. (1997) 果蝇磷酸肌醇 3-激酶 Dp110 促进细胞生长, *EMBO J.* 出版中 (The *Drosophila* phosphoinositide 3-kinase Dp110 promotes cell growth. *EMBO J.* In press)。
- Li, G., D'Souza-Schorey, C., Barbieri, M. A., Roberts, R. L., Klippel, A., Williams, L. T. 和 Stahl, P. D. (1995) 磷脂酰肌醇 3-激酶通过 Rab5 激活作为胞吞作用的调节剂的证据。《美国核酸科学进程》, 92, 10207-12211 (Evidence for phosphatidylinositol 3-kinase as a regulator of endocytosis via activation of Rab5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 10207-12211)。
- MacDougall, L. K., Domin, J. 和 Waterfield, M. D., (1996) 果蝇中的磷酸肌醇 3-激酶家族鉴定为新的信号转导传导器。《当代生物学》, 5, 1404-1415 (A family of phosphoinositide 3-kinases in *Drosophila* identifies a new mediator of signal transduction. *Curr. Biol.*, **5**, 1404-1415)。
- Molz, L., Chen, Y. -W., Hirano, M. 和 Williams, L. T. (1996) Cpk 是含有 C2 区的果蝇 PtdIns 3-激酶的新类型。《生物化学杂志》271, 13892-13899 (Cpk is a novel class of *Drosophila* PtdIns 3-kinase containing a C2 domain. *J. Biol. Chem.*, **271**, 13892-13899)。
- Nabel, G., Gali, S. J., Dvorak, A. M., Dvorak, H. F. 和 Cantor, H. (1981) 诱导物 T 淋巴细胞合成刺激肥大细胞的克隆的增殖的因子, 《自然》, 291, 332-334 (Inducer T lymphocytes synthesize a factor that stimulates proliferation of clones mast cells. *Nature.* **291**, 332-334)。
- Ormerod 等人, (1986) 《癌症研究》, 46, 884-890 (Cancer Research, 46, 884-890)。
- Otsu, M., Hiles, I., Gout, I., Fry, M. J., Ruiz-Larrea, F., Panayotou, G.,

- Thompson, A., Dhand, R., Hsuan, J., Totty, N., Smith, A. D., Morgan, S., Courtneidge, S., Parker, P. J. 和 Waterfield, M. D. (1991) 鉴定两个与受体酪氨酸激酶中 T/pp60^{c-src} 复合物, 和 PI3 激酶结合的 85 千道尔顿的蛋白质。《细胞》65, 91-104 (Characterization of two 85 kd proteins that associate with receptor tyrosine kinases. middle-T/pp60^{c-src} complexes. and PI3-kinase. *Cell*, **65**, 91-104)。
- Palacios, R. 和 Steinmetz, M. (1985) 表达 B-220 表面抗原的依赖于 IL-3 的鼠克隆在微生物系构型中含有 Ig 基因, 在体内产生 B 淋巴细胞。《细胞》41, 727-734 (IL-3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen. contain Ig genes in germ-line configuration and generate B lymphocytes in vivo. *Cell*, **41**, 727-734)。
- Palmer, R. H., Dekker, L. V., Woscholski, R., Le Good, A., Gigg, R. 和 Parker, P. J. (1995) 通过磷脂酰肌醇 4, 5-二磷酸和磷脂酰肌醇 3, 4, 5-三磷酸激活 PRK1。《生物化学杂志》270, 22412-22416 (Activation of PRK1 by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.*, **270**, 22412-22416)。
- Pons, S., Asano, T., Glasheen, E., Miralpeix, M., Zhang, Y., Fisher, T. C., Meyers Jr, M. G., Sun, X. J. 和 White, M. W. (1995) p55^{PIK} 的结构和功能暴露了磷脂酰肌醇 3-激酶的新调节亚基。《分子细胞生物学》, 15, 4453-4465 (The structure and function of p55^{PIK} reveal a new regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 4453-4465)。
- Reif, K., Gout, I., Waterfield, M. D. 和 Cantrell, D. A. (1995) 在 T 细胞激活基础上磷脂酰肌醇 3-激酶 p85 α 和 p85 β 同工型的趋异调节。《生物化学杂志》, 268, 10780-10788 (Divergent regulation of phosphatidylinositol 3-kinase P85 alpha and P85 beta isoforms upon T cell activation. *J. Biol. Chem.*, **268**, 10780-10788)。
- Rodriguez-Viciano, P., Warne, P. H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M. J., Waterfield, M. D. 和 Downward, J. (1994) 作为 Ras 的直接靶的磷脂酰肌醇-3-OH 激酶。《自然》370, 527-532 (Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature*, **370**, 527-532)。
- Rodriguez-Viciano, P., Warne, R., Vanhaesebroeck, Waterfield, M. D., 和 Downward, J. (1996) 通过与 Ras 和点突变激活磷酸肌醇 3-激酶。《EMBO J.》, 15, 2442-2451 (Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *EMBO J.*, **15**, 2442-2451)。
- Sackmann, E. (1994) 小泡和细胞形态的膜弯曲能量概念和形态转换。《FEBS lett.》, 346, 3-16 (Membrane bending energy concept of vesicle- and cell-shapes and shape-transitions. *FEBS lett.*, **346**, 3-16)。
- Sainio 等人 (1994) 《细胞分子神经生物学》, 14(5), 435-457 (Sainio et al., (1994). *Cell. Mol. Neurobiol.* **14**(5). 439-457)。
- Shepherd, P., Reaves, B. 和 Davidson, H. W. (1996) 磷脂酰肌醇激酶和膜运输。《细胞生物学趋势》, 6, 52-57 (Phosphoinositide 3-kinases and membrane traffic. *Trends Cell. Biol.*, **6**, 52-57)。
- Springer, T. A. (1994) 淋巴细胞循环的转运信号和白细胞渗出 the multistep paradigm。《细胞》76, 301-314 (Traffic signals for lymphocyte

- recirculation and leucocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, **76**, 301-314)。
- Stack, J.H., Horazdovsky, B. 和 Emr, S.D. (1995) 将酵母中的液泡中的受体传导的蛋白质分类: 蛋白质激酶, 脂激酶和 GTP 结合蛋白质的作用。 *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **11**, 1-33 (Receptor-mediated protein sorting to the vacuole in yeast: roles for a protein kinase, a lipid kinase and GTP-binding proteins. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **11**, 1-33)。
- Stephens, L.R., Hawkins, P.T. 和 Downes, C.P. (1989) 细胞中存在第三类多聚磷酸肌醇: D-磷脂酰肌醇 3-磷酸的代谢和结构证据。《生物化学杂志》, **259**, 267-276 (Metabolic and structural evidence for the existence of a third species of polyphosphoinositide in cells: D-phosphatidyl-myoinositol 3-phosphate. *Biochem. J.*, **259**, 267-276)。
- Stephens, L.R., Huges, K.T. 和 Irvine, R.F. (1991) 在活化的嗜中性粒细胞中的磷脂酰肌醇(3,4,5)三磷酸合成途径。《自然》, **351**, 33-39 (Pathway of phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate synthesis in activated neutrophils, *Nature*, **351**, 33-39)。
- Stephens, L.R., Jackson, T.R. 和 Hawkins, P.T. (1993) 拮抗剂刺激磷脂酰肌醇(3,4,5)三磷酸的合成: 新的细胞内发生信号系统? *Biochem. Biophys. Acta.*, **1179**, 27-75 (Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphate: a new intracellular signalling system? *Biochim. Biophys. Acta*, **1179**, 27-75)。
- Stephens, L., Smrcka, A., Cooke, F.T., Jackson, T.R., Sternweiss, P.C. 和 Hawkins, P.T. (1994) G 蛋白质 $\beta\gamma$ 亚基激活骨髓起源的细胞中新的磷酸肌醇 3 激酶活性。《细胞》, **77**, 83-93 (A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein $\beta\gamma$ subunits. *Cell*, **77**, 83-93)。
- Stephens, L., Hawkins, P.T., Eguinoa, A. 和 Cooke, F. (1996) PI3K 的异源三体 GTP 酶调节同工型和它的潜在效应物的调节, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, **351**, 211-215 (A heterotrimeric GTPase-regulated isoform of PI3K and the regulation of its potential effectors. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, **351**, 211-215)。
- Stoyanov, B., Volinia, S., Hanck, T., Rubio, I., Loutbchenkov, M., Maiek, D., Stoyanova, S., Vanhaesebroeck, B., Dhand, R., Nurnberg, B., Gierschik, P., Seedorf, K., Hsuan, J.J., Waterfield, M.D. 和 Wetzker, R. (1995) 克隆和鉴定激活 G 蛋白质的人磷酸肌醇 3 激酶。《科学》, **269**, 690-693 (Cloning and characterisation of a G protein-activated human phosphoinositide 3-kinase. *Science*, **269**, 690-693)。
- Summers, M.D. 和 Smith, H.E. (1987) 杆状病毒载体和昆虫细胞培养过程的方法的手册。 *Texas Agri. Exp. Station Bull.* 1555 页 (A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. *Texas Agri. Exp. Station Bull.* No 1555)。
- Taga, T. 和 Kishimoto, T. (1995) 通过拥有信号转导受体成份的细胞因子受体发出信号的机制。《当代免疫学评论》, **7**, 17-23 (Signalling mechanisms through cytokine receptors that share signal transducing receptor components. *Curr. Opin. Immunol.*, **7**, 17-23)。

- Tanti, J.-F., Gremaux, T., Van Obbergehen, E., 和 Le Marchand-Brustei, Y. (1994) 通过磷脂酰肌醇 3 激酶的丝氨酸激酶活性磷酸化胰岛素受体底物。《生物活性杂志》, 304, 17-21 (Insulin receptor substrate 1 is phosphorylated by the serine kinase activity of phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem. J.*, **304**, 17-21)。
- Taylor, S.S., Kinghton, D.R., Zheng, J., Ten Eyck, L.F. 和 Sowadski, J.M. (1992) 蛋白质激酶家族的结构构架。 *Annu. Rev. Cell Biol.*, **8**, 429-462 (Structural framework for the protein kinase family. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **8**, 429-462)。
- Toker, A., Meyer, M., Reddy, K.K., Falck, J.R., Aneja, R., Aneja, S., Parra, A., Burns, D.J., Ballas, L.M. 和 Cantley, L.C. (1994) 新的磷酸肌醇 PtdIns-3,4-P² 和 PtdIns-3,4,5-P₃ 激活蛋白质激酶 C 家族成员。《生物化学杂志》, 269, 32358-32367 (Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P² and PtdIns-3,4,5-P₃. *J. Biol. Chem.*, **269**, 32358-32367)。
- Vanhaesebroeck, B., Stein, R. 和 Waterfield, M.D. (1996) 磷酸肌醇 3 激酶和它们潜在功能的研究。《癌症调查》, 27, 出版中 (Phosphoinositide 3-kinases and the study of their potential function. *Cancer Surveys*, **27**. In press)。
- Birbasius, J.V., Guilherme, A. 和 Czech, M.P. (1996) 鼠 p170 是含有 C2 区的新磷脂酰肌醇 3 激酶。《生物化学杂志》, 271, 13304-13307 (Mouse p170 is a novel phosphatidylinositol 3-kinase containing a C2 domain. *J. Biol. Chem.*, **271**, 13304-13307)。
- Volinia, S., Hiles, I., Ormondroyd, E., Nizetic, D., Antonacci, R., Rocchi, M. 和 Waterfield, M. (1994) 人磷脂酰肌醇 3-激酶 p110 α (PIK3CA) 基因的分子克隆, cDNA 序列和染色体定位。《基因组》, 24, 472-477 (Molecular cloning, cDNA sequence and chromosomal localization of the human phosphatidylinositol 3-kinase p110 α (PIK3CA) gene. *Genomics*, **24**, 472-477)。
- Volinia, S., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., MacDougall, L.K., Stein, R., Zvelebil, M.J., Domin, J., Panaretou, C. 和 Waterfield, M.D. (1995) 与酵母 Vps34p-Vps15p 蛋白质分类系统相关的人磷脂酰肌醇 3 激酶复合物。 *EMBO J.*, **14**, 3339-3348 (A human phosphatidylinositol 3-kinase complex related to the yeast Vps34p-Vps15p protein sorting system. *EMBO J.*, **14**, 3339-3348)。
- Wagner 等人 (1996) 《自然生物介素》, 14, 840-844 (Nature Biotechnology, **14**, 840-844)。
- Wang, L.-M., Keegan, A.D., Paul, W.E., Heidarani, M.A., Gutkind, J.S. 和 Pierce, J.H. (1992) 在依赖于因子的骨髓细胞中 IL-4 激活来自 IL-3 的独特的信号转导级联, *EMBO J.*, **11**, 4899-4908 (IL-4 activates a distinct signal transduction cascade from IL-3 in factor-dependent myeloid cells. *EMBO J.*, **11**, 4899-4908)。
- Welham, M.J. 和 Schrader, J.W. (1992) 鼠肥大细胞中 Steel 因子诱导的酪氨酸磷酸化, 利用 IL-3 诱导信号转导途径的一般元素。《免疫学杂志》, 149, 2772-2783 (Steel factor-induced tyrosine phosphorylation in murine mast cells. Common elements with IL-3 induced signal transduction pathways. *J.*

Immunol., **149**, 2772-2783)。

Welham, M.J., Duronio, V. 和 Schrader, J.W. (1994a) 依赖于白细胞介素-4 的增殖将 p44^{erk-1}, p42^{erk-2} 和 p21^{ras} 活化与细胞生长分开。《生物化学杂志》, **269**, 5865—5873 (Interleukin-4-dependent proliferation dissociates p44^{erk-1}, p42^{erk-2} and p21^{ras} activation from cell growth. *J. Biol. Chem.*, **269**, 5865-5873)。

Welham, M.J., Dechert, U., Leslie, K.B., Jirik, F. 和 Schrader, J.W. (1994b) 白细胞介素(IL)-3 和粒细胞/巨嗜细胞集落刺激因子, 但不是 IL-4 诱导利用 Grb2 和磷脂酰肌醇 3 激酶对 SHPTP2 酪氨酸磷酸化, 激活和结合。《生物化学杂志》, **269**, 23764—23768 (Interleukin (IL)-3 and Granulocyte/Macrophage colony-stimulating factor, but not IL-4, induce tyrosine phosphorylation, activation and association of SHPTP2 with Grb2 and phosphatidylinositol 3'-kinase. *J. Biol. Chem.*, **269**, 23764-23768)。

Whitman, M., Downes, C.P., Keller, M., Keller, T. 和 Cantley, L. (1988) I 型磷脂酰肌醇激酶产生新的肌醇磷脂, 磷脂酰肌醇 3-磷酸。《自然》, **332**, 644—646 (Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature*. **332**, 644-646)。

Wientjes, F.B., Hsuan, J.J., Totty, N.F. 和 Segal, A.W. (1993) p40^{phos}, NADPH 氧化酶的活化复合物的第三个胞质成份含有 src 同源 3 区。《生物化学杂志》, **296**, 557—561 (p40^{phos}, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *Biochem. J.*, **296**, 557-561)。

Wilson 等人 (1989) 《癌症研究》, **49**, 711 页 (Cancer Research, **49**, p711)。

Zhang, J., Zhang, J., Shattil, S.J., Cunningham, M.C. 和 Rittenhouse, S.E. (1996) 血小板中的磷酸肌醇 3 激酶 γ 和 p85/磷酸肌醇 3 激酶, 被凝血酶受体或 β -佛波醇豆蔻酸乙酸相对活化和在促进 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 整合蛋白的配体结合功能中的作用。《生物化学杂志》, **271**, 6265—6272 (Phosphoinositide 3-kinase γ and p85/phosphoinositide 3-kinase in platelets. Relative activation by thrombin receptor or β -phorbol myristate acetate and roles in promoting the ligand-binding function of $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin. *J. Biol. Chem.* **271**, 6265-6272)。

Zvelebil, M.J., MacDougall, L., Leever, S., Volinia, S., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Panayotou, G., Domin, J., Stein, R., Koga, H., Salim, K., Linacre, J., Das, P., Panaretou, C., Wetzker, R. 和 Waterfield, M.D. (1996) 磷酸肌醇 3-激酶的多样化结构和功能。《Phil. Trans. R. Soc. Lond.》, **351**, 217-233 (Structural and functional diversity of phosphoinositide 3-kinases. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, **351**, 217-233)。

序列表

(1) 一般资料:

(i) 申请人:

(A) 名称: 路德维希肿瘤研究所

(B) 街道: 波斯特法沙大街

(C) 城市: 苏黎士

(D) 州: 坎顿 · 苏黎士州

(E) 国家: 瑞士

(F) 邮政编码: CH-8024

(ii) 发明名称: 新脂激酶

(iii) 序列号: 1

(iv) 计算机可读形式:

(A) 媒体类型: 软盘

(B) 计算机: IBM 兼容机

(C) 运行系统: PC-DOS/MS-DOS

(D) 软件: 释放 #1.0, 版本 #1.30 (EPO)

(2) 序列识别资料号: 1:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 1044 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 股数:

(D) 结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 无

(vi) 初原料:

(A) 组织: Homo sapiens

(G) 细胞类型: T 细胞

(H) 细胞系: 脱皮 4

(vii) 直接原料:

(A) 库: U937

(B) 克隆: 09.1

(xi) 序列描述: 序列识别号: 1:

Met Pro Pro Gly Val Asp Cys Pro Met Glu Phe Trp Thr Lys Glu Glu
1 5 10 15

Asn Gln Ser Val Val Val Asp Phe Leu Leu Pro Thr Gly Val Tyr Leu
 20 25 30

Asn Phe Pro Val Ser Arg Asn Ala Asn Leu Ser Thr Ile Lys Gln Leu
 35 40 45

Leu Trp His Arg Ala Gln Tyr Glu Pro Leu Phe His Met Leu Ser Gly
 50 55 60

Pro Glu Ala Tyr Val Phe Thr Cys Ile Asn Gln Thr Ala Glu Gln Gln
 65 70 75 80

Glu Leu Glu Asp Glu Gln Arg Arg Leu Cys Asp Val Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Pro Val Leu Arg Leu Val Ala Arg Glu Gly Asp Arg Val Lys Lys Leu
 100 105 110

Ile Asn Ser Gln Ile Ser Leu Leu Ile Gly Lys Gly Leu His Glu Phe
 115 120 125

Asp Ser Leu Cys Asp Pro Glu Val Asn Asp Phe Arg Ala Lys Met Cys
 130 135 140

Gln Phe Cys Glu Glu Ala Ala Ala Arg Arg Gln Gln Leu Gly Trp Glu
 145 150 155 160

Ala Trp Leu Gln Tyr Ser Phe Pro Leu Gln Leu Glu Pro Ser Ala Gln

165

170

175

Thr Trp Gly Pro Gly Thr Leu Arg Leu Pro Asn Arg Ala Leu Leu Val

180

185

190

Asn Val Lys Phe Glu Gly Ser Glu Glu Ser Phe Thr Phe Gln Val Ser

195

200

205

Thr Lys Asp Val Pro Leu Ala Leu Met Ala Cys Ala Leu Arg Lys Lys

210

215

220

Ala Thr Val Phe Arg Gln Pro Leu Val Glu Gln Pro Glu Asp Tyr Thr

225

230

235

240

Leu Gln Val Asn Gly Arg His Glu Tyr Leu Tyr Gly Ser Tyr Pro Leu

245

250

255

Cys Gln Phe Gln Tyr Ile Cys Ser Cys Leu His Ser Gly Leu Thr Pro

260

265

270

His Leu Thr Met Val His Ser Ser Ser Ile Leu Ala Met Arg Asp Glu

275

280

285

Gln Ser Asn Pro Ala Pro Gln Val Gln Lys Pro Arg Ala Lys Pro Pro

290

295

300

Pro Ile Pro Ala Lys Lys Pro Ser Ser Val Ser Leu Trp Ser Leu Glu
305 310 315 320

Gln Pro Phe Arg Ile Glu Leu Ile Gln Gly Ser Lys Val Asn Ala Asp
325 330 335

Glu Arg Met Lys Leu Val Val Gln Ala Gly Leu Phe His Gly Asn Glu
340 345 350

Met Leu Cys Lys Thr Val Ser Ser Ser Glu Val Ser Val Cys Ser Glu
355 360 365

Pro Val Trp Lys Gln Arg Leu Glu Phe Asp Ile Asn Ile Cys Asp Leu
370 375 380

Pro Arg Met Ala Arg Leu Cys Phe Ala Leu Tyr Ala Val Ile Glu Lys
385 390 395 400

Ala Lys Lys Ala Arg Ser Thr Lys Lys Lys Ser Lys Lys Ala Asp Cys
405 410 415

Pro Ile Ala Trp Ala Asn Leu Met Leu Phe Asp Tyr Lys Asp Gln Leu
420 425 430

Lys Thr Gly Glu Arg Cys Leu Tyr Met Trp Pro Ser Val Pro Asp Glu
435 440 445

Lys Gly Glu Leu Leu Asn Pro Thr Gly Thr Val Arg Ser Asn Pro Asn
450 455 460

Thr Asp Ser Ala Ala Ala Leu Leu Ile Cys Leu Pro Glu Val Ala Pro
465 470 475 480

His Pro Val Tyr Tyr Pro Ala Leu Glu Lys Ile Leu Glu Leu Gly Arg
485 490 495

His Ser Glu Cys Val His Val Thr Glu Glu Glu Gln Leu Gln Leu Arg
500 505 510

Glu Ile Leu Glu Arg Arg Gly Ser Gly Glu Leu Tyr Glu His Glu Lys
515 520 525

Asp Leu Val Trp Lys Leu Arg His Glu Val Gln Glu His Phe Pro Glu
530 535 540

Ala Leu Ala Arg Leu Leu Leu Val Thr Lys Trp Asn Lys His Glu Asp
545 550 555 560

Val Ala Gln Met Leu Tyr Leu Leu Cys Ser Trp Pro Glu Leu Pro Val
565 570 575

Leu Ser Ala Leu Glu Leu Leu Asp Phe Ser Phe Pro Asp Cys His Val
580 585 590

Gly Ser Phe Ala Ile Lys Ser Leu Arg Lys Leu Thr Asp Asp Glu Leu
595 600 605

Asp Ser Lys Met Lys Pro Leu Trp Ile Met Tyr Ser Asn Glu Glu Ala

755

760

765

Gly Ser Gly Gly Ser Val Gly Ile Ile Phe Lys Asn Gly Asp Asp Leu

770

775

780

Arg Gln Asp Met Leu Thr Leu Gln Met Ile Gln Leu Met Asp Val Leu

785

790

795

800

Trp Lys Gln Glu Gly Leu Asp Leu Arg Met Thr Pro Tyr Gly Cys Leu

805

810

815

Pro Thr Gly Asp Arg Thr Gly Leu Ile Glu Val Val Leu Arg Ser Asp

820

825

830

Thr Ile Ala Asn Ile Gln Leu Asn Lys Ser Asn Met Ala Ala Thr Ala

835

840

845

Ala Phe Asn Lys Asp Ala Leu Leu Asn Trp Leu Lys Ser Lys Asn Pro

850

855

860

Gly Glu Ala Leu Asp Arg Ala Ile Glu Glu Phe Thr Leu Ser Cys Ala

865

870

875

880

Gly Tyr Cys Val Ala Thr Tyr Val Leu Gly Ile Gly Asp Arg His Ser

885

890

895

Asp Asn Ile Met Ile Arg Glu Ser Gly Gln Leu Phe His Ile Asp Phe

900

905

910

Gly His Phe Leu Gly Asn Phe Lys Thr Lys Phe Gly Ile Asn Arg Glu

915

920

925

Arg Val Pro Phe Ile Leu Thr Tyr Asp Phe Val His Val Ile Gln Gln

930

935

940

Gly Lys Thr Asn Asn Ser Glu Lys Phe Glu Arg Phe Arg Gly Tyr Cys

945

950

955

960

Glu Arg Ala Tyr Thr Ile Leu Arg Arg His Gly Leu Leu Phe Leu His

965

970

975

Leu Phe Ala Leu Met Arg Ala Ala Gly Leu Pro Glu Leu Ser Cys Ser

980

985

990

Lys Asp Ile Gln Tyr Leu Lys Asp Ser Leu Ala Leu Gly Lys Thr Glu

995

1000

1005

Glu Glu Ala Leu Lys His Phe Arg Val Lys Phe Asn Glu Ala Leu Arg

1010

1015

1020

Glu Ser Trp Lys Thr Lys Val Asn Trp Leu Ala His Asn Val Ser Lys

1025

1030

1035

1040

Asp Asn Arg Gln

(1) 一般资料:

(i) 申请人:

(A) 名称: 路德维希肿瘤研究所

(B) 街道: 波斯特法沙大街

(C) 城市: 苏黎士

(E) 国家: 瑞士

(F) 邮政编码: CH-8024

(ii) 发明名称: 新脂激酶

(iii) 序列号: 2

(iv) 计算机可读形式:

(A) 媒体类型: 软盘

(B) 计算机: IBM 兼容机

(C) 运行系统: PC-DOS/MS-DOS

(D) 软件: 释放 #1.0, 版本 #1.30 (EPO)

(2) 序列识别资料号: 2

(i) 序列特征:

(A) 长度: 3387 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股数: 单

(D) 结构: 线性

(ii) 分子类型: 互补 DNA

(iii) 假设: 无

(iv) 反义: 无

(vi) 初原料:

(A) 组织: Homo sapiens

(G) 细胞类型: T 细胞

(H) 细胞系: 蜕皮-4

(vii) 直接原料:

(A) 库: U937

(B) 克隆: 09.1

(xi) 序列描述: 序列识别号: 2:

ATGCCCCCTG GGGTGGACTG CCCCATGGAA TTCTGGACCA AGGAGGAGAA TCAGAGCGTT	60
GTGGTTGACT TCCTGCTGCC CACAGGGGTC TACCTGAACT TCCCTGTGTC CCGCAATGCC	120
AACCTCAGCA CCATCAAGCA GCTGCTGTGG CACCGCGCCC AGTATGAGCC GCTCTTCCAC	180
ATGCTCAGTG GCCCGAGGC CTATGTGTTC ACCTGCATCA ACCAGACAGC GGAGCAGCAA	240
GAGCTGGAGG ACGAGCAACG GCGTCTGTGT GACGTGCAGC CCTTCCTGCC CGTCCTGCGC	300
CTGGTGGCCC GTGAGGGCGA CCGCGTGAAG AAGCTCATCA ACTCACAGAT CAGCCTCCTC	360
ATCGGCAAAG GCCTCCACGA GTTTGACTCC TTGTGCGACC CAGAAGTGAA CGACTTTTCG	420
GCCAAGATGT GCCAATTCTG CGAGGAGGCG GCCGCCGCC GGCAGCAGCT GGGCTGGGAG	480
GCCTGGCTGC AGTACAGTTT CCCCCTGCAG CTGGAGCCCT CGGCTCAAAC CTGGGGGCCT	540
GGTACCCTGC GGCTCCCGAA CCGGGCCCTT CTGGTCAACG TTAAGTTGA GGCAGCGAG	600
GAGAGCTTCA CCTTCCAGGT GTCCACCAAG GACGTGCCG TGGCGTGAT GGCCTGTGCC	660
CTGCGGAAGA AGGCCACAGT GTTCCGGCAG CCGCTGGTGG AGCAGCCGGA AGACTACACG	720
CTGCAGGTGA ACGGCAGGCA TGAGTACCTG TATGGCAGCT ACCCGCTCTG CCAGTTCCAG	780
TACATCTGCA GCTGCCTGCA CAGTGGGTTG ACCCCTCACC TGACCATGGT CCATTCCTCC	840
TCCATCCTCG CCATGCGGGA TGAGCAGAGC AACCTGCCC CCCAGGTCCA GAAACCGCGT	900
GCCAAACCAC CTCCATTCC TGCGAAGAAG CCTTCCTCTG TGTCCTGTG GTCCTGGAG	960
CAGCCGTTCC GCATCGAGCT CATCCAGGGC AGCAAAGTGA ACGCCGACGA GCGGATGAAG	1020

CTGGTGGTGC AGGCCGGGCT TTTCCACGGC AACGAGATGC TGTGCAAGAC GGTGTCCAGC	1080
TCGGAGGTGA GCGTGTGCTC GGAGCCCGTG TGGAAGCAGC GGCTGGAGTT CGACATCAAC	1140
ATCTGCGACC TGCCCCGCAT GGCCCGTCTC TGCTTTGCGC TGTACCCGT GATCGAGAAA	1200
GCCAAGAAGG CTCGCTCCAC CAAGAAGAAG TCCAAGAAGG CGGACTGCCC CATTGCCTGG	1260
GCCAACCTCA TGCTGTTTGA CTACAAGGAC CAGCTTAAGA CCGGGGAACG CTGCCTCTAC	1320
ATGTGGCCCT CCGTCCCAGA TGAGAAGGGC GAGCTGCTGA ACCCCACGGG CACTGTGCGC	1380
AGTAACCCCA ACACGGATAG CGCCGCTGCC CTGCTCATCT GCCTGCCCGA GGTGGCCCCG	1440
CACCCCGTGT ACTACCCCGC CCTGGAGAAG ATCTTGAGC TGGGGCGACA CAGCGAGTGT	1500
GTGCATGTCA CCGAGGAGGA GCAGCTGCAG CTGCGGGAAA TCCTGGAGCG GCGGGGTCT	1560
GGGGAGCTGT ATGAGCACGA GAAGGACCTG GTGTGGAAGC TGCGGCATGA AGTCCAGGAG	1620
CACTTCCCGG AGGCGCTAGC CCGGCTGCTG CTGGTCACCA AGTGGAAACA GCATGAGGAT	1680
GTGGCCAGTA TGCTCTACCT GCTGTGCTCC TGGCCGGAGC TGCCCGTCCT GAGCGCCCTG	1740
GAGCTGCTAG ACTTCAGCTT CCCCATTGC CACGTAGGCT CCTTCGCCAT CAAGTCGCTG	1800
CGGAAACTGA CGGACGATGA GCTGTTCCAG TACCTGCTGC AGCTGGTGCA GGTGCTCAAG	1860
TACGAGTCCT ACCTGGACTG CGAGCTGACC AAATTCCTGC TGGACCGGC CCTGGCCAAC	1920
CGCAAGATCG GCCACTTCCT TTTCTGGCAC CTCCGCTCCG AGATGCACGT GCCGTCGGTG	1980
GCCTGCGCT TCGGCCTCAT CCTGGAGGCC TACTGCAGGG GCAGGACCCA CCACATGAAG	2040

GTGCTGATGA AGCAGGGGGA AGCACTGAGC AACTGAAGG CCCTGAATGA CTTCGTCAAG	2100
CTGAGCTCTC AGAAGACCCC CAAGCCCAG ACCAAGGAGC TGATGCACTT GTGCATGCGG	2160
CAGGAGGCCT ACCTAGAGGC CCTCTCCCAC CTGCAGTCCC CACTCGACCC CAGCACCCCTG	2220
CTGGCTGAAG TCTGCGTGGA GCAGTGCACC TTCATGGACT CCAAGATGAA GCCCCTGTGG	2280
ATCATGTACA GCAACGAGGA GGCAGGCAGC GCGGCAGCG TGGGCATCAT CTTAAGAAC	2340
GGGGATGACC TCCGGCAGGA CATGCTGACC CTGCAGATGA TCCAGCTCAT GGACGTCCTG	2400
TGGAAGCAGG AGGGGCTGGA CCTGAGGATG ACCCCCTATG GCTGCCTCCC CACCGGGGAC	2460
CGCACAGGCC TCATTGAGGT GGTACTCCGT TCAGACACCA TCGCCAACAT CCAACTCAAC	2520
AAGAGCAACA TGGCAGCCAC AGCCGCCTTC AACAAGGATG CCCTGCTCAA CTGGCTGAAG	2580
TCCAAGAACC CGGGGAGGC CCTGGATCGA GCCATTGAGG AGTTCACCCT CTCCTGTGCT	2640
GGCTATTGTG TGGCCACATA TGTGCTGGC ATTGGCGATC GGCACAGCGA CAACATCATG	2700
ATCCGAGAGA GTGGCAGCT GTTCCACATT GATTTGGCC ACTTTCTGGG GAATTTCAAG	2760
ACCAAGTTTG GAATCAACCG CGAGCGTGTC CCATTCATCC TCACCTACGA CTTGTCCAT	2820
GTGATTCAGC AGGGGAAGAC TAATAATAGT GAGAAATTG AACGGTCCG GGGCTACTGT	2880
GAAAGGCCT ACACCATCCT GCGGCGCCAC GGGCTTCTCT TCCTCCACCT CTTGCCCCTG	2940
ATGCGGGCGG CAGGCCTGCC TGAGCTCAGC TGCTCAAAG ACATCCAGTA TCTCAAGGAC	3000
TCCCTGGCAC TGGGAAAAC AGAGGAGGAG GCACTGAAGC ACTTCCGAGT GAAGTTTAAAC	3060

GAAGCCCTCC GTGAGAGCTG GAAAACCAAA GTGAACTGGC TGGCCACAA CGTGTCCAAA	3120
GACAACAGGC AGTAGTGGCT CCTCCCAGCC CTGGGCCCAA GAGGAGGCGG CTGCGGGTCG	3180
TGGGGACCAA GCACATTGGT CCTAAAGGGG CTGAAGAGCC TGAAGTGCAC CTAACGGGAA	3240
AGAACCGACA TGGCTGCCTT TTGTTTACAC TGGTTATTTA TTTATGACTT GAAATAGTTT	3300
AAGGAGCTAA ACAGCCATAA ACGGAAACGC CTCCTTCATG CAGCGGCGGT GCTGGGCCCC	3360
CCGAGGCTGC ACCTGGCTCT CGGCTGA	3387

1 MPFCVDCPME INTKLEHQSV VVDLFLPTGV YLNEPVSDEMA NLSTIKQLLM ERAQYEPLEY KLSGPEAYVT TCINOTATAQO ELEDFOEMIC DVQDFLFLVLA
 101 LVAREGDRVK KLINQOISLL ICKGLEHFDSD LQDFEVNDFX ADKCFQCEEA AABEOOLGVE AMLOISFFLQ LEPSAQTMGY GTLLDFEAL LVNVKFEQSE
 201 ESFTFOVSTK DVPLALMACA LKKATVFRQ PLVEQEDYIT LQVNGEHEYL YGSIYICOTO YICSCLESGE TPELTVRESS SILAGDEDS MPAPQVQKFR
 301 AKPPPIPAK BSVSLMSLE QPFRIELIQ SKVNAEDMK LVQAGLFEK HEMLCATVSS SEVSVGSEPV WQORLEFDIM ICDLEPMAAL CFALYAVIDE
 401 AKKALSTKX SKKADCFIAM AMKLDYKRD QLKTEGICX MPISVFDKNG ILLNFTGTVR SNPRTDSAAA LLICLPEVAP HFVYYPALAK ILELGRHSEC
 501 VEVTEEQLO LREILERGS GELYEHKDL VNKLREVOE HPPEALAILL LVTKWKKED VAOMLYLGS WFELPVLAL ILLDFPFDK KVGSFAIKSL
 601 EKLTDDDELFO YLLOLVQVLK YESYLDCHL KFLLEDBALAM KKICHTLPM LESDEKVPVS ALRFGLIEA YCRGTEEMK VLMKQGEALS KLKALDFVK
 701 LSSQKTRFO TKELMELCH QRAYLEALSH LQSPLDPSTL LAFVCHQCT PROSDOKPLM IMYSHEKGS CGSVGILFM GDDLIQDMIT LOMIQLMDVL
 801 WKQEGIDEM TPYCCLPD RTGLITVLR SDTIANTQLM KSNMAATAAF NKDALLNMX SNMPCALDR AIEFTLSCA GICVATYVIG IGDEHSDMIM
 901 IRSCQLFEI DFGHEFLGNFK INFGINERV PFILTYDVE VIQCKTNS EKFERFGYC ERAYTILZEH GLLFLHELVAL KRAAGLPELS CSKDIOYKXD
 1001 SLALGKTEEE ALKHEFVKEN EALRESWTK VNWLAEVSK DMRQ

图 1A

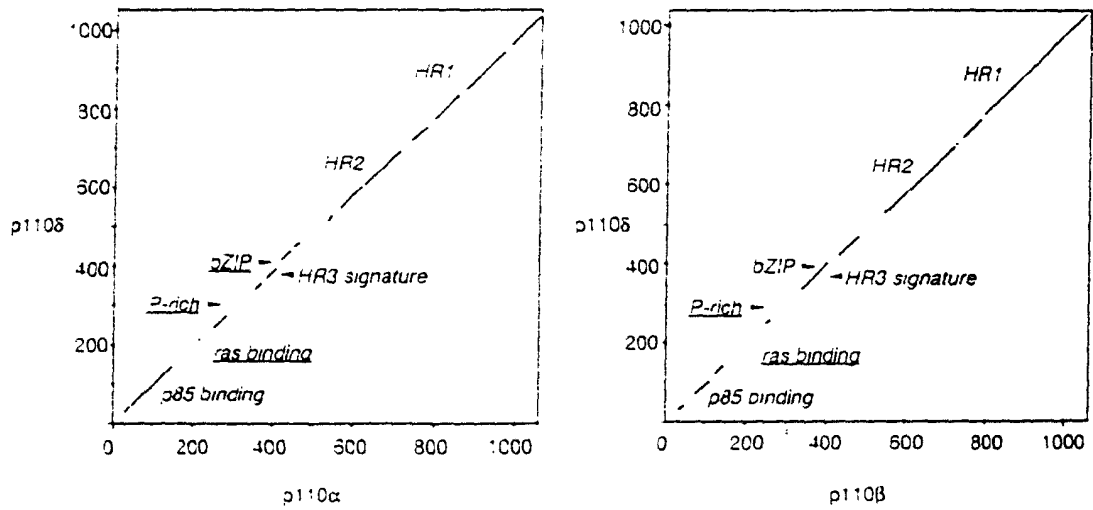


图 1B

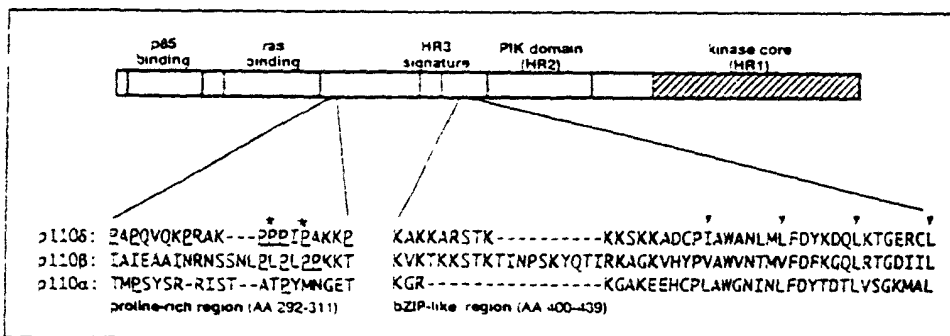


图 1C

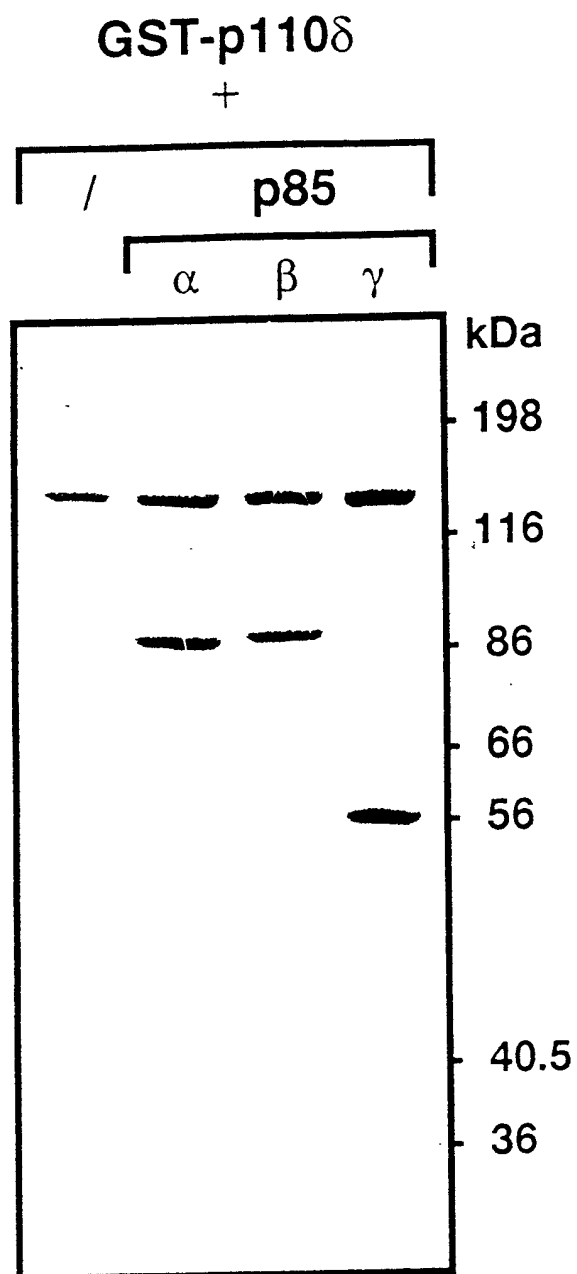


图 2A

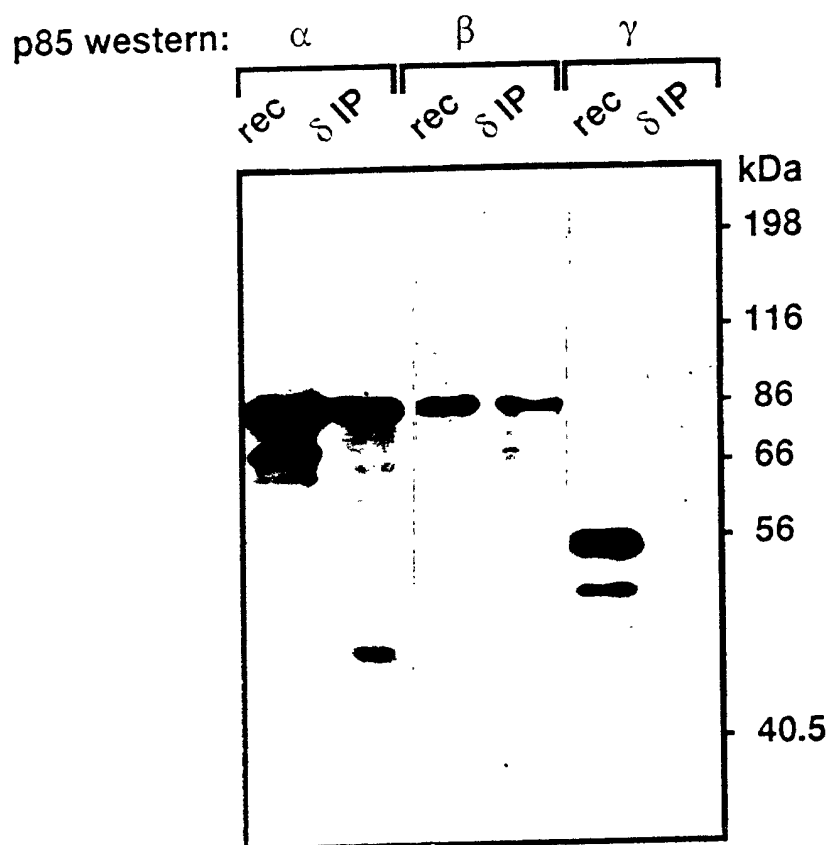


图 2B

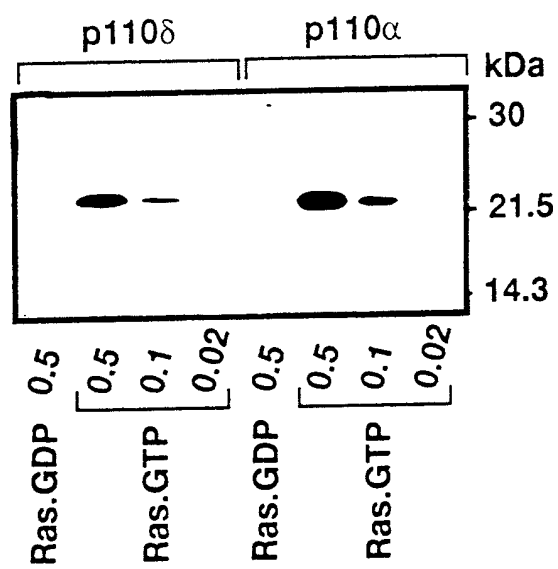


图 2C

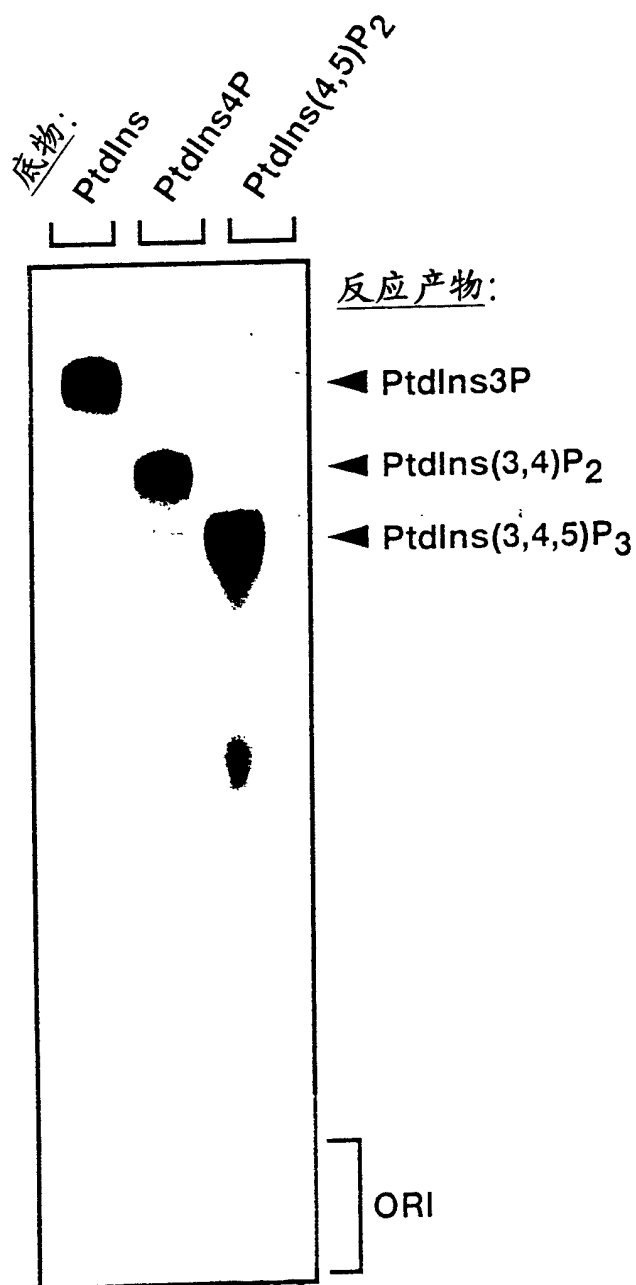


图 3A

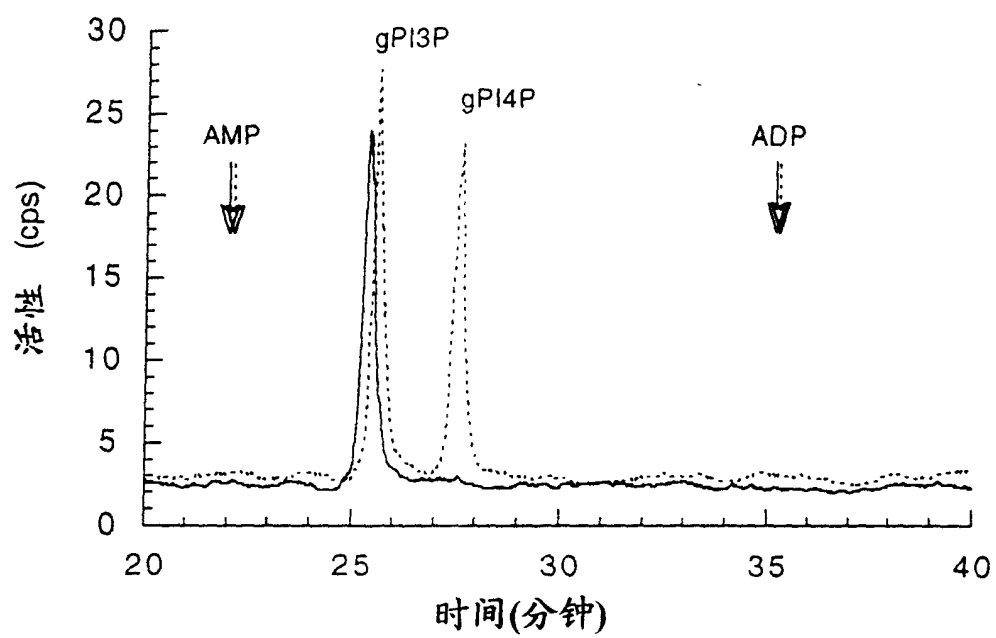
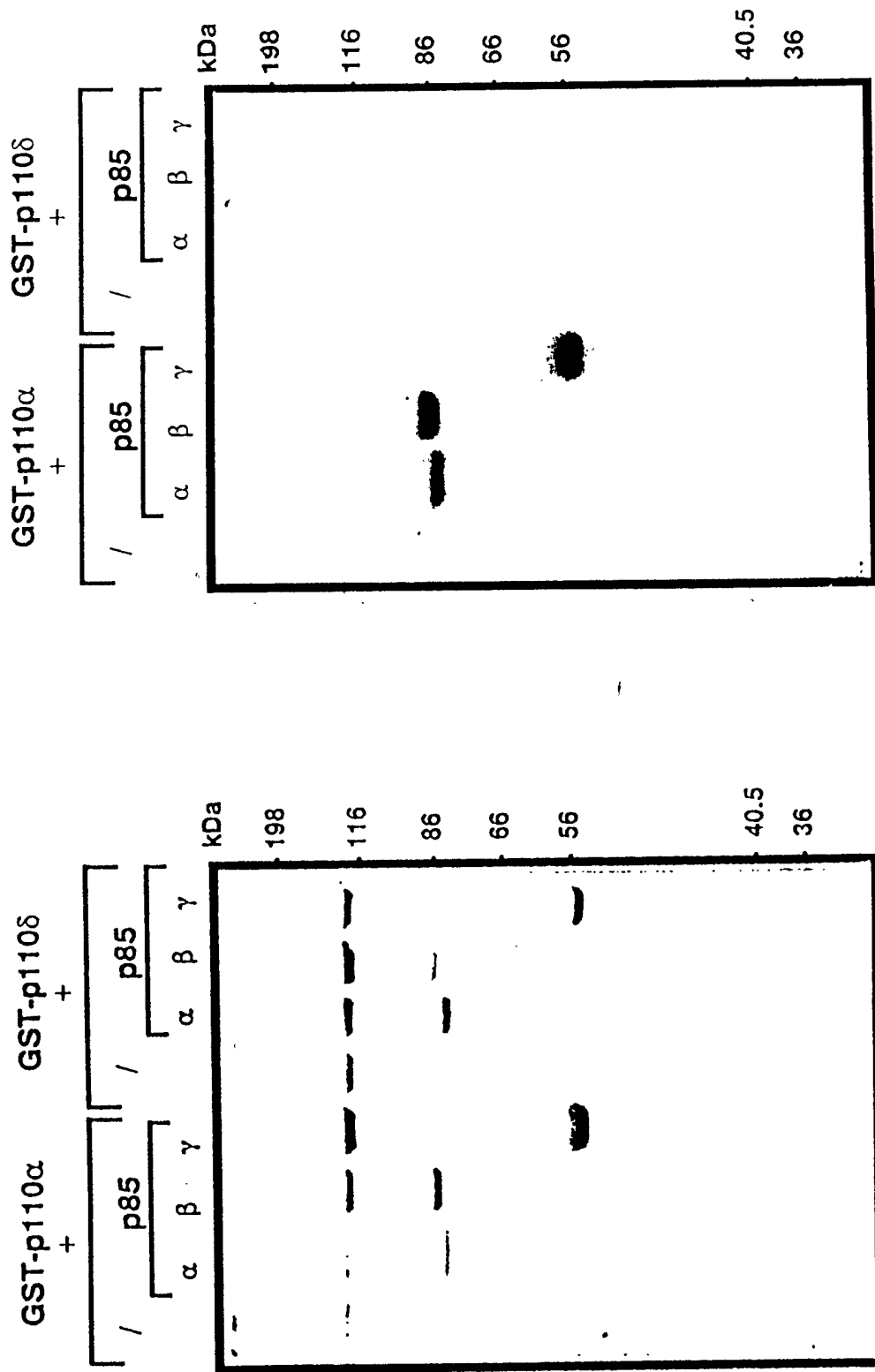


图 3B



放射自显影

考马斯蓝染色

图 4A

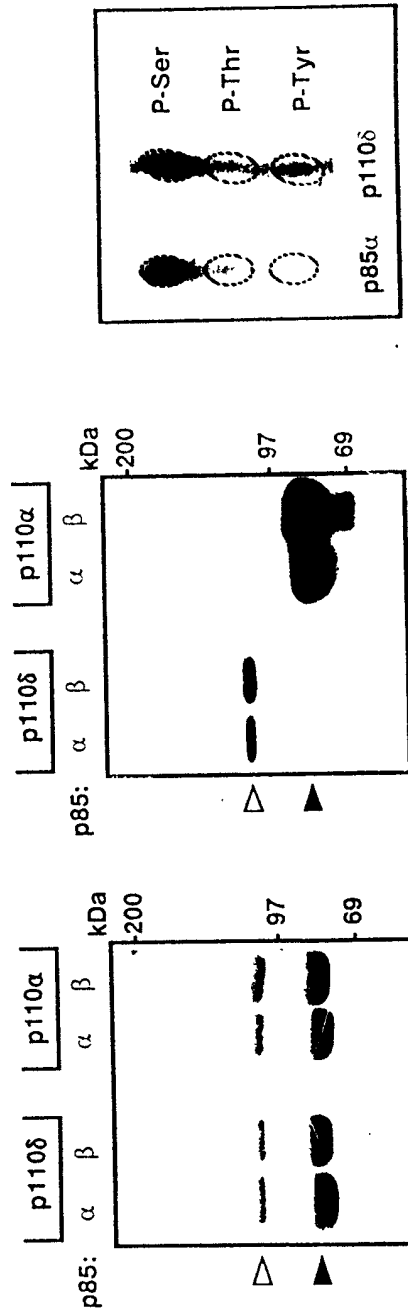


图 4B

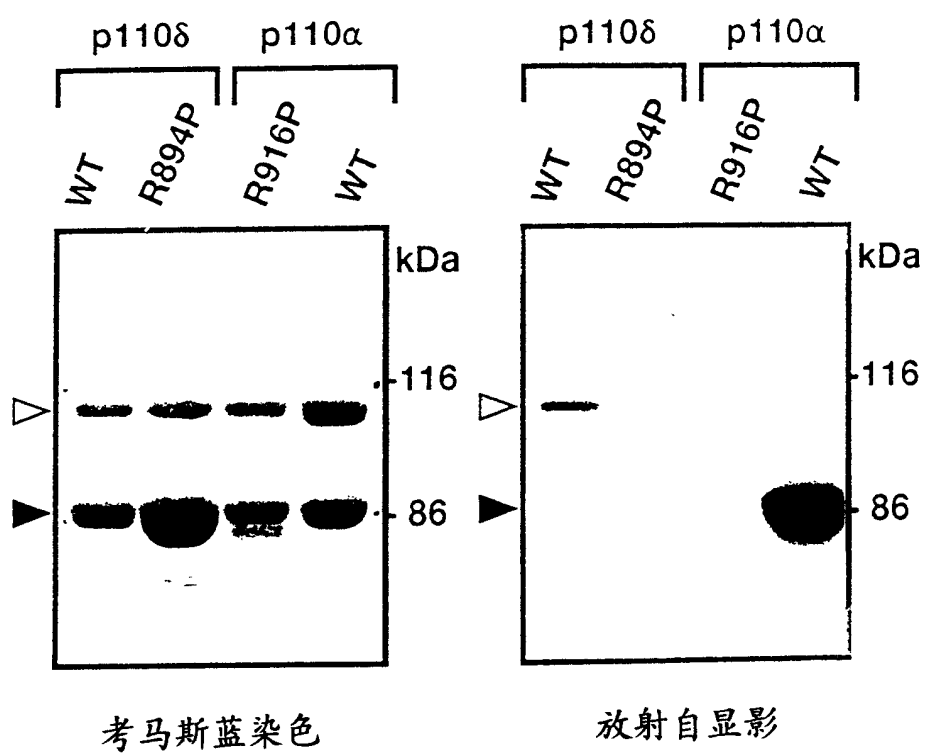


图 4C

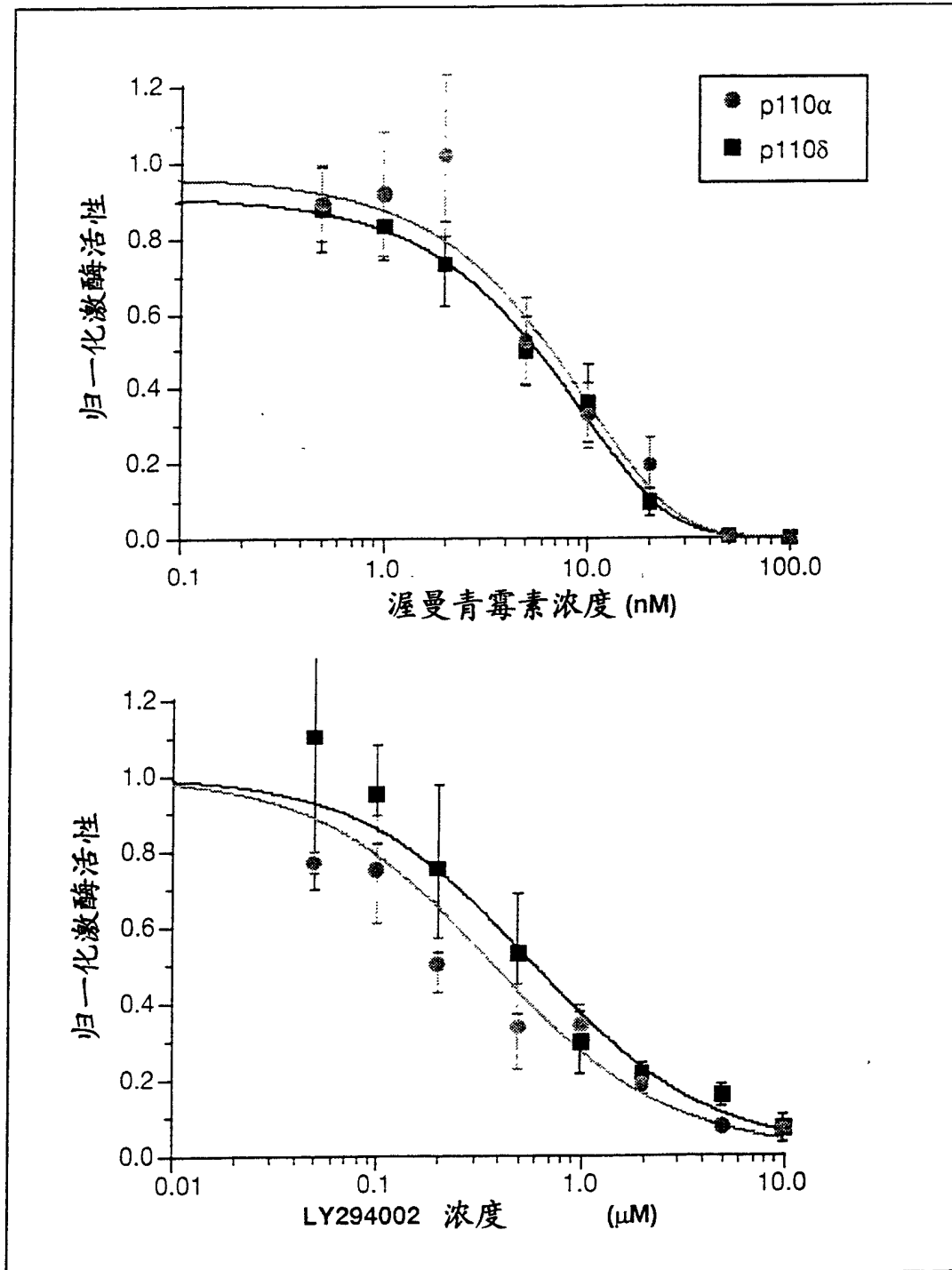


图 5

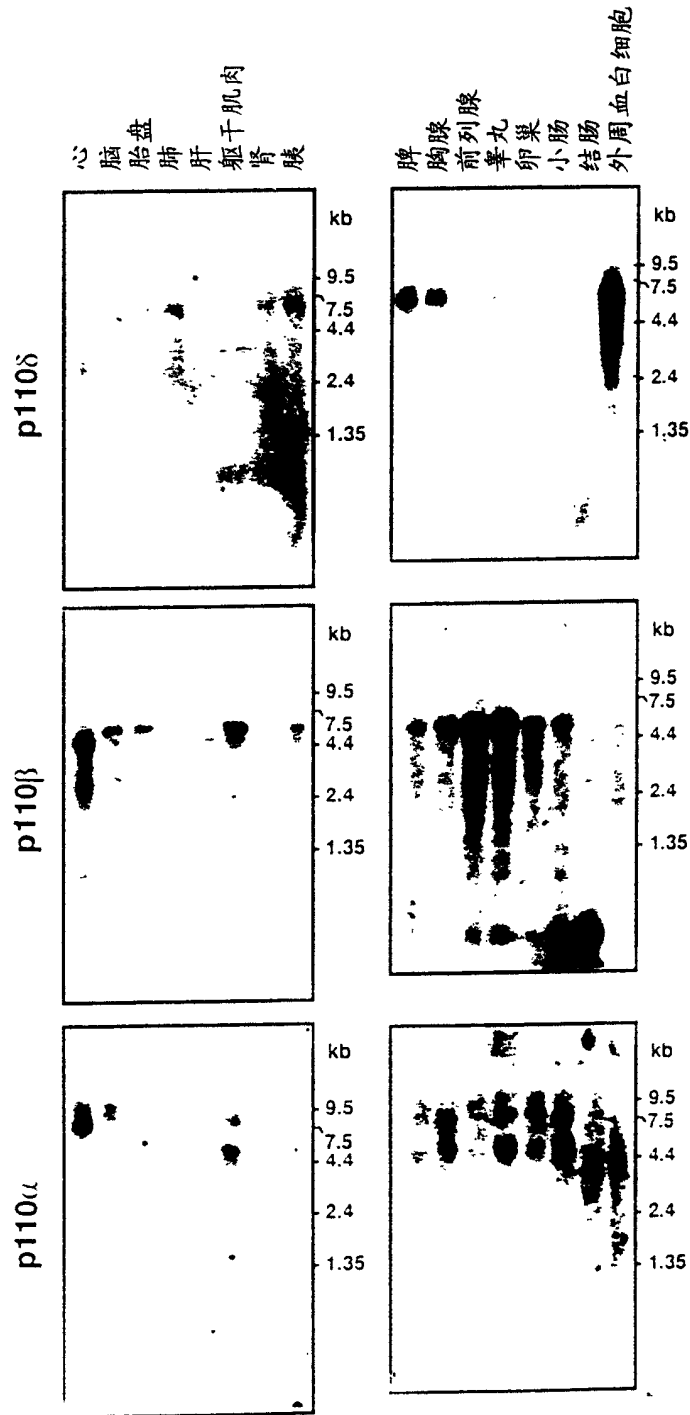


图 6

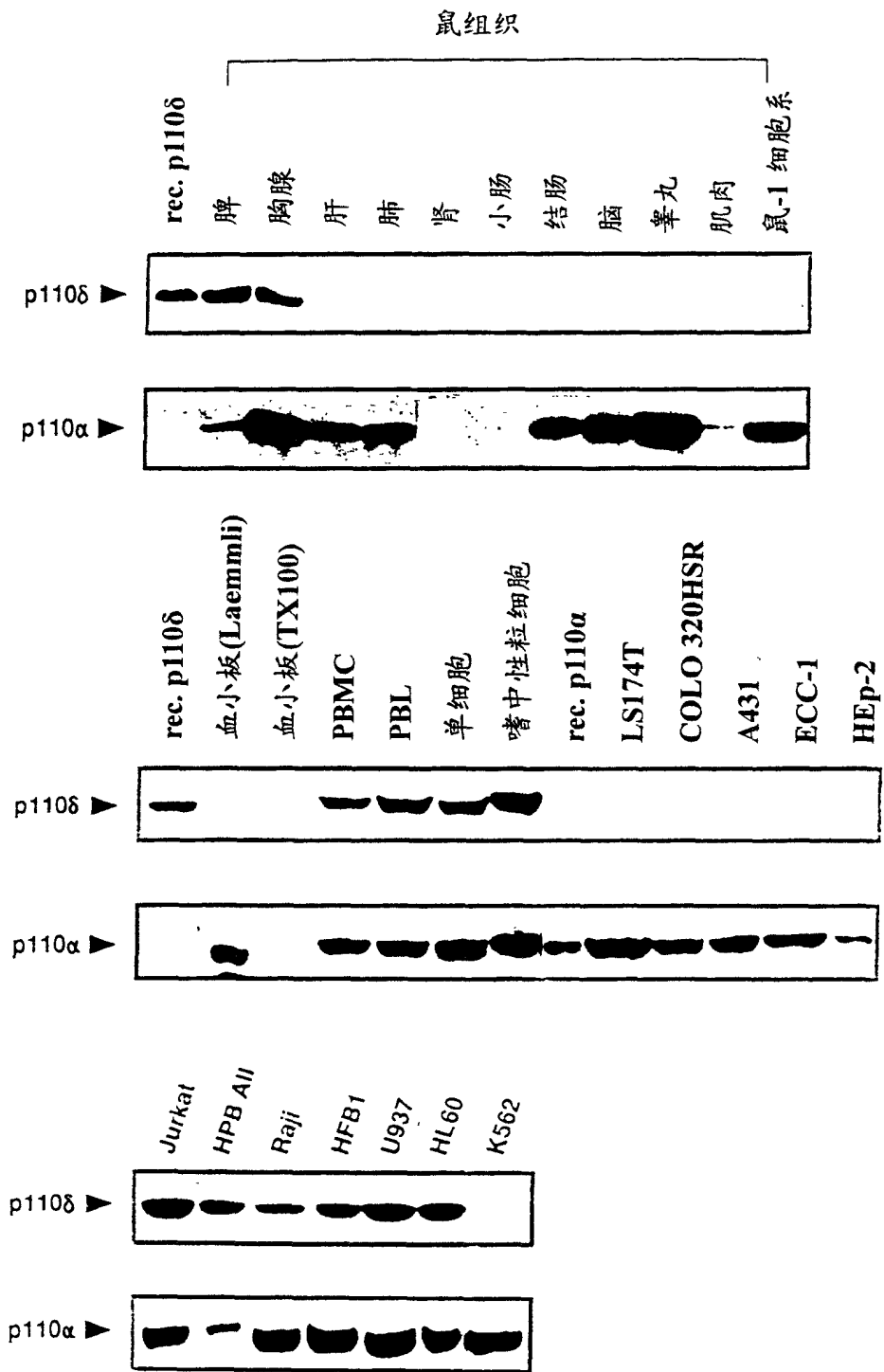
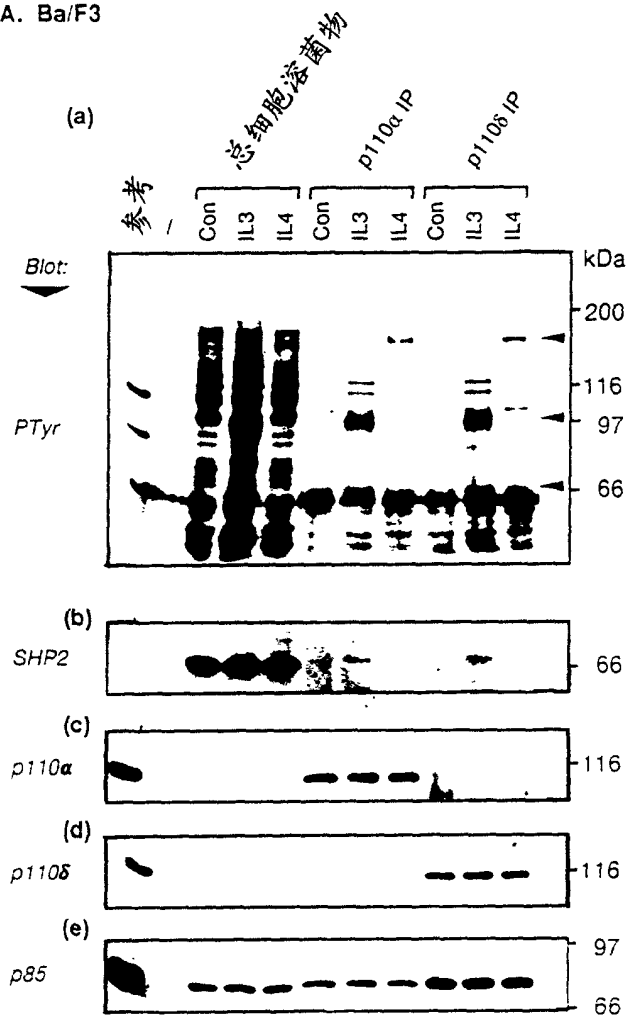


图 7

A. Ba/F3



B. MC/9

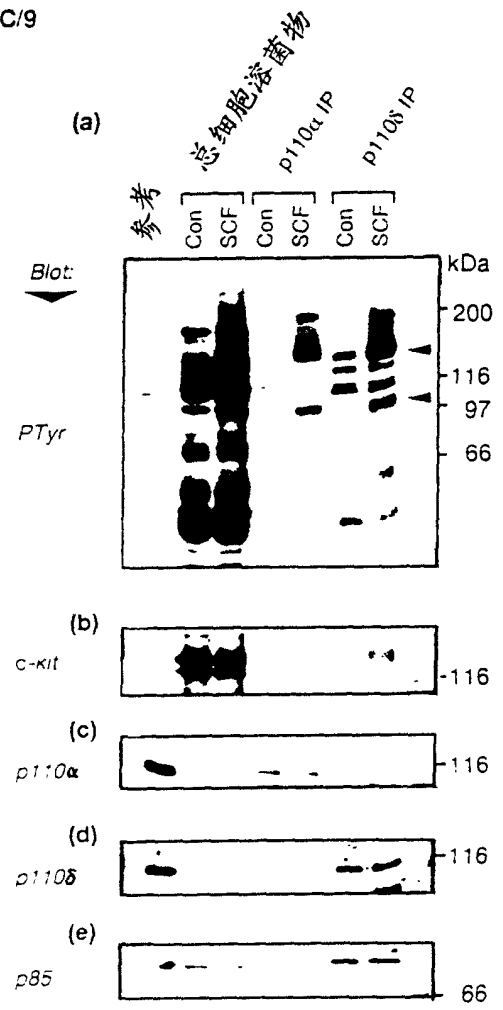


图 8

1 ATGCCCCCTG GGGTGGACTG CCCCATGGAA TTCTGGACCA AGGAGGAGAA
51 TCAGAGCGTT GTGGTTGACT TCCTGCTGCC CACAGGGGTC TACCTGAACT
101 TCCCTGTGTC CCGCAATGCC AACCTCAGCA CCATCAAGCA GCTGCTGTGG
151 CACCGCGCCC AGTATGAGCC GCTCTTCCAC ATGCTCAGTG GCCCCGAGGC
201 CTATGTGTTT ACCTGCATCA ACCAGACAGC GGAGCAGCAA GAGCTGGAGG
251 ACGAGCAACG GCGTCTGTGT GACGTGCAGC CCTTCCTGCC CGTCCTGCGC
301 CTGGTGGCCC GTGAGGGCGA CCGCGTGAAG AAGCTCATCA ACTCACAGAT
351 CAGCCTCCTC ATCGGCAAAG GCCTCCACGA GTTTGACTCC TTGTGCGACC
401 CAGAAGTGAA CGACTTTCGC GCCAAGATGT GCCAATTCTG CGAGGAGGCG
451 GCCGCCC GCCAGCAGCT GGGCTGGGAG GCCTGGCTGC AGTACAGTTT
501 CCCCCTGCAG CTGGAGCCCT CGGCTCAAAC CTGGGGGCCT GGTACCCTGC
551 GGCTCCCGAA CCGGGCCCTT CTGGTCAACG TTAAGTTTGA GGGCAGCGAG
601 GAGAGCTTCA CCTTCCAGGI GTCCACCAAG GACGTGCCGC TGGCGCTGAT
651 GGCTGTGCC CTGCGGAAGA AGGCCACAGT GTTCCGGCAG CCGCTGGTGG
701 AGCAGCCGGA AGACTACACE CTGCAGGTGA ACGGCAGGCA TGAGTACCTG
751 TATGGCAGCT ACCCGCTCTG CCAGTTCAG TACATCTGCA GCTGCCTGCA
801 CAGTGGGTTG ACCCCTCACC TGACCATGGT CCATTCCTCC ICCATCCTCG
851 CCAIGCGGGA TGAGCAGAGC AACCTGCCC CCCAGGTCCA GAAACCGCGT
901 GCCAAACCAC CTCCCATTCC TGCGAAGAAG CCTTCCTCTG TGTCCCTGTG
951 GTCCCTGGAG CAGCCGTTCC GCATCGAGCT CATCCAGGGC AGCAAAGTGA
1001 ACGCCGACGA GCGGATGAAG CTGGTGGTGC AGGCCGGGCT TTTCCACGGC
1051 AACGAGATGC TGTGCAAGAC GGTGTCCAGC TCGGAGGTGA GCGTGTGCTC
1101 GGAGCCCGTG TGGAAGCAGC GGCTGGAGTT CGACATCAAC ATCTGCGACC
1151 TGCCCCGCAT GGCCCGTCTC TGCTTTGCGC TGTACGCCGT GATCGAGAAA
1201 GCCAAGAAGG CTCGCTCCAC CAAGAAGAAG ICCAAGAAGG CGGACTGCCC
1251 CATTGCCTGG GCCAACCTCA TGCTGTTTGA CTACAAGGAC CAGCTTAAGA
1301 CCGGGGAACG CTGCCTCTAC ATGTGGCCCT CCGTCCCAGA TGAGAAGGGC
1351 GAGCTGCTGA ACCCCACGGG CACTGTGCGC AGTAACCCCA ACACGGATAG
1401 CGCCGCTGCC CTGCTCATCT GCCTGCCCGA GGTGGCCCCG CACCCCGTGT
1451 ACTACCCCGC CCTGGAGAAG ATCTTGAGC TGGGGCGACA CAGCGAGTGT

图 9A

1501 GTGCATGTCA CCGAGGAGGA GCAGCTGCAG CTGCGGGAAA TCCTGGAGCG
 1551 GCGGGGGTCT GGGGAGCTGT ATGAGCACGA GAAGGACCTG GTGTGGAAGC
 1601 TGCGGCATGA AGTCCAGGAG CACTTCCCCG AGGCGCTAGC CCGGCTGCTG
 1651 CTGGTCACCA AGTGAACAA GCATGAGGAT GTGGCCCAGA TGCTCTACCT
 1701 GCTGTGCTCC TGGCCGGAGC TGCCCGTCCT GAGCGCCCTG GAGCTGCTAG
 1751 ACTTCAGCTT CCCCATTGC CACGTAGGCT CCTTCGCCAT CAAGTCGCTG
 1801 CGGAAACTGA CGGACGATGA GCTGTTCCAG TACCTGCTGC AGCTGGTGCA
 1851 GGTGCTCAAG TACGAGTCCT ACCTGGACTG CGAGCTGACC AAATTCCTGC
 1901 TGGACCGGGC CCTGGCCAAC CGCAAGATCG GCCACTTCCT TTTCTGGCAC
 1951 CTCCGCTCCG AGATGCACGT GCCGTCGGTG GCCCTGCGCT TCGGCCTCAT
 2001 CCTGGAGGCC TACTGCAGGG GCAGGACCCA CCACATGAAG GTGCTGATGA
 2051 AGCAGGGGGA AGCACTGAGC AAAGTGAAG CCCTGAATGA CTTCGTCAAG
 2101 CTGAGCTCTC AGAAGACCCC CAAGCCCCAG ACCAAGGAGC TGATGCACTT
 2151 GTGCATGCGG CAGGAGGCCT ACCTAGAGGC CCTCTCCCAC CTGCAGTCCC
 2201 CACTCGACCC CAGCACCCCTG CTGGCTGAAG TCTGCGTGGA GCAGTGCACC
 2251 TTCATGGACT CCAAGATGAA GCCCCTGTGG ATCATGTACA GCAACGAGGA
 2301 GGCAGGCAGC GGCAGGCAGC TGGGCATCAT CTTTAAGAAC GGGGATGACC
 2351 TCCGGCAGGA CATGCTGACC CTGCAGATGA TCCAGCTCAT GGACGTCCTG
 2401 TGGAAGCAGG AGGGGCTGGA CCTGAGGATG ACCCCCTATG GCTGCCTCCC
 2451 CACCGGGGAC CGCACAGGCC TCATTGAGGT GGTACTCCGT TCAGACACCA
 2501 TCGCCAACAT CCAACTCAAC AAGAGCAACA TGGCAGCCAC AGCCGCTTC
 2551 AACAAAGGATG CCTGCTCAA CTGGCTGAAG TCCAAGAACC CGGGGGAGGC
 2601 CCTGGATCGA GCCATTGAGG AGTTCACCCCT CTCCTGTGCT GGCTATTGTG
 2651 TGGCCACATA TGTGCTGGGC ATTGGCGATC GGCACAGCGA CAACATCATG
 2701 ATCCGAGAGA GTGGGCAGCT GTTCCACATT GATTTTGGCC ACTTTCTGGG
 2751 GAATTTCAAG ACCAAGTTTG GAATCAACCG CGAGCGTGTC CCATTCATCC
 2801 TCACCTACGA CTTTGTCCAT GTGATTCAGC AGGGGAAGAC TAATAATAGT
 2851 GAGAAATTTG AACGGTCCG GGGCTACTGT GAAAGGGCCT ACACCATCCT
 2901 GCGGCGCCAC GGGCTTCTCI TCCTCCACCI CTTTGCCCTG ATGCGGGCGG
 2951 CAGGCCITGCC TGAGCTCAGC TGCTCCAAAG ACATCCAGTA TCTCAAGGAC
 3001 TCCCIGGCAC TGGGGAAAAC AGAGGAGGAG GCACTGAAGC ACTTCCGAGT
 3051 GAAGTTTAAC GAAGCCCTCC GTGAGAGCTG GAAAACCAA GTGAACTGGC

图 9B

3101 TGGCCCACAA CGTGTCCAAA GACAACAGGC AGTAGTGGCT CCTCCCAGCC
3151 CTGGGCCCAA GAGGAGGCGG CTGCGGGTCG TGGGGACCAA GCACATTGGT
3201 CCTAAAGGGG CTGAAGAGCC TGAACTGCAC CTAACGGGAA AGAACCGACA
3251 TGGCTGCCTT TTGTTTACAC TGGTTATTTA TTTATGACTT GAAATAGTTT
3301 AAGGAGCTAA ACAGCCATAA ACGGAACGC CTCCTTCATG CAGCGGCGGT
3351 GCTGGGCCCC CCGAGGCTGC ACCTGGCTCT CGGCTGA

图 9C

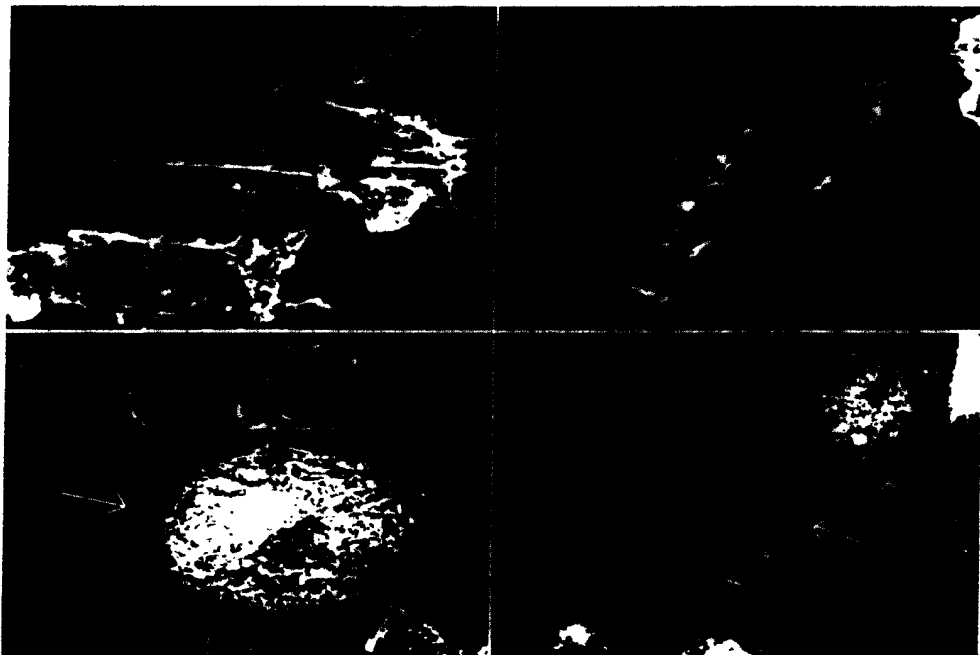


图 10