

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07H 21/04

C12Q 1/68 G01N 33/53

C07K 16/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00814096.0

[43] 公开日 2002 年 11 月 6 日

[11] 公开号 CN 1378552A

[22] 申请日 2000.8.14 [21] 申请号 00814096.0

[30] 优先权

[32] 1999.8.13 [33] US [31] 60/148,940

[86] 国际申请 PCT/US00/22093 2000.8.14

[87] 国际公布 WO01/12648 英 2001.2.22

[85] 进入国家阶段日期 2002.4.10

[71] 申请人 乔治华盛顿大学

地址 美国华盛顿

[72] 发明人 P·E·伯格

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘 玥

权利要求书 3 页 说明书 73 页 附图 15 页

[54] 发明名称 新型转录因子 BP1

[57] 摘要

提供一种编码转录因子 BP1、具有 SEQ ID NO:1 的分离的 DNA,认为 BP1 是一种 β -珠蛋白基因的阻抑蛋白。用含有所述 DNA 的载体转化的宿主细胞可以用来生产 BP1。具有与所述 BP1 可读框有效连接的可控制启动子的载体,可以用来转化镰状细胞贫血患者的产生 β -珠蛋白的细胞,由此提供治疗。因为 BP1 在白血病细胞和乳腺癌细胞中过量表达,所以可以通过测定可能患有这些疾病的患者的细胞样品中是否过量表达 BP1,来筛选和诊断急性髓细胞白血病、急性淋巴细胞白血病和乳腺癌。可以用编码 BP1 的 DNA 的反义 DNA 或 RNA 作为对急性髓细胞白血病、急性淋巴细胞白血病和乳腺癌的治疗。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种编码 BP1 的分离的 DNA, 所述 DNA 具有 SEQ ID NO: 1。
2. 权利要求 1 的分离的 DNA, 其中所述 BP1 表现出阻抑蛋白
5 功能。
3. 权利要求 1 的分离的 DNA, 其中所述 BP1 于 β -珠蛋白基因上游-530 bp 与沉默子 I 结合, 以及于 β -珠蛋白基因上游-300 bp 与沉默子 II 结合。
4. 权利要求 1 的分离的 DNA, 其中所述 BP1 与 δ -珠蛋白基因上游-530 bp 的 DNA 序列结合。
10
5. 权利要求 1 的分离的 DNA, 其中所述 BP1 与 $^G\gamma$ -珠蛋白基因上游-1400 bp 和-1100 的序列结合以及与 $^A\gamma$ -珠蛋白基因-1100 的序列结合。
6. 权利要求 1 的分离的 DNA, 其中所述 DNA 是 1251 bp 的
15 cDNA。
7. 权利要求 1 的分离的 DNA, 其中所述 DNA 含有一个可读框 (ORF)。
8. 一种载体, 所述载体包含权利要求 1 的分离的 DNA。
9. 一种宿主细胞, 所述宿主细胞是用权利要求 8 的载体转化的
20 宿主细胞。
10. 一种权利要求 9 的宿主细胞, 其中所述宿主细胞是真核宿主细胞。
11. 一种反义 DNA 或反义 RNA, 所述反义 DNA 或反义 RNA 与具有 SEQ ID NO:1 的 DNA 互补。
- 25 12. 一种治疗镰状细胞贫血的方法, 所述方法包括给予患者有效量的 BP1 的步骤。
13. 权利要求 12 的方法, 其中通过用含有 SEQ ID NO. 1 的可读框和一个可控制表达启动子的载体转化患者的产生 β -珠蛋白的细胞,

给予所述 BP1，使得在所述患者的产生 β -珠蛋白的细胞中可控制地产生 BP1。

14. 权利要求 12 的方法，其中所述 BP1 减少 β -珠蛋白的表达，并且降低胞内 HbS 浓度。

5 15. 一种筛选或诊断急性髓细胞白血病或急性淋巴细胞白血病的方法，所述方法包括以下步骤：

(a) 从患者获取细胞样品，和

(b) 测定与正常细胞相比所述细胞样品是否过量表达 BP1，其中如果有过量表达，则 BP1 的过量表达指示急性髓细胞白血病或急性淋巴细胞白血病的阳性诊断。
10

16. 权利要求 15 的方法，其中所述细胞样品得自骨髓或外周血。

17. 权利要求 15 的方法，其中测定 BP1 是否过量表达的步骤(b)，通过用衍生自 SEQ ID NO:1 的 PCR 引物进行 RT-PCR (反转录酶聚合酶链式反应)来完成。

15 18. 权利要求 17 的方法，其中所述 PCR 引物是 SEQ ID NO 8 和 SEQ ID NO 9 的寡核苷酸，其中所述 BP1 的表达通过 581 碱基对(bp)的 PCR 产物来指示。

19. 权利要求 17 的方法，其中所述 PCR 引物是 SEQ ID NO 10 和 SEQ ID NO 11 的寡核苷酸，其中所述 BP1 的表达通过 225 碱基对
20 (bp)的 PCR 产物来指示。

20. 权利要求 15 的方法，其中所述方法还包括提供抗 BP1 抗体的步骤，并且其中测定与正常细胞相比所述细胞样品是否过量表达 BP1 的步骤(b)，通过用所述抗 BP1 抗体经免疫组织化学检测 BP1 来完成。

25 21. 一种筛选/诊断乳腺癌的方法，所述方法包括以下步骤：

(a) 从患者的乳腺组织获取细胞样品，和

(b) 测定与正常细胞相比所述细胞样品是否过量表达 BP1，其中如果有过量表达，则 BP1 的过量表达指示乳腺癌的阳性诊断。

22. 权利要求 21 的方法, 其中测定 BP1 是否过量表达的步骤(b), 通过用衍生自 SEQ ID NO:1 的 PCR 引物进行 RT-PCR (反转录酶聚合酶链式反应)来完成。

23. 权利要求 22 的方法, 其中所述 PCR 引物是 SEQ ID NO 8 和 SEQ ID NO 9 的寡核苷酸, 其中所述 BP1 的表达通过 581 碱基对(bp) 的 PCR 产物来指示。

24. 权利要求 22 的方法, 其中所述 RT-PCR 引物是 SEQ ID NO 10 和 SEQ ID NO 11 的寡核苷酸, 其中所述 BP1 的表达通过 225 碱基对 (bp)的 PCR 产物来指示。

25. 权利要求 21 的方法, 其中所述方法还包括提供抗 BP1 抗体的步骤, 并且其中测定与正常细胞相比所述细胞样品是否过量表达 BP1 的步骤(b), 通过用所述抗 BP1 抗体经免疫组织化学检测 BP1 来完成。

26. 一种编码 BP1 蛋白的 mRNA 片段。

27. 权利要求 1 的分离的 DNA, 其中所述 BP1 是一种同源框基因, 并且是 distal-less 家族的成员。

28. 权利要求 1 的分离的 DNA, 其中所述 BP1 作图至染色体 17q21-22。

29. 一种抗 BP1 的多克隆抗体。

30. 一种抗 BP1 的单克隆抗体。

31. 一种组合物, 所述组合物包含一组 PCR 引物, 所述引物从编码 BP1 的 mRNA 的 cDNA 底物扩增一种单一 DNA 分子。

32. 权利要求 31 的组合物, 其中所述 PCR 引物组包含 SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 9 的寡核苷酸。

33. 权利要求 31 的组合物, 其中所述 PCR 引物组包含 SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 11 的寡核苷酸。

新型转录因子 BP1

5 本申请要求于1999年8月13日申请的第60/148,940号美国临时申请的优先权。该临时申请通过引用结合到本文中。

关于联邦资助研究的声明

10 本文所述的研究得到NIH资助号R01DK53533的支持。美国政府在本发明中享有一定的权利。

技术领域

15 本发明涉及编码转录因子BP1的DNA、含有所述DNA的载体和含有所述DNA的宿主细胞。本发明也涉及编码BP1的DNA的反义DNA或RNA、用于通过给予有效量BP1治疗镰状细胞贫血的方法、以及用于筛选急性髓细胞白血病、急性淋巴细胞白血病和乳腺癌的方法。

 (在所述临时申请中,转录因子BP1有时称为“BP1/Dlx9”或“BP1/D1x9”。在本文中,为了更加明确,将该转录因子简称为“BP1”。)

20 β -珠蛋白簇中的珠蛋白基因的表达局限于红细胞生成细胞,在胚胎发育(ϵ)、胎儿发育($G\gamma$ 和 $A\gamma$)和成体发育(δ 和 β)期间表达5种不同的基因。珠蛋白基因的转录激活不仅由于转录激活蛋白与待激活基因的启动子结合而发生,也由于位于 β -珠蛋白簇上游6-18 kb的调节元件-基因座控制区(LCR)而发生(参见例如 Berg, P. E.和 A. N. Schechter. 1992. 血红蛋白疾病的分子遗传学。载于 T. Friedmann (编著), Molecular Genetic Medicine. Academic Press, San Diego.; Forrester, W. C., C. Thompson, J. T. Elder 和 Groudine, M. 1986. 人类 β -珠蛋白基因簇中发育稳定的染色质结构。 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 1359-

25

1363; 和 Tuan, D., W. Soloman, Q. Li 和 I. M. London. 1985. 人类类红细胞中的“ β -珠蛋白”基因结构域. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**: 6384-6388。)。个体发育期间 β -珠蛋白簇基因的顺序激活必定遇到特定发育阶段期间无活性的珠蛋白基因的阻抑。阻抑由于阻抑蛋白与启动子/上游 DNA 的结合所致, 在成体 β -珠蛋白基因的情况下, 也可能由于缺乏 LCR 的激活作用所致(参见例如 Crossley, M.和 S. H. Orkin. 1993. β -珠蛋白基因座的调节。 Curr. Opinion Gen. Dev. **3**: 232-237。)。虽然对于与 β -珠蛋白基因附近的 DNA 序列结合的转录激活蛋白的了解相当多, 但对于阻抑其转录的蛋白质知之甚少。

10 如以下所讨论的, 已经表明 BP1 与 β -珠蛋白基因上游的两个沉默子 DNA 序列结合, 因此有强有力的证据表明, BP1 蛋白是一种 β -珠蛋白基因的阻抑蛋白。本发明提供编码 BP1 的 DNA 序列、使用得自所述 DNA 序列信息的信息筛选疾病例如乳腺癌、急性髓细胞白血病和急性淋巴细胞白血病的方法。已经发现所述 DNA 序列与其它两种人类基因 DLX4 和 DLX7 密切相关, 描述于 Quinn, L. M., B. V. Johnson, J. Nicholl, G. R. Sutherland 和 B. Kalionis. 1997. 从人类胎盘中分离和鉴定包括 Distal-less 家族新成员 DLX4 在内的同源框基因。Gene **187**: 55-61 和 Nakamura S, Stock, DW, Wydner, KL, Bollekens JA, Takeshita K, Nagai BM, Chiba, Kitamura T, Freeland TM, Zhao Z, Minowada J, Lawrence JB, Weiss KB 和 Ruddle FH. 一种新的哺乳动物 Distal-less 基因 Dlx-7 的基因组分析。Genomics 1996; **38**: 314-324。

25 许多类型癌症的存活率与早期检测和治疗相关。此外, 监测进行之中的癌症治疗有助于确定有效性。因此, 一直需要可靠的癌细胞筛选方法。一个筛选方法是检测和监测与正常细胞相比特定类型癌细胞中过量表达或表达不足的基因的表达。检测技术和具体标记已经公开于例如以下美国专利中: Smith 等的美国专利第 5,776,683 号、Pardee 等的美国专利第 5,965,409 号、Cole 等的美国专利第 6,037,129 号、Holt 等的美国专利第 5,677,125 号、Watson 等的美国专利第 6,004,756 号、

Mulshine 等的美国专利第 5,994,062 号、Zon 等的美国专利第 5,700,927 号和 Rio 等的美国专利第 5,981,218 号,上述专利通过引用结合到本文中。

5 因为没有一种标记或筛选方法是完全可靠的,因此在本领域中一直需要另外的遗传标记。特别是,一直需要用于鉴定乳腺癌、急性髓细胞白血病和急性淋巴细胞白血病的遗传标记。本发明通过提供 DNA BPI 组合物和用于筛选乳腺癌、急性髓细胞白血病和急性淋巴细胞白血病的方法,解决了本领域的这一问题。

10 问题也在于本领域中缺乏有关 β -珠蛋白基因阻抑的信息。正如下文所讨论的,有例如镰状细胞贫血的医学病症可以通过阻抑 β -珠蛋白的表达而得到治疗,本发明提供了一种推定的 β -珠蛋白阻抑蛋白 BPI 的制备。

发明的公开

15 本发明的一个目的是提供编码 BPI 的 DNA 序列。

本发明的另一目的是提供用于检测急性髓细胞白血病和急性淋巴细胞白血病的标记和方法。

本发明的另一目的是提供用于检测乳腺癌的标记和方法。

20 本发明的另一目的是提供可以通过阻抑 β -珠蛋白基因的表达而减轻的病症的疗法。

本发明的另一目的是提供镰状细胞贫血的疗法。

本发明的另一目的是提供可以通过阻断 BPI 的表达而减轻的病症的疗法。

25 在本发明中通过提供具有 SEQ ID NO: 1、编码 BPI 的分离的 DNA,达到这些目的和其它目的。BPI 表现出阻抑蛋白的功能:它与 β -珠蛋白基因上游的沉默子 I 和 II 结合,并且与 δ -珠蛋白基因上游-530 bp 的序列结合。

本发明也包括包含编码 BPI 的 DNA 的载体和用所述载体转化的

宿主细胞。

在一个替代的实施方案中,本发明涉及编码BP1、具有SEQ ID NO: 1的DNA的反义DNA或反义RNA。

5 本发明还提供治疗镰状细胞贫血的方法,所述方法包括给予有效量的BP1。

本发明提供急性髓细胞白血病或急性淋巴细胞白血病的筛选和/或诊断方法,所述方法包括以下步骤:(a)从患者获取细胞样品,和(b)测定与正常细胞相比所述细胞样品是否过量表达BP1。

10 本发明也提供乳腺癌的筛选和/或诊断方法,所述方法包括以下步骤:(a)从患者获取细胞样品,和(b)测定与正常细胞相比所述细胞样品是否过量表达BP1。

本发明还提供抗BP1的多克隆抗体。

本发明还提供用于扩增SEQ ID NO: 1的DNA的一组PCR引物。

15 根据以下详述和附图,本发明的上述目的和其它目的对于相关领域技术人员将变得显而易见,其中仅显示和描述了本发明的优选实施方案,这些实施方案仅仅用于说明实施本发明的最佳模式。正如众所周知的,可以在不偏离本发明的精神和范围的情况下,在相关领域的技术范围内对本发明进行修改。

20

附图简述

图1图示了 β -珠蛋白上游-100至-600 bp的区域,表明BP1于相对于加帽位点(+1)的-530 bp与沉默子I结合和于-300 bp与沉默子II结合,而另一种DNA结合蛋白BP2于-270bp与沉默子II结合。

25 图2是一幅放射自显影图,表明EMSA竞争测定的结果,证实所述cDNA编码一种蛋白质,该蛋白质具有预期的BP1结合特异性,即与 β -珠蛋白基因上游的沉默子I和II结合以及与 δ -珠蛋白基因上游-530 bp的序列结合的能力。从 λ 溶原体表达了与 β -半乳糖苷酶融合的所述推定的BP1蛋白。将这种融合蛋白部分纯化,并且与用于筛选所述文

库的沉默子 II 探针一起温育，产生一条第 1 泳道中由箭头所示的变动的条带。

图 3A 是一幅放射自显影图，显示了使用 630 bp BP1 cDNA (如本文所述获得的)一部分作为探针进行的 K562 RNA 的 RNA 印迹的结果。识别出一条 2.1 kb 的 RNA 条带。

图 3B 是一幅放射自显影图，显示了使用图 3A 中所述的同一探针进行的胎儿组织的 RNA 印迹的结果。

图 4 是 BP1 的序列。该序列也描述于所附序列表的 SEQ ID NO: 1 中。指明了该序列的可读框以及预测的蛋白质序列，所述蛋白质序列也描述于序列表的 SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 12 中。

图 5A 和图 5B 图示了瞬时转染测定中相对于增加量 pRSV/BP1-ORF (如本文所述亚克隆的)或相对于空载体的 K562 细胞的相对 CAT 活性。在图 5A 中，pεCAT/SI 是靶 DNA；在图 5B 中，pεCAT/SII 是靶 DNA。用增加量的或者空载体或者 pRSV/BP1-ORF 与靶质粒一起瞬时共转染 K562 细胞。

图 6 是一幅放射自显影图，显示了通过 RT-PCR 检测的 BP1 在类红细胞谱系细胞系和髓细胞谱系细胞系中的表达。

图 7A 和图 7B 是放射自显影图，显示了通过 RT-PCR 检测的 BP1、DLX7 和 DLX4 在 T 细胞 ALL 细胞系和红髓细胞(erythromyloid)细胞系中的表达。

图 8 是一幅放射自显影图，显示了 BP1、DLX7 和 DLX4 在正常骨髓、B 细胞和 T 细胞中的表达。使用半定量 RT-PCR 测定表达。

图 9 是一幅放射自显影图，显示了 BP1、DLX7 和 DLX4 在急性髓细胞白血病中的表达。显示了得自 6 位患者的样品。(-)表示表达等于或低于正常对照；(+)表示表达高于对照；(++)表示表达率至少三倍于(+)表达率。

图 10 是一幅图，比较了 BP1、DLX7 和 DLX4 在 AML 和 T 细胞 ALL 中的表达。黑色条带代表成年 AML，而白色条带代表儿童 T 细胞

ALL。

图 11 是一幅放射自显影图，显示了 BP1 在 CD34⁺细胞和 CD34⁻细胞中的表达。

5 图 12 是一幅图，显示了在与接受空载体的对照细胞(9A 和 9B)相比，用 BP1 反义生产质粒(10B 和 10D)转化的细胞系 4 天过程中的生存力百分比。

图 13 是一幅放射自显影图，显示了接受空载体(第 1-2 泳道)的细胞系(9A-9B)和用 BP1 反义生产质粒转化的细胞系 10B-10D (第 3-4 泳道)的 BP1 表达。

10 图 14 是一幅放射自显影图，显示了包括乳腺癌系 MCF7 ADR、MDA468 和 T47D 的几种乳腺癌细胞系的 BP1 表达，而在新乳腺组织中没有表达。

图 15 是一幅放射自显影图，显示了正常乳腺组织和恶性乳腺组织中 BP1 的表达。

15

实施本发明的最佳模式

本发明涉及具有 SEQ ID NO: 1 或基本上由 SEQ ID NO: 1 构成并且编码转录因子 BP1 的分离的 DNA。转录因子 BP1 表现出β-珠蛋白阻抑蛋白的功能，并且与β-珠蛋白基因上游的沉默子 I 和 II 结合、与
20 δ-珠蛋白基因上游-530 bp 的序列结合，也与印度(Indian)单倍型 D 序列结合。BP1 通常在胎盘和肾中表达。根据 SEQ ID NO: 1 的分离 DNA 的可读框推导的 BP1 的预测序列以 SEQ ID NO: 2 和 12 给出。在图 4 中一起给出所述 DNA 序列和所述蛋白质序列。本文所用的术语“分离的 DNA”是指不处于其天然环境的 DNA。

25 在本发明的一个优选实施方案中，编码 BP1 的所述分离的 DNA 是一种 1251 bp 的 cDNA。所述分离的 DNA 也包含一个可读框(ORF)。

本发明还涉及含有所述 DNA 的载体，以及涉及用含有所述 DNA 的载体转化的宿主细胞。在一个优选实施方案中，所述转化宿主细胞

是真核宿主细胞。

本发明还包括具有 SEQ ID NO: 1 的 DNA 的反义 DNA 或反义 RNA。

5 本发明还包括镰状细胞贫血的治疗方法，所述方法包括给予需要所述治疗的患者有效量的 BP1 的步骤。在本发明的该方法中，BP1 减少患者体内的 β -珠蛋白表达，并且降低 HbS 的胞内浓度。

本发明还包括急性髓细胞白血病或急性淋巴细胞白血病的筛选和诊断方法，所述方法包括以下步骤：

- 10 (a) 从患者获取细胞样品，和
- (b) 确定与正常细胞相比，所述细胞样品是否过量表达 BP1。

本发明也包括乳腺癌的筛选和诊断方法，所述方法包括以下步骤：

- 15 (a) 从患者获取细胞样品，和
- (b) 确定与正常细胞相比，所述细胞样品是否过量表达 BP1。

在所述检测白血病和乳腺癌的方法，可以通过用反转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)检测编码 BP1 的 mRNA，或通过用免疫组织化学检测来检测 BP1 自身，确定 BP1 的过量表达。

20 本发明还包括从编码 BP1 的 mRNA 的 cDNA 底物扩增单一 DNA 分子的 PCR 引物。这类 PCR 引物可以容易地得自 SEQ ID NO: 1 的 DNA 序列。本文所用的术语“单一 DNA 分子”是指具有足够特异性来确定扩增的底物来源于 SEQ ID NO: 1 序列的 DNA。

25 本发明还包括抗 BP1 的多克隆抗体和单克隆抗体。可以如下所述，通过用 BP1 或其抗原性片段免疫哺乳动物，以诱导产生含有多克隆抗体的血清，获得多克隆抗体。抗 BP1 的单克隆抗体可以采用杂交瘤技术获得，杂交瘤技术通常还包括以下步骤：从免疫后的哺乳动物分离脾细胞，将其与骨髓瘤细胞融合，然后鉴定分泌与 BP1 结合的抗体的融合细胞。

本发明还包括阻抑 β -珠蛋白基因的方法，所述方法包括给予有效

量的 BP1。

以下进一步表征本发明的这些方面。首先，表明 BP1 cDNA 的克隆及其在瞬时共转染测定中的过量表达引起与 β -珠蛋白基因的或者沉默子 I 或者沉默子 II 连接的报道基因的阻抑。这提供了 BP1 是一种 β -珠蛋白基因的阻抑蛋白的证据。测序揭示了编码 BP1 的 DNA 含有一个同源框，使得将所述 DNA 置于相互调节并且也调节不相关基因的一个保守基因家族中(参见例如 Jaynes, J. B. P. H.和 O'Farrell. 1988. 结合一个共同位点的含同源域蛋白对转录的激活和阻抑。Nature 336: 744-749 和其中的参考文献; Levine, M.和 T. Hoey. 1988. 作为序列特异性转录因子的同源框蛋白。Cell 55: 537-540。)。序列比较表明，编码 BP1 的 DNA 属于同源框基因的 Distal-less 家族，该家族在早期发育期间表达(参见例如 Cohen, S. M.和 G. Jurgens. 1989. 果蝇属 (*Drosophila*)中的近端-远端模式形成：在肢体发育中细胞对于 Distal-less 基因活性的自发需求。EMBO J 8: 2045-2055; Cohen, S. M., G. Bronner, F. Kuttner, G. Jurgens 和 H. Jackle. 1989. 在果蝇属中 Distal-less 编码肢体发育所需的一种同源域蛋白。Nature 338: 432-434; Dolle, P., M. Price 和 D. Duboule. 1992. 在面部、眼部和肢体发育期间鼠 Dlx-1 同源框基因的表达。Differentiation 49: 93-99; Robinson, G. W. 和 K. Mahon. 1994. Dlx-2 和 Dlx-3 的分化和重叠表达结构域提示 Distal-less 同源框基因在颅面发育中的独特作用。Mech. Dev. 48: 199-215; Simeone, A., D. Acampora, M. Pannese, M. D'Esposito, A. Stornaiuolo, M. Gulisano, A. Mallamaci, K. Kastury, T. Druck 和 K. Huebner. 1994. 脊椎动物 Dlx 基因家族两个成员的克隆和特征鉴定。Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2250-54; 和 Stock, D. W., D. L. Ellies, Z. Zhao, M. Ekker, F. H. Ruddle 和 K. M. Weiss. 1996. 脊椎动物 Dlx 家族的进化。Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 10858-10863。)。编码 BP1 的 DNA 的表达是高度局限性的，这是发育上重要的基因的特征。

克隆和表征 BP1

材料和方法:

克隆 BP1: 用一种寡核苷酸探针筛选 λ gt11 K562 细胞 cDNA 表达文库(Clontech, Inc.), 所述寡核苷酸探针含有位于沉默子 II DNA 中的 BP1 结合部位, 这包括 β -珠蛋白基因上游-336 bp 和-278 bp 之间的序列。如已描述的方法(参见例如 **Vinson, C. R., K. L. LaMarco, P. F. Johnson, W. H. Landschulz 和 S. L. McKnight. 1988.** 由一种重组噬菌体特化的序列特异性 DNA 结合活性的原位检测。Genes & Devel. 2: 801-806), 其中对其进行几处修改, 进行筛选。滤膜在含有 5% Carnation 的即溶奶粉的结合缓冲液(参见例如 **Berg P. E., D. M. Williams, R. -L. Qian, R. B. Cohen, S. X. Cao, M. Mittelman 和 A. N. Schechter. 1989.** 一种共同蛋白质与人类 β -珠蛋白基因 5' 的两个沉默子结合。Nucl. Acids Res. 17: 8833-8852)中, 于 4°C 预杂交 30 分钟, 然后在同一缓冲液中于 4°C 振摇杂交 2-12 小时。纯化阳性噬斑, 并经过另外三轮筛选。

电泳迁移率变动分析(EMSA): 结合反应包括加入结合缓冲液(10 mM Tris, pH 7.5, 50 mM NaCl, 5%甘油, 1 mM DTT, 1 μ l 1 mg/ml BSA, 1 μ g poly (dI-dC))中的 500 pg 融合蛋白或 250 ng 核提取物和 5,000-10,000 cpm 32 P-dCTP 标记的探针。在室温下保温 30 分钟。按照 Dignam 等所述(**Dignam, J. D., R. M. Lebovitz 和 R. G. Roeder. 1983.** 在得自分离的哺乳动物细胞核的可溶性提取物中由 RNA 聚合酶 II 引起的准确转录起始。Nucl. Acids Res. 11: 1475-1489)制备核提取物。按照已描述的方法(参见例如 **Cowell, I. G. 和 H. C. Hurst. 199.** 从 cDNA 表达文库克隆转录因子, 载于 D. S. Latchman (编著), Transcription factors: a practical approach. 第 120-122 页, IRL Press, New York)制备得自溶原体的蛋白质提取物。将竞争者与核提取物一起预保温 20 分钟, 然后加入所述探针。用于 EMSA 分析的探针和竞争者的寡核苷酸序列示于下面。

名称	序列
-530 参比	TGTATATATACACATATATATATATATATTTTTTTTT CTTTTCTTACCAGAAGGTTT (SEQ ID NO: 3)
-530 Indian	TGTACATATACACATATATATATATATATA TTTTTTCTTTTCTTACCAGAAGGTTT (SEQ ID NO: 4)
-300 β	TTCTTATTTGTGTAATAAGAAAATTGGGAAAACG ATCTTCAATATGCTTACCAAGCTG (SEQ ID NO: 5)
-530 δ	TTCTTTTAA TGGATATTTATTTCAATATAAT AAAAAATTAGAGTTT (SEQ ID NO: 6)
非特异性	TGCATATATATGTATATGTATGTGTGTATA (SEQ ID NO: 7)

5 质粒的构建: 为了构建表达 BP1 cDNA 可读框的质粒, 通过 RT-PCR 从 K562 细胞 mRNA 扩增 BP1 cDNA。将所得的 1000 bp 产物克隆到 pGEM7 载体(Promega, Inc.)中, 并且通过测序确证其身份。该质粒用 *Hind* III 和 *Xba* I 切割, 以释放 BP1 ORF, 将其定向克隆到 pRc/RSV (Invitrogen, Inc.)中。

10 转染和 CAT 测定: 用 DMR1E-C 试剂(Gibco-BRL, Inc.), 在 K562 细胞中进行瞬时转染测定。让细胞生长至 5×10^5 细胞/ml 的密度, 每个转染反应使用总共 2×10^6 细胞。使用 OPTI-MEM 无血清培养基 (Gibco-BRL, Inc.), 在 6 个孔板中进行转染。在加入总共 8 μ g 的质粒 DNA 和 鲑精 DNA, 在室温下与 1 ml OPTI-MEM I 减少血清培养基 (Gibco-BRL, Inc.)中的 16 μ l DMR1E-C 试剂络合 15-45 分钟。每孔加入 0.2 ml 无血清培养基中的 2×10^6 细胞, 将孔板于 37 $^{\circ}$ C 孵育 4-5 小时。

15 加入 2 ml 生长培养基, 在 48 小时后收获细胞。如已描述的方法(参见例如 Berg P. E., D. M. Williams, R. -L. Qian, R. B. Cohen, S. X. Cao, M. Mittelman 和 A. N. Schechter. 1989. 一种共同蛋白质与人类 β -珠蛋白基因 5'的两个沉默子结合。Nucl. Acids Res. 17: 8833-8852)进行 CAT 测定。

20 RNA 印迹分析: 用 RNeasy 试剂盒和 Oligotex 试剂盒(Qiagen, Inc.)

分离 RNA。每个泳道电泳 2 μg mRNA，然后通过毛细管作用将其转移至 Hybond N 滤膜(Amersham)上。用 Stratolinker (Stratagene)将 RNA 交联至滤膜上，用或者标准方法或者夹心法进行滤膜的杂交，这消除了背景(参见例如 Wu, S., Q. Lu 和 A. L. Kriz. 1995. RNA 印迹和 DNA 印迹的一步多夹心杂交。BioTechniques 18: 585-586。)。购买 RNA 斑点印迹(Clontech, Inc.); 所述印迹上加载的 RNA 的量已经由厂商相对于 8 种不同管家基因标准化，不需要将样品标准化。探针是一种 630 bp 的 DNA 片段，是通过 PCR 扩增克隆于 pBluescript 的 BP1 cDNA，随后用 *Eco* RI 消化释放缺乏同源框序列的部分 3' BP1 cDNA 而获得的。将其通过随机引发进行标记，然后于 65 $^{\circ}\text{C}$ 杂交过夜。洗涤印迹并且对 X 光胶片曝光。

RT-PCR: 用 TRIzol 试剂(GIBCO BRL)，按照厂商的说明分离总 RNA。用 SuperScript II RT (GIBCO BRL)，在 20 μl 的总反应体积中对 1 微克 RNA 进行反转录。在分别由 16.8 μl 蒸馏水、2.5 μl 10 \times PCR 缓冲液(200 mM Tris-HCl [pH 8.4], 500 mM KCl)、1.5 μl 25 mM MgCl_2 、0.5 μl 10 mM dNTP 混合物(dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 10 mM)、0.2 μl (1 单位) Ampli-Taq DNA 聚合酶(Perkin Elmer)以及 10 μM β 肌动蛋白或 BP1 正向引物和反向引物各 1 μl 构成的 25 μl 总反应体积中，用 1 μl 反转录产物进行 PCR。根据线性测定结果，对于 BP1 使用以下 PCR 条件。每个 PCR 循环如下组成：一个变性步骤(94 $^{\circ}\text{C}$ ，1 分钟)、一个退火步骤(58 $^{\circ}\text{C}$ ，1 分钟)和一个延伸步骤(72 $^{\circ}\text{C}$ ，1.5 分钟)，进行 27 个循环，然后是一个额外的延伸(72 $^{\circ}\text{C}$ ，5 分钟)。设计扩增一种 581 bp 产物的引物是：正向：

5'-CACCTCCTGTCTTACCCCTACACC-3' SEQ ID NO:8; 反向：
5'-GCCCTTCCCCAGATTCACATCATC-3' SEQ ID NO:9。PCR 产物在 2%琼脂糖凝胶上电泳，用溴化乙锭显现。该产物通过用限制性酶切割并且与内部探针杂交来确证。

或者，可以用以下引物：正向 5'-GTATGGCCACCTCCTGTCTT-

3' (SEQ ID NO:10)和反向: 5'-GAGTAGATGGTCCTCGGCTT-3' (SEQ ID NO: 11), 在以下条件下获得一种 225 bp 的产物: 94°C 2 分钟; 然后 94°C 1 分钟、62°C 1 分钟和 72°C 1.5 分钟, 30 个循环; 72°C 10 分钟。

5 BP1 cDNA 的克隆:

用一种含有-300 bp BP1 结合部位的多聚化寡核苷酸, 探测由人 K562 细胞制备的 λ gt11 cDNA 表达文库。筛选两百万个噬斑, 分离出一个阳性噬斑, 该噬斑表达一种识别-300 bp BP1 结合部位、但不识别阴性对照序列的蛋白质。

- 10 为了确证该 cDNA 编码具有 BP1 的预期结合特异性(即与 β -珠蛋白基因上游的沉默子 I 和 II 结合并且与 δ -珠蛋白基因上游-530 bp 的序列结合的能力(参见例如 Berg, P. E., S. Abhyankar 和 M. Chase. 1994. 高速泳动族蛋白 HMG-I (Y)与人类 β -珠蛋白基因上游的一个沉默子 DNA 序列结合。Blood 84 增刊 1: 262a))的蛋白质, 进行 EMSA 竞争
- 15 测定。如上所述, 从一种 λ 溶原体表达与 β -半乳糖苷酶融合的推定的 BP1 蛋白。将这种融合蛋白部分纯化, 与用于筛选该文库的沉默子 II 探针一起温育, 产生单一的变动的条带, 如箭头所示(图 2, 第 1 泳道)。顶部的条带标记所述孔的位置, 而底部的条带含有未变动的探针。加入 100 倍和 200 倍摩尔过量的冷竞争者, 以测定特异性。变动的条带
- 20 受到自身 DNA (未标记的-300 结合部位, 第 2-3 泳道)、含有或者参比序列(野生型)或者印度单倍型序列的沉默子 I 中-530 bp 的 BP1 结合部位(第 6-9 泳道)和 δ -珠蛋白基因上游发现的 BP1 结合部位(第 10-11 泳道)的竞争, 而不与非特异性 DNA 竞争(第 4-5 泳道)。注意: 所述印度序列是优于所述参比序列的竞争者, 表明 BP1 与印度序列的结合更为紧密, 正如先前用 K562 核提取物观察到的(参见例如 Elion, J., P. E. Berg,
- 25 C. Lapoumeroulie, G. Trabuchet, M. Mittelman, R. Krishnamoorthy, A. N. Schechter 和 D. Labie. 1992. β -珠蛋白基因 5' 的负控制区中 DNA 序列的变异与 β^s 突变的表型表达相关。Blood 79: 787-792。)。阴性对

照 - 纯 β 半乳糖苷酶蛋白没有表现出对所述探针的结合活性(数据未显示)。EMSA 分析因此证明: 所述融合蛋白的结合特性符合预期的 BP1 的特性。

5 所得 BP1 cDNA 的长度为 630 bp。当在含 K562 RNA 的 RNA 印迹中用该序列的部分作为探针时, 识别一条 2.1 kb 的 RNA 条带(图 3A)。这一结果表明: 克隆了不完整的 cDNA。为了延伸所述 cDNA 序列, 使用 cDNA 末端的快速扩增(RACE)。获得 5'方向和 3'方向的额外序列, 得到 1366 bp 的 cDNA。随后的微调产生 SEQ ID NO:1 (和图 4) 的 1251 bp 序列。此外, 获得了预测的可读框(ORF)。

10 使用 BLAST 的计算机分析表明, BP1 含有一个同源框(HB), 这将其分类为已知在发育中重要的一个基因家族中。已经定义了几个同源框基因的亚家族。根据与这些基因的同源框的序列同源性, BP1 是 Distal-less (Dlx)家族的一员。在图 4 中, 同源框以下划线标注, 并且也指示在同源域(参见例如 Pabo, C. O.和 R. T. Sauer. 1992. 转录因子: DNA 识别的结构家族和原理。Annu. Rev. Biochem. 61: 1053-1095。) 15 中发现包含三个预测 α 螺旋的氨基酸。第二个和第三个螺旋包含螺旋-转角-螺旋(HTH)基序, 这是同源域的特征。根据与 Kozak 共有序列(参见例如 Kozak, M. 1987. 得自 699 种脊椎动物信使 RNA 的 5'非编码序列的分析。Nucl. Acids Res. 15: 8125-8148)的同源性, 确定了一个推定的翻译起始位点。显示了可读框(ORF)及其预测的氨基酸序列。 20

瞬时转染测定:

为了检查所克隆的 BP1 ORF 的功能, 进行瞬时转染测定。将上述可读框(ORF)亚克隆, 以构建 pRSV/BP1-ORF。用增加量的或者空载体 25 或者 pRSV/BP1-ORF 与靶质粒一起瞬时共转染 K562 细胞(图 5A 和 5B)。靶 DNA 由克隆到一种表达载体中的沉默子 I (p ϵ CAT/SI)或沉默子 II (p ϵ CAT/SII)构成, 所述表达载体含有与 CAT 报道基因融合的 ϵ -珠蛋白启动子。(最初将该质粒用于确定沉默子 I 和 II 的实验中(参见例

如 Berg P. E., D. M. Williams, R. -L. Qian, R. B. Cohen, S. X. Cao, M. Mittelman 和 A. N. Schechter. 1989. 一种共同蛋白质与人类 β -珠蛋白基因 5'的两个沉默子结合。Nucl. Acids Res. 17: 8833-8852)。将 CAT 活性对共转染的内部标准 pCMV/ β gal 标准化。相对 CAT 活性以接受 pRSV/BP1-ORF 的细胞中的 CAT 活性与仅接受空载体的细胞的 CAT 活性之比来计算。当将增加量的 pRSV/BP1-ORF DNA 加入 p ϵ CAT/SI 时(图 5A), CAT 活性以依赖于剂量的方式受到阻抑, 平台始于 3 μ g pRSV/BP1-ORF。同样, 在 p ϵ CAT/SII 中增加 pRSV/BP1-ORF DNA 的加入, 引起 CAT 报道基因的阻抑增加(图 5B), 但加入最低量 1 μ g 时, 引起 CAT 表达的急剧降低。对照 - 缺乏沉默子 DNA 的 ϵ CAT 质粒对于 pRSV/BP1-ORF 的加入无反应(数据未显示)。因此, 表明 BP1 对 β -珠蛋白基因的两个沉默子均表现出阻抑蛋白活性。

BP1 的表达分析:

进行 RNA 分析, 以确定人类组织和细胞系中 BP1 表达的模式。在胎盘中, BP1 探针识别三个条带: 2.1 kb、2.6 kb 和 3.2 kb (图 3A)。也探测了胎儿组织的 RNA 印迹, 结果示于图 3B 中。在胎肾和胎肺中有表达(第 1 和 3 泳道), 为 2.1 kb 和 6.3 kb 的条带, 而在胎肝或胎脑中 没有检测到表达(第 2 和 4 泳道)。2.1 kb 的条带可能对应于 BP1, 因为它是从中克隆 BP1 的 K562 细胞中的唯一一条带。其它条带可以代表其它的同种型, 通常与同源框基因相关(参见例如 Cohen, S. M.和 G. Jurgens. 1989. 果蝇属(*Drosophila*)中的近端-远端模式形成: 在肢体发育中细胞对于 Distal-less 基因活性的自发需求。EMBO J 8: 2045-2055; Lowney, P., J. Corral, M. M. LeBean, L. Deaven, H. J. Lawrence 和 C. Largman. 1991. 一种人类 Hox1 同源框基因在人类造血细胞中表现出可变转录物的骨髓特异性表达。Nucl. Acids Res. 19: 3443-3449 和 O'Connor, M. B., R. Binari, L. A. Perkins 和 W. Bender. 1988. 得自双胸复合体的超双胸域的可变 RNA 产物。EMBO J 7: 435-445。)。

5 为了分析各种各样组织中的表达,探测了含有得自 50 种组织的正常人类 RNA 的斑点印迹(以下表 1)。在胎盘和肾中观察到强表达,而在脑皮质、脾、乳腺、小肠、肺、胎肺和胎肾(后两者存在于图 3B 的 RNA 印迹上和 RNA 斑点印迹上)中观察到弱表达。得自另外 41 种组织的 RNA 没有表现出表达。

表 1 BP1 的组织特异性表达

强	弱	阴性	阴性
胎盘	脑皮质	全脑	甲状腺
肾	脾	扁桃体	唾液腺
	乳腺	尾状核	垂体腺
	小肠		气管
	肺	小脑	外周淋巴细胞
	胎肺	海马	淋巴结
	胎肾	额叶	骨髓
		延髓	阑尾
		枕叶	丘脑
		豆状核	肝
		黑质	脊髓
			胎脾
		颞叶	胎胸腺
		底丘脑核	胎脑
		胸腺	胎心
		心脏	胎肝
		主动脉	
		骨骼肌	
		结肠	
		膀胱	
		子宫	
		前列腺	
		胃	
		睾丸	
		卵巢	
		胰	
		肾上腺	

迄今为止, 已经描述了在正常血细胞生成发育(hematopoietic development)期间和白血病细胞系中通常以谱系特异性方式表达的、属于HOX家族的25种人类同源框基因(参见例如 Lawrence, H. J.和 C. Largman. 1992. 正常血细胞生成和白血病中的同源框基因。Blood 80: 2445-2453)。因此, 通过RT-PCR检查红细胞类谱系和骨髓谱系细胞系中BP1的表达(图6)。在类红细胞K562和HEL细胞以及单核细胞THP-1和U937细胞中观察到最强表达, 而在巨核细胞MEG-01和单核细胞/粒细胞HL60中观察到较低的表达。虽然该实验中所用的细胞系通常用于检查造血谱系的基因表达, 但应该注意到, 它们来源于白血病。

如上所述, BP1表现出阻抑蛋白的功能。使用增加量的含有所述ORF的质粒, 引起对含有沉默子I或II DNA的靶 ϵ CAT报道基因的阻抑增加。所述报道基因的表达没有被完全消除, 据信是由于对于其它低丰度阻抑蛋白结合的可能需要所致。一种这样的蛋白质是BP2, 它也与沉默子II DNA结合, 看来具有阻抑蛋白功能(Berg P. E., D. M. Williams, R. -L. Qian, R. B. Cohen, S. X. Cao, M. Mittelman 和 A. N. Schechter. 1989. 一种共同蛋白质与人类 β -珠蛋白基因5'的两个沉默子结合。Nucl. Acids Res. 17: 8833-8852和Ebb, D., D. C. Tang, L. Drew, K. Chin, P. E. Berg 和 G. P. Rodgers. 1998. 阻抑成体 β -样珠蛋白基因的调节元件的鉴定。Blood Cells, Mol., Dis. 24: 356-369。)。沉默子II功能需要完整的BP1结合部位的数据和事实(参见例如Ebb, D., D. C. Tang, L. Drew, K. Chin, P. E. Berg 和 G. P. Rodgers. 1998. 阻抑成体 β -样珠蛋白基因的调节元件的鉴定。Blood Cells, Mol., Dis. 24: 356-369。)表明, BP1最可能是一种 β -珠蛋白基因的阻抑蛋白。因此, 它是被克隆的第一个 β -珠蛋白阻抑蛋白。

BP1是一种同源框基因, 也是Distal-less家族的成员(参见例如Cohen, S. M., G. Bronner, F. Kuttner, G. Jurgens 和 H. Jackle. 1989在果蝇属中Distal-less编码肢体发育所需的一种同源域蛋白。Nature 338: 432-434。)。同源框基因被认为是发育期间的主调节基因, 因为

在突变时,发生大量的形态异常。Distal-less 基因发现于如小鼠、非洲蟾蜍属(*Xenopus*)、斑马鱼和人类的多种多样的生物中(参见例如 Stock, D. W., D. L. Ellies, Z. Zhao, M. Ekker, F. H. Ruddle 和 K. M. Weiss. 1996. 脊椎动物 Dlx 家族的进化。Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 10858-10863)。在果蝇属中,幼虫头部和胸部感觉器官的正常发育需要 Distal-less (称为 D11)。在幼虫和成体果蝇中, D11 在肢体远端区发育中起重要作用(参见例如 Cohen, S. M.和 G. Jurgens. 1989. 果蝇属 (*Drosophila*)中的近端-远端模式形成: 在肢体发育中细胞对于 Distal-less 基因活性的自发需求。EMBO J 8: 2045-2055 和 Cohen, S. M., G. Bronner, F. Kuttner, G. Jurgens 和 H. Jackle. 1989. 在果蝇属中 *Distal-less* 编码肢体发育所需的一种同源域蛋白。Nature 338: 432-434。)。在果蝇属中有一个 D11 基因,但在其它生物中有多个 Distal-less 基因。在哺乳动物中,迄今已经鉴定出 7 个 Distal-less (在哺乳动物中称为 Dlx)基因。在鼠类发育期间, Dlx 基因在鳃弓、前脑、肢体、眼、牙齿、骨和面间充质中表达(参见例如 Dolle, P., M. Price 和 D. Duboule. 1992. 在面部、眼部和肢体发育期间鼠 Dlx-1 同源框基因的表达。Differentiation 49: 93-99, Robinson, G. W.和 K. Mahon. 1994. Dlx-2 和 Dlx-3 的分化和重叠表达结构域提示 Distal-less 同源框基因在颅面发育中的独特作用。Mech. Dev. 48: 199-215 和 Simeone, A., D. Acampora, M. Pannese, M. D'Esposito, A. Stornaiuolo, M. Gulisano, A. Mallamaci, K. Kastury, T. Druck 和 K. Huebner. 1994. 脊椎动物 Dlx 基因家族两个成员的克隆和特征鉴定。Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2250-54)。

BP1 和最近发现的两个人类基因 DLX7 (参见例如 Nakamura S., D. W. Stock, K. L. Wydner, J. A. Bollekens, K. Takeshita, B. M. Nagai, S. Chiba, T. Kitamura, T. M. Freeland, Z. Zhao, J. Minowada, J. B. Lawrence, K. B. Weiss 和 F. H. Ruddle. 1996. 一种新的哺乳动物 Distal-less 基因: Dlx-7 的基因组分析。Genomics 38: 314-324)和 DLX4

(先前称为 *Dlx8*; 参见例如 **Quinn, L. M., B. V. Johnson, J. Nicholl, G. R. Sutherland 和 B. Kalionis.** 1997. 从人类胎盘中分离和鉴定包括 *Distal-less* 家族新成员 *DLX4* 在内的同源框基因。 *Gene* **187**: 55-61)看来是同种型, 因为其同源框相同, 并且它们表现出多个扩大的同源性区。在原位杂交中使用荧光, 将 BP1 作图至染色体 17q21-23, 这也是 *DLX7* 和 *DLX4* 的基因座。此外, BP1 和 *DLX7* (参见例如 **Nakamura S., D. W. Stock, K. L. Wydner, J. A. Bollekens, K. Takeshita, B. M. Nagai, S. Chiba, T. Kitamura, T. M. Freeland, Z. Zhao, J. Minowada, J. B. Lawrence, K. B. Weiss 和 F. H. Ruddle.** 1996. 一种新的哺乳动物 *Distal-less* 基因: *Dlx-7* 的基因组分析。 *Genomics* **38**: 314-324 和 **Price, J. A., D. W. Bowden, J. T. Wright, M. J. Pettenati 和 T. C. Hart.** 1998. *Dlx3* 中一个与 *tricho-dento-osseous (TDO)* 综合征有关的突变的鉴定。 *Hum. Mol. Gen.* **7**: 563-569)从 BP1 的核苷酸 565-1250 享有完全的序列同一性, 虽然在 nt 565 更远的上游没有同源性。BP1 和 *DLX4* 之间的序列同源性也始于 BP1 的 nt 565, 并且包括该同源框。尚不了解 *DLX7* 和 *DLX4* 的功能。然而, 在 K562 细胞中 *DLX7* 表达的消除引起细胞凋亡(参见例如 **Shimamoto, T., S. Nakamura, J. Bollekens, F. H. Ruddle 和 K. Takeshita.** 1997. 对 *Dlx-7* 同源框基因的抑制引起 *GATA-1* 和 *c-myc* 基因表达的减少以及引起细胞凋亡。 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 3245-3249)。初步数据提示, 在 K562 细胞中缺乏 BP1 引起细胞凋亡。

BP1 的一个突出的特征是其局限性表达。BP1 mRNA 在胎盘和肾中表达最强(表 1 和图 3)。虽然在所述探针中没有同源框序列, 但与 *DLX7* 有部分序列同源性。因此, 采用 BP1 特异性引物, 通过 RT-PCR 评价 BP1 在胎盘和骨髓中的表达; 观察到正确大小的一个条带。表现出弱杂交的 7 种组织可能正在表达 BP1 和/或 *DLX7*。

41 种组织缺乏 BP1 的表达。如果 BP1 阻抑成体珠蛋白基因的表达, 则在胎肝和胎脾中没有 BP1 mRNA 似乎出乎意料。然而, 这两种

组织均得自24周的胎儿,此时 β -珠蛋白表达已经开始(参见例如 **Ley, T. J., K. A. Maloney, J. I. Gordon 和 A. L. Schwartz.** 1989. 人类红细胞类胎肝细胞中珠蛋白基因的表达。J. Clin. Invest. **83**: 1032-1038, **Mavilio, F., A. Giampaolo, A. Care, G. Migliaccio, M. Calandrini, G. Russo, G. L. Pagliardi, G. Mastroberardino, M. Marinucci 和 C. Peschle.** 1983. 人类血红蛋白开关的分子机制: 珠蛋白基因在胚胎、胎儿和成体成红细胞中的选择性甲基化不足和表达。Proc. Nat. Acad. Sci. USA **80**: 6907-6911, 和 **Papayannopoulou, T., T.H. Shepard 和 G. Stamatoyannopoulos.** 1983. 使用抗 γ -珠蛋白和抗 β -珠蛋白链荧光抗体研究人类早期胎儿的类红细胞中血红蛋白表达。载于: G. Stamatoyannopoulos 和 A. W. Nienhuis (编著), *Globin Gene Expression and Hematopoietic Differentiation*. 第 421-430 页, Alan R. Liss, New York)。为了进一步检查这一点,对4个10周胎肝样品进行RT-PCR。甚至到10周时, β -珠蛋白的转录就已经开始了(参见例如 **Ley, T. J., K. A. Maloney, J. I. Gordon 和 A. L. Schwartz.** 1989. 人类红细胞类胎肝细胞中珠蛋白基因的表达。J. Clin. Invest. **83**: 1032-1038),使用30个循环的扩增样品,没有检测到BP1的表达;使用35个循环时,在所述四个样品的每个样品中观察到可检测的正确大小的条带。因此,在胎肝中BP1的量非常低;没有得到卵黄囊组织以更好地追踪其表达模式。

至少25种HOX基因(这是最大的人类同源框基因家族)在血细胞生成发育期间通常以谱系特异性方式表达(有关综述参见 **Lawrence, H. J. 和 C. Largman.** 1992. 正常血细胞生成和白血病中的同源框基因。Blood **80**: 2445-2453。)。然而,尚不了解这些基因的功能。BP1被鉴定为 β -珠蛋白基因的调节物,使其成为第一个在血细胞生成中具有已知功能的人类同源框基因。

除上文讨论的沉默子I和沉默子II结合部位外,已经鉴定出可能受BP1调节的其它潜在的基因靶。进行序列分析,以鉴定与已知的BP1

结合部位具有至少 75%同源性的 DNA 序列。在 γ -珠蛋白基因上游鉴定出三个位点。这些位点位于 γ -珠蛋白基因上游-1427 bp 和-1091 bp 以及 A γ -珠蛋白基因上游-1091 bp。使用电泳迁移率变动分析,表明这些位点是 BP1 蛋白的结合部位。

5

多克隆抗体的产生、免疫沉淀和蛋白质印迹分析

在兔子中产生针对独特 N 末端 BP1 肽 SYPYTEPANPGDSYLSLSCQQ (SEQ ID NO:13)的多克隆抗体(Research Genetics)。用 A 蛋白 Sepharose 珠(Biorad)对新鲜制备的 K562 细胞蛋白裂解液进行免疫沉淀。用等量的 K562 蛋白裂解液、免疫沉淀的裂解液和冷的体外转录/翻译蛋白产物,通过 12.5% SDS-PAGE 凝胶进行分析。将所述蛋白质电泳转移至硝化纤维素膜上。BP1 抗体在 PBS 中稀释(1:2500),并且将其加入,于室温达 2 小时,然后加入抗兔第二抗体。用 ECL 试剂盒,按照建议的方案(Amersham Pharmacia Biotech),完成所述信号的检测。

10
15

含反义 BP1 DNA 的质粒的构建

如下将 239 bp (nt 219-558)的 BP1 DNA 片段以反义方向克隆到载体 pMT 中,置于绵羊金属硫蛋白启动子控制之下。用扩增所述 BP1 cDNA 的 nt 219 和 nt 1231 之间的 DNA 的引物,进行 RT-PCR。将该片段制成平端,克隆到 pGEM7 中。利用 pGEM7 的多接头中的一个 5' BamHI 位点和位于 nt 558 (在 BP1 内部)的一个 Xho I 位点,从该载体释放 BP1 DNA。将这种 239 bp 的 BP1 片段以反义反向定向克隆到 pMT 中。(参见例如 Canelles, M., Delgado, M. D., Hyland, K. M. Lerga, A., Richard, C., Dang, C.V.和 Leon, J. (1997) 在人类骨髓细胞中 Max 和抑制性 cMyc 突变体诱导红细胞类分化和对细胞凋亡的抗性。Oncogene 14, 1315-1327。)。

20
25

镰状细胞贫血的治疗

β -珠蛋白基因的第六个密码子中的一个突变导致镰状细胞贫血。目前对于镰状细胞贫血的疗法集中于对胎儿血红蛋白基因的重激活。这样的疗法可以包括基因治疗，这可以用来或者置换 β -珠蛋白基因，
5 或者加入经工程改造以过量表达胎儿珠蛋白的胎儿珠蛋白基因。然而，这些疗法由于存在缺陷型镰状细胞 β 蛋白而受到阻碍，缺陷型镰状细胞 β 蛋白干扰正常血红蛋白的形成。

如上所述，在 β -珠蛋白基因上游有两个沉默子区，有两种蛋白质 BP1 和 BP2 与它们结合(参见例如 **Berg P. E., D. M. Williams, R. -L. Qian, R. B. Cohen, S. X. Cao, M. Mittelman 和 A. N. Schechter. 1989.** 一种共同蛋白质与人类 β -珠蛋白基因 5' 的两个沉默子结合。Nucl. Acids Res. 17: 8833-8852)。BP1 在位于相对于加帽位点(+1)的-530 bp 与沉默子 I 结合和于-300 bp 与沉默子 II 结合，而 BP2 于-270 bp 与沉默子 II 结合，如图 1 所示。有趣的是，发现一种构筑蛋白 - 高速泳动族蛋白 I (HMG-I (Y))，与沉默子 I 中 BP1 结合部位或其附近的 DNA 结合并且使其弯曲，但不与沉默子 II 中 BP1 结合部位或其附近的 DNA 结合(参见例如 **Chase, M. B., S. Haga, W. D. Hankins, D. M. Williams, Z. Bi, J.W. Strovel, C. Obriecht 和 P. E. Berg. 1999.** HMG-I (Y)的结合引发人类 β -珠蛋白基因的一个沉默子中的结构变化。Am. J. Hem. 60: 27-35)。HMG-I (Y)可能促进 BP1 和其它可能的阻抑蛋白在该区中的结合。沉默子 II 中 BP1 位点的突变部分缓解阻抑(参见例如 **Ebb, D., D. C. Tang, L. Drew, K. Chin, P. E. Berg 和 G. P. Rodgers. 1998.** 阻抑成体 β -样珠蛋白基因的调节元件的鉴定。Blood Cells, Mol., Dis. 24: 356-369)，提示 BP1 可能作为 β -珠蛋白基因的阻抑蛋白起作用。此外，BP1
15 结合于另一成体珠蛋白基因 δ -珠蛋白基因上游的负调节区中(参见例如 **Berg, P. E., S. Abhyankar 和 M. Chase. 1994.** 高速泳动族蛋白 HMG-I (Y)与人类 β -珠蛋白基因上游的一个沉默子 DNA 序列结合。Blood 84 增刊 1: 262a)。本发明人认为，BP1 协同调节成体珠蛋白基因的表达。
20
25

BP1 蛋白可能直接参与发育期间从胎儿血红蛋白至成体血红蛋白的开关,因为它与胎儿 γ -珠蛋白基因附近的 DNA 结合,也与成体 δ -珠蛋白基因和 β -珠蛋白基因附近的 DNA 结合。实验已经证明,BP1 结合活性在胎儿珠蛋白基因的药理学重激活时增强。

5 由于认为 BP1 激活胎儿基因,而阻抑成体基因,故可以潜在地将其用来治疗镰状细胞贫血,作为涉及加入正常 β 基因或 γ 基因的治疗的一种替代方法。

已经观察到在 BP1 的结合亲和力和镰状细胞贫血(SCA)严重程度之间的负相关(参见例如 Elion, J., P. E. Berg, C. Lapoumeroulie, G. Trabuchet, M. Mittelman, R. Krishnamoorthy, A. N. Schechter 和 D. Labie. 1992. β -珠蛋白基因 5' 的负控制区中 DNA 序列的变异与 β^s 突变的表型表达相关。Blood 79: 787-792。)。在镰状细胞贫血中,突变的 β -珠蛋白基因(β^s)与 5 种限制单倍型绝对地连锁不平衡(参见例如 Kulozik, A. E., J. S. Wainscoat, G. R. Serjeant, B. D. Kar, B. Al-Awamy, G. J. F. Essan, A. G. Falusi, S. K. Haque, A. M. Hilali, S. Kate, W. A. E. P. Ranasinghe 和 D. J. Weatherall. 1986. β^s -珠蛋白基因单倍型的地理研究: 镰状细胞突变独立的亚洲起源的证据。Am. J. Hum. Genet. 39: 239-244; Lapoumeroulie, C., O. Dunda, G. Trabuchet, M. Mony-Lobe, D. Labie, J. Elion 和 R. Krishnamoorthy. 1989. 再一种非洲起源的新型镰状基因: 喀麦隆型。Blood 74: 225a 和 Pagnier, J., J. G. Mears, O. Dunda-Belkhodja, K. E. Schaefer-Rego, C. Beldjord, R. L. Nagel 和 D. Labie. 1984. 非洲血红蛋白 S 基因多中心起源的证据。Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1771-1773。)。在所述单倍型中镰状细胞贫血的临床严重程度有差异,印度-阿拉伯型(Indian-Arabo) (下文称为印度单倍型)是最轻的,而班图型(Bantu)最为严重(参见例如 Ali, S. A. 1970. 与异常高水平胎儿血红蛋白相关的科威特阿拉伯人中镰状细胞病的较轻度变异体。Br. J. Haematol. 19: 613-619 和 Perrine, R. P., M. E. Pembrey, S. Perrine 和 F. Shoup. 1978. 沙特阿拉伯人中镰状细胞贫血

的自然史。对 270 位受治疗者的研究。Ann. Internal. Med. **88**: 1-6)。BP1 的-530 bp 结合部位中的序列多态性也与这 5 种 SCA 单倍型连锁不平衡(参见例如 Chebloune, Y., J. Pagnier, G. Trabuchet, C. Faure, G. Verdier, D. Labie 和 V. M. Nigon. 1988. 非洲镰状细胞贫血患者中 β -珠蛋白基因 5' 侧翼区的结构分析: 非洲镰状细胞突变三种起源的进一步的证据。Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**: 4431-4435)。

使用电泳迁移率变动竞争分析, 发现 BP1 与印度单倍型序列结合的紧密程度 5-6 倍于与正常序列或参比序列的结合(参见例如 Berg, P. E., M. Mittelman, J. Elion, D. Labie 和 A. N. Schechter. 1991. 与 β -珠蛋白合成降低相关的与人类 β -珠蛋白基因的-530 突变的蛋白结合增加。Am. J. Hematol. **36**: 42-47; Elion, J., P. E. Berg, C. Lapoumeroulie, G. Trabuchet, M. Mittelman, R. Krishnamoorthy, A. N. Schechter 和 D. Labie. 1992. β -珠蛋白基因 5' 的负控制区中 DNA 序列的变异与 β^s 突变的表型表达相关。Blood **79**: 787-792 和 Zeng, F.-y., G. P. Rodgers, S.-z. Huang, A. N. Schechter, M. Salamah, S. Perrine 和 P. E. Berg. 1994. 具有阿拉伯单倍型的镰状细胞贫血患者 β -珠蛋白基因的-530 区的序列。Human Mutation **3**: 163-165)。另一方面, BP1 与班图单倍型序列的结合比与参比序列的结合弱 1-2 倍(参见例如 Elion, J., P. E. Berg, C. Lapoumeroulie, G. Trabuchet, M. Mittelman, R. Krishnamoorthy, A. N. Schechter 和 D. Labie. 1992. β -珠蛋白基因 5' 的负控制区中 DNA 序列的变异与 β^s 突变的表型表达相关。Blood **79**: 787-792), 这可能使得 β^s 的转录更多, 导致血红蛋白 S 的浓度增加。这与在班图型中观察到的镰状细胞病的严重程度增加相关。

如上所述, BP1 是一种用于治疗镰状细胞贫血(SCA)的强有力的候选者。预期降低 β^s -珠蛋白的表达, 将降低 HbS 的胞内浓度, 进而降低 HbS 的胞内浓度和聚合物的形成, 后者据信是 SCA 临床效应的主要原因(参见例如 Schechter, A. N., C. T. Noguchi 和 G. P. Rodgers. 1987. 镰状细胞病。载于 G. Stamatoyannopoulos, A. W. Nienhuis, P.

Leder, Majerus, P. W. (编著), *The Molecular Basis of Blood Diseases*. 第 179-218 页, Saunders Philadelphia)。另外, 用阻抑蛋白例如 BP1 治疗, 也可以间接再激活胎儿珠蛋白基因。这一观点基于已很好建立的体内和体外观察, 所述观察证明胎儿珠蛋白基因和成体珠蛋白基因的交互调节。Dover 和 Boyer (参见例如 **Dover, G. J. 和 S. H. Boyer. 1987.** 含胎儿血红蛋白的细胞具有与无胎儿血红蛋白的细胞相同的普通颗粒血红蛋白: 正常研究对象和高胎儿血红蛋白产生的研究对象中的 γ -珠蛋白基因表达和 β -珠蛋白基因表达之间的交互关系。*Blood* **69**: 1109-1113) 证明, 交互调节存在于由于 SCA 而表达高水平 HbF 和低水平 HbA、

5 胎儿血红蛋白异型细胞遗传存留 (HPFH) 和 β 地中海贫血的个体中。Perrine 等(参见例如 **Perrine, S. P., B. A. Miller, M. F. Greene, R. A. Cohen, N. Cook, C. Shackleton 和 D. V. Faller. 1987.** 丁酸类似物增加新生儿红细胞类祖细胞中的 γ -珠蛋白基因的表达。*Biochem. Biophys. Res. Comm.* **148**: 694-700) 表明, 在糖尿病母亲的婴儿血浆中以高水平存在的两种因子 α -氨基-正丁酸和胰岛素增加 γ -珠蛋白的表达, 并且伴随有 β -珠蛋白表达的降低。此外, 培养的得自 β 地中海贫血患者和 SCA 患者的红细胞类祖细胞, 当用丁酸钠、丁酸 4-苯酯或乙酸苯酯处理时, 表现出 γ -珠蛋白表达增加和 β -珠蛋白表达的交互降低(参见例如 **Fibach, E., P. Prasanna, G. P. Rodgers 和 D. Samid. 1993.** 得自正常供体以及

10 得自镰状细胞贫血患者和 β 地中海贫血患者的红细胞类前体中由乙酸苯酯和丁酸 4-苯酯引起的胎儿血红蛋白产生增强。*Blood* **82**: 2203-2209 和 **Perrine, S. P., B. A. Miller, D. V. Faller, R. A. Cohen, E. P. Vichinsky, D. Hurst, B. H. Lubin 和 T. Papayannopoulou. 1989.** 丁酸钠增强 HbSS 和 β 地中海贫血患者红细胞类祖细胞中的胎儿珠蛋白基因

15 表达。*Blood* **74**: 454-459)。由于目前 SCA 的治疗集中于对胎儿珠蛋白基因的化学再激活, 因此对 HbS 的阻抑可能降低或消除对这类化学药品的需要。

作为镰状细胞贫血的一个疗法, 优选方法是将编码 BP1 的 DNA

加入可以通过基因治疗给予患者的载体中，所述载体最好靶向表达珠蛋白基因的组织。为了避免由于BP1过量表达引起的潜在问题，可以将所述DNA与可控制型启动子连接。

5 白血病的筛选

急性髓细胞白血病(AML)是第二种最常见的儿童白血病，并且是最常见的成人白血病(参见例如 **Pui C-H.** 儿童白血病。 *New Eng J Med* 1995; **332**: 1618-1630 和 **Karp JE.** 急性白血病: 作为治疗靶的细胞存活机制。 *Int J Oncol* 1997; **11**: 657-674。)。在AML中存活率低，在儿童中存活率仅30-40%，而在成人中存活率为10-35%。另一方面，急性淋巴细胞白血病(ALL)是最常见的儿童白血病，但在成人中罕见。虽然几种分子标记与AML和ALL相关(参见例如 **Look AT.** 人类急性白血病中的癌基因转录因子。 *Science* 1997; **278**: 1059-1064; **Tenen DG,** **Hromas R,** **Licht JD,** **Zhang D-E.** 转录因子、正常骨髓发育和白血病。 *Blood* 1997; **90**: 489-491; 和 **Lawrence HJ,** **Sauvageau G,** **Humphries RK,** **Largman C.** HOX同源框基因在正常血细胞生成和白血病血细胞生成中的作用。 *Stem Cells* 1996; **14**: 281-291)，显然需要鉴定可能有助于诊断和确定适当疗法、和/或潜在用作治疗靶的其它标记。

包括同源框基因(HB)在内的转录因子表达的改变与急性白血病相关，已经描述了白血病细胞系和原代白血病未成熟细胞(blast)中同源框基因的异常表达。同源框基因的特征为编码DNA结合结构域的保守的180 bp DNA序列(参见例如 **Levine M.** **Hoey T.** 作为序列特异性转录因子的同源框蛋白。 *Cell* 1988; **55**: 537-540)。它们是“主调节基因”，对于各种各样生物的自然发育极为重要。最近的研究已经证明，HB基因也在血细胞生成期间表达(参见例如 **Lawrence HJ,** **Sauvageau G,** **Humphries RK,** **Largman C.** HOX同源框基因在正常血细胞生成和白血病血细胞生成中的作用。 *Stem Cells* 1996; **14**: 281-291)。有几个家族的HB基因，它们根据其同源框中特别的序列保守来限定。最大的家

族由人类中 39 个成员组成, 称为 HOX。

某些白血病异常地将同源框基因表达为融合蛋白(关于综述参见 Look AT. 人类急性白血病中的癌基因转录因子。 *Science* 1997; **278**: 1059-1064)。在这些情况下, 将得自一个基因的编码激活结构域的 DNA 与编码另一基因的 DNA 结合区的 DNA 融合, 给新蛋白产物带来一种不同的功能。已经确定了与 AML 或 ALL 相关的融合基因的下游靶。例如, 在前 B 细胞成淋巴细胞白血病中, HB 基因 Pbx1 与 E2A 融合(参见例如 Lu Q, Wright DD, Kamps MP. 在携带 t(1;19) 易位的人类白血病中与 E2A 的融合将 Pbx1 同源域蛋白转化为组成型转录激活蛋白。 *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 3938-3948), 而在急性髓细胞白血病(AML)中, HOXA9 与 NUP98-HOXA9 融合(参见例如 Borrow J, Shearman A.M., Stanton Jr. V.P., Becher R, Collins T, Williams AJ, Dube I, Katz F, Kwong YL, Morris C, Ohyashiki K, Toyama K, Rowley J, Housman DE. 急性髓细胞白血病中 t(7;11)(p15;p15) 易位将核孔蛋白 NUP98 基因和 I 类同源异型蛋白 HOXA9 的基因融合。 *Nature Genetics* 1996; **12**: 159-167 和 Nakamura T, Yamazaki Y, Hatano Y, Miura I. 在具有染色体易位 t(1;11)(q23;p15) 的人类急性髓细胞白血病中 NUP98 与 PMX1 同源框基因融合。 *Blood* 1999; **94**: 741-747)。在不涉及明显的细胞遗传学改变的其它类型白血病中, 在早期造血祖细胞中一种通常沉默的基因或者被激活, 或者也许不被减量调节。在 T-ALL 或 B-ALL 中表达的 9 种 HOXB 基因中的四种中观察到这一点, 但在正常的 T 淋巴细胞或 B 淋巴细胞中没有观察到这一点(参见例如 Petrini M, Quaranta MT, Testa U, Samoggia P, Tritarelli E, Care A, Cianetti L, Valtieri M, Barletta C, Peschle C. 选定的人类 HOX 基因在 B/T 急性淋巴细胞白血病和白介素-2/白介素-1 β 刺激的天然杀伤淋巴细胞中的表达。 *Blood* 1992; **80**: 185-193)。

在得自成人和儿童急性髓细胞白血病(AML)、儿童急性 T 细胞淋巴细胞白血病(ALL)以及儿童前 B 细胞 ALL 的红髓细胞白血病细胞系

和淋巴细胞白血病细胞系和骨髓样品中，研究了BP1表达。因为BP1有两种明显的同种型，称为DLX7和Dlx4，所以测量它们在所述样品中的表达。所有三种都在类红细胞细胞系和单核细胞细胞系以及在至少一半的所述淋巴细胞系中共表达。它们在正常骨髓、PHA刺激的T细胞或B细胞中如果有的话，也是几乎检测不到的。在63%的AML病例中发现BP1 RNA，包括81%儿科病例和47%的成人病例，在32%的T-ALL病例中发现BP1 RNA，但在任何前B ALL病例中没有表达。用DLX7和Dlx4获得相似的结果，所有三种对在相当数量的白血病中共表达。该数据表明，BP1表达发生于早期祖细胞中。因此，在白血病未成熟细胞中BP1 RNA的存在是原始细胞的分子标记和/或可能表明BP1是癌基因途径中的一种重要的上游因子。

BP1是致白血病的假设得到本研究的支持，研究表明，BP1的过量表达引起细胞系K562中克隆发生增加，以及导致这些细胞经历红细胞分化的能力降低。BP1在红白血病细胞系K562中的过量表达导致在软琼脂中生长增加，这是致白血病潜力的一个指标。

认为BP1表达引起K562细胞中增殖和存活增加，而分化减少。当众所周知的两种已知癌基因c-myc和c-myb中任一种过量表达时，在K562细胞中发现相似的结果。因此，所述数据表明，BP1在AML和T细胞ALL病症中作为一种癌基因起作用。

以下更为详细地描述了为了测定BP1的表达而进行的研究：

材料和方法：

白血病细胞系的培养：让T-ALL细胞系和B-ALL细胞系在补充2 mM谷氨酰胺、100 U/ml青霉素、100 µg/ml链霉素、0.1 mM非必需氨基酸、1 mM丙酮酸钠和10%胎牛血清的RPMI 1640 (Gibco-BRL)中生长。红髓细胞细胞系在补充2 mM谷氨酰胺、100 U/ml青霉素 100 µg/ml链霉素、10 mM HEPES和10%胎牛血清的RPMI 1640中培养。

临床样品：从马里兰大学(the University of Maryland)的发育疾病脑

组织库(the Brain Tissue Bank for Developmental Disorders)获得正常骨髓(BM)。成人 AML 骨髓样品得自马里兰大学 Greenebaum Cancer Center and The Johns Hopkins Cancer Center Cytogenetics Core Laboratory。得自儿童 T-ALL 和 B-ALL 患者的骨髓样品得自 Pediatric Oncology Group (POG)。在当地机构从每位患者或监护人获得了书面同意(informed consent)。白血病样品含有至少 85%的未成熟细胞。通过对流淘析,然后用磁珠(Miltenyi Biotec, Auburn, CA)进行谱系特异性分离,获得来自正常供体外周血的 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞。

RT-PCR: 分离单核细胞以通过 Ficoll-Paque 进行 RNA 分析。用 TRIZOL 试剂(Gibco-BRL, Gaithersburg, MD), 从所有样品中提取总 RNA。对于反转录(RT)反应,将 1 微克 DNA 酶 I 处理的 RNA 加入 2.5 μ M 寡聚 d(T)引物(PE Biosystems)、10 U RNA 酶抑制剂(Gibco-BRL)、0.5 mM dNTPs 和 100 U MMLV 反转录酶(Promega)中。RT 反应在热循环仪中于 25 $^{\circ}$ C 进行 10 分钟,4 分钟斜线升温(ramp),42 $^{\circ}$ C 50 分钟和 99 $^{\circ}$ C 5 分钟。在该 PCR 反应中使用 1-2 微升该反应物。设计对于 BP1、DLX4 和 DLX7 特异性的引物,通过限制性酶分析证实所述 PCR 产物。已经进行对于每组引物的线性分析,并且因此调节了循环条件(数据未显示)。引物序列和 PCR 循环条件示于以下表 2 中。

表 2: PCR 引物

引物	序列	PCR 条件	产物	参考文献
BP1	上游: 5' CACCTCCTGTCTTAC CCCTACACC3' (SEQ ID NO: 8) 下游: 5' GCCCTTCCCCAGATT CACATCATC3' (SEQ ID NO: 9)	94°C/1 min.; 62°C/1 min.; 72°C/1.5 min. 30 个 循环	581 bp	
DLX7	上游: 5' CCTACACCGTGTGT GCTGC3' (SEQ ID NO: 14) 下游: 5' CTGTTGCCATAGCCA CTG3' (SEQ ID NO: 15)	94°C/1 min.; 60°C/1 min.; 72°C/1.5 min. 30 个 循环	406 bp	
DLX4	上游: 5' CACGGTGTGGCGGG GGAGACAT3' (SEQ ID NO: 16) 下游: 5' CTGCGGTGGGAGGT CGGAGTTC3' (SEQ ID NO: 17)	94°C/1 min.; 60°C/1 min.; 72°C/1.5 min. 30 个 循环	350 bp	
β-肌动 蛋白	上游: 5' GGATCTTCATGAGGT AGTCAGTC3' (SEQ ID NO: 18) 下游: 5' CCTCGCCTTTGCCGA TCC3' (SEQ ID NO: 19)	94°C/1 min.; 60°C/1 min.; 72°C/1.5 min. 20 个 循环	626 bp	Raff 等, 1996
c-myb	上游: 5' ATTAGGTAATGAATT GTAGCCAG3' (SEQ ID NO: 20) 下游: 5' ACTTAGAGTAATGCT TTTACTGA3' (SEQ ID NO: 21)	94°C/30 秒; 55°C/30 秒; 72°C/1 min. 28 个 循环	228 bp	Majello 等, 1986 Shimamoto 等, 1997
GATA-1	上游: 5' CCATTGCTCAACTGT ATGGAGGG3' (SEQ ID NO: 22) 下游: 5' ACTATTGGGGACAG GGAGTGATG3' (SEQ ID NO: 23)	94°C/30 秒; 58°C/30 秒; 72°C/1 min. 28 个 循环	249 bp	Tsai 等, 1989 Shimamoto 等, 1997
SCL	上游: 5' CAATCGAGTGAAGA GGAGACCTCC3' (SEQ ID NO: 24) 下游: 5' TTGCGGAGCTCGGC AAAGGC3' (SEQ ID NO: 25)	94°C/45 秒; 55°C/45 秒; 72°C/1.5 min. 30 个 循环	144 bp	Chen 等, 1990

半定量 RT-PCR: 对于每种产物特异性的寡核苷酸用 γ - ^{32}P -dATP 末端标记, 然后加入至所述 PCR 产物(2.5 μl)的 10%。在热循环仪中进行杂交(94 $^{\circ}\text{C}$ 15 秒; 42 $^{\circ}\text{C}$ 1 分钟)。杂交产物在 5%聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 将凝胶干燥, 然后对胶片曝光。将放射自显影图与凝胶对准, 切下条带, 然后经闪烁计数来定量。

表达通过对 β -肌动蛋白标准化, 以阴性(-)、阳性(+)或不明确(+/-)记录: 通过将代表 BP1、DLX7 或 DLX4 的条带的 cpm 除以得自同一样品的 β -肌动蛋白条带的 cpm, 计算比值。在每个 AML 实验中包括一个正常 BM 和一个缓解(remission) BM; BP1、DLX7 和 DLX4 的平均比值(每个 6 次重复)为 0.01, 将其作为指导, 针对所述指导, 样品记录为-(0.0-0.10)、+/- (0.11-0.15)、+(>0.15)或++(>0.45)。两种植物凝集素 (PHA)刺激的正常 T 细胞培养物是 T 细胞 ALL 的对照; 其平均比值(10 次重复)是 0.05; 用同一标准如上所述对 BP1、DLX7 和 DLX4 评分。*c-myb* 和 GATA-1 在正常 BM 中表达(我们的观察, 并且在以下文献中有记录: Gewirtz AM, Calabretta B. *c-myb* 反义寡脱氧核苷酸在体外抑制正常的人血细胞生成。 *Science* 1988; **242**: 1303-1306. Guerrasio A, Saglio G, Rosso C, Alfarano A, Camaschella C, Lo Coco F, Biondi A, Ranbaldi A, Nicolis S, Ottolenghi S. 人类髓细胞白血病细胞中 GATA-1 mRNA 的表达。 *Leukemia* 1994; **6**: 1034-1038)。BM 中 *c-myb* 和 GATA-1 的平均比值分别为 0.57 和 2.1。比值在 0.10 和 1.14 之间(*c-myb*)或 0.10 和 4.2(GATA-1)之间的样品记录为(+), 即在正常 BM 范围内, 而大于 1.14 (*c-myb*)或大于 4.2 (GATA-1)的比值记录为(++)。每个 RT-PCR 和杂交独立地进行两次。

CD34 细胞的分离: 按照 NIH 的 Institutional Review Board 批准的准则, 从同意的健康成人供体的髂后嵴抽取骨髓细胞。首先用 Histopaque-1077 密度梯度离心制备细胞。然后将单核细胞与 CD34 (QEnd10)缀合的磁微珠(AmCellCorp, Sunnyvale, CA)一起孵育, 通过 MACS 磁分离柱(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, 德国)加工, 以获

得纯化的 CD34⁺细胞。对于较高纯度的 CD34⁺细胞,使用第二轮柱分离。所分离的 CD34⁺细胞的纯度一般高于 90%,用碘化丙锭排除法评估的细胞生存力总是高于 95%。剩余的 CD34⁻细胞的纯度高于 95%。

5 过量表达 BP1 的细胞系的构建:通过 RT-PCR,用根据原始 cDNA 设计的引物,从 K562 细胞 RNA 扩增了含有完整可读框的 1013 bp 的 BP1 cDNA 片段。将该片段克隆到 pGEM7 中,对其测序,然后用 *Hind* III 和 *Xba* I 将其亚克隆到 pRC/RSV (Invitrogen)中。

统计学分析:用费歇耳恰当检定法,评价 BP1、DLX4 和 DLX7 表达之间相关的显著性。所报道的所有 p 值均为双侧的。

10

详细结果:

正常细胞中 BP1 的表达:在四个正常骨髓样品、一个得自缓解的 AML 患者的骨髓样品、以及得自正常骨髓的 5 个 PHA 刺激的 T 细胞和 5 个 B 细胞的制剂中,测定 BP1 的 RNA 水平。在对 6 个代表性样品的半定量 RT-PCR 分析后获得的结果示于图 8 中。在这些对照样品的任一个中, BP1 RNA 几乎不可见; DLX4 和 DLX7 的结果相似。在较长时间的放射自显影曝光后,几种所述同种型在所有 6 种样品中观察到一个模糊条带(数据未显示)。

15

细胞系中 BP1 的表达:在多种白血病细胞系中,通过 RT-PCR 检查 BP1 的表达。分析了 14 种淋巴起源的细胞系的 BP1 表达。BP1 RNA 存在于 8 种 T 细胞 ALL 细胞系中的 4 种中和 4 种淋巴瘤细胞系中的 3 种中(表 3)。

20

表 3: 造血细胞系中 BP1 的表达

<u>淋巴</u>	<u>BP1 表达</u>	<u>骨髓</u>	<u>BP1 表达</u>
B 细胞谱系		红细胞类	
正常	+/-	K562	+
ALL		HEL	+
REH	+	单核细胞	
RS4;11	+	THP-1	+
伯基特淋巴瘤		U937	+
Raji	-	巨核细胞	
Daudi	+	MEG-01	+/-
		单核细胞/粒细胞	
T 细胞谱系		HL60	+/-
正常	+/-		
ALL			
Jurkat	+		
MOLT-3	+		
MOLT-4	+		
MOLT-13	+		
CCRF-CEM	-		
HSB2	-		
MOLT-16	-		
RPMI 8402	-		
淋巴瘤			
HUT78	+		
Sup-T1	+		

也在 T 细胞 ALL 细胞系中测定 DLX7 和 DLX4 RNA 水平(图 7A), 在所述细胞系中所述三种同种型共表达。在 6 种骨髓细胞系中的 4 种(K562、HEL、THP-1 和 U937)中也容易检测到 BP1 mRNA, 在 MEG-01 和 HL60 细胞中的表达较低。¹ 对在那些细胞系中 DLX7 和 DLX4 的分析表明, BP1、DLX7 和 DLX4 通常共表达, 在 K562 和 U937 细胞中所有三种同种型的表达都最高(图 7B)。与在多样化髓细胞白血病细胞

系和淋巴白血病细胞系中发现的表达相比,在正常骨髓中任何所述同种型的表达都很少或没有表达(如上所述),这一事实使得我们用半定量 RT-PCR 检查了急性白血病患者骨髓中的 BP1、DLX7 和 DLX4 的相对表达。

5 急性髓细胞白血病中 BP1 的表达: 在儿童和成人 AML 患者中检查了 BP1 的表达。总共研究了 39 位 AML 患者,其中 18 位不足 18 岁(儿童; 病例 8-27), 21 位 18 岁或 18 岁以上(成人; 病例 29-49)。以下表 4 总结了对所述 AML 样品的分析和得到的每位患者的临床数据,包括细胞遗传学、表面标记的表达和对治疗的初始反应; 所有患者都没有得到结果数据, 因此将其排除在外。数据按照法国-美洲-英国
10 (French-American-British) (FAB) 标准分组。(参见例如 **Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick, HR, Sultan C.** French-American-British Cooperative Group 分类的修订标准。 *Ann Intern Med* 1985; **103**: 620-625)。表达水平的确定如材料和方法中所述。对于该分析, 用正常骨髓作为阴性基线, 将临床样品与其进行比较。分类为 +/- 的样品被排除在统计学分析之外。BP1 以确定的方式在 81% (13/16) 的儿童骨髓样品和 47% (9/19) 的成人病例中过量表达。DLX7 在 59% (10/17) 的儿科病例和 38% (6/16) 的成人病例中过量表达, 而 DLX4 在 79% (11/14) 的儿科病例和 79% (15/19) 的成人病例
15 中过量表达。表明在选定样品中表达的 RT-PCR 分析的一个实例示于图 9 中。这里, 患者 15 表现除最高水平的 BP1 和 DLX7 以及较低的 DLX4 表达。根据费歇耳恰当检测, BP1 和 DLX7 之间($p=0.0002$)、BP1 和 DLX4 之间($p=0.0016$)以及 DLX7 和 DLX4 之间($p=0.023$)的相关性具有统计学显著性。
20

25

表 4. BP1、DLX7 和 DLX4 的表达和 AML 患者中的临床生物学特征

FAB	患者	BP1	DLX7	DLX4	c-myc	GATA-1	CD34	CD33	CD13	核型	反应**
正常 B.M.		-	-	-	+	+					
M0	12*	++	+	+/-	++	+	-	+	+	ND	PR
	37	+/-	-	+	++	+	+	+	+	46,XY,t(1;15),inversy iq	NR
	47	-	-	-	ND	ND	+	+	+	47,XY,+13	NR
M1	15*	++	++	+	++	+	+	+	+	46,XY,t(11;9)(q23;p13.1)	CR
	17*	+/-	-	+/-	++	+	+	+	+	46,Y,tX;7(q13;p15),dup(12)(p11p13)	CR
	19*	-	-	-	++	+	+	+	+	46,XX	CR
	22*	++	++	++	+++	+	+	+	+	47,XX,+21	ND
	26*	+	+	+/-	+	+	+	+	+	45,XX	CR
	27*	-	-	+	+	+	+	+	+	46,XY	CR
	29	-	-	+	++	+	+	+	+	46,XY,de(5)(q31q34)	NR
	40	++	++	++	++	+/-	-	+	+	46,XY,t(1;12)	CTC
	45	+	+	+	ND	ND	-	+	+	46,XY,de(1)(q32),de(13)(q12-22)	CR
	M2	18*	-	-	-	+/-	+	+	+	+	47,XX,+8
20*		+	-	+	+	-	-	+	+	46,XY	CR
44		-	ND	+/-	ND	ND	+	+	+	46,XY	CR
45		-	-	-	ND	ND	+	+	-	45,X,-Y	CR (<6 mo.)
48		+	+/-	ND	ND	ND	+	+	+	47,XY,+8	NR
M3	41	+	+	++	+	+	-	+	+	46,XX,t(15;17)(q21;q12-21)	CR
M4	23*	+/-	-	-	+	-	+	+	+	46,XX,inv(16)(p13q22)	CR
	31	-	-	-	+	+	-	+	+	45,XY,-7	NR
	32	-	-	-	+	+	-	+	+	45,XX,-16	NR
	35	+	+/-	+	+	+	-	+	+	46,XX	NR
	49	-	-	+	ND	ND	+	+	+	46,XY,inv(16)(p13q22)	CR
M5	8*	+	+	+	++	-	-	+	-	46,XX,t(11;17)(q23;q25)	CR
	9*	+	+/-	+/-	+	-	-	+	-	ND	CR
	11*	+	+	+	++	-	-	+	+	46,XY	NR
	13*	+	+	+	++	+	-	+	-	46,XY,der(1)t(1;6)(q32;p21.1), add(11)(q23),der(22)t(1;22)(q23;q11.2)	CR
	14*	+	+	+	+	+	-	+	+	46,XX	CR
	16*	+	-	+	+	+	-	+	+	46,XX	NA
	30	-	+/-	+	+	-	-	+	+	47,XY,+3	NA
	33	-	-	+	+	+	+	+	+	46,XY	NR
	34	+	+	+	+	+	+	+	-	48,XX,add(4)(p15.1),de(5)(q21q33), t(7;12)(p10;q10),add(11)(q23),+t(12)(p10), add(16)(q11.2),-17,+18,-20, +der(21)t(17;21)(q10;q10),-mar	NR
	36	+	-	+	+	+	+	+	-	46,XY,de(7)(q22),+(8)(q24.3)	NR
	38	+/-	-	++	+	+	+	+	+	46,XX	CR
	39	-	+/-	++	+	+	+	+	+	48,XY,t(1;16),+7,+19	CTC
	42	+	+	+	-	-	13%	+	62%	47,XY,t(6;8)(q23;q34),+8	RD
43	+	+	+	ND	ND	-	+	+	46,XY,t(3;5)(q25;q34)	NR	
M7	21*	-	++	++	+++	+++	+	+	-	46,XY	CR
	24*	+	+	+	++	+	+	+	+	45,XY,t(3;3)(q21;q26),-7	NR

*年龄不足 18 岁
**完整反应(CR)、无反应(NR)、部分反应(PR)、完全肿瘤清楚(CTC)
残留的疾病(RD)、没有确定(ND)、未获得数据(NA)

5 对所述 AML 样品进行 GATA-1 和 c-myc、原始细胞标记的分析，以表明表达 BP1 的细胞的分化状态。据信 GATA-1 参与骨髓发育的正调节，并且被认为在早期祖细胞中表达，然后在骨髓(而不是在红细胞类)分化中被减量调节，使其在骨髓途径中的表达成为未成熟的征兆。(参见例如 Crotta S, Nicolis S, Ronchi A, Ottolenghi S, Ruzzi L,

- Shimada Y, Migliaccio AR.** 在GM依赖性和G-CSF依赖性骨髓细胞系中红细胞转录因子表达的渐进失活。 *Nucl Acids Res* 1990; **18**: 6863-6869)。这在特征为早期祖细胞扩充的急性白血病中检测到。(参见例如 **Guerrasio A, Saglio G. Rosso C, Alfarano A, Camaschella C, Lo**
- 5 **Coco F, Biondi A, Ranbaldi A, Nicolis S, Ottolenghi S.** 人类髓细胞白血病细胞中 GATA-1 mRNA 的表达。 *Leukemia* 1994; **6**: 1034-1038)。 *c-myb* 在未成熟造血细胞中表达, 其表达随细胞分化而降低。(参见例如 **Gewirtz AM, Calabretta B.** *c-myb* 反义寡脱氧核苷酸在体外抑制正常的人血细胞生成。 *Scienc* 1988; **242**: 1303-1306; **Gonda T, Metcalf D.**
- 10 鼠髓细胞白血病分化期间 *myb*、*myc* 和 *fos* 原癌基因的表达。 *Nature* 1984; **310**: 249-251 和 **Luscher B, Eisenman RN.** 对 *Myc* 和 *Myb* 的新见解。第二部分。 *Myb*。 *Genes & Devel* 1990; **4**: 2235-2241。)。由于 *c-myb* 和 GATA-1 在正常骨髓中表达(数据未显示)(参见例如 **Gewirtz AM, Calabretta B.** *c-myb* 反义寡脱氧核苷酸在体外抑制正常的人血细胞生
- 15 成。 *Science* 1988; **242**: 1303-1306 和 **Guerrasio A, Saglio G. Rosso C, Alfarano A, Camaschella C, Lo Coco F, Biondi A, Ranbaldi A, Nicolis S, Ottolenghi S.** 人类髓细胞白血病细胞中 GATA-1 mRNA 的表达。 *Leukemia* 1994; **6**: 1034-1038。)。对于表达正常细胞水平的 *c-myb* 的样品给出阳性的分类(有关细节参见上文)。发现每种 AML 样品表现出
- 20 *c-myb* 表达至少与正常骨髓相等, 并且 42% (13/31)表现出较高的表达。与成人病例相比, 较高比率的儿科病例表现出高水平的 *c-myb* 表达, 与成人中比例为 21%相比, 在儿童中的比例为 59%。在 77% (24/31) 的 AML 病例中存在 GATA-1, 在儿童中有 72%表达, 而在成人中有 85%表达。
- 25 DLX7 和 DLX4 与 BP1 共表达是惊人的: 84% BP1+样品是 DLX7+, 而 100% BP1+样品是 DLX4+。GATA-1 在 74%的所述样品中共表达, 所有都是 *c-myb* 阳性, 45%表现出高水平 *c-myb*。在该项研究中的另一参数是表面标记的分析。有趣的是, 64%的 BP1 阳性样品为

CD34 阳性, 73%是 CD13 阳性, 而 100%是 CD33 阳性。

在所述 39 位 AML 患者中, 2 位具有异常染色体 17q 臂, 这是 BP1 的基因座。(参见例如 **Fu S, Strovel JW, Haga SB, Stamberg J. Berg PE.** 一种新同源框基因 BP1 作图至其同种型 DLX7 附近以及它们在 β -珠蛋白基因阻抑中作用的特征鉴定。 *Am. J. Hum. Gen.* 1998; **63**: A181)。患有急性前髓细胞白血病的患者 41 表现出 t(15;17)易位, 所述易位推测涉及 17 号染色体上的视黄酸受体。(参见例如 **Look AT.** 人类急性白血病中的癌基因转录因子。 *Science* 1997; **278**: 1059-1064。)。患者 8 表现出 t(11; 17) (q23;q25)易位。该易位被鉴定为染色体 11q23 上的 MLL 基因融合到或者 AF17q25 基因上或者融合到 MSF 上, 后两者都位于 17q25 上, 并且相差一个碱基。(参见例如 **Baer MR, Stewart CC, Lawrence D, Arthur DC, Mrozek K, Strout MP, Davey FR, Schiffer CA, Bloomfield CD.** 带有 11q23 易位的急性髓细胞白血病: 经多参数流式细胞术分析的髓单核细胞免疫表型。 *Leukemia* 1998; **12**: 317-325; **Taki T, Ohnishi H, Shinohara K, Sako M, Bessho F, Yanagisawa M, Hayashi Y.** 在带有 t(11;17) (q23;q25)的急性髓细胞白血病中一种推定的 septin 家族基因 AF17q25 融合 MLL 基因。 *Cancer Res* 1999; **59**: 4261-4265 和 **Osaka M, Rowley JD, Zeleznik-Le NJ.** 带有 t(11;17) (q23;q25)的治疗相关的急性髓细胞白血病中 MLL 的一种融合配偶体基因 MSF (MLL septin 样融合)。 *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 6428-6433)。由于已知 MLL 基因激活几种 HOX 基因, (参见例如 **Yu BD, Hess JL, Horning SE, Brown GAJ, Korsmeyer S.** Mll 突变体小鼠中改变的 Hox 表达和区段同一性。 *Nature* 1995; **378**: 505-508)。人们可能很想推测在这种情况下该融合蛋白可能激活 BP1。

急性淋巴白血病中 BP1 的表达: 为了与骨髓谱系白血病相比, 检查了 19 个儿童 T 细胞 ALL 病例(表 5)。

表 5. T 细胞 ALL 儿童中 BP1、DLX7 和 DLX4 的表达

患者	BP1	DLX7	DLX4
1	-	-	-
2	-	+	-
3	-	+	-
4	+	-	-
5	+	+	+
6	-	-	-
7	-	+	+
8	-	-	-
9	-	-	-
10	+	+	+
11	-	nd	-
12	+	-	-
13	-	-	+
14	+	+	+
15	-	nd	nd
16	+	+	+
17	-	nd	nd
18	-	nd	nd
19	-	nd	nd

这里, 32% (6/19) 是 BP1 阳性。未获得这些患者的结果数据。DLX7 和 DLX4 的分析表明, 40% (6/15) 的病例是 DLX7 阳性, 40% (6/15) 的病例是 DLX4 阳性。所述三种同种型在 AML 和 T 细胞 ALL 中表达的比较示于图 10 中。

接着, 分析了 19 位前 B-ALL 儿童患者。在任何这些病例中都没有观察到可检测的 BP1, 虽然 β -肌动蛋白对照正常表达(数据未显示)。

CD34⁺和 CD34⁻细胞中的 BP1 表达: 为了更精确地检查正常骨髓中 BP1 表达非常低的原因以及确定 BP1 是否在早期祖细胞中表达, 测定了 CD34⁺和 CD34⁻细胞中的 BP1 表达。在 CD34⁻细胞的两个独立分

离物中有明显的表达(图 11, 第 2 和 3 泳道)。相比之下, CD34+骨髓的 3 个独立样品中几乎没有可检测的 BP1 mRNA (第 4、5 和 6 泳道)。在第 1 泳道显示了在 K562 细胞中的表达, 以用作比较, b-肌动蛋白作为加样对照测定。

5 过量表达 BP1 的 K562 细胞的克隆发生: 已经发现 K562 细胞中 BP1 的强制表达导致分化降低和克隆发生增加。用人类红白血病细胞系 K562 检查 BP1 异位表达对红细胞分化的影响。分离出 4 个过量表达 BP1 的独立的 K562 克隆, 将其与含有空载体的两个克隆相比。发现所有过量表达的细胞系都表现出经历红细胞分化的能力降低(数据
10 未显示)。

可以根据白血病细胞在 0.5%软琼脂中生长的能力, 测量被认为是致癌性度量的克隆发生。与对照相比, 3 个过量表达 BP1 的细胞系表现出平板接种的每 15,000 细胞能够在软琼脂中生长菌落数显著增加(以下表 6)。这些结果提示, BP1 的过量表达可能与 K562 细胞中致癌性增加相关, 并且可能提高增殖容量或细胞存活率。通过将 30 个菌落
15 合并, 以获得每个菌落的细胞平均数, 可以测定每个菌落的细胞平均数(增殖的指标)(表 6)。该数值在过量表达的细胞系中没有增加, 过量表达的细胞系和对照的增殖曲线相同(数据未显示), 使得有可能与 7a 和 7b 相比, 所述过量表达表现出存活率增加, 而不是增殖增加。综合
20 而言, 这些数据暗示, BP1 的表达可能使 K562 细胞靠牺牲分化而存活, 这是某些癌基因表现出的一个特征。

表 6. 过量表达 BP1 的 K562 细胞的克隆发生

平板接种 的细胞系	相对 BP1 表达	菌落/15,000	平均细胞数 /菌落
7a (对照)	1	23±15	4400
7b (对照)	1	21±7	1300
8a	21	517±108	2900
8c	12	924±199	5300
8d	5	223±34	5800
8e	7	57±18	2300

5 K562 细胞为 BCL-2 阴性、p53 阴性，并且含有 BCR-ABL 易位；在 K562 细胞中过量表达 BP1 的效应在该转化背景下发生。为此，使用被无限增殖化、但未被转化的 NIH 3T3 细胞(如果将其注射到小鼠体内，则它们不引起恶性肿瘤)。BP1 在那些细胞中的强制表达导致在软琼脂中生长增加，水平降低约 4 倍。过量表达 BP1 的 NIH 3T3 细胞也表现出转化灶形成增加约 4 倍。高 BP1 表达对 K562 细胞和 NIH 3T3 细胞效应的差异可能意味着在 K562 细胞中观察到的克隆发生增加约 10 倍需要其它的遗传改变。

讨论:

15 总之，在 81% 儿童 AML 患者的骨髓中检测到 BP1 的显著 RNA 表达，相比之下，在 47% 的成人患者检测到 BP1 的显著 RNA 表达。相反，在正常骨髓中 BP1 的表达不可重现。BP1 阳性的最高百分比发生在 FAB 分类 M5 (单核细胞) 中，其中 77% 的 AML 病例是 BP1 阳性；在该类中得自 100% 的儿童的骨髓细胞是 BP1 阳性。2 个剪接变异体 DLX7 和 DLX4 分别在 48% 和 79% 的 AML 患者中共表达。也在 19 例儿童 T 细胞 ALL 病例中评估了 BP1、DLX7 和 DLX4 水平。虽然表达的频率与 AML 相比较低，但 BP1 在 32% T 细胞 ALL 中过量表达，DLX7

在 50% T 细胞 ALL 中过量表达, 而 DLX4 在 40% T 细胞 ALL 中过量表达, 相比之下在正常的 PHA 刺激的 T 淋巴细胞中的表达弱或没有表达。与此形成鲜明对比的是, 在前 B ALL 中没有检测到 BP1 表达。虽然 BP1 在 T 细胞 ALL 中表达、而不在前 B ALL 中表达的原因尚不清楚, 但这种差异可以提供了一种有用的诊断性区别。

c-myb 在所有 AML 样品中表达, 其表达水平与正常骨髓相当或较高。c-myb 的表达与未成熟性相关, (参见例如 Gewirtz AM, Calabretta B. c-myb 反义寡脱氧核苷酸在体外抑制正常的人血细胞生成。 *Science* 1988; 242: 1303-1306; Gonda T, Metcalf D. 鼠髓细胞白血病分化期间 myb、myc 和 fos 原癌基因的表达。 *Nature* 1984; 310: 249-251 和 Luscher B, Eisenman RN. 对 Myc 和 Myb 的新见解。第二部分。Myb。 *Genes & Devel* 1990; 4: 2235-2241。), 因此在正常范围内的那些情况可以在早期祖细胞阶段受到阻滞。较高的 c-myb 表达可能是致白血病过程的一部分, 因为 c-myb 的激活在小鼠中引起白血病。(参见例如 Wolff L, Koller R, Bies J, Nazarov V, Hoffman B, Amanullah A, Krall M, Mock B. 鼠前单核细胞白血病中的反转录病毒插入诱变: c-myb 和 Mml1。 *Curr Topics Micro Immuno* 1996; 211: 191-199。)。在这一方面, 在高度表达 c-myb 并且可以评估 BP1 表达的 11 个样品中, 9 个样品是 BP1 阳性。关于 HOX 基因在恶性造血细胞系中的表达有相当多的数据。所述 HOX 基因在 4 个染色体上成簇存在, 而 DLX 基因成对地位于相同染色体上。(参见例如 Lawrence HJ, Sauvageau G, Humphries RK, Largman C. HOX 同源框基因在正常血细胞生成和白血病血细胞生成中的作用。 *Stem Cells* 1996; 14: 281-291 和 van Oostveen JW, Biji JJ, Raaphorst FM, Walbooners JJM, Meijer CJLM. 同源框基因在正常血细胞生成和血液学恶性肿瘤中的作用。 *Leukemia* 1999; 13:1675-1690; Nakamura S, Stock DW, Wydner KL, Bollekens JA, Takeshita K, Nagai BM, Chiba, Kitamura T, Freeland TM, Zhao Z, Minowada J, Lawrence JB, Weiss JB 和 Ruddle FH. 一种新的哺乳动物 Distal-less

基因: *Dlx-7* 的基因组分析。 *Genomics* 1996; **38**: 314-324; **Simeone, A., Acampora D, Pannese M, D'Esposito M, Stornaiuolo A, Gulisano M, Mallamaci A, Kastury K, Druck T 和 Huebner K.** 脊椎动物 *Dlx* 基因家族两个成员的克隆和特征鉴定。 *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 2250-2254。)。 *BP1* 位于 17 号染色体上 *HOXB* 簇的 3' 端。(参见例如 **Fu S, Strovel JW, Haga SB, Stamberg J. Berg PE.** 一种新同源框基因 *BP1* 作图至其同种型 *DLX7* 附近以及它们在 β -珠蛋白基因阻抑中作用的特征鉴定。 *Am. J. Hum. Gen.* 1998; **63**: A181。)。 *HOXB* 基因优先在包括 K562 和 HEL 细胞系在内的类红细胞中表达。(参见例如 **Lawrence HJ, Sauvageau G, Humphries RK, Largman C.** *HOX* 同源框基因在正常血细胞生成和白血病血细胞生成中的作用。 *Stem Cells* 1996; **14**: 281-291; **Shen W-F, Largman C, Lowney P, Corral JC, Detmer K, Hauser CA, Simonitch TA, Hack FM, Lawrence HJ.** 合同源框基因在人类造血细胞系中的谱系限制表达。 *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 8536-8540; **Magli CM, Barba, P, Celetti A, De Vita G, Cillo, C, Boncinelli E.** 在人类造血细胞中 *HOX* 基因的协同调节。 *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 6348-6352; 和 **Mathews CHE, Detmer K, Boncinelli E, Lawrence HJ, Largman C.** 人 *HOX2* 基因座的同源框基因的红细胞类限制表达。 *Blood* 1991; **78**: 2248-2252)。 据信在所述 *HOX* 簇中基因在骨髓细胞中以区段为单位被关闭或打开。(参见例如 38、40)。 本文所示的数据提示, *BP1* 可能是这种协同调节的一部分, 因为在红髓细胞细胞系中的其表达模式与相邻的 *HOXB* 基因相似。 *HOX* 基因的转录也在 AML、T-ALL 和前 B-ALL 中发现, 但与 *BP1* 不同, 它们在正常骨髓容易被检测到。(参见例如 **Petrini M, Quaranta MT, Testa U, Samoggia P, Tritarelli E, Care A, Cianetti L, Valtieri M, Barletta C, Peschle C.** 选定的人类 *HOX* 基因在 B/T 急性淋巴细胞白血病和白介素-2/白介素-1 β 刺激的天然杀伤淋巴细胞中的表达。 *Blood* 1992; **80**: 185-193; **Lawrence HJ, Sauvageau G, Ahmadi N, Lopez AR, LeBeau**

MM, Link M, Humphries K, Largman C. HOXA10 同源框基因在正常造血细胞和白血病造血细胞中的阶段特异性和谱系特异性表达。 *Exp Hem* 1995; 23: 1160-1166; Biji JJ, van Oostveen JW, Walboomers JMM, Brink ATP, Vos W, Ossenkoppele GJ, Meijer CJLM. HOXC4、HOXC5 和 HOXC6 在髓细胞白血病和正常骨髓细胞中的分化和细胞类型限制性表达。 *Leukemia* 1998; 12: 1724-1732; Kawagoe H, Humphries RK, Blair A, Sutherland HJ, Hogge DE. HOX 基因、HOX 辅因子和 MLL 在白血病和正常人造血细胞的表型和功能限定的亚群中的表达。 *Leukemia* 1999; 13: 687-698; Salvati PD, Ranford PR, Ford J, Kees UR. 在儿童急性成淋巴细胞白血病中 HOX11 的表达与 T 细胞表型相关。 *Oncogene* 1995; 11: 1333-1338)。值得注意的是, 在正常的造血分化期间, 而不是在 AML 中, HOX 基因的表达被减量调节。(参见例如 Kawagoe H, Humphries RK, Blair A, Sutherland HJ, Hogge DE. HOX 基因、HOX 辅因子和 MLL 在白血病和正常人造血细胞的表型和功能限定的亚群中的表达。 *Leukemia* 1999; 13: 687-698)。在急性白血病中 BP1 RNA 的表达可能代表白血病未成熟细胞分化阶段的一种标记, 和/或可能直接参与白血病生成。本文所示的数据指出了这种可能性: AML 中 BP1 的表达发生在早期祖细胞中: (i) 如上所述, 所有 BP1 阳性细胞也是 *c-myb* 阳性, 而 74% 为 GATA-1 阳性, 而 *c-myb* 和 GATA-1 为早期祖细胞的指示物。(参见例如 20、22-24)。(ii) 在正常骨髓中观察到几乎不可检测到 BP1 的表达与原始细胞中的表达相符, 原始细胞包括非常少的正常骨髓亚群。(iii) BP1 在髓细胞白血病和淋巴白血病中的过量表达说明白血病发生可能发生在干细胞或多能造血祖细胞中。(iv) 进一步支持这一观点的是下述的观察: 59% 的 BP1 阳性未成熟细胞发现于被认为是原始的并且与干细胞白血病相关的 FAB 类中, 即 M0 (分化最少的)、M5 (单核细胞) 或 M7 (巨核细胞)。(参见例如 Cuneo A, Mecucci C, Kerim S, Vandenberghe E, Dal Cin P, Van Orshoven A, Rodhain J, Bosly A, Michaux JL, Martiat P., Boogaerts M, Carli MG,

Castoldi G, Van Den Berghe H. 多能干细胞涉及成巨核细胞白血病: 15 位患者中的细胞学和细胞遗传学证据。 *Blood* 1989; 74: 1781-1790; Bonnet D, Dick JE. 人类急性白血病作为起源于原始造血细胞的等级结构组构。 *Nature Medicine* 1997; 3: 730-737; Venditti A, Del Poeta G, Buccisano F, Tamburini A, Cox MC, Stasi R, Bruno A, Aronica G, Maffei L, Suppo G, Simone MD, Forte L, Cordero V, Postorino M, Tuffili V, Isacchi G, Masi M, Papa G, Amadori S. 分化最少的急性髓细胞白血病(AML-M0): 具有其它法国-美洲-英国亚型的 25 例病例的比较。 *Blood* 1997; 89: 621-629)。 (v) 64%的 BP1 阳性病例是 CD34 阴性。 CD34+干细胞表达几种 HOX 基因, 这种表达在 CD34-细胞中被减量调节。(参见例如 van Oostveen JW, Biji JJ, Raaphorst FM, Walbooners JJM, Meijer CJLM. 同源框基因在正常血细胞生成和血液学恶性肿瘤中的作用。 *Leukemia* 1999; 13:1675-1690 和 Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, Hogge DE, Dragowska WH, Reid DS, largman C, Lawrence J, Humphries RK. 功能独特的人骨髓细胞 CD34+亚群中同源框基因的差异表达。 *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12223-12227。)。相反, BP1 在 CD34-细胞中表达, 而在 CD34+细胞中被减量调节。这些结果与 AML 样品中的数据(点 v)一致, 在 AML 样品中 BP1 主要发现于 CD34-细胞中。在 CD34+细胞中非常低的表达可能代表或者在少数 CD34+细胞表达, 或者所述 CD34+细胞污染有 CD34-细胞。最近的论文支持存在一个在小鼠和人类中均具有繁殖能力的原始 CD34- lin-干细胞亚群。(参见例如 49-51)。在小鼠中, CD34- lin-干细胞被激活时可以转变为 CD34+干细胞; 这尚未在人类中研究过。(参见例如 Goodell MA. CD34+或 CD34-: 它确实重要吗? *Blood* 1999; 94: 2545-2547 和 Sato T, Iaver JH, Ogawa M. 鼠造血干细胞可逆表达 CD34。 *Blood* 1999; 94: 2548-2554)。由于我们的 CD34-细胞既含有 lin+亚群, 也含有 lin-亚群, 因此尚不了解 BP1 是否在干细胞中表达。然而, 显然 BP1 在血细胞生成早期被激活。因此, 假设 BP1 的表达随

后在分化期间受到阻抑。这一观点得到以下观察的支持：在细胞系 MB-02 的红细胞分化期间 BP1 被减量调节。观察到过量表达 BP1 的稳定细胞系表现出克隆发生增加 45 倍，这支持 BP1 的可能的致癌作用。此外，在 AML 中的其高表达频率可能表明 BP1 是致癌途径中的一种上游因子。需要其它实验以描绘 BP1 在正常血细胞生成中的作用，以直接确定它是否在致瘤性转化中起作用，以及检查急性白血病中其表达的临床显著性。

鉴于上述 BP1 在白血病中表达增加的发现，一种筛选急性髓细胞白血病或急性淋巴细胞白血病的方法包括以下步骤：从患者获取细胞样品，和确定与正常细胞相比所述细胞样品中的细胞是否过量表达 BP1。通常，为了检查白血病，从例如骨髓或外周血的合适来源获取细胞样品。优选通过测定细胞样品中 BP1 RNA 水平或 BP1 蛋白水平，确定 BP1 是否过量表达。可以通过本领域已知的 RNA 测定，例如 RNA 印迹分析、狭线印迹分析和斑点印迹分析、RT-PCR 和原位杂交，测定 RNA 水平。例如，例如在上述典型实例中描述的反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)技术，可以用来测定细胞是否产生 BP1 RNA。具体地说，从样品细胞中分离 RNA，将其转录以获得反转录产物(cDNA)。然后用得自 SEQ ID NO: 1 的正向和反向 PCR 引物进行聚合酶链式反应。BP1 的合适 PCR 引物对包括例如 SEQ ID NO 8 和 9，它们扩增 581 bp 产物，还包括 SEQ ID NO 10 和 11，它们扩增 225 bp 产物。在任何合适的反应条件下进行聚合酶链式反应，以扩增 BP1 产物。例如，对于 SEQ ID NO 8 和 9 的引物而言，通常的反应条件包括一个变性步骤(94°C，1 分钟)、一个退火步骤(58°C，1 分钟)和一个延伸步骤(72°C，1.5 分钟)，进行 27 个循环，然后是一个额外的延伸(72°C，5 分钟)。对于 SEQ ID NO 10 和 11 的引物而言，通常的反应条件包括将样品保持在 94°C 2 分钟；然后进行 30 个循环：94°C 1 分钟、62°C 1 分钟 72°C 1.5 分钟；然后将样品在 72°C 保持 10 分钟。然后从样品中分离 PCR 产物，用常用方法例如电泳进行显现或定量。可以通过本领域已知的

蛋白质测定, 例如免疫组织化学测定, 直接测定 BP1 蛋白的水平。为了提供用于免疫测定的多克隆抗体或单克隆抗体, 可以使用本文公开的 BP1 DNA, 通过本领域已知的技术, 产生足够量的基本纯化的 BP1, 以用以接种哺乳动物, 来产生与 BP1 特异性结合的多克隆抗体或单克隆抗体。

5

白血病的治疗

降低 K562 白血病细胞中 BP1 的表达引起细胞凋亡。为了证明这一点, 构建了含有调节反义 BP1 表达的诱导型金属硫蛋白启动子的载体, 并且将其稳定地导入 K562 细胞中。研究了 4 种细胞系, 两种含有空载体的对照(9A 和 9B), 两种含有所述反义质粒(10B 和 10D)。加入 50 μM 的 CdSO_4 (一种金属硫蛋白启动子的诱导物)达 4 天, 以诱导反义 BP1 表达。通过锥虫篮测定, 反义 BP1 的诱导导致生存力丧失(图 12)。对照的生存力有一些损失, 但 10B 和 10D 的细胞死亡显著较高。这与此时 BP1 mRNA 大大减少有关。图 13 显示了经 RT-PCR 测定的在 50 μM CdSO_4 存在下与 10B 和 10D (反义, 分别为第 3 和 4 泳道)、对照 9A 和 9B (分别为第 1 和 2 泳道)的 BP1 mRNA 的表达。在 10B 和 10D 中, BP1 RNA 的表达几乎消失。为了确定生存力的丧失是否由细胞凋亡增加所致, 用膜连蛋白 V 评价了细胞, 记录为膜连蛋白 V 阳性、碘化丙锭阴性细胞; 含反义质粒的细胞的凋亡显著增加(数据未显示)。这些实验连同过量表达 BP1 的细胞看来表现出存活率增加的事实一起表明: 降低 BP1 的表达与细胞凋亡有关, 证实对 BP1 表达调节的强有力结果是 K562 细胞的细胞存活。

10

15

20

表 7. 诱导 BP1 反义 RNA 后 K562 细胞的凋亡百分比

细胞系	第 1 天	第 2 天	第 3 天
9A	9±1	7±3	13±3
9B	5±3	9±1	13±1
10B	6±1	15±2	53±4
10D	9±1	20±1	68±1

这些结果提示，白血病的一种可能的疗法可能是在患者体内诱导编码 BP1 的 DNA 的反义寡核苷酸，由此所述反义寡核苷酸阻断白血病细胞中 BP1 的表达，因此引起这些细胞凋亡。

5 也已经发现，BP1 的强制表达使得白血病细胞对一种用来治疗 AML 患者的药物阿糖胞苷(Ara C)的敏感性提高。用不同浓度的 ara C 攻击过量表达 BP1 的 K562 细胞系。用 50 μm ara C 攻击 4 天后，对照细胞的生存力为 82-86%，而过量表达 BP1 的细胞的生存力范围为 27-29%至 66%，即生存力至多降低 3 倍(数据未显示)。在 100 μm Ara C
10 下没有观察到所述数据的显著差异。在 30 分钟和 60 分钟的膜连蛋白 V 测定中，观察到生存力最低的细胞的凋亡细胞频率最高。因此，显然凋亡增加表明，具有强制 BP1 表达的细胞系表现出对 Ara C 的敏感性增加。

15 在治疗上可以利用上述发现，根据该患者的 BP1 表达水平将给予患者的 Ara C 的剂量优化。

乳腺癌的筛选和治疗

20 为了确定在乳腺癌细胞系中是否过量表达 BP1，本发明人进行了多项研究，以检测与正常乳腺组织相比 BP1 的过量表达。图 14 显示了用几种乳腺癌细胞系测定的 BP1 表达，所述细胞系包括乳腺癌系 MCF7 ADR、MDA468 和 T47D。在进一步的研究中，在乳腺癌细胞系中通过 RT-PCR 检查了 BP1 的表达(表 8)。

表 8. 乳腺癌细胞系中的 BP1 表达

细胞系	ER	PR	恶性	致瘤性 ⁺	BP1
Hs578T	-	-	腺管癌	否	+/-
MCF7	+	+	腺管癌	**	+
MCF7ADR	*		ADR 抗性	是	+++
MDA-MB-231	-	-	腺管癌	是	++
MDA-MB-435s	-	-	腺管癌	否	+
MDA-MB-468	-	-	腺管癌	是	++
T47D	+	+	腺管癌	NA	+++
MCF10A	+	+	正常	否	+/-

* 对雌二醇无应答

+ 得自美国典型培养物保藏中心的数据。NA, 未获得数据。

** 在不加入雌二醇时为非致瘤性。

5

在 BP1 表达和细胞系在小鼠中引起乳腺肿瘤的能力之间的相关性最为显著。有趣的是, 在阿霉素(ADR)抗性 MCF7 细胞系 - MCF7ADR 中观察到高 BP1 表达。尚不了解在 BP1 表达和 ADR 之间是否有任何关系。来源于正常乳腺上皮的细胞系 MCF10A 表现出几乎不可检测到 BP1 mRNA。

10

为了进一步证明 BP1 在乳腺癌中表达, 在冷冻乳腺肿瘤组织和周围正常组织中检查了 BP1 表达。总共分析了 15 个肿瘤组织(表 9)。BP1 在所有 12 例 ER 阴性病例中表达, 但仅在三个 ER 阳性病例中的一个中表达。这些数据表明 BP1 在高分类级别的 ER、PR 肿瘤组织中表达的倾向。

15

表 9. BP1 表达与乳腺癌中 ER 和 PR 状况的比较

	<u>BP1+</u>	<u>BP1-</u>
<u>ER+PR+</u>	1	2
<u>ER-PR-</u>	12	0

对于来自正常乳腺组织和恶性乳腺组织的代表性样品的 RT-PCR 分析示于图 15 中。正常组织以 N 表示，而肿瘤以 T 表示。所有肿瘤组织都表现出 ER-PR-。在第 1-4 泳道中，显示了肿瘤组织和相应的正常组织。没有观察到正常样品的表达，而 BP1 在所有肿瘤中均表达。已经分析了总共 6 个正常乳腺组织。其中 5 个是 BP1 阴性，一个表现出低 BP1 表达(数据未显示)。在第 5-7 泳道中显示了另外 3 个肿瘤组织。 β -肌动蛋白的表达证明 RNA 的完整性，用作每种样品的加样对照。

鉴于以上所述，对 BP1 过量表达的检测是一种乳腺癌的筛选工具。该筛选方法的实施方式与白血病的筛选方法相同，只是在本方法中，从乳腺组织获得细胞样品。

15 参考文献

Ali, S. A. 1970. 与异常高水平胎儿血红蛋白相关的科威特阿拉伯人中镰状细胞病的较轻度变异体。Br. J. Haematol. 19: 613-619.

Berg, P. E., S. Fu 和 S. Haga. 1998. 未发表的数据。

Berg, P. E., S. Abhyankar 和 M. Chase. 1994. 高速泳动族蛋白 HMG-I (Y)与人类 β -珠蛋白基因上游的一个沉默子 DNA 序列结合。Blood 84 增刊 1: 262a.

Berg, P. E.和 A. N. Schechter. 1992. 血红蛋白疾病的分子遗传学。载于 T. Friedmann (编著), Molecular Genetic Medicine. Academic Press, San Diego. .

25 Berg, P. E., M. Mittelman, J. Elion, D. Labie 和 A. N. Schechter.

1991. 与 β -珠蛋白合成降低相关的与人类 β -珠蛋白基因的-530 突变的蛋白结合增加。Am. J. Hematol. **36**: 42-47。

Berg P. E., D. M. Williams, R. -L. Qian, R. B. Cohen, S. X. Cao, M. Mittelman 和 A. N. Schechter. 1989. 一种共同蛋白质与人类 β -珠蛋白基因 5' 的两个沉默子结合。Nucl. Acids Res. **17**: 8833-8852。

Chase, M. B., S. Haga, W. D. Hankins, D. M. Williams, Z. Bi, J. W. Strovel, C. Obrieht 和 P. E. Berg. 1999. HMG-I (Y) 的结合引发人类 β -珠蛋白基因的一个沉默子中的结构变化。Am. J. Hem. **60**: 27-35。

10 **Chebloune, Y., J. Pagnier, G. Trabuchet, C. Faure, G. Verdier, D. Labie 和 V. M. Nigon.** 1988. 非洲镰状细胞贫血患者中 β -珠蛋白基因 5' 侧翼区的结构分析: 非洲镰状细胞突变三种起源的进一步的证据。Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**: 4431-4435。

15 **Cho, K. E. Y., J. Geotz, C. V. E. Wright, A. Fritz, A. Hardwicke 和 E. M. D. Roberts.** 1988. 非洲蟾蜍属同源框基因中同一读框的差别利用编码享有同一 DNA 结合特异性的两种相关蛋白质。EMBO J. **7**: 2139-2149。

20 **Cohen, S. M. 和 G. Jurgens.** 1989. 果蝇属(*Drosophila*) 中的近端-远端模式形成: 在肢体发育中细胞对于 Distal-less 基因活性的自发需求。EMBO J **8**: 2045-2055。

Cohen, S. M., G. Bronner, F. Kuttner, G. Jurgens 和 H. Jackle. 1989. 在果蝇属中 *Distal-less* 编码肢体发育所需的一种同源域蛋白。Nature **338**: 432-434。

25 **Cowell, I. G. 和 H. C. Hurst.** 199. 从 cDNA 表达文库克隆转录因子, 载于 D. S. Latchman (编著), Transcription factors: a practical approach. 第 120-122 页, IRL Press, New York。

Crossley, M. 和 S. H. Orkin. 1993. β -珠蛋白基因座的调节。Curr. Opin. Gen. Dev. **3**: 232-237。

Dignam, J. D., R. M. Lebovitz 和 R. G. Roeder. 1983. 在得自分离的哺乳动物细胞核的可溶性提取物中由 RNA 聚合酶 II 引起的准确转录起始。 *Nucl. Acids Res.* **11**: 1475-1489。

Dolle, P., M. Price 和 D. Duboule. 1992. 在面部、眼部和肢体发育期间鼠 *Dlx-1* 同源框基因的表达。 *Differentiation* **49**: 93-99。

Dover, G. J. 和 S. H. Boyer. 1987. 含胎儿血红蛋白的细胞具有与无胎儿血红蛋白的细胞相同的普通颗粒血红蛋白: 正常研究对象和高胎儿血红蛋白产生的研究对象中的 γ -珠蛋白基因表达和 β -珠蛋白基因表达之间的交互关系。 *Blood* **69**: 1109-1113。

Ebb, D., D. C. Tang, L. Drew, K. Chin, P. E. Berg 和 G. P. Rodgers. 1998. 阻抑成体 β -样珠蛋白基因的调节元件的鉴定。 *Blood Cells, Mol., Dis.* **24**: 356-369。

Elion, J., P. E. Berg, C. Lapoumeroulie, G. Trabuchet, M. Mittelman, R. Krishnamoorthy, A. N. Schechter 和 D. Labie. 1992. β -珠蛋白基因 5' 的负控制区中 DNA 序列的变异与 β^s 突变的表型表达相关。 *Blood* **79**: 787-792。

Fibach, E., P. Prasanna, G. P. Rodgers 和 D. Samid. 1993. 得自正常供体以及得自镰状细胞贫血患者和 β 地中海贫血患者的红细胞类前体中由乙酸苯酯和丁酸 4-苯酯引起的胎儿血红蛋白产生增强。 *Blood* **82**: 2203-2209。

Forrester, W. C., C. Thompson, J. T. Elder 和 Groudine, M. 1986. 人类 β -珠蛋白基因簇中发育稳定的染色质结构。 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 1359-1363。

Jaynes, J. B. P. H. 和 O'Farrell. 1988. 结合一个共同位点的含同源域蛋白对转录的激活和阻抑。 *Nature* **336**: 744-749。

Kozak, M. 1987. 得自 699 种脊椎动物信使 RNA 的 5' 非编码序列的分析。 *Nucl. Acids Res.* **15**: 8125-8148。

Kulozik, A. E., J. S. Wainscoat, G. R. Serjeant, B. D. Kar, B. Al-

- Awamy, G. J. F. Essan, A. G. Falusi, S. K. Haque, A. M. Hilali, S. Kate, W. A. E. P. Ranasinghe 和 D. J. Weatherall. 1986. β^s -珠蛋白基因单倍型的地理研究: 镰状细胞突变独立的亚洲起源的证据。Am. J. Hum. Genet. **39**: 239-244。
- 5 Lapoumeroulie, C., O. Dunda, G. Trabuchet, M. Mony-Lobe, D. Labie, J. Elion 和 R. Krishnamoorthy. 1989. 再一种非洲起源的新型镰状基因: 喀麦隆型。Blood **74**: 225a。
- Lawrence, H. J.和 C. Largman. 1992. 正常血细胞生成和白血病中的同源框基因。Blood **80**: 2445-2453。
- 10 Levine, M.和 T. Hoey. 1988. 作为序列特异性转录因子的同源框蛋白。Cell **55**: 537-540。
- Ley, T. J., K. A. Maloney, J. I. Gordon 和 A. L. Schwartz. 1989. 人类红细胞类胎肝细胞中珠蛋白基因的表达。J. Clin. Invest. **83**: 1032-1038。
- 15 Lowney, P., J. Corral, M. M. LeBean, L. Deaven, H. J. Lawrence 和 C. Largman. 1991. 一种人类 Hox1 同源框基因在人类造血细胞中表现出可变转录物的骨髓特异性表达。Nucl. Acids Res. **19**: 3443-3449。
- Mavilio, F., A. Giampaolo, A. Care, G. Migliaccio, M. Calandrini, G. Russo, G. L. Pagliardi, G. Mastroberardino, M. Marinucci 和 C. Peschle. 1983. 人类血红蛋白开关的分子机制: 珠蛋白基因在胚胎、胎儿和成体成红细胞中的选择性甲基化不足和表达。Proc. Nat. Acad. Sci. USA **80**: 6907-6911。
- 20 Nakamura S., D. W. Stock, K. L. Wydner, J. A. Bollekens, K. Takeshita, B. M. Nagai, S. Chiba, T. Kitamura, T. M. Freeland, Z. Zhao, J. Minowada, J. B. Lawrence, K. B. Weiss 和 F. H. Ruddle. 1996. 一种新的哺乳动物 Distal-less 基因: Dlx-7 的基因组分析。Genomics **38**: 314-324。
- 25 O'Connor, M. B., R. Binari, L. A. Perkins 和 W. Bender. 1988. 得

自双胸复合体的超双胸域的可变 RNA 产物。EMBO J 7: 435-445。

Pabo, C. O.和 R. T. Sauer. 1992. 转录因子: DNA 识别的结构家族和原理。Annu. Rev. Biochem. 61: 1053-1095。

Pagnier, J., J. G. Mears, O. Dunda-Belkhodja, K. E. Schaefer-Rego, C. Beldjord, R. L. Nagel 和 D. Labie. 1984. 非洲血红蛋白 S 基因多中心起源的证据。Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1771-1773。

Papayannopoulou, T., T.H. Shepard 和 G. Stamatoyannopoulos. 1983. 使用抗 γ -珠蛋白和抗 β -珠蛋白链荧光抗体研究人类早期胎儿的类红细胞中血红蛋白表达。载于: G. Stamatoyannopoulos 和 A. W. Nienhuis (编著), Globin Gene Expression and Hematopoietic Differentiation. 第 421-430 页, Alan R. Liss, New York。

Perrine, S. P., B. A. Miller, D. V. Faller, R. A. Cohen, E. P. Vichinsky, D. Hurst, B. H. Lubin 和 T. Papayannopoulou. 1989. 丁酸钠增强 HbSS 和 β 地中海贫血患者红细胞类祖细胞中的胎儿珠蛋白基因表达。Blood 74: 454-459。

Perrine, S. P., B. A. Miller, M. F. Greene, R. A. Cohen, N. Cook, C. Shackleton 和 D. V. Faller. 1987. 丁酸类似物增加新生儿红细胞类祖细胞中的 γ -珠蛋白基因的表达。Biochem. Biophys. Res. Comm. 148: 694-700。

Perrine, R. P., M. E. Pembrey, S. Perrine 和 F. Shoup. 1978. 沙特阿拉伯人中镰状细胞贫血的自然史。对 270 位受治疗者的研究。Ann. Internal. Med. 88: 1-6。

Price, J. A., D. W. Bowden, J. T. Wright, M. J. Pettenati 和 T. C. Hart. 1998. Dlx3 中一个与 tricho-dento-osseous (TDO) 综合征有关的突变的鉴定。Hum. Mol. Gen. 7: 563-569。

Quinn, L. M., B. V. Johnson, J. Nicholl, G. R. Sutherland 和 B. Kalionis. 1997. 从人类胎盘中分离和鉴定包括 Distal-less 家族新成员 DLX4 在内的同源框基因。Gene 187: 55-61。

Robinson, G. W.和 K. Mahon. 1994. Dlx-2 和 Dlx-3 的分化和重叠表达结构域提示 Distal-less 同源框基因在颅面发育中的独特作用。Mech. Dev. **48**: 199-215。

5 **Schechter, A. N., C. T. Noguchi 和 G. P. Rodgers.** 1987. 镰状细胞病。载于 G. Stamatoyannopoulos, A. W. Nienhuis, P. Leder, Majerus, P. W. (编著), The Molecular Basis of Blood Diseases. 第 179-218 页, Saunders Philadelphia。

10 **Shimamoto, T., S. Nakamura, J. Bollekens, F. H. Ruddle 和 K. Takeshita.** 1997. 对 Dlx-7 同源框基因的抑制引起 GATA-1 和 c-myc 基因表达的减少以及引起细胞凋亡。Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 3245-3249。

15 **Simeone, A., D. Acampora, M. Pannese, M. D'Esposito, A. Stornaiuolo, M. Gulisano, A. Mallamaci, K. Kastury, T. Druck 和 K. Huebner.** 1994. 脊椎动物 Dlx 基因家族两个成员的克隆和特征鉴定。Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 2250-54。

Stock, D. W., D. L. Ellies, Z. Zhao, M. Ekker, F. H. Ruddle 和 K. M. Weiss. 1996. 脊椎动物 Dlx 家族的进化。Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 10858-10863。

20 **Tuan, D., W. Soloman, Q. Li 和 I. M. London.** 1985. 人类类红细胞中的“ β -珠蛋白”基因结构域。Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**: 6384-6388。

Vinson, C. R., K. L. LaMarco, P. F. Johnson, W. H. Landschulz 和 S. L. McKnight. 1988. 由一种重组噬菌体特化的序列特异性 DNA 结合活性的原位检测。Genes & Devel. **2**: 801-806。

25 **Wu, S., Q. Lu 和 A. L. Kriz.** 1995. RNA 印迹和 DNA 印迹的一步多夹心杂交。BioTechniques **18**: 585-586。

Zeng, F.-y., G. P. Rodgers, S.-z. Huang, A. N. Schechter, M. Salamah, S. Perrine 和 P. E. Berg. 1994. 具有阿拉伯单倍型的镰状细

胞贫血患者 β -珠蛋白基因的-530 区的序列。 *Human Mutation* 3: 163-165。

Chase MB, Haga S, Fu S, Davenport G, Morgan D, Mah A, Berg PE. 一种新的同源域蛋白 BP1 阻抑人类 β -珠蛋白基因。已提交。

5 **Levine, M., Hoey T.** 作为序列特异性转录因子的同源框蛋白。 *Cell* 1988; **55**: 537-540。

van Oostveen JW, Biji JJ, Raaphorst FM, Walbooners JJM, Meijer CJLM. 同源框基因在正常血细胞生成和血液学恶性肿瘤中的作用。 *Leukemia* 1999; **13**:1675-1690。

10 **Look AT.** 人类急性白血病中的癌基因转录因子。 *Science* 1997; **278**: 1059-1064。

Lu Q, Wright DD, Kamps MP. 在携带 t(1;19)易位的人类白血病中与 E2A 的融合将 Pbx1 同源域蛋白转化为组成型转录激活蛋白。 *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 3938-3948。

15 **Nakamura T, Yamazaki Y, Hatano Y, Miura I.** 在具有染色体易位 t(1;11)(q23;p15)的人类急性髓细胞白血病中 NUP98 与 PMX1 同源框基因融合。 *Blood* 1999; **94**: 741-747。

Petrini M, Quaranta MT, Testa U, Samoggia P, Tritarelli E, Care A, Cianetti L, Valtieri M, Barletta C, Peschle C. 选定的人类 HOX 基因
20 在 B/T 急性淋巴细胞白血病和白介素-2/白介素-1 β 刺激的天然杀伤淋巴细胞中的表达。 *Blood* 1992; **80**: 185-193。

Hawley RG, Fong AZC, Reis MD Zhang N, Lu M, Hawley TS. HOX11/TCL3 同源框基因的转化功能。 *Cancer Res* 1997; **57**: 337-345。

Fu S, Strovel JW, Haga SB, Stamberg J. Berg PE. 一种新同源框
25 基因 BP1 作图至其同种型 DLX7 附近以及它们在 β -珠蛋白基因阻抑中作用的特征鉴定。 *Am. J. Hum. Gen.* 1998; **63**: A181。

Pui C-H. 儿童白血病。 *New Eng J Med* 1995; **332**: 1618-1630。

Karp-JE. 急性白血病: 作为治疗靶的细胞存活机制。 *Int J Oncol*

1997; **11**: 657-674。

Copelan EA, McGuire EA. 成人急性成淋巴细胞白血病的生物学
和治疗。 *Blood* 1995; **85**: 1151-1168。

Tenen DG, Hromas R, Licht JD, Zhang D-E. 转录因子、正常骨
髓发育和白血病。 *Blood* 1997; **90**: 489-491。

Gewirtz AM, Calabretta B. c-myb 反义寡脱氧核苷酸在体外抑制
正常的人血细胞生成。 *Science* 1988; **242**: 1303-1306。

**Guerrasio A, Saglio G, Rosso C, Alfarano A, Camaschella C, Lo
Coco F, Biondi A, Ranbaldi A, Nicolis S, Ottolenghi S.** 人类髓细胞白
血病细胞中 GATA-1 mRNA 的表达。 *Leukemia* 1994; **6**: 1034-1038。

**Crotta S, Nicolis S, Ronchi A, Ottolenghi S, Ruzzi L, Shimada Y,
Migliaccio AR.** 在 GM 依赖性和 G-CSF 依赖性骨髓细胞系中红细胞转
录因子表达的渐进失活。 *Nucl Acids Res* 1990; **18**: 6863-6869。

Gonda T, Metcalf D. 鼠髓细胞白血病分化期间 *myb*、*myc* 和 *fos*
原癌基因的表达。 *Nature* 1984; **310**: 249-251。

Luscher B, Eisenman RN. 对 Myc 和 Myb 的新见解。第二部分。
Myb。 *Genes & Devel* 1990; **4**: 2235-2241。

Raff T, van der Giet M, Endemann D, Wiederholt T, Paul M. 用
于 RT-PCR 的不共扩增加工假基因的 β -肌动蛋白引物的设计和测试。
Biotechniques 1997; **23**: 456-460。

Majello B, Kenyon LC, Dalla-Favera R. 人 c-myb 原癌基因：
cDNA 的核苷酸序列和基因组基因座的组构。 *Proc Natl Acad Sci* 1986;
83: 9636-9640。

**Tsai SF, Martin DIK, Zon LI, D'Andrea AD, Wong GG, Orkin
SH.** 通过在哺乳动物细胞中表达克隆类红细胞谱系主要 DNA 结合蛋
白的 cDNA。 *Nature* 1989; **339**: 446-451。

**Chen Q, Cheng J-T, Tsai L-H, Schneider N, Buchanan G, Carroll
A, Crist W, Ozanne B, Siciliano MJ, Baer R.** Tal 基因在 T 细胞白血病

中经历染色体易位并且优先编码一种螺旋-环-螺旋蛋白。*EMBO J* 1990; 9: 415-424。

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick, HR, Sultan C. French-American-British Cooperative Group 分类的提议的修订标准。*Ann Intern Med* 1985; 103: 620-625。

Baer MR, Stewart CC, Lawrence D, Arthur DC, Mrozek K, Strout MP, Davey FR, Schiffer CA, Bloomfield CD. 带有 11q23 易位的急性髓细胞白血病: 经多参数流式细胞术分析的髓单核细胞免疫表型。*Leukemia* 1998; 12: 317-325。

10 **Taki T, Ohnishi H, Shinohara K, Sako M, Bessho F, Yanagisawa M, Hayashi Y.** 在带有 t (11;17) (q23;q25) 的急性髓细胞白血病中一种推定的 septin 家族基因 AF17q25 融合 MLL 基因。*Cancer Res* 1999; 59: 4261-4265。

15 **Osaka M, Rowley JD, Zeleznik-Le NJ.** 带有 t (11;17) (q23;q25) 的治疗相关的急性髓细胞白血病中 MLL 的一种融合配偶体基因 MSF (MLL septin 样融合)。*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 6428-6433。

Yu BD, Hess JL, Horning SE, Brown GAJ, Korsmeyer S. Mll 突变体小鼠中改变的 Hox 表达和区段同一性。*Nature* 1995; 378: 505-508。

20 **Wolff L, Koller R, Bies J, Nazarov V, Hoffman B, Amanullah A, Krall M, Mock B.** 鼠前单核细胞白血病中的反转录病毒插入诱变: c-myb 和 Mml1。*Curr Topics Micro Immuno* 1996; 211: 191-199。

25 **Shen W-F, Largman C, Lowney P, Corral JC, Detmer K, Hauser CA, Simonitch TA, Hack FM, Lawrence HJ.** 含同源框基因在人类造血细胞系中的谱系限制表达。*Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 8536-8540。

Magli CM, Barba, P, Celetti A, De Vita G, Cillo, C, Boncinelli E. 人类造血细胞中 HOX 基因的协同调节。*Proc Natl Acad Sci USA* 1991;

88: 6348-6352。

Mathews CHE, Detmer K, Boncinelli E, Lawrence HJ, Largman C. 人HOX2基因座的同源框基因的红细胞类限制表达。*Blood* 1991; **78**: 2248-2252。

5 **Celetti A, Barba P, Cillo C, Rotoli B, Boncinelli E, Magli MC.** 不同类型人类白血病中HOX基因表达的特征性模式。*Int J Cancer* 1993; **53**: 237-244。

Lawrence HJ, Sauvageau G, Ahmadi N, Lopez AR, LeBeau MM, Link M, Humphries K, Largman C. HOXA10同源框基因在正常造血细胞和白血病造血细胞中的阶段特异性和谱系特异性表达。*Exp Hem*
10 1995; **23**: 1160-1166。

Biji JJ, van Oostveen JW, Walboomers JMM, Brink ATP, Vos W, Ossenkoppele GJ, Meijer CJLM. HOXC4、HOXC5和HOXC6在髓细胞白血病和正常骨髓细胞中的分化和细胞类型限制性表达。*Leukemia*
15 1998; **12**: 1724-1732。

Kawagoe H, Humphries RK, Blair A, Sutherland HJ, Hogge DE. HOX基因、HOX辅因子和MLL在白血病和正常人造血细胞的表型和功能限定的亚群中的表达。*Leukemia* 1999; **13**: 687-698。

Salvati PD, Ranford PR, Ford J, Kees UR. 在儿童急性成淋巴细胞白血病中HOX11的表达与T细胞表型相关。*Oncogene* 1995; **11**:
20 1333-1338。

Cuneo A, Mecucci C, Kerim S, Vandenberghe E, Dal Cin P, Van Orshoven A, Rodhain J, Bosly A, Michaux JL, Martiat P., Boogaerts M, Carli MG, Castoldi G, Van Den Berghe H. 多能干细胞涉及成巨核
25 细胞白血病: 15位患者中的细胞学和细胞遗传学证据。*Blood* 1989; **74**: 1781-1790。

Bonnet D, Dick JE. 人类急性白血病作为起源于原始造血细胞的等级结构组构。*Nature Medicine* 1997; **3**: 730-737。

Venditti A, Del Poeta G, Buccisano F, Tamburini A, Cox MC,

- Stasi R, Bruno A, Aronica G, Maffei L, Suppo G, Simone MD, Forte L, Cordero V, Postorino M, Tuffilli V, Isacchi G, Masi M, Papa G, Amadori S. 分化最少的急性髓细胞白血病(AML-M0): 具有其它法国-美洲-英国亚型的 25 例病例的比较。 *Blood* 1997; **89**: 621-629。
- 5 **Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, Hogge DE, Dragowska WH, Reid DS, Iargman C, Lawrence J, Humphries RK.** 功能独特的人骨髓细胞 CD34+亚群中同源框基因的差异表达。 *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 12223-12227。
- Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE.** 一类新发现的具有 SCID-繁殖活性的人类造血细胞。 *Nature Med* 1998; **4**: 1038-1045。
- 10 **Goodell MA.** CD34+或 CD34-: 它确实重要吗? *Blood* 1999; **94**: 2545-2547。
- Sato T, Iaver JH, Ogawa M.** 鼠造血干细胞可逆表达 CD34。 *Blood* 1999; **94**: 2548-2554。
- 15 **Schiffer CA.** 成人急性髓细胞白血病。 载于: Holland JF, Frei E., Bast RC, Kufe DW, Morton DL, Weichselbaum RR (编著): *Cancer Medicine*. Philadelphia, PA. Lea & Febiger, 1997。
- Scott MP, Tamkun JW, Hartzel III GW.** 同源域的结构和功能。 *Biochem Biophys Acta* 989: 25, 1989。
- 20 **Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick, HR, Sultan C.** French-American-British Cooperative Group 分类的修订标准。 *Ann Intern Med* 103: 103, 1985。
- Luscher B, Eisenman RN.** 对 Myc 和 Myb 的新见解。 第二部分。 *Myb*. *Genes & Devel* 4: 2235, 1990。
- 25 **Crotta S, Nicolis S, Ronchi A, Ottolenghi S, Ruzzi L, Shimada Y, Migliacci AR.** 在 GM 依赖性和 G-CSF 依赖性骨髓细胞系中红细胞转录因子表达的渐进失活。 *Nucl Acids Res* **18**: 6863, 1990。

Romeo P-H, Prandini M-H, Joulin V, Mignotte V, Prenant M, Vainchenker W, Marguerie G, Uzan G. 巨核细胞和红细胞谱系共享特异性转录因子。 *Nature* 344: 447, 1990。

5 **Martin DIK, Orkin SH:** 红细胞因子 GM1/NF-E1/ERYF1 引起的转录激活和 DNA 结合。 *Genes Dev* 4: 1886, 1990。

Perkins A, Kongsuwan K, Visvader J, Adams JM, Cory S: 同源框基因表达加自分泌生长因子的产生诱发髓细胞白血病。 *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 8398, 1990。

10 **Lawrence HJ, Sauvageau G, Ahmadi N, Lopez AR, LeBeau MM, Link M, Humphries K, Largman C.** HOXA10 同源框基因在正常造血细胞和白血病造血细胞中的阶段特异性和谱系特异性表达。 *Exp Hem* 23: 1160, 1995。

Lawrence H.J., Sauvageau G, Humphries R.K., Largman C: HOX 同源框基因在正常血细胞生成和白血病血细胞生成中的作用。 *Stem Cells* 14: 281, 1996。

Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Humphries RK: HOX 同源框基因作为正常血细胞生成和白血病血细胞生成的调节剂。 *Aplastic Anemia and Stem Cell Biol* 11: 1221, 1997。

20 **Borrow J, Shearman A.M., Stanton Jr. V.P., Becher R, Collins T, Williams AJ, Dube I, Katz F, Kwong YL, Morris C, Ohyashiki K, Toyama K, Rowley J, Housman DE:** 急性髓细胞白血病中 t (7;11) (p15;p15) 易位将核孔蛋白 NUP98 基因和 I 类同源异型蛋白 HOXA9 的基因融合。 *Nature Genetics* 12: 159, 1996。

25 **Nakamura T, Largaespada DA, Lee MP, Johnson LA, Ohyashiki K, Toyama K, Chen SJ, Willman CL, Chen I-M, Feinberg AP, Jenkins NA, Copeland NG, Shaughnessy Jr JD:** 人髓细胞白血病中染色体易位 t (7;11) (p15;p15) 引起的核孔蛋白基因 NUP98 与 HOXA9 融合。 *Nature Genetics* 12: 154, 1996。

Shimamoto T, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Kawakubo K,

Fujimura T, Iwama H, Nakazawa S, Toyama K: 红细胞/巨核细胞相关的转录因子 GATA-1 和干细胞白血病基因的表达模式与造血分化相关以及与急性髓细胞白血病的结果有关。Blood 86: 3173, 1995。

Komatsu N, Kirito K, Izuma T, Eguchi M, Miura Y: GATA-1 和
5 红细胞生成素受体基因在红白血病中高度表达。Exp Hem 26: 1148, 1998。

Thompson MA, Ramsay RG: Myb: 一种具有新作用的老癌蛋白质。Bioessays 17: 341, 1995。

Bash, R. O., Hall, S., Timmons, C. F., Crist, W.M., Amylone, M.
10 **和 Smith 和 Baer, R. (1995)** TALL 基因的激活是发生在大多数 T 细胞急性成淋巴细胞白血病患者中吗? 一项儿科肿瘤学分组研究。Blood 86: 666-676。

Brown, L., Cheng, J-T., Chen, Q., Siciliano, M. J., Crist, W., Buchanan, G.和 Baer, R. (1990) tar-1 基因的定点重组在人类 T 细胞白血
15 病中经常发生。EMBO J 9: 3343-3351。

Bernard, O., Lecointe, N., Jonveaux, p., Souyr, M., Mauchauffe, M., Berger, R., Larsen, C. J.和 Mathieu-Mahul, D. (1991) 局限于人 T 细胞急性白血病的两个定点缺失和 t (1;14) 易位破坏 tar-1 基因的 5' 部分。Oncogene 6:1477-1488。

Aplan, P.D., Lombardi, D.P., Reaman, G., Sather, H., Hammond, G.和 Kirsch, I.R. (1992), 推定的造血转录因子 SCL 涉及 T 细胞急性成
20 淋巴细胞白血病。Blood 79: 1327-1333。

Begley, C.G., Aplan, P.D., Denning, S.M., Haynes, B.F., Waldmann, T.A.和 Kirsch, I.R. (1989) 基因 SCL 在早期血细胞生成期
25 间表达并且编码一种分化相关 DNA 结合基序。Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 10128-10132。

Visvader, J., Begley, C.G.和 Adams, J.M. (1990) LYL、SCL 和 E2A 螺旋-环-螺旋基因在造血系统中的差异表达。Oncogene 6: 187-194。

Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH: 血细胞生成的抗原性分析。 iii. 一种由针对 KG- la 细胞产生的单克隆抗体限定的造血祖细胞细胞表面抗原。 J Immunol 133:157, 1984。

- 5 **Elwood, N.J., Cook, W.D., Metcalf, D.和 Begley, C.G. (1993)** 涉及人类 T 细胞白血病中的基因 SCL 在鼠 T 淋巴细胞细胞系中具有致癌性。 Oncogene 8: 3093-3101。

10 上述描述和实施例的目的是说明本发明的某些实施方案，而不是表示有任何限制。对于本领域技术人员显而易见的是，可以在不偏离本发明的精神或范围的情况下，对本发明的组合物和方法进行各种修改和改变。本文引用的所用本专利和出版物通过引用全部结合到本文中。

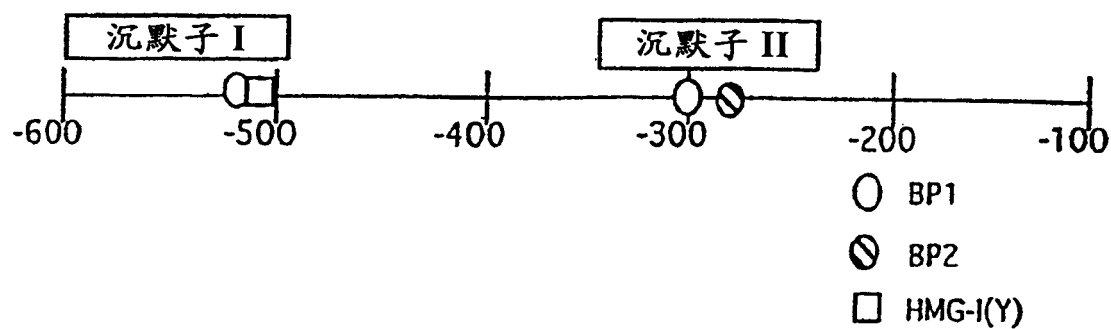


图 1

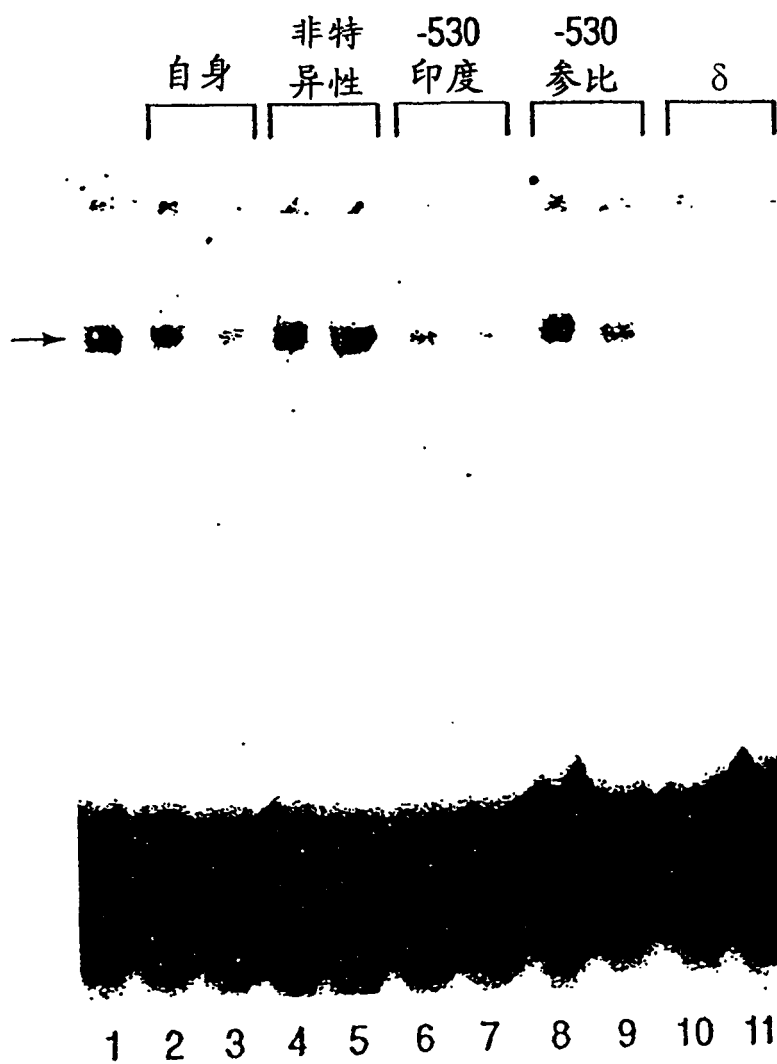


图 2

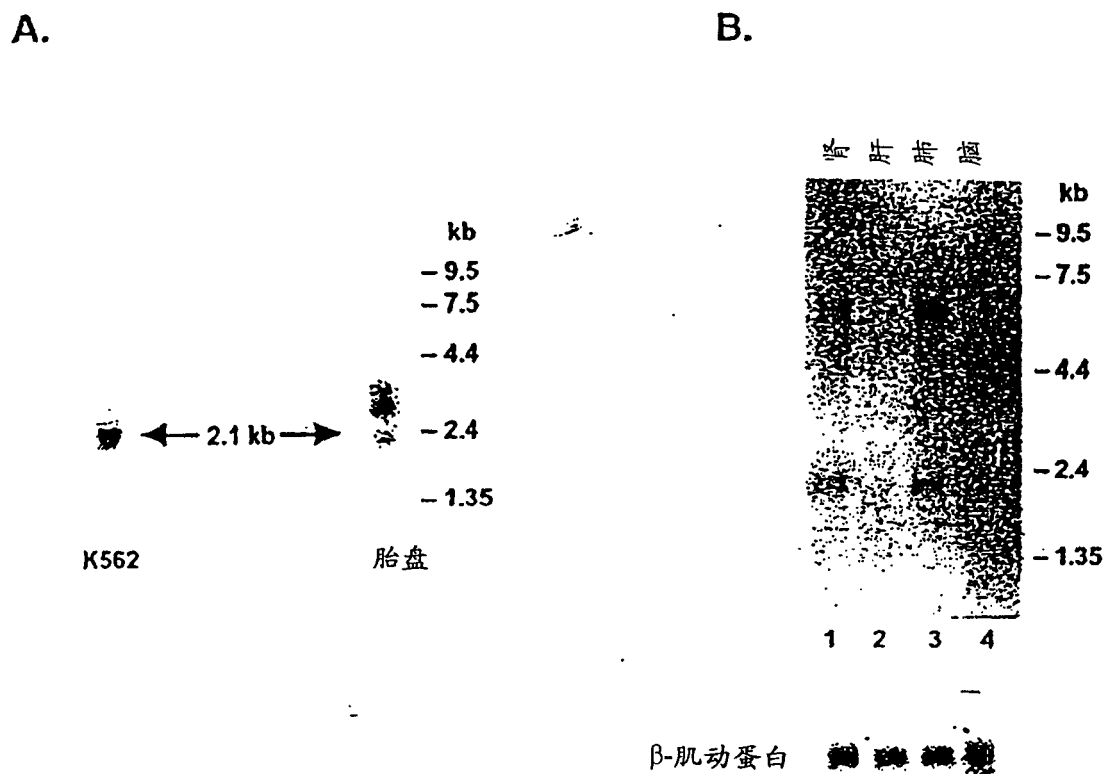


图 3

CCGCCCGGGC AGGTGGGAAC CGAACCCGAT GGAGAGGAGG GGGCCCCCAT GGATTTAGGG 60
 GGGGAGGGGA AAGTCATGGG GGGGCACCCC CCCGGAACCC CTTTCCCAGG CGCGGTTCT 120
 CCGCTGAAAG AGGCTCAGAG AGACACTTTC TCCGGGATCT TAAGTGTGGG GGCTGCTGGC 180
 TGGGGGGCCC GTCCGGCCCA ACGCCGGAGG CTTGAAAAG AGAGTTAGCA GCGGGAGCGG 240
 ACTACGTGCC GGGCCATGGC CCTTCTGCCC GGGCCCTGGC GACA 284

ATGACCTCTTTGCCCTGCCCCCTCCCCGGCCGGGACGCCTCCAAAGCTGTCTTCCCAGACCTC 347
 M T S L P C P L P G R D A S K A V F P D L (21)

GCCCTGTCCCGTCGGTAGCGGCTGCCTACCCGCTTGGCTTGTCCCTACAACCGCAGCCTCC 410
 A P V P S V A A A Y P L G L S P T T A A S (42)

CCCAATTTGTCTACTCCAGGCCGTATGGCCACCTCCTGTCTTACCCCTACACCGAGCCAGCG 473
 P N L S Y S R P Y G H L L S Y P Y T E P A (63)

AACCCCGGAGACTCCTACCTGTCTGCCAGCAACCCGCGGCTCTCTCAGCCCCCTCTGCGGA 536
 N P G D S Y L S C Q Q P A A L S Q P L C G (84)

CCTGCAGAGCACCCCTCAGGAACTCGAGGCAGACTCGGAGAAGCCGCGGCTGTCCCCGGAACCC 599
 P A E H P Q E L E A D S E K P R L S P E P (105)

TCCGAGCGGCGCCCTCAGGCCCCCGCCAAAAGCTCCGCAAGCCGAGGACCATCTACTCCAGC 662
 S E R R P Q A P A K K L R K P R T I Y S S (126)

CTGCAGCTGCAGCACCTAAACCAGCGTTTCCAGCACACGCAGTACCTGGCGCTGCCCGAGAGG 725
L Q L O H L N O R F Q H T Q Y L A L P E R (147)
 螺旋1

GCCCAGCTGGCAGCGCAGCTCGGCCTCACCCAGACCCAGGTAAAGATCTGGTTTCAGAACAAA 788
A Q L A A Q L G L T Q T Q V K I W F O N K (168)
 螺旋2 螺旋3

CGCTCCAAGTATAAGAAGCTCCTGAAGCAGAAATTCGGGGGCGAGGAAGGGGACTTCCCTGGG 851
R S K Y K K L L K Q N S G G Q E G D F P G (189)

AGGACCTTCTCTGTGTCTCCCTGCTCCCCACCCCTCCCTCCCTCTGGGATCTACCCAAGGCA 914
 R T F S V S P C S P P L P S L W D L P K A (210)

GGGACCCTGCCACCCAGTGGCTATGGCAACAGCTTTGGAGCCTGGTATCAGCATCACTCCTCA 977
 G T L P T S G Y G N S F G A W Y Q H H S S (231)

GATGTCCTGGCTTCGCCTCAGATGATG 1004
 D V L A S P Q M M (240)

TGAATCTGGG GAAGGGCGGG TCAGGCCAC AGCCTTCTG CAAAGCCCAG GACCCAGGCA 1064
 GTCCACCTGC ACCCCTTCTG GGCTGGGAGG AAACCAGCTC CAGATGGGTT TTCTCTGGAG 1124
 GACAAACAGT TAGAGGAGAA AAAGGAATGG AGCAGAGCCT GTACCCCTAA CCCTAACAGC 1184
 TAAATCAAGG ACCTCAGCCT TATATAATCA TTGTCCCCAC CACTACCATG GACTGAACAC 1244
 CTTACCC 1251

图 4

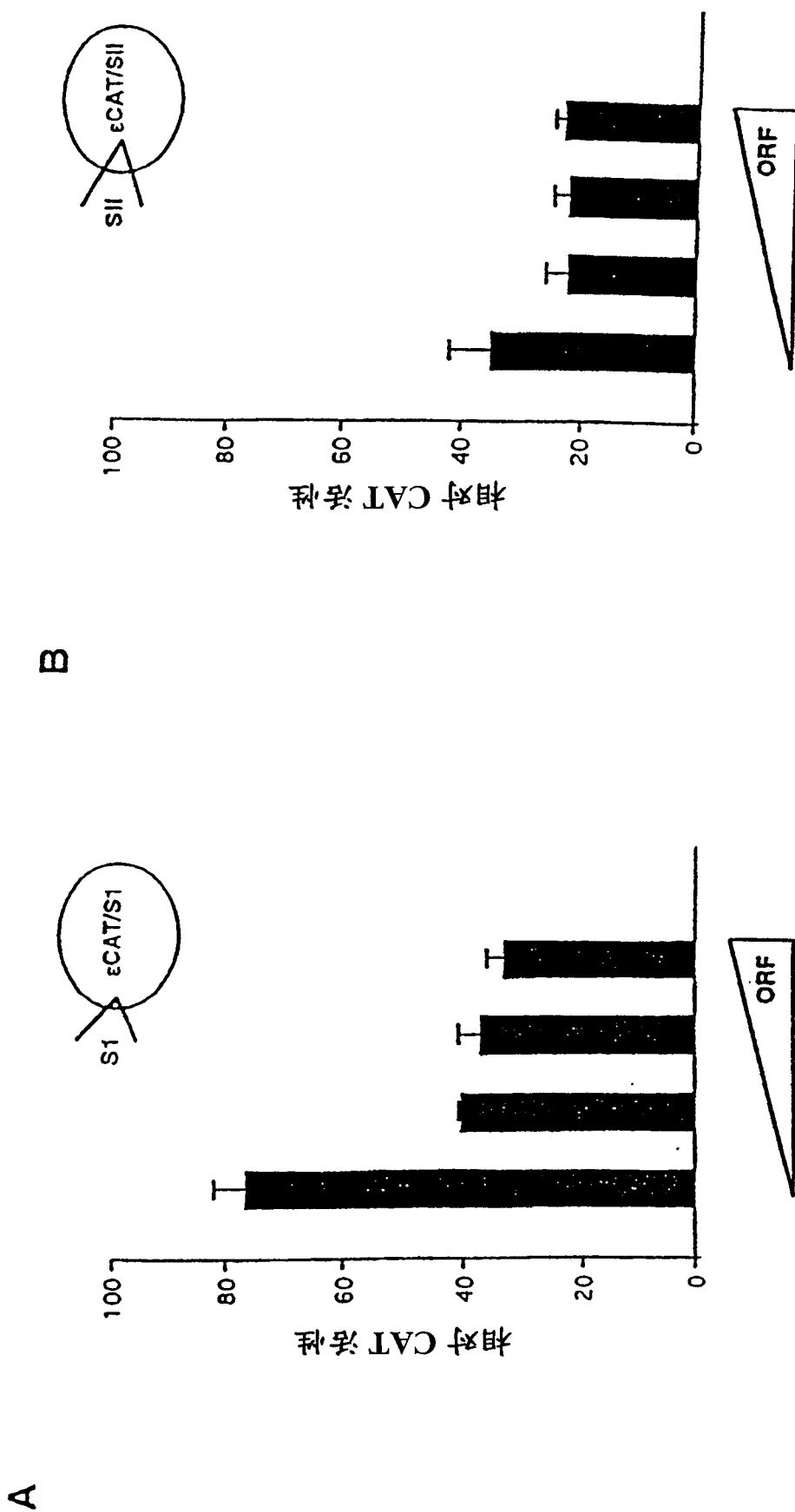


图 5

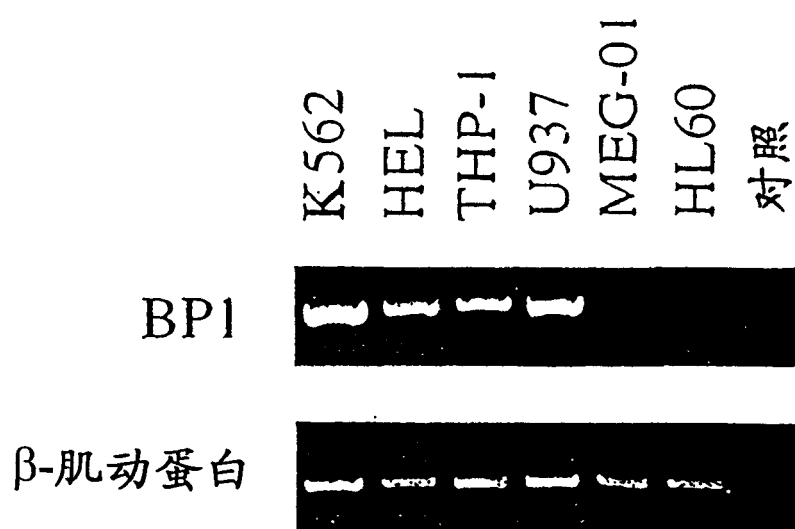


图 6

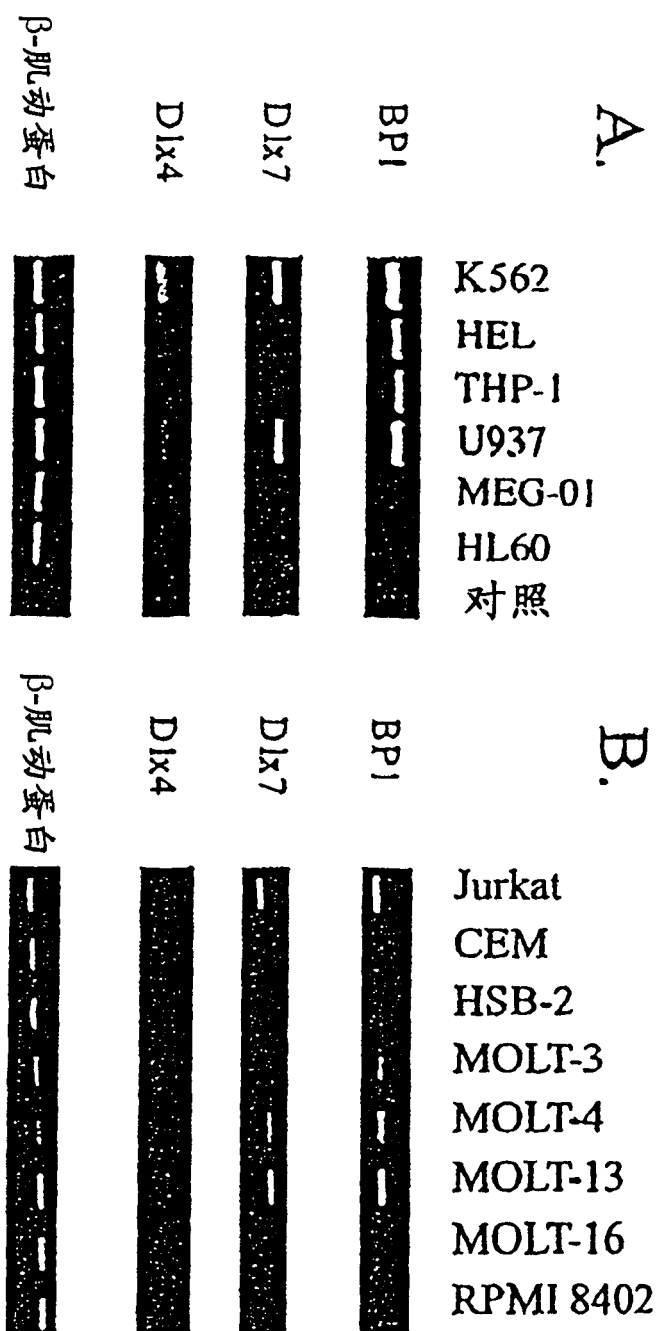


图 7

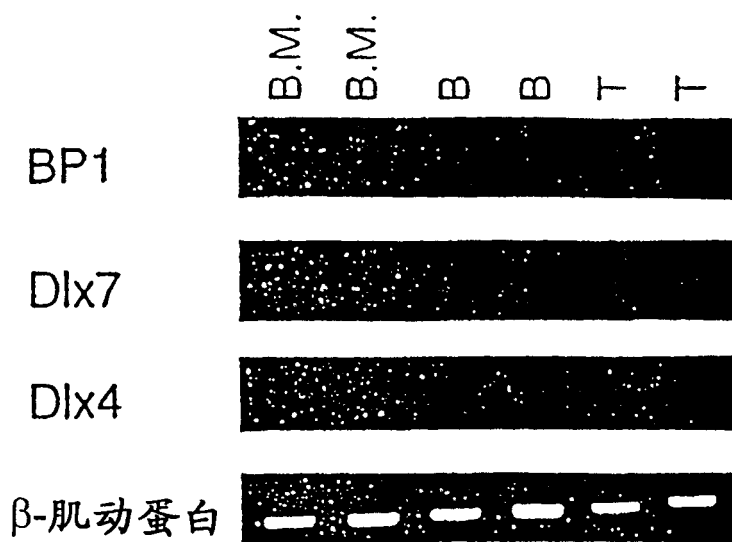


图 8

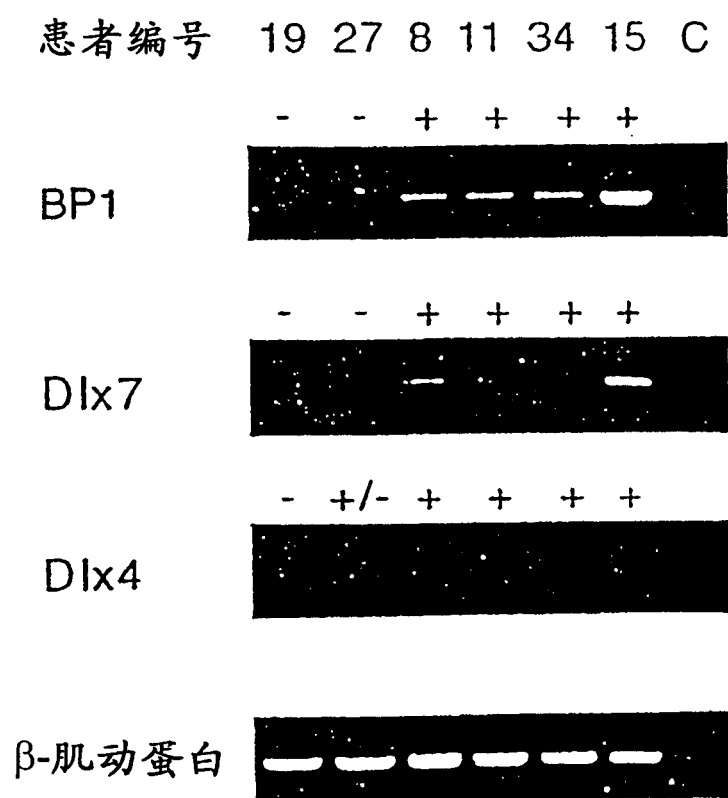


图 9

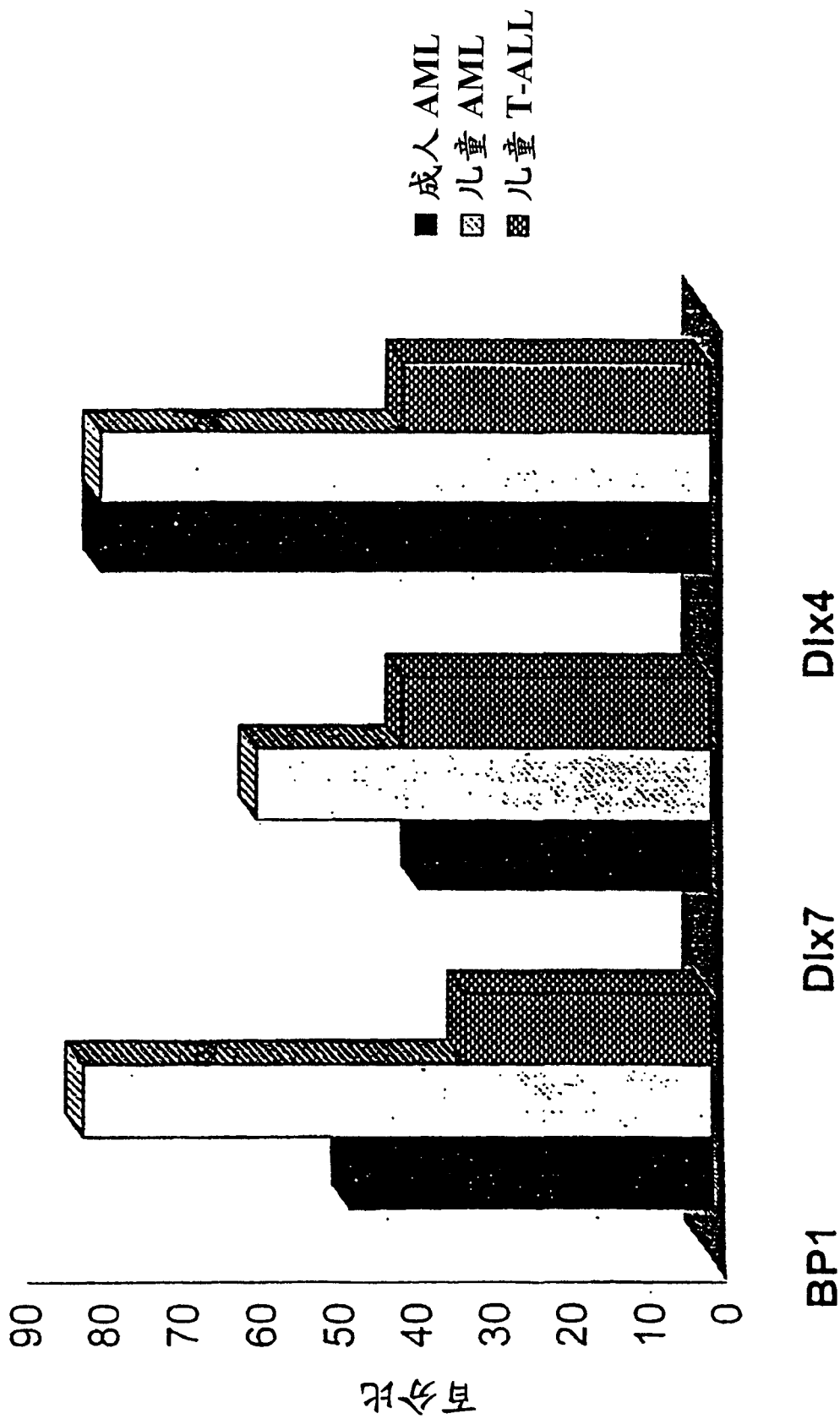


图 10

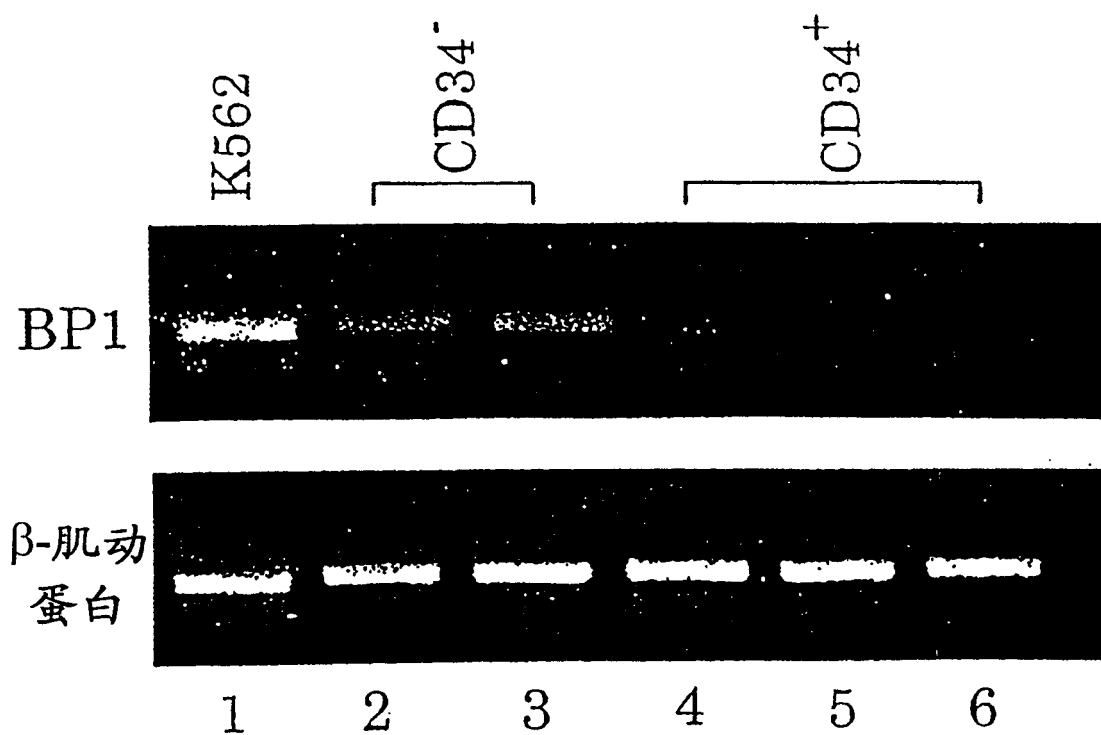


图 11

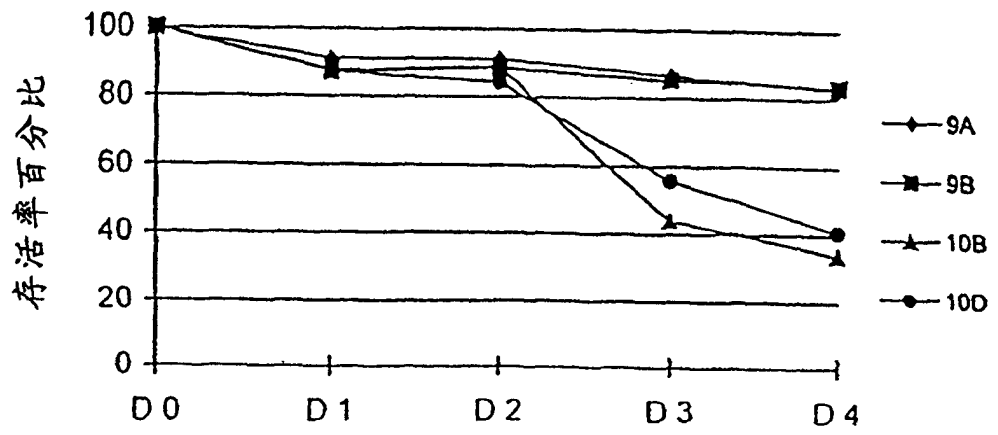


图 12

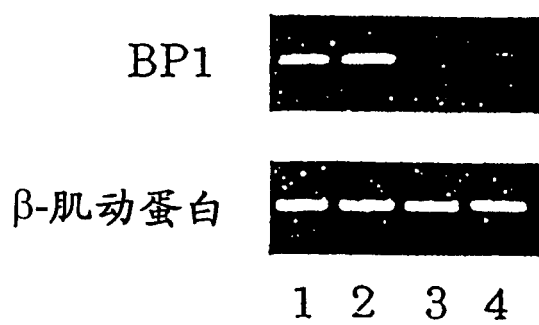


图 13

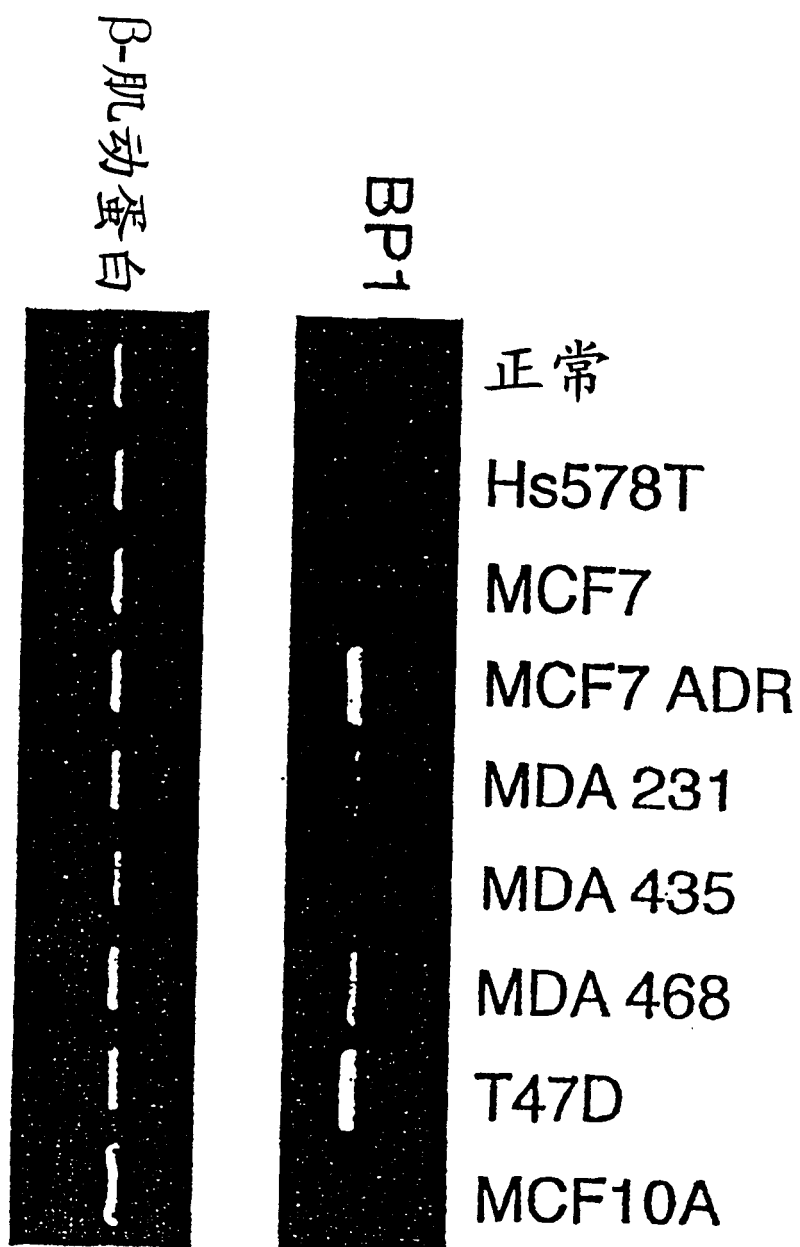


图 14

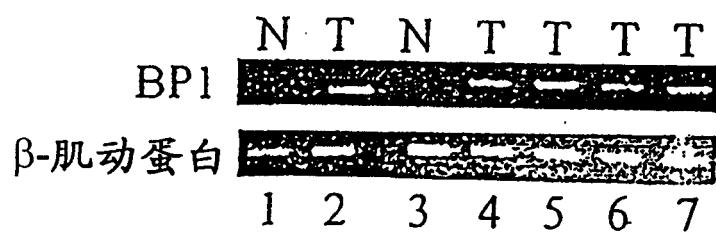


图 15

专利名称(译)	新型转录因子BP1		
公开(公告)号	CN1378552A	公开(公告)日	2002-11-06
申请号	CN00814096.0	申请日	2000-08-14
申请(专利权)人(译)	乔治华盛顿大学		
当前申请(专利权)人(译)	乔治华盛顿大学		
[标]发明人	PE伯格		
发明人	P·E·伯格		
IPC分类号	G01N33/48 A61K38/00 A61K48/00 A61P7/06 A61P35/02 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N5/08 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6886 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/577 C07H21/04 C07K16/00		
CPC分类号	C12Q1/6886 C07K14/4702 C12Q2600/158		
代理人(译)	刘玥		
优先权	60/148940 1999-08-13 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供一种编码转录因子BP1、具有SEQ ID NO:1的分离的DNA,认为BP1是一种β - 珠蛋白基因的阻抑蛋白。用含有所述DNA的载体转化的宿主细胞可以用来生产BP1。具有与所述BP1可读框有效连接的可控制启动子的载体,可以用来转化镰状细胞贫血患者的产生β - 珠蛋白的细胞,由此提供治疗。因为BP1在白血病细胞和乳腺癌细胞中过量表达,所以可以通过测定可能患有这些疾病的患者的细胞样品中是否过量表达BP1,来筛选和诊断急性髓细胞白血病、急性淋巴细胞白血病和乳腺癌。可以用编码BP1的DNA的反义DNA或RNA作为对急性髓细胞白血病、急性淋巴细胞白血病和乳腺癌的治疗。

