

细胞研究中的高内涵分析: 使用IN Cell Analyzer 1000 监测ERK信号的图像基础分析的优点

Ras/Raf细胞外信号调控激酶(ERK)转换级联反应在细胞的增殖中起关键性作用, 这使得它成为癌症研究中的重要目标。布里斯托尔大学的研究人员探索用对ERK信号空间和时间的密切关注监测这个信号途径。然而, 标准监测技术(Western印迹和共聚焦显微镜方法)相关的瓶颈问题使得他们的努力复杂化。

应用IN Cell Analyzer 1000完成高内涵分析, 消除了这些瓶颈并明显增加了通量, 使这个团队能够在几小时内得到结果, 而不是Western印迹所需要的几周或几个月。

在高内涵分析的帮助下, 他们能够:

- 获得单个细胞中亚细胞划分的详细信息以揭示把ERK从胞浆转运到胞核的最有效因素。
- 为了追踪上游效应发展一种通过敲除内源的ERK并反加野生型或修饰的受体蛋白质以监测ERK的有效策略。
- 确定了双重特异性磷酸酶(DUSPs)精确地且不同地影响ERK信号和划分——这是一种可能不能再简单的发现, 单一终点分析。

ERK信号研究中的瓶颈问题

大量的细胞外信号分子通过激活相对有限数量的有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK)级联影响靶细胞。特异性很大程度是依赖于动力学和MAPK活化定位的差异; 这些差异依次由MAPK相关蛋白调控作为支架、锚定、激活剂或效应剂。阐明影响信号的不同参数将在描述健康和疾病状态以及确定适当的治疗目标中起至关重要的作用。

布里斯托尔大学的研究人员探索了由G蛋白偶联受体和酪氨酸激酶受体(1-3)经过Ras/Raf/ERK途径的信号时空方面。在许多模型中, 增殖刺激引起ERK的持续激活并持续转移到细胞核, 而非增殖刺激仅引起瞬时激活和转移。

他们对隐藏在这些差异下的分子机理十分感兴趣, 但是用以监测ERK活化的技术所消耗的时间是他们研究的主要难题。他们因此估计使用IN Cell Analyzer 1000, 这促成了一种监测ERK信号时空方面的有效的方法的建立, 这种方法是基于siRNA敲除内源性的ERK并利用腺病毒介导反加野生型或修饰后的ERK2/GFP受体。

结果和观察

更高的通量

图1显示存在或不存在AG1478, 一种EGF受体激活的抑制剂, 和Ro-318425, 一种PKC抑制剂, 使用EGF或PKC激活剂PDBu刺激的HeLa细胞中ppERK1/2染色图。刺激或抑制的效应从小图中可以一目了然, 而全细胞ppERK染色定量(使用双对象分析)产生的剂量和时间依赖性类似于那些原先由Western印迹所获得的结果(数据没有展示)。然而, 结合使用高内涵分析方法学和IN Cell Analyzer 1000产生了更高的通量。对全部96孔板的图像的采集可以在20分钟内完成且图像的分析(超过50000个单细胞)需要差不多的时间。为了进行比较, 为Western印迹准备的细胞核和胞浆抽提物(2种抗体和96孔板)至少需要几天乃至几周的时间来完成。

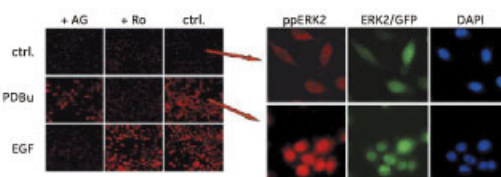


图1. HeLa细胞中ERK成像。图像采集来自培养在96孔板中并转染了ERK2/GFP的HeLa细胞。左面图显示存在AG1478(AG, 一种EGFR受体激活的抑制剂)或Ro-318425(Ro, 一种PKC抑制剂)时用EGF、PDBu或对照培养基(ctrl)刺激的细胞的ppERK染色。这些典型的小图阐明了通过EGF和PDBu的激活以及通过Ro-318425和AG1478的明确的抑制。右面图是活化的ERK(ppERK)染色的更高的放大倍数图, 对参照和PDBu刺激细胞的总的ERK定位(ERK2/GFP)和核染色(DAPI)。在刺激时ppERK和ERK2/GFP转移入细胞核清晰可见(注意在对照组的ppERK图像的对比度和亮度已经被增加以阐明定位和低水平活化)。

更好的洞察力

IN Cell Analyzer 1000也为研究人员提供了有关细胞内ERK亚细胞划分的附加详细信息。跟踪在对照细胞和用EGF或PDBu刺激的细胞中ERK活化的散点图显示两个因素都增加了细胞核和胞浆中的ppERK(图2)。

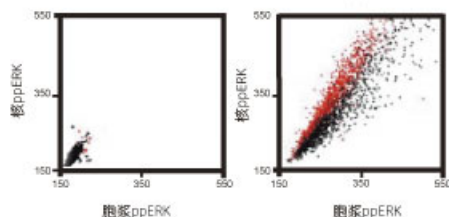


图2. 单细胞分析。胞浆ppERK染色强度是相对对照细胞(左图)或用PDBu或EGF刺激的细胞(右图)中胞浆的ppERK绘图。每个点代表一个细胞。数据来自于复孔。PDBu和EGF都增加了胞浆和核的ppERK, 但是PDBu(红点)比EGF(黑点)在增加核内的ERK活性中更加有效。

它们也显示在导致ppERK转入核中PDBu更加有效。这个信息对这个途径的机制至关重要，但是它不可能通过对全细胞抽提物的Western印迹或一种ELISA类型的ppERK分析而获得。

创新性的监测

由于ERK的磷酸化状态影响和一些(但不是全部)ERK支架蛋白的结合，研究人员希望能够平行监测ERK和ppERK的亚细胞分布。首先他们使用siRNA(针对非编码区)敲除内源性的ERK1和2的表达。然后他们使用重组的腺病毒(Ad)添加特异的ERK表达(腺病毒介导的ERK2/GFP，它和ERK2在功能上无法区分且能够使用适当的Ad滴度在生理水平表达)或ERK2/GFP的Y261A和D319N突变体(突变体削弱了有利于典型地通过ERK对DEF和D结构域的结合)。图3阐明了敲除/反加策略的效率以及EGF对野生型和突变型ERK2/GFP受体活化和转移的影响。D-结构域依赖型结合的抑制并没有影响上游的活化(图3)但的确以一种刺激特异性的方式(没有展示)影响ERK的空间和时间方面。

研究人员采用相同的敲除/反加监测方法来阐明双特异性磷酸酶(DUSPs)对ERK信号的刺激特异性效应。DUSPs是ERK信号最重要的支架和调控子之一且一直是作为潜在的治疗目标进行研究。他们使用敲除/反加方法筛选针对功能MAPK磷酸酶和10个结构相关的非典型DUSPs的siRNA库来测定对EGF和PDBu的急剧和缓慢的应答(ppERK上升和ERK2/GFP转移)。筛选的20个DUSPs中16个(包括非典型DUSPs)影响ERK信号(图4)，而且看到的效果取决于刺激物和终点测定(数据没有展示)。

结论

用IN Cell Analyzer 1000的半自动化图像采集和分析为ERK信号监测提供一种非常有效的方法。用这种方法所获得的高通量促进敲除/反加方法的建立，用于监测由于ERK突变和磷酸酶敲除所影响的应答时空方面的信号。令人惊讶的是，许多DUSPs影响ERK信号且是以不同的途径影响(例如选择性地影响急剧的或是缓慢的应答，或是选择性地影响对EGF和PDBu的应答)。这与功能性冗余完全相反，这一点将与开发DUSPs作为治疗靶点有关。重要的是，所发现的影响的广泛性在单一终端分析中是不明显

的(例如ppERK的Western印迹或ELISA)布里斯托尔组目前正在应用IN Cell Analyzer 1000把他们的工作扩展到探索ERK活化的下游结果，包括细胞周期分布和早期基因表达的改变。因此，由IN Cell Analyzer 1000提供的高内涵分析方法不仅增加了通量和节约了时间，而且促进研究人员得到更好的数据和了解更多细胞系统的知识。

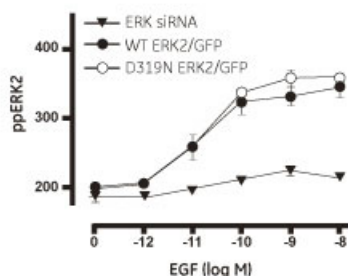


图3. ERK2/GFP的敲除/反加。细胞用ERK siRNA处理以敲除内源性的ERK1和2并接受或是没有反加(ERK siRNA)或是转染表达WT ERK2/GFP或D319N，如图所示。然后细胞在进行ppERK染色和成像前用显示的EGF浓度刺激。

从图上可以看出两种反加条件的ERK剂量依赖激活与没有敲除或反加的对照细胞(没有展示)是相当的且通过GFP转移到细胞核是平行的。这些实验表明了敲除/反加策略的有效性，而且显示对D-结构域依赖性结合的抑制(D319N突变体)不影响上游活化。

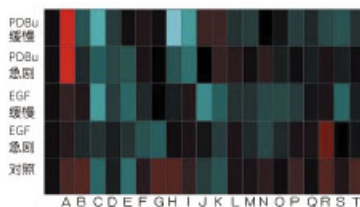


图4. siRNA筛选。敲除/反加方法被用于进行针对双特异性磷酸酶(DUSPs, 编码A-T)的siRNA库的效果的筛选。细胞接受EGF或PDBu急剧和缓慢的刺激，如图所示，而

且测定了对ppERK强度和分布的影响以及ERK2/GFP的分布。图像显示用对照值(黑色)标准化后的数据的热谱图；显示逐渐增加的抑制(蓝色)和逐渐增加的刺激(红色)。这些siRNA的不同效应(颜色标记)显示相应的磷酸酶在形成ERK应答中的特定的作用。

参考文献

1. Caunt, C. J. et al. Arrestin-mediated ERK activation by gonadotropin-releasing hormone receptors [GnRHRs]: Receptor-specific activation mechanisms and compartmentalization. *J. Biol. Chem.* 281, 2701-2710 (2005).
2. Count, C. J. et al. GnRH Receptor Signaling to ERK: Kinetics and Compartmentalization. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 17, 76-283 (2006).
3. Count, C. J. et al. Seven Transmembrane Receptor Signaling and ERK Compartmentalization. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 17, 308-313 (2006).

致谢

数据的产生和使用都得到了C. J. Caunt博士和C. A. McArdle教授的同意，南布里斯托尔大学临床科学系，布里斯托尔，英国。