



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 95102291.1

[51]Int.Cl⁶

[43]公开日 1996 年 6 月 19 日

C12Q 1 / 68

[22]申请日 95.2.23

[30]优先权

[32]94.2.24 [33]DE[31]94102839.1

[71]申请人 贝林格尔·英格海姆国际有限公司

地址 联邦德国英格海姆

[72]发明人 谷口维绍

[74]专利代理机构 柳沈知识产权律师事务所

代理人 巫肖南

C07K 14 / 47

权利要求书 2 页 说明书 25 页 附图页数 4 页

[54]发明名称 分析活检样品中干扰素调节因子-1特异性核糖核酸以诊断癌症，癌变前状态的方法

[57]摘要

本发明涉及通过使用分子标记，干扰素调节因子-1 (IRF-1) 诊断癌症，癌变前状态，以及对其它形式的疾病的易感性的方法。该方法特征在于优选地采用逆转录/聚合酶链反应方法分析取自于血液或其它活检材料的样品中的 IRF-1 特异性 RNA。

权 利 要 求 书

1、一种诊断癌症，癌变前状态，或其它形式疾病的易感性的方法，其特征在于在从血液或其它活检材料获得的样品中分析IRF-1特异性RNA。

2、根据权利要求1所述方法，其特征在于测定该样品是否含有与一种RNA分子相比，长度缩短的IRF-1特异性RNA分子，其中所述的一种RNA分子为IRF-1基因的全长氨基酸序列编码。

3、根据权利要求2所述方法，其特征在于测定所说的IRF-1特异性RNA分子是否缺失IRF-1基因的外显子2或外显子2和3。

4、根据权利要求2或3所述方法，其特征在于测定全长IRF-1-RNA，IRF-1 Δ 2-RNA和IRF-1 Δ 23-RNA的相对含量。

5、根据权利要求1~4任一项所述方法，其特征在于所述分析方法是通过逆转录/聚合酶链反应并且随后分析经扩增的cDNA来实现的。

6、根据权利要求5所述方法，其特征在于至少使用下列一种寡聚核苷酸作为引物。

5' TTCCCTCTTCCACTCGGAGT3' (SEQ ID NO: 1),

5' GATATCTGGCAGGGAGTTCA3' (SEQ ID NO: 2), 或

5' CTCTGGTCTTTCACCTCCTC3' (SEQ ID NO: 3)

7、根据权利要求1~6任一项所述方法，其特征在于所说癌症，癌变前状态，或其它形式疾病是造血系统疾病。

8、根据权利要求7所述方法，其特征在于所述造血系统疾病是

脊髓发育不良或白血病。

9、根据权利要求7或8所述方法，其特征在于所述样品取自于外周血单核细胞(PBM)或骨髓细胞。

10、至少一种IRF-1特异性寡核苷酸在诊断癌症，癌变前状态，或对其形式疾病的易感性的方法中的使用，其中在取自于血液或其它活检材料的样品中分析所说的IRF-1特异性RNA。

11、根据权利要求10所述的使用方法，其特征在于所述分析方法是通过对转录/聚合酶链反应并且随后分析经扩增的cDNA来实现的。

12根据权利要求10或11所述的使用方法，其特征在于所述寡核苷酸具有下列序列：

5' TTCCCTCTTCCACTCGGAGT3' (SEQ ID NO: 1),

5' GATATCTGGCAGGGAGTTCA3' (SEQ ID NO: 2), 或

5' CTCTGGTCTTTTCACCTCCTC3' (SEQ ID NO: 3).

13、具有下列序列的寡核苷酸：

5' TTCCCTCTTCCACTCGGAGT3' (SEQ ID NO: 1),

5' GATATCTGGCAGGGAGTTCA3' (SEQ ID NO: 2), 或

5' CTCTGGTCTTTTCACCTCCTC3' (SEQ ID NO: 3).

14、诊断癌症，癌变前状态或对其形式疾病的易感性的方法，其特征在于在取自于血液或其它活检材料的样品中测定生物活性IRF-1多肽的含量。

说明书

分析活检样品中干扰素调节因子-1

特异性核糖核酸以诊断癌症,

癌变前状态的方法

本发明涉及使用一种分子标记, 干扰素调节因子-1 (IRF-1) 诊断癌症, 癌变前状态以及对其它形式疾病的易感性的方法。

恶性细胞的转化是一个多步骤过程, 该过程是由于在参与调节细胞生长的多个遗传位点处进行性地获得结构变化引起的。已经有文献完整地记载, 在人类恶性细胞中, 起显性作用的原癌基因中发现的功能增加的突变常常伴随有肿瘤抑制基因中功能损失的突变的发生。已经鉴别出了几种肿瘤抑制基因, 这些基因的突变或缺失似乎是人类癌症发生的关键, 在这些基因中, p53, RB和WT1的基因产物存在于核中, 并且作为基因转录的调节子起作用 (参见Kaelin, Jr., et al., 1991; Lewin, 1991; Marshall, 1991; Weinberg, 1991; Haber and Housman, 1992; Vogelstein and Kinzler, 1992; Levine, 1993 的评论)。

最初鉴别出的两个结构相关的转录因子, IRF-1和IRF-2是作为干扰素 (IFN) 系统的调节子 (Miyamoto et al., 1988; Harada et al., 1989; Tanaka and Taniguchi, 1992)。还有其他人在不同文章中记载了鉴定出IRF-1 (Pine et al., 1990; Yu-Lee et al.,

1990; Abdollahi et al., 1991; Stark and Kerr, 1992)。IRF-1作为一种转录激活子起作用, 而IRF-2通过与IRF-1竞争结合到相同的DNA序列成分 (IRF-Es) 上而抑制IRF-1的作用 (Harada et al., 1989; Tanaka et al., 1993)。IRF-Es既存在于IFN- α 启动子也存在于IFN- β 启动子中, 还存在于IFN-诱导性基因启动子中的IFN-受激应答因子 (ISREs) 中 (Friedman and Stark, 1985; Shirayoshi et al., 1987; Levy et al., 1988)。已经证实对于I型IFN基因和某些IFN诱导性基因IRF-1起着激活子的作用 (Fujita et al., 1989; Harada et al., 1990; Au et al., 1992; Pine et al., 1992; Reis et al., 1992; Matsuyama et al., 1993; Ruffner et al., 1993; Kamiyo et al., 1994)。

还有人提供了证实IRF-1具有肿瘤抑制剂作用的证据; (i) IRF-1显示抗增殖活性 (Yamada et al., 1990; Kirchhoff et al., 1993; T. Tamura, M.S.L., and T. Kawakami, 结果未出版) (ii) 在NIH3T3细胞中, 阻遏物IRF-2的过量表达导致细胞转化并且通过激活剂IRF-1的伴随过量表达而抑制这种细胞转化 (Harada et al., 1993) 以及 (iii) 带有IRF-1基因中的无效突变的一级胚胎成纤维细胞 (EFs) (IRF-1^{-/-}小鼠) 对激活形式的c-Ha-ras的转化敏感, 这种转化特性也可以在来自p53^{-/-}小鼠的EFs中看到, 但不存在于野生型EFs中 (Tanaka et al., 1994)。这些结果共同暗示着IRF-1功能的损失归因于人类瘤的形成发育。

已将人类IRF-1基因定位到5q31.1 (Itoh et al., 1991; Willman et al., 1993; Harada et al., 1994)。以前曾测出在人白血病和间质缺失染色体5q的MDS中染色体谱带5q31是最普遍缺失的片段, 称

之为“关键区”(Le Beau et al., 1986; Nimer and Golde, 1987; Le Beau et al., 1989; Pederson and Jensen, 1991)。Del(5q)也是具有顽固性贫血和异常巨核细胞的特定临床骨髓发育紊乱的一个标志, 称作为“5q-综合症”, 其中所述的“紊乱”主要出现于老年妇女(Van den Berghe et al., 1985)。因此, 人们认为该染色体区包含了一个肿瘤抑制基因。但是, 根据与del(5q)相关的骨髓疾病反复不定的临床特征, 这种肿瘤抑制基因的失活可能伴随了变异的其它遗传活动的发生例如不同类型的骨髓紊乱症中癌基因的激活(Carter et al., 1992)。

曾有人证实, 在具有del(5q)或5q31易位的MDS和白血病的13例典型病例中每一病例都缺失了一个或两个IRF-1等位基因。再者, 在一例再发急性白血症中发现伴随有残留等位基因的缺失的一个IRF-1等位基因的失活基因重排(Willman et al., 1993)。该结果支持了这样的观点, 即IRF-1可能是del(5q)中缺失的关键的肿瘤抑制基因; 因此, 一个或两个IRF-1等位基因的丢失可归因于未抑制的细胞增殖, 从而促进了人白血症和MDS的发生。另一方面, 两个IRF-1等位基因仍保留于某些显示了5q缺失的MDS/白血症患者(Boulton et al., 1993; Le Beau et al., 1993)。

本发明解决的问题是找到一种使用分子标记诊断癌症的新方法以及提供该方法的手段。

本发明提供的诊断癌症, 癌变前状态或对其它形式疾病的易感性的新方法依据对血液或其它活检样品中IRF-1特异性RNA的分析。

本发明是基于意想不到地发现肿瘤抑制基因IRF-1的失活的新机理似乎在肿瘤和癌变前状态, 尤其是在造血系统疾病中起着决定

性作用。该机理似乎并不依赖于以前描述的IRF-1的缺失或突变，因为它发生于不可检测到这种变化的病例中。失活作用是通过一种拼接方式经改变的初级转录本实现的，因而是在RNA水平上。更具体地讲，在来自于健康的供体或患有白血病或脊髓发育不良综合症的患者的样品中可以检测到缺失了外显子2或外显子2和3的RNA分子。这些经改变的转录本并不导致产生功能性IRF-1多肽。对这种不寻常的外显子遗失的敏感性似乎是人类IRF-1基因的内在特性。令人兴奋的是，与健康供体相比，大量具有癌变前状态或恶性造血系统的患者中，全长转录本与失去了外显子2或外显子2和3的转录本之间的比例显著地发生变化。因此，拼接方式发生改变的IRF-1转录本可以作为恶性疾病，尤其是白血病，或癌变前的状态，特别是脊髓发育不良综合症，或对其它形式疾病的易感性分子标记。

由本发明提供的诊断癌症，癌变前状态，或对其它形式型疾病的易感性的新方法依据于对血液或其它活检样品中IRF-1特异性RNA分析。优选的是，这种分析是通过使用IRF-1特异性引物的聚合酶链反应（PCR），尤其是扩增步骤前结合逆转录（RT）步骤来实现。用于PCR的优选的引物具有下列序列：

5' TTCCCTCTTCCACTCGGAGT3' (SEQ ID NO: 1) 或

5' GATATCTGGCAGGGAGTTCA3' (SEQ ID NO: 2).

能恰当地适用于逆转录的引物具有下列序列：

5' CTCTGGTCTTTCACCTCCTC3' (SEQ ID NO: 3).

应该注意到上面公开的特异引物仅是举例，并且可由其它合适的寡聚核苷酸替代。

除RT/PCR外，也可以使用其它的分析RNA的方法，例如RT与连

接酶链反应(LCR)结合。

在另一方面, 本发明包括IRF-1特异性寡聚核苷酸, 优选的是具有SEQ ID Nos.1,2或3的序列的这类核苷酸, 及其它们在上述方法中的应用。

再者, 为了诊断目的, 可以采用合适的生物学或免疫学检测法测出从血液或其它活检物质获得的样品中生物学活性IRF-1多肽的含量。

人类IRF-1基因中外显子的缺失

人类IRF-1基因由10个外显子组成, 其中在第二个外显子内定位了起始因子ATG序列(图1A, Cha et al., 1993; Harada et al., 1994)。在利用S1定位法分析各种细胞系中IRF-1 mRNA表达期间, 我们注意到不寻常的转录本的表达。如图1B所示, 使用来自于健康供体(参见注1)的外周血单核(PBM)细胞的总RNA检测到三条被保护的谱带。最上部的谱带(谱带1, 248个核苷酸)与完整的IRF-1 mRNA相一致。从其大小判断, 其它两条谱带分别对应于缺失外显子2的RNA(谱带2, 180个核苷酸), 和缺失外显子2和3的RNA(谱带3, 80个核苷酸)。但是, 在两种造血细胞系, HL-60和HEL中, 由于mRNA表达水平低, 这些结果不明显。对于HL-60, 这可以解释为缺少一个IRT-1等位基因, 因为该细胞已经失去了一个染色体5(Gallagher et al., 1979)。为了获得更多的这些RNA的定量及定性分析结果, 接着, 我们进行了一个聚合酶链反应(PCR)试验。在该试验中, mRNA的逆转录之后紧接着PCR扩增(RT-PCR), 其中将PCR产物(扩增子)标记为高比活性(参见详细的实验程序)。如图1C所示, 再次用来自PBM细胞的RNA检测三条谱带, 该RNA用于诊断由S1定位

分析产生的谱带1、2和3(图1A)。对PCR扩增的cDNAs进行的核苷酸序列分析结果表明,事实上上部的、中间的以及下部的谱带分别对应于完整IRF-1 mRNA, 缺失外显子2的IRF-1 mRNA($\Delta 2$ mRNA), 以及缺失外显子2和3的IRF-1 mRNA($\Delta 23$ mRNA)(结果未表示)。在HL-60以及HEL细胞中也表达 $\Delta 2$ 和 $\Delta 23$ mRNAs。另外, 含有转染得的19 kb人IRF-1基因的小鼠NIH 3T3衍生的R27-3细胞系(Harada et al., 1993)也显示相同的外显子缺失类型, 表明这种外显子缺失的发生不依赖于宿主细胞类型以及染色体的位置。相反, 利用小鼠特异性引物对小鼠IRF-1 mRNA进行类似的RT-PCR分析时, 在R27-3和鼠造血细胞系BAF/BO3中仅扩增了代表完整mRNA的单一谱带(图1D)。因此所观察到的外显子缺失可能是人IRF-1基因的内在特性。重要的是, 在 $\Delta 2$ 和 $\Delta 23$ mRNAs中外显子2的缺失应该导致真正的起始因子AUG序列的缺失(图1A, Harada et al., 1994)(见下文)。

(注1)检测了来自健康供体的另外9个样品, 并且它们都基本上显示有类似于该例中观察到的表达方式。

在MDS/白血病中加速了IRF-1 mRNA外显子缺失

已经证实IRF-1起着肿瘤抑制剂的作用(Harada et al., 1993; Tanaka et al., 1994), 并且一个或两个IRF-1等位基因的缺失和/或重排是人MDS和白血病发展的关键(Willman et al., 1993)。另一方面, 仅一定比例的这些造血紊乱症伴随有5q异常(Kerim et al., 1990; Pederson-Bjergaard et al., 1990; Willman et al., 1993)。上述发现促使我们检查来自于MDS或继发性MDS白血病患者的细胞中外显子缺失的情形。从骨髓(BM)细胞或PBM细胞分离出总

RNA并进行RT-PCR分析。某些典型例子的结果示于图2中。在来自健康供体的BM细胞和来自MDS/白血病患者的BM细胞之间明显地存在显著差异。事实上，这里提供的两个样本(Pts. 228和356)中几乎没有可检测到的代表完整IRF-1 mRNA的扩增子，然而仍可检测到代表 $\Delta 23$ mRNA的扩增子。相反， β -肌动蛋白mRNA特异性扩增子的量保持相对恒定（参见实验程序和表1）。

我们对来自MDS或继发性MDS白血病患者的总共25个RNA样本进行类似的分析，结果概括于表1。首先通过图像分析(Fujix Bas 2000)定量地测定IRF特异性扩增子的量，然后将其量标准化到来自相同样本的 β -肌动蛋白扩增子的量；在该样本RNAs中 β -肌动蛋白mRNA的表达相对地是恒定的(Makino et al., 1990; Foley et al., 1993)。进一步将这些数目标准化到在来自健康供体的NBM.1细胞中存在的IRF-1和IRF-2扩增子的水平（任意地规定到1.00）。因此，表1中显示的数目表示与健康供体RNAs有关的完整的， $\Delta 2$ 、 $\Delta 23$ IRF-1 mRNAs和IRF-2 mRNA的表达，尽管表中数据没有提供关于绝对mRNA拷贝数的信息。

显然，代表完整IRF-1 mRNA的扩增子并没有在来自Pts. 581和117细胞的RNA样本中被检测到，其中没有任何一个样本显示在5q区发生细胞遗传畸变(表1)(参见注2)。另外，从其它5个样品(Pts. 190, 356, 228, 255, 578)检测到非常低水平的完整扩增子，而 $\Delta 2$ 和 $\Delta 23$ 扩增子，特别是 $\Delta 23$ 扩增子仍可检测的。还采用RT-PCR/SSCP分析法分析这些患者样本中的六个样本的p53突变，并且除一个样本(Pt. 356)外所有样本都没有显示发生这种突变的证据(表1; Sugimoto et al., 1993)。尽管没有象在上述样品中观察到的那样深的

程度, 几个其它样本(例如Pts. 570, 716, 194, 199, 707)也明显地显示了更低水平的完整IRF-1 mRNA扩增子。我们还分析了来自不同类型造血恶性症患者的RNA, 并且发现在某些样品, 包括仅表达 $\Delta 23$ mRNA的4AML患者之中的两个中有微量的或没有完整IRF-1扩增子

(结果未显示)。值得注意的是一些RNA样本显示出含量增加的IRF-2特异性扩增子(例如Pts. 581, 199, 534, 715)。

(注2) 就此范围来说, 对显示有外显子缺失加速的四个MDS或白血症患者(Pts. 255, 356, 707和716)进行RT-PCR/SSCP分析既没有显示在IRF-1外显子序列内有任何DNA缺失或突变, DNA 测序结果也没有显示已知影响拼接的内含子序列的任何改变。另外, 对这些患者的DNAs进行Southern 印迹分析也没有显示IRF-1基因有显著重排的迹象(结果未显示)。

$\Delta 2$ 和 $\Delta 23$ mRNA产物的分析

虽然 $\Delta 2$ 和 $\Delta 23$ mRNAs缺少IRF-1的真正的起始密码子, 但这些mRNA可能仍能指导新蛋白质的合成。构建与 $\Delta 2$ 和 $\Delta 23$ mRNAs相对应的cDNAs, 并用于指导体外转录-翻译反应。当采用SDS-PAGE分析 ^{35}S 甲硫氨酸标记的产物时, 检测到野生型的 $\Delta 2$ 和 $\Delta 23$ cDNA的特征谱带(图3A)。称作为 IRF-1 $\Delta 2$ 和IRF-1 $\Delta 23$ 的 $\Delta 2$ 和 $\Delta 23$ cDNA产物的大小相当于其合成分别在AUG密码子32(在外显子3中)和85(在外显子4中)开始的被截短了的IRF-1蛋白质。如图3B所示, 凝胶电泳移动分析显示IRF-1 $\Delta 2$ 和IRF-1 $\Delta 23$ 没有结合到含有两个高亲和力IRF-Es的寡聚体(C1寡聚体; Tanaka et al., 1993)。每个cDNA与一个在其启动子含有IRF-Es的报道质粒一起共转染到IRF-

阳性细胞系 (P19; Harada et al., 1990) 结果显示由完整IRF-1 cDNA编码的蛋白质, 但不是由 $\Delta 2$ 或 $\Delta 23$ cDNAs编码的蛋白质, 能激活该报道质粒(图3C)。 $\Delta 2$ 和 $\Delta 23$ cDNAs与完整IRF-1 cDNA的共转染并不影响IRF-1介导的基因的激活, 这表明既不是IRF-1 $\Delta 2$ 也不是IRF-1 $\Delta 23$ 以显性-阴性方式作用于IRF-1介导的转录活化(结果未显示)。

完整的人类IRF-1但不是IRF-1 $\Delta 23$ 显示肿瘤抑制剂活性

在大多数完整IRF-1 mRNA的表达较低或不能检测到的样本中, $\Delta 23$ mRNA却以相当高的水平进行表达(表1)。因此我们提出是否IRF-1 $\Delta 23$ 显示了肿瘤抑制剂活性的论点。用含有为完整IRF-1或IRF-1 $\Delta 23$ 编码的cDNA的表达载体, 和潮霉素(hgr)抗性基因(pMiwph; Kato et al., 1990)一起转染能表达c-Ha-ras癌基因(Tanaka et al., 1994)的活性形式的IRF-1^{-/-}EFs。将转染子平铺于甲基纤维素凝胶上培养。随后计算hgr-抗性菌落数目。如表2所示, 编码IRF-1的cDNA的转染导致深度地抑制菌落的形成, 而对于编码IRF-1 $\Delta 23$ 的cDNA没有观察到这样的效果。这些结果表明, 可能是由于失去了其DNA结合活性, IRF-1 $\Delta 23$ 缺少肿瘤抑制剂活性。

表 1 完整的IRF-1和交替拼接形式的IRF-1
在来自MDS/白血病患者细胞中的表达

来源	年龄, 性别	% 原始 ^a 细胞	p53mut. ^b	核型 ^c
[正常BM]				
(NBM)				
NBM.1	BM	38,M	N.D.	N.D.
NBM.2	BM	65,M	N.D.	N.D.
[RA]				
Pt.190	BM	38,F	(-)	N.D.
Pt.356	BM	74,M	(+)	46,XY,-18,5q-,9q-,+mar
Pt.441	BM	43,M	(-)	46,XY,12p-,20q-,21p+ / 46,XY,12p-, 20q-,21p+,21p+
Pt.581	BM	65,M	(-)	46,Xq-,Y,8q+
Pt.585	BM	45,F	(-)	46,XX
[RAEB]				
Pt.535	BM	54,M	(-)	46,XY
Pt.570	BM	61,M	(+)	47,XY,-5,-7,-12,-18,+22,15p+,+4mar
[RAEB-t]				
Pt.228	BM	72,M	(-)	46,XY
[GMMol.]				
Pt.255	BM	34,M	N.D.	46,XY,5q-,8p+,13q+,20q+
Pt.492	PB	57,M	N.D.	46,XY
Pt.519	BM	28,M	N.D.	46,XY
Pt.711	PB	77,F	N.D.	N.D.
Pt.716	BM	52,M	N.D.	46,XY,3q+,5p-q-,10p+,13q-
[MDS/LEU.I]				
Pt.117	PB	42,M	-100.0%	45,X,-Y
Pt.194	BM	68,M	43.6%	46,XY / 44,XY,-2,-5,-7,-9,-10,-17,-18, -20,19p+,+6mar
Pt.199	BM	60,F	68.0%	46,XX
Pt.231	BM	55,M	77.6%	46,XY
Pt.447	BM	44,F	67.0%	(-)
Pt.534	BM	60,F	50.0%	46,XX,t(11;19)
Pt.543	BM	44,F	35.3%	46,XX
Pt.578	BM	55,F	71.6%	46,XX,t(11;19)
Pt.706	PB	44,M	30.0%	46,XX,7p-,11q+
Pt.707	PB	56,M	50.0%	46,XY
Pt.713	BM	57,M	43.6%	47,XY,+8
Pt.715	BM	64,M	70.6%	44,X,-Y,-18,5q-
			N.D.	46,XY
细胞系				
HL-60				
K 562				
HEL				
Hela				
GM637				

表 1 (续)

	IRF-1	IRF-1Δ2	IRF-1Δ23	IRF-2 ^d
[正常BM]				
(NBM)				
NBM 1	1.00	0.16	0.83	1.00
NBM 2	0.97	0.07	0.46	0.76
[RA]				
Pt.190	0.05	0.05	2.36	1.31
Pt.356	0.08	0.12	1.31	0.91
Pt.441	0.42	0.03	0.19	1.40
Pt.581	0.00	0.00	0.15	3.24
Pt.585	0.43	0.07	0.32	2.68
[RAEB]				
Pt.535	0.89	0.16	0.73	1.26
Pt.570	0.39	0.06	0.29	1.73
[RAEB-t]				
Pt.228	0.08	0.02	0.20	0.73
[CMML]				
Pt.255	0.09	0.64	5.39	2.49
Pt.492	1.03	0.01	0.32	2.36
Pt.519	0.86	0.19	0.75	0.75
Pt.711	0.93	0.15	0.53	2.23
Pt.716	0.37	0.01	0.46	2.59
[MDS/LEU-1]				
Pt.117	0.00	0.00	7.80	1.89
Pt.194	0.37	0.15	0.52	0.49
Pt.199	0.30	0.33	4.01	6.51
Pt.231	0.77	0.14	1.19	1.20
Pt.447	1.00	0.48	1.06	1.69
Pt.534	0.63	0.13	0.38	3.76
Pt.543	1.19	0.08	0.38	2.77
Pt.578	0.15	0.00	0.15	1.83
Pt.706	0.75	0.03	0.47	2.94
Pt.707	0.39	0.02	0.42	1.09
Pt.713	0.47	0.07	0.42	1.21
Pt.715	0.67	0.04	0.21	3.21
细胞系				
HL-60	0.34	0.03	0.08	0.44
K 562	1.01	0.03	0.29	1.91
HEL	0.55	0.04	0.20	0.90
Hela	0.51	0.17	0.49	0.81
GM637	0.29	0.12	0.22	0.81

注：RA，顽固性贫血；RAEB，原始细胞过多性顽固性贫血；RAEB-t，转化中的RAEB；CMML，慢性骨髓单核细胞性白血病；MDS/LEU，由骨髓增生异常综合症引起的明显性白血病；BM，骨髓；PB，外周血；F，女性；M，男性；N.D.，未检测；p53mut.，p53突变。

a. 根据利用FAB分类法的形态学标准进行测定。

b. (-)：没有检测到突变。(+)：检测到突变。按Sugimoto et al., (1993)描述通过RT-PCR/SSCP分析测定MDS/白血病患者的p53基因的突变。

c. 根据人类细胞遗传学术语的国际系统(ISCN, 1991)对具有代表性的中期染色体扩散进行核型分析。

d. 相对于 β -肌动蛋白信号将IRF-1和IRF-2值定到标准值。将具有代表性的正常骨髓NBM.1的IRF-1完整形式和IRF-2的值分别定为1.00。每个值都是三个重复检测的平均值。

表 2 由完整的或交替拼接形式的
IRF-1对菌落形成能力的抑制

经转染的 构建体	菌落数目		
	实验1	实验2	实验3
pAct-C	995	934	699
pAct-H1	381	246	353
pAct-H1 Δ 23	844	803	813

注：经转染的构建体如下所示：pAct-c，对照肌动蛋白启动子载体；pAct-H1，完整IRF-1 cDNA表达的肌动蛋白启动子；pAct-H1 Δ 23，缺失外显子2和3的ITF-1 cDNA表达的肌动蛋白启动子。

实施例

RNA分离，S1定位图分析，以及RNA印迹分析

采用硫氰酸胍方法分离总的细胞RNA。按照以前曾经描述的方法进行S1定位图分析(Fujita et al., 1987)。为了制备探针DNA，将含有人IRF-1 cDNA FspI-KpnI片段有意义链的pBluescript II SK(+)噬菌体DNA作为模板，合成³²p标记的反意义DNA。然后采用BamHI消化该产物，分离含有核苷酸残基217至464 (Maruyama et al., 1989)的探针DNA。Harada et al. (1990)描述了RNA印迹分析

的程序。为了制备探针DNA, 采用随机引物法 (Amersham) 标记用于 β - 肌动蛋白的1Ha-204的2.0 kb BamHI-PvuII片段 (Miyamoto et al., 1988)。

合成的引物

设计用于特异性地扩增cDNA的引物。人IRF-1基因的引物 (Miyama et al., 1989) 是: 用于逆转录 (RT) 的反意义引物, 核苷酸 (nt) 490到471; 用于PCR的有意义引物, nt 92至111; 用于PCR的反意义引物, nt 470到451。IRF-2基因的引物 (Itoh et al., 1989) 是: 用于RT的反意义引物, nt 391到372; 用于PCR的有意义引物, nt 19至38; 用于PCR的反意义引物, nt 367到348。 β - 肌动蛋白的引物 (Ponte et al., 1984) 是: 用于RT的反意义引物, nt 470至451; 用于PCR的有意义引物, nt 311至330; 用于PCR的反意义引物, nt 448至429。小鼠IRF-1基因的引物 (Miyamoto et al., 1988) 是: 用于RT的反意义引物, nt 498至479; 用于PCR的有意义引物, nt 105至124, 用于PCR的反意义引物, nt 478至459。

RT-PCR分析

基本上按照以前描述的方法 (Makino et al., 1990) 进行RT-PCR分析。由于在紧随第一级指数动力学的PCR反应阶段可以定量地检测扩增子 (Wang et al., 1989; Makino et al., 1990; Foley et al., 1993), 因而认为高度特异性标记和更少的扩增循环提供了更高的灵敏度和更清晰的结果。在该检测分析中, 将来自相同RNA样品的IRF-1, IRF-2和 β - 肌动蛋白cDNAs进行PCR扩增, 并将 β - 肌动蛋白扩增子用作为mRNA定量分析的参考 (Makino et al., 1990)。

采用Chomczynski和Sacchi (1987) 中描述的单步骤方法分离总RNA。向含有1 pmol RT引物, 3.8 ml 5×RT缓冲液(250 mM Tris-HCl [pH 8.3], 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)的12.5 ml体积的反应混合物中加入500毫微克的总RNA。将该混合物在95℃加热2分钟, 置于冰上冷却, 并在37℃温育30分钟。在退火反应之后, 向该混合物中添加0.2 ml 5×RT缓冲液, 2 ml的0.1 M DTT, 4.0 ml 2.5 mM的各种dNTPs, 20 U的RNA酶抑制剂(Takara), 以及100 U的莫洛尼氏鼠白血病病毒(MMLV)逆转录酶(GIBCO BRL)至体积为20 ml, 然后在37℃温育60分钟。然后将RT反应产物在90℃温育5分钟, 置冰上冷却, 并加入40 ml蒸馏水。在体积为10 ml含有10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.01% (w/v) 明胶, 200 ml dNTPs, 各为1 mM的5'和3' ³²p末端标记的PCR引物, 0.25 U Taq DNA聚合酶(Perkin-Elmer Cetus), 以及3 ml的RT反应产物的反应混合物中进行PCR反应。用Perkin-Elmer Cetus DNA热循环仪按如下所示进行扩增: 在95℃反应30秒, 55℃反应30秒, 72℃反应1分钟。在扩增的指数阶段测定反应的循环数; 对于IRF-1和IRF-2为24个循环, 对于β-肌动蛋白为18个循环。将每种PCR反应混合物各1 ml在5% 聚丙烯酰胺凝胶以及0.5×TBE缓冲液中进行电泳。将凝胶干燥, 采用Fujix Bas 2000成像分析仪定量检测适当谱带的放射性。将IRF-1和IRF-2特异性扩增子的量校正为相同样品的β-肌动蛋白扩增子的量。针对在健康供体的NBM.1细胞中存在的IRF-1和IRF-2扩增子的水平(任意地定为1.00)进一步校正这些数据。对于IRF-1扩增子, 可以用Wang et al. (1989)描述的相同引物对多个不同mRNA种类进行定量分析。

质粒的构建

将每个含有完整的或交替拼接形式的IRF-1 cDNA的上述RT-PCR产物亚克隆到pCRTMII (Invitrogen)。为了构建用于体外转录的质粒(pBH1, pBH1 Δ 2和pBH1 Δ 23), 连接下面DNA片段; (i)来自pBluescript II SK(+)的EcoRI-BamHI主链片段(ii)来自含有IRF-1 cDNA的pCRTMII衍生物的EcoRI-EcoRV片段(iii)来自pHIRF31的EcoRV-BamHI片段(Maruyama et al., 1989)。通过用pAct-C的HindIII-BamHI主链片段(Harada et al., 1990)取代pBluescript衍生物的HindIII-BamHI主链片段而构建处于肌动蛋白启动子控制下的IRF-1表达载体(pAct-H1, pAct-H1 Δ 2和pAct-H1 Δ 23)。

体外转录和翻译

在帽类似物和三磷酸核糖核苷酸存在下, 使用含有完整的或突变的IRF-1 cDNAs的各种pBluescript II衍生物(pBH1, pBH1 Δ 2, 或pBH1 Δ 23)的T7启动子以及T7 RNA聚合酶将加帽的合成mRNA进行转录。反应按照制造者的方案(Stratagene)进行。用苯酚-氯仿萃取该RNA并用乙醇沉淀。再将该RNA重新溶于水中, 并将0.8 mg的RNA加到利用兔网状细胞溶解产物(Amersham)的体外翻译反应中, 在30°C进行60分钟。

凝胶转移试验

基本上按照以前描述的方法(Harada et al., 1990)完成该试验。使用³²P-标记的C1寡聚体(含有两个IRF结合基元; Tanaka et al., 1993)作为探针DNA。

DNA转染和CAT检测分析

使用含有四个IRF结合基元的5 mg p-55C1B报道基因(Fujita

et al., 1987; Tanaka et al., 1993), 以及5 mg的IRF-1表达载体转染P19胚胎癌细胞(2.5×10^5 个细胞/6 cm平皿)。按照所述(Harada et al., 1990)进行CAT检测分析。

在甲基纤维素凝胶上进行的菌落形成检测分析

采用磷酸钙方法(Harada et al., 1990)用15 mg 的IRF-1表达载体和0.3 mg的pMiwph (Kato et al., 1988)共转染活化形式的c-Ha-ras, rasEF11表达的IRF-1^{-/-}胚成纤维细胞(Tanaka et al., 1994) (5×10^5 个细胞/10 cm/平皿)。转染72小时后, 用溶于含有200 mg/ml潮霉素的培养基中的1.3%甲基纤维素凝胶悬浮细胞, 并平铺于由0.53%琼脂糖和培养基组成的琼脂糖床层上。铺平板3周后计算菌落数。

附图说明

图1

(A) 交替拼接方式的人IRF-1前mRNA。在上部的泳道中外显子按如图所述进行编号, 连接外显子的线条表示拼接。该图指出了位于外显子2内的起始因子ATG序列。在较低的泳道中, 显示完整的和交替拼接形式的IRF-1 mRNA。图中标出了被保护免受S1消化的探针的预期大小以及RT-PCR扩增的产物。

(B) 通过S1定位图谱分析检测交替拼接形式的IRF-1前mRNA。从健康志愿者(NPB.1)的外周血单核(PBM)细胞, HL-60细胞, 以及HEL细胞中分离总RNA。较上部泳道; 将15 mg的RNAs进行S1定位图谱分析(参见实验程序)。1道, ³²p-标记的HaeIII-消化的pBR322 DNA片段; 2道, 酵母tRNA, 作为阴性对照; 3道, 来自健康供体(NPB.1)的PBM细胞; 4道, HL-60; 5道, HEL。箭头指示如在(A)中描述的被

保护的探针的位置。较低部的泳道；将2.5 mg的RNAs进行Northern印迹分析并且用 β -肌动蛋白探针与滤纸进行杂交。

(C)对来自健康供体的PBM细胞，HL-60以及HEL中的IRF-1，IRF-2和 β -肌动蛋白mRNA进行的RT-PCR分析。利用与IRF-1、IRF-2和 β -肌动蛋白的引物分别将500毫微克的总RNA逆转录为cDNA。使用标记的引物将cDNA产物进行PCR（参见实验程序）。1道，酵母tRNA作为阴性对照；2道，来自健康供体(NPB.1)的PBM细胞；3道，HL-60；4道，HEL；5道， 32 p标记的HaeIII消化的pBR322 DNA片段。在上部泳道中，箭头指示在(A)中描述的PCR产物的位置。在中间以及下部泳道中，分别表示IRF-2和 β -肌动蛋白特异性扩增子。

(D)人以及鼠IRF-1 mRNA的RT-PCR分析比较。利用人或鼠IRF-1特异性引物将来自用人IRF-1基因组DNA转染的NIH 3T3衍生的克隆的总RNA (R27-3; Harada et al., 1993)以及来自鼠BAF/B03的总RNA进行RT-PCR分析（参见实验程序）。箭头指示(A)中描述的PCR产物的位置。1道， 32 p-标记的HaeIII消化的pBR322 DNA片段，2道，NIH 3T3衍生的克隆(R27-3)中人IRF-1扩增子；3道，R27-3中鼠IRF-1扩增子；4道，BAF/B03中鼠IRF-1扩增子。

图2: 来自具有代表性的MDS/白血病患者的mRNA的RT-PCR分析。

用来自健康供体的总RNA以及来自MDS/白血病患者的总RNA进行RT-PCR分析（参见实验程序）。在上部泳道中，箭头指示如图1A中描述的PCR产物的位置。1道， 32 p-标记的HaeIII消化的pBR322 DNA片段；2道，来自健康供体的骨髓细胞(NBM.1)；3道，Pt. 441；4道，Pt.228；5道，Pt.356；6道，Pt.231。在下部泳道中，显示 β

- 肌动蛋白特异性扩增子。

图3

(A) 完整的以及交替拼接形式的IRF-1的体外翻译产物。在12.5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上分析每种翻译反应(10 ml)的1 ml溶液。

(B) IRF-1突变体的DNA结合活性。将(A)中显示的体外翻译蛋白质进行凝胶转移分析。4道, 没有RNA的体外翻译产物; 5道, 没有提取物。箭头指示IRF-1 DNA复合物的位置。

(C) 由IRF-1突变体引起的转录激活。用5 mg的CAT报道基因p-55C1B和5 mg的效应因子基因转染P19细胞。经转染的效应因子基因如下所示: 对照, 5 mg的pAct-C; IRF-1, 2.5 mg的pAct-H1和2.5 mg的pAct-C; IRF-1 Δ 2, 2.5 mg的pAct-H1 Δ 2以及2.5 mg的pAct-C; IRF-1 Δ 23, 2.5 mg的pAct-H1 Δ 23以及2.5 mg的pAct-C。重复转染并且将检测分析重复三次, 结果基本上可重复。

参考文献

Abdollahi, A., Lord, K. A., Hoffman-Liebermann, B., and Liebermann, D. A. (1991). Interferon regulatory factor 1 is a myeloid differentiation primary response gene induced by interleukin 6 and leukemia inhibitory factor: Role in growth inhibition. *Cell Growth Differ.* 2, 401-407.

Au, W.-C., Raj, N. B. K., Pine, R., and Pitha, P. M. (1992). Distinct activation of murine interferon- α promoter region by IRF-1/ISGF-2 and virus infection. *Nucleic acids Res.* 20, 2877-2884.

Boultonwood, J., Fidler, C., Lewis, S., MacCarthy, A., Sheridan, H., Kelly, S., Oscier, D., Buckle, V. J., and Wainscoat, J. S. (1993). Allelic loss of IRF1 in myelodysplasia and acute myeloid leukemia: Retention of IRF1 on the 5q- chromosome in some patients with the 5q-syndrome. *Blood* 82, 2611-2616.

Carter, G., Rigde, S., and Padua, R. A. (1992). Genetic lesions in preleukemia. *Crit. Rev. Oncog.* 3, 339-364.

Cha, Y., Sims, S. H., Romine, M. F., Kaufmann, M., and Deisseroth, A. B. (1993). Human interferon regulatory factor 1: Intron-exon organization. *DNA Cell Biol.* 11, 605-611.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.

Foley, K. P., Leonard, M. W., and Engel, J. D. (1993). Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction. *Trends Genet.* 9, 380-385.

Friedman, R. L., and Stark, G. R. (1985). α -Interferon-induced transcription of HLA and metallothionein genes containing homologous upstream sequences. *Nature* 314, 637-639.

Fujita, T., Shibuya, H., Hotta, H., Yamanishi, K., and Taniguchi, T. (1987). Interferon- β gene regulation: Tandemly repeated sequences of a synthetic 6 bp oligomer function as a virus-inducible enhancer. *Cell* 49, 357-367.

- Fujita, T., Kimura, Y., Miyamoto, M., Barsoumian, E. L., and Taniguchi, T. (1989). Induction of endogenous IFN- α and IFN- β genes by a regulatory transcription factor, IRF-1. *Nature* 337, 270-272.
- Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., Metzgar, R., Aulakh, G., Ting, R., Ruscetti, F., and Gallo, R. (1979). Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 54, 713-733.
- Haber, D. A., and Housman, D. E. (1992). The genetics of Wilms' tumor. *Adv. Cancer Res.* 59, 41-68.
- Harada, H., Fujita, T., Miyamoto, M., Kimura, Y., Maruyama, M., Furia, A., Miyata, T., and Taniguchi, T. (1989). Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. *Cell* 58, 729-739.
- Harada, H., Willison, K., Sakakibara, J., Miyamoto, M., Fujita, T., and Taniguchi, T. (1990). Absence of the type I IFN system in EC cells: Transcriptional activator (IRF-1) and repressor (IRF-2) genes are developmentally regulated. *Cell* 63, 303-312.
- Harada, H., Kitagawa, M., Tanaka, N., Yamamoto, H., Harada, K., Ishihara, M., and Taniguchi, T. (1993). Anti-oncogenic and oncogenic potentials of interferon regulatory factors-1 and -2. *Science* 259, 971-974.
- Harada, H., Takahashi, E., Itoh, S., Harada, K., Hori, T., and Taniguchi, T. (1994). Structure and regulation of the human interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 genes: Implications for a gene network in the interferon system. *Mol. Cell. Biol.* 14, 1500-1509.
- Itoh, S., Harada, H., Fujita, T., Mimura, T., and Taniguchi, T. (1989). Sequence of a cDNA coding for human IRF-2. *Nucleic Acids Res.* 17, 8372.
- Itoh, S., Harada, H., Nakamura, Y., White, R., and Taniguchi, T. (1991). Assignment of the human interferon regulatory factor-1 (IRF1) gene to chromosome 5q23-31. *Genomics* 10, 1097-1099.

Kaelin, Jr., W. G., Pallas, D. C., DeCapiro, J. A., Kaye, F. J., and Livingston, D. M. (1991). Cellular proteins that can interact specifically with the retinoblastoma susceptibility gene product. *In* Origin of human cancer: A comprehensive review, Brugge, J., Curran, T., Harlow, E., McCormik, F. eds. (Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp.423-431.

Kamijo, R., Harada, H., Matsuyama, T., Bosland, M., Gerecitano, J., Shapiro, D., Le, J., Koh, S. I., Kimura, T., Green, S. J., Mak, T. W., Taniguchi, T., and Vilcek, J. (1994). Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science*, in press.

Kato, K., Kanamori, A., and Kondoh, H. (1990). Rapid and transient decrease of N-myc expression in retinoic acid-induced differentiation of OTF9 teratocarcinoma stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 10, 486-491.

Kerim, S., Mecucci, C., Cuneo, A., Vandenberghe, E., Louwagie, A., Stul, M., Michaux, J.-L., and Van den Berghe, H. (1990). 5q- anomaly in lymphoid disorders. *Leukemia* 4, 12-15.

Kirchhoff, S., Schaper, F., and Hauser, H. (1993). Interferon regulatory factor 1 (IRF-1) mediates cell growth inhibition by transactivation of downstream target genes. *Nucleic Acids Res.* 21, 2881-2889.

Le Beau, M. M., Albain, K. S., Larson, R. A., Vardiman, J. W., Davis, E. M., Blough, R. R., Golomb, H. M., and Rowley, J. D. (1986). Clinical and cytogenetic correlations in 63 patients with therapy-related myelodysplastic syndromes and acute nonlymphocytic leukemia: Further evidence for characteristic abnormalities of chromosomes No. 5 and 7. *J. Clin. Oncol.* 4, 325-345.

Le Beau, M. M., Chandrasekharappa, S. C., Lemons, R. S., Schwartz, J. L., Larson, R. A., Arai, N., and Westbrook, C. A. (1989). Molecular and cytogenetic analysis of chromosome 5 abnormalities in myeloid disorders: Chromosomal localization and physical mapping of IL-4 and IL-5. *Cancer Cells* 7, 53-58.

Le Beau, M. M., Espinosa III, R., Neuman, W. L., Stock, W., Roulston, D., Larson, R. A., Keinanen, M., and Westbrook, C. A. (1993). Cytogenetic and molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5484-5488.

Levine, A. J. (1993). The tumor suppressor genes. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 623-651.

- Levy, D. E., Kessler, D. S., Pine, R., Reich, N., and Darnell, Jr., J. E. (1988). Interferon-induced nuclear factors that bind a shared promoter element correlate with positive and negative transcriptional control. *Genes Dev.* 2, 383-393.
- Lewin, B. (1991). Oncogenic conversion by regulatory changes in transcription factors. *Cell* 64,303-312.
- Makino, R., Sekiya, T., and Hayashi, K. (1990). Evaluation of quantitative detection of mRNA by the reverse transcription-polymerase chain reaction. *Technique* 2, 295-301.
- Marshall, C. J. (1991). Tumor suppressor genes. *Cell* 64, 313-326.
- Maruyama, M., Fujita, T., and Taniguchi, T. (1989). Sequence of a cDNA coding for human IRF-1. *Nucleic Acids Res.* 17, 3292.
- Matsuyama, T., Kimura, T., Kitagawa, M., Pfeffer, K., Kawakami, T., Watanabe, N., Kündig, T. M., Amakawa, R., Kishihara, K., Wakeham, A., Potter, J., Furlonger, C. L., Narendran, A., Suzuki, H., Ohashi, P. S., Paige, C. J., Taniguchi, T., and Mak, T. W. (1993). Targeted disruption of IRF-1 or IRF-2 results in abnormal type I IFN gene induction and aberrant lymphocyte development. *Cell* 75, 83-97.
- Miyamoto, M., Fujita, T., Kimura, Y., Maruyama, M., Harada, H., Sudo, Y., Miyata, T., and Taniguchi, T. (1988). Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN- β gene regulatory elements. *Cell* 54, 903-913.
- Nimer, S. D., and Golde, D. W. (1987). The 5q- Abnormality. *Blood* 70, 1705-1712.
- Pederson, B., and Jensen, I. M. (1991). Clinical and prognostic implications of chromosome 5q deletions: 96 high resolution studied patients. *Leukemia* 5, 566-573.
- Pedersen-Bjergaard, J., Philip, P., Larsen, S. O., Jensen, G., and Byrting, K. (1990). Chromosome aberrations and prognostic factors in therapy-related myelodysplasia and acute nonlymphocytic leukemia. *Blood* 76, 1083-1091.
- Pine, R., Decker, T., Kessler, D. S., Levy, D. E., and Darnell, Jr., J. E. (1990). Purification and cloning of interferon-stimulated gene factor 2 (ISGF2): ISGF2 (IRF-1) can bind to the

promoters of both beta interferon- and interferon-stimulated genes but is not a primary transcriptional activator of either. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 2448-2457.

Pine, R. (1992). Constitutive expression of an ISGF2/IRF1 transgene leads to interferon-independent activation of interferon-inducible genes and resistance to virus infection. *J. Virol.* *66*, 4470-4478.

Ponte, P., Ng, S.-Y., Engel, J., Gunning, P., and Kedes, L. (1984). Evolutionary conservation in the untranslated regions of actin mRNAs: DNA sequence of a human beta-actin cDNA. *Nucleic Acids Res.* *12*, 1687-1696.

Reis, L. F. L., Harada, H., Wolchok, J. D., Taniguchi, T., and Vilcek, J. (1992). Critical role of a common transcription factor, IRF-1, in the regulation of IFN- β and IFN-inducible genes. *EMBO J.* *11*, 185-193.

Ruffner, H., Reis, L. F. L., Näf, D., and Weissmann, C. (1993). Induction of type I interferon genes and interferon-inducible genes in embryonic stem cells devoid of interferon regulatory factor 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *90*, 11503-11507.

Shirayoshi, Y., Miyazaki, J., Burke, P. A., Hamada, K., Appella, E., and Ozato, K. (1987). Binding of multiple nuclear factors to the 5' upstream regulatory element of the murine major histocompatibility class I gene. *Mol. Cell. Biol.* *7*, 4542-4548.

Stark, G. R., and Kerr, I. M. (1992). Interferon-dependent signaling pathways: DNA elements, transcription factors, mutations, and effects of viral proteins. *J. Interferon Res.* *12*, 147-151.

Sugimoto, K., Hirano, N., Toyoshima, H., Chiba, S., Mano, H., Takaku, F., Yazaki, Y., and Hirai, H. (1993). Mutations of the p53 gene in myelodysplastic syndrome (MDS) and MDS-derived leukemia. *Blood* *81*, 3022-3026.

Tanaka, N., Ishihara, M., Kitagawa, M., Harada, H., Kimura, T., Matsuyama, T., Aizawa, S., Mak, T. W., and Taniguchi, T. (1994). Cellular commitment to oncogene-induced transformation or apoptosis is dependent on the transcription factor IRF-1. Accompanied paper.

Tanaka, N., Kawakami, T., and Taniguchi, T. (1993). Recognition DNA sequences of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2, regulators of cell growth and the interferon system. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 4531-4538.

Tanaka, N., and Taniguchi, T. (1992). Cytokine gene regulation: Regulatory *cis*-elements and DNA binding factors involved in the interferon system. *Adv. Immunol.* *52*, 263-281.

Tanaka, S., Liu, L., Kimura, J., Shiojiri, S., Takahashi, Y., Kitaguchi, N., Nakamura, S., and Ueda, K. (1992). Age-related changes in the proportion of amyloid precursor protein mRNAs in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Mol. Brain Res.* *15*, 303-310.

Van den Berghe, H., Vermaelen, K., Mecucci, C., Barbieri, D., and Tricot, G. (1985). The 5q- anomaly. *Cancer Genet. Cytogenet.* *17*, 189-255.

Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1992). p53 function and dysfunction. *Cell* *70*, 523-526.

Wang, A. M., Doyle, M. V., and Mark, D. F. (1989). Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *86*, 9717-9721.

Weinberg, R. A. (1991). Tumor suppressor genes. *Science* *254*, 1138-1146.

Willman, C. L., Sever, C. E., Pallavicini, M. G., Harada, H., Tanaka, N., Slovak, M. L., Yamamoto, H., Harada, K., Meeker, T. C., List, A. F., and Taniguchi, T. (1993). Deletion of IRF-1, mapping to chromosome 5q31.1, in human leukemia and preleukemic myelodysplasia. *Science* *259*, 968-971.

Yamada, G., Ogawa, M., Akagi, K., Miyamoto, H., Nakano, N., Itoh, S., Miyazaki, J., Nishikawa, S., Yamamura, K., and Taniguchi, T. (1990). Specific depletion of the B-cell population induced by aberrant expression of human interferon regulatory factor 1 gene in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *88*, 532-536.

Yu-Lee, L.-Y., Hrachovy, J. A., Stevens, A. M., and Schwarz, L. A. (1990). Interferon-regulatory factor 1 is an immediate-early gene under transcriptional regulation by prolactin in Nb2 T cells. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 3087-3094.

说明书附图

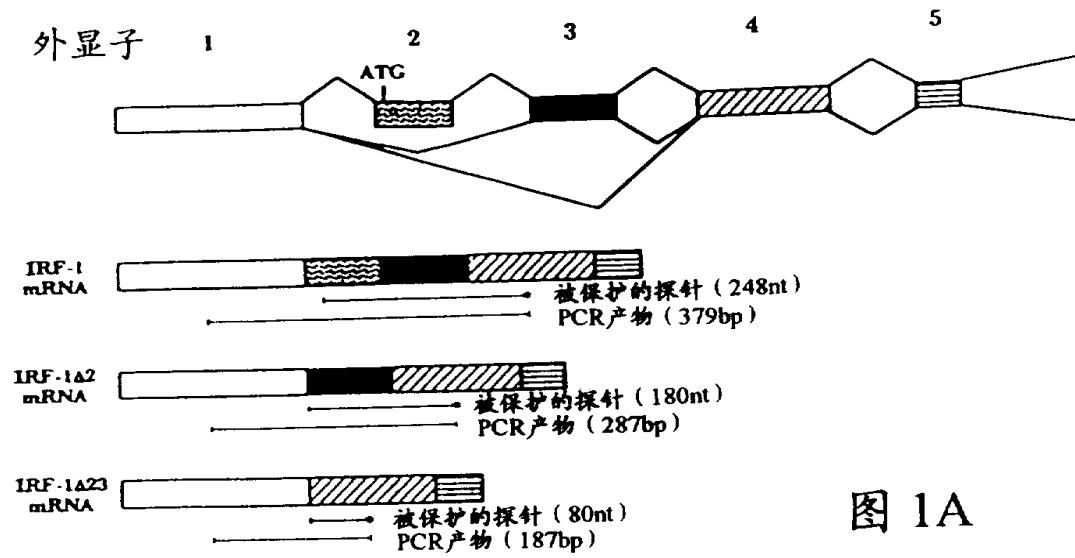
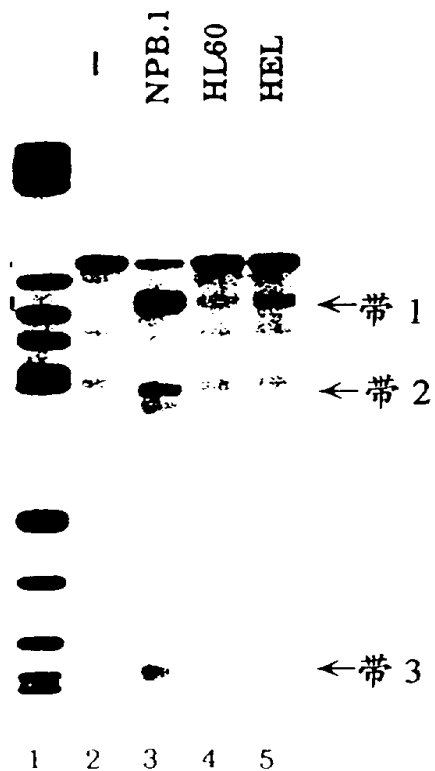


图 1A



β - 肌动蛋白

图 1B

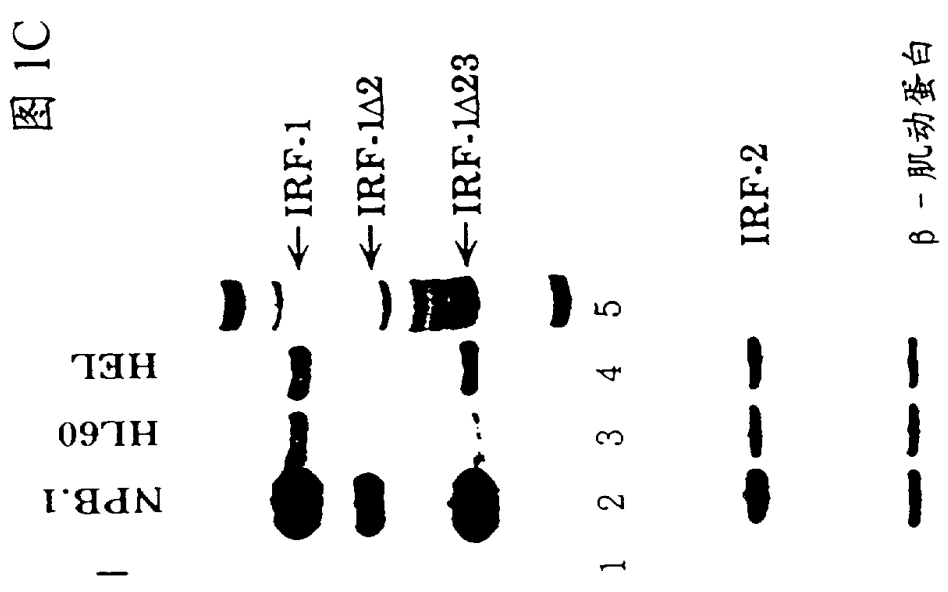
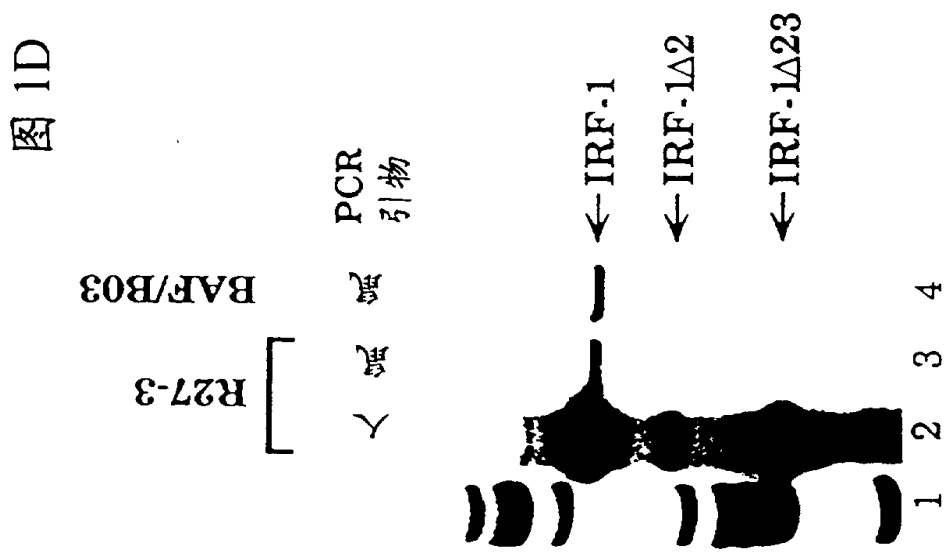
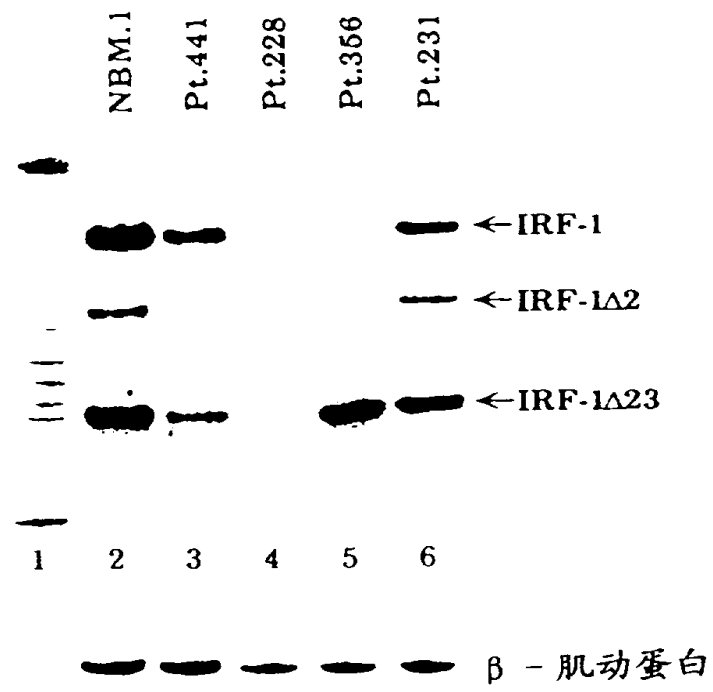


图 2



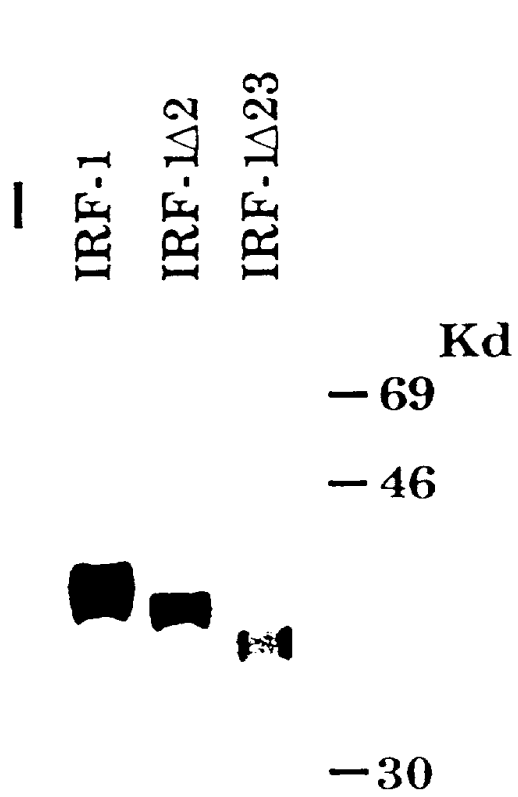


图 3A

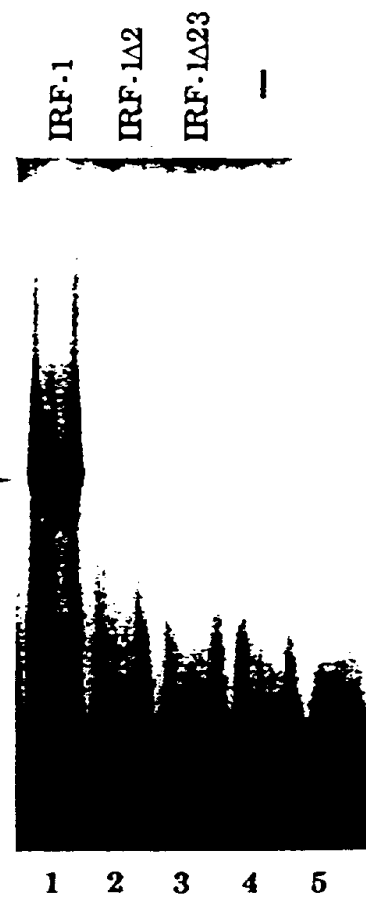


图 3B

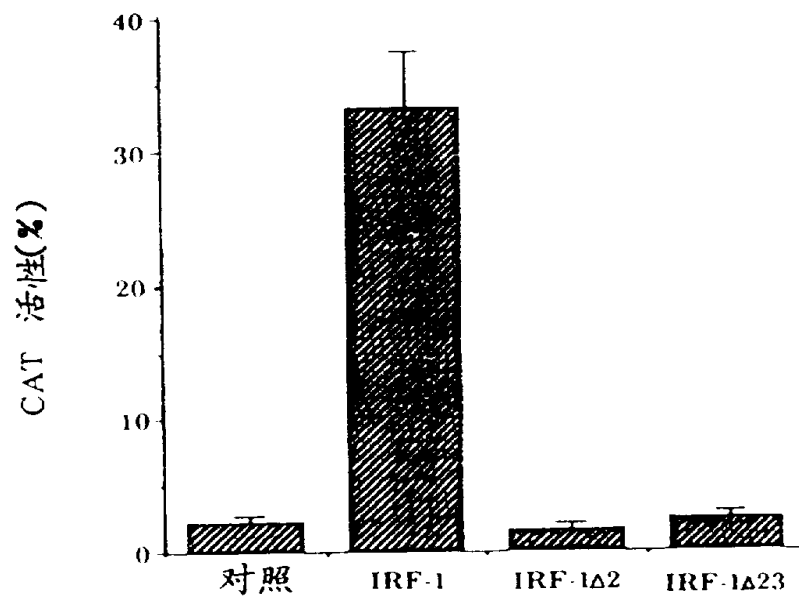


图 3C