

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00815255.1

[51] Int. Cl.

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年7月15日

[11] 授权公告号 CN 100513565C

[51] Int. Cl. (续)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

[22] 申请日 2000.9.1 [21] 申请号 00815255.1

[30] 优先权

[32] 1999.9.2 [33] EP [31] 99202858.9

[32] 1999.10.21 [33] EP [31] 99203465.2

[86] 国际申请 PCT/NL2000/000612 2000.9.1

[87] 国际公布 WO2001/016165 英 2001.3.8

[85] 进入国家阶段日期 2002.4.30

[73] 专利权人 利德公司

地址 荷兰莱顿

[72] 发明人 马蒂厄·许贝特斯·玛丽亚·诺特博恩

阿斯特丽德·阿德里安娜·安娜·玛丽亚·达南-范奥尔斯霍特

[56] 参考文献

EP0924296A 1999.6.23

WO9928460A 1999.6.10

审查员 吴永庆

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

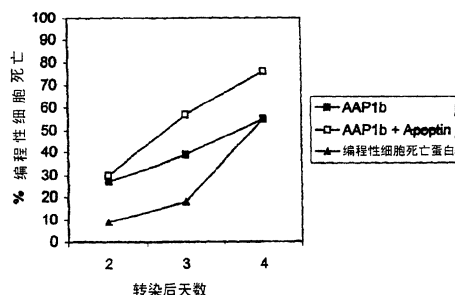
权利要求书 2 页 说明书 33 页 附图 4 页

[54] 发明名称

编程性细胞死亡蛋白关联蛋白

[57] 摘要

本发明涉及编程性细胞死亡领域。本发明提供了新的治疗可能性，例如可单独发挥作用、在编程性细胞死亡蛋白之后或与其联合发挥作用的新的组合疗法或新的治疗化合物，特别是用于 p53 (部分) 无功能的情况中。



1. 一种分离的或重组的核酸，其编码编程性细胞死亡蛋白关联蛋白质物质，其中所述编程性细胞死亡蛋白关联蛋白质物质含有图 3 所示的氨基酸序列中从第 23 位直至并包括第 250 位的氨基酸。
2. 含有权利要求 1 的核酸的载体。
3. 权利要求 2 的载体，其含有基因输送运载体。
4. 一种宿主细胞，其包含权利要求 1 的核酸或权利要求 2 或 3 的载体。
5. 权利要求 4 的宿主细胞，其是真核细胞，如酵母细胞或脊椎动物细胞。
6. 一种包含图 3 所示的氨基酸序列的蛋白质物质。
7. 一种分离的或合成的抗体，其特异识别权利要求 6 的蛋白质物质。
8. 权利要求 1 的核酸，或权利要求 2 或 3 的载体，或权利要求 4 或 5 的宿主细胞，或权利要求 6 的蛋白质物质在体外诱导编程性细胞死亡中的应用。
9. 权利要求 8 的应用，其中所述编程性细胞死亡是不依赖 p53 的。
10. 权利要求 8 或 9 的应用，进一步包含编码编程性细胞死亡蛋白的核酸的应用。
11. 权利要求 1 的核酸或权利要求 6 的蛋白质物质或权利要求 2 或 3 的载体或权利要求 4 或 5 的宿主细胞在制备用于治疗其中观测到提高的细胞增殖或降低的细胞死亡的疾病的药物中的应用。
12. 权利要求 11 的应用，其中所述细胞是癌细胞或涉及自身免

疫疾病的细胞。

13. 权利要求 11 或 12 的应用，进一步包含编码编程性细胞死亡蛋白的核酸。

14. 一个药物组合物，其包含权利要求 1 的核酸，或权利要求 2 或 3 的载体，或权利要求 4 或 5 的宿主细胞，或权利要求 6 的蛋白质物质。

15. 权利要求 14 的药物组合物，其进一步包含编码编程性细胞死亡蛋白的核酸。

16. 权利要求 1 的核酸或权利要求 6 的蛋白质物质或权利要求 2 或 3 的载体在制备用于鉴别推定的诱导癌变的因子的组合物中的应用。

17. 权利要求 16 的应用，其中所述推定的诱导癌变的因子包括一种基因或其功能片段。

18. 权利要求 1 的核酸或者权利要求 6 的蛋白质物质或者权利要求 2 或 3 的载体或者权利要求 4 或 5 的宿主细胞在制备用于诊断其中观察到细胞增殖增强或细胞死亡降低的疾病的诊断剂中的应用。

19. 权利要求 18 的应用，其中所述细胞是癌细胞或涉及自身免疫疾病的细胞。

20. 权利要求 18 或 19 的应用，进一步包含编码编程性细胞死亡蛋白的核酸。

## 编程性细胞死亡蛋白关联蛋白

本发明涉及编程性细胞死亡领域。编程性细胞死亡是一种活性程序性生理过程，用以消除多余的、改变的或恶性的细胞（Earnshaw, 1995, Duke 等, 1996）。在大多数细胞中，编程性细胞死亡的特征在于细胞收缩，细胞核分裂，DNA 浓缩并裂解为结构域大小的片段，随后核小体间（internucleosomal）降解。编程性细胞死亡的细胞分裂成为膜包裹的编程性细胞死亡体。最后，相邻的细胞和/或巨噬细胞迅速吞噬这些死亡的细胞（Wyllie 等, 1980; White, 1996）。可对在组织培养条件下生长的细胞和得自组织的细胞，用 DNA 染色剂如 DAPI 分析其编程性细胞死亡，DAPI 规律性地强染色正常 DNA，而只微弱和/或不规则地染色编程性细胞死亡 DNA（Noteborn 等, 1994, Telford 等, 1992）。

编程性细胞死亡过程可通过各种调控刺激物启动（Wyllie, 1995, White, 1996, Levine, 1997）。细胞存活率的变化在人体疾病的发病机理中起重要作用，例如在癌症产生和自身免疫疾病中，在其中观测到细胞增殖增强或细胞死亡降低（Kerr 等, 1994, Paulovich, 1997）。已经证明许多化疗化合物和放疗在许多情况中，通过野生型 p53 蛋白诱导肿瘤细胞的编程性细胞死亡（Thompson, 1996, Bellamy 等, 1995, Steller, 1995, McDonnell 等, 1995）。

然而，一些肿瘤在其发生期间获得一个 p53 的突变，这通常与对癌症治疗的反应低下相关。某些致瘤性 DNA 病毒的转化基因可通过直接与 p53 结合而使 p53 失活（Teodoro, 1997）。这种因子例如是肿瘤 DNA 病毒 SV40 的大 T 抗原对一些肿瘤（白血病）而言，原癌基因 Bcl-2 或 Bcr-ab1 的高水平表达与对各种诱导编程性细胞死亡的化疗剂的强烈抗性关联（Hockenberry 1994, Sachs 和 Lotem, 1997）。

对这些缺失功能性 p53 的肿瘤而言（代表一多半的肿瘤），另一种抗肿瘤治疗是基于诱导不依赖于 p53 的编程性细胞死亡而研究开发的（Thompson 1995, Paulovich 等, 1997）。研究人员需探求参与诱导编程性细胞死亡的因子，这种因子不需要 p53 和/或可以不被抗编程性细胞死亡活性阻断，如类似 Bcl-2 或 Bcr-abl 等的因子。这些因子可以是独特的编程性细胞死亡途径的一部分或可以是抑制编程性细胞死亡的化合物的（非常）下游。

编程性细胞死亡蛋白（Apoptin）是衍生自鸡贫血病病毒（CAV; Noteborn 和 De Boer, 1995, Noteborn 等, 1991, Noteborn 等, 1994; 1998a）的一种小蛋白质，其能在人体恶性转化细胞系中诱导编程性细胞死亡，但在非转化性人体细胞培养物中无此功能。在体外，编程性细胞死亡蛋白在正常的淋巴，皮肤，表皮，内皮和平滑肌细胞中不能诱导程序化细胞死亡。然而，当正常细胞是转化的时，它们通过编程性细胞死亡蛋白对编程性细胞死亡变得易感。编程性细胞死亡蛋白在正常人体成纤维细胞中长期表达表明编程性细胞死亡蛋白在这些细胞中无毒性或转化活性（Danen-van Oorschot, 1997 和 Noteborn, 1996）。

在正常细胞中，发现编程性细胞死亡蛋白在胞质中占优势，而在转化的或恶性的细胞中，即特征在于增生的，化生的，发育异常的或发育不全的细胞，其位于细胞核中，这提示编程性细胞死亡蛋白的位置与其活性相关（Danen-van Oorschot 等, 1997）。编程性细胞死亡蛋白诱导的编程性细胞死亡在不存在功能性 p53 的情况中发生（Zhuang 等, 1995a），而且不能被 Bcl-2, Bcr-abl（Zhuang 等, 1995），或被 Bcl-2 关联蛋白 BAG-1 阻断（Danen-Van Oorschot, 1997a, Noteborn, 1996）。

因此，编程性细胞死亡蛋白是一种治疗性化合物，其选择性破坏肿瘤细胞，或其它增生的，化生的，发育异常的或发育不全的细

胞，尤其由于缺失功能性 p53 以及 Bcl-2 和其它抑制编程性细胞死亡的因子（过）表达所致，对（化）疗法诱导的编程性细胞死亡已经有抗性的那些肿瘤细胞（Noteborn 和 Pietersen, 1998）。看起来甚至前恶性的，最小转化的细胞也对编程性细胞死亡蛋白的诱导死亡的作用敏感。另外，Noteborn 和 Zhang（1998）已经示出编程性细胞死亡蛋白诱导的编程性细胞死亡可用于诊断癌变倾向的细胞及治疗癌变倾向的细胞。

编程性细胞死亡蛋白在正常人体细胞中不诱导编程性细胞死亡，至少在体外不诱导，这一事实表明在体内进行编程性细胞死亡蛋白处理的毒性作用会非常小。Noteborn 和 Pietersen（1998）和 Pietersen 等（1998）已经提供了这样的证据，即腺病毒表达的编程性细胞死亡蛋白在体内不具有急性毒性作用。另外，在裸鼠中示出编程性细胞死亡蛋白具有强抗肿瘤活性。

然而，为进一步扩大本领域可利用的治疗性抗癌或抗自身免疫疾病化合物的范围，需要其它的治疗性化合物，将这种化合物设计为单独起作用，或者在使用编程性细胞死亡蛋白之后使用或与其共同使用，尤其在 p53 是（部分）无功能的那些情况中。

本发明提供了新的治疗可能性，例如新的组合治疗方法或新的治疗性化合物，其可单独起作用，或者在使用编程性细胞死亡蛋白之后使用或与其共同使用，尤其在 p53 是（部分）无功能的那些情况中。

在第一个实施方案中，本发明提供了一种分离的或重组的核酸或其功能等价物或片段，其编码编程性细胞死亡蛋白关联蛋白质物质，其单独或与其它诱导编程性细胞死亡的物质如编程性细胞死亡蛋白组合能提供编程性细胞死亡。本文中此蛋白质物质是指包含肽，多肽或蛋白质的一种物质，其任选地已经例如通过糖基化，十四烷基化，磷酸化，加入脂质，通过同源或异源二聚或多聚化，或本领域

域已知的任何其它（翻译后）修饰加以修饰。

本文中编程性细胞死亡蛋白关联（apoptin-associating）是指属于特异地参与可通过编程性细胞死亡蛋白诱导的编程性细胞死亡途径中发现的事件级联中的物质级联，优选特异地参与非 p53 依赖型编程性细胞死亡途径的那些物质。

在一个优选的实施方案中，本发明提供了一种分离的或重组的核酸或其功能等价物或片段，其编码能提供编程性细胞死亡的与编程性细胞死亡蛋白关联的蛋白质物质。当以下这两种诱导编程性细胞死亡的物质存在于相同细胞中时，更优选地所编码的与编程性细胞死亡蛋白关联的蛋白质物质与其它诱导编程性细胞死亡的物质例如编程性细胞死亡蛋白共定位。在正常的非转化性细胞中，这两种诱导编程性细胞死亡的蛋白质共定位于胞质中，而在转化的或恶性的细胞中，这两种诱导编程性细胞死亡的蛋白质共定位于细胞核中。在另一实施方案中，与编程性细胞死亡蛋白关联的物质能结合小鼠转录因子 YY1，后者已示出结合小鼠 AAP-1 同源物—RYBP（Garcia 等，1999）。在一个更优选的实施方案中，编码能提供编程性细胞死亡的与编程性细胞死亡蛋白关联的蛋白质物质的所述分离的或重组的核酸或其功能等价物或片段衍生自一个 cDNA 文库，如可衍生自家禽的文库，但更优选衍生自一个哺乳动物 cDNA 文库，优选地其中所述 cDNA 文库包含人 cDNA。

在另一实施方案中，本发明提供了一种编码能提供编程性细胞死亡的与编程性细胞死亡蛋白关联的蛋白质物质的分离的或重组的核酸或其功能等价物或片段，其能与编码能提供编程性细胞死亡的编程性细胞死亡蛋白关联的蛋白质物质的如图 1 或 2 所示的核酸分子杂交，尤其是编码一种能提供编程性细胞死亡的新蛋白质或其功能等价物，这种新蛋白质称为编程性细胞死亡蛋白关联蛋白质 1，简称 AAP-1。当然，本发明还提供了编码另外的能与 AAP-1 关联的

编程性细胞死亡蛋白关联的蛋白质物质的一种分离的或重组的核酸或其功能等价物或片段，达到位于编程性细胞死亡蛋白级联中的种另外的蛋白质的手段和方法在以下加以详细阐述。

特别地，本发明提供了一种编码能提供编程性细胞死亡的编程性细胞死亡蛋白关联蛋白质物质的分离的或重组的核酸或其功能等价物或片段，其与编码图 1 或 2 所示编程性细胞死亡蛋白关联的蛋白质物质的核酸分子或其功能等价物或片段的核酸有至少 70%的同源性，优选至少 80%的同源性，更优选至少 90%同源性，最优选至少 95%同源性。

另外，本发明提供了一种包含本发明核酸的载体。这种载体的实例在下文详细阐述；如载体 pMT2SM-AAP-1-a 或 b，表达 Myc 标记的 AAP-1-a 或 AAP-1-b cDNA 的 pMT2SM 载体，表达编程性细胞死亡蛋白关联的蛋白质片段的质粒，包含本发明核酸的大肠杆菌过表达载体如 pMAL 和 pET22b 等。这些和其它载体例如可用于发现来自上述级联的额外的编程性细胞死亡蛋白关联蛋白质物质，或者用于（过）表达由本发明的核酸编码的蛋白质。

在另一实施方案中，本发明提供了一种包含本发明核酸的载体，所述载体包括基因输送运载体，使本发明在基因疗法中非常有效。通过装备具有本发明核酸的基因运载体，及通过将所述运载体定向于已经过度增殖和/或已经示出死亡率降低的细胞，所述基因输送运载体给所述细胞提供编程性细胞死亡所需手段，提供了远程到达治疗的可能性。

另外，本发明提供了一种包含本发明核酸或载体的宿主细胞。例子包括转化的或转染的细菌或酵母细胞。根据本发明优选的宿主细胞是转化的真核细胞如酵母细胞，或脊椎动物细胞如用本发明核酸或载体转化或转染的哺乳动物细胞，或 COS 细胞。所述细胞一般能表达或产生具有关联编程性细胞死亡蛋白能力的能提供编程性细

胞死亡的蛋白质物质。

本发明还提供了一种分离的或重组的编程性细胞死亡蛋白关联蛋白质物质，其能提供编程性细胞死亡。例如如图 4 所示，这种编程性细胞死亡蛋白关联蛋白质物质在细胞例如在肿瘤细胞或其它过度增殖的细胞中的表达，诱导编程性细胞死亡。其可以单独发挥作用，也可与其它诱导编程性细胞死亡的物质如编程性细胞死亡蛋白组合发挥作用，尤其不依赖于 p53 而起作用，这表明在功能性 p53 缺乏的情况中，编程性细胞死亡可通过本发明的物质诱导。当能提供编程性细胞死亡的编程性细胞死亡蛋白关联蛋白质物质与另一种诱导编程性细胞死亡的物质如编程性细胞死亡蛋白一起使用时，这两种蛋白质物质共定位于正常细胞的胞质内，但不引起编程性细胞死亡。而在转化的或恶性的细胞中，这两种诱导编程性细胞死亡的蛋白质共定位于细胞核中并诱导编程性细胞死亡。本发明还提供了一种蛋白质物质，其结合转录因子 YY1，该转录因子已经示出结合 AAP1 小鼠同源物 RYBP。尤其地，本发明提供了一种由本发明核酸编码的蛋白质物质，例如包含图 3 所示的至少一部分氨基酸序列或其功能等价物或功能片段，其单独或与诱导编程性细胞死亡的物质如编程性细胞死亡蛋白组合使用能提供编程性细胞死亡。

本发明还提供了一种分离的或合成的抗体，其特异地识别本发明的蛋白质物质或其功能等价物或功能片段。这种抗体例如可通过用编程性细胞死亡蛋白关联蛋白质物质或其免疫原性片段或等价物免疫接种实验动物，并从所述免疫接种的动物中收集多克隆抗体而获得（如以下详细阐述），或者可通过本领域已知的其它方法获得，如通过产生单克隆抗体，或表达自核酸文库衍生的重组核酸的（单链）抗体或结合蛋白而获得，例如通过噬菌体展示方法获得。

利用这种抗体，本发明还提供了一种可由本发明这种抗体特异识别的蛋白质物质，例如通过免疫沉淀，Western 印迹，或本领域已

知的其它免疫学方法获得。

另外，本发明提供了本发明的核酸，载体，宿主细胞或蛋白质物质诱导编程性细胞死亡的应用，如图 4 所示。尤其地，提供了这种应用，其中所述编程性细胞死亡是不依赖于 p53 的。尤其地，这种应用进一步包括使用编码编程性细胞死亡蛋白或其功能等价物或片段的核酸，或使用编程性细胞死亡蛋白或其功能等价物或片段。如图 4 所示，组合这些诱导编程性细胞死亡的物质，可提高被处理的肿瘤细胞的编程性细胞死亡的百分率。

本发明提供的这种应用从治疗观点看是特别有益的。本发明提供了一种药物组合物，其包含本发明的核酸，载体，宿主细胞或蛋白质物质。另外，本发明提供的这种药物组合物还包含一种编码编程性细胞死亡蛋白或其功能等价物或片段的核酸，或编程性细胞死亡蛋白或其功能等价物或片段。

提供的这种药物组合物尤其是为了诱导编程性细胞死亡，例如其中所述编程性细胞死亡是非依赖于 p53 的，以治疗细胞增殖增强或细胞死亡降低的疾病，当所述疾病包括癌症或自身免疫疾病时，一般情况下均有细胞增殖增强或细胞死亡降低这种情况。本发明提供了一种治疗患有这样一种疾病的个体的方法，所述疾病表现为细胞增殖增强或细胞死亡降低，这种治疗方法包括用本发明的药物组合物治疗所述个体。特别地，这些组合物包含一种编程性细胞死亡途径的因子，这种因子是特异于转化的细胞的。因此，这些组合物对于与编程性细胞死亡过程的异常相关的疾病的新治疗方法是重要的，对于其诊断也是重要的，这种疾病例如是癌症或自身免疫疾病。

在诊断领域，本发明提供了一种在细胞样品中检测癌细胞或有癌变倾向细胞的方法，包括在所述样品中用本发明的核酸或载体转染细胞，培养所述细胞并确定样品中细胞编程性死亡的百分率。例如，我们可断定与正常非转化性细胞相比，AAP-1 的细胞定位在致

瘤性/转化的细胞中是不同的。另外，AAP-1 在细胞核中累积与诱导编程性细胞死亡相关，而在胞质中累积与细胞存活性和正常增殖能力相关。本发明因此提供了一种在细胞样品中检测癌细胞或有癌变倾向的细胞的方法，包括在所述样品中用本发明的核酸或载体转染细胞，并确定所述样品中衍生自所述核酸或载体的蛋白质物质在细胞中的胞内位置。特别地，本发明提供了一种方法，其中所述细胞中的所述蛋白质物质是通过用抗体对所述细胞进行免疫染色而检测的，如用免疫荧光分析，或本领域已知的其它免疫分析方法。优选地，所述抗体包括本发明的抗体。

本发明还提供了一种鉴别推定的诱导癌症的因子如转化基因或其功能片段的方法，包括将细胞样品与所述因子例如通过转染相接触，或只将此因子提供给细胞周围的培养基，并用本发明的方法检测细胞样品中癌细胞或有癌变倾向的细胞的存在情况。

另外，本发明提供了一种检测细胞样品的癌变倾向，及从而检测细胞样品来源的个体的癌变倾向的方法，包括将所述细胞与诱导癌症的因子如 UV 光相接触，并用本发明的方法检测细胞样品中癌细胞或有癌变倾向的细胞的存在情况。

本发明在以下的详细论述中加以更详尽的阐述，其并非限制本发明。

#### 发明详述

我们使用酵母双杂交系统 (Durfee 等, 1993) 鉴别编程性细胞死亡蛋白关联的细胞化合物，其是诱导编程性细胞死亡所必需的。所用的系统是一种体内策略，以鉴别能与编程性细胞死亡蛋白自然关联的人体蛋白。该系统已经用于从 cDNA 文库中筛选编码能结合感兴趣蛋白质的蛋白质的克隆 (Fields 和 Song, 1989, Yang 等, 1992)。本发明提供了一种新的编程性细胞死亡蛋白关联蛋白，其中之一称为编程性细胞死亡蛋白关联蛋白 1，简称为 AAP-1。本发明还提供

了一种诱导编程性细胞死亡的方法，通过干扰这种新揭示的 AAP-1 蛋白或其功能等价物或片段的功能，和/或通过（过）表达 AAP-1 蛋白或相关基因或其功能等价物或片段诱导编程性细胞死亡。

本发明还提供了一种抗肿瘤疗法，其基于干扰类 AAP-1 蛋白的功能和/或所述蛋白（过）表达。类 AAP-1 蛋白通常在无限增殖的细胞系中不是非常丰富的。因此，类 AAP-1 蛋白的异常高水平将导致与细胞转化相反的过程产生，这个过程称为编程性细胞死亡。本发明还提供了编程性细胞死亡蛋白诱导的编程性细胞死亡的介质，其是肿瘤特异性的。本发明提供了治疗癌症，自身免疫疾病或相关疾病的疗法，这种疗法基于单独使用类 AAP-1 蛋白或与编程性细胞死亡蛋白和/或类编程性细胞死亡蛋白化合物组合使用。

### 构建 pGBT9-VP3

为构建能通过酵母双交系统鉴别编程性细胞死亡蛋白关联蛋白的饵质粒，将质粒 pET-16b-VP3 (Noteborn, 未公布结果) 用 NdeI 和 BamHI 处理。将 0.4kb 的 NdeI-BamHI DNA 片段从低熔点琼脂糖中分离。将质粒 pGBT9 (Clontech 实验室, Palo Alto, 美国) 用限制酶 EcoRI 和 BamHI 处理。分离大约 5.4kb 的 DNA 片段，并连接于 EcoRI-NdeI 接头和含有从其自己的 ATG 起始密码子起始的编程性细胞死亡蛋白编码序列的 0.4kb 的 DNA 片段。将含有在酵母启动子 ADH 调节下的 GAL4 结合结构域序列和编程性细胞死亡蛋白的融合基因的最后构建体称为 pGBT-VP3，并根据 Sanger 所述方法 (1977) 通过限制酶分析和 DNA 测序加以证实是正确的。

所有克隆步骤基本如 Maniatis 等所述 (1992) 进行。将质粒 pGBT-VP3 通过在 CsCl 梯度离心及在 Sephacryl S500 层析柱 (Pharmacia) 中层析进行纯化。

## GAL4 活化结构域标记的 cDNA 文库

将表达载体 pACT 用于检测编程性细胞死亡蛋白关联蛋白，所述载体含有与 GAL4 转录活化结构域融合的来自 Epstein-Barr 病毒转化的人 B 细胞的 cDNA。此 pACT cDNA 文库衍生自 $\lambda$ -ACT cDNA 文库，如 Durfee 等，1993 所述。

## 细菌和酵母菌株

大肠杆菌 JM109 是质粒 pGBT9 和 pGBT-VP3 的转化受体。将菌株 electromax/DH10B 用于转化，以回收编程性细胞死亡蛋白关联的 pACT-cDNA，该菌株得自美国 GIBCO-BRL。

将酵母菌株 Y190 用于筛选 cDNA 文库和所有其它的转化体，其是所用的酵母双杂合系统的一部分。

## 培养基

为进行药物选择，将培养大肠杆菌用的 Luria Broth (LB) 平板补加氨苄青霉素(50ug/ml)。酵母 YPD 和 SC 培养基如 Rose 等(1990)所述制备。

用质粒 pGBT-VP3 和 pACT-cDNA 转化感受态酵母菌株 Y190，并筛选 $\beta$ -半乳糖苷酶活性。

根据 Klebe 等(1983)所述方法制备感受态酵母菌株 Y190 并转化。酵母细胞首先用 pGBT-VP3 转化，接着用 pACT-cDNA 转化，并将这些转化的酵母细胞生长于减去组氨酸的平板中，该平板中也没有亮氨酸和色氨酸。

将 Hybond-N 滤膜铺布于组氨酸阳性的酵母菌落上，并使其完全湿润。取出滤膜并淹没于液氮中以透化酵母细胞。将此滤膜解冻并使其有菌落一侧铺布于培养皿中的 Whattman 3MM 纸上，该培养皿具有含有 0.27%  $\beta$ -巯基乙醇和 1mg/ml X-gal 的 Z-缓冲液(每升：

16.1g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5.5g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.75g KCl 和 0.246g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , pH7.0)。将滤膜温育至少 15 分钟或过夜。

### 从酵母中回收质粒

得自组氨酸和 $\beta$ -半乳糖苷酶阳性酵母细胞的总 DNA, 是通过使用如 Hoffman 和 Winston (1987) 所述的碱性蜗牛酶裂解方法制备的, 并用于通过使用 Bio-Rad 基因脉冲仪, 根据生产者的指导经电穿孔转化 Electromax/DH10B 细菌。

将转化体铺板于含有抗生素氨苄青霉素的 LB 平板上。

### 分离编程性细胞死亡蛋白关联 pACT 克隆

通过菌落-滤膜分析将菌落裂解, 并与特异于 pACT 的放射性标记的 17-mer 寡聚体杂交 (见序列分析章节)。从 pACT-克隆中分离质粒 DNA, 通过 XhoI 消化分析 cDNA 插入体的存在情况。

### 序列分析

将含有编码编程性细胞死亡蛋白关联蛋白的序列的亚克隆, 根据 Sanger 方法使用双脱氧 NTPs 测序, 这是由 Eurogentec (Seraing, Belgium) 进行的。所用的测序引物是 pACT 特异性 17-mer, 其包含 DNA 序列 5' -TACCACTACAATGGATG-3' 。

将编程性细胞死亡蛋白关联 cDNAs 的序列与来自 EMBL/Genbank 的已知基因序列相对比。

### 构建 pMAL-AAP1 和 pET22b-AAP1

为构建能产生和分离编程性细胞死亡蛋白关联蛋白的蛋白质过表达质粒, 使用质粒 pMALTB 和 pET22b。质粒 pMALTB 是 pMAL-C2 (New England Biolabs) 的一种衍生物, 其中因子 Xa 位点已经由

Trombin 位点置换。将质粒 pMALTB 用 BamHI 和 SalI 处理，并从琼脂糖/TBE 凝胶（QIAGEN 凝胶提取试剂盒）中分离±7.0kb 的 DNA 片段。编码完整开放读框的 AAP1 序列是在 pACT-AAP-1b 上通过 PCR 反应获得的，使用正向引物：5'AACGGGATCCGGCGGCATGGGCG ACAAGAAGAGCCCGACC 3'，和反向引物：5'AAAAGTCGACTC AGAAAGATTCATCATTGACTGCTGACAT 3'；将±0.7kb 的 PCR 片段用 BamHI 和 SalI 消化，并从琼脂糖/TBE 凝胶中分离（QIAGEN 凝胶提取试剂盒）。将含有在 IPTG 诱导的 tac 启动子调节下的 MBP 基因和 AAP1 基因之间的融合体的最终构建体称为 pMAL-AAP1。

将质粒 pET22b(Novagen)用 NdeI 和 NotI 消化，并从琼脂糖/TBE 凝胶（QIAGEN 凝胶提取试剂盒）中分离±5.5kb 的 DNA 片段。编码完整开放读框的 AAP1 序列是在 pACT-AAP-1b 上通过 PCR 反应获得的，使用正向引物：5'GGGAATTCCATATGGGCGACAAGAAG AGCCCGACC3'，和反向引物：5 AAGGAAGTACGCGGCCGCGA AAGATTCATCATTGACTGCTGACATGT3'；将 PCR 产物用 NdeI 和 NotI 处理，并从琼脂糖/TBE 凝胶中分离±0.7kb 的片段（QIAGEN 凝胶提取试剂盒）。将含有在 IPTG 诱导的 T7lac 启动子调节下的 AAP1 基因和 (His) 6-尾之间的融合体的最终构建体称为 pET22b-AAP1。

根据 Sanger 所述方法（1977）通过限制酶分析和 DNA 测序证实这两个构建体是适当的。

所有克隆步骤基本如 Maniatis 等（1992）所述进行。

过表达 MBP-AAP1 和 AAP1-(His)6 的细菌菌株

为用质粒 pMAL-AAP1 产生蛋白质，使用大肠杆菌菌株 B834 (λDE3)，为用质粒 pET22b-AAP1 产生蛋白质，使用大肠杆菌菌株 BL21 (DE3)。这两个菌株均得自 Novagen。

## 结果与讨论

编程性细胞死亡蛋白在转化的细胞如衍生自人体肿瘤的细胞系中特异性诱导编程性细胞死亡。为鉴别在这种细胞转化特异性和/或肿瘤特异性编程性细胞死亡途径中必需的化合物，对酵母进行遗传筛选。我们使用一种人 cDNA 文库，其是基于含有完整 cDNA 拷贝的质粒载体 pACT，所述完整 cDNA 拷贝得自 Epstein-Barr 病毒转化的人 B 细胞 (Durfee 等, 1993)。

### 构建表达 GAL4-DNA 结合结构域和编程性细胞死亡蛋白的融合基因产物的饵质粒

为检测人转化/致瘤性 cDNA 文库中编程性细胞死亡蛋白关联蛋白的存在情况，要构建一种所谓的饵质粒。为此，将侧翼为编程性细胞死亡蛋白基因下游的约 40 个碱基对的完整编程性细胞死亡蛋白编码区，克隆入质粒 pGBT9 的多克隆位点中。

将称为 pGBT-VP3 的最终构建体通过限制酶分析，并对编程性细胞死亡蛋白和 GAL4-DNA 结合结构域之间的融合区域进行测序。

编码编程性细胞死亡蛋白关联蛋白的一个基因 (片段) 是在酵母中通过反式激活 GAL4 应答启动子而确定的。

将编程性细胞死亡蛋白基因融合于质粒 pGBT-VP3 的 GAL4-DNA 结合结构域，而将衍生自转化的人 B 细胞的所有 cDNAs 融合于质粒 pACT 的 GAL4-激活结构域。如果由所述 cDNAs 编码的一种蛋白质物质结合编程性细胞死亡蛋白，则 GAL4-DNA 结合结构域将位于 GAL4-激活结构域附近，导致 GAL4 应答启动子激活，该启动子调节报道基因 HIS3 和 LacZ。

含有表达编程性细胞死亡蛋白的质粒和表达编程性细胞死亡蛋白关联蛋白片段的质粒的酵母克隆，可生长于减去组氨酸的培养基上，并在 $\beta$ -半乳糖苷酶分析中染蓝。接着，可分离和定性具有编码

编程性细胞死亡蛋白关联蛋白的 cDNA 插入体的质粒。

然而在我们可以这样做之前，我们已经确定单独用质粒 pGBT-VP3，或组合空的 pACT 载体转化酵母细胞，不引起 GAL4 应答启动子激活。

鉴别由衍生自人体转化的 B 细胞系的 cDNA 编码的编程性细胞死亡蛋白关联蛋白

我们已经发现基于用 pGBT-VP3 和 pACT-cDNA 转化的两个酵母菌落，其能在减去组氨酸的培养基（也缺失亮氨酸和色氨酸）上生长，及在 $\beta$ -半乳糖苷酶分析中染成蓝色。这些结果表明所观测到的酵母菌落除了含有饵质粒 pGBT-VP3 之外，还含有编码潜在的编程性细胞死亡蛋白关联蛋白的质粒 pACT。

从阳性酵母菌落中分离质粒 DNA，转化到细菌中。通过使用 pACT 特异性标记的 DNA 探针进行滤膜杂交分析，可以确定含有 pACT 质粒的克隆。接着，分离 pACT DNA 并用限制酶 XhoI 消化，这是存在 cDNA 插入体的标示。最后，使用 Sanger 方法（Sanger 等，1977）对含有 cDNA 插入体的 pACT 质粒进行测序。

关于编程性细胞死亡蛋白关联蛋白的描述

对编程性细胞死亡蛋白关联蛋白进行酵母遗传筛选，可检测到两个 cDNA 克隆 A 和 B，其包含一个单一类型的蛋白质，将此新蛋白质称为编程性细胞死亡蛋白关联蛋白 1，简称 AAP-1。cDNA AAP-1-b 具有含 ATG 起始密码子的完整的开放读框，而 AAP-1-a cDNA 序列含有部分 AAP-1 开放读框，其完全同源于 AAP-1-b DNA 序列。

确定的 AAP-1-a 和 AAP-1-b cDNA 克隆的 DNA 序列分别示于图 1 和 2。衍生自克隆 AAP-1-b 的检测的 DNA 序列的氨基酸序列示

于图 3，此氨基酸序列代表完整的 AAP-1 氨基酸序列。

构建用于在哺乳动物细胞中鉴别 AAP-1 蛋白的表达载体

为研究克隆的 cDNAs AAP-1-a 和 AAP-1-b 是否确实编码（编程性细胞死亡蛋白关联的）蛋白质产物，我们进行以下实验。

DNA 质粒 pMT2SM 含有腺病毒 5 主要晚期启动子（MLP）和 SV40 ori，能在转化的哺乳动物细胞如在 SV-40 转化的 COS 细胞中高水平表达外源基因。另外，pMT2SM 载体含有 Myc 标记（氨基酸：EQKLISEEDL），其与外源基因产物同框。此 Myc 标记使得能通过 Myc 标记特异性 9E10 抗体识别例如编程性细胞死亡蛋白关联蛋白。

如下构建表达 Myc 标记的 AAP-1-a 或 AAP-1-b cDNAs 的 pMT2SM 载体。将 pACT-AAP-1-a 和 pACT-AAP-1-b cDNA 克隆用限制酶 XhoI 消化，并分离 cDNA 插入体。将表达载体 pMT2SM 用 XhoI 消化，并用牛小肠碱性磷酸酶处理，与分离的 AAP-1 cDNA 插入体连接。通过序列分析，鉴别正确方向的含有 AAP-1-a 或 AAP-1-b cDNA 的 pMT2SM 构建体。

通过用质粒 pMT2SM-AAP-1-a 或 pMT2SM-AAP-1-b 转染 COS 细胞，分析 Myc 标记的 AAP-1 蛋白的合成。作为阴性对照，将 COS 细胞模拟转染。在转染 2 天后，将细胞裂解，并用 Myc 标记特异性抗体 9E10 进行 Western 印迹分析。

用 pMT2SM-AAP-1-a 和 pMT2SM-AAP-1-b 转染的 COS 细胞，证实可合成特异性 Myc 标记的 AAP-1 产物，该产物具有期望的大小：33kDa（AAP-1-a）或 35kDa（AAP-1-b）。正如所预期的，模拟转染的 COS 细胞的裂解物不含有与 Myc 标记特异性抗体反应的蛋白质产物。

这些结果表明我们已经能分离 cDNAs，该 cDNAs 能产生具有

关联诱导编程性细胞死亡的编程性细胞死亡蛋白蛋白的能力的蛋白质产物。

在转化的哺乳动物细胞系中共免疫沉淀 Myc 标记的 AAP-1 蛋白和编程性细胞死亡蛋白

接下来，我们使用 Myc 标记特异性抗体 9E10，通过共免疫沉淀分析了编程性细胞死亡蛋白和 AAP-1 蛋白的关联情况。9E10 抗体已示出不直接结合编程性细胞死亡蛋白，这可使得使用 9E10 进行共免疫沉淀（myc 标记的）编程性细胞死亡蛋白关联蛋白和编程性细胞死亡蛋白。

为此，将 COS 细胞用编码编程性细胞死亡蛋白的质粒 pCMV-VP3 和质粒 pMT2SM-AAP-1-a 共转染。作为阴性对照，将细胞用表达编程性细胞死亡蛋白的 pCMV-VP3 和编码不与编程性细胞死亡蛋白关联的 myc 标记的  $\beta$ -半乳糖苷酶的质粒 pcDNA3.1.LacZ-myc/His-LacZ 转染。

在转染 2 天后，将细胞在缓冲液中裂解，该缓冲液含有 50mM Tris (7.5)，250mM NaCl，5mM EDTA，0.1% Triton  $\times$  100，1mg/ml  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ，和新鲜加入的蛋白酶抑制剂如 PMSF，Trypsine 抑制剂，Leupeptine 和  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 。将此特异性蛋白质如 Noteborn 等（1998）所述，使用 Myc 标记特异性抗体 9E10 进行免疫沉淀，并通过 Western 印迹分析。

用分别特异性抗 myc 标记和编程性细胞死亡蛋白的 9E10 抗体和 111.3 抗体进行的 Western 印迹染色示出，“总”细胞裂解物含有编程性细胞死亡蛋白和 Myc 标记的 AAP-1 蛋白或  $\beta$ -半乳糖苷酶产物。Myc 标记的 AAP-1 产物的免疫沉淀是与 16kDa 的编程性细胞死亡蛋白产物的免疫沉淀相关联的。相反，免疫沉淀 myc 标记的  $\beta$ -半乳糖苷酶不产生明显的编程性细胞死亡蛋白蛋白共沉淀。

总共进行了 3 个独立的免疫沉淀实验，均示出编程性细胞死亡蛋白与 AAP-1 蛋白的关联能力。

这些结果表明新确定的 AAP-1 蛋白能特异地与编程性细胞死亡蛋白关联，不仅在酵母背景中，在哺乳动物转化的细胞系统中也如此。

所述新的 AAP-1 蛋白在人转化性细胞中的过表达诱导编程性细胞死亡过程。

另外，我们已经测试了 AAP-1 是否具有编程性细胞死亡蛋白活性。首先，我们分析了新 AAP-1 蛋白在人体转化的细胞中的定位。为此，如 Danen-van Oorschot (1997) 所述，用质粒 pMT2SM-AAP-1-a 或 pMT2SM-AAP-1-b 转染人骨肉瘤衍生的 Saos-2 细胞，这两种质粒分别编码 myc 标记的 AAP-1-a 或 AAP-1-b 蛋白。

使用 myc 标记特异性抗体 9E10 和 DAPI，进行间接免疫荧光分析，这种分析染色细胞核 DNA，示出部分和完整 AAP-1 蛋白在细胞核中均存在。实际上，其共定位于染色质/DNA 结构中。

最后，我们测试了编码完整的或部分 AAP-1 蛋白的 cDNAs 的（过）表达是否诱导编程性细胞死亡。在转染 4 天后，大部分 AAP-1 阳性细胞被 DAPI 异常染色，这表明诱导了编程性细胞死亡 (Telford, 1992, Danen-van Oorschot, 1997)。

在人体肿瘤细胞如 Saos-2 细胞中共表达编程性细胞死亡蛋白和两种 AAP-1 蛋白导致比编程性细胞死亡蛋白或 AAP-1 蛋白的单独表达更快的编程性细胞死亡进程。完整的 AAP-1 蛋白的编程性细胞死亡活性的结果示于图 4。AAP-1 在减去 p53 的 Saos-2 细胞中可诱导编程性细胞死亡的事实表明，AAP-1 可诱导非依赖于 p53 的编程性细胞死亡。这些结果意味着 AAP-1 在其它（化学）治疗剂失效的情况下，可用作抗肿瘤因子。另外，发现编程性细胞死亡蛋白和 AAP-1 均诱导不依赖于 p53 的途径，表明 AAP-1 适合编程性细胞死亡蛋

白诱导的编程性细胞死亡途径。

### 编程性细胞死亡蛋白和 AAP-1 在人体肿瘤细胞中的共定位

为确定编程性细胞死亡蛋白和 AAP-1 在转化的人体细胞中共定位的可能性，将编码编程性细胞死亡蛋白和 AAP-1 的质粒在 Saos-2 细胞中转染。通过间接免疫荧光分析监测 AAP-1 和编程性细胞死亡蛋白的表达，通过聚焦激光扫描显微镜，使用抗 AAP-1 上 myc 标记的特异性抗体 mAb myc 9E10 和抗编程性细胞死亡蛋白的 C 末端的 pAb VP3-c。用编码 AAP-1 的质粒和编码编程性细胞死亡蛋白的质粒共转染的细胞，主要在细胞核中表达这些蛋白质。编程性细胞死亡蛋白和 AAP-1 均具有粒状结构和上述特征性结构。通过聚焦结构扫描显微镜，可清晰地示出在这些核结构中发生 AAP-1 和编程性细胞死亡蛋白部分共定位。

结论是我们鉴别了一种编程性细胞死亡蛋白关联蛋白，即新 AAP-1 蛋白，其存在于细胞核中并能在人体肿瘤细胞的诱导编程性细胞死亡（非 p53 依赖性）。另外，当 AAP1 和编程性细胞死亡蛋白在相同细胞中表达时，这两个诱导编程性细胞死亡的蛋白共定位于人体肿瘤细胞的细胞核中。

### AAP-1 位于人体正常二倍体细胞的胞质结构中

接下来，我们检测了 AAP-1 在正常的人体二倍体非转化性细胞中的作用是否与在人体肿瘤细胞中的作用相似。

为此，将人体二倍体 VH10 成纤维细胞（Danen-Van Oorschot, 1997），根据生产者的指导使用 Fugene（Roche, Almere, The Netherland），用编码 myc 标记的完整 AAP 蛋白的质粒 pMT2SM-AAP-1b 进行转染。并行地，将人体肿瘤衍生的 Saos-2 细胞也用质粒 pMT2SM-AAP-1b 转染。

通过使用 myc 标记的特异性抗体 9E10 进行的间接免疫荧光分析示出在正常的二倍体 VH10 成纤维细胞中，AAP-1 蛋白位于胞质中。正如所期望的，在人体肿瘤 Saos-2 细胞中，AAP-1 位于细胞核中。

另外，如在只表达 AAP-1 的细胞中所进行的测试相同，我们测试了在人体 VH10 成纤维细胞中 AAP-1 和编程性细胞死亡蛋白共表达对 AAP-1 细胞定位的作用。免疫荧光分析数据表明编程性细胞死亡蛋白和 AAP-1 均位于胞质结构中。这些发现表明 AAP-1 和/或编程性细胞死亡蛋白的表达在正常（人体）二倍体细胞中不产生一种蛋白或另一种的核定位。

#### 编程性细胞死亡蛋白和 AAP-1 在人体成纤维细胞中的共定位

为确定编程性细胞死亡蛋白和 AAP-1 在非转化性细胞中共定位的可能性，将编码编程性细胞死亡蛋白和 AAP-1 的质粒在 VH10 细胞中转染。通过间接免疫荧光分析利用聚焦激光扫描显微镜，使用抗 AAP-1 上 myc 标记的特异性抗体 mAb myc 9E10 和抗编程性细胞死亡蛋白 C 末端的 pAb VP3-c，监测 AAP-1 和编程性细胞死亡蛋白的表达。通过用 DAPI 进行核染色，对细胞进行扫描编程性细胞死亡蛋白和 AAP-1 的共定位情况，及编程性细胞死亡的诱导情况。

用编码 AAP-1 的质粒和编码编程性细胞死亡蛋白的质粒共转染的细胞，主要在胞质中表达这些蛋白质。编程性细胞死亡蛋白和 AAP-1 均具有线状结构，有时是粒状结构。利用聚焦激光扫描显微镜，可清晰地示出在这些胞质结构中出现 AAP-1 和编程性细胞死亡蛋白共定位。当单独表达 AAP-1 时观测到相似结构，或单独表达编程性细胞死亡蛋白时也如此。

因此，不管有或无编程性细胞死亡蛋白，AAP-1 在非转化性人体成纤维细胞中均定位于胞质，并具有线性聚集的结构。

结论是我们鉴别了一种编程性细胞死亡蛋白关联蛋白，称为 AAP-1，其在人体非转化性二倍体细胞中的定位与在人体致瘤性细胞中的定位不同。这些结果示出 AAP-1 在正常的二倍体细胞中和在致瘤性细胞中的作用方式不同。另外，当 AAP1 和编程性细胞死亡蛋白在相同的正常非转化性细胞中表达时，这两个诱导编程性细胞死亡的蛋白质均定位于胞质中。

诱导 SV40 大 T 抗原核定位信号与编程性细胞死亡蛋白共价连接的作用

在以下的实验中，我们测试了由编程性细胞死亡蛋白和 SV40 LT 抗原的核定位信号组成的嵌合蛋白的表达是否在非转化性和转化的人体细胞中诱导编程性细胞死亡，所述嵌合蛋白是 SV40 大 T 抗原的氨基酸 N 末端—脯氨酸—脯氨酸—赖氨酸—赖氨酸—赖氨酸—精氨酸—赖氨酸—缬氨酸—C 末端共价地连于编程性细胞死亡蛋白的 N 末端。此嵌合蛋白称为 NLS—编程性细胞死亡蛋白。

为此，将非转化性 VH10 人体成纤维细胞和转化的人体骨肉瘤衍生的 Saos-2 细胞 (Danen-van Oorschot 等, 1997)，用编码嵌合蛋白 NLS-编程性细胞死亡蛋白的质粒转染。在转化的人体细胞中，NLS-编程性细胞死亡蛋白的表达导致编程性细胞死亡蛋白定位于细胞核，并诱导编程性细胞死亡。然而，NLS-编程性细胞死亡蛋白在正常人体成纤维细胞中的表达导致编程性细胞死亡蛋白定位于细胞核，但不诱导编程性细胞死亡。这表明将编程性细胞死亡蛋白“强迫”转运至细胞核本质上不产生其编程性细胞死亡活性。编程性细胞死亡似乎需要额外的肿瘤相关事件。

在正常人体成纤维细胞中 NLS-编程性细胞死亡蛋白的表达对 AAP-1 的作用

接下来，我们测试了 NLS-编程性细胞死亡蛋白的表达是否可影响 AAP-1 在正常人体成纤维细胞中的细胞定位和/或其编程性细胞死亡活性。为此，将 VH10 细胞用编码 NLS-编程性细胞死亡蛋白或 AAP-1 的质粒共转染。利用间接免疫荧光分析和 DAPI 扫描，使用荧光显微镜，清晰地示出 NLS-编程性细胞死亡蛋白和 AAP-1 均位于细胞核中但不诱导编程性细胞死亡。这表明将 AAP-1 通过 NLS-编程性细胞死亡蛋白“强迫”转运至细胞核本质上不产生 AAP-1 编程性细胞死亡活性。AAP-1 与编程性细胞死亡蛋白相似，似乎需要一种另外的肿瘤相关的事件以在转化的细胞的细胞核中成为有编程性细胞死亡活性的。

#### AAP-1 在人体非转化性二倍体细胞中不诱导编程性细胞死亡

在以下实验中，我们测试了单独的 AAP-1 或与编程性细胞死亡蛋白组合在人体非转化性二倍体成纤维细胞中，是否也能诱导与在人体致瘤性/转化的细胞中所观测到的相同的编程性细胞死亡。

为此，将 VH10 细胞用上述质粒 pMT2SM-AAP-1-b 转染。将转染的细胞通过使用 myc 标记特异性的和/或编程性细胞死亡蛋白特异性抗体进行间接免疫荧光分析，和 DAPI 染色进行分析。DAPI 以与染色编程性细胞死亡 DNA 不同的方式染色完整的 DNA (Telford 等, 1992)。此分析清晰示出只含有 AAP-1 蛋白或含有 AAP-1 和编程性细胞死亡蛋白的 VH10 成纤维细胞，不经历编程性细胞死亡。

所得结果示出编程性细胞死亡蛋白相关的蛋白如 AAP-1，也许在“健康”的细胞中的功能方式与在肿瘤细胞中不同。

#### 诊断分析癌细胞

基于现有报道，我们能总结出 AAP-1 的细胞定位在致瘤性/转化的人体细胞中与在正常人体非转化性细胞中不同。另外，AAP-1

在细胞核中的累积与编程性细胞死亡相关，而其定位于胞质则与细胞存活性和正常增殖能力相关。因此，我们能开发一种诊断分析，以鉴别与正常“健康”的非转化性细胞相反的（人体）癌细胞。

这种分析包括用编码 AAP-1 的质粒转染“可疑的”（人体）细胞，例如人源的，或用表达 AAP-1 的病毒载体感染细胞，接着，检测细胞 1)通过过表达 AAP-1 基因经历编程性细胞死亡的能力和 2)AAP-1 的定位从胞质中移至细胞核中。

用特异于 AAP-1 和/或特异于连接于 AAP-1 的标记的单克隆抗体，通过免疫荧光分析可确定 AAP-1 的胞内定位，所述标记例如是本文所述的 myc 标记。如果在表达 AAP-1 的分析的细胞中编程性细胞死亡和/或 AAP-1 定位于细胞核的百分率明显高于在 APP-1 阳性对照的“健康”细胞中的结果，可证明所分析的细胞已经成为致瘤性/转化的细胞。作为阳性对照，已知人体致瘤性细胞用于表达 AAP-1。

共表达 SV40 大 T 抗原和 AAP-1 导致 APP-1 易位及诱导编程性细胞死亡

我们已经测试了转化基因的表达在衍生自健康个体的正常人体细胞中，对 AAP-1 诱导的编程性细胞死亡的作用。为此，将人体 VH10 二倍体成纤维细胞用编码完整 AAP-1 蛋白的质粒 pMT2SM，和编码 SV40 大 T 抗原的质粒 pR-s884 或阴性对照质粒 pCMV-neo (Noteborn 和 Zhang, 1998) 共转染。

通过间接免疫荧光分析，分析细胞的 AAP-1 诱导的编程性细胞死亡情况。当 AAP-1 用阴性对照的质粒转染时，正常的 VH10 细胞不经历编程性细胞死亡。这正如所期望的，此结果示出 AAP-1 的表达在正常人体二倍体细胞中不能诱导编程性细胞死亡，这通过上述数据证实。然而，表达 AAP-1 和 SV40 大 T 抗原的正常二倍体人体

成纤维细胞出现 AAP-1 诱导的编程性细胞死亡。

正常细胞从 AAP-1 抗性变为 AAP-1 敏感性，可能可通过以下事实加以解释：即 AAP-1 蛋白从定位于胞质易位为定位于细胞核。这种改变在用编码转化蛋白 SV40 大 T 抗原的质粒转染 2 天后变得显而易见。可以推断在此实施例中由于衍生自 DNA 肿瘤病毒的转化产物的表达而发生了一种事件，其导致过表达的 AAP-1 从胞质易位至细胞核，这随后诱导编程性细胞死亡。

### 基于 AAP-1 诱导的编程性细胞死亡、诱导癌症的基因、因子和癌症倾向的诊断分析

基于现有报道，我们能开发一种诊断分析以鉴别诱导和/或转化癌症的因子或基因。

第一类分析包括用编码 AAP-1 的质粒转染“正常的”细胞例如源自于人体的细胞，或用表达 AAP-1 的病毒载体，与编码推定的转化/诱导癌症的基因的质粒一起感染细胞。接着，测试细胞 1)通过过表达 AAP-1 基因经历编程性细胞死亡的能力，和 2)AAP-1 从胞质易位于细胞核的变化。

使用特异于 AAP-1 和/或特异于连接于 AAP-1 的标记如本文所述的 myc 标记的单克隆抗体，通过免疫荧光分析，可以确定 AAP-1 的胞内定位。如果在共表达 AAP-1 和推定的转化/诱导癌症的基因的正常细胞中，编程性细胞死亡和/或 AAP-1 定位于细胞核的百分率明显高于在表达对照质粒的 AAP-1 阳性对照细胞中的结果，则可以推断所分析的基因确实具有转化/诱导癌症的活性。

另一种诊断分析例如是基于用推定的致癌因子处理培养的正常二倍体细胞。例如可将这种因子加入培养基中，时间长短不一。接着，将细胞用编码 AAP-1 的质粒转染。此方案也可通过首先转染/感染正常二倍体细胞，然后用测试的因子处理此细胞而进行。

接下来的分析步骤与在第一种诊断分析中所述步骤相同。如果在共表达 AAP-1 和推定的转化/诱导癌症的基因的正常细胞中，编程性细胞死亡和/或 AAP-1 定位于细胞核的百分率明显高于在表达对照因子的 AAP-1 阳性对照细胞中的结果，则可以推断所分析的因子确实具有转化/诱导癌症的活性。

第三种诊断分析例如是基于处理培养的正常二倍体细胞，该细胞衍生自被测试的具有潜在癌症倾向的个体的皮肤活检组织，并将其在适当培养基中培养。接着，将细胞用 UV 照射及随后用编码 AAP-1 的质粒转染，或用表达 AAP-1 的病毒载体感染，或者将细胞首先转染/感染，然后照射。并行地，将得自正常健康个体的二倍体细胞用作对照。

接下来的步骤与第一种诊断分析中所述的步骤相同。如果在用 UV 处理后，在衍生自潜在具有癌症倾向的个体的二倍体细胞中，编程性细胞死亡和/或 AAP-1 定位于细胞核的百分率明显高于在 UV 处理的 AAP-1 阳性对照细胞中的结果，可以推断所分析的个体具有癌症倾向。

在转化的细胞中 AAP-1 和 YY1 的彼此关联

AAP-1 的小鼠同源物 RYBP (Garcia 等, 1999) 可与 YY1 相互作用。YY1 可激活或抑制细胞和病毒蛋白的转录。蛋白质之间的相互作用可影响 YY1 的活性。AAP-1 可以与 YY1 相互作用。AAP-1 和 YY1 之间的相互作用可影响 YY1 的活性，导致转录抑制或激活。基因的转录对编程性细胞死亡蛋白和/或 AAP-1 的编程性细胞死亡活性是重要的。

为确定 AAP-1 是否与 YY1 在体外形成复合物，将编码 AAP-1 和 YY1 的质粒 (pCMV-HAVY-1; Dr Yang Shi 惠赠, Harvard 医学院, 美国波士顿) 在 COS 细胞中共转染。作为阴性对照，将 YY1

与 LacZ 共表达。将细胞裂解，并用抗 AAP-1（或 LacZ）的 myc 标记的特异性抗体，抗 myc 9E10，和抗 YY1 的特异性抗体，抗 YY1，进行免疫沉淀分析。将所得复合物通过 Western 印迹进行分析。正如所期望的，在细胞裂解物中检测到 AAP-1 和/或 YY1 和/或 LacZ。

在用 AAP-1 和 YY1 转染的细胞中，清晰地观测到当使用特异于 myc 标记的 AAP-1 的抗体进行免疫沉淀时，AAP-1 和 YY1 均可检测到。印迹示出一个 32kD 的条带（AAP-1）和一个 67kD 的条带（YY1）。另外，我们使用特异于 YY1 的抗体进行了免疫沉淀。同样，YY1 和 AAP-1 在 Western 印迹中均可检测到。

在用只表达 AAP-1 的质粒转染的细胞中，只可检测到 AAP-1。用编码 YY1 的质粒转染的细胞示出 YY1 表达，但检测不到 AAP-1。为排除 AAP-1 与 YY1 的非特异性结合，将细胞用 AAP-1 和 LacZ 转染，及使用特异于 LacZ 的抗体进行免疫沉淀。尽管在 Western 印迹上可清晰观测到 LacZ 蛋白，但观测不到 AAP-1 蛋白。

因此，所得结果示出 AAP-1 特异性结合转录相关的因子 YY1。

### 产生和分离 MBP-AAP1 和 AAP1-(His)<sub>6</sub>

为测试产生 MBP-AAP1 和 AAP1-(His)<sub>6</sub> 融合蛋白的可能性，将编码开放读框的 AAP1 核酸克隆入蛋白质过表达盒 pMALTB 和 pET22b 中。根据生产者的指导（Novagen）诱导大肠杆菌产生可溶的融合蛋白。

通过亲和分析（直链淀粉树脂，New England Biolabs）和离子交换层析（High-S, Biorad）分离 MBP-AAP1 融合蛋白，产生 90—95%纯度的全长蛋白质。对此蛋白质进行的大小排阻层析（Pharmacia Superose 6 HR 10/30）示出，MBP-AAP1 制品的主要部分表现为是一个独特种类，一个同源三聚或四聚体。此发现提示重组 AAP1（MBP 融合蛋白形式）能正确折叠，及很可能是生物学活性的。

用金属亲和层析 ( $\text{Ni}^{2+}$ -NTA, QIAGEN) 分离 AAP1-(His)<sub>6</sub> 蛋白产生±80%纯度的蛋白质。

结论是 AAP1 与 MBP 的融合产生正确折叠的, 可溶的 AAP1, 其很可能是生物学活性的。

### 产生抗 AAP1 蛋白的多克隆抗体

为产生抗 AAP-1 蛋白的多克隆抗体, 合成一种推定的免疫原性肽 (由氨基酸 N 末端-CTKTSETNHTSRPLK-C 末端组成的 AAP-1 肽; EuroGentec SA, Belgium)。接着, 将兔根据生产者的标准程序用该肽注射。

通过 ELISA 和 Western 印迹分析示出, 用 AAP-1 肽注射的兔血清是特异于上述 AAP-1 产物的。这些结果意味着我们已经产生了特异性抗体, 其可用于检测编程性细胞死亡蛋白关联蛋白 AAP-1。

结论是我们提供了特异性因子对 AAP-1 蛋白功能的干扰作用诱导编程性细胞死亡。基于利用对 AAP-1 蛋白功能的干扰作用, 诱导 (非 p53 依赖性的) 编程性细胞死亡的治疗方法是可行的。这种相互作用的因子例如是编程性细胞死亡蛋白。已知诱导编程性细胞死亡及还已知增强编程性细胞死亡蛋白活性的另一种 CAV 衍生的蛋白质是 VP2 (Noteborn 等, 1997)。

### 附图说明

图 1 示出载体 pMT2SM-AAP-1-a 的部分序列。AAP-1-a cDNA 的 DNA 序列以黑体字表示。

图 2 示出载体 pMT2SM-AAP-1-b 的部分序列。AAP-1-b cDNA 的 DNA 序列以黑体字表示。

图 3 示出编程性细胞死亡蛋白关联克隆 AAP-1-b 的所分析区域的氨基酸序列 (以黑体字表示)。另外, 给出了 pACT 的多克隆位点

的 3 个 C 末端氨基酸 H-E-G，以例证 AAP-1 氨基酸序列与 GAL4 激活结构域同框。此特点证实了 AAP-1 区域确实是在酵母细胞中合成的。注意在图 3 中第 23 位氨基酸相当于类 AAP-1 蛋白的第一位氨基酸。本文中功能性结构域或片段可例如被鉴别为转录因子结合结构域，其是从第 1 位氨基酸（图 3 中为第 23 位）至大约 54 位；锌指基序，蛋白质之间相互作用和/或蛋白质与核酸之间相互作用结构域，其是从大约第 25 位（图 3 中第 47 位）至大约 42 位；编程性细胞死亡的相关区域，其在大约第 32 至 226 位；在大约第 74 氨基酸位至 81 位的核定位信号；在大约第 102 氨基酸位至 108 位的核定位信号，或者在另一种类 AAP-1 蛋白的等价位置。

图 4 示出当单独表达（实心方框）或与编程性细胞死亡蛋白组合表达（空心方框）时，AAP-1-b 蛋白在 Saos-2 细胞中的编程性细胞死亡活性。也标示了编程性细胞死亡蛋白诱导的编程性细胞死亡的百分率（实心三角形）。

## 参考文献

1. Bellamy, C. O. C., Malcomson, R. D. G., Harrison, D. J., and Wyllie, H. 1995. 细胞死亡和疾病: 编程性细胞死亡的生物学和调控. *Seminars in Cancer Biology* 6,3-12.
2. Danen-Van Oorschot, A. A. A. M., Ficher, D. F., Grimbergen, J. M., Klein, B., Zhuang, S.-M., Falkenburg, J. H. F., Backendorf, C., Quax, P. H. A., Van der Eb, J. A., and Noteborn, M. H. M. (1997). 编程性细胞死亡蛋白在人类转化的和恶性细胞中诱导编程性细胞死亡, 在正常细胞中不诱导. *Proceedings National Academy Sciences, USA*: 94, 5843-5847.
3. Danen-Van Oorschot, A. A. A. M, Den Hollander, A., Takayama, S., Reed, J., Van der Eb, A. J. and Noteborn, M. H. M. (1997a). BAG-1 抑制 p53-诱导的细胞编程性死亡而不抑制编程性细胞死亡蛋白诱导的编程性细胞死亡. *编程性细胞死亡* 2,395-402.
4. Duke, R. C., Ocjius, D. M., Young, J, D-E. (1996). 健康和疾病中的细胞自杀. *Scientific American* December 1996,48-55.
5. Durfee, T., Becherer, K., Chen, P.-L., Yeh, S.-H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W.-H., and Elledge, S. J. (1993). 眼癌蛋白与该蛋白质磷酸 I 型催化亚基相关. *Genes and Development* 7,555-569.
6. Earnshaw, W. C., 1995. 细胞编程性死亡中的核改变. *Current Opinion in Cell Biology* 7,337-343.

7. Fields, S. and Song, O. K. (1989). 检测蛋白质-蛋白质相互作用的一种新遗传系统. *Nature* 340,245-246.
8. Garcia, E., Marcos-Gutierrez, C., Del Mar Lorente, M., Moreno, J. C., and Vidal, M. RYBP, 一种与哺乳动物 polycomb 复合物的组分以及与转录因子 YY1 相互作用的新阻遏蛋白(1999). *EMBO Journal* 18,3404-3418.
9. Hockenberry, D. M. (1994). 在癌症、发育和编程性细胞死亡中的 Bcl-2. *Journal of Cell Science, Supplement* 18,51-55.
10. Hoffman, C. S. and Winston, F. (1987). 酵母的 10 分钟 DNA 制备物有效释放自身质粒用于转化大肠杆菌. *Gene* 57,267-272.
11. Kerr, J. F. R., Winterford, C. M., and Harmon, B. V. (1994). 编程性细胞死亡: 其在癌症和癌症治疗中的重要性. *Cancer* 73,2013-2026.
12. Klebe, R. J., Harriss, J. V., Sharp, Z. D., and Douglas, M. G. (1983). 细菌和酵母的聚乙二醇诱导的遗传转化的通用方法. *Gene* 25,333-341.
13. Levine, A. J. (1997). p53, 生长和分化的细胞看门人. *Cell* 88,323-331.
14. Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982). 分子克隆实验手册. CSHL Press, New York, USA.

15. McDonnell T. J., Meyn, R. E., Robertson, L. E. (1995). 编程性细胞死亡调控在癌症治疗中的应用. *Seminars in Cancer Biology* 6,53-60.
16. Noteborn, M. H. M. (1996). PCT 申请 WO 96/41191. 抗肿瘤疗法发展中的关键特征: 编程性细胞死亡蛋白在人类转化的和恶性细胞中诱导编程性细胞死亡, 在正常细胞中不诱导.
17. Noteborn, M. H. M., and De Boer, G. F. (1996). 专利 USA/no. 030,335.
18. Noteborn, M. H. M., De Boer, G. F., Van Roozelaar, D., Karreman, C., Kranenburg, O., Vos, J., Jeurissen, S., Zantema, A., Hoeben, R., Koch, G., Van Ormondt, H., and Van der Eb, A. J. (1991). 含有感染性复制周期的所有元件的克隆的鸡贫血病病毒 DNA 的鉴定. *Journal of Virology* 65, 3131-3139.
19. Noteborn, M. H. M., and Pietersen, A. (1998). 表达诱导编程性细胞死亡的蛋白 VP2 和/或编程性细胞死亡蛋白的基因输送载体. PCT 申请 PCT/NL98/00213
20. Noteborn, M. H. M., Todd, D., Verschueren, C. A. J., DeGauw, H. W. F. M., Curran, W. L., Veldkamp, S., Douglas, A. J., McNulty, M. S., Van der Eb, A. J., and Koch, G. (1994). 单个鸡贫血病病毒蛋白诱导编程性细胞死亡. *Journal of Virology* 68,346-351.
21. Noteborn, M. H. M., Verschueren, C. A. J., Koch, G., and Van der Eb, A. J. (1998). 重组杆状病毒编码的鸡贫血病病毒(CAV)蛋白 VP1 和

VP2 的同时表达是形成 CAV 特异性中和表位所需的. *Journal General Virology*, 79,3073-3077.

22. Noteborn, M. H. M., and Zhang, Y. (1998).确定试剂的转化能力以确定细胞被转化的倾向的方法和装置以及用编程性细胞死亡蛋白类活性预防治疗癌症. PCT 申请 PCT/NL98/00457

23. Noteborn, M. H. M., Danen-van Oorschot, A. A. A. M., Van der Eb, A. J. (1998a). 鸡贫血病病毒: 通过单链 DNA 病毒的单个蛋白诱导编程性细胞死亡. *Seminars in Virology* 8,497-504.

24. Paulovich, A. G., Toczyski, D., Hartwell, H. (1997).何时检查站失效. *Cell* 88,315-321.

25. Pietersen, A. M., Van der Eb, M. M., Rademaker, H. J., Van den Wollenberg, D. J. M., Rabelink, M. J. W. E., Kuppen, P. J. K., Van Dierendonck, J. H., Van Ormondt, H., Masman, D., Van de Velde, C. J. H., Van der Eb, Hoeben, R. C., and Noteborn, M. H. M. (1998). 用含有编程性细胞死亡蛋白基因的腺病毒特异杀伤肿瘤细胞. *Gene Therapy* 6,882-892.

26. Rose, M. D., Winston, F., and Hieter, P. (1990). 酵母遗传学方法, 实验教程手册. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

27. Sachs, L. and Lotem, J. (1993).正常和白血病细胞中的编程性细胞死亡的控制: 治疗新应用. *Blood* 82,15-21.

28. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulsen, A. R. (1977). 用链终止抑制剂进行 DNA 测序 Proceedings National Academic Sciences USA 74,5463-5467.
29. Steller, H. (1995). 细胞自杀的机制和基因. Science 267,1445-1449.
30. Telford, W. G., King, L. E., Fraker, P. J. (1992). 用流式细胞计数比较评价几种 DNA 结合染料对编程性细胞死亡相关染色质降解的检测. Cytometry 13,137-143.
31. Teodoro, J. G. and Branton, P. E. (1997). 病毒基因产物对编程性细胞死亡的调控. Journal of Virology 71,1739-1746.
32. Thompson, C. B. (1995). 发病机理及疾病治疗中的编程性细胞死亡. Science 267,1456-1462.
33. White, E. (1996). 生命、死亡和编程性细胞死亡的追击. Genes and development 10,1-15.
34. Wyllie, A. H. (1995). 编程性细胞死亡的遗传调控. Current Opinion in Genetics and Development 5, 97-104.
35. Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R., Currie, A. R. (1980). 细胞死亡: 编程性细胞死亡的重要性. International Review of Cytology 68,251-306.
36. Yang, X., Hubbard, E. J. A., and Carlson, M. (1992). 由双杂交系统

鉴别的蛋白激酶底物. *Science* 257,680-682.

37. Zhuang, S.-M., Landegent, J. E., Verschueren, C. A. J., Falkenburg, J. H. F., Van Ormondt, H., Van der Eb, A. J., Noteborn, M. H. M. (1995). 由鸡贫血病病毒编码的蛋白编程性细胞死亡蛋白在各种人血液学恶性细胞中体外诱导细胞死亡. *Leukemia* 9 S1,118- 120.

38. Zhuang, S.-M., Shvarts, A., Van Ormondt, H., Jochemsen, A.-G., Van der Eb, A. J., Noteborn, M. H. M. (1995). 衍生自鸡贫血病病毒的编程性细胞死亡蛋白在人骨肉瘤细胞中诱导不依赖于 p53 的编程性细胞死亡. *Cancer Research* 55,486-489.

XhoI

1 ACCANACCCAAAAAAGAGATCTGGAATTCGGATCCTCGAGGCCACGAAGGCCGAAACAG  
61 TGCTGAAGCCTTTAAATGCAGCATCTGGGATGTGAGGAAAGGCACCTCCACCAGAAAACC  
121 TCGGATCAATTCTCAGCTGGTGGCNCACAAGTGGCACAACAGTATGCCACCCACCACC  
181 CCCTAAAAGGAGAAGAAGGAGAAAGTTGAAAAGCAGGACAAAGAGAAAACCTGAGAAAGA  
241 CAAGGAAATTAGTCCTAGTGTACCAAGAAAAATACCAACAAGAAAACCAACCAAAGTC  
301 TGACATTCTGAAAGATCCTCCTAGTGAAGCAAACAGCATAACAGTCTGCAATGCTACAAC  
361 AAAGACCAGCCAAACAAATCACACCTCAAGGCCCGGGCTGAAAAACGTGGACAGCAGCAC  
421 TGCACAGCAGTTGGCAGTAACTGTGGCCAACGTCACCGTCATTATCACAGACTTTAAGGA  
481 AAAGACTCGCTCCTCATCGACATCCTCATCCACAGTGACCTCCAGTGCAGGGTCAGAACA  
541 GCAGAACCAGASCAGCTCGGGGTCACAGAGCCACAGACAAGGGCTCCTCCCGTTCCTCCAC  
601 GCCAAAGGGCGACATGTCAGCAGTCAATGATGAATCTTTCTGAAATTGCACATGGAATTG  
661 TGAAAACATGAAATCAGGGTATGAAATTCAAAACCTCCACCTGCCCATGCTGCTTGCATC  
721 CCTGGAGAACTCTCTGTGGACATCGACCTCTTAGTGTGCTGCCAGGATAAATTTCTGCTT  
781 GCCATGGGCATCTGGCCACCAAGGAATTTCCGACCCCTGACGATTACTCTTGACACTTTTA  
841 TGEATTCATGCTTTTAAATGATTTTCCTAACAAATCATTATAATTGGATGTGCTCCTGA  
XhoI  
901 ATCTACTTTTATAAAAAAAGCCTTYGTGGCCTCGAGAGATCTATGA

图 1

```

1      TATAACTATCTATTTCGATGATGAAGATACCCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTGGAAT
      XhoI
61     TCGGATCCTCGAGGCCACGAAGGCCTTTCCTCCTCCGAGCGGGCCGGTTTCGGCTTGGGG
121    GGGGCGGGGTACAGCCCATCCATGACCATGGGGCACAAGAAGAGCCCGACCAGGCCAAAA
181    AGACAAGCGAAACCTGCCGCAGACGAAGGGTTTGGGATTGTACCGTCTGCACCTTCAGA
241    AACAGTCTGAAGCCTTTAAATGCAGCATCTCGGATGTGAGGAAAGGCACCTCCACCAGA
301    AAACCTCGGATCAATTCTCAGCTGGTGGCACACAAGTGGCACACAGTATGCCACCCCA
361    CCACCCCTAAAAAGGAGAAGAAGGAGAAAGTTGAAAAGCAGGACAAAGAGAAACCTCAG
421    AAAGACAAGGAAATTAGTCCTAGTGTACCAAGAAAAATACCAACAAGAAAACCAAACCA
481    AAGTCTGACATTCTGAAAGATCCTCCTAGTGAAGCAAACAGCATACAGTCTGCAAATGCT
541    ACAACAAAGACCAGCGAAACAATFCACACCTCAAGGCCCCGGGTGAAAACGTGGACAGG
601    AGCACTGCACAGCAGTTGGCAGTAACTGTGGCAACGTCAACCGTCATTATCACAGACTTT
661    AAGGAAAAGACTCGCTCCTCATCGACATCCTCATCCACAGTGACCTCCAGTGCAGGGTCA
721    GAACAGCAGAACCAGAGCAGCTCGGGGTGAGAGACACAGACAAGGGCTCCTCCCGTCC
781    TCCACGCCAAAGGCCGACATGTCAGCAGTCAATGATGAATCTTCTGAAATTGCACATGG
841    AATTGTGAAAACATGAATCAGGGTATGAAATTCAAAACCTCCACCTGCCCATGCTGCTT
901    GCATCCCTGGAGAATCTTCTGTGGACATCGACCTCTTAGTGATCCTGCCAGGATAATTC
961    TGCTTGCCATGGGCATCTGGCCACCAAGGAATTCGCACCCTGACGATTACTCTTGACAC
1021   TTTTATGTATTCCATTGTTTTATATGATTTTCCTAACAATCATTATAATTGGATGTGCT
      XhoI
1081  CCTGAATCTACTTTTATAAAAAGGCCTTCGTGGCCTCGAGAGATCTATGA

```

图2

1	HEGLSPPSGA	GFGLGGAGYS	PSMIMGDEKES	PTRFKROAKP
41	AADEGFWDCS	VCIFRNIAKA	FKCSICDVERK	GTSTKPRIN
81	SQLVAGQVAQ	QYATPPFFIK	KKKEKVERQD	KKKPKDKKI
121	SPSVTGGTIN	KCTKPKSDIL	KDPPSEANSI	QSANATKTS
161	EDNTEDEEEL	KNVDRSTAGQ	LAVTVGVVTV	IITDFKERT
201	SSSTSSSTVT	SSAGSEQQDQ	SSSGSESTDK	GSSRSSTPKG
241	DMSAVDESF	*NCTWNCENY	ESGYEIQNLH	LPMLLASLEN
281	LLWTSTS**C	QDNFCLPWA	SGHOGISHPD	DYS*HFYVFH
321	CFI*FS*QSF	IIGCAPESTF	YKKAFVASRD	L*

图3

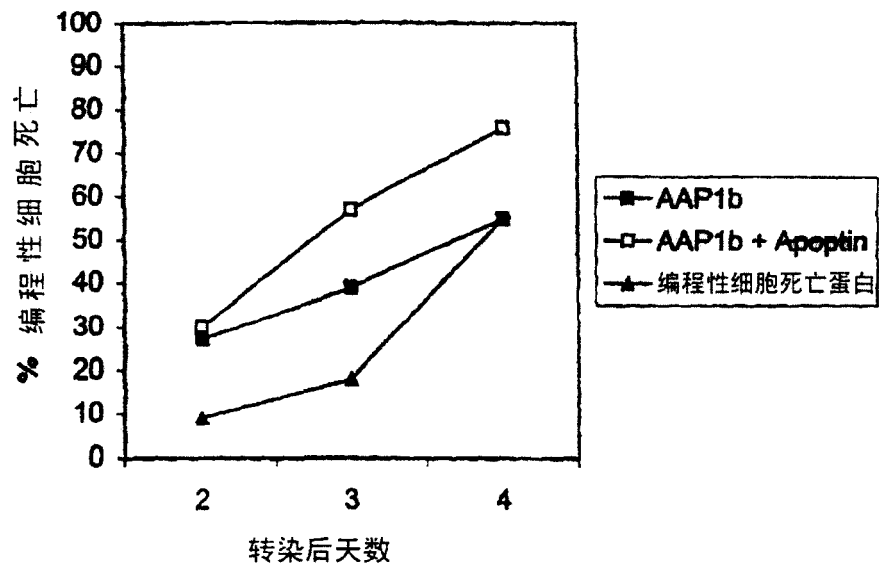


图4

专利名称(译)	编程性细胞死亡蛋白关联蛋白		
公开(公告)号	<a href="#">CN100513565C</a>	公开(公告)日	2009-07-15
申请号	CN00815255.1	申请日	2000-09-01
[标]申请(专利权)人(译)	利德股份有限公司		
[标]发明人	马蒂厄许贝特斯玛丽亚诺特博恩		
发明人	马蒂厄·许贝特斯·玛丽亚·诺特博恩 阿斯特丽德·阿德里安娜·安娜·玛丽亚·达南·范奥尔斯霍特		
IPC分类号	C12N15/12 C12N5/10 C12N1/19 C07K14/47 C07K16/18 A61K48/00 A61K38/17 A61K31/713 A61P35/00 A61P37/00 C12Q1/68 G01N33/68 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/48 A61K38/00 A61P37/06 A61P43/00 C12N15/09 C12Q1/02 G01N33/574		
CPC分类号	C07K16/18 C07K14/4747 A61K48/00 A61K38/00		
代理人(译)	林晓红		
审查员(译)	吴永庆		
优先权	1999203465 1999-10-21 EP 1999202858 1999-09-02 EP		
其他公开文献	CN1387569A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及编程性细胞死亡领域。本发明提供了新的治疗可能性，例如可单独发挥作用、在编程性细胞死亡蛋白之后或与其联合发挥作用的新的组合疗法或新的治疗化合物，特别是用于p53(部分)无功能的情况中。

