

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480036865.8

[51] Int. Cl.

A61K 31/4985 (2006.01)

A61K 31/505 (2006.01)

A61K 31/475 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

[43] 公开日 2007年1月17日

[11] 公开号 CN 1897951A

[51] Int. Cl. (续)

C07K 7/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

[22] 申请日 2004.12.10

[21] 申请号 200480036865.8

[30] 优先权

[32] 2003.12.11 [33] IT [31] RM2003A000572

[86] 国际申请 PCT/IT2004/000689 2004.12.10

[87] 国际公布 WO2005/056043 英 2005.6.23

[85] 进入国家阶段日期 2006.6.12

[71] 申请人 马西莫·佐洛

地址 意大利那不勒斯

[72] 发明人 马西莫·佐洛

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 范征

权利要求书5页 说明书44页 序列表4页

PCT/RO/134 表2页 附图19页

[54] 发明名称

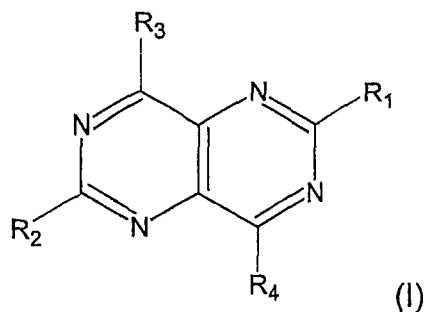
h-PRUNE 的酶抑制剂在过度表达 h-PRUNE 的肿瘤转移的预防和治疗中的应用

[57] 摘要

本发明涉及 h-PRUNE 的酶抑制剂的应用、用于过度表达 h-PRUNE 的肿瘤转移的预防 and 治疗的抑制剂的筛选方法和用于检测预后所述转移的诊断试剂盒。

1. h-PRUNE环核苷酸磷酸二酯酶活性抑制剂在制备用于预防和治疗以h-PRUNE过度表达为特征的肿瘤转移的药物中的应用。

2. 如权利要求1所述的应用,其特征在于, h-PRUNE环核苷酸磷酸二酯酶活性抑制剂具有通式(I):



其中, R₁和R₂相同或不同, 可以选自氨基醇、氨基烷基、胆固醇;
R₃和R₄相同或不同, 可以选自杂环芳环或芳环。

3. 如权利要求2所述的应用, 其特征在于, 所述杂环芳环可以选自吡唑、吡咯、咪唑、吡啶、嘧啶、吗啉。

4. 如权利要求2或3所述的应用, 其特征在于, R₁和/或R₂为二乙醇胺。

5. 如权利要求2~4中任一项所述的应用, 其特征在于, R₃和/或R₄为嘧啶。

6. 如权利要求2~5中任一项所述的应用, 其特征在于, 所述抑制剂为双嘧达莫。

7. 如权利要求1所述的应用, 其特征在于, h-PRUNE环核苷酸磷酸二酯酶活性抑制剂选自长春西汀、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、IC261及它们的衍生物、结构类似物和异构体。

8. 如权利要求1所述的应用, 其特征在于, h-PRUNE环核苷酸磷酸二酯酶活性抑制剂为包含下述氨基酸序列的肽: NIIHGSOSVESAEKE (SEQ ID No 9)。

9. 如权利要求1所述的应用, 其特征在于, h-PRUNE环核苷酸磷酸二酯酶活性抑制剂为包含下述氨基酸序列的肽: NIIHGSOSVESAEKE GGGYGRKKRRORRR (SEQ ID No 10); 且其特征在于, 它是可渗透的。

10. 如权利要求1~9中任一项所述的应用, 其特征在于, 以h-PRUNE过度表达为特征的肿瘤为乳腺癌、肉瘤、神经母细胞瘤、前列腺肿瘤、胰腺肿瘤、结肠肿瘤、

直肠肿瘤、成神经管细胞瘤、上皮瘤、肝癌、T细胞或B细胞淋巴瘤、骨髓瘤和黑色素瘤、以及肺部肿瘤。

11. 包含下述氨基酸序列的肽：

NIIHGSOSVESAEKE (SEQ ID No 9)。

12. 包含以下氨基酸序列的肽：

NIIHGSOSVESAEKEGGGYGRKKRRQRRR (SEQ ID No 10)，其特征在于它是可渗透的。

13. h-PRUNE抑制性化合物的筛选方法，它包括下述步骤：

a) 选择至少一种磷酸酯酶(PDE)抑制性化合物或者它们的衍生物、结构类似物或异构体；

b) 将所述至少一种化合物以 $0.05 \mu\text{M} \sim 10 \mu\text{M}$ 的浓度加入过度表达h-PRUNE的细胞系中；

c) 相对于所述至少一种化合物和化学引诱剂的浓度，定量分析h-PRUNE的环核苷酸磷酸二酯酶活性和/或分析细胞运动性，选择可以抑制所述磷酸二酯酶活性值到 $0.01 \sim 1 \text{pmol}/\text{min}^{-1}/\text{ug}^{-1}$ 和/或抑制所述运动性值到200~1200细胞的化合物。

14. 如权利要求13所述的方法，其特征在于，所述细胞系为MDA-C100 435 prune#4。

15. 如权利要求13或14所述的方法，其特征在于，定量分析通过c-AMP和/或c-GMP底物的水解试验进行。

16. 如权利要求15所述的方法，其特征在于，所述底物在 $0.008 \mu\text{M} \sim 1 \mu\text{M}$ 的浓度下使用。

17. 通过免疫测定、FISH分析、实时PCR、原位杂交检测生物样本中的h-PRUNE从而做出以h-PRUNE过度表达为特征的肿瘤的转移诊断的方法。

18. 如权利要求17所述的方法，方法包括以下步骤：

a) 用至少一种抗h-PRUNE抗体接触所述生物样本；

b) 检测抗原-抗体复合物；

c) 定量分析抗原-抗体复合物。

19. 如权利要求18所述的方法，其特征在于，所述生物样本为组织切片或生物液体。

20. 如权利要求17~19中任一项所述的方法，其特征在于，所述抗h-PRUNE抗体为单克隆或多克隆抗体。

21. 如权利要求17~20中任一项所述的方法，其特征在于，所述抗h-PRUNE抗

体通过放射性同位素、荧光分子或酶进行了标记。

22. 如权利要求18所述的方法，其特征在于，所述抗原-抗体复合物的检测和定量分析通过免疫组织化学、免疫沉淀、免疫荧光、ELISA、免疫印迹分析进行。

23. 如权利要求17所述的方法，其特征在于，实时PCR的h-PRUNE特异性引物包括以下序列：

5'-AGAGATCTTGGACAGGCAAAC-3'(SEQ ID No 1)；

3'-CCATGTTGACACAGTCCAGGAT-5'(SEQ ID No 2)；

或者它们的互补序列。

24. 如权利要求17所述的方法，其特征在于，用于实时PCR或原位杂交的标记探针包含下述寡核苷酸序列：

CTGCATGGAACCATC(SEQ ID No 3)

或它的互补序列，或者其中T由U代替的序列。

25. 如权利要求24所述的方法，其特征在于，用于实时PCR的所述标记探针为线性或环状的序列。

26. 如权利要求24或25所述的方法，其特征在于，所述探针通过至少一种放射性同位素和/或荧光染料标记。

27. 如权利要求24~26中任一项所述的方法，其特征在于，所述探针用至少一种荧光染料在5'和/或3'进行了标记。

28. 如权利要求24或25所述的方法，其特征在于，所述荧光染料为6-羧基荧光素。

29. 用于检测生物样本中的h-PRUNE来诊断以h-PRUNE过度表达为特征的肿瘤转移的诊断试剂盒，它包含至少一种抗h-PRUNE抗体、一对h-PRUNE特异性的引物或h-PRUNE特异性的标记的寡核苷酸探针。

30. 如权利要求29所述的诊断试剂盒，其特征在于，以h-PRUNE过度表达为特征的肿瘤为乳腺癌、肉瘤、神经母细胞瘤、黑色素瘤。

31. 如权利要求29或30所述的诊断试剂盒，其特征在于，所述抗h-PRUNE抗体为单克隆或多克隆抗体。

32. 如权利要求31所述的诊断试剂盒，其特征在于，抗h-PRUNE抗体通过放射性同位素、荧光分子或酶进行了标记。

33. 如权利要求29所述的诊断试剂盒，其特征在于，所述一对h-PRUNE特异性的引物包含序列：

5'-AGAGATCTTGGACAGGCAAACCT-3'(SEQ ID No 1);

3'-CCATGTTGACACAGTCCAGGAT-5'(SEQ ID No 2);

或者它们的互补序列。

34. 如权利要求29所述的诊断试剂盒, 其特征在于, 用于实时PCR或原位杂交的所述标记了的寡核苷酸探针包含寡核苷酸序列:

CTGCATGGAACCATC(SEQ ID No 3)

或它的互补序列, 或者其中T由U代替的序列。

35. 如权利要求34所述的诊断试剂盒, 其特征在于, 用于实时PCR的所述标记寡核苷酸的探针为线性或环状的序列。

36. 如权利要求34或35所述的诊断试剂盒, 其特征在于, 所述寡核苷酸探针通过至少一种放射性同位素和/或荧光染料标记。

37. 如权利要求34~36中任一项所述的诊断试剂盒, 其特征在于, 所述探针用至少一种荧光染料在5'和/或3'进行了标记。

38. 如权利要求37所述的诊断试剂盒, 其特征在于, 所述荧光染料为6-羧基荧光素。

39. 可以识别并选择性地结合h-PRUNE重组蛋白的单克隆鼠抗体, 其特征在于, 它属于IgM免疫球蛋白类, 由4G3/4克隆(于10/12/2004保藏在热那亚的CBA)产生。

40. h-PRUNE的兔多克隆抗体, 其特征在于, 用于免疫识别和选择性结合的肽含有以下氨基酸序列或其部分:

NH₂-Ala-Leu-Glu-Glu-Ala-Val-Ala-Glu-Val-Leu-Asp-His-Arg-Pro-Ile-Glu-Pro-Lys-COOH(SEQ ID No 4)。

41. 用于通过实时PCR的h-PRUNE扩增的特异性引物, 它包含至少一种以下的寡核苷酸序列:

5'-AGAGATCTTGGACAGGCAAACCT-3'(SEQ ID No 1);

3'-CCATGTTGACACAGTCCAGGAT-5'(SEQ ID No 2);

或者它们的互补序列。

42. 用于实时PCR或原位杂交的h-PRUNE特异性寡核苷酸探针, 它包含序列:

CTGCATGGAACCATC(SEQ ID No 3)

或它的互补序列, 或者其中T由U代替的序列。

43. 如权利要求42所述的寡核苷酸探针, 其特征在于, 所述探针为线性或环状的序列。

44. 如权利要求42或43所述的寡核苷酸探针, 其特征在于, 所述探针通过至少一种放射性同位素和/或荧光染料标记。

45. 如权利要求42~44中任一项所述的寡核苷酸探针, 其特征在于, 所述探针用至少一种荧光染料在5'和/或3'端进行标记。

46. 如权利要求45所述的寡核苷酸探针, 其特征在于, 所述荧光染料为6-羧基荧光素。

h-PRUNE的酶抑制剂在过度表达h-PRUNE的肿瘤转移的预防和治疗中的应用

本发明涉及h-PRUNE的酶抑制剂在过度表达h-PRUNE的肿瘤转移的预防和治疗中的应用、所述抑制剂的筛选方法和用于检测该转移的诊断试剂盒。

本发明更具体涉及h-PRUNE的酶抑制剂在乳房肿瘤、肉瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤的转移的预防和治疗中的应用和所述抑制剂的筛选方法。本发明还涉及所述肿瘤转移的诊断试剂盒。

人PRUNE (h-PRUNE) 蛋白属于DHH超家族，该家族包括一些磷酸酯酶，例如来自细菌的核RecJ和来自酵母与细菌的焦磷酸酶(Aravind等，1998)。

DHH超家族可以根据C末端基序分为两个主要的类别，该基序在各类别中是非常保守的，但不跨越各种类别。所有该超家族的成员都具有另外四个含有高保守电荷的氨基酸残基的基序，这些残基预期形成离子键和催化磷酸酯化反应。它们的主要特征是第三基序，即DHH(Asp-His-His)，该超家族以此被命名。

RecJ蛋白是DNA修复蛋白，它与其它核酸酶和缺乏特征的细菌蛋白同属于第一类；而PRUNE和聚磷酸酶属于第二类。

来自果蝇的PRUNE基因最初在其突变表型的基础上鉴定的，该突变表型由于果蝇蝶呤的减少而呈现紫褐色眼，与亮红眼的野生型果蝇不同(Timmons等，1996)。虽然纯合PRUNE突变体存活和生育，但在至少一个突变拷贝的存在下，它们被不断产生的假黑素瘤致死，突变拷贝干扰将产生翅的成虫盘的正确形成(awd/K-pn；也称作PRUNE杀手(Killer of PRUNE))。

人类编码多达8个awd基因(nm23)的直向同源基因，其中至少4个编码活性核苷二磷酸激酶(NDKPs)，该酶催化磷酸基从核苷三磷酸转移到核苷二磷酸(Lombardi等，2000)。

一些肿瘤和高度增殖性细胞过度表达nm23-H1 mRNA及其蛋白，大多数情况下该过度表达会导致早期的癌症。乳腺癌是一种复杂的疾病，由于其生物异质性和对治疗的广泛响应性，难以进行临床治疗(Keen等，2003)。对肿瘤发生的分子机理的进一步认识实现了对越来越多的生物标记的鉴别，这些生物标记已与病理进展的不同阶段的各种癌症预后相关，从而能够选择最合适的治疗处理(Keen等，Domchek

等, 2002)。

在目前用于原发性乳腺癌的良好确立的预后因素中, 有淋巴结受累、组织学检查、肿瘤大小、雌激素和孕酮受体状态、增殖指数、核或组织学级别(Kuru等, 2003, Morabito等, 2003)。提供在后续的转化、侵袭和转移过程中所涉及的新的分子用作标记, 用于在肿瘤病理进展中后续阶段的预后。

在乳腺癌和黑色素瘤中, 人nm23-H1的高表达与降低的转移潜力有关(Florenes等, 1992)。对于特定的乳腺癌, 转移的扩散实质上是所有癌症死亡的原因。

成为侵袭性肿瘤细胞需要改变它们的粘附性质, 解除原发瘤中与其它细胞的连接, 与它们侵袭的组织的宿主细胞的细胞外基质建立新的连接。在此范围内, 肿瘤细胞周围蛋白酶活性的调节起重要作用。为了从原发瘤转移并离开移生次级器官的循环系统, 肿瘤细胞也需要获得运动功能。

目前, 已经分离并鉴定了一些转移抑制基因(Steege等, 2003)。其中, 已知在肿瘤乳腺细胞中nm23过度表达时引起细胞运动性的下降(Freijs等, 1997, Hartsough等, 2001, Freijs等, 1997), 影响非不依赖贴壁的移生, 引起分化(Kantor等, 1993; Leone等, 1993; Howlett等, 1994; Hartsough等, 1998, Lombardi等, 2000)。此外, 已证明nm23-H1在侵袭性乳腺癌细胞系克隆MDA-C100中的过度表达在体内和体外显著地减少其转移表型(Hartsough等, 2000, Mao等, 2001, Tseng等, 2001)。

本发明人在以前的研究中证实了h-PRUNE与nm23-H1间的相互作用和通过nm23H1-S120G突变对该相互作用的破坏(Reymond等, 1999)。还发现h-PRUNE的一些拷贝的扩增引起细胞增殖的诱导, 与中度或低的nm23-H1水平相比, 高水平的h-PRUNE表达与增加的肉瘤和乳腺癌的侵袭性相关(Forus等, 2001)。

因此, 显然需要提供适合抑制h-PRUNE的酶活性的化合物, 有利地用于以h-PRUNE的过度表达为特征的肿瘤及其转移的治疗和预防。

目前, 本发明人鉴别了h-PRUNE的一种新的、特别是与乳腺癌的转移相关的酶活性, 而且该活性容易受到治疗性酶抑制。实际上, 本发明人目前已经发现, h-PRUNE具有环核苷酸磷酸二酯酶活性, 并有将cAMP优先于cGMP作为底物的亲和力, 这可以被一些磷酸二酯酶抑制剂有效地抑制。

此外, 通过本发明人进行的研究发现, 在一些组织中, 随着转移肿瘤中nm-23表达的减少, 同时h-PRUNE被过度表达。还发现, 在一个乳腺肿瘤模型中, 由于与

nm23H1的物理性的蛋白质-蛋白质相互作用，增加的cAMP-PDE h-PRUNE的活性与细胞运动性直接相关。该发现表明，h-PRUNE与nm23-H1间的相互作用导致nm23-H1在细胞增殖和抑制肿瘤转移过程中的保护功能的修饰。

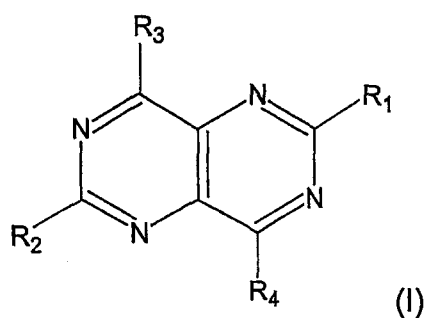
根据本发明的进一步研究，通过研究一组乳腺癌患者中h-PRUNE蛋白与nm23-H1的表达分布，评价了h-PRUNE作为乳腺癌临床进展的预后的潜在独立标记可能起到的作用。特别是，h-PRUNE表达在各种分析的临床病例中均一分布，可以有利地将该蛋白用作预后标记，并独立于其它的因素，例如肿瘤类型、组织学大小、雌激素和孕酮受体活性、淋巴结受累。新标记的鉴定可用于鉴定具有转移潜力的肿瘤，根据选择的目标疗法，使对乳腺癌患者的治疗更有效。

在通过用于评价hPRUNE环核苷酸磷酸二酯酶活性的抑制的适当的筛选方法测试了的磷酸二酯酶(PDE)抑制剂中，发现在体外和乳腺细胞模型中，根据IC₅₀双嘧达莫都具有最高的对hPRUNE活性的抑制能力，它是一种已知的具有抗凝剂特性的药物。另外，长春西汀和3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)在筛选中也表现出对hPRUNE抑制期望的IC₅₀值；来自该选择的数据表明，可筛选上述三种化合物的结构类似物、衍生物和异构体。

最后，大量转移性乳腺肿瘤的体内分析证实，增加的hPRUNE蛋白水平与nm23-H1表达的负调节间存在直接的关联，如临床跟踪研究所报道，它导致远距离转移的形成。

因此，本发明的目的之一是h-PRUNE环核苷酸磷酸二酯酶活性的抑制剂在制备用于以h-PRUNE过度表达为特征的肿瘤转移的预防和治疗中的药物中的应用，这样的肿瘤有例如乳腺癌、肉瘤、神经母细胞瘤、前列腺肿瘤、胰腺肿瘤、结肠肿瘤、直肠肿瘤、神经管母细胞瘤、上皮瘤、肝癌(epatocarcinoma)、T细胞或B细胞淋巴瘤、骨髓瘤和黑色素瘤。

本发明具体涉及具有以下通式(I)的h-PRUNE环核苷酸磷酸二酯酶活性的抑制剂：



其中, R_1 和 R_2 相同或不同, 可以选自氨基醇、氨基烷基、胆固醇;

R_3 和 R_4 相同或不同, 可以选自杂环芳环或芳环。优选地, 杂环芳环可选自吡唑、吡咯、咪唑、吡啶、嘧啶、吗啉。在本发明优选的实施方式中, R_1 和/或 R_2 为二乙醇胺, R_3 和/或 R_4 为嘧啶。

在本发明更优选的实施方式中, R_1 和 R_2 为二乙醇胺, R_3 和 R_4 为嘧啶, 抑制剂为双嘧达莫。

本发明还涉及h-PRUNE环核苷酸磷酸二酯酶活性的抑制剂的应用, 所述抑制剂选自长春西汀、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、IC261及它们的衍生物、结构类似物和异构体。

本发明的目的还在于包含下述氨基酸序列: NIIHGSDSVESAEKE (SEQ ID No 9) 的肽作为h-PRUNE环核苷酸磷酸二酯酶活性的抑制剂的应用。在特别优选的实施方式中, 所述肽还在前述氨基酸序列的下游包含另一个易于渗透的肽, 而且具有序列GGGYGRKKRRQRRR。因此, 该肽的特征在于, 它是可渗透的, 包括下述序列NIIHGSDSVESAEKEGGGYGRKKRRQRRR (SEQ ID No 10)。

本发明的目的还在于包含下述氨基酸序列NIIHGSDSVESAEKE (SEQ ID No 9) 的肽, 在特定的实施方式中, 该肽包含下述氨基酸序列NIIHGSDSVESAEKEGGGYGRKKRRQRRR (SEQ ID No 10); 其特征在于, 由于序列GGGYGRKKRRQRRR而, 它是可渗透的。

本发明的目的还在于包括以下步骤的h-PRUNE抑制性化合物的筛选方法:

- 选择至少一种磷酸二酯酶 (PDE) 抑制性化合物或者它们的衍生物、结构类似物或异构体;
- 将所述至少一种化合物以 $0.05 \mu\text{M} \sim 10 \mu\text{M}$ 的浓度加入一个h-PRUNE过度表达的细胞系中;
- 相对于所述至少一种化合物和化学引诱剂的浓度, 定量分析h-PRUNE的环核苷酸磷酸二酯酶活性和/或细胞运动性, 选择可以抑制所述磷酸二酯酶活性值到 $0.01 \sim 1 \text{pmol}/\text{min}^{-1}/\mu\text{g}^{-1}$ 和/或抑制所述运动性值达 $200 \sim 1200$ 细胞的化合物。

作为所述活性的抑制剂进行测试的化合物对h-PRUNE的环核苷酸磷酸二酯酶活性的抑制可以通过对前述化合物评价 IC_{50} 来确定。

该过度表达h-PRUNE的细胞系为MDA-C100 435 prune#4 (于10/12/2004保藏在热那亚的CBA)。

h-PRUNE的环核苷酸磷酸二酯酶活性的定量分析可以通过c-AMP和/或c-GMP底物的水解试验进行。所述底物在 $0.008 \mu\text{M} \sim 1 \mu\text{M}$ 的浓度下使用。

本发明的目的还在于制备药物组合物的方法，其中包括如上所述的方法以及附加的步骤d)：将至少一种经鉴定的化合物或者它们的衍生物、结构类似物或异构体与一种或多种佐剂和/或药理学上可接受的赋形剂混合。

另外，本发明适合根据上述方法选择h-PRUNE抑制性化合物用于制备以h-PRUNE过度表达为特征的肿瘤转移的预防和治疗药物，所述肿瘤可以是乳腺癌、肉瘤、神经母细胞瘤和黑色素瘤。

本发明的目的还在于用于通过免疫测定、FISH分析、实时PCR、原位杂交检测生物样本中的h-PRUNE来诊断以h-PRUNE过度表达为特征的肿瘤转移的方法。具体来说，所述方法可以包括以下步骤：

- a) 可用放射性同位素、荧光分子或酶标记的至少一种单克隆或多克隆抗h-PRUNE抗体接触所述生物样本，例如组织切片或生物液体；
- b) 检测抗原-抗体复合物；
- c) 定量分析抗原-抗体复合物。

抗原-抗体复合物的检测和定量分析可以通过免疫组织化学法、免疫沉淀法、免疫荧光法、ELISA、免疫印迹分析来进行。

关于通过实时PCR检测生物样本中的h-PRUNE来诊断以h-PRUNE过度表达为特征的肿瘤的方法，特异性引物为：

5'-AGAGATCTTGGACAGGCAAAC-3' (SEQ ID No 1)；

3'-CCATGTTGACACAGTCCAGGAT-5' (SEQ ID No 2)；

或者它们的互补序列。

关于使用原位杂交检测生物样本中的h-PRUNE来诊断以h-PRUNE过度表达为特征的肿瘤转移的方法，标记探针可以包含以下寡核苷酸序列：

CTGCATGGAACCATC (SEQ ID No 3)

或它的互补序列，或者其中T由U代替的序列。

用于实时PCR的所述标记探针可以是线性或环状的序列 (TaqMan, 杂交探针, 分子信标)，标记可以用至少一种放射性同位素和/或荧光染料进行。使用至少一种荧光染料 (发射或激发型)、较好是6FAM (6-羧基荧光素) 的标记可以在探针寡核苷酸序列的3'和/或5'端进行。

本发明的目的还在于用于检测生物样本中的h-PRUNE来诊断以h-PRUNE过度表达为特征的肿瘤转移 (例如，乳腺癌、肉瘤、神经母细胞瘤、黑色素瘤、前列腺癌、直肠结肠癌) 的诊断试剂盒，它包含可以用例如放射性同位素、荧光分子或酶进行

标记的至少一种单克隆或多克隆抗h-PRUNE抗体。

诊断试剂盒可以选择性地包括一对h-PRUNE特异性引物，它可以包含序列：

5'-AGAGATCTTGGACAGGCAAAC-3'(SEQ ID No 1)；

3'-CCATGTTGACACAGTCCAGGAT-5'(SEQ ID No 2)；

或者它们的互补序列。

最后，试剂盒可以包括至少一种用于实时PCR或原位杂交的标记的寡核苷酸探针，探针可以包含寡核苷酸序列：

CTGCATGGAACCATC(SEQ ID No 3)

或它的互补序列，或者其中T由U代替的序列。

用于实时PCR的所述标记的探针可以是线性或环状的序列，标记可以用至少一种放射性同位素和/或荧光染料、较好是6FAM(6-羧基荧光素)进行，标记可以在探针的寡核苷酸序列的3'和/或5'端进行。

本发明的目的还在于可以识别并选择性地结合h-PRUNE重组蛋白的单克隆鼠抗体，其特征在于，它属于IgM免疫球蛋白类，由4G3/4克隆(于10/12/2004保藏在热那亚的CBA)产生。该克隆通过采用完整的h-PRUNE重组蛋白在NH₂端含有麦芽糖结合蛋白的融合构建物(pMAL5结构物)的小鼠的免疫接种得到。该蛋白通过麦芽糖亲和性柱色谱纯化，然后用每只100ug的纯化蛋白以5加强剂量注射入两只小鼠。

另外，本发明还适用于h-PRUNE(A59)兔多克隆抗体，其特征在于，它识别并选择性结合用于兔免疫接种的含有以下氨基酸序列或其部分的肽：

NH₂-Ala-Leu-Glu-Glu-Ala-Val-Ala-Glu-Val-Leu-Asp-His-Arg-Pro-Ile-Glu-Pro-Lys-COOH(SEQ ID No 4)。

本发明的目的还在于提供用于采用实时PCR的h-PRUNE扩增的特异性引物，它含有至少一种以下的寡核苷酸序列：

5'-AGAGATCTTGGACAGGCAAAC-3'(SEQ ID No 1)；

3'-CCATGTTGACACAGTCCAGGAT-5'(SEQ ID No 2)；

或者它们的互补序列。

最后，本发明还涉及用于实时PCR或原位杂交的h-PRUNE特异性寡核苷酸探针，它包含下述序列：

CTGCATGGAACCATC(SEQ ID No 3)

或它的互补序列，或者其中T由U代替的序列。

用于实时PCR的所述寡核苷酸探针可以是线性或环状的序列，可以用至少一种

放射性同位素和/或荧光染料、较好是6FAM(6-羧基荧光素)进行标记,所述标记可以在探针的寡核苷酸序列的3'和/或5'端进行。

以下,根据其优选的实施方式,具体参照附带的附图,通过示例对本发明进行描述,而并非限制。

图1表示DHH家族磷酸二酯酶序列的多重比对,分别表示四个通用基序(I-IV)和位于第二结构域的可鉴别两个不同的亚家族的基序;数字表示每个蛋白质序列中第一个对位的残基的位置和不同单元之间的距离(A幅),hPRUNE蛋白的“带”结构基于PPASE和RecJ蛋白(B幅)的晶体结构以及RecJ蛋白的“带”结构(C幅);箭头表示天冬氨酸残基(D)。

图2表示h-PRUNE对于底物cAMP和cGMP的PDE活性的鉴定(A幅)。h-PRUNE蛋白的潜在催化位点的单位点和多位点突变分析直方图(B幅)。分别以cAMP和cGMP作为底物确定 K_m 和 V_{max} 的Lineweaver-Burk图(C, D幅)。在增加的 Mg^{2+} 浓度,在两种不同缓冲液存在下测定的cAMP-PDE活性(E幅)。在增加的 Mg^{2+} (实心点)或 Mn^{2+} (空心点)浓度下测定的cAMP-PDE活性。表示h-PRUNE(实线)和h-PRUNE Δ (虚线)的活性的图(F幅)。

图3表示稳定克隆分析和体外运动性测定。通过实时PCR定量分析对h-PRUNE和nm23-H1基因的mRNA表达的检测;表示相关的 ΔCt 值(A幅)。通过实时PCR对mRNA表达的检测;报告了mRNA的拷贝数(B幅)。分别使用h-PRUNE、nm23-H1和His-tag特异性抗体(对于PDE5A)的蛋白质印迹分析,表明每个独立的细胞克隆中的蛋白质表达量(C幅)。分别过量表达单独的h-PRUNE(克隆#3和#4)或者h-PRUNE及nm23-H1(克隆#7和#8)的MDA C-100(对照)、MDA H1-177、MDA-PRUNE和MDA-H1-177-PRUNE细胞系的细胞运动性(D幅)。MDA C-100(对照)、MDA-PRUNE(克隆#3和#4)、MDA-PRUNE Δ (克隆#10和#11)、MDA-PRUNE4D Δ (克隆#19和#20)、MDA-PDE5A(克隆#14和#16)和MDA-H1-177细胞系的细胞运动性(E幅)。单独过量表达nm23-H1突变体或者与h-PRUNE同时过度表达的MDA C-100(对照)、MDA-nm23H1-S120G、MDA-nm23H1-S120G-PRUNE(克隆#2和#3)、MDA-nm23H1-P96S、MDA-nm23H1-P96S-PRUNE(克隆#4和#5)细胞系的细胞运动性(幅F)。

图4表示体外和体内的h-PRUNE PDE活性分析;nm23蛋白存在下的h-PRUNE和h-PRUNE Δ 的cAMP-PDE活性(A幅)。B幅表中,报告了对于总蛋白质细胞溶解产物以 $pmol \times min^{-1} \times \mu g^{-1}$ 测定的h-PRUNE PDE活性的值。

图5表示对PDE的抑制活性和MDA C-100(对照)、MDA-PRUNE(克隆#3和#4)和MDA-PRUNE Δ (克隆#10和#11)细胞系的运动性分析的活动性直方图(A幅)。在B幅表

中，以 IC_{50} 的值报告了8种经测试的抑制剂对不同的PDE抑制活性；最后一栏表示了一些最敏感的化合物的h-PRUNE的 IC_{50} 值。

图6表示乳腺肿瘤相关转移的体外分析；基于MTA(多组织阵列(multiple tissue array))的FISH分析显示h-PRUNE(左)和nm23-H1(右)的扩增(A幅)。两组h-PRUNE高表达(+++)肿瘤(左)与中低(0/+)nm23-H1表达水平(右)比较的免疫组织化学分析(IHC)的100倍和200倍放大图(B, C幅)；对59个TNM_I乳腺癌病例的FISH和IHC分析的结果的表格(D幅)。

图7为表示乳腺癌中h-PRUNE促转移功能的模型。

图8表示比较正常组织和肿瘤乳腺组织的FISH和免疫组织化学分析；A幅中，表示可以区别正常组织和肿瘤组织中(左)和非转移性肿瘤组织(右)中的h-PRUNE拷贝数的基于MTA的FISH分析；B幅中，表示对两组低h-PRUNE表达(+)肿瘤进行的免疫组织化学分析的放大图。

图9表示乳腺癌中h-PRUNE的表达和细胞遗传学分析。A幅中，表示在TMA切片中进行的h-PRUNE表达的免疫组织化学分析和阳性(a)及阴性(b)的h-PRUNE免疫染色的40倍放大图。B幅中，报告了采用h-PRUNE/PAC279-h19作为探针、pUC177为对照的对相同样品的FISH分析。

图10表示对h-PRUNE和nm23-H1的表达的Kaplan-Meier存活分析。对所有的乳腺癌病例进行nm23-H1(A)和h-PRUNE(B)的免疫染色；存在(C)或不存在(D)腋窝淋巴结受累的情况下h-PRUNE阳性的乳腺癌。

图11, A表示杆状病毒产生的h-PRUNE蛋白和酪蛋白激酶 δ 磷酸化及未磷酸化的nm23H1的体外免疫沉淀，在S120-125区域内产生了一些单个的突变，以使通过体外免疫沉淀显示复合物的形成。使用在杆状病毒中存在于合成的重组蛋白质的NH₂末端的抗HIS抗体，通过蛋白质印迹可以看到这些蛋白质。泳道1和2显示作为对照的重组蛋白质。用A-59抗h-PRUNE多克隆抗体进行免疫沉淀，用抗His tag(prune/nm23)多克隆抗体通过蛋白质印迹进行检测；图11B表示蛋白质序列和蛋白质的MALDI-MS，磷酸化阳性的丝氨酸用粗体表示；图11C使用pcDNA-HA-nm23H2构建物和抗HA识别抗体显示COS7表达的nm23-H2，然后经SDS聚丙烯酰胺凝胶纯化和胰酶消化，再进行MALDI-MS分子量分布分析，肽和肽的分子量的鉴别使用Voyager质谱仪进行，存在对应于1处或2处磷酸化而增加的质量(80道尔顿，160道尔顿)。

图12A：在兔中得到的识别对应于nm23H1磷酸化区域的肽的K73多克隆抗体用磷酸化的肽进行多次亲和纯化，泳道1和泳道2表示杆状病毒产生的nm23H1和H2重组

蛋白，在体外被酪蛋白激酶 δ 磷酸化时，被富有识别磷酸化丝氨酸的IgG的特异性K73抗体识别。这些数据通过K73特异性抗体显示在丝氨酸120-125区域存在特异性磷酸化；图12C：MDA H1177用50mMol IC261孵育不同的时间，如实施例4所述，总提取物中的30mg用于通过以磷酸化的肽纯化的K73多克隆抗体进行的nm23的磷酸化的分析。泳道6(在0h给出)表示泳道1中使用的30mg提取物，用10单位ICP在37°C下处理1小时得到。图12D中，MDA C100以两种不同浓度的IC261处理6小时，h-prune用A59多克隆抗体免疫沉淀，通过抗nm23H1单克隆抗体(NOVOCASTRA)检测与nm23-H1的相互作用。泳道1和5分别表示20ng重组h-prune WB阳性对照和20ngMDAH1177细胞提取物。

图13A表示用经双嘧达莫、IC261或者双嘧达莫和IC261处理的细胞运动性的值(5次独立重复测定的算术平均 \pm SD)；图13B(左下)表示IC261的存在改变MDA prune#4细胞中线性的cAMP含量(cAMP总含量-PDE活性)，这表明复合物引起细胞中PDE-cAMP的增加。实际上，图13B(右下)表示重组h-prune蛋白在体外于IC261的存在下不改变其生物活性，比活性值与未处理的蛋白相似。从这些数据可知，IC261抑制h-prune-nm23复合物，后者引起体内磷酸二酯酶活性的增加，在MDA prune#4是明显的。

图14表示使用prune特异性单克隆抗体(4G3/4)通过蛋白质印迹对h-prune进行的检测。

实施例1:h-PRUNE的结构和功能分析

材料与方法

蛋白质序列分析

使用PSI-BLAST程序(Altschul等, 1997), 在国家生物技术中心(NIH, Bethesda)的蛋白质序列的非冗余数据库中进行了反复搜索。使用T_coffe程序(Notredame等, 1993)构建蛋白质序列的多重比对, 在PSI-BLAST程序的结果的基础上进行了修正。

使用Philip Fitch程序和Molphy程序包的ProtML程序构建了系统发生树。

通过SWISS-PDB-viewer软件进行了蛋白质结构的同源建模, 用模板人工地调整比对, 使蛋白质骨架的冲突最小化。使用GROMOS程序和Sippl样力场进行能量最小化。

使用MOLSCRIPT程序产生带状结构蛋白质的图像。

细胞培养

将HEK-293和MDA-MB-435细胞在添加10%胎牛血清、100单位/ml青霉素和100

μ g/ml链霉素的达尔贝科氏(Dulbecco's)改良伊格尔培养基中,于37°C、5%CO₂的条件下进行培养。

杆状病毒中的蛋白质表达和纯化

用杆状病毒表达系统(Invitrogen)进行蛋白质表达。简而言之,将编码h-PRUNE、nm23-H1和nm23-H1(MacDonald等,1996)及h-PRUNE的突变体:h-PRUNE Δ 、D28A、D106A、D179A、D28A-D106A、D28A-D106A-D126A、D28A- Δ 、4D Δ (D28A-D106A- Δ -D179A)的cDNA亚克隆到EcoRI/XhoI消化的pFastBac-Hta载体中。

为了产生h-PRUNE突变的cDNA,h-PRUNE构建物的定点诱变使用QuikChangeIII试剂盒(Stratagene)按照制造商的说明书进行(见实施例2)。

病毒感染和纯化条件如Garzia和coll.(2003)所述。

然后,组氨酸标记的h-PRUNE和h-PRUNE Δ 在MonoQ HR5/5柱(Amersham)用pH8.0的10mM Tris-HCl缓冲液纯化。柱洗脱以0~0.8M NaCl的线性梯度在1ml/min的流速下进行20分钟。组分进一步用pH8.0的10mM Tris-HCl透析,并测试活性。

通过SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离蛋白的纯化。

h-PRUNE磷酸二酯酶活性的鉴定和表征

通过cAMP/cGMP检测分析测定PDE活性,如Fisher等,1998所述,采用闪烁测定(Amersham-Pharmacia Biotech)。

稀释样品,并在含有所需浓度的cAMP或cGMP底物(未标记与³H标记的比例为3:1)的100 μ l测定缓冲液(50mM Tris-HCl, pH7.4, 8.3mM MgCl₂, 1.7mM EGTA)中于30°C进行孵育。

包括仅含有培养基的空白试验的所有反应重复3次,可以给予孵育的时间,让<25%的底物周转(根据经验确定)。

通过加入50 μ l硅酸钇SPA珠(Amersham)终止反应。

酶活性根据按照制造商的方案检测的同位素标记的产物的量来计算。作为阴性对照,使用预先与针对基序III区域产生的A59多克隆抗体孵育的h-PRUNE(Apotech Corporation, CH)和h-PRUNE Δ 突变体。

具体来说,对于h-PRUNE和h-PRUNE突变体的PDE活性,在30°C下孵育200ng纯化的酶10分钟。

具有K_m和V_{max}值的Lineweaver-Burk图及通过在底物浓度范围内(0.05-10.0 μ M)和固定的稀释酶量测定水解超过5-40分钟来确定。初始比例在每个底物浓度计算,并根据后者作图,从而确定动力学参数。

为了研究不同的缓冲液和nm23活性对h-PRUNE的PDE活性的影响并进行抑制作用的研究，PDE测定如实施例2的“材料与方法”部分中所述进行改进。

体外细胞运动性测定

制备过度表达h-PRUNE、h-PRUNE Δ 、h-PRUNE4D Δ 和人PDE5A的稳定的MDA克隆，如实施例2的“材料与方法”部分中所述进行分析。

在细胞运动性测定中，如前所述使用对照乳腺癌细胞系MDA-C100(Leo等，1993)，以及在体内显示抑制转移过程的nm23-H1过量表达的抑制的细胞系(MDA-H1-177)。

通过6孔穿孔(trans-well)技术(Corning-Costar)，分别使用最终浓度为0.25%、0.5%的FCS和2.5、5.0ng/ml的纤连蛋白(Sigma)作为化学引诱剂，确定细胞运动性(具体参看实施例2的“材料与方法”部分)。

统计分析

包括PDE活性和细胞运动性的所有测定使用t检验验证，检验方法见<http://www.graphpad.com/quickcalcs/index.cfm>。

FISH和HIC分析、肿瘤临床病例收集和TNM选择在实施例2的“材料与方法”部分中叙述。

结论

h-PRUNE的结构和功能分析

对h-PRUNE蛋白进行了迭代的蛋白质数据库搜索(PSI-BLAST)，可以用统计上显著的预期值重新获得h-PRUNE的真核直向同源物，以及来自各种细菌的无机焦磷酸酶和来自不同生物体的DHH蛋白，包括RecJ核酸酶(图1, C幅)。

使用BLASTCLUST程序的DHH蛋白的聚类和使用最大相似性方法的系统发生分析显示PRUNE蛋白(人和果蝇)与无机焦磷酸酶同属于DHH第二家族(图1, A幅)。

两个DHH蛋白的家族共有含DHH超家族典型的四个保守基序的共同N末端结构域，但它们在C末端结构域相互不同。共有的N末端结构域具有一个带平行 β 折叠的 α/β 折叠，含有形态DXD(基序I)、D(基序II)、DHH(基序III)和D/E(基序IV)的绝对保守的元件(图1, A, B幅)。

所有这些残基在该结构域的同一面，而且螯合至少两个二价阳离子一起形成催化位点。PRUNE蛋白含有形态DHR代替规范DHH(基序III)，在该家族的所有其它成员中观察到这一点(图1, A幅)。

在两个DHH家族中，C末端结构含有5条链的核心片层，其中4条形成两个 β 链

发卡结构。然而，DHH蛋白的第一和第二家族之间C末端结构的差异能显著地促成两个超家族的底物特异性。另外，作为DHH模序的哺乳动物PRUNE的C末端结构域包含非球状的延伸，其中有一些可起调节磷酸化的作用的保守的丝氨酸。

h-PRUNE的结构分析显示了RecJ(Yamagata等, 2002)与焦磷酸酶(Ahn等, 2001)的相似性，因此也提示与后者潜在的相似活性。

然而，与awd/K-pn样NDPK的强协同相互作用提示PRUNE蛋白可能有可选的底物，例如核苷酸。

关于DHH家族的进化研究显示磷酸酯酶来源于许多含有不同磷酸酯酶和水解酶结构域的蛋白质折叠。这些包括:HD折叠，根据它识别经典的信号PDE(PDE1-11)(Aravind, 1998); 金属- β -内酰胺酶折叠(Galperin等, 1999, Aravind, 1999), 产生PdsA样PDE; 以及类似钙依赖磷酸酶的磷酸酯酶折叠(Aravind, 1998), 产生Icc类PDE。

DHH催化结构域具有一个与其它家族截然不同的折叠，含有若干类似的金属螯合残基(天门冬氨酸和组氨酸)，可能确定一类全新的PDE。为了验证该假设，表达、纯化了h-PRUNE，并对潜在的PDE活性进行了测定。

h-PRUNE的PDE活性的鉴定和表征

为了确定h-PRUNE水解环核苷酸(cAMP和cGMP)中的磷酸酯键的能力，克隆h-PRUNE并使用杆状病毒表达系统进行表达。通过亲和色谱纯化His标记的h-PRUNE和在基序III区域(DHRP126-129AAAA)产生的突变h-PRUNE Δ 。

使用PDE测定来表征纯化了了的h-PRUNE的催化活性，并确定特异性底物。

如图2, A幅所示，h-PRUNE具有显著的PDE活性，对cGMP的活性比对cAMP的活性更高，而h-PRUNE Δ 显示该活性下降40%。作为阳性对照，使用PDE2；作为阴性对照，使用经A59特异性多克隆抗体预孵育了的h-PRUNE和h-PRUNE Δ 。

为了确认所测得的PDE活性，在人HEK-293细胞内短暂地过度表达h-PRUNE和h-PRUNE Δ ，然后进行免疫沉淀，并对免疫沉淀的蛋白质进行PDE测定。

这些结果表明来自于昆虫和人类细胞的h-PRUNE纯化蛋白都表现出PDE活性。

为了鉴定催化位点中可能包含的氨基酸，进行了对影响h-PRUNE的PDE活性的单位点或多位点的突变分析。将DHH特征基序(图1, B幅)的所有天门冬氨酸残基单独或组合地进行突变(图2, B幅)。使用杆状病毒表达系统表达突变体，并纯化至均一性(纯化的得率为80%)。

测试蛋白质它们的cAMP-PDE活性，发现h-PRUNE4D Δ (D28A, D106A, Δ , D179A)

突变体的活性下降了80%。总之,发现D28、D126、H127、R128、P129和D179的氨基酸是h-PRUNE的PDE活性所必需的,这表明很可能它们是催化位点的一部分。相反,基序II中D106A突变对h-PRUNE的PDE活性没有影响。

为了确定 K_m 值,通过另外的纯化步骤以高纯化产率(90%)使用离子交换色谱(Mono-Q柱)将His标记的h-PRUNE蛋白纯化至均一。通过测定在底物浓度范围内(0.05-10.0 μ M)固定量的纯化了了的酶的核苷酸水解,并根据反应线性部分的数据点确定了 K_m 和 V_{max} 值。cAMP和cGMP都是h-PRUNE的底物, K_m 值分别为 $0.9 \pm 0.03 \mu$ M和 $2.3 \pm 0.11 \mu$ M(图2, C和D幅)。

cAMP和cGMP的最大底物转换率(V_{max})分别为 $12.8 \pm 0.5 \text{ pmol} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g}^{-1}$ 和 $16.1 \pm 0.8 \text{ pmol} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g}^{-1}$ 纯化的酶。

因此,得到了DHH超家族的蛋白质的环核苷酸磷酸二酯酶活性的证据。为了研究缓冲液对h-PRUNE的PDE活性的影响,对Tris-HCl和HEPES缓冲液在同样的盐的存在下进行了测试,在Tris-HCl缓冲液的存在下观察到更高的PDE活性(图2, E幅)。

考虑到DHH蛋白的离子依赖性,在PDE cAMP测定中评价了h-PRUNE的 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 依赖性。虽然在在Tris-HCl缓冲液中发现更高的活性,但PDE测定在避免氧化还原反应的HEPES缓冲液的存在下进行,并使用两种不同的二价离子的递增浓度。

虽然在无离子的缓冲液中测得了一些PDE活性,但 Mg^{2+} 促进h-PRUNE的PDE活性(图2, E幅);相反, MnCl_2 的存在下,该活性被抑制。此外,h-PRUNE Δ 突变体没有像野生型蛋白质一样被 Mg^{2+} 活化(图2, F幅),这表明在h-PRUNE Δ 突变体中被修饰了的基序III是磷酸二酯酶活性所必需的。综上所述, Mg^{2+} 浓度对h-PRUNE的cAMP-PDE活性有正面影响。

稳定的乳腺MDA h-PRUNE克隆和与细胞运动性的相关性

为了研究h-PRUNE在调节mn23-H1的抗运动性和转移抑制活性中的功能,使用乳腺癌MDA-C100和HI-177细胞模型(Hartough等, 2000, Mao等, 2001, Tseng等, 2001)。

MDA435-C100细胞(高转移性乳腺癌细胞, ATCC)用在含LTR的质粒构建物(pBabe构建物, 用于在哺乳动物细胞中产生嗜亲性反转录病毒)中的h-PRUNE基因cDNA进行转染,转染后得到不同嘌呤霉素抗性克隆(培养20天来分离克隆),质粒抗菌素抗性在LTR启动子下选择h-prune cDNA过度表达。

在MDA-C100细胞中,产生了若干过度表达h-PRUNE cDNA的稳定克隆(克隆#3和#4, 最后于10/12/2004保藏在热那亚的CBA)、h-PRUNE Δ cDNA(克隆#10和#11)、

h-PRUNE4D Δ cDNA(克隆#19和#20)和PDE5A cDNA(克隆#14和#16)。h-PRUNE cDNA在过度表达nm23-H1的MDA-H1-177(克隆#7和#8)、过度表达nm23-H1-P96S的MDA(克隆#4和#5)和过度表达nm23H1-S120G的MDA(克隆#2和#3)中被稳定。

其中一些克隆通过采用TaqMan技术的实时PCR分析表征, 来确定h-PRUNE的mRNA的表达水平(图3, A幅)。4个克隆通过定量分析和拷贝数的外推法得到它们的mRNA表达水平, 与目标参考基因(GAPDH)比较(图3, B幅)。

此外, 进行了蛋白质印迹分析来鉴定h-PRUNE、nm23和PDE5A蛋白的表达水平(图3, C幅)。

所产生的稳定克隆使用穿孔细胞培养箱对细胞运动性进行测定(Frei je等, 1997, Hartsough等, 2001, Frei je等, 1997)。对6个独立的克隆(MDA-C-100; MDA-PRUNE克隆#3和#4, 于10/12/2004保藏在热那亚的CBA; MDA-H1-177-PRUNE克隆#7和#8; MDA-1I-177)进行了测定。MDA-PRUNE克隆与对照细胞系MDA-C100相比, 运动性增加了1倍(图3, D幅)。

克隆所观察到的MDA-H1-177-PRUNE的值与仅过度表达nm23-H1的细胞系MDA-H1-177相比, 增加到2.2倍(图3, D幅)。所观察到的克隆MDA-H1-177的值与MDA-C100细胞系相比, 如以前所报道(Hartsough等, 2001), 减少了至少40%, 这证明nm23-H1对细胞运动性的抑制作用。

为了研究h-PRUNE的PDE活性对细胞活动性的促进, 对MDA-C-100、MDA-H1-177、MDA-PRUNE(克隆#3和#4, 于10/12/2004保藏在热那亚的CBA)、MDA-PRUNE Δ (克隆#10和#11)和MDA-PRUNE4D Δ (克隆#19和#20)进行了测定。选择这些突变体是因为它们影响h-PRUNE的PDE活性的能力不同。

与MDA-PRUNE稳定克隆相比, 在MDA-PRUNE Δ 和MDA-PRUNE4D Δ 克隆中分别观察到细胞运动性的40%和几乎全部(90%)的下降。为了验证在乳腺癌细胞系中是否仅h-PRUNE的PDE活性促进细胞运动性, 对在MDA-C100中过度表达被充分表征了的PDE(PDE5A)的克隆(MDA-PDE5A克隆#14和#16)进行了测试。在过度表达PDE5A的克隆中都没有发现细胞运动性的增加(图3, E幅), 这表明在该常规的细胞模型中只有h-PRUNE的PDE活性能诱导细胞运动性。

此外, 报道了(Frei je等, 1997, Hartsough等, 2001, Frei je等, 1997)nm23H1-S120G(与h-PRUNE没有相互作用的突变体)(Reymond等, 1999)和nm23H1-P96S(保持结合h-PRUNE能力的突变体)蛋白能诱导细胞运动性。

对h-PRUNE在细胞运动性活性过度表达的具有和不具有h-PRUNE的突变体中的

作用进行了研究，并与细胞运动性进行相关。与MDA-C100对照细胞系相比，MDA-nm23H1-S120G-PRUNE克隆表现出近60%的运动性增加，而与MDA-C100细胞相比，MDA-nm23H1-P96-PRUNE克隆表现出200%的运动性增加(图3, F幅)。

综上所述，结果表明MDA-C100细胞中的h-PRUNE的过度表达增加细胞运动性。h-PRUNE能够消除nm23-H1的抗运动性效应，从而促进了细胞运动性。在h-PRUNE的相互作用被削弱了的nm23H1-S120G突变体中，当h-PRUNE过度表达时没有观察到该效应，这可能是由于nm23-H1-h-PRUNE复合物对细胞运动性增加的作用。

体外和体内的h-PRUNE的PDE活性

考虑到nm23-H1和h-PRUNE的物理的相互作用(MacDonald等, 1996)，对nm23是否会影响h-PRUNE的PDE活性和nm23-h-PRUNE的相互作用的生化意义进行了检测。这通过用h-PRUNE纯化蛋白预先孵育nm23-H1和在体外测量cAMP-PDE活性来实现。

在nm23-H1的存在下，h-PRUNE的PDE活性表现出相对于对照多达2倍的增加。此外，为了证明该增加的活性是由于物理的相互作用，对不同的nm23进行了测试。无相互作用的突变体nm23H1-S120G(图4, A幅)无法使h-PRUNE的PDE活性增加；相反，有相互作用的突变体nm23H1-P96S几乎与野生型nm23-H1同样地使h-PRUNE的PDE活性增加，只是幅度较小。如以前所报道(Reymond等, 1999)，这可能是由于对h-PRUNE较低的结合亲和力。

作为进一步的对照试验，在nm23-H1蛋白的存在下对h-PRUNE Δ 的PDE活性进行了测试，因为这两种蛋白在共免疫沉淀测定中没有相互作用。测得的h-PRUNE Δ 的PDE活性没有增加(图4, A幅)。

这些结果证明h-PRUNE和nm23-H1的直接物理相互作用与h-PRUNE的PDE活性的增加之间的相关性。另外，对于在运动性测定中使用的各个稳定克隆，对免疫沉淀的蛋白质分析了特定的h-PRUNE的cAMP-PDE活性(图4, B幅)。

由这些分析得到的结果，MDA-PRUNE克隆具有8倍于MDA-C100的cAMP-PDE活性。相反，MDA-PRUNE Δ 相比MDA-PRUNE下降了0.5倍，这与它们的细胞运动性特性相关(图4, B幅)。

此外，还发现MDA-h-PRUNE克隆中的h-PRUNE的PDE活性与稳定的双MDA-H1-177-PRUNE相比，增加到1.4倍(图4, B幅)。

这些结果表明了h-PRUNE的PDE活性与细胞运动性的直接相关性。另外，MDA-nm23H1-S120G-PRUNE克隆与MDA-nm23H1-P96S-PRUNE相比，h-PRUNE的PDE活性下降到1/3，这暗示了h-PRUNE的cAMP-PDE活性、细胞运动性和蛋白质-蛋白质相互

作用的直接相关性。综上所述，h-PRUNE的PDE功能与蛋白质-蛋白质相互作用间的直接相关性对细胞运动性会产生显著的影响。

h-PRUNE的PDE抑制剂研究和对细胞运动性的影响

为了鉴别h-PRUNE的cAMP-PDE活性在细胞中的生理作用，对一组选择性的PDE抑制剂进行测试，并验证是否对h-PRUNE蛋白质活性有任何影响。

h-PRUNE水解cAMP的能力被双嘧达莫(已知抑制PDE5、PDE6、PDE9、PDE10和PDE11)选择性地抑制。测定双嘧达莫抑制h-PRUNE的PDE活性的 IC_{50} 为 $0.78 \pm 0.05 \mu M$ ，该值比其它的选择性PDE抑制值(PDE5、PDE9、PDE10)低(较高的特异性)。只有PDE6和PDE11具有比h-PRUNE低的 IC_{50} 值(图5, A幅)。

h-PRUNE也对非选择性的特异性PDE抑制剂IBMX(3-异丁基-1-甲基黄嘌呤)(IC_{50} : $40.2 \pm 0.8 \mu M$)和PDE1C特异性抑制剂长春西汀(IC_{50} : $22.3 \pm 1.1 \mu M$)中度敏感。

即使当对其它PDE的 IC_{50} 值高100倍的浓度施用，一些该研究中所用的其它抑制剂也不影响h-PRUNE的cAMP水解活性。抑制研究的结果总结在图5, A幅中。

为了研究体外的生理抑制作用，以上给出的数据在MDA-MB-435乳腺癌细胞系中得到进一步验证。

选择使用过度表达h-PRUNE的MDA克隆，因为如上所述h-PRUNE的PDE活性部分降低(40%) (图2, A和B幅)，所以作为附加对照使用MDA-PRUNE Δ ，以验证在那个范围内双嘧达莫能抑制它们的活性，并使其与细胞运动性相关。

MDA-PRUNE和PRUNE Δ 克隆都用双嘧达莫($8 \mu M$, IC_{50} 的10倍浓度)孵育24小时，使酶完全失活，然后如上所述地重复运动性测定。

用双嘧达莫处理后，MDA-PRUNE和MDA-PRUNE Δ 克隆分别表现出40%和20%的平均运动性下降，表明抑制剂抑制h-PRUNE的PDE活性，造成细胞运动性的实质性降低(图5, B幅)。

对于出现转移的患者的乳腺癌研究

为了验证h-PRUNE在体内的致癌作用，我们随机选择了59个报告了转移的病例(TxNxMI，按照描述疾病的解剖学范围的TNM分类(Hejna等, 1999))。

在诊断时或跟踪期间(至少跟踪5年；诊断时间：1992-97)，在含有显示转移的原发瘤组织的多组织阵列(tissue multiple array, TMA)上进行分析。

使用含有h-PRUNE(279-H19)的PAC作为探针的FISH分析显示，59个肿瘤病例中的22个(37%)有三体或更多的拷贝数，表明h-PRUNE基因组区域的扩增。使用含有

nm23-H1的PAC作为探针，在共55个分析的病例中，仅发现一个二体或没有扩增(图6, A幅)。

此外，在TMA上使用两种分别识别h-PRUNE和nm23-H1的抗体(A59、K73)进行免疫组织化学分析。报告了正常和非转移性癌症组织的FISH和免疫组织化学分析。

按照免疫组织病理学分级，在所有22个病例(37%)中，在h-PRUNE染色体区域的细胞基因扩增后，也发现与nm23-H1的低或中度表达水平相反的高h-PRUNE蛋白表达，这表明大约三分之一的乳腺癌转移形成是由于伴随低水平的nm23-H1转移抑制功能的h-PRUNE扩增和表达。

此外，7个病例(12%)没有呈现h-PRUNE扩增，但具有高h-PRUNE蛋白水平，而nm23-H1水平低(图6, D幅)。这提示存在不依赖基因扩增的h-PRUNE过度表达的可选择机制。

这些数据表明在乳腺癌中h-PRUNE蛋白的促进转移的作用。

实施例2: 乳腺MDA稳定克隆的基因表达图谱

材料与方法

突变体的制备

使用下述寡核苷酸产生h-PRUNE突变体:

h-PRUNE Δ (DHRP126-129AAAA): 5'-GTA GCA GAG GTG CTA GCC GCT GCA GCC ATC GAG CCG AAA CAC-3' (SEQ ID No 5);

D28A: 5'-GAA GCC TGT GCT TTG GAC TCC-3' (SEQ ID No 6);

D106A: 5'-ACC CTC ATC CTT GTC GCT CAT CAT ATC TTA TCC-3' (SEQ ID No 7);

D179a: 5'-GAA CCA TCA TCC TGG CAT GTG TCA ACA TGG-3' (SEQ ID No 8)。

突变的核苷酸以粗体字表示，被改变的密码子加下划线。所有的突变经DNA测序确认。

h-PRUNE的PDE磷酸二酯酶活性的表征

为了研究缓冲液对h-PRUNE的PDE活性的影响，改变PDE测定，使用MgCl₂的递增浓度(0、1、2、4、8、16和32mM)、pH7.4的50mM Tris-HCl或pH7.5的50mM HEPES缓冲液。

为了研究离子存在的影响，在MgCl₂或MnCl₂盐的递增浓度(1、2、4、8、16、32和64mM)、pH7.5的50mM HEPES缓冲液中进行PDE测定。作为阴性对照，在与h-PRUNE相同的条件下使用h-PRUNE Δ 。在用pH7.4、1.7mM EGTA的50mM Tris-HCl或pH7.5、1.7mM EGTA的50mM HEPES缓冲液对蛋白质彻底透析后，在没有离子状态下测试

h-PRUNE活性。

通过采用不同的nm23 (纯化得率70%，-H1、-H1-S120G或-H1-P96S) 预先孵育的纯化了的h-PRUNE进行测定, 研究了nm23 (NDPK) 活性对h-PRUNE的PDE活性的影响。

通过用nm23-H1预先孵育纯化了的突变蛋白质并进行PDE测定, 对nm23-H1对h-PRUNE Δ 可能的影响进行测试。

关于抑制剂研究, 对8种不同的潜在的抑制剂进行了测定, 即: 西洛酰胺、双嘧达莫、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX)、米力农、咯利普兰、长春西汀、舒林酸、扎普司特 (Sigma)。

为了使 IC_{50} 接近 K_i , 使用低浓度的cAMP (0.01 μ M)。所有的抑制研究重复三次。

稳定克隆分析

h-PRUNE、h-PRUNE Δ 和h-PRUNE4D Δ 的cDNA亚克隆到经EcoRI/XhoI消化的、在N末端用His标记修饰的pBABE载体中。人PDE5A的cDNA通过添加EcoRI和XhoI限制性末端进行PCR扩增, 从而将其克隆到同样的His标记的载体中。

用pBABE-h-PRUNE表达载体转染MDA-C100、MDA-H1-177、MDA-nm23H1-S120G和MDAnm23H1-P96S克隆。用pBABE-h-PRUNE Δ 、pBABE-h-PRUNE4D Δ 和pBABE-h-PDE5A表达载体转染MDA-C100克隆。

使用Lipofectamine (Invitrogen) 按照制造商说明进行转染。在含有10%胎牛血清、100单位/ml青霉素、100 μ g/ml链霉素和2 μ g/ml嘌呤霉素的达尔贝科氏改良伊格尔培养基 (Sigma) 中筛选转染子。

为了制备成批转染的细胞系, 含有100个嘌呤霉素抗性的克隆的板经胰酶消化, 从而建立细胞系。

每个MDA克隆分离出若干嘌呤霉素抗性的pBABE-h-PRUNE、pBABE-h-PRUNE Δ 、pBABE-h-PRUNE4D Δ 和pBABE-PDE5A克隆, 转染并通过实时PCR和蛋白质印迹分析进行表征。

对于实时PCR分析, 个别细胞克隆 (MDA-C100、MDA-H1-177、MDA-nm23H1-S120G和MDAnm23H1-P96S细胞系, 若干h-PRUNE和h-PRUNE Δ 稳定克隆) 以 $7-9 \times 10^6$ 细胞的密度放置在75cm²烧瓶中。

用TRIZOL® (Invitrogen) 提取并纯化mRNA, 然后使用ABI PRISM 7000设备 (Applied Biosystems) 通过TaqMan定量实时PCR测定。合成基因引物对 (Applied Biosystems: NME1-P/N 4331182; GAPDH), 并使用Assay on Design构建h-PRUNE和h-PRUNE Δ 基因的6FAM探针序列:

6FAM-CTGCATGGAACCATC (SEQ ID No 3);
FOR:AGAGATCTTGGACAGGCAAACCT (SEQ ID No 1);
REV:CCATGTTGACACAGTCCAGGAT (SEQ ID No 2)。

筛选若干克隆, 并通过定量分析和拷贝数的外推法对它们的mRNA表达水平进行测定, 与参考目标(GAPDH)进行比较。

对于蛋白质印迹分析, 通过SDS-PAGE以10% (w/v) 或12.5% (w/v) 的聚丙烯酰胺凝胶分析缓冲液中的15 μ g蛋白质溶解产物, 并电印迹到PVDF膜(Immobilon-P, Millipore)上。分别对于h-PRUNE用h-PRUNE特异性多克隆抗体(A59, 针对基序III区域)、对nm23-H1用nm23-H1(克隆NM301, 对H1同种型特异; Santa Cruz)抗体、对PDE5A抗体用抗His-tag(QIAGEN)的Penta-His, 对溶解产物进行免疫检测。

用辣根过氧化物酶标记的抗小鼠IgG孵育后, 通过增强的化学发光进行显色(Amersham)。选择了MDA-PRUNE(克隆#3和#4)、MDA-H1-177-PRUNE(克隆#7和#8)、MDA-nm23H1-S120G-PRUNE(克隆#2和#3)、MDA-nm23H1-P96S-PRUNE(克隆#4和#5)和MDA-PRUNE Δ (克隆#11)、MDA-PRUNE4D Δ (克隆#19)、MDA-PDE5A(克隆#14)这11个细胞系, 将蛋白质在蛋白质印迹上正态化。

体外细胞运动性测定

使用穿孔技术(6孔-Coming-Costar)。在下层孔中, 孵育含有0.1% BSA、100单位/ml青霉素、100 μ g/ml链霉素、5mM HEPES缓冲液的2.5ml DMEM(运动性培养基)和稀释的化学引诱剂; 在上层孔中, 细胞在37°C下以5% CO₂孵育3小时。在引诱过程后, 固定细胞, 用Gill n° 1苏木精溶液按照制造商方案染色(Coming-Costar); 最后, 在显微镜下进行细胞计数。

FISH分析

4mm厚的福尔马林固定的石蜡包埋的组织切片上, 通过切口平移用dUTP-CY3(红)标记的PAC 279-H19(PRUNE-染色体 1q21.3)和PAC nm23-H1(nm23H1-染色体 17q21)、通过切口平移用dUTP-FluorX(绿)标记的对照pUC177(pUC177由M. Rocchi博士提供)。

核用4',6-二脒基-2-苯基-咪唑(DAPI)进行复染。每个病例进行二个独立的试验。通过使用COHU Video and Cytovision软件的Olympus电脑化落射荧光显微镜拍摄数码照片。完整地保存杂交信号, 由至少两名独立的研究人员对非重叠的核进行评价。

IHC分析

分别用特异性A59 h-PRUNE多克隆抗体和nm23-H1抗体对MDA肿瘤进行免疫检测(克隆73, 对H1和H2同种型特异; Apotech Corporation, CH)。

用免疫组织化学染色的强度将肿瘤样本按h-PRUNE和nm23-H1蛋白表达进行分类, 显微镜下在被分析的细胞的至少20%中出现判为阳性(强+++ , 中++ , 扩散弱染色+), 或者阴性0(缺少或局部弱染色)。

肿瘤病例采集和TNM筛选

通过Sassari的AUSL1采集肿瘤病例, 包括至少跟踪5年的患者。该研究使用如Sobin所述的TNM系统分类(Hejna等, 1999), 它用于描述疾病的解剖学范围, 基于以下三部分的评估: T对应于原发瘤的范围(T0~T4), N对应于是否存在局限性淋巴结转移以及其范围(N0~N4), M代表是否存在远距离转移(M0或M1)。所采集的59个乳腺肿瘤病例被分类为TxNxM1阳性。

乳腺细胞克隆中的基因表达

按照以下的过程进行探针的制备。

通过TRIZOL®方法从MDA-H1-177-PRUNE(克隆#8)和MDA-H1-177克隆提取RNA。用作了以下改动的Amersham CyScribe第一链cDNA标记试剂盒标记15~20ug的总RNA模板。

将反转录时间增至3小时。然后, 探针在37°C用Rnase-H消化30分钟。

为了去除残留的RNA, 反应混合物用0.25M NaOH孵育20分钟, 然后用2.8M MOPS中和。对Cy5和Cy3计算掺入的Cy染料的数量。标记的Cy5和Cy3靶等量结合, 在玻片上杂交。

掺入的Cy染料少于5pmol的探针不用于杂交。

对玻片采用标准的杂交方案。进行两组独立的试验。

扫描和图像分析

通过Medway Far 2000-I进行扫描, 用来自Media Cybernetics的Array Pro软件进行图像分析。扫描仪灵敏度保持在900~1000, 以补偿饱和度和低亮度。图像以16位格式进行处理。

数据挖掘

为了确定两种试验条件下观察到的基因表达上的差异的统计显著性, 每个试验重复3次。

为了描述数据的显著性和易变性, 对若干重复的试验进行t检验。使用在网页<http://www.igb.uci.edu/servers/cybert>上可以得到的Cyber-T工具来进行该检

验。截留值使用 $p=0.05$ 。作为该分析的结果，预期不同的数据组中有近5%的假阳性。仅使用通过该检验的数据组(数据选择根据t检验)。

结论

为了验证过度表达单独的nm23-H1和/或与h-PRUNE的组合的稳定克隆的基因表达图谱，使用具有19000个基因组的现成芯片进行基因芯片研究。该芯片含有点样在玻片上的人Unigene的cDNA数据组(Ontario, Canada, Array facility, <http://www.microarrays.ca/>)。

来自MDA-H1-177和MDA-H1-177-PRUNE(克隆#8)克隆的RNA被用于进行杂交。对每个乳腺癌克隆进行2组独立的试验，外推得到t检验的值($p=0.05$)(<http://www.tigem.it/zollo/cancerCell/supplemental/array.html>)。

如表1所示，发现转移过程中所涉及的一些基因的表达水平与MDA-H1-177克隆相比在MDA-H1-177-PRUNE(克隆#8)中的调节是不同的。表1总结了对稳定的乳腺细胞克隆进行的芯片试验；在各栏中从左至右报告了：基因鉴定的ID号、Unigene参考号和人染色体上的位置；重复进行两次独立试验后，MDA-H1-177/MDA-H1-177-PRUNE克隆#8的芯片数据间的关系；t检验值，包括标准差和p值；基因的参考文献；相应转移的过程。

表 1

基因鉴定ID	信号强度比 Cy3/Cy5 (H1-177/克隆8)	信号强度比 Cy5/Cy3 (H1-177/克隆8)	#obs	Mn	SD	t	P	基因参考文献	转移相关的过程
310622:W31182:310622:H s.181385:未表征的造血 干细胞/祖细胞蛋白质 MDS030:MDS030:9:9p24.1	1.441332	1.442391601	2	1.4418	0.0005	995.8991	0.006	作者:Zhao,M., Gu, J., Li, N., Peng, Y., Ha n, Z. 和Chen. Z. 标题: 来自骨髓异常增生综 合征患者的造血干细 胞/祖细胞中表达的基 因 期刊:未出版	血管发生
489392:AA054454:489392 :Hs.82159:蛋白酶体(前 体、大粒子)亚单位, α 型 1:PSMA1:11:11p15.1	1.42474	1.423157331	2	1.4239	0.0007	635.9779	0.001	Coux, O; Tanaka, K; Golderberg, A; 20S和26S蛋白酶体的 结构和功能 Ann. Rev. Biochem. 65: 801-847, 1996	蛋白质降解
485121:AA037777:485121 :Hs.25300:II型磷脂酰肌 醇4-激酶 :PI4KII:10:10q24	0.39234	0.394341204	2	0.3933	0.0035	-366.7976	0.0017	J Biol Chem, 2001, 5, 18:276(20):16635-40 Minogue S. Anderson JS. Warugh MG, dos Santos M. Corless S, Cramer R, Hsuan JJ.	胞吞作用和细胞 骨架重组
4692752:BG538790:46927 52:Hs.94881	3.977598	4.013662507	2	3.9955	0.0063	306.9319	0.002	Cancer Lett, 1995, 5, 4:91(1):47-54 Salesiotis AN, Wang CK, Wang CD, Burger A, Li H, Seth A	转移

307259:W21103:307259:Hs .84344:CGI-1135蛋白: LOC51024:7:7q11.22	0.851047	0.857366017	2	0.8542	0.0052	-42.6056	0.0149	Hs.38738 人 CLDN15 密 蛋白 15: Colegio OR, Van Itallie CM, McCrea HJ, Rahner C, Anderson -IM. 密蛋白在上皮细 胞间的细胞旁路中产生 电荷选择性通道 Am J Physiol Cell Physiol. 2002, 7:283(1):C142-7. PMID:120550 B2	粘连
4862951:80766316:486295 1:Hs.347991:核受体亚家 族2, 组F, 成员2: NR2F2:15:15q26	0.868882	0.862911048	2	0.8658	0.0048	-41.7638	0.0152	Pereira等. (1999)	血管发生和 发展
266005:N31521:266005:Hs .198689:大疱性类天疱疮 抗原1, 230/2 40kDa: BPAG1:6:6p12-p11	0.777256	0.787969285	2	0.7825	0.0096	-35.8148	0.0177	Brown, A.; Bemier, G.; Mathieu, M.; Rossant, J .; Kothary, R. 小鼠肌张 力失常基因是大疱性类 天疱疮抗原1的神经异 构 Nature Genet. 10: 301-306, 1995	细胞骨架组 构
278764:N98784:278764:Hs .148495:蛋白酶体(前体、 大粒子)26S亚单位, 非 ATPase, 4:PSMD:1:1q21.1	0.695804	0.681432398	2	0.6885	0.0147	-35.7552	0.0178	Deveraux, Q.; Jensen, C .; Rechsteiner, M.; 富 含二亮氨酸重复的26S 蛋白酶亚单位的分子克 隆和表达 J. Biol. Chem. 270:2372 6-23729, 1995. PubMed ID:7559544	蛋白质降解

54551 17:BM91 1128:54551 17:Hs.1111779: 分泌性蛋白质, 酸性,富半胱氨 酸(胃粘连蛋 白): SPARC:5:5q31. 3 -q32	1. 472603	1. 515475276	2	1. 4938	0. 0202	27. 9731	0. 0227	Biochem Biophys Res Commun, 2001, 9, 21: 2B7 (2): 422- 6 人血管内皮细胞中VEGF对SPARO 的诱导 Kato Y, Lewalle JM, Baba Y, Tsukuda M, SsKai N, Baba M, Kobayashi K, Koshika S, Nagashima Y, Franckenne F, Noel A, Foidart JM, Hata RI	血管发生
321313:W321 80:321313: Hs. 387254	0. 699574	0. 67106627	2	0. 6851	0. 0294	-18. 1757	0. 0349	Sfiligoi C, De Luca A, Cascone I, Sorbello V, Fuso L, Panzone R, Biglia N, Audero E, Arisio R, Busotino F, Sismondi P, De Bortoli M. 相关文章:乳腺癌中促 血管生成素的表达与淋巴结侵入 和存活相关 Int J Cancer. 2003, 2, 1:103(4):466-74.	血管发生
320701:W32046 :320701:Hs. 54 15	0. 772313	0. 74904291	2	0. 7605	0. 0216	-17. 8901	0. 0355	Sfiligoi C, De Luca A, Cascone I, Sorbello V, Fuso L, Panzone R, Biglia N, Audero E, Arisio R, Busotino F, Sismondi P, De Bortoli M. 相关文章:乳腺癌中促 血管生成素的表达与淋巴结侵入 和存活相关 Int J Cancer. 2003, 2, 1:103(4):466-74.	血管发生

300555:W07526: 300555:Hs. 2936 :基质金属蛋白 质酶13(胶原酶 3):MMPI3:11:11 q22.3	1. 094073	1. 105961019	2	1. 1	0. 0076	17. 6383	0. 036	Del Casar Lizcano JM, Vizoso Pineiro F, Gonzalez Sanchez LO, Marlin Suarez A, Gava R, Cuesta Fernandez E, Diez Santisteban MC. 相关文章:胶原酶-3(MMP-13)在胃癌中的表达和临床意义 Gastroenterol Hepatol. 2003, 1;26(1):1-7. 西班牙语 胶原酶3前体	转移
429533:AA01145 7:429533:Hs. 23 7617:二肽基肽 酶9:DPP9:19:	1. 185238	1. 164378856	2	1. 1752	0. 0131	17. 3649	0. 0366	IV Olsson C, Waghmann N, 二肽基肽酶IV的新同源物人DPP9的鉴定和表征, Gene, 2002, 10, 18: 2991-(1-2):185-93	肿瘤生物学 (转移)
4747535:BG6760 28:4747535:Hs. 89626:甲状旁腺 激素样激素: PTHLH:12:12p12 . 1-p11. 2	0. 944871	0. 951010591	2	0. 8479	0. 0045	-16. 5107	0. 0385	Linferth R, Anderson N, Boey R, Nolan T, Downey S, Brady G, Ashcroft L, Bundred N, 早期乳腺癌中甲状旁腺激素相关蛋白及其受体的共表达预示患者的低存活, Clin Cancer Research, 2002, 10(10)3172-7 PMID:12374885	转移
504278:AA14950 1:504278:Hs. 33 2405:精氨酸酶, 肝:ARG1:6:6q23	1. 391833	1. 329405384	2	1. 3602	0. 0324	13. 4093	0. 0473	Davel LE, Jasnis MA, de la Torre E, Goloh T, Diamant M, Magenta G, Sacerdote de Lustig E, Sale ME. 巨噬细胞的肿瘤诱导的血管发生的调变中涉及的精氨酸代谢途径, FEBS Lett. 2002, 12, 4: 532(1-2):216-20	血管发生
127468:R08943: 127468:Hs. 2691 81:EST, 类似于 苯斑蛋白2	1. 34385	1. 378604879	2	1. 3611	0. 0180	241. 491	0. 0263	苯斑蛋白2a和2b:核质和桥粒斑中双重定位的结构蛋白, 期刊:J. Cell Biol. 135(4), 1009. -1025(1996)PUBMED8922383 MEDLINE97081101	粘连

选择肿瘤发生和转移过程中涉及并在基因表达分析中显著变化的一些基因，通过可选的方法确认它们的表达水平。

对11个基因进行了实时PCR试验(从GeneBank ID序列选择基因的引物对)。发现这些所选基因中的7个和4个分别在MDA-H1-177-PRUNE克隆(克隆#8)中被增量调节和减量调节。在稳定的h-PRUNE过度表达克隆的水平上这种基因表达的分化示于表2，该表达通过基因芯片和实时PCR得到确认。

在上述的细胞模型中，发现了已知涉及细胞骨架重构(II型磷脂酰肌醇4-激酶)、蛋白酶活化(蛋白酶体26s亚单位、nedd4结合蛋白)、肿瘤发生(I-丝束蛋白、rab1b、bracal相关蛋白(brap2))、蛋白质磷酸化和核转运(酪蛋白激酶 II 1-ckip1相互作用蛋白)的基因的增量调节。

同时，在涉及细胞外基质连接或细胞粘附(亲斑蛋白、LIM)、细胞骨架重构(斑蛋白)和肿瘤抑制活性(EXT1)的4个基因中发现减量调节，其证据示于表2中。该表报告了稳定的h-PRUNE过度表达MDA克隆中不同的基因表达；从左至右各栏中记载了：Genebank ID鉴定；基因名称；重复进行两个独立试验后克隆#8/克隆#177的芯片表达值之间的关系；芯片表达的P值；通过实时PCR得到的克隆#8/克隆#177的芯片表达值之间的关系；实时PCR的P值；相关的细胞生物学过程。

表 2

增量调节		基因名称					实时表达值比		实时表达值比		实时表达值比		实时表达值比	
Genebank ID	基因名称	基因芯片表达值比 克隆#8/克隆177	P值	实时表达值比 克隆#8/177	P值	实时表达值比 克隆#8/177	P值	实时表达值比 克隆#8/177	P值	实时表达值比 克隆#8/177	P值	实时表达值比 克隆#8/177	P值	实时表达值比 克隆#8/177
NM_030981.1	RAB 1B ras家族	0.6902	0.0184	0.4005	0.001	0.4005	0.001	0.4005	0.001	0.4005	0.001	0.4005	0.001	0.4005
BT007330.1	II型磷脂酰肌醇4-激酶	0.3933	0.0017	0.2230	0.0013	0.2230	0.0013	0.2230	0.0013	0.2230	0.0013	0.2230	0.0013	0.2230
AF035620.1	BRACA1相关蛋白(BRAP2)	0.7563	0.0027	0.0670	0.0062	0.0670	0.0062	0.0670	0.0062	0.0670	0.0062	0.0670	0.0062	0.0670
M22300.1	丝束蛋白	0.7491	0.0078	0.0990	0.0001	0.0990	0.0001	0.0990	0.0001	0.0990	0.0001	0.0990	0.0001	0.0990
NM_018177.2	NEDD4结合蛋白2(NABP2)	0.7567	0.0145	0.2230	0.001	0.2230	0.001	0.2230	0.001	0.2230	0.001	0.2230	0.001	0.2230
NM_016274.3	CK2相互作用蛋白1(CKIP1)	0.7929	0.0161	0.3499	0.0004	0.3499	0.0004	0.3499	0.0004	0.3499	0.0004	0.3499	0.0004	0.3499
XM_2080211	26-S 蛋白酶体	0.6886	0.0178	0.4475	0.0044	0.4475	0.0044	0.4475	0.0044	0.4475	0.0044	0.4475	0.0044	0.4475
减量调节														
Genebank ID	基因名称	基因芯片表达值比 克隆#8/克隆177	P值	实时表达值比 克隆#8/177	P值	实时表达值比 克隆#8/177	P值	实时表达值比 克隆#8/177	P值	实时表达值比 克隆#8/177	P值	实时表达值比 克隆#8/177	P值	实时表达值比 克隆#8/177
RO8943.1	类似亲斑蛋白的EST Ro8943	1.3611	0.0263	2.9180	0.4764	2.9180	0.4764	2.9180	0.4764	2.9180	0.4764	2.9180	0.4764	2.9180
AF061258.1	LIM	1.1717	0.0145	3.0525	0.0092	3.0525	0.0092	3.0525	0.0092	3.0525	0.0092	3.0525	0.0092	3.0525
BC0011741	EXT1	2.1573	0.0398	2.9588	0.0623	2.9588	0.0623	2.9588	0.0623	2.9588	0.0623	2.9588	0.0623	2.9588
NM_001723.2	斑蛋白	0.7826	0.0178	0.5625	0.0619	0.5625	0.0619	0.5625	0.0619	0.5625	0.0619	0.5625	0.0619	0.5625

综上所述,发现与肿瘤发生联系的过程所涉及的基因的表达水平显著变化,这表明h-PRUNE对该乳腺癌细胞系的高致癌潜力起到决定性的作用。

结论

基于属于DHH超家族的称为RecJ核酸酶和无机磷酸酯酶的两种蛋白质的结构分析表明,h-PRUNE可能具有金属离子依赖性的磷酸酯酶活性。DHH家族结构分析和磷酸酯酶的蛋白质折叠的进化研究的结果证明哺乳动物h-PRUNE具有环核苷酸磷酸二酯酶活性。

由于h-PRUNE与具有已知作用在核苷酸上的NDPK活性的nm23-H1同种型相互作用,我们将注意力集中到环核苷酸磷酸二酯酶活性的表征和其在细胞信号传导中的作用。在DHH家族的保守基序III中含有取代的h-PRUNE突变体表现出PDE活性的下降(图2, A, B, F幅)。

在不同位点的单突变或多突变分析显示,只有在基序III的组氨酸(127)、精氨酸(128)和脯氨酸(129)以及分别出现在基序I、III和IV的天门冬氨酸D28、D126、D179的突变发现会对h-PRUNE的PDE活性产生实质性的影响,这表明它们很可能包含在h-PRUNE的PDE催化位点中。

如蛋白质建模(图1, B幅)所推测,保守基序III区域负责 Mg^{2+} 的结合,此外,在体外的功能测定中发现h-PRUNE在无金属离子(图2, E幅)或低金属离子浓度(图2, F幅)的条件下也有作用。

已证实h-PRUNE和nm23s蛋白水平在肉瘤和乳腺癌肿瘤中是不平衡的,这提示h-PRUNE可能对nm23-H1的抗转移功能进行负调节。h-PRUNE表达的增加与这些肿瘤和癌症进展的侵袭性直接相关(Forus等, 2001)。由于一些报道推测nm23-H1的抗转移活性与NDPK活性无关(Steeg等, 1993, Wagner 1997),我们研究了h-PRUNE对细胞运动性的影响,而细胞运动性是癌症细胞迁移出原发瘤部位所需要的首要的细胞功能之一。

为了证明h-PRUNE的PDE活性与这些现象直接相关,在乳腺癌模型中过度表达h-PRUNE、h-PRUNE Δ 和h-PRUNE4D Δ , 则观察到野生型蛋白质的过度表达诱导细胞运动性,而其PDE功能的降低(h-PRUNE Δ 、h-PRUNE4D Δ)与细胞运动性的降低相符合。

相反,发现突变体h-PRUNE4D Δ 的PDE活性降低80%,MDA中的过度表达没有引起细胞运动性显著增加,这排除了其它潜在的h-PRUNE活性引起运动性增加的可能。

虽然没有其它表征了的细胞内PDE与细胞迁移相关,还是研究了MDA稳定克隆

中PDE活性的增加是否会促进细胞运动性。为此，在同样的细胞模型中过量表达PDE5A并测试了对细胞运动性的影响。通过其对双嘧达莫的灵敏性(IC_{50} 为 $0.9\ \mu\text{M}$)选择的PDE5A对MDA乳腺细胞的运动性没有影响，这表明只有h-PRUNE的PDE功能会引起乳腺癌细胞中的细胞运动性增加。

此外，观察到在高nm23-H1表达背景下的h-PRUNE过度表达表现出运动性下降的表型和与只过度表达h-PRUNE的细胞相比较低的h-PRUNE的PDE活性。然而，与nm23-H1的相互作用时在体外h-PRUNE的PDE活性提高(图4, A幅)，在体内没有观察到该效应。这些现象可以解释为与如果MDA-PRUNE克隆相比，大量的nm23-H1在MDA-H1-177-PRUNE中的存在(图3, B幅)。

这会对PRUNE-nm23H1复合物的形成产生负面影响，其形成可能依赖于不同的寡聚和/或经翻译后修饰的nm23-H1形式(例如，丝氨酸磷酸化)的存在(Steeg等，2003)。

为了证实作为h-PRUNE对nm23-H1的抗转移功能的负调节的水解是由于蛋白质-蛋白质相互作用而引起的PDE活性增加，我们研究了两种nm23-H1突变体对h-PRUNE的PDE活性的影响。这些蛋白质突变体是可以与h-PRUNE进行物理的相互作用的nm23H1-P96S和与h-PRUNE相互作用的nm23H1-S120G(Reymond等，1999)；两种突变体都在乳腺癌细胞(MDA-435)中转染，它们可以抑制nm23-H1野生型蛋白质的内源性抗运动性效应(Frije等，1997，MacDonald等，1996)。

另外，证明在例如nm23-H1-S120G的高nm23表达系统中过度表达h-PRUNE的乳腺癌细胞具有比在nm23-H1-P96S系统中过度表达h-PRUNE的细胞低的细胞运动性。

因此，进一步证明这两种蛋白质之间的物理相互作用可能促进运动性。此外，h-PRUNE-nm23-H1-S120G克隆的PDE活性比在过度表达h-PRUNE和nm23-H1-P96S的克隆中所观察的PDE值低近66%(图4, B幅)，这有力地说明蛋白质-蛋白质相互作用、h-PRUNE的cAMP-PDE活性和细胞运动性效应之间的相关性。

为了了解已知的PDE抑制剂是否能够选择性地作用于h-PRUNE的PDE活性，对一组8种PDE抑制剂进行了测试，并发现双嘧达莫能够以突出的 IC_{50} 值抑制h-PRUNE的PDE活性。

此外，双嘧达莫的使用显著地降低稳定的h-PRUNE乳腺克隆的运动性，在h-PRUNE Δ 过度表达的克隆中其幅度较小(图5, B幅)。普遍认为例如双嘧达莫的抗凝剂以及类似的药物通过抑制细胞对毛细血管壁的粘附而起到干扰凝血途径激活的作用。根据本文报道的结果，有理由认为双嘧达莫能够作为扩散的乳腺癌转移的预

防和治疗药物使用。

另外，在体外观察到的细胞运动性活化的数据在体内通过使用大量来自TxNxM1患者的乳腺癌组织得到证实。在59个出现肿瘤远距离转移的病例中，22个病例(37%)中发现h-PRUNE的拷贝数得到扩增并过度表达，而发现在所有分析的病例中nm23-H1都在较低水平表达(图6, B, C, D幅)。

原始数据显示h-PRUNE在乳腺癌中的负预后作用，这由h-PRUNE过度表达的患者中统计上显著的总存活率的降低推断得到。所示数据说明h-PRUNE增量调节转移所涉及的基因，其体内活性增加了更具侵袭性的肿瘤活动的危险，这在乳腺癌患者中造成对临床结果的负面作用。所报道的数据具有重要的药理学价值，即有可能提供可以选择性抑制h-PRUNE的PDE活性的药物，用于乳腺癌治疗，以阻断h-PRUNE促转移的恶性功能。而且，如果相比MDA-H1-177克隆，在乳腺MDA-H1-177-PRUNE(克隆#18)中其表达被改变，这通过芯片表达分析得到，并经实时PCR证实。所示结果也进一步证明MDA乳腺癌细胞系的侵袭性和转移潜力与h-PRUNE的过度表达相关(实施例2)。

综上所述，这些结果强调了h-PRUNE促进细胞运动性和负影响nm23-H1抗转移功能的转移的作用。用于研究h-PRUNE在癌症进展中的作用的模型一般要求在肿瘤细胞中扩增。

在细胞质区室该扩增引起h-PRUNE的PDE活性增加，这负影响了nm23的转移功能的抑制基因。h-PRUNE的PDE活性的活化是由于与nm23-H1蛋白的物理相互作用；复合物形成引起游离的nm23-H1形式水平的实质性减少，这影响了细胞增殖、细胞运动性和转移过程(图7)。

实施例3:在侵袭性乳腺癌的诊断中h-PRUNE过度表达作用的研究

材料与amp;方法

患者

在本研究中，包括诊断为乳腺癌并经组织学检查证实的患者。经当地伦理委员会的批准，病例分别来自瑞士的巴塞尔大学医院和Sassari大学的病理学研究所的两个档案。第一个档案包括1531例侵袭性导管癌、310例侵袭性小叶癌、69例粘液癌、65例管癌、48例髓样癌和86例其它类型的侵袭性癌症。因此，福尔马林固定、石蜡包埋的肿瘤样本取自巴塞尔大学医院病理学研究所；巴塞尔临床病理学研究所；和苏黎世Triemli医院。第二个档案包括307例侵袭性导管癌、69例侵袭性小叶癌、12例粘液癌和24例其它类型的侵袭性癌症。

从巴塞尔和Sassari的记录得到了每个患者的所有临床病理学特征，包括诊断时所处疾病阶段、治疗、复发、治愈存活和最后控制的时间。

病理学阶段、肿瘤直径和结状态从初期的病理学报告得到。2299个病例有跟踪10年后的临床数据(中位数, 56个月; 范围, 2-120个月); 222个病例有跟踪15年后的临床数据(中位数, 138个月; 范围, 121-176个月)。本研究对标本和数据的使用得到巴塞尔大学医院和Sassari大学的伦理委员会的批准。

多组织阵列(TMA)

TMA构建如前所述(Simon等, 2001; Simon等, 2002)。简而言之, 使用半自动遥控的精密设备, 从组织供体的代表性的肿瘤区域挖取直径0.6mm的组织圆柱体, 放在6块不同的石蜡块上, 每一块包含342~522个独立样本。将得到的TMA块的4块测微切片转移到包覆的切片系统(Instrumedics Inc., Hackensack, New Jersey)。通过苏木精-伊红染色证实肿瘤组织在多阵列样本上的存在。组织微阵列包括来自每个患者的乳腺癌不同区域的至少2块切片, 以及作为对照的正常组织。

免疫组织化学(IHC)

福尔马林固定、石蜡包埋的组织切片使用抗h-PRUNE特异性单克隆抗体(克隆4G3/4, 针对重组融合蛋白1~351位氨基酸; Apotech Corporation, CH)和抗nm23-H1抗体(克隆K73, -H1同种型特异性; Apotech Corporation, CH)进行免疫学染色。免疫组织化学分析使用Vectastain Elite ABC试剂盒(vector Laboratories Inc.)按照制造商的说明和已知的方案(Forus等, 2001; D'angelo等, 2003)进行。

通过对代表性的健康乳腺组织的对照组织病理学切片染色来确立优化的IHC方案。在正常的乳腺组织中, nm23-H1蛋白被均一地表达, 而h-PRUNE的表达缺少或强度低。

使用54个随机双份放置的多阵列上的正常样本对染色进行半定量的评价; 使用免疫组织化学染色的强度和分布将肿瘤样本对h-PRUNE和nm23表达分为阳性(强[+++]到中度[++]染色, 均匀分布或在大多数的肿瘤细胞中呈现)或阴性(无或弱染色[+])。

FISH分析

按照已知的方案对石蜡包埋的TMA切片进行处理(Simon等, 2002; Muresu等, 2002)。

跨越位于染色体1q21.3上的h-PRUNE基因区域的PAC 279-H19克隆和对位于染色体17q21.3上的nm23-H1基因特异的DNA/BAC克隆通过使用dUTP-CY3(红)的切口平

移标记,并用作探针。对应于染色体1q12上的着丝粒周区域的pUC177和对应于染色体17的着丝粒区域的pZ17-14克隆通过使用dCTP-FluorX(绿)的切口平移进行标记并用作对照。

核用4',6-二脒基-2-苯基-吲哚(DAPI)进行复染。每个病例进行二个独立的试验。

使用配备适合DAPI、Cy3(orange)或FluorX(Vysis)的滤光器和COHU Video和Cytovision软件的Olympus BX-61落射荧光显微镜拍摄数码照片。在至少10个完整保存并且非重叠的核上的杂交信号由至少两名独立的研究人员进行评价。

统计分析

本研究包括以下的变量和类别:病理学原发瘤尺寸(pT)、病理学结状态(pN)、转移的存在(M)、雌激素及孕酮受体(分别为ER和PR)状态、诊断时的年龄、组织学肿瘤类型和总存活(从外科手术的时间起计算)。尤其是,由于对研究中涉及的患者没有要求这些变量,在大量的病例中没有获得结和受体状态的数据。

使用统计程序包Egret(版本2.0.3)进行存活数据分析。使用未处理的死亡率和肿瘤特定的死亡率作为检验,采用Cox回归模型。

总的存活时间以月计,独立的变量(h-PRUNE、nm23-H1、pT、pN)被分为三个年龄组:23-44(N=252)、45-64(N=1146)和65-98(N=1123)。

通过h-PRUNE和nm23-H1免疫组织化学数据的细分,进行Kaplan Meier估计。

使用皮尔逊卡方检验,结合病理学参数(组织学肿瘤类型、pT、pN、M、ER、PR)进行h-PRUNE和nm23-H1表达的评价。计算样本比例分析的确切系数来确定所有的有意参数(低于0.05水平)。所有分析使用针对Windows的SPSS/7.5统计程序包进行。

结论

对包括组织学上证实的乳腺癌诊断和有用的跟踪数据的来自2109名患者的档案中的组织的TMA切片,进行对于h-PRUNE和nm23-H1表达水平以及h-PRUNE染色体拷贝数的评估。对另外的来自412名乳腺癌患者(即有TNM分类的)的TMA切片评价h-prune免疫染色。大多数的患者作为组织变异有导管癌(1888;73%),在诊断时超过60岁(1425;57%)。每个患者的可获得临床跟踪的数据涵盖中位数为59个月的范围(范围2-176个月);研究期间大多数的患者依然健在(1717;68%),在跟踪中仅很少的病例故逝(12;0.5%)。h-PRUNE和nm23-H1蛋白的表达通过使用两种特异性抗体(分别为4G3/4和K73单克隆抗体克隆)的免疫组织化学分析进行评价。图9(A和B

幅)展示了一系列多组织阵列中h-PRUNE蛋白染色的代表性例子。

在2463例被检测的肿瘤(58例未评估)中的大多数(1340;54%)中观察到h-PRUNE蛋白的强阳性的细胞质的免疫染色(称作h-PRUNE+);在2061例被检测的肿瘤中的615例(30%)中观察到nm23-H1蛋白的阳性的细胞质的免疫染色。在2061例评价了h-PRUNE和nm23-H1表达的肿瘤组织中,观察到阳性免疫染色的逆分布[1180例(57%)乳腺癌为h-PRUNE+,而615例(30%)为nm23-H1+]。表3中报告了侵袭性乳腺癌中存在的h-PRUNE和nm23-H1蛋白的免疫组织化学分析(IHC)的结果。h-PRUNE和nm23-H1的表达间没有发现统计上的相关性。

表 3

IHC分析	nm23-H1		总计	P
	阳性	阴性		
h-PRUNE阳性	359(30%)	821(70%)	1180	0.219
h-PRUNE阴性	256(29%)	625(71%)	881	

在基于不同的组织病理学参数的患者的小组(2109名乳腺癌患者)中进行h-PRUNE和nm23-H1的蛋白质表达的分布的评价。h-PRUNE或nm23-H1的表达与肿瘤类型(管癌对小叶癌)、pT、pN、ER和PR活性间没有发现显著的相关性(表4)。

表 4

肿瘤参数		h-prune			h-prune		总计	P
		阴性	阳性		阴性	阳性		
原发瘤 尺寸	T ₁	319 (42%)	440 (58%)	T ₁₋₂	765 (44%)	985 (56%)	1750	0.63
	T ₂	446 (45%)	545 (55%)					
	T ₃	54 (45%)	65 (55%)	T ₃₋₄	160 (45%)	196 (55%)	356	
	T ₄	106 (45%)	131 (55%)					
分级	G1	211 (40%)	323 (60%)	G ₁₋₂	584 (41%)	831 (59%)	1415	0.13
	G2	373 (42%)	508 (58%)					
	G3	336 (48%)	357 (52%)	G ₃	336 (48%)	357 (52%)	693	
组织学 类型	导管癌	621 (42%)	865 (58%)				1486	0.42

	小叶癌	117 (40%)	174 (60%)				291	
	其它	125 (49%)	131 (51%)				256	
ER	+	649 (42%)	882 (58%)				1531	0.37
	-	204 (44%)	259 (56%)				463	
PR	+	279 (43%)	369 (57%)				648	0.34
	-	523 (42%)	714 (58%)				1237	

对来自乳腺癌患者的1016例肿瘤进行了荧光原位杂交(FISH)分析。对应于位于染色体1q21.3的h-PRUNE基因组区域的PAC克隆(279-H19)和对应于位于染色体1q12的着丝粒周区域的对照克隆被用作探针。173(17%)的病例中,在大于20%的被分析的细胞核中的1q21.3发现了多重FISH信号(表5;图9C)。考虑到有至少两个着丝粒基因拷贝的病例和由于多个着丝粒信号而具有整个染色体1的多体性的乳腺癌,在染色体1q21.3发现非常低水平的h-PRUNE扩增(1016例中68例;6.7%)。这表明基因扩增机制在少数乳腺癌病例中发生。h-prune基因组区域的DNA拷贝数的增加与具有三体($p=0.027$)或四体($p=0.033$)的肿瘤的阳性h-prune免疫染色的存在显著地具有有效的统计学相关(表5)。然而,这种细胞遗传学变化的低频率提示乳腺癌中所涉及的可选的病理遗传学途径决定h-PRUNE活化和h-prune的体细胞表达增加。

表 5

标记	数量	二体	%	三体	%	P	四体	%	P
h-prune 阴性	440	386	88	54	12		21	4.8	
h-prune 阳性	576	457	79	119	21	0.027	47	8.2	0.033
受试 总计	1016	843	83	173	17		68	6.7	

*:对应于位于染色体1q21.3的h-PRUNE基因的PAC克隆杂交后,在大于20%的被分析的细胞核中的多重信号; **:也包括整个染色体1的扩增; 数量:病例数; P:卡方检验。

h-prune和临床病理学参数间的相关性

为了评价h-PRUNE过度表达在乳腺癌中的临床病理学作用,使用2109例乳腺癌病例的系列(具有所有的病理学原发瘤信息和多达15年的临床跟踪数据;表4)和412例乳腺癌病例的系列(具有完整的TNM分类和多达10年的临床跟踪数据;表6),对侵袭性原发乳腺肿瘤进行免疫组织化学分析。

表 6

TNM		h-prune			h-prune		总计	P
		阴性	阳性		阴性	阳性		
肿瘤 尺寸	T ₁	83 (58%)	59 (42%)	T ₁₋₂	170 (58%)	122 (42%)	292	0.099
	T ₂	87 (58%)	63 (42%)					
	T ₃	11 (44%)	14 (56%)	T ₃₋₄	26 (47%)	29 (53%)		
	T ₄	15 (50%)	15 (50%)					
结状态	N ₀	125 (71%)	50 (29%)	N ₀₋₁	230 (68%)	109 (32%)	339	0.017
	N ₁	105 (64%)	59 (36%)					
	N ₂	6 (30%)	14 (70%)	N ₂₋₃	6 (27%)	16 (73%)		
	N ₃	-	2 (100%)					
转移	M ₀	210 (67%)	103 (33%)				313	0.029
	M ₁	14 (36%)	25 (64%)				39	

P:皮尔逊卡方检验; 双尾; 95%置信区间;

还通过免疫组织化学分析对来自2109患者的亚组的肿瘤切片的nm23-H1表达进行了研究(表7)。

表 7

肿瘤参数		nm23-H1			nm23-H1		总计	P
		阴性	阳性		阴性	阳性		
尺寸	T ₁	489 (68%)	226 (32%)	T ₁₋₂	1162 (69%)	985 (31%)	1679	0.27

	T ₂	673 (70%)	291 (30%)					
	T ₃	86 (45%)	31 (26%)	T ₃₋₄	254 (73%)	94 (27%)	348	
	T ₄	168 (73%)	63 (27%)					
分级	G1	360 (69%)	159 (31%)	G ₁₋₂	937 (68%)	434 (32%)	1371	0.14
	G2	577 (68%)	275 (32%)					
	G3	501 (74%)	179 (26%)	G ₃	501 (74%)	179 (26%)	680	
组织学	导管癌	1031 (69%)	455 (31%)				1486	0.68
	小叶癌	201 (69%)	90 (31%)				291	
	其它	167 (65%)	89 (35%)				256	
ER	阳性	1076 (71%)	447 (29%)				1523	0.41
	阴性	329 (70%)	142 (30%)				471	
PR	阳性	449 (69%)	203 (31%)				652	0.27
	阴性	871 (71%)	362 (29%)				1233	

P: 皮尔逊卡方检验; 双尾; 95%置信区间; ER, 雌激素受体状态; PR, 孕酮受体状态。

这后一亚组无法对远距离转移的存在提供信息; 通过淋巴结受累的存在(N+)或不存在(N-)可以部分得到这些乳腺癌患者的结状态信息(在210/482[44%]N+病例和179/496[36%]N-病例中观察到阳性h-prune免疫染色, P=0.109; 类似地, 这两组中没有发现nm23-H1+免疫染色的统计学相关性)。因此, 每个参数的预后值在存活分析的基础上确定。

2002年12月, 782名(31%)患者因病去世, 通过健在的患者的72个月的跟踪, 总体存活时间的中位数为59个月。使用皮尔逊卡方检验, 评价h-prune和nm23-H1免疫染色与一些病理学参数的关系: 组织学类型、肿瘤率(由Elston和Ellis标准化)、pT、ER、PR和(如果可以得到)pN及M。没有发现h-prune或nm23-H1的表达与肿

瘤类型(导管癌对小叶癌)、组织学分级、pT、ER及PR活性间有统计学上显著的相关性(表4)。然而,在412名乳腺癌患者的系列中,阳性的h-prune免疫染色与晚期的结状态(N₂₋₃组; p=0.017)或远距离转移的存在(M₁组; p=0.029)显著地相关(表6)。这一系列的统计分析证实h-prune过度表达与原发瘤尺寸没有任何显著联系(表6)。

使用按照疾病阶段和诊断的年龄调整了的Cox模型,没有发现h-prune的过度表达(HR 0.61, 95% CI 0.31-1.18, p=0.144)或nm23-H1(HR 0.98, 95% CI 0.90-1.07, p=0.158)的预后值(表8和9; 图10)。

表 8

对2109名乳腺癌患者的统计分析			
标记*	危险率	95% CI	P
h-PRUNE (阴性或阳性)	0.93	0.78-1.09	0.369
nm23-H1 (阴性或阳性)	0.98	0.90-1.07	0.158
肿瘤尺寸 (pT ₁ 对pT ₂₋₄)	0.81	0.68-0.96	0.017
肿瘤分级 (G ₁ 对G ₂₋₃)	0.70	0.59-0.83	0.001

表 9

标记*	危险率	95% CI	P
h-prune (阴性对阳性)	0.61	0.31-1.18	0.144
肿瘤尺寸 (pT ₁₋₄)	12.49	4.10-38.02	<0.001
结状态 (pN ₀₋₃)	2.43	1.34-4.40	0.003

综上所述,在该系列的乳腺癌患者中,肿瘤等级、原发瘤尺寸和腋窝淋巴结状态保持与预后密切相关的参数(表8和9)。

总之,因此h-prune标记与晚期的乳腺癌状态相关,可以认为是淋巴结状态从N1到N1状态的过程中的新标记。

实施例4:对抑制引起h-prune的cAMP-PDE活性的体内抑制的NM23 H1和H2磷酸化和具有h-prune的复合物形成的IC261的研究

材料与amp;方法

研究表明nm23H1和H2蛋白在体外和体内被酪蛋白激酶1 δ 磷酸化,并且磷酸化介导复合物的形成(图11)。

方法-体外

进行体外磷酸化、相互作用测定,并产生磷酸-nm23抗体。纯化的重组nm23及其突变体以100ng的量在Garzia等(2003)所述的CKI标准反应缓冲液中于30℃孵育1

小时。然后，nm23磷酸化蛋白在添加5%BSA的co-IP标准缓冲液中与h-prune孵育。H-prune蛋白用针对h-prune的基序III区域上的肽的多克隆抗体A59进行免疫沉淀。通过随后对免疫沉淀物的蛋白质印迹分析，检测到磷酸化或没有结合h-prune的nm23的不同突变体的存在，免疫沉淀使用同时检测h-prune和nm23蛋白的抗His尾抗体(Qiagen)。

使用来自nm23-H1蛋白的在S122位磷酸化的N115~E127的磷酸肽作为免疫原得到K73多克隆抗体，在非选择性抗体中生成的蛋白质A的柱上纯化IgG，并进一步在用作免疫原的磷酸肽(NIIHGSDSVKSAE)上进行亲和纯化后使用抗血清。按照制造商的方案，通过与Affi-凝胶25树脂(biorad)溶解在DMSO中的1mg脱盐磷脂的交联进行该第二步。然后，将偶联的树脂用于使用磷酸化、经纯化且富含IgG肽的K73多克隆抗体免疫的兔的血清的亲和纯化，直接用于Affigel结合的肽柱上，直到抗体被柱完全吸附。每ml柱分别用10ml的pH8的100mM Tris-HCl、10ml的500mM NaCl的pH8的10mM Tris-HCl、10ml的10mM Tris-HCl洗涤。用pH3的0.1M甘氨酸洗脱。

方法-体内

原位蛋白质消化和MALDI分析

从Sigma购得胰蛋白酶、二硫苏糖醇和碘乙酰胺。99%纯度的三氟乙酸(TFA)-HPLC来自Carl Erba。所有其它具有最高纯度的试剂和溶剂可以从Baker得到。

对在milliQ水梯度中洗涤2次、从SDS凝胶上割下的考马斯亮蓝染色的蛋白质进行分析。首先，用CAN对割下的染色物进行洗涤，然后用0.1M碳酸氢铵洗涤。然后，除去溶液，重复洗涤2次。通过于56°C在二硫苏糖醇(DTT)中孵育45分钟，将蛋白质样本还原。如前所述，通过用ACN/AMBIC洗涤，除去还原缓冲液。在黑暗中，通过于室温在55mM碘乙酰胺中孵育30分钟，将游离的半胱氨酸烷基化。用碳酸氢铵和ACN洗涤凝胶微粒。在pH8.0的10mM碳酸氢铵中用胰蛋白酶(12.5ng/ μ l)进行消化。凝胶片在4°C下孵育4小时。任何，除去胰蛋白酶溶液，加入新的等量的缓冲溶液；样本在37°C孵育18小时。使用足以完全凝胶再水化的最小反应体积。然后，通过在室温下用10mM碳酸氢铵和溶解在50%CAN中的0.1%TFA洗涤凝胶微粒提取肽。

使用Applied Biosystem Voyager DE-PRO设备和新的Voyager MALDI TOF/TOF质谱仪记录MALDI-TOF质谱。将肽和 α -氰基-羟基氰酸(10mg/ml的ACN溶液/0.1%TFA水溶液，体积比2:1)的混合液加入到金属盘，在室温下干燥。使用外标进行质量校准。使用制造商提供的软件分析最初的数据，以单同位素质量表示。

图3所示的结果说明不存在磷酸化，位点上的nm23H1和nm23H2蛋白不会与h-prune形成复合物。

对h-prune过度表达克隆的细胞运动性研究

对IC261产生的抑制的研究

分别用8 μ M双嘧达莫或50 μ M IC261(酪蛋白激酶 I δ 和 ϵ 抑制剂; Calbiochem, Nottingham, UK) 对MDA-PRUNE#3及MDA-PRUNE#4细胞克隆和MDA-435 C-100细胞(对照细胞)处理24小时或8小时。然后,使用0.5%胎血清FCS浓度作为化学引诱剂对“波伊登小室(Boyden chamber)”细胞进行细胞运动性测定。然后,在显微镜下计数细胞,对得到数据进行统计分析(图13A)。

显微镜下计数细胞,细胞运动性值为5个独立测验的算术平均 \pm SD,试验重复进行(MDA克隆prune#3和#4/IC261处理的MDA克隆prune#3和#4, $p < 0.002$)。

体内细胞运动性测定

如D'Angelo等2004所述得到稳定的h-prune过度表达MDA克隆。在细胞运动性测定中使用对照的MDA-C100乳腺癌细胞系(Leone等, 1993a; Lenoe等, 1993b)。细胞运动性使用穿孔技术(6孔, Corning-Costar)进行测定,使用最终浓度为0.5%的FCS作为化学引诱剂(参见D'Angelo等, 2004)。体内h-prune抑制运动性测定如下进行。MDA-prune(克隆#3和#4)和MDA-C100用双嘧达莫(8 μ M, 其 IC_{50} 的10倍浓度)孵育24小时使酶完全钝化,同样的细胞系用IC261以50 μ M的浓度孵育8小时,该条件下,没有出现细胞凋亡信号而nm23磷酸化达到最大幅度的下降,然后如上所述地重复运动性测定。所有结果为5个独立试验的平均值,每个试验都重复进行。用在网站<http://www.graphpad.com/quickcaics/index.cfm>获得的改良的t检验方法进行统计分析, $P \leq 0.05$ 的值被认为是统计上显著的。

在IC261施用情况下的h-prune过度表达细胞中cAMP-PDE的总容量的研究

MDA-Prune#4细胞直接或用50 μ M IC261处理8小时后使用。然后,将细胞溶解,并用Amersham的“闪烁近似测定”方法对它们的cAMP-PDE的总容量进行测定。IC261存在下,没有检测到重组的h-prune的cAMP磷酸二酯酶活性的改变(图13B, 右),而在prune过度表达的MDA-prune#4克隆中显示出灵敏地降低cAMP-PDE活性的总容量的能力,这表明h-prune和nm23复合物引起细胞PDE-cAMP增加,而该复合物可以在体内被IC261抑制。

对cAMP的A. PDE活性测定

用闪烁近似测定来测定PDE活性(Amersham-Pharmacia Biotech)。样本为

20 μ g MDA-prune#4的总提取物，MDA-C100提取的用作对照，将它们于30°C在含有所需浓度的cAMP底物(未标记与 3 H标记的比为3:1)的100 μ l测定缓冲液(50mM Tris-HCl[pH 7.4], 8.3mM MgCl₂, 1.7mM EGTA)中孵育。包括仅缓冲液的空白试验的所有反应重复3次，可以给予孵育的时间，让<25%的底物周转(根据经验确定)。通过加入50 μ l硅酸钼SPA珠(Amersham)终止反应。酶活性根据按照制造商的方案检测的同位素标记的产物的量来计算。使用IC261的处理与前述的运动性测定相同。

结论

得到的结果显示，在体内通过用IC261抑制酪蛋白激酶1 δ ，可能抑制nm23-H1和H2的磷酸化，并因而抑制与h-prune蛋白结合。通过使用该药物，可能抑制h-prune-nm23复合物的形成，这最后依赖于酪蛋白激酶 I 在8120、8122、8125区域(NIIHGSDSVESAEKE)的磷酸化。本研究实现将IC261用于抑制nm23-H1和H2与h-prune的结合，以及抑制由该蛋白质复合物诱导的细胞运动性。

新的工序可以预期新的肽的应用，该肽可渗透在细胞中，对h-prune的结合具竞争性，占据体内有限的磷酸化的nm23-H1和H2，其序列来源于8120、8122、8125位丝氨酸的范围的nm23-H1和H2的氨基酸序列(例如，H1:NIIHGSDSVESAEKE后接HIV TAT蛋白区域的可渗透的肽序列GGGYGRKKRRQRRR;以95%的纯度由PRIMM合成)。这样或类似的肽可以在体内与酪蛋白激酶 I 对H1和H2野生型蛋白质的磷酸化竞争，减低有限的磷酸化nm23，这些nm23可与h-prune形成复合物，增加细胞内h-prune的cAMP-PDE活性，最终诱导细胞运动性。还合成具有酪蛋白激酶 I 的识别序列的对照肽(H1-:SDEIGKVSENIAHSE后接可渗透的肽序列GGGYGRKKRRQRRR)。使用该技术，可以更特异性地抑制体内h-prune和nm23之间的相互作用。

实施例5:抗h-prune的单克隆抗体的制备(4G3/4, 于10/12/2004保藏在热那亚的CBA)

凝胶纯化在大肠杆菌中通过pMaltose载体产生在N末端融合了一个尾部的h-prune蛋白。对小鼠免疫5周(每次注射100 μ g蛋白质)，取出脾脏用于制备一些杂交瘤培养物。需要大约2mg的蛋白质抗原用于免疫和分析。如果蛋白质无法得到，Primm可以提供用于免疫的结合的合成肽。单克隆抗体的形成和生产分为不同阶段:

- 肽合成和肽结合(如果需要)
- 约10mg肽的合成，纯度>70%
- 3~4mg肽与载体蛋白的结合(作为抗原)

-1~2mg肽与用于ELISA筛选的不同载体蛋白的结合

阶段 I (1.5个月)

用抗原免疫三只BALB/c小鼠。对免疫的动物血清中的特异性免疫球蛋白进行定量滴定。进行免疫应答的ELISA测定，选择用于后续脾细胞融合的动物。

阶段 II (2个月)

切取脾脏，融合脾细胞和骨髓瘤细胞；通过ELISA进行杂交筛选，冷冻大部分阳性克隆。

阶段 III (1-1.5个月)

通过有限稀释进行阳性克隆(1/2或4)的克隆和亚克隆。冷冻杂交瘤(2等份/克隆)。解冻1份克隆，进行生活力、生产率和稳定性测定。

阶段 IV (1-1.5个月)

在来自0.5l上清的细胞培养物中生产和纯化0.5-4mg任意mAb。

筛选的杂交瘤生产出纯化自杂交瘤培养物上清的大鼠IgM。用于免疫细胞化学的mAb的量为1:100稀释至300ug/ml的mAb溶液。抗体作用和识别人和大鼠的prune。内源性蛋白质的检测使用ICC、IF和蛋白质印迹(图14)。

抗体纯化按照以下的IgM纯化方案进行：溶解的细胞的上清以1ml/min流动。HiTrap IgM(1ml, Amersham-Pharmacia)的平衡使用5体积的20mM磷酸钠、0.8M(NH₄)₂SO₄、pH7.4(缓冲液A)；5体积的20mM磷酸钠、pH7.4(缓冲液B)；5体积的20mM磷酸钠、30%异丙醇、pH7.4(缓冲液C)。对肽和纯化了的整个蛋白质进行ELISA测定，确定生产的抗原和克隆筛选的特异性。

将杂交瘤上清导入柱中，使用3种缓冲液重复洗脱三次，即：用15体积的缓冲液A(15ml)洗涤柱；用12体积(12ml)的缓冲液B(1ml馏分收集)洗脱柱；测定馏分在280nm的吸收，收集吸光度<0.10.D.的馏分；在4℃下，将馏分用具有截断装置的管以1×PBS缓冲液在12000-14000的范围内透析过夜。用7ml的缓冲液C将柱再生。柱保存在缓冲液B+20%乙醇中。

参考文献

-Aravind, I. 和 Koonin, E. V. (1998). Trends in biochemical sciences 23, 17-19.

-Timmons, L. 和 Shearn, A., (1996). Genetics 144, 1589-1600.

-Lombardi, D., Lacombe, M. L. 和 Paggi, M. G., (2000). J. Cell Physiol 182, 144-149.

-
- Keen, J. C., Davidson, N. E., (2003). *Cancer* 97, 825-833.
 - Domchek, S. M., Weber, B. L., (2002). *Curr Opin Oncol* 14, 589-593.
 - Kuru, B., Camlibel, M., Ali Gulcelik, M., Alagol, H., (2003). *J. Surg. Oncol* 83, 167-172.
 - Morabito, A., Magnani, E., Gion, M., (2003). *Clin Breast Cancer* 3, 381-390.
 - Florenes, V. A., Aamdal, S., Myklebost, O., Maelandsmo, G. M., Bruland, O. S. 和 Fodstad, O., (1992). *Cancer Res* 52, 6088-6091.
 - Steeg, P. S., (2003). *Nat Rev Cancer* 3, 55-63.
 - Frejcie, J. M., Blay, P., Macdonald, N. J., Manrow, King. 和 Steeg, P. S., (1997). *J Biol Chem* 272, 5525-5532.
 - Hartsough, M. T., Clare, S. E., Mair, M., Elkaloun, AG., Sgroi, D., Osborne, C. K., Clarke, G. 和 Steeg, P. S. (2001). *Cancer Res* 61, 2320-2327.
 - Frejcie, J. M., Lawrence J. A., Hollingshead M. G., De la Rosa, A., Narayanan, V., Grever, M., Sausville, E. A., Paull, K. 和 Steeg P. S. (1997). *Nat Med* 3, 395-401.
 - Kantor, J. O., McCormick, B., Steeg, P. S. 和 Zetter, B. R., (1993) *Cancer Res* 53, 1971-1973.
 - Leone A, Flatow, U., Van Houtte K, 和 Steeg P. S. (1993). *Oncogene* 8, 2325-2333.
 - Howlett, A. R., Petersen, O. W., Steeg, P. S. 和 Bissell M. J., (1994) *J Natl Cancer Inst* 86, 1838-1844.
 - Hartsough, M. T., 和 Steeg P. S., (1998). *Am J Hum Genet* 63, 6-10.
 - Lombardi D., L. M. L., Paggi M. G., (2000), *J. Cell Physiol.* 182, 144-149.
 - Hartsough, M. T., 和 Steeg P. S., (2000). *J. Bioenerg Biomembr* 32, 301-308.
 - Mao, H., Liu, H., Fu, X., Fang, Z., Abrams, J., 和 Worsham, M. J. (2001). *Int J Oncol* 18, 587-591.
 - Tseng Y. H., Vicent, D., Zhu, J., Niu, Y., Adeyinka, A., Moyers, J. S., Watson, P. H., 和 Kahn, C. R. (2001). *Cancer Res* 61, 2071-2079.
 - Reymond A, Valorio, S., Merla, G., Al-Maghteh, M., Zuffardi, O., Bulfone A, Ballabio A, 和 Zollo, M., (1999). *Oncogene* 18, 7244-7252.
 - Forus A, D' Angelo A., Henriksen, J., Merla, G., Maelandsmo, G. M.

Florenes, Y. A., Olivieri S., Bjerkehagen, B., Meza-Zepeda, L. A., Del Vecchio Blanco, F., Muller, C., Sanvito F., Kononen, J., Nesland, J. M. Fodstad O., Reymond A, Kallioniemi, O. P., Arrigoni G., Ballabio A, Myklebost, O., 和 Zollo M. (2001). *Oncogene* 20, 6881-6890.

-Altshul, S. F., Madden, T. L., Schaffer A. A., Zhang Z., Miller W., 和 Lipman, D. J. (1997). *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402.

-Notredame C., Higgins D. G., 和Heringa J., (2000). *J Mol Biol* 302 205-217.

-Macdonald, N. J., Freije, J. m. p, Stracke, M. L, Manrow R. E., 和 Steeg, P. S. (1996). *J. Biol Chem* 271, 25107-25116.

-Garzia, L, Andre A., Amoresano, A., D'Angelo, A., Martusciello R, Cirulli, C., Turumi, T, Marino G. 和 Zollo M., (2003). *Biotechniques* vol 35, 384-391.

-Fisher D. A, Smith, J. F., Pillar, J. S., St Denis, S. H. 和Cheng, J. B. (1998). *J Biol Chem* 273, 15559-15564.

-Leone, A., Seeger R. C., Hong C. C. M., Hu, Y. Y., Arboleda M. J. Brodeur G. M., Stram, D., Slamon D. J., 和Steeg, P. S. (1993). *Oncogene* 8, 855-865.

-Yamagata, A., Kakuta, Y., Masui, R和Fukuyama, K(2002). *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 5908-5912.

-Ahn, S., Milner, A. J. Futterer, K, Konopka, M., Ilias, M., Young T. W. 和White S. A(2001). *J. Mol Biol* 313, 797, 811.

-Aravind L, 和Koonin EV. (1998). *Trends Biochem Sci* 23, 469-472.

-Aravind L, 和Koonin EV. (1998). *Nucleic Acids Res* 26, 3746-3752.

-Galperin M. Y., Natale D. A, Aravind L, 和 Koonin EV. (1998). *J. Mol Microbiol Biotechnol* 1, 303-305.

-Aravind L., (1999). *In Silico Biol* 1, 69-91.

-Hejna, M., Raderer M., 和 Zielinsky, C. C. (1999). *J Natl Cancer Inst* 91, 22-36.

-Stteg, P. S., De la Rosa, A., Flatow, U., Macdonald N. J., Benedictc M., 和 Leone A., (1993). *Breast Cancer Res Treat* 25, 175-187.

-Wagner, P. D., Steeg, P. S. 和 Vu, N. D. (1997). *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 9000-9005.

-Simon, R, Nocito, A. , Hubscher, T. , (2001). J. Natl Cancer Inst, 93, 1141-1146.

-Simon, R, Sauter, G. , (2002). Exp Hematol, 30(12), 1365-1372.

-D' Angelo, A. , Garzia, L, Andre, A. , (2003). Cancer Cell 2003.

-Muresu, R, Sini, M. C. , Cossu, A. , (2002). Eur J Cancer 38, 1802-1809.

<110> 马西莫·佐洛(Zollo, Massimo)
 <120> h-PRUNE的酶抑制剂在过度表达h-PRUNE的肿瘤转移的预防和治疗中的应用
 <130> PCT25791
 <150> RM2003 000572
 <151> 2003-12-11
 <160> 12
 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
 <223> h-PRUNE的正向引物
 <400> 1
 agagatcttg gacaggcaaa ct 22
 <210> 2
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
 <223> h-PRUNE的反向引物
 <400> 2
 ccatgttgac acagtccagg at 22
 <210> 3
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
 <223> h-PRUNE的6FAM探针
 <400> 3
 ctgcatggaa ccatc 15
 <210> 4
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 抗h-PRUNE单克隆抗体的抗原
 <400> 4
 Ala Leu Glu Glu Ala Val Ala Glu Val Leu Asp His Arg Pro Ile Glu
 1 5 10 15
 Pro Lys

<210> 5
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> h-PRUNE Δ 的引物

<400> 5
 gtagcagagg tgctagccgc tgcagccatc gagccgaaac ac 42

<210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> D28A h-PRUNE的引物

<400> 6
 gaagcctgtg ctttggactc c 21

<210> 7
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 106A h-PRUNE的引物

<400> 7
 accctcatcc ttgtcgctca tcatatctta tcc 33

<210> 8
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> D179a h-PRUNE的引物

<400> 8
 gaaccatcat cctggcatgt gtcaacatgg 30

<210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> h-prune H1的抑制剂

<400> 9
 Asn Ile Ile His Gly Ser Asp ser Val Glu ser Ala Glu Lys Glu
 1 5 10 15

<210> 10
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>

<223> h-prune H1的可渗透的抑制剂

<400> 10

Asn Ile Ile His Gly Ser Asp Ser Val Glu Ser Ala Glu Lys Glu Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 20 25

<210> 11

<211> 167

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> h-prune序列

<400> 11

Met Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Gly Ser Pro Val Glu Met
 1 5 10 15

Ala Asn Leu Glu Arg Thr Phe Ile Ala Ile Lys Pro Asp Gly Val Gln
 20 25 30

Arg Gly Leu Val Gly Glu Ile Ile Lys Arg Phe Glu Gln Lys Gly Phe
 35 40 45

Arg Leu Val Ala Met Lys Phe Leu Arg Ala Ser Glu Glu His Leu Lys
 50 55 60

Gln His Tyr Ile Asp Leu Lys Asp Arg Pro Phe Phe Pro Gly Leu Val
 65 70 75 80

Lys Tyr Met Asn Ser Gly Pro Val Val Ala Met Val Trp Glu Gly Leu
 85 90 95

Asn Val Val Lys Thr Gly Arg Val Met Leu Gly Glu Thr Asn Pro Ala
 100 105 110

Asp Ser Lys Pro Gly Thr Ile Arg Gly Asp Phe Cys Ile Gln Val Gly
 115 120 125

Arg Asn Ile Ile His Gly Ser Asp Ser Val Lys Ser Ala Glu Lys Glu
 130 135 140

Ile Ser Leu Trp Phe Lys Pro Glu Glu Leu Val Asp Tyr Lys Ser Cys
 145 150 155 160

Ala His Asp Trp Val Tyr Glu
 165

国际申请号：PCT/IT2004/000689

关于微生物保藏的信息

在说明书第8页第21行，第62页第33行提到了有关的微生物¹

A. 保藏鉴定

在附加页上指出了其它保藏物²

保藏单位姓名³

CBA, 中央生物技术保藏中心 (Centro Biotecnologie Avanzate)

保藏单位地址 (包括邮政编码和国家)⁴

Istituto Nazionale per la Ricerce Sul Cancro

16132 热纳亚 意大利

保藏日期⁵ 2004年12月9日 登录号⁶ PD040004

B. 附加指定⁷ (如不使用, 保持空白)。该信息续在另一附加页上

C. 作出指定的指定州⁸ (如果不指定所有州)

D. 另外附加的指定⁹ (如不用, 保持空白)

下面列出的指定将在以后递交国际局⁹ (载明指示, 如“保藏物登录号”)

E. 当提交时, 该页与国际申请一起收到 (由受理局核对)

(授权官员)

国际局收到日期 (从申请人)¹⁰

为

(授权官员)

PCT/RO/134 表 (1981 年 1 月)

国际申请号：PCT/IT2004/000689

关于微生物保藏的信息

在说明书第6页第20行，第60页第28行提到了有关的微生物¹

A. 保藏鉴定

在附加页上指出了其它保藏物²

保藏单位姓名³

CBA, 中央生物技术保藏中心(Centro Biotechnologie Avanzate)

保藏单位地址（包括邮政编码和国家）⁴

Istituto Nazionale per la Ricercce Sul Cancro

16132 热纳亚 意大利

保藏日期⁵ 2004年12月9日 登录号⁶ PD040005

B. 附加指定⁷（如不使用，保持空白）。该信息续在另一附加页上

C. 作出指定的指定州⁸（如果不指定所有州）

D. 另外附加的指定⁹（如不用，保持空白）

下面列出的指定将在以后递交国际局⁹（载明指示，如“保藏物登录号”）

E. 当提交时，该页与国际申请一起收到（由受理局核对）

（授权官员）

国际局收到日期（从申请人）¹⁰

为

（授权官员）

PCT/RO/134表（1981年1月）

A)

Rv2837c_Mc VGVVCHVHEPAGTIGAGLALALVLDGCG [35] VDLVTVVTPSPVDRLGMLG [6] RELVTDHHRASND [10] SADSTYTNVAEILDANGKPIDRVAHCIYAGIAKIDPTGSGFRWASV
 s111253_Sep DLALCHQDAFQVLAGRAVGLAKLHFGSR [34] IRLSLTVNQDQRLGQAA [8] RQVAIVYEHKASP [11] AVGASTTLIVELKQRADELSLWFSASVVALGHHVYTGUSLTFYQT
 MGA_Ng IYVHFHVREPGCLGAGQGLPHLLKANF [32] EALALVWANTYKRNLELRE [7] KAVLAKDHPHRED [11] SVVACCSQIVEMATVAKVTPPPVAATLIYIGIYVTSRFLYSNT
 YFQ1_Bs IILHRHVREPEAYGSGQGLYELRETY [30] GALVTVCTAMQERLDQR [4] AKLAKDHPHRED [13] SVSEMIYELSGKHEGHMLNTKAAELTYAGIVGTVGRFLFENT
 AF2029_Af LGIFTHDHPFSSKSSAYALREIARQFD [37] YDAFAIVLSSGRGVANSP [3] DISIVDDEHPAK [10] DWGNTATILTEYIKELKITSKILATALFQKESSTDFRKNTR
 M0977_Mj NKLIIVTHDTPGLTSRAILQKLAERLN [23] YDLIIFPAVGGSQLMHKE [11] DKILIDHPQPEE [18] GABICGAGSVLPAKAINWIDIDAKZAVIAGNCSIQMLEGKLI
 M1198_Mj RPHIIRHETDGYCGGILNLSKALIPYI [46] LPLVYLWANGSTEDIPAI [7] IEVIVDHPHFGEE [85] KGRYDRYELKTKALCHDFEAFYLRVMDGKIVDQIILATNIKEF
 HPI042_Hp MONTYHLSHLSLQVYACQLNSQFFRNQ [27] BELIANSALANLANEAYL [13] IQIQMLDHPHISGK [19] IYVEFLAKHYAILEPKYNTWLBPLVEMVNSVDIHTQGYGFEFG
 RecJ_H1 QKIVIVGDHPAGMSTALSLALRQLG [31] VQALMNVGVSSFDGVAF [5] IRVAVTDEHLPPE [33] LAVRAKPRELGIFFAETQPHFTDALLVALGTLAVPLDQMNK
 RecJ_Hp TELIVVGDYDAGVVISSAIWAKFFESLN [27] APLIIVVWNGINAFARAF [5] YTLIITDEKCLRH [27] LVAFYLCYGRHOLGKSKSHSELCLAGVATIDANPLTFFNR
 RecJ_Sep EKVYIWDPEFAGGITSVAVLWEGCLQFF [32] TELIIVVQVWNGINLDEIVY [5] MDVIVTDEHLPED [27] VAFKLYEALVNOYPTVYVQQLPELDLIDVVAIQIITLQVTLQDCCR
 YBQ_Bs ILIFGCHQMPSTGTCISALAVADLVKVLG [36] VGVWLVWVWENRQQSIDI [3] QVLEVTDHPHRLAN [12] FVGCATATILNMYKENVNVIKELKELAGLMLSHIISLSSLLFKSPTC
 ICRA_Sg ILVFGCHQMPSSALGSSVAFYALAREAY [36] AROVTLWVWENRQQSVAID [3] EYGVWVWENRAN [12] FVGSASSIYVRFKESVAVSKEIAGLMLSGHISGHTLLKSPPT
 Y608_Mj RYVWGHQRPSTGLASAVLAVFLDCYP [31] GKEIIVWVWENRQQSFDL [3] KLIATIDHPHVKGL [19] IAELYPKDAILDGGKKEKELKPKDLPKAGILLLSALISGHTVLRKSPPT
 AF0756_Af VYVYGHVREPEAYGSAIAPAYLAKHK [46] GKAVYALVWENRQQSVAID [3] EYVAVWENRQQS [12] FVGCATVTKLFDKTVGVEIPDIDTAGILLSSILSSHTVLRKSPPT
 U60409_Im TVYQNGEGGDPGSIWGCIVLWLEFDKQP [44] QIARHETDPAALNLSWVLY [14] RVVGVWENRQQS [11] LKTVGSACTIVTELYRECGEDVVCPTLLTARTVITVWVNFEPKQK
 PPK1_Sc TICWGNSSPDPGSIWGCIVLWLEFDKQP [44] ELANSTVWENRQQSVAID [2] NVVGDIDHPHFDLQ [14] SCSSILVFNWYKELQKQDREVVVWNIAPILKAGLIDTSMRRKVB
 PRUNE_Dm HLVWGNSSCLDLSAVSAVTLAFVYQRH [48] DWVWTLWVWENRQQSVAID [1] NVTEIDHPHFDLQ [18] SVGSCATLVQRYLAEDQKQDREVVVWNIAPILKAGLIDTSMRRKVB
 h-prune.1_Hs HWVLGNRQCSLDSVSAALAFVTLAKTT [52] QLTLLVWVWENRQQSVAID [2] AVAVTEIDHPHFDLQ [12] LVGSCATLVYERILQGAPELIDRTRTALLHGTIILQVWMDLKIIG

基序 4

基序 3

基序 2

基序 1

家族 1

家族 2



1

特异性基序

G1s
 Rv2837c_Mc [107] TVNLAAVASGFGCGGHRLANGYTTGS 1648883
 s111253_Sep [123] DTDLQTLLEFPYGGGQARAVNLRDV 1653244
 MGA_Ng [102] GINWZDIAIKYGGQQRNRSQALITWK 1045875
 YFQ1_Bs [103] GPVINGLARKUNGCGHPLASQASIVSN 2293259
 AF2029_Af [102] EYLRDAFGWGSMDRANRANGQIPLG 2648507
 M0977_Mj [254] AIKYASRKNVSGGGRKPKACGAYIPDN 2128614
 M1198_Mj [109] QLMBEIPEASLDGQHECAGSLKFEV 2128720
 HPI042_Hp [137] CWCELSQWCFNGGRRNWSGGKIDQF 2314198
 RecJ_H1 [168] RIHSQFANILAKFGGRNANRAGLSIRE 1172895
 RecJ_Hp [155] DALNGVSSILLYGQGRQACGLSVERN 2313437
 RecJ_Sep [165] ALLH5QRHMLGFGGRPPFAAGLSLPLD 1653638
 YBQ_Bs [31] DASKTIVEELSLDAKEFTLG [75] TALLAGVYSRKKQVYVPLTD 586817
 ICRA_Sg [31] MLAKSABELEDIDAKTFELN [75] HAPLAGVSRKKQVYVPLTE 1743856
 M0608_Mj [32] VVGLKPEEINNDKFNDFN [74] SVFLEGVWRKKQVYVPLER 1591318
 AF0756_Af [32] AVDDIATANDIKEDYKQFDM [75] SVMLDGVSRKKQVYVPLER 11498362
 L2759.9_Im [36] DVLALSVPQILRDKQFSFK [105] YSLSDPSLRKK-LVPLASE 1407725
 PPK1_Sc [41] DIKGFVSVDILAKDYKQFNQ [97] MFKQLNVEATRKKQVYVPLER 730369
 PRUNE_Dm [37] DISKLTTEVLRIKDKVLAQTD [97] LROHNVQATRRK-ILPVIYR 1079081
 h-prune.1_Hs [34] DVSELTTEQLRDKQKTIYRQ [94] YLQGTQVYSRKK-LPLAQE 11245938

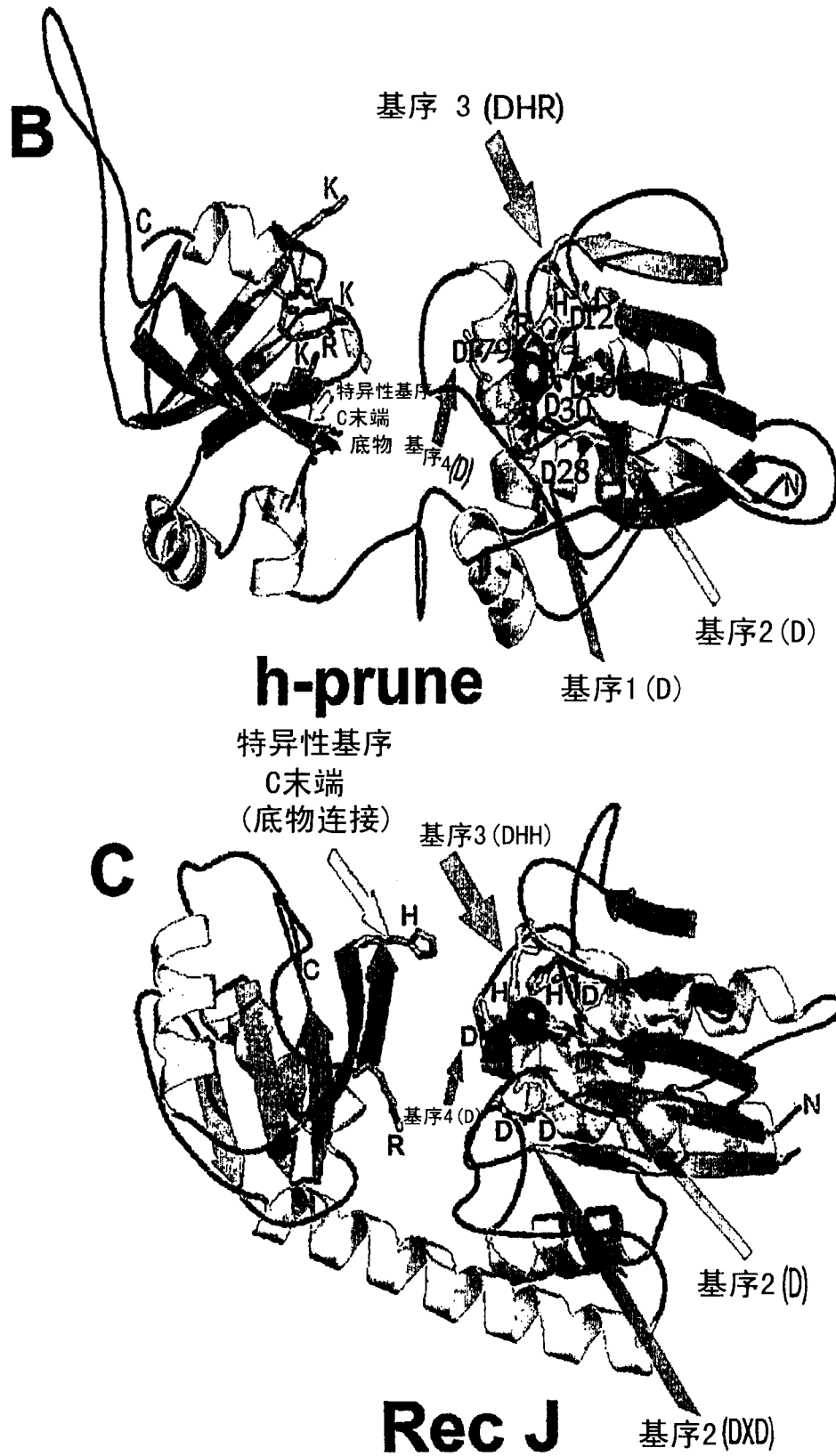
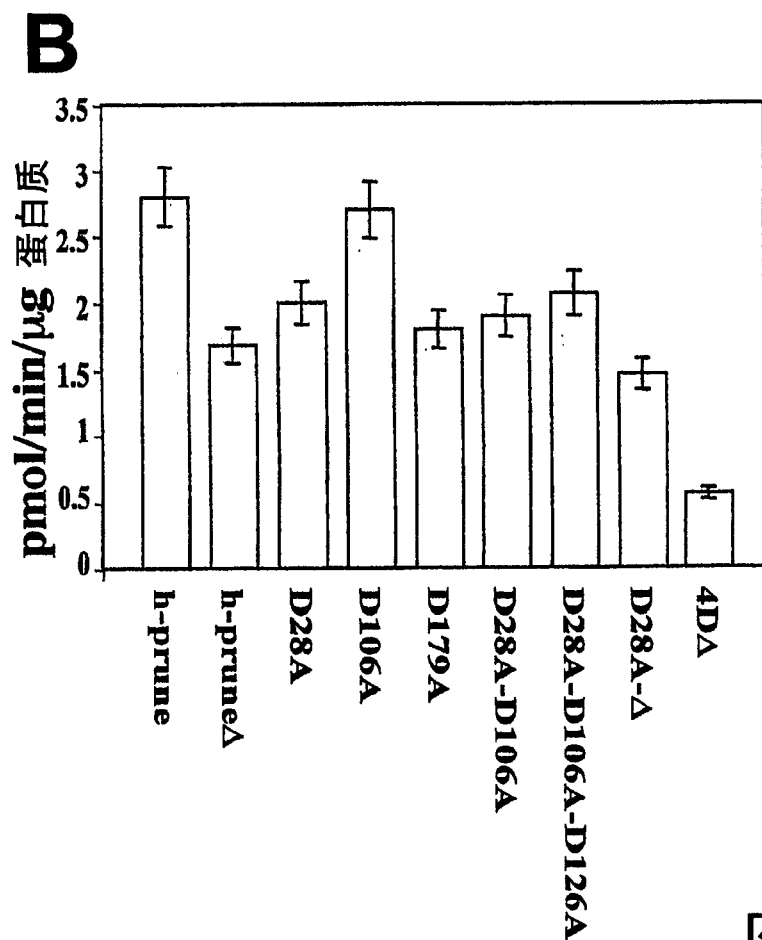
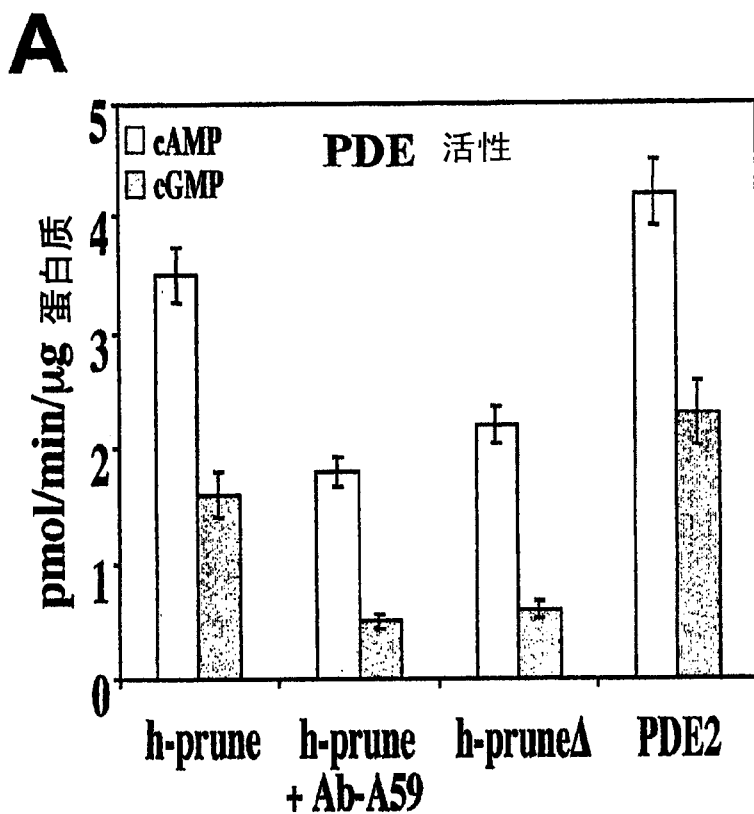


图 1



图

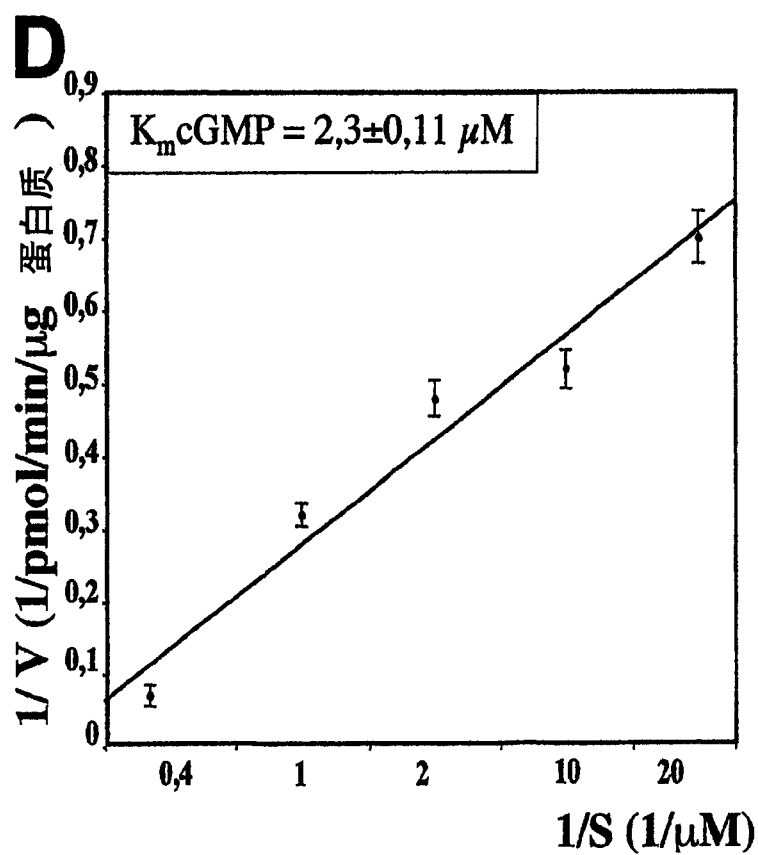
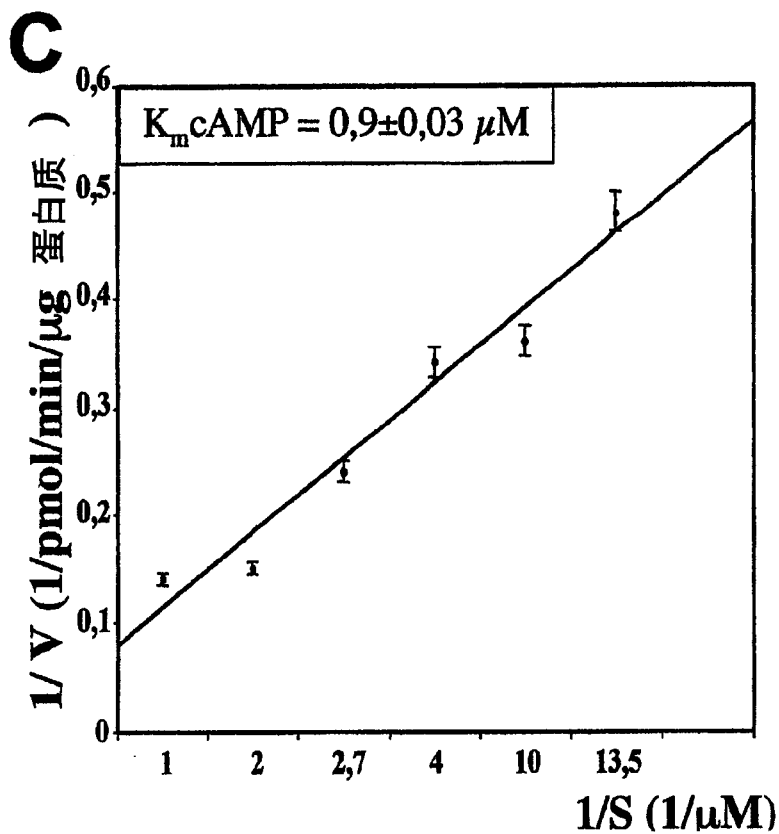


图 2

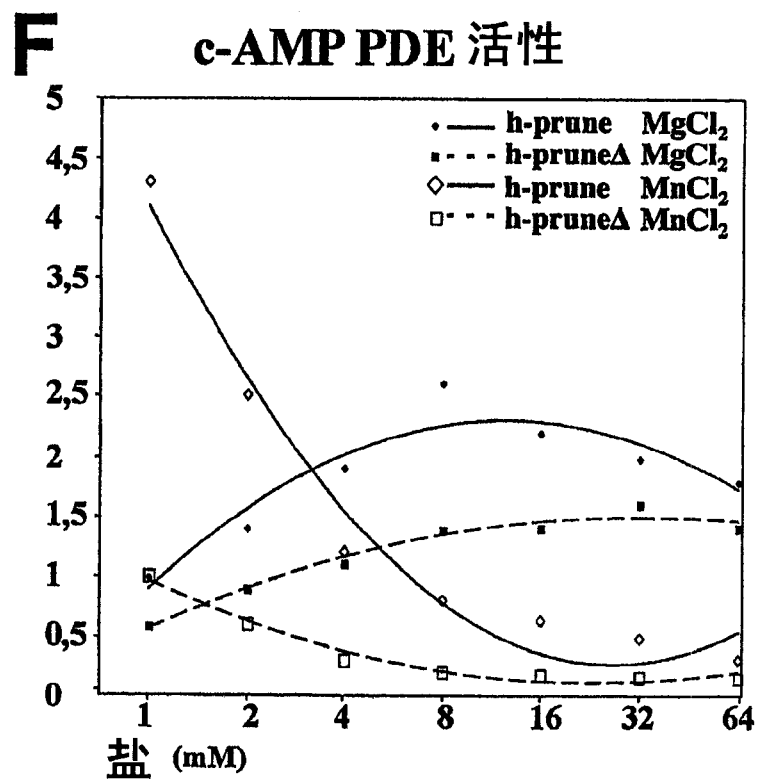
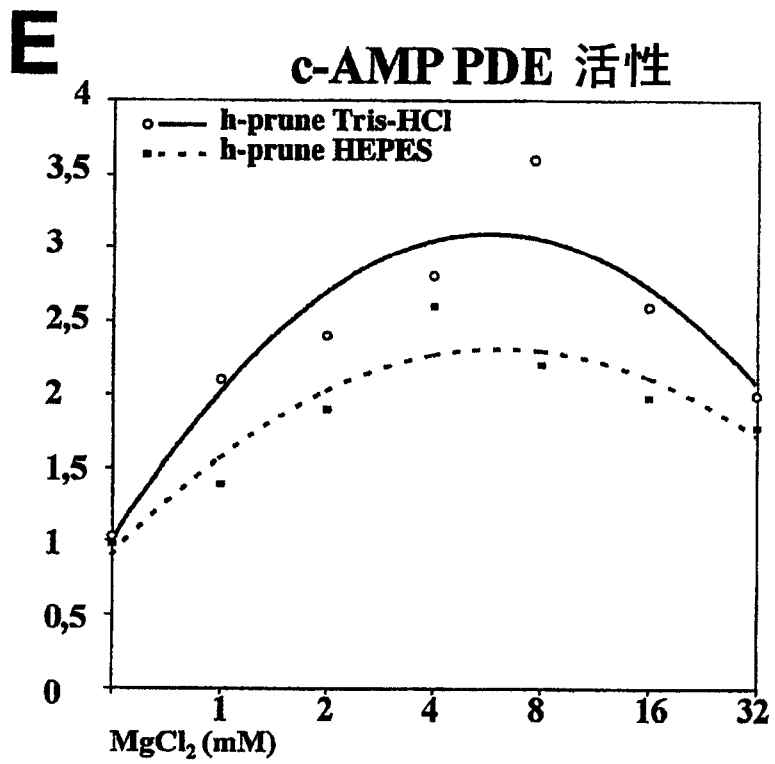
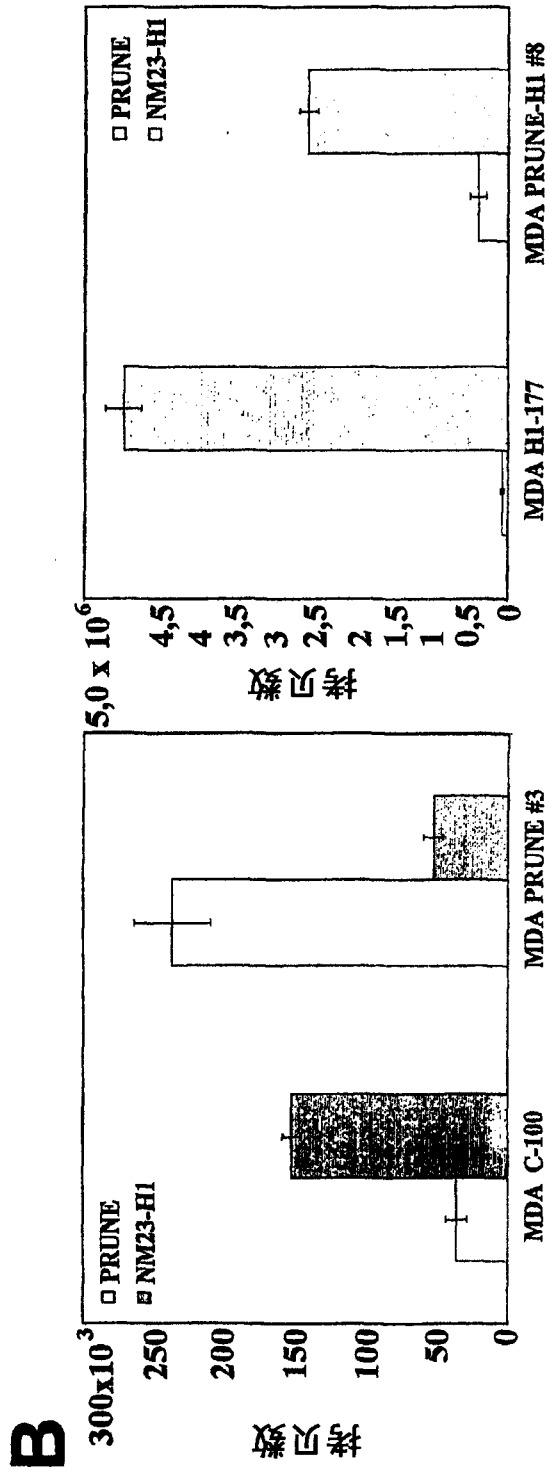
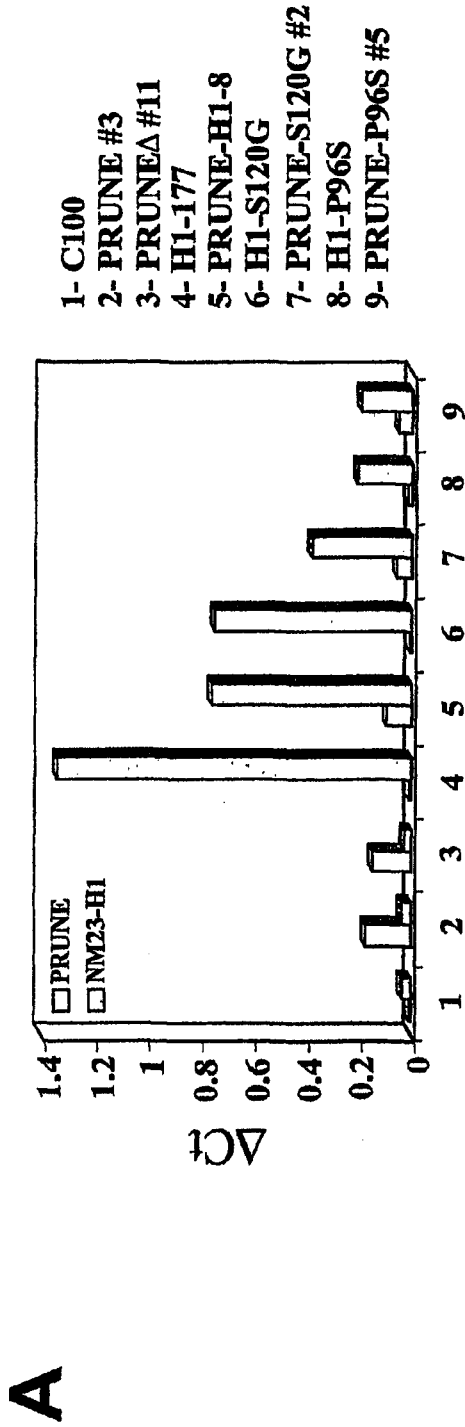
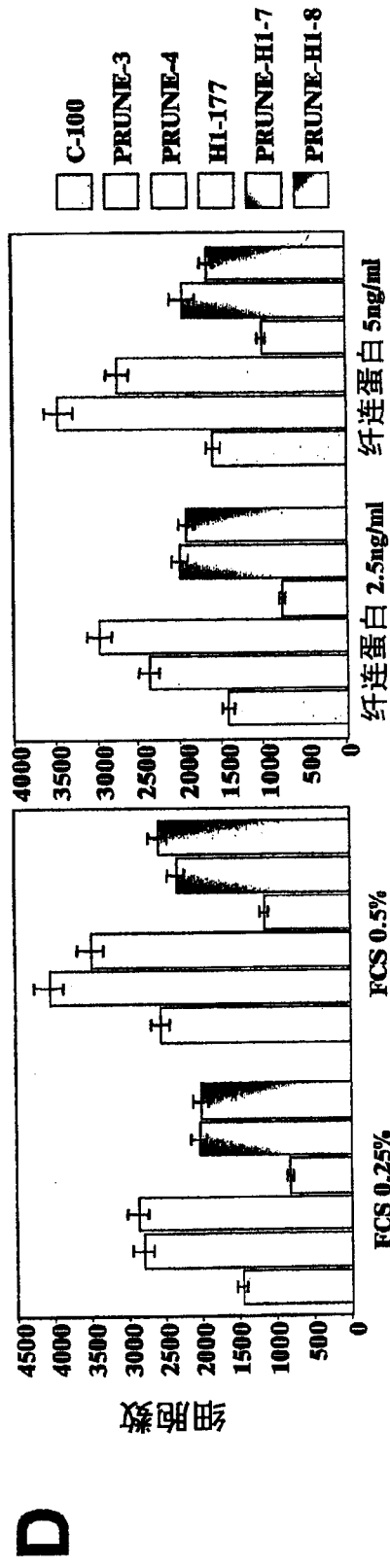
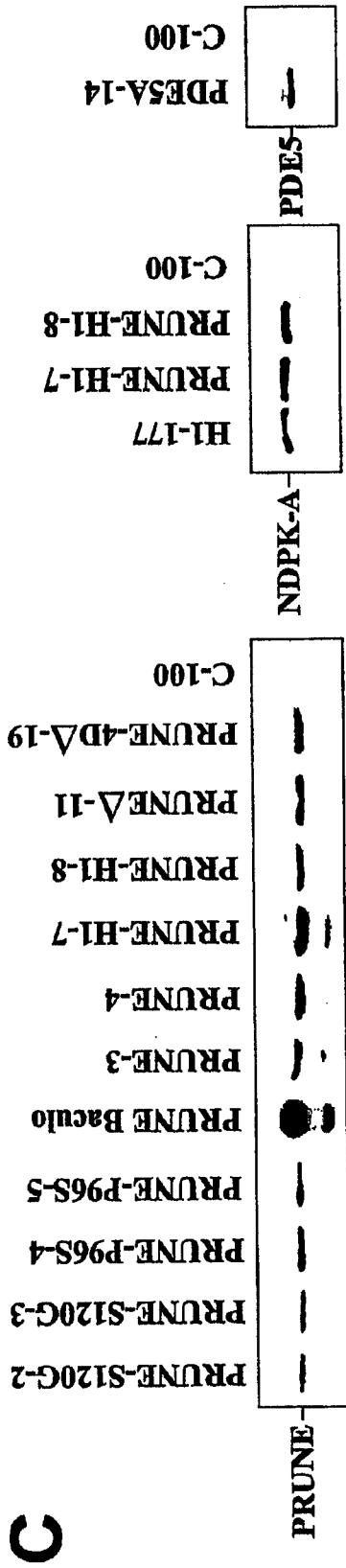


图 2



3



3

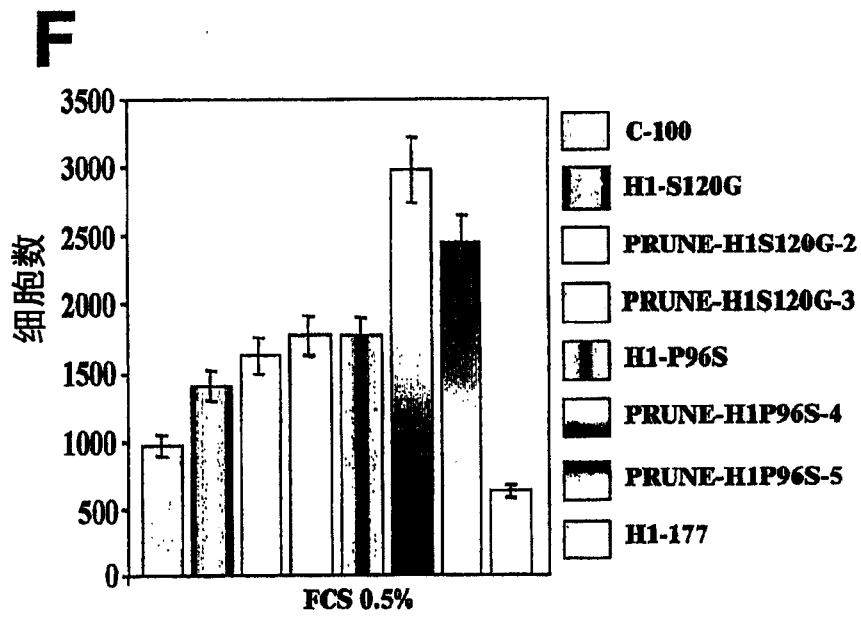
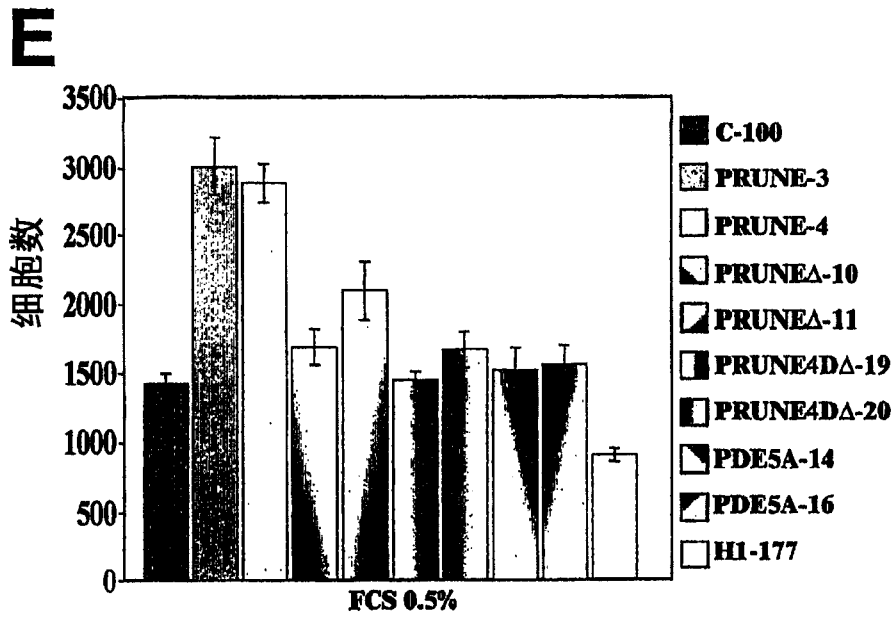
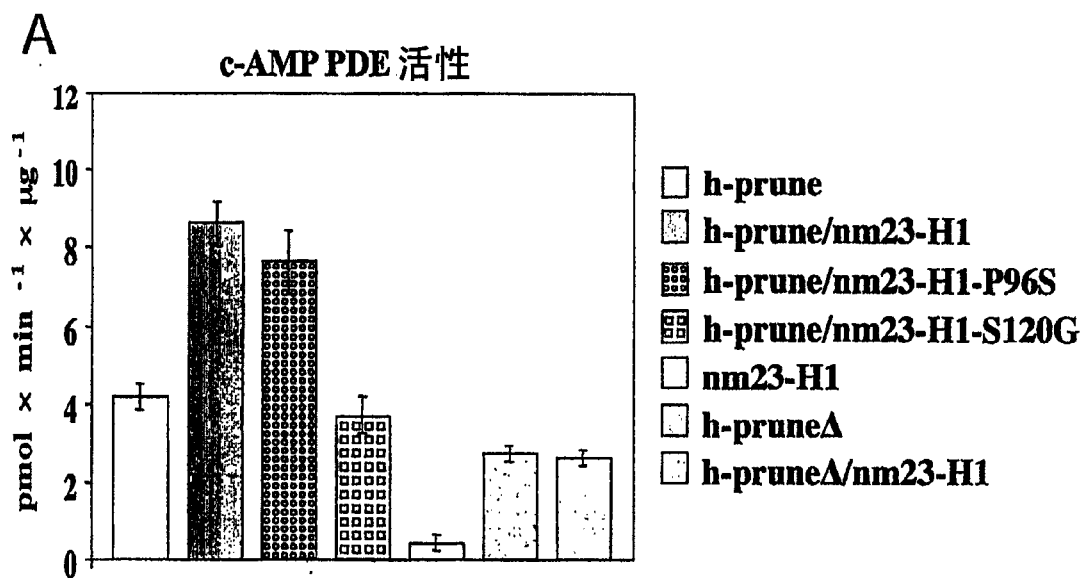


图 3



B

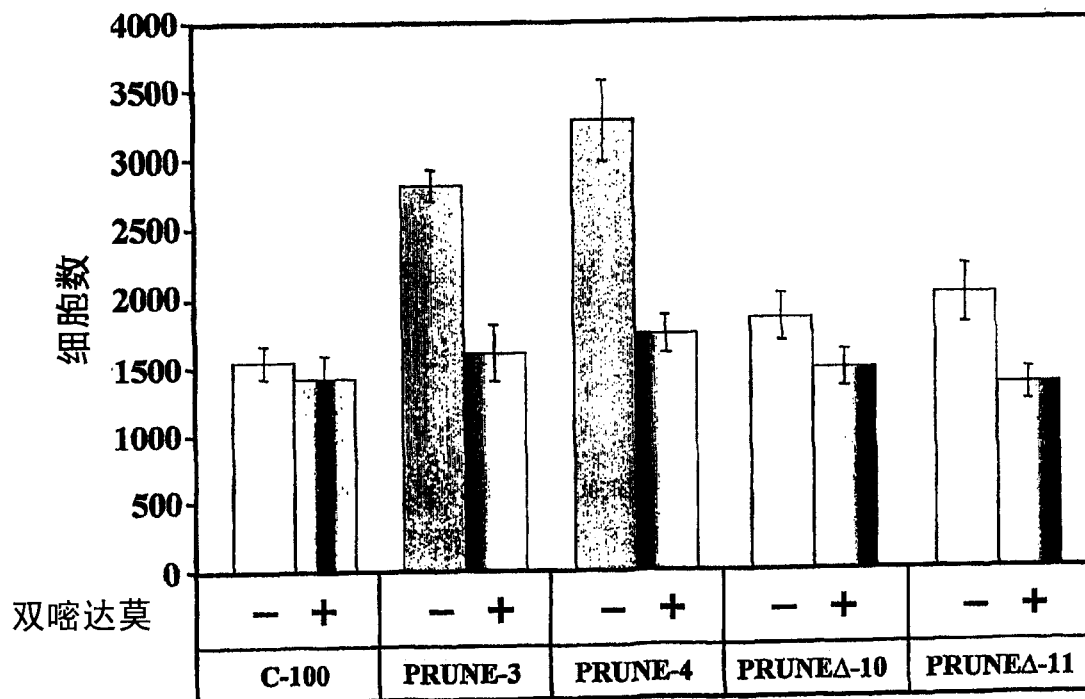
克隆名称	PDE h-prune 活性 ($\text{pmol} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g}^{-1}$)	运动性 细胞数
MDA C-100	3.8 \pm 0.7	1548 \pm 84
MDA H1-177	2.2 \pm 0.4	928 \pm 73
MDA PRUNE #3	35 \pm 5.3	2812 \pm 294
MDA PRUNE #4	28.7 \pm 2.5	3272 \pm 271
MDA PRUNE Δ #10	16.8 \pm 1.2	1682 \pm 64
MDA PRUNE Δ #11	14.6 \pm 0.9	2087 \pm 97
MDA PRUNE-H1 #7	18.8 \pm 2.6	2048 \pm 93
MDA PRUNE-H1 #8	22 \pm 4.2	2006 \pm 87
MDA H1S120G	2.4 \pm 0.8	1328 \pm 54
MDA PRUNE-H1S120G #2	4.4 \pm 1.6	1624 \pm 89
MDA PRUNE-H1S120G #3	5.3 \pm 1.4	1767 \pm 108
MDA H1P96S	3.0 \pm 0.3	1742 \pm 38
MDA PRUNE-H1P96S #4	19.2 \pm 0.3	2982 \pm 184
MDA PRUNE-H1P96S #5	11.6 \pm 0.4	2448 \pm 143

图

4

A

抑制剂	对PDE类型的选择性	IC ₅₀ μM	h-prune IC ₅₀ μM
西洛酰胺	PDE3	0.05	>100
双嘧达莫	PDE5/6/9/10/11	0.9/0.38/4.5/1.1/0.37	0.78±0.05
IBMX	无选择性	2-59	40.2±0.8
米力农	PDE3	1.3	>100
咯利普兰	PDE4	2.0	>100
长春西汀	PDE1C	8.1	22.3±1.1
扎普司特	PDE1/5/6	6.9/0.76/0.15	>100
舒林酸	cGMP PDEs	—	>100

B

图

5

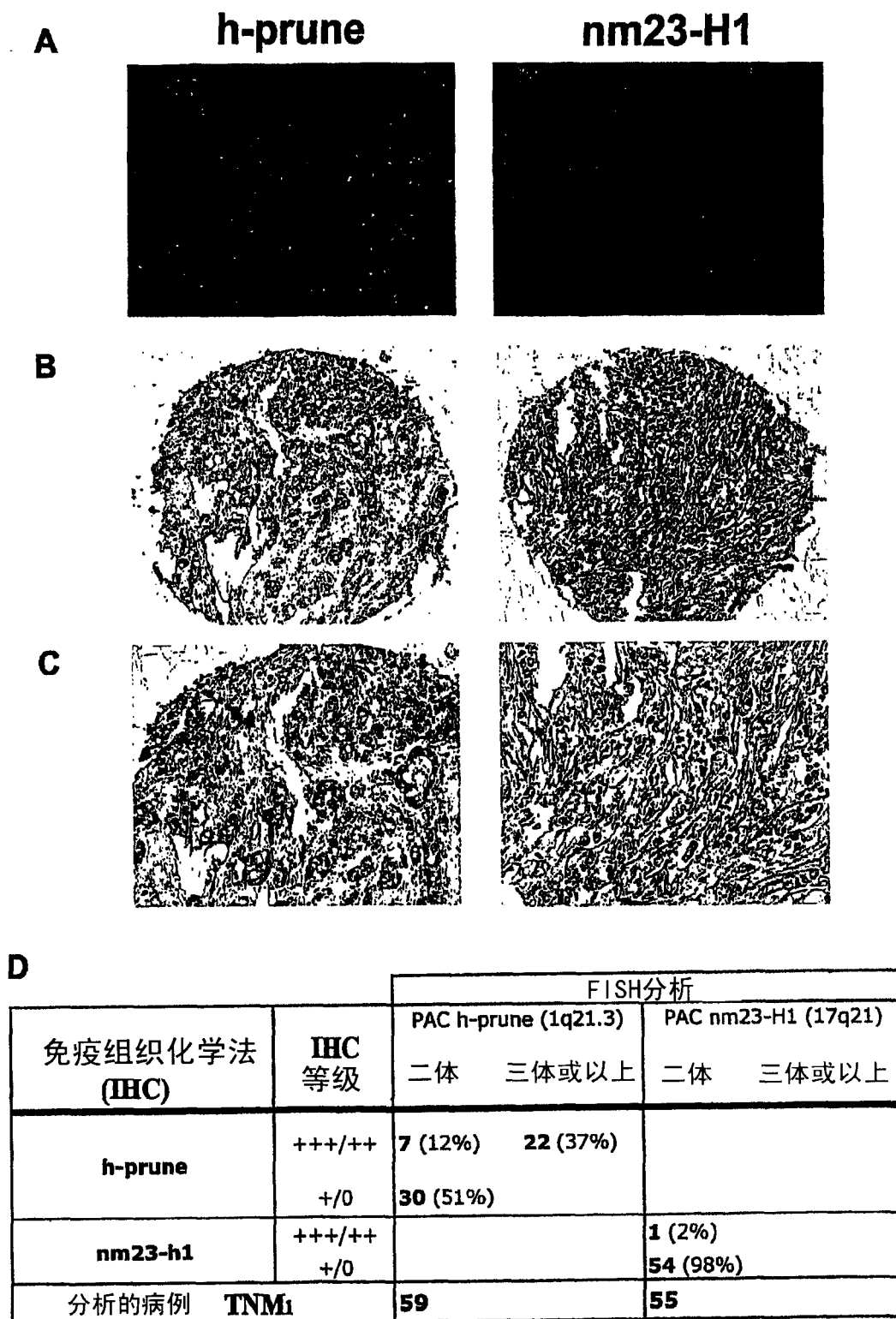
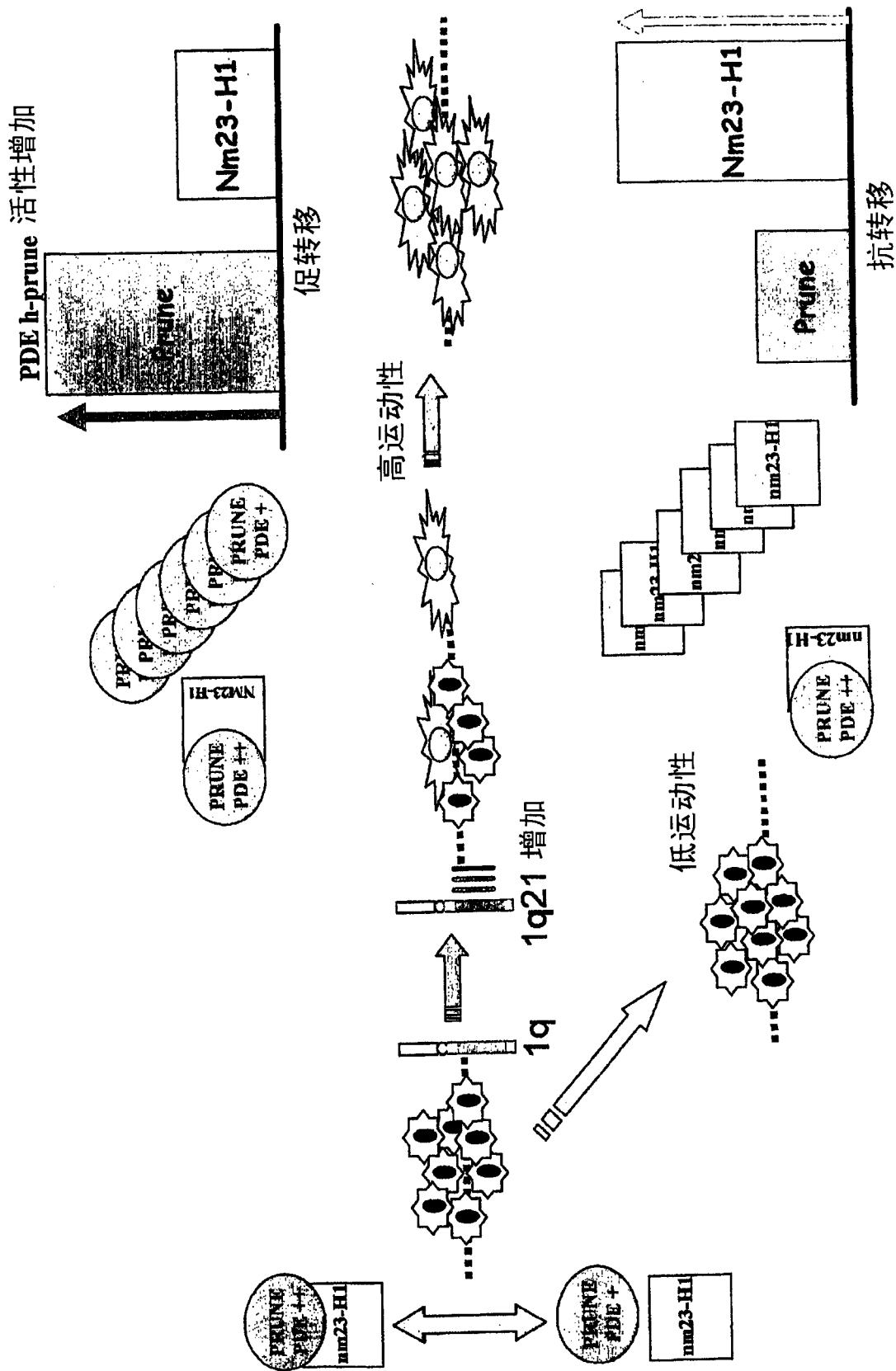


图 6



图

7

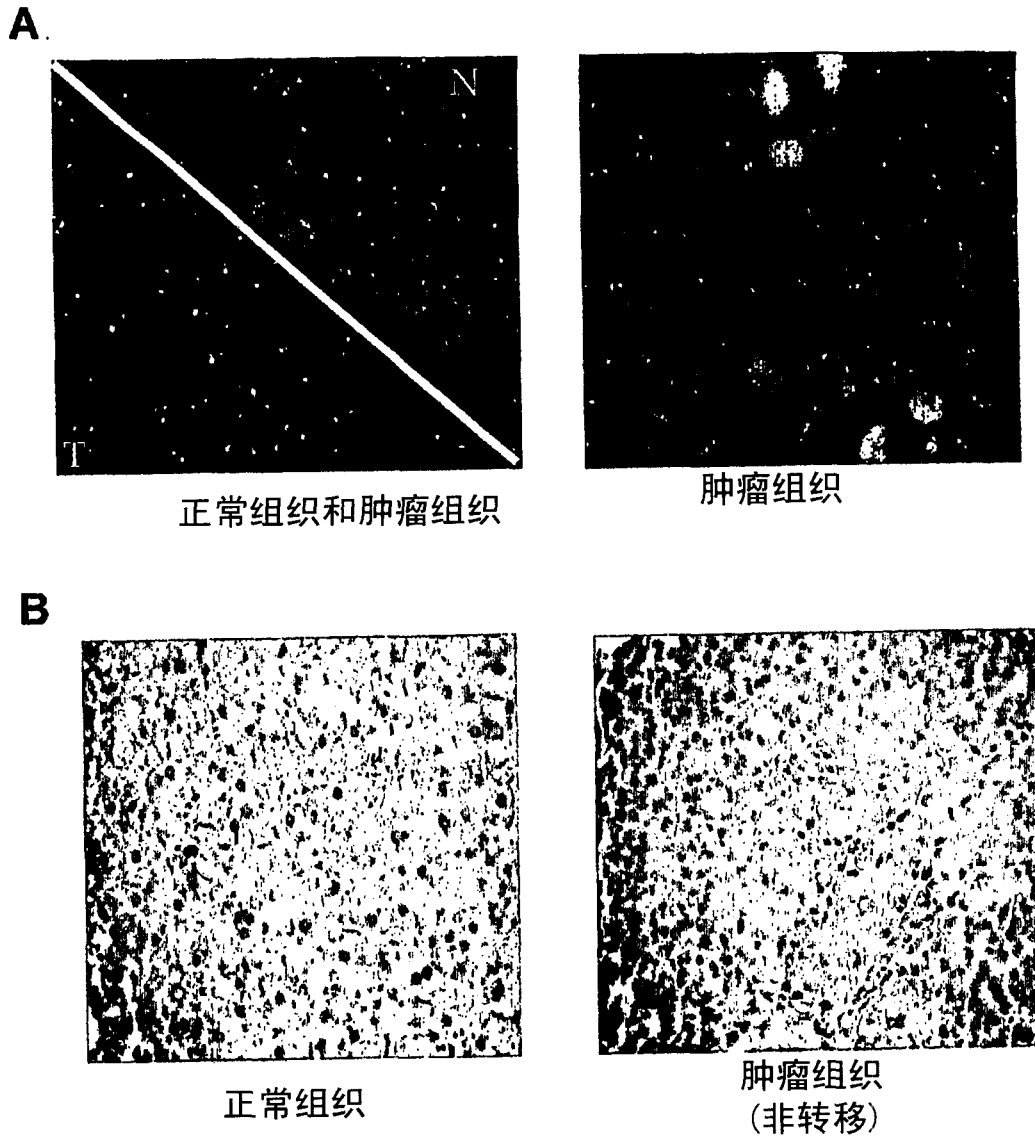


图 8

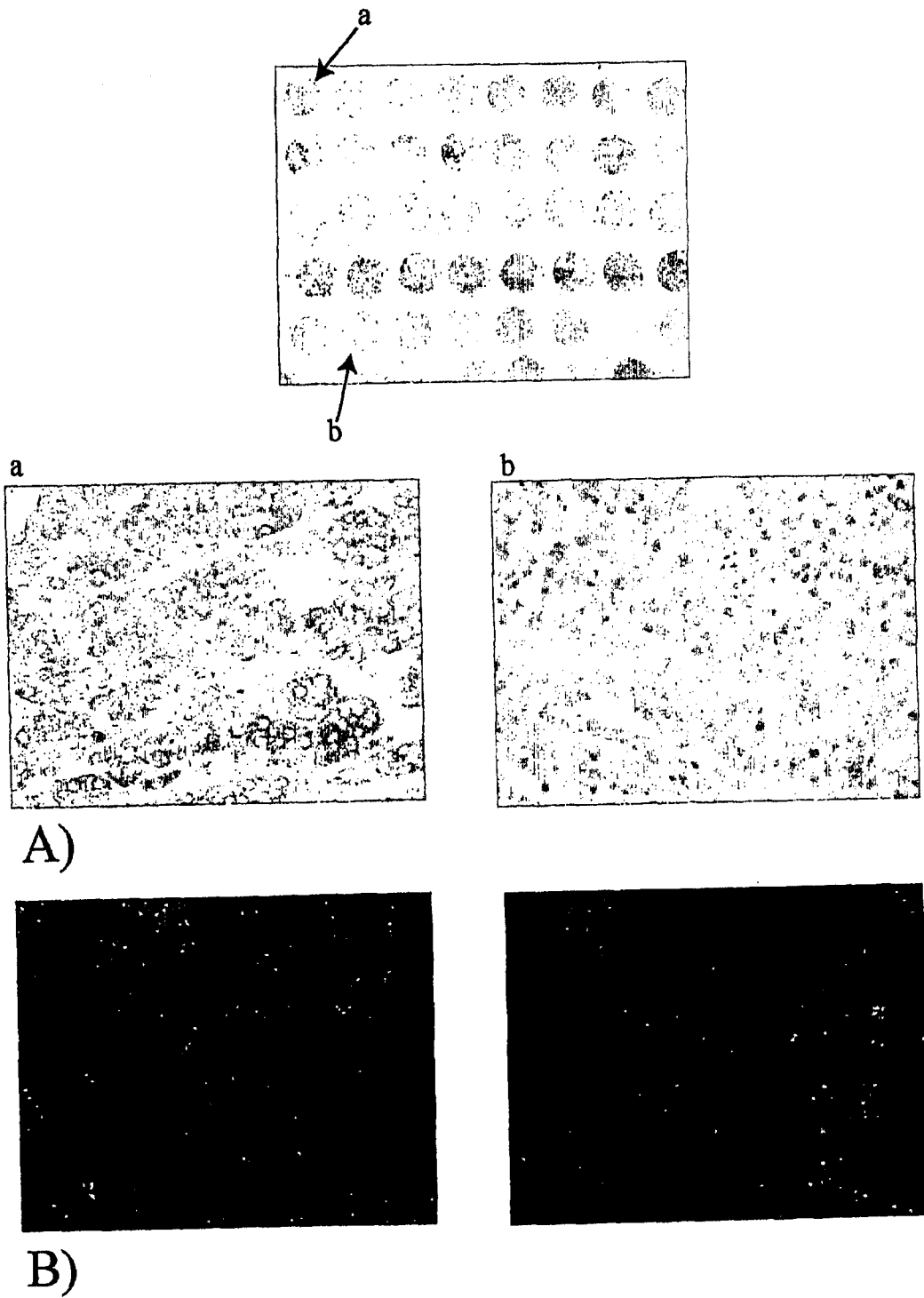
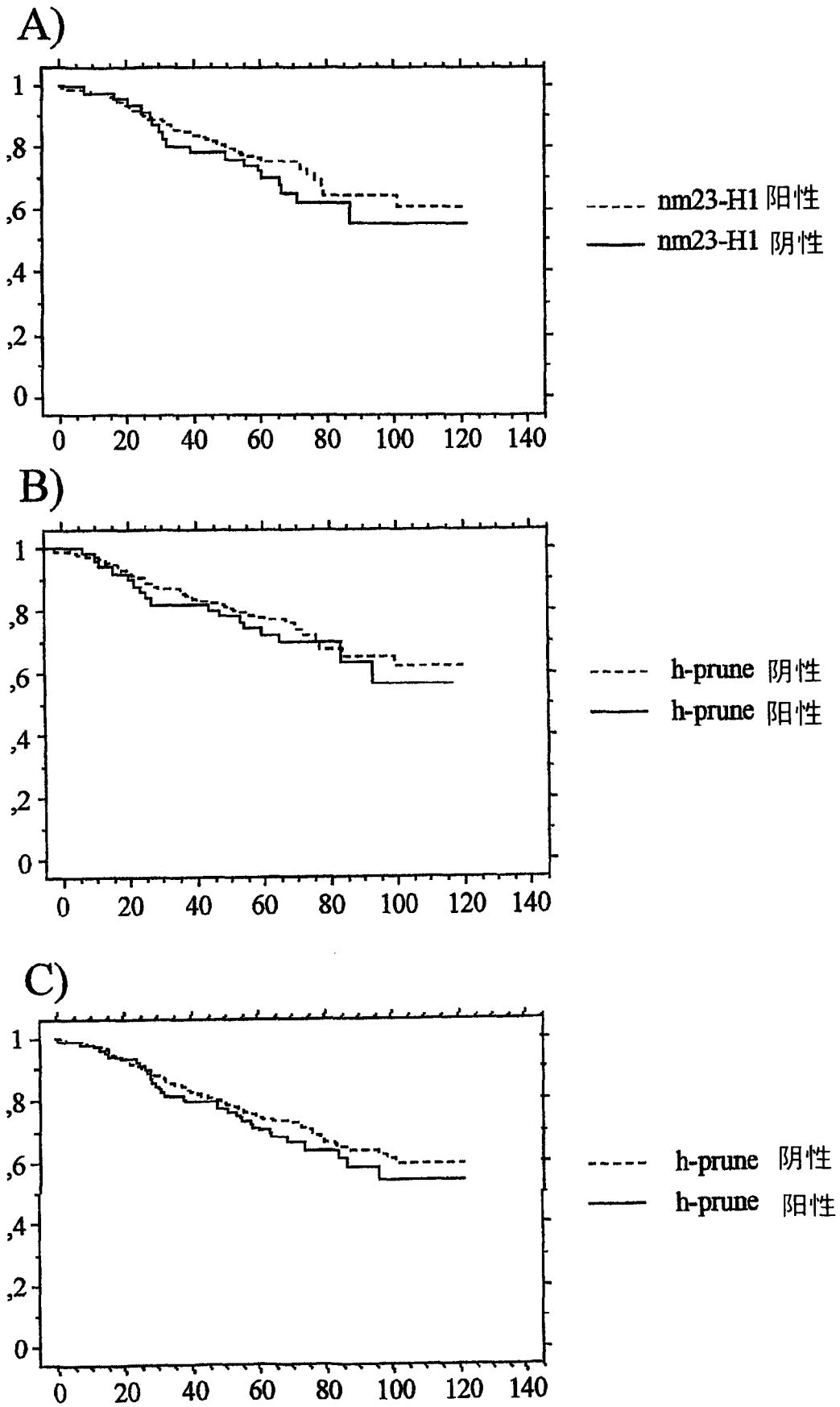
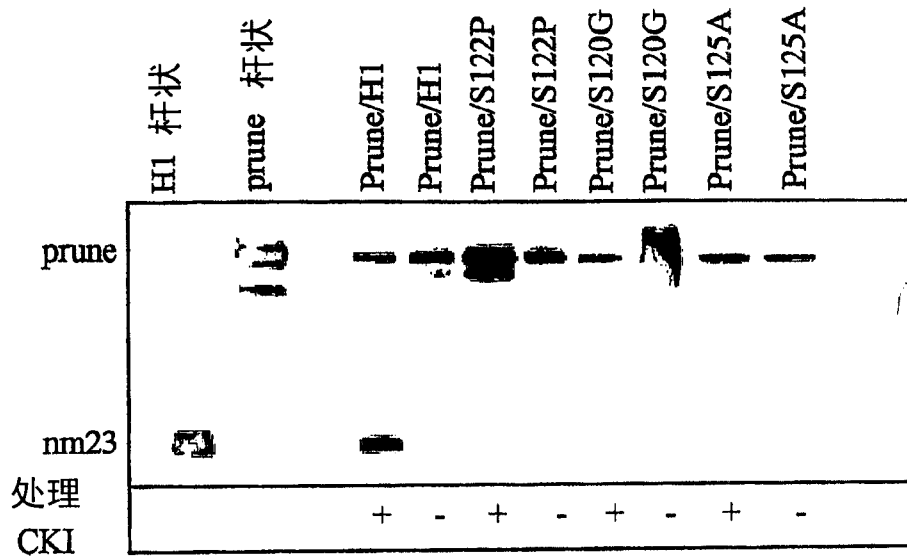


图 9



图

10



A)

B)

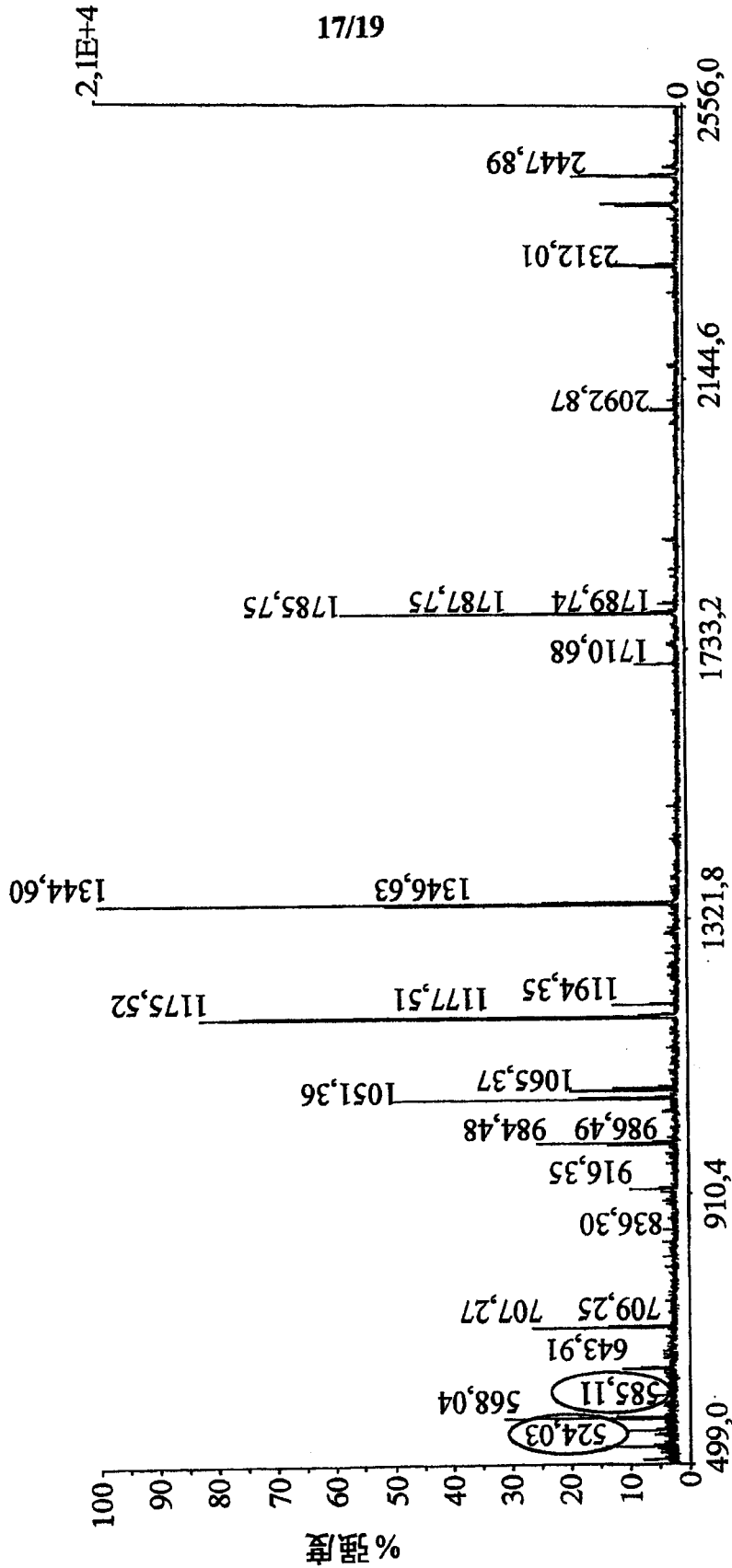
```

MYDVPDYASLGSPVEMA
NLERTFIAIKPDGVQRGLV
GEIIKRFEQKGFRLVAMK
FLRASEEHLKQHYIDLKD
RPFFPGLVKYMNSGPVVA
MVWEGLNVVKTGRVML
GETNPADSKPGTIRGDFCI
QVGRNIIHGSDSVKSAEK
EISLWFKPEELVDYKSCA
HDWVYE
    
```

图

11

Voyager Spec #1 MC[BP = 1344,6 2144,6]



11C





A

	1	2	3	4
CKIδ	+	+	-	-
同种型 Nm23	H1	H2	H1	H2

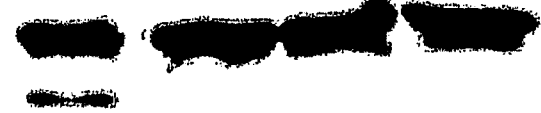
nm23 → 


B

IC261	0h	2h	4h	6h	8h	0h
CIP	—	—	—	—	—	+
磷酸化 nm23H1						
总 nm23H1						

C

	1	2	3	4	5
IC261 μMol		50	200	—	

h-prune → 

nm23H1 → 

图

12

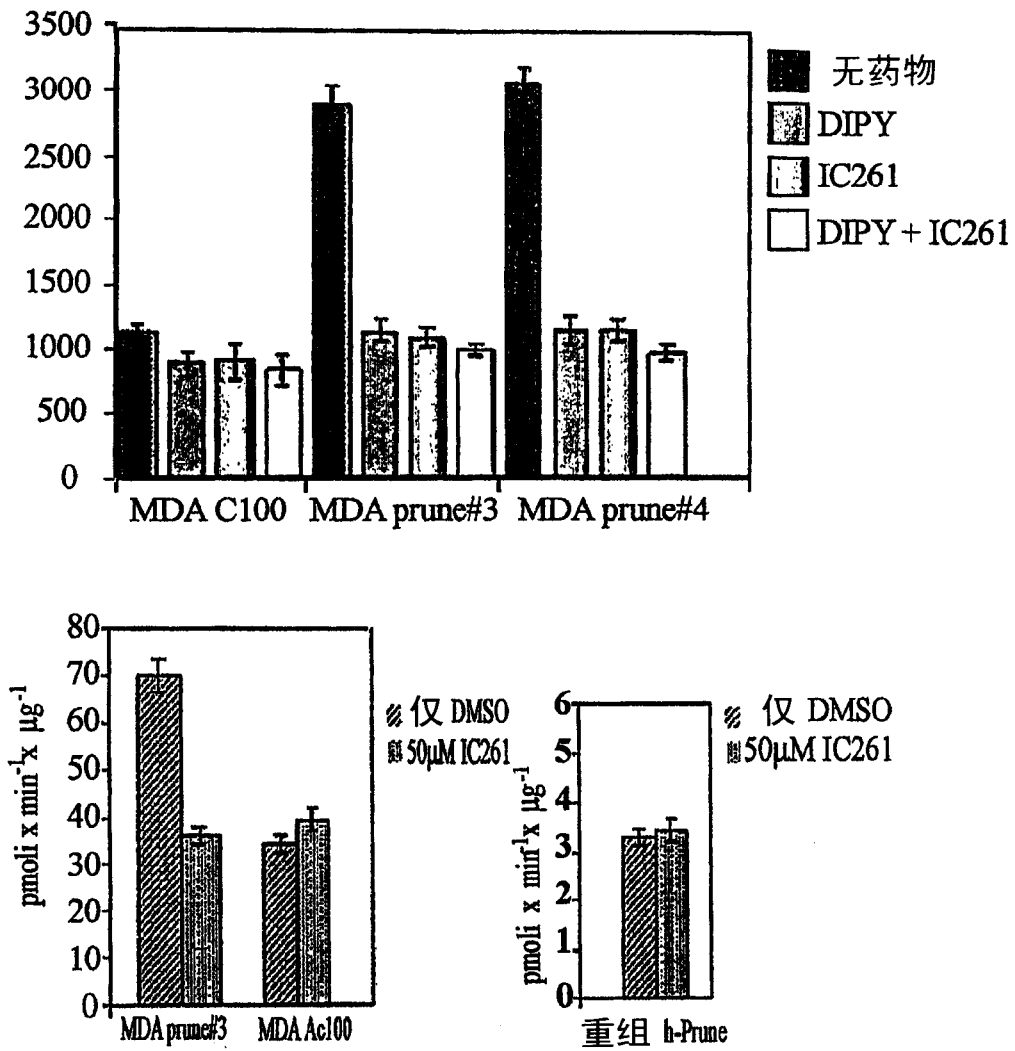


图 13

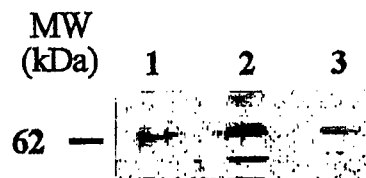


图 14