



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111094329 A

(43)申请公布日 2020.05.01

(21)申请号 201880057573.4

(22)申请日 2018.09.06

(30)优先权数据

62/554,669 2017.09.06 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.03.05

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/049755 2018.09.06

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/051090 EN 2019.03.14

(71)申请人 马歇尔大学科研协会

地址 美国西弗吉尼亚州

(72)发明人 穆米塔·班纳吉 崔晓语 谢子建

(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

代理人 金海霞 刘慧

(51)Int.Cl.

G07K 14/47(2006.01)

G01N 33/48(2006.01)

G01N 33/50(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书26页 附图39页

(54)发明名称

检测Na/K-ATP酶介导的SRC信号转导以进行
癌症的诊断和预后的方法

(57)摘要

提供了用于对象中癌症的诊断或预后的方法,所述方法包括下述步骤:从对象获得生物样品;确定所述生物样品中存在的Na/K ATP酶中Y260残基处磷酸化的量;以及将所述样品中所述磷酸化的量与对照水平进行比较,从而诊断所述癌症。还提供了用于检测从氧化磷酸化向有氧糖酵解的代谢切换的方法,其中获得包括一个或多个细胞的生物样品,并在所述一个或多个细胞中确定Na/K ATP酶中Y260残基处磷酸化的量。

Na/K-ATP 酶亚型	Y260位置
人类 $\alpha 1$	255 RGIVVYTGDR T 265
人类 $\alpha 2$	253 RGIVATGDR T 263
人类 $\alpha 3$	245 RGVVVATGDR T 255
人类 $\alpha 4$	263 RGIVATGDST 273

1. 一种用于对象中癌症的诊断或预后的方法,所述方法包括:
获得生物样品;
确定所述生物样品中存在的Na/K ATP酶中Y260残基处磷酸化的量;以及
如果存在所述磷酸化的话将所述样品中所述磷酸化的量与所述磷酸化的对照水平进行比较,其中如果所述样品中所述磷酸化的量与所述对照水平相比降低,则所述对象被诊断为具有癌症或癌症风险。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述Na/K ATP酶是 $\alpha 1$ Na/K ATP酶亚型。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述生物样品包括一个或多个癌细胞。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述生物样品包含肿瘤活检组织。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述癌症是前列腺癌或乳腺癌。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述癌症是转移癌。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中确定Y260残基处磷酸化的量包括使用质谱 (MS) 分析、免疫测定分析或两者来确定磷酸化的量。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述生物样品是从对象获得的。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述对象是人类。
10. 根据权利要求1所述的方法,其还包括在所确定的所述Y260残基的磷酸化的量的基础上选择或修改所述癌症的治疗。
11. 根据权利要求1所述的方法,其还包括测量所述生物样品中Scr活性的量的步骤。
12. 根据权利要求1所述的方法,其还包括在将对象诊断为具有癌症或癌症风险后向所述对象施用化学治疗剂。
13. 一种用于检测从氧化磷酸化向有氧糖酵解的代谢切换的方法,所述方法包括:
获得包括一个或多个细胞的生物样品;以及
确定所述一个或多个细胞中存在的Na/K ATP酶中Y260残基的磷酸化的量。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述Na/K ATP酶是 $\alpha 1$ Na/K ATP酶亚型。
15. 根据权利要求13所述的方法,其中所述一个或多个细胞包含癌细胞。
16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述癌细胞是前列腺癌细胞、肾癌细胞或乳腺癌细胞。
17. 根据权利要求13所述的方法,其中确定所述Y260残基处磷酸化的量包括使用质谱 (MS) 分析、免疫测定分析或两者来确定磷酸化的量。
18. 根据权利要求13所述的方法,其中所述生物样品是从对象获得的。
19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述对象是人类。
20. 根据权利要求13所述的方法,其还包括确定所述一个或多个细胞中产生的乳酸盐的量的步骤。

检测Na/K-ATP酶介导的Src信号转导以进行癌症的诊断和预后的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2017年9月6日提交的美国临时申请系列号62/554,669的优先权,所述临时申请的全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本公开的主题内容涉及检测Na/K-ATP酶介导的Src信号转导以进行癌症的诊断和预后的方法。具体来说,本公开的主题内容的某些实施方式涉及在Na/K-ATP酶磷酸化的基础上检测Na/K-ATP酶介导的Src信号转导以进行癌症的诊断和预后的方法。

背景技术

[0004] 癌细胞为了能量利用而显示出对有氧糖酵解提高的依赖性,这种现象被称为瓦博格效应(Warburg effect)。这种代谢切换为癌细胞提供了重要的代谢物。已知在癌细胞中原癌基因Src激酶通过将代谢酶类磷酸化驱动所述瓦博格效应,并通常在癌症中被过度活化。尽管对Src活性的结构调控了解很多,但不足以解释癌症中的这种明显的过度活化。迄今为止,尚未鉴定到Src的细胞质膜调节物,在所述细胞质膜处Src参与从多个细胞表面受体传递信号。

[0005] Na/K-ATP酶是高表达的膜蛋白,并且在大多数人类细胞中细胞质膜含有超过一百万个所述酶。有趣的是,仅仅约30%的细胞质膜Na/K-ATP酶从事离子泵送。最近的研究揭示出 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶与Src相互作用形成受体复合物,其允许内源强心性甙类(CTS)通过EGF受体/活性氧物质(ROS)途径启动蛋白质和脂类激酶级联,从而调控一系列细胞活动。然而,尚不知道这种相互作用对Src的质膜池的调控是否重要。

发明内容

[0006] 正如在研究了本文件中提供的信息后对本领域普通技术人员来说变得显而易见的,本公开的主题内容满足一些或所有上述需求。

[0007] 本概述描述了本公开主题内容的几个实施方式,并且在许多情况下列出了这些相互作用的变化和排列。本概述仅仅是大量不同实施方式的示例。给定实施方式的一个或多个代表性特点的提及同样是示例性的。这种实施方式通常可以在具有或不具有提到的特点的情况下存在;同样,那些特点可以应用于本公开主题内容的其他实施方式,不论其在本概述中是否列出。为了避免过多的重复,本概述没有列出或提出这些特点的所有可能的组合。

[0008] 本公开的主题内容包括检测Na/K-ATP酶介导的Src信号转导以进行癌症的诊断和预后的方法。具体来说,本公开的主题内容的某些实施方式包括在Na/K-ATP酶磷酸化的基础上检测Na/K-ATP酶介导的Src信号转导以进行癌症的诊断和预后的方法。在某些实施方式中,提供了一种用于对象中癌症的诊断或预后的方法,所述方法包括下述步骤:获得生物样品;确定所述生物样品中存在的Na/K ATP酶中Y260残基处的磷酸化的量;以及如果存在

所述磷酸化的话将所述样品中所述磷酸化的量与所述磷酸化的对照水平进行比较,其中如果所述样品中磷酸化的量与所述对照水平相比降低,则所述对象被诊断为具有癌症或癌症风险。在某些实施方式中,所述Na/K ATP酶是 $\alpha 1$ Na/K ATP酶亚型。在某些实施方式中,所述癌症是前列腺癌、肾癌或乳腺癌或其他类型的癌症。在某些实施方式中,所述癌症是转移癌。

[0009] 就用于确定所述Y260残基的磷酸化的生物样品而言,在某些实施方式中,所述生物样品包含血液、血浆或血清。在某些实施方式中,所述生物样品包括一个或多个癌或肿瘤细胞,例如在某些实施方式中来自于肿瘤活检组织的一个或多个肿瘤细胞。在某些实施方式中,所述生物样品从对象例如人类对象获得。

[0010] 在某些实施方式中,确定所述Na/K ATP酶中Y260残基处磷酸化的量包括使用质谱(MS)分析、免疫测定分析(例如ELISA)或上述两者或全部确定所述磷酸化的量。在某些实施方式中,可以在所确定的Y260残基的磷酸化的量的基础上选择或修改癌症治疗。在某些实施方式中,在将所述对象诊断为具有癌症或癌症风险后,可以随后向所述对象施用化疗剂或其他抗癌药剂。在某些实施方式中,作为另外的诊断或治疗指标,也可以测量所述生物样品中Src活性的量。

[0011] 在本公开主题内容的某些实施方式中,还提供了用于检测从氧化磷酸化向有氧糖酵解的代谢切换的方法。在某些实施方式中,这些检测方法包括下述步骤:获得包括一个或多个细胞的生物样品;以及确定所述一个或多个细胞中存在的Na/K ATP酶中Y260残基的磷酸化的量。在某些实施方式中,所述检测方法还包括确定所述一个或多个细胞中产生的乳酸盐的量的步骤和/或如果存在所述磷酸化的话将所述磷酸化的量与对照水平进行比较的步骤,其中所述磷酸化的量的降低指示了所述代谢切换。在某些实施方式中,所述Na/K ATP酶是 $\alpha 1$ Na/K ATP酶亚型。在某些实施方式中,所述一个或多个细胞包含癌细胞,例如在某些实施方式中一个或多个细胞包含前列腺癌细胞、肾癌细胞或乳腺癌细胞。

[0012] 对于本领域普通技术人员来说,在研究了本文件中的描述、附图和非限制性实施例后,本公开主题内容的其他特点和优点碱改变的显而易见。

附图说明

[0013] 图1A-1E包括的图像、表和图示出了将 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶中的Y260鉴定为Src结合位点,包括:(图1A)示出了不同人类Na/K-ATP酶亚型的第二胞质结构域(CD2)中含有Y260的序列的表的比较; (图1B)示出了不同细胞系中CD2与Src之间的相互作用的图像,其中那个示出了代表性印迹;; (图1C)示出了哇巴因对ERK活化的影响的图像和图(*与相同细胞系的介质处理的对照相比 $p < 0.05$ (Student's T-检验); #不同细胞系之间相比 $p < 0.05$ (单向ANOVA)); (图1D)示出了CD2中Y260磷酸化的检测的图像,其中示出了代表性印迹; (图1E)示出了小鼠组织中 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶的Y260磷酸化和表达的图像,其中示出了代表性印迹。

[0014] 图2A-2H包括示出了Y260磷酸化和Src的图像和图,包括:(图2A)示出了在纯化的猪肾 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶(2 μ g)中Y260在2mM Mg^{2+} -ATP存在下在10分钟内被Src(4.5单位)磷酸化的图像,其中示出了代表性印迹,并且对照印迹示出了在Y418和Y529位点处被 Mg^{2+} -ATP的Src磷酸化; (图2B)示出了在LLC-PK1细胞中PP2(5 μ M, 30分钟)对 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶的酪氨酸磷酸化的影响的图像,其中示出了代表性免疫印迹; (图2C)示出了Src家族激酶敲除对Y260磷

酸化的影响的图像,其中细胞裂解物从Src、Yes、Fyn敲除SYF和Src挽救SYF细胞制备,并示出了代表性印迹;(图2D)示出了在LLC-PK1细胞中哇巴因对Y260磷酸化的影响随时间变化的图像和图(**与介质处理的对照相比 $p<0.01$);(图2E)示出了在LLC-PK1细胞中不同浓度的哇巴因对Y260磷酸化的影响的图像;(图2F和2G)示出了在LLC-PK1细胞中重组EGF以时间(图2F)和剂量(图2G)依赖性方式影响Y260磷酸化的图像,其中示出了代表性免疫印迹,和(图2H)示出了整合蛋白信号转导对Y260磷酸化的影响的图像,其中细胞附着诱导的整合蛋白信号转导通过将细胞在纤连蛋白包被的板上铺板来测量,并示出了代表性印迹。

[0015] 图3A-3E包括示出了Y260A突变对Src介导的信号转导的影响的图像和图,包括:(图3A-3C)示出了Y260A突变对哇巴因诱导的信号转导的影响的图像和图,其中将AAC-19(对照)和Y260A突变体细胞用不同浓度的哇巴因处理10分钟,收集细胞裂解物并分析Src活化(pY418Src/c-Src)(图3A)、ERK活化(pERK1/2/ERK1/2)(图3B)和Akt活化(pS473Akt/Akt)(图3C)($*p<0.05$ 和 $**p<0.01$,与介质处理的AAC-19对照相比,##与介质处理的Y260A对照相比 $p<0.01$,和••在所指示的相同处理剂量下不同细胞系之间 $p<0.01$ (双向ANOVA), $n=4-5$);(图3D)示出了通过免疫沉淀分析的 α 1Na/K-ATP酶/Src相互作用的图像和图(**与AAC-19相比 $p<0.01$ (Student's T-检验));(图3E)示出了通过Src活化和EGFR活化评估的Y260A突变对EGF信号转导的影响的图像和图,其中示出了代表性印迹和定量,并使用与(图3A-3C)中相同的统计符号。

[0016] 图4A-4H包括示出了Y260A突变对细胞代谢的影响的图,包括:(图4A)示出了来自于AAC-19和Y260A突变体细胞的培养基的乳酸盐生产的图(**与对照AAC-19细胞相比 $p<0.01$);(图4B)示出了不同浓度的2-DG对细胞ATP含量的影响的图($*p<0.05$ 和 $**p<0.01$,与介质处理的对照(相同细胞系)相比(单向ANOVA));(图4C)示出了葡萄糖撤除对细胞生长的影响的图,其中细胞数被计数并表示为变化倍数($*p<0.05$ 和 $**p<0.05$,与同一细胞系中0时相比(单向ANOVA));(图4D)示出了AAC-19和Y260A细胞的生物能量参数ECAR测量的图,其中呈现了4-7个分开的测量的实际代表性迹线;(图4E)正如所标注的示出了从图4D中呈现的实验计算的糖酵解备用能力和与乳酸盐相关的ECAR的图(**与AAC-19细胞相比 $p<0.01$ (Student's T-检验));(图4F)示出了AAC-19和Y260A突变体细胞的生物能量参数-OCR测量的图,其中闲置能力从OCR测量来计算(*与AAC-19细胞相比 $p<0.05$ (Student's T-检验));(图4G)示出了在存在或不存在5 μ M PP2的情况下4h来自于Y260A细胞的培养基的乳酸盐生产的图(**与Y260A对照相比 $p<0.01$);以及(图4H)示出了在存在或不存在5 μ M PP2的情况下培养4h的Y260A细胞中ECAR测量的图。

[0017] 图5A-5F包括示出了人类癌症中Y260磷酸化和 α 1Na/K-ATP酶/Src相互作用的图和图像,包括:(图5A)示出了癌细胞系中Y260磷酸化的测量的图像和图,其中将来自于一组前列腺(LNCAP、DU145和PC3)和乳腺(MCF7、MDAMB231和BT-20)癌细胞系的细胞裂解物与相应的对照细胞(前列腺RWPE1和乳腺MCF10A)的Na/K-ATP酶 α 1表达和Y260磷酸化进行比较(**与相应的正常细胞系相比 $p<0.01$ (未配对T-检验,Welch's检验));(图5B)示出了通过免疫沉淀分析的对照DU-P1和敲减A4-7细胞中Src与 α 1Na/K-ATP酶之间的相互作用的图像和图(**与DU-P1相比 $p<0.01$ (Student's T-检验));(图5C)示出了通过免疫印迹分析的 α 1Na/K-ATP酶敲减对Src活性、FAK活性和Myc的影响的图像和图,其中示出了代表性免疫印迹,并呈现了来自于4-5个分开的实验的定量数据($*p<0.05$ 和 $**p<0.01$,与DU-P1相比(Student's

T-检验))；(图5D)示出了在来自于DU-P1和A4-7细胞培养物的培养基中(左图)和来自于在存在或不存在5 μ M PP2的情况下培养4h的A4-7细胞的培养基中(右图)乳酸盐的测量的图(* $p < 0.05$,与DU-P1(左图)或没有PP2处理的A4-7(右图)相比(Student's T-检验))；(图5E)示出了在48小时内DU-P1与A4-7相比的细胞增殖速率(左图)和48小时时A4-7增殖的PP2抑制(右图)的图(** $p < 0.05$ 和** $p < 0.01$,与DU-P1 24h相比,##与A4-7 24h相比 $p < 0.01$,和••在同一时间点不同细胞系之间 $p < 0.01$,**与未处理的对照相比 $p < 0.01$)；和(图5F)示出了 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶敲减对肿瘤生长的影响的图像和图,其中将DU-P1和A4-7细胞异种移植到NOD/SCID小鼠中,并通过在不同时间点测量肿瘤体积来评估肿瘤生长,其中在上图中示出了从异种移植的小鼠收获的肿瘤的照片,并且其中在下图中呈现了来自于异种移植的DU-P1和A4-7细胞的肿瘤重量和体积的定量数据(* $p < 0.05$ 和** $p < 0.01$,与基础肿瘤体积相比,##在同一时间点DU-P1在异种移植与A4-7异种移植之间相比 $p < 0.01$ (双向ANOVA),和**与DU-P1异种移植重量相比 $p < 0.01$ (Student's T-检验))。

[0018] 图6A-6E包括示出了在原发肿瘤和转移病灶中 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶表达的测量的图像和图,包括：(图6A)示出了前列腺癌中 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶的表达的图像和图,其中左图示出了在成对的人类正常前列腺组织(左)、癌(中)和骨转移(右)中的 $\alpha 1$ 表达模式,其中将人类组织阵列用 $\alpha 1$ 单克隆抗体免疫染色(棕色),其中将苏木精用于细胞核的复染(蓝色),其中在右侧示出了定量数据。** $p < 0.0001$ (单向ANOVA,Bartlett's检验),并且其中前列腺癌中 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶的下调通过成对组织分析进一步验证(最右侧图)** $p < 0.001$,成对T-检验(Wilcoxon符号秩检验)；(图6B-6C)示出了 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶在乳腺癌和肾癌中的表达的图像和图,其中左图与A中相同示出了在正常组织、癌和转移病灶中 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶的表达模式,并且其中右图示出了 $\alpha 1$ 染色的定量数据(** $p < 0.0001$ (单向ANOVA,Bartlett's检验))；(图6D)示出了在三种不同的人类癌症中Na/K-ATP酶 $\alpha 1$ 表达的比较,其中将图6A-6A中 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶表达的定量测量列表；和(图6E)示出了Na/K-ATP酶 $\alpha 1$ (ATP1A1)基因表达的转录下调和肾癌患者存活率的图,其中左图示出了人类肾癌中 $\alpha 1$ 表达的下降(TCGA-KIRC数据库, $n = 530$),成对T-检验(Wilcoxon符号秩检验),并且其中右图示出了 $\alpha 1$ 基因表达与患者存活率之间的反相关性(对数秩存活率检验)。

[0019] 图7是示出了在正常和癌细胞中 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶介导的Src调控的示意图,其中已确立的信号转导途径用实心黑色箭头表示,推测的信号转导途径用虚线黑色箭头表示(NKA=Na/K-ATP酶,Cav=小窝蛋白1,FAK=粘着斑激酶,RTK=受体酪氨酸激酶,PI3K=磷脂酰肌醇3激酶,ROS=活性氧物质,PLC=磷脂酶C,PKC=蛋白激酶C,PKM2=丙酮酸激酶同工酶M2,PDH=丙酮酸脱氢酶,ERK=细胞外调节性激酶),并且其中带圆圈字母P表示磷酸化和活化。

[0020] 图8A-8E包括了图像、示意图和图,包括：(图8A)示出了不同细胞系中 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ CD2的表达的图,其中产生不同细胞系,制备细胞裂解物并使用抗GFP抗体对其进行Western印迹；(图8B)示出了 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶的CD2(第二胞质结构域)的氨基酸序列的示意图,其中被称为CD2N的N端片段用初始线标记,并且被称为CD2C的C端片段用另一条线标记,并且其中预测的Src结合区在框中示出；(图8C)示出了在不同细胞系中CD2N和CD2C片段的表达的图像,其中制备YFP-CD2N和YFP-CD2C细胞系,从所指示的每个细胞系制造细胞裂解物并对其进行Western印迹；(图8D)示出了哇巴因对ERK活化的影响的图,其中如所指示的将细胞用哇巴因处理,制造细胞裂解物并对其进行ERK活化(pERK1/2/ERK 1/2)的Western印迹分析(*与

同一细胞系的介质处理的对照相比 $p < 0.05$, #在相同处理下不同细胞系之间相比 $p < 0.05$) ; (图8E) 示出了体外测定的图像, 说明了纯化的GST或GST- $\alpha 1CD2$ (5 μ g) 被纯化的重组Src或Lyn (4.5单位) 在2mM Mg^{2+} -AT存在下的Y260磷酸化, 其中上图示出了pY260 $\alpha 1$ 印迹, 下图示出了同一个膜的丽春红-S染色。

[0021] 图9A-9G包括的图和图像示出了: (图9A) 大鼠 $\alpha 1Na/K$ -ATP酶在不同细胞系中的表达, 其中产生了Y260A突变体细胞系, 并使用大鼠 $\alpha 1$ 特异性抗体 (NASE) 分析来自于3个不同克隆的细胞裂解物的大鼠 $\alpha 1Na/K$ -ATP酶, 其中猪LLC-PK1和大鼠 $\alpha 1$ 挽救的AAC-19细胞被用作阴性和阳性对照, 并且其中探测微管蛋白作为同一个膜上的载样对照; (图9B) Y260A中的 $\alpha 1$ 和 $\beta 1$ 亚基表达, 其中使用识别猪和大鼠 $\alpha 1$ 两者的 $\alpha 6F$ 抗体将突变体克隆21与对照AAC-19和 $\alpha 1$ 敲减细胞系PY-17进行比较 (**与AAC-19相比 $p < 0.01$ (单向ANOVA)) ; (图9C) 示出了在AAC-19和Y260A突变体克隆21细胞的质膜中 $\alpha 1Na/K$ -ATP酶表达的免疫荧光染色; (图9D) 3H 哇巴因结合研究, 示出了在Y260A突变体克隆21中与母体 $\alpha 1$ 敲减细胞系PY-17相比内源 (猪) $\alpha 1Na/K$ -ATP酶的表达 (**与PY-17相比 $p < 0.01$ (Students T检验)) ; (图9E) Na/K -ATP酶活性测定; (图9F) AAC-19和Y260A细胞之间蛋白质磷酸化的比较, 包括示出了Src激酶的Y418和Y529磷酸化的Western印迹, 其中也探测了总Src作为载样对照, 其中定量数据在右侧示出 (**与AAC-19细胞相比 $p < 0.01$ (Student T-检验)) 并且其中中蛋白酪氨酸磷酸化印迹示出在底部; 和 (图9G) 对Src被PP2的抑制做出响应的蛋白质磷酸化, 其中示出了代表性印迹和Src活性 (pY418) 的定量 (**与对照相比 $p < 0.01$ (Student T-检验)) 。

[0022] 图10A-10B包括的图像和图示出了: (图10A) 与对照AAC-19相比Y260突变体克隆24中的总 $\alpha 1$ 和 $\beta 1$ 亚基表达; 和 (图10B) 示出了在AAC-19和Y260A克隆24细胞中哇巴因诱导的ERK活化 (pERK1/2/ERK 1/2) 的Western印迹 (**与介质处理的对照 (相同细胞系) 相比 $p < 0.01$, ##与不同细胞系相比 $p < 0.01$, • • 在所指示的相同处理剂量下不同细胞系之间 $p < 0.01$ (双向ANOVA)) 。

[0023] 图11A-11E包括的图、图像和表示出了: (图11A) AAC-19和Y260A细胞的细胞增殖速率的比较 (* $p < 0.05$ 和** $p < 0.01$, 同一细胞系中与0-时相比, 和 • • 在相同时间点时两个细胞系之间相比 $p < 0.01$ (双向ANOVA)) ; (图11B) AAC-19和Y260A的OCAR测量, 其中最大呼吸和质子泄漏数据从OCAR测量来产生和计算, 并且其中呼吸控制率基于所示的方程来计算; (图11C) 从OCAR测量所计算的耦合效率 (**与对照AAC-19相比 $p < 0.01$) ; (图11D) RNAseq分析, 示出了在Y260A突变体细胞中与AAC-19相比参与代谢切换的被上调的基因, 其中上调被表示为Log2比率; (图11E) 将Y260A细胞用5 μ M PP2处理过夜, 并使用qPCR测量不同基因的mRNA表达水平 (**与未处理的对照相比 $p < 0.01$) 。

[0024] 图12A-12E包括的图像和图示出了: (图12A) 比较了正常前列腺RWPE1相比于前列腺癌细胞系DU145中 (左侧) 和正常乳腺MCF10A相比于乳腺癌细胞系MDAMB231中 (右侧) 的 $\alpha 1Na/K$ -ATP酶/Src激酶相互作用的免疫共沉淀; (图12B) 示出了DU145、DU-P1 (对照) 和 $\alpha 1$ -敲减细胞系 (A4-3和A4-7) 中 $\alpha 1Na/K$ -ATP酶的表达的Western印迹; (图12C) DU-P1和A4-7细胞的EGF刺激, 其中将细胞暴露于不同浓度的EGF 5分钟, 并通过Western印迹测量Src活化 (pY418 Src/c-Src) 和Src介导的磷酸化位点处的EGFR活化 (pY845 EGFR/EGFR) ; (图12D) 将A4-7细胞用5 μ M PP2处理90m, 并测定来自于对照和处理过的细胞的裂解物的Src、ERK和EGFR的活化, 其中也探测相同裂解物的Myc表达 (**与未处理的对照相比 $p < 0.01$) ; 和 (图

12E) 在存在或不存在PP2 (5 μ M, 4h) 的情况下培养的A4-7细胞的ECAR测量。

[0025] 图13A-13B包括的图示出了: (图13A) 在TCGA-PRAD数据库, n=495中, 与正常前列腺相比前列腺癌中Na/K-ATP酶 α 1 (ATP1A1) 的基因表达降低; 和 (图13B) 在同一数据库中基于最佳截止值的 α 1基因表达的降低不与患者存活率相关。

[0026] 图14是示出了图9F中总蛋白磷酸化水平的全长印迹的图。

具体实施方式

[0027] 在本文中阐述了本公开主题内容的一个或多个实施方式的详细情况。对于本领域普通技术人员来说, 在研究了本文中提供的信息后, 本文中描述的实施方式的修改和其他实施方式将是显而易见的。本文中提供的信息、特别是所描述的示例性实施方式的具体细节, 主要是为了清楚地理解而提供, 并且应该理解不从其产生不必要的限制。在有冲突的情况下, 以本文的说明书包括定义为准。

[0028] 尽管本文中使用的术语据信被本领域普通技术人员很好地理解, 但为了便于本公开主题内容的解释, 仍阐述了某些定义。

[0029] 除非另有定义, 否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的技术人员通常理解的相同的含义。

[0030] 除非另有指明, 否则在整个本公开中参考的所有专利、专利申请、公布的申请和出版物、GenBank序列、数据库、网址和其他出版的材料, 均整体通过引用并入本文。

[0031] 当对URL或其他这样的标识符或地址做出引用时, 应该理解这些标识符可能变化, 并且因特网上的信息可以出现和消失, 但等同的信息可以通过搜索因特网来发现。对它们的引用证明了这些信息的可利用性和公开传播。

[0032] 当在本文中使用, 除非另有指明, 否则用于任何保护基团、氨基酸和其他化合物的缩写均符合它们的常用用法、公认的缩写或IUPAC-IUB生物化学命名委员会 (Commission on Biochemical Nomenclature) (参见Biochem. (1972) 11 (9): 1726-1732)。

[0033] 尽管与本文中所描述的相似或等同的任何方法、装置和材料可用于本公开主题内容的实践和试验, 但代表性的方法、装置和材料描述在本文中。

[0034] 在某些情况下, 本文中公开的核苷酸和多肽被包含在可公开获得的数据库例如 GENBANK[®]和SWISSPROT中。包括序列的信息和与包含在这些可公开获得的数据库中的这些核苷酸和多肽有关的其他信息明确地通过参考并入本文。除非另有指明或明显看出, 否则对这些可公开获得的数据库的引用是对截止本申请提交之日的最新版本的数据库的引用。

[0035] 本申请可以“包含”(开放性) 本发明的组分以及本文中描述的其他成分或要素, 或“基本上由它们构成”。当在本文中使用, “包含”是开放性的, 并意味着所叙述的要素或它们的结构或功能等同物加上未叙述的其他一种或多种要素。术语“具有”和“包括”也应被解释为开放性的, 除非上下文另有建议。

[0036] 遵从沿用已久的专利法惯例, 当在本申请、包括权利要求书中使用时, 没有具体数目的指称是指“一个或多个”。因此, 例如, 对“细胞”的指称包括多个这种细胞, 以此类推。

[0037] 除非另有指明, 否则在本说明书和权利要求书中使用的表示成分的量、性质例如反应条件等的所有数字, 在所有情况下应该被理解为被术语“约”修饰。因此, 本说明书和权

利要求书中阐述的数值参数是可以随着力图通过本公开主题内容获得的所需性质而变的近似值,除非指明不是如此。

[0038] 当在本文中使用时,术语“约”在指称值或质量、重量、时间、体积、浓度或百分率的量时,意味着涵盖距所指定的量在某些实施方式中 $\pm 20\%$ 、在某些实施方式中 $\pm 10\%$ 、在某些实施方式中 $\pm 5\%$ 、在某些实施方式中 $\pm 1\%$ 、在某些实施方式中 $\pm 0.5\%$ 并且在某些实施方式中 $\pm 0.1\%$ 的变动,只要这些变动适合于执行本公开的方法即可。

[0039] 当在本文中使用时,范围可以被表示成从“约”一个特定值和/或至“约”另一个特定值。还应该理解,在本文中公开了大量的值,并且在本文中每个值除了所述值本身之外,也被公开为“约”该特定值。例如,如果值“10”被公开,则“约10”也被公开。还应该理解,在两个特定单元之间的每个单元也被公开。例如,如果10和15被公开,则11、12、13和14也被公开。

[0040] 当在本文中使用时,“任选的”或“任选地”意味着随后描述的事件或情况发生或不发生,并且所述描述包括所述事件或情况发生的情形和它不发生的情形。例如,任选可变的的部分意味着所述部分是可变的或不可变的。

[0041] 应该认识到,Na/K-ATP酶的 $\alpha 1$ 亚基与Src激酶结合以形成受体复合物,其活化/失活以构象依赖性方式受到调控。此外,体外和体内研究表明, $\alpha 1$ Na/K-ATP酶可以通过两对结构域相互作用的机制调控Src。 $\alpha 1$ 亚基的第二胞浆结构域作用类似于Src SH2配体,并且 $\alpha 1$ 的核苷酸结合结构域结合激酶结构域并将Src保持在失活状态下。此外,尽管 α 亚基存在4种亚型,但只有 $\alpha 1$ 充当Src激酶的动态调控物,正如从使用其他亚型的研究明显看出的。就此而言,本公开主题内容至少部分基于该亚型特异性Src调控和 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶的Y260氨基酸残基作为Src相互作用位点的鉴定。具体来说,已确定Y260是Src特异性磷酸化位点,并且对允许Src介导的信号转导的动态调控的组成性功能受体复合物的形成是重要的。此外,已发现该相互作用的破坏导致细胞中的代谢切换,并且是癌细胞中观察到的也被称为瓦博格效应的现象、即代谢的重编程中的贡献因素。正如在下文中进一步详细描述,许多癌细胞显示出 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶的表达降低和Y260磷酸化的减少,并且现在已确定 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶中的Y260是Src特异性磷酸化和结合位点,其为Na/K-ATP酶/Src介导的信号转导所需,并且进而能够利用Y260磷酸化的减少动态控制有氧糖酵解,导致细胞的有氧糖酵解和乳酸盐生产增加,同时也使细胞对由糖酵解能力和储备减少造成的糖酵解抑制敏感。

[0042] 因此,本公开主题内容包括利用Y260磷酸化作为Na/K-ATP酶介导的Src信号转导的生物标志物,用于癌症的诊断和预后的系统和方法。在某些实施方式中提供了一种检测Na/K-ATP酶介导的Src信号转导的方法,所述方法包括获得生物样品并确定所述生物样品存在的Na/K-ATP酶中Y260残基的磷酸化的量的步骤。在某些实施方式中,所述Na/K-ATP酶是 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶亚型(参见例如官方符号/基因:ATPA1, GEN ID:476, SWISSPROT ENTRY ID: P05023(人))。

[0043] 在某些实施方式中,提供了一种用于对象中癌症的诊断或预后的方法,所述方法包括下述步骤:获得生物样品;确定所述生物样品中存在的Na/K ATP酶中Y260残基的磷酸化的量;以及如果存在所述磷酸化的话将所述样品中所述磷酸化的量与所述磷酸化的对照水平进行比较,其中如果与所述对照水平相比所述样品中所述磷酸化的量减少,则所述对象被诊断为具有癌症或癌症风险。在某些实施方式中,本公开主题内容包括通过确定来自

于对象的生物样品中Na/K ATP酶中的Y260残基的磷酸化的量来在对象中诊断癌症和确定在对象中是否开始或继续癌症的预防或治疗的方法和系统。在某些实施方式中,所述Na/K ATP酶是 α 1Na/K ATP酶亚型。

[0044] 当在本文中使用时,术语“诊断”是指专业技术人员可以通过其估计或甚至确定对象是否患有给定疾病或病症的方法。专业技术人员通常在一种或多种诊断指标例如Na/K ATP酶中Y260残基的磷酸化的量的基础上做出诊断,所述诊断指标的量(包括存在或不存在)指示了所述病症的存在、严重性或不不存在。

[0045] 与诊断一起,临床疾病预后也是受到极大关注并感兴趣的领域。为了计划最有效的疗法,了解癌症的阶段和发展的快慢是重要的。如果可以做出更准确的预后,就可以为患者选择适合的疗法以及在某些情况下不太严苛的疗法。为了将对象按照癌症的发展分类为将从特定疗法获益的对象并与其中可选的或另外的疗法可能更加适合的其他对象区分开,本文中公开的磷酸化水平的测量可能是有用的。

[0046] 同样地,当在本文中使用时,“做出诊断”或“诊断”还包括确定预后,其可以被提供用于在测量本文公开的诊断生物标志物水平(例如Na/K ATP酶中Y260残基的磷酸化的量)的基础上预测临床结果(使用或不使用医学治疗时)、选择适合的治疗(或治疗是否将会有效)或监测当前的治疗并潜在地更换所述治疗。

[0047] 当在本文中使用时,短语“确定预后”是指专业技术人员可以通过其预测对象中病症的过程或结果的方法。术语“预后”不指以100%准确度预测病症的过程或结果的能力,即使在测试生物标志物的存在、不存在或水平的基础上或多或少地可能可以预测给定过程或结果的发生。相反,专业技术人员将会理解,术语“预后”是指某种过程或结果将会发生的可能性高,也就是说当与那些未表现出给定状况的个体相比时,在表现出所述状况的对象中过程或结果更可能发生。例如,在未表现出所述状况(例如不具有Y260磷酸化减少)的个体中,给定结果的机会可能是约3%。在某些实施方式中,预后是给定结果的约5%的机会、约7%的机会、约10%的机会、约12%的机会、约15%的机会、约20%的机会、约25%的机会、约30%的机会、约40%的机会、约50%的机会、约60%的机会、约75%的机会、约90%的机会或约95%的机会。

[0048] 专业技术人员将会理解,将预后指标与不利结果的倾向性相关联是统计分析。例如,在某些实施方式中低于对照水平的Y260磷酸化水平可以给出对象与磷酸化水平高于或等于所述对照水平的对象相比更可能患有癌症的信号,正如通过统计显著性水平所确定的。此外,磷酸化水平从基线水平的变化可以反映出对象预后,并且磷酸化水平的变化程度可以与不利事件的严重性相关。统计显著性通常通过比较两个或更多个群体并确定置信区间和/或p值来确定。参见例如Dowdy和Wearden,《用于研究的统计学》(Statistics for Research), John Wiley&Sons, New York, 1983,其整体通过引用并入本文。本公开主题内容的优选置信区间是90%、95%、97.5%、98%、99%、99.5%、99.9%和99.99%,而优选的p值是0.1、0.05、0.025、0.02、0.01、0.005、0.001和0.0001。

[0049] 在其他实施方式中,可以确立预后或诊断指标的水平的阈值变化程度,并且可以将生物样品中所述指标的水平的变化程度简单地与所述水平的阈值变化程度进行比较。本文中描述的Y260磷酸化的水平的优选阈值变化是约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约50%、约75%、约100%和约150%。在其他实施方式中,可以建立“诺模图”,通过

其可以将预后或诊断指标的水平与对给定结果的相关倾向性直接相关。专业技术人员熟悉使用这些诺模图来关联两个数值,并且理解这种测量中的不确定度与标志物浓度的不确定度相同,因为参考了各个样品测量值而不是群体平均值。

[0050] 在本公开主题内容的某些实施方式中,可以做出一种或多种诊断或预后指标的多次确定,并且可以使用Na/K ATP酶中Y260磷酸化的量的时间变化来监测疾病的进展和/或针对所述疾病的适合疗法的效能。在这个实施方式中,例如,人们可能预期看到在有效疗法的过程中Na/K ATP酶中的Y260磷酸化随时间增加。因此,在某些实施方式中,本公开主题内容提供了一种确定对象中的治疗效能和/或癌症进展的方法。在某些实施方式中,所述方法包括确定在多个不同时间点从所述对象收集的生物样品中Na/K ATP酶中的Y260磷酸化的量,并将在不同时间点收集的样品中Na/K ATP酶中Y260磷酸化的量进行比较。例如,第一时间点可以被选择成在治疗开始之前,并且第二时间点可以被选择成在治疗开始后的一定时间。然后可以在从不同时间点获取的每个样品中测量一个或多个Y260磷酸化水平,并观察定性和/或定量差异。来自于所述第一和第二样品的生物标志物水平的量的变化可以与在所述对象中确定所述疾病的治疗效能和/或进展相关联。

[0051] 当在本文中指称诊断和预后生物标志物的用途中使用时,术语“关联”和“相关联”是指将对象中所述生物标志物的存在或数量与它在已知患有给定病症(例如癌症)或已知具有给定病症风险的对象中或在已知没有给定病症的对象即“正常个体”中的存在或数量进行比较。例如,可以将生物样品中的Y260磷酸化水平与已知与特定类型的癌症相关的水平进行比较。所述样品的Y260磷酸化水平被称为已与诊断相关联;也就是说,专业技术人员可以使用所述磷酸化水平来确定所述对象是否患有特定类型的癌症并因此做出响应。或者,可以将所述样品的Y260磷酸化水平与已知与良好结果(例如不存在癌症)相关的对照标志物水平例如在正常对象群体中存在的平均水平进行比较。

[0052] 在某些实施方式中,诊断或预后生物标志物仅仅通过其存在或不存在与病症或疾病相关联。在其他实施方式中,可以建立诊断或预后Y260磷酸化的阈值水平,并且可以将对象样品中Y260磷酸化的水平简单地与所述阈值水平进行比较。

[0053] 正如提到的,在某些实施方式中,可以做出一种或多种诊断或预后生物标志物的多次确定,并且可以使用所述标志物的时间变化来确定诊断或预后。例如,可以在初始时间确定磷酸化的诊断水平,并在第二时间再次确定。在这样的实施方式中,从所述初始时间到第二时间Y260磷酸化的减少可以诊断特定类型的癌症或给定预后。此外,可以将一种或多种标志物的变化程度与癌症的严重性和将来的不利事件包括转移相关联,正如在下文中进一步描述的。

[0054] 本领域技术人员将会理解,尽管在某些实施方式中可以对多个时间点的同一诊断标志物做出比较性测量,但人们也可以在一个时间点测量给定标志物并在第二时间点测量第二标志物,并且这些标志物的比较可以提供诊断信息。

[0055] 对于从所述对象提供生物样品的步骤而言,当在本文中使用时,术语“生物样品”是指潜在包含Na/K-ATP酶的任何体液或组织。在某些实施方式中,例如,所述生物样品可以是血液样品、血清样品、血浆样品或其子级分。在某些实施方式中,所述生物样品包含一个或多个细胞,例如从肿瘤活检组织或其他来源获得的癌细胞。在某些实施方式中,有鉴于Src和Na/K-ATP酶的破坏作为在癌细胞中观察到的代谢的重编程中的贡献因素,本公开主

题内容的方法还可以包括在所述对象中确定的Y260残基的磷酸化的量的基础上选择或修改癌症的治疗的步骤。在某些实施方式中,在将所述对象诊断为具有癌症或癌症风险之后,然后可以向所述对象施用化疗药剂或其他抗癌药剂。在某些实施方式中,也可以测量所述生物样品中Src活性的量作为另外的诊断或治疗指标。

[0056] 现在转向鉴定所述生物样品中存在的Na/K-ATP酶中Y260磷酸化的量或Src活性的步骤,可以使用本领域技术人员已知的各种不同方法来鉴定所提供的生物样品中的这种磷酸化和活性。在某些实施方式中,确定样品中生物标志物的量包括使用质谱术和/或免疫测定装置和方法来测量样品中的Y260磷酸化,尽管其他方法对于本领域技术人员来说也是公知的。参见例如美国专利号6,143,576、6,113,855、6,019,944、5,985,579、5,947,124、5,939,272、5,922,615、5,885,527、5,851,776、5,824,799、5,679,526、5,525,524和5,480,792,每个所述专利整体通过引用并入本文。免疫测定装置和方法可以以各种不同的夹心、竞争或非竞争性测定法格式利用标记的分子,以产生与感兴趣的分析物的存在或量相关的信号。此外,某些方法和装置例如生物传感器和光学免疫测定法,可用于在不需标记的分子的情况下确定分析物的存在或量。参见例如美国专利号5,631,171和5,955,377,每个所述专利整体通过引用并入本文。

[0057] 在本公开主题内容的某些实施方式中,Y260磷酸化可以利用对磷酸化的Na/K-ATP酶亚型例如 $\alpha 1$ 亚型特异的抗体来确定。在其他实施方式中,Y260磷酸化可以通过将Src和Na/K-ATP酶免疫共沉淀来确定。在某些实施方式中,考虑到Na/K-ATP酶介导的Src信号转导需要Y260磷酸化,因此通过评估已知在Src下游的蛋白激酶包括但不限于ERK和Akt的活化来确定Y260磷酸化。

[0058] 在某些实施方式中,质谱(MS)分析可以单独地或与其他方法(例如免疫测定法)相组合用于确定生物样品中Na/K-ATP酶中的Y260磷酸化的存在和/或量。在某些实施方式中,所述MS分析包括基质辅助激光解吸/电离(MALDI)飞行时间(TOF)MS分析,例如直接点样MALDI-TOF或液相色谱MALDI-TOF质谱分析。在某些实施方式中,所述MS分析包括电喷雾电离(ESI)MS,例如液相色谱(LC)ESI-MS。质量分析可以使用可商购的质谱仪例如三节四极质谱仪来完成。利用MS分析包括MALDI-TOF MS和ESI-MS来检测生物样品中生物标志物肽的存在和量的方法在本领域中是已知的。进一步的指南参见例如美国专利6,925,389、6,989,100和6,890,763,每个所述专利通过引用并入本文。

[0059] 尽管所述方法的某些实施方式仅仅需要所述生物样品中Na/K-ATP酶的Y260磷酸化的存在或不存在的定性评估,但所述方法的其他实施方式需要所述生物样品中Na/K-ATP酶的Y260磷酸化的量的定量评估。这些定量评估可以例如使用上述方法之一来进行,正如本领域技术人员将会理解的。

[0060] 在本文描述的方法的某些实施方式中,可希望包括与所述生物样品同时进行分析的对照样品,以便可以将从所述生物样品获得的结果与从所述对照样品获得的结果进行比较。此外,设想了可以提供标准曲线,所述生物样品的测定结果可以与其进行比较。这样的标准曲线呈现了磷酸化水平随测定单位的变化,即如果使用荧光信号的话,随荧光信号强度的变化。使用从多个供体获取的样品,可以为正常组织中所述一种或多种标志物的对照水平提供标准曲线。

[0061] 标志物的分析可以与一个测试样品内的其他标志物分开或同时进行。例如,可以

将几种标志物合并在一个测试中,用于多个样品的高效处理并用于潜在地提供更大的诊断和/或诊断准确度。此外,本领域技术人员将会认识到测试来自于同一对象的多个样品(例如在连续的时间点)的价值。这种系列样品的测试可以允许鉴定标志物水平随时间的变化。标志物水平的提高或降低以及标志物水平的变化的不存在,可以提供关于疾病状态的有用信息,包括但不限于鉴定事件发生的大概时间、可拯救组织的存在和数量、药物疗法的适合性、各种不同疗法的有效性以及对象的结果、包括未来事件的风险的鉴定。

[0062] 标志物的分析也可以以各种不同的物理格式进行。例如,微量滴定板的使用或自动化可用于便于进行大量测试样品的处理。或者,可以开发单一样品格式以便于及时地进行即时治疗和诊断,例如在救护车运输或急诊室背景中。

[0063] 正如上文提到的,取决于所述方法的实施方式,Y260磷酸化的量或其他标志物的鉴定可以是所述标志物的存在或不存在的定性确定,或者它可以是所述标志物浓度的定量确定。就此而言,在某些实施方式中,将所述对象鉴定为具有癌症或癌症风险的步骤需要做出某些阈值测量,即所述生物样品中Na/K-ATP酶中的Y260磷酸化的水平低于对照水平。在所述方法的某些实施方式中,所述对照水平是所述Na/K-ATP酶中的Y260磷酸化或其他标志物的任何可检测的水平。在所述方法的其他实施方式中,在对照样品与所述生物样品同时测试的情况下,所述对照水平是在所述对照样品中的检测水平。在所述方法的其他实施方式中,所述对照水平基于标准曲线和/或通过标准曲线鉴定。在所述方法的其他实施方式中,所述对照水平是具体鉴定的浓度或浓度范围。同样地,所述对照水平可以部分基于所实践的方法的实施方式和所需特异性等,在对于本领域技术人员来说显而易见的可接受限度内选择。

[0064] 对于根据本公开的主题内容诊断的癌症来说,术语“癌症”在本文中用于指称在动物中发现的所有类型的癌症或赘生物或恶性肿瘤,包括白血病、上皮癌、黑素瘤和肉瘤。癌症的实例是脑癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、头颈癌、肾癌、肺癌、非小细胞肺癌、间皮瘤、卵巢癌、肉瘤、胃癌、子宫癌和成髓细胞瘤。在某些实施方式中,所述癌症选自前列腺癌、肾癌和乳腺癌。在某些实施方式中,所述癌症是转移癌。

[0065] “白血病”广义上是指血液形成器官的进行性、恶性疾病,并且通常以血液和骨髓中的白细胞及其前体的增殖和发育畸变为特征。白血病类疾病包括例如急性非淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、急性粒细胞性白血病、慢性粒细胞性白血病、急性早幼粒细胞白血病、成人T-细胞白血病、非白血性白血病、非白细胞增多性白血病、嗜碱性粒细胞白血病、胚细胞白血病、牛白血病、慢性粒细胞性白血病、皮肤白血病、胚胎白血病、嗜酸性粒细胞白血病、Gross'白血病、毛细胞白血病、成血性白血病、成血细胞性白血病、组织细胞性白血病、干细胞白血病、急性单核细胞性白血病、白细胞减少性白血病、淋巴性白血病、成淋巴细胞性白血病、淋巴细胞性白血病、淋巴原性白血病、淋巴系白血病、淋巴肉瘤细胞白血病、肥大细胞白血病、巨核细胞性白血病、微成髓细胞性百宝箱、单核细胞性白血病、原始粒细胞性白血病、髓细胞性白血病、髓性粒细胞白血病、髓单核细胞白血病、内格利型白血病、浆细胞白血病、浆细胞性白血病、早幼粒细胞白血病、里德尔细胞白血病、Schilling's白血病、干细胞白血病、亚白血病性白血病和未分化细胞白血病。

[0066] 术语“上皮癌”是指由倾向于浸润周围组织并引起转移的上皮细胞构成的恶性新生长。示例性上皮癌包括例如腺泡癌、腺泡状癌、腺样囊性癌、腺样囊状癌、腺癌、肾上腺皮

质癌、肺泡癌、肺泡细胞癌、基底细胞癌、基底上皮细胞癌、基底样癌、基底鳞状细胞癌、细支气管肺泡癌、细支气管癌、支气管癌、脑样癌、胆管细胞癌、绒膜上皮癌、胶样癌、粉刺性癌、子宫体癌、筛状癌、铠甲状癌、皮肤癌、柱状癌、柱状细胞癌、导管癌、硬癌、胚胎性癌、髓样癌、表皮样癌、腺样上皮细胞癌、外植癌、溃疡性癌、纤维癌、胶样癌、胶状癌、巨细胞癌、巨细胞癌、腺癌、粒层细胞癌、毛发基质癌、多血癌、肝细胞癌、许特耳氏细胞癌、透明癌、肾上腺样癌、幼稚型胚胎性癌、原位癌、表皮内癌、上皮内癌、Krompecher's癌、Kulchitzky细胞癌、大细胞癌、豆状癌、豆状癌、脂肪瘤状癌、淋巴上皮癌、髓样癌、髓样癌、黑色素癌、软癌、粘液癌、粘液癌、粘液细胞癌、粘液表皮样癌、粘液癌、粘液癌、粘液瘤样癌、鼻咽癌、燕麦细胞癌、骨化性癌、骨样癌、乳头状癌、门脉周癌、浸润前癌、棘细胞癌、软糊状癌、肾细胞癌、储备细胞癌、肉瘤样癌、施奈德癌、硬癌、阴囊癌、印戒细胞癌、单纯癌、小细胞癌、马铃薯状癌、球状细胞癌、梭形细胞癌、海绵样癌、鳞状癌、鳞状细胞癌、串状癌、毛细管扩张性癌、血管扩张性癌、移行细胞癌、结节性癌、结节性癌、疣状癌和绒毛状癌。

[0067] 术语“肉瘤”通常是指由类似于胚胎结缔组织的物质组成的肿瘤，并且通常由包埋在纤维状或均质物质中的紧密堆积的细胞构成。肉瘤包括例如软骨肉瘤、纤维肉瘤、淋巴肉瘤、黑素肉瘤、粘液肉瘤、骨肉瘤、Abemethy's肉瘤、脂肪肉瘤、脂肉瘤、腺泡状软组织肉瘤、成釉细胞肉瘤、葡萄样肉瘤、绿色瘤肉瘤、绒毛膜癌、胚胎肉瘤、威尔姆斯瘤肉瘤、子宫内膜肉瘤、间质肉瘤、尤因氏肉瘤、筋膜肉瘤、成纤维细胞性肉瘤、巨细胞肉瘤、粒细胞肉瘤、霍奇金氏肉瘤、特发性多发性色素性出血性肉瘤、B细胞成免疫细胞肉瘤、淋巴瘤、T细胞成免疫细胞肉瘤、詹恩逊氏肉瘤、卡波氏肉瘤、库普弗细胞肉瘤、血管肉瘤、白血病性肉瘤、恶性间质瘤肉瘤、骨膜外肉瘤、网状细胞肉瘤、劳斯肉瘤、浆液囊性肉瘤、滑膜肉瘤和毛细血管扩张肉瘤。

[0068] 术语“黑素瘤”是指从皮肤和其他器官的黑素细胞系统产生的肿瘤。黑素瘤包括例如肢端雀斑样痣黑素瘤、无黑色素性黑素瘤、良性幼年黑素瘤、Cloudman's黑素瘤、S91黑素瘤、Harding-Passey黑素瘤、幼年黑素瘤、恶性雀斑样痣黑素瘤、恶性黑素瘤、结节性黑素瘤、甲下黑素瘤和浅表扩散性黑素瘤。

[0069] 其他癌症包括例如霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、成神经细胞瘤、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、横纹肌肉瘤、原发性血小板增多症、原发性巨球蛋白血症、小细胞肺肿瘤、原发性脑肿瘤、胃癌、结肠癌、恶性胰腺胰岛素瘤、恶性类癌、癌前皮肤病变、睾丸癌、淋巴瘤、甲状腺癌、成神经细胞瘤、食道癌、泌尿生殖道癌、恶性高钙血症、宫颈癌、子宫内膜癌和肾上腺皮质癌。在某些实施方式中，所述癌症选自前列腺癌和/或乳腺癌。

[0070] 在本公开主题内容的某些实施方式中，还提供了检测从氧化磷酸化向有氧糖酵解的代谢切换的方法和测定法。在某些实施方式中，这些检测方法包括下述步骤：获得包括一个或多个细胞的生物样品；和确定所述一个或多个细胞中存在的Na/K ATP酶中Y260残基处磷酸化的量。在某些实施方式中，所述检测方法还包括确定所述一个或多个细胞中产生的乳酸盐的量的步骤。在某些实施方式中，所述Na/K ATP酶是 $\alpha 1$ Na/K ATP酶亚型。在某些实施方式中，所述一个或多个细胞包含癌细胞，例如在某些实施方式中前列腺癌细胞、肾癌细胞或乳腺癌细胞。

[0071] 在本公开主题内容的某些实施方式中，提供了用于检测Na/K-ATP酶介导的Src信号转导和/或用于确定Na/K ATP酶中Y260残基处磷酸化的量的系统或测定法。这些系统和

测定法可以被提供为例如商业化试剂盒,其可用于测试来自于对象的生物样品或一系列生物样品。所述系统也可以包括用作对照的某些样品。所述系统还可以包括一个或多个标准曲线,提供作为测定法单元的功能的标志物的水平。

[0072] 在某些实施方式中,提供了一种用于分析生物标志物的系统或测定法,其包含对Na/K-ATP酶中的Y260磷酸化具有特异性的抗体。这种系统或测定法可以包含用于分析至少一个测试样品的装置和试剂。所述系统还可以包含使用所述系统并对从对象获得的样品进行分析的说明书。

[0073] 对于本公开的主题内容而言,优选的对象是脊椎动物对象。优选的脊椎动物是温血动物;优选的温血动物是哺乳动物。优选的哺乳动物最优选为人类。当在本文中使用时,术语“对象”包括人类和动物对象两者。因此,根据本公开的主题内容,提供了兽医治疗性用途。因此,本公开的主题内容提供了哺乳动物的诊断,所述哺乳动物例如人类,以及由于濒危而重要的哺乳动物如西伯利亚虎,具有经济重要性的动物例如在农场饲养以供人类消费的动物,和/或对人类具有社会重要性的动物例如作为宠物或在动物园中饲养的动物。这些动物的实例包括但不限于:食肉动物,例如猫和狗;猪科动物,包括猪、阉猪和野猪;反刍动物和/或有蹄类动物,例如牛、公牛、绵羊、长颈鹿、鹿、山羊、野牛和骆驼;以及马。还提供了鸟类的治疗,包括濒危和/或在动物园中饲养的鸟类品种以及禽类、更特别是驯养禽类即家禽如火鸡、鸡、鸭、鹅,珍珠鸡等的治疗,因为它们对人类也具有经济重要性。因此,还提供了对牲畜包括但不限于驯养的猪、反刍动物、有蹄类动物、马(包括赛马)、家禽等的治疗。

[0074] 除非另有指明,否则本公开主题内容的实践可以利用在本领域技术范围之内的细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组DNA和免疫学的常规技术。这些技术在文献中充分解释。参见例如《分子克隆实验指南》(Molecular Cloning A Laboratory Manual) (1989) 第二版,Sambrook、Fritsch和Maniatis主编,Cold Spring Harbor Laboratory Press,第16和17章;美国专利号4,683,195;《DNA克隆》(DNA Cloning),第I和II卷,Glover主编,1985;《寡核苷酸合成》(Oligonucleotide Synthesis),M.J.Gait主编,1984;《核酸杂交》(Nucleic Acid Hybridization),D.Hames&S.J.Higgins主编,1984;《转录和翻译》(Transcription and Translation),B.D.Hames&S.J.Higgins主编,1984;《动物细胞培养》(Culture Of Animal Cells),R.I.Freshney,Alan R.Liss, Inc.,1987;《固定化细胞和酶》(Immobilized Cells And Enzymes),IRL Press,1986;Perbal(1984),《分子克隆实用指南》(A Practical Guide To Molecular Cloning);参见《酶学方法》(Methods In Enzymology) (Academic Press,Inc.,N.Y.);《用于哺乳动物细胞的基因转移载体》(Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells),J.H.Miller和M.P.Calos主编,Cold Spring Harbor Laboratory,1987;《酶学方法》(Methods In Enzymology),Vols.154和155,Wu等主编,Academic Press Inc.,N.Y.;《细胞和分子生物学中的免疫化学方法》(Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology),Mayer和Walker主编,Academic Press,London,1987;《实验免疫学手册》(Handbook Of Experimental Immunology),第I-IV卷,D.M.Weir和C.C.Blackwell主编,1986。

[0075] 本公开的主题内容通过下述具体但非限制性实施例进一步说明。

[0076] 实施例

[0077] 材料和方法

[0078] 抗体及其来源。单克隆抗Src抗体 (B12)、多克隆抗ERK1/2 (细胞外调节性激酶1/2) 抗体、单克隆抗磷酸化ERK1/2抗体、山羊抗小鼠IgG HRP和山羊抗兔IgG HRP第二抗体-Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)。抗Src (Y418) 兔单克隆抗体-Invitrogen (Carlsbad, CA)。抗Akt、抗磷酸化Akt (S473) 以及抗PKM2和抗磷酸化PKM2 (Y105) 兔抗体、磷酸化FAK576/7和FAK兔抗体-Cell Signaling Technologies (Danver, MA)。单克隆抗 α 1Na/K-ATP酶亚基抗体 (α 6f)-Developmental Studies Hybridoma Bank at The University of Iowa (Iowa City, IA)。单克隆抗Src (GD-11) 抗体、多克隆兔抗 α 1Na/K-ATP酶抗体 (06-520)、用于免疫沉淀的蛋白-G-琼脂糖珠和PP2-Millipore (Billerica, MA)。抗GFP和抗c-Myc兔多克隆抗体-Abcam (Cambridge, MA)。抗磷酸化 α 1Na/K-ATP酶 (Y260) 抗体-Assay Biotech (Fremont, CA)。转染试剂盒 (Lipofectamine 2000) 来自于Invitrogen。QuikChange 诱变试剂盒来自于Stratagene (La Jolla, CA)。多克隆大鼠 α 1特异性抗体 (抗NASE抗体) 由 Dr. Thomas Pressley (Texas Tech University, Lubbock, TX) 善意馈赠。所有其他试剂购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)。

[0079] 小鼠研究。动物方案由马歇尔大学动物护理和使用学术委员会 (Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of Marshall University) 根据NIH指南批准。将雄性C57/BL6J小鼠 (8-10周龄) 人道地处死, 并将不同器官立即冷冻, 用于制备用于免疫印迹的组织裂解物。肿瘤异种移植物通过将 5×10^6 个DU-P1或A4-7细胞皮下注射到6周龄雌性NOD/SCID小鼠 (Charles River) 的左肋和右肋中来建立。使用卡尺测量肿瘤长度 (L) 和宽度 (W), 并将肿瘤体积估算为 $V = (L \times W^2) / 2$ 。

[0080] 人类样品的免疫组织化学 (IHC) 染色分析。Na/K-ATP酶 α 1 IHC染色由US Biomax (Rockville, MD) 使用人类肾、前列腺和乳腺组织微阵列进行, 并如前所述来执行。因此, 不可能记录患者的详情。用于IHC的抗体-小鼠单克隆抗Na/K-ATP酶 α 1抗体 (Millipore)。将细胞核用苏木精复染。两位独立的研究人员检查染色强度, 并且如所定义的对每个载片评分三次: 0, 不存在; 1, 弱; 2, 中; 3, 强。记录平均评分。

[0081] 细胞培养和细胞系产生。所有细胞系购自ATCC (Manassas, VA) 并按照ATCC的指示维持。在用于信号转导实验之前将LLC-PK1血清饥饿。在用于信号转导实验之前, 将AAC-19、Y260A和DU145、A4-7细胞系分别在0.5%和1%血清存在下培养24小时。将LLC-PK1细胞用含有 α 1CD2、 α 2CD2的pEYFP-C1载体或pEYFP-C1空载体转染 (Lipofectamine 2000)。在目测验证YFP表达后, 将细胞用1mg/ml G418选择一周。选择G418抗性克隆并扩增。然后在用于实验之前将细胞在不含G418的情况下培养至少三代。CD2N和CD2C细胞以类似的方式产生。Y260A细胞通过用在Y260处带有突变的pRC/CMV- α 1AACm1载体转染PY-17细胞来产生, 并用哇巴因 (3 μ M) 选择。分离哇巴因抗性克隆并扩增成稳定的细胞系。在用于任何实验之前将所述细胞在不含哇巴因的情况下培养至少3代。DU-P1、A4-7和A4-3细胞系通过用含有 α 1Na/K-ATP酶特异性siRNA的载体转染DU145细胞并如上所述用嘌呤霉素选择来产生。所有构建物通过DNA测序来验证。

[0082] 免疫印迹、免疫沉淀和免疫染色分析。免疫印迹测定如前所述来进行。条带的强度使用ImageJ软件 (NIH) 来定量。免疫沉淀通过向500 μ g细胞裂解物 (1 μ g/ μ l浓度) 添加5 μ g抗Src (Millipore Cat#05-184) 抗体或向800 μ g细胞裂解物 (1 μ g/ μ l浓度) 添加8 μ g抗 α 1Na/K-ATP酶抗体 (Millipore Cat#06-520) 来进行。然后如前所述分析沉淀的蛋白质。对于免疫染

色来说,使用的抗体是抗 α 1Na/K-ATP酶抗体 (Millipore Cat#05-369) 和Alexa Fluor 488 偶联的抗小鼠第二抗体。

[0083] 细胞生长测定和MTT测定。细胞生长测定和MTT测定如以前所描述来进行。

[0084] ATP和乳酸盐的生物化学测量。ATP测量使用CellTiter-Glo Luminescent细胞活性测定试剂盒来进行。将每孔10,000个细胞在96孔培养板中培养。在用所指示浓度的2-DG在无血清DMEM中处理45分钟后,重构测定试剂并添加到培养板中。反应物的发光计数使用微孔板读板器从不透明壁的96孔板确定。乳酸盐测量通过以前所描述的比色法来进行。在PP2研究中,在培养皿中更换含有血清和5 μ M PP2的培养基,并在4小时后收集用于测量。

[0085] 生物能学。细胞的生物能学性质使用Seahorse XFp细胞外通量分析仪,通过按照制造商提供的指南测量氧消耗速率 (OCR) 和细胞外酸化速率 (ECAR) 来表征。在Seahorse测定开始之前,通过滴定研究确定每种细胞系的最佳FCCP浓度。除非另有指明,否则将每孔10,000个细胞接种培养基。在测定之前1小时,更换具有不同底物(对于Cell Mito Stress Test测定来说10mM葡萄糖、2mM谷氨酰胺和1mM丙酮酸;对于Glycolysis Stress Test测定来说2mM谷氨酰胺)的无碳酸氢盐培养基 (Agilent Technologies)。在通过药物投送端口添加各种不同的抑制剂、刺激剂、底物或化合物之前,测量基线OCR和ECAR速率三次。在PP2研究中,将细胞用5 μ M PP2预处理4h,然后进行分析。

[0086] 3 H哇巴因结合测定和ATP酶活性测定。 3 H-哇巴因结合测定和ATP酶活性测定如以前所描述来进行。

[0087] 细胞附着诱导的整合蛋白信号转导。细胞附着诱导的整合蛋白信号转导如以前所述来进行。

[0088] RNAseq分析。RNAseq分析由BGI Tech,China进行。简单来说,从细胞裂解物提取RNA,用DNase 1处理,并使用磁性Oligod(T) 珠来分离mRNA。然后用片段化缓冲液将mRNA片段化,并使用它们作为模板合成cDNA。在琼脂糖凝胶电泳后,选择适合的片段作为模板用于PCR扩增。在QC步骤中,将Agilent 2100Bioanalyzer和ABI StepOnePlus实时PCR系统用于样品文库的定量和定性。将所述文库用HiSeqTM 2000测序仪测序。生物信息学分析通过基因表达的深度分析来进行。

[0089] RNA提取、cDNA合成和定量PCR。总RNA使用QIAGEN RNeasy小提试剂盒来分离。将相同量的总RNA用于合成第一链cDNA,使用用于qRT-PCR的SuperScript III第一链合成SuperMix (ThermoFisher)。将来自于每个样品的cDNA作为模板,用于使用Roche LightCycler® 480实时PCR系统的定量PCR (Syber green)。所有引物由Integrated DNA Technologies (IDT) 合成。 β -肌动蛋白被用作内部对照。

[0090] 统计分析。数据被记录为平均值 $\pm$ SEM(平均值的标准误差)。使用Student's T-检验来度量两个个体组之间的差异,并使用单向方差分析 (ANOVA) 来度量超过两个组之间的差异。将双向ANOVA用于度量超过两个组之间的差异,同时每个组含有超过一个变量。在适合情况下使用单向ANOVA (Bartlett's 检验) 或配对T-检验来度量组织阵列数据之间的差异。使用配对T-检验和随后的Wilcoxon符号秩检验来分析来自于TCGA数据库的基因表达数据。存活性分析通过对数秩存活性检验来度量,小于0.05的p值被认为是显著的。

[0091] 实施例1-磷酸化的Y260作为Src特异性结合位点的鉴定

[0092] 已观察到 α 1Na/K-ATP酶的第二胞浆结构域 (CD2) 起到类似于Src SH2结构域配体

的功能。通过比较来自于不同 α 亚型的CD2的氨基酸序列,发现 $\alpha 1$ CD2而不是来自于其他亚型的CD2,含有单一Tyr (Y260) 残基(图1A)。由于SH2结构域偏好性地结合含有磷酸化的酪氨酸的序列,因此相信Y260可能允许与Src激酶的 $\alpha 1$ 亚型特异性相互作用。

[0093] 为了测试这一假说,产生了表达YFP- $\alpha 2$ CD2或YFP- $\alpha 1$ CD2的稳定细胞系,然后比较了它们结合并改变Src介导的信号转导的能力(图8A)。如图1B中所示, $\alpha 1$ CD2而不是 $\alpha 2$ CD2或对照YFP,从细胞裂解物免疫共沉淀Src激酶。与以前的发现相一致, $\alpha 1$ CD2的表达阻断了哇巴因诱导的ERK活化,而 $\alpha 2$ CD2未能做到这一点(图1C)。为了寻求Y260提供与Src的亚型特异性相互作用的进一步证据,产生了表达 $\alpha 1$ CD2的N-端或C-端的细胞系,并证实了含有Y260的C-端部分而不是N-端部分的表达足以在细胞中阻断哇巴因诱导的ERK活化(图8B-8D)。这些结果表明,Y260可以是存在于 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶中但不存在于其他亚型中的Src特异性相互作用位点。

[0094] 为了进一步评估Y260的重要性,接下来确定了Y260是否可以以Src依赖性方式被磷酸化。在第一组实验中,将 $\alpha 1$ CD2在Y260处磷酸化并使用抗pY260 Na/K-ATP酶 $\alpha 1$ 抗体检测(图1D)。正如预期,在 $\alpha 2$ CD2或对照YFP细胞裂解物中没有观察到磷酸化。其次,在从小鼠组织包括肾、肝、脑和心制备的裂解物中,发现全长 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶在Y260处被磷酸化(图1E)。有趣的是,在不同组织中pY260的水平变化,在心脏中表达最低,并且在所检查的组织中 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶的总表达最低的肝脏中表达最高。

[0095] 为了鉴定负责这种磷酸化的蛋白,将带有GST标签的 $\alpha 1$ CD2与纯化的Src在ATP存在下温育,并使用相同的抗pY260抗体探测Y260磷酸化。如图8E中所描绘,在GST-CD2而不是GST中检测到磷酸化。同样地,使用体外测定法,Src能够将纯化的猪肾 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶在Y260处磷酸化(图2A)。最后,用Src家族激酶抑制剂PP2预处理LLC-PK1细胞减弱了Y260磷酸化(图2B)。为了进一步核实所述发现,从Src家族激酶(Src、Yes和Fyn)被敲除的SYF细胞和Src挽救的SYF细胞(Klinghoffer等,1999)收集细胞裂解物。如图2C中所描绘,在Src挽救的而不是母体SYF细胞中检测到 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶的Y260磷酸化。 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶在SYF细胞中的表达实际上远高于在Src挽救的SYF细胞中的表达。为了探究这种调控的特异性,也测量了 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶中由胰岛素信号转导介导的Y10磷酸化(Feraille等,1999)。如图2B-2C中所描绘,Y10磷酸化不依赖于Src激酶。Src激酶的抑制剂或敲除均不影响Y10磷酸化。这些数据表明Y260是Src特异性磷酸化位点,并且抗pY260抗体特异性识别在Y260处被磷酸化的截短的和全长 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶多肽两者。

[0096] 实施例2-Y260磷酸化代表了Src信号转导的通用特点

[0097] 如果 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶代表了Src的重要的通用调控物,则当细胞用不仅哇巴因而且其他受体配体刺激时预期Y260磷酸化将增加。因此,在其中Src对于信号转导来说是必需的三个不同信号转导途径中测试了Y260磷酸化。首先,在LLC-PK1细胞中哇巴因以时间和浓度依赖性两种方式增加Y260磷酸化(图2D-2E)。为了确保该影响是Y260特异性的,也探测了Y10磷酸化。与以前的研究相一致,哇巴因对Y10磷酸化不显示出影响(图2E)。其次,用EGF刺激Y260磷酸化。EGF与哇巴因相同,产生Na/K-ATP酶的Y260磷酸化以及Src在Y418处的磷酸化的时间和剂量依赖性的刺激(图2F-2G)。此外,将细胞在纤连蛋白包被的板上铺板,并在整合蛋白信号转导途径中分析Y260磷酸化的刺激。注意到Y260磷酸化的增加并与Src的活化良好地相关联(图2H)。这些数据表明Y260磷酸化代表了Src调控的通用特点,不仅与Na/

K-ATP酶的受体功能相关,而且与受体酪氨酸激酶和脂蛋白信号转导相关。

[0098] 实施例3-Y260为Na/K-ATP酶介导的信号转导所需

[0099] 为了调查Y260在Src介导的信号转导中的作用,产生了表达功能丧失的(Y260A)突变体大鼠 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶的稳定细胞系。将 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶敲减细胞系PY-17用于转染,将正常的大鼠 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶挽救的细胞系AAC-19用作对照。对照实验(图9A)显示,克隆21和AAC-19表达可比量的大鼠 $\alpha 1$ 。³H-哇巴因结合测定表明在Y260A突变体细胞中内源猪 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶的表达仅等于总Na/K-ATP酶的约1%(图9D)。在功能上,所述表达的Y260A突变体被表达在质膜中,完全能够挽救 $\beta 1$ 亚基的表达并形成有功能的Na/K-ATP酶,表现出与AAC-19细胞中可比的哇巴因敏感的ATP酶活性(图9B-9E)。

[0100] 接下来,在Src在其中发挥作用的两个不同信号转导途径中测量了Y260A突变的影响。首先,将Y260A突变体和AAC-19细胞用不同浓度的哇巴因处理,并进行Src、ERK和Akt活性的Western印迹测量。在AAC-19细胞中哇巴因刺激Src、ERK和Akt磷酸化。这些刺激被Y260A突变体废止(图3A-3C)。为了确认观察到的影响是由Na/K-ATP酶/Src相互作用的抑制造成的,进行了免疫沉淀分析。与AAC-19细胞相比,Y260A突变引起 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶与Src的结合的显著降低(~60%)(图3D)。对照实验显示Y260A突变体细胞的另一个克隆即克隆24与克隆21相同,也不能对哇巴因刺激做出响应(图10A-10B)。

[0101] 其次,评估了Y260在EGFR信号转导中的作用。将Y260A突变体克隆21和AAC-19细胞暴露于不同浓度的EGF并测量EGFR磷酸化。如图3E中所描绘的,EGF在AAC-19中但不在Y260A突变体细胞中刺激Src激酶活性。与此一致的是,EGF在AAC-19中但不在Y260A突变体细胞中刺激EGFR在Y845处的磷酸化,所述位点是已知的Src磷酸化位点23。有趣的是,观察到在Y260A突变体细胞中基础EGFR Y845磷酸化显著增加,表明了Y260介导的Src相互作用在基础Src和Src效应物活性的调控中的重要作用。

[0102] 为了确证这一发现,首先测量了基础蛋白质酪氨酸磷酸化。如图9F中所示,Y260A细胞表达更多酪氨酸被磷酸化的蛋白质。为了测试这种效应是否是Src介导的,测量了在Y418和Y529处的Src磷酸化。如图9F中所示,在Y260A细胞中Src活性(pY418)提高几乎2倍,但Y529磷酸化没有变化。一致的是,与对Src抑制剂PP2敏感的AAC-19细胞(图9G)相比,在Y260A细胞中基础ERK活性提高(图3B)。

[0103] 实施例4-Y260A突变导致代谢切换

[0104] 上述研究表明,Y260磷酸化是质膜中的Src介导的信号转导对各种不同刺激物做出响应的主要调控机制。为了评估这种新发现的信号转导机制的普遍意义,探测了Y260在细胞代谢的调控中的潜在作用。

[0105] 在Y260A突变体细胞系(克隆21和24两者)的常规培养物中,注意到比对照AAC-19细胞更快的培养基酸化。培养基的测量证实了Y260A突变体细胞产生比AAC-19细胞多80%的乳酸盐(图4A)。这表明Y260介导的Src相互作用的破坏可能引起从线粒体氧化磷酸化向有氧糖酵解的代谢切换。为了进一步试验这一假说,首先通过2-脱氧葡萄糖(2-DG)测量了细胞内ATP含量对糖酵解抑制的响应。与AAC-19细胞相比,Y260A细胞对2-DG敏感得多(图4B)。其次,测量了葡萄糖剥夺对细胞生长的影响。Y260A突变体细胞在不存在葡萄糖的情况下不能生长,而AAC-19细胞生长。事实上,在此期间AAC-19细胞的数目超过倍增(图4C)。

[0106] 然后在不同抑制剂存在下确定了AAC-19和Y260A细胞两者中的细胞外酸化速率

(ECAR)。首先将细胞在无葡萄糖基础培养基中培养。向细胞添加葡萄糖诱导了ECAR的极大提高,表明有氧糖酵解的增加(图4D)。为了测量糖酵解的最大能力,随后添加了抑制线粒体ATP生产的寡霉素,在AAC-19中但不在Y260A细胞中导致ECAR的进一步提高。此外,糖酵解抑制剂2-DG的添加完全逆转了ECAR的提高。数据分析表明Y260A突变体细胞中糖酵解储备的减少和有氧糖酵解的增加(图4E)。当测量氧消耗速率时,除了在Y260A突变体细胞中储备能力下降(图4F)之外,没有注意到线粒体功能(例如呼吸控制比和耦合效率)的重大缺陷(图11B-11C)。由于已知癌基因活化改变细胞代谢表型,因此在Y260A细胞中确定了这种效应是否依赖于Src被 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶的调控异常。如图4G-4H中所描绘,通过用Src抑制剂PP2处理Y260A细胞进行Src抑制,足以降低乳酸盐生产(图4G)和糖酵解速率(图4H)两者。

[0107] 为了进一步调查代谢适应性,通过RNAseq分析比较了Y260A突变体细胞和对照AAC-19细胞的基因表达情况。在Y260A突变体细胞中,参与糖酵解代谢的几个重要基因被显著上调(图11D)。值得注意的是,己糖激酶2亚型(HK2)、丙酮酸脱氢酶激酶(PDK)和乳酸脱氢酶(LDHA)显著增加,这在经历代谢切换的癌细胞中也已被观察到。在Y260A中也观察到葡萄糖转运蛋白GLUT4和几种氨基酸转运蛋白的表达的显著提高,为这些突变体细胞表现出与癌细胞相似的代谢适应性的见解提供了进一步支持。为了进一步证实这些效应由Src激酶的调控异常介导,将Y260A细胞用PP2处理,以观察它是否能够逆转代谢性基因表达的变化。如图11E中所示,PP2处理恢复了大多数这些被上调基因的mRNA水平,正如通过qPCR所测量的。

[0108] 实施例5-在许多癌细胞系中Y260磷酸化减少

[0109] 有鉴于代谢切换在癌症生物学中的重要作用,上述发现引出了癌细胞可能丧失 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶介导的Src调控的能力这一假说。为了试验这一假说,在两组不同的癌细胞系中比较了pY260水平,其应该是Na/K-ATP酶/Src相互作用的指示物。正如在图5A中所示,与相应的对照细胞系相比,在前列腺和乳腺癌细胞系两者中Y260磷酸化极大减少。为了核实这一点,在所选细胞系中将Src激酶免疫沉淀,然后在癌症和对照细胞系之间比较共沉淀的 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶水平。通过免疫共沉淀检测到Na/K-ATP酶/Src相互作用的显著降低(图12A)。

[0110] 实施例6- $\alpha 1$ Na/K-ATP酶的敲减在DU145细胞中提高有氧糖酵解并促进肿瘤异种植物的生长

[0111] 为了测试 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶介导的Src相互作用对有氧糖酵解的控制和肿瘤生长来说是否重要,使用siRNA将DU145前列腺癌细胞中 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶的表达敲减,并产生了稳定细胞系A4-7、A4-3和对照载体转染的DU-P1细胞系。DU-P1细胞表达与母体DU145细胞相近量的 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶,而A4-7细胞显示出约50%的下调(图12B)。功能分析表明 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶的敲减引起Na/K-ATP酶/Src相互作用的显著降低(图5B)。在A4-7细胞中观察到Src及其效应物FAK(粘着斑激酶)活性的显著提高(图5C)。此外,EGF能够在对照DU-P1细胞中但不在A4-7细胞中刺激Src活化和EGFR的Y845磷酸化(图12C)。与Y260A突变体细胞相同,在A4-7细胞中基础EGFR Y845磷酸化提高。此外,A4-7细胞表达更大量的Myc,这指示了它们更高的攻击性和增殖性本质(图5C)。与此相符,在A4-7细胞中检测到乳酸盐生产的进一步提高,其对Src被PP2的抑制敏感(图5D和图12E)。为了比较肿瘤形成能力,针对DU-P1细胞测试了A4-7细胞的细胞增殖速率。A4-7的细胞增殖速率显著高于对照,并被PP2逆转(图5E)。最后,当将对照DU-P1和A4-7细胞植入到NOD/SCID小鼠中时,观察到A4-7相比于DU-P1肿瘤尺寸的接近4倍

的增加(图5F)。

[0112] 实施例7-在几种人类癌症、特别是转移病灶中 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶的表达降低

[0113] 为了评估上述发现的临床相关性,在其中 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶在正常上皮中的表达高的三种不同类型的人类癌症中测量了 $\alpha 1$ 蛋白的表达。首先,分析了66个前列腺癌、12个骨转移和23个正常组织样品。在前列腺癌($n=66$)中与对照($n=23$)相比 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶的表达显著降低(图6A)。这通过成对分析(正常相比于癌, $n=15$)得到确认。更重要的是,在12个骨转移样品中的11个样品中没有可检测的 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶信号。其次,将10个正常乳腺组织和62个导管癌样品与卵巢和淋巴结中的相应转移样品一起进行比较(图6B)。在原发肿瘤中 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶的表达显著降低,并且在转移样品中进一步降低。第三,与对照($n=15$)相比,在肾细胞癌($n=61$)中也发现 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶表达的显著降低(图6C)。有趣的是,肾癌的肾上腺转移中的降低似乎不如前列腺癌的骨病灶中的降低严重。然而,在正常肾小管中 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶被高表达(正常组织中15个样品中的15个被评分为3)。这种表达水平仅在约10%的肾细胞癌(61个样品中的6个)中被检测到,并且在转移病灶中进一步下降到0%。

[0114] 转录调控可能代表了人类癌症中 $\alpha 1$ 表达改变的重要机制。数据库搜索揭示出在TCGA-KIRC数据库中的肾透明细胞癌($n=530$)中, $\alpha 1$ Na/K-ATP酶mRNA的表达显著降低($p<0.001$)。对于正常肾和肾癌来说,平均log₂值分别为11和8.4。最重要的是,这种表达模式与患者存活率反相关,较低的表达与高死亡率相关(图6E)。还检测到前列腺癌中 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶mRNA表达的显著降低。然而,差异小于0.3Log₂值。因此,在前列腺癌中,在降低的mRNA表达与患者存活率之间没有相关性(图13A-13B)。

[0115] 实施例的讨论

[0116] 上述实施例描述了 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶Y260作为Src特异性磷酸化和结合位点,以及Y260磷酸化的增加作为对膜受体的活化做出响应Src介导的信号转导的一般性特点的发现。在人类癌细胞中,似乎这种Src被 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶的动态调控显著减弱或丧失。这种调控异常提高了基础Src活性,导致Src效应物例如ERK、EGFR、Akt和FAK的活化,它们都与癌症进展有关。此外,上述实施例为Src被 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶的调控的丧失引起代谢切换并促进肿瘤异种移植物的形成和生长提供了证据。 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶介导的Src调控和这种调控丧失的结果的示意图在图7中给出。这些和其他重要问题将进一步讨论。

[0117] Na/K-ATP酶 $\alpha 1$ 亚型作为Src家族激酶的未受到充分重视但重要的调控物:最近的研究表明了 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶介导且Src依赖性的途径在胚胎发育的控制、肾脏的盐处理和炎症和ROS胁迫在其中发挥重要作用的疾病进展中的重要作用。有趣的是,似乎 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶也与Src家族激酶的其他成员相互作用,并且这种相互作用(例如Lyn)对CD36和CD40介导的信号转导来说是关键的。上文呈现的新发现证实了 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶结合并调控Src的能力。具体来说,Y260及其被Src激酶的磷酸化在许多Src激酶介导的信号转导途径中显得是重要的,因为它不仅参与哇巴因信号转导,而且参与EGF以及整合蛋白信号转导。这些数据表明,在质膜中 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶是Src激酶的配偶体(调控物),这得到功能丧失的Y260A突变体研究的进一步支持。此外,所述Y260A突变体Na/K-ATP酶作为离子泵完全是有功能的,但在结合和调控Src方面缺陷。因此,它不仅阻断哇巴因而且阻断EGF诱导的Src信号转导。此外,它也引起Src调控异常,因为在Y260A细胞中基础Src活性提高几乎2倍。附带地,检测到ERK活性的提高,其对Src抑制剂PP2敏感(图9G)。这些发现与以前的观察相一致,即 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶的

敲减或结合Src的 $\alpha 1$ 突变体的表达提高基础Src以及因此ERK活性。因此,所述新发现证实了这一论点,即 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶是Src的质膜池的主要调控物。不希望受到任何特定理论或机制限制,进一步相信 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶与Src之间的相互作用的丧失将引起Src的调控异常,这可以引起哇巴因诱导的信号转导的失效和提高的基础Src活性。

[0118] 尽管许多蛋白质与Src相互作用并调控它,但 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶似乎是可以通过它的两个结构域-结构域相互作用同时调控Src的唯一一种蛋白质。这种平衡且顺序的调控对于Src信号转导的动态本质来说是必不可少的。不论基础Src活性被提高还是降低,任一种相互作用的破坏都将改变Src信号转导,引起细胞代谢和生长的变化。

[0119] $\alpha 1$ Na/K-ATP酶在有氧糖酵解的调控中的作用及其在癌症生物学中的意义:尽管已暗示癌基因如KRAS或PI3K基因中的突变与癌细胞中观察到的代谢切换有关,但仍不清楚原癌基因SRC的调控异常如何影响肿瘤生长。Src家族激酶(SFK)在癌症中常常被过度活化,但在自然界中Src中的活化突变或染色体重排相对罕见。隐藏在人类癌症中缺陷的Src调控之下的精确分子机制仍有待解析。

[0120] 有趣的是,Y260A突变体细胞经历从线粒体氧化磷酸化向有氧糖酵解的代谢切换(即乳酸盐生产的增加),这种现象通常在致癌细胞中看到。在这些细胞中几种重要的糖酵解基因的表达被上调,这进一步支持了所述表型。一致的是,PP2处理不仅降低这些参与糖酵解的上调基因的表达,而且阻断乳酸盐生产的增加(图4G-4H)。简短来说,这些研究为 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶可能如何通过Src充当细胞代谢的调控物提供了分子视角。

[0121] 还相信,这种机制可能提供了将癌症中的Na/K-ATP酶 $\alpha 1$ 亚基下调与缺陷的Src调控以及因此改变的细胞代谢相连的新的联系。上述研究证实,带有Y260A突变体Na/K-ATP酶的细胞具有提高的有氧糖酵解和乳酸盐生产。在人类癌细胞系中Y260磷酸化显著减少,表明Src被 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶的调控的丧失。这一发现被组织阵列数据进一步证实,所述数据显示在三种不同类型的人类癌症中 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶显著减少。其他人也已报告在肺癌、皮肤癌和睾丸癌中Na/K-ATP酶 $\alpha 1$ 的表达降低。显然,转录(例如肾)和翻译后机制(例如前列腺)两者都参与 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶的下调。所述翻译后调控似乎涉及 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶的胞吞作用的提高。

[0122] $\alpha 1$ Na/K-ATP酶在癌症生物学中的重要性被另外两个观察进一步证实。首先,在来自于前列腺癌、乳腺癌和肾细胞癌的转移样品中 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶的表达被进一步降低。相对于原发肿瘤组织,在转移病灶中Src活性更高。合理的是, $\alpha 1$ Na/K-ATP酶表达的降低减少了Src的调控,导致基础Src活性的提高。这得到下述数据的支持,即在 $\alpha 1$ 敲减的A4-7细胞中Src及其效应物例如EGFR和FAK的活性被进一步提高(图5C和图12C)。此外,A4-7细胞具有提高的乳酸盐生产和c-Myc表达(图5C-5D),这指示了它们更具攻击性的状态。这被当异种移植到小鼠中时肿瘤尺寸的几乎4倍的增加再次证实(图5F)。这一观察与使用其他Src调控物如Csk所报告的敲减研究相一致。其次,TCGA-KIRC数据库中肾透明细胞癌($n=530$)的数据分析揭示出在患者样品中 $\alpha 1$ mRNA的表达显著降低。这种降低与患有肾透明细胞癌的患者们的生存率反相关。

[0123] 简短来说,所述新发现为 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶通过调控细胞Src激酶而起到类似肿瘤抑制剂的作用提供了强力证据。此外,据认为,Y260磷酸化可以用作癌症中Na/K-ATP酶/Src相互作用的指示物。这在其中据报道 $\alpha 1$ Na/K-ATP酶的表达高的某些癌症类型中可能是重要的。最后,重要的是指出尽管已确认代谢切换在肿瘤发生中发挥作用,但数据不允许我们得

出A4-7细胞中肿瘤发生的提高是由糖酵解提高造成的这一结论。有趣的是,观察到在Y260A细胞中这种切换事实上抑制细胞增殖(图11A)。这种细胞命运的表现矛盾可以通过最新的发现来解释,所述发现表明正常细胞中癌基因的活化可以诱导它们进入被称为衰老的非增殖状态,而癌细胞中癌基因的活化可以导致它们变得过度增殖。

[0124] 本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请通过引用并入本文,其程度等同于每个单独的出版物、专利和专利申请被具体且单独地指明通过引用并入本文,包括在下述名单中阐述的参考文献:

[0125] 参考文献

[0126] 1.DeNicola,G.M.&Cantley,L.C.,癌症的燃料选择:挑食者的新调味剂(Cancer's Fuel Choice:New Flavors for a Picky Eater),Molecular cell 60,514-523,doi:10.1016/j.molcel.2015.10.018(2015)。

[0127] 2.Irby,R.B.&Yeatman,T.J.,Src表达和活化在人类癌症中的作用(Role of Src expression and activation in human cancer),Oncogene 19,5636-5642,doi:10.1038/sj.onc.1203912(2000)。

[0128] 3.Liang,J.等,PKM2被Cdc25A的去磷酸化促进瓦博格效应和肿瘤发生(PKM2 dephosphorylation by Cdc25A promotes the Warburg effect and tumorigenesis),Nat Commun 7,12431,doi:10.1038/ncomms12431(2016)。

[0129] 4.Zhang,J.等,己糖激酶的c-Src磷酸化和活化促进肿瘤发生和转移(c-Src phosphorylation and activation of hexokinase promotes tumorigenesis and metastasis),Nat Commun 8,13732,doi:10.1038/ncomms13732(2017)。

[0130] 5.Jin,L.等,LDHA的磷酸化介导的活化促进癌细胞侵入和肿瘤转移(Phosphorylation-mediated activation of LDHA promotes cancer cell invasion and tumour metastasis),Oncogene 36,3797-3806,doi:10.1038/onc.2017.6(2017)。

[0131] 6.Cairns,R.A.,Harris,I.S.&Mak,T.W.,癌细胞代谢的调控(Regulation of cancer cell metabolism),Nature reviews.Cancer 11,85-95,doi:10.1038/nrc2981(2011)。

[0132] 7.Liang,M.等,非泵送性Na/K-ATP酶池的鉴定(Identification of a pool of non-pumping Na/K-ATPase),The Journal of biological chemistry282,10585-10593(2007)。

[0133] 8.Lingrel,J.B.,Na,K-ATP酶的强心性甾类/哇巴因结合位点的生理意义(The physiological significance of the cardiotonic steroid/ouabain-binding site of the Na,K-ATPase),Annu Rev Physiol 72,395-412,doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135725(2010)。

[0134] 9.Blanco,G.&Wallace,D.P.,在常染色体显性多囊肾病中哇巴因作为囊肿生成因子的新作用(Novel role of ouabain as a cystogenic factor in autosomal dominant polycystic kidney disease),American journal of physiology.Renal physiology 305,F797-812,doi:10.1152/ajprenal.00248.2013(2013)。

[0135] 10.Cui,X.&Xie,Z.,蛋白质相互作用和Na/K-ATP酶介导的信号转导(Protein Interaction and Na/K-ATPase-Mediated Signal Transduction),Molecules(Basel,

Switzerland) 22, doi:10.3390/molecules22060990 (2017)。

[0136] 11. Tian, J. 等, Src与Na⁺/K⁺-ATP酶的结合形成有功能的信号转导复合物 (Binding of Src to Na⁺/K⁺-ATPase forms a functional signaling complex), *Molecular biology of the cell* 17, 317-326 (2006)。

[0137] 12. Ye, Q. 等, 将离子运输偶联到蛋白质激酶活性的潜在受体的鉴定 (Identification of a potential receptor that couples ion transport to protein kinase activity), *The Journal of biological chemistry* 286, 6225-6232, doi: 10.1074/jbc.M110.202051 (2011)。

[0138] 13. Ye, Q. 等, 构象转变缺陷的突变体 α 1Na/K-ATP酶的表达减弱Src介导的信号转导 (Expression of mutant α 1 Na/K-ATPase defective in conformational transition attenuates Src-mediated signal transduction), *The Journal of biological chemistry* 288, 5803-5814, doi:10.1074/jbc.M112.442608 (2013)。

[0139] 14. Li, Z. & Xie, Z., Na/K-ATP酶/Src复合物和强心性甾类激活的蛋白质激酶级联 (The Na/K-ATPase/Src complex and cardiotonic steroid-activated protein kinase cascades), *Pflugers Arch* 457, 635-644, doi:10.1007/s00424-008-0470-0 (2009)。

[0140] 15. Banerjee, M., Duan, Q. & Xie, Z., Na/K-ATP酶 α 1亚基的第二胞浆结构域对Src激酶的SH2配体样效应 (SH2 Ligand-Like Effects of Second Cytosolic Domain of Na/K-ATPase α 1 Subunit on Src Kinase), *PloS one* 10, e0142119, doi:10.1371/journal.pone.0142119 (2015)。

[0141] 16. Xie, J. 等, 在 α 1缺陷的猪肾上皮细胞中大鼠NaK-ATP酶 α 2的表达能够进行离子泵送但不能进行哇巴因诱导的信号转导 (Expression of rat NaK-ATPase α 2 enables ion pumping but not ouabain-induced signaling in α 1-deficient porcine renal epithelial cells), *Am J Physiol* 309, 373-382, doi:10.1152/ajpcell.00103.2015 (2015)。

[0142] 17. Madan, N. 等, 通过大鼠Na/K-ATP酶的 α 3亚型的Src不依赖性ERK信号转导 (Src-independent ERK signaling through the rat α 3 isoform of Na/K-ATPase), *American journal of physiology. Cell physiology* 312, C222-c232, doi:10.1152/ajpcell.00199.2016 (2017)。

[0143] 18. Songyang, Z. 等, SH2结构域识别特定磷酸肽酶序列 (SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences), *Cell* 72, 767-778 (1993)。

[0144] 19. Klinghoffer, R.A., Sachsenmaier, C., Cooper, J.A. & Soriano, P., Src家族激酶为整合蛋白但不为PDGFR信号转导所需 (Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction), *The EMBO journal* 18, 2459-2471, doi:10.1093/emboj/18.9.2459 (1999)。

[0145] 20. Feraille, E. 等, 肾近端小管细胞中Na⁺, K⁽⁺⁾-ATP酶活性的胰岛素诱导的刺激依赖于 α -亚基在Tyr-10处的磷酸化 (Insulin-induced stimulation of Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase activity in kidney proximal tubule cells depends on phosphorylation of the α -subunit at Tyr-10), *Molecular biology of the cell* 10, 2847-2859 (1999)。

[0146] 21. Playford, M.P. & Schaller, M.D., 在正常和肿瘤生物学中Src与整合蛋白之间

的相互作用(The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology), *Oncogene* 23,7928-7946,doi:10.1038/sj.onc.1208080 (2004)。

[0147] 22.Lai,F.等,能够泵送但信号转导缺陷的突变体 α 1Na/K-ATP酶的鉴定(Identification of a mutant α 1Na/K-ATPase that pumps but is defective in signal transduction),*The Journal of biological chemistry* 288,13295-13304,doi:10.1074/jbc.M113.467381 (2013)。

[0148] 23.Sato,K.,受EGFR在Tyr845上的磷酸化调控的细胞功能(Cellular functions regulated by phosphorylation of EGFR on Tyr845),*International journal of molecular sciences* 14,10761-10790,doi:10.3390/ijms140610761 (2013)。

[0149] 24.TeSlaa,T.&Teitell,M.A.,监测糖酵解的技术(Techniques to monitor glycolysis),*Methods in enzymology* 542,91-114,doi:10.1016/b978-0-12-416618-9.00005-4 (2014)。

[0150] 25.Levine,A.J.&Puzio-Kuter,A.M.,癌症中代谢切换被癌基因和肿瘤抑制基因的控制(The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes),*Science (New York, N.Y.)* 330,1340-1344,doi:10.1126/science.1193494 (2010)。

[0151] 26.Bertram,J.S.,癌症的分子生物学(The molecular biology of cancer),*Molecular aspects of medicine* 21,167-223 (2000)。

[0152] 27.Grander,D.,突变的癌基因和肿瘤抑制基因如何引起癌症?(How do mutated oncogenes and tumor suppressor genes cause cancer?),*Medical oncology (Northwood, London, England)* 15,20-26 (1998)。

[0153] 28.Hitosugi,T.等,酪氨酸磷酸化抑制PKM2以促进瓦博格效应和肿瘤生长(Tyrosine phosphorylation inhibits PKM2 to promote the Warburg effect and tumor growth),*Science signaling* 2,ra73,doi:10.1126/scisignal.2000431 (2009)。

[0154] 29.Lunt,S.Y.&Vander Heiden,M.G.,有氧糖酵解:满足细胞增殖的代谢需求(Aerobic glycolysis:meeting the metabolic requirements of cell proliferation),*Annual review of cell and developmental biology* 27,441-464,doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154237 (2011)。

[0155] 30.Barthel,A.等,丝氨酸/苏氨酸激酶Akt1对GLUT1基因转录的调控(Regulation of GLUT1 gene transcription by the serine/threonine kinase Akt1),*The Journal of biological chemistry* 274,20281-20286 (1999)。

[0156] 31.Vander Heiden,M.G.等,生长因子可以通过对葡萄糖代谢的作用来影响细胞生长和存活(Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism),*Molecular and cellular biology* 21,5899-5912 (2001)。

[0157] 32.Wieman,H.L.,Wofford,J.A.&Rathmell,J.C.,细胞因子刺激通过Glut1活性和转运的磷脂酰肌醇-3激酶/Akt调控来促进葡萄糖摄取(Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking),*Molecular biology of the cell* 18,1437-1446,doi:

10.1091/mbc.E06-07-0593 (2007)。

[0158] 33.Glossmann,H.,Presek,P.&Eigenbrodt,E.,劳斯肉瘤病毒的src基因产物与丙酮酸激酶失活因子的结合 (Association of the src-gene product of Rous sarcoma virus with a pyruvate-kinase inactivation factor),Molecular and cellular endocrinology 23,49-63(1981)。

[0159] 34.Koh,C.M.等,MYC和前列腺癌 (MYC and Prostate Cancer),Genes&cancer 1, 617-628,doi:10.1177/1947601910379132 (2010)。

[0160] 35.Ward,P.S.&Thompson,C.B.,代谢重编程:甚至warburg都没有预料到的癌症标志 (Metabolic reprogramming:a cancer hallmark even warburg did not anticipate),Cancer cell 21,297-308,doi:10.1016/j.ccr.2012.02.014 (2012)。

[0161] 36.Normanno,N.等,癌症中的表皮生长因子受体 (EGFR) 信号转导 (Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer),Gene 366,2-16,doi:10.1016/j.gene.2005.10.018 (2006)。

[0162] 37.Samatar,A.A.&Poulikakos,P.I.,在癌症中靶向RAS-ERK信号转导:希望和挑战 (Targeting RAS-ERK signalling in cancer:promises and challenges),Nature reviews.Drug discovery 13,928-942,doi:10.1038/nrd4281 (2014)。

[0163] 38.Wang,Y.等,TRIB1通过经FAK/Src和ERK途径活化MMP-2来促进结肠直肠癌细胞迁移和侵入 (TRIB1 promotes colorectal cancer cell migration and invasion through activation MMP-2via FAK/Src and ERK pathways),Oncotarget 8,47931-47942,doi:10.18632/oncotarget.18201 (2017)。

[0164] 39.Dvela-Levitt,M.等,母体循环哇巴因的减少损害子代生长和肾脏发育 (Reduction in maternal circulating ouabain impairs offspring growth and kidney development),Journal of the American Society of Nephrology:JASN 26, 1103-1114,doi:10.1681/asn.2014020130 (2015)。

[0165] 40.Liu,J.等,肾近端小管中Na/K-ATP酶信号转导受损对Dahl盐敏感性高血压有贡献 (Impairment of Na/K-ATPase signaling in renal proximal tubule contributes to Dahl salt-sensitive hypertension),The Journal of biological chemistry 286, 22806-22813,doi:10.1074/jbc.M111.246249 (2011)。

[0166] 41.Sodhi,K.等,pNaKtide抑制Na/K-ATP酶活性氧物质扩增并减弱脂肪生成 (pNaKtide Inhibits Na/K-ATPase Reactive Oxygen Species Amplification and Attenuates Adipogenesis),Science advances Vol.1,no.9 (2015)。

[0167] 42.Sodhi,K.等,在喂食西式饮食的C57Bl6和ApoE敲除小鼠中pNaKtide通过阻断Na/K-ATP酶/ROS扩增来减轻脂肪性肝炎和动脉粥样硬化 (pNaKtide Attenuates Steatohepatitis and Atherosclerosis by Blocking Na/K-ATPase/ROS Amplification in C57Bl6 and ApoE Knockout Mice Fed a Western Diet),7,193,doi:10.1038/s41598-017-00306-5 (2017)。

[0168] 43.Liu,J.等,用pNaKtide减弱Na/K-ATP酶介导的氧化剂扩增可改善实验性尿毒症心肌病 (Attenuation of Na/K-ATPase Mediated Oxidant Amplification with pNaKtide Ameliorates Experimental Uremic Cardiomyopathy),Nature

Communications (2016)。

[0169] 44.Kennedy,D.J.等,在肾脏中CD36和Na/K-ATP酶- α 1形成促炎性信号转导(CD36 and Na/K-ATPase- α 1 form a proinflammatory signaling loop in kidney), *Hypertension* (Dallas, Tex.:1979) 61,216-224,doi:10.1161/hypertensionaha.112.198770 (2013)。

[0170] 45.Chen,Y.等,氧化型LDL结合性CD36在巨噬细胞中召集促进动脉粥样硬化的Na⁺/K⁺-ATP酶-Lyn复合物(Oxidized LDL-bound CD36 recruits an Na⁺/K⁺-ATPase-Lyn complex in macrophages that promotes atherosclerosis),*Science signaling* 8,ra91,doi:10.1126/scisignal.aaa9623 (2015)。

[0171] 46.Xie,J.F.等,在肾实质中Na/K-ATP酶/Src复合物介导CD40的调控(Na/K-ATPase/Src complex mediates regulation of CD40 in renal parenchyma),*Nephrology Dial Transplant* (2017)。

[0172] 47.Shvartsman,D.E.等,Src激酶活性和SH2结构域调控Src与脂类和蛋白质靶的结合的动力学(Src kinase activity and SH2 domain regulate the dynamics of Src association with lipid and protein targets),*The Journal of cell biology* 178,675-686,doi:10.1083/jcb.200701133 (2007)。

[0173] 48.Sakai,H.等,人类结肠直肠癌中Na(+),K(+)-ATP酶 α 3亚型的上调和 α 1亚型的下调(Up-regulation of Na(+),K(+)-ATPase α 3-isoform and down-regulation of the α 1-isoform in human colorectal cancer),*FEBS letters* 563,151-154,doi:10.1016/S0014-5793(04)00292-3S0014579304002923[pil] (2004)。

[0174] 49.Baker Bechmann,M.等,结肠直肠癌和肝转移中的Na,K-ATP酶同工酶(Na,K-ATPase Isozymes in Colorectal Cancer and Liver Metastases),*Frontiers in physiology* 7,9,doi:10.3389/fphys.2016.00009 (2016)。

[0175] 50.Salyer,S.A.等,在高转移性乳腺癌细胞中液泡ATP酶驱动的钾转运(Vacuolar ATPase driven potassium transport in highly metastatic breast cancer cells),*Biochimica et biophysica acta* 1832,1734-1743,doi:10.1016/j.bbadis.2013.04.023 (2013)。

[0176] 51.Uhlen,M.等,蛋白质组学:人类蛋白质组的基于组织的图谱(Proteomics.Tissue-based map of the human proteome),*Science* (New York,N.Y.) 347,1260419,doi:10.1126/science.1260419 (2015)。

[0177] 52.Li,Z.等,Na/K-ATP酶模拟物pNaKtide肽抑制人类癌细胞的生长(Na/K-ATPase mimetic pNaKtide peptide inhibits the growth of human cancer cells),*The Journal of biological chemistry* 286,32394-32403,doi:10.1074/jbc.M110.207597 (2011)。

[0178] 53.Talamonti,M.S.,Roh,M.S.,Curley,S.A.&Gallick,G.E.,在人类结肠直肠癌的进展期中pp60c-src的活性和水平提高(Increase in activity and level of pp60c-src in progressive stages of human colorectal cancer),*The Journal of clinical investigation* 91,53-60,doi:10.1172/jci116200 (1993)。

[0179] 54.Hiscox,S.等,在耐他莫昔芬乳腺癌细胞中提高的Src活性促进细胞侵入和死

亡(Elevated Src activity promotes cellular invasion and motility in tamoxifen resistant breast cancer cells),Breast cancer research and treatment 97,263-274,doi:10.1007/s10549-005-9120-9(2006)。

[0180] 55.Kunte,D.P.等,肿瘤抑制基因C-端Src激酶的下调:癌前结肠上皮过度增殖期间的早期事件(Down-regulation of the tumor suppressor gene C-terminal Src kinase:an early event during premalignant colonic epithelial hyperproliferation),FEBS letters 579,3497-3502,doi:10.1016/j.febslet.2005.05.030(2005)。

[0181] 56.Mathieu,V.等,钠泵 $\alpha 1$ 亚基:用于转移性黑素瘤治疗的与疾病进展相关的靶(The Sodium Pump $\alpha 1$ Subunit:a Disease Progression-Related Target for Metastatic Melanoma Treatment),Journal of cellular and molecular medicine,doi:JCMM708[pii]10.1111/j.1582-4934.2009.00708.x(2009)。

[0182] 57.Hanahan,D.&Weinberg,R.A.,癌症的标志:下一代(Hallmarks of cancer:the next generation),Cell 144,646-674,doi:10.1016/j.cell.2011.02.013(2011)。

[0183] 58.Hanahan,D.&Weinberg,R.A.,癌症的标志(The hallmarks of cancer),Cell 100,57-70,doi:S0092-8674(00)81683-9[pii](2000)。

[0184] 59.Tian,J.等,钠泵表达的变化决定了哇巴因对细胞生长的影响(Changes in sodium pump expression dictate the effects of ouabain on cell growth),The Journal of biological chemistry 284,14921-14929,doi:M808355200[pii]10.1074/jbc.M808355200(2009)。

[0185] 60.Barker,S.B.&Summerson,W.H.,生物材料中乳酸的比色法测定(The colorimetric determination of lactic acid in biological material),Journal of Biological Chemistry 138,535-554(1941)。

[0186] 应该理解,本公开主题内容的各种不同细节可以被改变而不背离本文公开的主题内容的范围。此外,上面的描述仅仅是出于说明的目的而不是出于限制的目的。

Na/K-ATP 酶亚型	Y260位置
人类 $\alpha 1$	255 RGIVVYTGDRT 265
人类 $\alpha 2$	253 RGIVATGDRT 263
人类 $\alpha 3$	245 RGVVATGDRT 255
人类 $\alpha 4$	263 RGIVATGDST 273

图1A

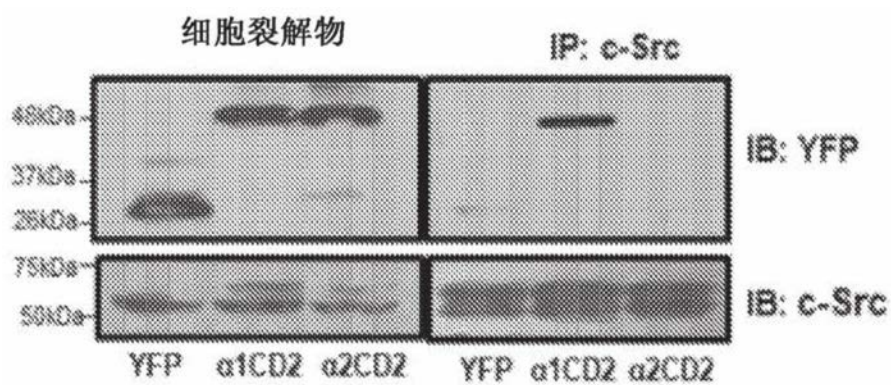


图1B

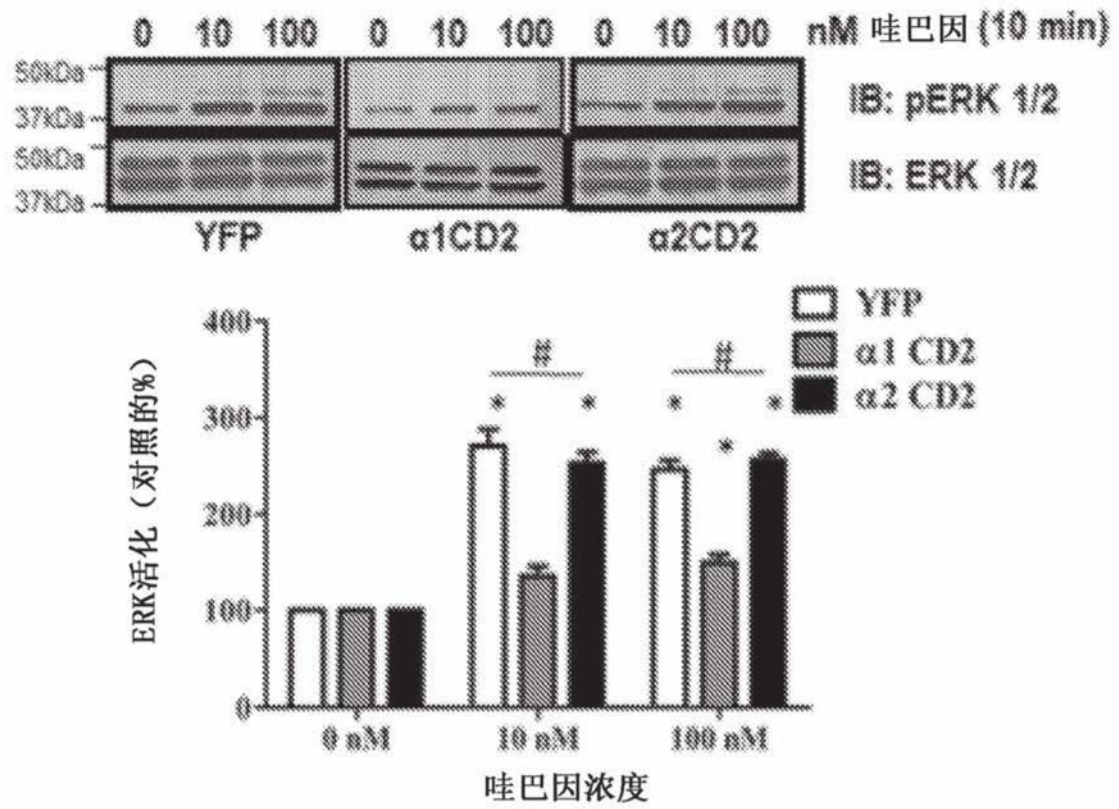


图1C

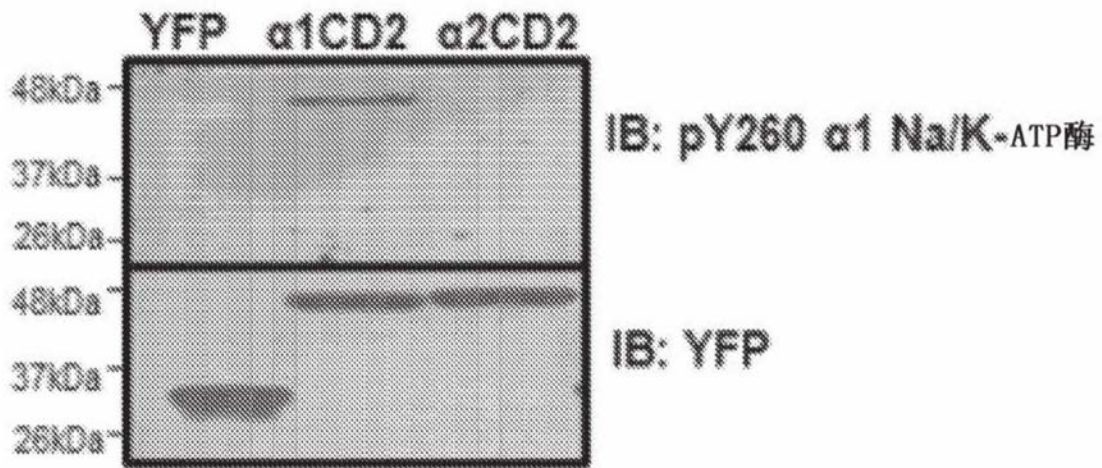


图1D

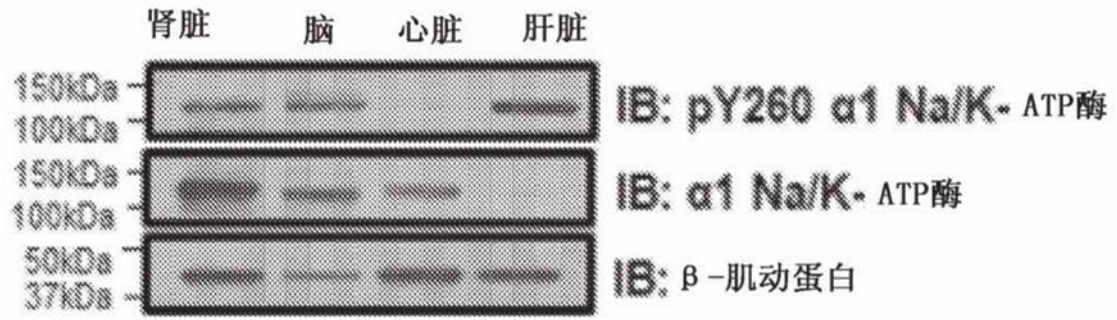


图1E

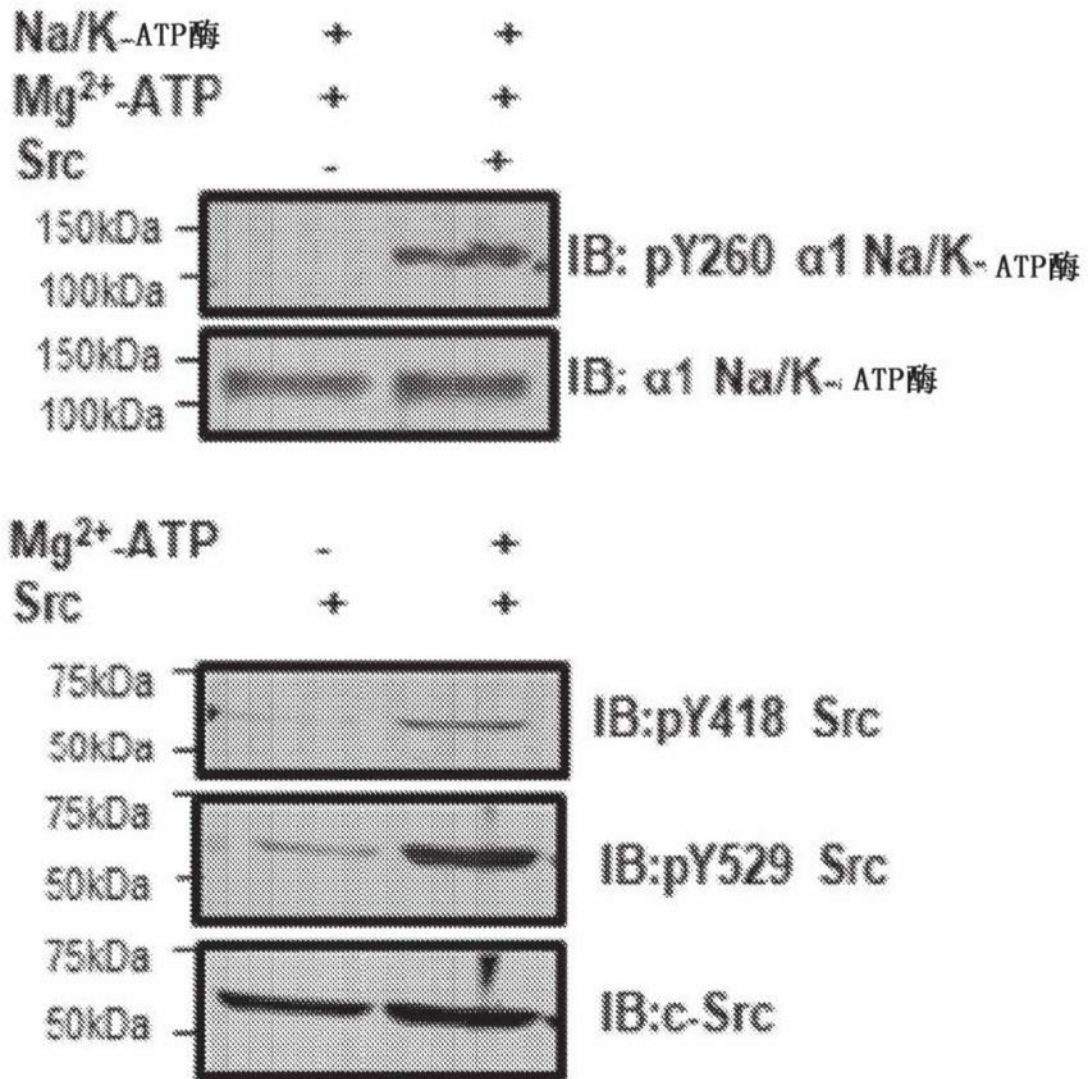


图2A

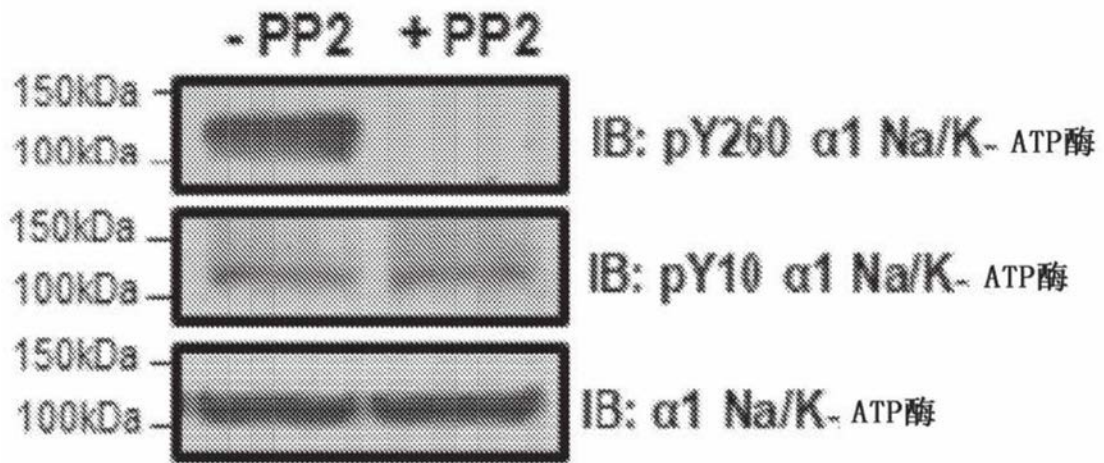


图2B

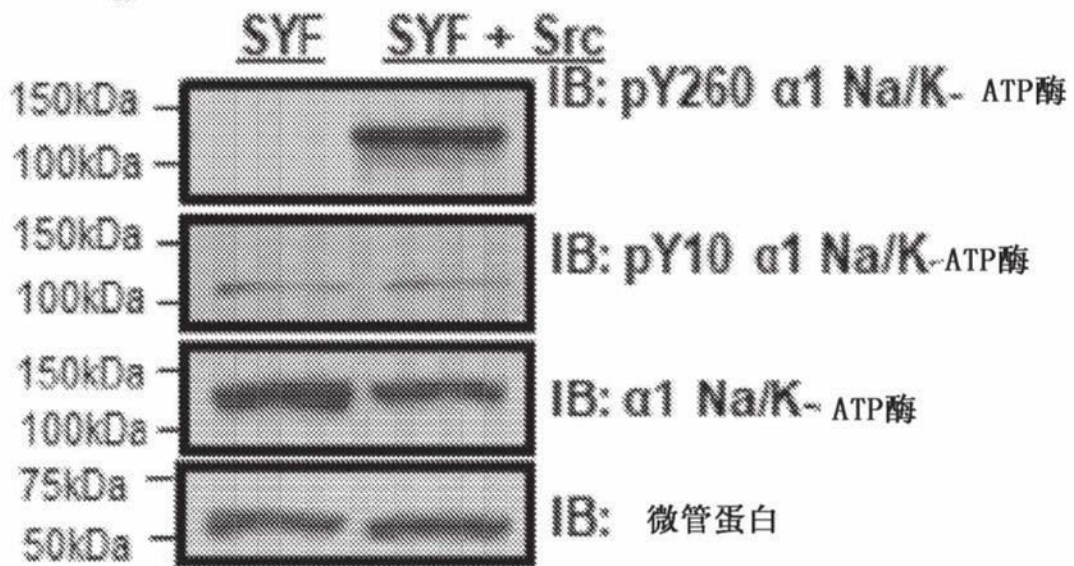


图2C

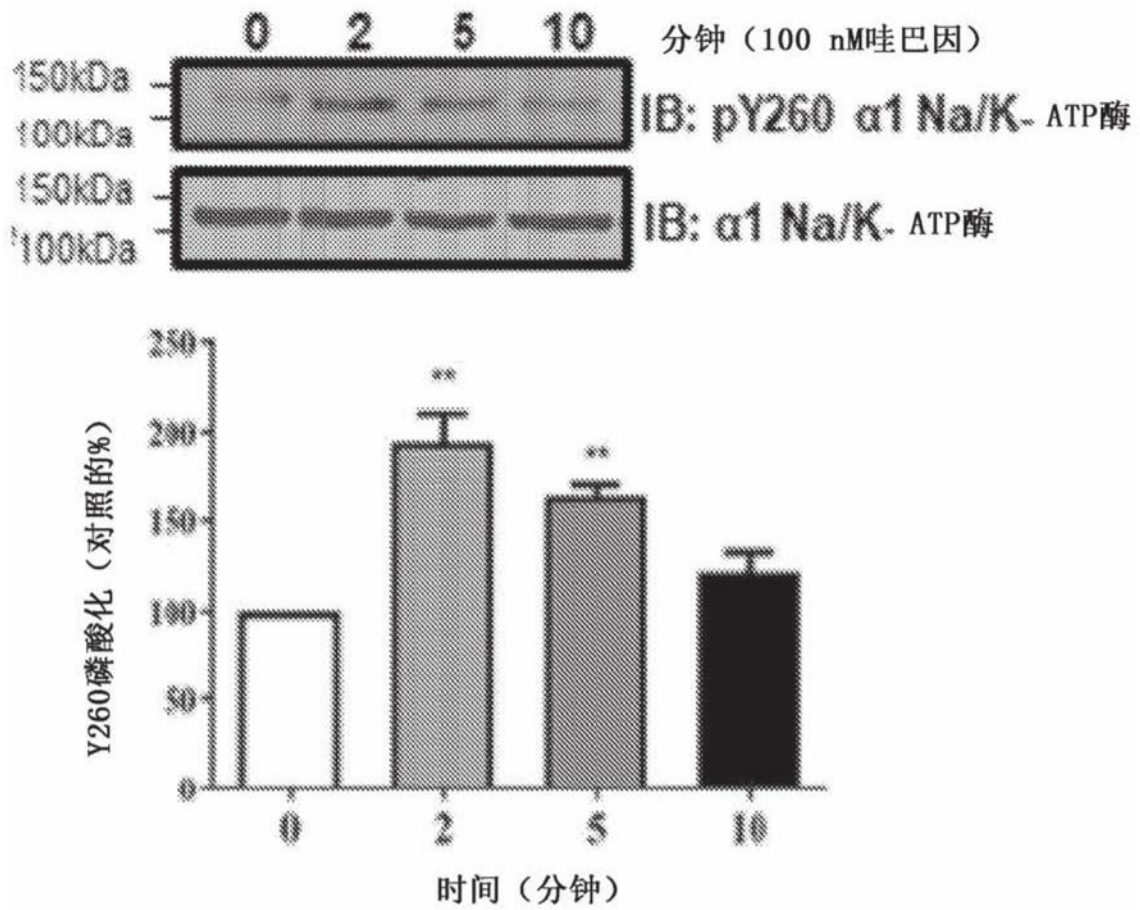


图2D

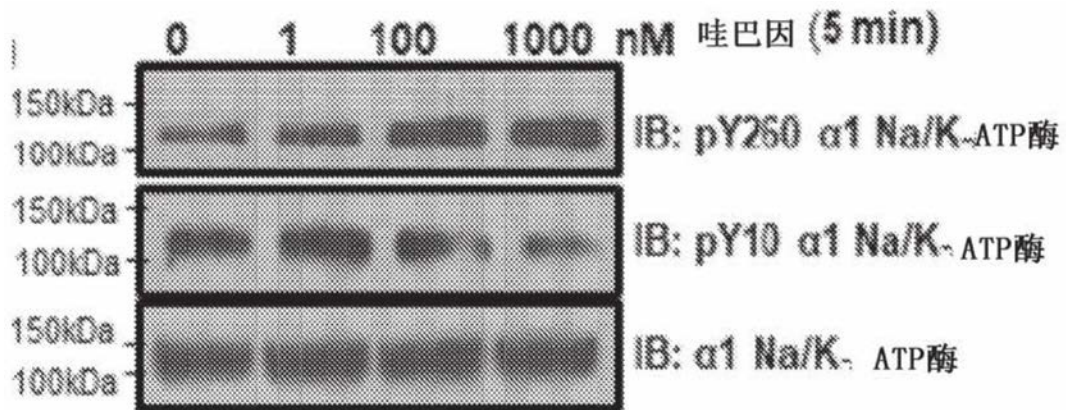


图2E

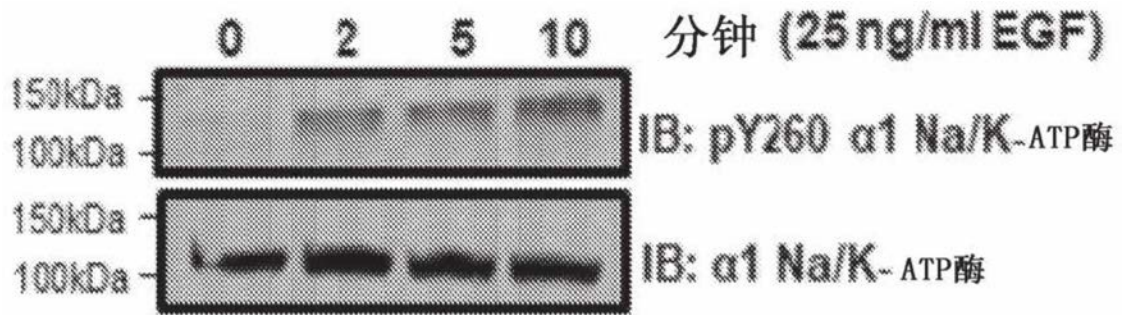


图2F

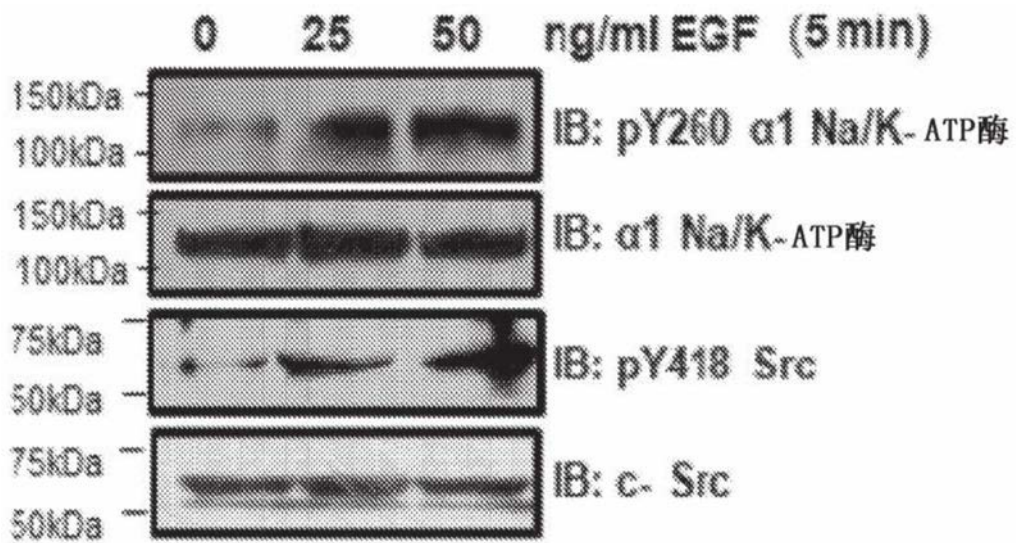


图2G

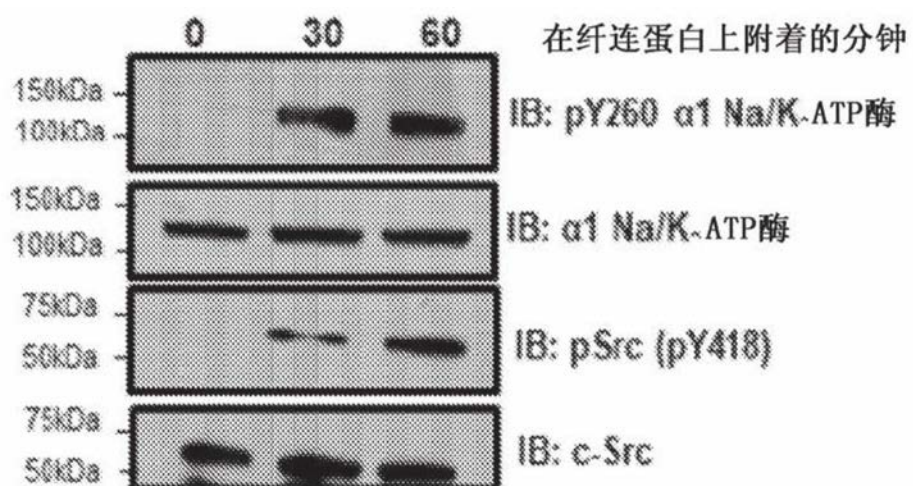


图2H

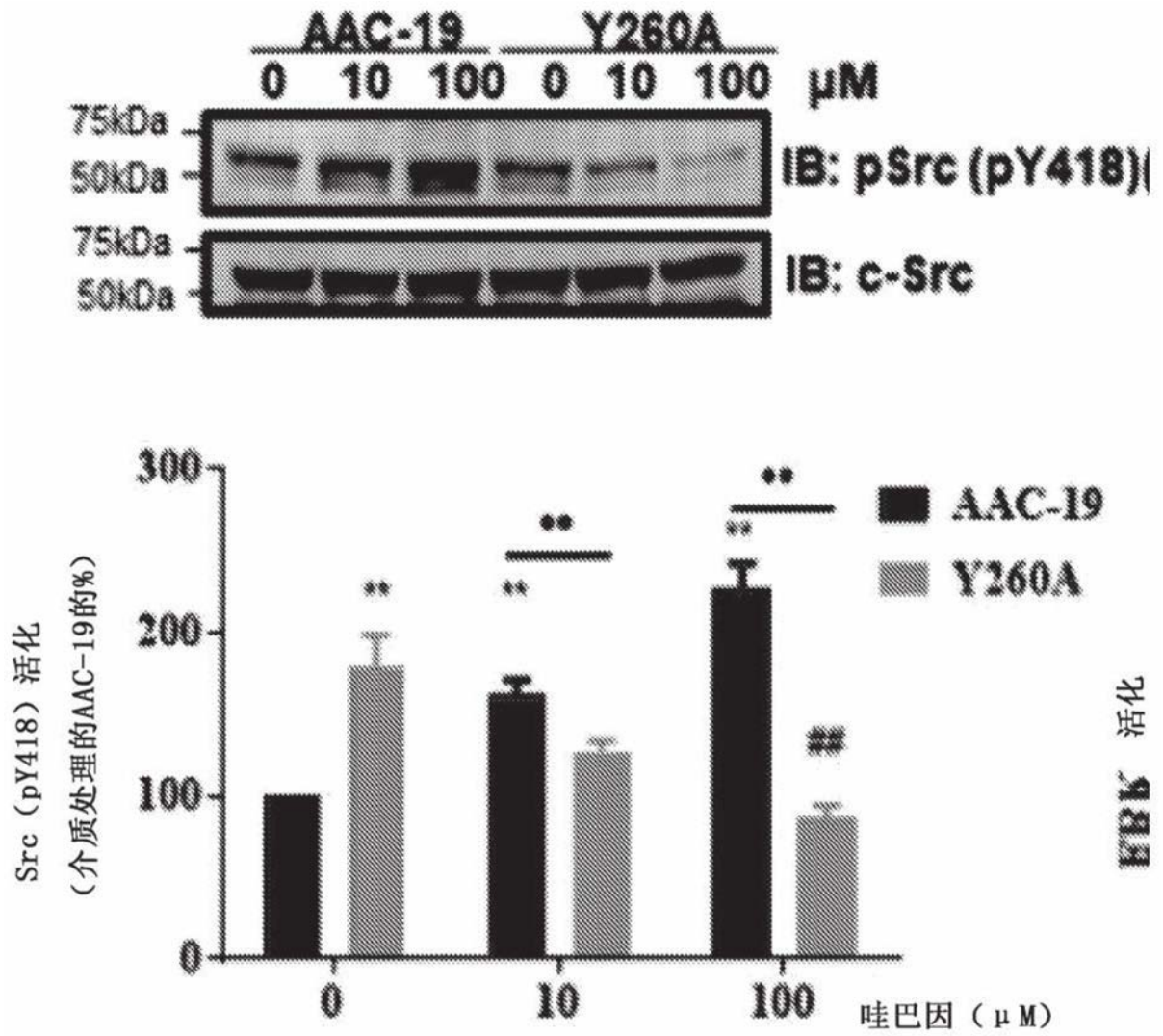


图3A

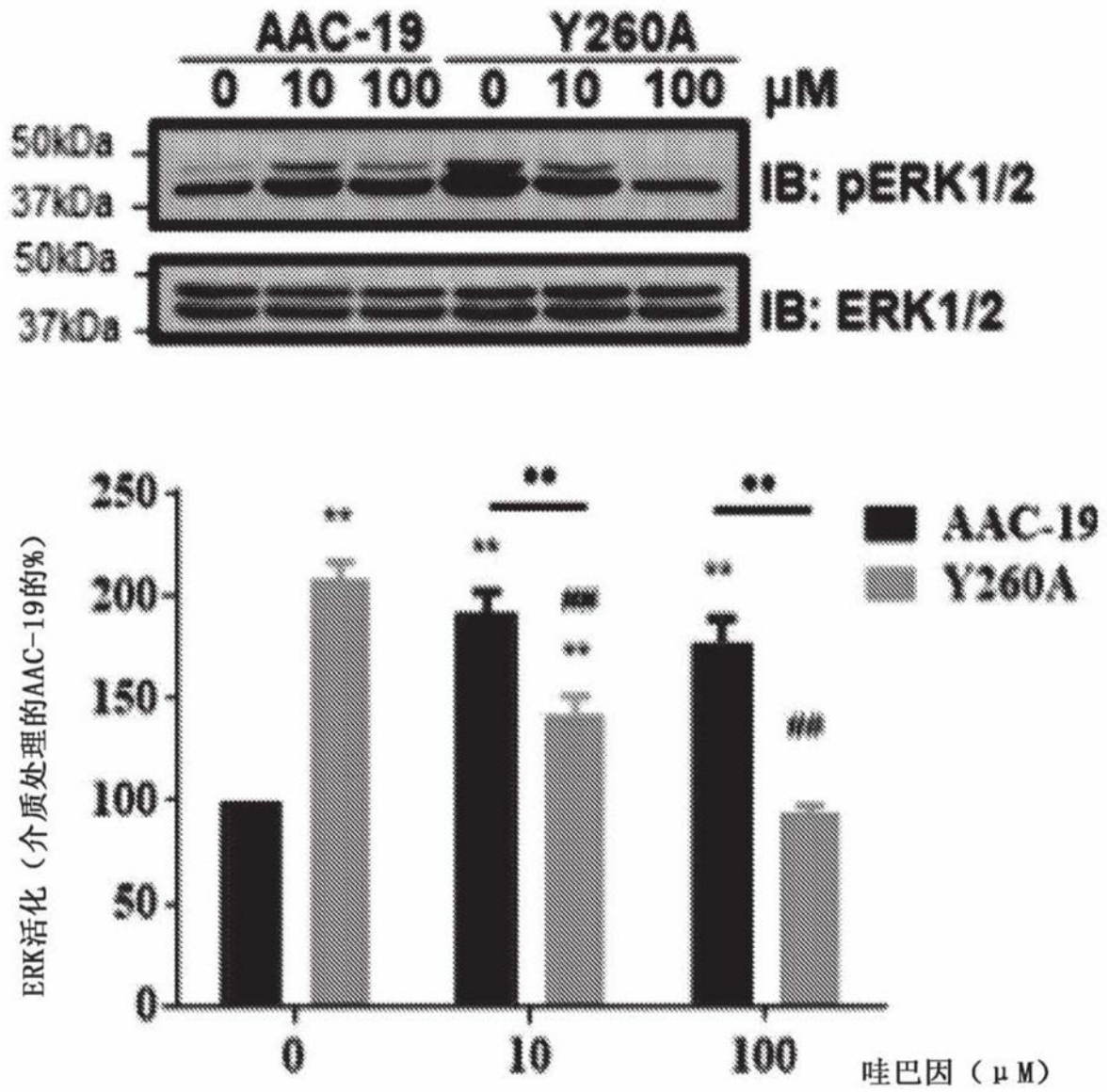


图3B

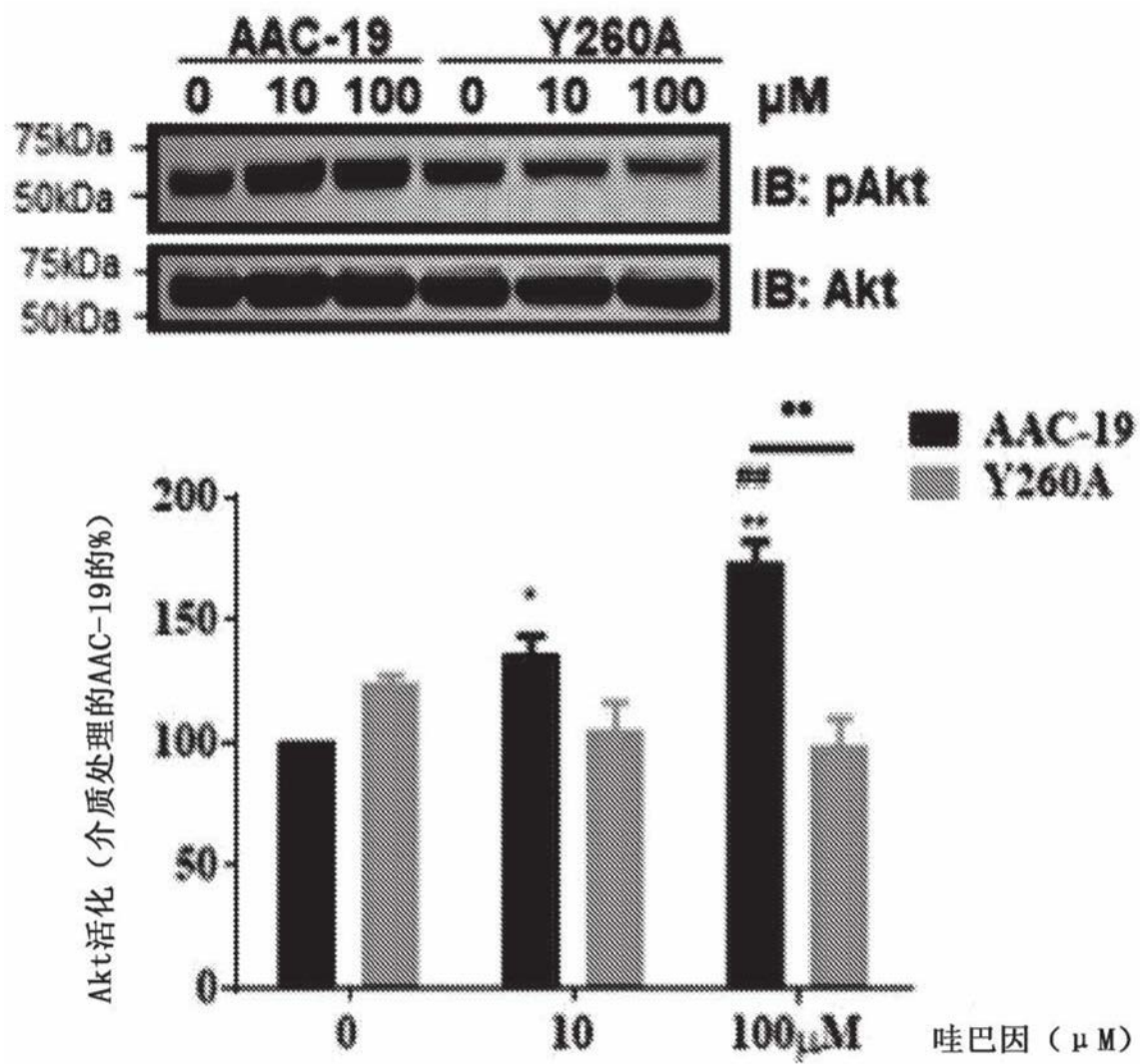


图3C

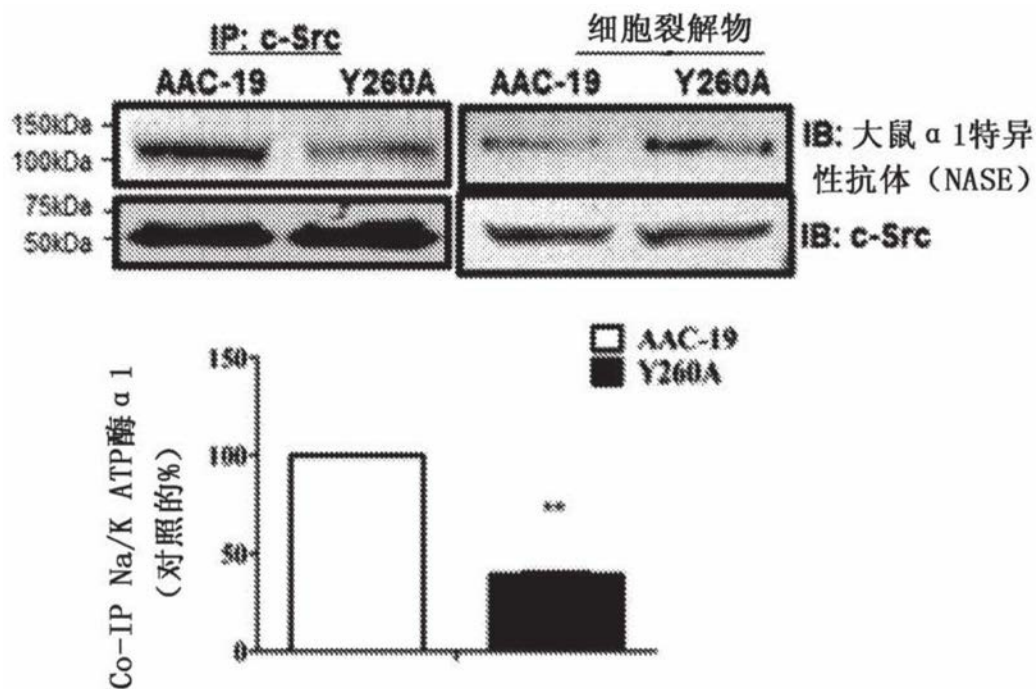


图3D

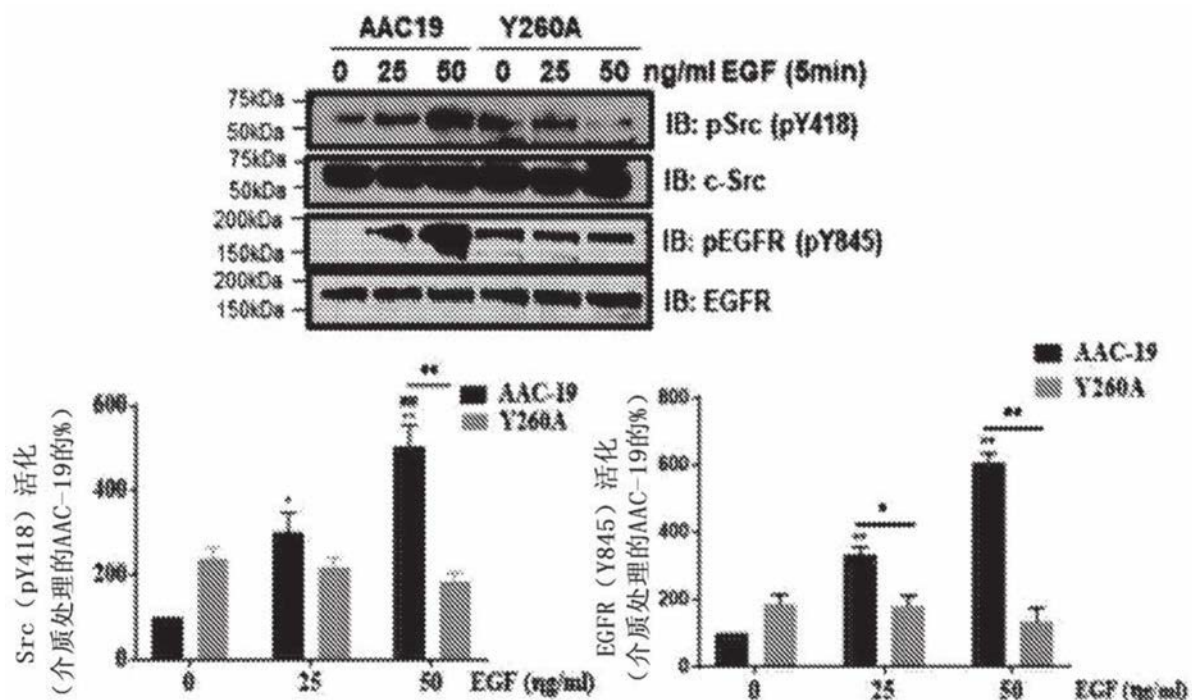


图3E

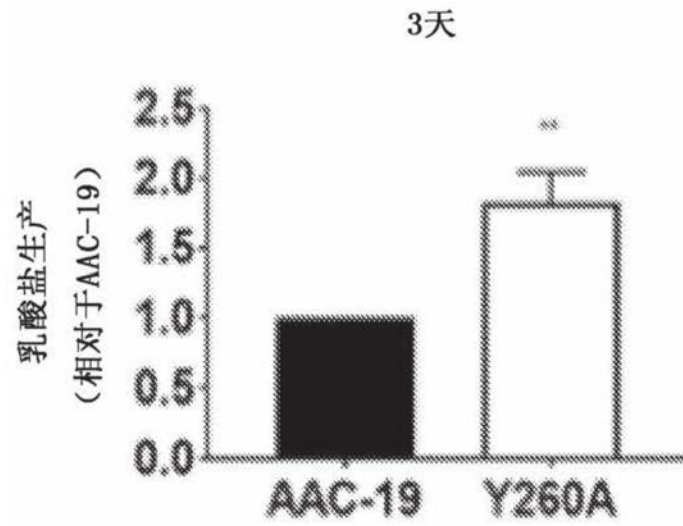


图4A

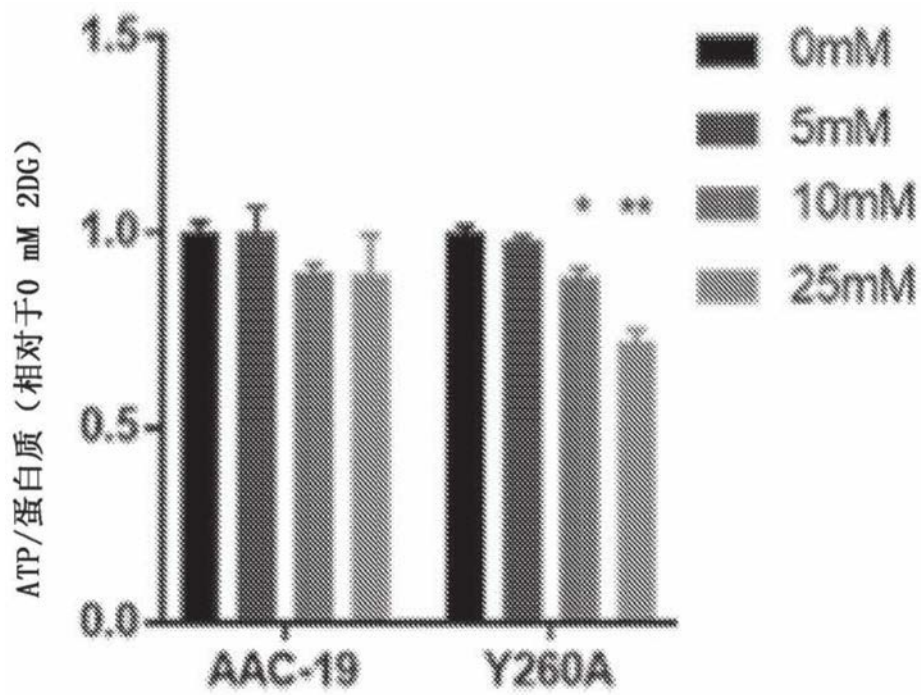


图4B

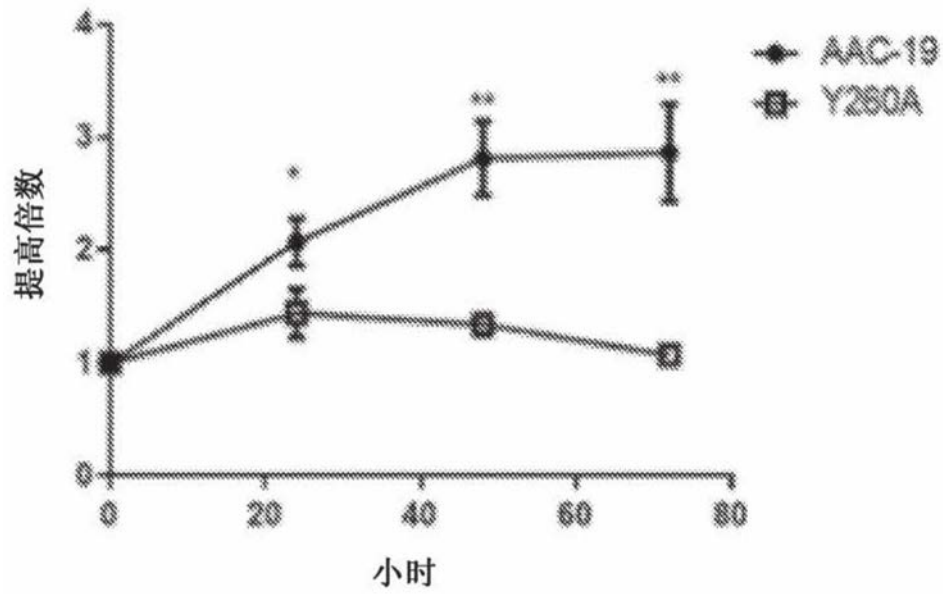


图4C

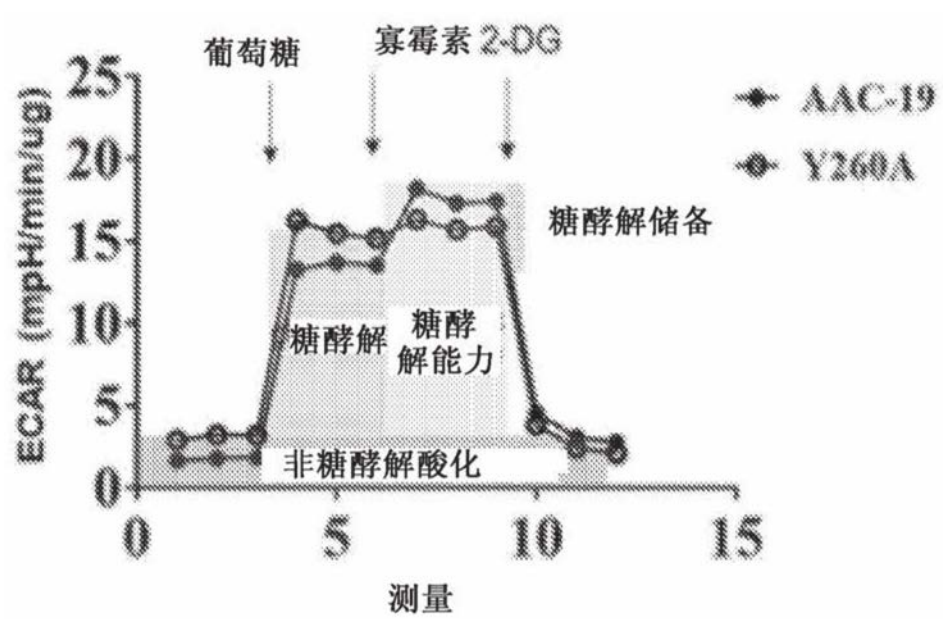


图4D

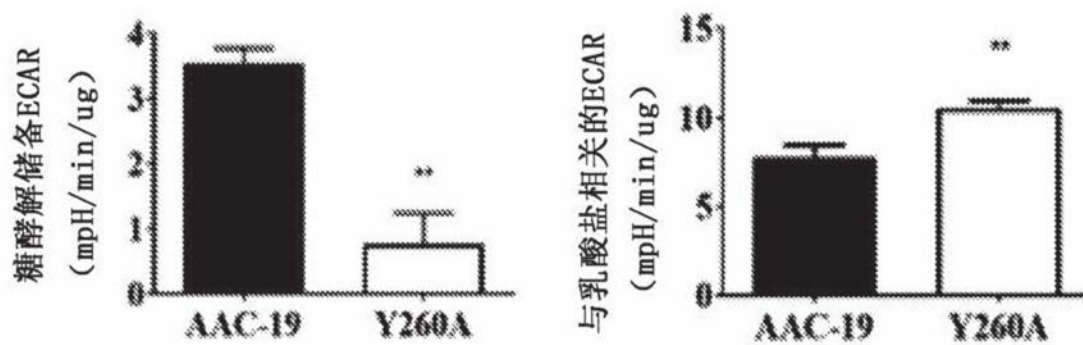


图4E

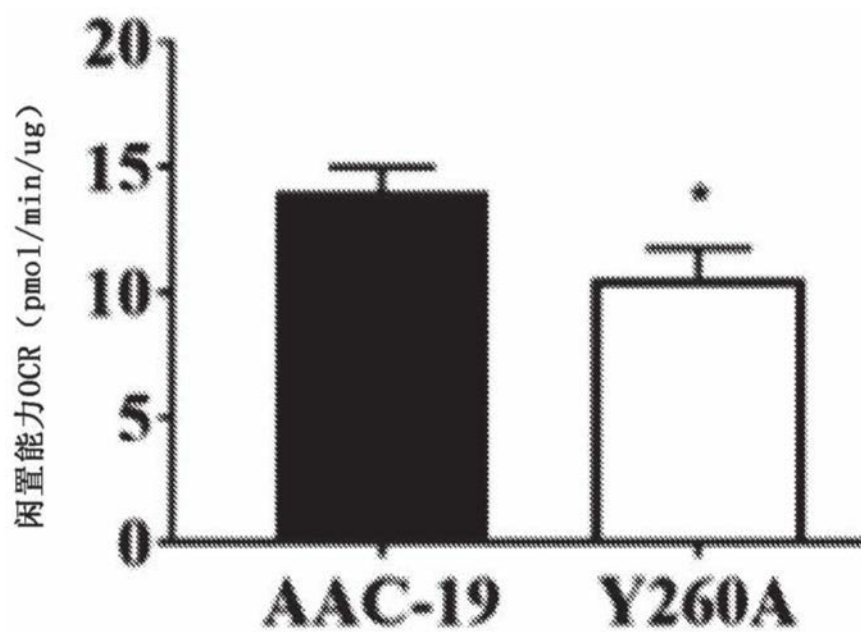


图4F

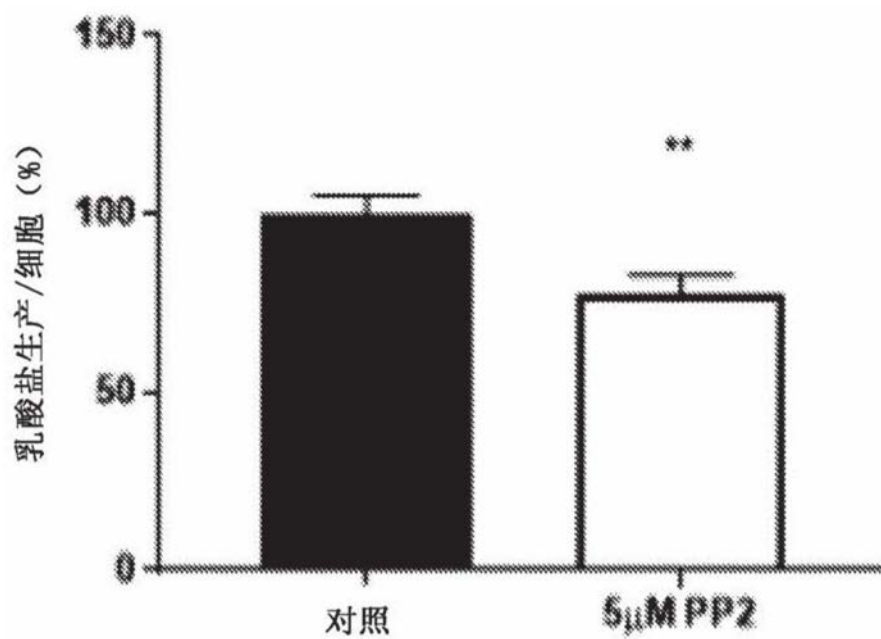


图4G

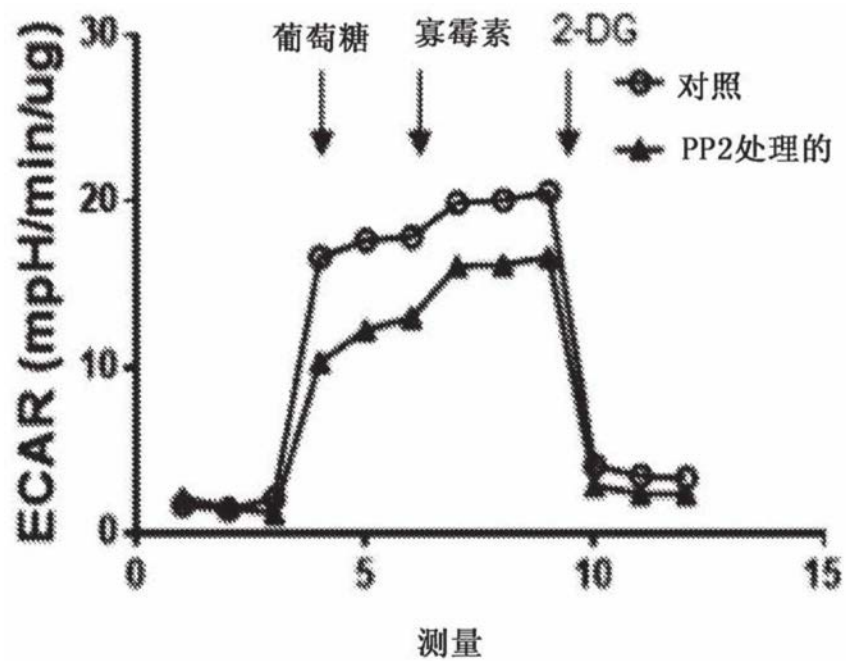


图4H

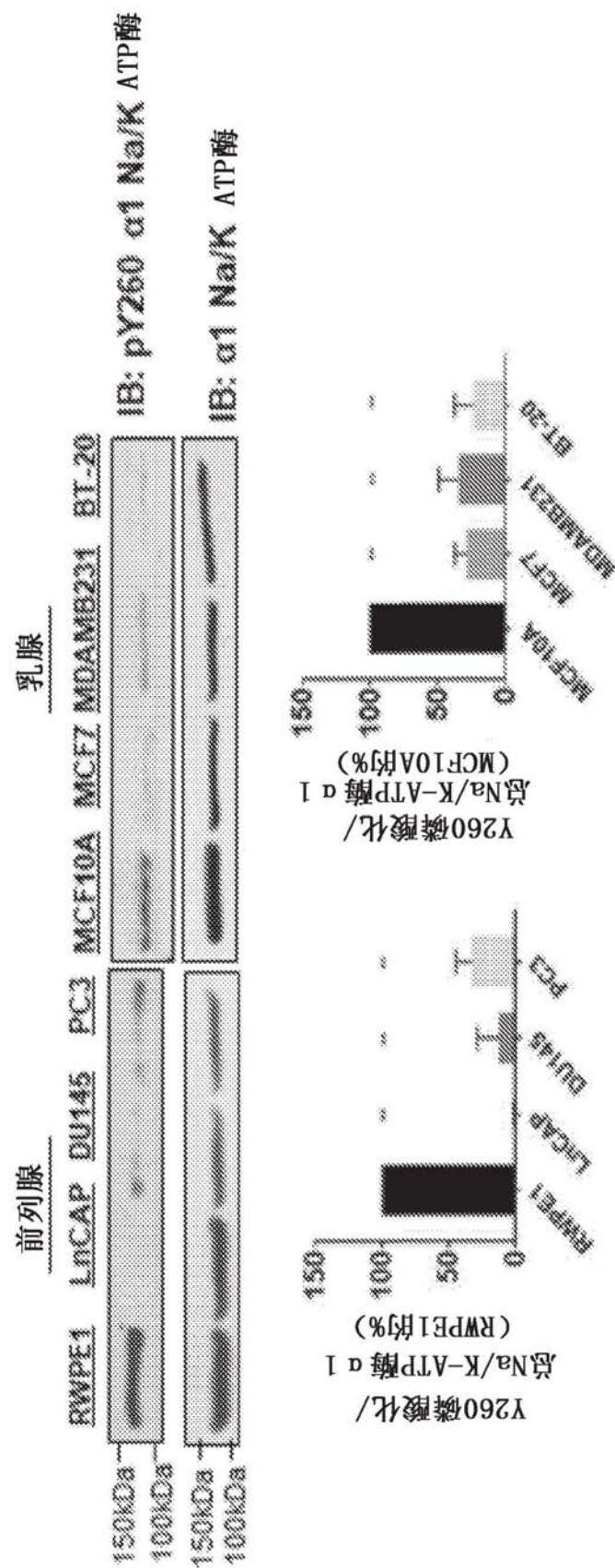


图5A

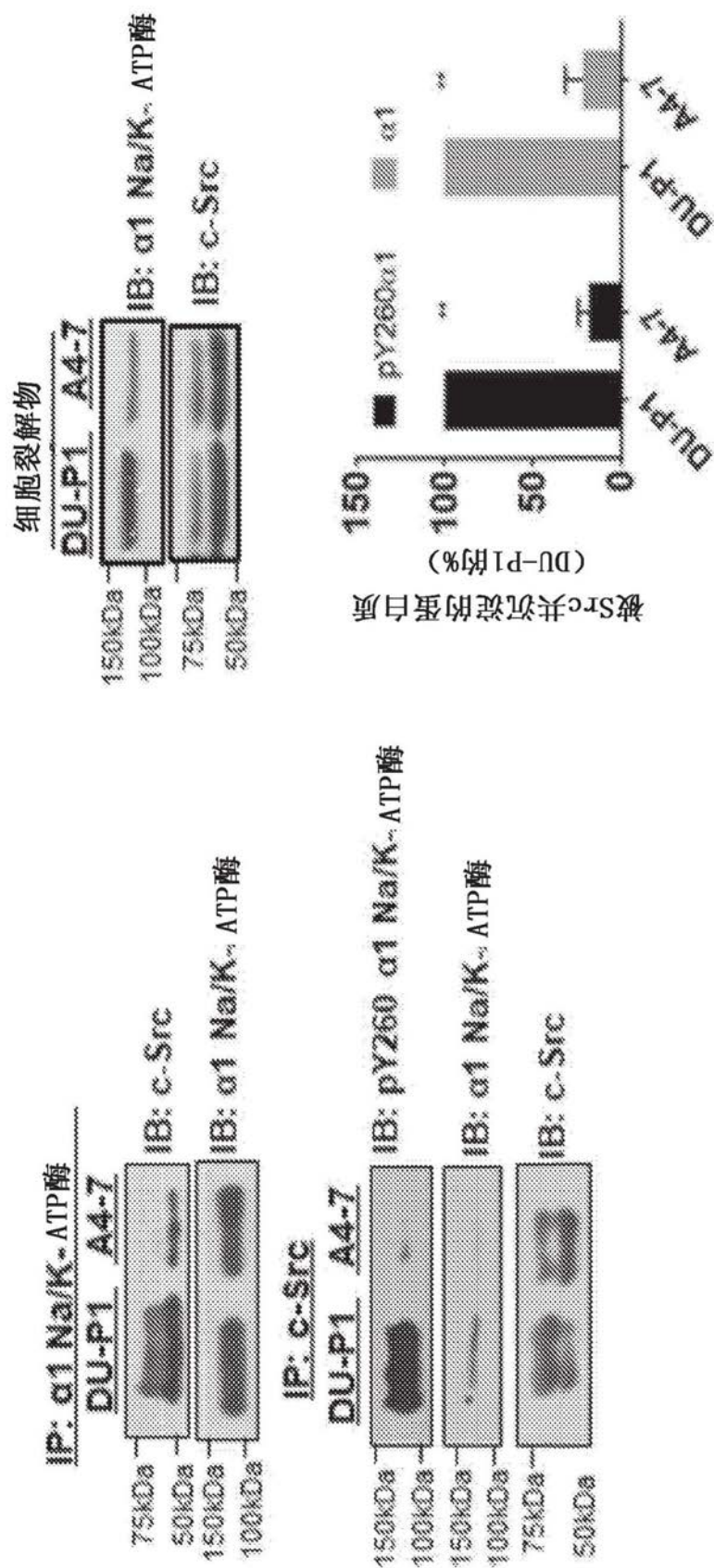


图5B

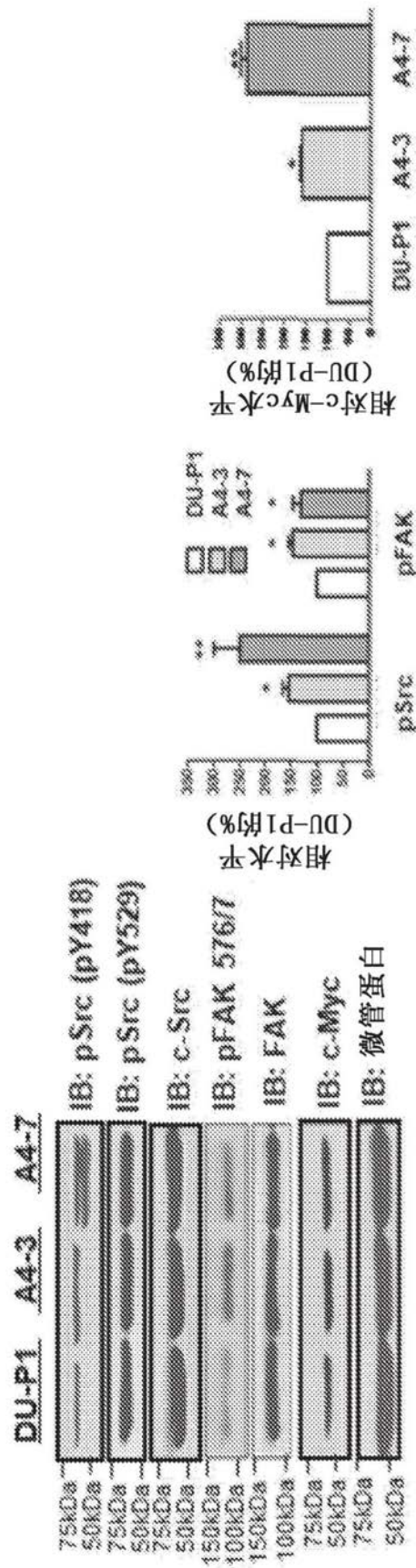


图5C

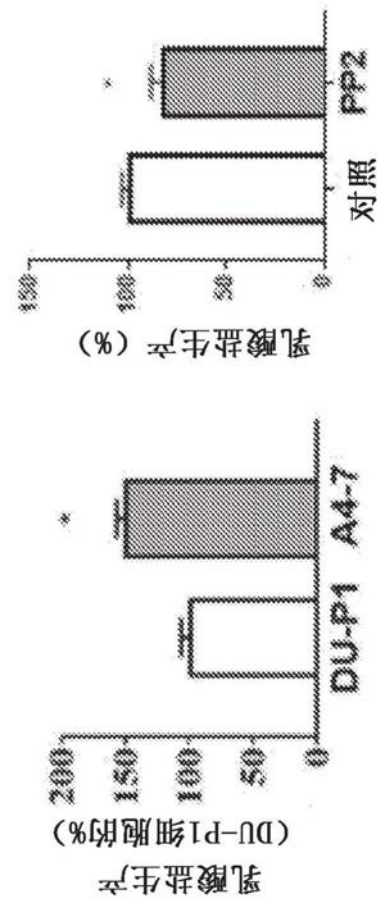


图5D

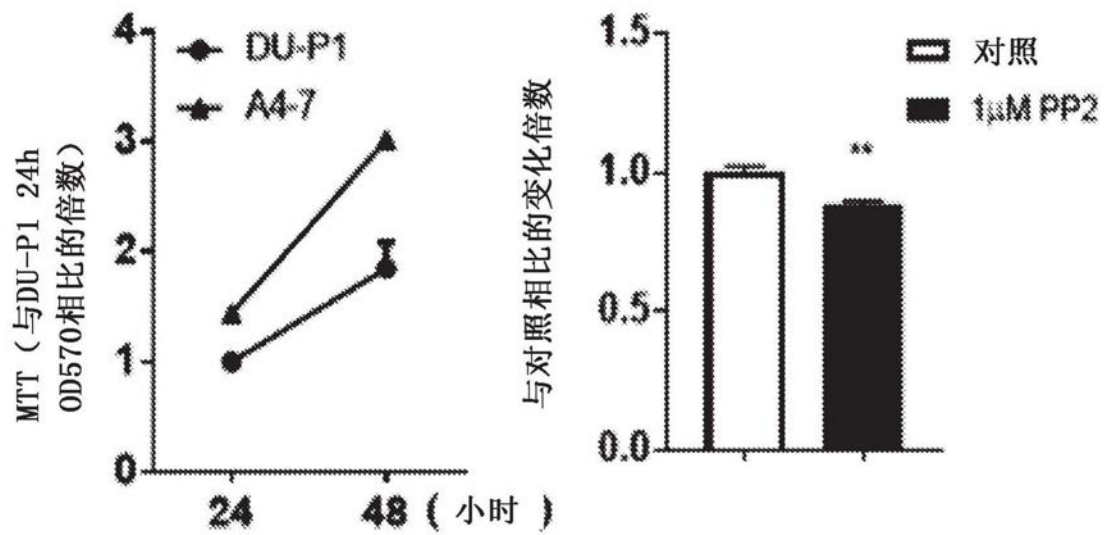


图5E

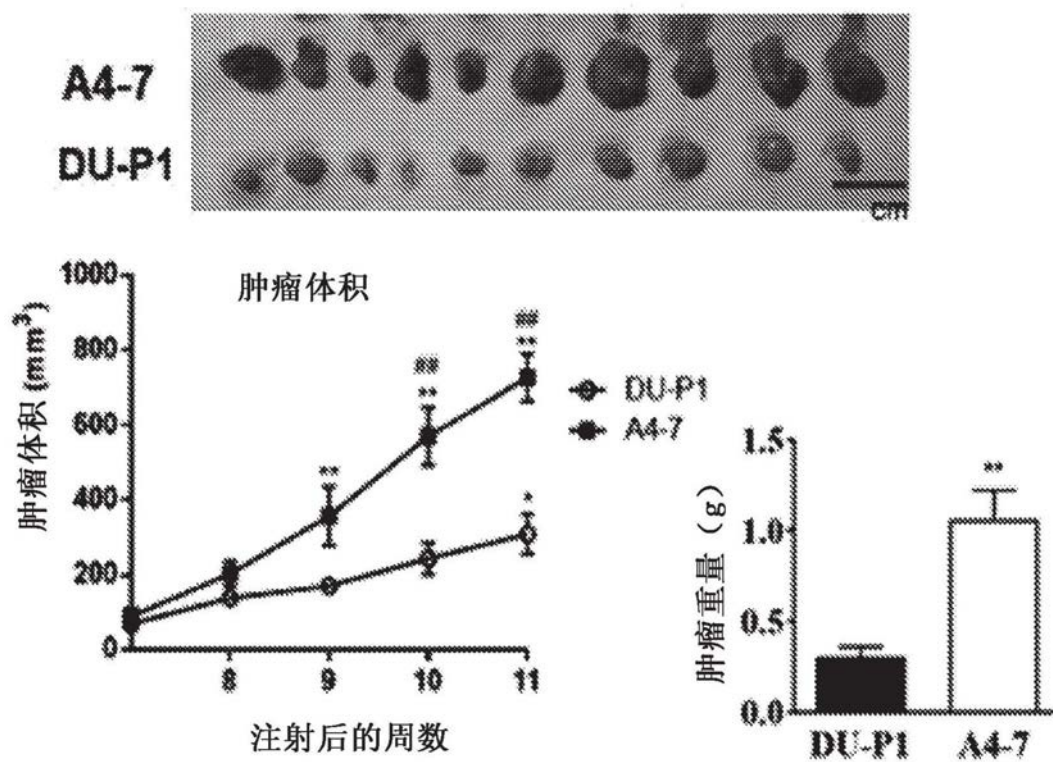


图5F

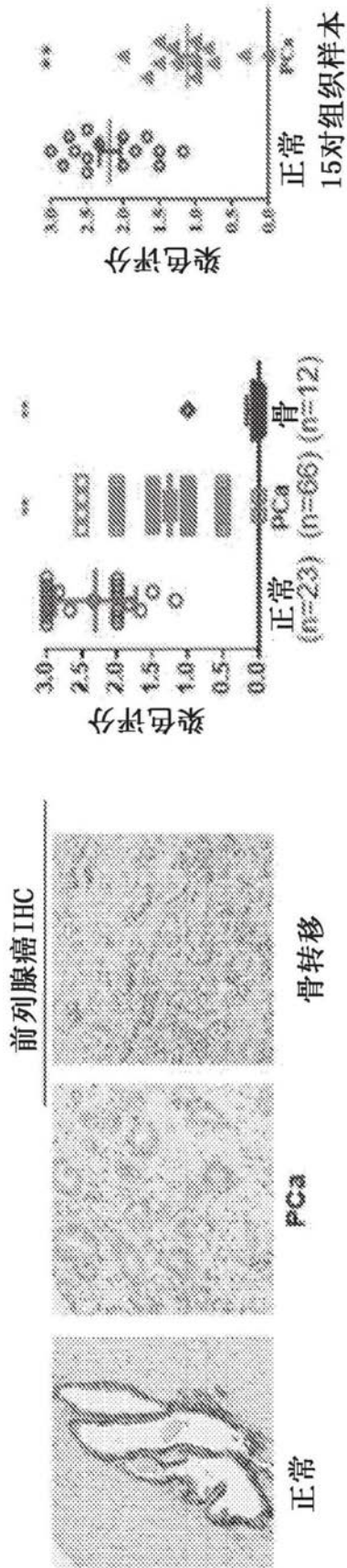


图6A

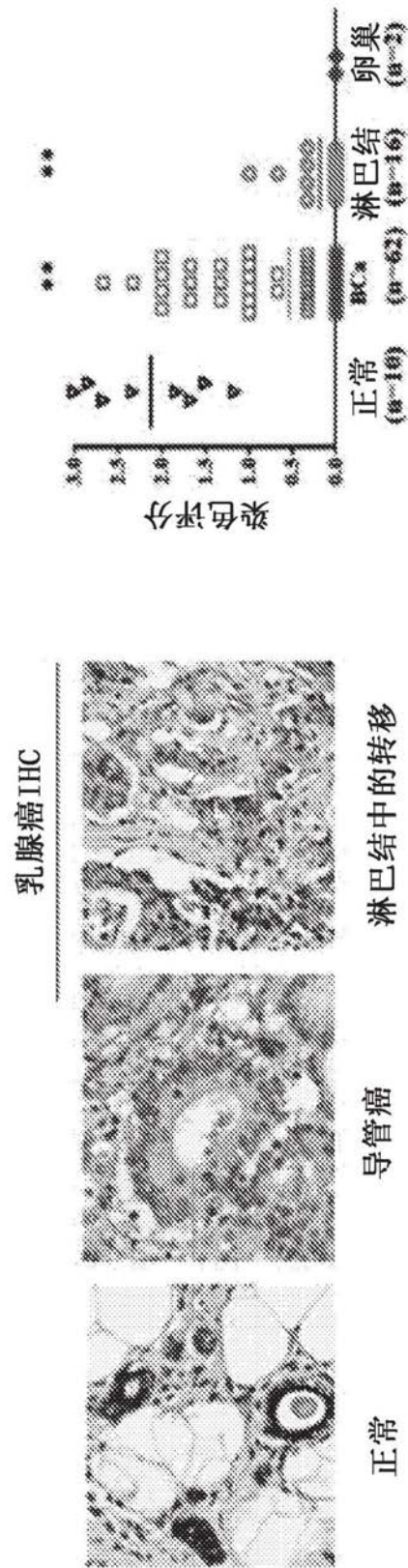


图6B

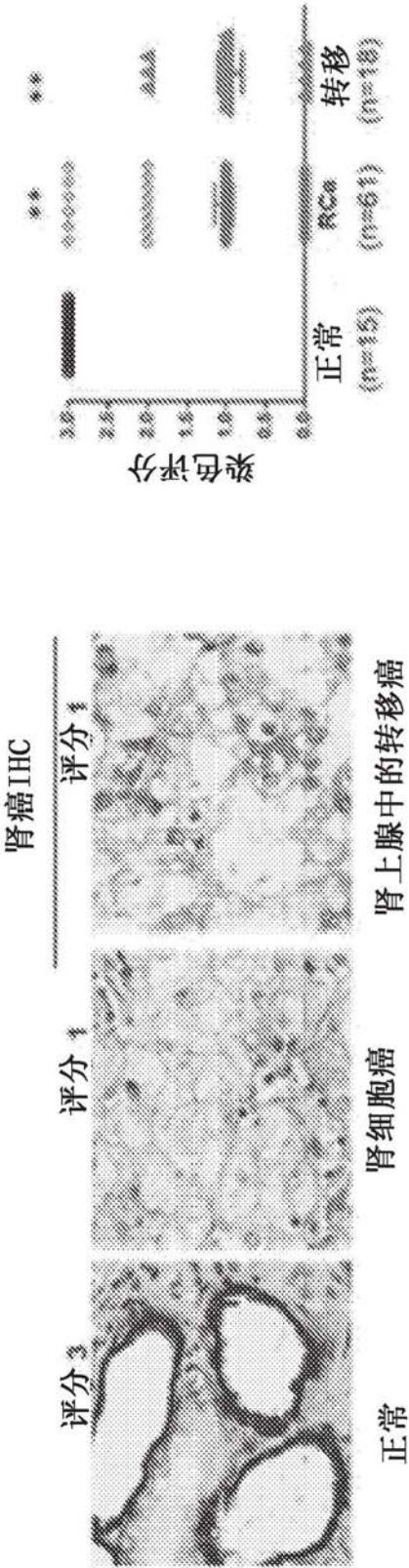


图6C

	正常	癌症	转移
前列腺	2.30±0.12	1.25±0.08 ↓	0.08±0.08 ↓
肾	3.00	1.03±0.11 ↓	0.94±0.15 ↓
乳腺	1.96±0.67	0.53±0.73 ↓	0.18±0.29 ↓

图6D

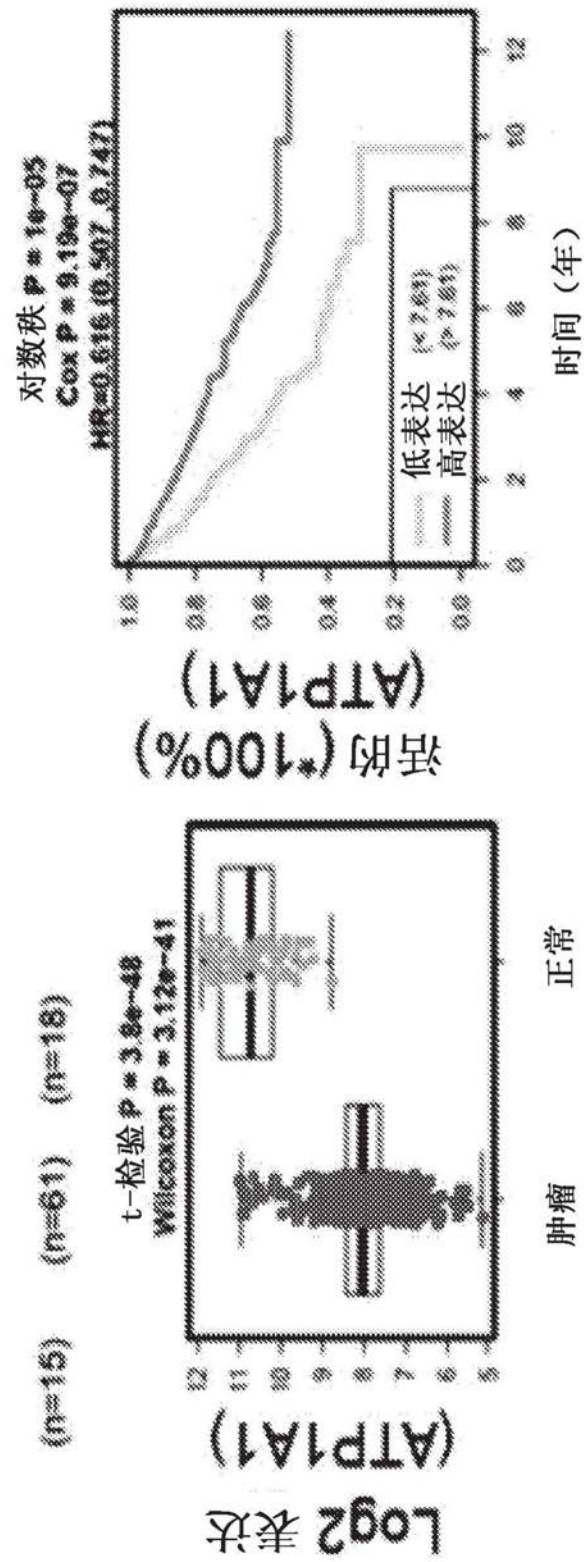


图6E

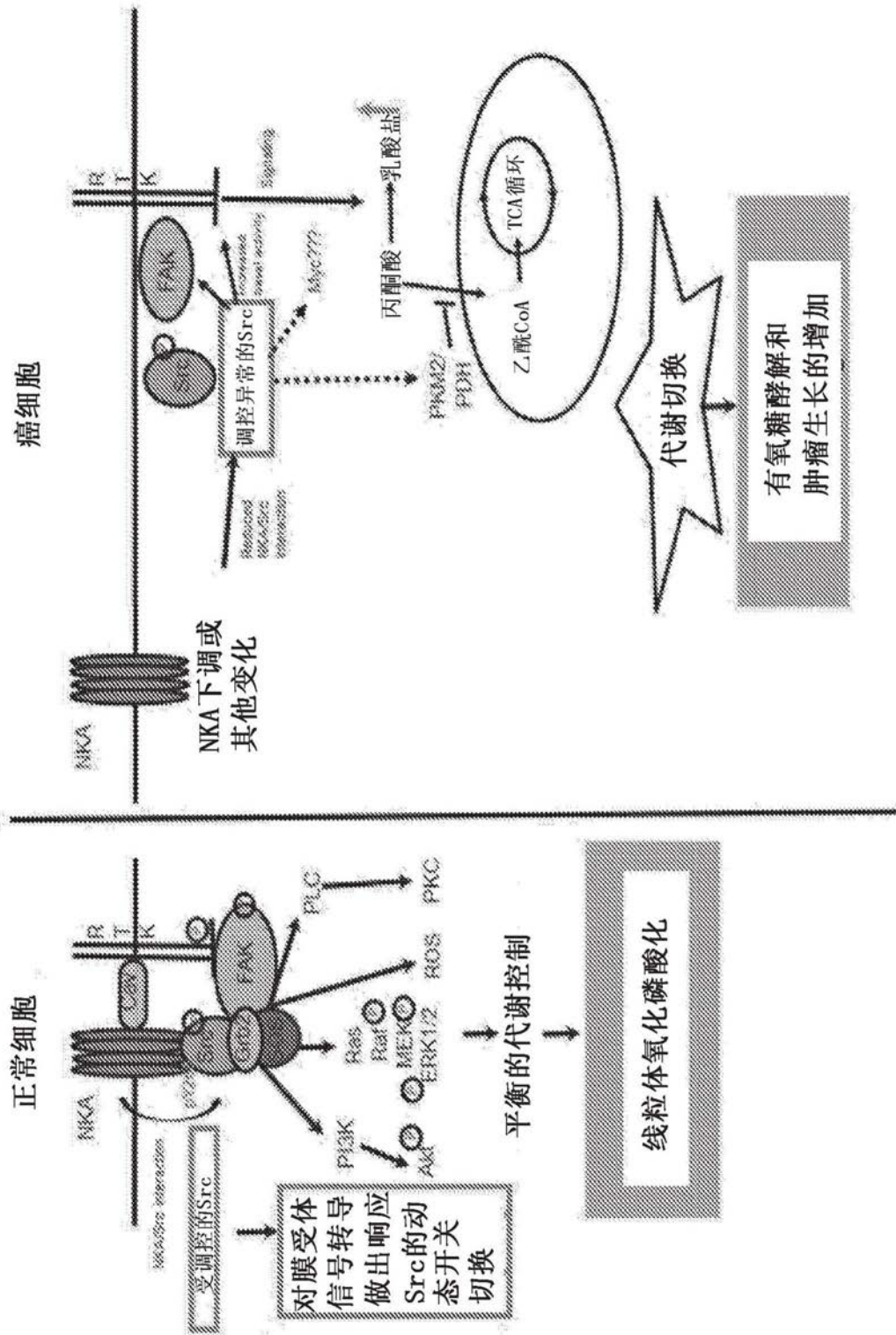


图7

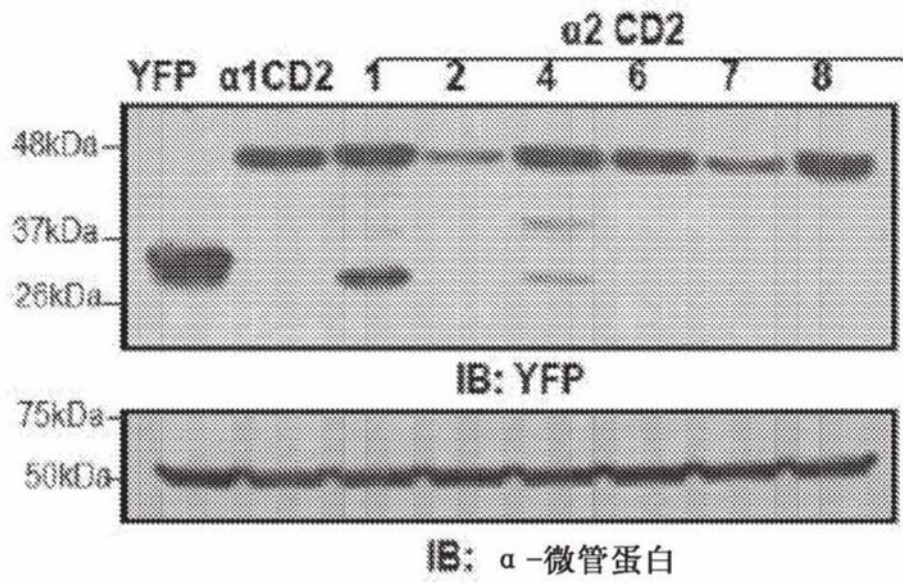


图8A

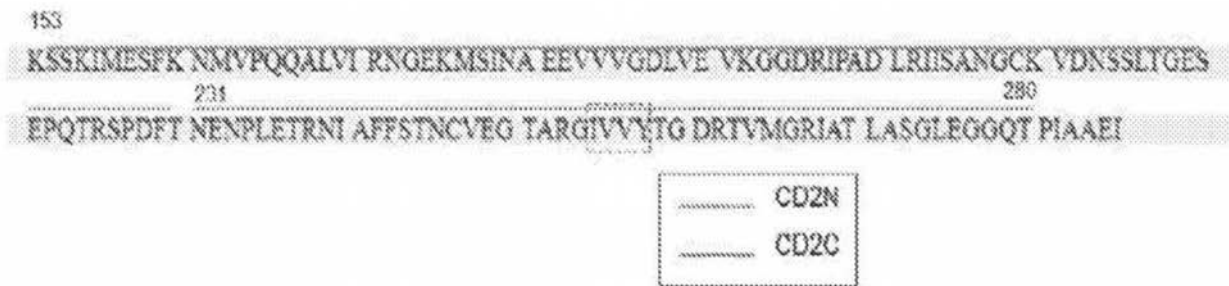


图8B

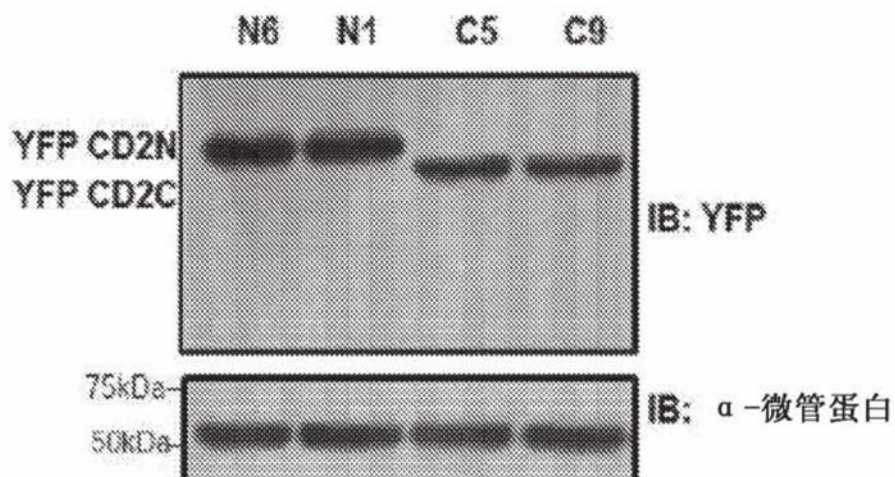


图8C

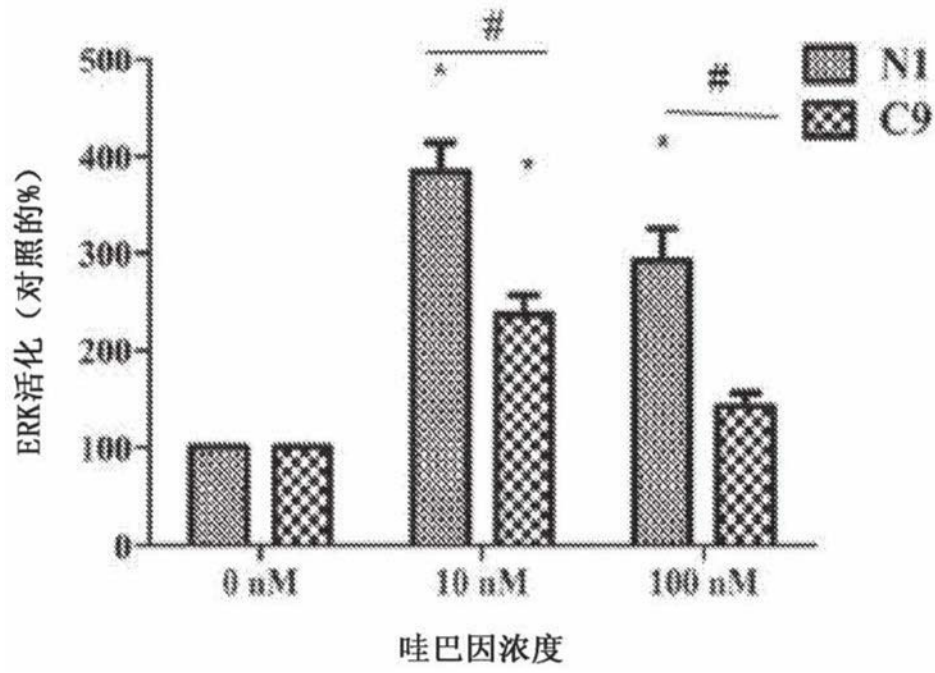


图8D

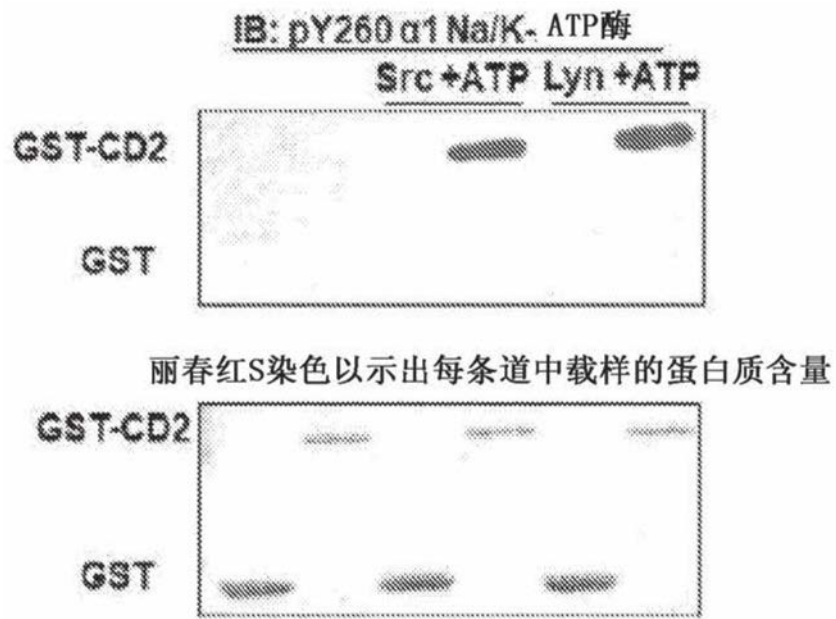


图8E

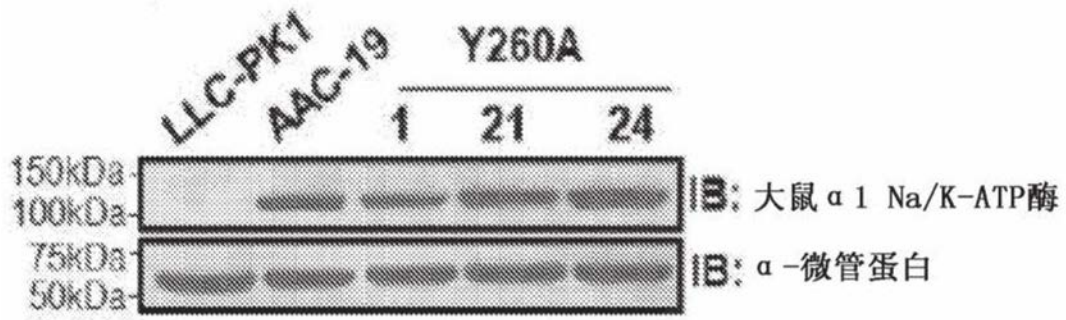


图9A

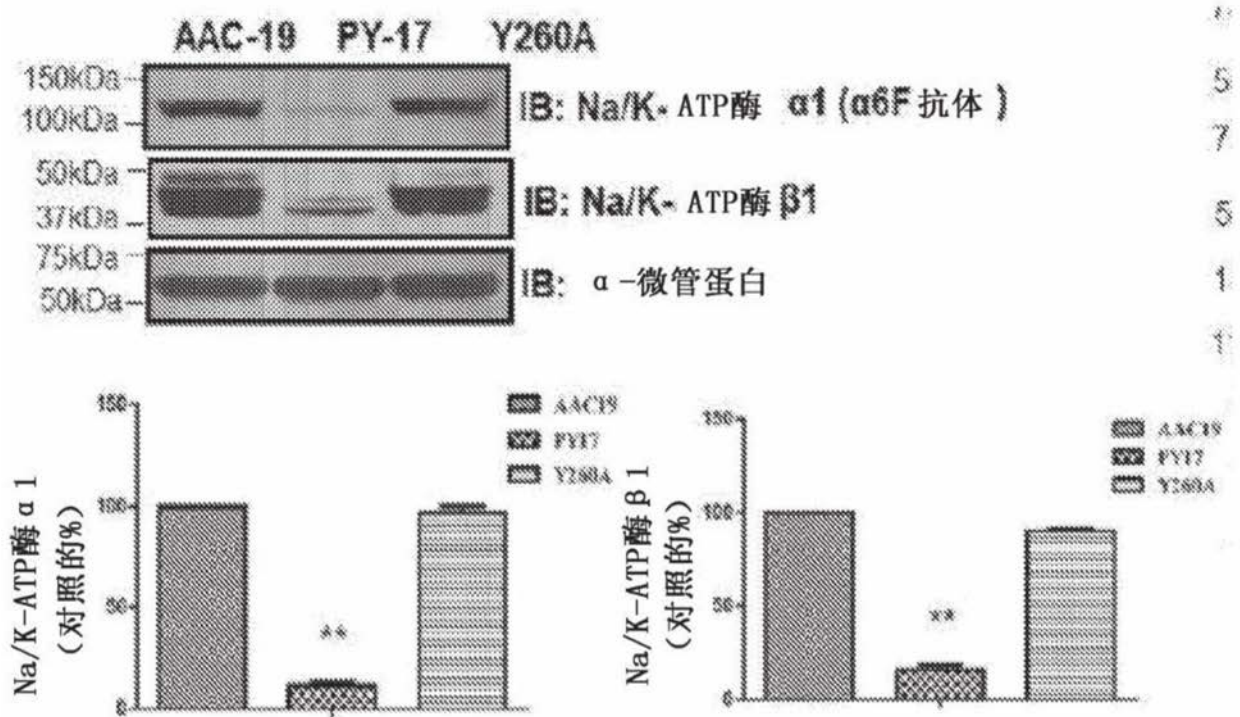


图9B

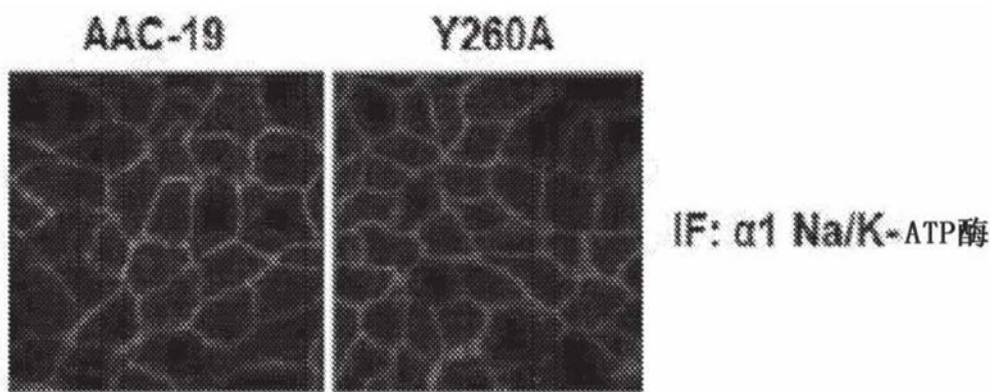


图9C

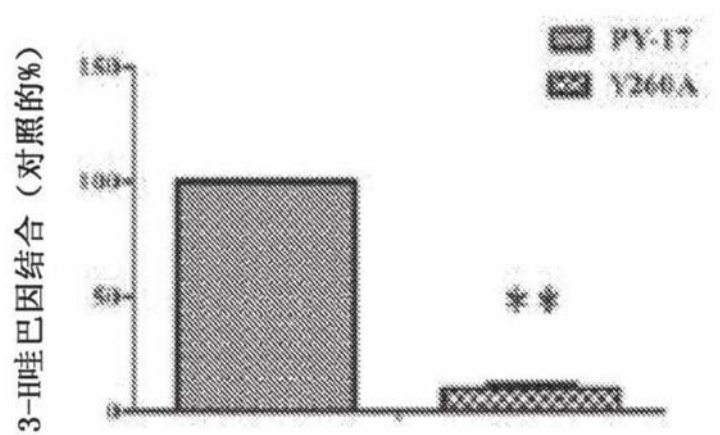


图9D

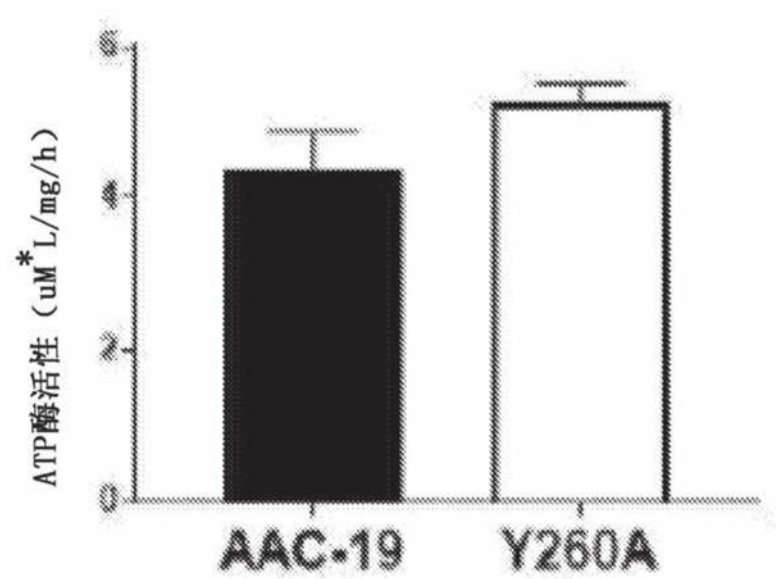


图9E

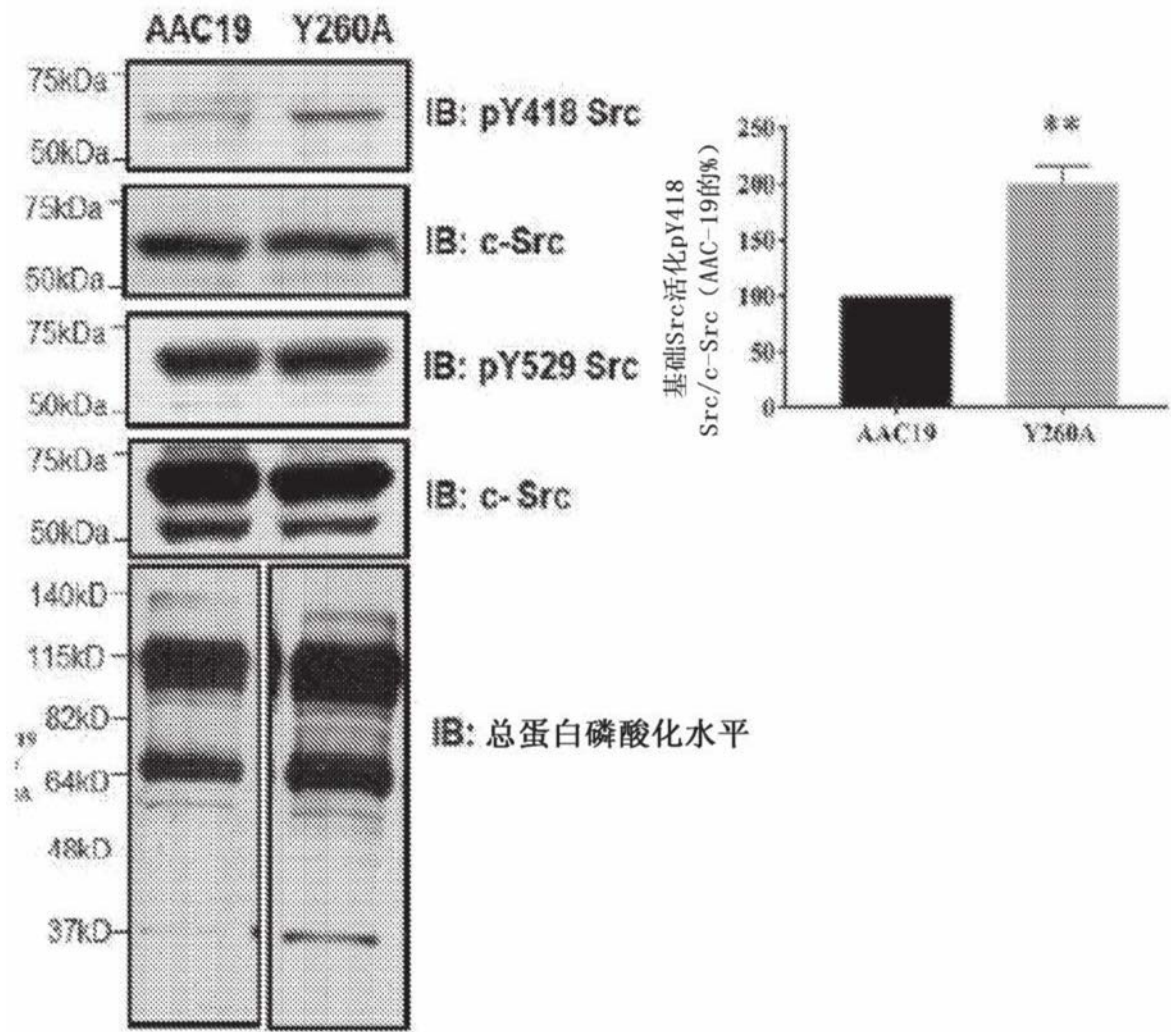


图9F

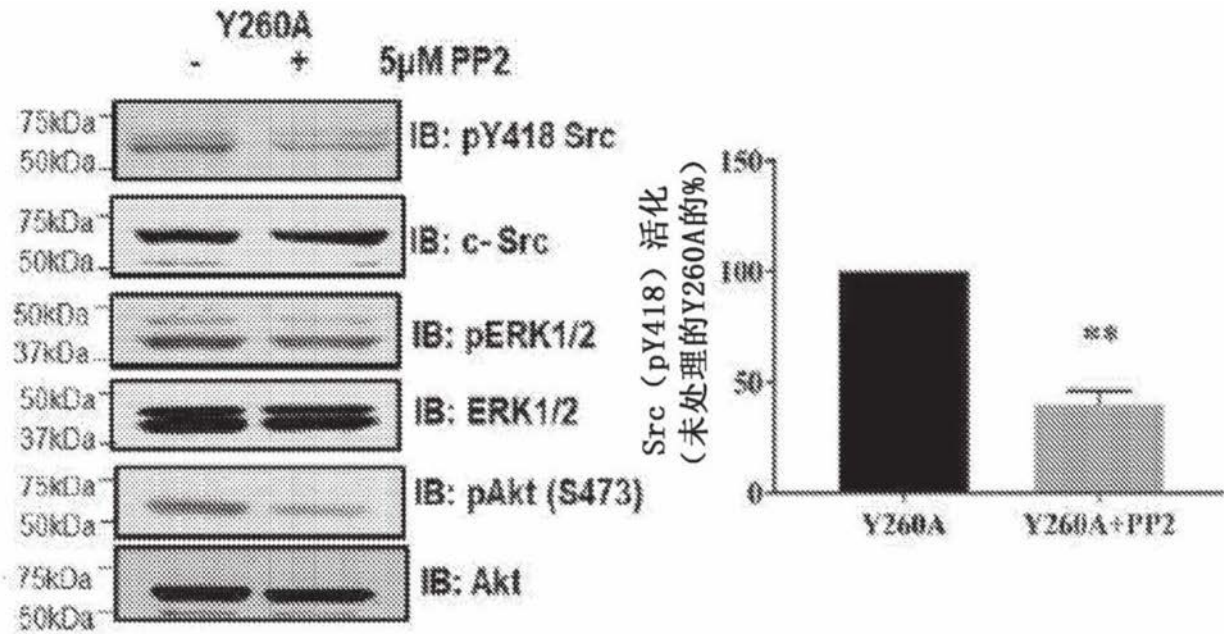


图9G

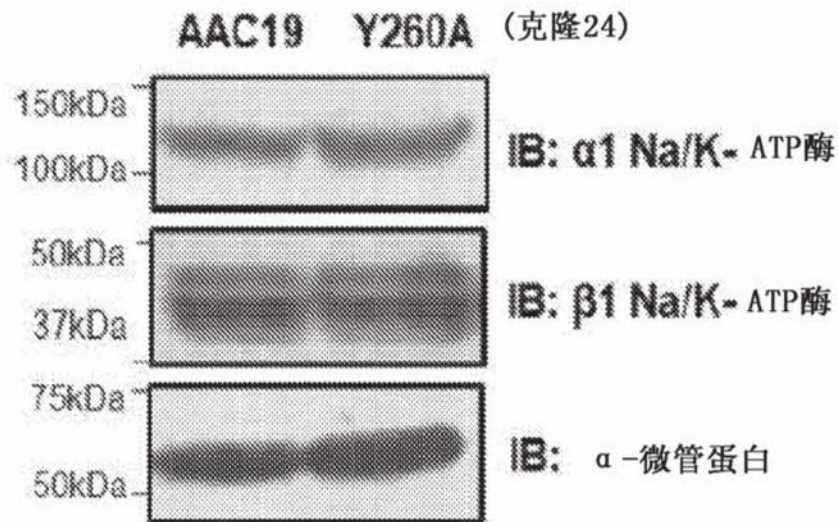


图10A

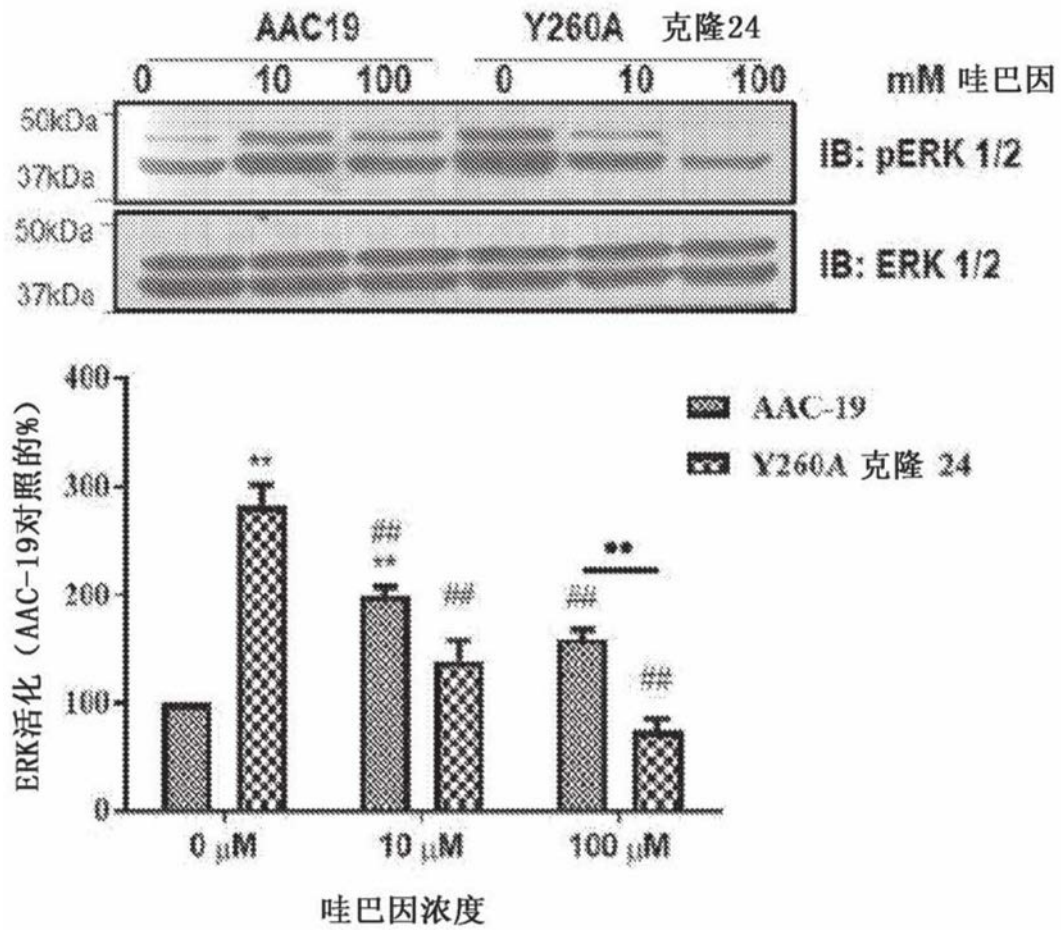


图10B

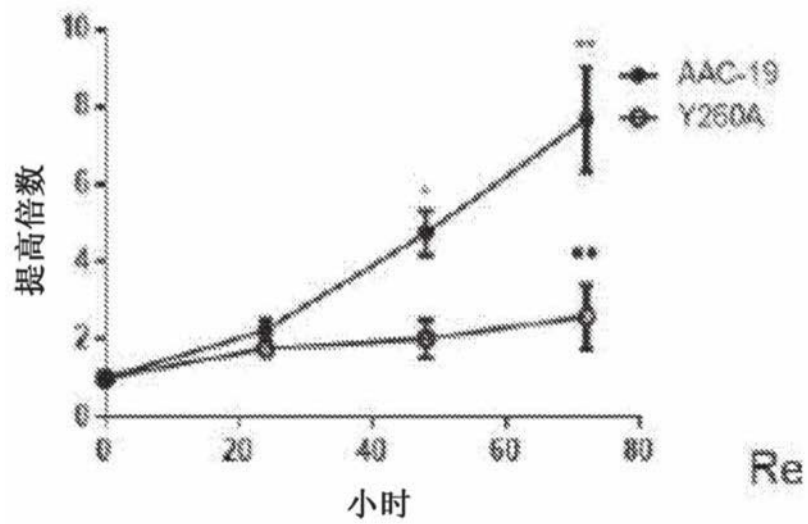


图11A

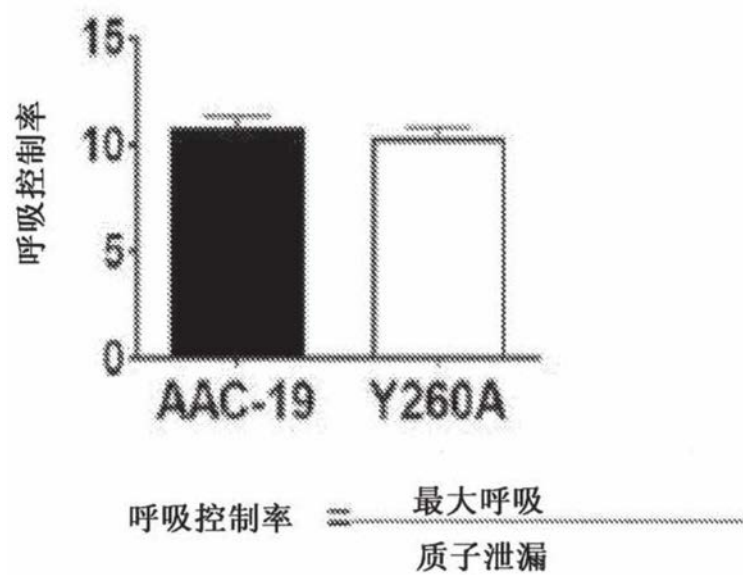


图11B

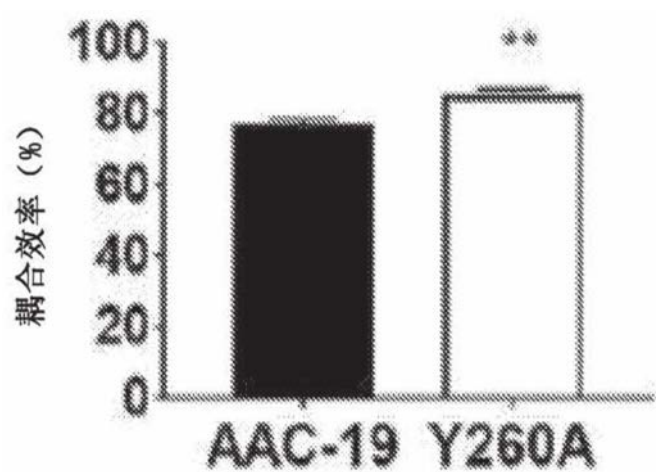


图11C

上调的基因	基因名称	log2 比率	AAC19 FPKM	Y260A FPKM	p值	FDR值
PDK1	丙酮酸脱氢酶激酶1	0.43	36.77	49.84	3.09E-03	7.21E-03
PDK4	丙酮酸脱氢酶激酶4	1.08	1.89	4.01	1.70E-03	4.20E-03
HK2	己糖激酶2	0.43	39.68	53.47	3.30E-06	1.21E-06
LDHA	乳酸脱氢酶A	0.32	1230.09	1534.50	8.14E-40	1.38E-38
SLC2A4	GLUT4	0.77	2.86	4.89	3.20E-02	5.88E-02
GOT1	天冬氨酸氨基转移酶	0.58	129.48	193.20	4.90E-20	4.82E-19
SLC7A7	碱性氨基酸转运蛋白	0.32	21.57	26.93	4.60E-02	8.24E-02
SLC7A3	阳离子氨基酸转运蛋白	0.77	4.99	8.52	7.27E-03	1.57E-02

图11D

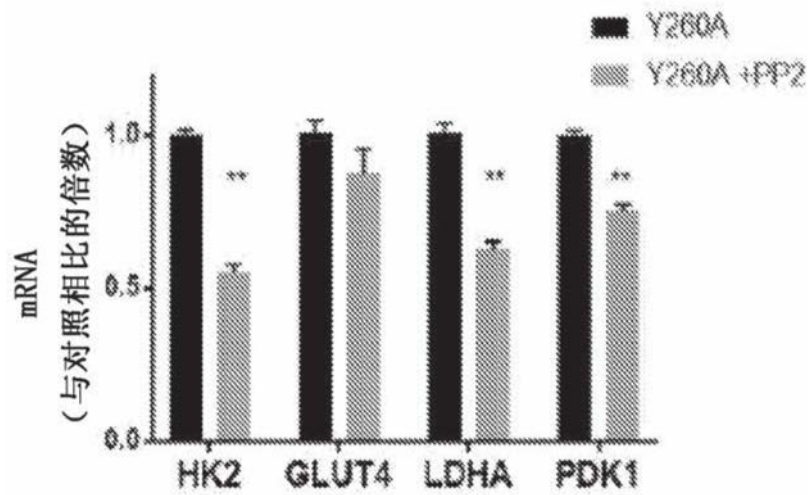


图11E

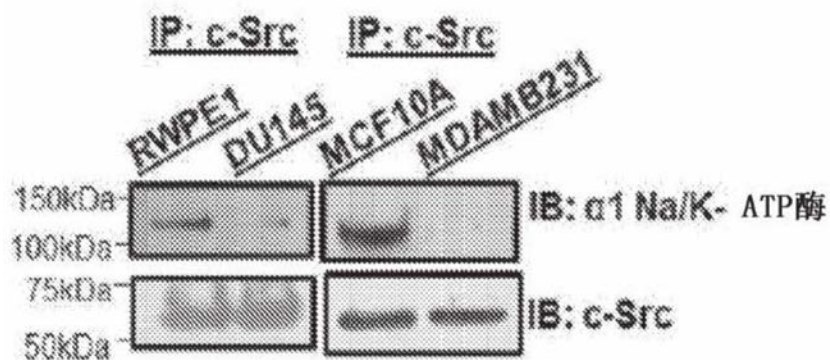


图12A

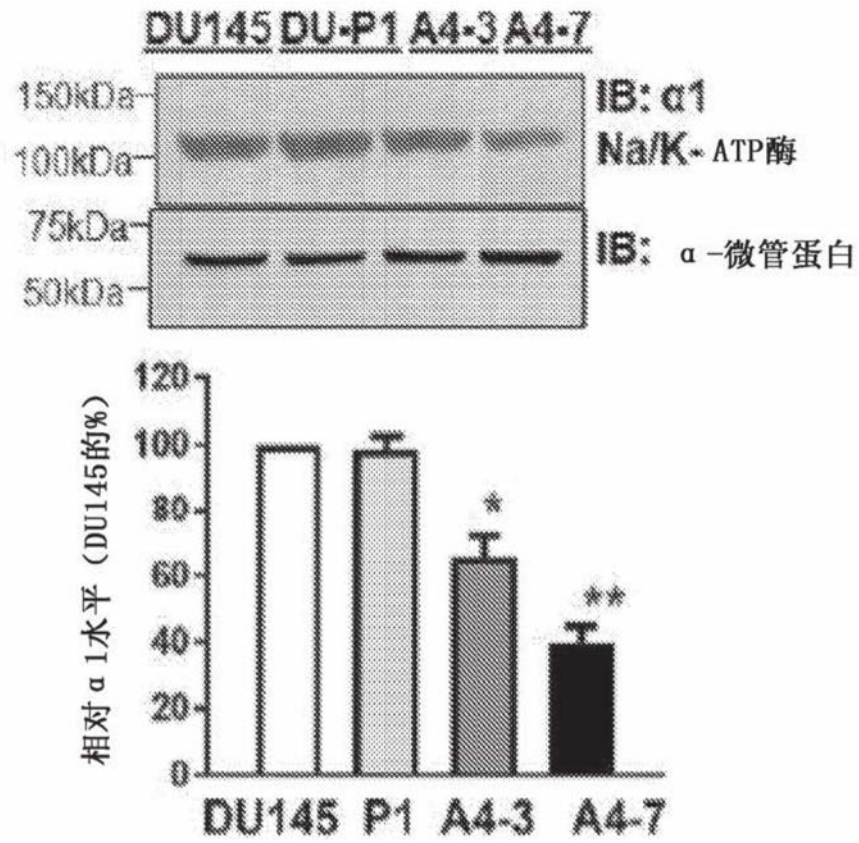


图12B

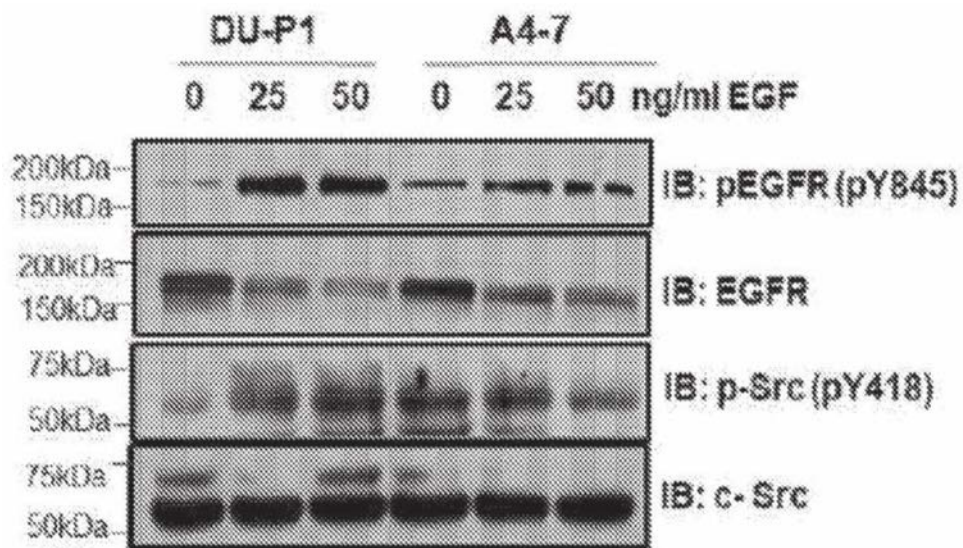


图12C

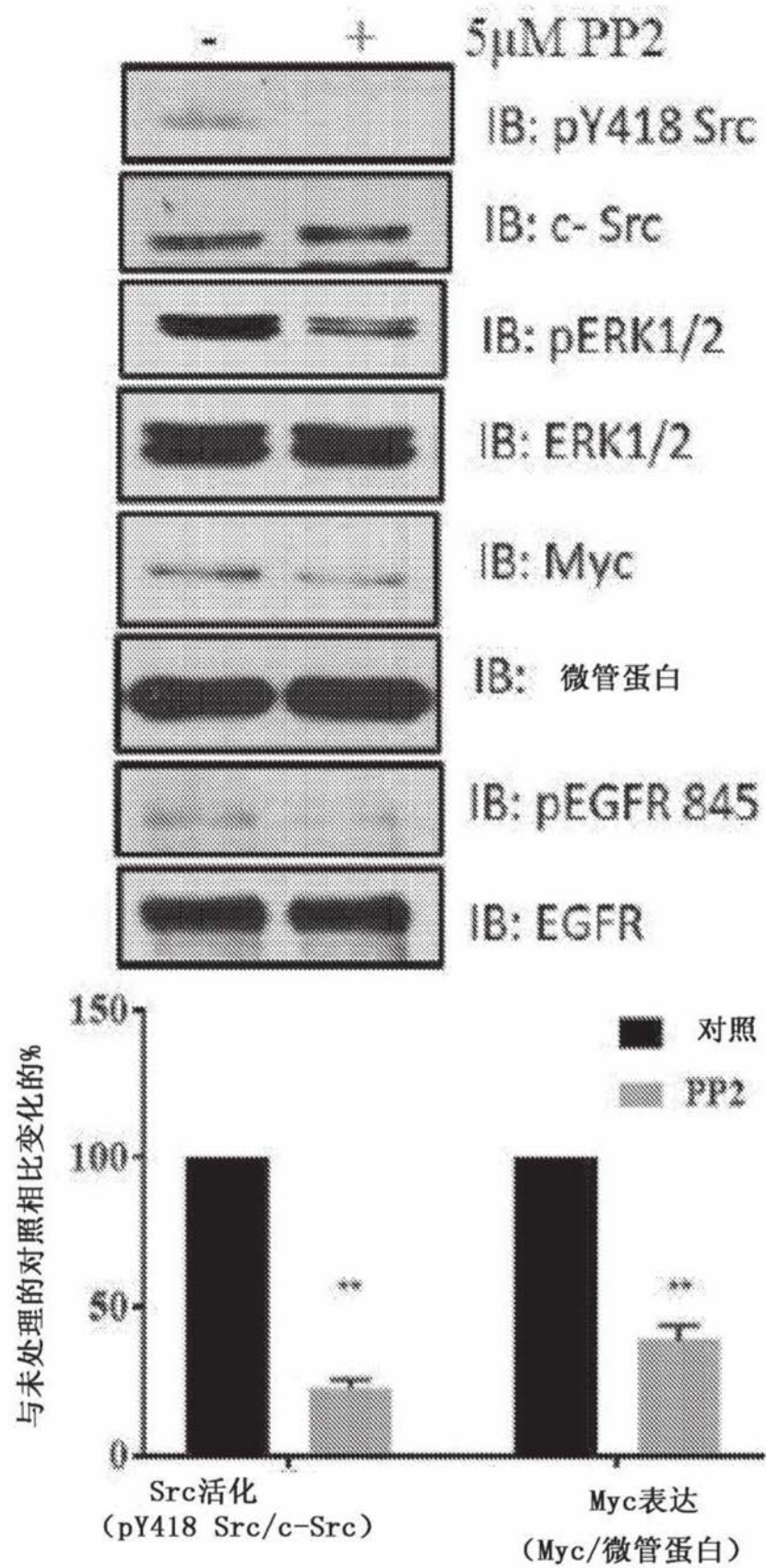


图12D

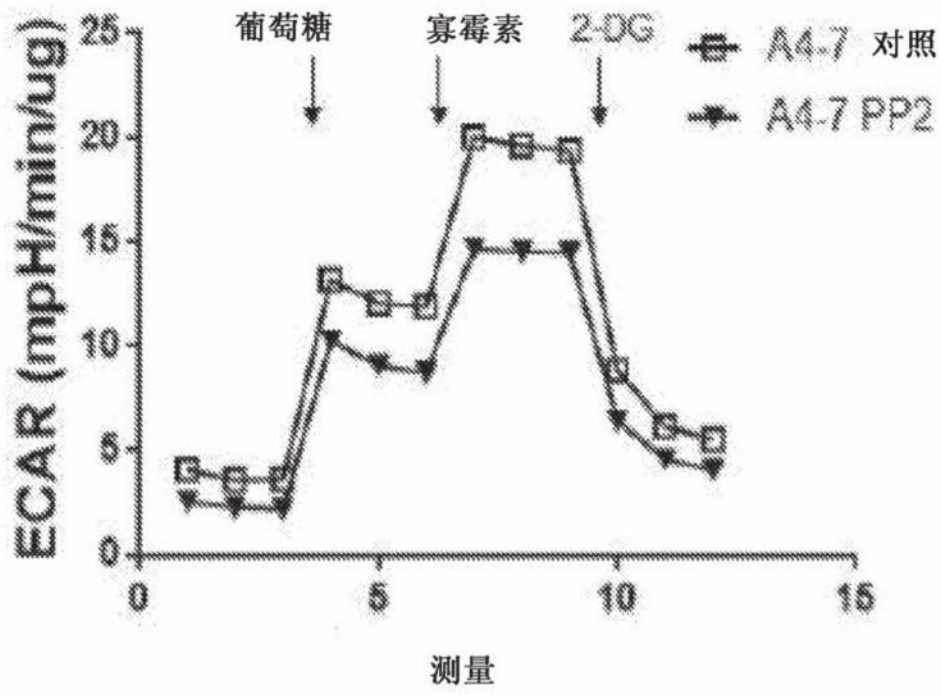


图12E

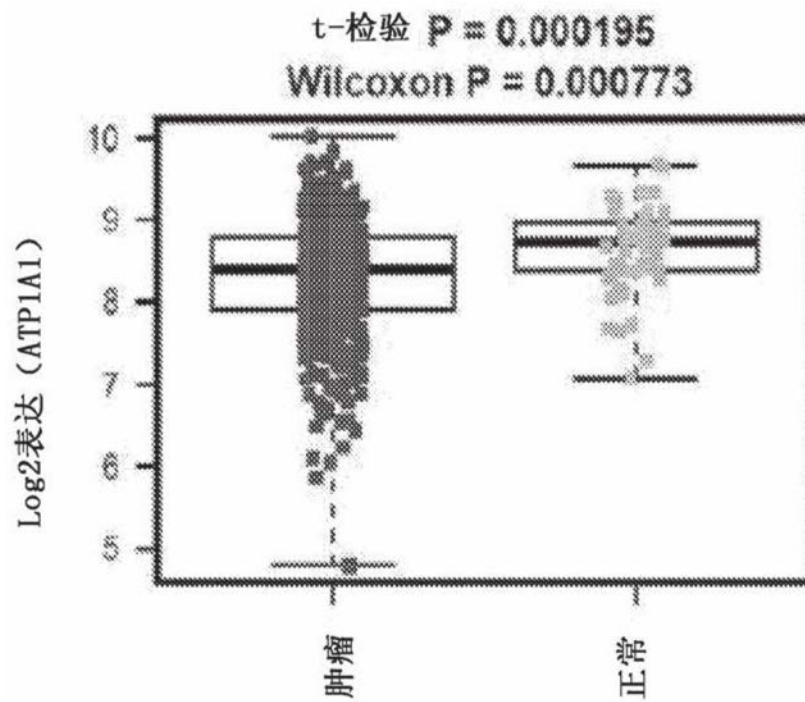


图13A

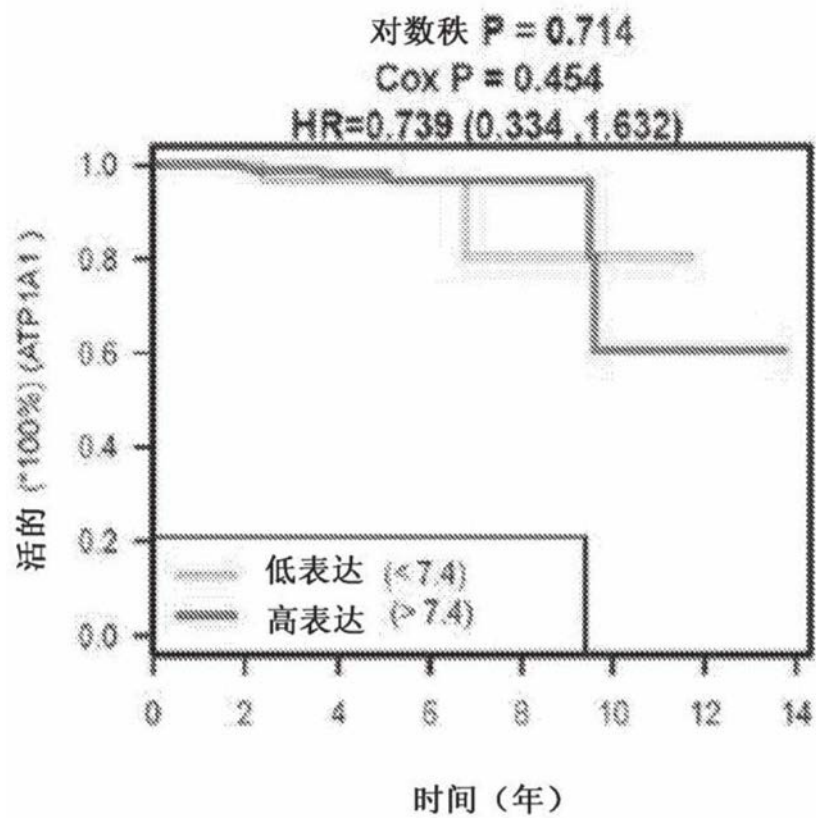


图13B

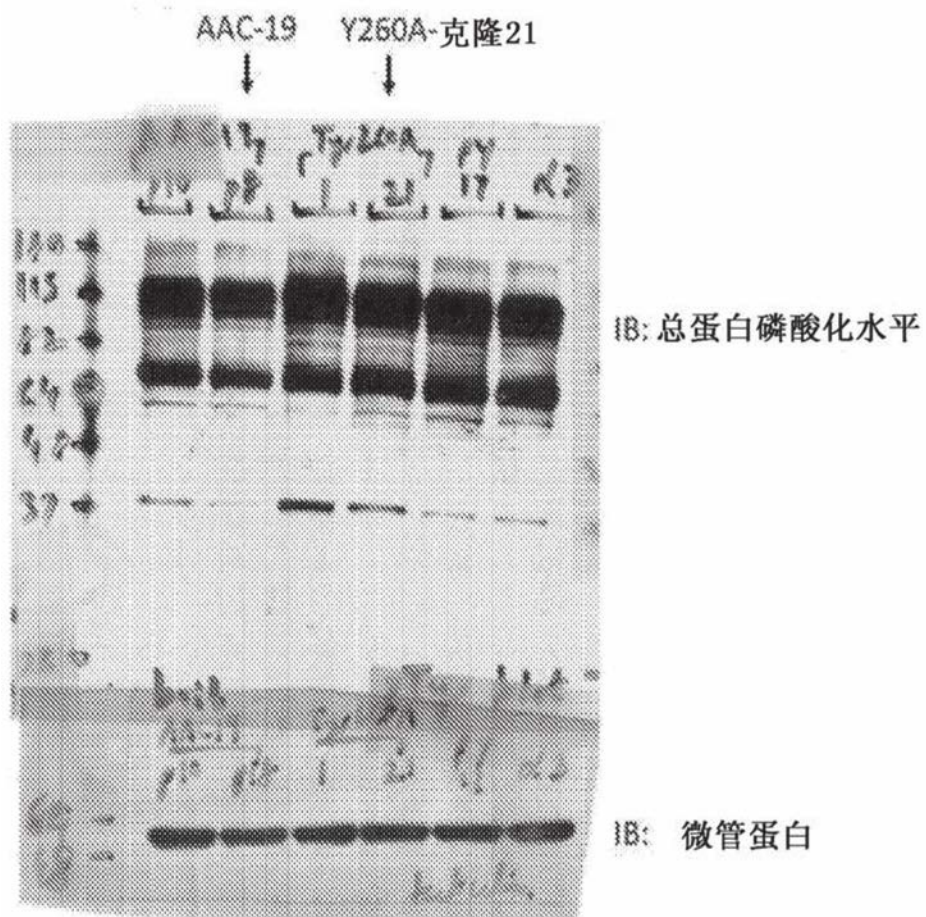


图14

专利名称(译)	检测Na/K-ATP酶介导的SRC信号转导以进行癌症的诊断和预后的方法		
公开(公告)号	CN111094329A	公开(公告)日	2020-05-01
申请号	CN201880057573.4	申请日	2018-09-06
[标]申请(专利权)人(译)	马歇尔大学科研协会		
申请(专利权)人(译)	马歇尔大学科研协会		
当前申请(专利权)人(译)	马歇尔大学科研协会		
[标]发明人	穆米塔班纳吉 谢子建		
发明人	穆米塔·班纳吉 崔晓语 谢子建		
IPC分类号	C07K14/47 G01N33/48 G01N33/50 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/57415 G01N33/57434 G01N33/57438 G01N33/6872 G01N2333/914 G01N2440/14 G01N2800/52		
代理人(译)	金海霞 刘慧		
优先权	62/554669 2017-09-06 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供了用于对象中癌症的诊断或预后的方法，所述方法包括下述步骤：从对象获得生物样品；确定所述生物样品中存在的Na/K ATP酶中Y260残基处磷酸化的量；以及将所述样品中所述磷酸化的量与对照水平进行比较，从而诊断所述癌症。还提供了用于检测从氧化磷酸化向有氧糖酵解的代谢切换的方法，其中获得包括一个或多个细胞的生物样品，并在所述一个或多个细胞中确定Na/K ATP酶中Y260残基处磷酸化的量。

Na/K-ATP 酶亚型	Y260位置
人类 $\alpha 1$	255 RGIVVYTGDR T 265
人类 $\alpha 2$	253 RGIVATGDR T 263
人类 $\alpha 3$	245 RGVVATGDR T 255
人类 $\alpha 4$	263 RGIVATGDST 273