

[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 200580031373.4

[51] Int. Cl.

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 15/14 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

[43] 公开日 2007年8月22日

[11] 公开号 CN 101023353A

[22] 申请日 2005.7.21

[21] 申请号 200580031373.4

[30] 优先权

[32] 2004.7.21 [33] US [31] 10/898,734

[86] 国际申请 PCT/US2005/026026 2005.7.21

[87] 国际公布 WO2006/012507 英 2006.2.2

[85] 进入国家阶段日期 2007.3.19

[71] 申请人 利兰·斯坦福青年大学托管委员会

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 O·D·佩雷斯 G·P·诺兰

J·M·伊瑞斯

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 韦东

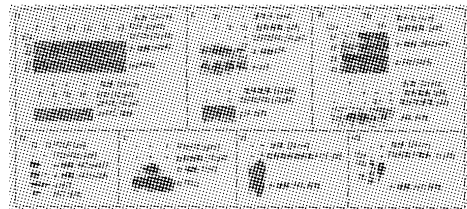
权利要求书2页 说明书112页 附图115页

[54] 发明名称

将危险分层次的方法与组合物

[57] 摘要

本发明提供同时测定一种细胞中多个蛋白质的活化状态的方法。此方法可以根据活化状态快速检测复杂细胞群的异质性，与鉴定显示细胞群活化的相关改变的细胞亚组。此外，此方法可以使细胞活性或特性相关联。另外，利用细胞活化的增强剂可以特征鉴定这种途径与细胞群。



1. 一种检测一种细胞中第一和第二可活化蛋白质中至少一种的活化状态的方法，所述方法包括以下步骤：

a) 提供包含所述第一和第二可活化蛋白质的一群细胞；

b) 使所述细胞群与多个活化状态特异性结合元件接触，其中所述多个活化状态特异性结合元件包括：

i) 与所述第一可活化蛋白质的第一同种型结合的第一活化状态特异性结合元件；和

ii) 与所述第二可活化蛋白质的第一同种型结合的第二活化状态特异性结合元件；和

c) 采用流式细胞术检测是否存在所述第一和第二结合元件的结合从而测定所述第一和第二可活化蛋白质的活化状态。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，用第一标记物标记所述第一结合元件，用第二标记物标记所述第二结合元件，所述第一和第二标记物不同。

3. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述细胞群是原代细胞。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，还包括利用所述第一和第二可活化蛋白质的活化状态信息来测定至少一种细胞的细胞状态。

5. 如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述细胞状态是药物敏感性。

6. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，还包括在与所述结合元件进行所述接触前，先使所述细胞群与候选药物接触。

7. 如权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述候选药物是增强剂。

8. 如权利要求 7 所述的方法，其特征在于，所述增强剂是细胞因子。

9. 如权利要求 7 所述的方法，其特征在于，所述增强剂是生长因子。

10. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述活化状态是磷酸化状态。

11. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，至少一种所述可活化蛋白质是激酶。

12. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，至少一种所述可活化蛋白质

是胱冬酶。

13. 一种检测一种细胞中至少一种第一可活化蛋白质的活化状态的方法，所述方法包括以下步骤：

- a) 提供至少包含所述第一可活化蛋白质的一群细胞；
- b) 使所述细胞群与多个底物接触；其中所述多个底物包括至少一个由该群细胞中的所述第一可活化蛋白质修饰的第一底物；和
- c) 采用流式细胞术检测所述可活化蛋白质的活化状态。

将危险分层次的方法与组合物

本申请要求2004年7月21日提交的美国专利申请号10/838,734的优先权，该篇申请全文纳入本文作为参考。

发明领域

本发明总体上涉及采用流式细胞术检测蛋白质的领域。更具体地说，本发明涉及采用多色流式细胞术(polychromatic flow cytometry)鉴定信号转导事件与细胞活化状况。本发明还涉及利用增强剂来影响活化状态进一步特征鉴定信号转导事件与活化状况。

背景技术

蛋白质是细胞的主要组分，蛋白质的时空表达模式与亚细胞定位确定了细胞的形状、结构与功能。许多蛋白质受动态调节，因而它们的活性在对内部或外来信号(cue)的反应中发生改变，这些信号在本文称为“活化事件”。这种调节通常发生在一般称为信号转导级联反应的蛋白质-蛋白质相互作用网络中。级联反应的各成员往往处在活化或非活化状态，这些状态之间的转换导致经由级联反应的信号传播或抑制。鉴于级联反应在细胞发育和功能中具有整体作用，它们的调节异常可导致许多疾病，特别是涉及细胞不适当增殖的那些疾病，例如癌症。

研究信号转导的人员常规采用依赖细胞群裂解物的方法，例如 western 印迹。这种方法本身具有局限性可能混淆关键信息。例如，利用细胞群产生的裂解物使稀少细胞事件被稀释而致其关键活化状况不再明显这种可能性将增加。此外，利用裂解物只能得到信号级联反应时天然细胞活化的大致状况，因为裂解本身改变了级联反应环境。由于这种局限性，需要能关注天然环境中信号转导级联反应各成员的新方法来更好地了解活化状况在疾病中的作用。

因此,本发明提供同时测定一种细胞中多种蛋白质活化状态的方法。此方法可根据活化状态快速检测复杂细胞群的异质性并鉴定细胞群活化时出现相关改变的细胞亚组。此外,此方法能根据信号转导活化状态将细胞活性或特性相关联,包括分类疾病状态。另外,利用细胞活化增强剂可进一步特征鉴定这种(活化)途径和细胞群。

发明概述

在一优选的实施方案中,本发明提供检测各细胞或细胞群中至少两种可活化蛋白质活化状态方法。此方法的第一步骤是提供含有两种可活化蛋白质的细胞群。该步骤之后使该细胞群与多个活化状态特异性结合元件相接触。这些活化状态特异性结合元件包括能与第一可活化蛋白质的第一同种型相结合的第一活化状态特异性结合元件和能与第二可活化蛋白质的第一同种型相结合的第二活化状态特异性结合元件中的至少一种。采用流式细胞术检测是否存在这些元件的结合(情况)从而确定该两种蛋白质的活化状态。

在其它实施方案中,用不同的标记物标记该两种结合元件。在另一实施方案中,所测试的细胞是原代细胞(primary cell)。

在其它实施方案中,可利用第一和第二可活化蛋白质的活化状态信息测定至少一种细胞的细胞状态。

在其它实施方案中,所测定的细胞状态是药物敏感性。

在其它实施方案中,细胞群先与候选试剂相接触,再与所述结合元件相接触。

在其它实施方案中,所述候选试剂的增强剂。

在其它实施方案中,所述增强剂是细胞因子。

在其它实施方案中,所述增强剂是生长因子。

在其它实施方案中,所述至少一种可活化蛋白质的活化状态是磷酸化状态。

在其它实施方案中,所述至少一种可活化蛋白质是激酶。

在其它实施方案中,所述至少一种可活化蛋白质是胱冬酶(caspase)。

在其它实施方案中,本发明提供检测细胞群各细胞中至少一种可活化蛋白质活化状态的方法。该方法的第一步骤是提供含有第一可活化蛋白质的细胞群。下一步骤包括使该细胞群与多种底物相接触,该多种底物至少包括一种可被可活化蛋白质修饰的底物。然后采用流式细胞术检测受修饰的底物量来检测可活化蛋白质的活化状态。

在其它实施方案中,本发明提供采用流式细胞术同时检测一种细胞中多个可活化蛋白质活化状态的方法与组合物。本发明也提供筛选能同时调节一种细胞中多个可活化蛋白质活性或活化状态的生物活性制剂的方法与组合物。可利用这些方法与组合物测定某细胞的蛋白质活化状况来预测或诊断疾病状态,监测疾病状态的治疗(情况)。此外,可任选采用本发明的方法与组合物来连续检测一种细胞中多个可活化蛋白质的活化状态。此外,可任选采用本发明的方法与组合物来检测一种蛋白质的活化状态或调节一种蛋白质的活性或活化状态。

本发明提供可用于本发明方法的多种细胞群、单细胞、细胞裂解物、蛋白质与含有该多种细胞群、单细胞、细胞裂解物、蛋白质的样品。具体地说,本发明提供可活化蛋白质与能和某可活化蛋白质的某特定同种型相结合的活化状态特异性抗体。在一方面,将所述活化状态特异性抗体与标记物,优选荧光标记物,更优选 FRET 标记物相偶联。

本发明一方面提供检测一种细胞第一与第二可活化蛋白质中至少一种活化状态的方法,该方法包括以下步骤: a) 提供含有该第一和该第二可活化蛋白质的细胞群; b) 使该细胞群与多个活化状态特异性抗体相结合,其中该多个活化状态特异性抗体包括: i) 至少一种能与该细胞群中该第一可活化蛋白质的相应同种型结合的第一活化状态特异性抗体; 和 ii) 至少一种能与该细胞群中该第二可活化蛋白质的相应同种型结合的第二活化状态特异性抗体; 和 c) 采用流式细胞术检测该细胞群的一种细胞中该第一和第二结合状态特异性抗体的结合(情况),其中该第一活化状态特异性抗体的结合(情况)表明该第一可活化蛋白质处于具体活化状态,该第二活化状态特异性抗体的结合(情况)表明该第二可活化蛋白质处于具体活化状态。

在其它方面,第一可活化蛋白质是一种激酶。在其它方面,第一可活化蛋

白质是胱冬酶。

在其它方面，第一可活化蛋白质是第一激酶，第二可活化蛋白质是第二激酶。在其它方面，第一激酶的所述同种型也可以是第一磷酸化激酶，第二激酶的所述同种型也可以是第二磷酸化激酶。在另一方面，第一活化位点特异性抗体与第一磷酸化激酶相结合，第二活化位点特异性抗体与第二磷酸化激酶相结合。

在其它方面，第一可活化蛋白质是第一胱冬酶，第二可活化蛋白质是第二胱冬酶。在其它方面，第一胱冬酶的所述同种型是第一胱冬酶原的切割产物，第二胱冬酶的所述同种型是第二胱冬酶原的切割产物。在另一方面，多个活化位点特异性抗体包括能和第一胱冬酶的同种型相结合的第一活化位点特异性抗体与能和第二胱冬酶的同种型相结合的第二活化位点特异性抗体。

在另一方面，本发明提供检测一种细胞中至少一种第一可活化蛋白质活化状态的方法，该方法包括以下步骤：a) 提供至少含有第一可活化蛋白质的细胞群；b) 使该细胞群与多种底物相接触，其中该多种底物包括至少一种能被该细胞群中该第一可活化蛋白质的相应同种型修饰的第一底物；和 c) 采用流式细胞术检测该细胞群一种细胞中第一底物的修饰(情况)，其中受到修饰(情况)表明第一可活化蛋白质处于具体活化状态。

在另一方面，该细胞群还含有第二可活化蛋白质；所述多种底物还包括能被该细胞群中第二可活化蛋白质的相应同种型修饰的第二底物；和步骤 c) 包括采用流式细胞术检测该细胞群一种细胞中第二底物的修饰(情况)，其中受到修饰(情况)表明第二可活化蛋白质处于具体活化状态。

在另一方面，本发明提供根据一种细胞中至少一种第一可活化蛋白质的活化状态检测该种细胞蛋白质活化状况的方法，该方法包括以下步骤：a) 提供至少含有第一可活化蛋白质的细胞群；b) 使该细胞群与多种底物相接触，其中该多种底物包括至少一种能被该细胞群中第一可活化蛋白质的相应同种型修饰的至少一种第一底物；c) 使该细胞群与多个活化状态特异性抗体相接触，其中该活化状态特异性抗体包括至少一种能与该细胞群中第一可活化蛋白质的相应同种型结合的至少一种第一活化状态特异性抗体；和 d) 采用流式细胞术

同时检测：i) 该细胞群一种细胞中第一活化状态特异性抗体的结合(情况)，其中该活化状态特异性抗体的结合(情况)表明第一可活化蛋白质处于具体活化状态；和 ii) 在该种细胞中第一底物受到修饰(情况)，此修饰(情况)表明第一可活化蛋白质处于具体活化状态。

在其它方面，所述细胞群还含有第二可活化蛋白质；所述多种底物还包括能被该细胞群中第二可活化蛋白质的相应同种型修饰的第二底物；和步骤 d) 还包括采用流式细胞术检测该种细胞中第二底物的修饰(情况)，其中受到修饰(情况)表明第二可活化蛋白质处于具体活化状态。

在其它方面，所述多个活化状态特异性抗体还包括能与该细胞群中第二可活化蛋白质的相应同种型结合的第一活化状态特异性抗体，和步骤 c) 还包括采用流式细胞术检测该细胞群该种细胞中第二活化状态特异性抗体的结合(情况)，其中结合(情况)表明第二可活化蛋白质处于具体活化状态。

在另一方面，本发明提供筛选能调节细胞中至少一种第一可活化蛋白质活性的生物活性制剂的方法，该方法包括：a) 提供一细胞群，各种细胞至少含有该第一可活化蛋白质、第二可活化蛋白质与第三可活化蛋白质，其中第一可活化蛋白质能活化第二可活化蛋白质从而形成第二可活化蛋白质的特定同种型(同种型-2)，第二可活化蛋白质能活化第三可活化蛋白质从而形成第三可活化蛋白质的特定同种型(同种型-3)；b) 使细胞与第二活化状态特异性抗体、第三活化状态特异性抗体与候选生物活性制剂相接触，其中第二活化状态特异性抗体能与同种型-2 相结合，第三活化状态特异性抗体能与同种型-3 结合；c) 根据同种型-2 和该同种型-3 的存在采用荧光激活细胞分选(FACS)方法分选该细胞群的一种细胞；和 d) 测定在存在或不存在候选生物活性制剂时该种细胞中同种型-2 与同种型-3 之比，其中在存在或不存在候选生物活性制剂时同种型-2 与同种型-3 之比的差异表明候选生物活性制剂能改进第一可活化蛋白质活性。

在其它方面，用某种活化制剂活化第一可活化蛋白质。

在其它方面，所述第一可活化蛋白质是胱冬酶。在另一方面，所述第一可活化蛋白质是一种激酶；在其它方面，所述激酶是 PI3K；在其它方面，用生长因子或细胞表面受体的活化而活化该 PI3K。

在另一方面，所述激酶是 PI3K；第二可活化蛋白质是 PIP2；第三可活化蛋白质是 PIP3；同种型-2 是 PIP 4, 5 双磷酸(bisphosphate)；同种型-3 是 PIP 3, 4, 5。

在其它方面，第一可活化蛋白质是 ICAM-2；其活性是凋亡；第二可活化蛋白质是 PIP2；第三可活化蛋白质是 PIP3；同种型-2 是 PIP 4, 5 双磷酸；同种型-3 是 PIP 3, 4, 5。在其它方面，步骤 a)还包括簇集 ICAM-2、ICAM-3 或 ICAM-1。

在另一方面，所述多个活化状态特异性抗体包括选自以下的至少一种抗体：抗-AKT-磷酸-Ser473、抗-AKT 磷酸-Thr308、抗-p44/42 MAPK 磷酸-Thr202/Tyr204、抗-TYK2 磷酸-Tyr1054/1055、抗-p38 MAPK 磷酸-Thr180/Tyr182、抗-JNK/SAPK 磷酸-Thr183/Tyr185、抗-磷酸-酪氨酸、抗-磷酸-苏氨酸、抗-PIP2 和抗-PIP3。

在其它方面，步骤 a)还包括使所述细胞群与能诱导至少该第一可活化蛋白质活化的制剂相接触。

在其它方面，步骤 a)还包括使所述细胞群与能诱导第一和第二可活化蛋白质中至少一种的活化制剂相接触。

在其它方面，步骤 a)还包括使所述细胞群与能诱导第一、第二和第三可活化蛋白质之一活化的制剂相接触。

在其它方面，这些方法包括根据第一可活化蛋白质的活化状态与第二可活化蛋白质的活化状态分选该种细胞。

在其它方面，第一活化状态特异性抗体包含第一标记，第二活化状态特异性抗体包含第二荧光标记，所述分选是荧光激活细胞分选(FACS)。

在其它方面，第一活化状态特异性抗体包含第一 FRET 标记；第二活化状态特异性抗体包含第二 FRET 标记，其中所述分选是荧光激活细胞分选(FACS)。

在其它方面，第一活化状态特异性抗体包含 FRET 标记；第二活化状态特异性抗体包含标记；所述分选是荧光激活细胞分选(FACS)。

在其它方面，步骤 a)还包括混合这些细胞。

在其它方面，所述细胞是哺乳动物细胞。

在其它实施方案中，本发明提供预测患者临床结果的方法，所述方法包括首先产生数目充足个体的统计学代表性细胞因子反应图(response panel)，随后产生患者的细胞因子反应图；然后比较所述患者的细胞因子反应图与数目充足个体的统计学代表性细胞因子反应图来预测患者的临床结果。

在其它实施方案中，首先检测未刺激细胞中多种磷酸蛋白的磷酸化状态，然后检测经细胞因子刺激细胞中多种磷酸蛋白的磷酸化状态，再测定刺激与未刺激细胞中磷酸蛋白的磷酸化状态差异(如果有的话)来制备所述细胞因子反应图。

在其它实施方案中，通过胞内磷酸化特异性流式细胞术进行检测。

在其它实施方案中，所述磷酸-蛋白选自：Stat1、Stat3、Stat5、Stat6、p38 和 Erk1/2。

在其它实施方案中，所述细胞因子选自：Flt3 配体、GM-CSF、G-CSF 或 IL-3。

附图简述

图 1 描述了证明磷酸化特异性抗体与激酶活性相关的实验结果。A) 通过特异性激酶诱导与抑制条件测定 i) p44/42、ii) p38、iii) JNK/SAPK、iv) AKTser473/AKTthr308、v) TYK2、vi) PKA-底物与 vii) PKC-PAN 底物的磷酸化特异性抗体的磷酸化特异性。显示了激酶的诱导条件以及该途径的特异性抑制剂。激酶对已知底物具有活性见以下各磷酸-western 分析。AKT、p38、SAPK/JNK、p44/42、MAPK 和 TYK2 的非磷酸化特异性抗体反映的是存在的总激酶。如用磷酸化特异性抗体所检测的，在诱导各激酶磷酸化的条件下测定激酶活性，将其与激酶磷酸化状态相关联。由于磷酸-PKA 底物与磷酸-PKC-PAN 底物抗体的性质，因而不能直接检测激酶活性。由于两种抗体识别的均是各自激酶底物处于磷酸化形式多种 PKC 和 PKA 靶蛋白中的识别基序，故所用的条件测定的是 PKC 和 PKA 的总体活化。AKT、p44/42、p38 和 JNK 激酶的免疫印迹/激酶试验在 NIH3T3 细胞中进行，TYK2、PKC 和 PKA 的数

据测定在 Jurkat 细胞中进行 (处理条件详情参见材料与方法)。

B) 如表 2 所图示, 先用激酶诱导剂(诱导的)或激酶抑制剂(抑制的)处理 Jurkat 细胞再(施加)诱导条件。制备胞内 FACS 染色用的细胞, 分析激酶活性, 图中显示了所述活性用磷酸化特异性抗体-荧光团偶联物荧光(强度)对数。图中的重叠说明激酶活性增加或降低的各自变化。右下图代表了以磷酸-ERK 活性表示(0.001、0.01、0.1、1.0、10 $\mu\text{g/ml}$)检测的用 EGF 处理的剂量反应曲线。以下是所用的抑制剂与激活剂: 用表皮生长因子(EGF)活化和用 MEK1/2 抑制剂 U0126²¹⁻²³*抑制 p44/42 (ERK1/2); 加入培养基与血小板衍生生长因子活化和用 PI3K 激酶抑制剂 LY294002²⁰*抑制 AKT; 用茴香霉素²⁹*活化和用星形孢菌素抑制 JNK; 用茴香霉素²⁹*活化和用化合物 SB203580^{24,29}*抑制 p38 MAPK; 用佛波醇 12-豆蔻酰化 13-乙酸酯 (PMA)活化 PKA, 与蛋白质磷酸酶抑制剂花萼海绵诱癌素 A²⁵*培育进行磷酸化检测; 用离子霉素 (IO)活化和用双吡啶基马来酰亚胺(bisindolymaleimide) II^{26,27}*抑制 PKC; 用干扰素 γ (IFN γ)诱导和用通用酪氨酸激酶抑制剂染料木黄酮^{28,3}*抑制 TYK2 的活性。*参见实施例 1 的“参考文献”中相应的参考号和引用。

C) TYK2、PKA 和 PKC 底物探针是磷酸化特异性探针。用 λ 磷酸酶处理受刺激样品(上述)再胞内染色降低了用磷酸-TYK2 和磷酸-PKA 底物探针的检测(效果)。除了 λ 磷酸酶以外, 为降低磷酸化 PKC 底物的检测(效果)需要用小牛小肠磷酸酶处理细胞。

D) 流式细胞术检测到 p44/42 的磷酸化与平均荧光强度相关。利用磷酸-p44/42 激酶探针通过磷酸化特异性检测和平均荧光强度(MFI)半定量分析 p44/42 的磷酸化。作了 Jurkat 细胞对所示浓度 EGF 的 30 分钟剂量反应曲线, 通过磷酸化特异性抗体的免疫印迹与开发的 p44/42 激酶探针作流式细胞术评估 p44/42 的磷酸化。Y 误差棒是 MFI 值的标准偏差。X 误差棒是与未刺激对照相比的磷酸化百分比的标准偏差。所示值代表 3 个独立实验。因数据点掩盖, 误差棒不可见。

图 2 描述了显示经不同刺激诱导后的多维分析以解信号转导网络的实验结果。

A) CD4⁺和 CD19⁺淋巴细胞亚组的激酶活性差异。用所示刺激处理 PBMC 一小时，制备的细胞用流式细胞术测定胞内激酶磷酸化状态。不同刺激后观察 CD4⁺细胞的 p44/42 活性高与低应答。

B) 通过 CD69 检测 T 细胞活性，代表对 CD3/CD28 与 PMA/离子霉素刺激时 p44/42 激酶活性的差异。刺激条件如图所示。

C) 人工 T 细胞刺激检测到的多种激酶活性。制备培养的用 PMA/离子霉素 (IO)处理的 Jurkat 细胞，用流式细胞术测定其胞内激酶磷酸化状态。CD69 表达表明 T 细胞活化。X 轴对应于荧光(强度)对数值，Y 轴对应于细胞数目。

D) p38 磷酸化是(衡量)细胞颗粒性的函数。同时检测磷酸化与非磷酸化的 p38，显示随着细胞颗粒性增加(侧向分散(side scatter)参数中的空心棒(Open bar))p38 从非磷酸化转变为磷酸化。

E) p44/42 与 p38 激酶活性的 3-参数分析是(衡量)JNK 活性的函数，图示对信号转导干扰(crosstalk)的可能性。用 IL-1 α 、处理 PBMC，同时采用流式细胞术检测 JNK、p44/42 和 p38 活性。磷酸-JNK/SAPK 图中的空心棒表示 JNK 活化的强度。

F) AKT、p38、PKA 和 p44/42 活性的 5-参数分析是 IL-1 β 处理的 PBMC 中 TYK2 活性的函数。在引发 TYK2 活性时，未检测到所有 4 种激酶活性。在 TYK2 活性的较高水平时观察到 p38、p44/42 和 AKT 活性的同步活化。在 p38 和 p44/42 活性的较高水平时观察到 PKA 活性。

图 3 显示通过多色流式细胞术(11-色，13-参数)分离、制备与分析静息 T 细胞的流程图。

通过 Ficoll-梯度离心分离淋巴细胞，除去粘附细胞。流式细胞图说明了典型的淋巴细胞门控分选(gate)与 CD3⁻(细胞)群的存在。磁性激活细胞分选除去了活化的 T 细胞、NK 细胞、剩余的巨噬细胞与 B 细胞，富集了静息 T 细胞。先评估富集的(细胞)群，再刺激以确定存在 CD4⁺和 CD8⁺细胞。用 IL-1 α 、IL-1 β 或 IL-2 进行刺激，将制备的细胞用表 1 所述染料作流式细胞术分析。有时，观察到对某些刺激一些表面标记下调，表现为关键分子，即 CD3、CD4、CD8 的受体下调(当与这些标记在刺激处理前的流式细胞图相比时很明显)。描述了

CD4⁺与 CD8⁺T 细胞用 5 种分化标记门控分拣记忆细胞与原代细胞的实例。按照 De Rosa 等(的方法)分别对 CD4⁺和 CD8⁺(细胞)群适当布置 CD45RA 分拣。根据分化标记通过多标记分拣鉴定原初与记忆细胞后测定胞内激酶活性。将激酶状况对 CD11a 标记作图, 虽然它们经分拣均具有原初与记忆标记。通过联用两种 11-色实验可以评估多种激酶活性。

图 4 显示采用多色流式细胞术不难辨别各特定淋巴细胞亚组中信号转导状况的实验结果。为直接比较, 使原初与记忆 T 细胞激酶分布状况重叠。当 CD8⁺原代细胞中激酶磷酸化但未超过 log₁₀ 荧光强度时(图 2 所示抑制剂/诱导剂实验确定的值), 可观察到阈值依赖型激酶的活化机理。可观察到 IL-1 α (刺激时), CD4⁺原代细胞的应答低下。

图 5 描述了通过流式细胞术监测活化或未活化激酶强度的实验结果。

A) 用 p44/42、p38、AKT、TYK2 和 JNK 的磷酸化与非磷酸化特异性探针检测天然状态各激酶。如下处理 Jurkat 细胞 10 分钟, 用表 2 所示各浓度的诱导剂诱导各自激酶初始活化: 用 PDGF 刺激 AKT, 用 EGF 刺激 MAPK 活化, 用茴香霉素刺激 p38 和 JNK 活化。磷酸-p44/42、磷酸-p38、磷酸-AKTser473、磷酸 AKTthr308 与磷酸-JNK/SAPK 根据它们的非磷酸化特异性对应物的给定刺激可检测不同(细胞)群。分拣 AKT 阳性细胞并如图所示对 AKTser473-与 AKTthr308 磷酸化作图。合适地显示未刺激细胞的非磷酸化特异性激酶进行比较。

图 6 显示 LFA-1 刺激能诱导人原初 CD4⁺ T 细胞 JAB1 和胞黏蛋白-1 释放与磷酸化的实验结果。A) 用 CD3、CD28 与 sICAM-2 刺激(5 μ g/ml, 30 分钟)的细胞核提取物的磷酸-cJun 免疫印迹。B) α -JAB1、IgG 转染与非转染细胞中磷酸-cJun(S63)的单细胞分析。中值荧光强度作图+SD。C)在未刺激的 (A-C 图)、LFA-1 刺激的 (sICAM-2 5 μ g/ml) (D-F 图)与 α -JAB1 转染的细胞 (G-I)中的共焦 JAB1 与胞黏蛋白-1。G-I 图未用 α -JAB1 抗体染色。D) 对未刺激的、sICAM-2 和 CD3 刺激的(5 μ g/ml, 30 分钟)细胞 JAB1 和胞黏蛋白-1 的免疫沉淀物作磷酸-丝氨酸和磷酸-苏氨酸免疫染色, 然后剥离条带并分别作 α -JAB1 和 α -胞黏蛋白-1 染色。E) 流式细胞术检测经 sICAM-2 刺激(5 μ g/ml, 30 分钟), IgG、 α -JAB1、

α -胞黏蛋白-1 N-末端、 α -胞黏蛋白-1 C-末端与 C-末端胞黏蛋白-1 肽转染细胞中的磷酸-p44/42(T202/Y204)。F) 描述的实验结果显示: A) 采用流式细胞术对 CD3、CD28 和 LFA-1 刺激的磷酸-p38(T180/Y182)、磷酸-AKT(S473)、磷酸-Lck(S158)、磷酸-mek1/2(S217/221)、磷酸-elk(S38)进行的动力学分析。我们观察到 CD28 刺激诱导的磷酸-AKT、磷酸-p38 和磷酸-mek1/2 的含量高于 CD3 或 LFA-1 刺激(所诱导的)。这些报导与近来提出 CD28 刺激可活化这些途径的发现(Kane 等, 2001; Li 等, 2001)一致。我们注意到 LFA-1 刺激诱导磷酸-lck 随时间的变化不同于 CD3 和 CD28 刺激的。CD3 和 CD28 刺激使得 elk-1 磷酸化, 其程度低于 LFA-1 刺激(诱导的)。

图 7 描述了利用磷酸-蛋白质抗体阵列显示人原初 T 细胞中的 CD3/CD28/LFA-1 信号转导的实验结果。A) CD3/CD28/LFA-1 与 C3/CD28 刺激的原初 CD4⁺ T 细胞的磷酸-蛋白质分布状况差异。从以下方程计算磷酸-蛋白质阵列荧光的比值, 其中 MFI 等于平均荧光强度: Log, (参见材料与方法)。荧光强度比例尺描述了磷酸化倍数, 其中绿色代表高(强度), 黑色代表低(强度)。B) 用 CD3、CD28 和 sICAM-2 刺激的 CD4⁺ T 细胞的细胞周期分析。采用 Ki-67 表达与 DNA 含量的双重染色测定处于细胞周期 G₀、G₁、S+G₂/M 期的细胞。认为低 Ki-67-信号的细胞处于 G₀ 期, 具有 2n DNA 的 Ki-67 + 信号的细胞处于 G₁ 期, 具有 2n DNA 的 Ki-67 + 信号的细胞处于 S 或 G₂/M 期。

图 8 A)和 B)显示原初 CD4⁺ T 细胞的多维分析流程图。采用多重(multiplex)磁性细胞分选、13-参数流式细胞术、转录因子状况与细胞因子珠阵列测定刺激对原初人 CD4⁺ T 细胞(CD3⁺CD4⁺CD8⁻CD45RA⁺CD62L⁺CD11a^{dim}CD27⁺CD28⁺)免疫表型的作用。此图显示细胞因子和磷酸-蛋白质的胞内水平与表面表型/活化标记相关。C) 证实了这些细胞是分别用 sICAM-2 和 CD28 刺激以及 CD3/sICAM-2 组合刺激的原初 CD4⁺ T 细胞(如 5 种分化标记所示)。B) 刺激(如所示, 10 μ g/ml)24 和 48 小时后的 CD25 表达。

图 9 描述了通过监测胞内 IL-2 与表面 CD25 和 CD69 标记显示 T 细胞活化的实验结果。A) 检测经 CD3/CD28 与 LFA-1 刺激或 CD3 与 CD28 刺激 6 小

时的 IL-2 胞内滴度。中值荧光强度图示为所见的阵列。B) 未刺激的、CD3/CD28/LFA-1 (0.001 $\mu\text{g/ml}$, 1: 1: 1)刺激的与 CD3/CD28 (10 $\mu\text{g/ml}$)刺激的 CD4 T 细胞中 CD69 和 CD25 表达的双变量分析。C) 未刺激的、CD3/CD28 刺激的与 CD3/CD28/LFA-1 刺激 12 小时后的(细胞)中 CD69 表达的双变量图与胞内 IL-2 的检测。

图 10 显示转录因子核定位与活性分布状况的实验结果。A) NFAT-萤光素酶、NF- κ B-萤光素酶和 AP-1-萤光素酶转染的 Jurkat 细胞的报导基因实验。用 CD3、CD3/CD28 和 CD3/CD28/LFA-1 刺激(6 小时, 10 $\mu\text{g/ml}$), 萤光素酶活性的倍数图。B) CD3、CD28 和 LFA-1 刺激 (10 $\mu\text{g/ml}$, 12 小时)所致的转录因子核分布状况(如图所示)。使核提取物(5 $\mu\text{g/ml}$)与包被了转录因子特异性共有序列 DNA 的板杂交, 用 ELISA 检测。数值按阴性对照标准化, 以 655 nm 吸光度单位表示。CD3/CD28 与 CD3/CD28/sICAM-2 刺激细胞的核分布状况(如上所述)。C) 上述 CD3/CD28 与 CD3/CD28/LFA-1 滴定(如图所示)的 NFAT-萤光素酶报导物活性。D-E) 显示 CD3、CD28 与 LFA-1 刺激的转录因子分布状况与细胞计量珠阵列的实验结果。A) 制备受刺激细胞的核提取物, 与包被有 p65、p50、cFos、creb、atf2 和 cRel 的共有序列的 96 孔板杂交。用标准 ELISA 技术检测结合的蛋白质。CD3 刺激导致 NF- κ B 亚基 p65 与 p50 水平降低, 未检测到 cFos、cRel、CREB 水平(变化), 其作用与 LFA-1 刺激相似。然而, 单用 CD3 刺激导致 atf2 水平升高超过 CD28 与 LFA-1 刺激。单用 CD28 刺激导致 NF- κ B p65 与 p50 亚单位的水平降低, CREB 的水平升高。LFA-1 刺激导致 NF- κ B p65 亚基与 cRel 的水平略升高一些。B) 是用于测定对 CD3/CD28 和 CD3/CD28/LFA-1 刺激 (10 $\mu\text{g/ml}$, 16 小时)而致分泌 IFN α 、IL-10、IL-2、IL-4、IL-5、IL-2 和 TNF α 的细胞计量珠阵列(CBA)。利用重组细胞因子按照标准曲线利用计算机处理数值, 同时测定处理细胞的上清液。单用 CD3 和 LFA-1 刺激后细胞因子分泌检测报导无明显的细胞因子分泌, CD28 刺激导致 IL-4 和 IL-5 水平升高, INF α 水平降低。

图 11 显示人原初 CD4 T 细胞中胞内产生 IL-4 与 INF α 的实验结果。经 CD3 和 CD28 与经 CD3/CD28 和 LFA-1 刺激 6 小时后滴定的 IFN α 与 IL-4 胞内水平。

中值荧光强度根据未刺激细胞标准化, 计算 IL-4/IFN α 比值的对数, 图示为强度等高线图。强度水平范围见标示描述(右侧)。

图 12 显示对于 CD3/CD28 和 CD3/CD28/LFA-1 刺激 (10 μ g/ml, 16 小时) 而致分泌 IFN α 、IL-10、IL-2、IL-4、IL-5 和 TNF α 的细胞计量珠阵列和细胞计量珠阵列(CBA)实验结果。利用重组细胞因子按照标准曲线用计算机处理数值, 同时用 PharMingen 的 CBA 阵列检测处理细胞的上清液。

图 13 显示经 p44/42 MAPK 级联反应活化的 NIH3T3 中异位 ICAM-2 群集的实验结果。A) ICAM-2 和 ICAM2-AC 逆转录病毒表达载体靶向细胞表面。用针对各自末端的特异性抗-人抗体通过流式细胞术来验证 ICAM-2 和 ICAM2-AC 转导的 NIH3T3 的质膜靶分子。B) 经 Western-印迹验证的 ICAM-2 与 ICAM2-AC 表达与 Jurkat 细胞的内源性 ICAM-2 相比较。C) 表面 ICAM-2 群集后引发 p44/42 MAPK 级联反应。在所示时间经抗人 ICAM-2 单克隆抗体使血清饥饿的 ICAM-2 细胞通过 ICAM-2 交联(10 μ g/ml)。收集细胞裂解物, 进行标准电泳和免疫印迹分析。用 RAF、MEK、p44/42 MAPK (ERK1/2)、Elk-1 和 Rsk1 的磷酸化特异性抗体检测蛋白质的磷酸化。然后剥下印迹条带, 用针对各自激酶的正常抗体(非磷酸化特异性抗体)再次检测。D) p44/42 MAPK 激酶活性试验检测到 ICAM-2 群集诱导了 p44/42 MAPK 活化。血清饥饿的细胞用 ICAM-2 (10 μ g/ml)交联 30 分钟后, 评估 p44/42 MAPK 活性。阳性与阴性指示线表示 MAPK 激酶内部对照与用作诱导条件阴性对照的对照 IgG。

图 14 显示 p44/42 MAPK 活性介导生长动力学升高的实验结果。A) ICAM-2 群集后引发再次进入细胞周期。细胞血清饥饿 72 小时以使细胞在没有化学药物时同步, 然后使细胞通过 ICAM-2 交联(10 μ g/ml, 18 小时)并采用流式细胞术分析细胞周期。误差棒表示一式三份实验的标准偏差。给出了具体细胞周期阶段分拣(结果)(左图)。B) MTT 细胞存活性试验检测接触抑制诱导的细胞周期停滞。将所示细胞类型以所示递增细胞密度方式接种于 96 孔板, 使细胞与 MTT 试剂一起培育检测细胞呼吸。在最初的 2 小时设置期间 4 小时后, 读取 580 nm 吸光度来检测(呼吸)产物。误差棒表示一式三份实验的标准偏差。C) 通过随时间(而变)的细胞密度监测生长动力学。将所示细胞类型以 10^4 个细

胞接种，采用标准克隆产生试验监测所示期间的细胞密度。误差棒表示一式三份实验的标准偏差。

图 15 显示 ICAM-2 能与表面 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 和 $\beta 3$ 整联蛋白结合的实验结果。A) 亲和层析检测几种 ICAM-2 相互作用表面蛋白。通过用免疫方法消除了经转导的 NIH3T3 细胞的中 ICAM-2，化学偶联于 FITC 制备 ICAM-2-FITC 探针(第一幅和第二幅图)，用抗-ICAM-2 免疫印迹与荧光标记检测。用 ICAM-2-FITC 作为标记探针的 farwestern 方法在 ICAM-2 裂解物中检测到 96 和 16 kDa 相互作用的蛋白质条带(第三幅图)。使 ICAM-2 与载体对照细胞的表面蛋白质生物素化，应用于亲和层析双柱系统(采用构建的 ICAM-2 偶联固体支持物与链霉亲和素-琼脂糖支持物)。几种蛋白质条带经鉴定是 ICAM-2 相互作用与表面表达蛋白(通过链霉亲和素 FITC 检测生物素化蛋白)(第四幅图)。B) ICAM-2 可溶性蛋白与细胞表面结合。用 ICAM-2-FITC 探针标记 NIH3T3、Jurkat 和 BaF3 细胞，采用流式细胞术检测。利用胰蛋白酶预处理细胞减弱 ICAM-2-FITC 的结合能力(右图)。C) ICAM-2 与 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 和 $\beta 3$ 整联蛋白相互作用。利用单克隆抗体对 ICAM-2 固体支持物的最终洗脱液与随后链霉亲和素-琼脂糖柱流出液进行 β 整联蛋白免疫印迹分析。细化对 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 和 $\beta 3$ (整联蛋白)的检测并验证了 MALDLMS 分析的质谱读数。D) ICAM-2 与 $\beta 2$ 整联蛋白相互作用诱导了 p44/42 MAPK 激酶活性。用单克隆抗体封闭血清饥饿细胞的 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 和 $\beta 3$ 整联蛋白，再使 ICAM-2、ICAM2-AC 与载体对照细胞中的 ICAM-2 交联。E) 用定量流式细胞术评估整联蛋白分布状况。将 $\alpha 5$ 、 αL 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 和 $\beta 4$ 单克隆抗体偶联于藻红蛋白(PE)，利用 QuantiBRiTE PE 珠通过流式细胞术定量检测(详见材料与方法)。作为标准抗原浓度曲线的函数的线性回归分析能定量测定每个细胞上表面分子的数目。误差棒表示一式三份实验的标准偏差。F) 利用 αL 整联蛋白抗体封闭可溶性 ICAM-2 诱导的 p44/42 MAPK 磷酸化与活性。将 ICAM-2 可溶性蛋白与用或不用所示浓度抗 αL 单克隆抗体预处理的血清饥饿 Jurkat 细胞一起培育 30 分钟(类似于 mAb 封闭实验)，(进行)磷酸-p44/42 MAPK 免疫印迹(左图)与 p44/42 MAPK 活性试验(右图)。

图 16 显示 ICAM-2/LFA-1 相互作用通过 PYK2 和 SYK 传递至 Raf 的实验

结果。利用各种 Src 相关激酶的药学抑制剂进行抑制剂筛选, 鉴定到 PYK2 与 SYK 是将 ICAM-2 诱导的信号传递至 Raf 与 p44/42 MAPK 激酶所需。用 10 μ M 所示化合物处理血清饥饿的细胞 30 分钟, 然后通过 ICAM-2 交联 30 分钟(10 μ g/ml), 利用磷酸特异性抗体以标准免疫印迹方法评估磷酸化的 Raf 与 p44/42 MAPK。溶解于 0.1%DMSO 的对照 IgG 作为阴性对照。印迹是一式三份实验的代表。B) 在 ICAM-2 相互作用基础上, SYK 和 PYK 与 LFA-1 亚基的相互作用得到增强。进行共免疫沉淀实验, 免疫沉淀 α L 与 β 2 整联蛋白并作免疫印迹(检测) SYK 和 PYK 的存在, 作为刺激 30 分钟产生的功能指标(用 10 μ g/ml 的抗体, 1 μ M 化合物和对照 19 作为阴性对照)。相互共免疫沉淀证实 PYK 与 SYK 和 β 2 整联蛋白缔合(下图)。C) 抗磷酸酪氨酸免疫沉淀与随后的 PYK2 免疫印迹测定到 PYK2 在有 ICAM-2 或其它刺激存在时被磷酸化。

图 17 描述了以下实验结果: 共聚焦显微术揭示 ICAM-2 与 LFA-1 相互作用以及随后的 PYK2 磷酸化后, Jurkat 细胞中的 YPK2 与 SYK 发生细胞重分布至膜表面。用可溶性 ICAM-2 蛋白 (10 μ g/ml)或牛血清白蛋白 (未刺激的, 10 μ g/ml)处理 Jurkat 细胞 10 分钟, 进行共聚焦显微术(参见材料与amp;方法)。对细胞作 PYK2、SYK2 与磷酸化 PYK2(在酪氨酸 402 处)(称为 PYK2 pTyr402) 染色。图 A-F 代表未处理的细胞, 图 G-L 代表 ICAM-2 处理的细胞。箭头指向突出 PYK2 和 SYK 细胞分布的显著差异。比例尺标杆在图的左下角(微米)。图 G-L 的放大率较高以清楚显示分布差异。

图 18 显示采用流式细胞术激酶试验测定到细胞-细胞接触可引发表达 LFA-1 细胞中 p44/42 MAPK 活化与表达 ICAM-2 的细胞中 AKT 活化的实验结果。A) 将 Jurkat 细胞与逆转录病毒转导的 ICAM-2 细胞混合 30 分钟, 通过 CD3 和 CD4 表面标记的表面染色进行流式细胞术, 利用荧光偶联的磷酸化特异性单克隆抗体胞内染色磷酸-p44/42 MAPK 和磷酸-AKT(详见材料与amp;方法)。如荧光强度对数所测定的一样, 根据 CD3 和 CD4 表面标记分析分选高与低磷酸化 AKT 和 p44/42 MAPK(细胞)群。这些图描述了 CD3 与磷酸-AKTser473 或磷酸-p44/42, 但与 CD4 类似。B) 细胞间 ICAM-2/LFA-1 相互作用引发的信号转导途径模型。与 ICAM-2 结合后 LFA-1 活化了通过 PYK2 与 SYK 介导的

RAF/MEK/MAPK 级联反应。由于 ICAM-2 群集于细胞表面，表达 ICAM-2 的细胞活化了 AKT 存活途径。

图 19 显示对星形孢菌素诱导凋亡的抗凋亡分子逆转录病毒文库筛选鉴定 ICAM-2 的实验结果。A) cDNA 文库筛选方案。用 Jurkat T 细胞逆转录病毒 cDNA 文库感染 10^7 个 NIH3T3 细胞，用星形孢菌素($1 \mu\text{M}$)处理 24 小时以诱导凋亡(Stolzenberg 等, 2000)。培养存活的克隆一周，重复选择三次。进行表型传递试验以确定哪个病毒整合物编码抗凋亡功能。用天然 Moloney 鼠白血病病毒 (MMLV)感染一等份的存活细胞群。这拯救了复制缺陷型病毒载体原病毒，产生了感染性颗粒。用拯救的病毒载体感染 NIH3T3 细胞，用星形孢菌素处理以证实抗凋亡表型。B) 从星形孢菌素诱导凋亡筛选存活下来的(细胞)群复杂性。进行 RT-PCR 评估存活(细胞群)的复杂性。存活的细胞群(1□)显示几条不连续的条带，传递后的细胞群(2□)显示一条条带。M-分子量标记。最初以 10% 加入文库的阴性对照载体(LacZ)未检测到，却不难检测到表达 Bcl-2 载体的独立感染。C) 受感染 NIH3T3 细胞编码 ICAM-2 逆转录病毒载体的 western 印迹分析。D) 编码 ICAM-2 的逆转录病毒载体异位表达表面 ICAM-2。右图：用编码 ICAM-2 的逆转录病毒载体构建物或对照载体感染的 BaF3 前-B-细胞，采用流式细胞术检验内源性和表达的 ICAM-2 的表面表达水平。左图：采用流式细胞术染色内源性 ICAM-2 表达的 HUVEC 细胞。E) 用星形孢菌素或抗-Fas 抗体处理 ICAM-2 转导的 NIH3T3 和 Jurkat T-细胞 24 小时的剂量反应曲线。空心方框：表达 ICAM-2 的细胞。实心方框：只表达载体的对照细胞。无星形孢菌素或抗-Fas mAb 的各培养物中凋亡细胞的比例小于 3%。凋亡细胞的百分比表示为一式三份培养物的平均值(柱形) \pm SD。

图 20 显示 ICAM-2 过度表达导致广泛起作用的抗凋亡表型的实验结果。A) 通过膜联蛋白-V 结合试验评估 ICAM-2 对星形孢菌素诱导凋亡的作用。在存在或不存在星形孢菌素时($1 \mu\text{M}$, 24 小时)对表达 ICAM-2 的 NIH3T3 与表达对照载体的 NIH3T3 细胞进行膜联蛋白-V 结合试验。DMSO 运载体用作阴性对照。无星形孢菌素的各培养物中凋亡细胞的比例是 $5\% \pm 1.2$ 。B) 在有不同凋亡诱导物存在时 ICAM-2 在 Jurkat、NIH3T3、70Z/3 和 BaF3 细胞中过度表

达的作用。用星形孢菌素($1 \mu\text{M}$)或抗-Fas 抗体($5 \mu\text{g/ml}$)处理受感染的细胞,或如所示除去 IL-3, 进行 24 小时, 然后如所述(Jacobson 和 Raff, 1995)评估凋亡。用编码 ICAM-2、ICAM2-AN、载体对照或 Bcl-2 的逆转录病毒构建物感染细胞, 诱导凋亡(24 小时, 70Z/3 细胞: $0.2 \mu\text{M}$ STP, 4 小时)。凋亡细胞的百分比表示为一式三份培养物的平均值(柱形) \pm SD。C) 存活需要 α -辅肌动蛋白结合位点。通过抗-ICAM-2-FITC 单克隆抗体(IC2/2)对 ICAM-2, 野生型序列 (红线); ICAM2 Δ C, 胞质结构域缺失 (实细线); 具有颠倒 α -辅肌动蛋白结合位点的全长颠倒 ICAM-2 C(阴影线)进行 FACS 分选, 用鬼臼亚乙苷培育($100 \mu\text{M}$, 24 小时)。鬼臼亚乙苷处理后恢复 24 小时, 计数存活的细胞。存活细胞的百分比表示为一式三份培养物的平均值(柱形) \pm SD。

图 21 显示 ICAM-2 的抗凋亡作用需要 PI3-激酶的实验结果。A) PI3K 的药学抑制剂消除了 ICAM-2 的抗凋亡作用。用加入(空心)或未加入(实心) 100 nM 渥曼青霉素的星形孢菌素($1 \mu\text{M}$)处理经 ICAM-2 或载体转导的 BaF3 细胞 24 小时(左柱状图)。采用核染色和荧光显微术(左柱状图)和膜联蛋白-V 结合试验(右柱状图)测定凋亡。不用星形孢菌素的各培养物中凋亡细胞的比例是 $8\% \pm 2$ 。凋亡细胞的百分比表示为一式三份培养物的平均值(柱形) \pm SD。在存在或不存在 $10 \mu\text{M}$ LY294002 时用星形孢菌素($1 \mu\text{M}$)处理 ICAM-2、ICAM2-AC 或载体转导的 NIH3T3 细胞 24 小时(右柱状图)。DMSO 运载体用作阴性对照。凋亡细胞的百分比表示为一式三份培养物的平均值(柱形) \pm SD。B) ICAM-2(上图)或载体对照细胞(下图)中 PI3K 与 AKT 定位的共聚焦图像。C) ICAM-2(上图)或载体对照细胞(下图)中埃兹蛋白和 PIK 的 p85 亚基(绿色)定位的共聚焦图像。

图 22 显示 ICAM-2 信号导致磷脂酰肌醇 3,4,5 三磷酸的产生、PDK-1 和 AKT 活化与随后的 AKT 下游效应物磷酸化的实验结果。A) ICAM-2 和 α 辅肌动蛋白与埃兹蛋白相互作用。用 ICAM-2 免疫沉淀 ICAM-2、ICAM2- Δ C 或对照细胞, 作 α -辅肌动蛋白或埃兹蛋白的免疫印迹分析。对照裂解物未进行免疫沉淀, 作为所检测的相互作用蛋白质的阳性对照物。B) ICAM-2 细胞显示高水平的磷脂酰肌醇 3,4,5 三磷酸。ICAM-2 细胞和对照细胞是血清饥饿的(48 小时), 用 LY294002 处理($10 \mu\text{M}$, 24 小时)或在生长培养基中培育, 制备好的细胞用

于流式细胞术胞内检测磷脂酰肌醇 3,4,5 三磷酸。C) PDK-1 I 激酶水平在 ICAM-2 细胞中升高, 部分受 Y-27632 的抑制。PDK-1 激酶从与所示化合物(10 μ M, 1 小时)培育的细胞中免疫沉淀并与失活的 SGK 酶和肽底物进行免疫激酶反应。采用闪烁计数法检测 ATP 的磷酸转移至肽底物, 表示为每分钟计数值 (CPM)。D) ICAM-2 和对照细胞的膜/胞质溶胶组分中 AKT 的免疫印迹与 AKT 激酶活性分析。E) 在存在星形孢菌素时 ICAM-2 细胞维持了 AKT 激酶水平与丝氨酸 472 与苏氨酸 308 处的双重磷酸化。F) 星形孢菌素处理后, AKT 激酶底物 BAD 和 GSK3 在表达 ICAM2 的细胞中维持磷酸化。显示用免疫印迹检测用 DMSO-运载体(-)或 1 μ M 星形孢菌素(+)处理的 ICAM-2、ICAM-2 Δ C 和载体对照细胞的提取物的 BAD 和 GSK3 磷酸化(情况)。

图 23 显示内源性 ICAM-2 连接诱导埃兹蛋白的酪氨酸磷酸化和将 PI3K 募集到膜上从而导致 PDK-1 和 AKT 激酶活化的实验结果。A) 不同来源的细胞系之间 ICAM-2 的表达水平不同。进行定量流式细胞术分析以评估转化的和非转化的成纤维母细胞、T 细胞和不同 B 细胞分化状态的淋巴细胞与髓系细胞间的 ICAM-2 表面分子数目(详见材料与方法)。表面分子数目/细胞表示为一式三份培养物的平均值(柱形) \pm SD。B) 内源性 ICAM-2 交联诱导埃兹蛋白酪氨酸磷酸化并增强 ICAM-2 相互作用。显示用单克隆抗体使 Jurkat 细胞通过 ICAM-2 交联所示时间, 并进行免疫沉淀/免疫印迹。C) 用 src 和 Rho-依赖性激酶的化学抑制剂抑制埃兹蛋白磷酸化。D) ICAM-2 的功能是使埃兹蛋白磷酸化并增强与 PI3K 的 p85 亚基的相互作用。如上所述测定。E) 如上所述, ICAM-2 连接是 PDK-1 活性的函数。F) ICAM-2 连接是 PI3K 和 AKT 定位到膜的函数。对通过 ICAM-2 结合的 Jurkat 细胞以时间为函数进行膜/胞质溶胶分级并进行 PI3K 和 AKT 免疫印迹。

图 24 显示淋巴细胞通过内源性 ICAM-2 结合诱导 AKT 活化从而使细胞存活的实验结果。A) ICAM-2 交联以时间为函数诱导了 Jurkat T 细胞中 AKT 活化及其后的 GSK3、FKHR 和 AFX 磷酸化。血清饥饿的 Jurkat T 细胞与同种型对照或抗-人 ICAM-2(10 μ g/ml)培育所示时间。如上所述测定 AKT 激酶活性, 免疫印迹分析证实由于 ICAM-2 交联功能导致 AKT 双重磷酸化、FKHR 和

GSK3 磷酸化与 BAD 磷酸化。B) ICAM-2 交联诱导了 BaF3 前-B 细胞中 AKT 的活化。C) 采用流式细胞术膜联蛋白-V 结合试验检测到用星形孢菌素(1 μm , 6 小时)处理的 Jurkat T 细胞上 ICAM-2 群集而导致凋亡降低。利用 ICAM-2 mAb(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)使 106 个 Jurkat T 细胞上的 ICAM-2 交联 30 分钟, 然后用星形孢菌素(+)或 DMSO(-)处理。采用膜联蛋白-V 结合试验通过流式细胞术测定凋亡。D) 存在 $\text{GTP}\gamma\text{S}$ 、Psi-鸢尾黄素、Y-27632 和除莠霉素 A 时消除了 ICAM-2 存活信号。Jurkat 细胞与所示抑制剂(10 μM , 1 小时)培育, 再通过 ICAM-2(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1 小时)交联, 用抗-Fas 处理(50 ng/ml , 8 小时)。采用膜联蛋白-V 结合试验评估细胞凋亡。E) ICAM-2 交联诱导埃兹蛋白与 PI3K、ICAM-2、载体对照、Jurkat(细胞)缔合, 显示通过 ICAM-2 交联(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 15 分钟)的 Jurkat 细胞的免疫沉淀与随后的免疫印迹。

图 25 显示通过 ICAM-2 结合诱导 AKT 活性并防止原初 B 细胞凋亡的实验结果。A) 人外周血单核细胞通过 ICAM-2 交联(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 45 分钟), 再用 $\text{TNF}\alpha$ 200 ng/ml 加 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 环己酰亚胺与抗-Fas 抗体 (10 ng/ml CH11)处理 12 小时引发凋亡。多参数 FACS 分析显示 ICAM-2 在 $\text{CD}4^+$ 和 $\text{CD}19^+$ (细胞)群中诱导 AKT 活化保护(细胞)免遭凋亡。(收集的 1×10^6 个(细胞)事件中计数最少有 80,000 个 $\text{CD}19^+$ 细胞)。B) PBMC 通过 ICAM-1、2、3、CD43 或 CD44 交联(10 $\mu\text{g}/\text{m}$, 45 分钟), 通过流式细胞术检测磷脂酰肌醇 3,4,5 三磷酸、磷脂酰肌醇 4,5 二磷酸, 或磷酸-AKTser473。如所示分拣的细胞亚组。C) PBMC 通过 ICAM-1、2、3、CD43 或 CD44 交联(10 $\mu\text{g}/\text{m}$, 45 分钟), 再如上述诱导凋亡。通过流式细胞术检测的膜联蛋白-V 结合(情况)来检测凋亡并分拣 $\text{CD}19^+$ 细胞。D) PBMC 通过 ICAM-2 交联, 然后在存在或不存在抑制性化合物 Psi-鸢尾黄素、Y-27632(10 μM , 30 分钟)时如上所述诱导凋亡。通过膜联蛋白-V 结合试验检测凋亡。E) LFA-1 重叠试验。用 LY294002 (2 μM , 1 小时)处理后, 将 LFA-1 + Jurkat 细胞重叠在载体对照或表达 ICAM-2 的细胞上。用 LFA-1 或 Mac-1 的单克隆抗体处理(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30 分钟)一些 Jurkat 样品, 然后重叠在 ICAM-2 或载体对照(细胞)上。37 $^\circ\text{C}$ 混合细胞 30 分钟, 然后进行流式细胞术。分拣 Jurkat 细胞, 将其从所示磷酸-AktSer473 ICAM-2 细胞分析中除去。F) ICAM-2 介导的细胞

存活信号模型。ICAM-2 寡聚通过 Src/Rho 依赖性机理募集埃兹蛋白并使之磷酸化。通过埃兹蛋白与 PI3K 的 p85 调节亚基相互作用导致 PI3K 募集至膜。PI3K 的膜易位产生的磷脂酰肌醇 3,4,5 三磷酸能活化 PDK-1 并通过与 AKT 的 PH 结构域结合将其募集到质膜。胞质 AKT 易位至膜使 PDK1/2 得以磷酸化 AKT 的 ser473 和 thr308 位点进而活化 AKT。然后 AKT 磷酸化下游效应物 GSK3、BAD、FKHR (可能还有其它效应物, 取决于细胞类型)。这些效应物的磷酸化可只阻断凋亡或协同产生存活信号。

图 26 显示对星形孢菌素诱导凋亡的抗凋亡分子逆转录病毒文库筛选的实验结果。A) cDNA 文库筛选方案。用 Jurkat T 细胞逆转录病毒 cDNA 文库感染 10^7 个 NIH3T3 细胞, 用星形孢菌素($1 \mu\text{M}$)处理 24 小时以诱导凋亡(Stolzenberg 等, 2000)。存活的克隆生长一周, 重复选择三次。进行表型传递试验以测定哪个病毒整合体编码抗凋亡功能。用天然 Moloney 鼠白血病病毒 (MMLV) 感染一等份存活细胞群。这拯救了复制缺陷型病毒载体原病毒, 产生了感染性颗粒。用拯救的病毒载体感染 NIH3T3 细胞, 用星形孢菌素处理以证实为抗凋亡表型。B) 显示从星形孢菌素诱导凋亡筛选存活下的(细胞)群复杂。进行 RT-PCR 以评估存活(细胞群)的复杂性。存活的细胞群(1□)显示几条不连续的条带, 传递后的细胞群(2□)显示一条条带。M-分子量标记。最初以 10%加入文库的阴性对照载体(LacZ)未检测到, 却不难检测到表达 Bcl-2 载体的独立感染。

图 27 显示 ICAM-2 过度表达抑制星形孢菌素诱导凋亡的实验结果。A) 对受感染的 NIH3T3(细胞)进行编码 ICAM-2 的逆转录病毒载体 western 印迹分析。B) 编码 ICAM-2 的逆转录病毒载体能异位表达表面 ICAM-2。右图: 用编码 ICAM-2 的逆转录病毒载体构建物或载体对照感染 BaF3 前-B-细胞并采用流式细胞术检验内源性和所表达的 ICAM-2 的表面表达水平。左图: 采用流式细胞术染色表达内源性 ICAM-2 的 HUVEC 细胞。C) 用星形孢菌素或抗-Fas 抗体处理 ICAM-2 转导的 NIH3T3 和 Jurkat T-细胞 24 小时的剂量反应曲线。空心方框: 表达 ICAM-2 的细胞。实心方框: 只表达载体的对照细胞。无星形孢菌素或抗-Fas mAb 的各培养物中凋亡细胞的比例小于 3%。凋亡细胞的百分比表示为一式三份培养物的平均值(柱形) \pm SD。D) 阴性对照 NIH3T3 的载体对照

(-STP)、阳性对照 NIH3T3 的载体对照(+STP)与表达 ICAM-2 的 NIH3T3 的固缩(细胞)核。用 Hoescht (5 $\mu\text{g/ml}$)、吖啶橙 (25 μM)与溴化乙锭 (25 μM)染色核。插入物(insert)表示细胞死亡或细胞活性程度。E) 通过膜联蛋白-V 结合试验评估 ICAM-2 对星形孢菌素诱导凋亡的作用。在存在或不存在星形孢菌素时(1 μM , 24 小时)对表达 ICAM-2 的 NIH3T3 与载体对照 NIH3T3 进行膜联蛋白-V 结合试验。DMSO 运载体用作阴性对照。无星形孢菌素的各培养物中凋亡细胞的比例是 5% +/- 1.2。

图 28 显示 ICAM-2 介导抗凋亡作用的实验结果。A) 在各种凋亡诱导物存在时 ICAM-2 过度表达对 Jurkat、NIH3T3、70Z/3 和 BaF3 细胞的作用。显示用星形孢菌素(1 μM)或抗-Fas 抗体(5 $\mu\text{g/ml}$)处理受感染的细胞,或如所示除去 IL-3 后的 24 小时情况,然后如所述(Jacobson 和 Raff, 1995)评估凋亡。用编码 ICAM-2 的逆转录病毒构建物或载体对照感染 Jurkat T 细胞。用编码 ICAM-2 的逆转录病毒构建物或载体对照感染小鼠前-B 70Z/3 细胞,用星形孢菌素(0.2 μM)处理 4 小时,评估凋亡。用编码 ICAM-2、ICAM2- ΔN 或 Bcl2 的逆转录病毒构建物感染 IL-3-依赖性 BaF3 细胞。为诱导凋亡,将细胞维持于缺乏 IL-3 的培养基中 24 小时。用抗小鼠 Fas 处理表达逆转录病毒所编码的 ICAM-2 或框内该胞外结构域的缺失的 BaF3-细胞 24 小时,评估细胞死亡。凋亡细胞的百分比表示为一式三份培养物的平均值(柱形) +/- SD。B) 存活需要 α -辅肌动蛋白结合位点。用编码 ICAM-2 的以下逆转录病毒构建物转导 NIH3T3 细胞: ICAM-2, 野生型序列 (阴影线); ICAM2 ΔC , 胞质结构域缺失 (实细线); 含颠倒 α -辅肌动蛋白结合位点的全长颠倒 ICAM-2 C(阴影线)。用只识别天然蛋白质(IC2/2)的荧光偶联抗-ICAM-2 单克隆抗体标记转导的细胞。然后通过 FACS(MoFlo, Cytomation, Ft. Collins, CO)纯化细胞。培养分拣的细胞,然后用 100 μM 鬼臼亚乙苷攻击 24 小时。除去药物后使存活的细胞恢复 24 小时,计数活细胞数目。活细胞的百分比表示为一式三份培养物的平均值(柱形) \pm SD。C) α -辅肌动蛋白和埃兹蛋白与 ICAM-2 免疫共沉淀并与 ICAM-2 的 C 末端相互作用。ICAM-2 从 ICAM-2、ICAM2- ΔC 和载体对照转导的 NIH3T3 中免疫沉淀。通过 SDS-PAGE 分辨免疫沉淀物,免疫印迹分析 α -辅肌动蛋白、埃兹

蛋白和 ICAM-2。

图 29 显示 PI3K 的药学抑制剂消除 ICAM-2 的抗凋亡作用的实验结果。A) ICAM-2 的抗凋亡作用是渥曼青霉素与 LY294002 敏感的。用加入(空心)或未加入(实心)100 nM 渥曼青霉素的星形孢菌素(1 μ M)处理经 ICAM-2 或载体转导的 BaF3 细胞 24 小时。采用核染色和荧光显微术(左柱状图)和膜联蛋白-V 结合试验(右柱状图)测定凋亡。不用星形孢菌素的各培养物中凋亡细胞的比例是 8% +/- 2。凋亡细胞的百分比表示为一式三份培养物的平均值(柱形) \pm SD。在存在或不存在 10 μ M LY294002 时用星形孢菌素(1 μ M)处理经 ICAM-2、ICAM2- Δ C 或载体转导的 NIH3T3 细胞 24 小时。DMSO 运载体用作阴性对照。凋亡细胞的百分比表示为一式三份培养物的平均值(柱形) \pm SD。B) 表达 ICAM-2 的 NIH3T3 细胞在存在 PI3K 抑制剂 LY294002 时对凋亡敏感。对星形孢菌素(1 μ M)或 LY294002(10 μ M)处理的 ICAM-2、ICAM2- Δ C 或对照载体转导的 NIH3T3 细胞进行 BrdU TUNEL 试验。凋亡细胞的百分比表示为一式三份培养物的平均值(柱形) \pm SD。

图 30 显示 ICAM-2 能诱导 AKT 激酶活化与 BAD 和 GSK 磷酸化的实验结果。A) 在表达 ICAM-2 的细胞中 AKT 激酶水平与丝氨酸 473 和苏氨酸 308 处双重磷酸化升高, 并能在存在星形孢菌素时维持。在存在或不存在星形孢菌素时, AKT 激酶从 1 μ M 星形孢菌素(+)或 DMSO-运载体(-)处理与应 GSK 底物培育的表达 ICAM-2、ICAM-2 Δ C 和对照载体(pBMN-Z-IN-GFP)的 NIH3T3 成纤维母细胞中免疫沉淀。通过抗-磷酸-GSK 特异性免疫印迹鉴定磷酸化的 GSK。B) 星形孢菌素处理后, AKT 激酶底物 BAD、FKHR 与 GSK3 在表达 ICAM-2 的细胞中维持磷酸化。通过免疫沉淀 BAD 或 GSK3 与用磷酸-BAD 或磷酸-GSK3 特异性抗体免疫印迹来检验用 DMSO-运载体(-)或 1 μ M 星形孢菌素(+)处理的表达 ICAM-2、ICAM-2 Δ C 和对照载体的 NIH3T3 成纤维母细胞提取物的 BAD 和 GSK3 磷酸化(情况)。C) 免疫印迹测定到 ICAM-2 的抗凋亡作用不依赖于 Bcl-2 或 Bcl-X_{L/S}。用 DMSO-运载体(-)或 1 μ M 星形孢菌素(+)处理 ICAM-2 或 ICAM-2 Δ C 转导的 NIH3T3(细胞)24 小时, 通过免疫印迹检验 Bcl-2 和 Bcl-X_{L/S} 表达。D) 不同来源的细胞系之间 ICAM-2 的表达水平不同。进行

定量流式细胞术分析来评估转化和未转化的成纤维母细胞、T-细胞和不同分化状态 B-细胞的淋巴细胞与髓系细胞之间 ICAM-2 表面分子的数目。从已知量的藻红蛋白(phycoerythrin)分子标记珠的荧光数值几何平均值得到标准曲线,用此标准曲线校正荧光数值的几何平均值(详见实验方法)。表面分子数目/细胞表示为一式三份培养物的平均值(柱形) \pm SD。

图 31 显示内源性 ICAM-2 交联诱导 BaF3 B 细胞的 AKT 活化并保护 Jurkat T 细胞免遭凋亡的实验结果。A) ICAM-2 与单克隆抗-ICAM2 抗体交联诱导 AKT 活化。血清饥饿的 BaF3 前 B 细胞与 10 μ g/ml 的正常大鼠 IgG2(同种型对照)或抗-小鼠 ICAM-2 培育所示时间。按照所述测定 AKT 激酶活性,进行免疫印迹分析来证实由于 ICAM-2 交联导致 AKT 双重磷酸化、FKHR 磷酸化与 BAD 磷酸化。同种型对照不诱导 AKT 磷酸化或 FKHR 或 BAD 的磷酸化(数据未显示)。B) 通过流式细胞术膜联蛋白-V 结合试验检测到 ICAM-2 群集在星形孢菌素处理的 Jurkat T 细胞上能降低凋亡。利用单克隆抗-ICAM-2 抗体(10 μ g/ml)交联 10⁶ 个 Jurkat T-细胞上的 ICAM-230 分钟,再用星形孢菌素(+)或 DMSO 运载体(-)处理。利用膜联蛋白-V 结合试验通过流式细胞术测定凋亡。(收集了 100,000 个(细胞)事件)。C) ICAM-2 在 Jurkat T 细胞上的交联降低了星形孢菌素处理导致的死亡百分比。死亡细胞的百分比表示为一式三份实验的平均值(柱形) \pm SD。D) ICAM-2 交联诱导了 Jurkat T 细胞以时间为函数的 AKT 活化以及随后的 GSK3、FKHR、AFX 磷酸化。E) ICAM-2 交联能克服星形孢菌素诱导的凋亡。(+)显示用星形孢菌素(1 μ M)处理 10⁶ 个 Jurkat T-细胞 1 小时诱导了凋亡。星形孢菌素诱导凋亡 1 小时后,利用单克隆抗-ICAM2 抗体(10 μ g/ml)交联 ICAM-2 所示时间。在同种型对照(10 μ g/ml)中未观察到切割的胱冬酶衰减(数据未显示)。F) ICAM-2 交联诱导了 AKT 活化与随后的 BAD 磷酸化,足以克服星形孢菌素所诱导的凋亡。如上所述处理 Jurkat 细胞。采用 AKT 激酶试验测定 AKT 活性,用针对 ser473 和 thr308 位点的磷酸化特异性抗体作免疫印迹检测双重磷酸化 AKT。通过 BAD 免疫沉淀然后用 ser112 和 ser136 位点磷酸化特异性抗体进行免疫印迹检测 BAD 磷酸化。同种型对照(10 μ g/ml)不产生 AKT 活化(数据未显示)。

图 32 显示 ICAM-2 交联后活化 AKT 介导原初人 CD4⁺和 CD19⁺细胞中对 TNF α 和 Fas 诱导凋亡的耐受性实验结果。A) 利用单克隆抗体(中图)或抗 ICAM-2 标记的抗体(下图)检验人外周血单核细胞的 AKT 活化,然后分拣 CD4 或 CD19 标记细胞(收集了 50,000 个(细胞)事件)。B) 通过 ICAM-2(10 μ g/ml, 45 分钟)交联人外周血单核细胞,然后用 TNF α 200 ng/ml 加 1 μ g/ml 环己酰亚胺与抗-Fas 抗体 (10 ng/ml CH 11)处理 12 小时引发凋亡。多参数 FACS 分析表明 ICAM-2 诱导了 CD4⁺与 CD19⁺(细胞)群中 AKT 活化而保护(它们)免遭凋亡。(收集 1×10^6 个(细胞)事件中计数最少有 80,000 个 CD19⁺细胞)。C) ICAM-2 介导的抗凋亡信号转导模型。ICAM-2 与胞内接头蛋白质 α -辅肌动蛋白和埃兹蛋白结合将 PI3K 募集到质膜。PI3K 产生的磷酸肌醇通过与 AKT 的 PH 结构域结合将其募集到质膜。胞质溶胶 AKT 易位至膜使 PDK1/2 得以磷酸化 AKT 的 ser476 和 thr308 位点而活化 AKT。然后 AKT 磷酸化下游效应物 GSK3、BAD、FKHR (可能还有其它效应物,取决于细胞类型)。这些效应物的磷酸化可只阻断凋亡或协同产生存活信号。

图 33 显示可溶性 ICAM-2 结合能诱导 LFA-1 群集和细胞骨架极化的结果。A) 通过天然凝胶电泳与凝胶过滤检测逆转录病毒转导 NIH3T3 细胞的纯化人 ICAM-2 的纯度、大小和形成的凝聚物 (参见材料与方法)。分析两种不同制品的纯化 ICAM-2 与 NSO 细胞的 ICAM2-FC。利用对应于分子量标准品的迁移距离计算分子量。利用 BSA 连续稀释液 A 作为标准品测定浓度。分子量与浓度示于图中。B) 作为时间函数的 ICAM-2 配体与细胞表面结合。将 5×10^6 个未刺激与 PMA 刺激(1 μ g/ml, 30 分钟)的 Jurkat T 细胞与 ICAM-2-FITC 或 LFA-1-FITC 抗体 (1 μ g/ml)一起培育,进行时间依赖性流式细胞术。制作分拣的同源细胞群随时间变化的平均荧光强度图。流速维持在 200-300 个细胞/秒,以 10 毫秒为间隔获得 1200 秒的荧光强度值。C) 流式细胞术分析 37 $^{\circ}$ C 和 4 $^{\circ}$ C 与细胞松弛素(cytochalasin) D 处理(10 μ M, 30 分钟)的 Jurkat 细胞表面结合的 ICAM-2-FITC 和 α -LFA-1-FITC。D) 每 10^4 个细胞上 ICAM-2-FITC 结合的曲线拟合分析。37 $^{\circ}$ C 细胞以 50 μ L 体积将 Jurkat 细胞与所示浓度的 ICAM-2-FITC 培育 30 分钟。洗涤细胞 1 次,分析 10^4 个细胞的平均荧光强度(MFI)。根据以

下方程计算所结合的 ICAM-2-FITC 百分比: $100 \times [(MFI_{[x]} - MFI_{[未染色的]}) / (MFI_{[饱和的]} - MFI_{[未染色的]})]$, 其中 $[x]$ = ICAM-2-FITC 浓度, $[饱和的]$ = 结合饱和时的浓度。数值按方程 $Y = m1 * M0 / (m2 + M0)$ 拟合 (参见材料与方法)。E-H) 描述了可溶性 ICAM-2 和 ICAM-2-FITC 的产生。E) 纯化的 ICAM-2 的天然凝胶电泳。考马斯染色凝胶, 纯化的 ICAM-2 未显示有凝聚(凝胶过滤后, 我们发现此纯化步骤中加入甘油可消除形成较高分子量物质)。F) 通过天然 PAGE 进行 ICAM-2 的纯度分析。对全部泳道进行光密度检测来测定含量。计算相对于该泳道总密度的各条带密度来测定纯度百分比。制品 1(左)与制品 2(右)的 ICAM-2。纯度大于 98%。G) ICAM-2 与 FITC 偶联, 纯化的偶联物(通过离心层析(spin chromatography))与抗-ICAM-2 抗体的免疫印迹(左图), 然后证实凝胶中存在的荧光偶联物(右图)。H) 40°C 用低浓度的细胞松弛素 D 处理细胞导致一细胞亚组的 ICAM-2 结合升高并在 37°C 饱和。在 37°C 和 4°C, 通过流式细胞术滴定细胞松弛素 D 处理的(10 mM, 30 分钟)与未处理的 Jurkat 细胞的 ICAM-2-FITC 表面结合(情况)。中值荧光强度(MFI)以 ICAM-2-FITC 浓度为函数作图。

图 34 显示同时检测 ICAM-2 诱导的 LFA-1 群集、活化与肌动蛋白/微管重建(reorganization)的实验结果。A) Jurkat 细胞用 ICAM-2 刺激(10 μ g/ml, 30 分钟)后肌动蛋白和微管结构的共聚焦显微术。用鬼笔环肽-alexa633 染色肌动蛋白, 用紫杉醇-alexa546 染色微管蛋白。插入图显示经代表性处理后的放大细胞图像。B) 上述肌动蛋白和微管的流式细胞术染色。C) 左图: ICAM-2-FITC(1 μ g/ml, 所示时间)表面分布的荧光局部分析。颜色强度梯度描述了高和低荧光强度值。右图: ICAM-2-FITC 表面结合 (10 μ g/ml, 30 分钟)与抗- β 2-alexa568 (克隆 CTB104)的共聚焦显微术。D) 37°C 和 4°C, 通过流式细胞术染色显示经细胞松弛素 D 处理的 Jurkat 细胞中 ICAM-2-FITC 的表面结合(荧光强度)和表面分布(荧光脉冲)。E) 如本文所述每个细胞每次飞行时间的 ICAM-2-FITC 荧光强度值。F) mAb24-alexa633 活化的 LFA-1 的流式细胞术染色。如所示刺激(10 μ M, 30 分钟), 先用 PMA(1 μ g/ml), 再用 ICAM-2 刺激(10 μ g/ml, 30 分钟)。染色在 37°C 进行。G) 如上所示计算, 作为时间函数的 mAb24-633 的中值荧光强度(MFI)值与 ICAM-2 群集值。

H-I) 描述了 ICAM-2 诱导的 p44/42 MAPK 磷酸化与 LFA-1 mAb 的抑制作用以及与其它刺激的比较。H) 用 ICAM-2 刺激(浓度如图所示, 30 分钟), 然后用递增浓度的 LFA-1 mAb 封闭的 Jurkat 细胞总裂解物的磷酸-p44/42 MAPK 免疫印迹分析。I) 采用磷酸-p44/42 MAPK 的 FACS 检测比较对(各种)刺激的磷酸-p44/42 MAPK 诱导。刺激是 1 mg/ml (PHA、PMA、离子霉素)、10 mg/ml (LFA-1 mAb 和 ICAM-2)或 10 mM PD98059 和 U0126。化学抑制 30 分钟后进行刺激。数据表示为磷酸-p44/42 MAPK 阳性细胞与未刺激细胞的百分比。注意到 LFA-1 mAb 交联与 ICAM-2 刺激之间有差异。

图 35 显示 ICAM-2 经 LFA-1 相互作用诱导 p44/42 MAPK 活化的实验结果。A) 处理的 Jurkat 细胞(上述)中 ICAM-2-FITC(黏附)和 mAb24-Alexa633 (LFA-1 活化)的中值荧光强度值(MFI)。扣除了未刺激对照的和/或化合物预处理的值。B) 上图: 采用流式细胞术检测 Jurkat 细胞中以 ICAM-2 剂量为函数的胞内磷酸-p44/42 MAPK(参见材料与amp;方法)。图示平均荧光强度值(MFI) \pm 标准偏差(SD)。下图: 如上所述对 ICAM-2 处理的 Jurkat 细胞进行胞内磷酸-p44/42 MAPK 染色。滴定 β_2 和 α_L 整联蛋白的 mAb(10 μ g/ml, 10 分钟), 然后如所示进行 ICAM-2 处理, 图示 MFI \pm SD。C) p44/42 MAPK 激酶试验测定到 β_2 与 α_L 整联蛋白抗体阻断了 ICAM-2 诱导的 p44/42 MAPK 活化。诱导与抑制条件如上所述。重组活性 p44/42 MAPK 用作内部阳性对照(以“+”表示)。D) 图示在存在化学试剂 (10 μ M)、EDTA (1 mM)、PMA、离子霉素和 ICAM-2 刺激 (如上所示)时通过流式细胞术(显示的)胞内磷酸-p44/42 的抑制与活化分布状况。图示 MFI 值 \pm SD。E) 描述 sICAM-2 诱导了 Pyk2 和 Syk 膜定位。用 ICAM-2 蛋白质(10 mg/ml)或牛血清白蛋白(未刺激的, 10 mg/ml)处理 Jurkat 细胞 10 分钟, 制备物进行共聚焦显微术(参见材料与amp;方法)。细胞用 Pyk2 和 Syk 染色。图 A-C 代表未刺激细胞, 图 D-F 代表 ICAM-2 处理的细胞。比例尺标于各图的左下角(微米)。

图 36 显示 ICAM-2 诱导 Pyk2 和 Syk 磷酸化以及 α_2 整联蛋白缔合的实验结果。A) 酪氨酸激酶抑制剂对磷酸-raf 和磷酸-p44/42 的免疫印迹抑制状况。用所示化合物处理(10 μ M, 30 分钟) 1×10^6 个细胞, 然后用 ICAM-2 刺激(10

$\mu\text{g/ml}$, 30 分钟)。细胞裂解物作磷酸-raf 和磷酸-p44/42 的免疫印迹分析。单用化合物不诱导可检测的磷酸化。B) ICAM-2 刺激后 Pyk2 和 Syk 被磷酸化并与 $\alpha 2$ 整联蛋白免疫共沉淀。利用磷酸-Pyk Y402 和磷酸-syk(Tyr525/526)抗体测定磷酸化特异性。C) PKC α/β 、Pyk2 和 Syk 磷酸化状态以 ICAM-2 刺激为时间函数的动力学分析。如上所示处理与加工的细胞。利用磷酸-特异性 PKC α/β_{II} (Thr638)与以下抗体;首先免疫沉淀 Pyk2 和 Syk,再用抗-磷酸酪氨酸抗体 (PY20)检测,剥下条带然后用所示非磷酸化特异性抗体检测,免疫印迹代表了一式三份实验。E) 描述了 LFA-1 诱导的 Pyk2 和 Syk 磷酸化依赖于 PKC。我们采用磷酸酪氨酸 ELISA,用酪氨酸激酶的化学抑制剂对 sICAM-2 诱导的 Pyk2 和 Syk 磷酸化抑制(情况)进行了筛选。除了酪氨酸磷酸化抑制剂 A9(一种特异性 Pyk2 抑制剂)以外,存在 PKC 抑制剂双吡啶基马来酰亚胺 II(BIM II)和星形孢菌素(STP)也消除了 Pyk2 磷酸化。磷酸酶 Cg 的抑制剂(新霉素)、Syk 的抑制剂(四羟反式芪(piceatannol))和 PKC 抑制剂 BIM I(图 4A 补充)也能影响 Pyk2 磷酸化。抑制 Pyk2、PLCg1 完全消除了 Syk 磷酸化,PKC 抑制剂强烈影响 Syk 磷酸化。因此,Pyk2 和 Syk 磷酸化均依赖于 PKC 活性,而 Syk 磷酸化还依赖于 PLCg1 和 Pyk2 活性。采用此方法不能评估特异性 PKC 同工酶。

应该知道化学遗传方法能通过验证在存在各自化学抑制剂时各激酶的磷酸化状态来测定对 sICAM-2 刺激的反应中 PKC、Pyk2、PLCg1 和 Syk 活性的层次。用 BIM II 抑制 PKC 消除了 Pyk2、PLCg1 和 Syk 的磷酸化。用新霉素抑制 PLCg1 消除了 Syk 的磷酸化,对 Pyk2 未观察到抑制作用。用四羟反式芪抑制 Syk 不阻断 Pyk2 或 PLCg1 的磷酸化。这些观察结果提示 PKC 活化处于 PYK2、PLCg 和 SYK 活化的上游, PYK2 和 PLCg1 的活化导致 SYK 活化。因此,从 LFA-1 到 Raf-1 的上游信号转导看来涉及 PKC/Pyk2/PLCg1/Syk。然而,我们知道磷酸-蛋白质免疫沉淀技术不能排除这些分子存在于混合物中的可能性。目前我们正在另一项研究中研究这些混合物。

图 37 显示 ICAM-2 可诱导 IL-2 活化的人 PBMC 细胞毒性淋巴细胞活性。

A) 在存在 IL-2 时用 ICAM-2(10 μ g/ml)处理 PBMC12 小时, 然后与 CFSE 标记的靶 HL60 细胞以 50: 1 的 E: T 比例培育 4 小时。残余的 HL60 细胞采用流式细胞术定量测定。B) 用 IL-2 (100 U/ml, 12 小时)和 ICAM-1、-2 或 3 FC 蛋白质 (10 μ g/ml)处理 PBMC, 将其用于上述细胞毒性试验。结果代表 4 次独立实验。

图 38 显示 ICAM2 与 ICAM-1 和 ICAM-3 介导 CD56⁺CD8⁺细胞毒性淋巴细胞亚组释放穿孔素和粒酶差异的实验结果。模拟处理(IgG), ICAM-1、ICAM-2 或 ICAM-3(FC 融合蛋白含量是 10 μ g/ml)处理 IL-2 活化的 PBMC12 小时, 然后与靶 HL60 细胞以 50: 1 的 E: T 比例培育 4 小时。然后将制备的细胞用 CD8-CY5PE、CD56-PE 表面染色剂和穿孔素-CY5 和粒酶-A-FITC 胞内染色剂进行流式细胞术。如图 I 所示, 分拣的 CD56⁺CD8^低、CD56⁺CD8^{中等}、CD56⁺CD8^高、CD56⁻CD8⁻、CD56⁻CD8^高细胞群与合适门控的细胞群频率。图 II-V 是用穿孔素和粒酶-A 荧光强度对数显示的分拣亚组细胞群。这些结果代表 3 次独立实验, 在 25: 1 和 12: 5 的 E: T 比例时相似(数据未显示)。进行手动校验。B) 分拣 CD56⁺CD8⁺(细胞)群亚组(如所示), 显示 ICAM-1、-2、-3 刺激细胞的胞内穿孔素。按照以下方程计算穿孔素百分比, 其中 MFI 等于平均荧光强度: $100 \times [(MFI_{\text{实验}} - MFI_{\text{同种型 mAb}})/(MFI_{\text{对照}} - MFI_{\text{同种型 mAb}})]$ 。未刺激的细胞用作对照。C) 计算胞内粒酶-A 值, 按上述表示。

图 39 显示人 CD56⁺CD8⁺细胞中 ICAM-2 诱导 LFA-1 介导的 p44/42 MAPK 与 LFA-1 活化相关的实验结果。A) CFSE 标记的 HL60 细胞与 CD56⁺CD8⁺细胞形成偶联物。对用所示化学物质处理(10 μ M, 30 分钟), 然后用 ICAM-2 处理(10 μ g/ml, 30 分钟)的 PBMC 进行偶联物流式细胞术试验,。CFSE 标记的 HL60 细胞以 25: 1 的 E: T 比例培育 5 分钟, 用 1%低聚甲醛固定。然后用 CD8 和 CD56 抗体作免疫标记, 分拣 CD8⁺CD56⁺细胞群并计算 HL60 荧光相对总 HL60 细胞的百分比。B) 用 ICAM-2 处理(10 μ g/ml, 30 分钟)IL-2 活化的 PBMC, 或模拟处理(IgG), 分析活化 LFA-1(mAb24-Alexa633)、磷酸-p44/42-Ax488、CD8-CY5PE 和 CD56-PE 染色。分拣 CD56⁺CD8⁺细胞群, 显示活化 LFA-1 与磷酸-p44/42 状况。如上所述计算 mAb24-Ax633 和磷酸-44/42-Ax488 的

平均荧光强度(MFI)及显示其随时间的变化。

图 40A 和 40B。细胞因子应答图显示了原发性急性髓细胞性白血病中增强的信号转导结。图 40A, 为观察正常和白血病细胞的信号转导网络, 设计了含有 6 种靶磷酸-蛋白质和 6 种刺激条件的网格。以列显示的刺激状态包括未刺激的或用 20 ng/mL 的 FL、GM-CSF、G-CSF、IL-3 或 IFN- γ 刺激的。以行显示用 Stat1、Stat3、Stat5、Stat6、p38 和 Erk1/2 的磷酸化-特异性抗体检测靶蛋白的磷酸化。网格中各方块代表了一个磷酸化位点对一种条件的反应(称为信号转导结的状态)。图示 U937 细胞的网格与其所根据的流式细胞术数据之间的关系。在这些细胞中, 观察到用 IFN- γ 刺激后 Stat1 磷酸化与未刺激状态相比显示中值荧光强度(MFI)增加最大。图 40B, 显示了 HL-60 AML 细胞系、正常 CD33+ 白细胞与六种 AML 患者样品的代表性细胞因子反应图。利用这些 AML 母细胞的反复实验得到相似结果($n = 3$), 正常(细胞)中有差异, 健康供血者最低($n = 6$)。计算各信号转导结对刺激的反应, 以 $\text{Log}_2(\text{MFI 刺激的}/\text{MFI 未刺激的})$ 表示。

图 41A、41B 和 41C。利用肿瘤样品中不同的基础和增强信号转导结来确定 AML 生物特征。图 41A, 将细胞因子反应图扩大包括所有 30 种 AML 患者样品, 重新排列以突出各磷酸-蛋白质的基础和增强的信号转导。给各图的第一列着色以显示基础磷酸化的差异(相对于 AML 母细胞中最低的)。检测了 900 种细胞因子反应, 93 种(10.3%)显示在刺激后可检测到磷酸化(水平)升高(大于 0.55 倍)。利用结状态的方差确定有无显著性差异。图 41B, 显著的细胞因子反应主要限于 7/30 细胞因子反应结, 肿瘤间的方差大于 0.1(黄圈)。图 41C, 绝对中值与各结状态方差图表明信噪比阈值。将七种显著的细胞因子反应状态与六种基础磷酸化状态用作肿瘤信号转导状态的 13-种参数, 称为生物特征。

图 42A 和 42B。按照信号转导生物特征分组的 AML 患者有 4 组显示与临床预后标记显著相关。图 42A, 根据相似性采用层次群集将 6 位正常供血者(D01-D06)、U937 和 HL-60 肿瘤细胞系和 30 种 AML 患者样品的分化 CD33+ 髓细胞的 13-种参数生物特征分组。将 AML 和肿瘤细胞系细胞因子反应的热图(heat map)根据供血者样品中值缩放以提供动态颜色范围。正常供血者样品

群集在一起,代表一组。如前所示,基础反应与 AML 样品中反应最低者有关。图 42B,根据信号转导生物特征的相似性鉴定主要 4 组 AML 患者。我们根据确定这些组并绘制所鉴定的患者组中几种临床标记的信号转导用信号转导群 (Signaling Cluster) (SC)术语命名这些组。具有 SC-P2 或 SC-NP 状况的患者样品显示相反的临床标记,这些标记往往与确定 SC 的细胞因子反应相关(采用 χ^2 检验评估显著性)。SC-P2 与 SC-NP 分别代表了 33.3%与 36.7%的患者。用化疗治疗具有 SC-P2 状况的患者未显示缓解(9/9, $p = 0.002$)。SC-P2 患者样品在 Flt3 中往往含有突变(8/10),而具有 SC-NP 状况的患者样品显示几乎没有增强的细胞因子反应并几乎总表达野生型 Flt3(9/11) ($p = 0.02$)。具有 SC-P2 状况的样品罕见表达 CD15/ Lewis X 抗原(9/10, $p = 0.03$)。细胞遗传改变分为 SC-P2 和 SC-NP 分支(20/20, $p < 0.001$)。

图 43A、43B、43C、43D、43E 和 43F。原发 AML(患者样品)中 Flt3 突变可增强髓细胞(因子)信号转导结。图 43A,显示了所检验的所有 30 种 AML(患者样品)中具有野生型或突变型 Flt3 的基础和细胞因子反应结状态。磷酸化 Stat5 的 MFI 与具有野生型 Flt3 的患者和具有突变型 Flt3 的患者略有不同。相反, GM-CSF 诱导的 Stat5 磷酸化与 G-CSF 诱导的 Stat5 和 Stat3 磷酸化均与 Flt3 突变相关 (p 分别等于 0.04、0.02 和 0.01)。作为代表 Flt3 突变对髓细胞信号转导的整体作用方式,我们总结了四种髓细胞因子反应的信号转导状态的生物特征为: p-Stat3 / G-CSF 与 p-Stat5 / GM-CSF / G-CSF / IL-3。总结此髓细胞因子反应在具有 Flt3 突变的 AML 患者中明显升高($p = 0.005$)。图 43B,显示了具有野生型 Flt3 的五位患者与具有突变型 Flt3 的六位患者的代表性 2D 流式细胞术图(ITD)。在各图的上列可观察到具有 Flt3 突变的 AML 母细胞经 GM-CSF 刺激 15 分钟后, Stat5(而不是 Stat3)磷酸化。在各图的下列,具有 Flt3 突变的 AML 母细胞经 G-CSF 刺激后, Stat5 和 Stat3 均磷酸化。在两种情况中,具有野生型 Flt3 的 AML 样品显示在这些结处缺乏细胞因子应答。

图 44A 和 44B。具有野生型 Flt3 与突变型 Flt3 的 AMP 患者样品经 G-CSF 刺激后 Stat5 和 Stat3 磷酸化的代表性 2D 流式细胞术图(ITD)。SC-NP 和

SC-P2 的患者样品中 Stat5 和 Stat3 磷酸化(分别是 y 和 x 轴) 的 2D 轮廓图。显示了基础磷酸化水平与对 G-CSF 的反应水平。

图 45A、45B-1 和 45B-2。肿瘤生物特征与肿瘤细胞信号转导的增强模型。图 45A。利用 AML 中 STAT 与 Ras/MAPK 信号转导结状态的一个例子显示了鉴定肿瘤生物特征的通用方法。图 45B-1 和 45B-2。用各群集中观察到的共同信号转导状况构建 SC-NP 和 SC-P2 分布状况的肿瘤网络组成图。在某状况组的大多数样品中检测到加亮的结是基础高或增强结。

图 46A、46B 和 46C。具有 SC-P2 状况的三位 AML 患者显示在增强信号转导机理中相似但也有不同。如图 45B-1 所示, 总结各患者样品的信号转导表型的路径图, 显示了 SC-P2 的三种状况。

发明详述

信号转导级联反应的胞内试验受限于不能根据特定信号转导级联反应中各元件的活化状态来检测功能数据并使之相关。这种检测与相关性对于区分信号转导或疾病表现期间稀有细胞亚组产生的信号转导状态改变重要。也发现可利用信号转导级联反应中变化的相关性对(患者)群的病理学差异进行分类。本发明提供的方法和组合物能采用流式细胞术来同时检测一种细胞中多种可活化元件(例如, 蛋白质)的活化状态, 并提供将这些状态与(患者)群的差异相关联的分析方法来处理这些问题。

以下文献特别全文纳入本文作为参考: 2002 年 7 月 10 日提交的 USSN 10/193,462; 2001 年 7 月 10 日提交的美国临时申请号 60/304,434; 与 2001 年 8 月 2 日提交的美国临时申请号 60/310,141。

本发明还提供筛选能调节一种细胞中可活化元件活化状态的生物活性药物的方法与组合物。因此, 这些方法与组合物不只可用于预测或诊断疾病状态, 也可用于监测疾病状态的治疗。例如, 测定一组蛋白质的磷酸化状态可分类细胞各亚群与归并入相关类别, 从而有助于确定疾病的诸如预后、疾病进展、对具体药物的反应等。

本发明也提供包括利用增强剂来放大收集的与特定元件活化状态相关的

功能数据量的方法与组合物。例如，可采用本发明的方法与组合物来测定衍生自一种来源但各自接触不同增强剂(如各种细胞因子)的细胞的活化状况，可将因不同增强剂的影响导致活化状况变化纳入此分析中。

活化

本文所用的“可活化元件”或其语法等价词指具有两种同种型(在一些情况中是三种或更多种同种型)的细胞元件，所述同种型对应于具有特定生物学、生物化学或物理特性，例如酶活性、修饰(如翻译后修饰)或构象的该元件的特定形式。在优选的实施方案中，所述可活化元件是蛋白质。虽然以下讨论一般指可活化蛋白质，但也包括其它可活化细胞元件，例如下文将进一步讨论的脂质、碳水化合物与代谢物。就具体生物学活性、修饰或构象而言，可活化元件可以是活化的或非活化的。具体地说，可活化蛋白质的“活化的”或“活性”同种型具有特定生物学活性、修饰或构象，而可活化蛋白质的“非活化”或“无活性”同种型不具有相应的特定生物学活性、修饰或构象(或具有较低或降低的水平)。在一些实施方案中，可能有一种以上同种型与活性或活化状态相关；例如，可活化酶可以是与能结合底物的“开放”构象相关的同种型，第二“过渡状态”同种型与无活性的同种型(例如，活性受抑制)相关。类似地，某些蛋白质可具有多种磷酸化状态、多种糖基化状态等。因此，可活化元件一般具有一种“失活”同种型与至少一种“活性”同种型。然而在一些情况中，可能需要将不具有同种型的元件纳入分析；例如，一种结果(readout)可能是存在或不存在特定代谢物，如可以没有“可活化”状态。

在一优选的实施方案中，可活化元件的生物学、生物化学或物理特性(例如，酶活性、修饰或构象)是活化剂或细胞信号转导可诱导的或“可活化”的。活化剂的例子包括但不限于：激酶、磷酸酶、蛋白酶(如胰冬酶)、药物与激素。细胞信号转导事件的例子包括但不限于：元件群集或与同源分子或配体结合。这些例子在下文详细讨论。

本发明也利用已被“增强”的细胞。与“活化”相反，“增强”状态指细胞与增强剂接触后被活化的状态。如下文所详述的，增强剂通过直接或间接影

响可活化蛋白在活化同种型之间转换的能力对信号转导级联反应施加它们的作用。增强剂的例子一般包括与细胞活化相关的各种环境信号，在本质上是化学/生物化学(例如，IIs 与 IFN)或物理学(温度、pH、有限培养基、紫外辐射等)信号。

本文所用的“同种型”或其语法等价词指具有特定可检测生物学活性、修饰或构象的可活化元件的某种形式。同种型可以是可活化蛋白质的活化(或活性)形式，或非活化(或非活性)形式。具体或特定的性能或活性一般与可活化蛋白质的活化同种型相关，有时在本文称为“活化状态活性”。

活化的类型

可活化蛋白质的活化可采取各种不同形式，一般涉及该蛋白质的生物学、生物化学和/或物理性能的改变。例如，许多可活化蛋白质在对蛋白质共价修饰的反应中受到动态调节。其它活化事件可以是非共价的；例如，许多酶的活化可受到别构抑制，这通常涉及抑制剂分子的非共价结合。

本领域人员可知道，各种活化事件均可用于本发明。基本要求一般是所述活化应导致可活化蛋白质发生改变，这可通过一些指征(称为“活化状态指标”)来检测，优选是改变了与标记的结合元件的结合，或可检测生物学活性的变化(例如，活化状态具有可检测的酶活性，而与之相比，非活化状态无此活性)。重要的是利用可检测事件或组分来区分两种或多种活化状态(例如，“关”和“开”)的同种型。

因此，本发明提供检测各种活化事件，包括但不限于：磷酸化、切割、异戊二烯化、分子间群集、构象变化、糖基化、乙酰化、半胱氨酸化(cysteinylation)、亚硝基化、甲基化、泛素化(ubiquination)、硫酸化以及产生硒蛋白和融合蛋白的活化同种型。

共价修饰的一个例子是用磷酸基团取代氨基酸侧链中的羟基(磷酸化)。已知能识别特定蛋白质底物并催化蛋白质底物上的丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸残基磷酸化的各种蛋白质。这种蛋白质通常称为“激酶”。能被磷酸化的底物蛋白质通常称为磷蛋白。一旦被磷酸化，底物蛋白质可通过特异性识别该底物蛋白

质的蛋白质磷酸酶的作用将其磷酸化残基转变回羟基。蛋白质磷酸酶催化以羟基取代丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸残基上的磷酸基团。通过激酶和磷酸酶的作用，蛋白质可在多个残基上可逆或不可逆地磷酸化从而调节其活性。因此，可活化蛋白质上存在或不存在一个或多个磷酸基团是本发明的一种优选结果。

可活化蛋白共价修饰的另一例子是组蛋白的乙酰化。组蛋白的 DNA 结合功能受到各种乙酰化酶和脱乙酰酶活性的紧密调节。此外，组蛋白乙酰化和组蛋白脱乙酰化与恶性(肿瘤)的进展相关。参见 *Nature*, 2004 年 5 月 27 日; 429(6990): 457-63。

活化的另一形式包括可活化元件的切割。例如，蛋白质调节的一种形式包括蛋白酶解时切割肽键。虽然随机或方向错误的蛋白酶解切割可能损伤蛋白质的活性，但是许多蛋白质通过蛋白酶识别并切割特定肽键作用而活化。许多蛋白质衍生自前体蛋白质或原蛋白(pro-protein)，这些前体蛋白质或原蛋白在蛋白酶解切割特定肽键后成为该蛋白质的成熟同种型。许多生长因子以此方式合成并加工，该蛋白质的成熟同种型通常具有前体形式不显示的生物学活性。许多酶也以此方式合成并加工，此类蛋白质的成熟同种型通常有酶活性，而其前体形式没有酶活性。此类型的调节一般不可逆。因此，为抑制经蛋白酶解而活化的蛋白质的活性，必须采用除“重连接(reattachment)”以外的机理。例如，许多经蛋白酶解活化的蛋白质是相对短命的蛋白质，它们的这种转换有效地导致信号失活。也可利用抑制剂。将蛋白酶解活化的酶有丝氨酸和半胱氨酸蛋白酶，包括组织蛋白酶和胱冬酶。

在一优选的实施方案中，所述可活化酶是胱冬酶。胱冬酶是一类介导细胞程序性死亡(本领域称为“凋亡”)的重要酶。胱冬酶组成性存在于大多数细胞中，以单链酶原驻留在胞质溶胶中。通过第一蛋白酶解切割此酶，原单链分成大和小胱冬酶亚基，第二次切割除去 N-末端结构域而活化为功能完全的蛋白酶。这些亚基组装成具有两个活性位点的四聚体(*Green, Cell*, 94: 695-698, 1998)。也发现许多其它经蛋白酶解活化的酶(本领域称为“酶原”)可用于本发明作为可活化元件。

在其它实施方案中，可活化元件的活化包括该元件的异戊二烯化。“异戊

二烯化”与本文所用的语法等价词指在该元件中加入任何脂基团。异戊二烯化的常见例子包括加入法尼基、牻牛儿基牛儿基、豆蔻酰化与棕榈酰化。这些基团一般通过硫醚键与可活化元件相连，虽然可采用其它连接方式。

在其它实施方案中，可活化元件的分子间群集可用于检测可活化元件的活化。“群集”或“多聚化”与本文所用的语法等价词指一个或多个信号转导元件的任何可逆或不可逆缔合。各簇可由 2、3、4 个等元件组成。2 个元件组成的簇称为二聚体。3 个或更多个元件组成的簇通常称为寡聚物，这些簇各自的数目具有其自身的名称；例如 3 个元件的簇是三聚体，4 个元件的簇是四聚体等。

簇可由相同或不同的元件构成。相同元件组成的簇称为“均质”簇，而不同元件组成的簇称为“异质”簇。因此，所述簇可以是均质二聚体，例如 β_2 -肾上腺素受体。或者，所述簇可以是异质二聚体，例如 GABA_B-R。在其它实施方案中，所述簇是均质二聚体(例如 TNF α)或异质三聚体(例如膜结合的可溶性 CD95 形成的簇来调节凋亡)。在其它实施方案中，所述簇是均质寡聚物，例如促甲状腺素释放激素受体，或异质寡聚物，例如 TGF β 1。

在一优选的实施方案中，群集介导活化这些元件或信号转导潜能，而不论诱导元件群集的实际机理。例如，可活化元件的群集是 a) 作为膜结合受体通过与配体(配体包括天然产生或合成的配体)的结合，b) 作为膜结合受体通过与其它表面分子的结合，或 c) 作为胞内(非膜结合)受体与配体结合。

在一优选的实施方案中，所述可活化元件是与配体，例如细胞表面受体结合后群集的膜结合受体元件。本文所用的“细胞表面受体”指产生在细胞表面上，与胞外环境相互作用并能直接或间接调节细胞活性，例如通过胞内二级信使活性或导致特定基因转录的特异性启动子转录的方式在胞内传递或转导环境相关信息的分子。一类受体元件包括配体结合时活化从而群集的膜结合蛋白或蛋白质复合物。本领域知道这些受体元件可具有各种形式，但它们一般至少包含 3 个结构域。第一，这些受体具有胞外或胞内朝向(通常是前者)的配体结合结构域。第二，这些受体具有膜结合结构域(通常是跨膜结构域)，其形式可采取跨(膜)7 次的跨膜结构域(下文将结合 G-蛋白偶联受体讨论)，或受体的氨

基酸之一具有脂质修饰,例如豆蔻酰化从而通过脂质插入物本身进入脂双层中与膜结合。最后,这些受体具有负责传播该受体下游效应物的信号转导结构域。

这种受体元件的例子包括激素受体、细胞因子受体、类固醇受体、黏附受体与生长因子受体,包括但不限于 PDGF-R (血小板衍生生长因子受体)、EGF-R (表皮生长因子受体)、VEGF-R (血管内皮生长因子)、uPAR (尿激酶纤溶酶激活物受体)、ACHR (乙酰胆碱受体)、IgE-R (免疫球蛋白 E 受体)、雌激素受体、甲状腺激素受体、整联蛋白受体 ($\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 、 $\beta 5$ 、 $\beta 6$ 、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$)、MAC-1 ($\beta 2$ 和 cd11 b)、 $\alpha V\beta 3$ 、阿片样物质受体 (μ 和 κ)、FC 受体、血清紧张素受体 (5-HT、5-HT6、5-HT7)、 β -肾上腺素受体、胰岛素受体、瘦蛋白受体、TNF 受体 (组织坏死因子)、细胞因子受体 (IL1-a、IL-b、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、CCR5、CCR7、CXCR4、CCR-1-10、CCL20)、抑制素受体、FAS 受体、BAFF 受体、FLT3 受体、GMCSF 受体和纤连蛋白受体。

在一优选的实施方案中,所述可活化元件是细胞因子受体。细胞因子是一族细胞间联系的可溶性介质,包括白介素、干扰素和集落刺激因子。细胞因子的特征在于它们的功能丰余度和多效性。大多数构成不同超家族的细胞因子受体不具有内在的蛋白质酪氨酸激酶结构域,然而受体刺激通常能引起胞内蛋白质,包括受体自身的酪氨酸快速磷酸化。细胞因子受体超家族的许多成员能活化 Jak 蛋白质酪氨酸激酶家族,从而导致 STAT 转录激活物因子磷酸化。IL-2、IL-4、IL-7 和干扰素 γ 均显示能活化 Jak 激酶(Frank 等,(1995),*Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 92: 7779-7783; Scharfe 等,(1995),*Blood*, 86: 2077-2085; Bacon 等,(1995),*Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 92: 7307-7311; 与 Sakatsume 等,(1995),*J. Biol. Chem.*, 270: 17528-17534)。也已阐明了 Jak 磷酸化后的下游反应。例如,已证明 T 淋巴细胞与 IL-2 接触将导致信号转导分子及转录活化蛋白(STAT) STAT1 α 、STAT1 β 和 STAT3 以及两种 STAT-相关蛋白, p94 和 p95 磷酸化。发现 STAT 蛋白易位至核中与特定的 DNA 序列结合,提示 IL-2 活化特定基因的机理涉及免疫细胞功能(Frank 等,同上)。Jak3 与 IL-2、IL-4

和 IL-7 细胞因子受体的 γ 链结合 (Fujii 等, (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92: 5482-5486 与 Musso 等, (1995), *J. Exp. Med.*, 181: 1425-1431)。Jak 激酶显示可被许多经由细胞因子受体, 例如生长激素、促红细胞生成素与 IL-6 转导信号的配体活化(Kishimoto, (1994), *Stem cells*, 增刊 12: 37-44)。

在一优选的实施方案中, 所述可活化元件是神经生长因子受体超家族的成员, 例如肿瘤坏死因子 α 受体。肿瘤坏死因子 α (TNF- α 或 TNF-alpha)是主要由活化巨噬细胞和淋巴细胞产生, 但也在内皮细胞与其它类型细胞中表达的多效性细胞因子。TNF- α 是炎症、免疫学和病理生理学反应的主要介质。(Grell, M.等, (1995), *Cell*, 83: 793-802)。TNF 存在两种不同形式, 26 kDa 膜表达形式, 和该 26 kDa 形式经蛋白酶解切割得到的可溶性 17 kDa 细胞因子。可溶性 TNF 多肽长 157 个氨基酸, 是主要的生物学活性分子。

TNF- α 通过与高亲和力细胞表面受体相互作用施加其生物学作用。克隆并特征鉴定了两种不同的膜 TNF- α 受体。分别是 55 kDa 称为 p55 TNF-R 与 75 kDa 称为 p75 TNF-R (Corcoran. A.E.等, (1994), *Eur. J. Biochem.*, 223: 831-840)。此两种 TNF 受体在氨基酸水平显示 28%的相似性。这局限于胞外结构域并由 4 个重复的富含半胱氨酸各长约 40 个氨基酸的基序构成。各基序在保守性位置含有 4-6 个半胱氨酸。Dayhoff 分析显示最大亚基间相似性在各受体的前三个重复基序中。包括 TNF-R/神经生长因子受体超家族的许多其它受体和细胞表面分子均具有此特征性结构(Corcoran. A.E.等, (1994), *Eur. J. Biochem.*, 223: 831-840)。

通过受体簇集, 或通过三价配体 TNF 或通过交联性单克隆抗体引发 TNF 信号转导(Vandevorde, V.等, (1997), *J. Cell Biol.*, 137: 1627-1638)。TNF 与结构相关的细胞因子淋巴毒素(LT)的晶体学研究显示这两种细胞因子均存在均质三聚体, 其亚基以三倍对称性边对边包装。从结构上讲, TNF 或 LT 均未反映它们受体的重复模式。各单体呈圆锥形, 在圆锥底部的相对侧含有两个亲水性环。近来对 p55 可溶性 TNF-R/LT 复合物的晶体结构测定证实了毗邻单体的环连接在一起而在单体之间形成沟槽, TNF-R 结合在这些沟槽中的假设(Corcoran. A.E.等, (1994), *Eur. J. Biochem.*, 223: 831-840)。

在优选的实施方案中,所述可活化元件是受体酪氨酸激酶。受体酪氨酸激酶可根据它们胞外结构域的结构相似性以及它们胞质结构域中酪氨酸激酶催化区的组成为5个亚组。亚组 I(表皮生长因子(EGF)受体样)、II(胰岛素受体样)与 EPH/ECK 家族含有富含半胱氨酸序列(Hirai 等, (1987), *Science*, 238: 1717-1720; Lindberg 和 Hunter, (1990), *Mol. Cell. Biol.*, 10: 6316-6324)。此三类受体酪氨酸激酶的激酶区功能结构域编码为一连续序列(Hanks 等, (1988), *Science*, 241: 42-52)。亚组 III(血小板衍生生长因子(PDGF)受体样)和 IV(成纤维细胞生长因子(FGF)受体)的特征是它们的胞外结构域具有免疫球蛋白(Ig)样折叠,以及通过一无关氨基酸的可变延伸段使它们的激酶结构域分成两部分(Yanden 和 Ullrich, (1988), 同上; Hanks 等, (1988), 同上)。

已知成员数目最多的家族是 Eph 家族(该家族的第一个成员最初分离自产生促红细胞生成素的肝细胞癌细胞系)。自从 Eph 受体的原型描述(Hirai 等, (1987), *Science*, 238: 1717-1720)以来,不算多种物种中发现的明显直向同源受体,已报导了此家族至少 10 个成员的序列。额外的部分序列以及新成员仍不断报导的速度提示此家族甚至更大(Maisonpierre 等, (1993), *Oncogene*, 8: 3277-3288; Andres 等, (1994), *Oncogene*, 9: 1461-1467; Henkemeyer 等, (1994), *Oncogene*, 9: 1001-1014; Ruiz 等, (1994), *Mech. Dev.*, 46: 87-100; Xu 等, (1994), *Development*, 120: 287-299; Zhou 等, (1994), *J. Neurosci. Res.*, 37: 129-143; 与 Tuzi 和 Gullick, (1994), *Br. J. Cancer*, 69: 417-421 中的参考文献)。很明显,虽然 Eph 家族成员数目众多,但所有这些分子经鉴定均为没有已知配体的孤儿受体。

本文所用的术语“Eph 受体”或“Eph 型受体”指一类包括至少 11 种侧向同源基因的受体酪氨酸激酶,虽然此类中存在更多的直向同源物,例如不同物种的同源物。Eph 受体总体上是同源性相关受体的不连续组,易于识别,例如它们的典型特征是胞外结构域在接近 N-末端含有特征性的半胱氨酸残基间隔与两个纤连蛋白 III 型重复(基序)(Hirai 等, (1987), *Science*, 238: 1717-1720; Lindberg 等, (1990), *Mol. Cell Biol.*, 10: 6316-6324; Chan 等, (1991),

Oncogene, 6: 1057-1061; Maisonpierre 等, (1993), Oncogene, 8: 3277-3288; Andres 等, (1994), Oncogene, 9: 1461-1467; Henkemeyer 等, (1994), Oncogene, 9: 1001-1014; Ruiz 等, (1994), Mech. Dev., 46: 87-100; Xu 等, (1994), Development, 120: 287-299; Zhou 等, (1994), J. Neurosci. Res., 37: 129-143; 与 Tuzi 和 Gullick, (1994), Br. J. Cancer, 69: 417-421 中的参考文献)。示范性 Eph 受体包括 eph、elk、eck、sek、mek4、hek、hek2、eek、erk、tyro1、tyro4、tyro5、tyro6、tyro11、cek4、cek5、cek6、cek7、cek8、cek9、cek10、bsk、rtk1、rtk2、rtk3、myk1、myk2、ehk1、ehk2、pagliaccio、htk、erk 与 nuk 受体。

在另一实施方案中,所述受体元件是血细胞生成素受体超家族的成员。本文用血细胞生成素受体超家族来定义具有 3 个结构域构造的单次跨膜受体:与活化配体结合的胞外结构域,短的跨膜区段与胞质驻留结构域。这些受体的胞外结构域的含有约 200-210 个氨基酸的胞外配体结合结构域的同源性虽低但很明显。同源区的特征是该区 N-末端一半有 4 个半胱氨酸残基与紧靠跨膜结构域外有 Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS)基序。这些受体的其它结构与功能的进一步细节见 Cosman, D.等, (1990)。例如 IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、促乳素、胎盘催乳素、生长激素 GM-CSF、G-CSF、M-CSF 与促红细胞生成素的受体经鉴定为此受体家族的成员。

在其它实施方案中,所述受体元件是除白细胞功能抗原-1(LFA-1)以外的整联蛋白。整联蛋白家族成员的受体为异质二聚体(由各种 α 和 β 亚基构成),其功能是介导细胞骨架与胞外基质之间相互作用。(综述于 Giancotti 和 Ruoslahti, Science, 285, 1999 年 8 月 13 日)。 α 与 β 亚基的不同组合产生了各种配体特异性,而存在细胞类型特异性因子时可进一步提高这种特异性。已知整联蛋白群集能活化许多胞内信号,例如 RAS、MAP 激酶与磷脂酰肌醇-3-激酶。在一优选的实施方案中,所述受体元件是由选自以下整联蛋白的 β 整联蛋白与 α 整联蛋白构成的异质二聚体(除 LFA-1 以外): β 1、 β 2、 β 3、 β 4、 β 5、 β 6、 α 1、 α 2、 α 3、 α 4、 α 5 和 α 6 或是 MAC-1 (β 2 和 cd11b)或 α V β 3。

在另一实施方案中，可活化元件通过与其它表面分子接触群集而转导信号。与上述受体相反，这些元件通过与其它表面分子接触群集而转导信号时，通常利用存在于第二细胞表面的分子作为配体。此类受体在细胞间相互作用，例如介导细胞间黏附和免疫识别中有重要作用。

这种受体元件的例子是 CD3 (T 细胞受体复合物)、BCR (B 细胞受体复合物)、CD4、CD28、CD80、CD86、CD54、CD102、CD50 与 ICAM 1、2 和 3。

在一优选的实施方案中，所述受体元件是 T 细胞受体复合物(TCR)。TCR 有两种不同的异质二聚体($\alpha\beta$ 或 $\gamma\delta$)，二者均与非多态性 CD3 多肽 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 一起表达。CD3 多肽，特别是 ζ 及其变体对胞内信号转导关键。表达 $\alpha\beta$ TCR 异质二聚体的细胞在大多数淋巴区室内占优势，它们负责经典的辅助或细胞毒性 T 细胞应答。在大多数情况中， $\alpha\beta$ TCR 配体是与 I 类或 II 类 MHC 分子结合的肽抗原(《基础免疫学》(Fundamental Immunology)，第四版，W. E. Paul 编，Lippincott-Raven Publishers，1999，第 10 章，第 341-367 页)。

在一优选的实施方案中，所述受体元件是 B 细胞抗原受体(BCR)。抗原与特异性 B 细胞接触可引发 BCR 的跨膜信号转导功能。BCR 分子与抗原结合后迅速内化摄入抗原并在内体或溶酶体中降解。以蛋白质抗原为例，抗原衍生的肽结合于 II 类 MHC 分子的沟槽中。结合后，此复合物被送至细胞表面，在该处用作特异性辅助 T 细胞的刺激。辅助 T 细胞识别抗原诱导其与 B 细胞形成紧密而持久的相互作用并合成 B 细胞生长和分化因子。以此方式活化的 B 细胞可增殖并最终分化为抗体分泌细胞(也称为浆细胞)(《基础免疫学》，第四版，W. E. Paul 编，Lippincott-Raven Publishers，1999，第 6-7 章，第 183-261 页)。

在一优选实施方案中，所述元件是胞内黏附分子(ICAM)。ICAM-1、-2 和 -3 是属于免疫球蛋白超家族的细胞黏附分子。每种这些受体具有一个跨膜结构域，它们均通过结构上类似于 Ig-环的胞外结合结构域与 $\beta 2$ 整联蛋白结合。(《信号转导》(Signal Transduction)，Gomperts 等编，Academic Press Publishers，2002，第 14 章，第 318-319 页)。

在另一实施方案中,所述可活化元件是 G 蛋白偶联受体大家族的成员。近来有报导说 G-蛋白偶联受体能群集。(Kroeger 等, *J Biol Chem*, 276: 16, 12736-12743, 2001 年 4 月 20 日; Bai 等, *J Biol Chem*, 273: 36, 23605-23610, 1998 年 9 月 4 日; Rocheville 等, *J Biol Chem*, 275 (11), 7862-7869, 2000 年 3 月 17 日)。本文所用的 G 蛋白偶联受体及其语法等价词指能与异质三聚“G 蛋白”结合的受体家族。已知有许多不同的 G 蛋白能与这类受体相互作用。G 蛋白信号转导系统包括三种成分:受体本身、GTP-结合蛋白(G-蛋白)与胞内靶蛋白。细胞膜用作开关板。如果这些受体作用于同一类型的 G 蛋白,通过不同受体到达的信息可能产生一种作用。另一方面,如果受体作用于不同种类的 G 蛋白,或者如果 G 蛋白可作用于不同效应物,则活化一种受体的信号可能产生多种作用。

静息状态的 G 蛋白(由 α 、 β 与 γ 亚基构成)与核苷酸鸟苷二磷酸(GDP)形成复合物并与受体接触。当激素或其它第一信使与受体结合时,受体构象改变,而改变其与 G 蛋白的相互作用。这刺激 α 亚基释放 GDP,更丰富的核苷酸鸟苷三磷酸(GTP)取代 GDP 而活化 G 蛋白。然后 G 蛋白解离将 α 亚基与依旧形成复合物的 β 和 γ 亚基分开。取决于反应途径, $G\alpha$ 亚基或 $G\beta\gamma$ 复合物均能与效应物相互作用。效应物(经常是酶)进而将失活的前体分子转化为在胞质中扩散触发代谢级联反应的活化“第二信使”。几秒钟后, $G\alpha$ 将 GTP 转化为 GDP 从而使自身失活。然后失活的 $G\alpha$ 可再次与 $G\beta\gamma$ 复合物缔合。

数百个(如果不是数千个)受体是通过分离的至少 17 种不同形式的异质三聚体 G 蛋白输送信息。虽然最大可变性见于 α 亚基,但也报导了几种不同的 β 和 γ 结构。此外,有许多不同的 G 蛋白依赖性效应物。

大多数 G 蛋白偶联的受体由一条跨膜 7 次的蛋白质链构成。这种受体经常称为 7-跨膜受体(STR)。已发现了 100 种以上的不同 STR,包括能与同一配体结合的许多不同受体,可能有更多 STR 有待发现。

此外,已鉴定到其天然配体未知的 STR;这些受体称为上述的“孤儿”G 蛋白-偶联受体。例子包括 Neote 等, (1993), *Cell*, 72, 415; Kouba 等, *FEBS Lett.*, (1993), 321, 173; Birkenbach 等, (1993), *J. Virol.*, 67, 2209 克隆

的受体。

G 蛋白偶联受体的已知配体包括：嘌呤与核苷酸，例如腺苷、cAMP、ATP、UTP、ADP、褪黑素等；生物胺（及相关的天然配体），例如 5-羟色胺、乙酰胆碱、多巴胺、肾上腺素、组胺、去甲肾上腺素、酪胺/章鱼胺及其它相关化合物；肽，例如促肾上腺皮质激素 (acth)、促黑激素 (msh)、黑皮素、神经降压肽 (nt)、铃蟾肽及相关肽、内啡肽、缩胆囊肽、胃泌素、神经激肽 b (nk3)、无脊椎动物速激肽样肽、k 物质 (nk2)、p 物质 (nk1)、神经肽 y (npy)、促甲状腺素释放因子 (trf)、缓激肽、血管紧张素 ii、 β -内啡肽、c5a 过敏毒素(anaphalatoxin)、降钙素、趋化因子（也称为互泌素）、促肾上腺皮质激素释放因子 (crf)、强啡肽、内啡肽、fmlp 和其它甲酰化肽、促卵泡素 (fsh)、真菌交配信息素、甘丙肽、肠抑胃肽受体 (gip)、高血糖素样肽 (glps)、高血糖素、促性腺释放激素 (gnrh)、生长激素释放激素 (ghrh)、昆虫利尿激素、白介素-8、leutropin (1 h/hcg)、met-脑啡肽、阿片样肽、催产素、甲状旁腺素 (pth)和 pthrp、垂体腺苷酸环化酶激活肽 (pacap)、肠泌素、促生长素抑制素、凝血酶、促甲状腺激素 (tsh)、血管活性肠肽 (vip)、加压素、加压催产素；类十二烷酸，例如 ip-前列环素、pg-前列腺素、tx-凝血噁烷；视黄醛化合物，例如脊椎动物 11-顺式视黄醛、无脊椎动物 11-顺式视黄醛和其它相关化合物；脂和脂质化合物，例如大麻素、花生四烯酰乙醇酰胺、溶血磷脂酸、血小板激活因子、白三烯等；兴奋性氨基酸和离子，例如钙离子和谷氨酸。

优选的 G 蛋白偶联受体包括但不限于： α 1-肾上腺素受体、 α 1B-肾上腺素受体、 α 2-肾上腺素受体、 α 2B-肾上腺素受体、 β 1-肾上腺素受体、 β 2-肾上腺素受体、 β 3-肾上腺素受体、m1 乙酰胆碱受体 (AChR)、m2 AChR、m3 AChR、m4 AChR、m5 AChR、D1 多巴胺受体、D2 多巴胺受体、D3 多巴胺受体、D4 多巴胺受体、D5 多巴胺受体、A1 腺苷受体、A2a 腺苷受体、A2b 腺苷受体、A3 腺苷受体、5-HT1a 受体、5-HT1b 受体、5HT1-样受体、5-HT1d 受体、5HT1d-样受体、5HT1d β 受体、K 物质 (神经激肽 A)受体、fMLP 受体 (FPR)、fMLP-样受体 (FPRL-1)、血管紧张素 II 1 型受体、内皮

肽 ETA 受体、内皮肽 ETB 受体、凝血酶受体、生长激素释放激素 (GHRH) 受体、血管活性肠肽受体、催产素受体、促生长素抑制素 SSTR1 和 SSTR2、SSTR3、大麻素受体、促卵泡激素 (FSH) 受体、leutropin (LH/HCG) 受体、促甲状腺素 (TSH) 受体、凝血噻烷 A2 受体、血小板激活因子(PAF)受体、C5a 过敏毒素受体、CXCR1 (IL-8 受体 A)、CXCR2 (IL-8 受体 B)、 δ 阿片样物质受体、 κ 阿片样物质受体、mip-1 α /RANTES 受体 (CRR1)、视紫红质、红视蛋白、绿视蛋白、蓝视蛋白、代谢型谷氨酸 mGluR1-6、组胺 H2 受体、ATP 受体、神经肽 Y 受体、淀粉样蛋白前体受体、胰岛素样生长因子 II 受体、缓激肽受体、促性腺素释放激素受体、缩胆囊肽受体、促黑素受体、抗利尿激素受体、高血糖素受体与促肾上腺皮素 II 受体。此外，至少有 5 种受体(CC 和 CXC 受体)参与 HIV 病毒黏附于细胞。HIV 的两种主要辅助受体是 CXCR4 (融合受体, LESTR, SDF1 受体)和 CCR5 (m-营养)。更优选的受体包括以下人受体: 褪黑素受体 1a、甘丙肽受体 1、神经降压肽受体、腺苷受体 2a、促生长素抑制素受体 2 和促肾上腺皮质激素释放因子受体 1。特别优选褪黑素受体 1a。其它 G 蛋白偶联受体 (GPCR)是本领域已知的。

在一优选的实施方案中,所述可活化元件是能群集的胞内受体。此类元件不与膜结合。相反,它们游离弥散在胞内基质中而与可溶性配体结合,然后群集并转导信号。与上述元件相反,许多此类成员能在群集后与 DNA 结合直接导致 RNA 转录改变。

在一优选的实施方案中,能群集的胞内受体是过氧化物酶体增殖物活化的受体(PPAR)。PPAR 是能对亲脂性化合物起反应的可溶性受体,能诱导参与脂肪酸代谢的各种基因。三种 PPAR 亚型: PPAR α 、 β 和 γ 显示在配体结合后能结合 DNA 并与类视黄醇 X 受体异质二聚化。(Summanasekera 等, J Biol Chem, M211261200, 2002 年 12 月 13 日)

在另一实施方案中,所述可活化元件是核酸。核酸可以许多方式活化和灭活,包括但不限于切割灭活前导序列以及诱导结构或功能改变的共价或非共价修饰。例如,可将许多催化性 RNA(如锤头核酶)设计为具有灭活作用的前导序

列，除非发生切割，否则该前导序列可使该核酶的催化活性失活。共价修饰的例子是 DNA 甲基化。已证明甲基化导致的灭活是某些基因沉默的原因，例如淋巴瘤中 STAT 调节性 SOCS 基因。参见 *Leukemia*, 2004 年 2 月; 18(2): 356-8。外套细胞淋巴瘤(mantle cell lymphoma)和滤泡性淋巴瘤的 SOCS1 和 SHP1 过度甲基化：暗示 Jak/STAT 途径的渐成性活化。Chim CS, Wong KY, Loong F, Srivastava G。

在另一实施方案中，所述可活化元件是小分子、碳水化合物、脂质或其它天然产生或合成的具有活化同种型的化合物。此外，如上所述，这些元件的活化无需包括从一个(同种型)转换为另一(同种型)，但可通过是否存在该化合物来检测。例如，存在 cAMP 而不是非环状 AMP 向环状 AMP 的转换可用来检测 cAMP(环状腺苷一磷酸)的活化。

增强作用

在一个实施方案中，本发明包括在引入环境信号后(例如通过给予增强剂)测定细胞活化状况。在这种实施方案中，不只测定活化的绝对水平，还测定信号转导级联反应在所述元件活化中的作用。一般可用增强剂来改变信号转导级联反应，然后测定细胞的活化状况，测定增强剂的影响，是为与非增强细胞相比分析活化状况的差异。例如，通过同时检测复杂的肿瘤细胞群中单细胞水平的多种元件的磷酸化事件，可能构建与区分不同细胞亚组中(传导)途径的异常。类似地，增强可视为细胞的“引发”。引发的一个例子是原代细胞发育为记忆细胞。此种引发的一个结果是记忆细胞反应更快，因为它们的活化阈值因以前接触过输入的引发物而低于原代细胞。

理解增强剂在本发明中作用的关键是知道：任何一个细胞或细胞群的活化状况，包括测定一种或多种不同的可活化元件的活化状态。这些元件每种在信号转导级联反应或网络中形成一特定的结点。由于许多细胞信号转导网络互相连通，影响一个结点的信号可能对其它结点的活化状态之间转换能力有影响点因此，通过研究在存在或不存在增强剂时各结点的活化状态可能测定互连各结点的网络结构并根据它们对此结构的影响给活化状况分类。增强及其在分类活

化状况中的作用详细讨论于标题为“分析”的下文与实施例2中。

如上所述，增强剂可采取各种环境信号与输入物形式。增强剂的特征定义为能影响细胞信号转导网络的信号或输入物。增强剂的例子包括但不限于：物理参数，例如热、冷、紫外辐射，以及单用或处于细胞环境中的细胞因子、药物、激素、抗体、肽和蛋白质片段，细胞自身，病毒与生物和非生物复合物(如，珠、板、病毒被膜、抗原呈递分子，如主要组织相容性复合体)。

在一优选的实施方案中，增强剂是细胞或细胞群。例如使认为是效应物的正常T细胞常规库与不同患者的各种肿瘤细胞群接触，监测肿瘤在效应物中产生不同信号转导状况的能力(与该增强剂在各种肿瘤细胞中通过相互刺激增强信号转导的能力)。类似地，可将患者的正常T细胞与各种肿瘤细胞群(同一患者的)混合，检测绘制正常T细胞和肿瘤细胞中信号转导潜力(活化事件)状况图。可在一根试管中利用能识别细胞表面表位的抗体鉴定的相关细胞亚群(例如效应物和肿瘤细胞)中进行这种试验。此外，可在一系列增强条件下(例如，利用抗体共刺激)进行这些试验。

检测状态

检测某具体蛋白质(即可活化元件)的活化状态通常有各种方法。在一实施方案中，利用能特异性地与该蛋白质一种同种型结合的标记的结合元件(BE)。或者，将可活化蛋白质的状态用作结果；例如在含有信号转导结构域的细胞表面受体为例，可直接检验该信号转导结构域的活化(或不活化)。例如，两种同种型可以是无活性(负信号)与激酶活性(利用显色底物检测)。

结合元件

“结合元件”、“BE”及其语法等价词指能检测某元件的一种同种型超过另一种的任何分子，例如核酸、小的有机分子和蛋白质。

在一优选的实施方案中，本文所用的BE是蛋白质，术语“蛋白质”指至少两个共价相连的氨基酸，包括蛋白质、多肽、寡肽和肽。蛋白质可以由天然产生的氨基酸和肽键构成，或是合成的肽模拟物结构。因此，本文“氨基酸”

或“肽残基”指天然产生或合成的氨基酸。例如，高苯丙氨酸、瓜氨酸和正亮氨酸认为是符合本发明目的的氨基酸。“氨基酸”也包括亚氨基酸残基，例如脯氨酸和羟脯氨酸。侧链可以是(R)或(S)构象。在优选的实施方案中，氨基酸是(S)或 L-构象。如果利用非天然产生的侧链，可利用非氨基酸取代基，从而(例如)防止或延缓体内降解。可合成含有非天然产生的氨基酸的蛋白质，或者在一些情况中重组制备；参见 van Hest 等，FEBS Lett, 428: (1-2) 68-70, 1998 年 5 月 22 日；Tang 等，Abstr. Pap Am. Chem., S218: U138, 第 2 部分, 1999 年 8 月 2 日；二者均专门纳入本文作为参考。

在一优选的实施方案中，蛋白质 BE 是一种抗体。在一特别优选的实施方案中，蛋白质 BE 是活化状态特异性抗体。因此，可采用本发明的方法与组合物来检测样品中任何具体的元件同种型，所述同种型可利用抗原检测，可利用抗原与样品中存在的该可活化元件的其它同种型鉴别。例如，本发明的活化状态特异性抗体可用于本发明方法来鉴定复杂细胞群的亚组或亚群的不同信号转导级联反应；以及潜在信号转导层次中蛋白质活化(例如激酶活化)的次序。

本文的“抗体”指基本上由已知免疫球蛋白基因的全部或一部分编码的一种或多种多肽构成的蛋白质。例如，人的已知免疫球蛋白基因包括：共同组成无数可变区基因的 kappa (k)、lambda (l)和重链遗传基因座，与分别编码 IgM、IgD、IgG、IgE 和 IgA 同种型的恒定区基因 mu (u)、delta (d)、gamma (g)、sigma (e)和 alpha (a)。本文中抗体意味着包括全长抗体和抗体片段，指用于实验、治疗或以下所述其它目的的任何生物的天然抗体、工程改造的抗体或重组产生的抗体。如本领域所知，术语“抗体”包括通过修饰完整抗体产生的或采用重组 DNA 技术从头合成的抗体片段，例如 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv 或抗体的其它抗原性结合子序列。特别优选含有本文所述 Fc 变体的全长抗体。术语“抗体”包括单克隆和多克隆抗体。抗体可以是拮抗剂、激动剂、中和性、抑制性或刺激性抗体。

本发明的抗体可以是非人、嵌合型、人源化或全人抗体。对嵌合型与人源化抗体的概念和描述可参见 Clark 等，2000 及其引用的参考文献 (Clark, 2000, Immunol Today, 21: 397-402)。嵌合型抗体包含操作性连接于人抗体

恒定区的非人抗体可变区，例如小鼠或大鼠来源的 VH 和 VL 结构域(参见例如美国专利号 4,816,567)。在一优选的实施方案中，本发明的抗体是人源化抗体。本文所用的“人源化”抗体指该抗体含有人构架区(FR)和非人(通常是小鼠或大鼠)抗体的一个或多个互补决定区(CDR)。提供 CDR 的非人抗体称为“供者”，提供构架区的人免疫球蛋白称为“受者”。人源化主要依赖于将供者 CDR 嫁接到受者(人)的 VL 和 VH 构架区上(Winter US 5225539)。此方案称为“CDR 嫁接”。为重新获得初始嫁接构建物所丢失的亲和力往往需要所选的受者构架残基“回复突变”成相应的供者残基(US 5530101; US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 6180370; US 5859205; US 5821337; US 6054297; US 6407213)。人源化抗体最好也至少含有免疫球蛋白恒定区(通常是人免疫球蛋白)的一部分，因此一般含有人 Fc 区域。本领域熟知非人抗体人源化的方法，基本上可按照 Winter 及其同僚的方法进行(Jones 等, 1986, *Nature*, 321: 522-525; Riechmann 等, 1988, *Nature*, 332: 323-329; Verhoeyen 等, 1988, *Science*, 239: 1534-1536)。本领域也知道人源化鼠单克隆抗体的其它例子，例如与人蛋白 C (O'Connor 等, 1998, *Protein Eng*, 11: 321-8)、白介素 2 受体(Queen 等, 1989, *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 10029-33)和人表皮生长因子受体 2 (Carter 等, 1992, *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 4285-9)结合的抗体。在其它实施方案中，本发明的抗体可以是完全人抗体，即抗体的序列完全或基本上是人的。本领域已知许多产生全人抗体的方法，包括利用转基因小鼠(Bruggemann 等, 1997, *Curr Opin Biotechnol*, 8: 455-458)或人抗体文库加选择方法(Griffiths 等, 1998, *Curr Opin Biotechnol*, 9: 102-108)。

“抗体”的定义中特别包括脱糖基化(aglycosylate)抗体。本文所用的“脱糖基化抗体”指该抗体在其 Fc 区的 297 位没有连接碳水化合物，其中编号是按照 Kabat 的 EU 系统。脱糖基化抗体可以是去糖基化抗体，是通过(例如)化学或酶法除去了 Fc 区的碳水化合物的抗体。或者，脱糖基化抗体可以是非糖基化或无糖基抗体，即表达出的抗体的 Fc 区不含碳水化合物，例如通过使编码糖基化模式的一个或多个残基突变，或在不能将碳水化合物连接于蛋白质的

生物，例如细菌中表达。

“抗体”的定义中特别包括含有 Fc 可变部分的全长抗体。本发明的“全长抗体”指构成抗体的天然生物学形式的结构，包括可变区与恒定区。例如，在大多数哺乳动物中(包括人和小鼠)，IgG 类全长抗体是四聚体，由相同的两对两条免疫球蛋白链组成，每对具有一条轻链和一条重链，每条轻链含有免疫球蛋白结构域 VL 和 CL，每条重链含有免疫球蛋白结构域 VH、Cg1、Cg2 和 Cg3。在一些哺乳动物，例如骆驼和羊驼中，IgG 抗体可能只由两条重链组成，每条重链含有与 Fc 区域相连的可变结构域。本文所用的“IgG”指属于基本上由已知的免疫球蛋白 γ 基因编码的多肽类抗体。在人中，此类(抗体)包括 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。在小鼠中，此类(抗体)包括 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3。

本文所用的术语“活化状态特异性抗体”或“活化状态抗体”或其语法等价词指能与相应和特定抗原特异性结合的抗体。所述相应且特定的抗原优选是可活化元件的特定同种型。活化状态特异性抗体的结合也优选能表明特异性可活化元件的特异性活化状态。因此，在优选的实施方案中，活化状态特异性抗体与可活化元件相应同种型的结合可表明该元件的身份(identity)以及该元件的活化状态。

如上所述，可利用活化状态特异性抗体检测激酶活性，然而本发明提供了测定激酶活化的其它方法。例如，已知有可被蛋白质激酶特异性识别而磷酸化的底物。可利用与这种磷酸化底物特异性结合但不与这种非磷酸化底物结合的抗体(磷酸-底物抗体)来测定样品中活化激酶的存在。

在其它实施方案中，利用固定的多个活化状态抗体测定元件的活化状况。可使抗体非扩散性地结合于含有分离样品接受区域的不可溶支持物上(例如，微滴定板、阵列等)。不可溶支持物可用能结合组分、易于和可溶性材料相分离，或者与整个筛选方法相容的任何组分制成。这种支持物的表面可以是固体或多孔的以及任何方便的形状。合适的不可溶支持物的例子包括微滴定板、阵列、膜和珠。这些支持物通常由玻璃、塑料(例如聚苯乙烯)、多糖、尼龙或硝酸纤维素、teflon™等制成。由于用少量试剂和样品就能同时进行大量试验，微滴定板和阵列特别方便。在一些情况中，包括磁性珠等。

组分的具体结合方式不重要，只要其与本发明的试剂和整个方法相容，能维持组分的活性并且不扩散。优选的结合方法包括利用抗体(当蛋白质与支持物结合时空间上不含封闭配体结合位点或活化序列)、直接与“粘性”或离子支持物结合、化学交联、在表面上合成抗体等。抗体结合后，洗涤除去多余的未结合物质。然后可通过与牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白或其它无害蛋白质或其它组分培育来封闭样品接受区域。

可活化元件活化同种型的抗原性不同于可活化元件非活化同种型的抗原性，或者不同活化状态同种型的抗原性。在一优选的实施方案中，元件的活化同种型具有不存在于元件的非活化同种型中的表位，或反之亦然。在另一优选的实施方案中，此差异是由于：在元件中共价加入了成分，例如磷酸成分；或由于元件的结构改变，例如蛋白质切割；或因元件经诱导而构象改变导致元件呈递的同一序列抗原性不同。在另一优选的实施方案中，这种构象改变导致元件的活化同种型呈递的至少一种表位是非活化同种型中不存在的，或不呈递至少一种存在于该元件非活化同种型中的表位。在一些实施方案中，可区分抗体的表位集中在该元件活性位点周围，虽然如本领域已知的那样，某元件一个区域的构象改变也可导致该元件不同区域的改变。

已生产了许多能与蛋白质的磷酸化同种型特异性结合但不与蛋白质的非磷酸化同种型特异性结合的可购得的抗体(例如，参见 Cell Signaling Technology 的目录，其内容纳入本文作为参考)。已生产了许多这种抗体来研究可逆性磷酸化的信号转导蛋白质。具体地说，已生产了许多能特异性结合蛋白质激酶的磷酸化、活化同种型的这种抗体，它们有时在本文中称为激酶活化状态抗体或其语法等价词。本发明所用的特别优选的抗体包括：磷酸-AKT Ser473 单克隆抗-4E2、磷酸-p44/42 MAP 激酶 (Thr202/Tyr204)单克隆抗体、磷酸-TYK2 (Tyr1054/1055)抗体、磷酸-p38 MAP 激酶 (Thr180/Tyr182)单克隆抗体 28B10、磷酸-PKC-PAN 底物抗体、磷酸-PKA-底物、磷酸-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)G9 单克隆抗体、磷酸-酪氨酸单克隆抗体 (P-tyr-100)、p44/42 MAPK、p38 MAPK、JNK/SAPK 和磷酸-AKT-Thr308。

在一优选的实施方案中，利用了活化状态抗体的表位识别片段而不是整个

抗体。在另一优选的实施方案中，固定表位识别片段。在另一优选的实施方案中，利用识别某表位的抗体轻链。可通过本领域熟知的重组方法利用编码识别某表位的轻链基因产物的重组核酸来制备这种抗体片段。

本发明也可利用非活化状态抗体。在一优选的实施方案中，非活化状态抗体能与元件的活化或非活化形式二者的表位结合。这种抗体可用于测定样品中的非活化加活化元件的含量。在另一优选的实施方案中，非活化状态抗体能与元件非活化形式中存在而元件活化形式中不存在的表位结合。可用这种抗体测定样品中非活化元件的含量。可利用非活化状态抗体的两种类型来测定，例如用本文所述候选生物活性药物处理前后样品中活化状态元件含量的变化是否与非活化状态元件含量的变化一致。例如，可用这种抗体测定活化元件的增加是否因非活化状态元件活化，或该元件的表达增加，或此两种情况所致。

在另一优选的实施方案中，利用类似于标准化流式细胞术中已知或所用那些的珠来固定抗体。可采用本领域已知和/或本文所述的方法将多个活化状态特异性抗体连接于珠。可在允许多个活化元件(如果存在的话)与多个固定的抗体结合的条件下使这种偶联珠与样品(优选细胞提取物)接触。可将包含非活化状态抗体的第二多价抗体加入固定的活化状态特异性抗体-活化的元件复合体，根据各标记的存在通过 FACS 分选这些珠，存在标记表明相应的第二抗体发生结合并且存在相应的活化元件。

在本发明的其它实施方案中，可用以下氨基酸取代蛋白质 BE 的芳香族氨基酸：D-或 L-萘基(naphyl)丙氨酸，D-或 L-苯基甘氨酸，D-或 L-2-噻吩基(thieneyl)丙氨酸，D-或 L-1-、2-、3-或 4-苊基丙氨酸，D-或 L-3-噻吩基丙氨酸，D-或 L-(2-吡啶基)-丙氨酸，D-或 L-(3-吡啶基)-丙氨酸，D-或 L-(2-吡嗪基)-丙氨酸，D-或 L-(4-异丙基)-苯基甘氨酸，D-(三氟甲基)-苯基甘氨酸，D-(三氟甲基)-苯基丙氨酸，D-对-氟苯基丙氨酸，D-或 L-对-联苯基苯基丙氨酸，D-或 L-对-甲氧基联苯基苯基丙氨酸，D-或 L-2-吡啶(烷基)丙氨酸与 D-或 L-烷基丙氨酸，其中烷基可以是取代或未取代的甲基、乙基、丙基、己基、丁基、戊基、异丙基、异丁基、sec-isotyl、异戊基与 C1-C20 的非酸性氨基酸。

可用能维持带负电荷的以下非羧酸氨基酸及其衍生物或类似物取代酸性氨基酸：例如其非限制性例子是(磷酰基)丙氨酸、甘氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苏氨酸；或硫酸化的(如， $-\text{SO}_3\text{H}$)苏氨酸、丝氨酸或酪氨酸。

其它取代可包括通过将“烷基”与任何天然氨基酸组合制成的非天然羟基化氨基酸。本文所用的术语“烷基”指 1-24 个碳原子的支链或非支链饱和烃基团，例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、辛基、癸基、十四烷基、十六烷基、二十烷基、二十四烷基(tetracyl)等。烷基包括含有氮、氧、硫原子的杂烷基。本文的优选烷基含有 1-12 个碳原子。可用烷基取代天然产生的氨基酸序列中赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸、瓜氨酸或(胍基)-乙酸或其它(胍基)烷基-乙酸任何位置的碱性氨基酸，其中“烷基”如上定义。也可用腈衍生物(例如，含有 CN-成分取代 COOH)取代天冬酰胺或谷氨酰胺，甲硫氨酸亚砷可取代甲硫氨酸。本领域技术人员熟知制备这种肽衍生物的方法。

此外，可用酮亚甲基(ketomethylene)取代任何多肽的任何酰胺键。预计这种衍生物能抵抗酶降解而稳定性提高，因此其优点在于配制用于口服、静脉内、肌肉内、腹膜内、局部、直肠、眼内或其它途径给予的化合物时体内半衰期增长。

本发明变体多肽中氨基酸的其它氨基酸修饰包括：半胱氨酰基残基与 α -卤代乙酸(和相应的胺)，例如与 2-氯乙酸或氯乙酰胺反应得到羧甲基或羧基酰氨基甲基衍生物。半胱氨酰基残基也可通过与诸如以下化合物反应来衍生：溴三氟丙酮、 α -溴- β -(5-imidazolyl)丙酸、氯乙酰基磷酸酯、N-烷基马来酰亚胺、3-硝基-2-吡啶基二硫化物、甲基 2-吡啶基二硫化物、对-氯汞苯甲酸、2-氯汞-4-硝基酚或氯-7-硝基苯并-2-噁-1,3-二唑。

可通过使组氨酰基残基在例如 pH 5.5-7.0 与诸如焦碳酸二乙酯(diethylprocarbonate)化合物反应来衍生，因为此试剂对组氨酰基侧链具有相对特异性；也可利用对-溴苯甲酰甲基溴，例如该反应优选在 pH 6.0，0.1M 可卡酸钠中进行。

赖氨酰基与氨基末端残基可与诸如柠檬酸或其它羧酸酐化合物反应。预计

用这些试剂衍生具有逆转赖氨酰基残基(所带)电荷的作用。

其它用于衍生含 α -氨基残基的合适试剂包括诸如亚氨酸酯的化合物,如甲基吡啶亚胺甲酯(methyl picolinimidate); 磷酸吡哆醛; 吡哆醛; 氯氢硼化物(chloroborohydride); 三硝基苯磺酸; O-甲基异脲; 2,4 戊二酮; 与转氨酶催化的与乙醛酸反应。可通过与一种或几种常规试剂反应来修饰精氨酰基残基,其中有按照已知方法步骤的苯甲酰甲醛、2,3-丁二酮、1,2-环己二酮和茛三酮。因为胍官能团的高 pKa, 衍生精氨酸残基需要在碱性条件下进行反应。此外, 这些试剂可与赖氨酸的基团以及精氨酸 ϵ 氨基反应。酪氨酰基残基的特异性修饰本身是熟知的, 例如通过与芳香族重氮化合物或四硝基甲烷反应可将光谱标记物引入酪氨酰基残基。

可利用 N-乙酰基咪唑(acetylimidazol)和四硝基甲烷分别形成 O-乙酰基酪氨酰基和 3-硝基衍生物。可通过与碳二亚胺(R'-N-C-N-R'), 例如 1-环己基-3-(2-吗啉基-(4-乙基)碳二亚胺或 1-乙基-3-(4-氮杂-4,4-二甲基戊基)碳二亚胺反应来选择性修饰羧基侧链基团(天冬氨酰基或谷氨酰基)。可通过与铵离子反应将其它天冬氨酰基或谷氨酰基残基转化为天冬酰胺基和谷氨酰胺基。

天冬酰胺基和谷氨酰胺基残基常可脱去酰氨基成为相应的天冬氨酰基或谷氨酰基残基。或者, 可在温和的酸性条件下使这些残基脱酰氨基。这些残基的两种形式属于本发明的范围。

在一优选的实施方案中, 活化状态特异性 BE 是一种肽, 其含有能与可活化元件的靶结构相结合的识别结构。本领域熟知并可采用本领域已知的方法, 包括通过噬菌体展示文库制备各种识别结构(参见, 例如 Gururaja 等, Chem. Biol., (2000), 7: 515-27; Houimel 等, Eur. J. Immunol., (2001), 31: 3535-45; Cochran 等, J. Am. Chem. Soc., (2001), 123: 625-32; Houimel 等, Int. J. Cancer, (2001), 92: 748-55, 各篇文献纳入本文作为参考)。或者, 可采用组合化学方法产生识别结构, 例如对可活化蛋白质的靶结构具有亲和力的聚合物(参见, 例如 Barn 等, J. Comb. Chem., (2001), 3: 534-41; Ju 等, Biotechnol., (1999), 64: 232-9, 各篇文献专门纳入本文作为参考)。在其它实施方案中, 所述识别结构是抗-层粘连蛋白单链抗体片段(scFv) (参见, 例如 Sanz 等, Gene

Therapy, (2002), 9: 1049-53; Tse 等, J. Mol. Biol., (2002), 317: 85-94, 各篇文献专门纳入本文作为参考)。在一优选的实施方案中, 活化状态特异性 BE 含有以下识别结构: SKVILFE-随机肽环-SKVILFE。具有这种识别结构的 BE 能以高亲和力与特定的靶结构结合。此外, 可将荧光团连接于本发明方法所用的这种 BE 上。

在一优选的实施方案中, 所述 BE 是核酸。本文的“核酸”或“寡核苷酸”或其语法等价词指至少两个共价相连的核苷酸。本发明的核酸通常含有磷酸二酯键, 虽然在一些情况中(如下所述)包括具有其它骨架的核酸类似物, 这些骨架包括例如磷酰胺(phosphoramidite) (Beaucage 等, Tetrahedron, 49(10): 1925, (1993)及其参考文献; Letsinger, J. Org. Chem., 35: 3800, (1970); Sprinzl 等, Eur. J. Biochem., 81: 579, (1977); Letsinger 等, Nucl. Acids Res., 14: 3487, (1986); Sawai 等, Chem. Lett., 805, (1984); Letsinger 等, J. Am. Chem. Soc., 110: 4470, (1988); Pauwels 等, Chemica Scripta, 26: 141 91986)), 硫代磷酸酯 (Mag 等, Nucleic Acids Res., 19: 1437, (1991); 美国专利号 5,644,048), 二硫代磷酸酯 (Briu 等, J. Am. Chem. Soc., 111: 2321, (1989)), O-甲基亚磷酰胺(methylphosphoramidite)键 (参见 Eckstein, 《寡核苷酸与类似物: 实用方法》(Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach), 牛津大学出版社), 与肽核酸骨架和连接键 (参见 Egholm, J. Am. Chem. Soc., 114: 1895, (1992); Meier 等, Chem. Int. Ed. Engl., 31: 1008, (1992); Nielsen, Nature, 365: 566, (1993); Carlsson 等, Nature, 380: 207, (1996), 所有文献纳入本文作为参考)。其它类似的核酸包括具有正骨架(Denpcy 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 6097, (1995); 非离子骨架 (美国专利号 5,386,023; 5,637,684; 5,602,240; 5,216,141 和 4,469,863; Kiedrowshi 等, Angew. Chem. Intl. Ed. English, 30: 423, (1991); Letsinger 等, J. Am. Chem. Soc., 110: 4470, (1988); Letsinger 等, Nucleoside & Nucleotide, 13: 1597 (1994); ASC 研讨会系列 580, 《反义研究中的碳水化合物修饰》(Carbohydrate Modifications in Antisense Research)的第 2 和 3 章, Y.S. Sanghui 和 P. Dan Cook 编; Mesmaeker 等, Bioorganic & Medicinal Chem.

Lett., 4: 395, (1994); Jeffs 等, J. Biomolecular NMR, 34:17, (1994); Tetrahedron Lett., 37: 743, (1996))与非核糖骨架的, 包括以下文献中所述的: 美国专利号 5,235,033 和 5,034,506; ASC 研讨会系列 580, 《反义研究中的碳水化合物修饰》的第 6 和 7 章, Y.S. Sanghui 和 P. Dan Cook 编。核酸的定义中也包括含有一个或多个碳环糖的核酸(参见 Jenkins 等, Chem. Soc. Rev., (1995), 第 169-176 页)。Rawls, C & E News, 1997 年 6 月 2 日, 第 35 页描述了几种核酸类似物。所有这些文献专门纳入本文作为参考。可对核糖-磷酸骨架进行这些修饰而有助于加入其它成分, 例如标记物, 或提高这种分子在生理环境中的稳定性和半衰期。

本领域技术人员应知道, 所有这些核酸类似物可用于本发明。此外, 可制备天然产生的核酸与类似物的混合物。或者, 可制备不同核酸类似物的混合物, 天然产生的核酸与类似物的混合物。特别优选含有肽核酸类似物的肽核酸(PNA)。与天然产生的核酸的高度荷电磷酸二酯骨架相反, 这些骨架在中性条件下基本上是非离子性的。

所述核酸可以是单链或双链, 或者可同时含有双链或单链序列部分。所述核酸可以是 DNA(基因组和 cDNA)、RNA 或杂交体, 其中核酸含有脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸的任何组合与碱基, 包括尿嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤、肌苷、黄嘌呤(xanthine)、次黄嘌呤(hypoxanthine)、异胞嘧啶(isocytosine)、异鸟嘌呤等的任何组合。本文所用的术语“核苷”包括核苷酸与核苷和核苷酸类似物, 及修饰的核苷, 例如氨基修饰的核苷。此外, “核苷”包含非天然产生的类似结构。因此, 例如本文将各含有一个碱基的肽核酸的一个单位称为核苷。

核酸 BE 可以是天然产生的核酸、随机核酸或“偏好的”随机核酸。例如, 与上述蛋白质一样, 可利用原核或真核基因组的消化产物。当最终表达产物是核酸时, 至少 10 个、优选至少 12 个、更优选至少 15 个、最优选至少 21 个核苷酸位置需要随机化, 如果随机化不够完美则优选更多位置。类似地, 当最终表达产物是蛋白质时, 至少 5 个、优选至少 6 个、更优选至少 7 个氨基酸位置需要随机化; 而且, 如果随机化不够完美则优选更多位置。

在一优选的实施方案中，BE 是合成化合物。已有许多技术可用于各种有机化合物和生物分子的随机与定向合成，包括随机化寡核苷酸的表达。参见，例如讨论产生新化合物的方法，包括随机化学方法以及酶方法的 WO 94/24314，该篇文献专门纳入作为参考。

或者，一优选实施方案利用已有的或不难制备的细菌、真菌、植物和动物提取物形式的天然化合物(如 BE)。

此外，不难通过常规化学、物理和生物化学方法修饰天然或合成产生的化合物。可对已知的药理学制剂进行定向或随机化学修饰(包括酶修饰)以产生本发明可用的 BE。

在另一优选的实施方案中，BE 是小的有机化合物。可从能被化学修饰的一系列底物合成 BE。本文的“化学修饰”包括传统的化学反应以及酶反应。这些底物一般包括但不限于烷基(包括烷烃、烯烃、炔烃和杂烷基)、芳基(包括芳烃和杂芳基)、醇、醚、胺、醛、酮、酸、酯、酰胺、环状化合物、杂环化合物(包括嘌呤、嘧啶、苯并二氮杂类、 β -内酰胺、四环素类、头孢菌素类和碳水化合物)、类固醇(包括雌激素、雄激素、可的松、蜕皮素(ecodysone)等)、生物碱(包括麦角、长春花、箭毒、吡咯烷(pyrollizdine)和丝裂霉素)、有机金属化合物、带杂原子的化合物、氨基酸与核苷。可在这些成分上进行化学反应(包括酶反应)来形成本发明所用的新底物或 BE。

在一优选的实施方案中，BE 是碳水化合物。本文所用的术语“碳水化合物”包括具有通式 $(\text{CH}_2\text{O})_n$ 的化合物。优选的碳水化合物例子是二糖、三糖与寡糖以及多糖，例如糖原、纤维素和淀粉。

在一优选的实施方案中，BE 是脂质。本文所用的术语“脂质”包括可溶于非极性有机溶剂的水不溶性有机分子。优选脂质的例子是类固醇，例如胆固醇与磷脂，例如鞘磷脂(sphingomeylin)。

标记物

本发明的方法与组合物提供含有标记或标签的 BE。标记物指可直接(即一级标记)或间接(即二级标记)检测的分子;例如可目测和/或检测或鉴定从而知道

其存在与否的标记物。可将化合物直接或间接与能提供可检测信号的标记物相偶联，例如放射性同位素、荧光剂、酶、抗体、颗粒(如磁性颗粒)、化学发光剂或特异性结合分子等。特异性结合分子包括成对(分子)，例如生物素/链霉亲和素，地高辛和抗地高辛等。优选的标记物包括但不限于：光学荧光和产色染料，包括标记物、标记酶和放射性同位素。

利用两种活化状态特异性抗体的例子，“独特标记”指识别第一种活化元件的第一活化状态抗体含有第一标记物，识别第二种活化元件的第二活化状态抗体含有第二标记物，其中所述第一和第二标记物可检测且可区分，从而使所述第一和第二抗体得以独特标记。

标记物一般分为四类：a) 可以是放射性或重原子同位素的同位素标记物；b) 磁、电、热标记物；c) 含有发光、磷光和荧光染料或成分的产色、光学标记物；和 d) 结合伴侣(partner)。标记物可包括酶(辣根过氧化物酶等)与磁性颗粒。在一优选的实施方案中，可检测标记物是一级标记物。一级标记物是可直接检测的标记物，例如荧光团。

优选的标记物包括光学标记物，例如荧光染料或成分。荧光团可以是“小分子”荧光剂或蛋白质荧光剂(例如，绿色荧光蛋白及其所有变体)。

“荧光标记物”指可通过其固有的荧光特性检测的任何分子。合适的荧光标记物包括但不限于：荧光素、罗丹明、四甲基罗丹明、伊红、赤癬红、香豆素、甲基-香豆素、苾、Malacite 绿、芪、萤光黄、Cascade BlueTM、得克萨斯红、IAEDANS、EDANS、BODIPY FL、LC 红 640、Cy 5、Cy 5.5、LC 红 705 和 Oregon 绿。专门纳入本文作为参考的《分子探针手册》(Molecular Probes Handbook), Richard P. Haugland, 1996 描述了合适的光学染料。合适的荧光染料包括但不限于：绿色荧光蛋白 (GFP; Chalfie 等, Science, 263(5148): 802-805 (1994 年 2 月 11 日); EGFP; Clontech – Genbank 登录号 U55762)、蓝色荧光蛋白 (BFP; 1. Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 第八大街, 蒙特利尔 (魁北克), 加拿大, H3H 1 J9; 2. Stauber, R. H., Biotechniques, 24(3): 462-471, (1998); 3. Heim, R. 和 Tsien, R. Y., Curr. Biol., 6: 178-182, (1996))、增强型黄色荧光蛋白 (EYFP; 1.

Clontech Laboratories, Inc., 1020 East Meadow Circle, Palo Alto, CA, 94303)、萤光素酶 (Ichiki 等, J. Immunol., 150(12): 5408-5417, (1993))、 β -半乳糖苷酶 (Nolan 等, Proc Natl Acad Sci USA, 85(8): 2603-2607, (1988 年 4 月)) 与 Renilla (WO 92/15673; WO 95/07463; WO 98/14605; WO 98/26277; WO 99/49019; 美国专利 5,292,658; 美国专利 5,418,155; 美国专利 5,683,888; 美国专利 5,741,668; 美国专利 5,777,079; 美国专利 5,804,387; 美国专利 5,874,304; 美国专利 5,876,995 和美国专利 5,925,558)。上述所有引用的文献专门纳入本文作为参考。

本发明所用特别优选的标记物包括: Alexa-Fluor 染料 (Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680)、Cascade 蓝、Cascade 黄和 R-藻红蛋白 (PE) (Molecular Probes) (Eugene, Oregon)、FITC、罗丹明和得克萨斯红 (Pierce, Rockford, 伊利诺斯)、Cy5、Cy5.5、Cy7 (Amersham Life Science, 匹兹堡, 宾夕法尼亚)。本领域已知 Cy5PE、Cy5.5PE、Cy7PE、Cy5.5APC、Cy7APC 的串联偶联方案。可定量评估荧光探针偶联物来测定标记程度, 本领域也熟知包含染料光谱性能的方案。

在另一优选的实施方案中, 荧光标记是 GFP, 更优选 GFP 的 Renilla、Ptilosarcus 或 Aequorea 种类。

在一优选的实施方案中, 利用二级可检测标记物。二级标记物是间接检测的标记物; 例如可利用二级标记物与一级标记物的结合或反应所产生的其它产物来检测一级标记物(例如, 酶)等。二级标记物包括但不限于: 结合伴侣对中的一个; 可化学修饰的成分; 核酶抑制剂; 酶, 例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、萤光素酶等。

在一优选的实施方案中, 二级标记物是结合伴侣对。例如, 标记物可以是能与其结合伴侣结合的半抗原或抗原。例如, 合适的结合伴侣对包括但不限于: 抗原 (例如蛋白质 (包括肽)和小分子)和抗体 (包括其片段 (Fab 等)); 蛋白质和小分子, 包括生物素/链霉亲和素; 酶和底物或抑制剂; 其它的蛋白质-蛋白质相互作用对; 受体-配体; 碳水化合物及其结合伴侣。也可用核酸-

核酸结合蛋白质对。优选的结合伴侣对包括但不限于：生物素 (或亚氨基-生物素)和链霉亲和素，地高辛及其抗体，与 Prolinx™ 试剂。

在一优选的实施方案中，结合伴侣对包含一种抗原和能特异性结合该抗原的一种抗体。本文的“特异性结合”表示伴侣结合的特异性足以区分(伴侣)与体系中其它组分或污染物。在试验条件下，包括洗涤步骤到除去非特异性结合分子，所述结合应足以维持结合。在一些实施方案中，(伴侣)对的解离常数小于约 10^{-4} - 10^{-9} M⁻¹，优选小于约 10^{-5} - 10^{-9} M⁻¹，更优选小于约 10^{-7} - 10^{-9} M⁻¹。

在一优选的实施方案中，二级标记物是化学修饰的成分。在此实施方案中，将含有反应性官能团的标记物掺入待标记的分子。然后用一级标记物标记该官能团(可在试验前或后)。合适的官能团包括但不限于：氨基、羧基、马来酰亚胺基团、氧基团和硫醇基团，特别优选氨基和硫醇基团。例如，可使含有氨基的一级标记物与含有氨基的二级标记物相连。例如利用本领域已知的接头；如熟知的均质-或异质-双功能接头(参见纳入本文作为参考的 1994, Pierce Chemical Company 目录，交联接头技术章节，第 155-200 页)。

在优选的实施方案中，本发明的方法和组合物可利用多种荧光标记物，各标记物彼此不同且可辨别。

本领域知道可采用标准方法或利用 Molecular Probes (Eugene, Oregon)的蛋白质-蛋白质/蛋白质-染料交联试剂盒进行抗体-标记物偶联。

在一优选的实施方案中，利用标记的抗体来分析细胞中可活化蛋白质的功能。在进行这种分析中，要考虑实验的几个方面：(1) 确定用于染色的抗体混合物的合适组合；(2) 利用感兴趣的抗原(即可活化蛋白质)和抗体克隆确定染色方法的顺序；和(3) 全面评估细胞培养条件对细胞刺激的作用。因为不同抗体克隆在不同方案中会得到不同结果且染色不相似，所以抗原克隆的选择对人细胞表面抗原特别重要。选择细胞类型和优化培养条件也是检测差异的关键。例如，一些细胞系能适应培养条件并产生不同应答。

采用多色、多参数流式细胞术需要荧光团与蛋白质(“FTP”)比值明确的第一偶联抗体。一般不足以给出 FTP 比值的范围，但需要完整地定量测定最终产物，因为 FTP 比值(的对数)相差两倍的分子表示磷酸-表位染色显著降低。注

意各荧光团的最佳 FTP 是唯一的并且(不同)抗体克隆与磷酸化-表位的最佳 FTP 不同也很重要。

在一优选的实施方案中,任何蛋白质荧光团(即, PE, APC, PE-串联偶联物 (PE-TR、PE-Cy5、PE-CY5.5、PE-CY7), PE-Alexa 颜料 (PE-AX610、PE-AX647、PE-680、PE-AX700、PE-AX750), APC-串联偶联物 (APC-AX680、APC-AX700、APC-AX750、APC-CY5.5、APC-CY7), GFP, BFP, CFP, DSRED, 和所有含藻胆色素蛋白的海藻蛋白衍生物)的最佳比值是 1:1(一个抗体对一个蛋白质染料)。

在其它实施方案中,就内部染色而言,FTP 比值是 1-6;对 AX488 而言,FTP 优选 2-5,更优选 4;就 AX546 而言,FTP 比值优选 2-6,更优选 2;就 AX594 而言,FTP 比值优选 2-4;就 AX633 而言,FTP 优选 1-3;就 AX647 而言,FTP 比值优选 1-4,更优选 2。就 AX405、AX430、AX555、AX568、AX680、AX700、AX750 而言,FTP 比值优选 2-5。

或者,可采用下文详述的基于 FRET 的检测系统。FRET 可用于本发明来检测涉及群集或多聚的活化状态,其中活化改变了两个 FRET 标记物的邻近关系。在一优选的实施方案中,利用荧光共振能量转移(FRET)对为成员的至少两种荧光标记物。

FRET 是本领域已知的现象,其中一种荧光染料的激发光转移为另一种而不发射光子。FRET 对由供者荧光团和受者荧光团组成。供者的荧光发射光谱与受者的荧光吸收光谱必须重叠,两种分子必须密切靠近。导致 50%供者失活(将能量转移给受者)时的供者与受者之间的距离由 Förster 半径(R_0)确定,通常是 10-100 Å。检测到包含 FRET 对的荧光发射光谱变化,表明密切接近的 FRET 对(即彼此在 Å 以内)的数目变化。一个用 FRET 供者标记,另一个用 FRET 受者标记的这两个分子结合或解离通常可导致此情况,这种结合使 FRET 对密切接近。这种分子的结合可导致受者荧光发射增强和/或供者的荧光发射猝灭。

本发明所用的 FRET 对(供者/受者)包括但不限于: EDANS/荧光素、IAEDANS/荧光素、荧光素/四甲基罗丹明、荧光素/LC 红 640、荧光素/Cy 5、荧光素/Cy 5.5 与荧光素/LC 红 705。

在 FRET 的另一方面,可利用荧光供者分子和非荧光受者分子(“猝灭剂”)。在此应用中,当猝灭剂从密切接近供者处被取代时供者的荧光发射增强,而当猝灭剂密切接近供者时,供者的荧光发射减弱。有用的猝灭剂包括但不限于:TAMRA、DABCYL、QSY 7 与 QSY 33。有用的荧光供者/猝灭剂对包括但不限于:EDANS/DABCYL、得克萨斯红/DABCYL、BODIPY/DABCYL、荧光黄/DABCYL、香豆素/DABCYL 与荧光素/QSY 7 染料。

该领域技术人员知道 FRET 和荧光猝灭可用于监测标记分子的结合随时间变化情况能提供有关结合反应时间进程的连续信息。

优选测定 FRET(结合)程度的变化作为供者和受者荧光量比值变化的函数,该方法称为“比值法”。底物绝对量、激发光强度的改变与样品在激发光波长时的浊度或其它背景吸收几乎平行地影响供者和受者的荧光强度。因此,两种发射光强度的比值比一种光单独强度更可靠因而是优选的检测解离(的方法)。

本文所述的比值测量荧光报导系统对蛋白质整合的分析比现有报导(系统)具有明显优点,因为它可以灵敏地检测并区分表达和不表达的一种活细胞。在一优选的实施方案中,该试验系统利用易于加载然后被胞内捕获的无毒、非极性荧光底物。利用同源蛋白修饰荧光底物随着底物转化为产物而发生荧光发射转移。由于报导读数是以比值衡量的,该结果在报导蛋白质试验中唯一,因为此法可控制变量,例如施加入各细胞的底物用量。稳定的、易于检测的胞内读数不需要在表达分析前建立克隆细胞系。可采用此系统和其它类似的流式分选系统从数百万活细胞库中分离出具有特定受体元件群集和/或活化状况的细胞。

本发明的方法与组合物也可利用标记酶。标记酶指表示能与其底物反应而产生可检测产物的酶。本发明所用的合适标记酶包括但不限于:辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和葡萄糖氧化酶。本领域熟知利用这种底物的方法。一般可通过酶催化与标记酶底物的反应产生可鉴定产物而表明存在标记酶。这种产物可以是不透明的,例如辣根过氧化物酶与四甲基联苯胺反应产生的产物可具有各种颜色。已开发了能产生荧光反应产物的其它标记酶底物,例如鲁米诺(得自 Pierce Chemical Co.)。本领域熟知利用标记酶底物鉴定标记酶的方法,

已有许多商品化试剂盒。利用各种标记酶的例子与方法见 Savage 等, *Previews*, 247: 6-9, (1998); Young, *J. Virol. Methods*, 24: 227-236, (1989), 各篇文献全文纳入本文作为参考。

放射性同位素指任何放射性分子。本发明所用的合适放射性同位素包括但不限于： ^{14}C 、 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I 和 ^{131}I 。本领域熟知放射性同位素作为标记的应用。

如上所述，标记物可以间接检测，即标签是结合对的一个伴侣。“结合对的伴侣”表示第一和第二成分之一，所述第一和第二成分彼此具有特异性结合亲和力。本发明所用的合适结合对包括但不限于：抗原/抗体（例如，洋地黄毒苷/抗洋地黄毒苷、二硝基苯基 (DNP)/抗-DNP、丹酰-X-抗-丹酰、荧光素/抗-荧光素、萤光黄/抗-萤光黄、罗丹明/抗罗丹明、生物素/亲和素（或生物素/链霉亲和素）与钙调蛋白结合蛋白 (CBP)/钙调蛋白。其它合适的结合对包括例如以下多肽：FLAG-肽 [Hopp 等, *BioTechnology*, 6: 1204-1210, (1988)]; KT3 表位肽 [Martin 等, *Science*, 255: 192-194, (1992)]; 微管蛋白表位肽 [Skinner 等, *J. Biol. Chem.*, 266: 15163-15166, (1991)]; T7 基因 10 蛋白肽标签 [Lutz-Freyermuth 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6393-6397, (1990)]及它们各自的抗体。如本文所述，本领域技术人员应知道结合对伴侣可以应用于标记以外的领域。

本领域技术人员应知道一种结合对的伴侣也可以是另一种结合对的伴侣。例如，某种抗原(第一成分)可以与第一抗体(第二成分)结合，而该第一抗体既可以第二抗体(第三成分)的抗原。还应知道这种情况是第一成分和第三成分通过作为双方的结合对伴侣的中间第二成分而间接结合。

如上所述，本领域技术人员应知道结合对的一个伴侣可包含标记物。还应知道这将使含标记物的结合伴侣结合时以其标签作了间接标记。恰如所述，本文将标记物与作为结合对之一标记伴侣的标签结合称为“间接标记”。

“表面底物结合分子”或“结合标签”及其语法等价词表示对特定的表面底物具有结合亲和力的分子，所述底物一般是涂布在某表面上、掺入其中或相连在表面上的结合对的一成员。合适的表面底物结合分子与它们的表面底物包

括但不限于：聚组氨酸 (poly-his)或聚-组氨酸-甘氨酸 (poly-his-gly)标签与镍底物；谷胱甘肽-S 转移酶标签及其抗体底物 (得自 Pierce Chemical)；flu HA 标签多肽及其抗体 12CA5 底物 [Field 等, *Mol. Cell. Biol.*, 8: 2159-2165, (1988)]；c-myc 标签及其 8F9、3C7、6E10、G4、B7 和 9E10 抗体底物 [Evan 等, *Molecular and Cellular Biology*, 5: 3610-3616, (1985)]；单纯疱疹病毒糖蛋白 D (gD)标签及其抗体底物 [Paborsky 等, *Protein Engineering*, 3(6): 547-553, (1990)]。本发明所用的表面结合底物分子通常包括但不限于：与镍底物结合的聚组氨酸结构(His-标签)、与包含抗体的表面底物结合的抗原、与亲和素底物结合的半抗原(例如，生物素)、与包含钙调蛋白的表面底物结合的 CBP。

熟知抗体嵌合底物的制备(方法)；参见 Slinkin 等, *Bioconj. Chem.*, 2: 342-348, (1991)；Torchilin 等, 同上；Trubetskoy 等, *Bioconj. Chem.*, 3: 323-327, (1992)；King 等, *Cancer Res.*, 54: 6176-6185, (1994)；Wilbur 等, *Bioconjugate Chem.*, 5: 220-235, (1994) (所有文献专门纳入本文作为参考)，蛋白质与抗原相连或蛋白质产生(的方法)如上所述。钙调蛋白嵌合的底物可购得，Simcox 等, *Strategies*, 8: 40-43, (1995)描述了含有 CBP 的蛋白质的产生(方法)，该文献全文纳入本文作为参考。

本领域技术人员应知道可以各种方法制备本发明的标签-组分，所述方法主要取决于标签的形式。本发明的组分与标签宜通过共价键相连。

下文描述在标签也是多肽时制备标签-多肽的重组方法。本领域熟知标签标记蛋白质的制备(方法)，用于这种制备的试剂盒可购得(例如，Kodak 和 Sigma)。蛋白质的标签标记的例子包括但不限于：Flag-多肽与 His-多肽。制备与利用标签标记蛋白质的方法见例如全文纳入本文的 Winston 等, *Genes and Devel.*, 13: 270-283, (1999)，以及上述试剂盒所提供的产品手册。

靶分子和底物的生物素化(方法)是熟知的，例如已知有大量用于生物素化蛋白质、核酸、碳水化合物、羧酸的生物素化试剂，包括氨基反应性与巯基反应性试剂；参见纳入本文作为参考的《分子探针目录》(*Molecular Probes Catalog*)，第四章，Haugland，第六版，1996。生物素化的底物可通过亲和

素或链霉亲和素与生物素化的组分结合。类似地，也已知有大量半抗原化(haptenylation)试剂 (Id.)。

本领域已知用放射性同位素标记蛋白质的方法。例如，这种方法可见全文纳入本文作为参考的 Ohta 等, *Molec. Cell*, 3: 535-541, (1999)。

通过重组方法制备含有标签的蛋白质是熟知的，制备这种蛋白质的试剂盒可购得。例如，专门纳入本文作为参考的 Joanne Crowe 等所著, Qiagen 的 QIAexpress 手册描述了这种试剂盒及其应用。

本领域熟知利用化学反应基团，例如巯基、氨基、羧基等使标记物功能化的(方法)。在一优选实施方案中，功能化标签以促进共价连接。可以直接或通过接头共价连接标签。在一实施方案中，接头是用于连接分子的较短偶联成分。可以直接在本发明的组分上合成偶联成分，使之含有至少一个功能基团以促进标签连接。或者，例如偶联成分可具有至少两个用于连接功能化组分与功能化标签的功能基团。在其它实施方案中，所述接头是一种聚合物。在此实施方案中，可直接或通过组分或标签的偶联成分实现与聚合物的共价连接。在一优选的实施方案中，直接共价连接，即不利用接头。在此实施方案中，所述组分优选含有功能基团，例如用于与功能化标签直接相连的羧酸基团。应知道可以各种方法(包括上述的)连接所述组分与标签。在一优选的实施方案中，标签与多肽的氨基或羧基末端相连。本领域技术人员应知道以上对共价连接标签的描述实际上适用于本发明任何两分子间的连接。

在一优选的实施方案中，如上所概述的，使标签功能化以促进共价连接。因此，如本文所述，可购得含有功能基团的各种标签，所述基团包括但不限于：异硫氰酸基团、氨基、卤代乙酰基、马来酰亚胺、琥珀酰亚胺酯和磺酰基，所有基团可用于共价连接标签与第二分子。标签的功能基团的选择取决于上述接头或本发明组分的连接位点。因此，例如可利用氨基修饰或胍基修饰的标签通过碳二亚胺化学(方法)偶联直接连接蛋白质的羧酸基团，例如利用本领域已知的 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺 (EDAC) (参见《分子探针目录》的第 9 和 11 章，同上；也参见 Pierce, 1994, 《目录与手册》(Catalog and Handbook), 第 T-155—T-200 页，二者均纳入本文作为参考)。在一实施方

案中，首先将碳二亚胺连接于标签，例如本文所述可购得的许多标签。

其它活化状态指示剂

本发明所用的其它活化状态指示剂是可以通过显示活化结果来检测活化的指示剂。例如，可利用底物的磷酸化检测负责磷酸化该底物的激酶的活化。类似地，可利用底物的切割作为导致这种切割的蛋白酶活化的指示。本领域熟知能使这种指示与可检测信号相关联，例如上述标记物和标签与结合元件相关联的方法。例如，切割底物除去了猝灭成分，从而使先前被猝灭的标记物产生可检测信号。

FACS 分析

在一优选的实施方案中，本发明提供测定一种细胞的可活化元件活化状况的方法。该方法包括根据至少两种可活化元件的活化状态用 FACS 分选细胞。可如下述根据可活化元件活化状态利用 BE(例如活化状态特异性抗体)来分选细胞和检测 BE。或者，上述非 BE 系统可用于本文所述任何系统中。

当在本发明的方法与组合物中利用荧光标记的组分时，应知道可采用不同类型的荧光监测系统，例如 FACS 系统来实施本发明。优选采用 FACS 系统或高通量筛选系统，例如 96 孔或更大的微滴定板。在荧光材料上进行试验的方法是本领域熟知的，描述于例如 Lakowicz, J. R., 《荧光光谱学原理》(Principles of Fluorescence Spectroscopy), 纽约: Plenum Press, (1983); Herman, B., “共振能量转移显微术”(Resonance energy transfer microscopy), 刊于: “培养活细胞的荧光显微术”(Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture), B 部分, 《细胞生物学方法》(Methods in Cell Biology), 第 30 卷, Taylor, D. L.和 Wang, Y.-L 编, San Diego: Academic, (1989), 第 219-243 页; Turro, N.J., 《现代分子光化学》(Modern Molecular Photochemistry), Menlo Park: Benjamin/Cummings Publishing Col, Inc., (1978), 第 296-361 页。

可利用荧光计检测样品的荧光。通常使具有第一波长激发光源的激发光通

过激发光学器件。激发光学器件使该激发光激发样品。样品中的荧光蛋白发生反应而发射波长不同于激发光波长的发射光。然后收集光学器件收集样品的发射光。该装置可包括温度控制器以维持样品于扫描的特定温度。根据一个实施方案，用多轴平移工作台移动容纳了多个样品的微滴定板中待接触(激发光)的不同孔。可通过合适编程的数字计算机来操控该多轴平移工作台、温度控制器、自动聚焦元件与图像和数据收集相关的电子器件。该计算机也能将试验期间收集的数据翻译为另一种格式来显示。通常可利用已知的机器人系统与组件。

在一优选的实施方案中，采用流式细胞术检测荧光。也可采用检测荧光的其它方法，例如量子斑点法(参见如 Goldman 等, *J. Am. Chem. Soc.*, (2002), 124: 6378-82; Pathak 等, *J. Am. Chem. Soc.*, (2001), 123: 4103-4; Remade 等, *Proc. Natl. Sci. USA*, (2000), 18: 553-8, 各篇文献专门纳入本文作为操控)以及共聚焦显微术。流式细胞术一般包括使单个细胞通过激光束路径。通过光电倍增管检测(激光)束的散射与和细胞结合或细胞中的荧光分子受激发而产生可读的输出值，例如大小、粒度或荧光强度。

本发明方法的检测、分拣或分离步骤可采用荧光激活细胞分选(FACS)技术，其中用 FACS 从细胞群中选择含有特定表面标记的细胞，或者该选择步骤可利用可回收的磁性反应颗粒来捕获靶细胞和/或除去背景。各种 FACS 系统是本领域已知的，可用于本发明的方法中(参见，例如 1999 年 4 月 16 日提交的 WO 99/54494; 2001 年 7 月 5 日提交的 U.S.S.N. 20010006787; 各篇文献专门纳入本文作为参考)。

在一优选的实施方案中，根据在存在或不存在增强(作用)时细胞的活化状况(阳性细胞)，利用 FACS 细胞分选仪(例如，FACSVantageTM 细胞分选仪，Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, Calif.)分选与收集细胞。

在一个实施方案中，首先使细胞与抗特异性可活化元件的特定同种型的荧光标记活化状态特异性 BE(例如抗体)接触。在这种实施方案中，使含有细胞的液滴通过细胞分选仪来检测各细胞上所结合 BE 的量。通过赋予含有阳性细胞的液滴电磁负荷(electromagnetic charge)，可将阳性细胞与其它细胞分开。然

后可将阳性选择的细胞收集于无菌收集容器中。这些细胞分选方法详述于，例如 FACS Vantage™ 培训手册，具体参考 3-11-3-28 与 10-1-10-17 章节，该文献全文纳入本文作为参考。

在另一实施方案中，可根据可活化元件某同种型的存在，采用细胞磁性分离法来分拣阳性细胞。在这种分离技术中，首先使待阳性选择的细胞与特异性结合元件(例如，能与可活化元件某同种型结合的抗体或试剂)接触。然后使细胞与偶联有能和该特异性元件结合的试剂的可回收颗粒(例如，磁性反应性颗粒)接触。然后(例如)采用磁场来物理分离该细胞-结合元件-颗粒复合物与非阳性或非标记细胞。当利用磁性反应性颗粒时，可利用磁场将阳性或标记的细胞保留在容器中，同时除去阴性细胞。这些与类似的分离方法描述于，例如全文纳入本文的 Baxter Immunotherapy Isolex 培训手册。

在一优选实施方案中，提供了测定单个细胞受体元件活化状态的方法。这些方法包括提供细胞群并通过 FACS 分选该细胞群。这些细胞优选根据至少两种可活化元件的活化状态分离。在一优选的实施方案中，可利用多种可活化元件活化状态抗体来同时测定多种元件的活化状态。

在一优选的实施方案中，根据至少两种元件的活化状态通过 FACS 分选细胞与联合测定其它 FACS 可读输出值，例如表面标记的存在、粒度和细胞大小，使一种细胞的多种元件活化状态与 FACS 检测的其它细胞性质相关联。

在一优选的实施方案中，根据元件群集进行细胞分选。在一实施方案中，可利用双联体鉴别器(doublet discriminator)鉴定元件群集。

双联体鉴别器如此命名是因其首先用于鉴别 G0 或 G1 期的双联体细胞与 G2 或 M 期的单个细胞。本领域熟知，在预测细胞分裂时，处于细胞周期 G0 和 G1 期的细胞具有一条互补 DNA，而处于 G2 和 M 期的细胞具有两条互补 DNA。因此，只检测细胞内 DNA 含量的 FACS 仪器不能鉴别 G0 或 G1 期的双联体细胞(两个细胞各含有一条互补 DNA)与 G2 或 M 期细胞(一个细胞含有两条互补 DNA)。然而，因为如下所述双联体鉴别器也能检测细胞大小，双联体可与 G2 或 M 期的单细胞区别，因为虽然(它们的) DNA 含量相同但具有两倍的大小。

本文所用的双联体鉴别器的功能在于比较两种 FACS 可读输出值。此两种 FACS 可读输出值的第一种是荧光强度。FACS 仪器通常利用激光激发荧光染料并利用光电倍增管检测这些荧光染料所发射的光子。然后将所发射的光子转化为电压读数,称为电压脉冲分布。检测到的荧光强度可以是电压脉冲分布的最大强度或积分电压脉冲分布(而不是只取最大值)以得到更精确的数值。双联体鉴别所需的第二 FACS 可读输出值是信号脉冲幅度。信号脉冲幅度是细胞通过激光束所用时间的检测值,通常称为“飞行时间”(TOF)。因为 TOF 与通过激光的细胞大小成比例。细胞越大,通过(激光)束所需的时间越多,细胞越小所需时间越少,TOF 也与细胞的表面积成比例。

因为信号脉冲幅度与表面积成比例,双联体鉴别器可有效地检测元件群集。使荧光强度按细胞表面积标准化后,将群集检测为与非簇集状态的强度相比,每单位表面积强度的增加值。然后将此标准化的荧光强度对时间作图以表示某事件(例如给予生物活性药物后)簇集的增加或降低。利用双联体鉴别器检测群集的一个例子见以下实施例 1。

应该知道本发明也能对信号转导中元件的群集事件进行排序。具体地说,本发明使得技术人员能根据一种细胞中多种元件的群集与活化水平的相关性构建元件群集和活化层次。可通过单个时间点某细胞或细胞群的活化状态与对照的比较,或通过比较多个时间点的细胞来观察其余(细胞)产生的亚群来实现排序。

本发明提供测定细胞群中各细胞亚组存在的有价值方法。宜评估同源细胞群中的信号转导途径以确保细胞之间信号转导中的差异不会定量或定性地遮蔽信号转导事件及其中的变化。因为最终的同源系统是一种细胞,本发明允许单独评估细胞从而能以显著方式鉴定真实差异。

因此,本发明提供区分较大细胞群内某些细胞亚组的方法。如本文所概述,与该细胞群中其它亚组相比,这些细胞亚组经常显示改变的生物学特征(例如,活化状态、对增强作用的应答改变)。例如,如本文所概述的,本发明方法可鉴定诸如原代细胞群(如外周血单核细胞)中与其它亚组相比,显示应答改变(例如,耐药性或对药物的敏感性)的细胞亚组。此外,此类评估可区分不同的活

化状态，对增强作用应答的改变、细胞谱系、细胞分化状态等。

应该知道这些方法可鉴定人工和刺激条件下，复杂细胞群(如外周血单核细胞或原初和记忆淋巴细胞)中的不同信号转导级联反应。

其它技术

本领域技术人员应知道除 FACS 分析以外，本发明方法和组合物可用于各种试验形式。例如，本发明方法可使用类似于 DNA 芯片的芯片。可按预定形状的阵列将核酸点样于芯片的阵列仪(arrayer)和方法是已知的。此外，蛋白质芯片与合成方法是已知的。这些方法和材料适合于预定形状的阵列将活化状态 BE 固定于芯片。在一优选的实施方案中，这种芯片包含多种元件活化状态 BE，可用于测定存在于细胞表面的元件的活化状态。

在另一实施方案中，芯片包含多种“第二组 BE”，在此情况中一般是未标记的 BE。使这种芯片与样品(优选细胞提取物)接触，包含元件活化状态特异性 BE 的第二多种 BE 用于夹心试验来同时测定样品中多种活化元件的存在。优选分别独特标记多种活化状态特异性 BE 以有助于检测。

在另一实施方案中，可采用共聚焦显微术来检测各细胞的活化状况。共聚焦显微术依赖于连续收集经空间过滤的各样品点发出的光，然后经电子处理得到该样品的放大图像。共聚焦显微术所包括的信号处理还能检测一种细胞内标记的结合元件，因此在此实施方案中，可用一种或多种结合元件标记细胞。在优选的实施方案中，和共聚焦显微术联用的结合元件是与荧光标记物偶联的抗体，然而也能使用其它结合元件，例如其它蛋白质或核酸。

在其它实施方案中，本发明方法和组合物可与“胞内 Western 试验”联用。在这种试验中，首先用标准组织培养技术在标准组织培养瓶中培养细胞。一旦生长至汇合，除去生长培养基，洗涤细胞用胰蛋白酶处理。然后计数细胞，将足以转移合适细胞数目的(培养液)体积以等份(加)入微孔板(例如，NuncTM96 MicrowellTM板)。将培养基换为不含血清的培养基后，使各孔在完全培养基中生长至最佳汇合。此时，不处理对照，但用生物活性药物，例如 EGF 培育实验孔(细胞)。用生物活性药物培育后，固定细胞，用针对所研究的活化元件的

标记抗体染色。一旦细胞被标记,用摄像机,例如 Odyssey 摄像机 (LiCor, Lincoln Nebraska),采用全文纳入本文的 Odyssey 操作手册 v1.2.所述技术扫描各板。可如下所述分析扫描多孔板所得的数据并测定活化状况。

可使用的生物活性候选物类型

在一优选的实施方案中,本发明提供能调节元件活性的生物候选药物的筛选方法。例如,可筛选药物与药物候选物来评估药物/候选物对活化状况分布的作用,或产生所需活化状况。这些方法包括使细胞与候选生物活性药物接触,采用本文概述的技术(包括 FACS)测定所述细胞中的元件活化。

在一优选的实施方案中,该方法包括使多种细胞与多种候选生物活性药物接触,根据至少一种元件的活化通过 FACS 分选细胞。

本文的“候选的生物活性药物”、“候选药物”、“候选调节剂”、“候选调节药物”或“外源性化合物”或其语法等价词表示任何分子,例如蛋白质、小有机分子、碳水化合物(包括多糖)、多核苷酸、脂质等。候选生物活性药物的定义中特别包括药物。一般可利用不同药物浓度平行检测多个试验混合物以获得对各种浓度的不同反应。通常将这些浓度中的一个,即 0 浓度或在检测水平以下用作阴性对照。此外,可利用阳性对照。

候选药物包括许多化学类型。在一优选的实施方案中,候选药物是小分子。在另一优选的实施方案中,候选药物是有机分子,特别是小有机分子,所述分子含有能与蛋白质(发生)结构性相互作用所需的官能团,特别是氢键,一般包含至少一个氨基、羰基、羟基或羧基,优选至少两个功能性化学基团。候选药物常包含环状碳或杂环结构和/或用一个或多个化学官能团取代的芳香族或聚芳香族结构。

本领域技术人员知道候选药物可得自各种来源,包括合成或天然化合物库。本领域技术人员应知道本发明提供了一种筛选任何候选调节剂库,包括各种已知的组合化学型库的快速和简单方法。

在一优选的实施方案中,与上述结合元件相关的候选药物是合成化合物。本方法的优点之一是无需在试验前特征鉴定候选药物。采用本发明的方法,可

筛选任何候选药物能否调节(例如, 提高或降低)可活化元件的活性。此外, 如本领域已知的, 采用分裂合成反应(split synthesis reaction)所用的编码标签基本上可鉴定所测试的化学成分。

或者, 优选的实施方案利用已有的或易于制备的细菌、真菌、植物和动物提取物形式的天然化合物库作为候选药物。

此外, 通过常规化学、物理和生物化学方法不难修饰天然或合成制备的文库与化合物。可直接或随机化学修饰(包括酶修饰)已知的药理学制剂来产生结构类似物。

在一优选的实施方案中, 候选药物包括蛋白质、核酸与化学分子(moiety)。

在一优选的实施方案中, 候选药物是以上定义的蛋白质。在一优选的实施方案中, 候选药物是天然产生的蛋白质或天然产生蛋白质的片段。因此, 如下文更详细描述的那样, 可测试含有蛋白质的细胞提取物或蛋白性质细胞提取物的随机或定向消化产物。可以此方式制备原核与真核蛋白质文库来筛选任何数目的候选药物。此实施方案中, 特别优选细菌、真菌、病毒和哺乳动物蛋白质库, 更优选后者, 特别优选人蛋白质。

在一优选的实施方案中, 候选药物是约 2-约 50 个氨基酸的肽, 优选约 5-约 30 个氨基酸, 特别优选约 8-约 20 个。这些肽可以是上述天然蛋白质的消化产物、随机肽或“偏好的”随机肽。本文中“随机化”或其语法等价词表示各种核酸与肽分别基本上由随机核苷酸与氨基酸构成。由于这些随机肽(或下述的核酸)一般是化学合成的, 它们可在任何位置掺入任何核苷酸或氨基酸。设计的合成方法能产生随机化的蛋白质或核酸, 从而在其序列长度上形成所有或大多数可能的组合, 进而形成随机化的候选生物活性蛋白药物库。

所述库应提供足够多的结构多样性随机化药物群, 而实现概率上多样性范围广泛进而能与特定可活化蛋白质相互作用的药物群。因此, 相互作用药物文库必须足够大从而使得至少其成员之一具有的结构能与某可活化蛋白质或包括该可活化蛋白质的信号转导途径的其它特定组分相互作用。虽然难于估计相互作用(药物)文库所需的绝对大小, 但自然界提供的免疫应答暗示是: 10^7 - 10^8 种多样性不同抗体能提供具有足够亲和力与某生物面临的大多数潜在抗原相

相互作用的至少一种组合。已公布的体外选择技术也显示 10^7 - 10^8 的文库大小足够发现对某靶标有亲和力的结构。长 7-20 个氨基酸的肽的所有组合的文库(例如本文概述的)可能编码 20^7 (10^9)- 20^{20} (种结构)。因此, 利用具有 10^7 - 10^8 种不同分子的文库, 本方法能(获得)7 个氨基酸的理论上完全相互作用(药物)文库的“工作”亚组, 与 20^{20} 文库形状的亚组。因此, 在一优选的实施方案中, 所述方法可同时分析至少 10^6 、优选至少 10^7 、更优选至少 10^8 、最优选至少 10^9 种不同序列。优选的方法应尽可能使文库的体积和多样性最大。

在一实施方案中, 所述文库是完全随机化的, 任何位置没有序列优先或恒定不变的。在一优选的实施方案中, 此文库是偏好的。即, 序列中的一些位置保持恒定, 或者从有限数目的可能性中选择。例如, 在一优选的实施方案中, 核苷酸或氨基酸残基在例如疏水性氨基酸、亲水性氨基酸残基、空间偏好(小或大)的残基的某确定类型内随机选择, 从而产生用于交联的半胱氨酸、用于 SH-3 结构域的脯氨酸、用作磷酸化位点的丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸或组氨酸等, 或随机化为嘌呤等。

在一优选的实施方案中, 偏向于能与已知各类分子相互作用的肽或核酸。例如, 当候选药物是肽时, 已知许多胞内信号转导是通过与其它多肽相互作用(通过小肽结构域)的多肽短区域进行。例如, 先前已证明 HIV-1 被膜胞质结构域的一个短区域能阻断细胞钙调蛋白的作用。显示与黄蜂肥大细胞脱粒肽毒素同源的 Fas 胞质结构域中的一些区域可能限于具有诱导死亡的凋亡功能或 G 蛋白诱导功能的短肽区域。爪蟾抗菌肽(一种源自爪蟾的天然肽)具有强效抗肿瘤和抗微生物活性。蛋白质激酶 C 同工酶(β PKC)的短肽片段显示能阻断刺激后爪蟾卵母细胞中 β PKC 的核易位。并且, 短的 SH-3 靶肽已用作与 SH-3 蛋白质特异性结合的假底物。这当然是目前已有的具有生物学活性短肽的例子, 因为此领域的参考文献很多。因此, 小肽对胞内信号转导级联反应具有活性潜能是优先的。此外, 许多分子的激动剂和拮抗剂也可用作候选调节剂的偏好随机化的基础。

因此, 许多分子或蛋白质结构域适合用作产生偏好随机化候选调节剂的起点。已知许多能赋予常规功能、结构或亲和力的小分子结构域。此外, 如本领域

域所知道的那样，弱氨基酸同源性的区域可具有强的结构同源性。已知许多这样的分子、结构域和/或相应的共有序列，包括但不限于：SH-2 结构域、SH-3 结构域、普列克底物蛋白、死亡域、蛋白质切割/识别位点、酶抑制剂、酶底物和 Traf。

在一优选的实施方案中，所述候选调节剂是多肽。在另一优选实施方案中，该多肽是至少含 4-20 个氨基酸的环状肽。在另一优选实施方案中，该多肽也是可催化灭活的多肽。可催化灭活的多肽的例子包括但不限于：可催化灭活的可活化蛋白质和，更具体地说可催化灭活的激酶(例如，PI3K)或胱冬酶。在另一方面，所述候选调节剂是可活化蛋白质的肽片段，所述肽片段包含的氨基酸序列是该可活化蛋白质的全长氨基酸序列的子序列。

在一优选的实施方案中，候选药物是以上有关结合元件所述的核酸。

在一优选的实施方案中，候选药物是以上有关结合元件所述的有机分子。

本领域人员应知道能一次筛选多种类型的候选药物，例如通过在本发明方法中组合候选药物。因此，所用的候选药物文库可只包含一种类型的药物(即，肽)或多种类型药物(肽和有机药物)。

通用筛选方法

在测定活化状况的通用方案中，首先将细胞悬浮在小体积培养液中。然后将细胞等份加入多孔板或其它合适的基板，在存在或不存在生物活性药物时培育。在合适的温度持续培育合适的时间后，按本领域所熟知方法终止培育并固定细胞。

一旦固定，沉淀细胞并悬浮在甲醇中进行渗透处理，虽然其它渗透处理方法也与本发明相容。此时可保存细胞，或者可立即与标记的结合元件混合并分析。

“混合”表示在促进用已知方法或本发明方法检测活性的条件下(例如，促进抗体与相应抗原或可活化蛋白质某同种型结合，或促进可活化蛋白质的活化状态)在体外或体内混合细胞反应混合物的各种成分。

通过产生应答反应面板图开始分析。与多孔板的实验布局相似，应答反应

面板图大致为结(行)和状态(列)的两维阵列。结点对应于混合状况研究中的各蛋白质。也发现具有其它特征的其它应答反应面板图可用于本发明。应答反应面板图代表了多孔板上各样品的 FACS(或其它检测方法)输出。通常取[MFI 刺激的/MFI 未刺激的]的 \log_2 ，然而已知其它标准化方法可与本发明联用。就基础结而言，可用[MFI 基础/MFI 样品最低基础]的 \log_2 将检测值置于相同的比例。为鉴定活化状况，收集所有样品的结状态，研究样品的方差。当包括多个时间点时，各时间点的样品可视作单独的样品。活化状况通常包括方差大于正常细胞中所见到的那些结状态。

如上所述，本发明提供检测细胞中元件活化的方法与组合物。本文所用的术语“细胞”及其语法等价词表示任何细胞，优选任何原核或真核细胞。

合适的原核细胞包括但不限于：细菌，例如大肠杆菌(*E. coli*)、各种杆菌(*Bacillus*)，与嗜极端细菌，例如嗜热菌等。

合适的真核细胞包括但不限于：真菌，例如酵母菌和丝状真菌，包括曲霉属(*Aspergillus*)、木霉菌属(*Trichoderma*)和链孢霉菌(*Neurospora*)；植物细胞，包括玉米、高粱、烟草、油菜、大豆、棉花、番茄、马铃薯、苜蓿、向日葵等的细胞；动物细胞，包括鱼、鸟和哺乳动物细胞。合适的鱼细胞包括但不限于：鲑鱼、鳟鱼、tulapia、金枪鱼、鲤鱼、比目鱼、庸鲽、箭鱼、鳕鱼和蓑鲉的细胞。合适的鸟细胞包括但不限于：鸡、鸭、鹌鹑、野鸡和火鸡、与其它原鸡(jungle fowl)或准许捕猎的鸟的细胞。合适的哺乳动物细胞包括但不限于：马，母牛，水牛，鹿，绵羊，家兔，啮齿类，例如小鼠、大鼠仓鼠和豚鼠，山羊、猪，灵长类，海洋哺乳动物，包括海豚和鲸的细胞，以及细胞系，例如任何组织或干细胞类型的人细胞系，与干细胞，包括多能和非多能与非人合子细胞。

合适的细胞也包括参与各种疾病状况，甚至非疾病状态的那些细胞类型。因此，合适的真核细胞类型包括但不限于：所有类型的肿瘤细胞 (特别是黑色素瘤、髓细胞性白血病、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、肾癌、前列腺癌、胰腺癌与睾丸癌)，心肌细胞，树突细胞，内皮细胞，上皮细胞，淋巴细胞 (T 细胞和 B 细胞)，肥大细胞，嗜酸性粒细胞，血管内膜细胞(vascular

intimal cell), 巨噬细胞, 天然杀伤细胞, 红细胞, 肝细胞, 白细胞, 包括单核白细胞, 干细胞, 例如造血, 神经, 皮肤, 肺, 肾, 肝和肌细胞的干细胞 (用于筛选分化和去分化因子), 破骨细胞, 软骨细胞和其它结缔组织细胞, 角质形成细胞, 黑素细胞, 肝细胞, 肾细胞与脂肪细胞。特别优选原发疾病状态细胞, 例如原发性肿瘤细胞。合适的细胞也包括已知用于研究的细胞, 包括但不限于: Jurkat T 细胞、NIH3T3 细胞、CHO、COS 等。参见专门纳入本文作为参考的 ATCC 细胞系目录。

在一优选的实施方案中, 本发明所用的细胞取自患者。本文所用的“患者”指人和其它动物以及其它生物, 例如实验动物。因此。这些方法与组合物适用于人和兽医学领域。在一优选的实施方案中, 患者是哺乳动物, 在一更优选的实施方案中, 患者是人。

在增强模型中筛选药物

在研究增强作用的通用方案中, 首先将细胞(例如, 包括但不限于以上有关通用筛选方法所述的任何细胞类型)悬浮于小体积培养液中并计数。样品中应存在合适数量的存活细胞(为 4 种核心染色), 加上合适量的各保存样品。然后将细胞稀释至合适浓度, 将等份的合适体积加入多孔板或其它合适的基板, 如下所示(参见实施例 3)。然后将合适浓度与体积的增强剂加入各列细胞中。在合适温度下使增强作用持续适当时间。洗涤细胞除去增强剂以终止增强作用。然后用生物活性药物经培育增强的细胞以筛选该药物的作用。如本领域已知的那样, 在不同时间点固定细胞终止与该药物的接触。

增强后, 沉淀细胞, 重悬于甲醇进行渗透处理, 虽然如上所述其它渗透处理方法也与本发明相容。此时可保存细胞, 或者可立即与标记的结合元件培育并分析。

如上所述进行分析, 包括产生应答反应面板图、使各结标准化、计算方差。

一旦各结得以标准化并测定了方差, 采用生物特征结状态的无监督归类 (unsupervised clustering) 给样品分组。采用统计学显著性检验(例如, 对以前定义的假设进行卡方检验和斯氏 t 检验)测定得到的各组临床参数的分布。然后

给予具有相似增强作用的各组样品名称,根据观察到的所有可能路径的相互作用,根据各组的观察情况使路径图加亮与变暗。总之,如果组中一半以上样品显示增强作用超过所有样品的中值,则使该路径加亮。否则使该路径变暗。

可根据各样品观察到的情况为它们构建路径图,根据这些图,可将某样品表型分类为属于某组(预计具有与该组相似的特征)。一旦制成了某组的预测面板图(predictive panel),可在类似于原始(样品)的另一组样品上验证。利用额外的数据可最大限度减小并优化该图,从而使之尽可能精确并具有尽可能少的某给定样品的结状态测量值。

分析

流式细胞术的进展能同时计数单个细胞的多达 13 种参数(De Rosa 等, 2001), 并正向基因组和蛋白质组数据亚组的研究发展 (Krutzik 和 Nolan, 2003; Perez 和 Nolan, 2002)。随着参数、表位和样品的数目增加,流式细胞术实验的复杂性和数据分析问题急速增长。开发能在设置的实验条件日益增多的情况下研究信号转导结的刺激面板图(stimulation panel)增加了另一层次的数据复杂性。为解决所产生的实验和信息学问题,本发明提供的利用(产)热图排列流式细胞术实验的倍数改变结果技术从而有助于评估。

可用许多方法展示流式细胞术实验,例如阵列。总而言之,阵列流式细胞术实验根据实验设计与在流式细胞术样品之间观察到的差异简化了多维流式细胞术数据。比较一组流式细胞术样品中改变的一种常规方法是使同一图上一个参数的直方图重叠。阵列流式细胞术实验宜包含与实验样品作比较的未染色、对照染色或未刺激细胞的对照群。将此对照置于阵列的第一位置,随后实验样品顺次置于对照之后。然而,不宜使用大量直方图或多组 2D 流式细胞术图。

相对于各样品的中值荧光指数(MFI)的改变,可对各峰着色以突出实验样品之间的差异。如下计算相对于基础状态的改变:

$$x' = \log_2 (x_{\text{实验}}/x_{\text{基础}}) \text{ [方程 1-1, 结状态相对于基础状态的改变]}$$

在方程 1-1 中,参数(例如,蛋白质磷酸化、蛋白质表达水平)的倍数改变

表示为相同细胞的实验 MFI、刺激(例如, 增强的)MFI 与对照 MFI(例如, 未受刺激的)之间的改变。由于取改变的 \log_2 , 增加是正值, 降低是负值, 小改变接近 0。为明确表达实验的结果, 可根据实验设计排列相同颜色值。在此容量较小的实验中, 排列方法的优点不明显, 将此技术扩展到大量靶标、样品、时间点和细胞亚组推动了阵列流式细胞术发展。

可利用具体例子描述本发明的这些方面。此例中的靶磷酸-蛋白质-Stat1 称为信号转导结, 所研究的刺激条件称为结状态。由于此通用语言描述了多种细胞信号转导机理, 它可用于阵列流式细胞术实验。因此, 胞内信号转导机理可全面显示细胞状态, 包括磷酸化、蛋白酶解切割、泛素化(ubiquitylation)、乙酰化、表达水平和其它翻译后的蛋白质状态。说明流式细胞术试验可监测各种这些事件, 因此可同时绘制一种细胞中许多蛋白质组事件的图。

在能得到应答反应图的一组常规条件下排列几个信号转导结, 提供了靶细胞群的两维分布状况。在此具体例子中比较了 U937 细胞系中的 6 种磷酸-蛋白质的信号转导。可同时检测各细胞中这些磷酸-蛋白质或者可依次检测重复的多份样品。以此方式可同时比较每条通道的多个参数数据, 可联合比较平行分析的样品。当从良好开发的系列试验发展为统一测定各样品状况(例如, 患者样品)的模型时, 此技术特别有用。通过在一幅反应图中扣除另一样品或通用对照物的应答反应, 研究人员可快速鉴定该两个样品间不同的其余信号转导机理。

也可采用阵列流式细胞术来筛选某固定组的信号转导结的单一或组合刺激。在板阵列流式细胞术实验中, 行与列代表对某应答反应所检测的刺激条件的栅格。板中每孔可含有相同的细胞, 这些细胞作为群体用作信号转导检验试管。在 x、y 坐标处给予刺激, 刺激设定时间后, 固定细胞, 各组细胞同时进行同一组多靶标染色。96-孔板阵列流式细胞试验的天然形式具有几种优势。能多通道加入试剂的设备降低了实验误差、提高了一致性、能在短时间范围内先后开始与终止大量生物化学实验。

在阵列流式细胞术的另一例子中, 比较了用佛波醇 12-豆蔻酰 13-乙酸酯(PMA)/离子霉素增强后四分钟时间点的外周血白细胞(PBL)中的信号转导机

理。细胞用髓系细胞(CD33)与磷酸化的 4 种信号转导蛋白(p38、Stat1 和 p53)表面标记染色。以反向时程顺序启动信号转导,固定所有样品,一致染色。此实验中特别惊人的是一些磷酸-蛋白质只在从静态无应答反应者的背景分别分析细胞亚组时才显示应答。采用经典的单参数技术(例如, Western 印迹)分析磷酸蛋白质极难获得此结果,可能涉及髓细胞与总 PBL 的物理分离,此过程可能扰乱胞内信号转导。

为阐明实验样品与对照之间的差异, MFI 改变近似为 \log_2 倍数改变。以此方式列举信号转导事件使流式细胞术数据可应用于统计学方法与归类算法。应注意此处采用术语“归类”不同于受体群集;指以任何方式将数据点聚集到一起的算法。此外,当将多种参数置于相似的倍数诱导比例上时(例如,蛋白质表达、RNA 含量、DNA 含量和细胞周期、多种条件下的蛋白质磷酸化、重复遗传元件的长度、患者存活时间、离体刺激后细胞死亡),可进行样品的交叉平台比较(cross-platform comparison)。

一旦鉴定了一组关键的参数,具有相似分布状况的样品的无监督归类提供了鉴定样品群内各组关系的强有力方法。类似于实验和基因,根据 DNA 微阵列生物学家提出的惯例,流式细胞术的(样品)群排列为:将感兴趣的各细胞或样品置于行中,将感兴趣的各参数置于列中。一旦合适的(样品)群与参数放入后,可进行许多归类技术。成功地应用无监督归类一般取决于聪明地选择或采用方差作图算法选择(参见下文)的感兴趣参数,因而归类的大多数或所有因素对被归类的样品组重要。这是因为无监督归类各组样品只根据各信号转导状态报导值的相似性。此技术的风险是以此方式鉴定的各组可能在临床上不相关,但提供了强大的激励作用,因为避免了可能的人为、组织前组(pre-organized group)。如下文所概述的,此方法用于鉴定极性髓细胞性白血病的信号转导病理机理。采用此方法也易于鉴定对某确定系统具有特定活性的化合物。

测定感兴趣细胞群与特征鉴定这些群,然后归类流式细胞术的数据。阵列流式细胞术中至少有两种通用方法来鉴定细胞群进行归类:

1. 各样品或亚组(例如,临床试验中的患者)参数组的“外向内(outside-in)”比较。在此更普通的情况中,细胞群是同源的或者是产生的与感兴趣靶标同源

的不同组细胞谱系。样品-水平比较的例子是鉴定患者肿瘤细胞中信号转导状况与这些状况和临床反应的非随机分布的相关性。这可认为是一种外向内方法，因为感兴趣的细胞群是在作图和将其分布状况与其它细胞群比较之前预先确定的。

2. 异质细胞群中各细胞水平的参数“内向外(inside-out)”比较。此比较的一个例子是在确定条件下混合造血细胞的信号转导状态作图与随后用计算机鉴定的细胞簇与谱系特异性标记的比较。这可认为是一种单细胞研究的内向外方法，因为它在分类前不假定存在特定的细胞群。此方法的主要缺陷在于：它产生的细胞群(至少在一开始)需要用多种瞬时标记来计数并且可能(这些标记)不能接近一种细胞表面表位。结果，可能难以测定这类细胞群的生物学意义。此非常规方法的主要优点是无偏好地追踪细胞群而不会导致谱系或细胞类型之间可能的随意差别。

各项技术致力于(提高)流式细胞术在单个细胞水平上递送大量多参数数据的能力。就癌症而言，存在第三“中间(meta)-水平”肿瘤数据，因为肿瘤一般视作单一实体，根据过去的技术(historical technique)分类。这些技术包括了器官或组织来源、分化程度、增殖指数、转移扩散与患者有关的遗传或代谢数据。

此外，本发明提供方差作图技术对肿瘤信号转导空间作图。这些方法代表了肿瘤生物学研究中的显著进步，因为不依赖于假定的正常对照物比较肿瘤。传统的分化状态分析方法(例如，DNA 微阵列，扣除 Northern 印迹)一般依赖于各患者的肿瘤样品与正常对照物(一般是毗邻的与理论上未转化的组织)作比较。或者，它们依赖于组别的多次归类与再归类，然后根据表型对患者样品进一步分层次。相反，肿瘤状态的方差作图先将肿瘤样品与其自身比较，再与亲代肿瘤细胞群比较。结果，含有肿瘤中最大多样性的结状态提供了差别状态分析的核心参数。与肿瘤和提出的正常对照物之间的差异相反，对于给定的多样性肿瘤库，此项技术使得研究人员能鉴定作为肿瘤病理差别基础的分子事件(例如，肿瘤对化疗的反应)。

方差(σ^2)是代表一组肿瘤样品中观察到的结状态多样性的一种方式。就阵

列流式细胞术实验而言，结状态的方差是从该样品组的平均值计算为各样品测量值的均方差：

$$\sigma^2 = \frac{\sum(x - \bar{x})^2}{N} \quad \text{[方程 1-2, 结状态的方差]}$$

在方程 1-2 中， x 是各样品的 \log_2 倍数结状态测量值， \bar{x} 是所有样品的 x 的平均值， N 是样品数目。结状态测量值变化频繁且数量巨大的参数具有最高的方差。出于技术原因，采用此技术要改良之处是比较不同参数不能总报导 MFI 的相似差别。由于 BE 的荧光团标记不佳或 BE 染色背景高可能降低结状态的 MFI 漂移。这些问题通常会降低结状态的方差从而导致可能有的明显信息被忽略。进行结状态的临床状况测定重要的是利用特征熟知的试剂进行工作，和比较相似比例的各结与它们的状态。

当采用方差作图来测定患者样品的信号转导空间分布状况时，将信号转导被相似方式干扰的肿瘤分为一组，而不论组织或细胞类型的来源(参见 AML 的分布状况测定)。类似地，根据谱系标记或组织来源认为较为相似的两种肿瘤解释(interpret)环境刺激的能力可能极为不同，测定不同两组中的分布状况。采用此项技术我们发现急性髓细胞性白血病肿瘤样品的增强信号转导可预示患者对细胞毒化疗的反应(参见 AML 的分布状况测定)。当采用同一技术测定分布状况时，正常组织组通常显示低方差($\sigma^2 < 0.1$)。正常组织中检测到的一些方差反映了亚临床病理学变化，因为估计该技术可检测免疫应答与感染(所致)的单个细胞信号转导的扰乱。这些观察结果提示阵列流式细胞术实验中信息结状态的工作方差(working variance)阈值($\sigma^2 = 0.1$)。此方差阈值表明阵列流式细胞术极其灵敏，精确度的进步将进一步降低背景噪声，降低此阈值。在肿瘤中，许多结状态的方差远高于该阈值(AML 分布状况测定中有意义的结的中值 σ^2 是 0.34)。这些结果显示肿瘤信号转导的方差图检测到肿瘤信号转导网络演化中的显著差异。

当鉴定到信号转导状况群集时，经常可用它测定其它因素，例如临床反应、存在基因突变与蛋白质表达水平在这些组中是否非随机分布。如果实验或参考文献显示阵列流式细胞术实验中有这样的假设，可采用简单的统计学检验，例

如斯氏 t 检验和 χ^2 检验加以判断。类似地，如果认为实验中的两种可变因素是相关的，可用线性回归的 γ^2 相关系数来表示其相关性程度。如下文所概述的，可采用各种这些检验来评估阵列流式细胞术的数据，本文介绍了它们在分析肿瘤患者样品库中的合适应用。

在阵列流式细胞术实验中检验的许多假设要询问两组之间流式细胞术结状态的数值是否显著不同。为询问两细胞群的平均值是否显著不同，斯氏 t 检验是获得 p 值的合适方法。例如，如以下实施例所示，我们检验了 Flt3 基因中有突变的患者样品发现 Stat3 对 G-CSF 的反应增强的假设。在这种阵列流式细胞术数据与其它参数的交叉平台比较中最常用斯氏 t 检验。这种检验的 t 值计算为：

$$t \text{ 值} = \frac{\bar{x}_A - \bar{x}_B}{\sqrt{\left(\frac{s_A}{N_A}\right) + \left(\frac{s_B}{N_B}\right)}} \quad \text{[方程 1-3, 两种平均值的 t 值]}$$

在方程 1-3 中， \bar{x}_A 是组 A 结状态的平均值， s_A 是组 A 结状态的标准偏差。 N_A 是组 A 中样品的数目。方程 1-2 的分母也称为标准误差。自由度(df)在此例中是 $N - 2$ ，利用该 t 值在统计学表中查询该假设的 p 值。就比較的两种参数而言，在将样品组织为不连续的各组(例如，“突变阳性”和“突变阴性”)时，可适当利用 χ^2 检验来测定 p 值。当比较源自群集组的信号转导状况内的各因素时(例如具有特定信号转导状况的样品内是否存在基因突变)，最常用此检验。利用 χ^2 检验计算的 p 值表示了某参数在各组中非随机分布的程度。通过比较观察到的分布(情况)与预计的分布(情况)计算两组(A 和 B)的一组参数(p1、p2、p3、...)的 χ^2 值。组 A 中参数 p1 预计的分布(E_A^{p1})计算为：

$$E_A^{p1} = \left(\frac{O_A^{p1} + O_B^{p1}}{N}\right) \sum O_A \quad \text{[方程 1-4, A 组中 p1 的预计分布]}$$

在方程 1-4 中， O_A^{p1} 是组 A 中观察到的 p1 样品数目，N 是所比较样品的总数， $\sum O_A$ 是组 A 中观察到的样品总数。联用方程 1-2 计算的预期值与观察值来计算 χ^2 值：

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E} \quad \text{[方程 1-5, 观察到的分布的 } \chi^2 \text{ 检验]}$$

利用方程 1-5 计算各参数和各组所有可能组合的总和。然后利用得到的 χ^2 值与自由度(在此简单情况中是参数的数目)在统计学表中查询 p 值。

当 p 值小于 $\alpha=0.05$ 的阈值时(表明观察到的作用随机发生的机会小于二十分之一),一般认为是显著的。通常认为 p 值等于或小于 0.001 表明观察(结果)极其显著。然而,在一些检验中必须校正阈值。当进行多次 t 检验而没有首先指定一种假设时, t 检验可能的风险随之产生。例如,有时研究人员将肿瘤患者组分成各组(例如,“肿瘤”与“正常”或“肿瘤 A”与“肿瘤 B”),然后检验各组许多参数(例如,5,000 种基因的表达)的显著性。在此情况中,任何一种基因的平均值偶然显示不同的概率随要检验的每种基因而增加, α -值应随之成比例改变。如果 α 值不成比例改变,则可观察到在具有较高 p 值的实际结果(actual hit)中存在假阳性。

成比例改变 α -值的一种直接方式是将其除以所检验的参数或假设的数目。因此,如果同时检验两组中 5,000 种因素,显著性阈值应设置在更加严格的值 $\alpha=0.00001$ 。此问题的其它解决方法利用多组基因作为假设单位,减少检验数目和检测预先存在的假设数目。我们采用方差作图与无监督归类来修改我们的分布状况测定方法以避免多次 t 检验的危险(参见 AML 分布状况测定)。一旦以此方式鉴定了各组,可采用 χ^2 检验来测定各组中各参数(例如,化疗反应)是否非随机分布。此外,采用方差作图鉴定信号转导分布状况后,可适当地采用 t 检验来测定各假设的显著性,例如 Flt3 野生型和突变型患者样品中 Stat5 的基础和增强活性(参见 AML 分布状况测定)。

许多阵列流式细胞术实验的理想结果是确定信号转导分子网络如何一起起作用调节诸如凋亡和增殖等细胞过程。目测多维信息的强有力技术利用自身组织图(SOM)为研究人员勾画本发明参数、信号转导结状态之间的关系。对参数间相关性空间作图的基础算法始于测定所分析参数之间 Pearson 积动量相关系数(γ)的平方:

$$r = \frac{N \sum (XY - (\sum X)(\sum Y))}{\sqrt{([N \sum X^2 - (\sum X)^2][N \sum Y^2 - (\sum Y)^2])}} \quad \text{[方程 1-6, Pearson 系数]}$$

在将方程 1-5 应用于阵列流式细胞术的过程中, X 和 Y 是计算相关性的两

种结状态的倍数 MFI 值, N 是样品数目, 总和是该组样品中所有值的总和。然后将超过显著性阈值($\gamma^2 > 0.5$)的那些相关性用作信号转导结之间相关性距离的量度。将各相关的结置于距离与其相关的结 $1-\gamma^2$ 处(可有一定弹性)。采用此项技术对一组白血病结之间的相关性作图: Bcl-2 表达、p53 累积与五种 p53 磷酸化 (Jonathan Irish 的未发表的工作)。此项技术提供信号转导的直观图作为相关的结或结状态的网络。SOM 是产生假设与目测数据的强有力工具, 但不能用于表明因果联系。阵列流式细胞术 SOM 的持续目标是在不同分析水平清楚地表示结和结状态, 而仍能保留状态之间的相关性。

白血病患者样品的阵列流式细胞术分析表明原代组织样品与适应于培养的细胞极为不同。在信号转导的基础细胞试验中, 我们惊奇地发现原发性肿瘤细胞不一定有组成型异常调节, 而这是多年来有关该问题的参考文献所暗示的 (Benekli 等, 2002; Gouilleux-Gruart 等, 1997; Spiekermann 等, 2002)。相反, 我们现在知道肿瘤细胞产生了反映增殖增加、凋亡抑制与其它肿瘤逃避机理的信号转导反应。认为环境信号揭示这些途径是“增强的”。评估信号转导结的基础和增强状态是阐明肿瘤信号转导病理学的优选方法(参见 AML 分布测定)。

随着应答反应面板图与信号转导增强模型的开发, 我们发现可用其开发新的语言来描述细胞信号转导的全景。此外, 可利用这种病理学信号转导表型对人类疾病进行分类、对患者风险分层次并最终使疾病疗法瞄准最有效的患者组。此增强信号转导的通用模型概括了核心推动力落后于产生肿瘤的选择性压力: (肿瘤细胞)获得增殖信号而不触发细胞死亡。在急性髓细胞性白血病中, 这种增殖信号采取 Stat5 对髓系细胞因子 G-CSF、GM-CSF 的反应增强和 IL-3 与 Flt3 效应物对 Flt3 配体的反应增强的形式(参见 AML 分布状况测定), 通过 Bcl-2 家族成员表达、Stat1 信号转导丧失、p38 MAPK 调节改变与 p53 活性抑制而丧失了凋亡作用(Jonathan Irish, 未公布的数据)。这些信号转导结对环境信号(例如, 增强信号)的反应在鉴定临床上有关的肿瘤状况中非常有用。因此, 本发明显示耐受化疗的肿瘤细胞含有可为环境信号所活化的潜在信号。因此, 了解调节异常的肿瘤信号转导机理包括评估癌基因与肿瘤抑制剂的表达水平

以及能否使信号转导分子活化。

从所述增强模型三类结状态可得出几种合理的结论。一组细胞或样品中某结状态的增强作用与实验规定的对照组(例如其中该结是不增强或不同增强的一组样品)有关。基础结状态的确定与实验条件有关,反映了可能存在未预料到的因素,影响了基础状态。换言之,此肿瘤细胞信号转导模型每份样品的分布状况中每个结都需要内部对照。因为实际结果要从增强信号转导的反应面板图状况中除去大部分样品间的变异性。此外,在肿瘤信号转导的增强模型中,一组实验样品不只能与假定的正常组比较,还要与显示不同信号转导表型的其它肿瘤比较。这对正常细胞群中罕见,不是得自患有该肿瘤的患者或在不清楚某具体肿瘤的正常前体细胞时尤其重要。如下所示(参见 AML 状况测定),此类型的增强信号转导模型能够只通过细胞信号转导中的差异来确定肿瘤分组。

根据增强模型可作出的另一推论是如果所有或几乎所有样品或细胞中的结状态与给定的环境信号以相同方式反应,则它未必增强,尽管可能(产生)反应。虽然违反直觉,但它是增强模型的重要组成部分。实际上,这表示要描述结状态为增强时,在测定分布状况的样品群时必须要有显著大小的对照群。虽然此群无需推理定义,但它在一定程度上必须显示对鉴定与该群相关的其它参数(例如,基因突变、肿瘤标记、临床反应)的实验具有显著性。

这种信息结和它们所占据状态的模型提供了灵活的术语来描述细胞蛋白质采用构象、翻译后修饰或定位而传递特定信号的过程。在本文中,用于测定疾病细胞状况的应答反应面板图可以相同方式用作程序设计人员鉴定不合格计算机程序中缺陷(bug)的一系列诊断命令。在两种情况中,输入值的选择应能使输出的信息最多并能显示指令在何处被错误解释。

通过鉴定肿瘤中被扰乱的信号转导结,可精确地诊断治疗反应与鉴定药理学干预的分子靶标。在许多情况中,肿瘤细胞的异常调节的信号转导可能是程序性细胞死亡的信号。这些增殖信号转导的负面结果通常由凋亡性肿瘤抑制途径执行,此途径在肿瘤中常已丧失或失活。在另一信号,例如抗凋亡分子(如, Bcl-2、Bcl-XL、Toso)的表达使凋亡途径失活的那些肿瘤中,可能靶向抗凋亡机理并重激活程序性细胞死亡。因此,一些癌基因的表达可作为同时发出促存

活和促死亡指令的增殖信号积累的模型。与这些癌基因协同作用的是使促死亡信号转导结局失效的其它突变。此模型与表明癌基因表达逆转可导致肿瘤细胞快速死亡的结果一致(Chin 等, 1999; Felsher, 2003)。

增强模型和阵列流式细胞术方法的固有特征是受刺激结状态以基础或静息状态作对照。当样品之一间的变异支配着分布状况(例如, 比较各样品与正常对照)时, 此固有的对照能实现用其它标准化技术所难以获得的清晰水平。这对患者样品尤其正确。注意到基础结状态中常存在的信息变异很重要; 基础状态在过去对肿瘤细胞信号转导重要, 以急性髓细胞性白血病为例, 样品的大多数基础状态变化广泛(Stat1 显著例外, 参见 AML 分布状况测定)。为包括某结的基础状态, 应将某基础值置于和应答反应相同的范围。这可通过比较肿瘤疾病样品中各基础状态与固定点, 例如观察到的最小或中值来实现:

$$x' = \log_2 \left(\frac{x}{x_{\text{最小}}} \right) \text{ [方程 1-7, 成比例改变的结状态]}$$

方程 1-7 以相当的 \log_2 范围提供了基础值范围, 但它不表明与正常状态相比发生改变的任何信息。

硬件/通用技术

该领域技术人员应知道本文提供的这些试验的步骤次序可变。然而, 也应知道尽管本文提供了各种选择(化合物、所选择的特性或各步骤的次序), 但这些选择也可各自单独提供, 可分别与本文提供的其它选择分开进行。此外, 本发明范围应包括本领域明显和且已知能提高试验灵敏度的步骤。例如, 可有额外的洗涤步骤、封闭步骤等。

在一优选的实施方案中, 将反应混合物或细胞加到 96 孔板或其它可购得的多孔板的孔中。在其它优选的实施方案中, 反应混合物或细胞加到 FACS 仪器中。本发明可用的其它多孔板包括但不限于: 384 孔板与 1536 孔板。本领域技术人员显然明白用于盛放反应混合物或细胞并且本发明可用的其它容器。

可在适合于检验活性的条件下将用于检测可活化蛋白质的活化状态或活性、或调节这种活化状态或活性的试验组分顺序或以预定顺序或分组加入。本

文描述了本领域已知这种条件。此外，下文提供了其它指南(参见，例如实施例)。

在一优选的实施方案中，本发明方法包括利用液体处理组件。液体处理系统可包括机器人系统，机器人系统包括任何数目的组件。此外，本文概述的任何或所有步骤可以自动化；因此，例如这些系统可以完全或部分自动化。

本领域技术人员应知道可利用各种组件，包括但不限于：一条或多条机器臂；用于放置微孔板的平板机械手；自动加盖或加帽机械手用于除去或替换无交叉污染平板上各孔的盖子；用一次性移液尖头分配样品的尖头组件(tip assembly)；用于样品分配的可洗涤尖头组件；96孔加样区(block)；冷却的试剂架；微滴定板移液管定位器(任选冷却的)；用于平板和尖头的堆放塔(stacking tower)；和计算机系统。

全部机器人或微流体系统包括自动化液体、颗粒、细胞和生物处理(包括高通量移液)装置进行筛选应用的所有步骤。包括液体、颗粒、细胞和生物操作，例如吸取、分散、混合、稀释、洗涤、精确的体积转移、回收、弃去移液尖头和一次样品吸取后多头递送相同体积进行反复移液。这些操作是无交叉污染的液体、颗粒、细胞和生物转移。此仪器可自动化重复执行微孔板样品到过滤器、膜和/或子平板的(转移)、高密度转移、全板连续稀释和高容量操作。

在一优选的实施方案中，利用对试验组分具有特异性的化学衍生的颗粒、平板、药盒、试管、磁性颗粒或其它固相基质。微孔板、试管或任何固相基质的结合表面包括非极性表面、高极性表面、促进共价结合的修饰葡聚糖包被表面、抗体包被表面、能结合融合蛋白或肽的亲和力介质表面、固定有蛋白质(例如重组蛋白 A 或 G)的表面、核苷酸树脂或包被表面，与本发明可利用的其它亲和基质。

在一优选的实施方案中，具有各种体积，用于多孔板、多试管、支架、药盒、小试管(minitube)、深孔板、微离心管、冷冻管、方孔板(square well plate)、过滤器、芯片、光纤、珠的平台，与其它固相基质或平台，推荐安装在含添加容量的可升级模块平台(upgradable modular platform)上。此模块平台包括速度可调的轨道摇床，用于样品来源、样品和试剂稀释的多定位工作台，试验板，

样品和试剂储槽，移液头与活动洗涤站。

在一优选的实施方案中，利用热循环仪和热调节系统来稳定热交换器(例如受控区或平台)的温度，将样品的培育温度精确控制在 0°C-100°C。

在一优选的实施方案中，装有一种或多种磁性探针、亲和力探针的可交换移液管头(单道或多道)，或移液管通过可机器人操作液体、颗粒、细胞和生物。多孔或多管磁性分离器或平台操作一种或多种样品形式的液体、颗粒、细胞和生物。

在一些实施方案中，仪器包括检测器，取决于标记物和试验可以采用各种不同的检测器。在一优选的实施方案中，可用的检测器包括具有多道荧光的显微镜；具有单波长和双波长端点与动力学性能、荧光共振能量转移(FRET)、发光、猝灭、双光子激发与强度再分布来提供荧光、紫外光和可见分光光度检测的平板读数计；捕获并将数据和图像转化为可定量形式的 CCD 照相机；与计算机工作站。

在一优选的实施方案中，所述检测通过 FACS 进行。在另一方面，所述检测通过高压液相层析(HPLC)，例如反相 HPLC 进行，在其它方面，所述检测通过质谱进行。

这些仪器适合放在用于多孔板或试管细胞培养和转化与危险操作的无菌层流或通风橱，或封闭的、自身有空调的系统中。活细胞试验时，可在温度、湿度与通气时间受控的生长条件下培养活细胞。细胞的自动转化仪与自动菌落检出器有助于快速筛选所需细胞。

可采用流式细胞术或毛细管电泳形式单独捕获磁性和其它珠、细胞和生物。

灵活的硬件和软件使得仪器适用于多种应用。软件程序模块可产生、修改与运行各方法。系统诊断模块可对仪器进行排列、正确连接和电动机操作。定制的工具、实验室器具与液体、颗粒、细胞和生物转移模式可执行不同应用。数据库可保存方法和参数。机器人与计算机接口可在仪器之间进行通信。

在一优选的实施方案中，机器人设备包括通过总线与存储装置和一组输入/输出装置(例如，键盘、鼠标、监视器、打印机等)进行通信的中央处理单元。

如下文所概述的，可在 CPU 中加入或安装本发明的倍增装置。中央处理单元、存储器、输入/输出装置与总线之间的联系是本领域熟知的。因此，取决于所进行的实验，CPU 存储(装置)中保存了各种不同程序。

这些机器人流体处理系统可利用许多不同试剂，包括缓冲剂、样品、洗涤剂、试验组分，例如标记探针等。

以下实施例用于完全描述上述发明的应用方式以及提供所考虑的实施例本发明各方面内容的最佳方式。应知道这些实施例决不是要限制本发明的真实范围，而是为说明性目的。本文引用的所有参考文献专门全文纳入作为参考，包括 2002 年 7 月提交的美国专利申请系列号 10/193,462，该专利要求美国专利系列号 60/304,434 和系列号 60/310,141 的提交日期的优先权。

实施例

实施例 1

在此实施例中，本发明人(在本文也称为“我们”)采用本发明的方法和组合物显示了白细胞功能抗原-1(LFA-1)是免疫细胞突触形成所必需的，及其在各种自身免疫疾病的病理生理学中的作用。在此实施例中，本发明人采用本发明的方法和组合物证实 ICAM-2 能通过微管和肌动蛋白细胞骨架诱导与受体群集和活化相连的 LFA-1 信号转导途径。单一细胞分析测定到 ICAM-2 显示 21.7 pM/细胞结合亲和力。ICAM-2/LFA-1 结合诱导 PKC 活化与肌动蛋白和微管细胞骨架再组建。经活化 LFA-1 的作用细胞毒 T 细胞效应物-靶细胞结合，这些事件导致 p44/42 MAPK 途径的 Syk 依赖性活化。ICAM-2 介导的人 CD56⁺CD8⁺穿孔素释放对白血病靶细胞产生细胞毒性。与其它 ICAM 相比，发现 ICAM-3 与 ICAM-2 的作用最相似，与 ICAM-1 不相似。在 IL-2 预先活化的人 PBMC 中，介导 CD56⁺CD8^{中等}细胞群穿孔素释放(的能力)是 ICAM-2 > ICAM-3 >> ICAM-1。所有 ICAM 均能导致 CD56⁺CD8^高(细胞)群的穿孔素与粒酶-A 丧失。这些结果确定 ICAM-2/LFA-1 在亚组特异性细胞毒性 T 细胞免疫力中具有特定的功能。

引言

白细胞功能抗原-1(LFA-1)是参与白细胞黏附的一种 α 、 β 异质二聚体整联蛋白(van Kooyk, Y.和 Figdor, C. G., (2000), *Curr Opin Cell Biol*, 12, 542-547)。目前已充分了解 LFA-1 参与淋巴细胞黏附,在免疫突触形成(Dustin, M. L.和 Shaw, A. S., (1999), *Science*, 283, 649-650)、白细胞外渗与再循环(Volkov, Y.等, (2001), *Nat Immunol*, 2, 508-514)中有突出作用。LFA-1 黏附受胞间黏着分子(ICAM)-1、-2 和-3 配体的控制(van Kooyk 和 Figdor, 2000)。患有白细胞黏附缺陷疾病(LAD)(LFA-1 整联蛋白突变或丢失综合征)的患者受到严重的复发性细菌感染,整体免疫力受损(Bunting, M.等, (2002), *Curr Opin Hematol*, 9, 30-35)。在这些临床表象中,LFA-1 敲除小鼠提示 LFA-1 可能在过继性免疫治疗介导肿瘤衰退中有潜在作用(Mukai, S.等, (1999), *Cell Immunol*, 192, 122-132; Nishimura, T.等, (1999), *J Exp Med*, 190, 617-627)。虽然这些研究将淋巴细胞黏着分子与免疫功能受损在遗传上相关联,但介导这些免疫病理学的分子细节还未充分了解。

对 LFA-1 的研究主要集中在整联蛋白的黏附作用上。配体结合后 LFA-1 整联蛋白活化与受体群集的身体过程是如何相互联系并转化为细胞信号还不清楚。对 LFA-1 敲除小鼠缺乏这些事件如何导致 LAD 的破坏作用与免疫应答受损不了解。因此,我们想要解释 ICAM-LFA-1 的相互作用模型的分子细节来理解细胞与细胞接触时引发的 LFA-1 信号转导机理。我们采用多参数单细胞分析来监测用可溶性 ICAM-2 处理后 LFA-1 受体的动力学,发现肌动蛋白与微管细胞骨架使 ICAM-2 黏附与 LFA-1 活化和群集相关。微管细胞骨架约束了 LFA-1 构象的变化(活化),用多参数流式细胞术检测此事件发生在 LFA-1 群集之前。诱导 LFA-1 活化导致 p44/42 促分裂原活化的蛋白激酶通路(MAPK; RAF/MEK/ERK)活化,该事件依赖于 Pyk2 和 Syk 激酶活性。

本发明人研究了细胞毒性 T 细胞与白血病靶细胞之间黏附时 ICAM-2 介导 LFA-1 活化的这些分子细节,该事件需要细胞与细胞接触。人 CD56⁺CD8⁺T 细胞的 ICAM-2 刺激能诱导穿孔素/粒酶-A 介导的对白血病细胞的细胞毒性。其它两种 LFA-1 配体,ICAM-3 与 ICAM-1(程度较低)均有此定向杀伤(作用)。这些结果明辨了 ICAM-2/LFA-1 信号转导机理是针对细胞毒性 T 淋巴细胞免疫力

的,提示肿瘤通过分泌 ICAM-2 与可能的 ICAM-3 而规避细胞毒性 T 细胞免疫应答的可能机理。

结果

重组 ICAM-2 促进 LFA-1 介导的黏附

本发明人选择 Jurkat T 细胞系模型作为首先分析 LFA-1 信号转导机理,然后在人 T 细胞中验证此发现的系统。制备生物化学方法纯化的 ICAM-2 蛋白来研究不存在其它配体时 ICAM-2/LFA-1 的相互作用。我们采用免疫亲和层析与随后的凝胶过滤法纯化了逆转录病毒转导 NIH3T3 细胞产生的人 ICAM-2。我们将其与 NSO 小鼠骨髓瘤细胞制备的 ICAM-2-FC 融合蛋白作比较。这些基于小鼠的哺乳动物表达系统因能产生 ICAM-2 的生物活性形式而选择。ICAM-2FC 蛋白的生物化学分析与该融合蛋白的预计分子量(76 kD)相符,纯化的人 ICAM-2 分子量为 72-74 kD。此大小与纯化自 Jurkat T 细胞的 75 kD ICAM-2 相似。

本发明人制备了 FITC 偶联的 ICAM-2(ICAM-2-FITC),通过流式细胞术与激光扫描共聚焦显微术(LSCM)研究 LFA-1 受体的动力学。我们通过监测单个细胞上 ICAM2-FITC 的结合动力学检验了 LFA-1 受体的配体结合(情况)。在前 150 秒观察到结合低,到 750 秒逐渐增加,然后保持水平。相反,抗-LFA-1 抗体在前 50-100 秒显示最初的结合峰,直至 800 秒才平衡。用 PMA 处理预先活化 LFA-1 (McDowall, A.等, (1998), J Biol Chem, 273, 27396-27403)显示 ICAM-2 立即结合。150 秒后 ICAM-2 逐渐结合提示在一些结合诱导的事件(利用抗 LFA-1 未观察到的特性)或在 PMA 活化 LFA-1 后, LFA-1 与其 ICAM-2 配体的结合得到提高。在胰蛋白酶处理的细胞中未观察到 ICAM-2-FITC 的结合(数据未显示),此结合受抗 LFA-1 的抗体阻断(下述的)。因此,看来 ICAM-2 配体的结合作为时间函数增加,提示靶细胞上存在可诱导的结合位点。

通过流式细胞术分析 ICAM-2 结合群显示依赖于肌动蛋白细胞骨架与温度。37°C ICAM-2 黏附高于 4°C。在 37°C 与 4°C 用肌动蛋白解聚试剂细胞松弛素 D 预处理显示有两种 ICAM-2 结合群,与抗-LFA-1 观察到的结合现象相反。

观察到 ICAM-2-FITC 在 37°C 比在 4°C 更易饱和(数据未显示)。通过计算每个细胞结合的 ICAM-2-FITC 百分比得到单个细胞对 ICAM-2 的结合亲和力测量值。曲线拟合分析表明解离常数是 $0.21 \pm 0.07 \text{M}/10^4$ 个细胞。此数值等于 21.7 pM/细胞,代表了生理环境内细胞表面 LFA-1 的所报导的 ICAM-2 第一配体结合测量值。因此, ICAM-2 配体结合的单个细胞定量分析提示在生理温度下为强结合。

可溶性 ICAM-2 诱导 LFA-1 群集和细胞骨架极化

本发明人研究了 LFA 结合是否会改变细胞骨架结构,观察了 ICAM-2 刺激后肌动蛋白和微管细胞骨架的再组建。本发明人采用流式细胞术监测细胞骨架结构,观察到 ICAM-2 结合后肌动蛋白和微管组织同时改变(一种与解聚相符的作用)。ICAM-2 处理诱导 LFA-1 在 1 分钟内快速群集,在 5 分钟时多重群集事件。利用 ICAM-2-FITC 配体观察细胞表面,表明 ICAM-2 配体诱导了 LFA-1 受体群集。利用非阻断性 2 整联蛋白抗体(克隆 CTB104)此群集事件显示有一定共定位作用。因此,我们推测 ICAM-2 与 LFA-1 结合诱导的信号可导致 LFA-1/ICAM-2 复合物的重组建。因此,我们决定研究与肌动蛋白/微管细胞骨架中观察到的改变有关的这种现象。

本发明人采用多参数流式细胞术评估 ICAM-2 结合时与 LFA-1 活化与群集相关的 LFA-1 受体动力学。我们利用 FACS Calibur 仪器上的双联体鉴别器来区分激光激发单细胞后分布的与聚集的荧光脉冲(FFP)。37°C 与 4°C 培育 ICAM-2 显示 FFP 降低,而用细胞松弛素 D 处理该作用极大增强。通过荧光强度监测 ICAM-2-FITC 的表面结合,用荧光脉冲(FP)飞行时间(TOF)使之标准化。我们将每 TOF 的 ICAM-2-FITC 强度值解释为定量评估 LFA-1 群集,因为 TOF 与激光激发的细胞区域成比例。计算出作为时间函数的 ICAM-2 刺激的此数值与通过 LSCM 观察到的群集增加成比例。

ICAM-2 黏附诱导的 LFA-1 构象改变受微管细胞骨架调节

虽然 ICAM-2 黏附提高与诱导的 LFA-1 群集反映了 ICAM-2 配体亲合力的总体增加,但它不一定反映 LFA-1 活化状态(高亲和力状态)(McDowall 等, 1998)。LFA-1 活化后,构象改变使 mAb24 抗体所识别的表位暴露(Neeson,

P. J.等, (2000), *J Leukoc Biol*, 67, 847-855)。利用 mAb24-Alexa633 偶联物, 通过流式细胞术评估 ICAM-2 刺激后 LFA-1 的活化状态。未受刺激的细胞不显示 mAb24 结合, 与用 PMA 处理观察到的诱导相反。ICAM-2 刺激的细胞显示活性 LFA-1 中有双峰(bimodal)群, 细胞松弛素 D(处理)减弱了该作用。用微管干扰剂诺可唑和紫杉醇处理导致 ICAM-2 刺激后 LFA-1 完全活化。相反, 通过细胞松弛素 D 破坏肌动蛋白细胞骨架减弱了 ICAM-2 诱导的 LFA-1 活化, 虽然它提高了 LFA-1 受体群集与随后的 ICAM-2 结合。因此, 肌动蛋白和微管细胞骨架网络对 LFA-1 活性和亲合力的影响不同。

本发明人采用流式细胞术同时监测作为单位时间 ICAM-2 刺激的函数的 LFA-1 活化与群集。使 mAb24 抗体的平均荧光(强度)与 LFA-1 群集值相关联显示 30 秒内 LFA-1 活化先于 LFA-1 群集, mAb24 抗体的结合显著增加, 但群集只有适度增加。然而, 再 30 秒后直至 30 分钟 mAb24 的结合只有少许增加, 但群集值显著增加。因此, 这些结果提示 ICAM-2 配体诱导 LFA-1 活化后(发生)LFA-1 群集。

本发明人观察到利用 mAb24 结合检测时, 用 PKC 抑制剂, 双吡啶基马来酰亚胺 I(bisindolymaleimide I) (BIM I)处理细胞抑制了 ICAM-2 诱导的 LFA-1 活化。ICAM-2-FITC 结合检测 ICAM-2 黏附不受影响。这提示配体诱导的受体构象改变依赖于胞内激酶。感兴趣的是 ICAM-2 诱导了钙流(PKC 活化所需的组分)(数据未显示)。因此, 这些观察结果提示 ICAM-2 配体诱导的 mAb24 新表位(neoepitope)暴露触发了 PKC 依赖性胞内信号转导事件。我们决定研究 ICAM-2 与 LFA-1 结合的下游信号转导结果。

ICAM-2 通过 LFA-1 诱导了 p44/42 MAPK 活性

进行流式细胞术的激酶状况测定实验来鉴定 ICAM-2 刺激后 PKC 活化信号转导途径的下游。用 ICAM-2 处理诱导 p44/42 MAPK 磷酸化与活化。如单细胞流式细胞术分析测定的那样, ICAM-2 滴度与 p44/42 MAPK 磷酸化相关, 这些结果与激酶活性分析相同。特异性整联蛋白 mAb 的滴度与 ICAM-2 结合相匹敌, 从而降低了所诱导的 p44/42 MAPK 磷酸化。用各种整联蛋白的 mAb 预处理后未观察到此抑制作用, 表明 ICAM-2/LFA-1 相互作用介导了 p44/42

MAPK 活化。

ICAM-2/LFA-1 诱导 p44/42 MAPK 活性需要 PKC、PYK2 与 SYK 的活化

本发明人采用流式细胞术的 p44/42 MAPK 激酶抑制和活化状况测定来鉴定 LFA-1 信号转导所需的组分。PKC 抑制剂 BIM I, 细胞骨架干扰剂细胞松弛素 D、紫杉醇、诺可唑与用 EDTA 螯合二价阳离子均减弱了 ICAM-2 诱导的 p44/42 MAPK 信号, 提示配体诱导的 LFA-1 在机制上与通过肌动蛋白-微管细胞骨架的信号转导相关。为鉴定负责将信号从 LFA-1 向 p44/42 MAPK 传递的上游激酶, 应用了一系列激酶抑制剂并检验了它们消除 ICAM-2 诱导的 p44/42 MAPK 活性的能力, 而除莠霉素 A 和泻素, src 和 p56lck 的抑制剂无作用。酪氨酸磷酸化抑制剂 A9 与四羟反式芪分别是脯氨酸-酪氨酸激酶 2 (Pyk2)与脾-酪氨酸激酶 (Syk)的特异性抑制剂 (Avdi 等, (2001), J Biol Chem, 276, 2189-2199; Fuortes 等, (1999), J Clin Invest, 104, 327-335), 它们消除了 ICAM-2 诱导的 p44/42 MAPK 及其上游激活物 Raf-1 的活化。

本发明人检验了 Pyk2 与 Syk 是否能与特定整联蛋白相互作用。ICAM-2 处理后, Pyk2 和 Syk 磷酸化并与整联蛋白共沉淀, 表明 Pyk2 和 Syk 易位至膜。这与作为时间函数的 ICAM-2 刺激后 Pyk2 和 Syk 的磷酸化一致。在 1 分钟时检测到 PKC η 与 Pyk2 磷酸化, 然后在 5 分钟时检测到 Syk 磷酸化。我们确认 Pyk2 和 Syk 活性依赖于 PKC 活化。综合以上结果, 提示 ICAM-2 所赋予的 LFA-1 信号转导机理至少由 PKC 引发并通过 Pyk2 和 Syk 传播至 p44/42 MAPK 途径。

LFA-1 参与效应细胞-靶细胞黏附并促进人细胞毒性 T 细胞活化

因为 LFA-1 参与淋巴细胞间的黏附(几种免疫突触处发生的过程), 我们感兴趣的是研究鉴定的生理环境中 ICAM-2/LFA-1 相互作用的分子事件。有人提出 ICAM-2 群集的局部呈递(不依赖于表达水平)是天然杀伤细胞产生细胞毒性的有效靶结构(Helander, T. S.等, (1996), Nature, 382, 265-268)。我们首先应用 FACS 的效应物-靶杀伤试验来定量监测用不同效应物: 靶细胞比例的刺激后人 PBMC 对 HL60 白血病细胞的靶细胞裂解。已有报导说流式细胞术检

测靶细胞裂解比标准的铬释放试验更灵敏(Lecoeur, H.等, (2001), *J Immunol Methods*, 253, 177-187)。我们用荧光染料 CFSE 标记 HL60 细胞, 通过流式细胞术监测标准效应物-靶细胞试验中的细胞含量。可溶性 ICAM-2 在存在 IL-2 时可引发靶细胞裂解, 但不存在 IL-2 时不引发。在 IL-2 预先活化的细胞中, ICAM-1 和 ICAM-3 未引发强效的细胞毒性细胞应答, 这与 ICAM-2 相反。

由于天然杀伤细胞(NK)包含异质(细胞)群, 即特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL 及其 $C8^+$ 亚组)、NK 细胞 ($CD16^+$ 及其亚组)与 $CD4^+$ TH1 细胞(Biron, C. A.和 Brossay, L., (2001), *Curr Opin Immunol*, 13, 458-464.), 我们测定了对人 NK 细胞亚组而言 ICAM-2 是否是唯一的。我们利用流式细胞术的多维分选能力在人 PBMC 中鉴定到具有溶细胞活性的不同细胞群。我们也通过流式细胞术监测穿孔素和粒酶-A 的胞内水平, 这两种蛋白质介导了这些(细胞)群中 NK 细胞的靶细胞裂解。通过 CD8 和 CD56 表面染色, 我们在人 PBMC 中鉴定了 6 种不同(细胞)群, 对这些亚组随后进行了胞内功能试验。我们在存在 ICAM-1、ICAM-2 和 ICAM-3 可溶性配体与 HL60 靶细胞时进行效应物-靶(细胞)细胞毒性试验。我们未观察到刺激后(细胞)群亚组的频率有显著改变。用 ICAM-1、-2 或-3 刺激后, $CD56^+CD8^{\text{低}}$ (细胞)群显示胞内穿孔素或粒酶-A 没有显著改变。 $CD56^+CD8^{\text{中等}}$ (细胞)群显示 ICAM-2 和 ICAM-3 刺激后穿孔素阴性细胞群的频率略有上升(1.5-2 倍)(21.5% ICAM-2 > 19.8% ICAM-3 > 13.7% ICAM-1)。与未刺激的相比, ICAM-1、-2 和-3 刺激后 $CD56^+CD8^{\text{高}}$ (细胞)群显示粒酶-A 与穿孔素均丧失, 其中与 ICAM-1(4.12%)或 ICAM-3(3.07%)相比, ICAM-2 刺激后粒酶-A 阴性细胞群中显著丧失(58.3%)。所有 ICAM 刺激的 $CD56^-CD8^{\text{高}}$ (细胞)群也显示粒酶-A 与穿孔素均丧失。由于不可能确切鉴定 $CD56^-CD8^{\text{高}}$ (细胞)群内的亚组, 将它们从分析中删除。

如下所示, 相对于未刺激的细胞, 定量测定 $CD56^+CD8^{\text{低}}$ 亚组中穿孔素和粒酶-A 的胞内含量也鉴定到 ICAM 的相似与差异。ICAM-2 与 ICAM-3 介导粒酶-A 与穿孔素丧失的程度高于 ICAM-1。此外, 在 IL-2 预活化的细胞中, 用 ICAM 刺激观察到的差异(ICAM-2 > ICAM-3 >> ICAM-1)显示穿孔素丧失, 特别是在

CD56⁺CD8^{中等/高}(细胞)群中。ICAM-2 与 ICAM-3 也诱导了 CD56⁺CD8^低(细胞)中穿孔素丧失, 然而 ICAM-2 需要通过 IL-2 预活化。检测到(不同刺激的)CD8^高亚组(CD56⁺或 CD56⁻)的粒酶-A 水平较低: ICAM-2 > ICAM-3 > ICAM-1 > 未刺激的。在存在 IL-2 预活化时, 所有 ICAM 均诱导 CD56⁺CD8^{高/中等}(细胞)群中粒酶-A 释放, ICAM-2 降低尤其多。CD56⁺CD8^低(细胞)群中未观察到粒酶-A 有显著改变。不同效应物-靶细胞比例时(50: 1、25: 1、12.5: 1)这些差异相似 (数据未显示)。因此, CD56⁺CD8 亚组中 ICAM-1、-2 和-3 刺激的溶细胞活性存在相似性和差异。所有三种 ICAM 均能介导 CD56⁻CD8^高(细胞)群中穿孔素释放。ICAM-2 和 ICAM-3 在介导 CD56⁺CD8^高和 CD56⁺CD8^{中等}(细胞)群的穿孔素/粒酶-A 释放中最相似。

用流式细胞术偶联物形成试验检测时, 我们将注意力集中在 CD56⁺CD8⁺细胞上(均是 CD8^{中等}和 CD8^高亚组), 检验了抑制 Syk、p44/42 MAPK 或破坏细胞骨架是否有害地影响了效应物-靶(E: T)细胞偶联 (Morgan, M. M.等, (2001), *J Immunol*, 767, 5708-5718)。破坏细胞骨架肌动蛋白和微管提高了 E: T 偶联物形成, 与用这些试剂破坏提高了 LFA-1 活化的先前结果一致。用四羟反式茛抑制 Syk 抑制了偶联细胞形成, 而用 PD98059 抑制 p44/42 MAPK 不抑制其形成。这些结果提示 Syk 活性是效应物-靶细胞经 LFA-1 黏附所需并与表明 Syk/ZAP-70 是同一细胞上 LFA-1 之间活化所需的报导一致(Soede, R. D.等, (1999), *J Immunol*, 163, 4253-4261)。p44/42 MAPK 看来不是 E: T 偶联物形成所需。监测 ICAM-2 刺激后活性 LFA-1 与 p44/42 的胞内活化显示 CD56⁺CD8⁺细胞中这两种标记之间存在时间依赖性相关。

讨论

此报导观察到: (1) ICAM-2 在不存在外源性激活物, 例如细胞因子或 TCR 信号转导时能诱导 LFA-1 群集、活化与细胞骨架再组建; (2) LFA-1 在配体结合后将信号传递至涉及 PKC、Pyk2 和 Syk 的 p44/42 MAPK 途径; 和(3) LFA-1 受体动力学在机制上通过肌动蛋白和微管细胞骨架网络与信号转导相连。这些分子事件的生理结果触发了穿孔素和粒酶 A 介导的 CD56⁺CD8⁺ T 细胞细胞毒性, 这些事件主要为 ICAM-2 与 ICAM-3 所共有, 而不是 ICAM-1。

两种整联蛋白信号转导机理取决于所研究系统而不同,二者均集中于黏附对细胞形态和迁移的作用(Dib, K, (2000), *Front Biosci*, 5, D438-451)。两种整联蛋白信号转导显示涉及通过桩蛋白、vav 和 GTP 酶活化蛋白等的酪氨酸磷酸化后细胞骨架的再组建 (Fuortes, M.等, (1994), *J Cell Biol*, 127, 1477-1483; Zheng, L.等, (1996), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 8431-8436)。注意力集中在 LFA-1 介导的白细胞黏附(CD11a/CD18)的研究显示 PKC 有调节 LFA-1 亲合力的作用(Bleijns, D. A.等, (2001), *J Biol Chem*, 276, 10338-10346; Hedman, H.和 Lundgren, E., (1992), *J Immunol*, 149, 2295-2299), 证实 TCR 信号转导能活化 LFA-1 (Peterson, E. J.等, (2001), *Science*, 293, 2263-2265)。也显示趋化因子在不存在 TCR 信号转导时能在淋巴细胞/内皮细胞接触期间用作 LFA-1 的激活物(Constantin, G.等, (2000), *Immunity*, 13, 759-769)。在不存在外部(趋化因子)或内部(TCR 或共刺激分子)刺激时, LFA-1 整联蛋白的黏附、群集和活化如何与胞内信号转导事件相关尚不清楚。

ICAM-2 的第一 Ig 结构域的合成肽(P1, 氨基酸 21-42)在高浓度(62 M)能诱导 LFA-1 介导的黏附, 该浓度与集团细胞黏附试验(bulk cellular adhesion assay)中低 48 倍的 ICAM-2 可溶性蛋白浓度(1.3 M)相当(Kotovuori, A.等, (1999), *J Immunol*, 162, 6613-6620)。然而, P1 结合不诱导 LFA-1 的活性构象, 不诱导钙流入(Kotovuori 等, 1999), 而全长 ICAM-2 结合导致 LFA-1 活化(参见图 45D)与钙流入事件(数据未显示)。计算的 ICAM-2 亲合力是 217 ± 66 nM(每 10^4 个细胞), 而采用工程改造的 LFA-1 “活性” 锁闭 I 结构域的 BIAcore 分析报导的是 605 ± 55 nM kD (Shimaoka, M.等, (2001), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 6009-6014)。本文报导的 ICAM-2 结合亲和力是用生理环境中的单细胞分辨, 这是用纯化或遗传改造的 LFA-1 不可能达到的。观察到肽与蛋白质浓度差异可能归因于肽合成中的杂质和/或内源性 ICAM-2 中天然存在碳水化合物组分, 所述组分使其接近 66 kD 的分子量增加了 30 kD, 有人提出这些组分使 ICAM-2 结合定向于 LFA-1(Casasnovas, J. M.等, (1997), *Nature*, 387, 312-315; de Fougères, A. R.等, (1991), *J Exp Med*, 174, 253-267)。

我们采用多参数流式细胞术研究了肌动蛋白和微管细胞骨架在 ICAM-2 配体诱导的 LFA-1 受体活化与群集中的作用。破坏肌动蛋白细胞骨架提高了 LFA-1 群集与 ICAM-2 结合,证实了先前提出的肌动蛋白细胞骨架约束了 LFA-1 迁移的研究(Lub, M.等, (1997), *Mol Biol Cell*, 8, 341-351)。感兴趣的是,肌动蛋白解聚消除了 ICAM-2 诱导的 LFA-1 活化。相反,如 mAb24 识别的新表位暴露所检测的那样,用诺可唑与紫杉醇破坏微管提高了 LFA-1 活化。近年来,有报导说微管解聚增加了巨噬细胞系中两种整联蛋白的侧向迁移性(Zhou, X.等, (2001), *J Biol Chem*, 276, 44762-44769);因此可以想像 LFA-1 活化表位暴露所需的配体结合后微管调节了构象改变。这些观察结果提示配体结合后,肌动蛋白-微管细胞骨架能调节 LFA-1 的高亲合力与高亲和力状态。我们观察到存在所测试的所有细胞骨架破坏剂(细胞松弛素 D、诺可唑和紫杉醇)消除了 LFA-1 信号转导,表明 LFA-1 受体是通过细胞骨架与信号转导机理相关。因此, LFA-1 的高亲合力与高亲和力状态在机理上不相关提示配体结合后在于 LFA-1 整联蛋白-细胞骨架接合处存在调节/介导这两种状态的胞内事件将 LFA-1 受体动力学向胞内信号转导蛋白传递。

设计了几种化学抑制筛选来鉴定参与 LFA-1 向 p44/42 MAPK 信号转导事件的蛋白质。鉴定到 Pyk2 和 Syk 是 ICAM-2 结合后 p44/42 MAPK 途径活化所需,二者依赖于 PKC 活性。B 细胞中 Pyk2 的磷酸化与 LFA-1/ICAM-2 相互作用介导的同型黏附相关(McDonald, J. T.等, (2000), *Immunol Invest*, 29, 71-80)。此外,在其它模型系统中显示 Pyk2 活化是 p44/42 MAPK 活性所需(Barsacchi, R.等, J. (1999), *FEBS Lett*, 461, 273-276; Lev, S.等, (1995), *Nature*, 376, 737-745)。Syk 是 III 3 信号转导中关键的酪氨酸激酶(Saci, A.等, (2000), *Biochem J*, 351 Pt 3, 669-676),连接 Fc R1 信号转导与 ras/MAPK 途径 (Jabril-Cuenod 等, (1996), *J Biol Chem*, 271, 16268-16272)。采用药理学方法(利用四羟反式芪抑制)、生物化学方法(显性负 Syk)或遗传方法(Sky^{-/-}小鼠)抑制或消除 Syk 抑制了天然细胞毒性 (Brumbaugh, K. M.等, (1997), *J Exp Med*, 186, 1965-1974; Colucci, F.等, (1999), *J Immunol*, 163, 1769-1774)。因此, LFA-1 活化信号转导至 Syk(显示对 NK 细胞功能

重要的激酶)使表面整联蛋白活化与效应细胞功能之间生化相关。

本发明人证实 Pyk2 与 Syk 是 ICAM-2 诱导 LFA-1 信号转导至 Raf-1 (p44/42 MAPK(RAF/MEK/ERK)级联反应的上游激酶)所需。抑制 p44/42 MAPK 不能阻止 CD56⁺CD8⁺细胞结合。免疫荧光分析显示用 p44/42 MAPK 抑制剂 PD98059 处理 NK 白血病细胞系 YT 抑制了穿孔素重分布于效应物-靶细胞接触位点 (Wei, S.等, (1998), *J Exp Med*, 187, 1753-1765)。此外, p44/42 MAPK 途径显示在调节天然杀伤细胞的细胞毒性中重要 (Jiang, K.等, (2000), *Nat Immunol*, 1, 419-425)。因此, 本文证实在 LFA-1/ICAM-2 结合而活化的 p44/42 MAPK 途径显示至少与穿孔素颗粒胞吐作用相关。因此, ICAM-2 引发的 LFA-1 信号转导途径包括(图示的)效应物-靶细胞黏附事件与人 CD56⁺CD8⁺细胞毒性 T 细胞群中溶细胞机理活化的信号转导接合点。这些结果提供了 LFA-1 整联蛋白黏附功能与溶细胞信号转导机理相关的直接证据。

如效应物-靶细胞偶联时穿孔素和粒酶-A 释放所证实, 我们也观察到在介导细胞溶解活性中 ICAM-2 与 ICAM-3 作用相似, 而与 ICAM-1 相反(参见图 8)。我们以前观察到 ICAM-2 与 ICAM-3 间胞内信号转导机理相似, 但也与 ICAM-1 不同(Perez, O. D.等, (2002), *Immunity*, 16, 51-65)。然而, 这些结果不能排除 ICAM-2 也可能刺激有待鉴定的其它有溶解细胞能力的细胞亚组, 因为在大量 PBMC 中观察到有高度细胞溶解活性(参见图 9)。

以前关于细胞毒性 T 细胞的研究已证实阻断 LFA-1/ICAM 相互作用可抑制效应物-靶细胞黏附, 因此得出结论: 它也阻断了 NK 细胞的细胞溶解活性 (Donskov, F.等, (1996), *Nat Immun*, 15, 134-146; Krensky, A. M.等, (1984), *J Immunol*, 132, 2180-2182; Matsumoto, G.等, (2000), *Eur J Immunol*, 30, 3723-3731)。LFA^{-/-}小鼠的 NK 细胞的功能研究证实 LFA-1 黏附是 IL-2 活化的 NK 杀伤作用所需(Matsumoto 等, 2000), 也证实 LFA^{-/-}CD8⁺T 细胞的 T 细胞活化与效应物功能有缺陷(Shier, P.等, (1999), *J Immunol*, 163, 4826-4832)。感兴趣的是, LAD 患者的 NK 细胞的 NK 细胞细胞毒性有缺陷 (Shibuya, K.等, (1999), *Immunity*, 11, 615-623)。直到近年来才证明细胞毒性 T 淋巴细胞的直接杀伤作用涉及 CTL-靶位点处针对 LFA-1 的微管组织中

心(MTOC)极化(Kuhn, J. R.和 Poenie, M., (2002), *Immunity*, 16, 111-121), 表明 LFA-1 可能具有除紧密黏附以外的功能。

总之, 我们发现 ICAM-2 作为 LFA-1 的配体可能介导 LFA-1 受体活化与群集——一种依次使微管和肌动蛋白细胞骨架极化并活化 p44/42 MAPK 途径的事件。发现这些事件是 CD56⁺CD8⁺T 细胞效应物-靶细胞结合与穿孔素/粒酶 A 介导的细胞溶解活性所需。ICAM-3 也有此作用。本文报导的控制 LFA-1 受体动力学和胞内信号转导的机理提示 LFA-1 信号转导除具有黏附作用进而发生其它分子相互作用以外, 还促进 CD56⁺CD8⁺细胞溶解活性。MTOC 不适当定位在小鼠肿瘤模型中显示能抑制 CD8⁺肿瘤渗出 T 细胞裂解颗粒的胞吐, 从而消除 CTL 应答所需的穿孔素介导的细胞溶解活性(Radoja, S.等, (2001), *J Immunol*, 167, 5042-5051)。令人意料不到的是, 缺陷型 CD8⁺肿瘤渗出 T 细胞有效地介导了体外细胞杀伤(Radoja, S.等, (2001), *J Immunol*, 166, 6074-6083), 提示在肿瘤微环境中存在肿瘤介导的抑制机理。在癌症与自身免疫疾病患者的血清中观察到可溶性 ICAM(1 和 3)产生, 虽然分析并未扩展至 ICAM-2(Bloom 等, (2002), *J Rheumatol*, 29, 832-836)。只有一份报导指出白血病患者中可溶性 ICAM-2 水平升高, 化疗后降低(Mustjoki, S.等, (2001), *Br J Haematol*, 113, 989-1000)。这些观察的病因学未知。在本文所述的工作范围内, 推测表面 ICAM-2 调节异常或可溶性 ICAM-2 的分泌可能过早而不能有效地触发或阻断了效应物-靶位点处 CD56⁺CD8⁺细胞溶解活性, 使肿瘤得以规避 T 细胞的裂解。了解 ICAM-2 与其它整联蛋白配体相互作用中的其它特定作用能更好地理解效应物: 靶细胞界面传播的事件。

材料与方 法

免疫学与化学试剂

1、2、3、4、5、6、1、4、5、L、LFA-1、Pyk2、SyK、Mac-1、ICAM-1 和 ICAM-3 的 mAb (PharMingen)。CD3、CD4、CD8、CD19、CD56、CD45 直接偶联物 (FITC/PE/PERCP/APC/生物素)、粒酶-A-FITC (PharMingen)。穿孔素-CY5 和 CD8-CY5PE (斯坦福大学的 Herzenberg 实验室馈赠)。ICAM-2 mAb and ICAM-2-FITC (IC2/2 Research Diagnostics)。抗-磷酸

PYK2(Y402)、抗-磷酸-p44/42 (pT185Py187) (Biosource)。抗-磷酸 PKC / (Thr638)、抗-磷酸-Syk(Tyr525/526)、抗-磷酸 Raf1 (Ser259) (Cell Signaling Technologies)。所用的蛋白质与化学试剂是：异硫氰酸荧光素 (FITC) (Pierce)、Alexa 氟染料系列 488、546、568、633、紫杉醇-alexa546、鬼笔环肽-alexa633 和 CFSE (Molecular Probes)。酪氨酸磷酸化抑制剂 A9 和 18、SB203580、四羟反式芪、双吡啶基马来酰亚胺 I 和 II、除莠霉素 A (Calbiochem)。泻素、染料木黄酮、DMSO、PMA、PHA、星形孢菌素、离子霉素、碘化丙锭、细胞松弛素 D (Sigma)。蛋白质 A/G 琼脂糖 (SCBT)。重组人 IL-2 (Roche)、重组人 ICAM-1-FC、ICAM2-FC、ICAM3-FC (Genzyme)。小鼠与家兔 IgG 的二抗 (Santa Cruz)。由小鼠 IgG (用作抗体)、1 % BSA (用作蛋白质)或 0.001 % DMSO 载体 (用作化学物质)组成的模拟治疗。

细胞培养

NIH3T3 细胞维持在 DMEM、10% DCS、1 % PSQ (Duelbecco 改进的 Eagle 培养基, 10% 供者小牛血清、1 % 青霉素-链霉素 (1000 单位/ml 与 2mM L-谷氨酰胺 PSQ) 中。Jurkat T 细胞以 1×10^5 个细胞/ml 维持在 RPMI-1640、10% FCS、1% PSQ 中, 进行所有功能试验前血清饥饿 12 小时。细胞维持在 5%CO₂/37 °C 潮湿培养箱中。通过 Ficoll-plaque 密度离心 (Amersham Pharmacia, Uppsala, 瑞典) 从健康供血者 (Stanford Blood Bank) 的全血中得到人外周血单核细胞, 并除去了黏附细胞。采用磁性活化细胞分选负分离原初 CD8⁺T 细胞用于所示研究 (Dynal, 奥斯陆, 挪威)。

制备可溶性 ICAM-2 与合成 ICAM-2-FITC 和 ICAM-2 珠

如所述从 Jurkat 细胞得到的全长 ICAM2 cDNA, 克隆入逆转录病毒载体 PBM-Z-IN 的 BamHI/SalI 位点 (Perez 等, 2002)。通过逆转录病毒感染的 NIH3T3 细胞中过度表达人 ICMA-2, 采用免疫亲和层析收集。采用两步骤的裂解方法与随后在抗-ICAM-2 固体支持物上纯化来亲和纯化 ICAM-2。细胞于 4°C 用缓冲液 A (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1 % NP40, 2.5 mM Na₂PO₄, 1 mM -磷酸甘油, 1 mM Na₃VO₄, 1

ug/ml 亮抑肽酶, 1 mM PMSF, 蛋白酶抑制剂混合物片剂 (Boehringer Mannheim))裂解 5 分钟, 然后 4°C 用 50% v/v 的缓冲液 B(缓冲液 A 加 1% Triton-X-100)渗透处理 30 分钟。离心收集上清液(14,000 PRM, 4°C)。按照生产商所建议的, 将针对 C-末端的抗-ICAM-2 pAb(4 mgs, Santa Cruz)与 Affi-Gel Hz 活化的支持物 (Biorad)偶联。此支持物通过 FC 区与 Ig 分子偶联, 得到较高的抗原结合容量。收集上清液的分批裂解物进行(结合)(4°C, 2 小时), 用缓冲液 C(0.1% 吐温-20, PBS pH 7.4)洗涤 4 次。用 4.5 M NaCl (Tris pH 6.8 配制)洗脱 ICAM-2 蛋白, 透析过夜(PBS pH 7.4, 0.001%叠氮化物, 0.01%甘油, 4°C), 采用体积排阻自旋层析浓缩, 用 0.01%甘油使之稳定。抗-ICAM-2 固体支持物用缓冲液 C 再次平衡, 保存于 0.001%硫柳汞 (thimerosal)中, 最多反复利用三次。通过考马斯凝胶(染色)评估纯度>98%。体积排阻层析除去了分子量较高的凝聚物, 采用天然凝胶电泳未在纯化的 ICAM-2 中观察到这些凝聚物。用此方法纯化获得 20 mg 用于此项研究。通过与 NHS-荧光素(Pierce)化学偶联来合成 ICAM-2-FITC, 凝胶过滤除去未反应的染料。流式细胞术检测到, 当用 LFA-1 抗体克隆 TS1/22 或 TS1/18(Developmental Hybridoma Studies Bank)或未标记的 ICAM-2 蛋白阻断时, ICAM-2-FITC 探针不能整合入胰蛋白酶消化的 Jurkat 细胞或(与之)结合。2 整联蛋白克隆 CT104 (Santa Cruz)不能阻断 ICAM-2-FITC 结合。纯化的 ICAM-2 与纯化自 NSO 小鼠骨髓瘤细胞的人重组 ICAM-2FC 融合蛋白 (Genzyme)相当。ICAM-1 FC 和 ICAM-3FC 也纯化自 NSO 细胞 (Genzyme)。蛋白质以 14,000 RPM 离心 5 分钟, 然后使用。按照生产商(Dynal)的建议, 将 1 mg ICAM-2 蛋白质与 2×10^8 个环氧活化的珠偶联。如所示使用总共含有 2 g ICAM-2 蛋白质的 4×10^5 个珠。利用 VersaDoc 仪器 (Biorad)进行凝胶摄像, 用 Quantity One 定量软件 (Biorad)分析。

流式细胞术

如所述进行胞内和胞外染色(Perez 和 Nolan, 2002)。将磷酸化-特异性抗体与所述 Alexa 氟染料系列偶联制备活性激酶的胞内探针, 将其用于磷酸-蛋白质优化的条件(Perez 和 Nolan, 2002)。同步直接施加固定缓冲液进行动力学

分析, 96-孔(板)维持于 37°C。利用鬼笔环肽-Alexa633 和紫杉醇-Alexa546 染料 (Molecular Probes) 进行胞内肌动蛋白与微管染色。如本文所述利用 ICAM-2-FITC 进行黏附和群集试验。37 °C 用 mAb24-Alexa633 或 mAb24-Alexa546 偶联物表面染色评估 LFA-1 活化。流式细胞术数据代表了 3 次独立实验(10^6 个细胞/样品)的结果。收集了 10-50,000 个事件, 在 FACSCalibur 仪器上手动校验。柱状图形式绘制数据, 表示为几何平均荧光强度(MFI)并用同种型对照标准化。Log 比值定义为刺激(细胞)的 MFI 对未刺激细胞的 MFI。利用 Flowjo 软件 (Treestar) 分析数据。

单细胞 ICAM-2 结合测量

ICAM-2-FITC 结合的百分比表示为 $100 \times ((\text{MFI}_{\text{实验}} - \text{MFI}_{\text{对照}}) / (\text{MFI}_{\text{最终}} - \text{MFI}_{\text{对照}}))$, 其中 $\text{MFI}_{\text{实验}}$ 等于实验浓度的平均荧光强度, $\text{MFI}_{\text{对照}}$ 等于未染色细胞的平均荧光强度, $\text{MFI}_{\text{最终}}$ 等于饱和结合的终浓度平均荧光强度。如图 42 所示, 将样品 37°C 以终浓度在 50 L 染色培养基(def RPMI, 4%FCS)中培育 30 分钟, 洗涤 1 次 (500 L, PBS pH 7.4, 含有 1mM EDTA), 重悬在 100 L 中 (1%低聚甲醛)。利用染色条件的稀释因子与 72.1 kD 的分子量确定摩尔浓度。染色缓冲液含有 2.4 mM 钙与 2 mM 镁。数据按方程 $V = V_{\text{max}}[S] / (K_m + [S])$ 拟合, 其中 V 是结合百分比, $[S]$ 是 ICAM-2-FITC 浓度, K_m 是利用 Kaleidagraph 软件(获得)的米-曼结合常数。

激光扫描共聚焦显微术

如所示处理 Jurkat 细胞, 通过温和离心(1000 RPM, 10 分钟)使细胞黏附于聚-L-赖氨酸(Sigma)涂覆的无菌盖玻片上(1 mg/ml, 30 分钟), 用磷酸缓冲盐水 pH7.4(PBS)洗涤两次, 用 2.7%低聚甲醛(PBS 配制)固定。渗透处理细胞(5 分钟, PBS 配制的 0.1% Triton-X-100), PBS 洗涤两次, 用 4%FCS 封闭, 如所示进行抗体或胞内染色。固定染色盖玻片, 利用 Zeiss 激光扫描共聚焦显微镜 510 目测。

免疫沉淀、免疫印迹与激酶试验

用冰冷却的 PBS 洗涤 2×10^6 个细胞(如所示处理), 用裂解缓冲液(20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100,

2.5 mM Na₂PO₄, 1 mM -磷酸甘油, 1 mM Na₃VO₄, 1 g/ml 亮抑肽酶, 1 mM PMSF, 蛋白酶抑制剂混合物片剂 (Boehringer Mannheim)收集制备细胞提取物。14,000 RPM 离心(5 分钟, 4°C)提取物, 采用标准方法免疫印迹 10-20 g (BCA 蛋白质试验 (Pierce))。用蛋白 A/G 加琼脂糖珠预先清洁免疫沉淀(物)(IP), 与第一抗体(1 小时)、蛋白 A/G 加琼脂糖珠(1 小时)培育, 用裂解缓冲液洗涤四次。将印迹与所示抗体一起培育, 用 ECL (Amersham)显色。剥离免疫印迹条带, 用剥离缓冲液(62.5 mM Tris, pH 6.8, 10% SDS, 1% -巯基乙醇)培育(30 分钟, 55°C)进行再检测(如所示)。按照生产商(Cell Signaling Technologies)的建议利用 p44/42 MAPK 激酶试剂盒检测 MAPK 活性。

细胞溶解活性、穿孔素释放试验与偶联物形成试验

采用流式细胞术检测 CFSE 标记的 HL60 细胞来检测靶细胞溶解。用 1 g CFSE (30 分钟, 37°C)标记 HL60 细胞。靶(细胞)洗涤两次, 模拟处理, IL-2 活化 (100 U/ml), CD3/CD28 活化 (1 g/ml)或用 ICAM2 珠或可溶性 ICAM-1、-2 或 3 (10 g/ml, 30 分钟, 37°C)处理, 然后以 10⁴个靶细胞/孔接种于 96-孔圆底板。以 50: 1、25: 1 和 12.5: 1 的 E: T 比例加入 CTL, 37°C 培育 4 小时。然后对细胞进行多参数流式细胞术与胞内穿孔素染色。按照以下方程计算特异性裂解百分比: 特异性裂解% = 100 - 100 × (实验 HL60 计数/对照 HL60 总计数)。利用 CFSE 荧光检测 HL60 数。按照以下方程计算穿孔素百分比: 穿孔素% = 100 × [(实验穿孔素 MFI - 同种型 mAb MFI)/(穿孔素总 MFI - 同种型 mAb MFI)]。MFI 指流式细胞术胞内检测的平均荧光强度。如所述用流式细胞术测定细胞偶联物(Morgan 等, 2001)。以 10 M 所示化合物进行化学抑制(30 分钟, 37°C), 然后如所示进行刺激。所有实验一式三份进行。

实施例 2

磷酸化-蛋白质驱动的信号转导网络支持改变的肿瘤生长因子应答反应, 认为这些网络对肿瘤细胞病理学的引发与维持至关重要。在急性髓细胞性白血

病(AML)中,生长调节异常与凋亡抑制导致不成熟的髓系祖细胞堆积与致癌进展。在本文我们证实除了广泛研究的基础磷酸化状态外,检测细胞因子刺激导致的磷酸化-蛋白质应答能揭示信号转导调节异常,能鉴定信号转导的病理学状况。我们还证实可利用磷酸-蛋白质状况的无监督群集来鉴定 AML 患者组与预后指示物(例如受体酪氨酸激酶 Flt3 突变与化疗耐受)的关系。在具有 Flt3 突变的患者中,用于确定患者组的生物化学差异表明 Stat3 和 Stat5 对髓系细胞因子 GM-CSF 与 G-CSF 的应答增强。

在一信号转导的增强模型中,预计细胞生长调节异常伴有对细胞内部信号转导状态反应过敏产生的差异。在认为是 AML 祖细胞中一个关键信号转导网络是 Janus 激酶/信号转导蛋白及转录活化蛋白 (STAT)途径。Stat 蛋白在正常调节细胞增殖、分化与存活的造血细胞因子受体信号转导途径中重要。在 AML 中,几篇报导提出参与癌发生的 STAT,例如 Stat3 和 Stat5 被组成型活化,可能是治疗性干预的有效靶标。已知在一些 AML 中被组成型活化的平行信号转导系统是 Ras 与促分裂原活化的蛋白激酶 (Ras-MAPK)途径(包括 MAPK 蛋白 p38 与 Erk1/2)。除了关键蛋白的基础磷酸化改变外,信号转导的增强模型预测癌细胞可能具有其它信号转导改变使之以不恰当或过敏方式对环境输入(信号)起反应。与这种环境输入(信号)接触可能额外检测到反映(病因的或反应性的)了引发与维持特定肿瘤亚型生长所需潜在变化的磷酸-蛋白质网络中的差异。因此,可利用肿瘤中磷酸化-蛋白质信号转导的变化作为区别疾病进程与对治疗反应的标记。

我们希望检验信号转导(的变化)能否分类特征熟知的一群 30 位成人 AML 患者的白血病母细胞的病理学差异。为符合在更天然的环境中同时检测多个事件的标准,我们采用胞内磷酸化-特异性流式细胞术来检测取自这些患者的原代白血病细胞中的多种经磷酸化而活化的信号转导分子。设计了由 36 种磷酸化-蛋白质状态(6 种基础状态与 30 种细胞因子应答)组成的细胞因子应答反应图来检测肿瘤细胞的信号转导变化(图 40a)。网格中各方块估计含有 30,000 个细胞事件的多维流式细胞术文件。通过计算受刺激细胞的中值荧光强度(MFI)除以未刺激细胞的强度 Log₂ 倍数差异,将各磷酸化-蛋白质对细胞因子应答反

应与基础状态作比较。虽然目测应答反应图中的数据很简单，但得到的多参数流式细胞术数据详细反映了感兴趣亚组的单细胞磷酸化-蛋白质应答反应状况。

细胞因子应答反应图包括检测磷酸化的 Stat1、Stat3、Stat5、Stat6、p38 与 Erk1/2。检测这些蛋白质信号转导网络怀疑其促进了白血病发生。我们收集了未刺激的细胞与用 20 ng/mL Flt3 配体 (FL)、GM-CSF、G-CSF、IL-3 或 IFN- γ 刺激 15 分钟的细胞的数据。例如，我们将此反应图应用于 U937 组织细胞淋巴瘤细胞系(图 40a)、HL-60 AML 细胞系与多份正常外周血 CD33+亚组的样品 (图 40b)。CD33 +细胞代表髓细胞谱系的分化细胞，用于评估供血者样品对细胞因子应答反应的变异。总之，供血者之间正常淋巴细胞亚组对细胞因子的应答反应变化很小($\sigma^2 < 0.1$, $n = 6$)，这些细胞系与 CD33+细胞中的信号转导反映了以前报导的信号转导 4 机理。然后，我们制备了 30 份 AML 患者样品中 6 份的细胞因子应答反应网格(图 40b, AML-P01 到 P06)。收集了细胞系、分化细胞样品与 AML 样品的反复测量值($n > 3$)，证实该技术与单克隆抗体显示了类似于以前研究的可重复性水平。然而，重要的是对刺激的反应突出了患者肿瘤样品中信号转导的相似性与差异。例如，虽然 AML-P02 与 AML-P03 显示有许多相似性，但 AML-P02 通过 Stat5 磷酸化对 GM-CSF 和 G-CSF 起反应，而 AML-P03 只对 GM-CSF 起反应(图 40b)。此外，虽然 IFN-g(刺激)后此组中大多数患者样品与对照显示 Stat5 强效磷酸化，但 AML-P05 与 AML-P01 缺乏此反应。

我们将此细胞因子应答反应图拓展至包含所有 30 位 AML 患者(图 41a)来寻找患者应答反应的显著相似性与差异。以前对 AML 癌发生的研究将注意力集中在组成型信号转导途径，进行的工作基于此活化水平可能足以监测细胞信号转导状态的异常调节的假设。基础 STAT 与 Ras-MAPK 蛋白质磷酸化中的差异与以前报导显示 AML 中信号转导途径的普遍的不同组成型活化相一致。

然而，支持肿瘤潜在突变中的差异可能导致增强信号转导中差异的假设，许多原代 AML 母细胞中的磷酸蛋白质应答反应表明显著诱导了 STAT 和 RAS/MAP-K 途径成员的磷酸化但存在差异(图 41a、b)。除了 6 种基础磷酸化

状态外,我们在 AML 患者样品中鉴定到对 30 种细胞因子中的 7 种应答反应状态有显示显著差异($\sigma^2 > 0.1$, 图 41 b, 加亮为黄色)。这 7 种是: (i) G-CSF(刺激)后 Stat3 磷酸化, (ii-v) GM-CSF、G-CSF、IL-3 和 IFN- γ (刺激)后 Stat5 磷酸化, (vi) IFN- γ (刺激)后 Stat1 磷酸化, 和(vii) FL(刺激)后 Erk1/2 磷酸化。其余的肿瘤细胞因子应答反应变化显示等于或低于正常、分化的 CD33+细胞中的变化, 两种显著性阈值最接近的结状态不影响随后的患者分组。绝对中值对方差作图表明了信噪阈值与方差和中值基础状态或细胞因子应答反应的关系。

根据增强信号转导假设, 我们预计这 13 种磷酸化-蛋白质状态代表了引发或维持肿瘤病理差异的潜在致癌作用, 可用于区分患者的危险层次。我们根据 AML 的分类, 利用这些磷酸化-蛋白质生物特征的无监督群集设计了信号转导。按照生物学假设归类患者, 然后检验与临床参数的相关性(与通过临床结果预先分组患者, 然后检验作为假设的各结状态相反), 可以避免多次 t 检验的统计学危险。即使当正常对照细胞罕见或难以大量获得时(例如利用髓系祖细胞时), 此方法也能鉴定疾病亚组, 因为可利用实验样品间的差异来确定各组而不是比较各样品与所提出的正常对照。

为了以相似性分组生物特征(图 42a), 我们采用可得自 Multiple Experiment Viewer (MeV) (<http://www.tigr.org/software/tm4/mev.html>)的全谱系分层归类算法。相似性分组鉴定了主要的四类 AML 患者(图 42b)。各称为信号转导类(SC), 根据该类的基础信号转导状况称为: (i) SC-NP: 显示很低或没有增强细胞因子应答和具有不同基础磷酸化(有下划线的字母表示同源首字母缩写), (ii) SC-PB: 显示增强的细胞因子应答与基础磷酸-蛋白质状态高, (iii) SC-P1: 显示强烈增强信号转导、基础磷酸化低与对 IFN-G 起反应 p-Stat1 的, 和(iv) SC-P2: 基础磷酸化低和显示有许多增强的细胞因子应答。

为检验增强的信号转导假设, 我们研究了以前测定的可对 AML 进行预后的临床因素是否与生物特征产生的 SC 显著相关(图 42b)。对 1 个化疗疗程(给予足够健康能耐受相关细胞毒性的患者阿糖胞苷和蒽环类(anthracycline))的

耐药性与 SC-P2 显著相关($p = 0.002$, 图 42b)。SC-P2 患者构成此类的 33%(10/30)。此发现证实根据信号转导的人癌症分类(临床结果的推理知识)能得到预测对治疗有无反应的患者类型。

我们预测可能增强原先存在的髓系信号转导网络的一种遗传改变是 Flt3 受体酪氨酸激酶的突变。在约 30%AML 患者中检测到 Flt3 异常, 足以确定可作为 AML11、12 的负面预后指标。

细胞系实验提示突变型 Flt3 的表达导致产生组成型 Stat5 和 Ras-MAPK 活性, 然而以前发表的 Flt3 突变体与患者的野生型原代 AML 母细胞 27 的基础 Stat5 磷酸化比较未观察到此联系。

值得注意的是, 显示对髓系细胞因子反应高的 AML 患者样品含有 Flt3 的内部串联重复序列, 而含有非增强 SC 状况的样品缺乏此种突变($p=0.02$)。在含有 Flt3 突变未归类于 SC-P2 的患者中, 4/7 显示有其它突变, 包括 Asp835 Flt3 突变或 N-Ras 突变 (数据未显示)。如其他人报导的那样, 我们观察到正常或 Flt3-突变型 AML 患者中 Stat5 的基础磷酸化没有显著差异(图 43a)。

在显示有 Flt3 突变的 AML 患者组中 Stat5 和 Stat3(程度较低)的增强信号转导常见。在含有 Flt3 突变的患者中, GM-CSF 和 G-CSF(刺激)后 Stat3 的磷酸化显著增强(p 分别等于 0.04 和 0.02, 图 43a 和图 43b)。应注意 G-CSF(刺激)后 Stat3 磷酸化(AML 中显示显著变化的唯一 Stat3 生物特征状态)也与 Flt3 突变相关 ($p = 0.01$, 图 43a 和图 43b)。为说明 Flt3 突变对髓系信号转导结的作用, 我们总结了四种细胞因子应答反应结状态 (G-CSF(刺激)后的 p-Stat3, GM-CSF、G-CSF 和 IL-3(刺激)后的 p-Stat5)并对 AML 患者样品中髓系细胞因子应答反应和 Flt3 突变之间的相关性作图。我们观察到显著相关性($p = 0.005$, 图 43a)从而强烈支持了 AML 中 Flt3 突变是通过预先存在的增强途径增强了信号转导的观点。这可能表明显示增强的髓系信号转导的患者, 特别是具有 SC-P2 状况的患者可能对包括 STAT 途径抑制剂的疗法反应良好。此外, 这些数据提示 SC 分组各反映了白血病发生所需的增殖效益, 当这种效益与其它基因组和蛋白质组变化相结合而在白血病细胞的促分裂信号转导网络中产生共同特征。六种细胞表面抗原与 SC 各组或 Flt3 的相关性鉴定到与 SC-P2 和

Flt3 突变显著相关的 CD15/Lewis X 的意外丧失 (χ^2 检验分别表明 $p = 0.03$ 和 $p < 0.001$, 图 42b)。

IFN- γ (刺激)后 SC-NP 的状况(包括 36.7%的患者(11/30))主要包括低到无细胞因子应答反应与 Stat1 低磷酸化(图 42a)。与此组相关的其它应答反应是 IL-3(刺激)后的低 Stat5 磷酸化与 CSF(刺激)后的低 Stat 磷酸化,二者均与 SC-P2 中观察到的变化相反。感兴趣的是,在 SC-NP 中有属于紧密相关分支(图 42a, 层次分支 AML-P23 到 AML-P30)的细胞遗传改变 10, 所述分支包括两位含有 9;11 易位的患者(AML-P27 和 AML-P24)与两位丧失染色体 5 的患者(AML-P23 和 AML-P17)。无可检测的细胞遗传改变的患者构成了紧密相关的 SC-P1 分支(图 42a, 层次分支 AML-P13 到 AML-P20)。在 SC-NP 和 SC-P1 分支中又分为改变的或二倍体细胞遗传分支具有统计学显著性($p < 0.001$)。含有 9;11 易位的唯一另一位患者, AML-P03 含有 Flt3 的 Asp835 突变, 状况为 SC-PB。显示 SC-NP 状况的 AML-P26 是这些患者中丧失染色体 17 拷贝(Stat5 和 Stat3 的基因座)的唯一患者。

如上所示,基于单细胞的生物特征的重要优点是它们能够充分估计复杂的数据从而进行生物学有效归类同时保留潜在的流式细胞术数据用于进一步检验。除了验证对照与比较反应的幅度外,我们检验了原始流式细胞术直方图和 2D 图,发现数据的较高维表象鉴定到具有独特特性的细胞亚组。例如, Stat5 与 Stat3 对 GM-CSF 和 G-CSF 反应的 2D 轮廓图显示可通过 Flt3 突变状态对 10 份代表性的 AML 患者样品分组(图 43b)。应注意虽然 Stat3 和 Stat5 均认为在白血病中是组成型活化有许多结构相似性, Flt3 突变与 GM-CSF(刺激)后增强的 Stat5 磷酸化相关但与 Stat3 磷酸化没有关系(上行)。相反,在大多数情况中,各原代 AML 母细胞中 Flt3 突变看来与 p-Stat5 / G-CSF 结和 p-Stat3 / G-CSF 结的增强状况相关(下行)。这强烈提示在两维流式细胞术中观察到的有意义亚组细胞中 Flt3 突变可能导致重要的磷酸化-蛋白转录因子的意外共活化。

利用 MeV 软件将 AML-P05 的母细胞的磷酸-蛋白质信号转导分类为具有类似于 SC-NP 的状况,尽管检测到 Flt3 突变。存在具有类似于 SC-P2 状况的 p-Stat5 与 p-Stat3 增强作用的确定的 AML-P05 母细胞亚组出乎意料,这提示一

些细胞可能获得了导致信号转导变化的其它突变(图 43b)。与具有 FK3-ITD 和非 SC-P2 状况的所有其他患者一样, AML-P05 在 1 个化疗疗程后(症状)缓解($p < 0.001$, 图 42b)。此外, 采用能辨别对输入刺激起反应的肿瘤细胞亚组的多参数方法可以克服公认的肿瘤微小异质性(micro-heterogeneity)分类的局限性。可利用提取的高维信息来进一步细化我们对本文所提供系统的理解, 特别是当同时检测其它磷酸-蛋白质或其它单细胞事件时。这些亚组的差异是否简单代表了肿瘤中的非反应细胞、癌症'干'细胞 2 或克隆演化的其它阶段尚有待确定。

本文报导的根据机理分类 AML 表明磷酸化-蛋白质组可提供肿瘤病理学的信息。此外, 所述细胞因子应答反应方法不难应用于癌症研究以外的领域。通过激活细胞群对外部刺激起反应, 可能辨别潜在信号转导病理学中的差异, 从而分类患者群。在这点上, AML 母细胞对细胞因子刺激起反应是显著的, 因为通常认为它们具有组成型活化的 STAT 与 Ras-MAPK 信号转导。发现这些肿瘤细胞的增强的细胞因子应答反应可与基础磷酸化状态信息联用并归类从而产生具有临床相关性的分类, 这对临床分组设计与检验根据机理的癌症疗法重要。这些结果提示可为生物特征明确的患者应答组中的特定细胞亚组定制定向于这些亚组患者的化疗方案(包括激酶抑制剂或其它疗剂)。

材料与amp;方法

患者与 AML 母细胞制品

该项研究得到当地伦理委员会批准, 告知允许后才收集样品。从一大组新患 AML 与外周血母细胞高计数 20 的连续患者中选择样品。这些患者是 1999 年 4 月到 2003 年 8 月被医院接受的, 中值年龄为 60, 年龄范围在 29-84。因为选择的这些患者母细胞计数高, 采用简单的密度梯度分离外周血样品来制备富集的 AML 细胞群(Ficoll-Hypaque; NyCoMed, 奥斯陆, 挪威; 比重 1.077), 然后按照以前开发的技术 28 进行安全、标准化的冷冻保存。这些患者代表了以前研究的 Flt3 信号转导与 AML20 突变组的后一部分。急性髓细胞性白血病细胞系 HL-60 与单核细胞样淋巴瘤细胞系 U-937 得自美国模式培养物保藏所 (www.atcc.org), 培养在 RPMI 培养基 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) + 10%胎牛血清 (HyClone, South Logan, UT, USA)。

刺激 AML 母细胞

使含有>95% AML 母细胞的外周血融化, 加入 5 mL Stem Span H3000 成分明确的无血清培养基(Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada), 计数, 以 2×10^6 个细胞/mL 重悬然后将 2 mL 各白血病样品加入六只 FACS 试管(Falcon 2052, BD-Biosciences, San Jose, CA), 37°C 静置 2 小时。轻柔地重悬 AML 母细胞以免凝聚, 37°C 再静置 45 分钟。此时向各只试管中加入载体 (缺陷型 RPMI 培养基, Invitrogen, Carlsbad, CA) 或 40 μ L 刺激物至终浓度 20 ng/mL。刺激物包括人重组 Flt3 配体 (FL)、GM-CSF、G-CSF、IL-3 与 IFN- γ (所有细胞因子购自 Peprotech, Inc., Rocky Hill, NJ, USA)。将样品放回 37°C 培养箱中 15 分钟以进行信号转导和磷酸化, 然后向各试管的 2 mL 细胞中加入 100 μ l 32% 低聚甲醛 (PFA, Electron Microscopy Services Fort Washington, PA, USA) 至终浓度为 1.6%。室温固定细胞 15 分钟, 在 2 mL 冰冷却的甲醇中悬浮 10 分钟渗透处理, 4°C 保存直至为流式细胞术染色。

胞内磷酸-特异性流式细胞术

向 PFA 固定, 甲醇渗透处理的 AML 母细胞中加入 2 mL 磷酸缓冲盐水(PBS) 使之复水, 轻柔重悬, 然后离心。用 2 MI PBS 洗涤细胞沉淀物一次, 重悬于 150 μ L PBS + 0.1% BSA (Sigma, St. Louis, MO, USA), 等分加入三只新 FACS 试管中。将含有每份样品 0.065 μ g 第一偶联的磷酸化-特异性抗体的 50 μ L 抗体混合物加入各试管的 AML 母细胞。室温染色 20 分钟。Alexa (Ax) 染料 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 偶联的第一偶联抗体 (均购自 BD-Pharmingen, 圣迭戈, 加利福尼亚, 美国) 包括磷酸-Stat3(Y705)-Ax488、磷酸 -Stat5(Y694)-Ax647 、 磷酸 -Stat6(Y641)-Ax488 、 磷酸 -Stat1(Y701)-Ax647 、 磷酸 -p38(T180/Y182)-Ax488 与 磷酸 -Erk1/2(T202/Y204)-Ax647 的抗体, 这些抗体成对 (Stat5/Stat3、Stat1/Stat6 与 Erk/p38) 分别应用于随后在 FL-1 和 FL-4 上的 Alexa-488 and Alexa 647 检测 (Molecular Probes, Eugene, OR)。然后加入 2 mL PBS + 0.1 % BSA 洗涤染色的 AML 母细胞, 重悬于终体积为 200 μ L 的 PBS 中。采用台式

FACSCalibur 双激光细胞计数器 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, 新泽西, 美国)收集各样品的约 30,000 个未分选的事件。当利用抗 CD33 的抗体检测正常 PBL 对髓系谱系细胞因子的反应时, 将这些抗体与藻红蛋白偶联 (克隆 WM53, BD-Pharmingen, 圣迭戈, 美国)在 FL-2 上检测。

统计学分析

计算受刺激细胞群对未受刺激细胞群的中值荧光强度指数(MFI)的 \log_2 倍数来估计细胞因子刺激后 STAT 和 Ras-MAPK 蛋白磷酸化的变化。计算样品对肿瘤中最低值的 MFI \log_2 倍数来比较基础磷酸化的差异。为测定观察到的与预计的分布的(差异)有无统计学显著性, 我们采用了 χ^2 检验(图 42b), 为测定两(细胞)群平均值差异的显著性, 我们采用斯氏 t 检验($\alpha=0.05$, 图 43a)。采用斯氏 t 检验来验证现有的假设。

实施例 3

以下实施例采用本发明的方法与组合物来产生与分析和特定药物接触后的增强作用数据。

将患者原始样品(12 位患者每人收集五份样品(共 60 份样品))等份加入 96-孔板以提供表 1 所示的细胞因子应答反应图。然后用表 2 详述的 4-色或 6-色抗体混合物染色每块 96 孔板。

除患者样品外, 利用三种细胞系进行体外药物研究(U937、HL60、MV411)。在 5 个时间点(1 小时、2 小时、4 小时、12 小时、24 小时)用药物分别处理这些细胞系, 然后进行细胞因子刺激。将得到的 15 份样品等份加入 96-孔板, 如上所述染色。

最后, 将六位正常供血者的收集物处理为“对照”样品。这些对照样品包括六位供血者每位的五份收集物, 与患者原始样品相同处理。此外, 将六位供血者每位的五份收集物与体外药物研究所用的三种细胞系相同处理。

收集每份完全处理样品的流式细胞术数据, 通过上述生物信息学工具分析, 根据加工后的流式细胞术数据产生统计学检验的显著性分析结果。

表 1. 增强作用研究的通用方案
1) 将细胞悬浮在小体积的不含血清 H3000 stem span 培养基中。
2) 计数细胞。每份样品应存在最少 20,000,000 个活细胞 (用于四种核心染色), 加 5 百万个每份保存样品。
3) 如下所示(实验布局), 将细胞稀释至 6.2×10^5 个细胞/100 uL, 将各 100 uL 等份加入 96-孔板。
4) 将刺激物以 10 ng/mL 加入各列细胞。37°C 刺激 15 分钟。
5) 为终止刺激, 向各孔加入 10 uL 32% PFA 固定细胞 (室温, 5 分钟)。
6) 沉淀细胞, 重悬在甲醇中渗透处理。此时可保存细胞 3-6 周, 或立即用标记的抗体染色并分析。
7) 与实验设计相似, 评估结(行)和状态(列)的两维阵列应答反应图。一般取 [MFI 刺激的/MFI 未刺激的] 的 \log_2 。就基础结而言, 可利用 $\log_2[\text{MFI 基础 } x / \text{MFI 肿瘤样品最低基础}]$ 将测量值置于相同的范围。
8) 为鉴定生物特征, 收集所有肿瘤样品的结状态, 研究肿瘤的方差。就多药物时间点而言, 各时间点的样品视作不同样品。方差大于在正常细胞中所见的这些结状态通常包括在生物特征中。
9) 利用生物特征结状态的无监督归类来分组样品。
10) 采用统计学显著性检验测定得到各组中临床参数的分布 (对以前确定的假设进行卡方与斯氏 t 检验)。
11) 给予具有相似增强作用的患者样品组名称。
12) 基于观察到的所有可能途径的相互作用, 根据各组的观察情况使途径图加亮与变暗。总之, 如果某组中一半以上样品显示增强作用超过所有样品的中值, 则使该途径加亮。否则使该途径变暗。
13) 根据各样品观察到的增强情况为各患者构建途径图, 根据这些图将某患者样品表型分类属于某组(预计具有与该组相似的临床结局)。
14) 制作由生物特征结状态构成的该疾病的预测图, 以类似于原始(样品)的另一组患者样品验证。最大限度减小并优化此图, 从而使之尽可能精确并具有尽可能少的某给定样品的结状态测量值。

表 2. 利用一份样品(对应于药物治疗某时间点取得的患者样品)的增强实施例的 96 孔实验应答反应图布局								
		未刺激的 (基础)	TGF β	IL-3	Flt3 配体	GM-CSF	G-CSF	IFN γ
		1	2	3	4	5	6	7
染色 1	a	a1	a2	a3	a4	a5	a6	a7
染色 2	b	b1	b2	b3	b4	b5	b6	b7
染色 3	c	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7
染色 4	d	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7
Bank	e	e1	e2	e3	e4	e5	e6	e7
Bank	f	f1	f2	f3	f4	f5	f6	f7
Bank	g	g1	g2	g3	g4	g5	g6	g7
有色的行为分而析染色, 灰色行, 允许计数细胞, 可保存在甲醇中用于进一步研究								
保存的样品可用于遗传分析, 染色其它靶细胞或重复/对照染色								

a1-g7 名称指 96 孔板坐标。

表 3.4-色与 6-色染色

4-色	染色 1	染色 2	染色 3	染色 4
	pstat1(Y701)-AX488 pstat3(Y705)-pe pstat6(Y694)-AX647 CD33-percpcy5.5	Pstat5(Y694)-AX488 p-erk1/2-PE p-p38-AX647 CD33-percpcy5.5	p-flt3-AX488 pstat4(Y693)-AX546 pstat3(S727)-AX647 CD33-percpcy5.5	p-Flt3-AX488 p-erk1/2-PE pstat5(Y694)-AX647 CD33-percpcy5.5
6-色	染色 1	染色 2	染色 3	染色 4
	pstat1(Y701)-AX488 pstat3(Y705)-pe pstat6(Y694)-AX647 CD33-percpcy5.5 CD38-PeCy7 CD14-APCCy7 TRUCOUNT BEADS	Pstat5(Y694)-AX488 p-erk1/2-PE p-p38-AX647 CD33-percpcy5.5 CD38-PeCy7 CD14-APCCy7 TRUCOUNT BEADS	p-Flt3-AX488 pstat4(Y693)-AX546 pstat3(S727)-AX647 CD33-percpcy5.5 CD38-PeCy7 CD14-APCCy7 TRUCOUNT BEADS	p-Flt3-AX488 p-erk1/2-PE pstat5(Y694)-AX647 CD33-percpcy5.5 CD38-PeCy7 CD14-APCCy7 TRUCOUNT BEADS

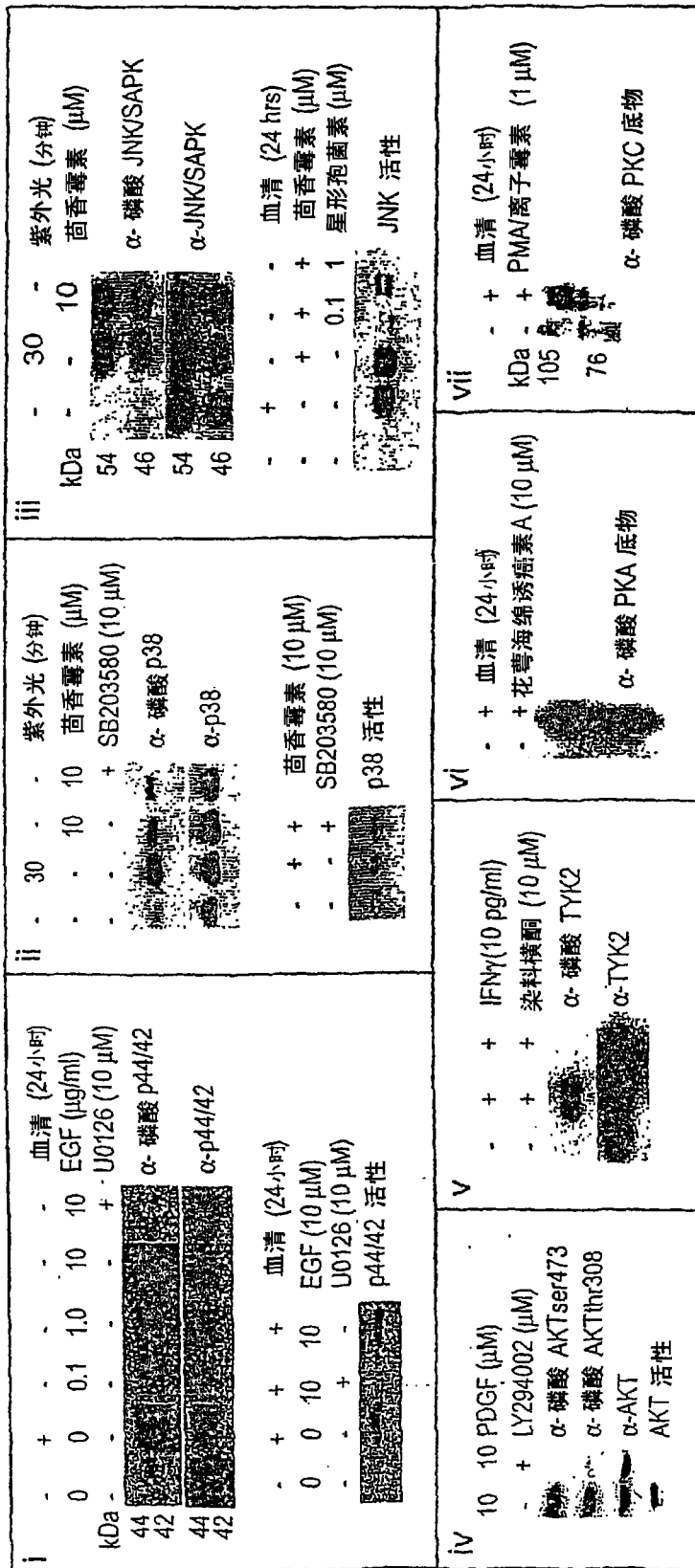


图 1A

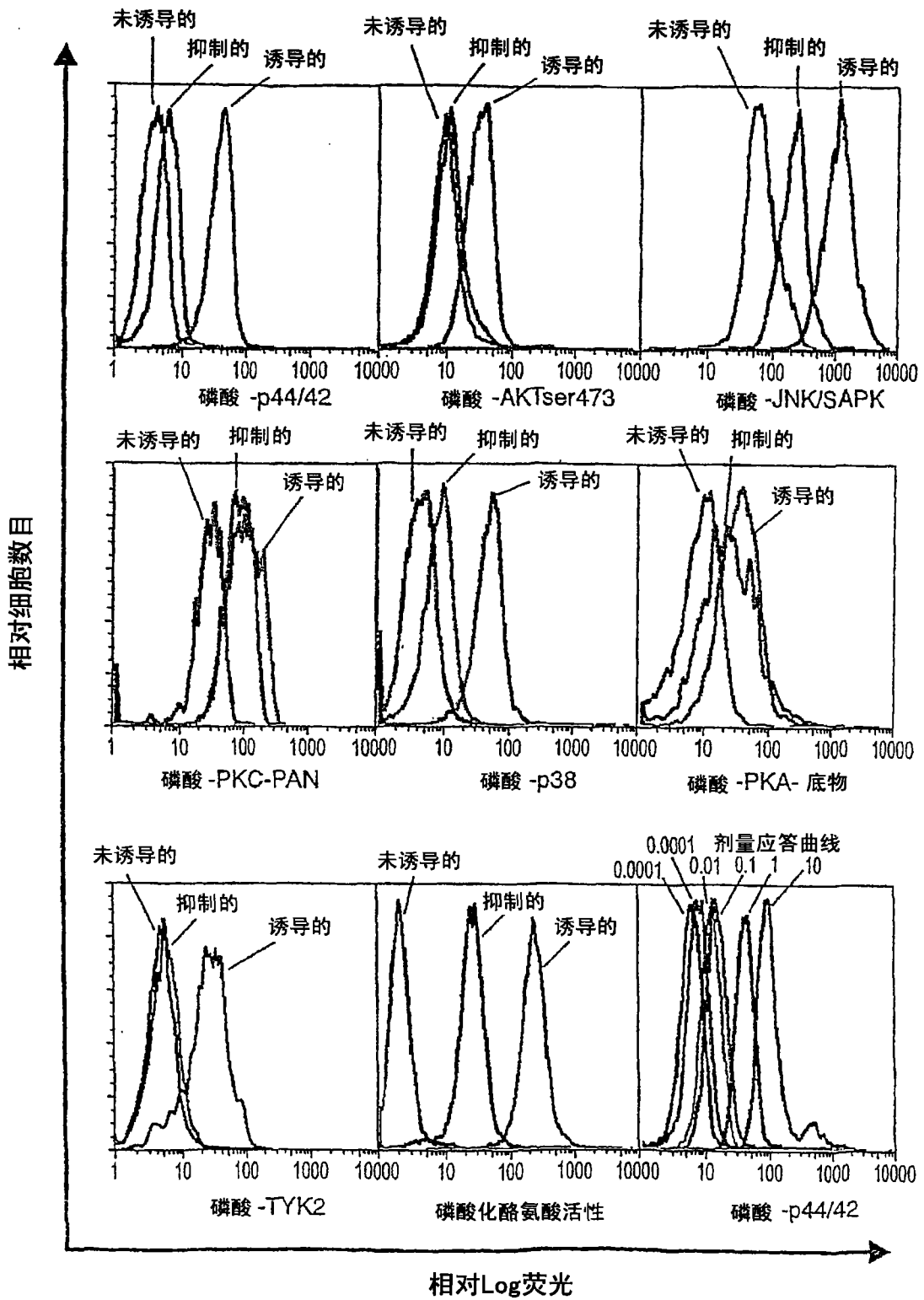


图 1B

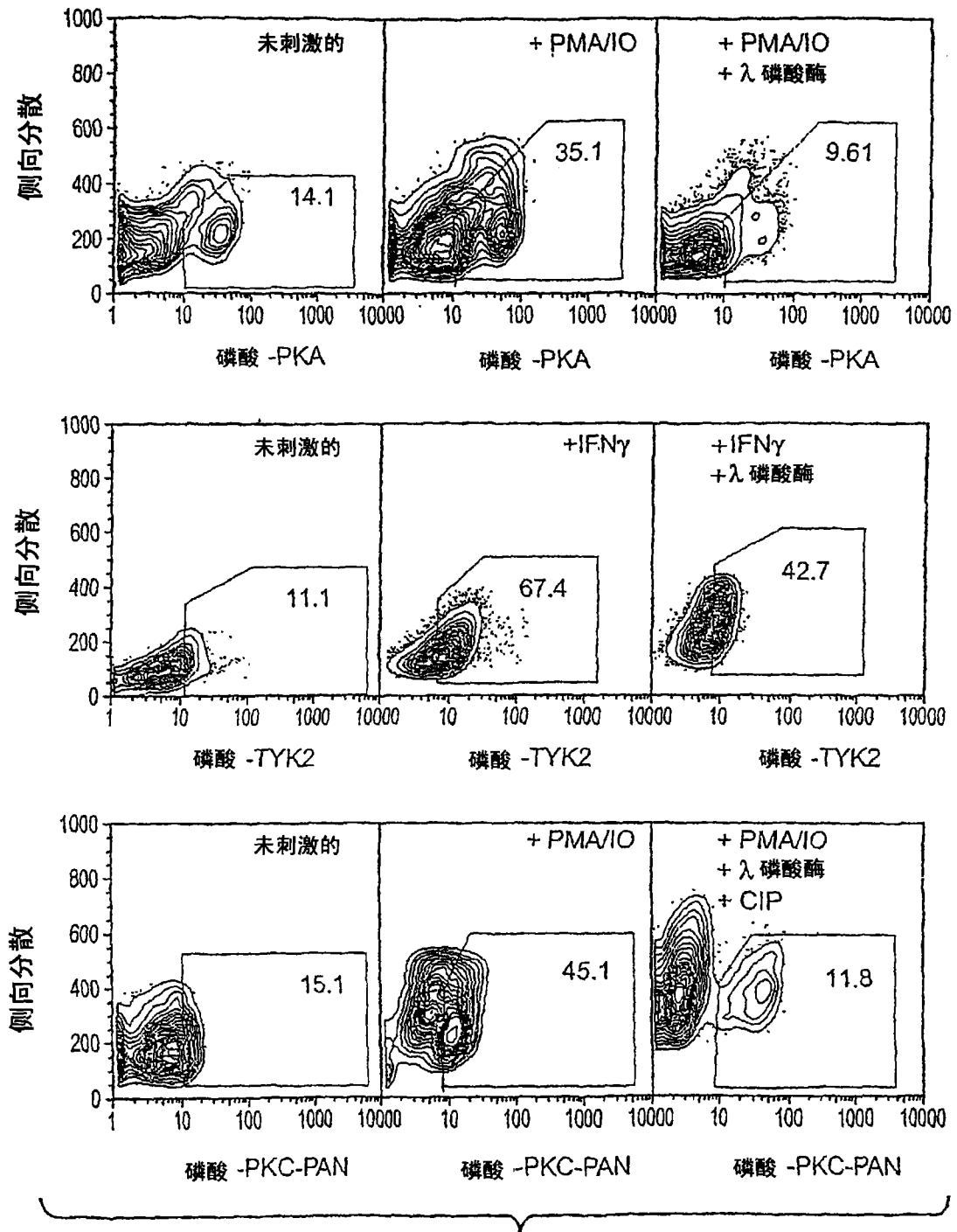


图 1C

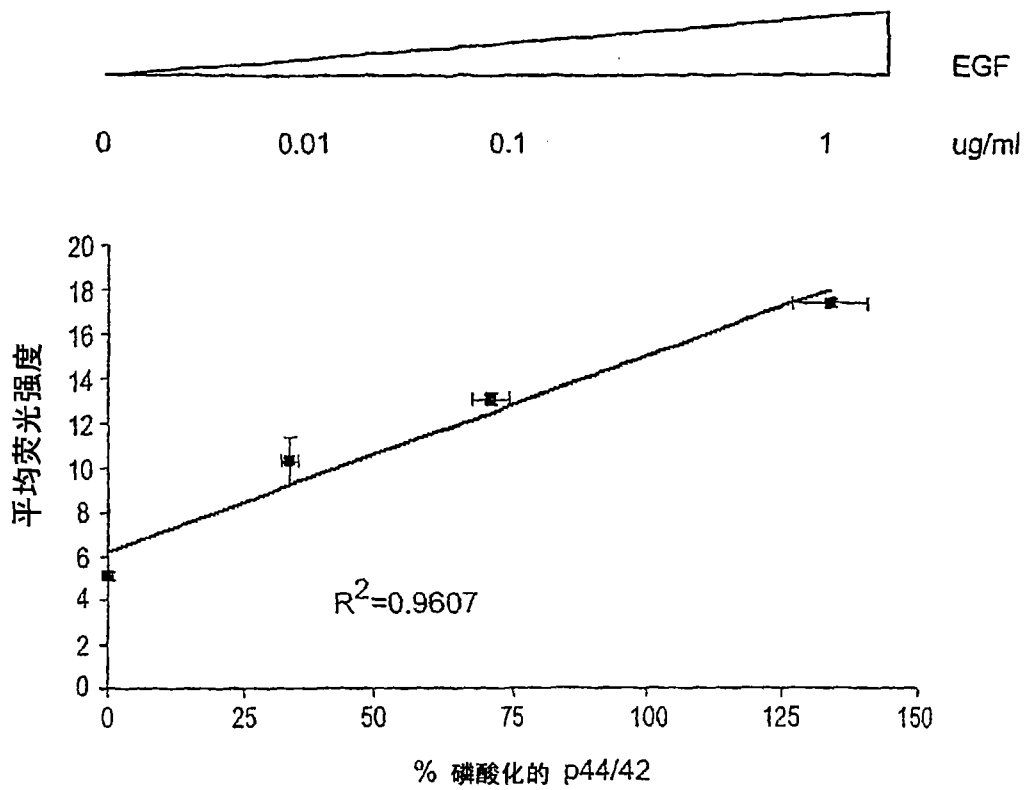


图 1D

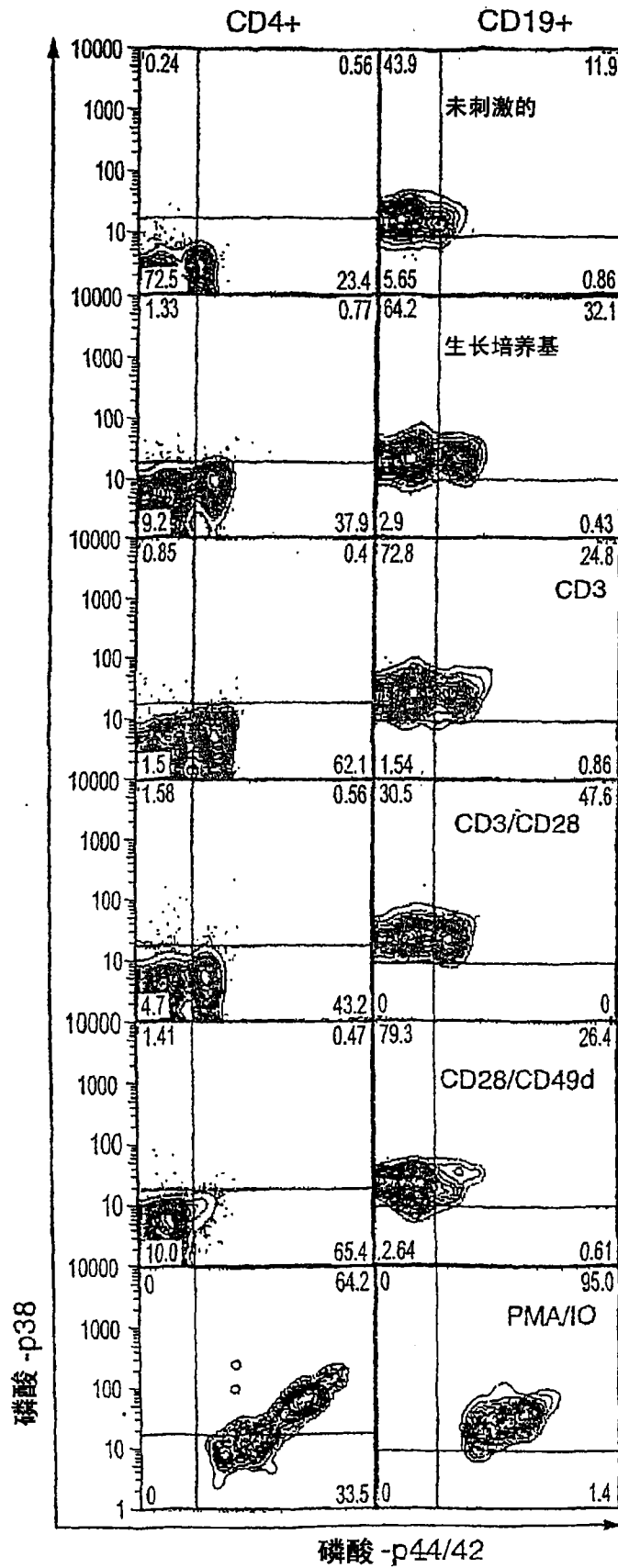
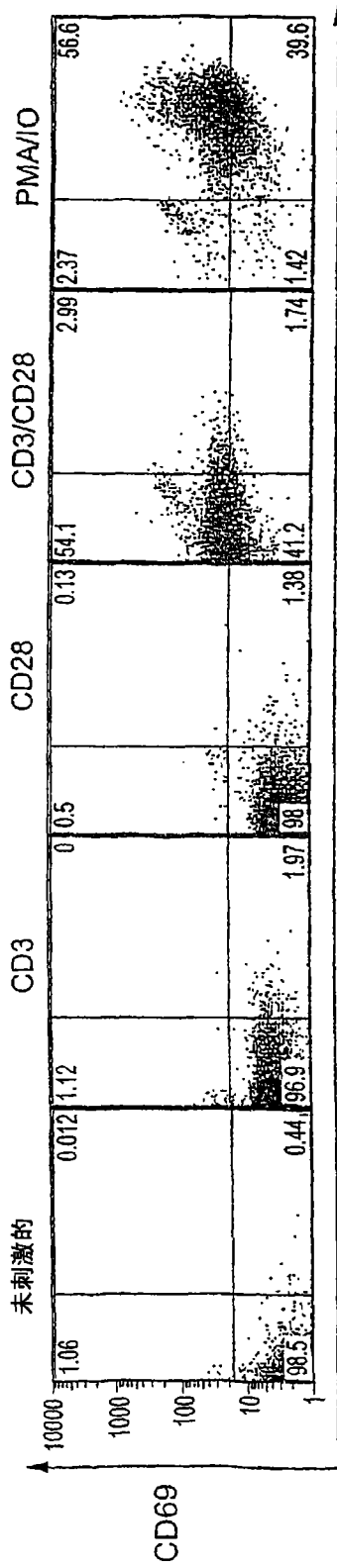


图 2A



磷酸-p44/42

图 2B

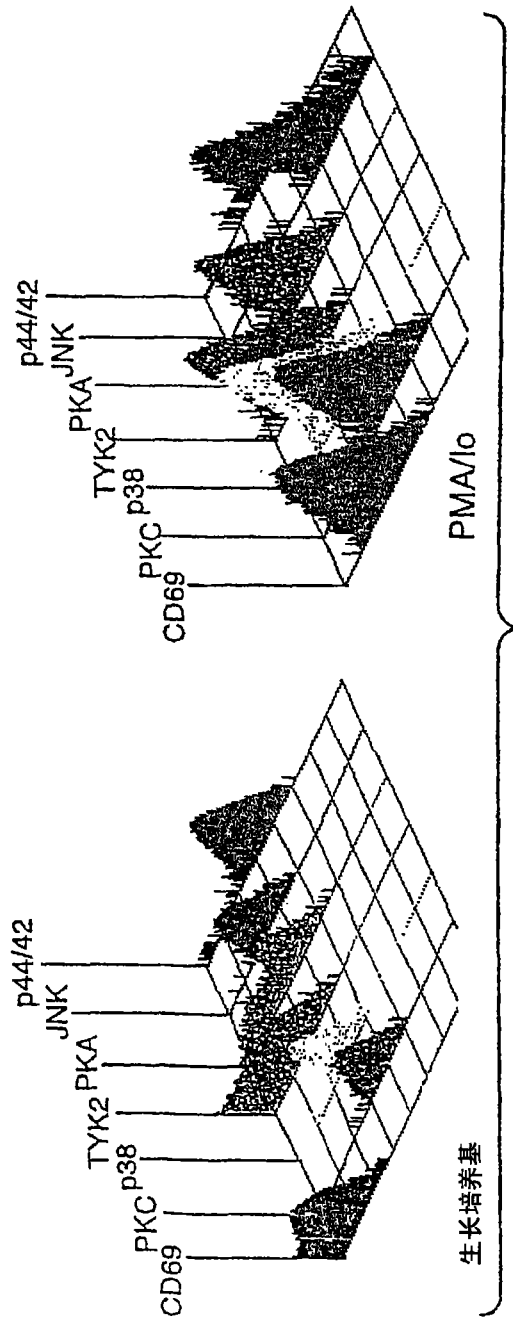


图 2C

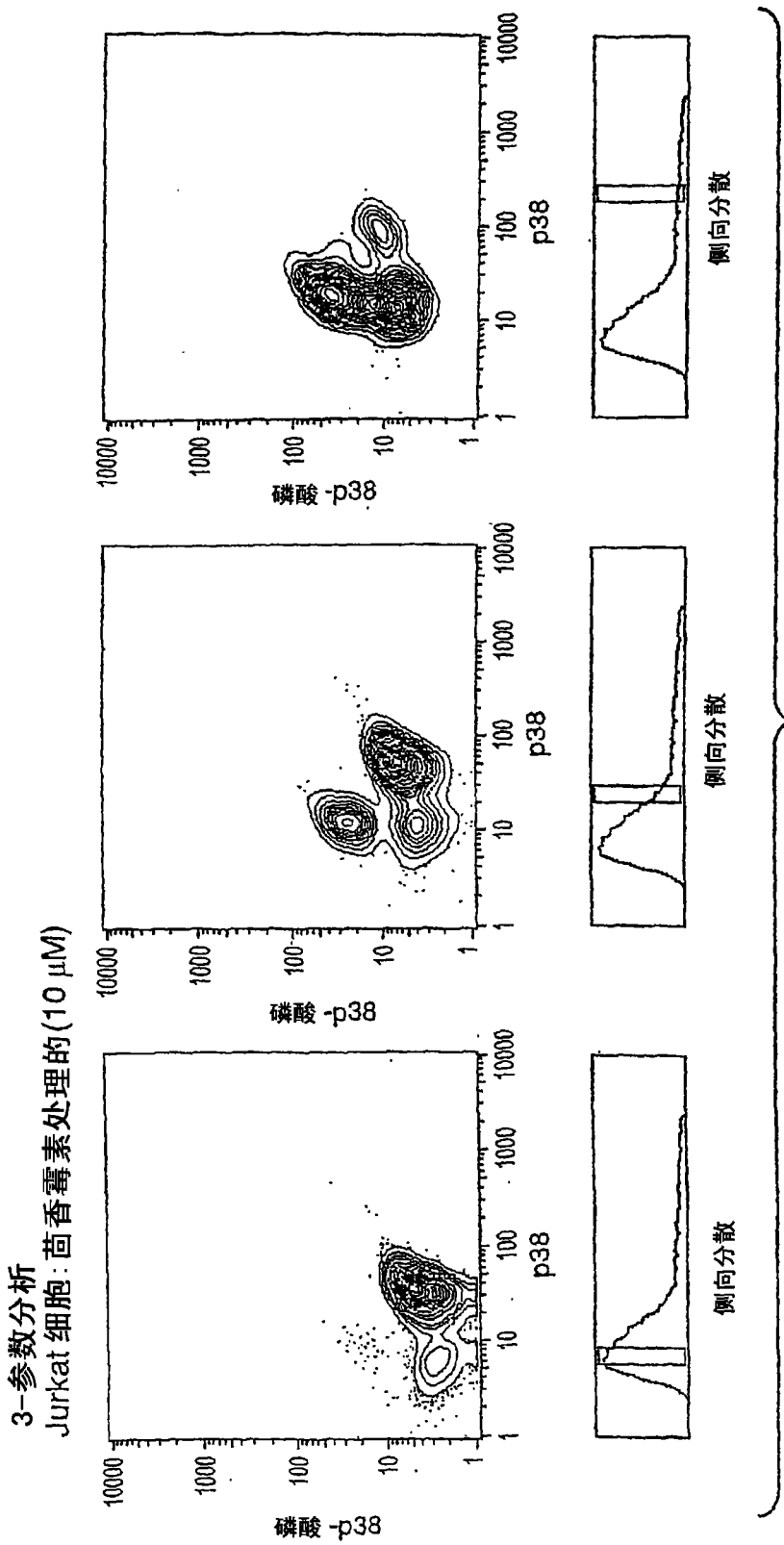


图 2D

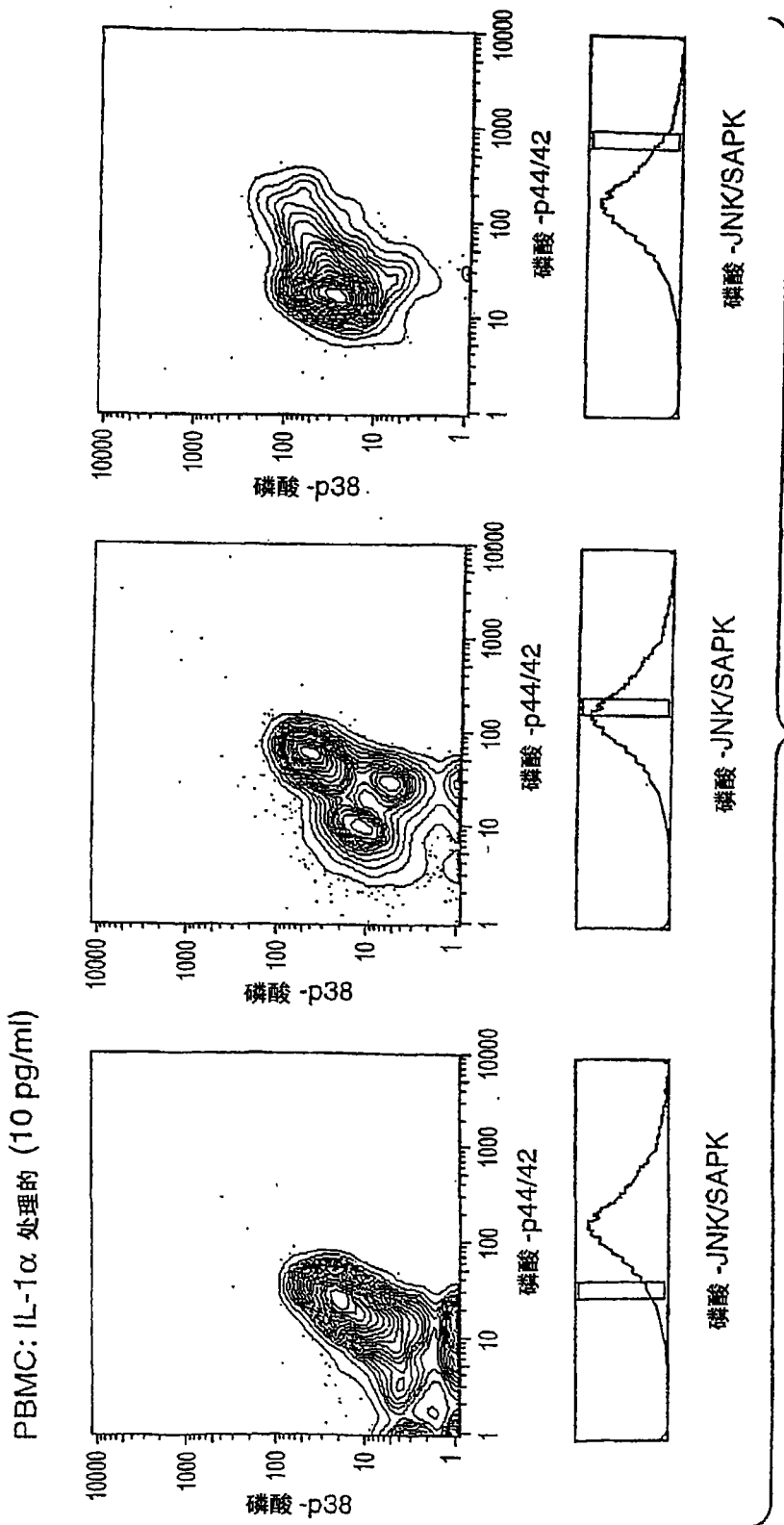


图 2E

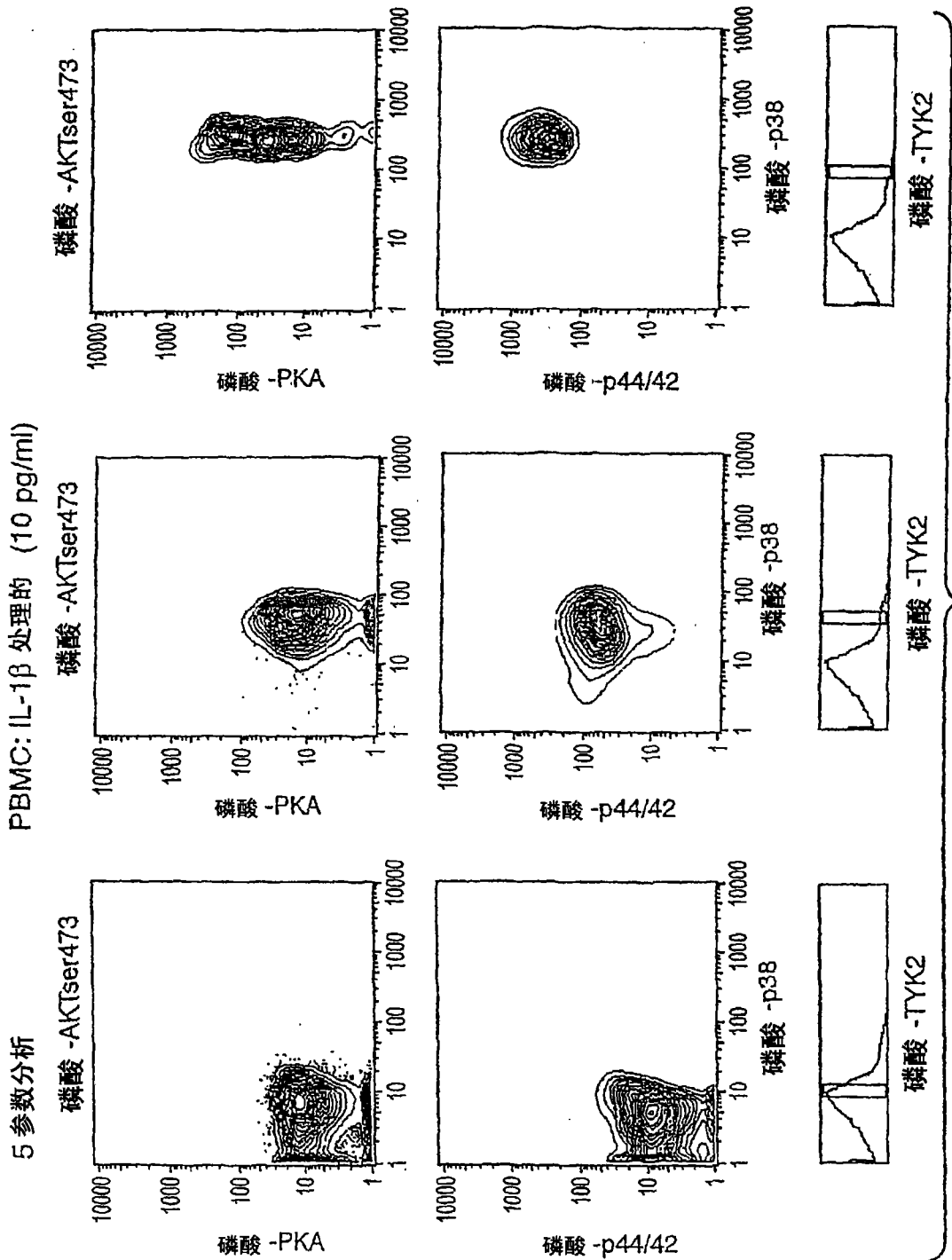


图 2F

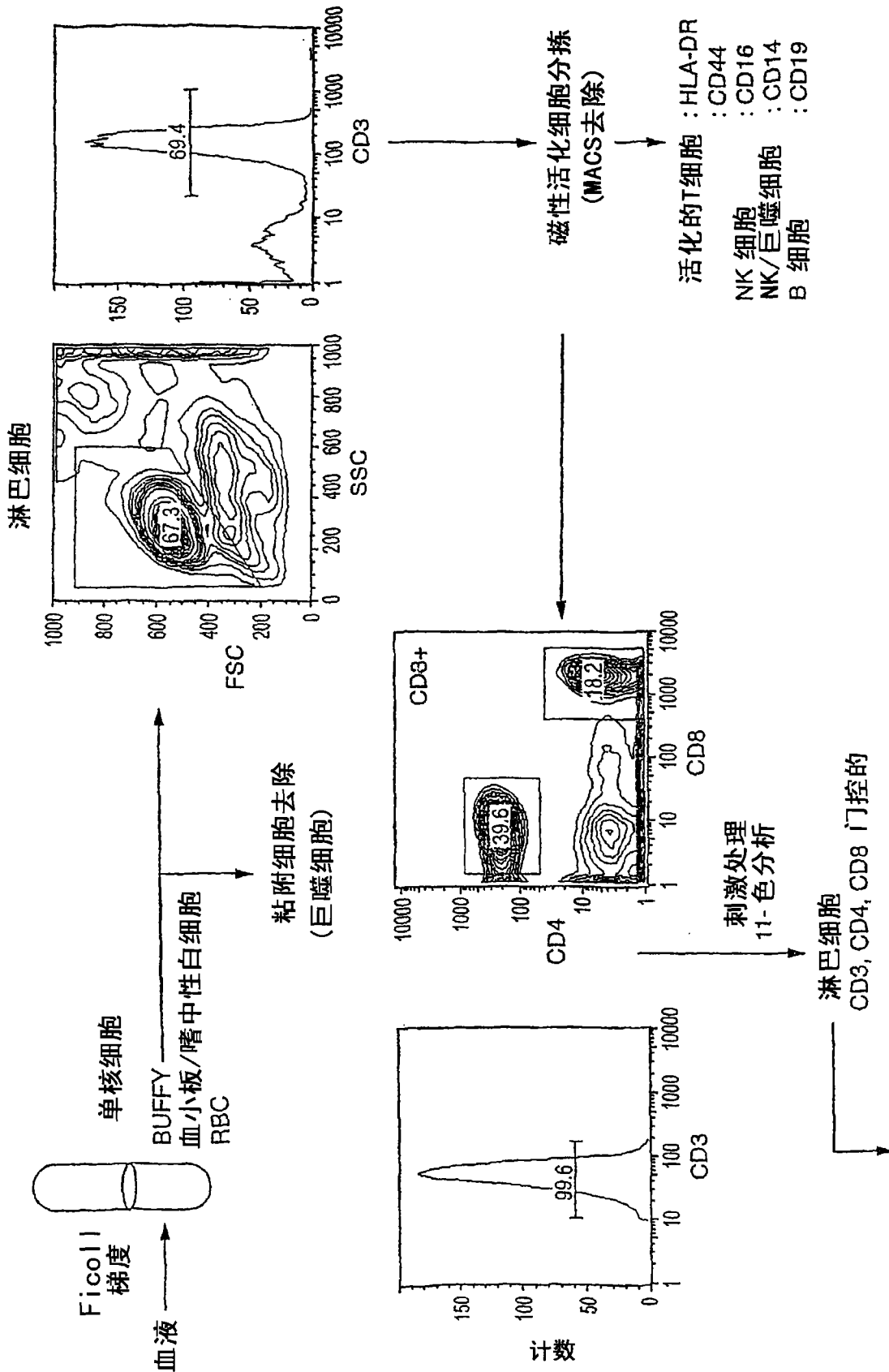


图 3A

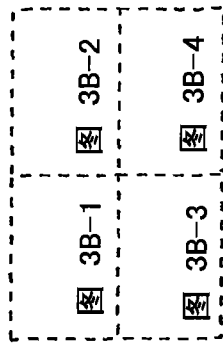


图 3B

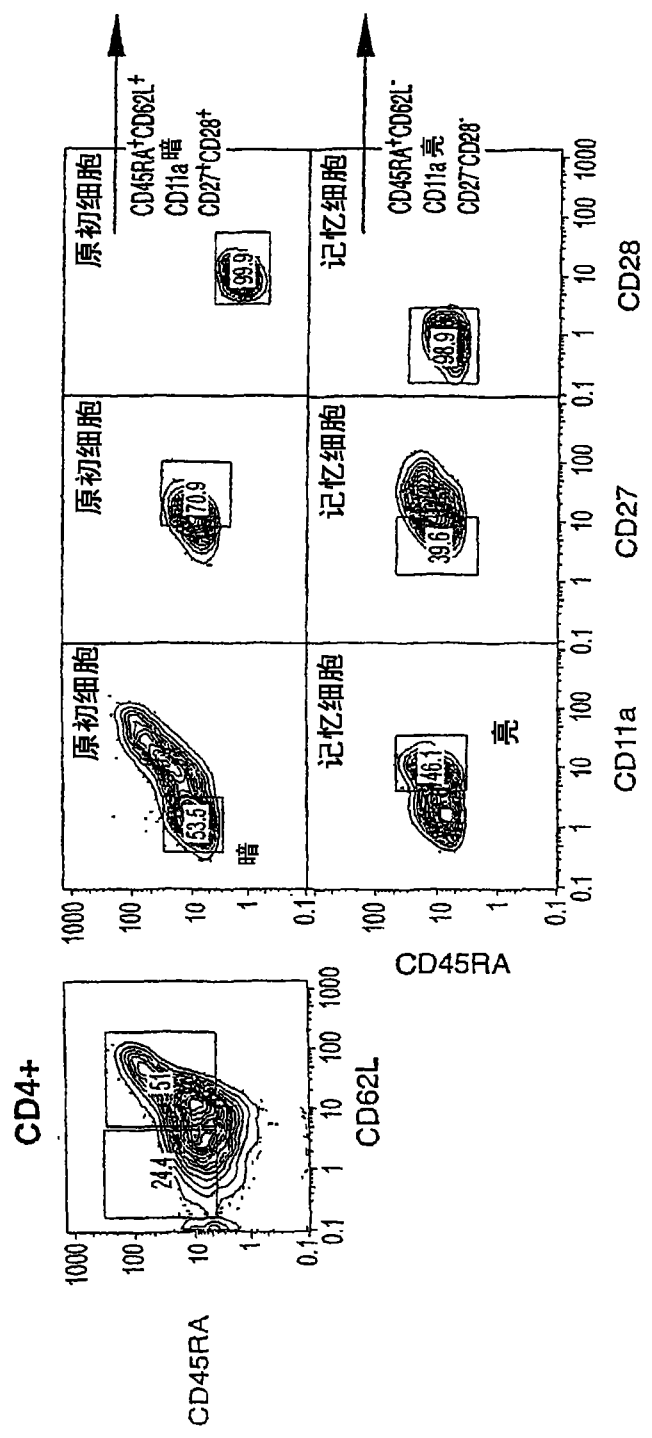


图 3B-1

8表面标记免疫表型

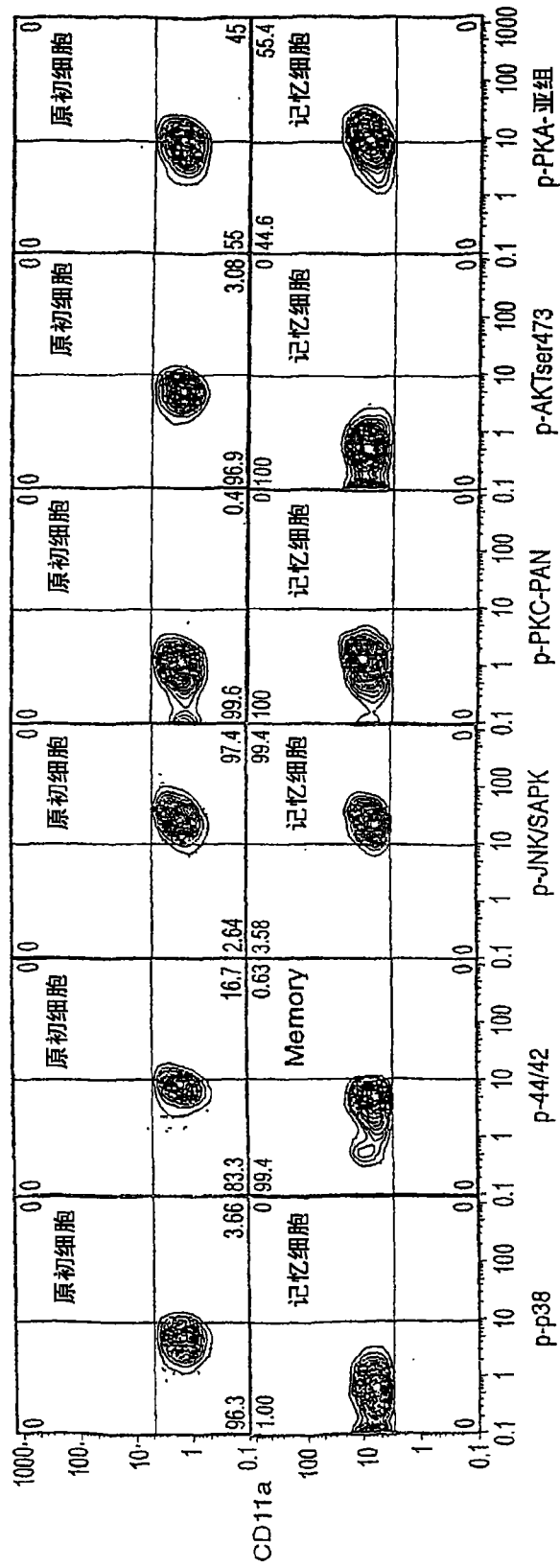


图 3B-2

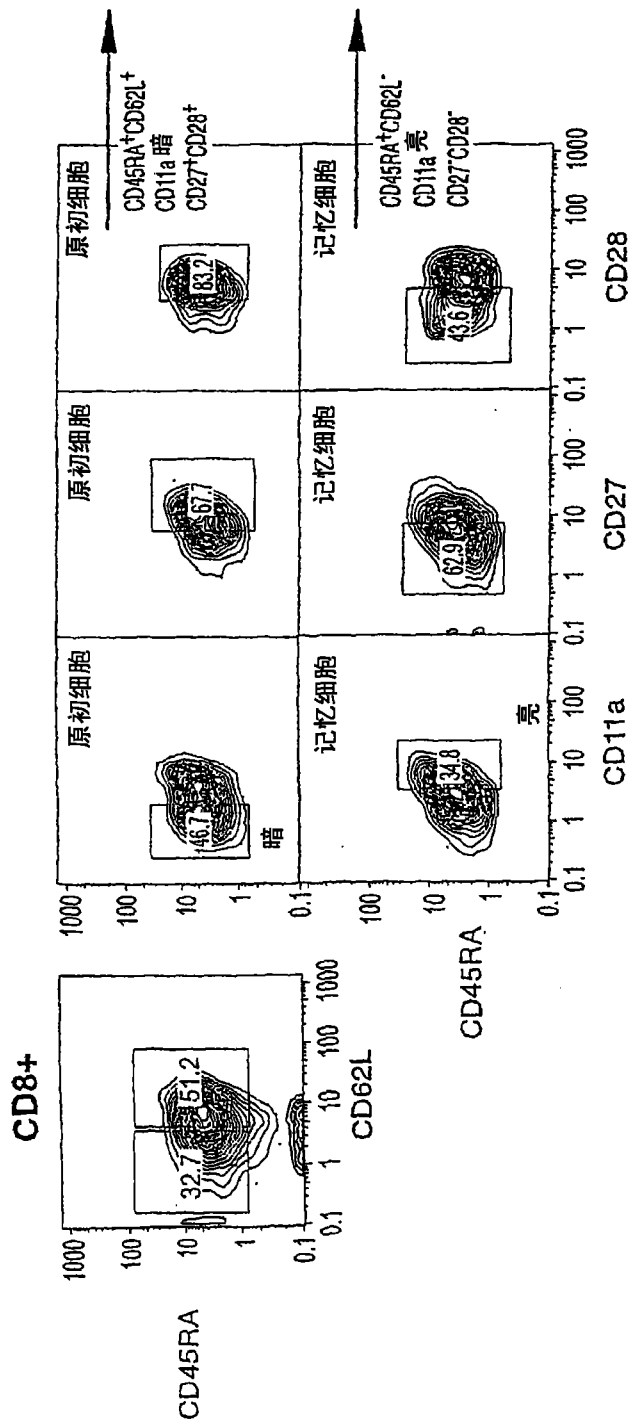
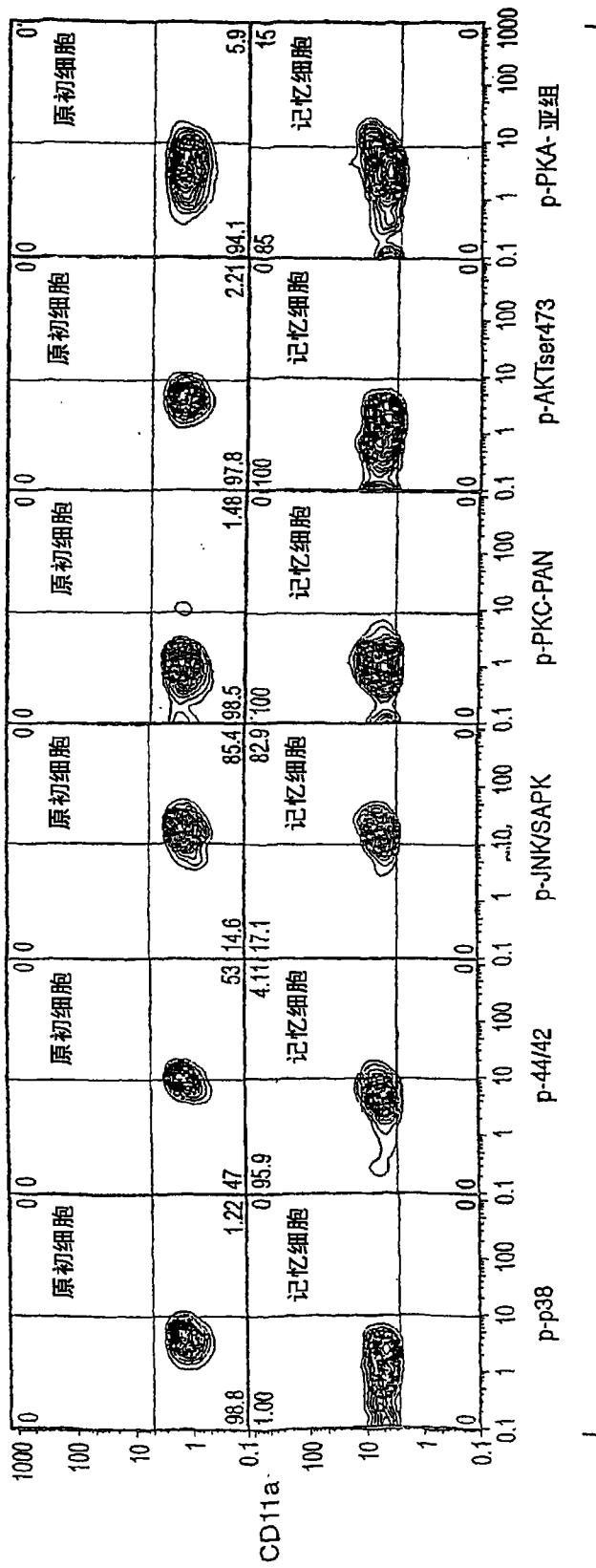


图 3B-3



多维分析

图 3B-4

CD4+ 原初细胞: CD3+CD4+CD8-CD45+CD62L+CD11a^暗 CD27+CD28+
 记忆细胞: CD3+CD4+CD8-CD45+CD62L-CD11a^亮CD27-CD28-

CD8+ 原初细胞: CD3+CD4-CD8+CD45+CD62L+CD11a^暗 CD27+CD28+
 记忆细胞: CD3+CD4-CD8+CD45+CD62L-CD11a^亮CD27-CD28-

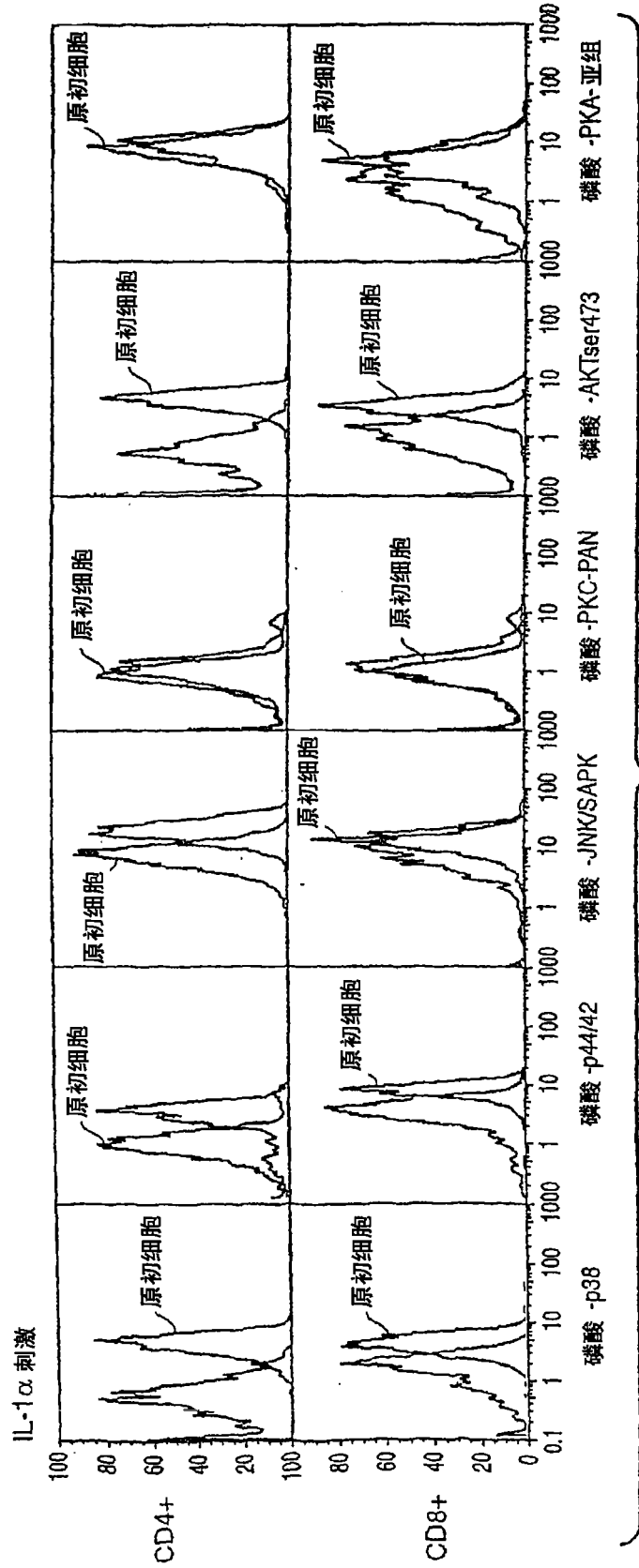


图 4B

CD4+ 原初细胞: CD3+CD4+CD8⁻CD45+CD62L+CD11a^暗 CD27+CD28+
 记忆细胞: CD3+CD4+CD8⁻CD45+CD62L⁻CD11a^亮CD27⁻CD28⁻

CD8+ 原初细胞: CD3+CD4⁻CD8+CD45+CD62L+CD11a^暗 CD27+CD28+
 记忆细胞: CD3+CD4⁻CD8+CD45+CD62L⁻CD11a^亮CD27⁻CD28⁻

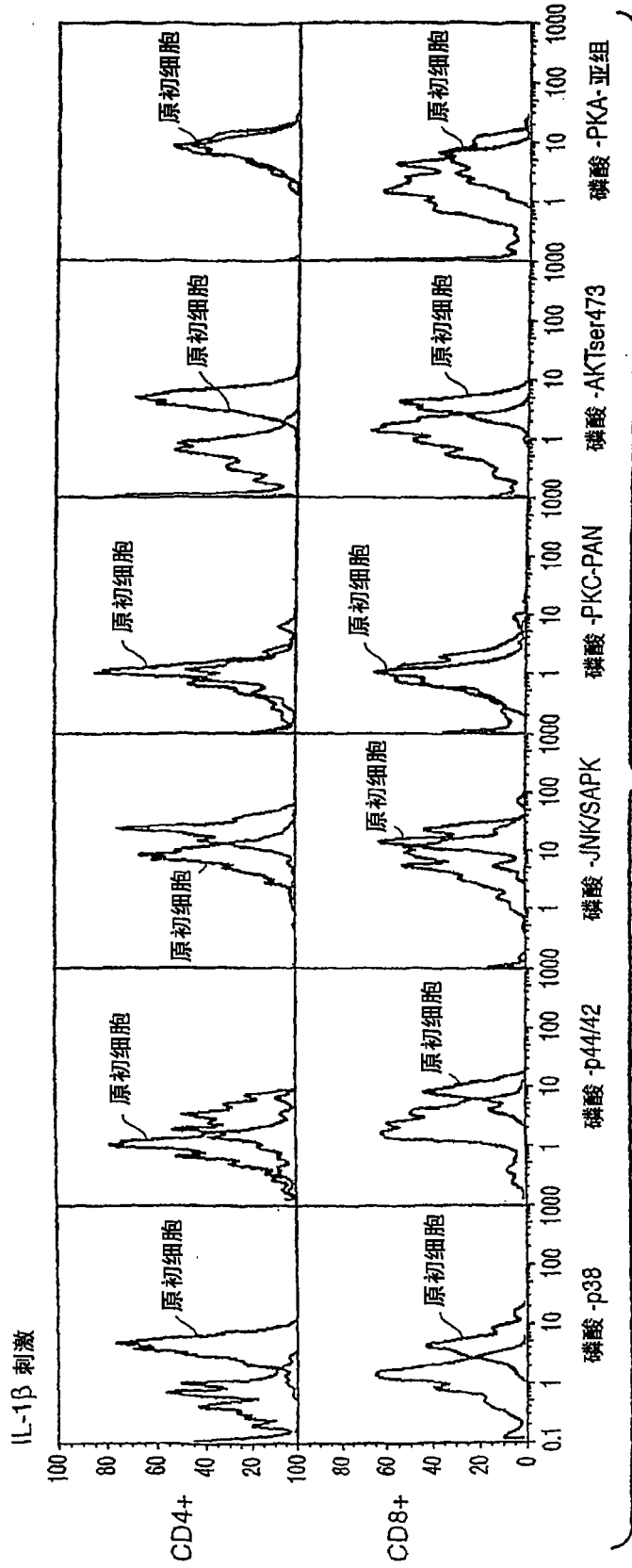


图 4C

CD4+ 原初细胞: CD3+CD4+CD8-CD45+CD62L+CD11a^暗 CD27+CD28+
 记忆细胞: CD3+CD4+CD8-CD45+CD62L-CD11a^亮CD27-CD28⁻

CD8+ 原初细胞: CD3+CD4-CD8+CD45+CD62L+CD11a^暗 CD27+CD28+
 记忆细胞: CD3+CD4-CD8+CD45+CD62L-CD11a^亮CD27-CD28⁻

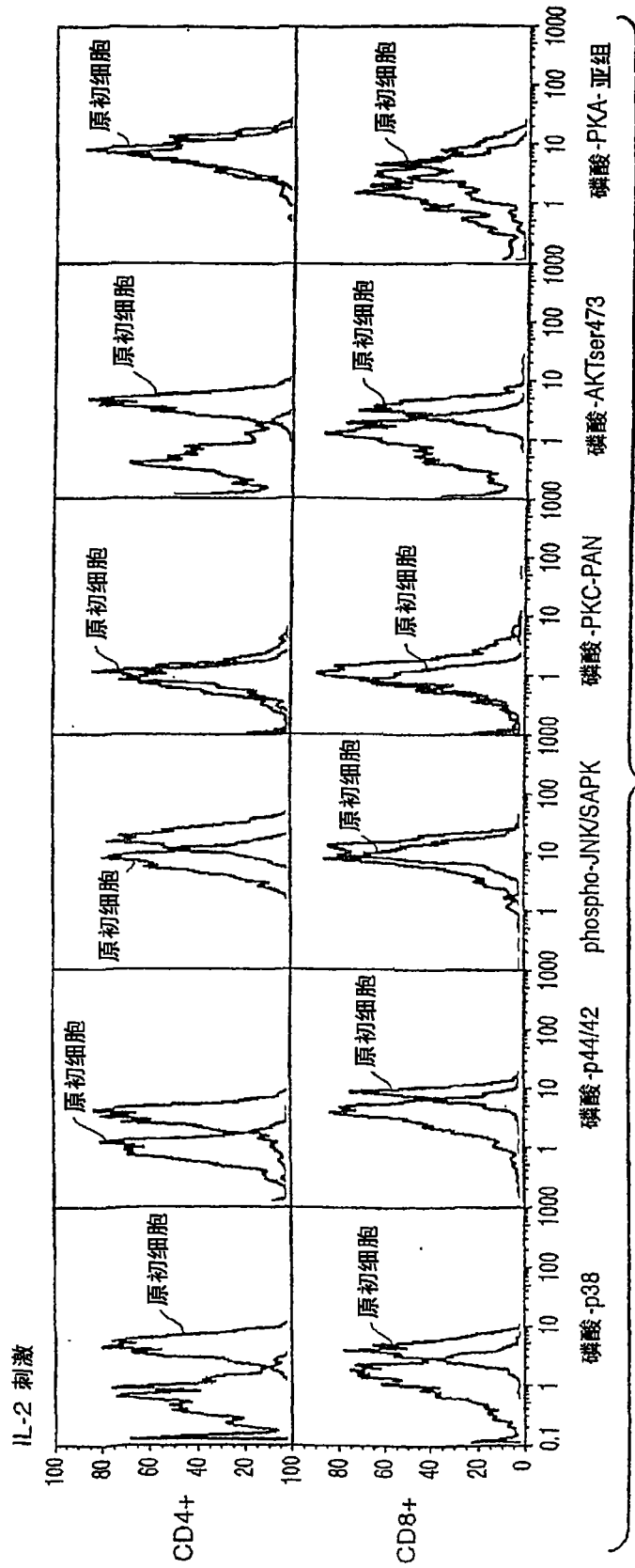


图 4D

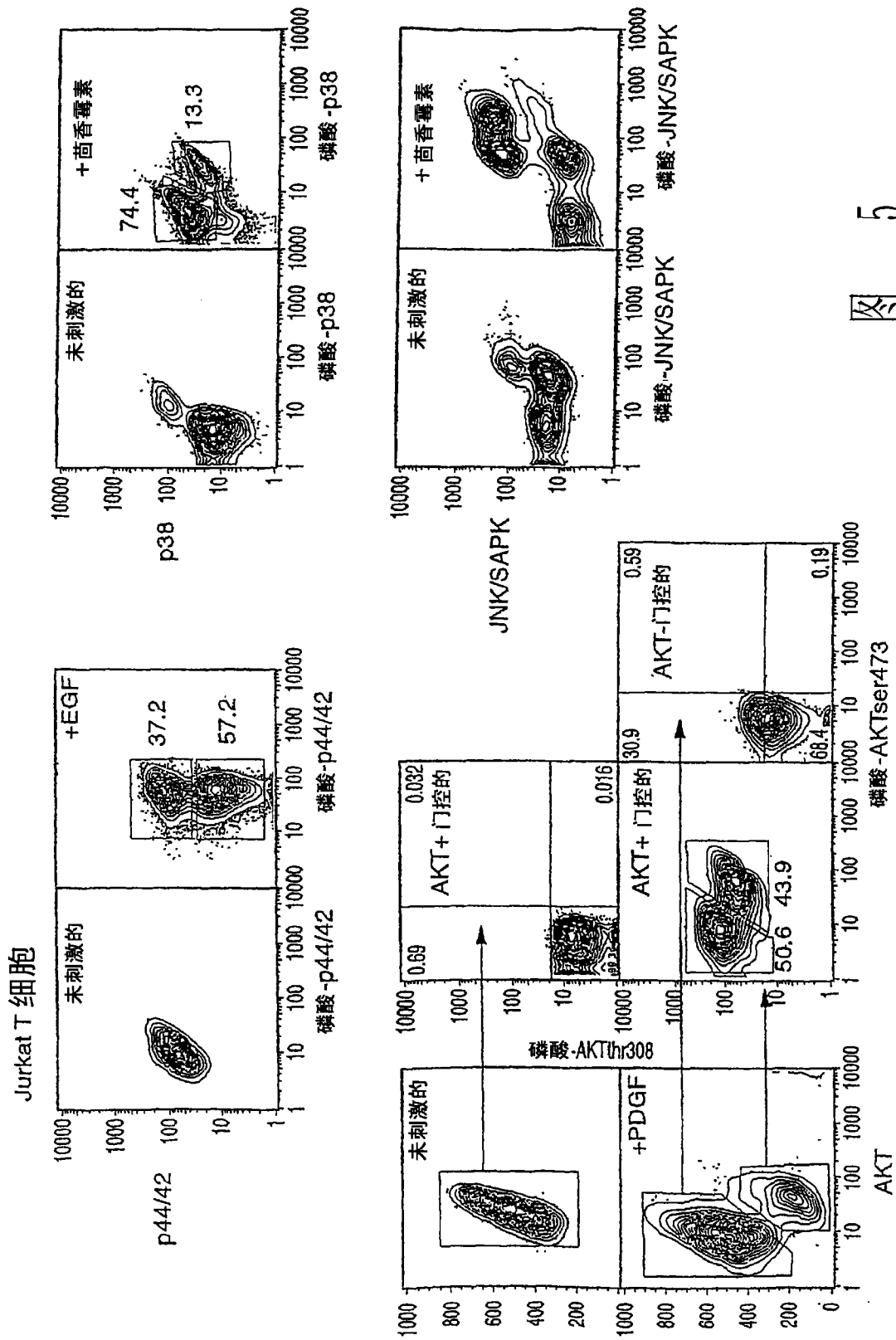


图 5

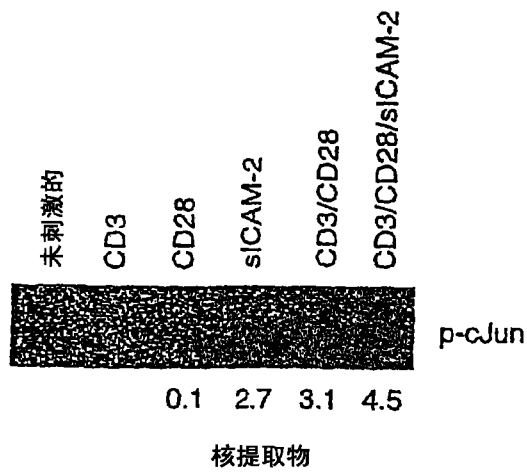


图 6A

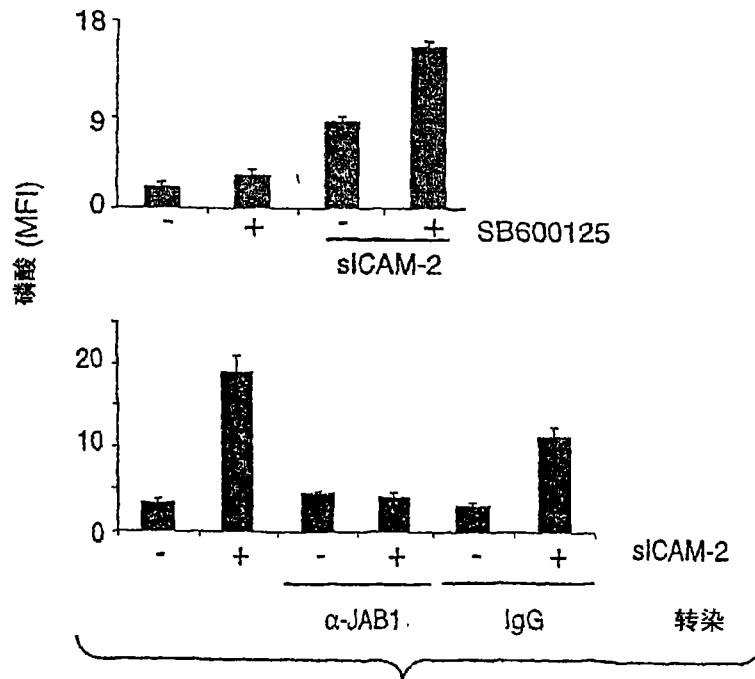


图 6B

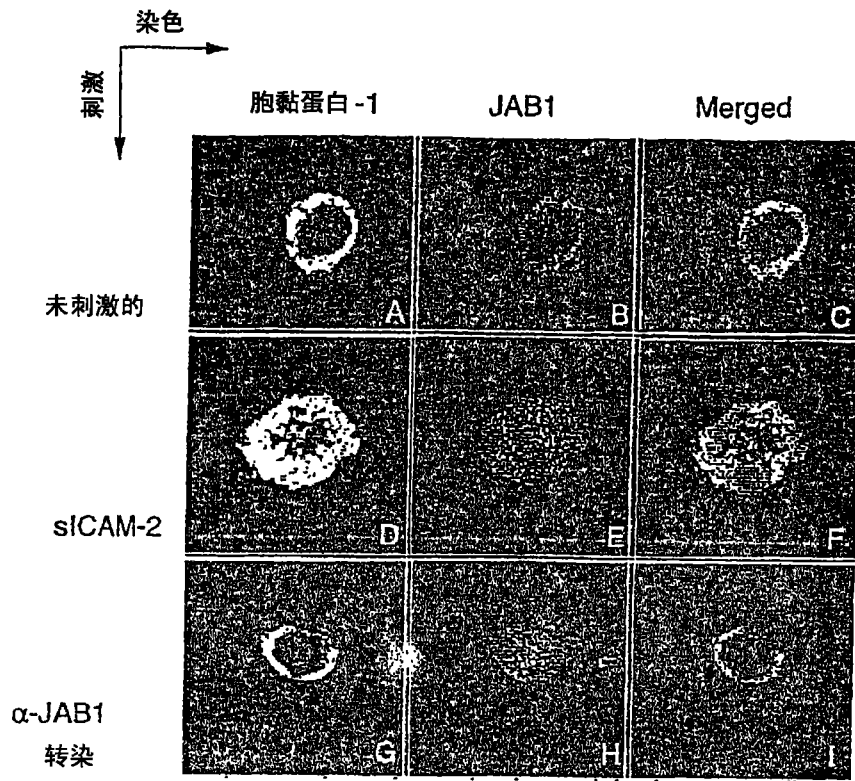


图 6C

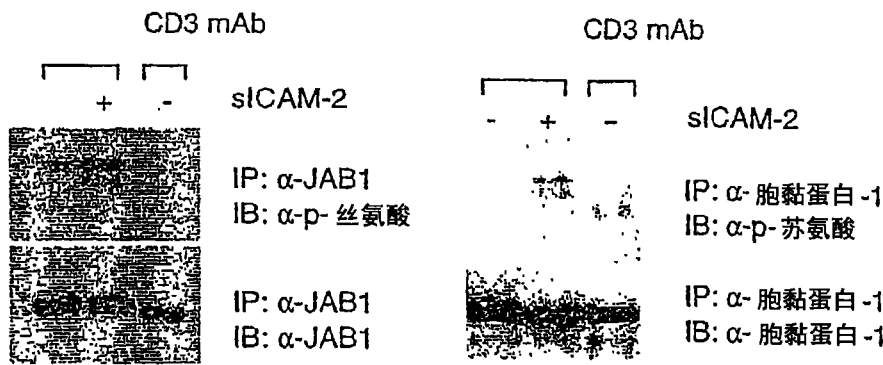


图 6D

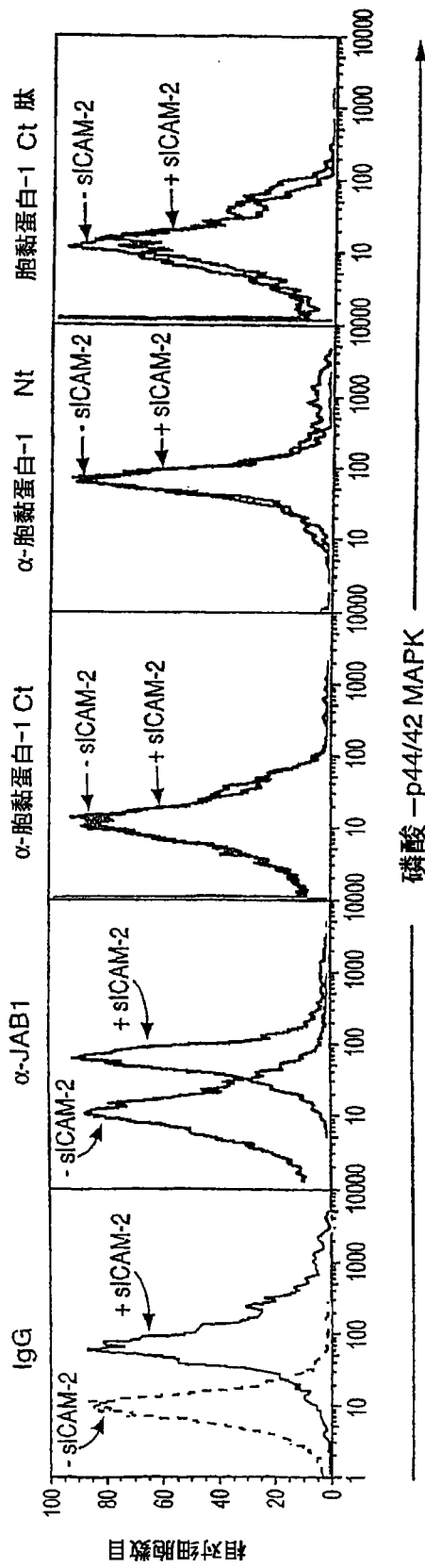
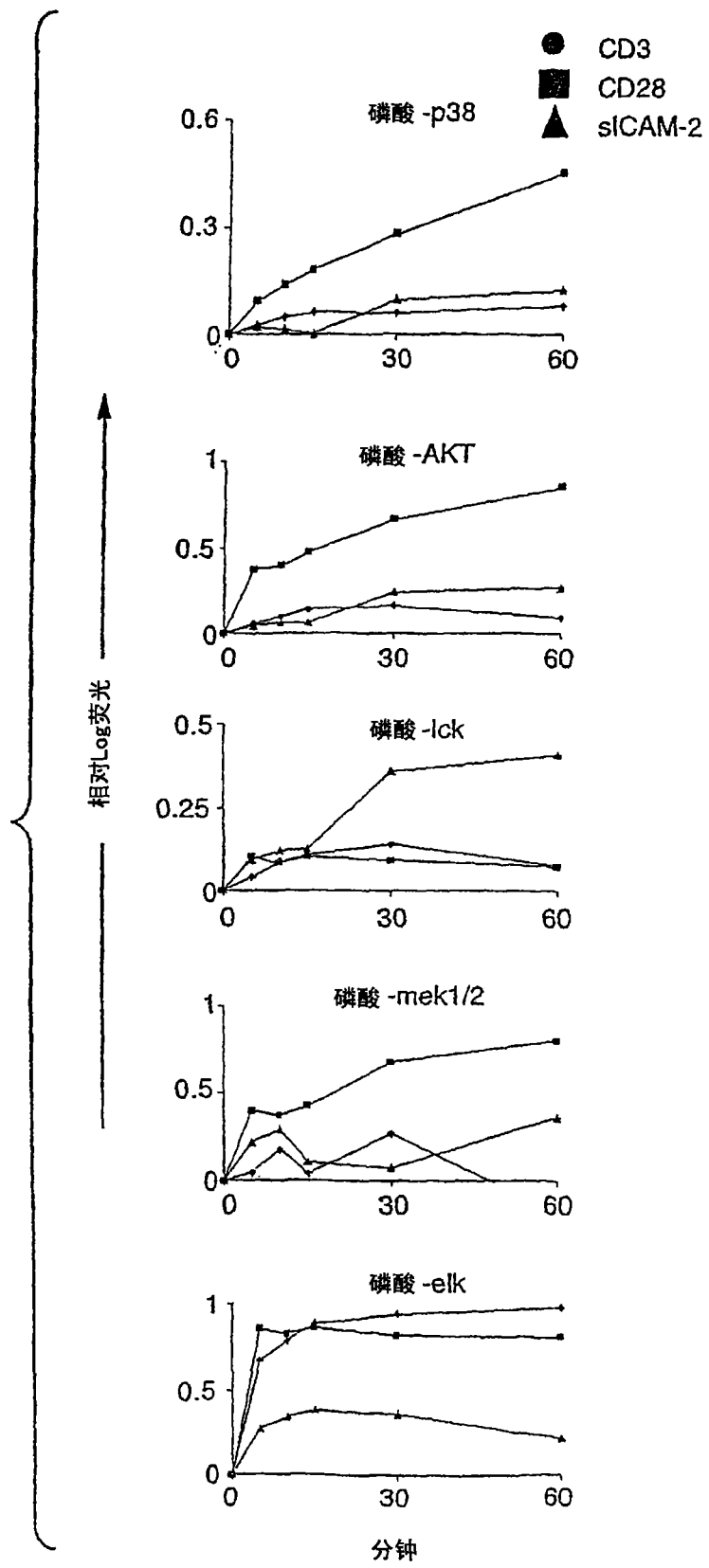


图 6E

图 6F



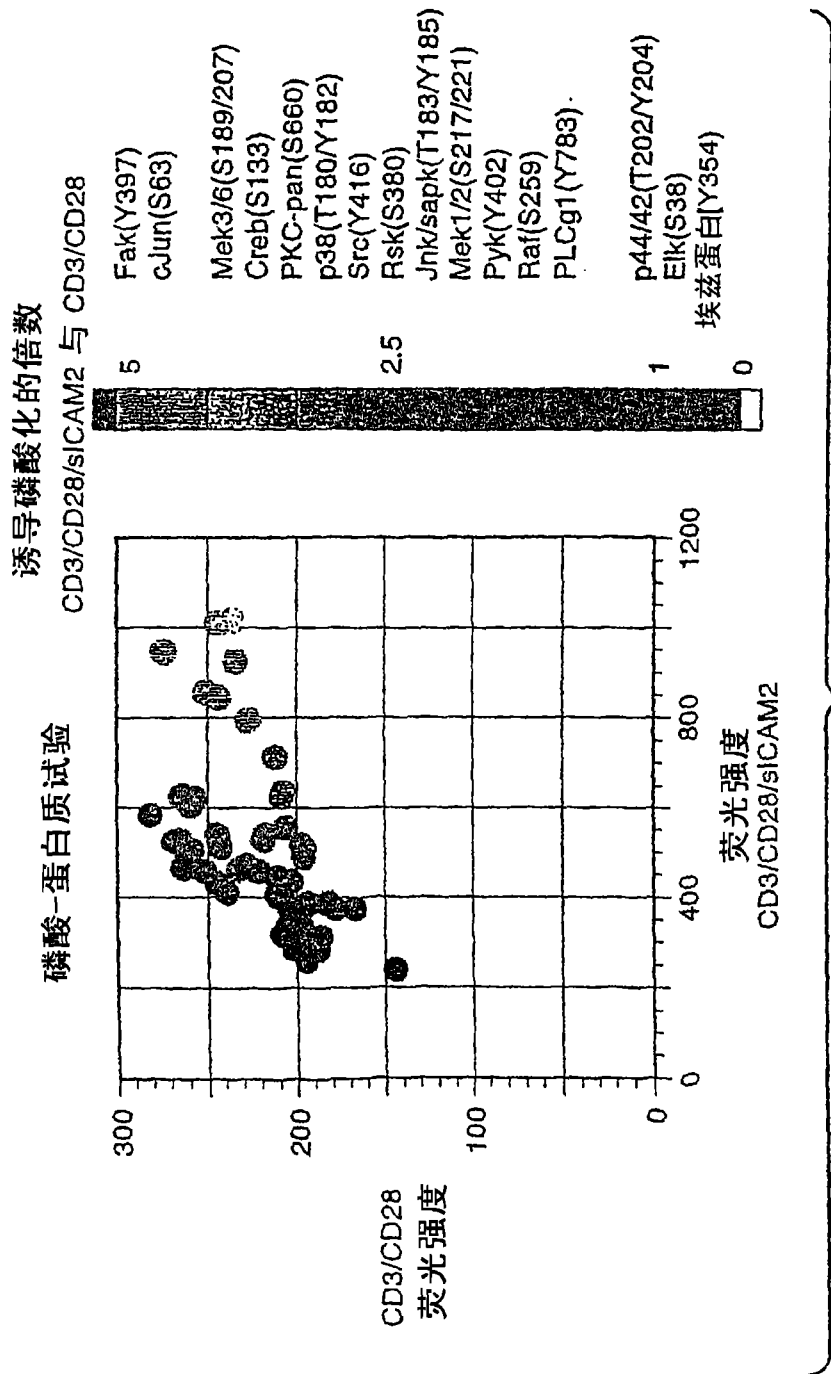


图 7A

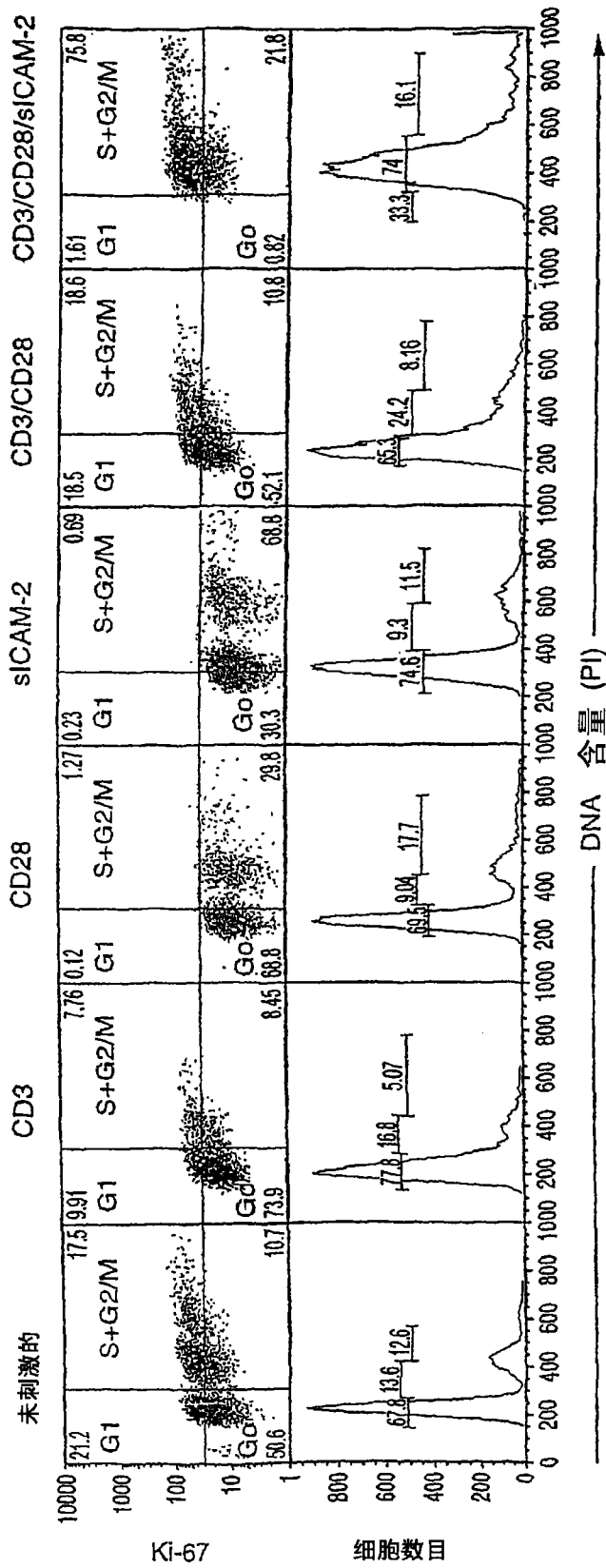
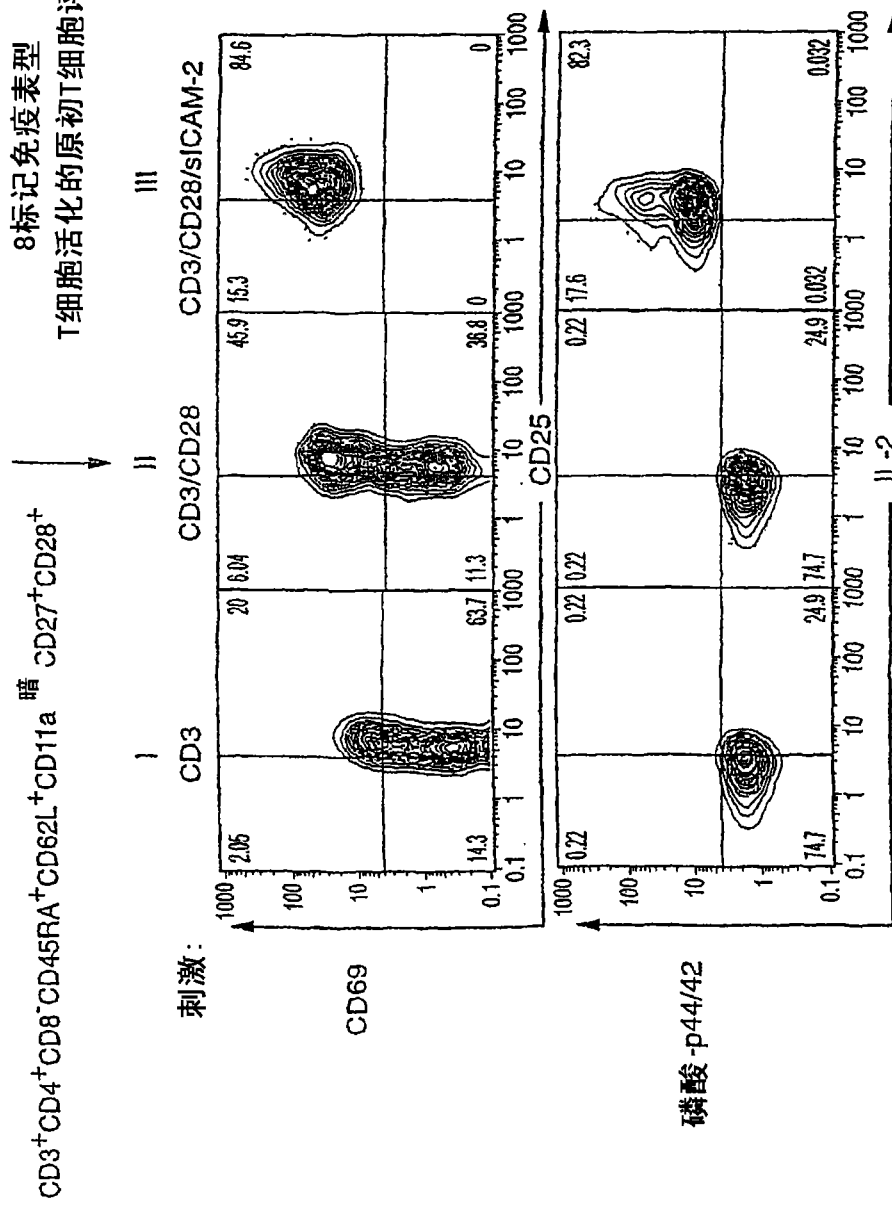


图 7B

8标记免疫表型
T细胞活化的原初T细胞评估



多维分析 (33参数)

图 8A-2

图 8A-1

图 8A

CD3+CD4+CD8-CD45RA+CD62L+CD11a^暗 CD27+CD28+ 门控的细胞(按照图3)

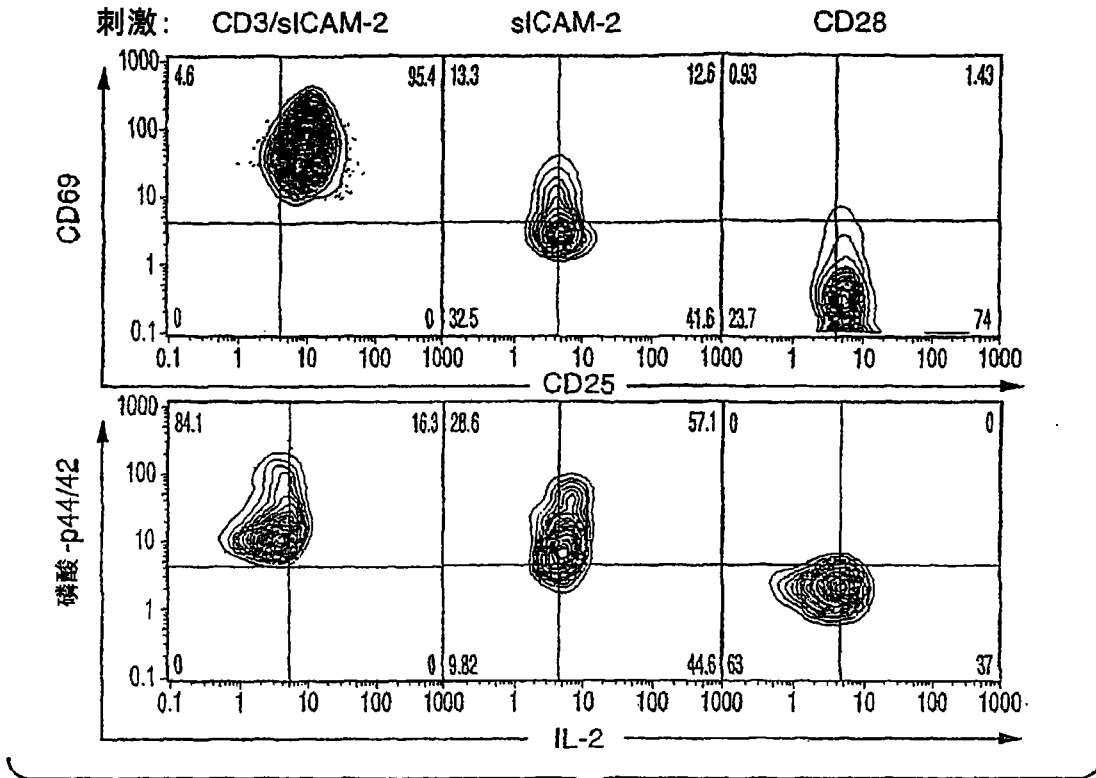


图 8B

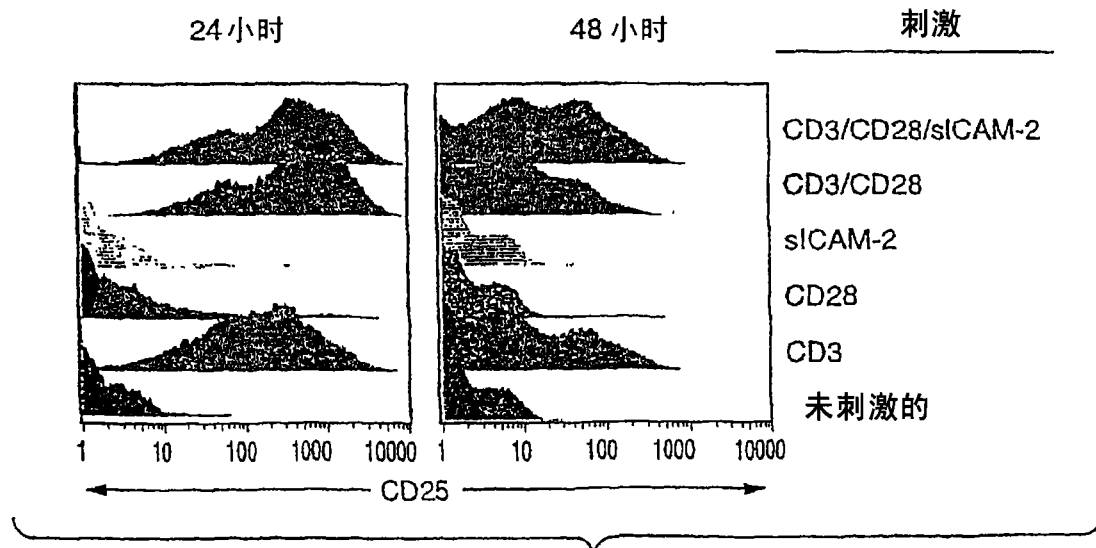


图 8C

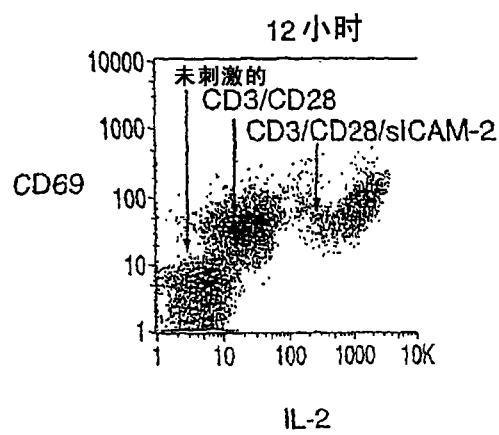
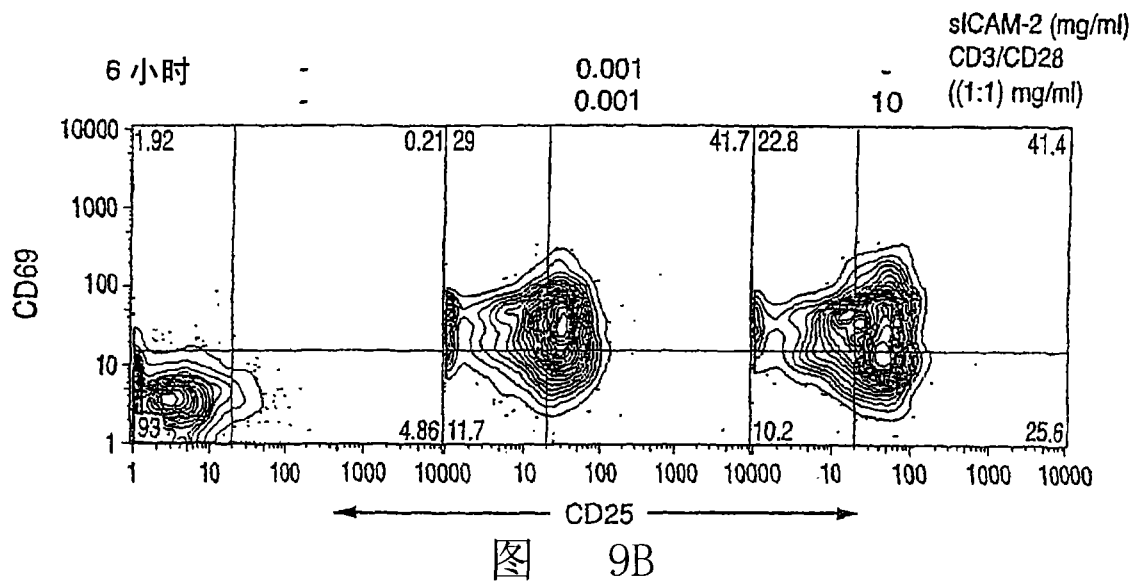
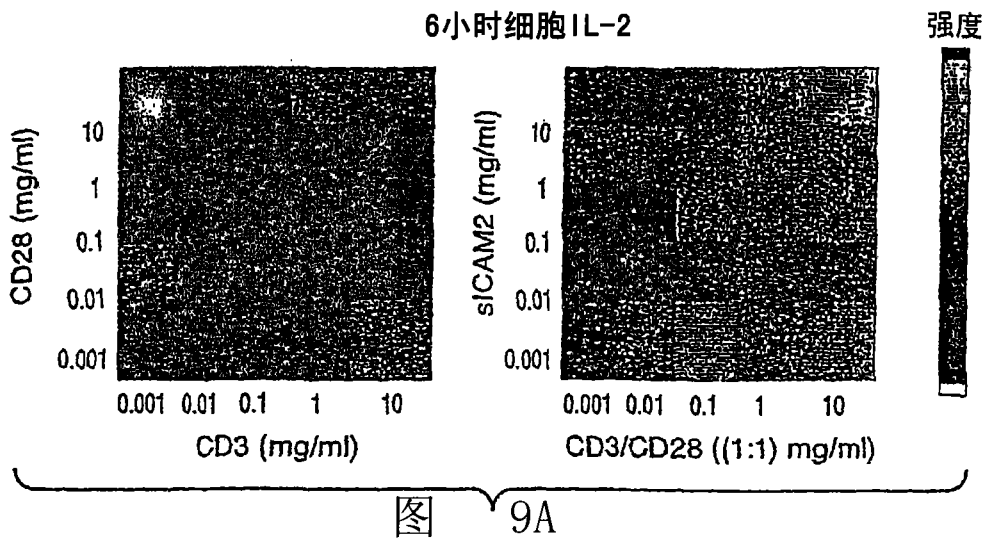
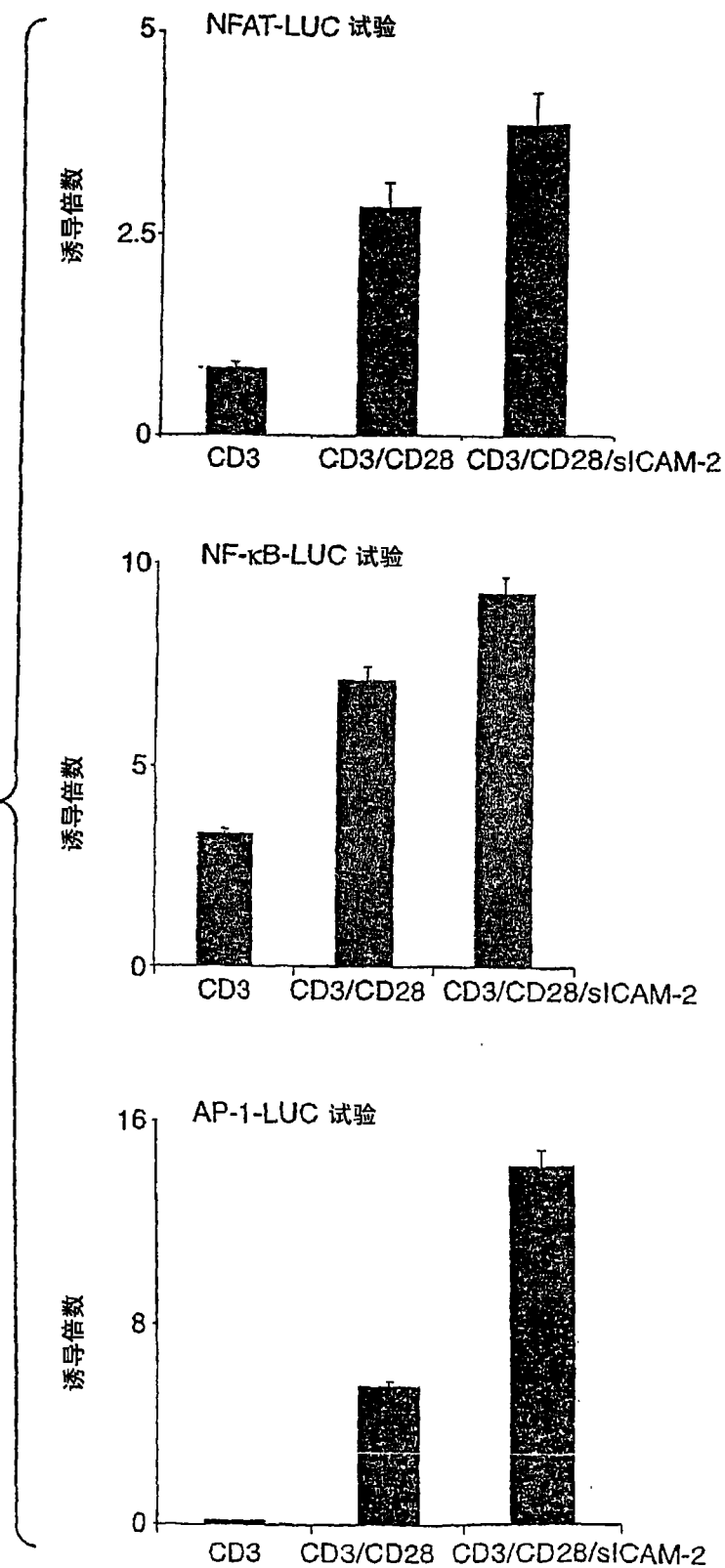


图 10A



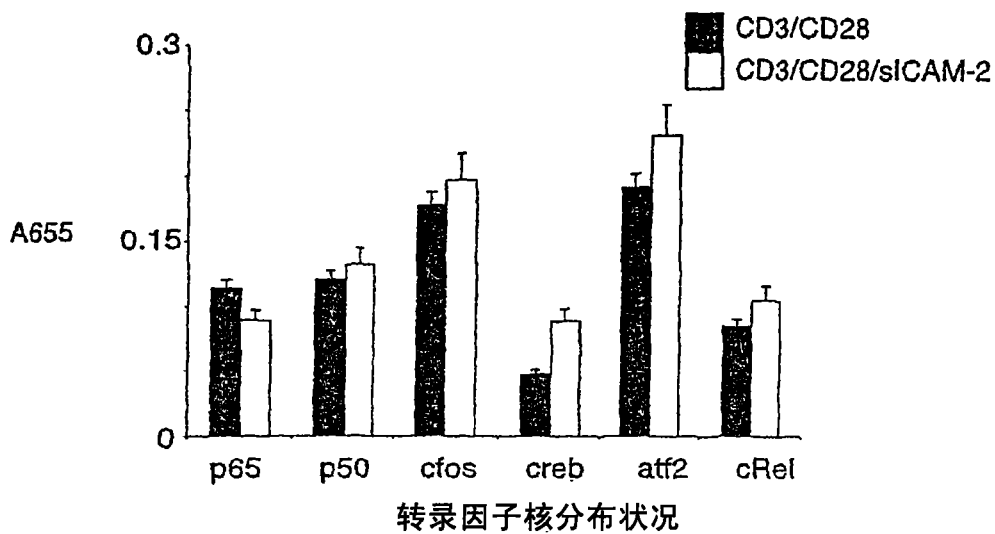


图 10B

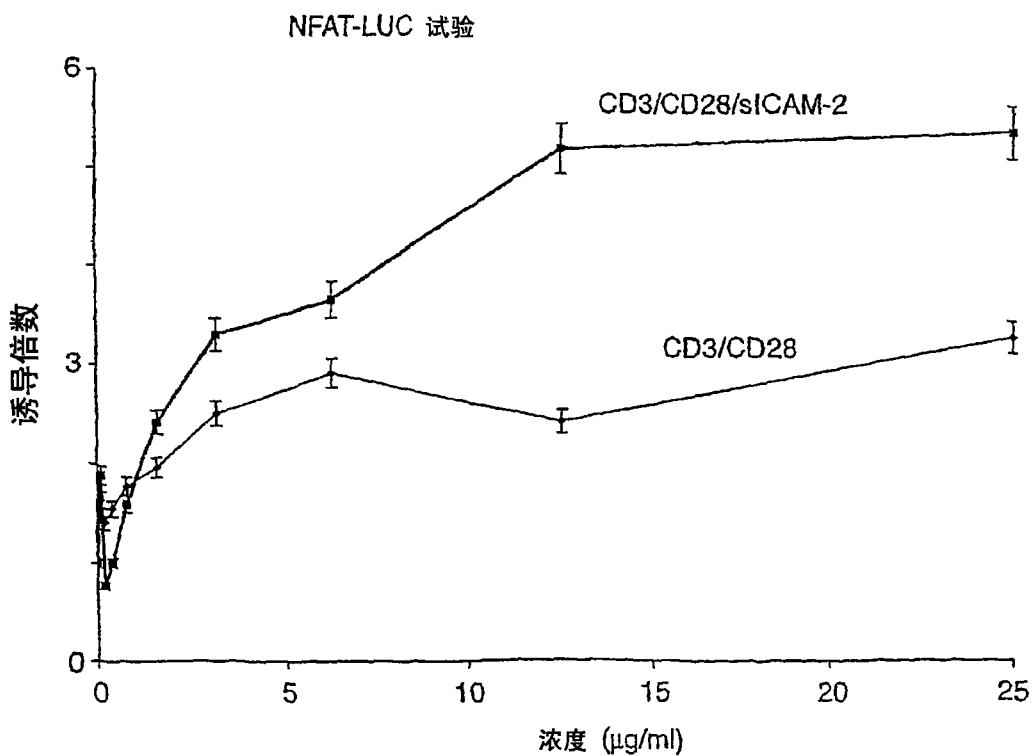


图 10C

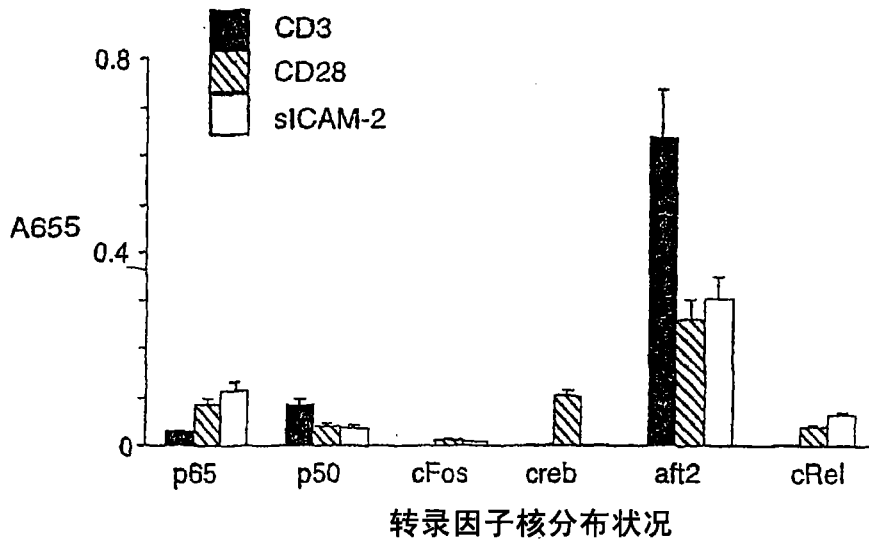


图 10D

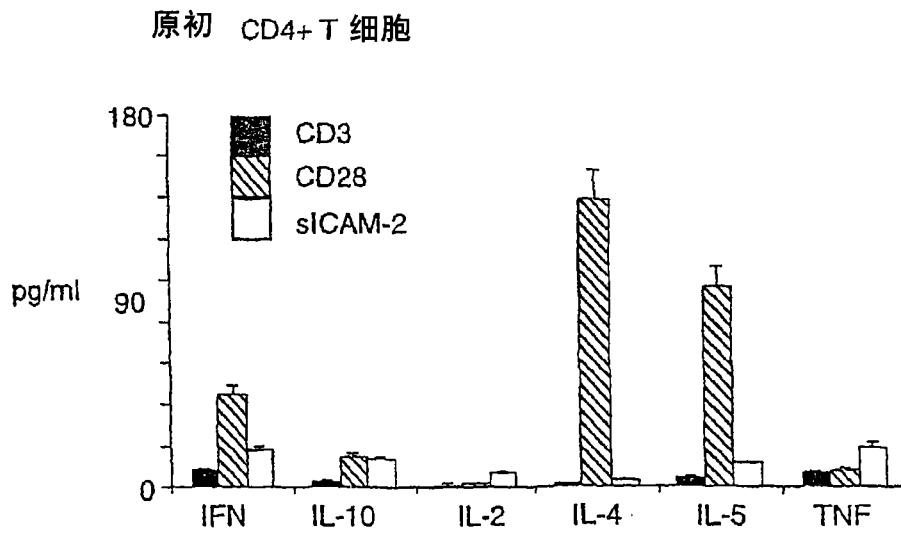


图 10E

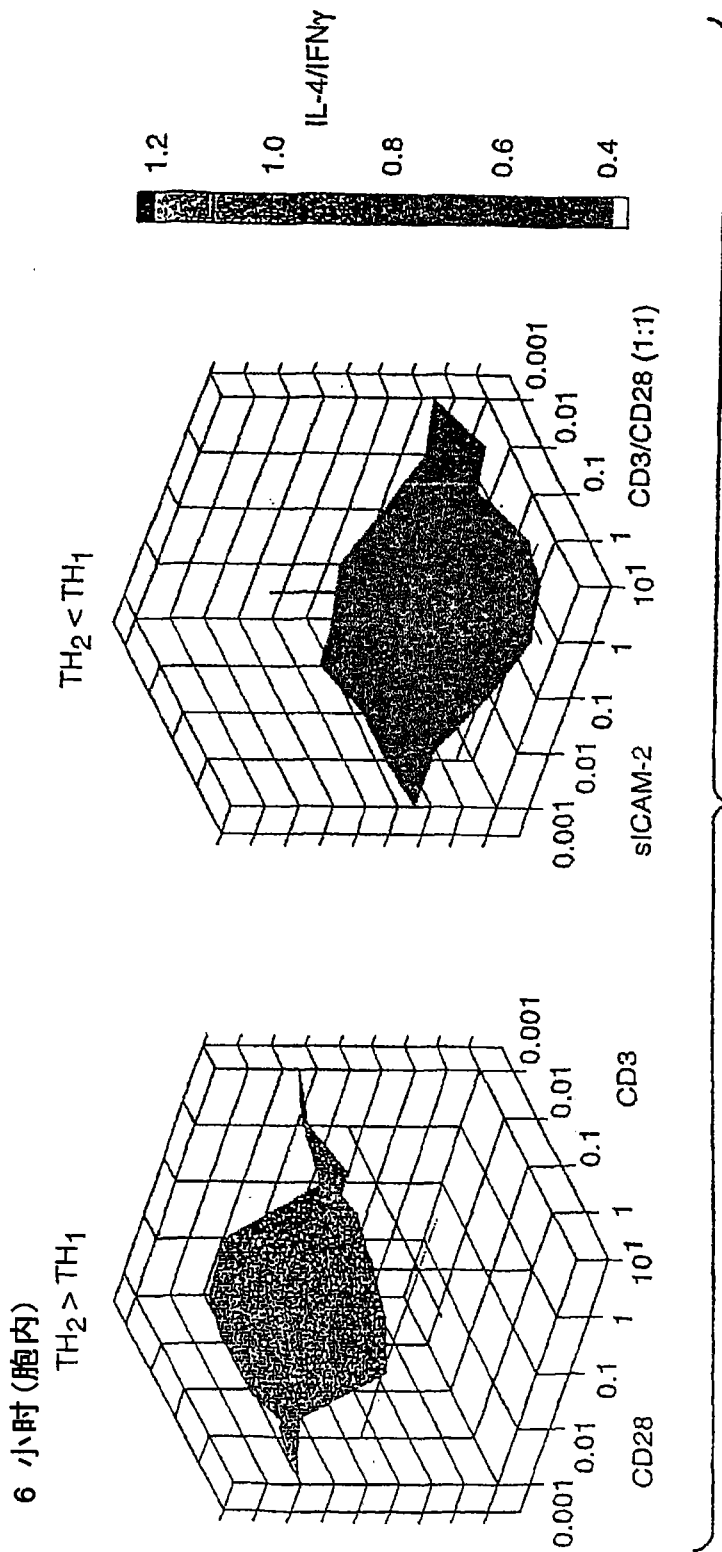


图 11

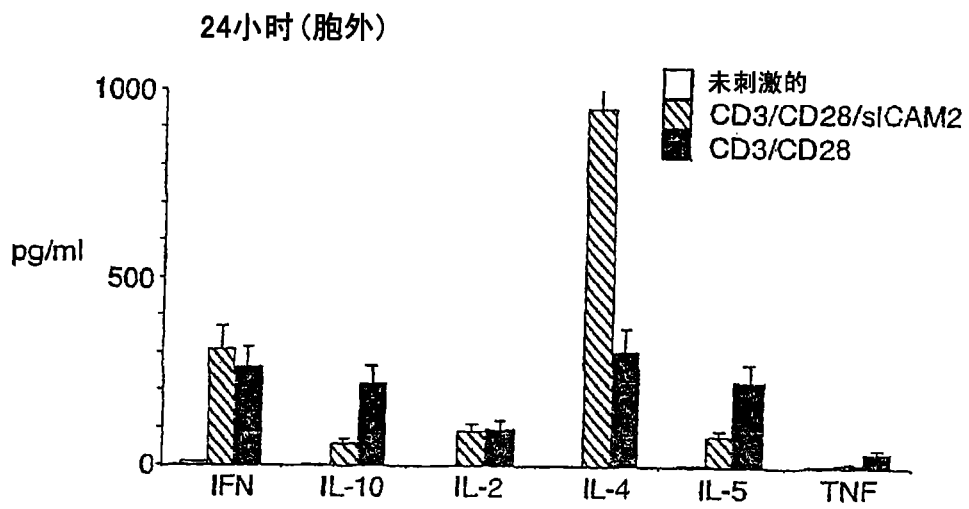


图 12

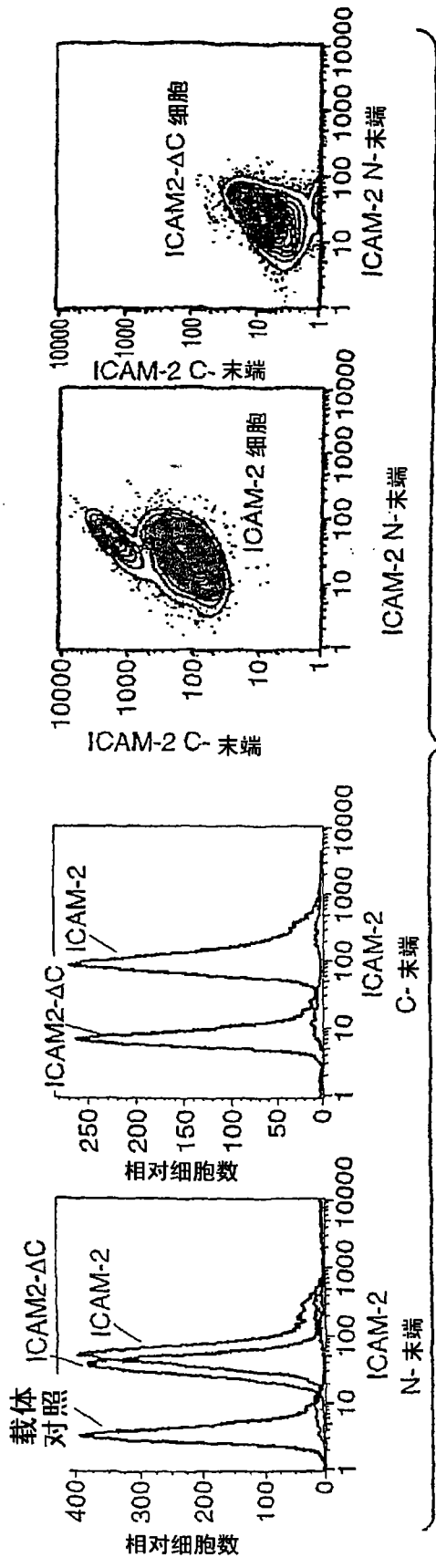


图 13A

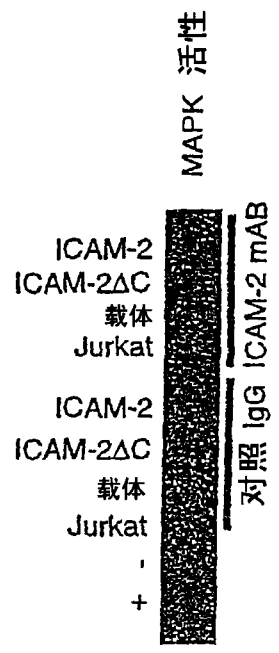


图 13B

活化P44/42 MAPK级联反应
异位 ICAM-2 群集

图 13D

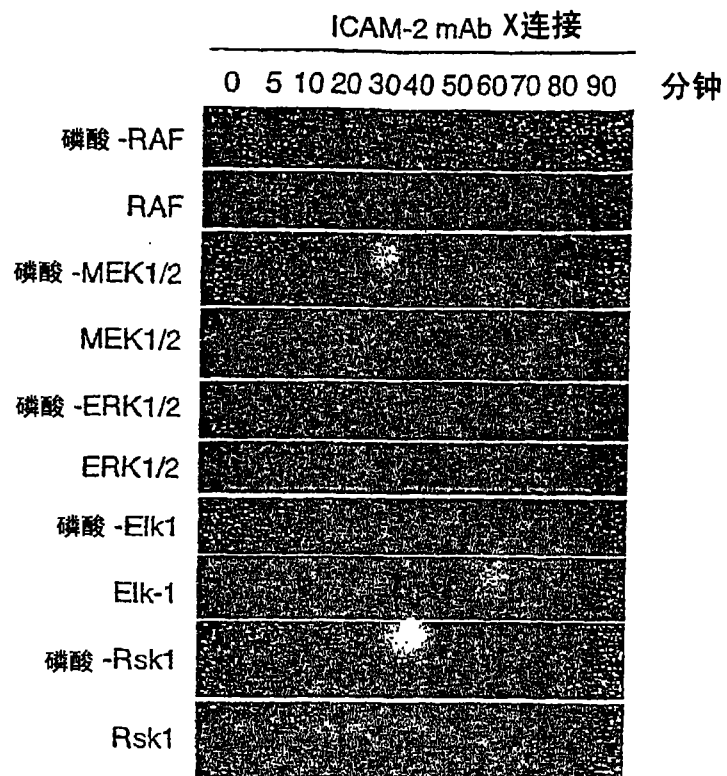


图 13C

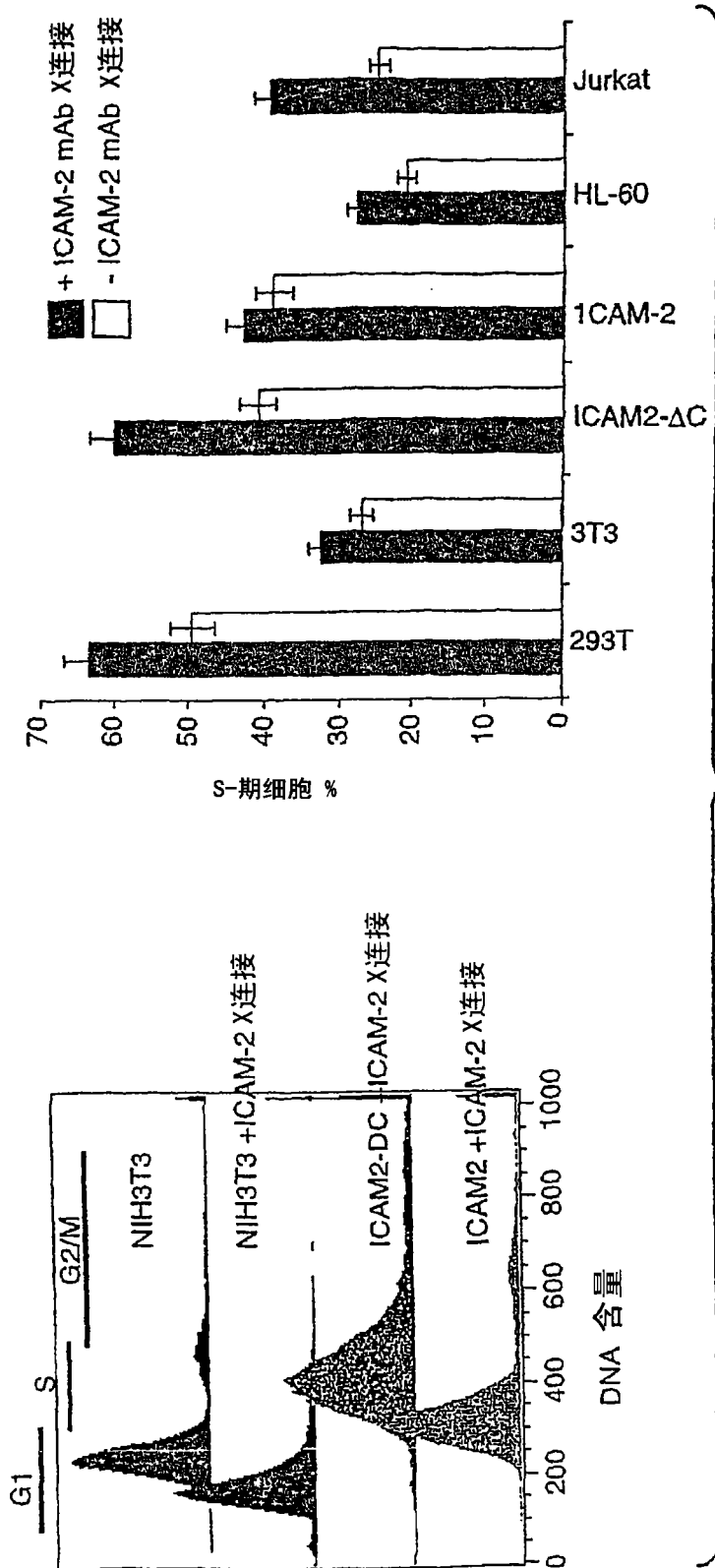


图 14A

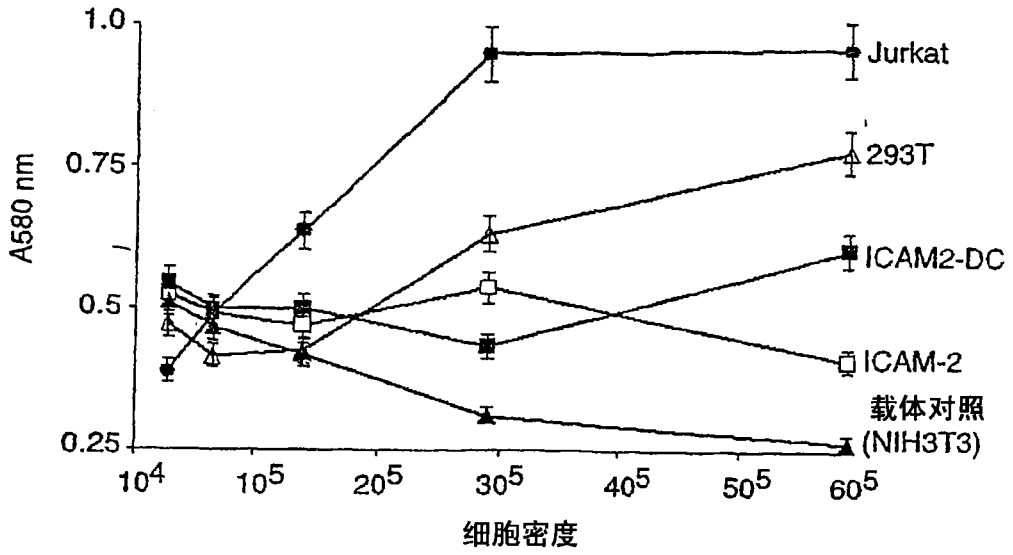


图 14B

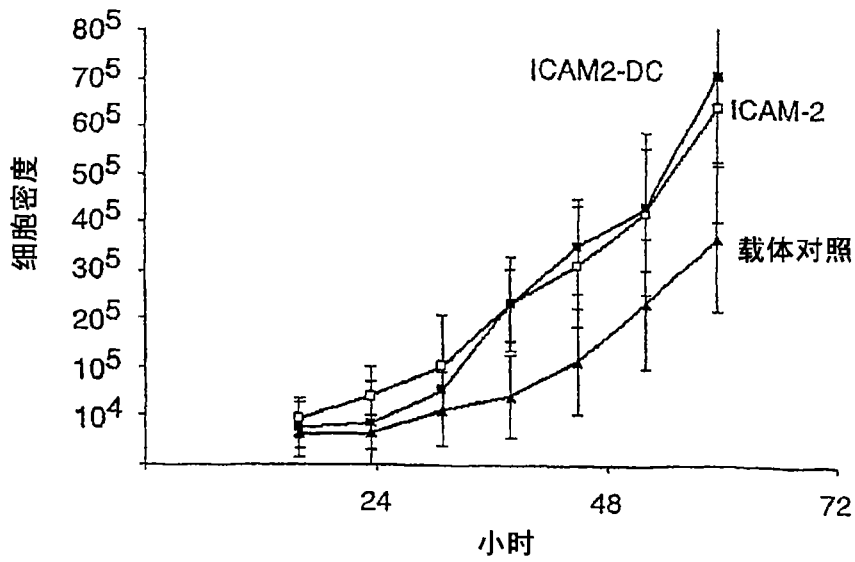
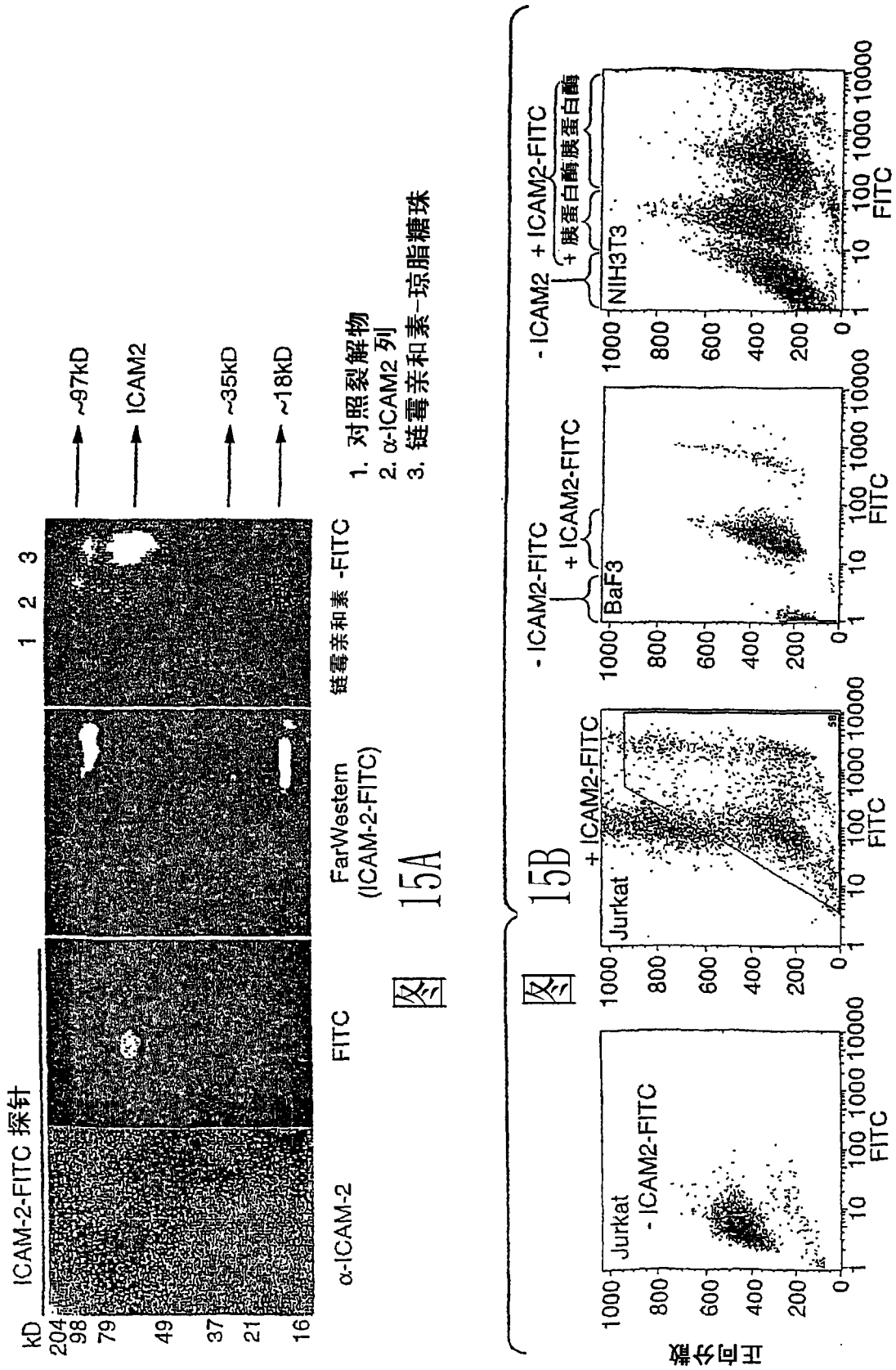


图 14C



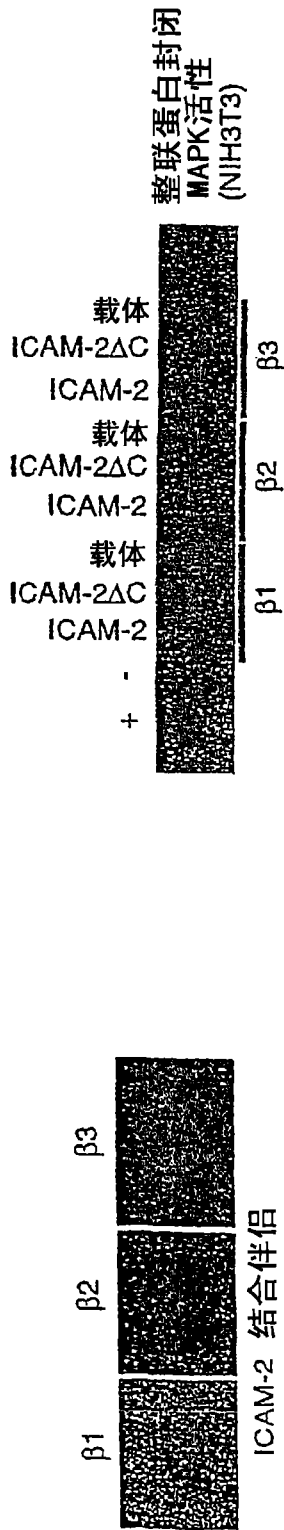


图 15D

图 15C



图 15F



图 15E

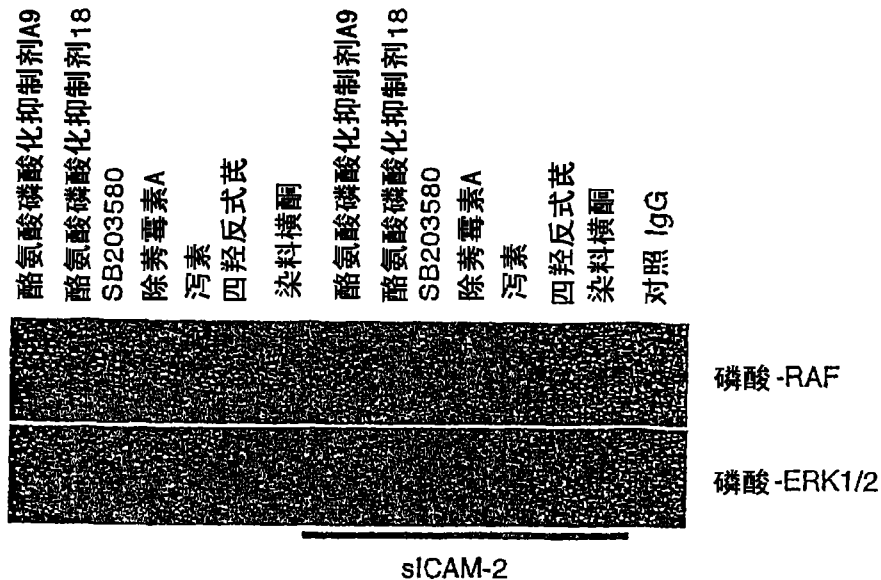
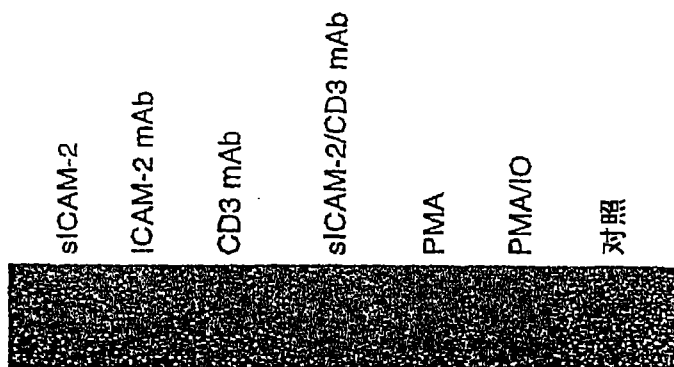


图 16A



IP: 抗-磷酸酪氨酸
Blot: PYK2

图 16C

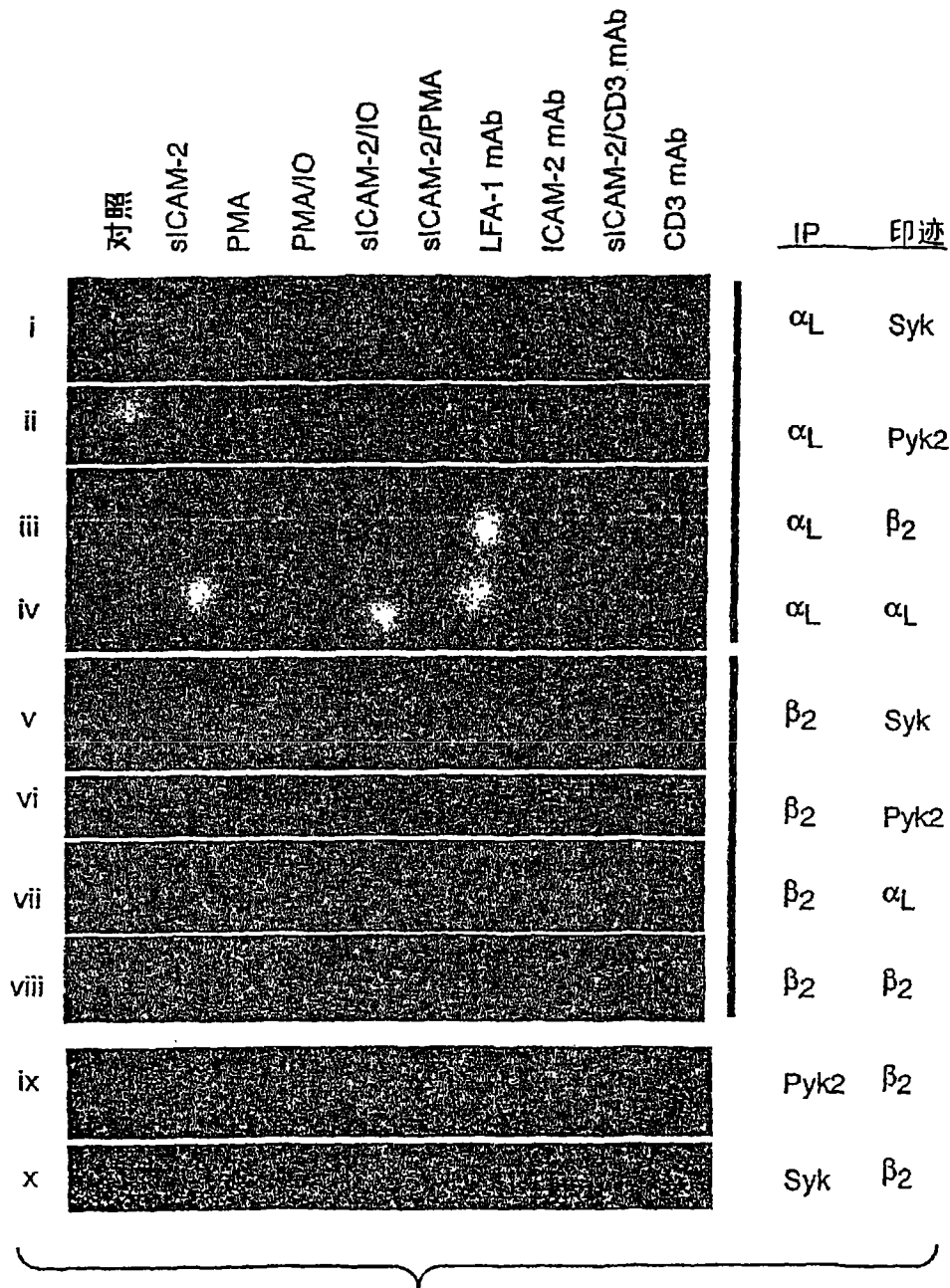


图 16B

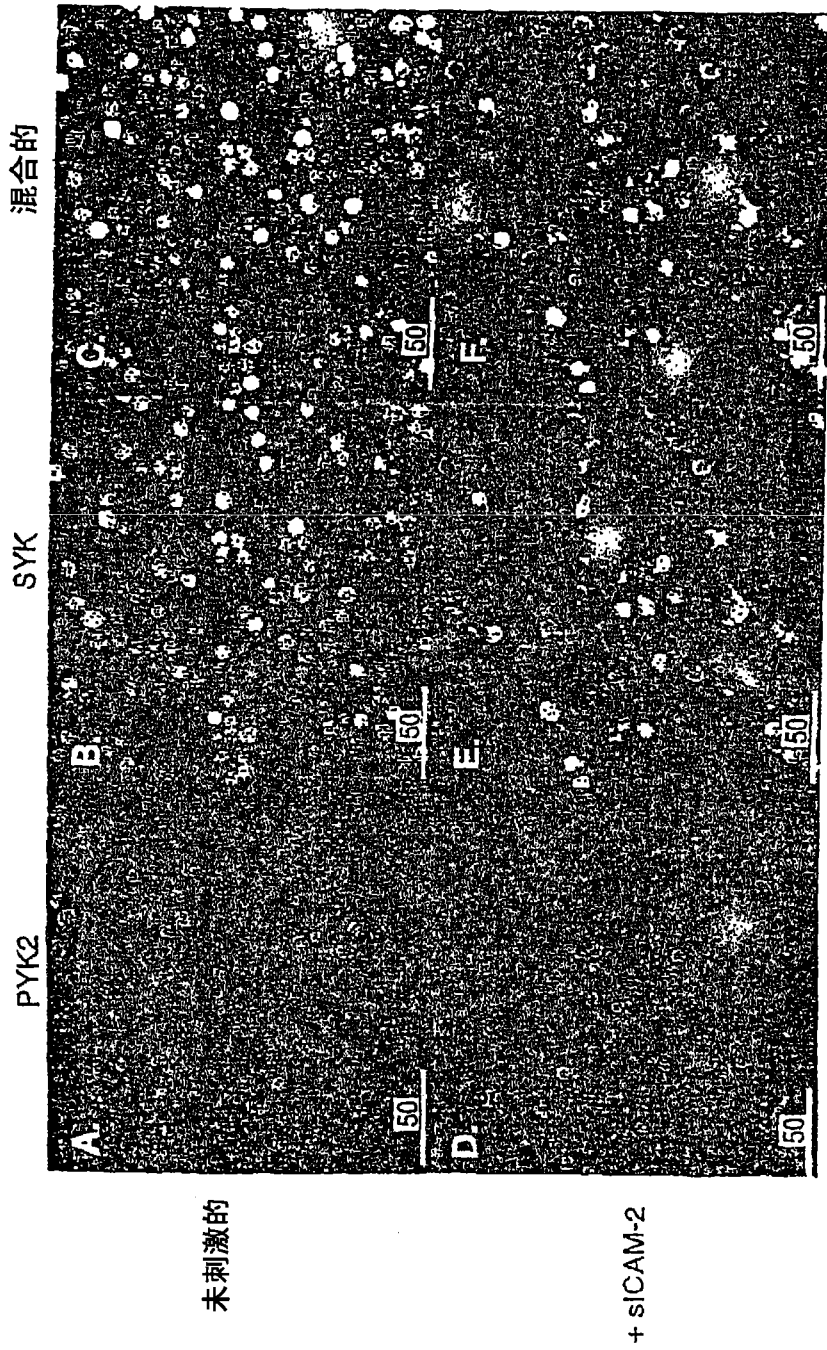


图 17A

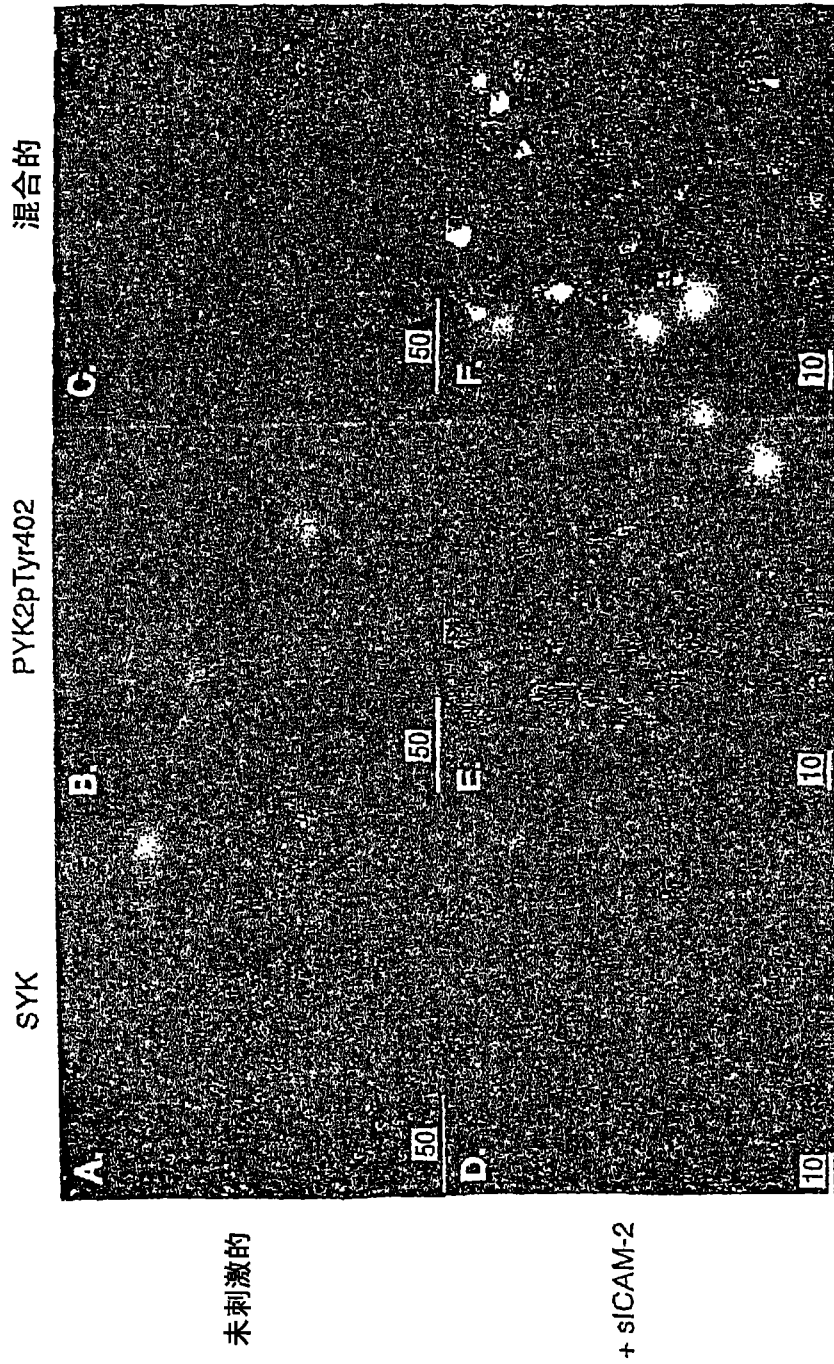


图 17B

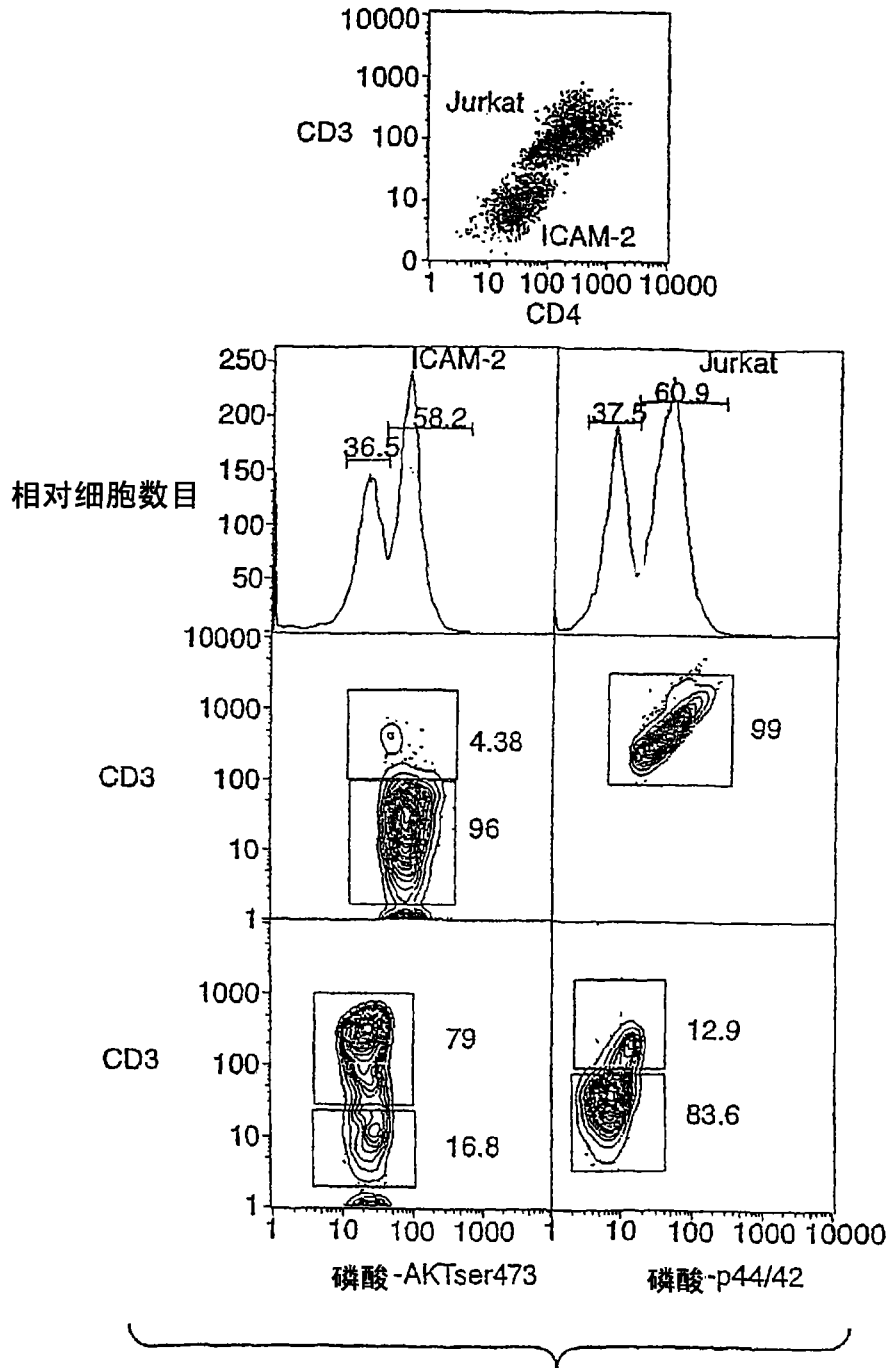


图 18A

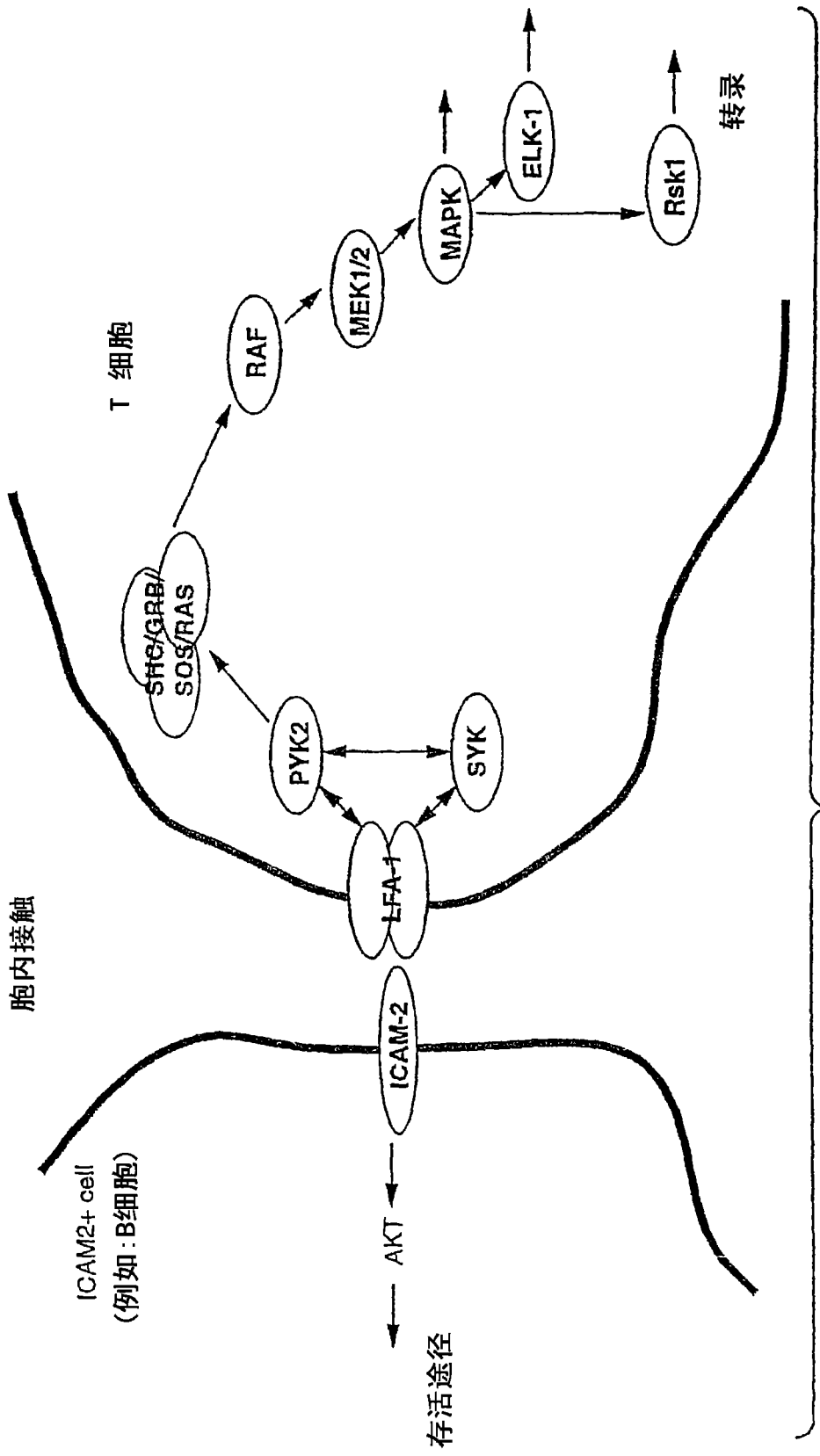
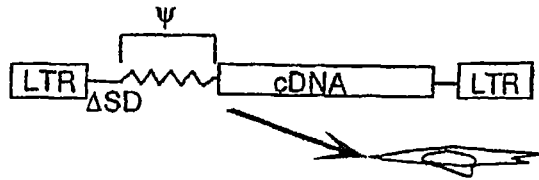


图 18B

1. 用cDNA文库感染3T3细胞



2. 用星形孢菌素处理24小时.
存活者生长1周. 重复X3.

3. 用MMLV感染存活的细胞来拯救原病毒作为感染颗粒.

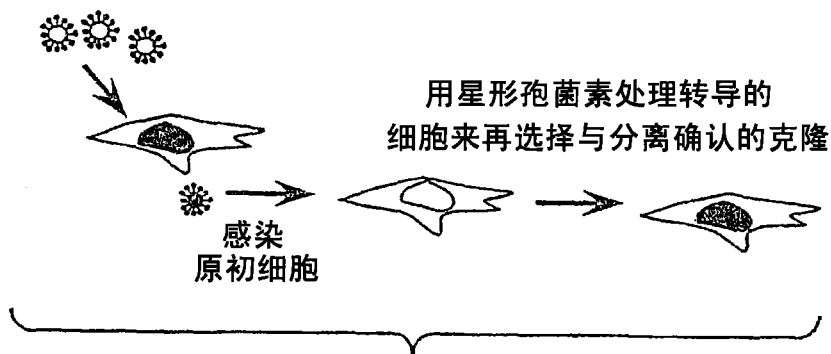


图 19A

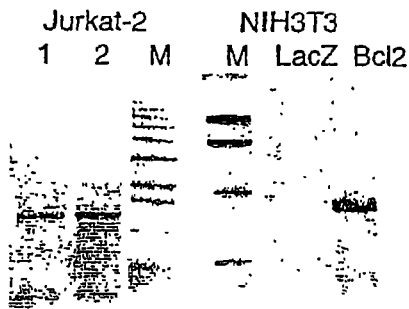


图 19B

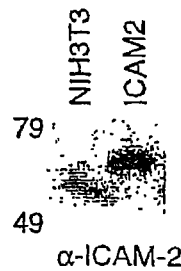


图 19C

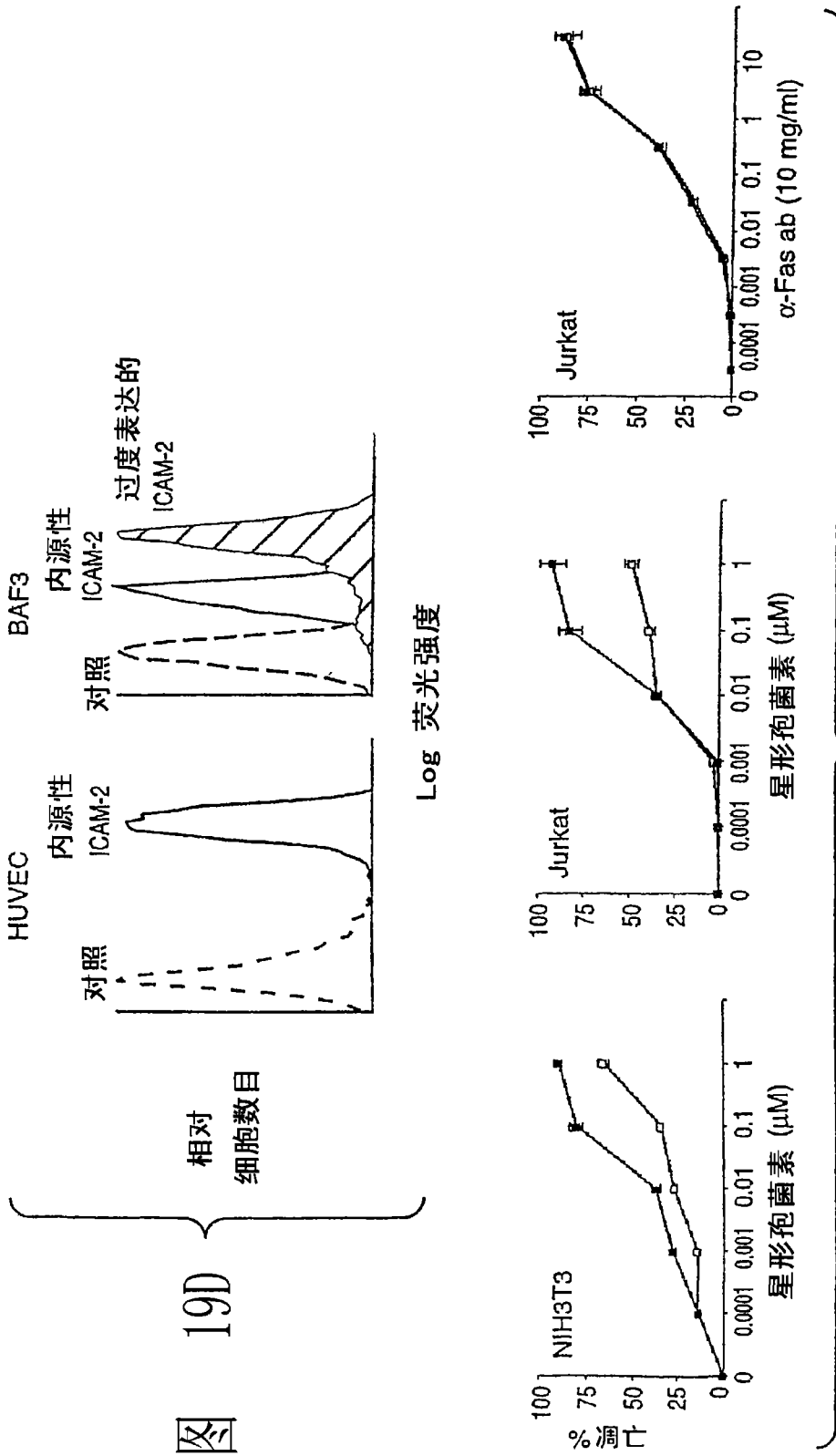


图 19E

图 19D

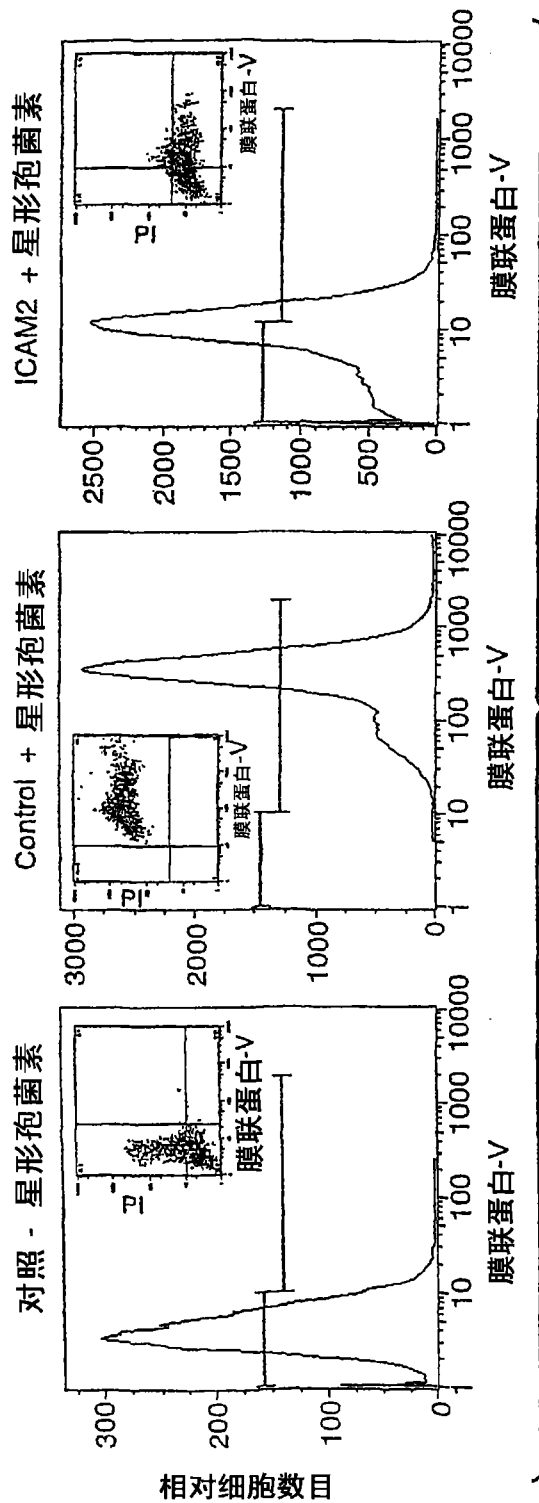


图 20A

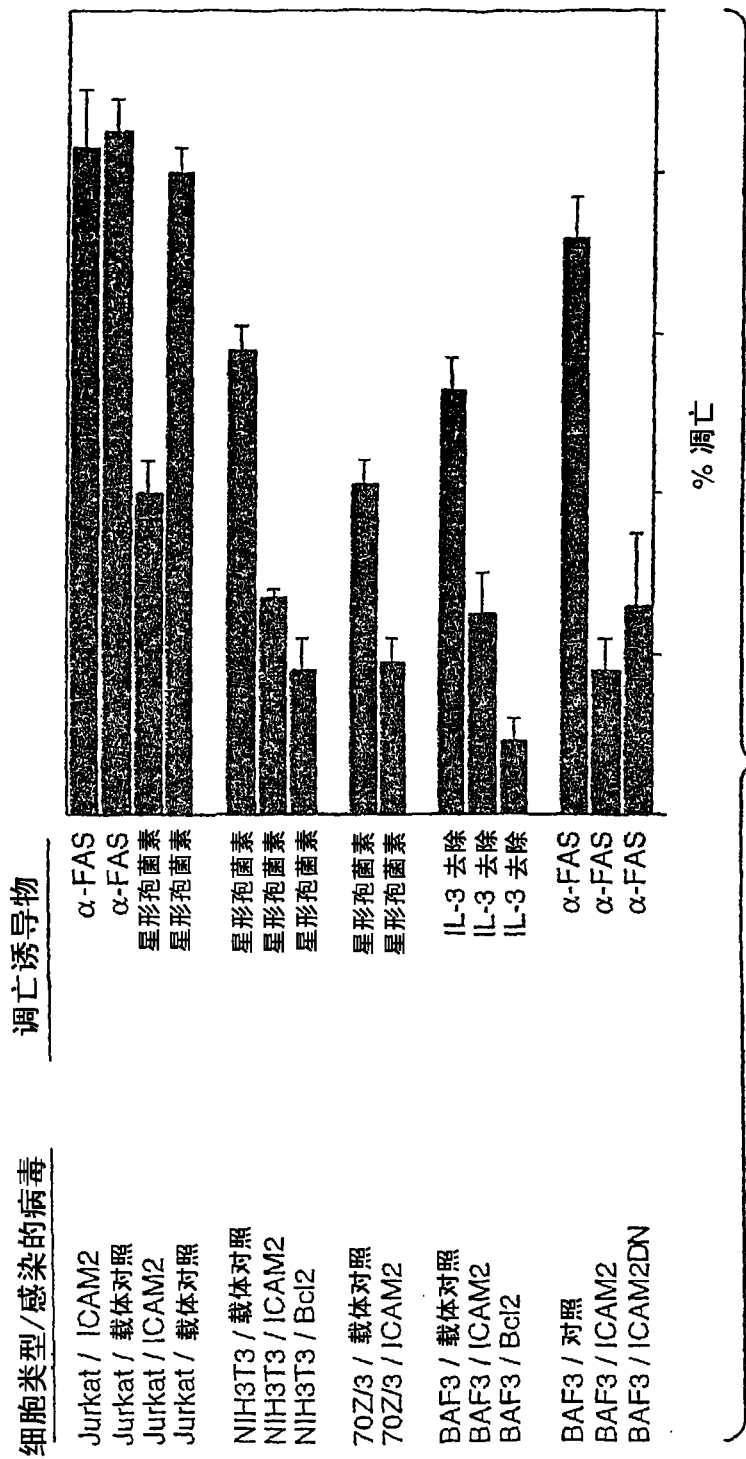


图 20B

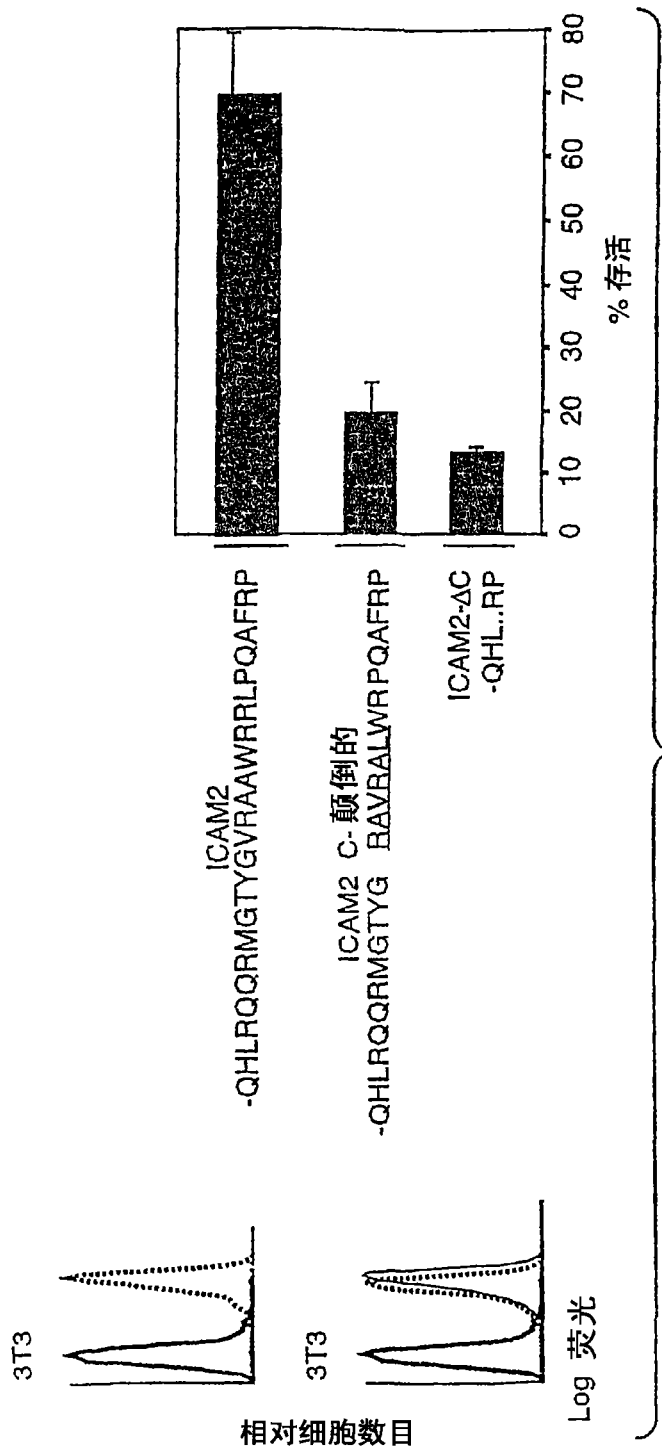


图 20C

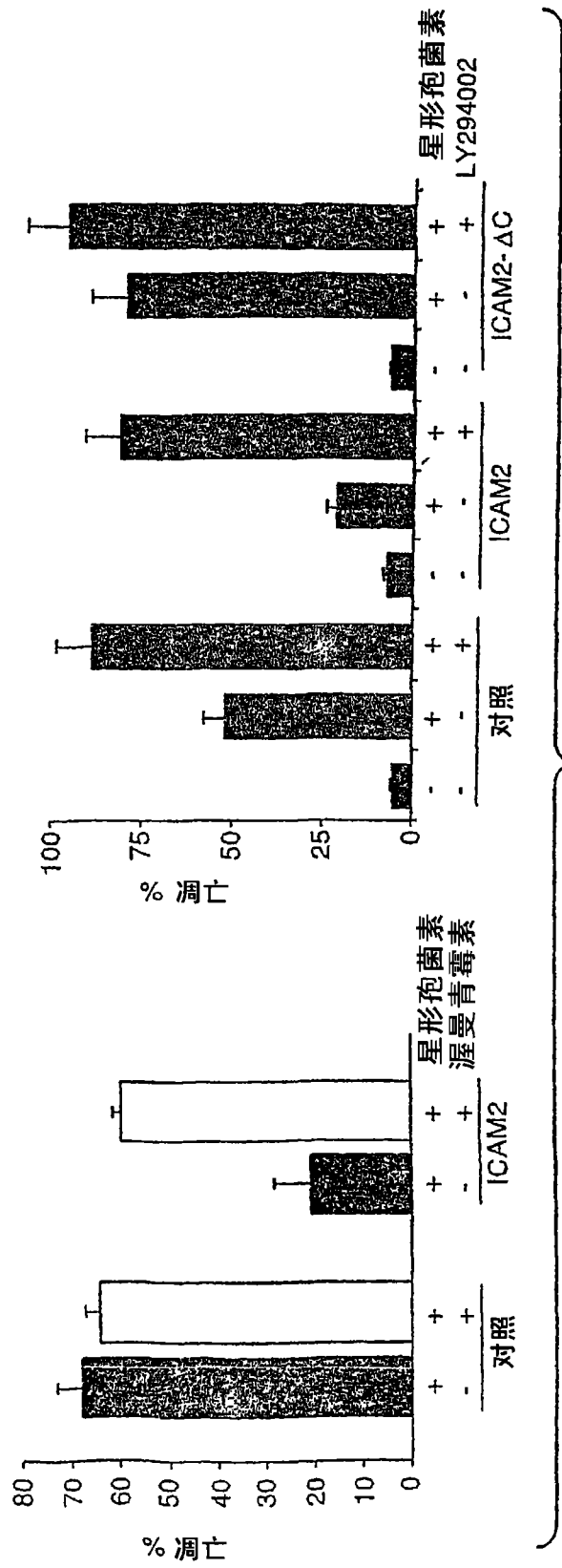


图 21A

图 21B

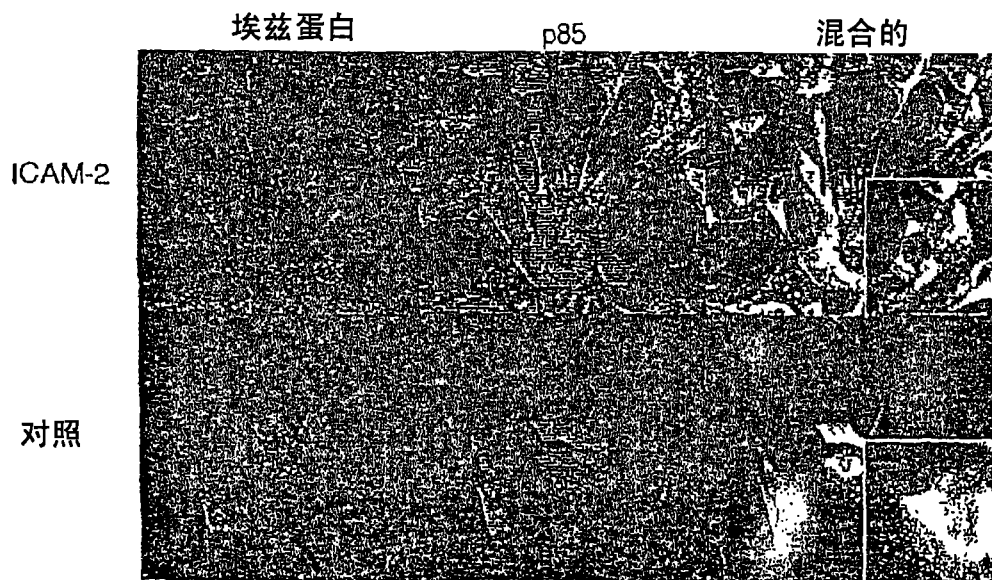
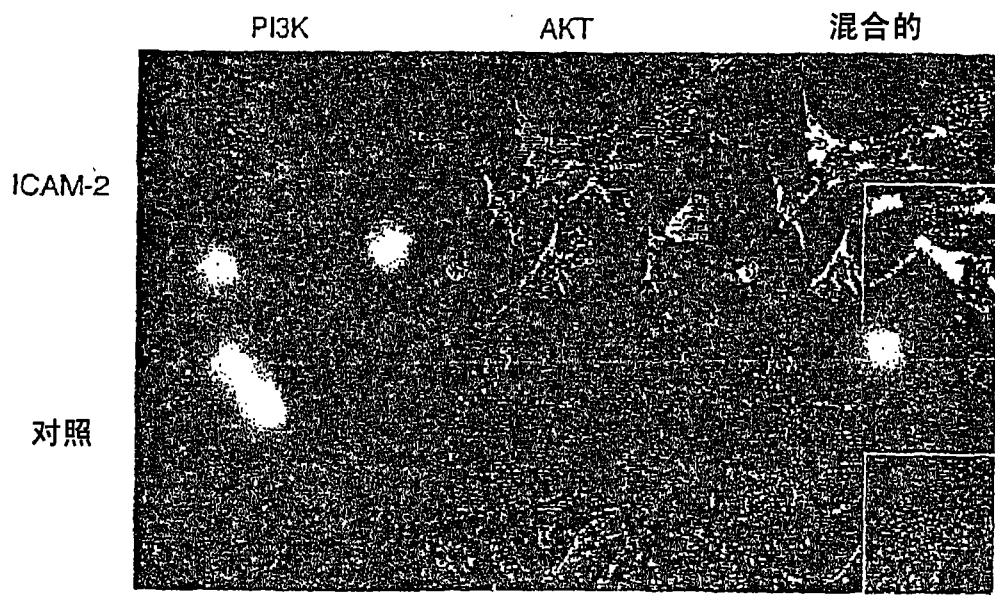


图 21C

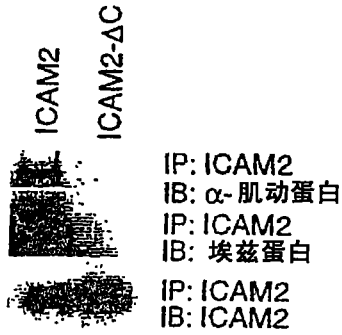


图 22A

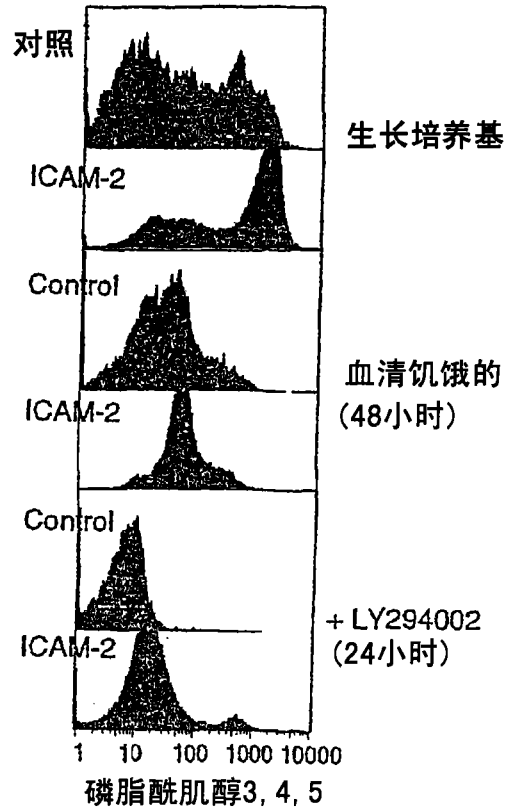


图 22B

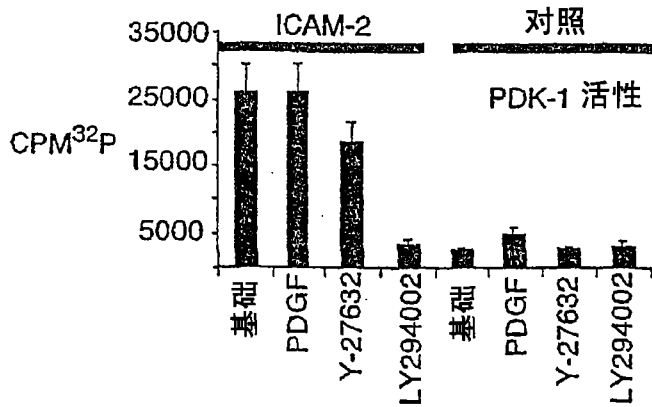


图 22C

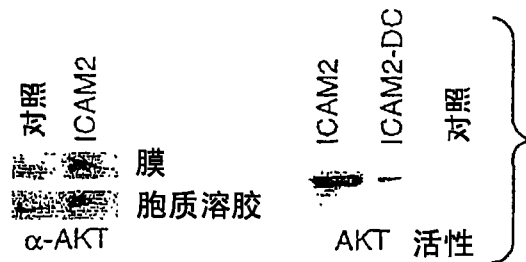
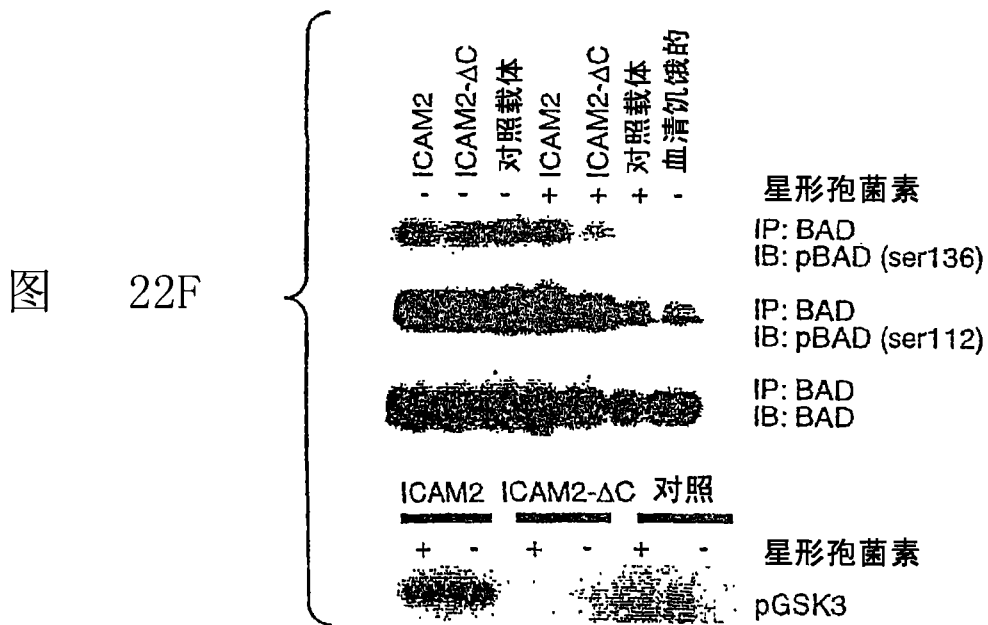
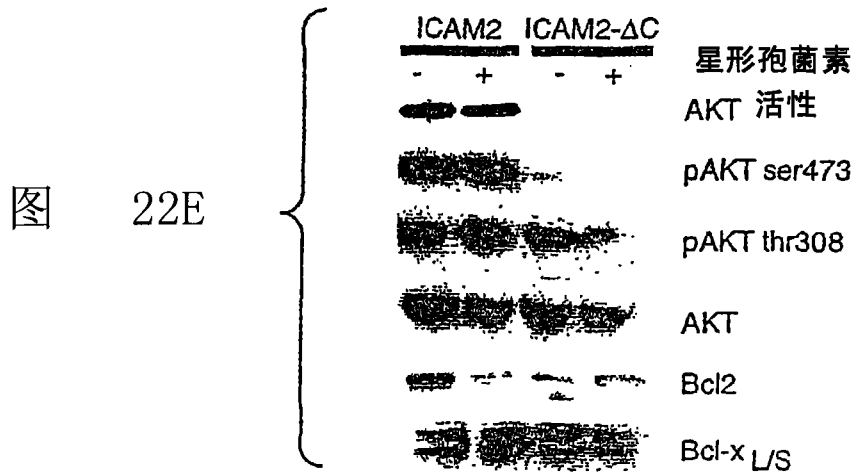


图 22D



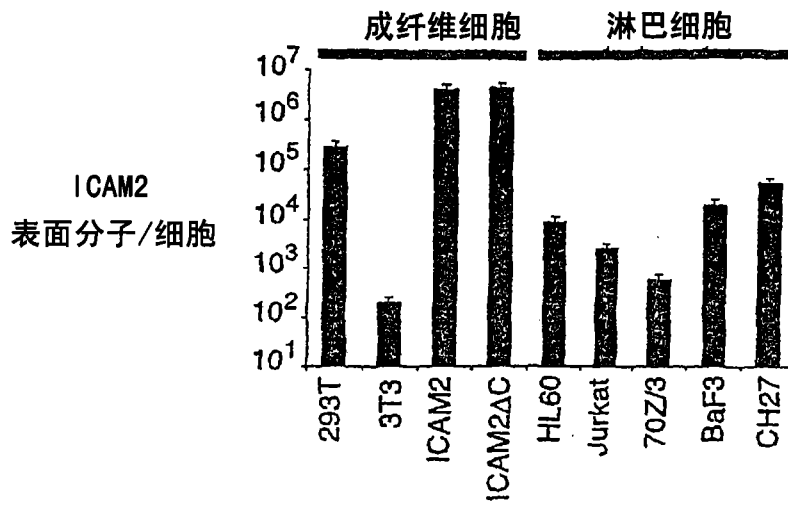


图 23A

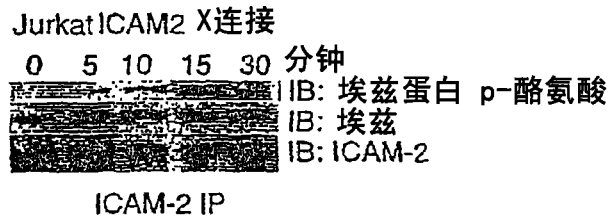


图 23B

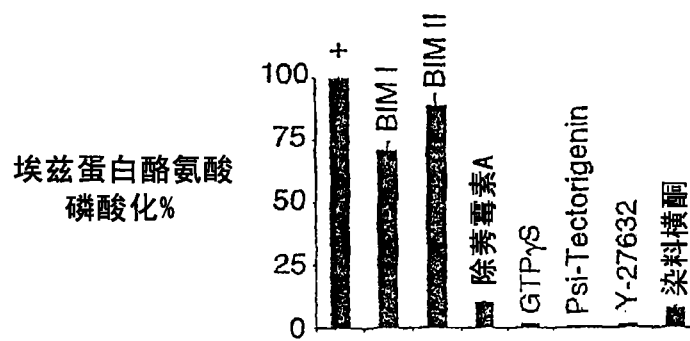


图 23C

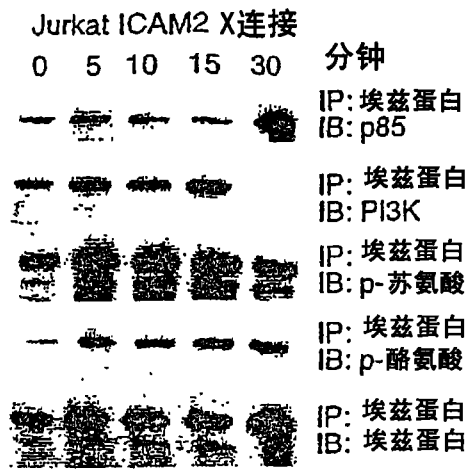


图 23D

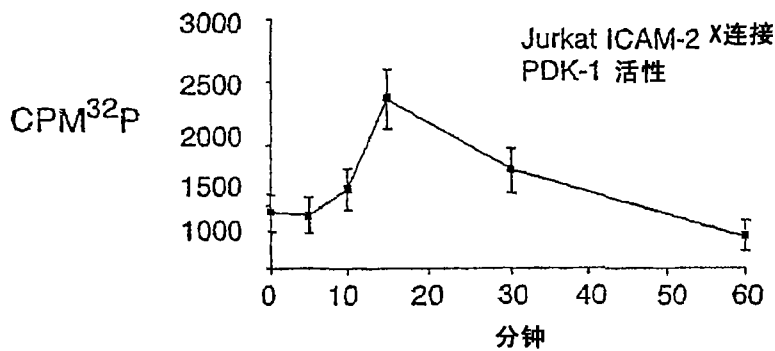


图 23E

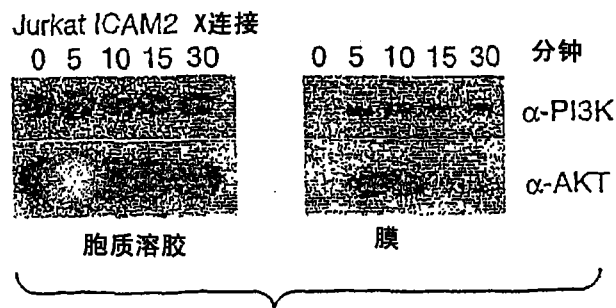


图 23F

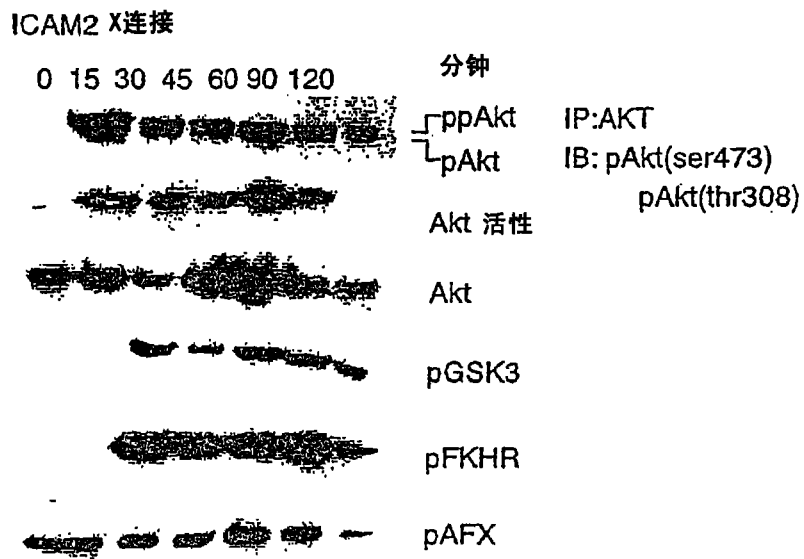


图 24A

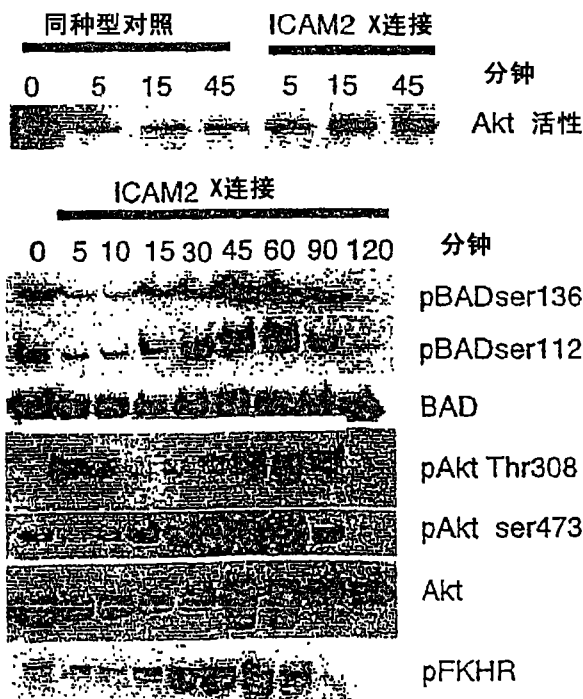


图 24B

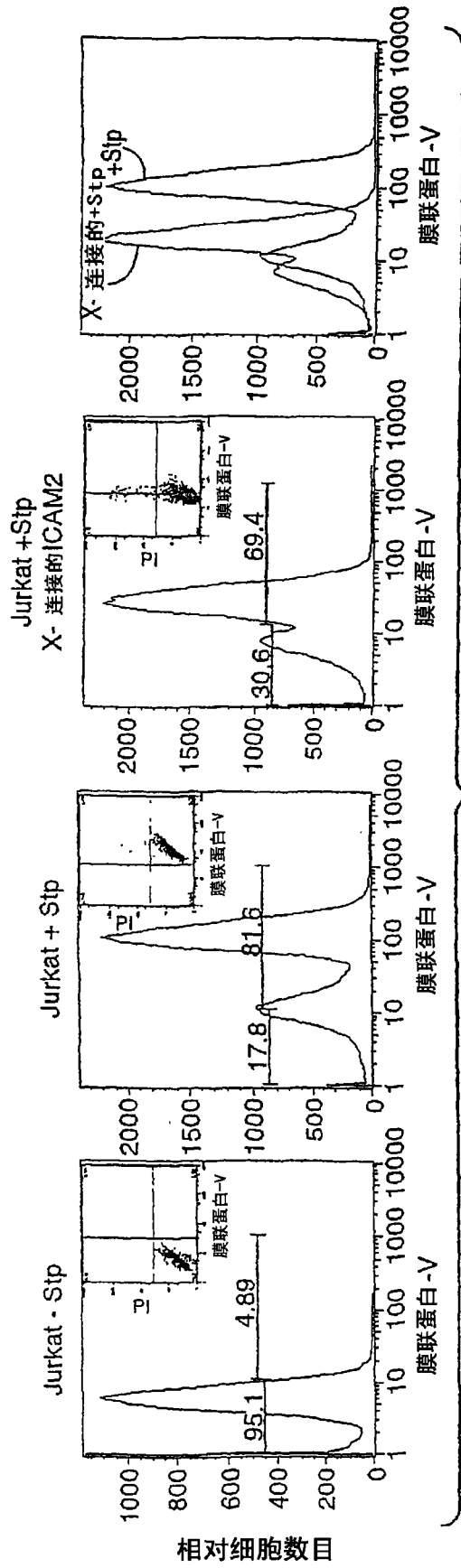


图 24C

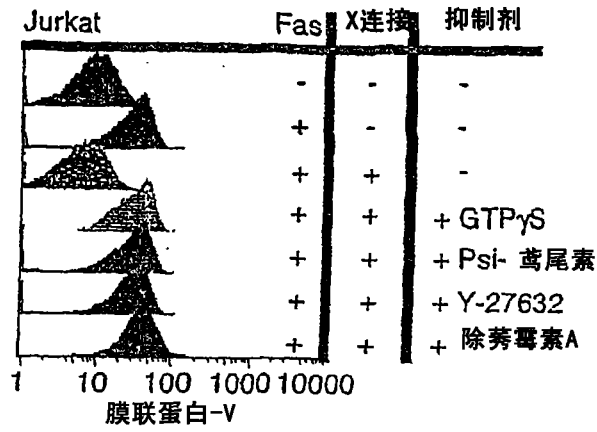


图 24D

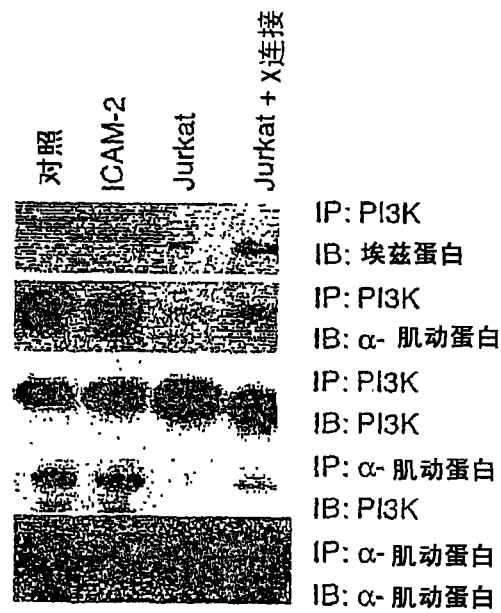


图 24E

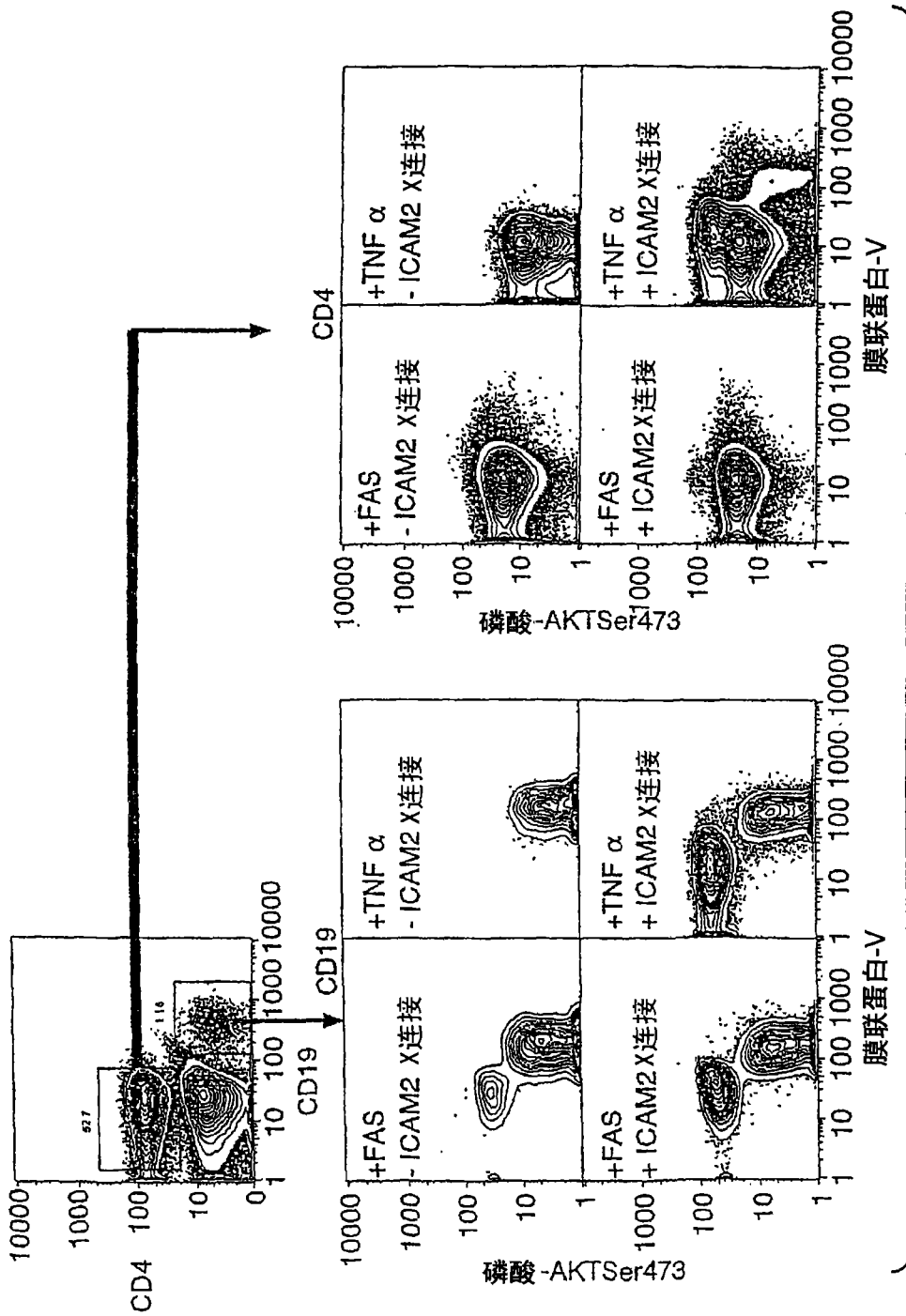


图 25A

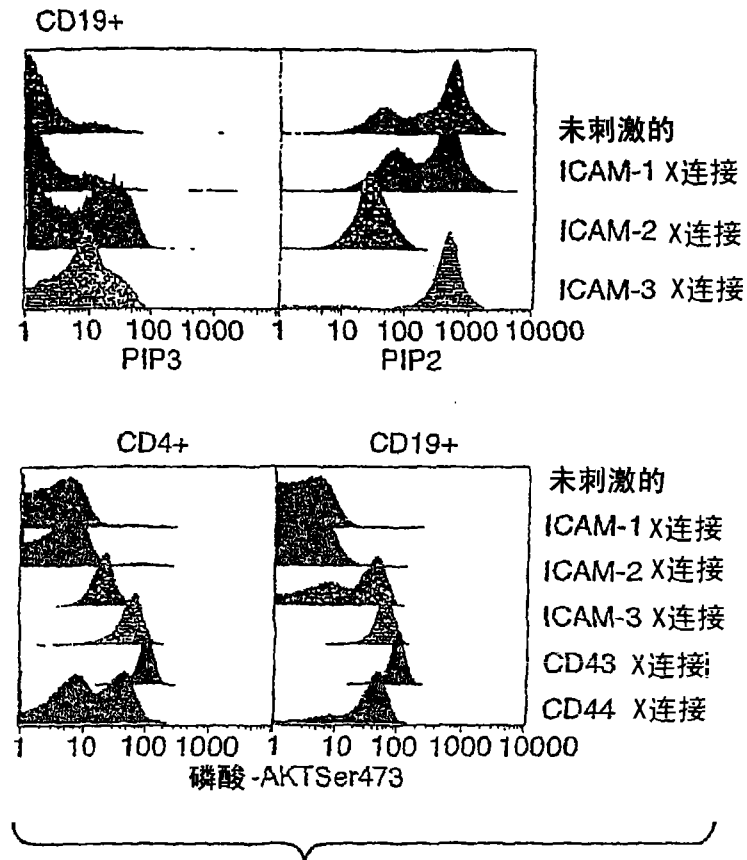


图 25B

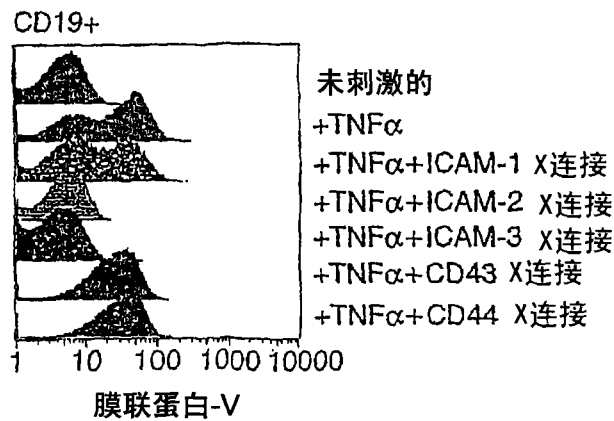


图 25C

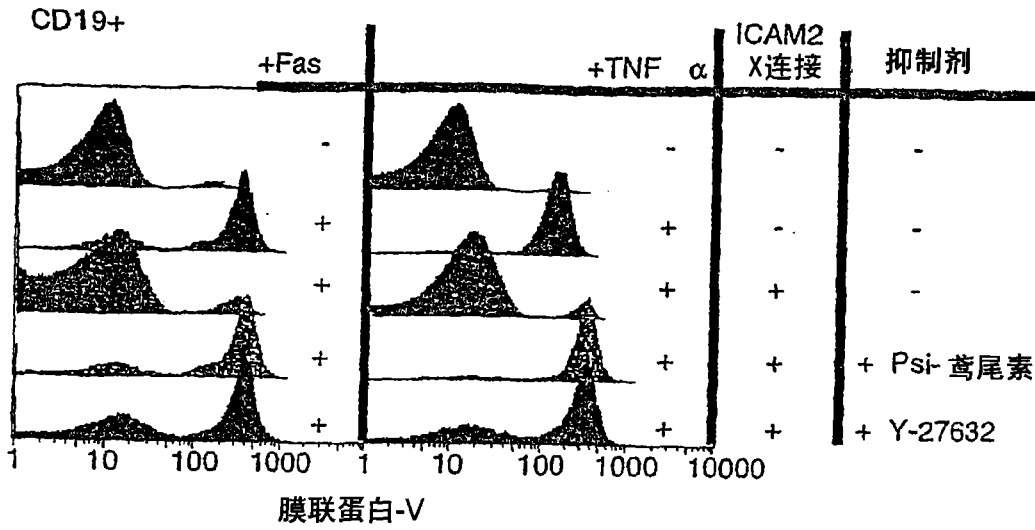


图 25D

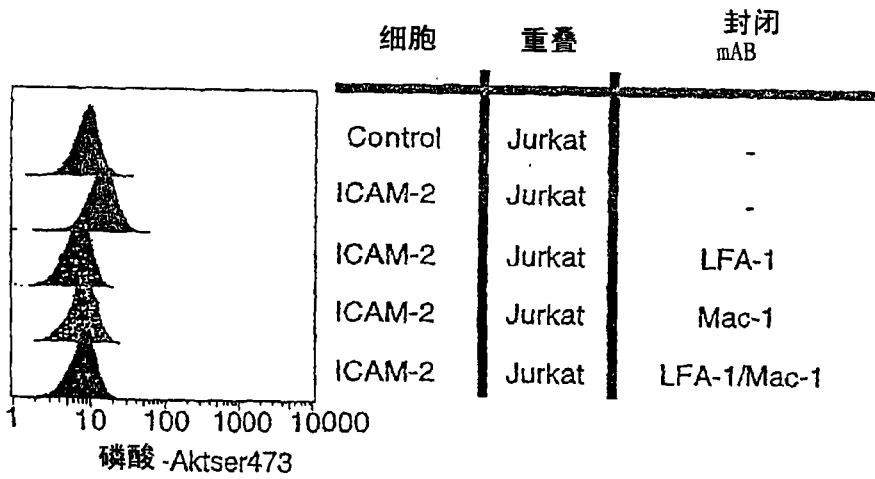


图 25E

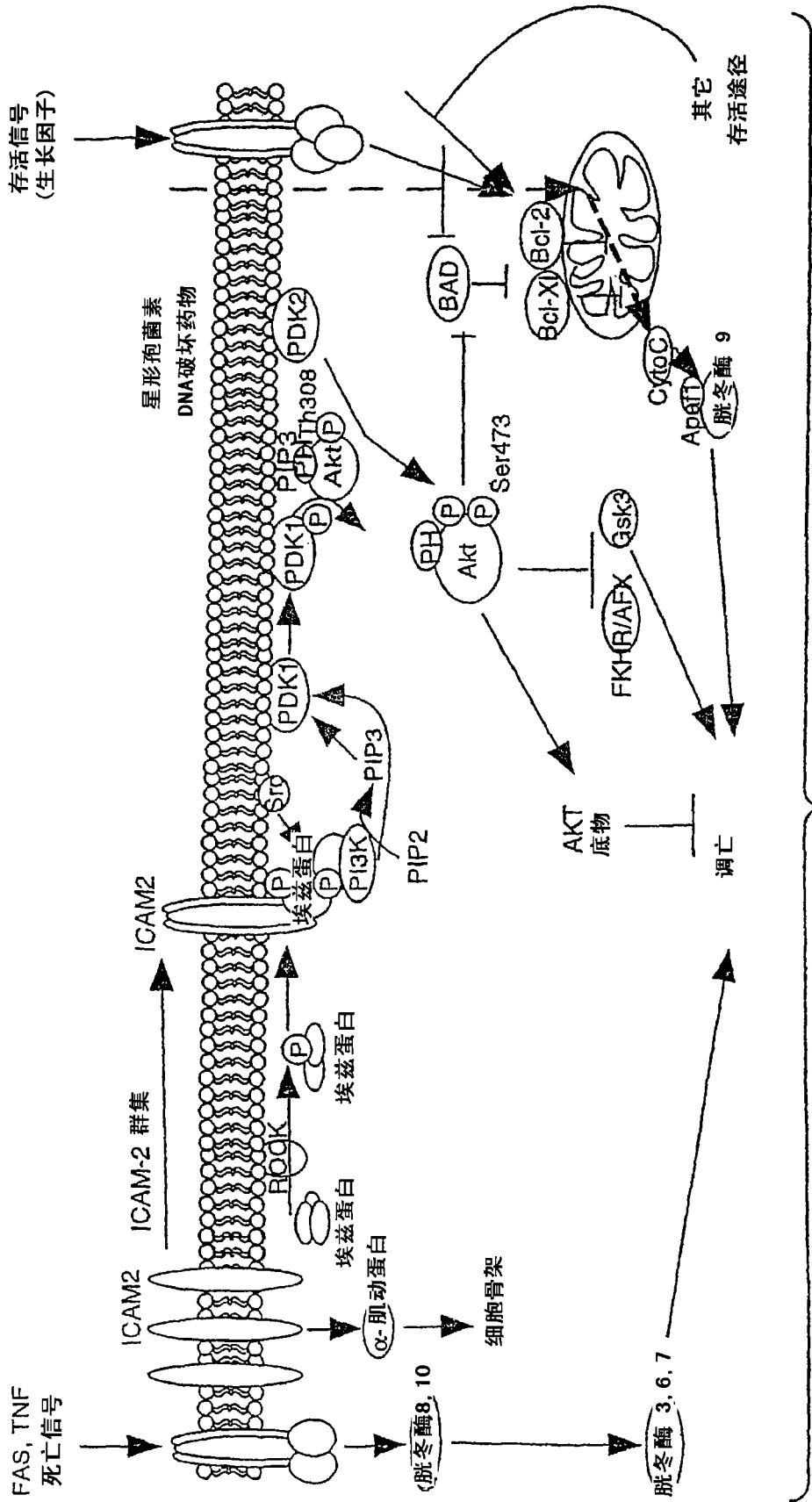
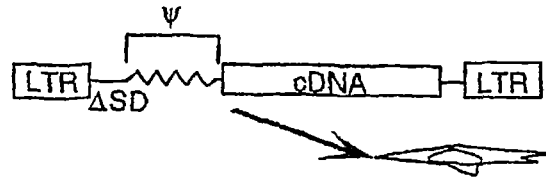


图 25F

1. 用cDNA文库感染3T3细胞



2. 用星形孢菌素处理24小时.
存活性生长1周. 重复X3.

3. 用MMLV感染存活的细胞来拯救原病毒作为感染颗粒.

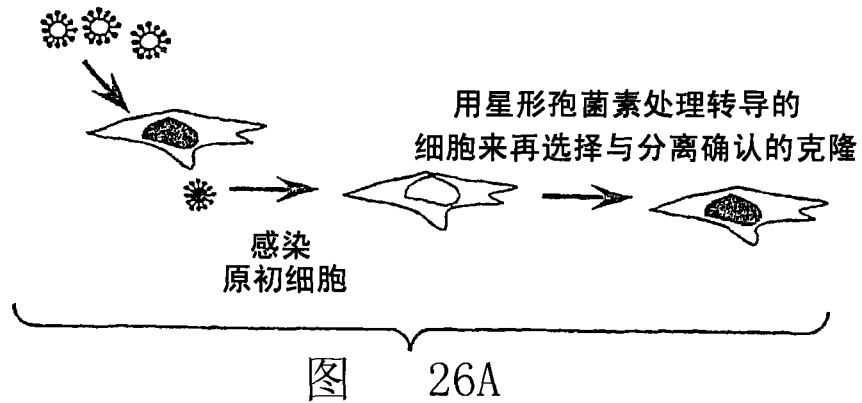


图 26B

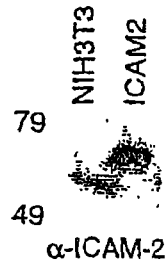


图 27A

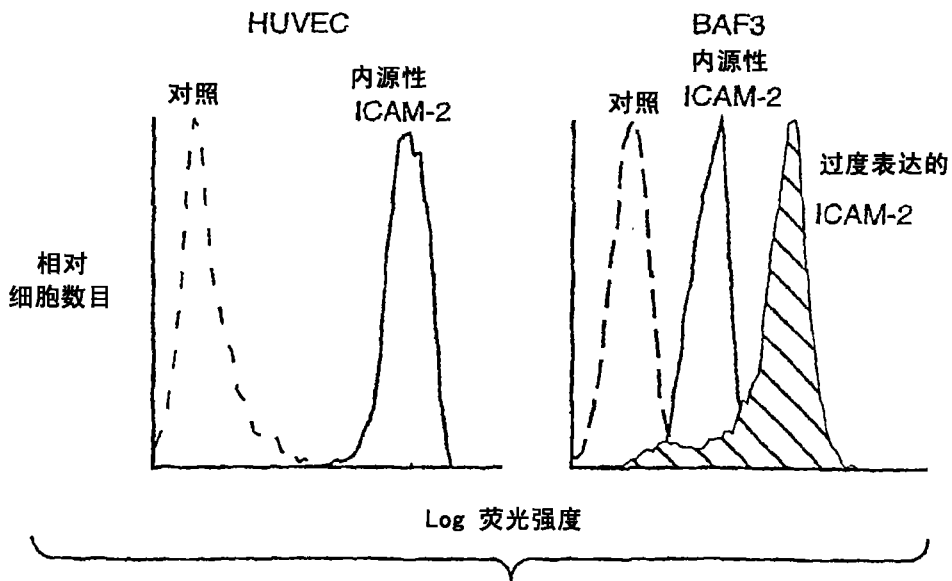


图 27B

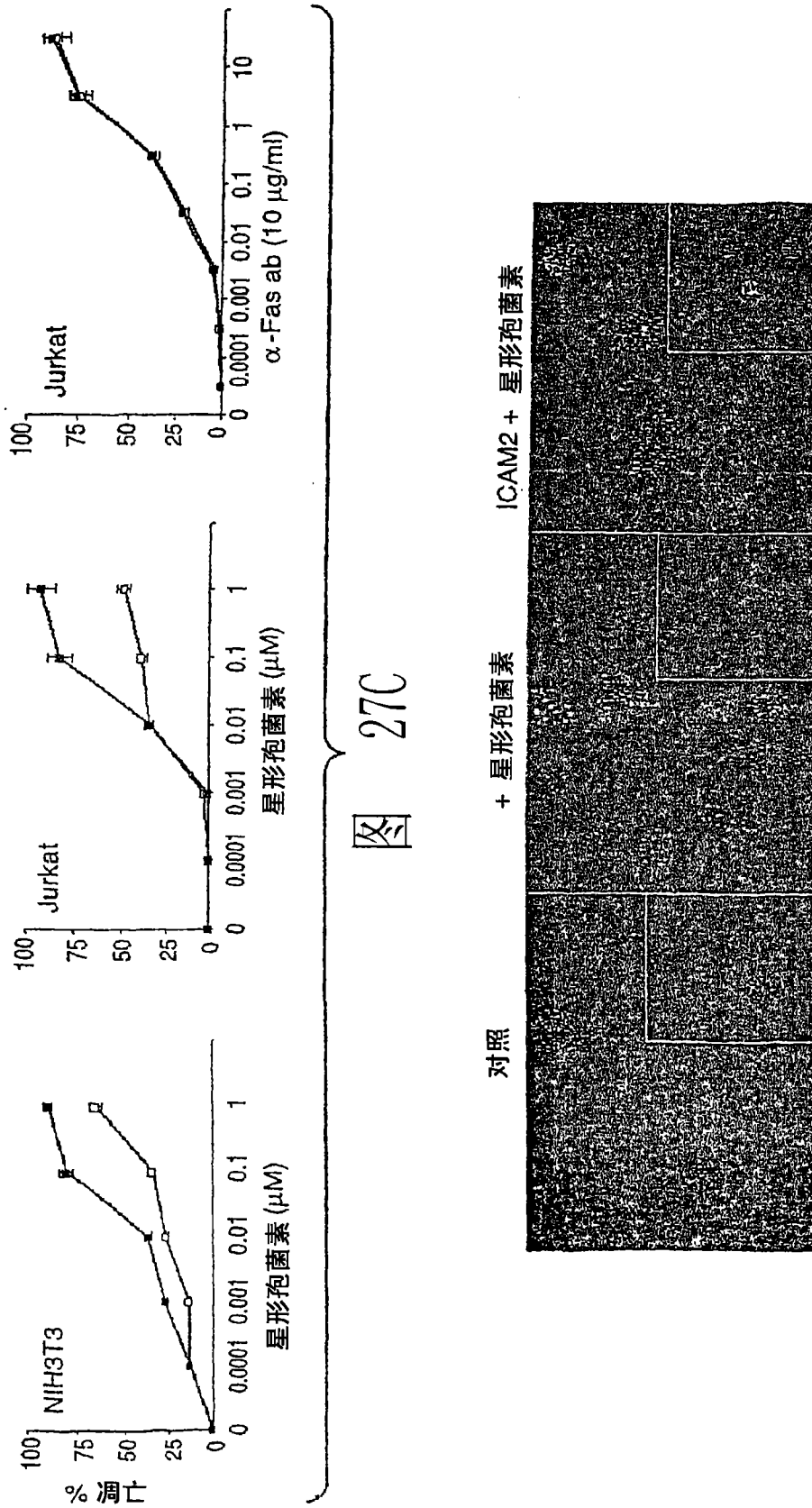


图 27C

图 27D

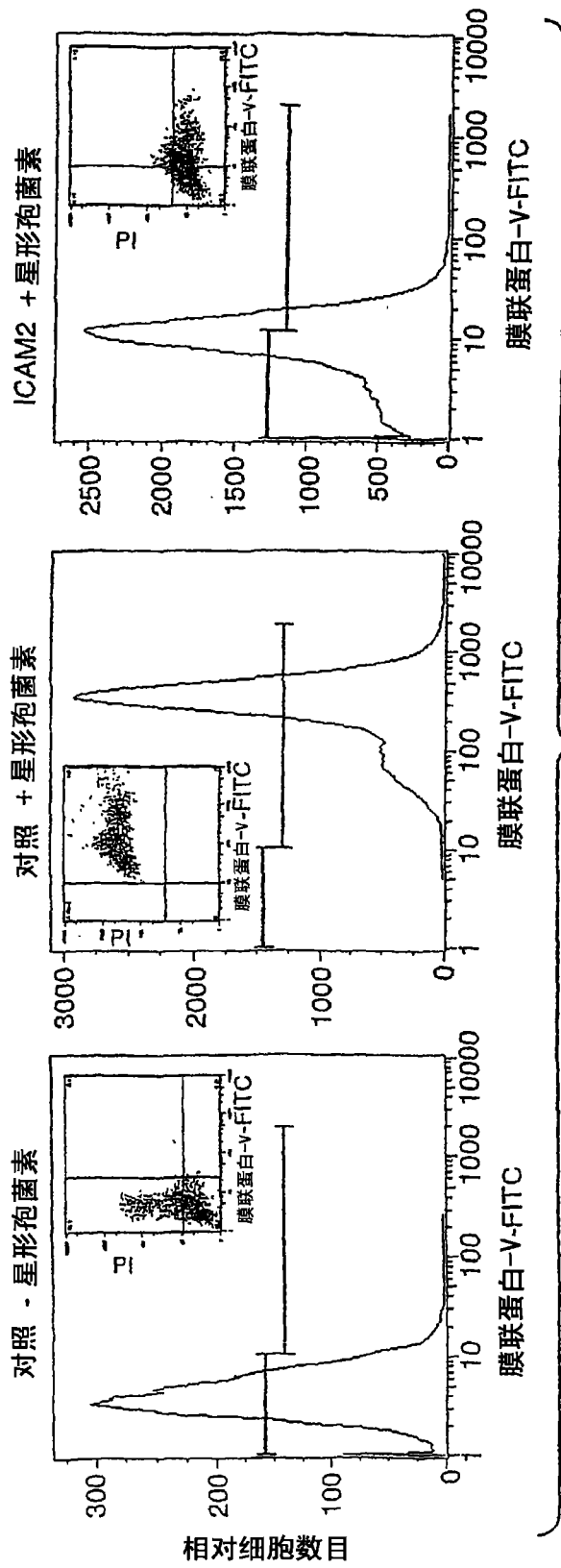


图 27E

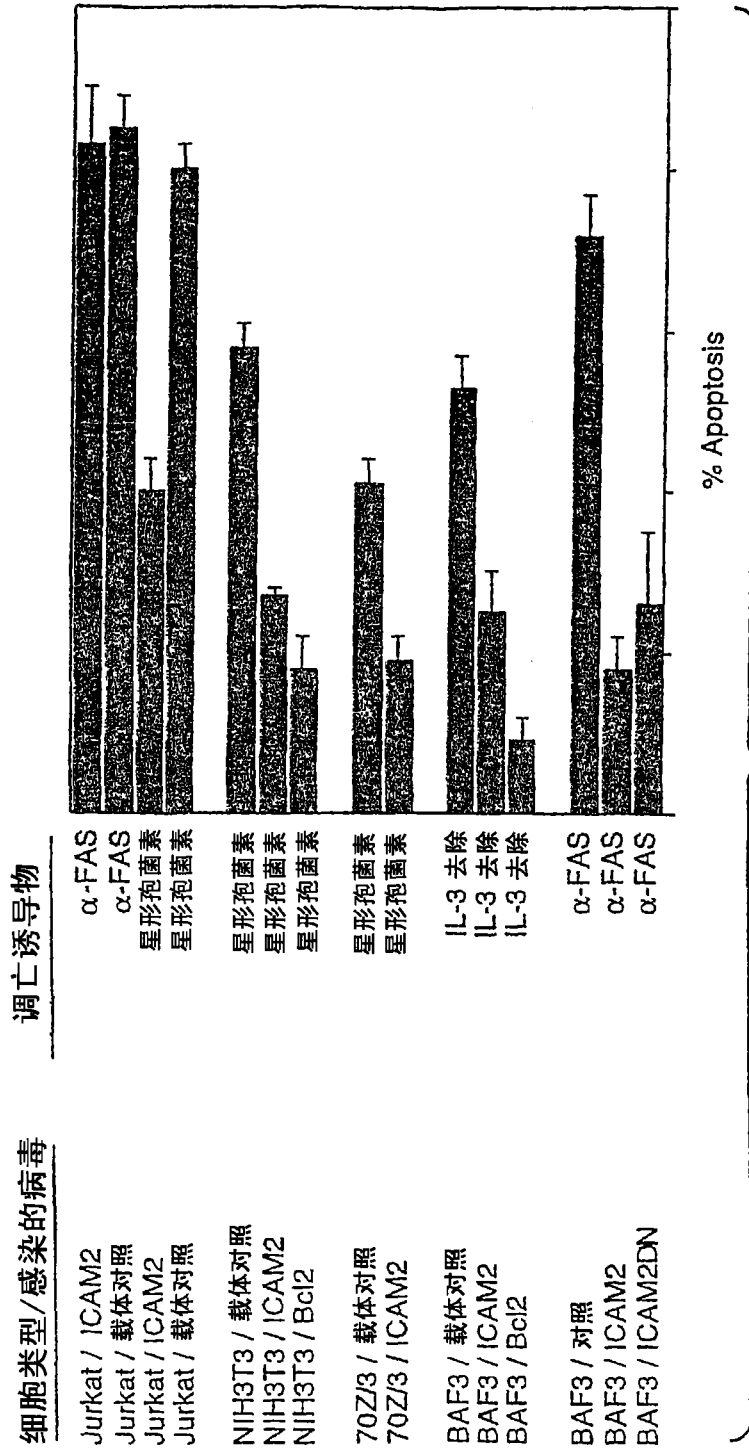
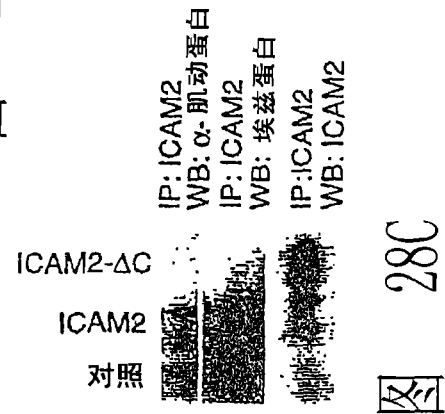
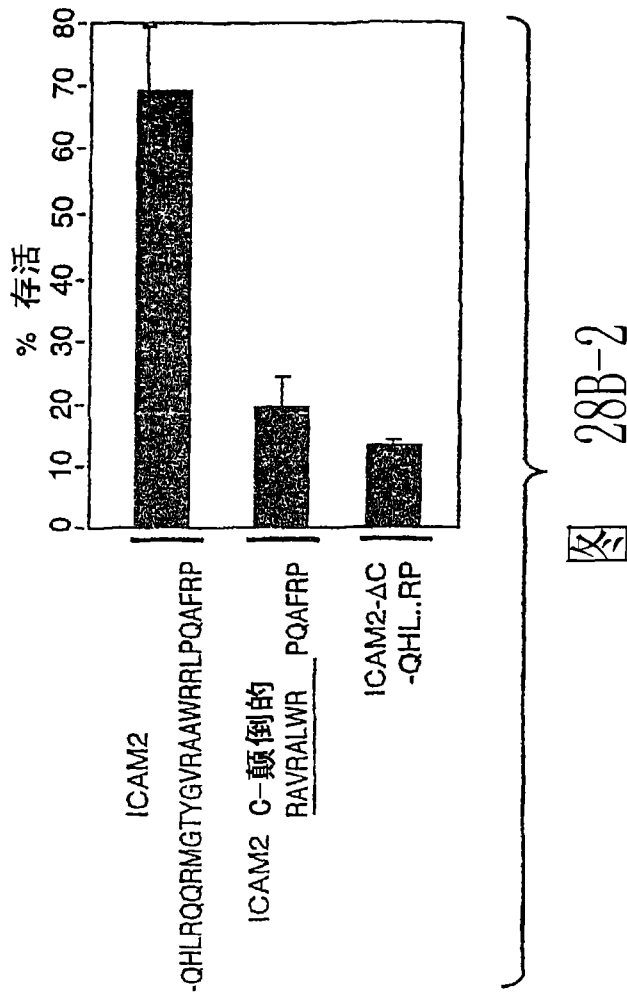
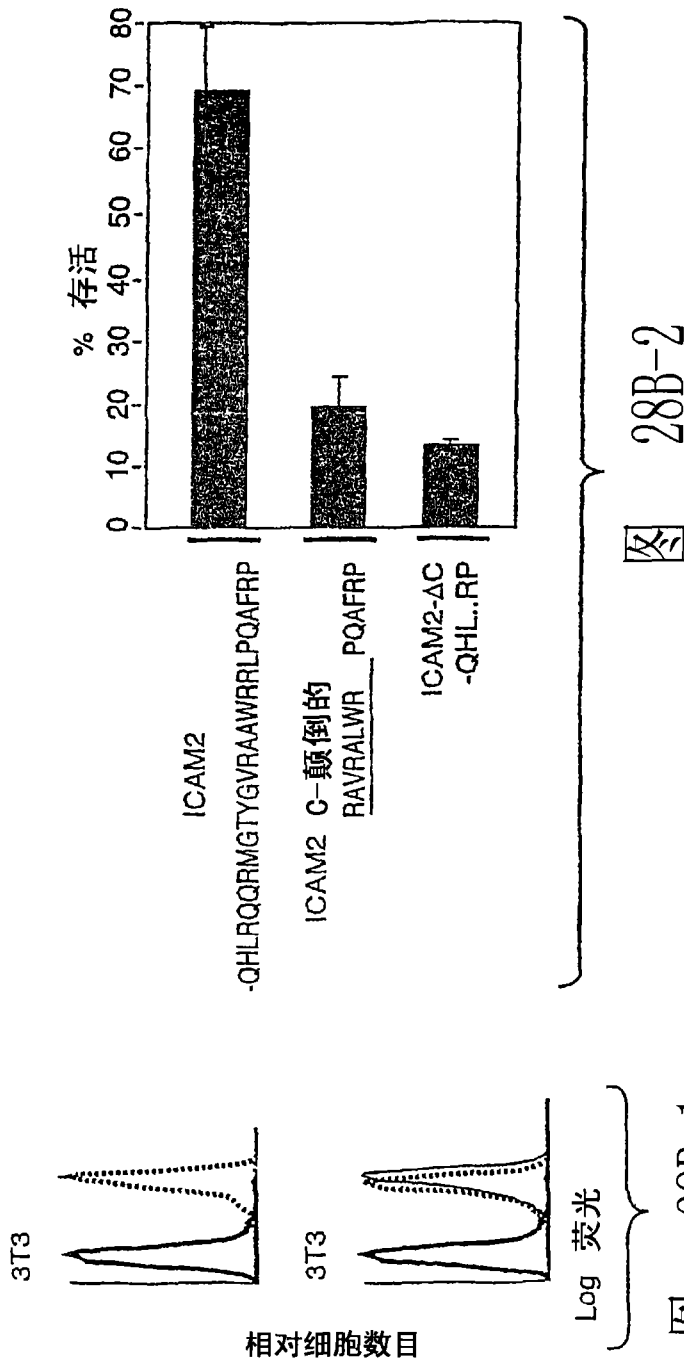


图 28A



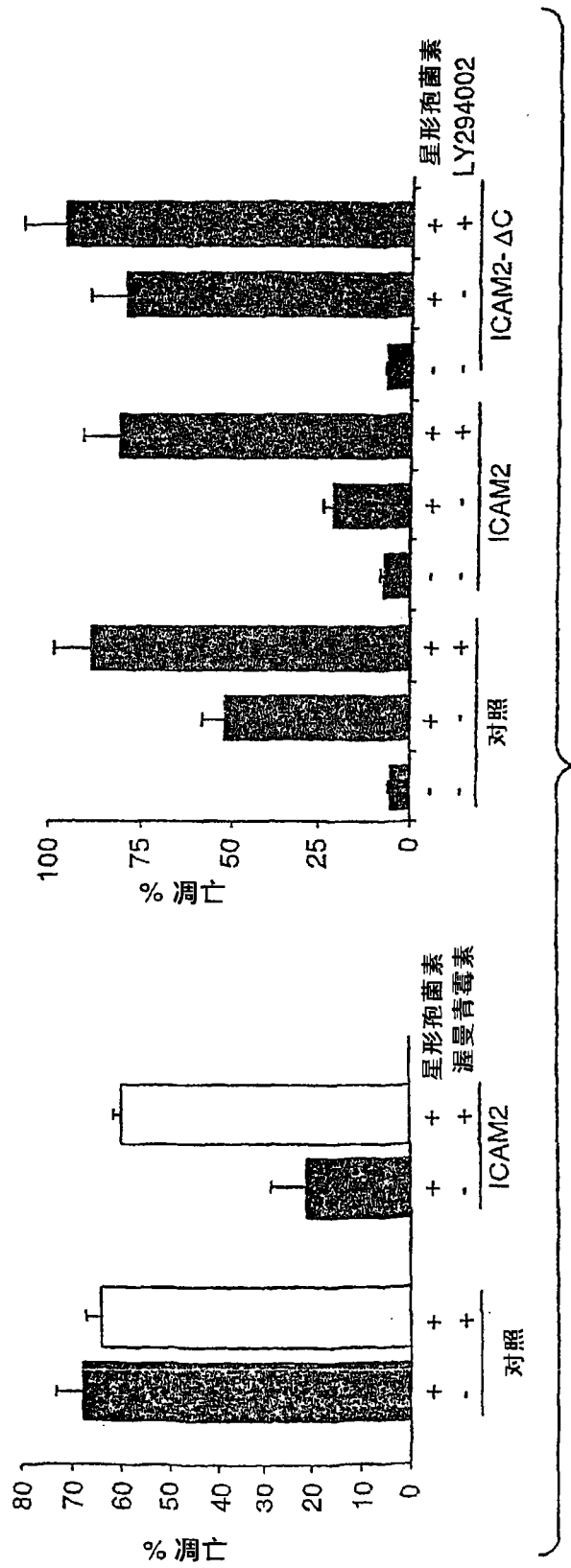


图 29A

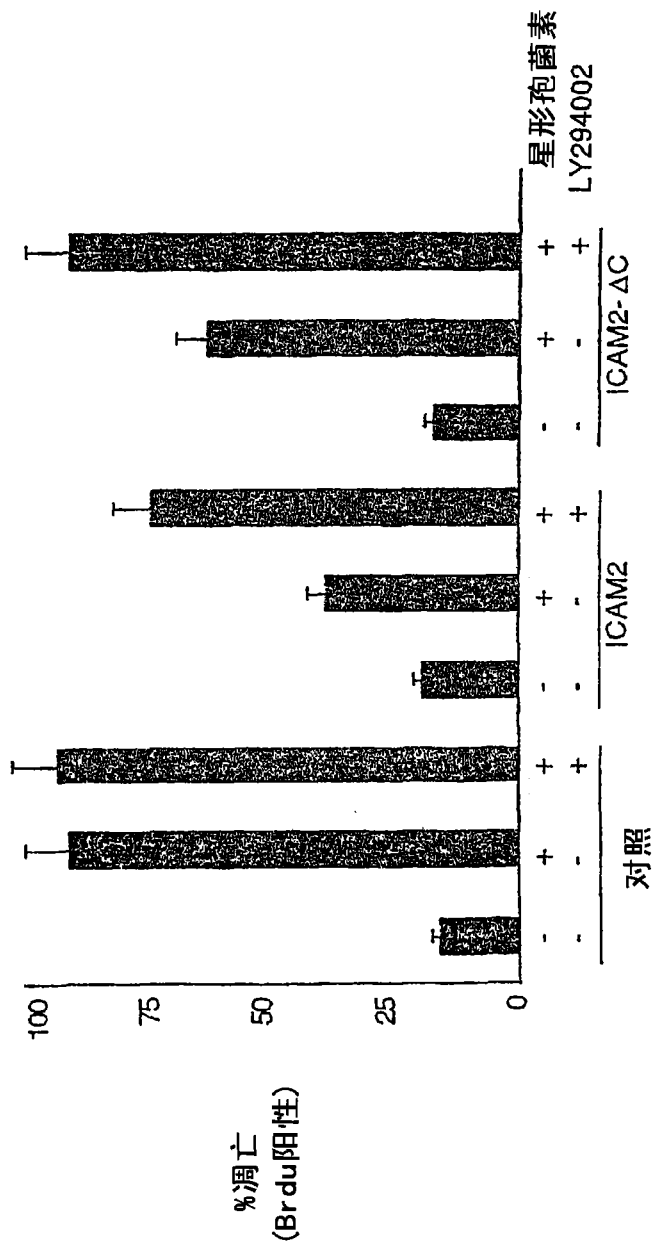
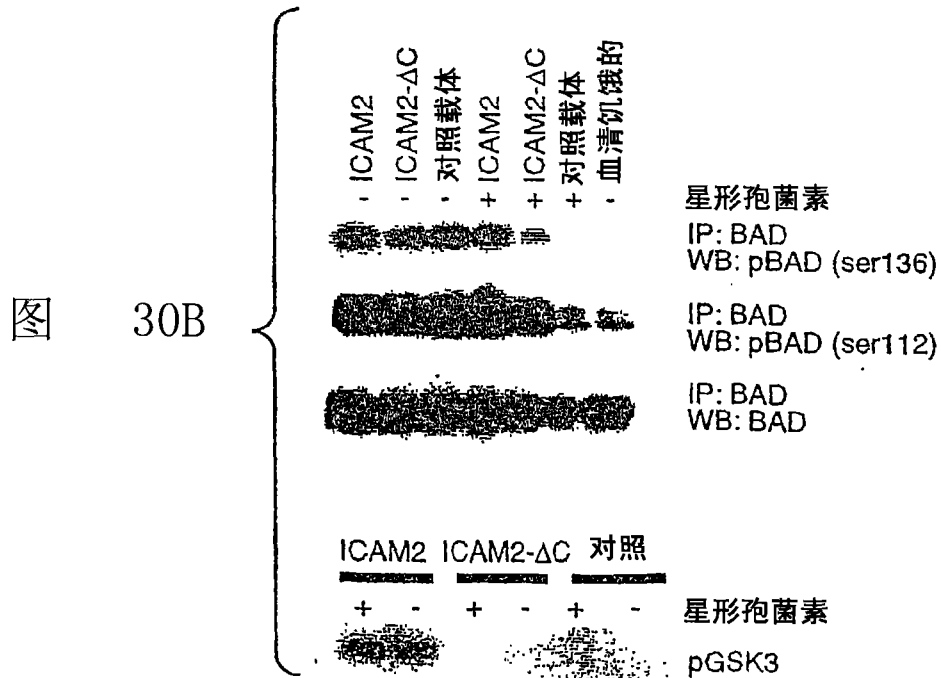
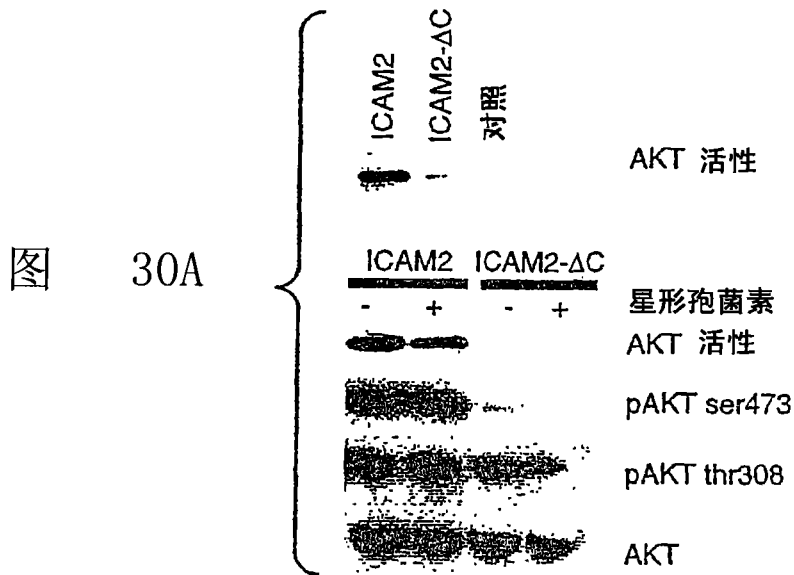


图 29B



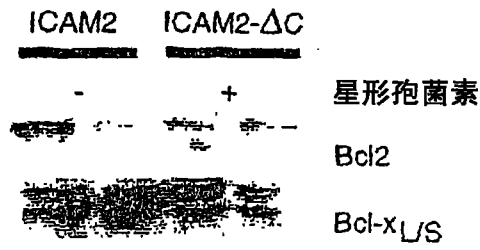


图 30C

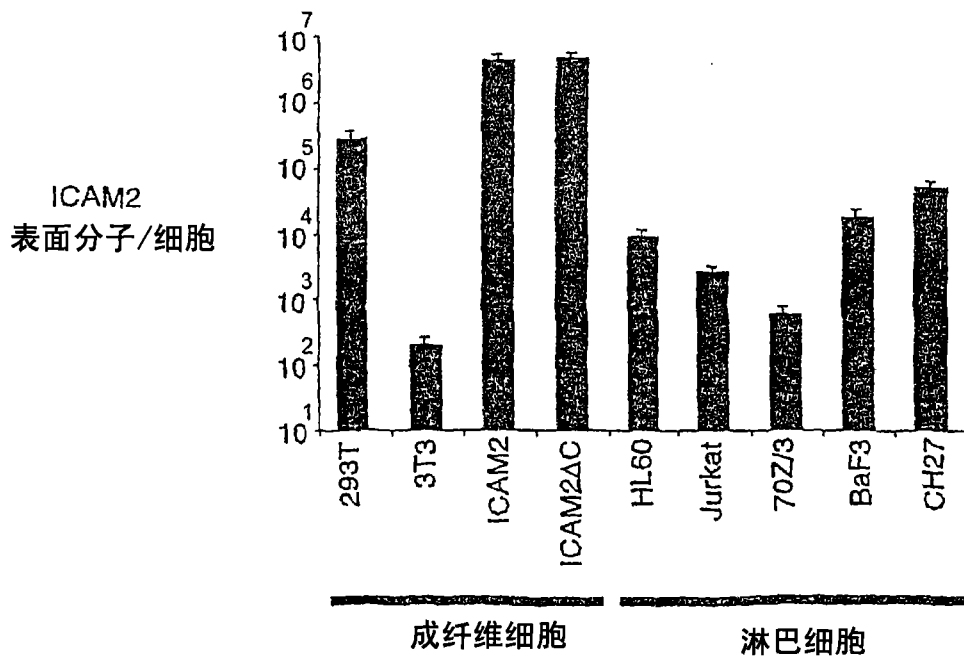


图 30D

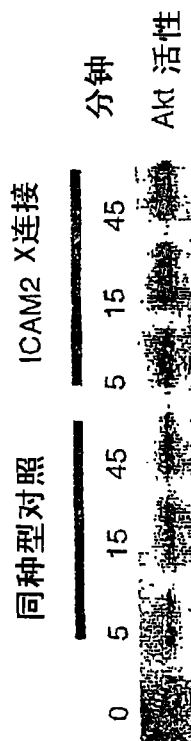
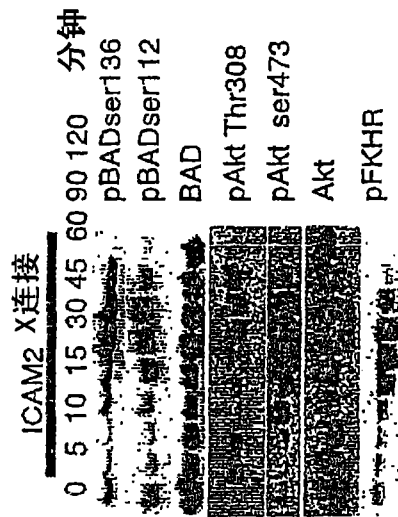


图 31A

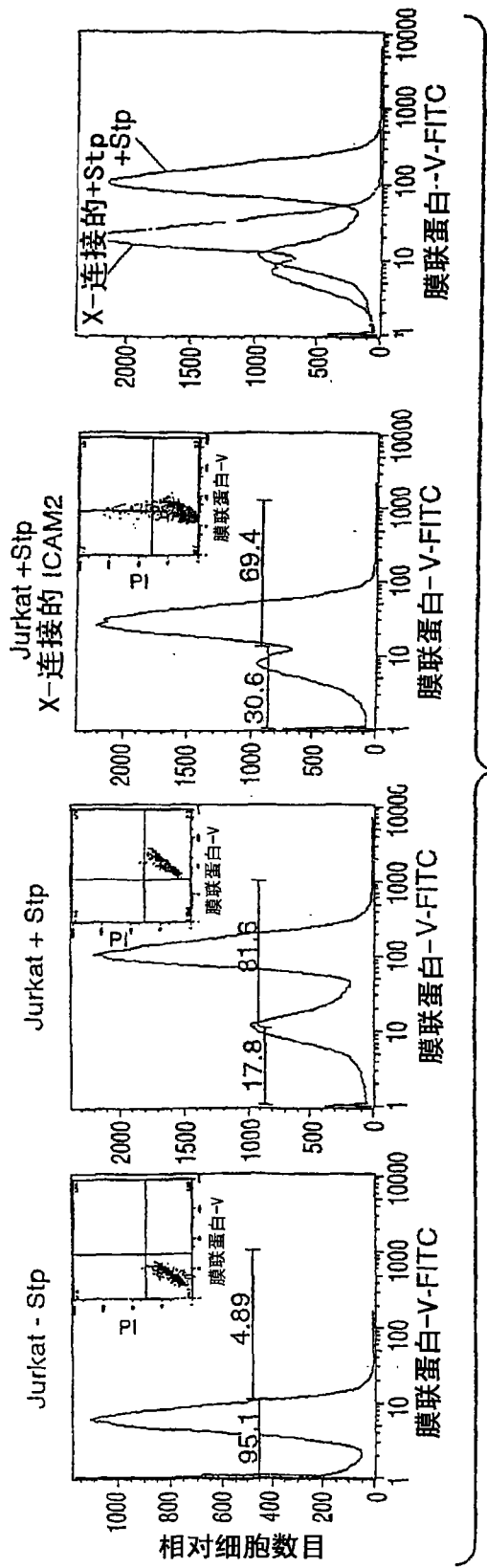


图 31B

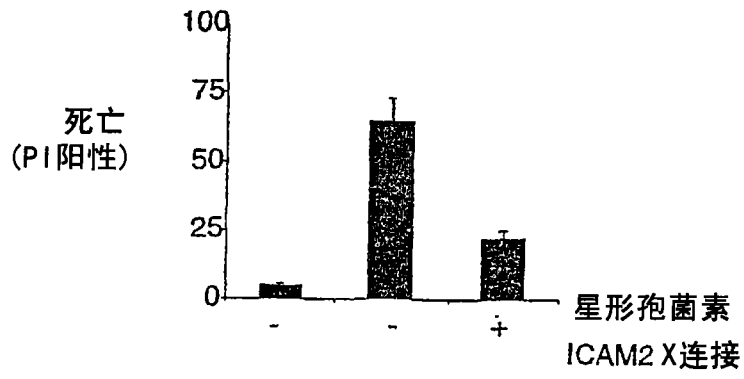


图 31C

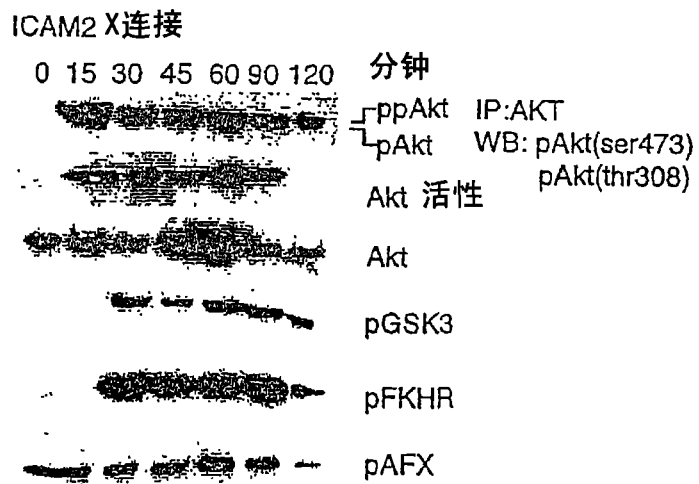


图 31D

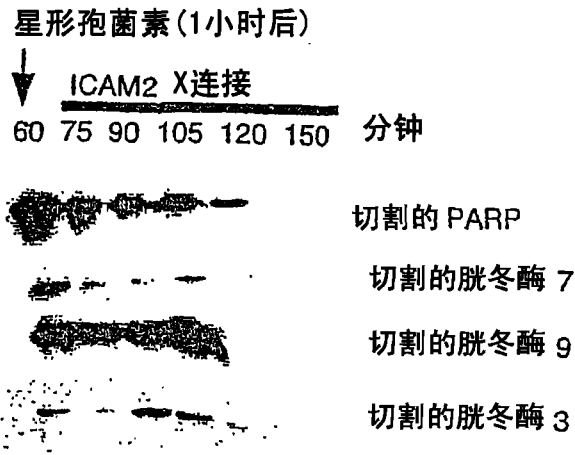


图 31E

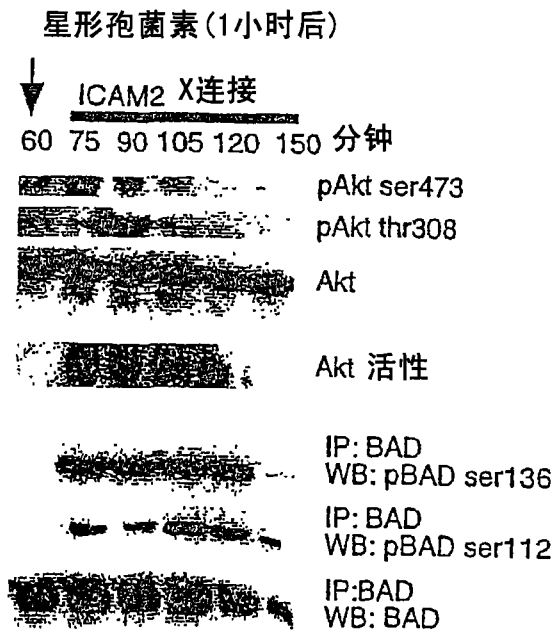


图 31F

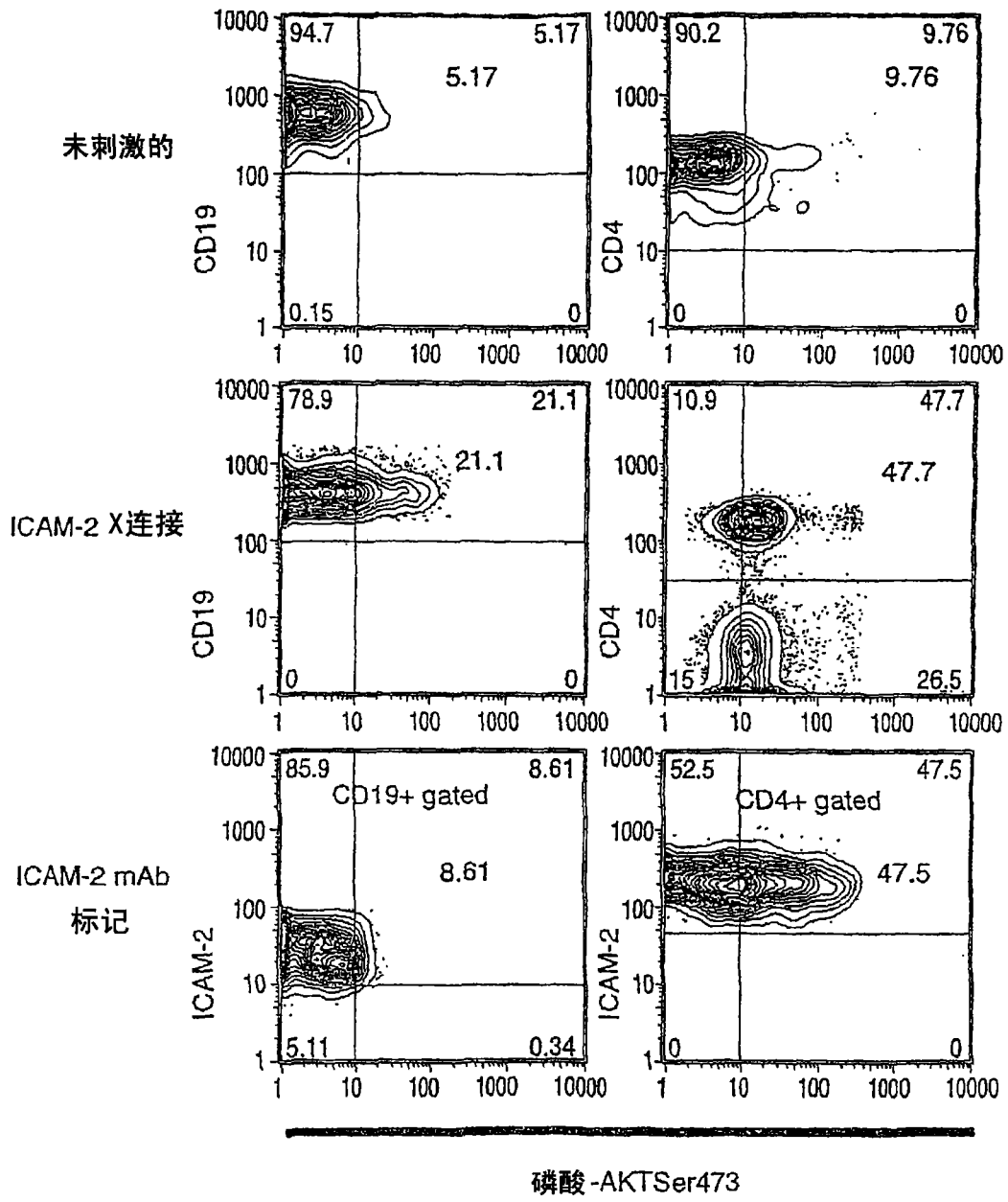


图 32A

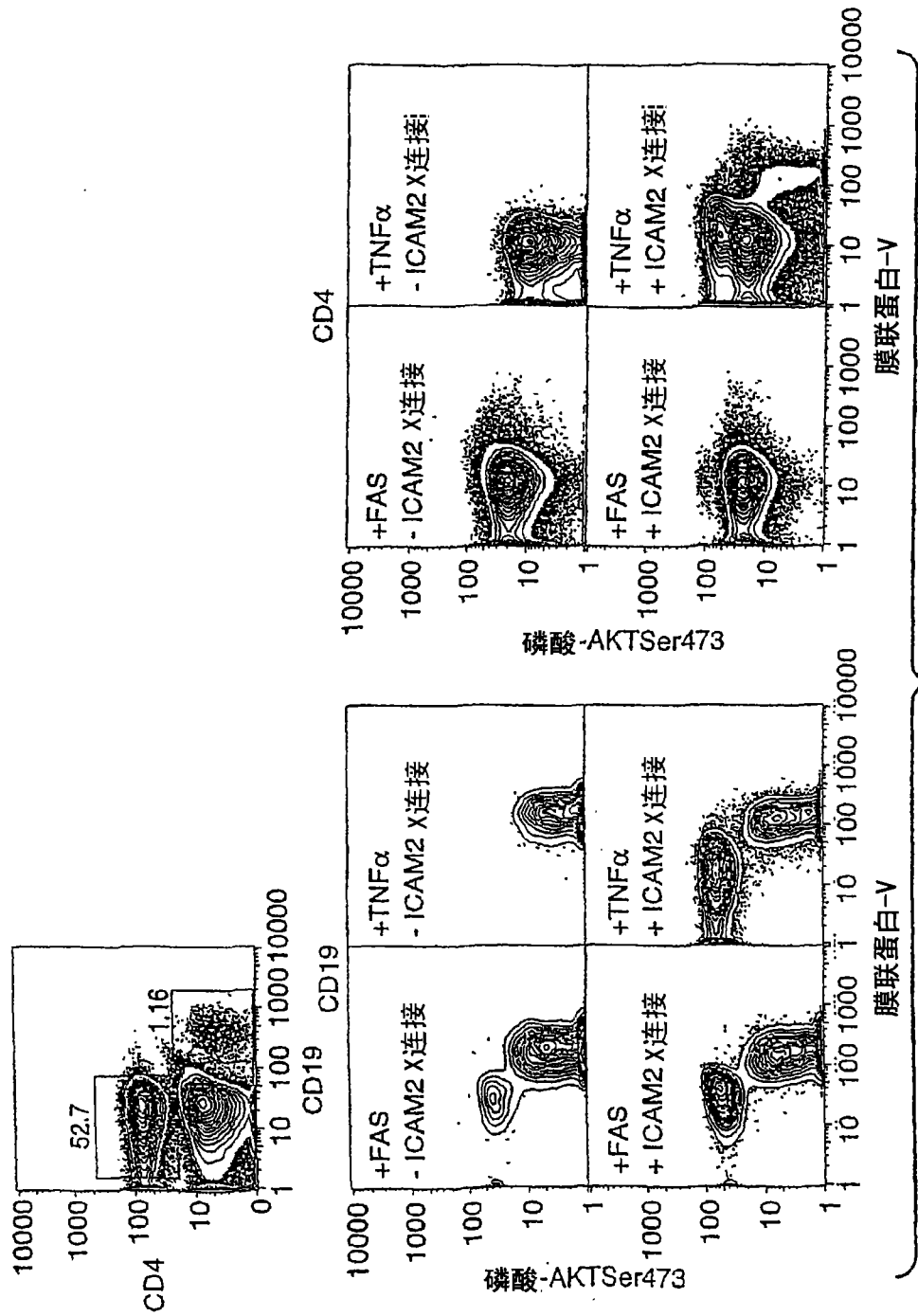


图 32B

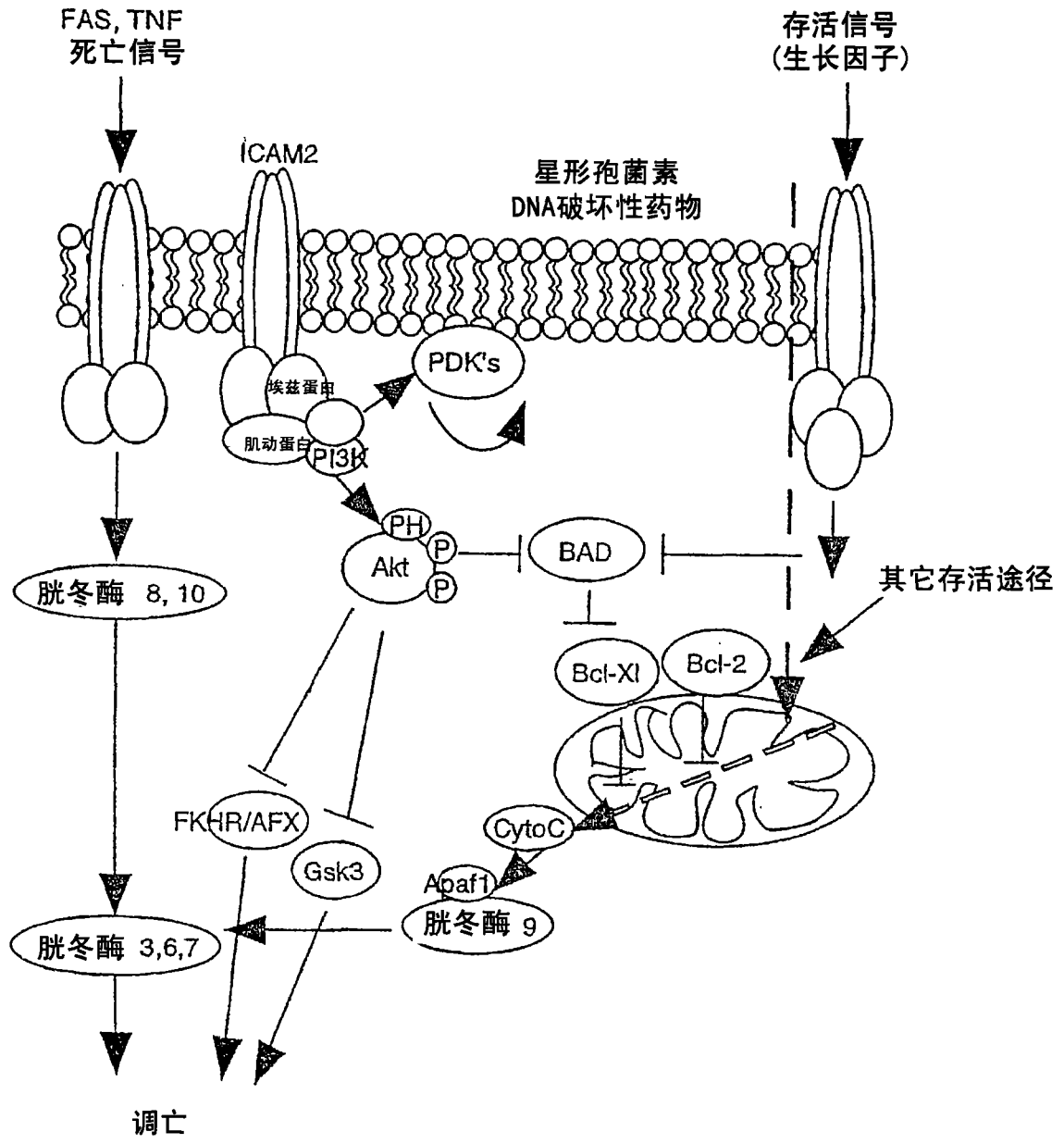


图 32C

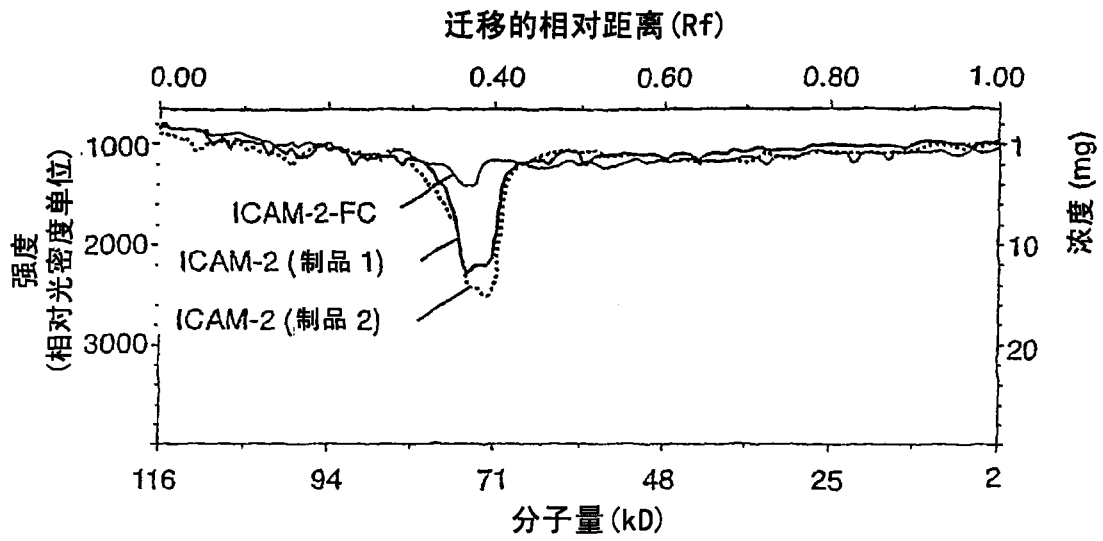


图 33A

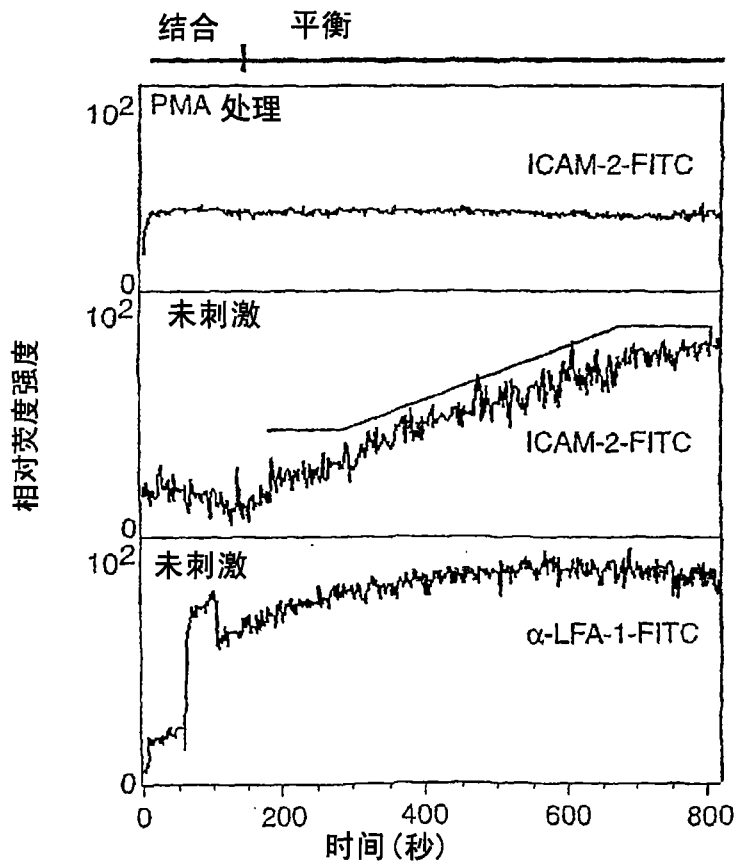


图 33B

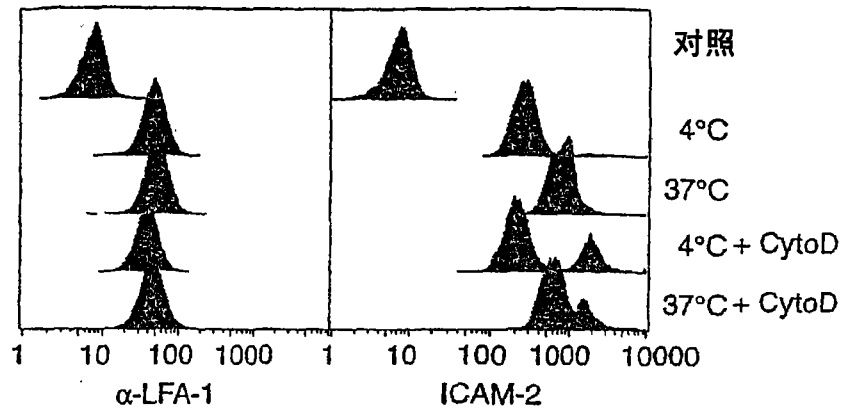


图 33C

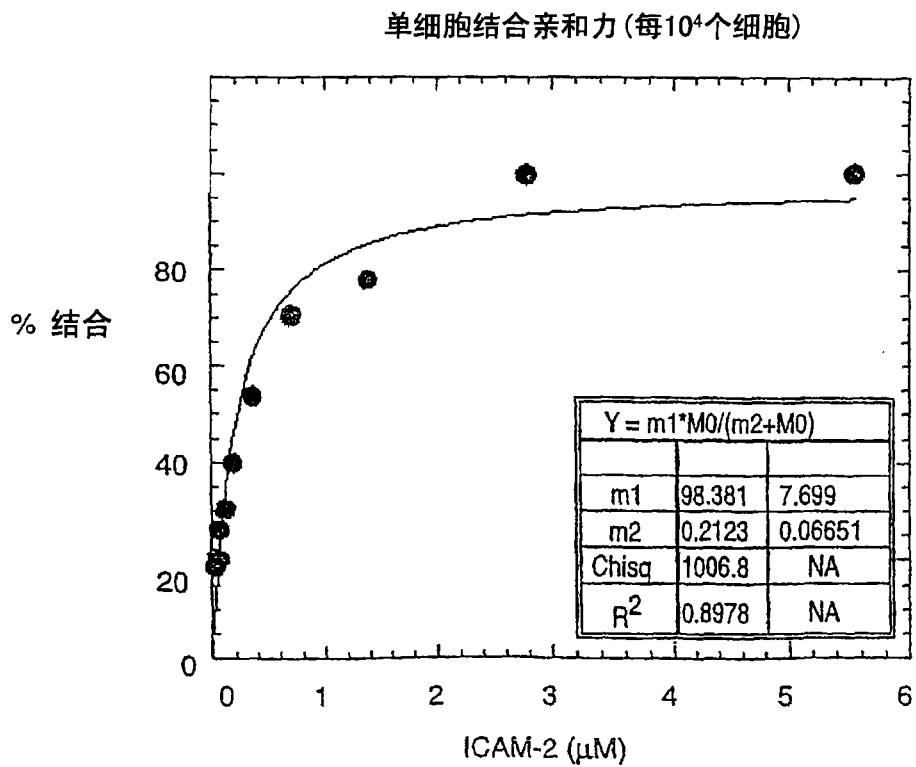


图 33D

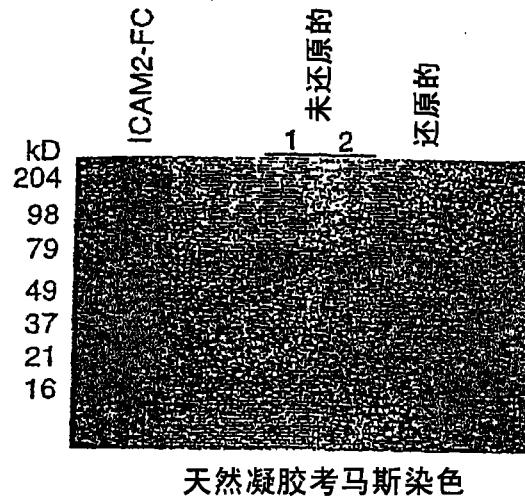


图 33E

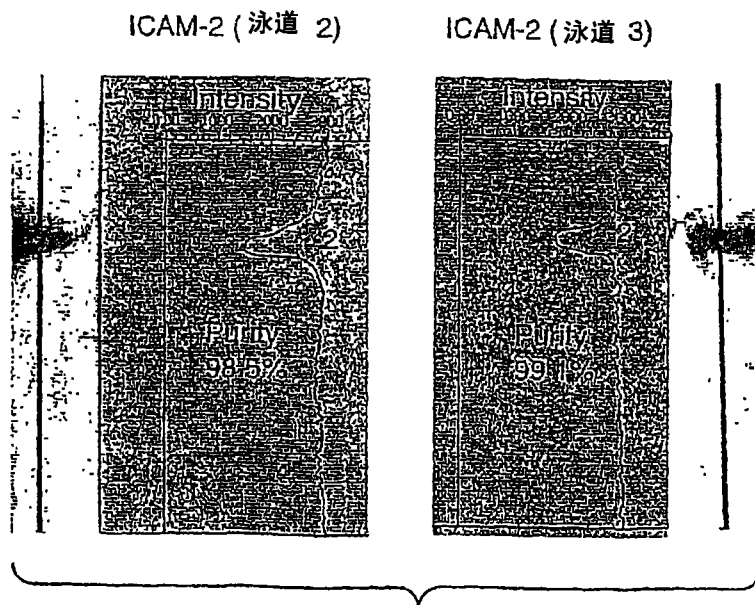


图 33F

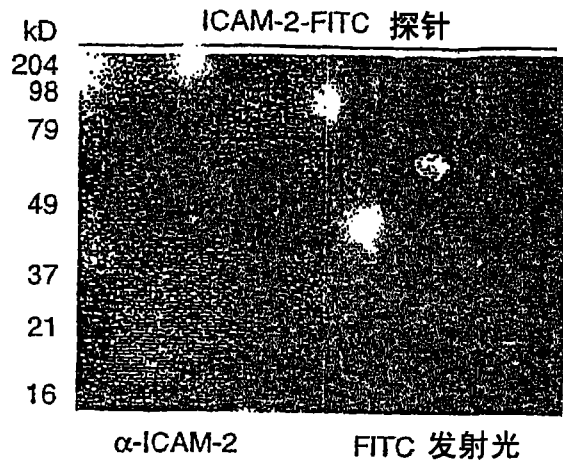


图 33G

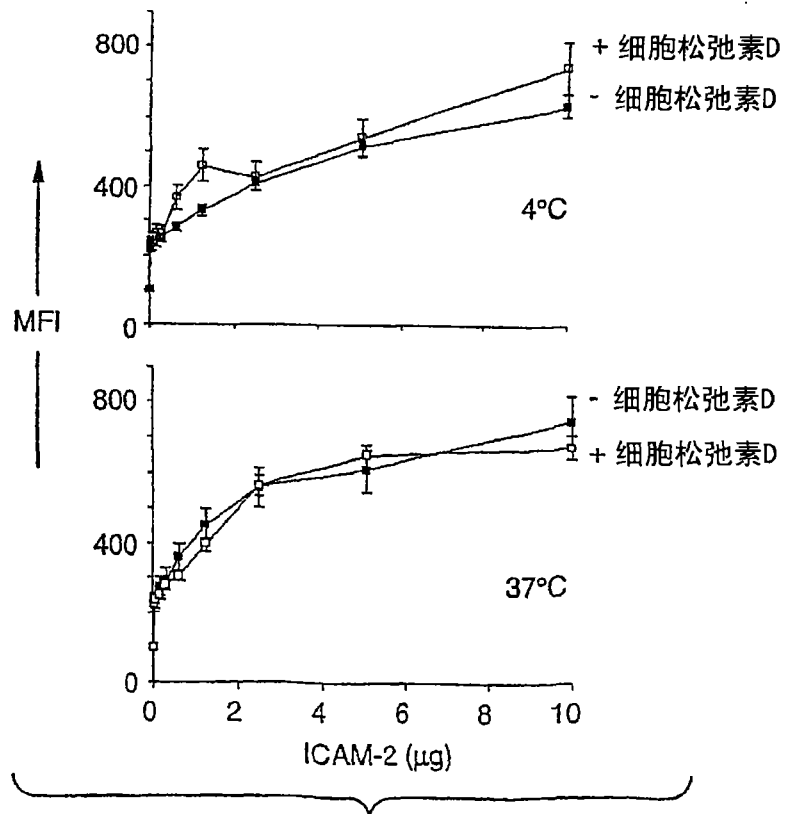


图 33H

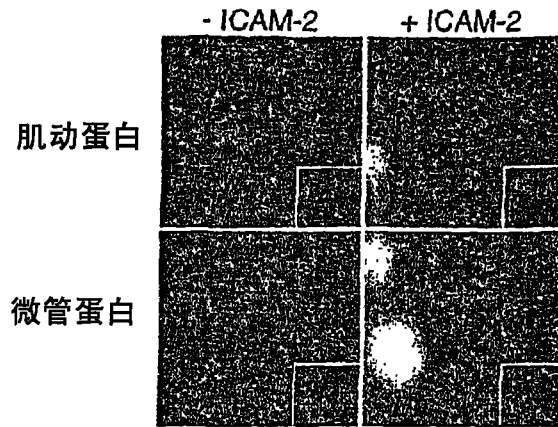


图 34A

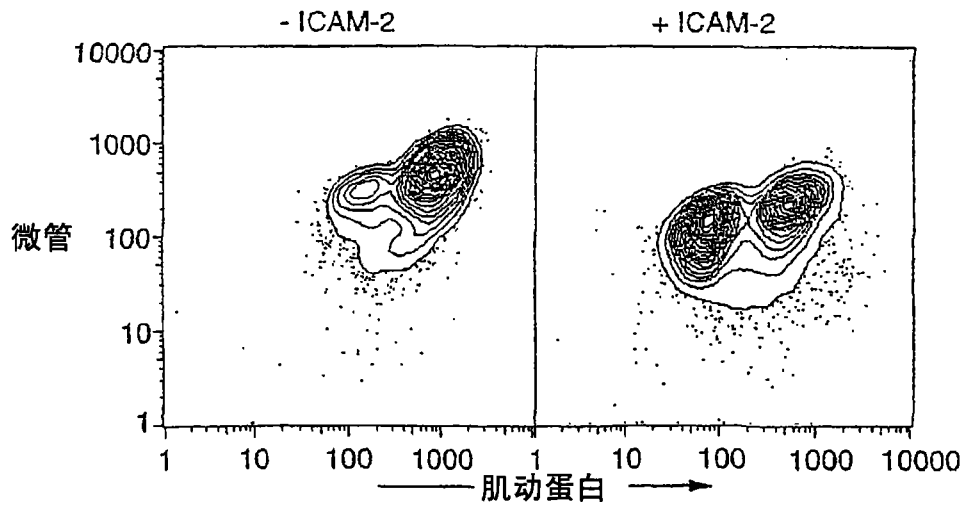


图 34B

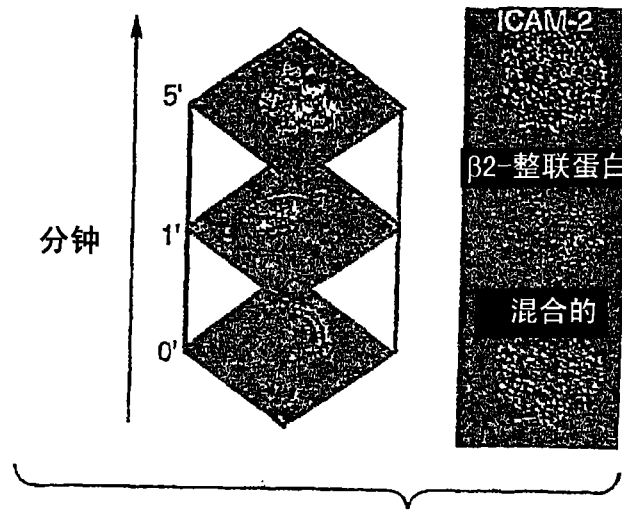


图 34C

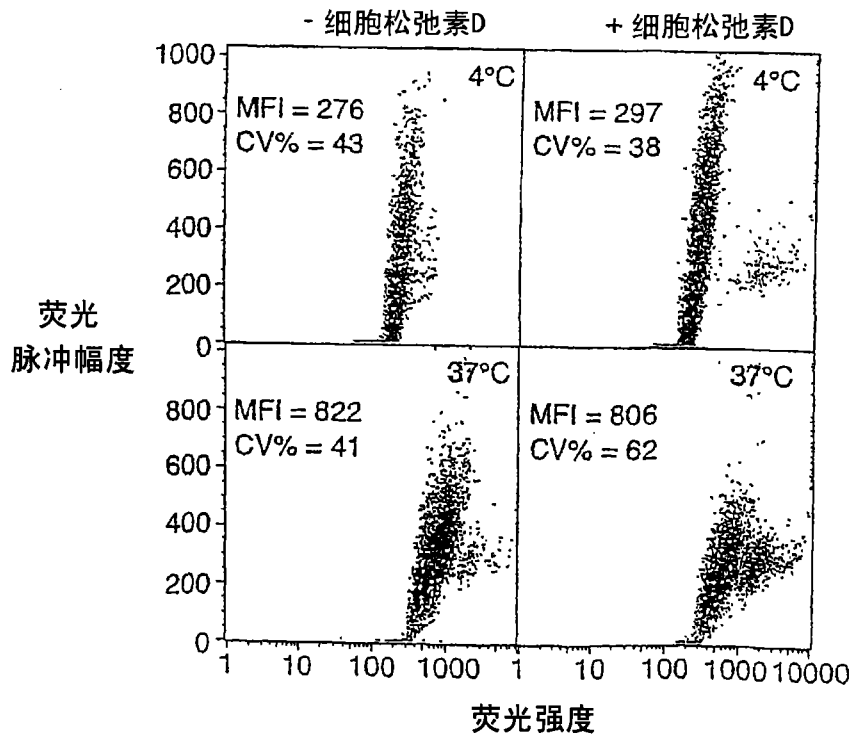
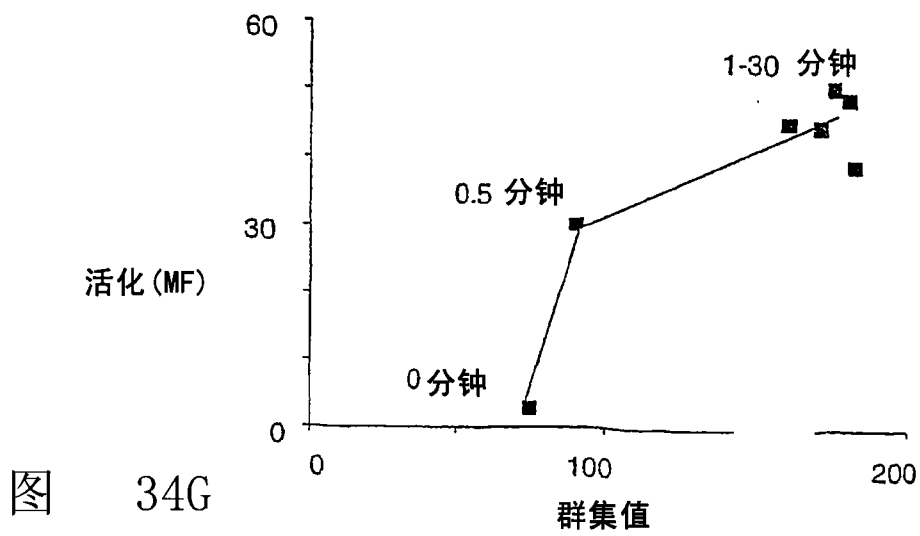
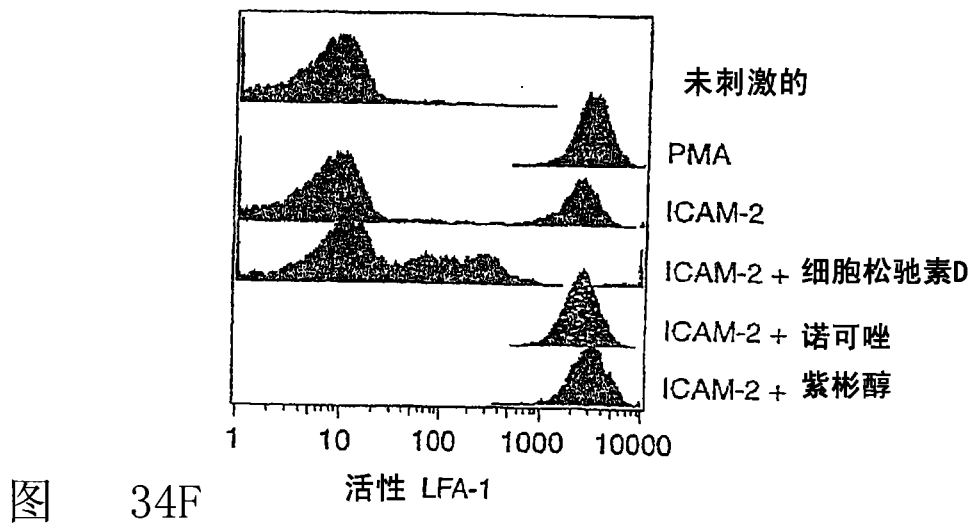
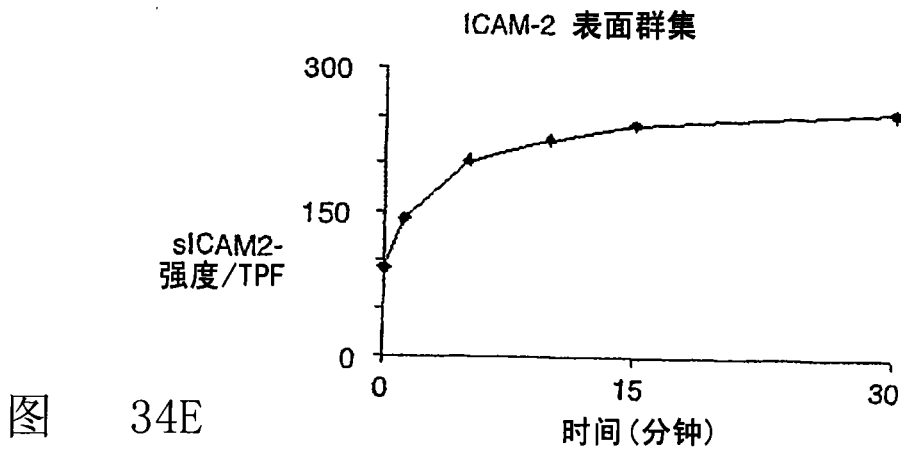


图 34D



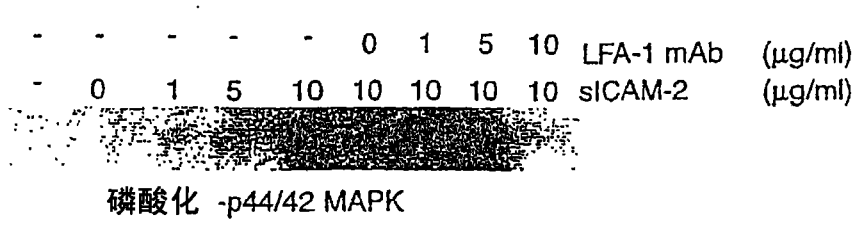


图 34H

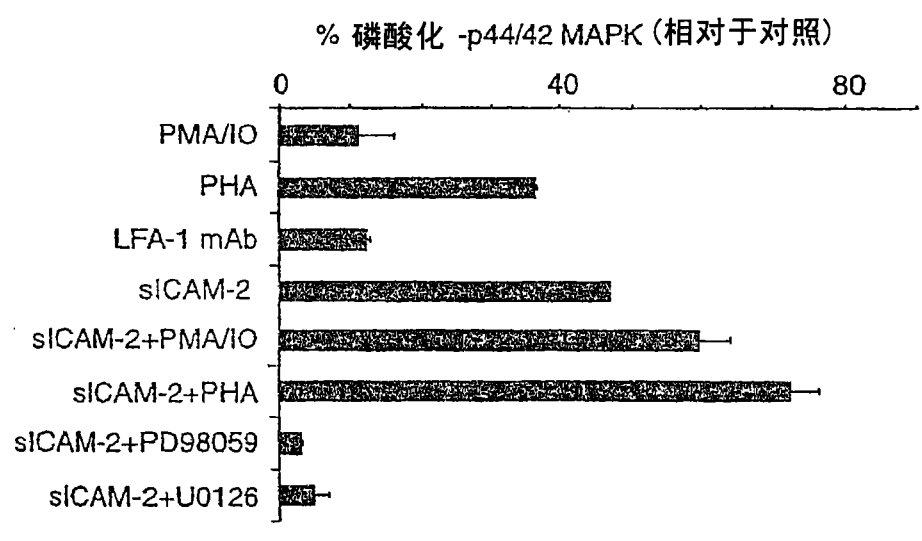


图 34I

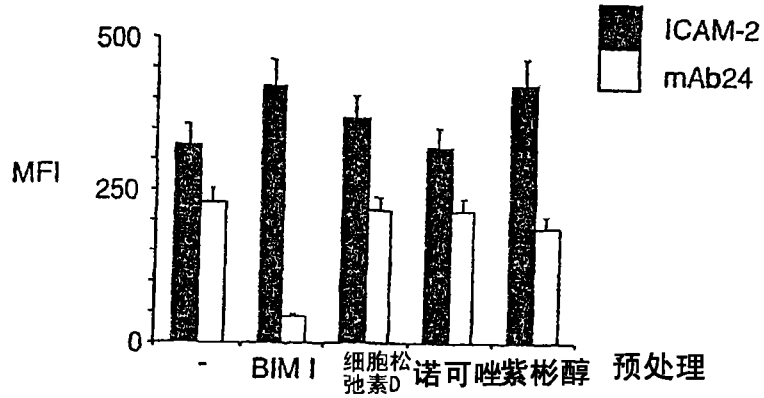


图 35A

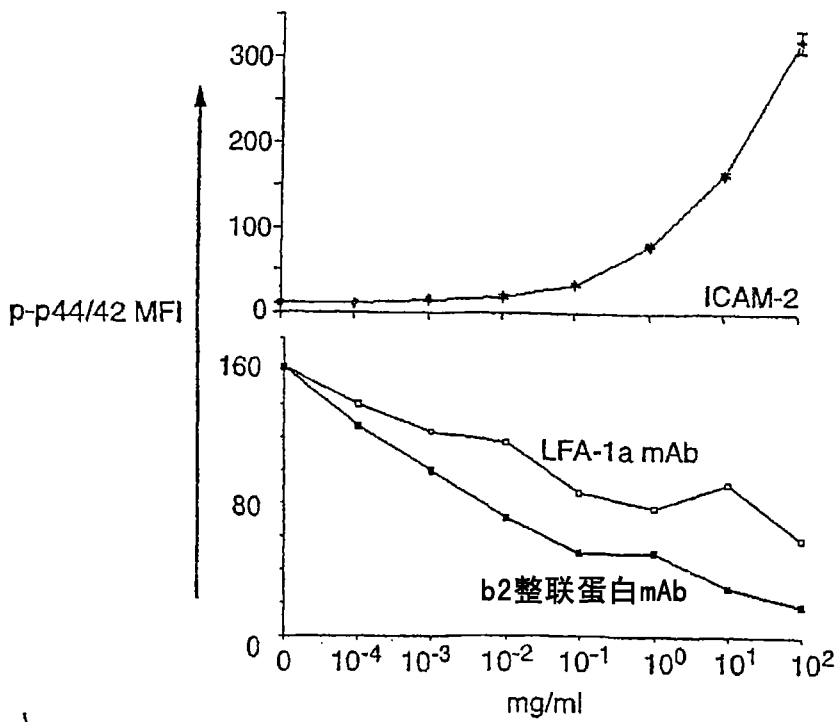


图 35B

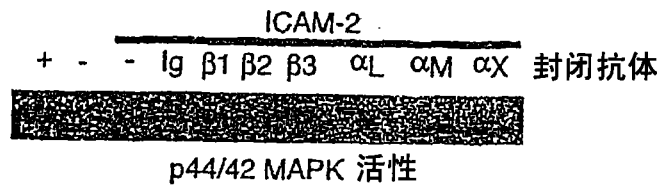


图 35C

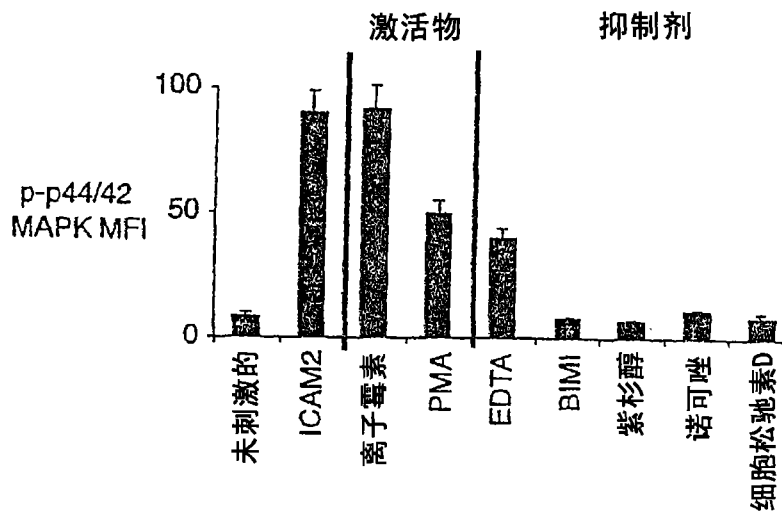


图 35D

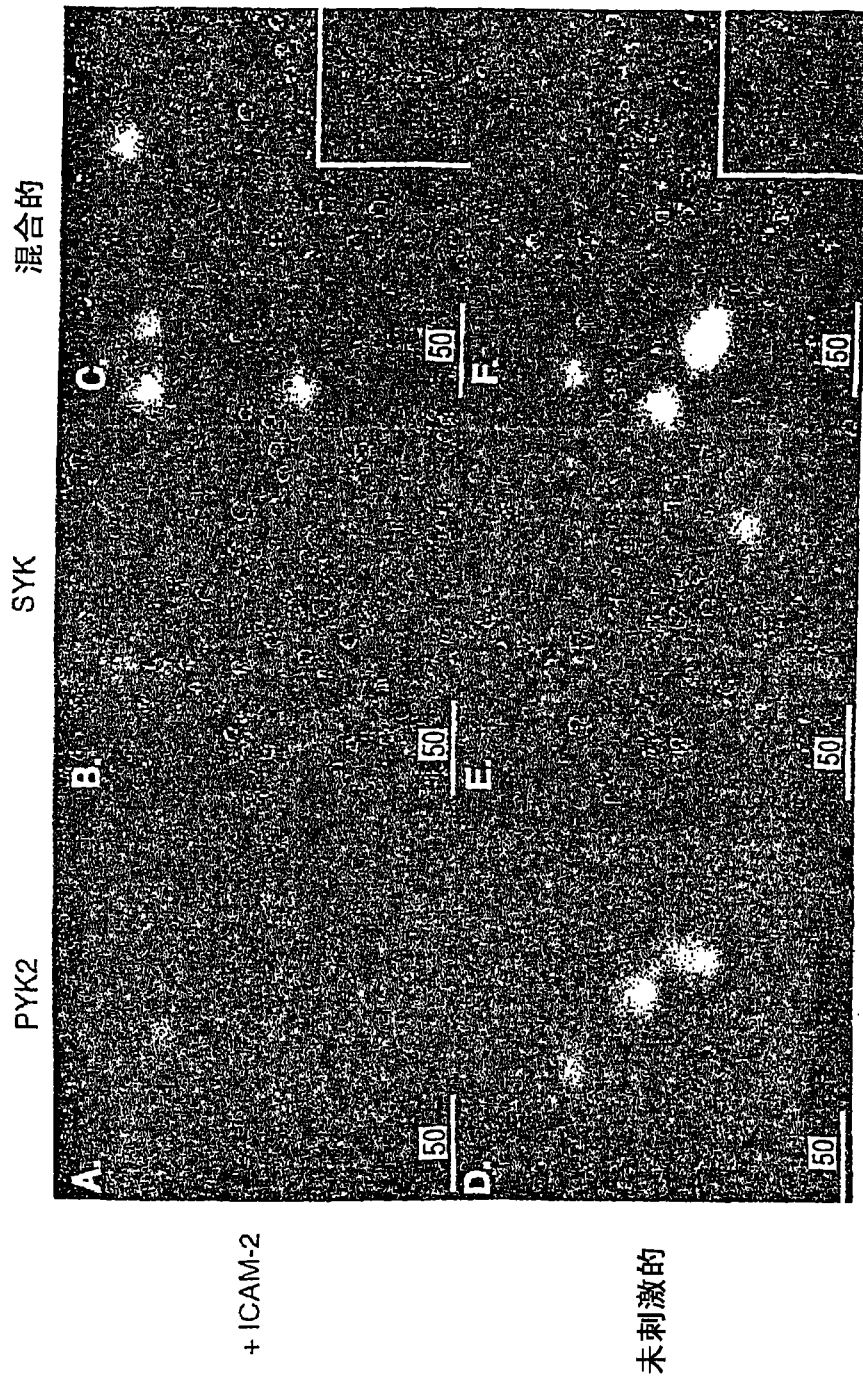


图 35E

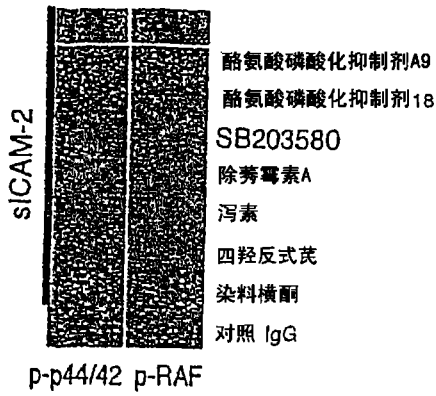


图 36A

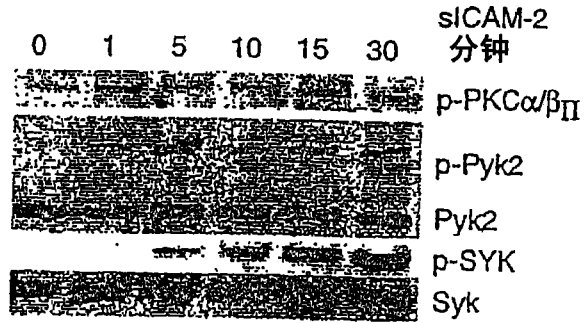


图 36C

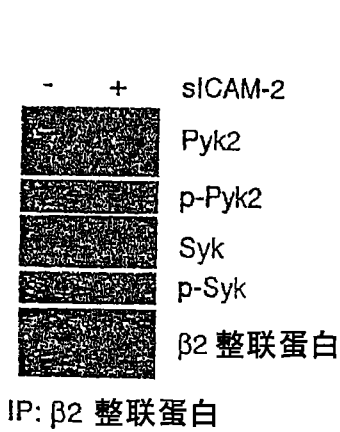


图 36B

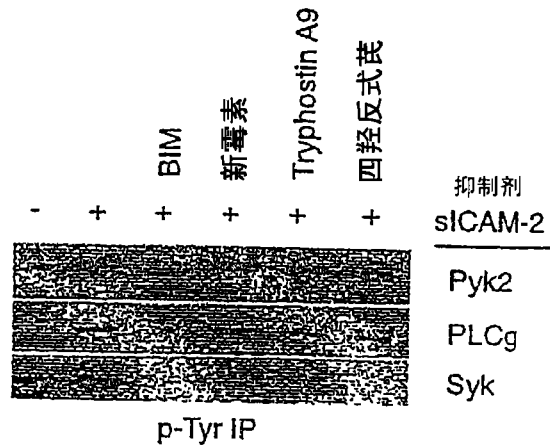


图 36E

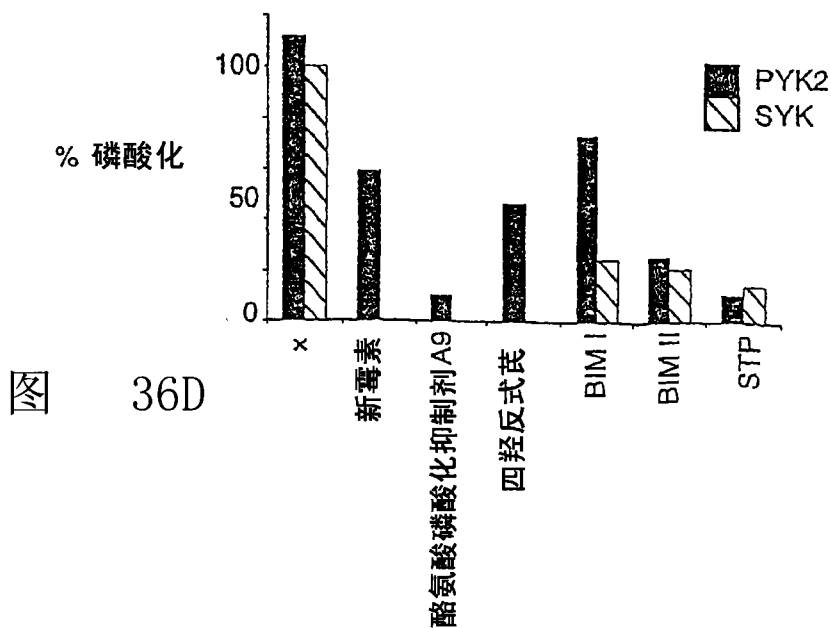


图 36D

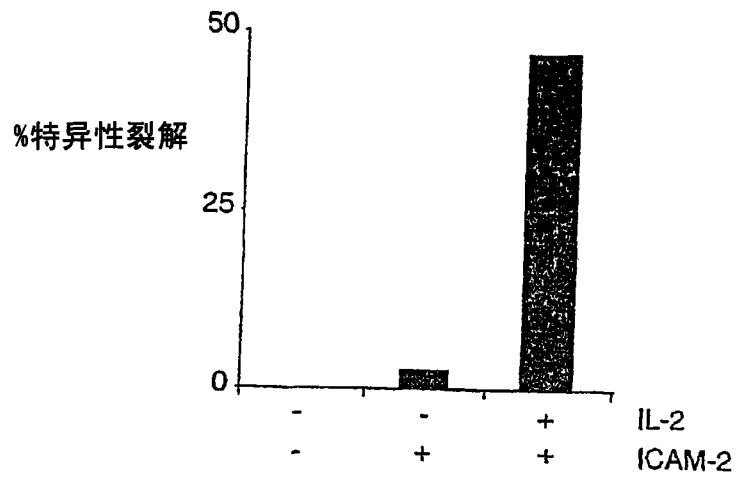


图 37A

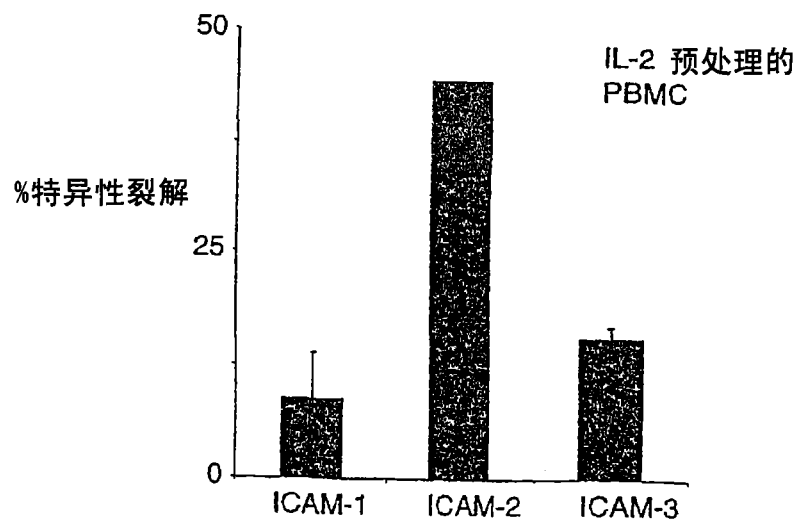


图 37B

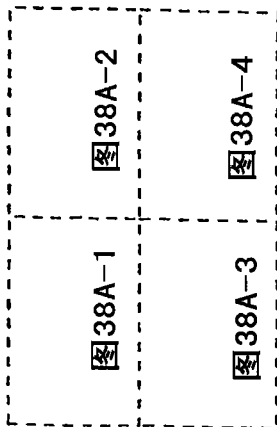


图 38A

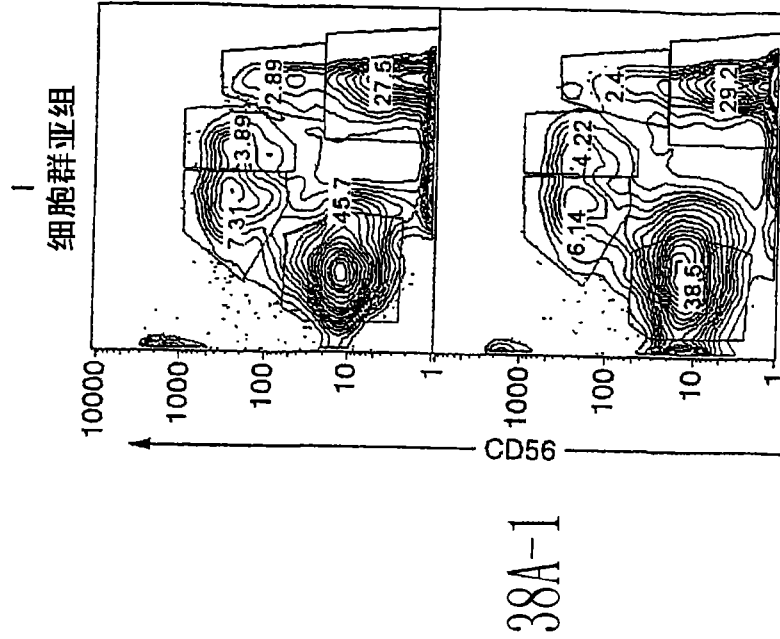


图 38A-I

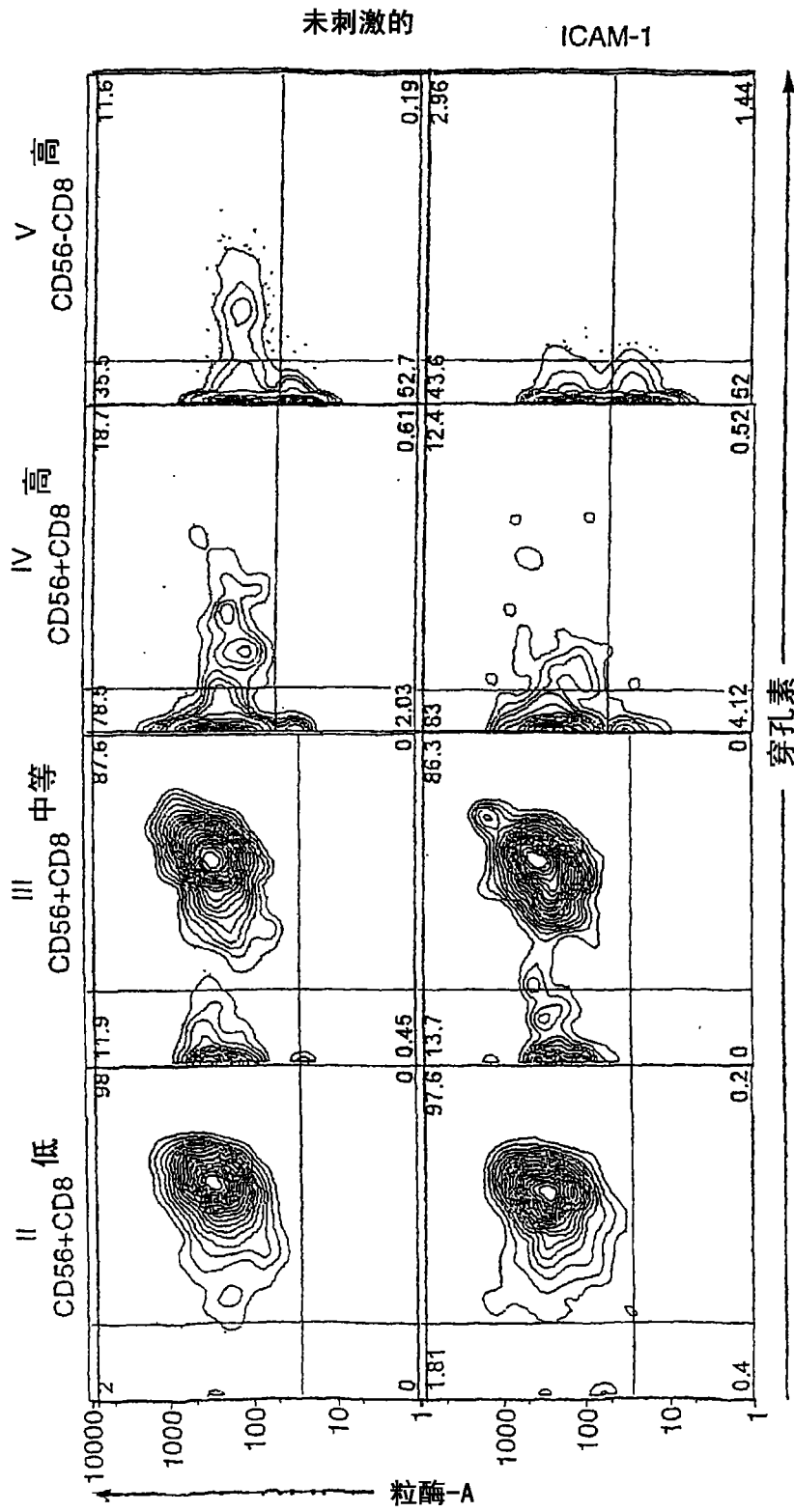


图 38A-2

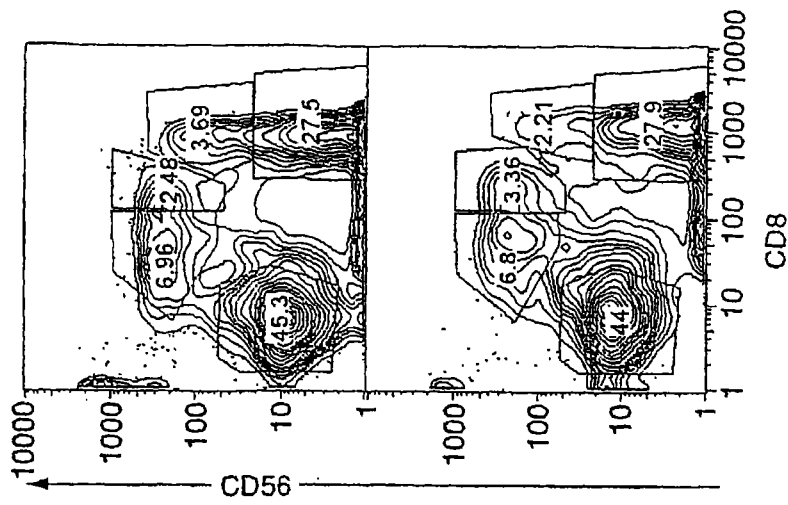


图 38A-3

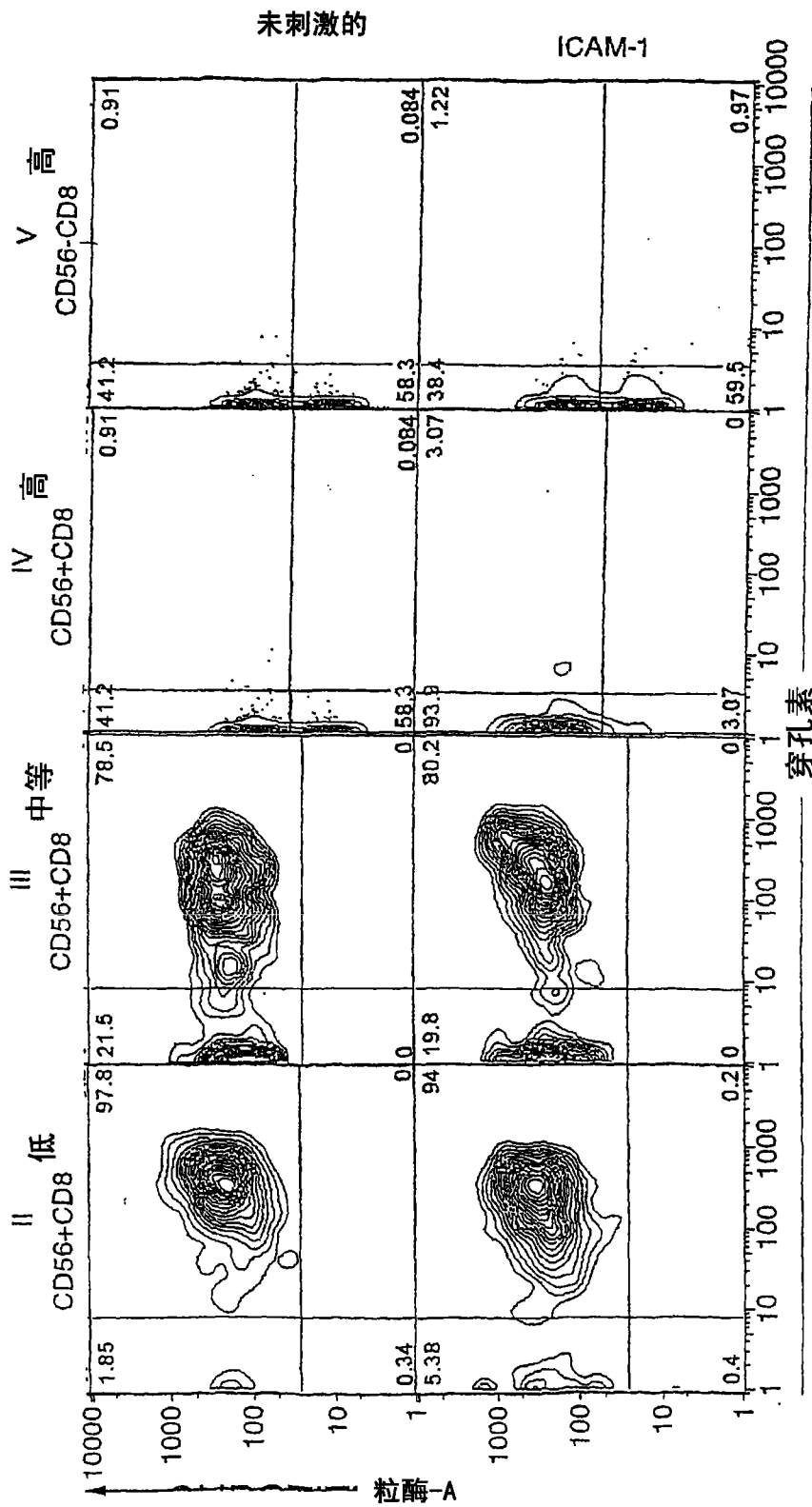


图 38A-4

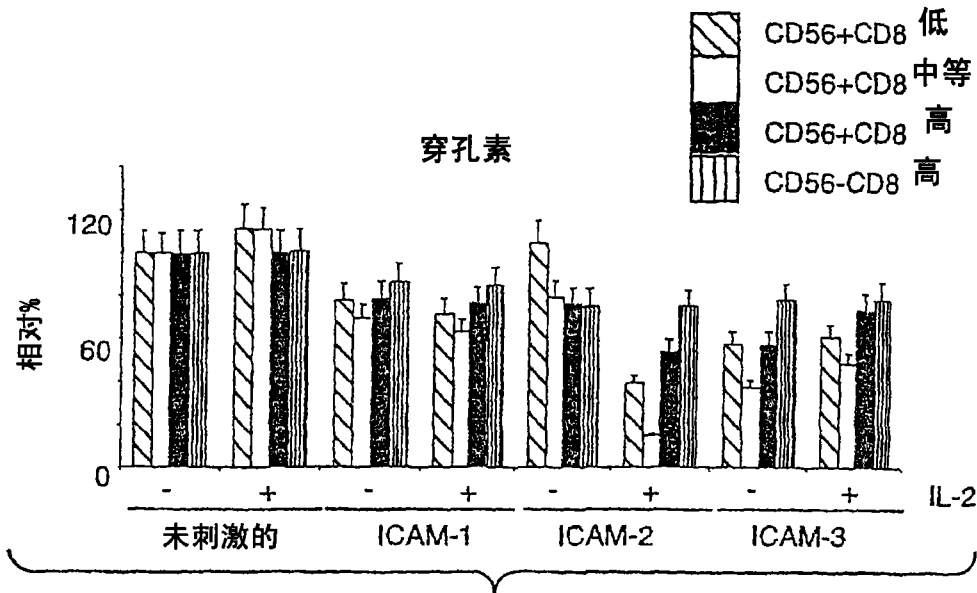


图 38B

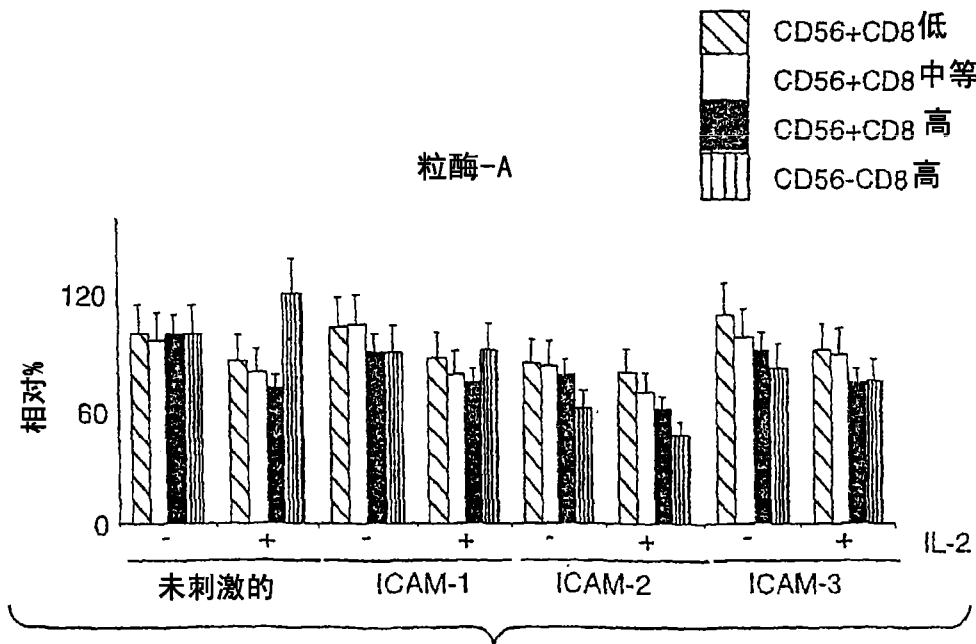


图 38C

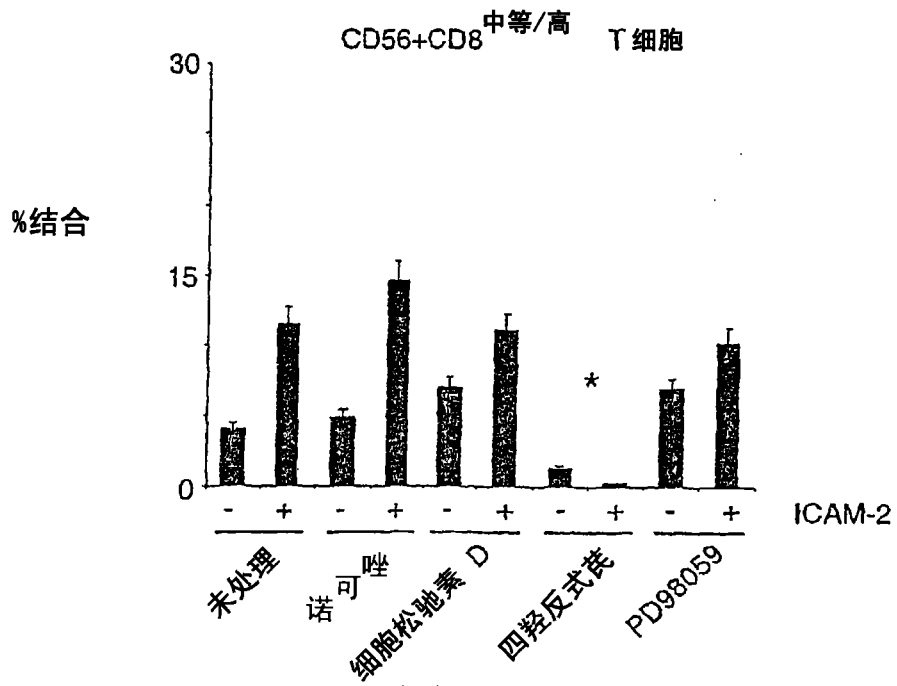


图 39A

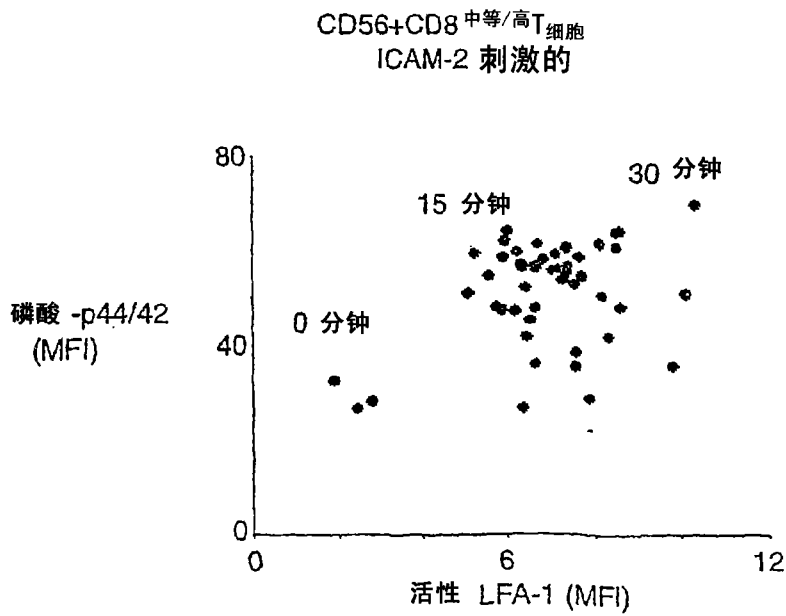


图 39B

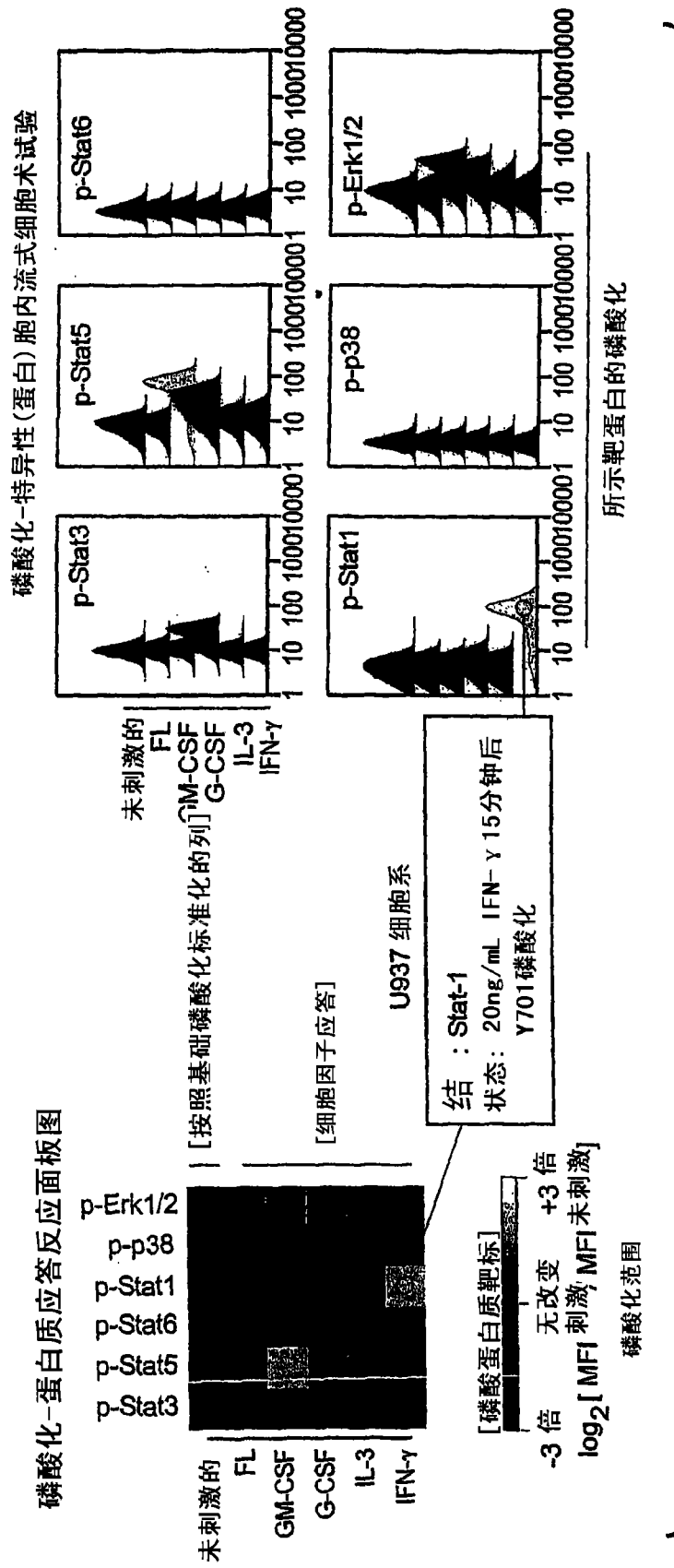


图 40A

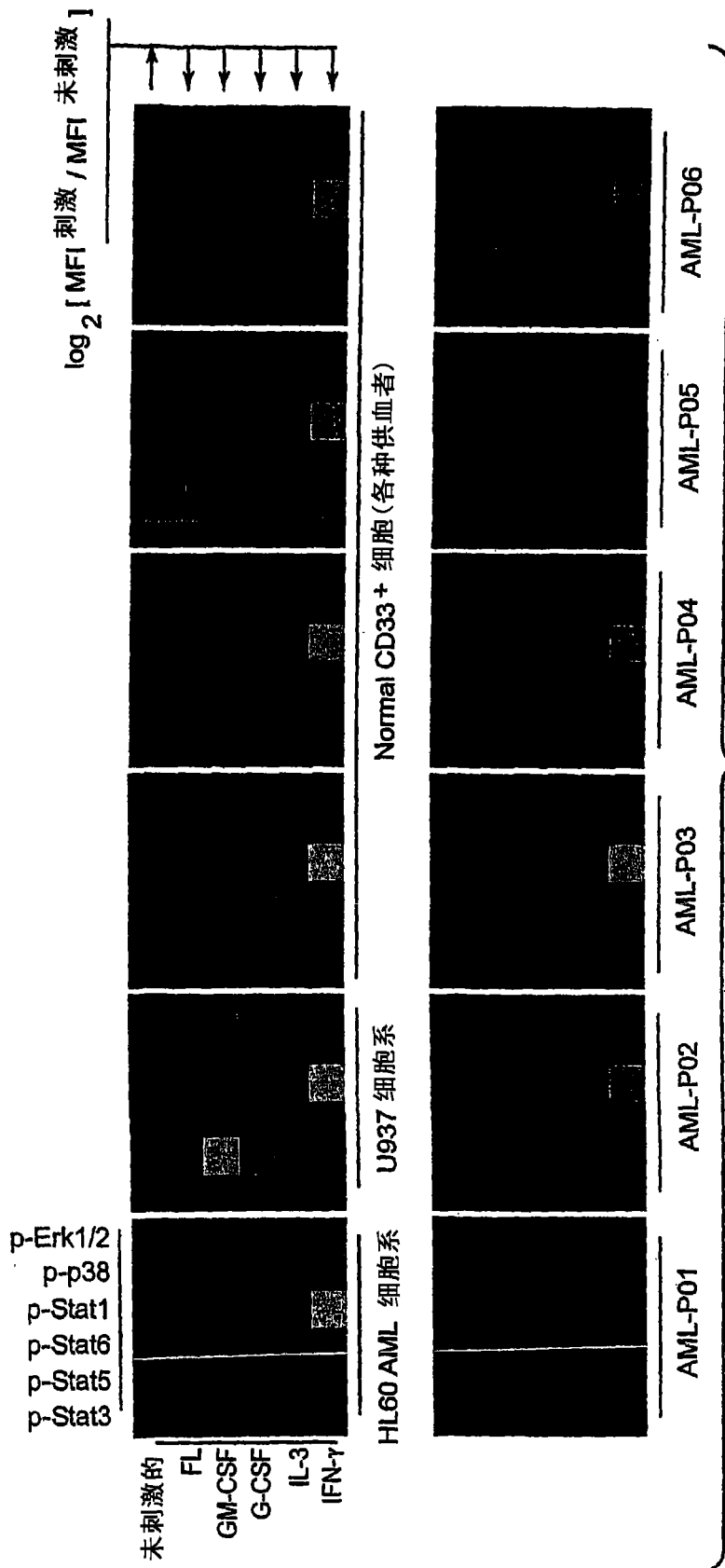


图 40B

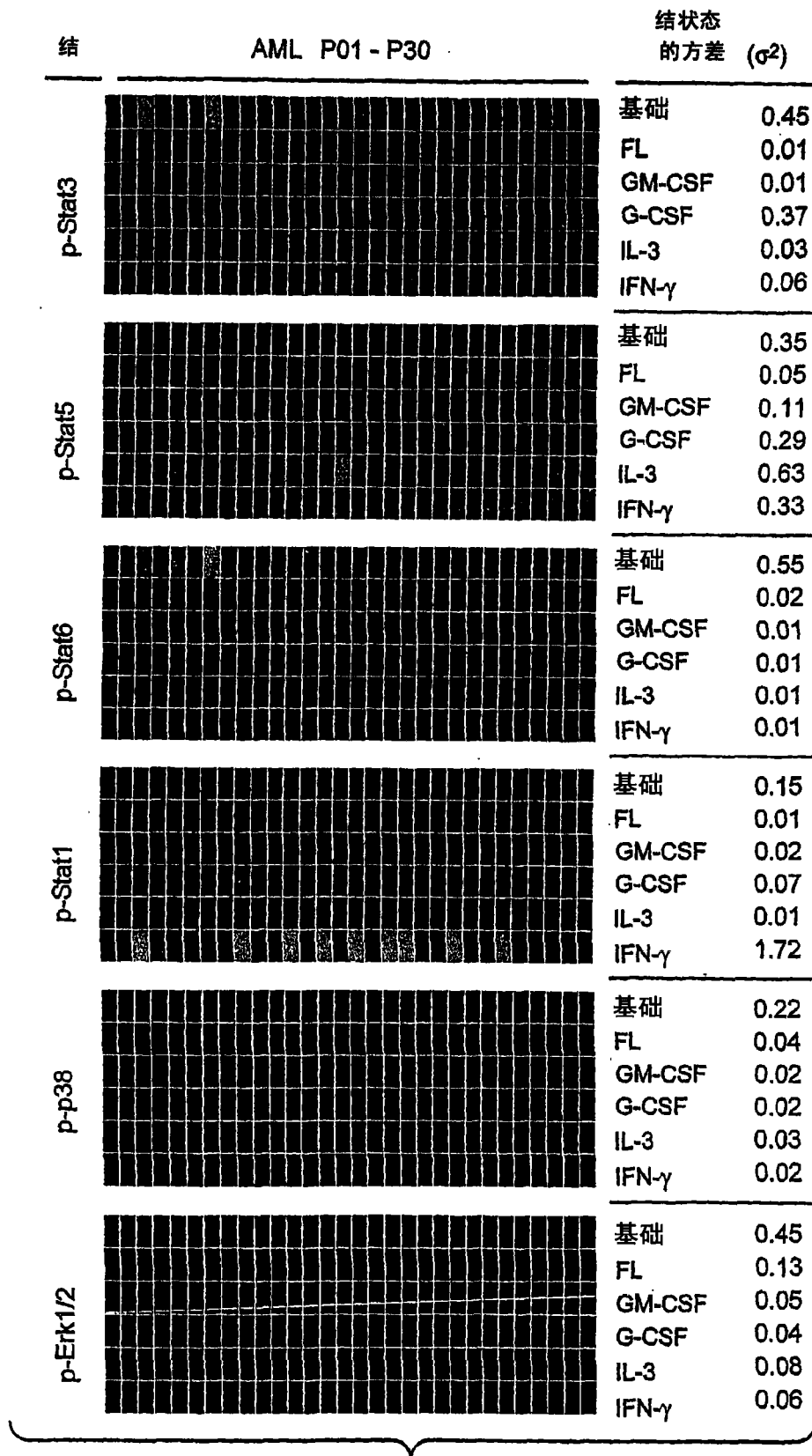
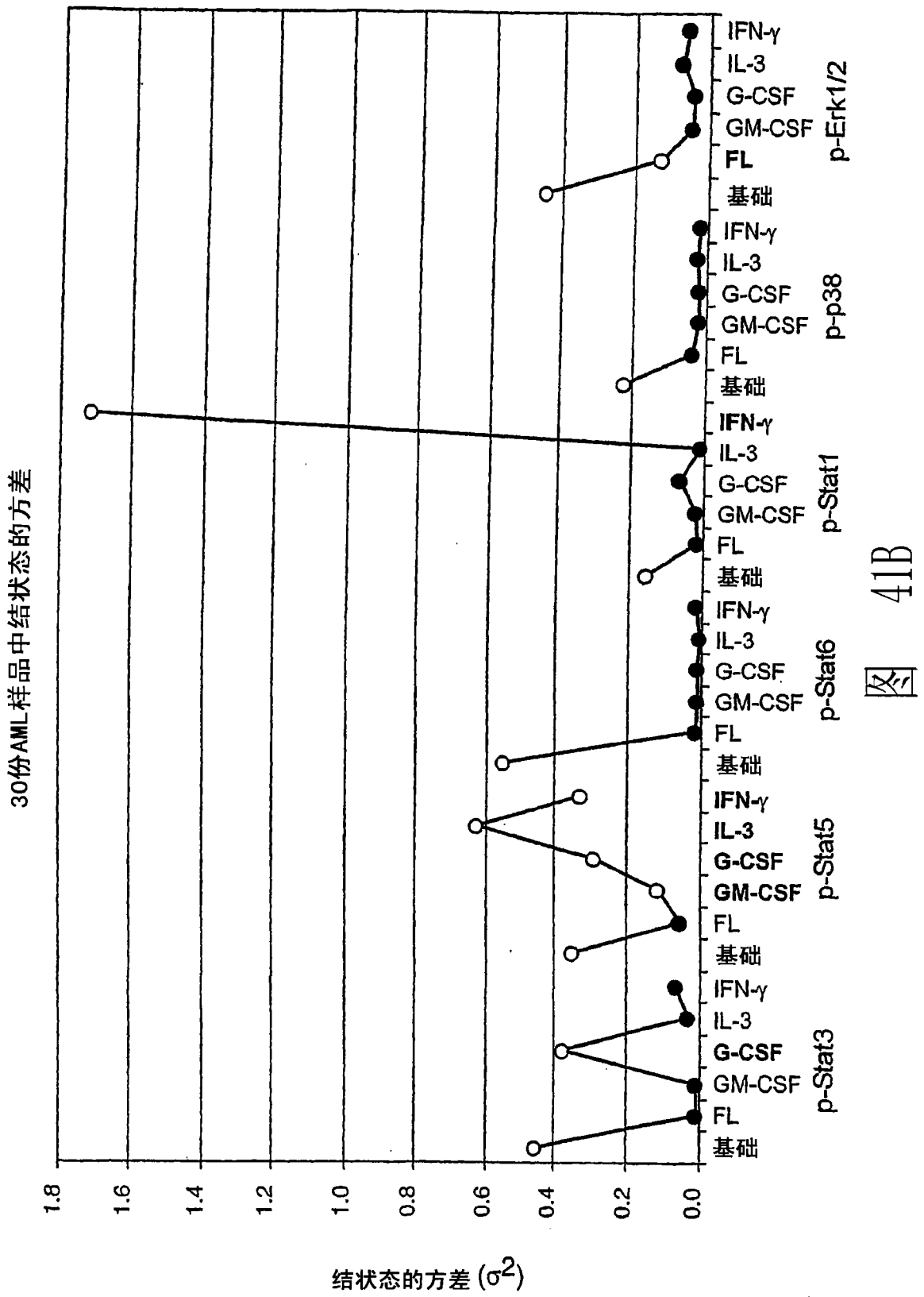


图 41A



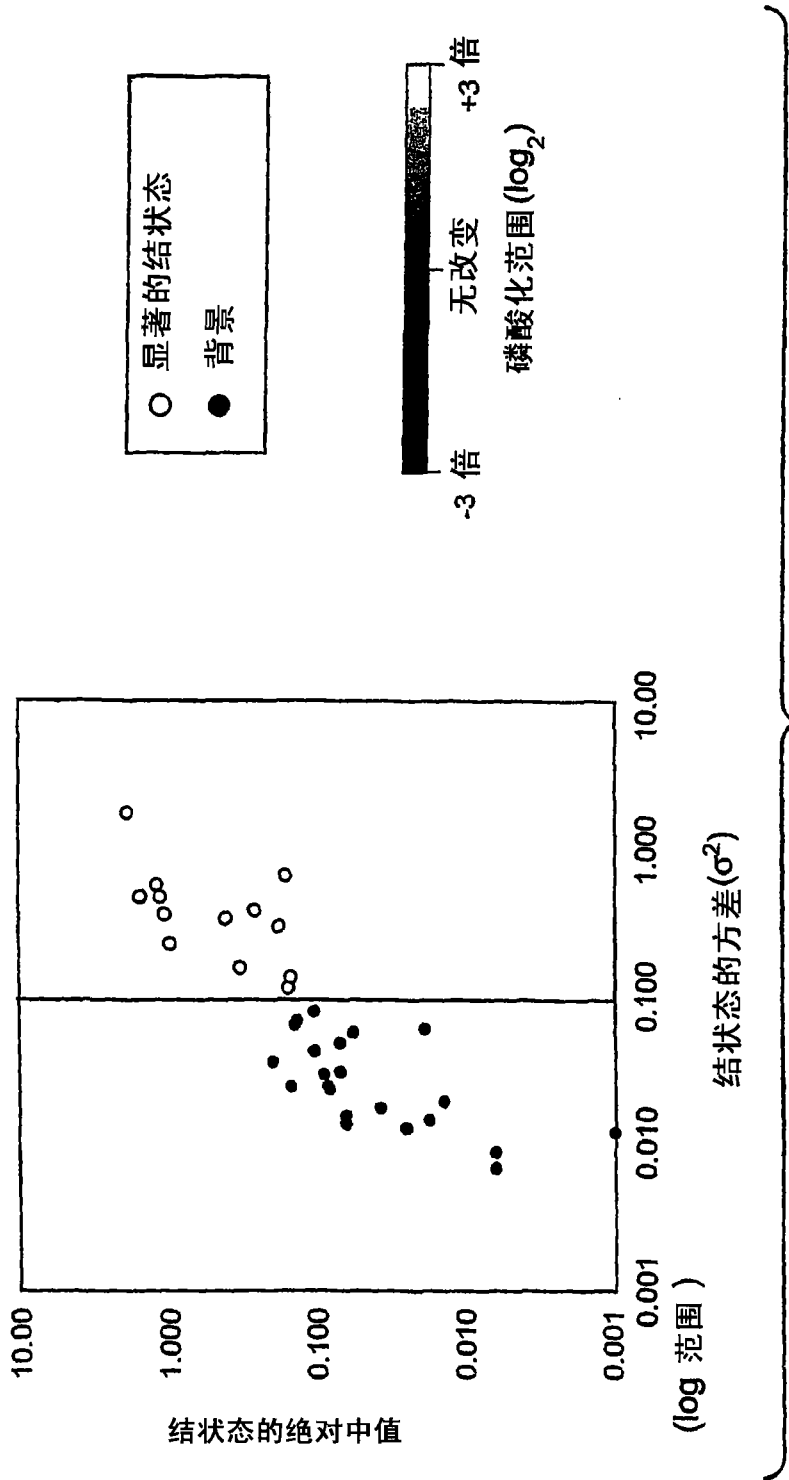
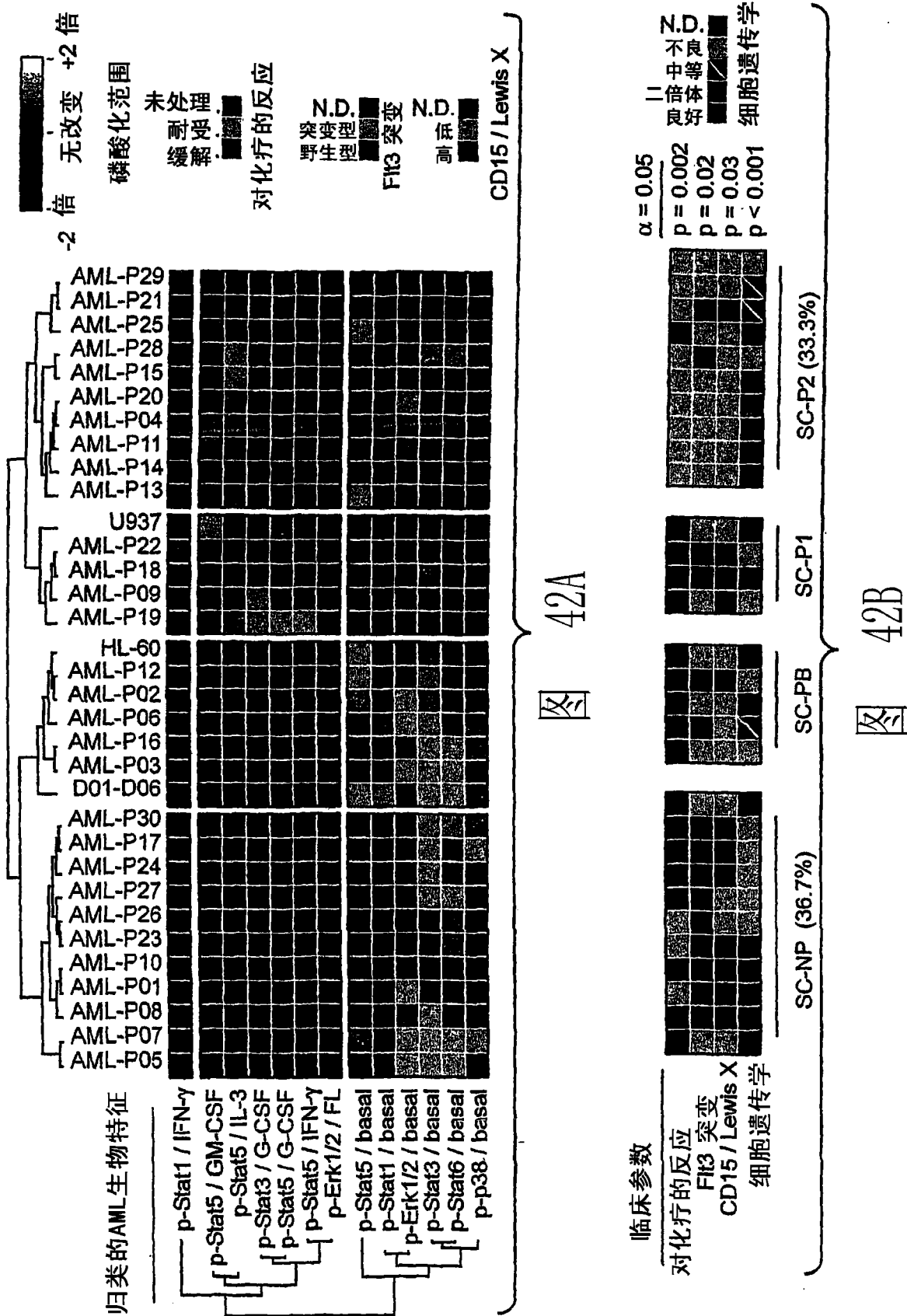


图 41C



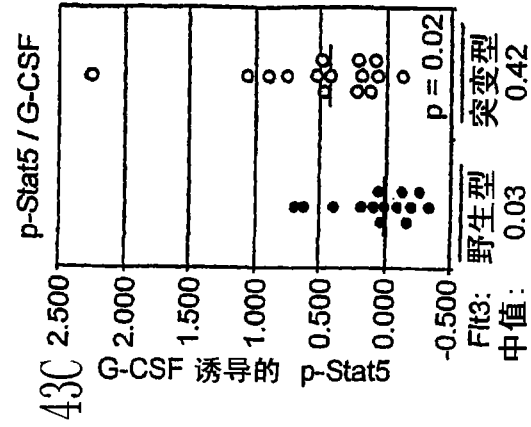


图 43C

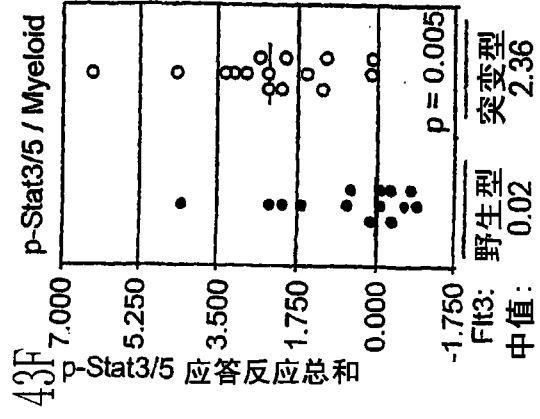


图 43F

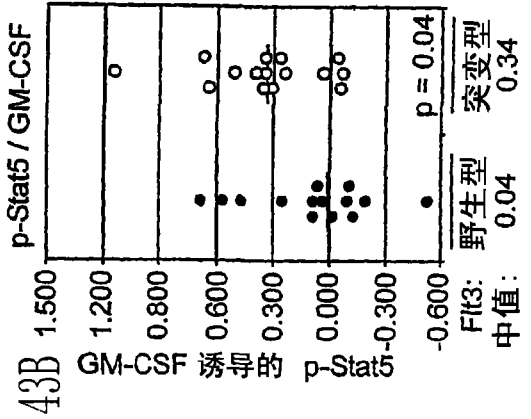


图 43B

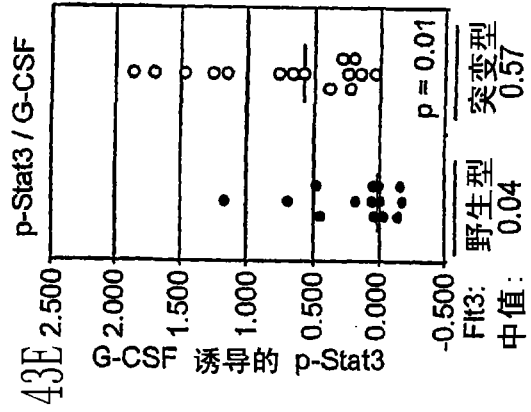


图 43E

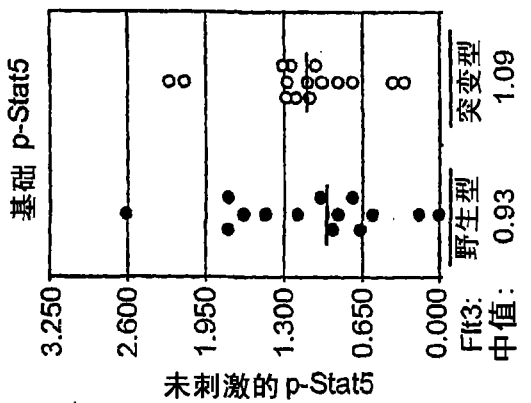


图 43A

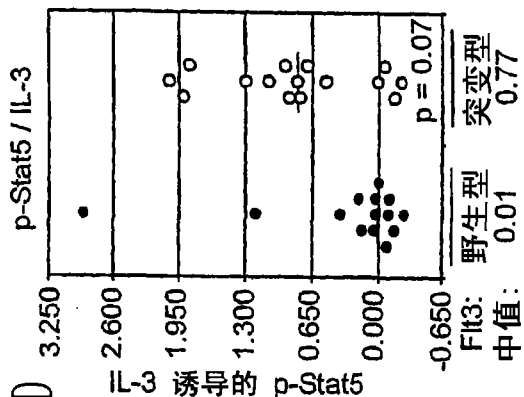
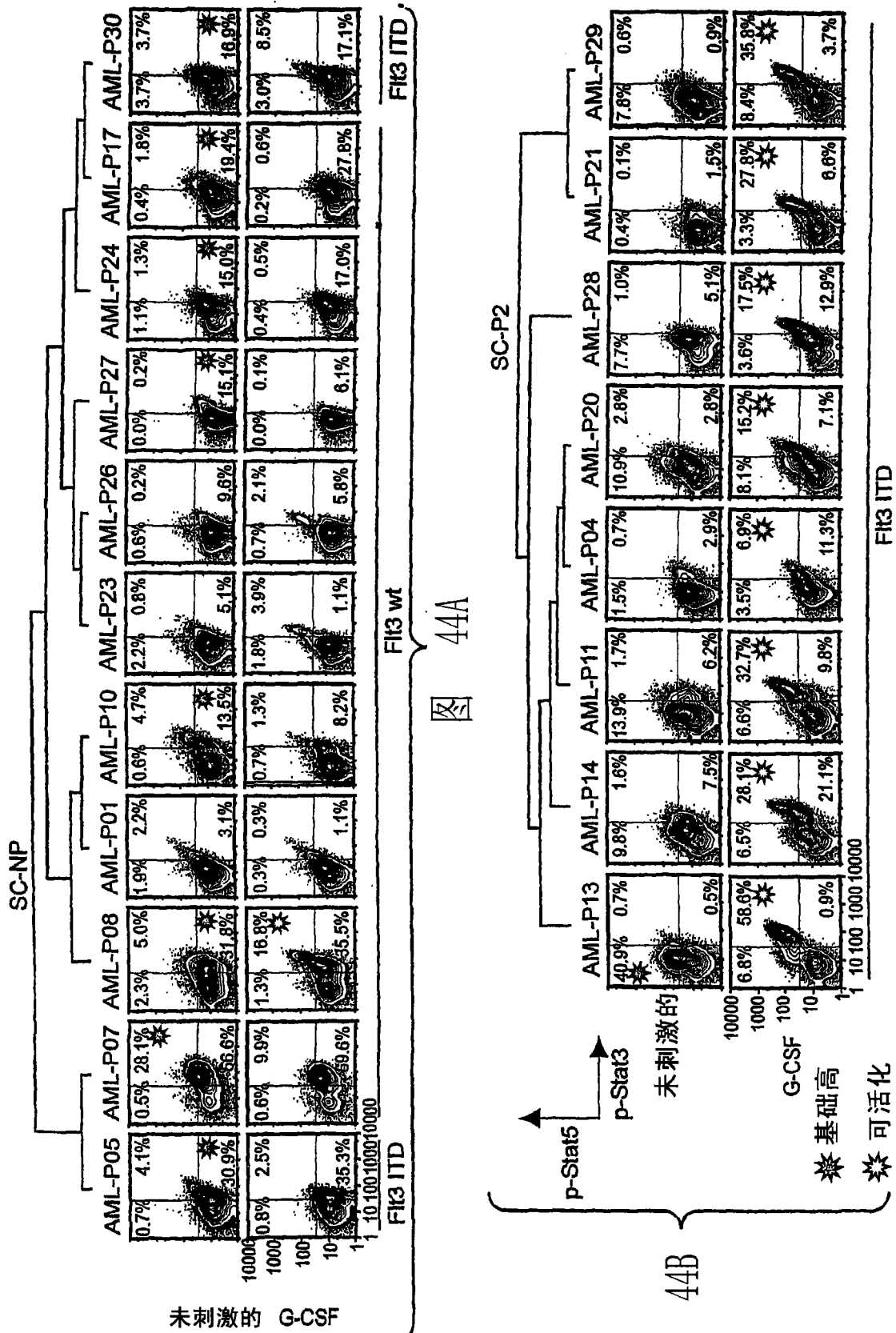


图 43D



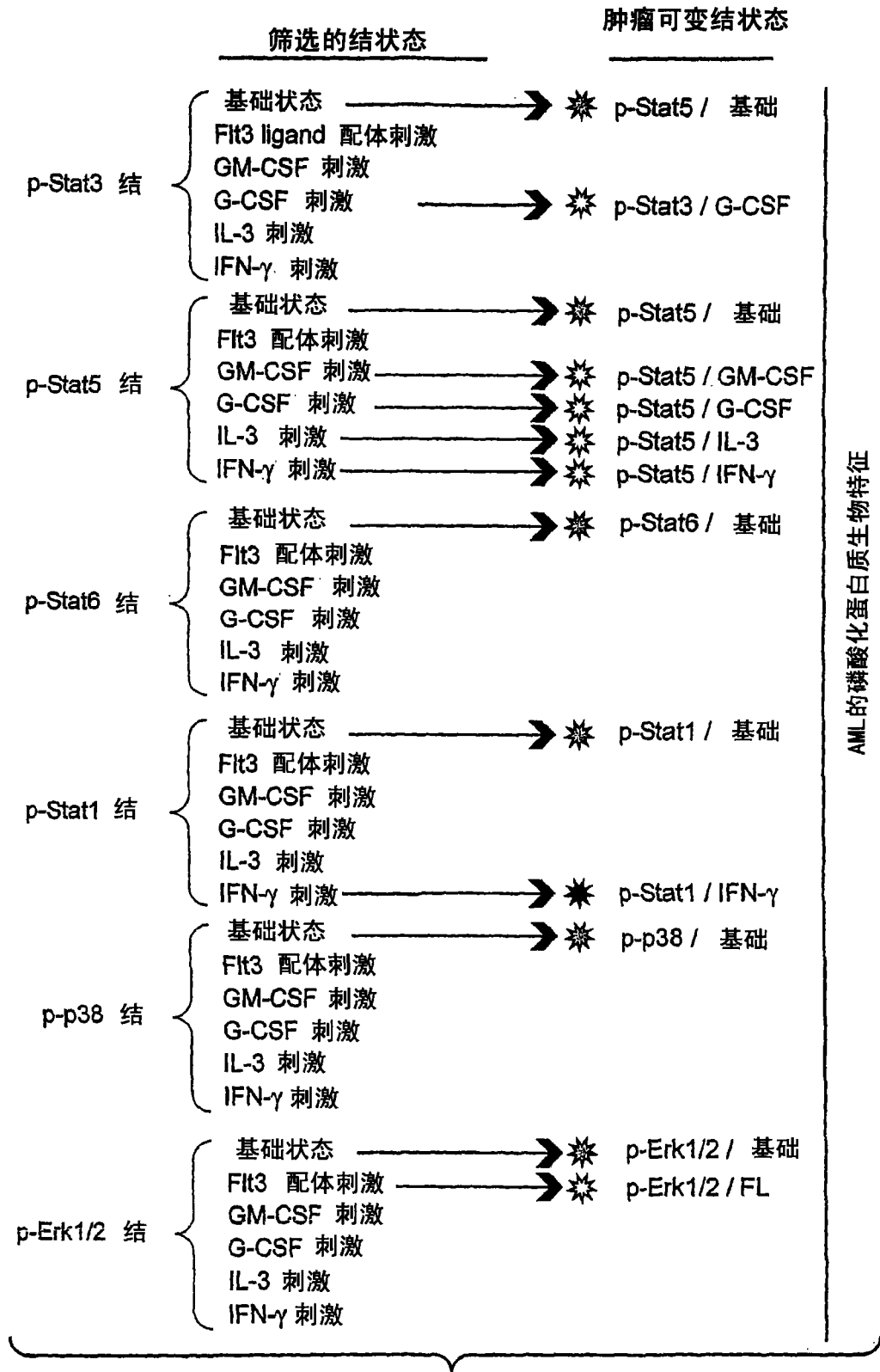


图 45A

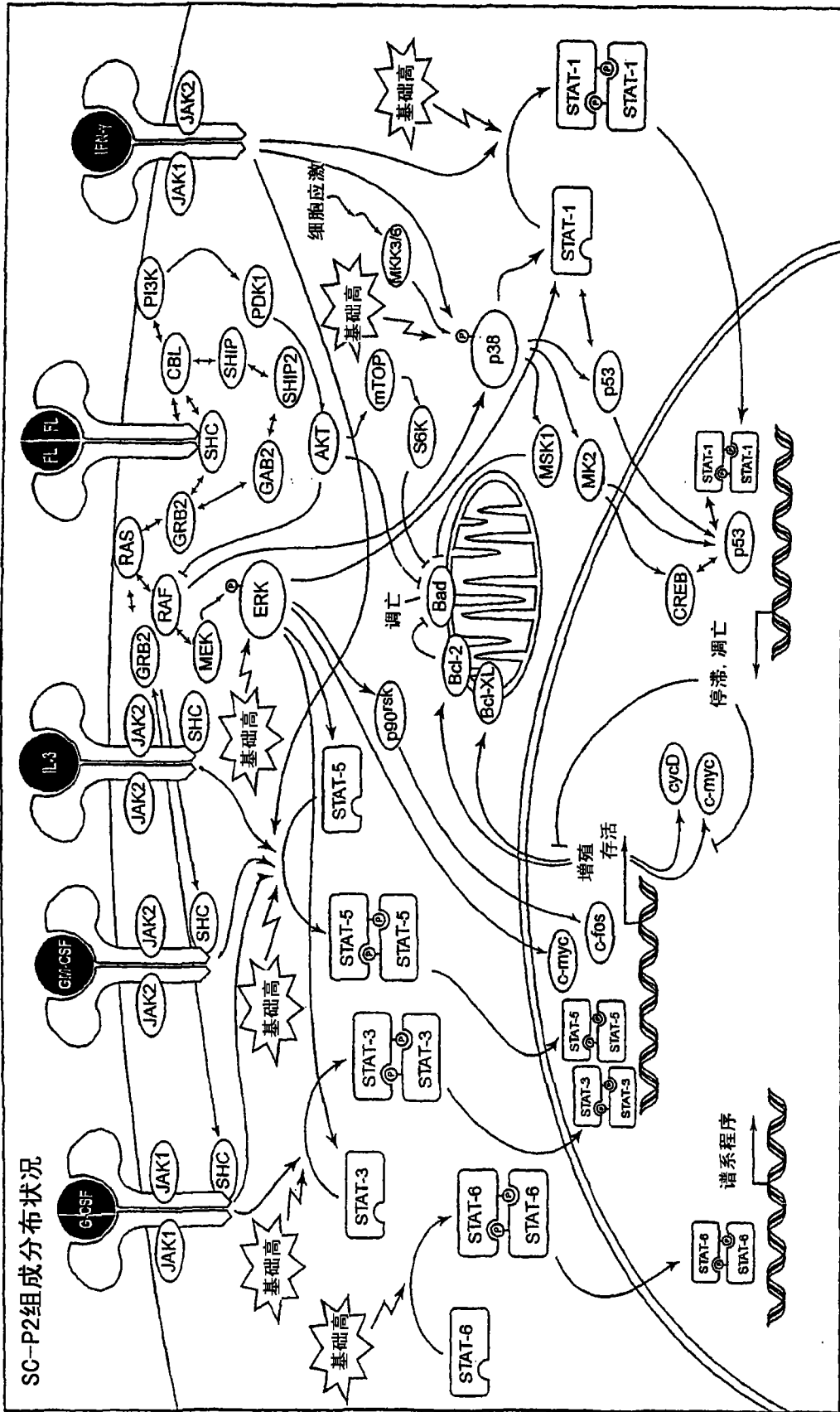


图 45B-1

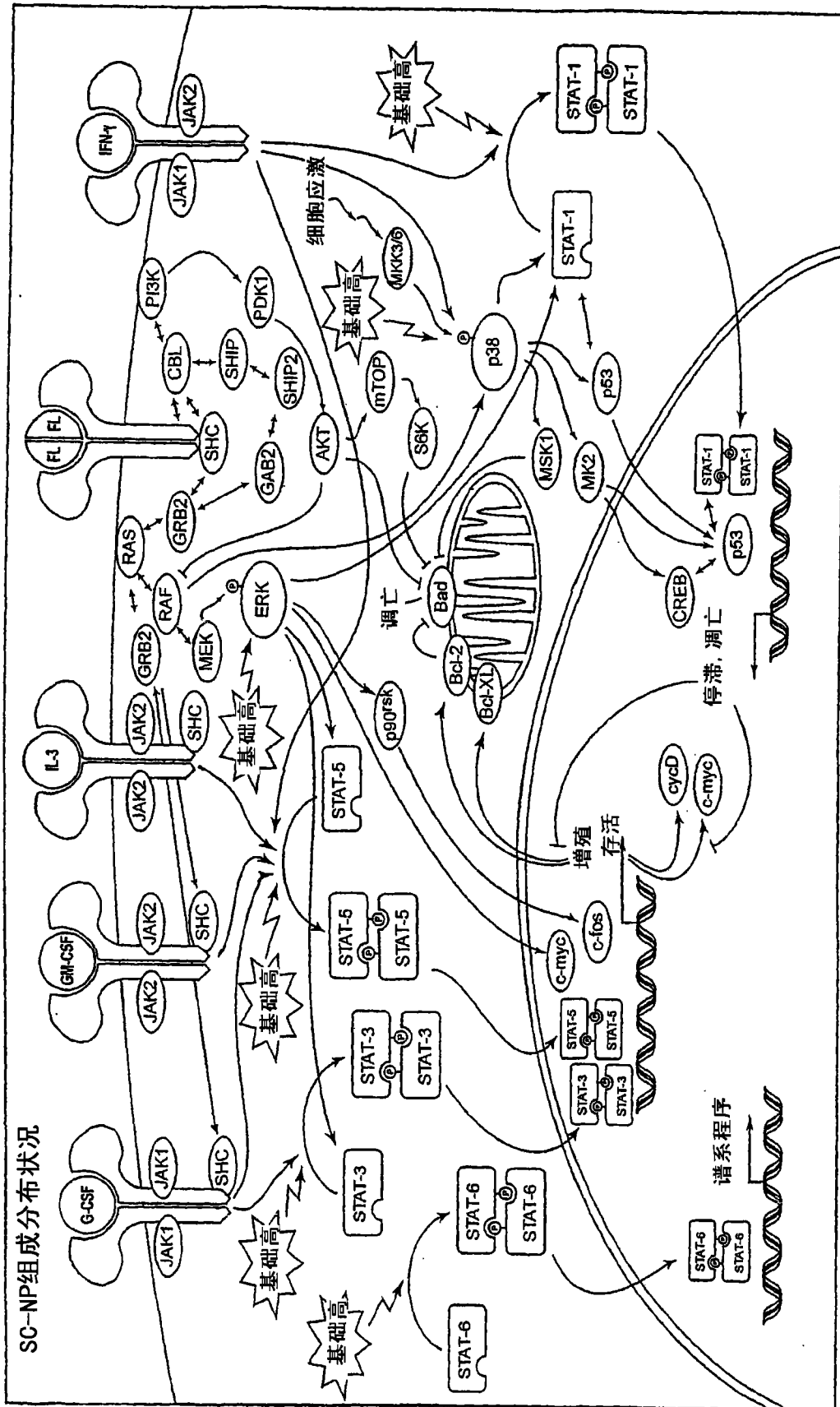


图 45B-2

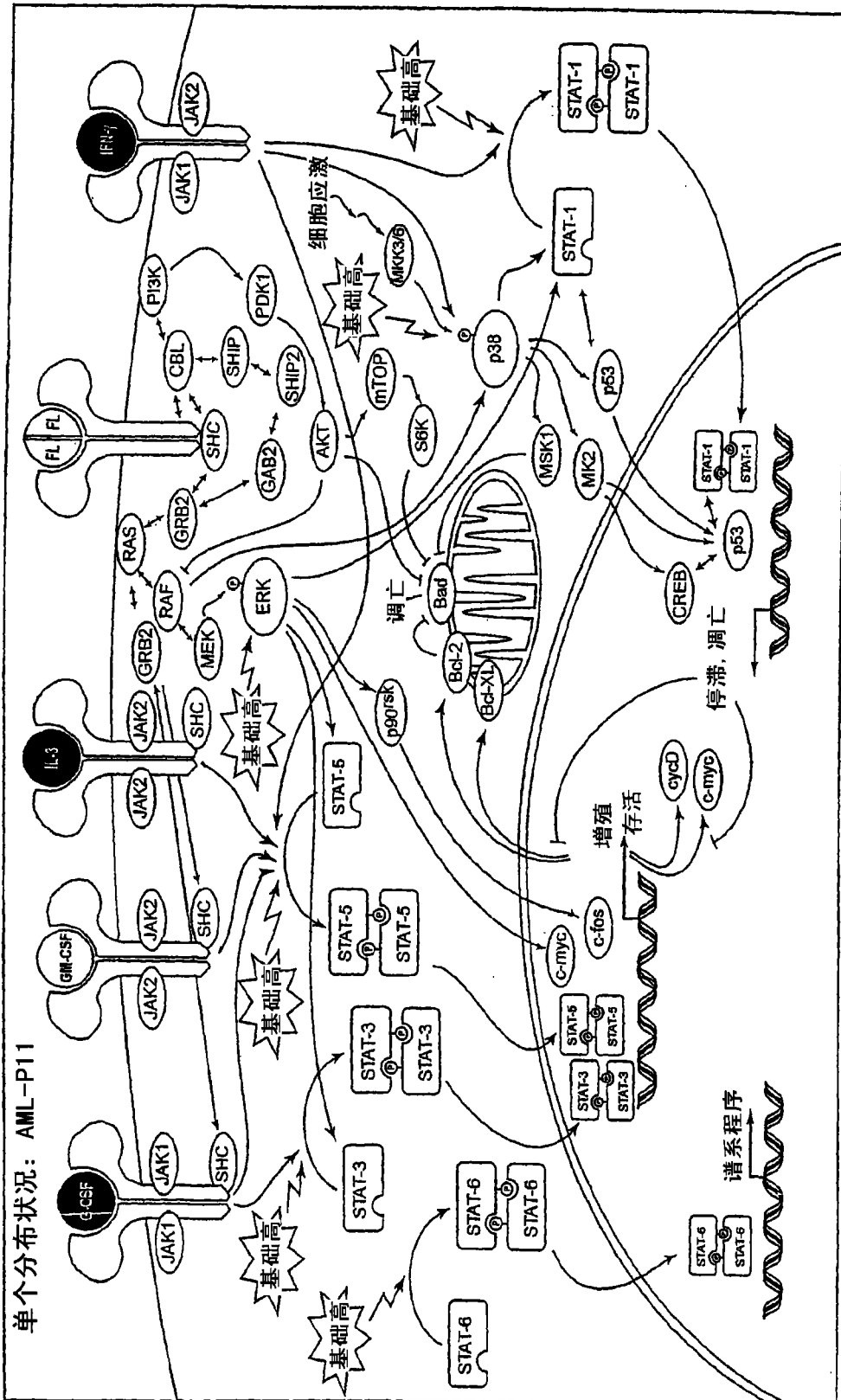


图 46A

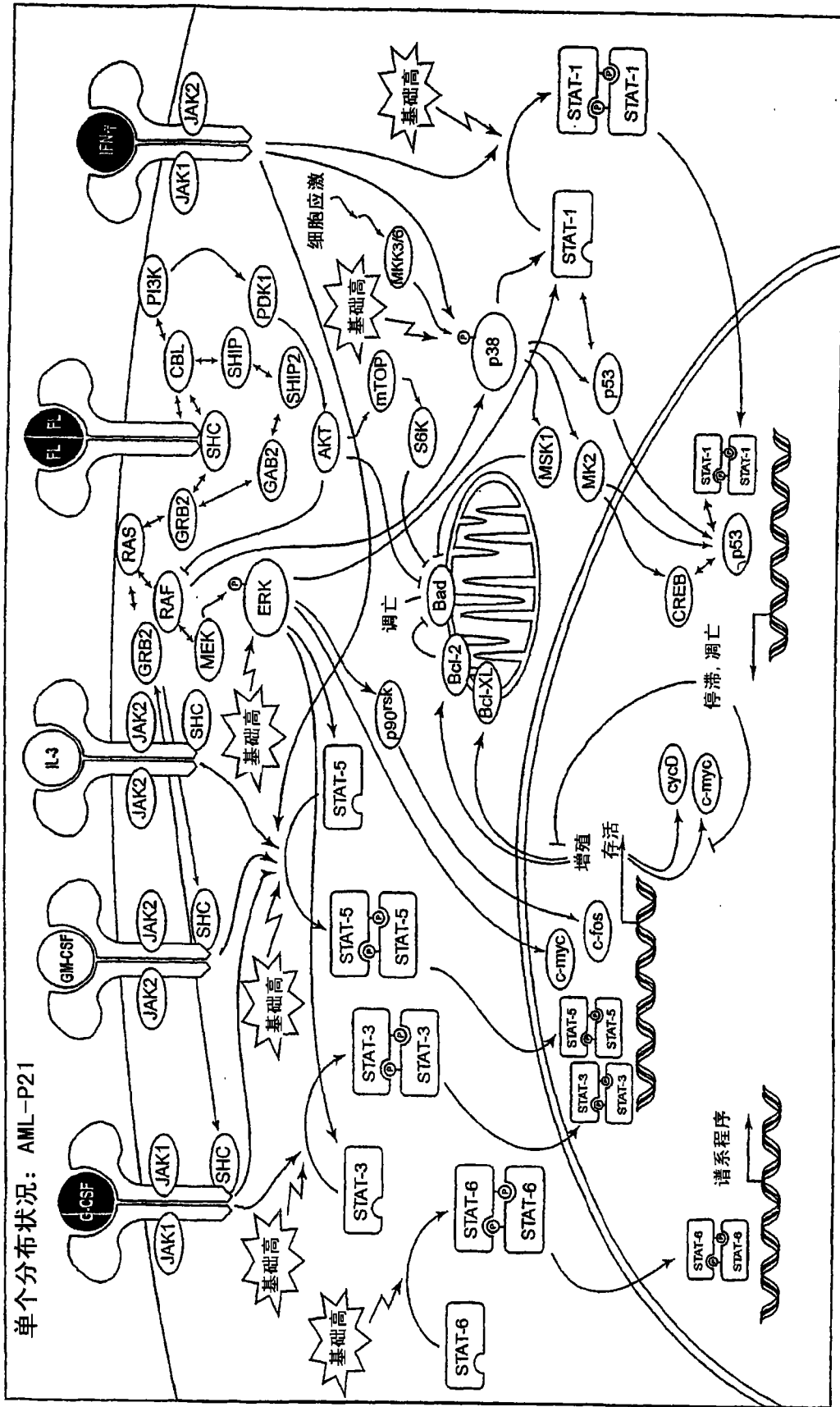


图 46B

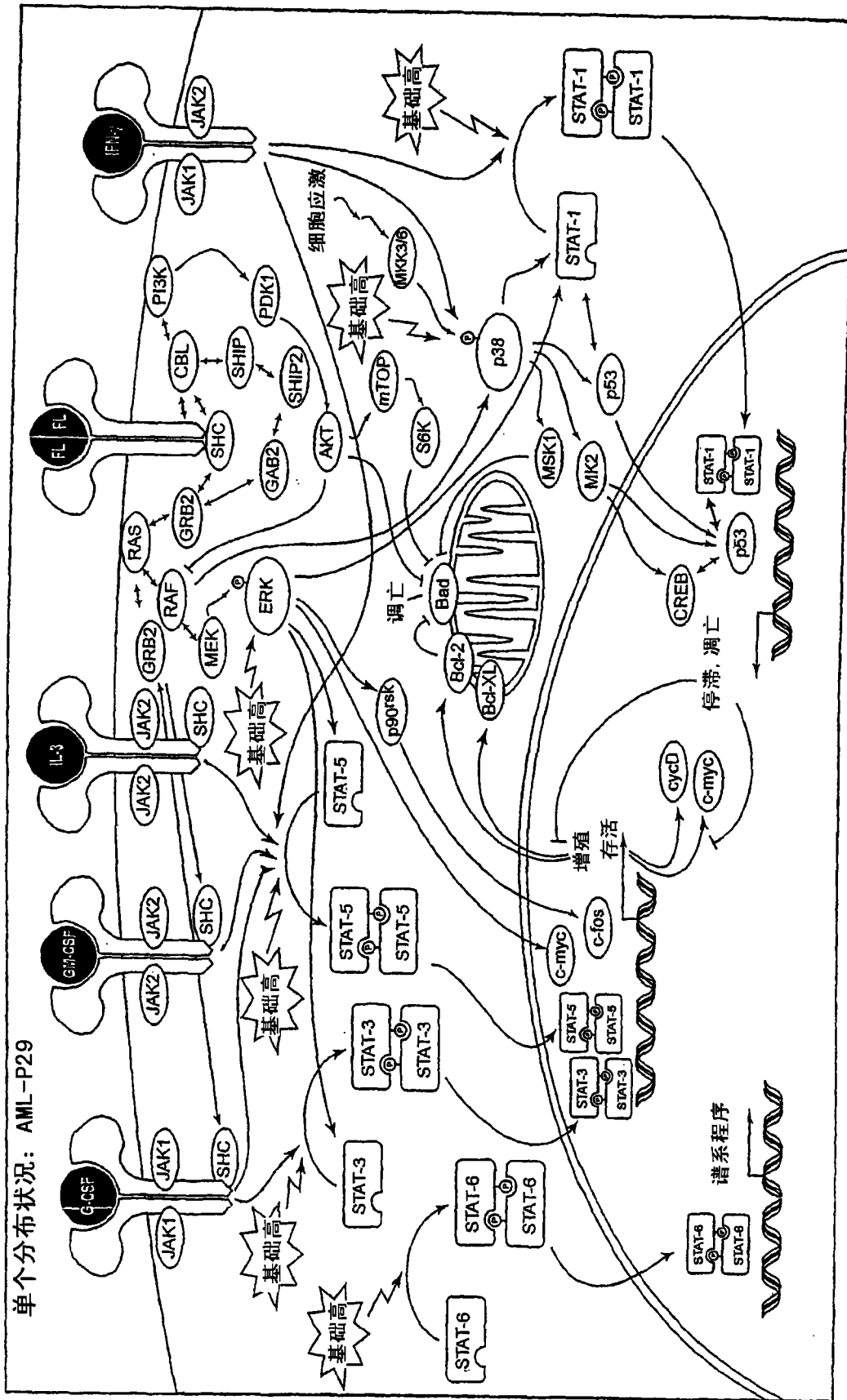


图 46C