

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/68

C07K 16/18 C07K 14/47

C12N 15/00 C12N 5/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00819028.3

[43] 公开日 2003 年 8 月 6 日

[11] 公开号 CN 1434923A

[22] 申请日 2000.12.15 [21] 申请号 00819028.3

[30] 优先权

[32] 1999.12.15 [33] US [31] 60/171,012

[32] 1999.12.16 [33] US [31] 60/172,350

[86] 国际申请 PCT/US00/34375 2000.12.15

[87] 国际公布 WO01/44816 英 2001.6.21

[85] 进入国家阶段日期 2002.8.15

[71] 申请人 加州大学评议会

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 V·R·林加帕

T·D·鲁特科夫斯基

R·S·赫奇

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

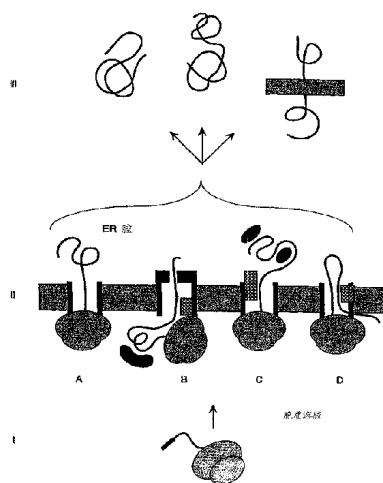
代理人 张广育 姜建成

权利要求书 7 页 说明书 58 页 附图 20 页

[54] 发明名称 构象和拓扑学蛋白调控

[57] 摘要

提供了用于鉴定未知的、作为不同构象异构体存在的、蛋白的新型构象异构体的方法和组合物。通过利用嵌合基因，用不同的信号序列取代天然信号序列导致产生一种构象异构体，就可以对天然蛋白和该嵌合基因的产物进行比较。如果构象不同，可以将不同的蛋白用于生产抗体，解释与天然和不同构象异构体蛋白相关的机理，分析不同构象异构体在生理样品中的存在，鉴定与该构象异构体特异性结合的化合物，特别是药物等。如果所述构象异构体的形成与疾病状态相关，该构象异构体就可用于筛选，以便鉴定作为药物候选物的化合物。



ISSN 1008-4274

1. 一种鉴定至少具有两种不同拓扑结构形式的蛋白分子的构象异构体的方法，该方法包括：

5 比较通过表达嵌合基因所获得的蛋白的拓扑图，所述嵌合基因的 DNA 序列与编码天然蛋白的开放读框编码至少基本上相同的氨基酸序列，其中，所述天然蛋白是由具有一个信号序列的基因编码的，所述嵌合基因具有不同的信号序列，其中，所述嵌合基因表达产物与所述天然基因表达产物相比在拓扑图方面的改变表明所述蛋白是所述天然蛋白的一种构象异构体。

10 2. 如权利要求 1 的方法，其中，所述表达是在裂解物中进行的。

3. 如权利要求 2 的方法，其中，所述裂解物是分级分离的裂解物。

15 4. 如权利要求 1 的方法，其中，所述表达是在补充了分级分离和重建的微粒体膜的系统中进行的。

5. 如权利要求 1 的方法，其中，所述表达是在完整细胞中进行的。

6. 如权利要求 1 的方法，其中，通过表达所述嵌合基因和所述天然基因所获得的成熟蛋白是相同的。

20 7. 一种用于制备不同于主要正常野生型蛋白构象异构体的一种构象异构体的抗体的方法，该方法包括：

用一种通过表达嵌合基因所获得的蛋白对哺乳动物宿主进行免疫，所述嵌合基因的 DNA 序列与编码天然蛋白的开放读框编码至少基本上相同的氨基酸序列，其中，所述天然蛋白是由具有一个信号序列的基因编码的，所述嵌合基因具有不同的信号序列，因此，在产生抗体的条件下产生了一种构象异构体，该抗体与所述构象异构体的结合亲和力不同于所述抗体与所述天然蛋白的结合亲和力。

8. 如权利要求 7 的方法，还包括：

30 在免疫之后，无限增殖化来自所述哺乳动物宿主的 B-淋巴细胞，以便提供无限增殖化的能够分泌抗体的 B-淋巴细胞；

筛选所述抗体对除了所述主要正常野生型蛋白的构象异构体之外的所述不同构象异构体的不同亲和力，以便鉴定不同的构象异构体特

异性抗体；和

分离所述能分泌所述不同构象异构体特异性抗体的无限增殖化的B-淋巴细胞。

9. 如权利要求 8 的方法，其中，所述哺乳动物宿主是小鼠，所述 B-淋巴细胞是脾细胞，而所述无限增殖化是与肿瘤细胞融合产生杂交瘤。

10. 一种用于检测蛋白的构象差异的方法，该方法包括：

使通过表达一种嵌合基因而获得的非变性蛋白与一种试剂接触，所述嵌合基因的 DNA 序列与编码天然蛋白的开放读框编码至少基本上相同的氨基酸序列，其中，所述天然蛋白是由具有一个信号序列的基因编码的，所述嵌合基因具有不同的信号序列，因此，能产生一种构象异构体，所述试剂能够可检测地修饰可达到的所述构象异构体和所述天然蛋白所共有的氨基酸的侧基，以便产生含有修饰过的侧基的构象异构体和天然蛋白；和

检测所述构象异构体和所述天然蛋白之间在所述修饰过的侧基上的差别，将其作为所述构象异构体和所述天然蛋白之间构象差别的指示。

11. 如权利要求 10 的方法，其中，所述试剂是交联剂或化学改性剂。

12. 如权利要求 10 的方法，其中，所述化学改性剂是 N-磺基生物素或三硝基苯磺酸。

13. 如权利要求 10 的方法，还包括：

评估所述感兴趣的蛋白对蛋白酶的反应性，其中，改变了的反应性是所述蛋白与所述天然蛋白相比构象差别的指示。

14. 一种用于检测感兴趣的蛋白的构象差异的方法，所述方法包括：

通过高压液相层析分析通过表达一种嵌合基因所获得的非变性蛋白，所述嵌合基因的 DNA 序列与编码天然蛋白的开放读框编码至少基本上相同的氨基酸序列，其中，所述天然蛋白是由具有一个信号序列的基因编码的，所述嵌合基因具有不同的信号序列，因此，能产生一种构象异构体，其中，所述感兴趣的蛋白与天然蛋白相比在层析图上的改变是构象差异的指示。

15. 如权利要求 14 的方法，其中，所述高压液相层析是用疏水性吸附柱进行的。

16. 一种用于鉴定一种构象异构体在一种样品中存在的方法，其中，至少存在来自其构象异构体尚未鉴定的蛋白的两种不同的构象异构体，其中，不同于主要野生型构象异构体的构象异构体是通过在细胞宿主中表达产生的，所述测定包括：

将所述样品与一种实体混合，与所述野生型构象异构体相比，该实体对所述不同的构象异构体具有改变了的结合亲和力；和

检测所述实体的结合，作为所述不同构象异构体存在的指示。

17. 如权利要求 16 的方法，其中，所述实体是抗体。

18. 如权利要求 16 的方法，其中，所述实体是标记过的分子量低于 5kDal 的分子。

19. 一种 DNA 构建体，包含与一种非天然信号序列结合的编码 PrP 蛋白的 DNA 序列。

20. 如权利要求 19 的 DNA 构建体，其中，所述信号序列会导致 Ctm-PrP 的形成。

21. 一种非人哺乳动物，含有权利要求 19 的 DNA 构建体。

22. 一种评估个体对与疾病状态相关的环境变化的反应的方法，该方法包括：

使来自所述个体的淋巴细胞接触所述环境变化；和

测定所述淋巴细胞中 Ctm-PrP 表达的变化，作为个体对环境变化反应的指标。

23. 一种用于筛选易感与 Ctm-PrP 相关疾病的个体的方法，该方法包括：

测定所述个体中受所述疾病影响的细胞、组织或器官或与受所述疾病影响的细胞、组织或器官相关的体液中 Ctm-PrP 的含量，与对照细胞、组织、器官或体液中的含量进行比较；或

与正常细胞在外部试剂作用下 Ctm-PrP 含量比较，测定在外部试剂作用下与疾病相关细胞中 Ctm-PrP 含量的变化，将其作为对与 Ctm-PrP 相关疾病易感性的指标。

24. 如权利要求 23 的方法，其中，所述疾病是神经变性疾病或肌病。

25. 如权利要求 23 的方法, 其中, 所述组织是脑组织或肌肉组织, 所述细胞是淋巴细胞, 且所述体液是脑脊液。

26. 一种用于筛选化合物对一种蛋白的不同构象异构体的相对量的影响, 该方法包括:

5 使细胞与所述化合物混合足够的时间, 以便形成所述蛋白及其任何不同的构象异构体; 和

与在没有所述化合物的条件下所述不同构象异构体的量相比, 分析所述不同构象异构体改变了的含量。

10 27. 一种用于筛选化合物对在哺乳动物中产生的一种蛋白的不同构象异构体的相对量的影响的方法, 该方法包括:

给一种哺乳动物提供所述化合物; 和

与在没有所述化合物的条件下所述构象异构体的相对量相比, 测定在所述哺乳动物的体液或组织中所述蛋白的构象异构体相对量的变化。

15 28. 如权利要求 27 的方法, 其中, 所述蛋白是 PrP。

29. 测定一种试剂对一种内源蛋白构象异构体的相对量的影响的方法, 该方法包括:

20 使一种嵌合宿主与所述试剂接触, 其中, 所述嵌合宿主的特征是具有来自不同物种编码所述蛋白的外源基因, 或者是由与编码所述蛋白的基因相同的转运机制加工过的内源基因之外的基因; 和

测定所述试剂对作为所述内源基因替代物的所述外源基因的影响。

30. 具有改变了的构象的一种或多种蛋白, 所述一种或多种蛋白是通过以下方法生产的:

25 在一种分级分离的裂解物中实现一种嵌合基因的表达, 所述嵌合基因的 DNA 序列与编码天然蛋白的开放读框编码至少基本上相同的氨基酸序列, 其中, 所述天然蛋白是由具有一个信号序列的基因编码的, 所述嵌合基因具有不同的信号序列, 其中, 所述蛋白不是 Ctm-PrP, 因此, 产生了具有改变了的构象的一种或多种蛋白。

30 31. 具有改变了的构象的一种或多种蛋白, 所述一种或多种蛋白是通过以下方法生产的:

用分级分离和重建的膜实现一种嵌合基因的表达, 所述嵌合基因

的 DNA 序列与编码天然蛋白的开放读框编码至少基本上相同的氨基酸序列，其中，所述天然蛋白是由具有一个信号序列的基因编码的，所述嵌合基因具有不同的信号序列，其中，所述一种或多种蛋白不是 Ctm-PrP，因此，产生了具有改变了的构象的一种或多种蛋白。

5 32. 一种用于改变蛋白构象的方法，该方法包括：

实现一种嵌合基因的表达，所述嵌合基因的 DNA 序列与编码天然蛋白的开放读框编码至少基本上相同的氨基酸序列，其中，所述天然蛋白是由具有一个信号序列的基因编码的，所述嵌合基因具有不同的信号序列，因此，获得了至少一种与所述天然蛋白相比具有改变了的构象的蛋白。

10 33. 如权利要求 32 的方法，其中，所述表达是在补充了来自一种或多种生物的完整的或分级分离和重建的膜的完整的或分级分离的裂解物中进行的，所述生物缺乏或具有改变了的编码一种或多种与所述天然蛋白表达相关的信号序列、新生链或转运器相互作用的蛋白的基因。

15 34. 如权利要求 32 的方法，其中，所述生物是天然存在的。

35. 如权利要求 32 的方法，其中，所述生物缺乏的所述基因编码反式作用因子。

36. 如权利要求 32 的方法，其中，所述生物是海胆胚胎。

20 37. 具有改变了的构象的一种或多种突变体或嵌合蛋白，其中，所述一种或多种蛋白是通过权利要求 31 的方法生产的，其中，所述一种或多种蛋白不是 Ctm-PrP。

38. 如权利要求 32 的方法，其中，所述不同的信号序列是可调控的信号序列。

25 39. 如权利要求 38 的方法，其中，所述可调控的信号序列是由一种或多种反式作用因子调控的。

40. 一种用于对信号序列进行分类的方法，该方法包括：

在至少两种条件下实现多个嵌合基因的表达，每一个嵌合基因的 DNA 序列编码至少基本上相同的氨基酸序列，其中，每一个嵌合基因具有不同的信号序列，以便产生具有改变了的构象的一种或多种蛋白，其中，所述条件包括：

30 a. 分级分离的裂解物；

b. 分级分离和重建的膜；和

c. 补充了来自一种哺乳动物的完整的或重建膜的分级分离的裂解物，所述生物缺乏或者具有改变了的基因或补充了缺失的编码一种或多种与所述天然蛋白表达相关的信号序列、新生链或转运器相互作用的蛋白的基因；

d. 补充了来自一种非哺乳动物的完整的或重建膜的分离的裂解物，所述生物缺乏或者具有改变了的基因或补充了缺失的编码一种或多种与所述天然蛋白表达相关的信号序列、新生链或转运器相互作用的蛋白的基因；和

e. 细胞质溶胶混合物；

评估在上述至少两种条件下由所述多个嵌合基因所获得的表达产物，作为所述每一个不同信号序列的分类指标。

41. 如权利要求 40 的方法，其中，所述 DNA 序列编码或 PrP 或催乳素，其含有作为所述催乳素构象改变报道标记的工程产生的糖基化受体位点。

42. 如权利要求 40 的方法，其中，所述表达产物是通过选自下列一组的方法评估的：对蛋白酶处理的反应性，高压液相层析，侧基修饰。

43. 一种用于鉴定至少具有两种不同形式的蛋白分子的构象异构体定量分布变化的方法，该方法包括：

比较来自一种动物的多个活检样品中所述蛋白的构象分布；和测定所述多种活检样品中所表达的每一种构象的量，作为所述构象异构体定量分布改变的指标。

44. 如权利要求 43 的方法，其中，所述多个活检样品取自所述动物的不同组织。

45. 如权利要求 43 的方法，其中，所述多个活检样品是以不同的时间间隔获得的。

46. 一种分离的细胞或重组非人细胞，包含：

一种疾病相关蛋白的一种或多种构象异构体，其中，所述疾病相关蛋白的所述构象异构体不是 Ctm-PrP。

47. 如权利要求 46 的分离细胞或重组非人细胞，其中，所述疾病是神经变性疾病或肌病。

48. 一种疾病相关蛋白的分离或纯化的构象异构体，其中，所述疾病相关蛋白的构象异构体不是 Ctm-PrP。

49. 一种疾病相关蛋白的分离的或纯化的构象异构体，其中，所述构象异构体是按照权利要求 1 的方法鉴定的。

5 50. 一种嵌合基因，包括：

一个编码一种疾病相关蛋白的开放读框，以及一个除了该蛋白的天然信号序列之外的信号序列。

51. 如权利要求 50 的嵌合基因，其中，所述疾病相关蛋白是朊病毒蛋白。

10 52. 一种分离细胞或重组非人细胞，包括：

与反式作用因子结合的疾病相关蛋白的新生链。

53. 一种分离细胞或重组非人细胞，包括：

编码一种疾病相关蛋白的基因，其中，该基因的信号序列与反式作用因子结合。

15 54. 如权利要求 52 或 53 的分离细胞或重组非人细胞，其中，所述反式作用因子能改变所述疾病相关蛋白的构象。

55. 如权利要求 52 或 53 的分离细胞或重组非人细胞，其中，所述疾病相关蛋白是朊病毒蛋白。

构象和拓扑学蛋白调控

前言

5 技术领域

本发明的领域是生物学模型和治疗学。

背景

通常，高等真核生物中的基因表达，一般被认为包括通过转录，RNA 剪接和输出，以及翻译过程将基因组编码的信息转化成蛋白。另外两个过程是将新合成的蛋白定位到正确的细胞内区室中，并折叠成正确的三级结构。原则上讲，在这两个过程中，可以对基因表达进行调控。不过，到目前为止，前者一直被认为是对忠实性 (Song 等, 细胞 (2000) 100: 333-343)、降解 (Wiertz 等, 自然 (1996) 384: 432-438), 或者信号传递到其它区室 (Sidrauski 等, Trends Cell Biol (1998) 8: 245-249) 的调控, 而不是对表达基因的信息内容的调控。折叠同样不被视为基因表达的一个基本调控点。一般, 人们普遍接受的是蛋白不是正确折叠就是错误折叠的二分法 (Ellgaard 等, 科学 (1999) 286: 1882-1888)。一直以来, 人们还没有严肃考虑过这样的可能性, 那就是蛋白可能具有一种以上的正确折叠状态, 并且, 细胞能够在特定环境或条件下选择某种而非另一种折叠状态。如果上面的可能性有一种是真实的话, 基因组的信息含量将会大大增加。如果一项发明能够从不同的构象中选择一种的话, 这样的发明将成为一个能够以前所未有的方式测定并接纳基因组信息含量的平台。

25 就蛋白折叠而言, 现代生物学的一个根本定论是, 一级结构决定二级结构, 二级结构与诸如糖基化的相关的翻译后修饰共同决定蛋白的三级结构 (Anfinsen, 科学, 1973, 181: 223-230)。这一观点的一种修订是基于这样的认识: 分子伴侣蛋白通过避免不合适的相互作用, 进而促进实现正确的最终折叠状态的过程, 从而在提高蛋白折叠的忠实性方面起着关键作用 (Ellis 和 Hartl, Faseb J, 1996, 10: 20-26)。以下认识构成了被普遍接受的蛋白折叠观点的第二种修订: 折叠有可能在分子的很多部分同时开始, 使得链筒向最低的能量状态汇

集，而不必沿途试验每一种可能性（Dill 和 Chan，自然结构生物学，1997，4：10）。上述观点都没有考虑到这样的可能性，那就是折叠有可能是通过一个途径而不是另一个途径的方式调控，取决于一种而不是另一种蛋白-蛋白相互作用方式。如果真是这样的话，就可以对蛋白折叠进行操作，以期能够产生诊断或治疗优点。

注定将要从细胞中分泌出来的蛋白，一般含有位于氨基末端的信号序列，该序列能启动一系列蛋白-蛋白相互作用，将正在生长的链导向内质网（ER）膜，并通过转运通道进入 ER 腔（Blobel, PNAS, 1980, 77: 1496-1500）。业已阐明了在上述过程中，信号识别颗粒及其受体（Walter 和 Johnson, 1996）、异源三聚体 Sec61 复合体（Gorlich 和 Rapoport, 细胞, 1993, 75: 615-630）和其它蛋白（Jungnickel 和 Rapoport, 细胞, 1996, 82: 261-270）的作用。

在这一大的主题下，膜内在蛋白组装成 ER 膜似乎是一个复杂的变数，由内部信号序列和终止转移序列，以及杂合的信号-锚序列导向，它们与各种 ER 蛋白的相互作用引导多肽的最终跨膜方向，并且，通常是在多肽链从转运通道释放到脂双层中之后，再将该蛋白锚定在脂双层方面起作用（Skach 和 Lingappa, 生物学化学杂志, 1993, 268: 23552-23561; Borel 和 Simon, 细胞, 1996, 85: 379-389; Heinrich 等, 细胞, 2000, 102: 233-244; Moss 等, 分子生物学细胞, 1998, 9: 2681-2697）。

对于分泌蛋白来说，其信号序列通常被与 ER 膜相关的信号肽酶复合体从生长中的链上裂解下来，将新生链留在 ER 腔中（Matlack, 细胞生物学杂志, 1999, 270: 6170-6180），被裂解的信号肽很有可能回到胞质溶胶中并降解（Lyko 等, 生物学化学杂志, 1995, 270: 19873-19878）。在细菌和诸如酵母的原始真核生物中，大量的转运是在合成完成以后进行的（Rapoport 等, 生物学化学杂志, 1999, 380: 1143-1150）。在这种翻译后转运中，有人提出信号序列作为分子伴侣蛋白在保持非折叠状态方面起作用（Liu 等, PNAS, 1986, 86: 9213-9217）。不过，在高等真核生物中，通过 ER 膜的大多数转运，似乎是与翻译同时进行的，就是说，当链仍然在生产的过程中，一般认为，新生链被直接转移到 ER 腔中，在这里开始折叠（Chen 和 Helenius, 分子生物学细胞, 2000, 11: 765-772）。

综上所述，本文所提供的上述研究表明，有必要对现有的蛋白折叠范例进行若干改进：

首先，必须放弃正确折叠的和错误折叠的蛋白这种简单的二分法，必须认识到，蛋白折叠可以产生多种正确的折叠状态，这些状态很有可能起着不同的功能。在大多数情况下，要检测到这些折叠状态是极其困难的，这不仅因为能方便地区分蛋白构象变体的工具十分有限，并且不容易应用，而且，还因为细胞在特定时间点将不需要的变体降解，而使得这项工作复杂化。

其次，必须认识到的是，细胞具有这样的机制：通过它，在某一时间可以选择（能避开降解机制，并输送到细胞表面或从细胞中输出）一种折叠状态（并因此选择一种功能），而在另一时间选择另一种折叠状态（也因此选择另一种功能）。

再者，已经清楚的是，与通过 ER 膜转运相关的细胞器和决定因子，在选择新合成的蛋白被加工成的折叠筒（folding funnel）形式方面起着重要作用，并且，操作信号序列或操作在细胞质溶胶、膜或 ER 腔中与肽链相互作用的细胞器，是改变所选择的折叠筒的途径，并因此改变蛋白的最终构象或构象组合。

蛋白折叠范例的前两种修订的主要意义在于，大大增加了基因组的信息含量。第三种修订的主要意义是，揭示了获取基因组这种增加了的信息含量的方法，以便产生诊断和治疗优点，提高本发明。

除了说明这些背景问题之外，我们的研究证实了一项发明，通过本发明可以用一种不改变蛋白的最终一级结构的方式，改变任何特定蛋白的折叠筒的选择，不过，这种改变可能导致蛋白的最终折叠构象或形状发生大的变化。我们证实，信号序列能够影响被生长中的多肽链所利用的折叠筒，并因此影响所产生的、新合成的蛋白的最终折叠构象。另外，细胞能够通过信号序列介导的调控，从不同的最终构象中选择一种。由于以不同方式折叠的线性多肽序列可能具有明显不同的形状、物理特性和生物学活性，这种新的调控水平能大大增加基因组的信息含量，并提高细胞现有的基因表达调控的潜力。

附图的简要说明

图 1 表示取代 PrP 信号序列对拓扑结构的影响。图 1 (A) 表示野生型 PrP、Prl-PrP 和 β L-PrP 的结构示意图。方框表示与 PrP 成

熟区融合的来自 PrP、前催乳素和前 β -内酰胺酶的信号序列。裂解位点用箭头标明。图 1 (B) 表示 PrP、Prl-PrP 和 β L-PrP 的拓扑结构。通过沉淀分离来自每一种构建体的体外翻译和转运反应的微粒体，并分成相等量的样品，用蛋白酶 K (PK) 进行消化，消化是在有或没有 1% Triton X-100 (洗涤剂) 的条件下进行，正如在凝胶下面所标明的。留下一份样品不进行处理。在没有洗涤剂的条件下，用 PK 消化 PrP 的三种拓扑结构形式产生显著大小的条带 (Hedge 等, 1988a, 科学 279, 827-834)。在凝胶的左侧标明了每一条带的位置以及相应拓扑结构的示意图。Prl-PrP 的信号序列的裂解是低效率的，使得 ^{35}S -PrP 和 ^{14}C -PrP 由信号裂解类型和信号未裂解类型代表。分子量标记在右侧。每一种构建体的 ^{14}C -PrP 拓扑结构的转运链的百分比，是通过三次这样的实验定量的，并且在 (C) 中示出 (平均值 \pm SEM)。

图 2 表示不影响 PrP 拓扑结构的导向动力学。图 2 (A) 表示在存在 X-轴上所标明的各种量的微粒体的条件下翻译的 PrP。在对拓扑结构进行蛋白水解分析之后，对放射自显影图进行定量，以便确定信号裂解了的总翻译产物的百分比 (实心正方形)，以及以 ^{14}C -PrP 拓扑结构形式转运的链的百分比 (空心圆形)。图 2 (B) 表示通过用 75mM ATA 在 5 分钟时抑制启动，使 PrP 的翻译反应同步。在交错的间隔 (如 X-轴所标明的) 取样，添加微粒体，并且让导向和转运进行 30 分钟。测定拓扑结构和信号裂解，并在图 2 (A) 中作图。图 2 (C) 表示 StuI-截短的 mRNA，它编码 PrP 的 223-聚体，在有 (空心柱) 或没有 (加阴影的柱) 微粒体的条件下翻译。5 分钟之后，用 ATA 抑制进一步的启动，并在 30 分钟向缺乏微粒体的样品中添加微粒体，并且将这两种反应再继续孵育 30 分钟。然后，用 10mM EDTA 将新生链从核糖体上释放出来。按上述方法评估并定量信号裂解和拓扑结构。

图 3 表示信号序列影响核糖体-膜结合。图 3 (A): 前催乳素 (Prl)、前 β -内酰胺酶 (β L)、 β L-Prl 和 Prl- β L 的截短的 mRNA 的翻译和转运，以及通过沉淀从这些反应物中分离微粒体。保留每一种样品的一等份试样不进行处理，并且，将 PK 加入其余试样中。Prl 和 β L-Prl 在 PvuII 位点上截断。 β L 和 Prl β L 在 HpaII 位点上截断。标明了这些构建体以氨基酸为单位的大小。图 3 (B): Prl-PrP、

野生型 PrP 和 β L-PrP 在 BstXI (野生型 PrP, 61 号氨基酸)、NaeI (113 号氨基酸)、XbaI (135 号氨基酸) 或 HincII (180 号氨基酸) 位点上截断, 并且通过图 3 (A) 所示方法进行蛋白水解分析。在每一个样品下面, 标明了通过对所示放射自显影图进行光密度测定定量检测受到保护的、未被 PK 消化的材料的百分比。右侧的示意图表示信号序列 (空心方框) 和跨膜结构域 (灰色方框) 相对核糖体的位置。

图 4 表示 TRAM 依赖性拓扑结构解离。图 4 (A): 构建体 PrP、PrP_(R2, 3)、PrP_(D2, 3)、PrP_(R4, 5) 和 PrP_(D4, 5) 的信号序列。在每一种构建体中氨基酸的改变下面划线, 并且用箭头标明信号裂解的位点。图 4 (B): 将图 4 (A) 所示构建体用于进行翻译和转运反应, 并且通过图 1B 所示蛋白水解方法, 对所得到的拓扑结构进行分析。通过对放射自显影图进行光密度测定, 对 CtmPrP 合成的百分比进行定量, 并且显示出了每一种构建体的百分比。在 X 轴上标明了每一种构建体的信号序列。同时示出了 Prl-PrP 和 β L-PrP 的 CtmPrP 合成, 以便于比较。图 4 (C): 将图 5A 所示 PrP 信号序列突变与催乳素成熟区融合。与催乳素成熟区融合的前原 α 因子 (依赖性) 和前催乳素 (非依赖性) 的信号序列, 分别起着 TRAM 依赖性和 TRAM 非依赖性信号序列的对照的作用 (参见 Voigt 等, 1996, 细胞生物学杂志 134, 25-35)。在含有或缺乏纯化 TRAM 的除去了 ConA 的蛋白脂质体 (按照在实验方法中所描述的方法制备) 中翻译并转运构建体。将每一个反应的一等份样品放在一边, 用于证实两种类型的蛋白脂质体的翻译效率是一样的。其余的材料用 0.5 毫克/毫升 PK 处理, 并且用抗蛋白抗体进行免疫沉淀。这里所给出的 TRAM 依赖性, 是以相对含有 TRAM 的膜而言, 在缺乏 TRAM 的蛋白脂质体中蛋白酶保护的材料减少的百分比来测定表示。

图 5 表示信号序列和 TM 结构域的关系。图 5 (A): 翻译、转运构建体 PrP_(AV3)、Prl-PrP_(AV3) 和 β L-PrP_(AV3), 并且通过与图 1B 完全相同的蛋白水解分析其拓扑结构。在右侧标明了每一种拓扑形式的迁移。图 5 (B): 翻译、转运构建体 PrP_(G123P)、Prl-PrP_(G123P) 和 β L-PrP_(G123P), 并且通过与图 1B 完全相同的方法用 PK 分析其拓扑结构。仅观察到了 ^{sec}PrP, 并且在右侧标明了它的迁移。图 5 (C):

在有微粒体的条件下翻译编码 PrP、Prl-PrP_(AV3)、和 β L-PrP_(G123P) 的大约 180 聚体的 HincII 截短的 mRNA，然后通过沉淀分离。用与图 3B 所示完全相同的方法，通过 PK 蛋白水解检查核糖体-膜结合状态。

5 图 6 表示^{SBC}PrP 与 PDI 的相互作用。图 6(A): 翻译编码 PrP_(G123P) 和 PrP_(AV3) (大约 180 聚体) 的 HincII 截短的 mRNA，并通过沉淀分离膜。一等份样品用 1mM DSS (+XL) 处理，其余的不进行处理 (-XL)。未交联的材料在凝胶的底部显示出。分子量标记物的迁移在右侧示出。箭头表示大约为 65kDa 的蛋白，它优先与 PrP_(G123P) 发生
10 交联。图 6(B): Prl-PrP 和 β L-PrP 在 HincII 位点上截断，并且用与图 6(A) 完全相同的方法处理。在每一个泳道中加等量的总翻译产物。在(A)中出现的 65kDa 的交联物用箭头表示。图 6(C): Prl-PrP 和 β L-PrP 在 NaeI 位点上截断 (大约 113 聚体)，并且用与图 (A) 完全相同的方法通过交联进行分析。标明了在图 6(A) 中出现过的
15 65kDa 交联物 (实心箭头)，以及同样优先与 Prl-PrP 形成的 60kDa 的交联物 (空心箭头)。图 6(D): PDIp 的纯化。所表示的是原始粗制微粒体 (RMs) 的考马斯染色；未提取过的 (沉淀) 或通过皂苷处理提取的蛋白；来自 ConA-琼脂糖凝胶柱的皂苷提取物的流通物 (FT) 和洗脱物。来自 Q-琼脂糖凝胶柱的 ConA 洗脱物的流通物和洗脱物，
20 并且合并来自凝胶过滤 (GF) 柱的峰级份，使得 p65 的纯化 (箭头) 几乎接近均质。有关纯化的细节可以参考实验方法。图 6(E): 在有胰腺微粒体 (上图) 或脑微粒体 (下图) 的条件下翻译 Prl-PrP 和 β -PrP，并且通过沉淀分离膜。在与 1mM DSS 交联之后，用 10mM EDTA 将新生链从核糖体上释放出来，并添加 0.5% 皂苷，以便提取腔蛋白。将一份等分试样放在一边 (泳道 1, 4)，并将抗 PDIp (泳道 2, 5) 或 PDI (泳道 3, 6) 的抗体直接添加到其余材料中，进行免疫沉淀。在胰腺微粒体中翻译的 Prl-PrP 优先与 PDIp (实心箭头) 和 PDI (空心箭头) 交联，而在脑微粒体中只观察到了与 PDI 的交联 (空心箭头)。图 6(F): 翻译编码野生型 PrP 和来自图 4A 的信号序列点突变，在
30 NaeI 位点上截断，以便产生 ~113 聚体的 mRNA，以及编码野生型前催乳素 (Prl)，并且在 MboII 位点上截断以便产生 100 聚体的 mRNA，并通过图 (A) 所示的交联进行分析。在交联并且用 10mM EDTA 释

放新生链之后，添加 0.5% 皂苷，使膜沉淀，并回收含有腔蛋白的上清液。箭头表示 ^{35}S -PrP-特异性腔交联物。每一种构建体的信号序列在凝胶的下面示出。

图 7 表示信号序列作用的假设模型。由信号序列决定核糖体-膜结合状态，该结合状态又影响 PrP 最后的拓扑学状态，并且有可能影响转运行为或其它底物的更微妙的方面。提供了每一种转运结果的例子。

图 8 表示 C^{tm} PrP 诱导的神经变性的剂量反应。图 8 (A): 野生型和突变型 PrP 分子在 ER 上的拓扑结构。用体外合成的编码每一种 PrP 构建体的转录物（在凝胶上方标明），进行兔网织红细胞裂解物无细胞翻译反应，该反应含有源于微粒体膜的 ER 和糖基化的竞争性肽抑试剂。在翻译之后，要么不对样品进行处理，要么在没有或有 0.5% Triton X-100 (“Det”) 的条件下用 PK 消化，如凝胶上方所标明的。在右侧标明了完整长度 PrP 分子、通过 PK 消化产生的 NH_2 -末端片段（表示 N^{tm} PrP）和 COOH -末端片段（表示 C^{tm} PrP）的位置。图 8 (B): 各种转基因小鼠系的表达水平。用 13A5 单克隆抗体对不同量的（微升，在泳道上方标明）来自每一种转基因小鼠的 10% 脑匀浆物中的 PrP 进行免疫印迹，并与叙利亚仓鼠脑匀浆物的滴度进行比较。图 8 (C): 在 $\text{Tg}[\text{SHaPrP}(\text{A117V})_{\text{H}}]$ （实心圆形）和 $\text{Tg}[\text{SHaPrP}(\text{N108I})_{\text{H}}]$ （空心圆形）中症状形成的时间进程。为了进行比较，给出了非转基因对照动物（点划线）和 $\text{Tg}[\text{SHaPrP}(\text{KH}\rightarrow\text{H})_{\text{H}}]$ （实心方形；数据来自 Manson 等，1994，神经学，46: 532-537）的结果。图 8 (D): 按照在方法中所描述的技术分析各种转基因小鼠和叙利亚仓鼠（如在凝胶上方所标明的）的 C^{tm} PrP 和 PrP^{Sc} 。 $\text{Tg}[\text{SHaPrP}(\text{A117V})_{\text{H}}]$ 和 $\text{Tg}[\text{SHaPrP}(\text{N108I})_{\text{H}}]$ 样品来自临床上生病的小鼠，而 $\text{Tg}[\text{SHaPrP}(\text{A117V})_{\text{L}}]$ 和 $\text{Tg}[\text{SHaPrP}(\text{N108I})_{\text{L}}]$ 样品来自至少为 600 日龄的小鼠（这些小鼠没有出现疾病迹象）。PrP 片段在‘温和’条件下抗 PK，表明 C^{tm} PrP 只出现在 $\text{Tg}[\text{SHaPrP}(\text{A117V})_{\text{H}}]$ 和 $\text{Tg}[\text{SHaPrP}(\text{N108I})_{\text{H}}]$ 样品中。在任何样品中都没有抵抗 PK 的 PrP^{Sc} 。

图 9 表示 C^{tm} PrP 和 PrP^{Sc} 之间的关系。图 9 (A)、(C)、(E): 各种转基因系在接种 Sc237 仓鼠朊病毒之后疾病发展的时间进程。

图 9 (B)、(D)、(F): 各种转基因系在发病时抵抗蛋白酶的 PrP^{Sc} 的相对水平。用在方法部分所描述的‘严酷 PK’条件消化每一个品系的双份样品, 并通过 SDS-PAGE 分离等量的每一种样品。通过用 13A5 单克隆抗体进行免疫印迹检测 PrP^{Sc} 特征性的 C-末端 PrP²⁷⁻³⁰ 片段 (用括弧表示)。未消化过的、完整长度的 PrP 的位置用星号标明。图 9 (G): 将每一个转基因系的 C_{tm}-指数 (参见表 1) 相对于在用 Sc237 朊病毒接种之后生病时间所积累的 PrP^{Sc} 的量进行作图。

图 10 表示 C_{tm}PrP 诱导的神经变性病缺乏传染性。最后, 将生病的 Tg[SHaPrP (KH → II)_H] 的小鼠 (KH → II) 和临床上正常的 Tg[SHaPrP] 小鼠 (wt) 处死, 并将脑组织的匀浆物接种到在图片下面所标明的各种宿主的大脑内。所使用的宿主动物是 Tg[SHaPrP (KH → II)_L] [(‘KH → II’)_L]、FVB/Prnp^{0/0} (无 PrP)、Tg[SHaPrP] 和叙利亚仓鼠。将接种之后单个动物死亡的时间 (天) 作图。将由所有原因导致的死亡, 包括与接种本身相关的死亡作图。该实验在大约 600 天之后终止, 剩余的动物都没有表现出任何神经疾病的体征或症状。每一个实验代表 3 组, 每组包括 10 只宿主动物, 给这些动物注射了用 3 只不同的待实验的动物制备的接种物。应当指出的是, 在我们的动物养护设施中, 仓鼠一般都存活大约 200-400 天, 而小鼠存活超过 600 天 (资料未发表)。

图 11 表示在 PrP^{Sc} 积累过程中 C_{tm}PrP 的产生。

图 11 (A): 实验设计示意图。用 RML 小鼠朊病毒 (加斜线的方形) 接种表达 SHaPrP 和 MoPrP 的双转基因小鼠 (分别用加阴影的圆形和空心圆形表示)。随着时间推移, 宿主 MoPrP^C 转化成 MoPrP^{Sc} 并积累。在此期间, 由于物种屏障 (species barrier) aPrP 未转化成 HaPrP^{Sc}, 因此, 可以检测 C_{tm}PrP。图 11 (B): 在接种 RML 之后, 在不同时间 (以周计) 小鼠体内总 PrP^{Sc} 和 HaPrP^{Sc} 的相对量。用‘严酷 PK’条件消化匀浆物, 用 PNGase 处理, 通过 SDS-PAGE 分析, 并且用 R073 多克隆抗体 (用于检测总的 PrP) 或 3F4 单克隆抗体 (用于选择性地检测 SHaPrP) 进行免疫印迹。除了泳道 2 和 11 (含有 1/4 量) 和泳道 3 和 10 (含有 1/10 量) 之外, 在每一个泳道中分析相同量的匀浆物。图 11 (C): 在接种 RML 之后的不同时间, 仓鼠 C_{tm}PrP

的相对量（用 3F4 单克隆抗体选择性地检测）。每一个柱表示 3 次测定的平均值 \pm SEM。

图 12 表示朊病毒疾病发病机理的三期模型。I 期是 PrP^{Sc} 的形成和积累。这一过程可以通过接种或者突变的 PrP^C 自发转化成 PrP^{Sc} 启动。II 期包括与产生 CtmPrP 有关的事件。这些事件能够在目前未知的步骤（带问号的点划线）被积累的 PrP^{Sc} 反式影响，或被 PrP 内部的某些突变顺式影响。III 期表示与 CtmPrP 介导的神经变性相关的事件（目前未知）。其中，第一步很可能包括将 CtmPrP 输出到 ER 后区室。在该模型中，PrP^{Sc} 可能导致疾病（通过 CtmPrP），但不是绝对必要的，而 CtmPrP 产生对于疾病的发展来说是必要的和足够的。

图 13 表示模式分泌蛋白信号序列的效率。在没有或有犬胰腺微粒体膜（RM）的条件下，在兔网织红细胞裂解物中，翻译前催乳素（Prl）、前 β -内酰胺酶（ β lac）和前 IgG 重链（IgG）的完整长度的 mRNA，将等量的翻译材料样品留下不进行处理，或者在有或没有 1% Triton X-100（洗涤剂）的条件下用蛋白酶 K 处理。标明了未处理过的材料（pPrl、p β lac、pIgG）的位置，以及信号裂解的（Prl, β lac）和糖基化的（IgG-CHO）材料的位置。

图 14 表示新生分泌蛋白对核糖体-膜结合的不同作用。图 14 (A): 前催乳素 mRNA 在连续的位点上截断，产生含有所标明数量的 N-末端氨基酸的新生链。信号裂解蛋白的氨基酸数量在括号中给出。通过 Rutkowski 等所披露的蛋白水解方法评估核糖体-膜结合状态（“信号序列在转运调控中的新作用”，参见优先权申请 60/171012 和 60/172350）。图 14 (B) 和 (C): 在所标明的位点上对 β lac 和 IgG mRNA 进行一系列截短，并通过 (A) 所述的蛋白水解方法进行分析。对每一幅照片来说，右侧的草图表示在链生长期间在 3 个点里面每一点的核糖体-膜结合状态。注意，只有图 14A 中的左侧照片以及图 B 和 C 中的左侧和中央照片表示“开放的”核糖体-膜结合，而 14A 的中央和右侧照片以及图 14B 和 C 的右侧照片表示“关闭的”核糖体-膜结合。

图 15: 在 PvuII 位点上截断催乳素（Prl）和 IgG/Prl（编码信号序列和每一种蛋白的成熟区的 56 个氨基酸），并在有犬胰腺粗制微粒

体的条件下翻译。通过沉淀分离目标链。将一份等分试样放在一边，并用 2mM BM(PEO)₃ 处理其它的样品[XL]。箭头表示大约为 35kDa 的蛋白，它优先与 Prl 交联。10kDa 的未交联材料位于照片的下面。分子量标记的迁移在凝胶的左侧标出。

5 图 16: 糖基化作为信号序列依赖性构象改变的报道标记。图 16 (A): 在有或没有犬粗制微粒体 (RM) 的条件下 (如图中所标明的), 在兔网织红细胞裂解物系统中翻译编码具有工程合成的 N-末端糖基化位点的天然前催乳素 (Prl)、或与小鼠 IgG 重链 (IgG/RPL)、大鼠生长激素 (GH/Prl)、或仓鼠 PrP 信号序列融合的糖催乳素 (PrP/Prl) 的体外转录的 mRNA。还要向某些样品中添加糖基化竞争抑制剂 (AP)。在翻译之后, 将样品放在一边不进行处理, 或者在 0℃ 下, 在有或没有 1% Triton X-100 (det) 的条件下与 0.5 毫克/毫升蛋白酶 K 一起孵育 30 分钟。然后, 将反应物进行 SDS-PAGE 电泳, 并通过放射自显影观察。出现了三种催乳素: 信号裂解了的、转运的、糖基化的催乳素 (Prl-CHO); 信号未裂解的、未转运的前催乳素 (pPrl); 和信号裂解的、转运的、非糖基化的催乳素 (Prl)。图 16 (B): 通过如图 16 (A) 所示扫描和放射自显影图的光密度分析测定来自三个实验的每一种构建体实现糖基化的催乳素链的百分比。图 16 (C): 用编码具有其自身信号序列或大鼠生长激素或小鼠 IgG 重链信号序列的糖催乳素的表达质粒对 COS-1 细胞进行瞬时转染。为了比较, 同样转染了缺乏糖基化位点的相同构建体 (-CHO)。在无血清、无甲硫氨酸培养基中对所述细胞进行 45 分钟预孵育之后, 将 100 μCi 的 ³⁵S-甲硫氨酸/半胱氨酸混合物加入该细胞培养基中, 将细胞标记 1 小时。将来自所述细胞的培养基样品直接在 SDS-PAGE 上电泳。糖基化和非糖基化形式的催乳素在照片的右侧标明。糖基化的 GH/Prl 和 IgG/Prl 是明显可见的, 没有观察到糖基化的天然催乳素。

图 17 表示成功转运需要结合调控。图 17 (A): 催乳素成熟区与它自身的信号序列融合 (Prl-Prl) 或者在信号序列裂解位点上与前 β-内酰胺酶 (βL-Prl) 或前 IgG 重链 (IgG-Prl) 的信号序列融合。在微粒体膜存在的条件下翻译编码这些底物的完整长度的 mRNA, 并且按照图 17A 所示进行分析。对每一种底物来说, 通过对达到了加工过

的、转运状态的总链的百分比进行定量测定确定转运的效率。每一个柱表示三次实验的平均转运百分比 (+/-SEM)。图 17 (B): 在 PvuII 或 AflIII 位点上截断编码 Prl-Prl、 β L-Prl 和 IgG-Prl 的 mRNA (成熟催乳素的氨基酸数量在括号中标出)。通过图 15B 所示的蛋白水解分析翻译的、沉淀的链, 以便评估核糖体-膜结合状态。在 Y-轴上对来自三次实验的每一种底物免受 PK 消化的平均百分比进行作图。图 17 (C): IgG-Prl 嵌合体的示意图。增加前 IgG 重链的长度或将非 IgG 氨基酸片段与催乳素成熟区融合。用箭头标出信号序列裂解位点。来自 IgG 的序列用空心方框表示, Prl 成熟区序列用柱表示, 而非 IgG 对照序列用加斜线的方框表示, Prl 信号序列用加阴影的方框表示。每一个构建体下面的数字表示来自前 IgG 重链、前催乳素信号序列 (Prl-Prl) 或起始甲硫氨酸为 1 号的非 IgG 序列 (IgG-Prl (1-132) 填充片段的 15-132 号) 的氨基酸数量。图 17 (D): 在有微粒体膜的条件下翻译图 17 (C) 所示底物, 并象图 17 (B) 一样分析三次实验的平均转运百分比。

图 18 表示转运调控如何导致构象多相性杂合性的示意图。左侧的罗马字编号表示在 ER 上蛋白生物发生的三个阶段的终点: I, 包括导向的最初事件; II, 转运本身的事件; 和 III, 最终的折叠蛋白。转运调控 (其中, 四种形式如图 18 (A-D) 中 II 期所示) 提供了在完成的、折叠的蛋白上实现多相性的方法 (参见 III), 正如本文所假设的。分子伴侣蛋白用实心椭圆表示, 而 TrAFs 用加斜线的矩形表示。在图 18 (A) 中, 易位子起着分子伴侣蛋白的作用。在图 18 (B) 中, 易位子在还原环境中迫使新生链开始折叠, 也许与分子伴侣蛋白或翻译后修饰细胞器相关。注意, 易位子的腔出口是关闭的, 而在组成核糖体-膜结合的细胞质一侧是开放的。在图 18 (C) 中, 情况相反——关闭的细胞质出口和开放的腔出口, 同样有不同的分子伴侣蛋白确定无疑地参与。最后, 图 18 (D) 表示 TrAFs 的作用可以导致蛋白拓扑结构的改变以及构象的改变。一级蛋白折叠不取决于这些因素。二级蛋白折叠根据 TrAF 作用会出现不同形式 (注意图 18B 与 C 中不同的分子伴侣蛋白), 所述作用构成了蛋白折叠在三级水平上的复杂性。蛋白折叠复杂性的最后一级是由于信号传递途径对 TrAFs 的调控, 这种调控使得细胞能够在图 (A) - (D) 中选择, 例如, 根据环境或其

它条件的改变而有所不同。

图 19: 按业已公开的方法 (Lopez 等, 科学, 1990, 248: 226-229), 在有胞质溶胶提取物的条件下转录并翻译 PrPcDNA, 所述提取物是从用二甲基亚砷诱导分化之前和之后 6 天里的 4 天的小鼠红白血病细胞中制备的。在翻译反应中, 35S 甲硫氨酸的存在, 使得放射性标记过的新合成的蛋白, 通过在十二烷基硫酸钠里的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 以及放射自显影 (AR) 可以观察到。一个活性单位是在补充了最终浓度为 5A280u/ml 的狗胰腺微粒体膜的 10 微升翻译反应物中改变 PrP 拓扑结构形式比例, 使其有利于 secPrP 所需要的提取物的量。为了制备胞质溶胶提取物, 在 10mM Hepes pH7.5 中膨胀之后对细胞进行匀浆, 并且通过以 100000Xg 离心 1 小时除去膜。正如所看到的, 来自未分化 MEL 细胞的胞质溶胶富含促进 secPrP 的活性, 而该活性随着时间的推移在细胞分化后丧失。在这种情况下, PrP 起着胞质溶胶调控活性的标记的作用, 该活性有可能在若干蛋白上用于不同的目的。注意, 在第 6 天时间点的凝胶上珠蛋白带的存在, 表明了珠蛋白的诱导, 它是这些细胞中的分化标记。

图 20: 按业已公开的方法, 在有标明来源的微粒体膜的条件下进行 PrP cDNA 的转录和翻译。如上文所述, 在没有或有洗涤剂的条件下对产物进行蛋白酶消化处理。给出了在没有洗涤剂的情况下, 用蛋白酶消耗的产物, 可以通过 SDS-PAGE 和 AR 方便地评估 Sec-PrP 与 Ctm-PrP 的比例。E=来自 13 日胚龄的仓鼠脑的微粒体膜; N=新生仓鼠脑微粒体膜; 7d=来自出生后 7 天的仓鼠脑的微粒体膜; 14d=来自出生后 14 天的仓鼠脑的微粒体膜; 21d=来自出生后 21 天的仓鼠脑的微粒体膜; A=来自成年仓鼠脑的微粒体膜; SUE=海胆胚胎微粒体膜 (它缺乏 TrAF, 因此只能产生相当于去掉了糖蛋白的分部分离的和重建的蛋白脂质体的 Ctm-PrP, Hegde 等, 1998, 分子细胞 2: 85-91)。上面的箭号表示 SecPrP 的位置; 下面的箭号表示 Ctm-PrP。下面的图片是对上面所标明的每一个泳道的分泌 PrP 与总 PrP 比例的定量。结果表明, 来自不同组织和物种, 以及来自不同发育时间的相同组织和物种的膜, 可能具有显著不同的 TrAF 活性。这一结果与下面的假设吻合: 即转运是调控蛋白生物发生的

重要部位，并且反式作用因子参与了转运调控。在这种情况下，朊病毒蛋白单独被用作 TrAF 活性的报道分子。相同的原理可应用于可能存在转运调控的所有基因。

发明概述

5 提供了用于生产具有各种拓扑图和/或拓扑结构类型的蛋白，提供嵌合蛋白，鉴定与拓扑图和/或拓扑结构类型形成相关的特殊试剂的方法和组合物，提供了体外和体内系统模型，以及用于鉴定拓扑图和/或拓扑结构类型不同的蛋白的方法。通过改变信号序列、用已知机制的序列取代野生型信号序列、在体外转运模型系统中选择性地包括易位
10 子相关蛋白、采用具有微粒体的修饰过的裂解物研究和制备具有不同构象的蛋白，以便研究并生产构象不同的蛋白，生产并利用剔除和突变型小型实验哺乳动物，从而调节目标蛋白的拓扑结构生产，并解释生理学机制。

具体实施方案的说明

15 将与蛋白转运系统的因素相关的方法和组合物用于阐明该系统组成部分及其功能，用嵌合基因调节蛋白折叠，该嵌合基因采用了非天然信号序列，以便提供“构象异构体”（至少具有大体上相同的氨基酸序列，但具有不同的物理拓扑结构或拓扑图的蛋白）。拓扑结构用于表示蛋白的不同位置，例如 C-细胞质与 N-细胞质的比较，而拓扑
20 图用于表示外部构象或形状的改变，将其用于鉴定构象异构体，提供用于该目的的体外和体内系统，并鉴定在转运期间调节蛋白构象的组合物。本文所说的拓扑图表示具有基本相同的或相似的氨基酸序列，但由于折叠/构象的差异而具有不同的三维形状的蛋白。在本文中，具有大体上相同的氨基酸序列的多肽是指具有保守氨基酸取代的多肽
25 （即分别用小的或大的侧链取代小的或大的侧链；或者分别用酸性、碱性、极性或疏水性侧链取代酸性、碱性、极性或疏水性侧链），这种取代不会改变蛋白的构象或拓扑结构。利用网织红细胞裂解物分离方法还提供了用于鉴定多基因产物的方法，所述产物在蛋白生物合成期间，能调节信号序列介导的折叠筒的选择。用于分离翻译提取物以及
30 分离具有包含或缺少特定反式作用活性的重建的亚组分的可溶性膜的方法，提供了好于现有系统的若干优点。该方法能够方便地用于大规模生产；分离所需要的材料要么是廉价的（常见化合物）要么是可

再利用的（离心管、离子交换树脂）；并且，最终产物在适当保存时具有很长的储存寿命。

该分离系统与现有 RRL 相比具有若干优点，包括：我们已经证实，通过简单地用 RRL 核糖体补充来自爪蟾卵母细胞的 S100 部分就可以导致翻译效率比现有的卵母细胞翻译系统增加一个数量级（2）。这样的卵母细胞系统可用于研究卵母细胞特异性事件，如发育调控因子的翻译抑制；以及在来自狗胰腺粗制微粒体试剂中所含的核糖体，似乎在恢复对 DEAE 级份翻译方面有很高活性。因此，转运过程可以在基本上同源的系统中进行研究，其中狗胰腺核糖体通过狗胰腺膜翻译和转运蛋白。与异源系统相比，在同源系统中可以更真实地再现核糖体和易位子蛋白之间的微妙的和调控的相互作用。

该系统可以方便地应用于其它翻译系统，如小麦胚芽翻译系统或爪蟾卵母细胞翻译系统。在某些情况下，分级分离系统能导致翻译效率的极大提高（如上文所述）。另外，混合和匹配来自多个这样的分离系统的成分的能力，使得能够研究与某些蛋白的生物发生相关的组织特异性事件。通过互补作用，它很有可能对鉴定与所述组织特异性事件相关的因子有用。所述组织特异性差异的例子在文献中有报导（Wolin 和 Walter, 细胞生物学杂志, 1989, 109: 2617-2622; Lopez 等, 科学, 1990, 248: 226-229）。

感兴趣的蛋白是这样的蛋白：它具有一个信号序列，可以在内质网中进行过加工。业已从不同蛋白中鉴定了大量的信号序列，并且，似乎能够操纵与多种非天然蛋白接合。信号序列通常是 N-末端，但可以在该蛋白的内部或 C-末端。信号序列是从这样的蛋白中选择的：已知该蛋白具有影响产物构象的特殊转运机制，或者可以是合成的，其中，转运作用是已知的或确定的。现在已经了解，信号序列影响与易位子接合翻译的蛋白的构象。不受任何理论的约束，信号序列指导核糖体是否与内质网（ER）形成紧密的、松散的或中等的结合，并且选择通道和同时加工的蛋白，由此对翻译的蛋白进行转运和加工。例如，用来自前催乳素的信号序列取代一种蛋白的信号序列会导致紧密结合。而用来自前 β 内酰胺酶的信号序列取代能提供松散的结合。能提供紧密结合的蛋白包括：生长激素；而松散结合包括：免疫学重链和酵母 α 因子；中等结合包括 ductin、钙网

蛋白、PrP、血管紧张素原和 MDR-1，其中，不同构象异构体之间的差异可能归因于多种机制。有关核糖体-膜结合的作用的讨论参见 Hegde 和 Lingappa, 1996, 细胞 85, 217-228。例如，有关转运机制的一般讨论参见例如 Ellgaard 等, 1999, 科学 286, 1882-1888; 5 Wickner 等, 1999, 科学 286, 1888-1893; 和 Ibba 和 Soll, 1999, 科学 286: 1893-1897。

可以用表达的裂解成分、微粒体和蛋白酶 K 评估信号序列。不同信号序列和一个共同的基因所发生的蛋白水解程度是核糖体与 ER 结合性质的指标。通过使用具有不同结合紧密度的信号序列，可以 10 改变所得到蛋白的构象。这些不同的构象异构体能以多种方式使用。所述构象异构体可用于生产抗体，生产抗血清或者优选生产单克隆抗体。抗血清和抗体是用常规方法制备的，用不同的蛋白构象异构体免疫宿主，在制备单克隆抗体时通常使用小鼠，使用或不使用佐剂，然后每 2 周或更长时间间隔再注射所述蛋白，并监测抗血清水 15 平。对于单克隆抗体来说，可以分离脾细胞，使其无限增殖并筛选。扩增能产生可以区分构象异构体的抗血清的杂交瘤。生产了一种可以区分两种构象异构体的抗体文库。然后可以用所述抗体分离每一种构象异构体，并分析宿主体内的不同构象异构体，使用适合该蛋白性质的生理学样品。

20 信号序列还可以通过分析交联形式进行评估，这种交联形式通过以下方式产生：编码感兴趣的真正的编码区 5'末端所述信号序列的截短的转录物通过无细胞翻译表达，并进行化学交联，所述交联剂包括，但不限于赖氨酸和胱氨酸特异性可裂解和不可裂解交联剂，通过免疫沉淀和在十二烷基硫酸钠中进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析交联形式， 25 然后进行放射自显影。

可以用不同寡肽和/或寡核苷酸的基质筛选不同的构象异构体。例如，参见 US5631734; 5856102 和 5919523。所述基质可以通过商业渠道获得，并可以根据特定的结合形式制备。这样，人们就可以添加一种生理学样品，测定存在哪种构象异构体，并估算每一种构象异构 30 体的含量。还可以利用所述基质通过其对该基质的结合力分离特定的构象异构体。所述基质和抗体可以同时使用以便证实其它测定，分离构象异构体，在同一个测定中同时使用。在单独测定中，或者在与其

它亲和力结合测定组合的测定中，可以用可检测的标记物标记抗体，例如，荧光剂、发光剂、磷光剂、酶、和放射性同位素等。有很多可用于确定特定表位的方法，通过这些方法可以区分构象异构体。在某些场合下，可能需要使用两种或两种以上抗体，通过结合的空间抑制作用，或不同的亲和力常数等确定构象异构体。

因为可以用寡聚物，特别是寡肽区分构象异构体，这些寡肽可用于鉴定不同的构象异构体。所述寡肽可以在竞争实验中使用，用于鉴定能竞争位点的其它寡肽或其它化合物，特别是结合构象异构体的小的天然或合成的有机化合物，其分子量小于 5kDa，通常小于大约 2.5kDa。然后，所述化合物又可应用于鉴定对所述位点具有更大亲和力的其它化合物。这样，可以鉴定与其它构象异构体相比，对一种构象异构体有特异性的药物。在测定中可以使用各种结合体，其中，可以对结合体进行标记，以便鉴定对所述构象异构体的结合。所述测定可以是均质的或不均质。

如果需要，可以利用野生型和/或嵌合基因的随机突变来表达所得到的基因。可以分析蛋白与亲本基因的相似性和差异。通过抗体结合可以确定突变的作用是将构象异构体从一种构象变成另一种构象，或是使表位发生改变。或者通过非变性条件下对化学修饰剂反应性的改变而测定交联形式或构象的差异，包括，但不限于 N-磺基生物素、三硝基苯磺酸 (TNBS)、N-乙基马来酰胺 (NEM)。来自人类患者或动物的发生了天然突变或进行了诱变的基因及其所表达的蛋白，可以与哺乳动物宿主体内随机突变的基因及其表达产物进行比较。这样，就可以诊断由导致不同的构象异构体的突变所引起的疾病状态，并开发治疗方法。

所述构象异构体可用于生物医学目的，以便应用于诊断和治疗患者。所述构象异构体可用于区分在正常情况下或在不同环境中，以不同比例产生构象异构体的个体宿主。一种环境是，存在一种化合物，特别是一种药物，以及结合亲和力和/或调节目标生理学活性化合物的活性，通常是蛋白，如膜受体、通道、酶、转录因子、管家蛋白、细胞骨架蛋白、和膜蛋白等。所述构象异构体可以是与膜结合的或游离于溶液中的活动的或固定的蛋白。应当在相同或不同容器中将一种化合物与不同的构象异构体混合，并测定该化合物与构象异构体的结

合。所述测定可以用多种方式进行，可以是竞争性的或者是非竞争性的。可以测定在溶液中残留的化合物量，其中，化合物量的减少是该化合物与构象异构体结合的指标。另外，可以使用与所述构象异构体结合的标记化合物，其中，感兴趣的是与蛋白的特定部分的结合，如酶和受体，以及特定位点与生物学活性相关的其它蛋白。例如，G-蛋白，转录因子，DNA 结合蛋白等。

所述构象异构体还可用于测定与其生理学活性相关的活性的差异。可以通过同质或非同质分析，测定对它的结合配偶体的结合力、可以评估哺乳动物宿主活性水平与两种构象异构体的比例之间的关系。同样，有多种方法可用于检测一种配体和一种受体或与复合物形成相关的两种或两种以上蛋白之间的结合。以上两种蛋白可以用荧光剂或能量受体标记，这样，这两种蛋白结合在一起时，就会在所述荧光剂的波长下减弱发射的水平，并在能量受体水平提高发射。另外，可以将其中的一种蛋白与一种表面结合，并通过标记过的第二种蛋白测定其它蛋白与结合蛋白的结合水平。另外，可以将每一种蛋白与不同的颗粒结合，其中，一种颗粒能产生一种化合物，该化合物能激活其它颗粒，如 LOCI。当标记过的实体小，如寡聚体或小的有机分子时，可以用荧光剂做标记，并采用荧光偏振进行检测。对测定方法的介绍披露于 US5989921；4806488；4318707；4255329；4233402；和 4199559 中。

在筛选生理学样品确定构象异构体的存在时，该样品可以是血液、细胞、脑脊液、唾液、尿液、毛发等。可以对样品进行预处理，如向血液中添加柠檬酸盐，凝固和分离红细胞，稀释，提取等。因此，所述构象异构体可以通过与特殊指征相关而确定，而这种指征可能与疾病、对药物的反应、物理性能、细胞退化、程序死亡等相关。

本发明作用的代表是对朊病毒的研究。业已发现，通过改变信号序列，能够获得不同含量的天然构象^{sec}PrP 和两种其它构象，^{Ntm}PrP 和神经变性^{Ctm}PrP。这有助于确定与野生型形式相比神经变性形式形成比例改变的机制。可以用类似方法改变具有信号序列的其它蛋白的信号序列，其中，该蛋白被怀疑与一种疾病状态或较低的能力相关。然后，可以确定该蛋白是否能产生不同的构象。如果发现了上文所述

的不同的构象异构体，与患病或降低能力的患者相比，在健康的正常患者体内确定不同的构象异构体。然后，可以按上述方法筛选针对不需要的构象异构体的药物。

另外，通过采用不同的信号序列，可以研究需要的构象异构体和
5 不需要的构象异构体之间比例发生变化的基础。与此结合、除此之外或取而代之，可以用体外裂解物研究 ER 相关蛋白与构象异构体形成的作用。制备除了转运必需蛋白之外缺乏所有成分的微粒体。个体蛋白可以被单独取代或组合取代，以便确定这种蛋白的存在对有关构象异构体形成的作用。一旦确定了与构象异构体形成相关的蛋白，就可
10 以筛选健康和异常患者体内与构象异构体形成相关的蛋白的存在，并确定突变或不同构象异构体的存在。这样，不仅可以解释在易位子中蛋白折叠的机制，还可以建立治疗的新目标。

对于无细胞蛋白翻译混合物来说，可以使用各种系统（Erickson
和 Blobel, 酶学方法 96: 38-50, 1983; Merrick, 酶学方法 101: 606-615,
15 1983）。其例子有由诸如 Promega（Madison, WI）的商品供应商出售的小麦胚芽提取物和兔网织红细胞提取物，及其高速离心上清液。其它参考文献包括 US5998163; 5998136 和 5989833。所述系统除了含有翻译器（tRNA、核糖体等）的无细胞提取物之外，还包括能源（ATP、GTP）和氨基酸的完全补充剂。用本领域已知方法保持足于
20 维持蛋白合成的能量水平，例如，通过在反应期间添加额外的核苷酸能源或者添加其它能源，如磷酸肌酸/肌酸磷酸激酶。存在于标准翻译混合物中的 ATP 和 GTP 的浓度，通常大约为 0.1-10mM，更经常是 0.5-2mM。一般，核苷酸的量应当足于提供至少大约 5 皮摩尔产物，优选提供至少大约 10 皮摩尔产物。

淋巴细胞也能形成 PrP，并可用作试剂影响的筛选，例如，所
25 述试剂是作为候选药物的化合物，或者用作个体在遇到环境改变或物理刺激时作出反应时的筛选。淋巴细胞遭受环境改变，这种改变可以是诸如添加一种化合物的化学变化，诸如 pH 改变等的物理变化等，其中，测定特定细胞对所述改变的敏感性，将其用作人体通
30 过改变 PrP 的性质而产生的对环境变化反应的倾向的指标。通过测定对环境变化的反应（这种变化可能包括污染物、杀虫剂等），可以确定这些化合物是一种普遍的威胁或者是只影响特异体质的人群。

通过与正常个体比较测定淋巴细胞中 Ctm-PrP 的存在和/或水平，可将所述细胞用于确定具有神经变性疾病症状的患者是否患有 Ctm-PrP 相关疾病。可以用本文所描述的多种测定方法测定 Ctm-PrP 的存在和水平。通过检测发生神经变性疾病的倾向，可以指导患者远离有可能增加神经变性疾病可能性的化合物的活性或不接触该化合物。另外，所述化合物对 Ctm-PrP 的作用还可用作联系所述活性与其它以类似方式作出反应的疾病的取代物。所述细胞还可用于单个患者，用于评估该个体患者对各种药物的反应，确定该药物对 Ctm-PrP 产生的影响。

如上文所述，很多蛋白具有不同的转运结果。已知在转运途径中具有不同形式的蛋白，如以两种不同的构象异构体形式存在，可以作为 f-Met 选择的不同甲硫氨酸的存在产生不同的信号序列，在链上具有大约 15-20 个氨基酸的疏水区，它可能是推测的跨膜序列，但是，可以作为分泌蛋白或被分泌的跨膜蛋白获得，这种蛋白可以用作化合物对转运结果影响的标记。代表性蛋白包括 ductin、钙网蛋白、MDR-1、和 PrP。

在转运过程中，有多种蛋白与 ER 结合，通常是作为 ER 的一部分，并且与通道相关，通过它将新生蛋白转运到 ER 腔的通道结合。所述蛋白包括核糖体，信号识别颗粒蛋白 (SRP)，具有 α 、 β 和 γ 亚基的异源三聚体 Sec61 复合体。转运链相关的膜蛋白 (TRAM)，信号肽酶 (五种蛋白的复合体)，寡糖基转移酶 (三种蛋白的复合体)，ER 腔蛋白，包括 BiP、GRP94、钙连接蛋白 (CNX)、ERD1C-53，蛋白二硫化物异构酶 (PDI)，Erp57，ERP72，伴侣蛋白，如 Hsp90、hsp47、Hsp60 或 GroEL 家族，Hsp70 或 DnaK 家族，Hsp100 或 Clp 家族和热休克同源物 70，tapasin，微粒体甘油三酯转移蛋白，保护蛋白/组织蛋白酶 A， β -连环蛋白，egasyn，共伴侣蛋白，如来自 DnaJ 家族的蛋白，酶，如尿苷 5'-二磷酸酯 (UDP)-葡萄糖：糖蛋白葡糖基转移酶 (GT)，葡糖苷酶 II，脯氨酰-羟化酶和羧基酯酶。

可以用文献中所描述的方法除去裂解物中的 ER 和转运产物的转运相关的辅助蛋白 (Gorlich 等, 1992, 自然 357, 47-52; Gorlich 和 Rapoport, 1993, 细胞 75, 615-630; 和 Hanein 等, 1996, 细胞 87,

721-732)。

通过改变感兴趣的蛋白的信号序列，可以制备用于在哺乳动物宿主中表达的基因。目前，取代 DNA 序列以便提供嵌合基因的方法有很多。例如，参见 Sambrook 等，1989，实验室手册，第 2 版，冷泉港出版社。简单地讲，分离所述基因的 DNA，了解其氨基酸序列，并使用简并探针。分离与探针结合的 DNA 序列并进行测序，确定编码感兴趣的蛋白序列的存在。如果希望避免出现内含子，可以分离 mRNA，逆转录，并用 PCR 扩增。在任何情况下，该信号序列都可以通过用一对引物扩增而用不同的信号序列来取代，其中一个引物在其 5' 末端具有一个信号序列，该信号序列与互补于与天然信号序列相邻的基因的序列结合，而另一个引物与第一个引物互补。由第二组引物提供该 DNA 序列的另一个末端。根据基因的大小，可以选择适宜的限制位点，以便将修饰过的 5'-末端 DNA 与该编码序列的其余部分连接。有多种技术可供选择使用，并且，每一个基因都具有一种明确的选择方案，以便提高具体合成的方便性。

一旦制备了所述基因，就可将其导入多种商业化载体的一种并克隆，和/或可以使用具有有义链的转录调控区 5' 末端的表达载体，以便进行表达。通过采用哺乳动物细胞，可以产生并分离来自不同结构的构象异构体，并按上述方法进行分析。这样，可以分离大量不同的构象异构体。

在开始阶段，可能希望通过不同的分离技术浓缩构象异构体，如 HPLC，毛细管电泳，亲和层析等。最初的分离只可用于提高特定级份中构象异构体的浓度或者分离构象异构体。在前一种情况下，需要用上文所述的技术进一步分离构象异构体。可以使用各种分离介质，包括离子交换、筛分介质、亲和介质等，使用不同的洗脱剂建立分离并提取不同构象异构体的方法。业已开发了各种方法，并且每一类构象异构体可以使用能优化分离并具有最少变性的方法。蛋白质纯化领域的技术人员能很容易地确定这样的方法。然后，可以将纯化的构象异构体用于分析，进行 X 射线结晶研究，以便确定结构的差别，与不同表位相关的氨基酸，和与野生型蛋白关联的蛋白的相互作用，以及该构象异构体可以结合的其它蛋白等。

一旦获得了编码所述嵌合蛋白的基因，就可以将该基因用于基因

治疗，诱变实验动物，随机诱变，以便确定诱变对折叠的影响，在表达构建体和单细胞或生物宿主中大规模生产该蛋白等。实验动物包括啮齿类动物、兔类动物、鸟类动物、犬科动物、猫科动物、猪等。

在某些场合下，可以创建病毒构建体，将所述嵌合基因导入病毒载体中，以便随机导入细胞，或者当该病毒具有嗜性时，导入该病毒所偏好的细胞。如果该基因具有有益作用，即使在有其它构象异构体的条件下，该构建体的存在可以缓解由天然构象异构体导致的症状。另外，通过导入非天然构象异构体，可以评估该非天然构象异构体对细胞、组织、器官和宿主的生理学的影响。

特别感兴趣的是导入，优选嵌合构建体取代野生型基因，该嵌合构建体包括野生型结构和已知会产生不同构象异构体的不同信号序列。通过与生殖细胞或随后转入生殖细胞的细胞核的同源重组，可以表达想要的构象异构体。当涉及到杂合性时，具有嵌合基因的后代可交配，以便获得纯合的后代。这样，就可以研究特定构象异构体的作用，该蛋白被转运到的部位是否发生了变化，在所述部位发生的这种变化的影响，以及不同表位或拓扑结构对蛋白功能的影响等。另外，可以用嵌合哺乳动物筛选对所述构象异构体具有生物学影响的化合物，以便可以评估针对特定指征的药物，所述指征直接与构象异构体相关，或者是该构象异构体在有关途径中的结果。所述动物模型可用于区分对野生型构象异构体和有可能形成的其它构象异构体的作用。

当非天然构象异构体是显性失活等位基因时，可以监测其活性的丧失对宿主生理学的影响。对宿主的影响可以与疾病状态进行比较，其中，观察到了相似的指征。可以通过采用具有与所述指征相关的已知功能的药物，已知能结合野生型等位基因的化合物或其他治疗对治疗效果进行评估。可以筛选具有非天然构象异构体的细胞，以便研究该非天然构象异构体对其它蛋白表达的影响。通过将所述细胞的 mRNA 转化成 cDNA，通过在没有所述天然基因的细胞和有所述非天然基因的细胞之间使用文献中已知的各种扣除技术，可以确定该非天然基因对其它蛋白表达的影响。另外，可以表达各种蛋白，并比较电泳、质谱或 HPLC 形式，以便确定不同的构象异构体是否会影响宿主的表达形式。

按照上述说明中以及在实验部分所描述的方法或其它等同方法，本发明可以研究与朊病毒蛋白相关的疾病和类似疾病，特别是与拓扑结构改变相关的疾病，如老年性痴呆。正如所证实的，通过制备表达天然 PrP、Ntm-PrP 和 Ctm-PrP 的表达构建体，可以对细胞和动物进行修饰，生产不同形式的蛋白。这样，就可以在培养物和体内研究添加各种候选试剂的作用，并测定在培养物和体内存在所述试剂的条件下，不同构象异构体形成的变化。通过对不同构象异构体在相同或不同细胞中对表达的影响以及对宿主生理学的影响进行表达分析，所述主题蛋白可以操纵不同构象异构体的存在，并研究疾病的病因，与该疾病病因相关的其它实体。可以用有或没有天然 PrP 基因的构建体培育小鼠模型，因为该宿主基因可以剔除，并且用所述嵌合基因取代。另外，可将突变导入 PrP 基因，这样会导致折叠的改变，以及对转运相关蛋白依赖性的改变或与该蛋白相互作用的改变。因此，可以对所述基因的天然或嵌合信号序列进行诱变，并确定对转运相关蛋白的影响。

本发明的应用

本发明可以在分子、细胞和有机体水平上加以应用（即解释、诊断或治疗疾病）。下面所提供的是具体的应用。

1. 采用本文所描述的方法，可以对抗体进行操作，以便增加其功能和用途。通过信号序列取代，单独以及与无细胞翻译系统中分离和重建的或变体膜和胞质溶胶结合，能够以微妙的或显著的方式改变免疫球蛋白的折叠途径，而实际上不改变最终产物本身的氨基酸序列。因此，可以获得其结合常数提高或降低了的变体免疫球蛋白，以及其效应子功能改变了的免疫球蛋白（例如，Fc 区的结合特异性）。实现上述目的的现有方法（例如，通过对真正的免疫球蛋白链进行定点或随机诱变）所具有的缺陷是，不仅改变折叠途径，而且改变该分子的一级结构本身。我们的方法将能够将这两种类型的改变分离，允许其中的一种而不出现另一种，实现诊断和/或治疗用途。所述信号序列变化还可用于转染的哺乳动物细胞，可以收获培养基并筛选构象和功能差异。

2. 大多数激素、细胞因子和生长因子与多种功能表现相关，并且，在某些场合下，能激活多种信号途径。例如，最初被作为发出饱感信

号的激素的瘦素，已经被证实起着骨密度独立中枢调节子的作用，并且与伤口愈合和血压控制有关。上述功能中的某一些明显是在缺少另一些的情况下出现的，并且，大多数肥胖个体是瘦素抵抗的，但没有骨密度疾病，这表明它们所产生的瘦素不能够起着饱感促进功能，但能够在保持骨密度方面起作用。传统的看法是，这种类型的多相性作用是通过受体或受体功能的多样性实现的。不过，正如来自本文所显示的 PrP 和催乳素的例子所证实的，配体构象的多样性，可以解释瘦素的某些甚至是大部分多相性结果。

通过鉴定单一的构象异构体，并开发能提高或降低单一构象异构体表达的药物或抑制一种构象异构体或另一种构象异构体的作用，有可能以促进激素的某些功能超过另一些的功能的方式影响基因表达。还可以根据表现为特定基因型和表型的构象异构体的组合对患者进行分类。这样，就可以根据不同个体在特定时间点上所表达的构象异构体的组合，对其采用不同的治疗，使用设计的或被证实对特定构象异构体组合或其它构象异构体相关亚型最有效的、不同的药剂。

因此，对于瘦素来说，通过交换信号序列，并且在含有分离的胞质溶胶和分离的和重建的或变异的膜的翻译系统的各种组合中进行合成，以及随后的筛选过程，可以制备能够促进骨密度而又不影响饱感或伤口愈合形式的瘦素，反之亦然。类似地，同样可以制备出能够更有效地抑制食欲，并因此克服瘦素抵抗形式的瘦素，瘦素抵抗在肥胖人体上是最常见的表型。相反，通过筛选其对瘦素构象异构体个体亚型的影响或者筛选其对改变分泌的瘦素构象异构体组合的影响，可以开发小分子药物。因此，可以开发出具有构象异构体特异性或选择性作用的药物，并因此抑制或增强构象异构体的作用，或抑制或增强身体产生特定构象异构体组合的能力。除了对特定受体的亲和力之外，通过不会以任何方式改变成熟的真正蛋白的序列的方式进行信号序列操作，还可以改变的参数包括与其它分子相关的半衰期、分泌动力学。该方法还可应用于分泌和膜内在酶，其中底物转换，而非受体亲和力，是相关的功能参数。

3.该方法可以与转基因技术结合，以便将信号序列不同的变体基因导入野生型和剔除型小鼠（缺乏内源基因）。这样，就可能筛选目

前还不知道的复杂分泌和膜内在蛋白的功能。因此，已知 95% 的野生型囊性纤维化跨膜调节蛋白 (CFTR)，在合成之后马上就被降解。通常的看法是，这是生物发生学的“错误”。应用本发明提出的另一种解释是，这 95% 的蛋白是在特定时间细胞所不需要的很多其它构象的总和，但是，可以在发育的特定时间从降解中挽救出来。由于 CFTR 的信号序列没有被裂解，改变折叠而又不导入突变的目标，必须是通过反式而不是顺式调节的方式进行的。因此，在补充了分离和重建的或变体膜及分离的和重建的胞质溶胶的翻译系统中 CFTR 的表达可以使一种构象相对另一种构象有所增强，可以通过单克隆抗体反应性、化学修饰、交联和其它特性对这些构象进行统计和分类，然后导入转基因动物，并筛选新的表现型和疾病。类似的方法可用于每一种通道形成和受体形成膜蛋白，包括与 ER 和/或其它内在和/或血浆膜相关的单一和多次跨膜蛋白。

4. 目前，人体上最难治疗的疾病是信号传导疾病，通常表现为激素、生长因子、细胞因子和受体抗性（又被称为脱敏化或下调）。业已鉴定了很多不同的抗性机制，尚有待确定大多数疾病的大多数病例是由于已经确定的机制或者是由于尚未了解的其它机制所引起的。根据我们在已经发表的和未发表的作品中所归纳的用 PrP 进行的研究，我们相信构象失调（正在产生或者从 ER 中排出的构象异构体的错误组合）是疾病发病机致的主要机制。这一结论可以通过以下方法证实：制备抗分泌蛋白的单克隆抗体，并证实一种亚型的分泌蛋白，在疾病状态下，或者在具有该疾病状态的亚型患者体内，以错误的方式存在（或缺乏）。决定困扰人类的主要疾病的主要基因，包括大量的分泌蛋白和膜蛋白，要筛选在其病理生理学中与构象失调的关系，与此相关的几个例子包括糖尿病、高血压、高脂血症、肥胖、骨质疏松、退行性关节炎、癌症、老年性痴呆和精神疾病。

本发明在疾病研究和治疗方面的应用

如上文所述，有多种重要的医学情况与基因有关，这些基因的构象调控是生理学和病理生理学功能的重要方面。下面将描述如何用本发明更好地理解特定疾病。

首先，在无细胞系统和转染过的哺乳动物细胞中，分析编码分泌和膜内在蛋白的关键的疾病相关基因，以便确定其信号序列所属的类

型。在体外和体内对天然蛋白的构象多相性进行分类，包括来自小鼠和人体（例如，来自血液）的样品，如果有的话，利用单克隆抗体、化学改性和与细胞和培养基内的其它蛋白共同结合，作为对构象进行分类的方法。

5 其次，尝试改变所合成的构象组合，以便扩增并稳定少量的和瞬时的构象异构体，并因此能够更方便地检测和鉴定，这样就可以将其与正常的主要构象异构体区别。这一目的可以通过两种通用途径实现，即通过交换裂解过的信号序列或者通过在分离的和重建的系统中表达所述蛋白，该系统能通过反式作用（或这种作用的缺乏）改变天然构象异构体组合。

10 第三，一旦鉴定了决定所述关键疾病相关蛋白的构象异构体组合，就可以筛选来自患者的、体现相关疾病的天然病史和表现型类型多样性的样品，并对所观察到的这些蛋白的构象异构体多相性进行筛选和分类。通过该分析可能确定 i) 与疾病相关的构象异构体；ii) 在实际发病之前出现的构象异构体组合的改变；iii) 可以根据疾病进展、并发症和天然病史的其它方面对患者进行分类的构象异构体组合的改变，包括药效风险的增加或降低，副作用和其它反应。应当指出的是，这些都是传统蛋白质工程会忽略的目标，因为它们不了解支持本发明的蛋白质构象多相性的证据。因此，它们没有去寻找相关蛋白的其它

15 构象异构体。另外，除了本发明之外，目前还没有系统地鉴别、扩增和鉴定构象异构体的上述变化的方法，没有本发明，就不可能确定具有患特定疾病的危险或受特定疾病困扰的人群内所述构象异构体的分布或显著性。

25 第四，利用所掌握的上文 1-3 中有关构象异构体与疾病关系的多种有价值的信息，可以开发出上文所述的测定方法，以便筛选能够以以下方式改变构象异构体组合的试剂：能减少不需要的构象异构体，并增加具有保护性的或者与疾病进展、药物毒性等无关的构象异构体。类似地，可以通过大量筛选大的化合物文库以及通过构象异构体特异性合理化药物设计寻找能选择性地抑制不需要的构象异构体或能

30 增强需要的构象异构体的作用的试剂。

下面将介绍在某些主要疾病上的具体应用。

糖尿病：编码胰岛素、胰岛素受体和葡萄糖转运蛋白家族的很多

5 成员的关键基因都具有裂解过的或未裂解过的信号序列，这使得它们能够用于此分析。另外，影响患者护理的一个关键的病理生理学过程，是被称为胰岛素抵抗的综合症。通常，这是由于受体功能失调所造成的，但在大多数情况下，导致这种失调的基础是未知的，并且不能排除这样的可能性：即这种失调可能是由配体导致的，而不是由受体导致的。在这种情况下，配体是胰岛素，能破坏胰岛素介导的信号传导的异常构象，可能是胰岛素或胰岛素受体或葡萄糖转运蛋白家族单个成员的特性，这种特性可以用已知方法确定。最后，尽管在传统基因组和蛋白分析方面做出了巨大努力，但在特定时间以及在经历过的自然历史中，个体表现型的巨大的多相性依然是另人困惑的。对本发明来说，这很可能意味着是失调的构象。

10 高血压：控制血压的多个关键基因编码分泌蛋白和膜内在蛋白，包括，例如，上皮钠通道 (EnaC)，血管紧张素原，血管紧张素受体，肾素，与醛固酮和其它甾类合成相关的甾类生物合成酶，以及 α 和 β 肾上腺素能受体等。高血压的病理生理学在很大程度上是一个谜，因此，构象异构体失调在高血压的病因学和发病机理方面起作用的可能性不能排除。临床流行病学和观察研究清楚地表明，患者的差异不仅表现在高血压诱发状态的性质（例如，对盐敏感和对盐不敏感；增强的交感活性等）方面，而且还表现在其对不同类型药物的敏感性，这些药物的副作用以及对这些药物的耐受能力方面。

20 肥胖：与控制肥胖相关的关键基因包括瘦素及其受体，以及到目前为止所鉴定的各种肥胖相关基因，包括促黑素皮质素和 mahogany 受体，刺鼠蛋白等，它们都包括裂解过的或未裂解过的信号序列。另外，大多数肥胖个体是瘦素抵抗的，这与下面的假设吻合，即瘦素的构象异构体差异介导了其生物学功能的不同（例如，过饱感、保持骨质密度、促进伤口愈合以及调节血压）。

30 癌症：理论上讲，癌症是与细胞生长和增殖相关的信号传导途径和对上述过程的生理学控制的失调，这些控制因素包括多种不同的细胞程序死亡触发因子和抗细胞程序死亡因子。其中，很多种是具有裂解过的或未裂解过的信号序列的分泌蛋白或膜蛋白。在很多场合下，癌症可以受到同样具有信号序列的多种分泌生长因子和细胞因子的正面影响和负面影响。有大量的资料支持这样的看法，即很多这样的因

子是多功能的，或者更确切地讲，是与促进或抑制特定信号途径相关的。本领域现在的难题是，了解一种因子是如何在一个时间点引起一种作用的，而在另一时间引起一种差异很大的作用。一种构象异构体向另一种构象异构体的转化会导致改变了的受体相互作用、信号传导、半衰期、结合等，这可能是癌症发生和发展过程中表型变异、免疫监视、癌症的出现和进展的一种或多种途径的关键，或者是对治疗的反应的关键。

骨质疏松：与骨密度调控相关的激素包括上文讨论过的瘦素，以及诸如甲状旁腺激素、成骨蛋白素的其它激素及其受体，它们都具有信号序列，某些信号序列是裂解过的，某些是未裂解过的，因此，可以通过本发明进行分析。骨密度的生理学是复杂的，对它的理解很少，并且存在多种自相矛盾的地方——同一种试剂在某些场合下能促进骨密度，但在其它条件下会导致骨质丢失。由信号改变所导致的构象多相性，是出现上述现象的潜在基础，因此，具有多种潜在的诊断和治疗用途。

神经变性：最有可能用构象学进行诊断和治疗的领域包括朊病毒病和老年性痴呆病，脊髓损伤和中风。导致朊病毒病的基因产物朊病毒蛋白是证实了构象调控的第一种蛋白。在这种情况下，构象调控表现为拓扑结构调控——三种可检测的构象异构体在跨膜拓扑结构上有所不同，使得它们较容易鉴定和区分。与老年性痴呆相关的淀粉样前体蛋白（基因产物，其异常代谢物与老年性痴呆相关）是具有与朊病毒蛋白相同特征的膜内在蛋白，包括可裂解的信号序列。与轴突导向相关的 netrins、semaphorins 及其它基因（因此是脊髓损伤修复的关键）具有相互矛盾的活性，这一点与多种构象异构体的假设吻合。

冠状动脉疾病：载脂蛋白 B 是与低密度脂蛋白代谢相关的复杂的、多功能分泌蛋白，并且是构象多相性的首要候选物。体内基本上每一种膜内在通道和受体蛋白都具有未裂解的信号序列，可以进行其它地方所描述的分选。

慢性阻塞性肺疾病：囊性纤维化跨膜调节蛋白（CFTR）是一种在前面讨论过的多次跨膜的膜内在蛋白，它的生物发生提示了一种被普遍接受的更为复杂的结果。导致难于接受如下假说的一个原

因是我们支持构象学说的证据大部分尚未发表，所述假说是降解了的 CFTR 链代表在特定时间点上细胞所不需要的其他构象，而非真正的错误折叠的链。尽管目前尚不了解上述其它功能，但有人推测上述 CFTR 的已知功能是作为影响盐环境的氯化物通道，所述盐环境是诸如防御素的抗微生物肽所需要的，是抗致病微生物的先天免疫性所需要的。因此，正如在多种肺病和其它疾病中所观察到的，导致氯化物通道功能丧失的构象失调有可能导致肺部和其它组织感染易感性的提高。通过本文所描述的使用分离的无细胞翻译和转运系统，同时结合包括单克隆抗体、化学修饰指纹在内的现有检测系统，包括蔗糖梯度分析在内的交联和结合分析，我们可以对 CFTR、MDR 基因及其它相关的转运子的其他构象进行分类，并确定这些不同的构象是否能以较高或较低程度用于患有感染性疾病和其它疾病的特定类型的患者。

精神疾病：与神经变性相似，大脑的功能性疾病有可能与信号传输和/或信号传导的紊乱相关。由于包括 G 蛋白偶联受体家族在内的细胞表面上的受体，通常负责细胞-细胞信号传导，并且通常具有裂解过的或其它形式的信号序列，这种类型的蛋白很有可能是构象调控的候选物。

综上所述，上面所引用的例子证明了本发明的广泛性质及其在多种疾病中的应用性，其中，所述疾病与含有信号序列的蛋白或受体相关。

作为优先权申请 60/171012 和 60/172350 的一部分提交的、伴随本申请的相关稿件被收作本文的参考，就如同在本文中专门指明的那样。所述稿件可以通过其标题和第一作者识别：Rutkowski 等，“信号序列在转运调控中的新作用”；Hegde 等，“传染性遗传朊病毒病与神经变性具有相同途径”（发表在‘自然’上，1999，402：822-826）；和 Lingappa 等，“通过转运调控进行的构象控制：分泌和膜蛋白折叠的新观点”。

提供下面的实施例是出于说明目的，而不是限定目的。

实施例

材料

按公开方法制备并使用兔网织红细胞裂解物 (RRL) 和狗胰腺粗制微粒体 (Hegde 和 Lingappa, 细胞, 1996, 85: 217-228, 及其所引用的参考文献)。用与制备犬微粒体相同的方法制备小鼠大脑微粒体, 同样用公开的方法制备 PK (Hegde 和 Lingappa, 细胞, 1998, 5 92: 621-631)。抗催乳素抗体从 USB (Cleveland, OH) 购买, 而 3F4 单克隆抗-PrP 抗体是由 Prusiner 实验室赠送的。抗 PDI 从 StressGen (Victoria, BC) 购买。辛二酸琥珀酸二酯 (DSS) 来自 Pierce (Rockford, IL)。皂苷来自 Calbiochem (La Jolla, CA), 并且以 20%w/v 母液形式溶解在水中, 调整到 10mM Hepes, pH7.2, 通过从 1.5ml (每 10 10mls 皂苷) SP 琼脂糖速流柱 (Amersham Pharmacia; Piscataway, NJ) 以及一个 2ml 的 Q-琼脂糖速流柱除去杂质。编码酵母前原- α 因子的克隆由 Tom Rapoport 提供。

网织红细胞裂解物的分级分离

15 本文所描述的方法是用于制备源于现有的兔网织红细胞裂解物 (RRL) 翻译系统的改进的体外翻译系统的。所述 RRL 翻译系统最初是由 Jackson 和 Hunt 开发的 (酶学方法, 1983, 96: 50-74), 提供了一种用于翻译 mRNA (合成的或天然的) 以哺乳动物为基础的提取成分。另外, 在补充了微粒体膜之后, 就可以重建分泌蛋白 20 和膜蛋白的生物发生。通过将 RRL 分级分离成限定的成分, 我们拓宽了这种体外翻译系统的适应性和潜在用途。这些发展具有用来解释多种生物学现象的若干优点 (参见下文)。简单地讲, 将 RRL 分离成天然核糖体和可溶性蛋白组分 (S-100)。通过在 DEAE 琼脂糖上进行阴离子交换层析对 S-100 作进一步分级分离。放弃流通液 (含 25 有所有的珠蛋白), 并且用 300mM 氯化钾对该柱进行分步洗脱。通过硫酸铵沉淀浓缩洗脱物 (含有相关的翻译因子), 然后进行透析。这种 DEAE 级份以及核糖体可以重建与原始 RRL 具有基本相同效率的翻译。下面是从 1ml RRL 中制备所述级份的详细方案。如果必要, 可以方便地将其扩大生产。柱缓冲液是 20mM Tris-乙酸, pH7.5, 30 20mM 氯化钾, 0.1mM EDTA、1mM DTT (新添加的), 10%v/v 甘油。洗脱缓冲液与柱缓冲液相同, 唯一的区别是采用 300mM 氯化钾。透析缓冲液是 20mM Hepes-KOH, pH7.5, 100 mM 乙酸钾, 0.5mM

乙酸镁, 0.1mM EDTA、1mM DTT (新添加的), 10%v/v 甘油。分级分离方法: i) 按照以前公开的方法 (Jackson 和 Hunt, 同上) 制备 RRL, 所不同的是不进行脱盐。简单地讲, 将来自贫血兔的血细胞洗涤若干次, 并通过低张裂解释放出细胞质溶胶。通过离心
5 除去未裂解的细胞和血影 (业已裂解并且释放了其细胞质溶胶的细胞)。上清液就是用于该分级分离的 RRL。ii) 将 RRL 调节到 1mM 氯化钙, 在 25℃ 下用 150U/ml 微球菌核酸酶消化 10 分钟, 并通过添加 EGTA 至 2mM 的浓度终止反应。在冰上将 RRL 冷却至 0℃, 并且, 随后所有的程序都是在 4℃ (在冷却室中) 或在冰上进行的。iii)
10 在 4℃ 下, 在 TL-100.2 转子上用厚壁聚碳酸酯试管 (1ml) 以 100,000RPM 的速度将核酸酶消化过的 RRL 离心 20 分钟。取出上清液 (S-100) 放入在冰上预冷的 2ml eppendorf 管中。用透析缓冲液冲洗沉淀 1 次, 并重新悬浮在 100 微升透析缓冲液中。然后以等份试样形式冷冻核糖体, 并在 -80℃ 下保存。核糖体至少能稳定保存
15 1 年时间, 而不会损失任何活性。尽管似乎使用至少 2-3 次都保持稳定不会出现任何问题, 但也要避免过多的冷冻-解冻。iv) 用等体积的 (1ml) 柱缓冲液稀释 S-100, 并加样到 3ml DEAE 琼脂糖柱上。用另外的柱缓冲液洗涤该柱, 直到最后的鲜红色珠蛋白标记从柱中流出。然后用 10ml 洗脱缓冲液对该柱进行分步洗脱, 并收集洗脱物。
20 向 10ml 洗脱物中缓慢添加 5.6 克硫酸铵固体, 并匀速搅拌 (调整到大约 80% 的饱和度)。在最后一次添加硫酸铵之后, 在 4℃ 下 (或者在冰上) 再搅拌 20-30 分钟。通过离心 (10000 × g, 15 分钟) 使沉淀物沉淀, 取出并弃去上清液, 并且, 将沉淀溶解在最多 1ml 透析缓冲液中, 优选 0.5ml (只需要轻轻地混合, 它就能很容易进入溶
25 液中)。在 4℃ 下, 用 500ml 透析缓冲液透析 8-12 小时, 以便除去残留的硫酸铵 (如果需要, 可以更换 1 次缓冲液)。从透析管中回收样品, 以等份试样形式冷冻, 并在 -80℃ 下保存。它可以稳定保存 1 年时间而不会有明显的活性损失。尽管似乎可以稳定使用 2-3 次而不会有任何问题, 但要避免过多的冷冻-解冻。

30

实施例 1

朊病毒蛋白

具有复杂的和高度调控的转运的底物的突出例子是朊病毒蛋白 (PrP), 它是与若干种神经变性疾病的发病机理相关的 35kD 的大脑糖蛋白 (Prusiner, 1997, 科学, 278, 241-251)。PrP 在 ER 上能以三种不同的拓扑形式同时合成 (Hegde 等, 1998, 科学 279, 827-834)。其中的一种形式被称为 ^{sc}PrP, 它能完全通过 ER 膜转运, 并且是在体内所出现的主要形式。相反, 另外两种形式的 PrP 是所产生的以相反方向单次跨膜的蛋白, N-或 C-末端在 ER 腔中 (分别称为 ^{Ntm}PrP 和 ^{Ctm}PrP)。PrP 生物合成似乎涉及到多个步骤, 导致至少三种不同的、并且可检测的结果, 因此, 将其用作 N-末端信号序列的任何潜在底物特异性作用的敏感探针。在下面的实验中, 用分泌蛋白前催乳素和前 β -内酰胺酶的已经作过充分研究的信号序列取代 PrP 的天然信号序列 (图 1A)。将嵌合蛋白 (分别为 Prl-PrP 和 β L-PrP) 与天然 PrP 进行比较, 比较其导向、转运以及合成 PrP 所特有的每一种拓扑形式的能力 (图 1B)。

15

质粒构建

在制备所有质粒构建体时使用标准技术 (Sambrook 等, 1989)。所有构建体都是用含有插在 HindIII 位点上的爪蟾珠蛋白 5'UTR 的 pSP64 载体 (Promega, Madison, WI) 构建的。通过 PCR 扩增编码前催乳素 1-30 号氨基酸和 PrP23-28 号氨基酸的片段构建 Prl-PrP。将 PCR 产物连接到 Bg12-PflmI 消化过的含有野生型 PrP 的载体上 (PrP SV12), 使得所得到的克隆包括前催乳素信号序列与 PrP 成熟区的精确融合。所有其它的 PrP、AV3、和 G123P 信号序列取代物都是以类似方法构建的, 除了 Prl-PrP_(AV3) 融合位点在 β L 信号裂解位点下游三个氨基酸处。该克隆与所构建的、完美融合的 Prl-PrP_(AV3) 的最终拓扑结构相同。发现在 μ L 信号序列的 2 号位置上含 Asp, 而不是 Ser。这种取代对 β L-PrP 的拓扑结构没有明显影响。通过以下方法制备 PrP_(R2, 3); PrP_(R4, 5); PrP_(D2, 3); 和 PrP_(D4, 5): 首先, 在 PrP SV12 的 8 号密码子上导入一个沉默 NheI 位点, 然后连接编码这些突变的退火的寡聚体或为 Bg12-NheI 片段。为了使所述信号序列与催乳素成熟区融合, 对后者进行 PCR 扩增 (从 34 号氨基酸开始) 和 NcoI 消化。将该片段连接到用 NcoI 消化过的有

30

效去除了催乳素的前 33 个氨基酸的野生型前催乳素载体 (pSP BPI) 上。恰在 34 号氨基酸上游工程制造一个编码 Thr-Arg 的 XbaI 位点, 扩增 PrP、前催乳素、前 β -内酰胺酶和前原- α 因子信号序列, 以 HindIII-SpeI 片段形式插入。用相同方法构建 PrI- β L。所有克隆都
5 通过双脱氧测序证实。

无细胞翻译和蛋白水解

业已描述了用 SP6RNA 聚合酶进行的体外转录, 用 RRL 进行的翻译以及至犬粗制微粒体中的转运 (Hegde 等, 1998, 细胞, 92, 621-631, 以及其中的参考文献)。翻译在 32°C (或者 26°C, 图 4C) 下进行 20-45 分钟。按照公开的方法, 通过沉淀分离特定的膜, 并重新悬浮在生理盐缓冲液 (PBS) 中 (Hegde 和 Lingappa, 1996, 细胞, 85: 217-228)。蛋白水解在 0°C 下用 0.5 毫克/毫升 PK 进行 45-90 分钟。用 12.5mM PMSF 终止反应, 并转入 100°C 的 10 倍体积的
15 1%SDS 中。

导向研究

在图 2B 中, 在没有膜的条件下, 在 32°C 下开始翻译, 然后在缺乏转录物的条件下进行 30 秒预孵育。在转移到 32°C 下 5 分钟之后, 添加金精三羧酸 (ATA-Sigma) 至 75 μ m。以交错的时间间隔取出等
20 量样品放在冰上。在采集了最后一个样品之后, 将膜添加到除了一份样品之外的所有样品中。然后, 将这些样品再送回到 32°C 下保持 30 分钟, 然后进行蛋白水解, 并用 3F4 进行免疫沉淀。在图 2C 中, 在有或没有微粒体的条件下, 在 32°C 下, 在 StuI 位点上截断的 PrP。5
25 分钟之后, 按上述方法向该该孵育物中添加 ATA。在翻译 30 分钟之后, 取出样品放到冰上, 向缺乏膜的样品中添加膜, 并在 32°C 下继续孵育 30 分钟。在翻译结束之后, 用 10mM EDTA 在 26°C 下处理 10 分钟, 使链释放出来。然后进行蛋白水解和免疫沉淀。

交联

对于要交联的样品来说, 按上述方法使翻译产物沉淀并重新悬浮, 并将其分成等量的试样。将一份样品放在一边, 向其它样品中添

加 DSS 到 1mM 的浓度,并在室温下孵育样品 30 分钟。通过添加 50mM Tris (pH8.0), 10mM EDTA, 和 10 微克/毫升 RNaseA (Sigma, St. Louis,MO) 终止反应。当需要分离腔交联物时, 还要添加 0.5% 皂苷, 然后在 4℃ 下, 用 TLA100 以 75000rpm 的速度离心沉淀 10 分钟。为了
5 了使交联材料免疫沉淀, 按上述方法添加皂苷, 并将抗体直接添加到淬火的交联反应物中。

微粒体膜分级分离

简单地讲, 按以前描述披露的方法制备粗制微粒体膜 (RMs)
10 (Walter 和 Blobel, 酶学方法, 1983, 96: 84-93)。在腔和外周膜蛋白进行提取之后, 用洗涤剂溶解一类膜内在蛋白, 并通过组合采用凝集素亲和和离子交换层析进行分级分离。在有脂类的情况下通过除去洗涤剂重建每一种级份, 并收集所产生的蛋白脂质体, 并用于分析底物-特异性活性。下面是用于制备和鉴定最初类型的级份的详细方案,
15 该方案证实了有关原理。可以按照下面的[d]部分详细描述的方法, 对这种初步方案进行改进。

分级分离方案: i) 按照以前描述的方法制备 RMs (Walter 和 Blobel, 1983, 同上)。简单地讲, 将来自刚死去的狗 (或猪) 的胰腺组织匀浆, 通过离心步骤除去碎片、细胞核和大的亚细胞结构,
20 然后, 对其余的材料进行高速离心。重新悬浮沉淀材料, 并在-80℃ 下冻存。所有后续步骤都是在冰上完成或是在 4℃ 下的低温室中完成, 除非另有说明。ii) 用含有 50mM Hepes, pH7.4, 250mM 蔗糖的缓冲液稀释 RMs (溶解在 50mM 三乙醇胺乙酸酯, pH7.4, 250mM 蔗糖, 1mM DTT 中), 并稀释到每微升 0.5 当量的最终浓度。添加
25 20% 的皂苷母液, 使最终浓度为 0.5%。对该溶液进行轻轻地充分混合, 然后, 通过在 TL100.3 转子 (Beckman 仪器) 中, 在 100,000rpm 速度下离心 10 分钟分离微粒体。将沉淀以每微升 0.5 当量的浓度悬浮在含有 500mM 乙酸钾, 50mM Hepes, pH7.4, 10mM EDTA, 125mM 蔗糖的缓冲液中。再次通过离心分离微粒体 (在 TL100.3 转子中以
30 100,000rpm 的速度离心 10 分钟), 并以每微升 1 当量的浓度重新悬浮在提取缓冲液 [350 mM 乙酸钾, 50mM Hepes, pH7.4, 5mM 氯化镁, 15%w/v 甘油, 5mM 2-巯基乙醇, 无 EDTA 蛋白酶抑制剂 (Roche

分子生物化学)和 0.8%脱氧-BigCHAP (Calbiochem)]中。冰上提取 10 分钟,然后在 TL100.3 转子中以 100,000rpm 的速度离心 30 分钟使不溶性材料沉淀。上清液被称为 DBC 提取物,并用于以下步骤。iii) 将 DBC 提取物与 1/5-1/7 体积的固定化 ConA (Pharmacia) 一起,在 4℃下孵育 10-15 小时,并持续轻轻地混合。取出上清液(去掉了 ConA 的 DPC 提取物),并放入另一个试管中,要么放在冰上保存(最多可以保存 12 小时),要么在液氮中冷冻,在-80℃下长期保存。用 5-7 倍体积的洗涤缓冲液[500 mM 乙酸钾, 50mM Hepes, pH7.4, 5mM 氯化镁, 15%w/v 甘油和 0.5mM 脱氧-BigCHAP]洗涤 ConA 珠 3 次,在 25℃下持续混合孵育 2 小时,用 5 倍体积的洗脱缓冲液[500 mM 乙酸钾, 50mM Hepes, pH7.4, 20mMEDTA, 15%w/v 甘油, 250mM 甲基- α -D-甘露糖吡喃糖苷, 2mM 2-巯基乙醇和 0.5mM 脱氧-BigCHAP]洗脱结合的蛋白。洗脱材料(ConA 洗脱物)在冰上冷却用于后续操作。iv) 用 1.5 倍体积的稀释缓冲液[50mM Hepes, pH7.4, 15%w/v 甘油]稀释 ConA 洗脱物,并分开用于与离子交换树脂一起孵育。将稀释过的 ConA 洗脱物添加到 1/20 倍体积的 Q-琼脂糖-Fast Flow 或 S-琼脂糖-Fast Flow (均购自 Pharmacia) 中,并持续混合孵育 1 小时。将 Q-琼脂糖-Fast Flow 和 S-琼脂糖-Fast Flow 的培养物的非结合级份,分别添加到 1/20 倍体积的 S-琼脂糖-Fast Flow 或 Q-琼脂糖-Fast Flow,在 4℃下孵育 1 小时,并持续混合。将该孵育物的非结合材料放在一边(Q/S-流通物和 S/Q 流通物)。来自第二次孵育物的树脂(使用 S-琼脂糖和 Q-琼脂糖)用 10 倍体积缓冲液[含有 200 mM 乙酸钾, 50mM Hepes, pH7.4, 15%w/v 甘油, 0.5%脱氧-BigCHAP]洗涤,然后用 4 倍体积的含有 1000mM 乙酸钾的同一种缓冲液洗脱。这些级份分别被称为 Q-FT 和 S-FT。来自第一次离子交换孵育物的树脂(使用 Q-琼脂糖和 S-琼脂糖)用 10 倍体积缓冲液[含有 200 mM 乙酸钾, 50mM Hepes, pH7.4, 15%w/v 甘油, 0.5%脱氧-BigCHAP]洗涤,然后用 4 倍体积的含有 500mM 乙酸钾的同一种缓冲液洗脱。然后,用 4 倍体积的含有 1000mM 乙酸钾的同一种缓冲液再次洗脱所述树脂。这些级份分别被称为 Q-500、S-500、Q-1000 和 S-1000。v) 按以下方法重建上述级份。首先,制备脂类:将 8 毫克磷脂酰胆碱(PC, 来自 10 毫克/毫升母液),

2 毫克磷脂酰乙醇胺 (PE, 来自 10 毫克/毫升母液), 10 毫克脱氧-BigCHAP (DBC, 来自 100 毫克/毫升母液) 混合, 并添加 1M DTT 母液至 10mM 的浓度。对样品进行真空干燥 (不加热), 并重新悬浮在 500 微升缓冲液中 [50mM Hepes, pH7.4, 15%w/v 甘油], 添加
5 100 毫克/毫升的 DBC 母液, 使其最终浓度大约为 20 毫克/毫升 (大约 2%w/v)。在液氮中冷冻液体混合物, 并在 -80℃ 下保存待用。为了进行重建, 将 100 微升 DBC 提取物或去掉了 ConA 的 DBC 提取物与 100 微升按上述方法制备的 ConA 洗脱缓冲液、ConA 洗脱物、S-FT、Q-FT、S-500、Q-500、S-1000 或 Q-1000 级份混合。另外,
10 添加 5 微升所述脂类混合物, 并充分混合样品, 然后, 将每一个样品添加到 160 毫克 BioBeads SM2 (Biorad) 中。在 4℃ 下孵育该混合物 12-18 小时, 并持续混合。vi) 为了回收蛋白脂质体, 从 BioBeads 中分离来自步骤 (v) 的液相, 并转移到新的试管中。用 5 倍体积的冰镇蒸馏水稀释这些样品, 混合, 并转移到放在冰上的 1.3 毫升离心管中。
15 在 TL100.3 转子上 (具有 1.3 毫升试管的适配器) 以 70,000rpm 的速度离心样品 20 分钟。弃去上清液, 并将沉淀的蛋白脂质体重新悬浮在 30 微升含有 100 mM 乙酸钾, 50mM Hepes, pH7.4, 250mM 蔗糖的缓冲液中。在液氮中冷冻所得到的悬浮液, 并在 -80℃ 下保存, 直到用于转运分析。vii) 按照以前描述的方法 (参考文献) 进行转运分析, 每 10 微升转运反应物使用 1 微升来自步骤 vi) 的蛋白脂质体。
20

PDIp 的纯化

用 50mM 三乙醇胺、250mM 蔗糖、0.2mM PMSF、5 微克/毫升抑蛋白酶肽、10 微克/毫升胰凝乳蛋白酶抑试剂、1 微克/毫升 E64、
25 5 微克/毫升抗蛋白酶、1mM DTT, 将 20,000 当量 (有关定义参见 Walter 和 Blobel, 1983) 的犬胰腺粗制微粒体膜调整到 80mls。在持续混合的条件下, 缓慢添加纯化的皂苷, 使最终浓度达到 1% w/v, 然后在 4℃ 下孵育 15 分钟, 通过在 70.1Ti 转子 (Beckman) 上以
30 70,000rpm 的速度离心 2 小时使膜沉淀。收集上清液并以 6.2 毫升/小时的速度加样到 5 毫升 ConA 琼脂糖柱上。然后, 用 25 毫升含有 100mM 乙酸钾的上述缓冲液和另外 25 毫升不含乙酸钾的上述缓冲

液，以 15 毫升/小时的流速洗涤该柱。在室温下，用 20 毫升含有 1M α -甲基-甘露糖吡喃糖苷的上述缓冲液，以 3 毫升/小时的速度洗脱该柱。将洗脱物收集在冰上，并在 4℃ 下加样到 1 毫升 Q-琼脂糖速流柱上。用 4 毫升 50mM HEPES, pH7.5, 2mM 乙酸镁, 1mM 氯化钙, 1mM DTT 洗涤该柱，并用 2 毫升含有 1M 乙酸钠的同一种缓冲液洗脱。在 Superdex PG16/16 柱 (Pharmacia) 上进一步分离洗脱物，并收集 80 份 1.5 毫升的级份。通过 SDS-PAGE 和考马斯染色，分析来自 31-56 号级份中每一个级份的 15 微升样品 (图 4B)。合并含有 GP65 的高峰级份，并将等分样品用于随后的序列分析 (通过 ProSeq, Salem, MA)。

TRAM 重建膜的制备

按公开方法制备去掉了糖蛋白的膜 (Hegde 等, 1998c)。以相当于原始膜 (通过免疫印迹判断) 中含量 4 倍的用量将按公开方法制备的纯化 TRAM (Gorlich 和 Rapoport, 1993) 添加到去掉了糖蛋白的提取物中。

其它

用 15% 凝胶或 12.5% 或 15% Tris/Tricine 凝胶进行 SDS-PAGE。直接通过放射自显影观察条带，或者借助于 TranScreenLE 增感屏 (Kodak; Rochester, NY) 观察。通过在 AGFA ArcusII 平板扫描仪上扫描，并使用 Adobe Photoshop 软件进行光密度测定完成定量测定。按公开方法进行免疫沉淀 (Chuck 和 Lingappa, 1992)。

尽管所有三种蛋白都能有效地导向并通过 ER 转运，但它们的拓扑结构明显不同。与以前的发现一致，PrP 主要是以 ^{sec}PrP 和 ^{Ntm}PrP 拓扑形式合成，具有很少但仍然显著数量的 ^{Ctm}PrP (大约 7%; 图 1C)。相反，PrI-PrP 主要是以 ^{sec}PrP 形式合成，其后是较少量的 ^{Ntm}PrP，和基本上不可检测数量的 ^{Ctm}PrP (小于 2%)。相反， β L-PrP 的拓扑结构明显偏向 ^{Ctm}PrP (大约 34%)，这主要是以 ^{sec}PrP 的减少为代价。这些结果表明，不同的信号序列所编码的信息能显著影响随后的拓扑结构事件。这些信息似乎是所有三种信号序列所共同拥有的基本导向特征的补充，并且取决于这种基本导向特征。因此，由胞质溶胶蛋白

珠蛋白的 N-末端 20 个氨基酸与成熟 PrP 融合所组成的嵌合蛋白，不能以任何一种拓扑形式转运（结果未发表）。综上所述，图 1 中的实验说明了 PrP 的信号序列在拓扑结构调控中起作用。

原则上讲，可以将上述信号序列对拓扑结构的影响归因于业已确定的信号序列在导向中的作用。如果不同的信号序列以不同的速度导向 ER 的话，就会根据核糖体-新生链复合体与易位子相互作用的时间，以不同的长度合成成熟底物的 N-末端。在导向步骤中合成量增加的一个后果是，有利于合成一种拓扑形式的 PrP（最有可能是 $C^{tm}PrP$ ，它的 N-末端结构域不进行转运）。这种假设意味着，操纵 PrP 导向的动力学，可以再现通过取代信号序列所发生的拓扑结构变化。用三种方法检验这种可能性。

首先，滴定存在于翻译反应物中的源于犬胰腺微粒体的 ER 量，并测定对 PrP 拓扑结构的影响。由于转运器的总浓度降低，从合成开始到与易位子相互作用之间的时间会延长，使得在导向之前合成的新生链的量增加。我们发现，在 10 倍范围内改变微粒体浓度，不会对不同的 PrP 拓扑形式的相对比例产生影响（图 2A）。体现在信号裂解效率降低方面的，随着微粒体浓度降低而导致的转运效率的降低，很可能是由于“转运能力”的丧失，这是新生链生长的相对较短的时期，此时，核糖体-新生链复合体能够与转运器发生有效的相互作用（Perara 等，科学，1986，232: 348-352）。用其它底物观察到了转运效率相似的丧失（资料未发表）。

在第二种方法中，通过在 5 分钟之后抑制启动，并随后添加微粒体使翻译反应同步。我们发现，在添加微粒体之前，无论翻译进行了多长时间，所合成的 $C^{tm}PrP$ 的百分比都保持稳定（图 2B）。在随后的时间点上，由于新生链的百分比增加，同样使得信号裂解的效率降低，所述新生链有可能丧失了转运能力。

最后，导向步骤本身是同步进行的。在这些实验中，以特定长度截断 PrP mRNA，并在没有微粒体膜的条件下进行翻译。所得到的核糖体-相关新生链，保留了在不进行进一步翻译的条件下转运的能力，并且，可以通过随后添加微粒体使导向同步（Perara 等，1986，同上）。在导向之后，将核糖体分解，并且，将通过截短的 PrP 链获得的拓扑结构（它只是缺乏 PrP C-末端的一小部分）与在翻译同时导向的相同

的截短产物进行比较。我们发现，使 PrP 的这种 223 聚体的导向同步，不会影响观察到的拓扑形式的相对比例（图 2C）。用 180 聚体也获得了类似结果（资料未发表）。综上所述，这些实验总体上表明，操纵 PrP 导向步骤的动力学，不足以改变所获得的最终拓扑结构。我们从这些发现中得出结论，由信号序列所编码的拓扑结构特异性信息，有可能在导向步骤以外的步骤起作用。

由于导向动力学的差异不能解释信号序列对 PrP 拓扑结构的影响，我们转而考虑信号序列作用的其它部分，ER 膜。在 ER 膜上进行的信号序列识别过程，似乎是在转运早期，并且在形成紧密的核糖体-膜结合之前就发生了。如果前催乳素和前 β 内酰胺酶信号序列编码由转运器识别的机制的天然差异，这种差别有可能表现在其结合状态上。

分析前催乳素和前 β 内酰胺酶的短的转运中间产物受蛋白酶 K (PK) 的影响性，它是核糖体-膜结合状态的探针。与以前的报导一致 (Connolly 等, 细胞生物学杂志, 1989, 108: 299-307; Jungnickel 和 Rapoport, 细胞, 1995, 82: 261-270), 所述结合的紧密密封, 将前催乳素 86 聚体保护起来, 使其不受蛋白水解作用。相反, 前 β 内酰胺酶 84 聚体很容易被消化, 表明它具有有一种开放的核糖体-膜结合 (图 3A)。为了确定这种差别是否因为信号序列的作用所产生的, 我们交换了前催乳素和前 β 内酰胺酶的信号序列 (构建体 β L-Prl 和 Prl- β L)。我们发现, β L-Prl 81 聚体容易受蛋白酶消化, 而 Prl- β L 93 聚体不容易受蛋白酶消化 (图 3A)。用长出大约 20 个氨基酸的转运中间体获得了类似结果 (资料未发表)。这些资料表明, 信号序列在分泌蛋白生物发生早期, 可以对核糖体-膜结合状态产生不同影响。

由上述结果可以看出, 信号序列对核糖体-膜结合的调节似乎是调控 PrP 拓扑结构的有说服力的机制。如果这样的话, 就可以预计其 N-末端留在细胞质溶胶中的 PrP 的拓扑形式 (C^{tm} PrP), 可能是由在转运初期不能形成紧密的核糖体-膜结合的链产生的。为了验证这一假设, 在 ER 上组装了长度逐渐增加的 PrP、Prl-PrP 和 β L-PrP 的转运中间产物, 并通过沉淀从与导向链分离, 并且, 通过 PK 消化分析核糖体-膜结合状态 (图 3B)。

当在相当于野生型 PrP 的 61 聚体的点上截断时，所有三种底物都能完全受蛋白酶的影响，因此，不能形成一种紧密的结合。不过，当这三种构建体的转运中间产物仅仅长出 52 个氨基酸时，就表现出受蛋白酶影响的不一致性，即使在跨膜结构域合成之前也是这样。在此时，产生很少 C^{tm} PrP 的 PrI-PrP，在很大程度上不受消化作用的影响，而有较大百分比的 β L-PrP 链易受蛋白酶影响。在该截断点上，所有三种构建体都能抗用高盐（0.5M 乙酸钾；资料未发表）从膜中提取，这表明核糖体与转运通道是稳定结合的。另外，在其生物发生过程中， β L-PrP 新生链依然比 PrI-PrP 链更容易受 PK 影响。大部分未受保护的链保留了它们的信号序列，这可能是开放结合的结果。随着链长度的增加，在所有三种底物上所出现的蛋白酶保护作用的减弱，有可能反映了在 N^{tm} PrP 合成期间结合的开放。总之，上述结果表明，由信号序列介导的对核糖体-膜结合的调控可能对随后的转运过程产生明显影响。

推测的核糖体-膜结合在决定最终拓扑结构方面的作用表明，调控所述结合的反式作用因子有可能影响 PrP 生物发生。有人认为 TRAM 糖蛋白与信号序列相互作用，促进核糖体-新生链复合体和易位子之间的最初结合（Voigt 等，细胞生物学杂志，1996，134：25-35）。某些底物（如前催乳素）信号序列的转运不取决于 TRAM，不过大多数（包括前 β 内酰胺酶）是 TRAM 依赖性的（Gorlich 等，自然，1992，357：47-52；Gorlich 和 Rapoport，细胞，1993，75：615-630；Voigt 等，1996，同上）。尽管提示在其它底物的转运期间 TRAM 还参与了核糖体-膜结合的调控（Hegde 等，细胞，1998，92：621-631），但到目前为止所进行的功能研究，未能证实 TRAM 在 PrP 拓扑结构方面的直接或关键作用（Hegde 等，分子细胞，1998，2：85-91）。因此，我们有理由认为，可以将信号序列的 TRAM 依赖性特征与其在 PrP 拓扑结构中的作用分开。

我们试图鉴定发生在 PrP 信号序列上的有可能以不同方式改变拓扑结构，但不取决于 TRAM 的突变。通过类比电荷对信号锚定蛋白拓扑结构的影响（例如，Sipos 和 von Heigne，欧洲生物化学杂志，1993，213：1333-1340；Spiess，FEBS Lett，1995，369：76-79），我们认为，发生在 PrP 信号序列上的非保守突变可能影响 PrP 生物

发生。保留信号序列的疏水性核心的完整性，以便能进行有效地导向，用精氨酸或天冬氨酸密码子分别取代 2 号和 3 号密码子或 4 或 5 号密码子 [$\text{PrP}_{(R2, 3)}$, $\text{PrP}_{(D2, 3)}$, $\text{PrP}_{(R4, 5)}$, 和 $\text{PrP}_{(D4, 5)}$]; 参见图 4A]。对 $\text{PrP}_{(R2, 3)}$ 和 $\text{PrP}_{(R4, 5)}$ 进行的拓扑分析，发现了 $\text{C}^{\text{tm}}\text{PrP}$ 合成的减少，而 $\text{PrP}_{(D2, 3)}$ 和 $\text{PrP}_{(D4, 5)}$ 都表现出 $\text{C}^{\text{tm}}\text{PrP}$ 合成的增加 (图 4B)。

为了评估这种突变信号序列的 TRAM 依赖性，我们分别用它们取代天然前催乳素信号序列与前催乳素融合。测定了上述构建体转运到包含或缺乏纯化的 TRAM 的、去除了糖蛋白的蛋白脂质体中转运的能力。TRAM 依赖性被定义为需要 TRAM 进行转运的链的百分比。我们发现，所有四种突变的信号序列对 TRAM 的依赖性都低于野生型 PrP 信号序列，尽管它们对 PrP 拓扑结构有不同的作用 (图 4C)。因此，PrP 信号序列的 TRAM 依赖性可以与该信号序列在调控拓扑结构方面的作用分开，这证明了以前得不到承认的，由信号序列影响拓扑结构的机制。

发生在跨膜结构域上的突变，可以影响 PrP 的拓扑结构 (Hegde 等, 科学, 1998, 279: 827-834)。与信号序列相似，由于跨膜 (TM) 结构域可以引起核糖体-膜结构的变化 (Liao 等, 细胞, 1997, 90: 31-41)，这两种结构域调控拓扑结构的机制很可能是相关的。就像某些信号序列能够打开核糖体-膜结合那样，PrP 的 TM 结构域可能能够引起所述结合的开放。在这种情况下，有利于 $\text{C}^{\text{tm}}\text{PrP}$ 的 TM 结构域突变体所引起的所述结合的开放，比野生型 PrP 所引起的开放更大，而有利于 secPrP 的突变体会起到保持关闭结合的作用。我们通过分析含有在信号序列和 TM 结构域上所发生改变的各种组合的 PrP 结构来验证这一假说。

用缬氨酸取代 TM 结构域上的保守的丙氨酸，能明显增加以 $\text{C}^{\text{tm}}\text{PrP}$ 拓扑结构形式产生的 PrP 的比例 (Hegde 等, 科学, 1998, 279: 827-834)。用前催乳素或前 β 内酰胺酶信号序列 [$\text{Prl-PrP}_{(AV3)}$ 和 $\beta\text{L-PrP}_{(AV3)}$] 对所述突变体之一 [$\text{PrP}_{(AV3)}$, 它能产生大约 40% 的 $\text{C}^{\text{tm}}\text{PrP}$ 分子] 进行工程改造。如果 AV3 突变能导致核糖体-膜结合不依赖于信号序列而打开， $\text{Prl-PrP}_{(AV3)}$ 构建体就能够合成大体上一样多的 $\text{C}^{\text{tm}}\text{PrP}$ 和 $\text{PrP}_{(AV3)}$ 。另人吃惊的是，我们发现 $\text{Prl-PrP}_{(AV3)}$ 能将 $\text{C}^{\text{tm}}\text{PrP}$ 合成降

低到几乎不可检测的水平 (图 5A, 中图)。相反, β L-PrP_(AV3) 几乎只能产生 CtmPrP (图 5A, 右图)。

类似地, 根据上述假设, 有利于 ^{sec}PrP 合成的 TM 突变体应当能导致核糖体-膜结合关闭。当我们取代 TM 突变体 PrP_(G123P) 的信号序列时, 使用前催乳素或前 β 内酰胺酶信号序列 [Prl-PrP_(G123P) 和 β L-PrP_(G123P)] 只能产生 ^{sec}PrP, 我们发现, 所有三种底物都只能合成 ^{sec}PrP。不过, 核糖体-膜结合的关闭可以提高转运的总体效率, 因为由闭合的结合所合成的链, ER 腔是从核糖体中排出的唯一选择。与此不同的是, 我们发现 β L-PrP_(G123P) 的转运与 PrP_(G123P) 和 Prl-PrP_(G123P) 的转运相比较差。这一结果表明, G123P 突变不是通过关闭核糖体-膜结合产生 ^{sec}PrP, 而是通过抑制有可能成为 CtmPrP 的链转运。

上述发现表明, TM 结构域不是独立于信号序列起作用, 而是受限于之前的信号序列作用。为了直接验证 TM 结构域是否对由信号序列决定的核糖体-膜结合的状态有任何作用, 我们在 TM 结构域出现之后, 分析了 Prl-PrP_(AV3) 和 β L-PrP_(G123P) 的结合状态。我们发现, β L-PrP_(G123P) 的结合保持开放, 而 Prl-PrP_(AV3) 关闭, 而无论 TM 结构域是什么样的 (图 5C)。以上结果表明, 所述信号序列对核糖体-膜结合的初步作用, 即使是在 TM 结构域合成之前, 对于随后的拓扑决定也是重要的。

在 TM 结构域合成之前 PrP 链具有跨膜拓扑结构这一发现是出人意料的。在生物发生如此早的阶段出现这一关键的调控步骤为什么是重要的呢? 一个可能的原因是, PrP 折叠的某些初期过程, 在 TM 结构域合成之后的生物发生的后期时间不容易逆转。因此, 以时间上和空间上有限制的方式起始这种初期折叠过程是重要的 (假定 N-末端最终会留在两个环境不同的区室中的一个)。为了验证这种可能性, 我们试图鉴定 PrP 和蛋白折叠器之间的相互作用, 这种相互是在拓扑结构定型之前, 以拓扑结构特异性方式开始的。

在初步的实验中, 我们通过交联鉴定表现出与 PrP_(G123P) 或 PrP_(AV3) 具有优势结合的蛋白。尽管有几种蛋白与这两种底物具有相当的相互作用, 一种 65kDa 的蛋白 (p65) 与 PrP_(G123P) 的交联强于与 PrP_(AV3) 的交联 (图 6A)。然后, 我们同样分析了在相同位置上截断了的 Prl-

PrP 和 β L- PrP, 并且发现 p65 与 PrI-PrP 的交联具有优势, 这表明在产生 ^{35}S -PrP 拓扑结构的过程中, 新生 PrP 链能与该因子专一结合(图 6B)。为了确定在 PrP 生物发生期间, 这种相互作用是何时开始的, 我们检查了 PrI-PrP 和 β L- PrP 的早期转运中间产物的这种交联的不同存在形式。很明显, 我们发现 p65 和略小一些的蛋白, 能优先与在野生型 PrP 的 113 号密码子上截断的 PrI- PrP 转运中间产物交联(图 6C)。因此, p65 在生物发生的很早阶段就与新生 PrP 链结合, 与底物最终以 ^{35}S -PrP 拓扑结构形成的倾向相关。

我们利用 p65 交联的加成物的生化特征来纯化并鉴定该蛋白。所述加成物可以用皂苷提取, 这表明 p65 定位于腔中; 在蔗糖梯度分析时它作为 4S 蛋白移动, 表明它是单聚体; 它保留在 ConA-琼脂糖柱上, 表明 p65 是糖基化的; 并且它还保留在 Q-琼脂糖柱上, 这表明 p65 传递负净电荷到其它带正净电荷的 PrP 分子上。上述特征在犬粗制微粒体的分部分离中相结合时, 可以纯化单一的主要 65kDa 蛋白(图 6D)。通过溴化氰裂解该蛋白所得到的肽片段的序列表明它是 PDIp, 它是伴侣蛋白的蛋白质二硫化物异构酶(PDI)家族的胰腺特异性成员(Desilva 等, 细胞生物学, 1996, 15: 9-16; Elliott 等, 欧洲生物化学杂志, 1998, 252: 372-377)。

通过用抗 PDIp 的抗体进行免疫沉淀证实 p65 作为 PDIp 的身份(图 6E)。另外, 用抗普遍存在的 PDI 的抗体使稍小一些的交联配偶体免疫沉淀, 这进一步表明了 PrP 及该蛋白家族之间的特殊相互作用。该免疫沉淀研究证实, PDI 和 PDIp 与 PrI-PrP 的交联比与 β L-PrP 的交联强(图 6E)。在从 PrP 优势表达的脑中分离的微粒体中, 也观察到了倾向于 ^{35}S -PrP 的构建体与 PDI 的交联差异。在这种情况下, 只观察到了与普遍存在的 PDI 的交联, 这与以前的观察吻合, 即 PDIp 在大脑组织中不能大量表达(Desilva 等, 1996, 同上)。

随后, 我们试图确定 ^{35}S -PrP 在生物发生的早期, 是否能与任何其它腔蛋白专一地性相互作用。检查皂苷可以提取的交联物, 发现了倾向于 ^{35}S -PrP 的构建体[PrP_(R2,3) 和 PrP_(R4,5)]与大约 30kDa、60kDa 和 65kDa 的蛋白之间的显著的相互作用(图 6F)。与倾向于 $^{\text{C}^{\text{m}}}$ -PrP 的变异[PrP_(D2,3) 和 PrP_(D4,5)]的相似交联明显减弱。正如所预料的, 通过免疫沉淀证实 60kDa 和 65kDa 的交联物是 PDI 和 PDIp(资料未发表)。

尚不了解 30kDa 交联配偶体的性质。上述交联物不是作为 ^{sec}PrP 的腔定位的偶然后果而发现的，因为在前催乳素的早期转运中间产物中，没有发现与腔蛋白的明显的交联（图 6F，资料未发表）。上述交联资料总体上表明，在 PrP 生物发生早期，由信号序列介导的事件的一个后果是，促进了新生链和随后有可能参与其生物发生的因子之间的相互作用的差别。

实施例 2

改变了的朊病毒蛋白的拓扑结构的发病机理是遗传性和传染性朊病毒病所共有的

朊病毒病可能是传染性的，散发的和遗传性的（Prusiner, S.B.PNAS.1998, 95: 13363-13383; Weissmann, C, 生物学化学杂志, 1999, 274-3-6; Johnson, 新英格兰医学杂志, 1998, 339: 1994-2004; Horwich, 细胞, 1997, 89: 499-510）。这种疾病的传染形式包括牛海绵状脑病和 Creutzfeldt-Jakob 病，通常，其特征是在大脑中积累可传染的病原体，以及异常折叠的朊病毒蛋白（PrP）异构型，它被称为 PrP^{Sc}。不过，在没有 PrP^{Sc} 的情况下，某些遗传性 PrP 突变似乎能导致神经变性（Brown, 神经学年刊, 1994, 35: 513-529; Tateishi, J.等, 神经学, 1990, 40: 1578-1581; Tateishi, 神经学, 1996, 46: 532-537; Tateishi, J.大脑病理学, 1995, 5: 53-59），是通过有利于 CtmPrP，即 PrP 的一种跨膜形式的合成来起作用（Hegde 等, 科学, 1998, 279: 827-834）。PrP 上的某些突变（包括与人类朊病毒病相关的 A117v 突变）能改变其在内质网（ER）上的生物发生，导致更大比例的 PrP 分子以跨膜形式 CtmPrP 合成。转基因小鼠中有利于 CtmPrP 突变的表达会导致神经变性的改变，类似于在朊病毒病中所出现的情况（Hegde 等, 科学, 1998, 279: 827-834）。有利于 CtmPrP 的突变的检测表明，较高含量的 CtmPrP 会导致神经变性（Hegde 等, 科学, 1998, 279: 827-834），但尚不清楚这种神经变性的机制是否与传染性朊病毒病的发病机理相关。为了探索这一问题，制备了具有不同的形成 CtmPrP 的倾向的突变 PrP 转基因的小鼠，然后评估其对 PrP^{Sc} 诱导的神经变性的易感性。

无细胞翻译和转运。大体上按以前描述的方法 (Hegde 等, 科学, 1998, 279: 827-834) 用 SP6 聚合酶转录相关的编码区, 在含有来自狗胰腺的微粒体膜的兔网织红细胞裂解物中翻译, 并进行蛋白水解。翻译反应在 32℃ 下进行 40 分钟, 蛋白水解反应用 0.5 毫克/毫升 PK 在 0℃ 下进行 60 分钟。用 R073 抗体对产物进行免疫沉淀 (Rogers, M.等, 免疫学杂志, 1991, 147: 3568-3574), 在 15% 丙烯酰胺凝胶上通过 SDS-PAGE 分离, 并通过放射自显影观察。

表 1

10

转基因小鼠的生产和鉴定

转基因系 编号	转基因 系名称	体外 %Ctm	PrP 表达 水平(相对 于 Sha)	Ctm- 指数	发病 年龄 (日)	体内 Ctm- PrP	Sc237 接种 时间
TgSHaPrP (STE)H	F1788	6	4	24	-	-	323+/- 14(9/9)
TgSHaPrP (A117V)L	E15781	31	0.4	12	-	-	70+/- 2(6/6)
TgSHaPrP (A117V)H	E15727	31	4	124	572+/- 35(5/5)	+	55+/- (6/6)
TgSHaPrP (N108I)L	E15786	35	1	35	-	-	311+/- (3-3)
TgSHaPrP (N108I)H	E15790	35	5	175	312+/- 24(7/7)	+	233+/- 2(9/9)
TgSHaPrP (KH-II)L	E12485	48	0.4	19	-	-	257+/- 2(9/9)
TgSHaPrP (KH-II)M	F1220	48	1	48	472+/- 13(6/6)	+	181+/- 5(10/10)
TgSHaPrP (KH-II)H	F1198	48	4	192	58+/-11 (24/24)	++	ND ^b

表 1. 用于本研究的转基因小鼠系的特征。体外 %Ctm 的值来自图

8a 的定量测定。PrP 的表达水平是通过用 13A5 单克隆抗体进行定量 Western 印迹测定的，并以相对在叙利亚仓鼠*Sha 中 PrP 的表达形式表示；有关代表性实验可以参考图 1B。每一个转基因系 C_{tm} 指数是通过将在前面两个柱中的值相乘而得出的。‘发病年龄’表示临床症状出现的年龄[平均值±SEM (n/n.)]。用于测定 C_{tm}PrP 在体内存在的生化测定方法如以前所描述的⁹，并且应用于临床上生病的动物（此时转基因系发病）或超过 600 日龄的小鼠（此时转基因系没有出现神经变性）。‘Sc237 接种时间’表示从接种 Sc237Sha 朊病毒开始，到出现功能失调的神经疾病体征所用的时间[平均值±SEM (n/n.)]。

^a资料来自参考文献 9。

^bND 表示未测定。

按以前描述的方法制备的 (Manson, 等, 神经变性, 1994, 3: 331-340 及其所引用的参考文献)。用 13A5 单克隆抗体对脑组织匀浆物进行免疫印迹, 评估 PrP 表达 (Kascsak, R.J.等, 病毒学杂志, 61: 3688-3693), 与正常叙利亚仓鼠脑组织的系列稀释液进行比较 (图 8B 和表 1)。按以前描述的方法观察这些小鼠自发疾病的发展 (Prusiner, 神经学年刊, 1982, 11: 353-358)。通过让 Tg[SHaPrP]/Prnp^{0/0} (A3922 系)⁹与 Tg[MoPrP]/Prnp^{0/0} (B4053 系) 杂交制备能同时表达 SHaPrP 和 MoPrP 的双转基因小鼠 (参见图 11) (Telling, 基因发育, 1996, 10: 1736-1750)。通过按以前描述的方法 (Prusiner, 神经学年刊, 1982, 11: 353-358) 给小鼠 (每只动物 30 微升) 或仓鼠 (每只动物 50 微升) 脑内接种 1% 大脑匀浆物 (w/v) 评估传染性 (参见图 10)。业已描述了 (Marsh, 传染病杂志, 1975, 131: 104-110; Chandler, Lancet, 1961, 1: 1378-1379) 仓鼠朊病毒的 Sc237 株 (用于图 9) 以及小鼠朊病毒的 RML 株 (用于图 11)。

评估脑的 C_{tm}PrP 和 PrP^{Sc}。通过连续用 16、18 和 20 号针头抽吸, 在 PBS (5%w/v 或 10%w/v) 中将脑组织 (刚从大脑中取出的或者在液氮中快速冷冻后在 -80℃ 下冷冻保存的) 匀浆。为了检测 C_{tm}PrP (‘温和’蛋白水解条件), 将有关样品的 17 微升等分试样 (浓度为 25 微克/微升) 调整到 (最终体积为 20 微升) 1%NP-40, 0.25 毫克/毫升 PK,

并在冰上孵育 60 分钟。为了检测 PrP^{Sc} (‘严酷’蛋白水解条件), 将 17 微升样品 (浓度为 25 微克/微升) 调整到 (最终体积为 20 微升) 0.5%NP-40, 0.5%脱氧胆酸盐, 0.1 毫克/毫升 PK, 并在 37℃下孵育 60 分钟。应当指出的是, 温和消化条件和严酷消化条件之间的差别尽管是可操作的, 但是是很明显的, 因为涉及到孵育温度有 37℃的改变, 并且, 存在非离子型洗涤剂 and 混合的非离子型和离子型洗涤剂。通过添加 PMSF 到 5mM 的浓度终止蛋白水解反应, 再孵育 5 分钟, 并将样品转移到 5 倍体积的煮沸的 1%SDS, 0.1M Tris, pH8.9 中, 然后, 按照生产商的指导用 PNGase 消化样品, 用 10%tricine-SDS-PAGE 溶解, 转移到硝酸纤维素膜上, 并用 3F4 或 13A5 单克隆抗体 (Kascsak, 病毒学杂志, 61: 3688-3699), 或者 RO73 多克隆抗体检测 (Rogers, 免疫学杂志, 1991, 147: 3568-2574)。

结果

在图 8a 中示出了改变 ER 上 CtmPrP 合成量的叙利亚仓鼠 (Sha) PrP 的四种突变型的体外转运产物。制备了能在 FVB/PrP/Prnp^{0/0} 背景中表达上述每一种突变型 PrP 的转基因小鼠, 并进行鉴定 (参见表 1 和图 8b)。分别在大约 60、472、572 和 312 天, 观察到 Tg[SHaPrP (KH→II)_H]、Tg[SHaPrP (KH→II)_M]、Tg[SHaPrP (A117V)_H] 和 Tg[SHaPrP (N108I)_H] 小鼠出现神经变性疾病的体征和症状 (图 8c 和表 1)。相反, Tg[SHaPrP (ΔSTE)] 小鼠或能表达较低含量与疾病相关的转基因小鼠 {Tg[SHaPrP (KH→II)_L]、Tg[SHaPrP (A117V)_L] 和 Tg[SHaPrP (N108I)_L] } 都不会出现自发疾病 (表 1, 资料未发表)。对来自每一种转基因小鼠品系的脑组织进行生物化学分析, 发现在发病的品系中有升高的 CtmPrP, 而不是 PrP^{Sc} (图 8D)。总之, 图 8 中的数据重申这样的观点, 那就是 CtmPrP 形式的 PrP 合成的增加, 与神经变性疾病的发展相关。

更突出的是在两个方面出现的 CtmPrP 和疾病严重程度之间的明显的剂量关系。首先, 在 ER 上合成的 CtmPrP 越多 (KH→II>N108I>A117V), 自发疾病的发病就越早 (表 1)。其次, 将上述每一种突变的表达水平降低到一个明显的界限, 会终止 CtmPrP 的产生 (图 8d, 参考文献 9) 以及疾病的发展。

另外，表达 KH→II 的三种转基因品系的发病时间，与相应的表达水平呈负相关（表 1）。上述观察表明，突变倾向于 $C^{tm}PrP$ 的性质及其表达水平，都能造成神经变性的发展。

5 将这一组具有不同的产生 $C^{tm}PrP$ 的倾向的转基因小鼠，用于剖析 $C^{tm}PrP$ 和 PrP^{Sc} 之间的关系。我们首先检查了具有相同的转基因表达水平，但具有不同的产生 $C^{tm}PrP$ 倾向的转基因小鼠：Tg[SHaPrP (□STE)]和 Tg[SHaPrP (A117V)_H]对于 PrP^{Sc} 的易感性。在用 Sc237 仓鼠朊病毒接种时我们发现，Tg[SHaPrP (□STE)]和 Tg[SHaPrP (A117V)_H]小鼠分别在大约 323 和 54 天发病（图 9a，表 1）。在疾病发病时间对代表性小鼠进行的生物化学分析发现，Tg[SHaPrP (□STE)]小鼠含有明显高于 Tg[SHaPrP (A117V)_H]小鼠的 PrP^{Sc} （图 10 9b）。因此，能产生较多 $C^{tm}PrP$ 的转基因品系更易感 PrP^{Sc} ，在总 PrP^{Sc} 积累水平较低时就发病。

15 随后，我们比较了 Tg[SHaPrP (KH→II)_L]相对于 Tg[SHaPrP (A117V)_H]对 Sc237 的易感性（图 9e）。通过保持突变稳定，避免有关潜在的繁殖障碍的问题，同时仍然能通过调节表达水平改变产生 $C^{tm}PrP$ 的倾向。正如所预料的，通过降低表达水平，可以延长从 Sc237 接种之后到发病的孵育时间。不过，更明显的是，我们发现采用 KH→II 和 A117V 突变体，在疾病发病时，较低水平的表达子含有较高含量的 PrP^{Sc} （图 9d, f）。用表达不同水平野生型 PrP 的小鼠，发现了在发病时表达水平和 PrP^{Sc} 数量之间的类似的反比关系（参考文献 10）。因此，如上文所述，具有较低产生 $C^{tm}PrP$ 倾向的小鼠，在疾病发病时积累了较高含量 PrP^{Sc} 。为了将上述接种数据在同一幅图上进行作图，我们用一种被我们称之为 C_{tm}-指数的方法，根据其产生 $C^{tm}PrP$ 的倾向对不同的转基因小鼠品系进行分类（参见表 1）。该指数是通过用以 $C^{tm}PrP$ 拓扑结构形式合成的链的百分比乘以转基因表达水平而得到的。因此，将两种已知能影响 $C^{tm}PrP$ 产生的参数结合在一起。图 9g 表示在 C_{tm}-指数和在发病时所积累的 PrP^{Sc} 链之间存在明确的关系。这种关系表明， PrP^{Sc} 导致发病的能力是宿主产生 $C^{tm}PrP$ 倾向性的函数。

30 图 9 中的数据证实了两个重要观点。首先，在对各种转基因小鼠品系接种之后，在临床上发病时，观察到了 PrP^{Sc} 积累量差别很

大。假定在每一种情况下小鼠的株系相同，唯一的差别是 PrP 转基因表达的⁵的性质和水平，这一发现强调的结论是，蛋白酶抵抗 PrP^{Sc} 的积累可能不是发病的最有可能的原因；很有可能与随后的事件相关（明显涉及 CtmPrP）。其次，PrP^{Sc} 的积累量和调节 CtmPrP 产生的因素之间有关系。这种关系表明，CtmPrP 和 PrP^{Sc} 是一种途径的组成部分，在该途径中，它们有可能潜在地直接或间接互相影响各自的代谢。

协调图 9g 中的数据的一种方法是，如果 PrP^{Sc} 的积累导致了 CtmPrP 的产生量增加，然后它引起神经变性。因此，具有较高产生 CtmPrP 倾向的（即高 Ctm 指数）转基因小鼠，在 CtmPrP 产量提高到超过导致发病所需要的阈值之前，需要积累较少的 PrP^{Sc}。该模型可以解释在图 9g 中观察到的反比例关系，并可以做出两项其它的预测。首先，由于显著倾向于合成 CtmPrP 的形式的 PrP 的转基因小鼠在神经变性疾病发展中能完全消除对 PrP^{Sc} 的需求，来自这种小鼠的组织将不会¹⁰是传染性的。其次，在传染性朊病毒病中，在 PrP^{Sc} 积累过程中，CtmPrP 含量应当提高。验证了上述预测。

为了评估与 CtmPrP 相关的疾病的传染性，将来自临床上发病的 Tg[SHaPrP (KH→II)_H]小鼠的脑匀浆物接种到四个宿主的大脑内：¹⁵ i) 能以低水平表达 (KH→II) 突变的 Tg[SHaPrP (KH→II)_L]小鼠，ii) 能超量表达野生型 SHaPrP 的 Tg[SHaPrP]小鼠，iii) 具有 PrP 基因纯合型破坏的 FVB/Prnp^{0/0} 的小鼠和 iv) 叙利亚仓鼠。如图 10 所示，当在三个独立的宿主中直接相比，来自最终生病的 Tg[SHaPrP (KH→II)_H]小鼠的匀浆物，在诱导神经疾病的速度方面与来自对照 Tg[SHaPrP]匀浆物没有差别。另外，在接种之后多达 625 天的时间，²⁰ 对来自图 10 的代表性脑组织进行的生物化学和病理学检查，在实验动物或对照动物中都没有发现 PrP^{Sc} 或神经疾病的任何证据（资料未发表）。另外，用 Sc237 朊病毒接种 Tg[SHaPrP (KH→II)_L]小鼠，在脑中很容易产生 PrP^{Sc}（图 2d），它能将疾病再次传染给 Tg[SHaPrP (KH→II)_L]和 Tg[SHaPrP]小鼠（资料未发表）。因此，尽管 PrP (KH→II) 能够形成 PrP^{Sc}，但在 Tg[SHaPrP (KH→II)_H]小鼠体内与疾病相关的 CtmPrP 不会产生可检测的 PrP^{Sc}，因此，是非传染性的。缺乏²⁵ 传染能力这一事实，进一步支持了这样的假说，即遗传性朊病毒病

的神经变性是由 $C^{tm}PrP$ 直接引起的。根据图 9g 的资料所做出的第二种推测是，在传染性朊病毒病中 PrP^{Sc} 的积累会诱导 $C^{tm}PrP$ 产量的提高，这在随后会导致神经变性。不幸的是，对这一推测的直接验证受到了积累的 PrP^{Sc} 的生物化学特性的妨碍 (Meyer, PNAS, 1986, 83: 2310-2314)。由于在它的级份中，它是高度抗蛋白酶并且是非均质的，因此，它倾向于对所有的亚细胞级份造成明显的污染。另外，它还干扰对 $C^{tm}PrP$ 检测的分析，这同样是基于对蛋白酶的防护。由于 PrP^{Sc} 不容易被细胞降解并且能积累到很高的含量¹²，即使是对亚细胞级分很少量的污染也足以使得对 $C^{tm}PrP$ 的少量增加的检测变得困难。因此，需要另外一种方法来监测积累的 PrP^{Sc} 对新合成的 PrP 的拓扑结构的影响 (参见图 11a)。

为了设计这样一种实验，我们利用了三种发现。首先，在小鼠和叙利亚仓鼠之间存在 PrP^{Sc} 转化的物种障碍 (Prusiner, 细胞, 1990, 63: 637-686; Pattison, Res Vet Sci, 1968, 9: 408-410)。其次，与 PrP^{Sc} 形成的物种障碍相反，在小鼠 PrP^S (MoPrP) 和 SHaPrP 之间没有发现合成、转运或拓扑结构方面的物种特异性差别 (Hegde, 科学, 1998, 279: 827-834)。最后，对 SHaPrP 高度专一的单克隆抗体 (它不能与 MoPrP 发生交叉反应) 可用于区分这两种 PrP 转基因的表达¹⁵。因此，在这种双转基因动物上，在小鼠 PrP^{Sc} 积累期间，我们可以利用仓鼠 $C^{tm}PrP$ 的形成作为‘报道分子’。对于该实验来说，用小鼠朊病毒 (RML 菌株的) 接种能合成 MoPrP 和 SHaPrP 的双转基因小鼠。然后，在 PrP^{Sc} 积累和发病过程中以不同的时间间隔处死小鼠，并检查总的 PrP^{Sc} 积累量，以及仓鼠 $C^{tm}PrP$ 的存在 (参见图 4a)。其原则是，在接种之后，只有 MoPrP 是朊病毒复制和 PrP^{Sc} 产生的底物¹³。可以通过检查 SHaPrP 评估 PrP^{Sc} 积累对细胞产生 (或不产生) $C^{tm}PrP$ 的能力的影响。

这些动物上观察到的临床发病时间大约是在接种之后 9 周 (资料未发表)。我们发现，在这 9 周时间里 PrP^{Sc} 积累，最早可以检测到的时间是大约 5-6 周 (图 11b)。正如所预料的，通过本研究的生物化学标准 (图 11b) 和以前研究的传染性标准¹³ 都没有发现 SHaPrP 能产生任何 PrP^{Sc} 。不过明显的是，在检查 SHaPrP 时，发现了 $C^{tm}PrP$ 含量的显著增加。在没有接受接种物的对照组小鼠中没

有出现这种增加（资料未发表）。上述发现与 $C^{tm}PrP$ 能在缺乏传染形式的 PrP 的条件下导致神经变性的能力的发现（参考文献 9，图 8 和 10）结合在一起，表明 PrP^{Sc} 积累可以通过诱导 $C^{tm}PrP$ 从头合成而导致发病。

5 上述发现表明，在 PrP^{Sc} 积累、 $C^{tm}PrP$ 形成和代谢事件、以及神经变性疾病发展之间存在因果关系。三种互补的和独立的品系的证据，证实了这一结论。首先，将 $C^{tm}PrP$ 的产生量提高到超过特定阈值（通过调节 PrP 突变和表达水平的组合）会导致在没有 PrP^{Sc} 形成的情况下发生神经变性（图 8，图 10 和参考文献 9）。其次，引起神经
10 变性疾病的 PrP^{Sc} 积累量受宿主产生 $C^{tm}PrP$ 的倾向的影响（图 9）。再者，在 PrP^{Sc} 积累期间，脑表现出含有含量逐渐增加的 $C^{tm}PrP$ （图 11）。总之，上述结果表明在朊病毒病发病机理上存在三个连续的时期（图 12）。

有人认为，传染性朊病毒病是由启动 I 期的 PrP^{Sc} 的积累步骤开始的。原则上讲，遗传性朊病毒病是在 I 期或 II 期起作用。如果有关
15 PrP 突变能导致 PrP^{Sc} 的自发形成，就会启动 I 期， PrP^{Sc} 就可以复制和积累，并随后导致 $C^{tm}PrP$ 含量提高（II 期）。对于被认为能导致 Creutzfeldt-Jakob 病的某些遗传性变体的 E200K 突变来讲，这种机制似乎是合理的¹⁶。因此，在这些患者体内出现了 PrP^{Sc} ¹⁷，并且这种
20 病很容易传染给实验动物⁷。另外，某些其它的 PrP 突变可以通过直接导致 $C^{tm}PrP$ 产量的提高而绕过 I 期。导致人类 Gerstmann-Straussler-Scheinker¹⁸ 疾病的 A117V 突变可能就是通过这种机制起作用的。这样就可以解释这种病为什么是不能传染的⁶⁻⁸，以及在这些患者大脑组织中为什么没有检测到 PrP^{Sc} ^{6, 9}。

25 朊病毒病发病的最后时期，包括一旦产生了 $C^{tm}PrP$ 就会导致神经变性疾病的机制。发生这种现象的机制以及与它相关的细胞内途径尚不完全了解。不过，似乎并不仅仅是因为 $C^{tm}PrP$ 发生了简单地错误折叠，在 ER 上保留或积累，或者引起非折叠蛋白反应。下面的发现支持这种看法，即基本上所有的 $C^{tm}PrP$ 都在 ER 外转运⁹，ER
30 是目前已知的在分泌途径上控制蛋白折叠质量的细胞器^{19, 20}。另外，通过接近生理水平的转基因表达可以诱发疾病，就像 Tg[SHaPrP (KH→II)_M] 动物或含有 A117V 突变的人 GSS 病例的情况一样。

因此，现有的资料表明了 $C^{tm}PrP$ 诱导神经变性是一种更具有选择性的方式。

披露于图 12 中的框架，建议了未来研究的若干新途径。首先，在 $C^{tm}PrP$ 生物合成和转运中的调控事件尚有待阐明。PrP 转运早期事件过程的重建以及在无细胞系统中拓扑结构的确定可以分离，这似乎是用于鉴定调控 $C^{tm}PrP$ 合成的反式作用因子的有希望的途径^{21, 22}。另外，影响拓扑结构的若干突变体的获得，有利于确定 $C^{tm}PrP$ 转运中的后期事件的研究。其次，通过研究 $C^{tm}PrP$ 代谢所获得的知识，将毫无疑问地帮助人们更好地了解这些过程是如何通过 PrP^{Sc} 积累以反式方式调节的。上述研究有可能更好地阐述 PrP^{Sc} 积累和 $C^{tm}PrP$ 介导的神经变性事件之间的关系。假设 PrP^{Sc} 积累会影响细胞的若干代谢功能^{23, 24, 25}，其中的一种或多种有可能影响 $C^{tm}PrP$ 产生，从而引起发病。在 PrP^{Sc} 积累以外的步骤直接导致 $C^{tm}PrP$ 介导的神经变性的 PrP 突变体的存在（参考文献 9 和图 8），有利于说明朊病毒病发病机理中的下游事件。

实施例 3

催乳素、 β 内酰胺酶和免疫球蛋白 G 重链信号序列对蛋白构象的影响

一般，普遍接受蛋白正确折叠和错误折叠这种对立的一分为二的观点（Ellgaard 等，1999，科学，286：1882-1888）。换句话说，没有考虑过这样的可能性，那就是蛋白有可能具有一种以上的正确折叠状态，并且，在不同的时间或不同的场合，可以选择某种而非另一种折叠状态。由于线性多肽序列以不同的方式折叠，会具有明显不同的形状、物理特性和生物学活性，这种新水平的调控会大大增加基因组的信息含量，和调控细胞基因表达的能力。为了检验这一假说，我们首先选择了三种不相关的、简单的分泌蛋白，那就是催乳素（Prl）、 β 内酰胺酶（ β lac）和免疫球蛋白 G 重链（IgG），以便确定每一种信号序列在转运其自身的过客序列通过 ER 膜方面（参见图 13）是否与不同新生链同样有效。

在三个独特的限制性内切酶识别位点的每一个位点上将上述 cDNA 的样品截断，这样，在转录时，截短的 cDNA 就会产生编码越

来越长的 C-末端延伸长度的所述分泌蛋白的 RNA 转录物，并最终在补充了微粒体膜的无细胞翻译系统中表达这些转录物。如图 14 所示，尽管事实是这三种信号序列在转运其自身的新生链方面是同样高效的，但还是对不同的新生链转运建立了根本不同的核糖体-膜结合，这是根据新生的、截短的链对蛋白酶 K 消化的接受程度确定的（参见图 14 中每一幅图片右侧的草图）。

当最初导向到 ER 膜时，所有三种链都能够接触蛋白酶（图 14A-C 的左侧图片）。之后不久，对于催乳素来说，随着新生链被直接转运到 ER 腔中，形成了紧密的密封（参见图 14A 的中间图片）。不过，对于 β 内酰胺酶和 IgG 重链来说，核糖体-膜结合在随后的相当长时间内都保持开放（参见图 14B 和 C 的中间图片），并且直到随后更晚时间它才有效关闭（图 14B 和 C 的右侧图片）。这表明不同的蛋白是通过明显不同的核糖体-膜结合转运到 ER 腔中。正如通过对朊病毒蛋白（PrP）生物发生进行研究所表明的，如果信号序列参与了蛋白折叠的调控，这可能部分是通过为新生链开始折叠建立不同的环境而实现的。当核糖体-膜结合保持开放时，正如图 14B 和 C 的中间图片所示，所述链在细胞质溶胶的还原性环境中开始折叠；当核糖体-膜结合关闭时，如图 14A 的中间图片和图 14B 和 14C 的右侧图片所示，未折叠的或部分折叠的链进入 ER 腔的氧化环境中，以便开始或继续折叠筒选择的过程。

正如在上面的朊病毒蛋白（PrP）的生物发生中所示（例 1），核糖体-膜结合的开放和关闭状态，与相对于 Ctm 形式的分泌形式的 PrP 合成相关，相同的多肽序列以不同的形式折叠，并且形成不同的跨膜拓扑结构形式。图 14 中的资料将核糖体-膜结合状态与蛋白折叠的这种相关性，扩展到了诸如催乳素和免疫球蛋白重链的简单的分泌蛋白。

如果信号序列在某种程度上通过它们所建立的核糖体-膜结合的性质在蛋白折叠中起着所假定的调控作用的话，交换两种不同的分泌蛋白的信号序列，将会以下面三种推测形式产生重大后果：

首先，交换信号序列将会改变新生链所存在的环境（例如，通过用蛋白酶 K 检测所确定的核糖体-膜结合的改变，或通过化学交联确定的与新生链结合的蛋白的改变），催乳素信号序列后面的催乳素新

生链和 IgG 信号序列后面的催乳素之间的化学交联差别的例子如图 15 所示。用 PrP 得出了基本上相同的结论。

其次，通过在不同环境中与不同的接触蛋白相互作用，而导向两种不同的折叠筒的两种蛋白的折叠可能是不同的。证实这种看法的一种途径是，对作为蛋白构象报道标记的糖基化位点进行工程操作，并证实同一种链在一种信号序列后面能被糖基化，但在另一种信号序列后面不会糖基化，尽管这两种信号序列最终都要从该蛋白上裂解掉。这一观点在图 16 中得到了验证，图 16 中示出了具有工程改造过的糖基化报道标记的催乳素，催乳素的前面是它本身的信号序列 (Prl) 或免疫球蛋白重链 (IgG-Prl)、生长激素 (GH/Prl) 的信号序列。从图 16A 中每一幅图的第 5 泳道可以看出，所得到的在不同的信号序列后的成熟催乳素链的构象不同，这种不同表现在寡糖基转移酶将核心 N-连接的糖添加到该新生链的能力方面。图 16B 对这种差异进行了定量测定。这种构建体的截短形式的表达，揭示了不同催乳素糖基化方面的差异不是一种动力学现象，因为延长时间孵育截短的、并因此是非生长的新生链不会导致任何进一步的糖基化。图 16C 表示，通过糖基化评估的这种构象差别，在分泌到用相应的编码不同信号序列后面的催乳素的构建体转染过的 cos 细胞的培养基中的材料上表现的很明显。因此，催乳素的构象只是通过在不同的信号序列后面合成而改变的。这种差别不能被已知的信号序列作用解释，因为，所利用的所有信号序列都具有对其天然底物 (参见图 13) 和由修饰过的催乳素编码区编码的底物相同的导向和转运能力。另外，通过质量控制器判断在图 16 中所合成的催乳素的所有构象都是正确折叠的，这是通过其向培养基中的分泌来评估的。

第三种推测是，在交换信号序列的某些场合下，信号序列和随后的过客之间的“错配”可能足够严重，以至于即使是完全导向的链，也不能找到与转运到 ER 腔中相匹配的折叠筒，并且，有可能“回落”到细胞质溶胶中，而不能转运。确切地讲，这种形式的缺陷是在一种 PrP 突变上发现的，这种突变型只能以分泌形式由完整的 ER 膜表达，它在去掉了糖蛋白的重建微粒体膜中的表达，导致这种链不能被转运 (Hegde 等, 1998, 分子细胞, 2: 85-91)。

在图 13 中，我们证实了位于 β lac 和 IgG 信号序列后面的催乳素

表现出明显的转移缺陷 (图 13A), 这一缺陷可以通过导入来自信号序列之后的 IgG 区域的序列而得到弥补 (图 13B 和 13C)。另外, 通过将 PrP 的信号序列换成催乳素的信号序列, 可以纠正突变 PrP 通过去掉了糖蛋白的重建膜的转运缺陷 (资料未发表), 这表明该缺陷不是所述膜所固有的, 也不是所述链所固有的, 相反, 它体现了特殊信号序列-链组合的不兼容性, 这与所假设的信号序列在折叠筒选择中的作用相吻合。

实施例 4

从以上说明中可以看出, 信号序列可以决定蛋白的最终折叠状态, 正如在某些而非其他信号序列后面的蛋白上进行工程操作产生糖基化位点的可行性所证实的。由于生长的链根据核糖体-膜结合以及新生链和转运器之间的蛋白-蛋白相互作用的性质向不同的折叠筒形式发展, 获得了不同的构象。由于这种构象的差别, 即使是在链生长期间, 蛋白的不同折叠形式对修饰酶在接受能力也不同。因此, 工程产生的糖基化位点, 作为蛋白构象被糖基化的报道标记, 当出现在一种信号序列后面时可以被糖基化, 但出现在另一种信号序列后面时不能被糖基化。另外, 在极端情况下, 核糖体-膜结合的性质使得明显的链折叠开始于转运之前, 必需出现真实链的额外信息, 以便关闭核糖体-膜结合。没有这样的额外信息, 所述链就不能转运, 正如由 IgG 信号序列后面的催乳素所证实的。

因此, 模式分泌蛋白再现了以前用朊病毒蛋白 (例 1) 所得到的发现, 表明上述结果并不是特殊情况。实际上, 对朊病毒蛋白来说, 看上去特殊的并非是其生物发生和折叠途径, 而是表现出拓扑结构差异的不同折叠途径, 这使得它们更难于检测。

实施例 5

通过反式作用因子调控蛋白折叠

正如在上面的例 1 中所证实的, 在传染性朊病毒病的 PrP^{Sc} 增加过程之后, 紧接着是 CtmPrP 产量的增加。因此, PrP^{Sc} 的积累似乎以反式方式调节与 CtmPrP 产生或代谢相关的事件。当其 C-末端结构域转运到 ER 腔中的 CtmPrP 超量表达时, 会启动自发性神经变性

(Hegde, 科学, 1998, 279: 827-834)。正如在例 2 中所证实的, $C^{tm}PrP$ 似乎是在临床症状出现之前诱导的, 这表明它能启动通向神经变性的最终的共同途径。一种 ER 膜的尚不了解的糖蛋白被认为是转运辅助因子 (TrAF), 它能够通过将新生的 PrP 链导向通向 ^{sec}PrP 的途径“保护”正常脑使其不表达 $C^{tm}PrP$ (Hegde, 分子细胞, 1998, 2: 85-89)。

新生 PrP 链在不同拓扑形式之间的分布机制是复杂的 (Rutkowski, 已提交)。PrP 信号序列本身可能通过建立至少两个新生链群体来起作用: 某一些具有开放的核糖体-膜结合; 另一些具有关闭的核糖体-膜结合。因此, 信号序列可以决定所出现的 PrP 的 N-末端结构域所要面对的环境。只有接触细胞质溶胶环境的链才有可能成为 $C^{tm}PrP$ 。尽管必要, 但开放的核糖体-膜结合不足于产生 $C^{tm}PrP$, 因为有其它的蛋白-蛋白相互作用决定最终的结果。阻止跨膜结构域指导 $C^{tm}PrP$ 形成的突变导致这些链被重新导向细胞质溶胶, 在这里它们很有可能被降解。

^{sec}PrP 和 $C^{tm}PrP$ 之间的区别通常是以拓扑结构为基础作出的。不过, 具有相同序列的这两种多肽的构象也不相同, 这种差别是通过在非变性洗涤剂溶液中, 用有限的蛋白酶消化时它们的敏感性不同而确定的。因此, 转运调控似乎是一种产生在构象和功能方面的不同的多种形式的 PrP 的方式。指导新生 PrP 链产生 ^{sec}PrP 而不是 $C^{tm}PrP$ 的细胞器 (即 TrAF) 本身可以被调控, 基于羊瘙痒症感染增加脑中可检测的 $C^{tm}PrP$ 的量的能力。总之, 这些发现导致了一种新的原则: 蛋白的构象不仅是由它本身的一级氨基酸结构决定的, 而且还由诸如 TrAF 的蛋白决定, 它能影响两种或两种以上不同功能构象结果中的哪一种实际会出现或占主导地位。

因此, 复杂的分泌或膜内在蛋白可能具有很多潜在的功能折叠状态。这些不同的折叠状态表现为在一系列可能的环境中 (例如, 细胞质溶胶、膜、ER 腔), 在新生链内的配体和易位子上的受体之间有组合系列的相互作用。各种构象的产生与降解速度的对比, 决定着在任何特定时间, 特定的底物会表达哪一种以及表达多少可能的最终结果。这些过程通过来自细胞表面和其它地方的信号途径整合, 它们根据特殊的及时需要 (Chapman, Annu Rev Cell and Dev Biol, 1998,

14: 459-485) 和细胞的总体程序来协调蛋白的生物发生 (Bonafacio, 自然, 1990, 334: 247-251)。

这一观点需要分泌和膜内在新生链向一种以上折叠筒发展 (或在一个复杂的折叠筒内采用不同的途径得到不同的结果)。这一目的是通过新生链上分离的序列与 TrAFs 或 TrAts 可以接触的环境相互作用而实现的。不同的 TrAFs 位于不同的区室 (细胞质溶胶、膜、ER 腔), 它能对不同的链或特定链的不同类型的折叠状态起作用, 并且, 还起着从不同的功能性折叠形式中选择一种的作用。这可以被认为是蛋白折叠的“三级”复杂性。它与分子伴侣蛋白概念的不同在于, 每一种可能的结构结果都是有功能的——只是在功能或调控的某些方面有差别。因此, 分泌和膜内在蛋白可能以多种构象形式存在, 每一种形式具有独特的功能特征。

最后, 决定在可能的不同折叠筒之间进行选择的易位子及其包括 TrAFs 在内的组成成分本身, 可以通过细胞内信号进行调控, 这构成了蛋白折叠的“四级”复杂性。图 18 归纳了转运调控的工作模式, 并将其与蛋白折叠的四个等级相联系。

为了研究反式转运调控, 我们开发了分离的和重建的系统, 其中, 对细胞质溶胶或膜进行操作的结果是, 可以改变 PrP 的构象组合, 由于 PrP 得到的结果 (Rutkowski 和 Lingappa) 可以在用其它不相关的蛋白进行的研究中得到再现 (Rutkowski 和 Lingappa; Lingappa, Buhman 和 Farese), 显然可以对该系统进行操作, 以便实现检测并研究任何含有信号序列的感兴趣的基因产物的构象异构体的目的。

25 结果

以前, 影响转运和构象的反式作用影响的证据一直是相对间接的 (Hegde 等, 1998, 分子细胞 2: 85-91; Hegde, 1999, 自然, 402: 822-826)。现在, 我们发现了可以更直接地支持这一观点的两条新证据线索。首先, 我们发现用分化之前和之后的小鼠红白血病 (MEL) 细胞制备的细胞质提取物能够影响 PrP 的转运, 使构象形式偏向 Sec-PrP (参见图 19)。其次, 当用处在出生后早期发育阶段的不同时间的仓鼠脑制备微粒体膜时, 发现 TrAF 活性不同, 从胚胎脑第 13 天最

高，到出生后 14 天最低，这种波动方式与以下假说吻合：抑制 Ctm-PrP 的 TrAF 活性在特定的大脑部位降低，以便促进 Ctm-PrP，并且，作为啮齿类动物早期脑发育程序的一部分启动神经元程序死亡（参见图 20）。

5 基于上述结果，我们决定以适合与来自其它来源的反式作用因子补充的方式，分级分离兔网织红细胞裂解物。我们发现核糖体沉淀和 DEAE 洗脱物级份的组合，足以恢复完整的翻译活性（参见图 21-23）。分级分离方法在上面已经描述。

类似地，我们对以前公开的方法（Gorlich 和 Rapoport, 1994, 10 细胞, 75: 615-630; Hegde 等, 1998, 分子细胞 2: 85-91）进行了改进，以便制备分离的和重建的蛋白脂质体，它在功能上与以前的试剂相同，但它所具有的优点是成本低、速度快和可以进行进一步的分离。在上文介绍了该方法。

从以上结果可以看出，本发明提供了新颖平台和范例用于检测、15 扩大、理解和操纵转运系统在生理学过程中的参与，以及任何分泌和膜内在蛋白或其它具有用于通过 ER 膜转运的信号序列的蛋白的不同构象异构体对宿主生理学的影响。由于可以操纵蛋白的折叠，不同的构象异构体可以产生不同的生理学结果，可以获得研究构象异构体对细胞途径的作用，鉴定与不同构象异构体形成相关的试剂，处理由特定构象产生的不利结果，以及理解由不同构象异构体形成所导致的细胞过程的机会。可以开发出新的药物，并可以从不同于目前所采用的观点的角度来考虑疾病。

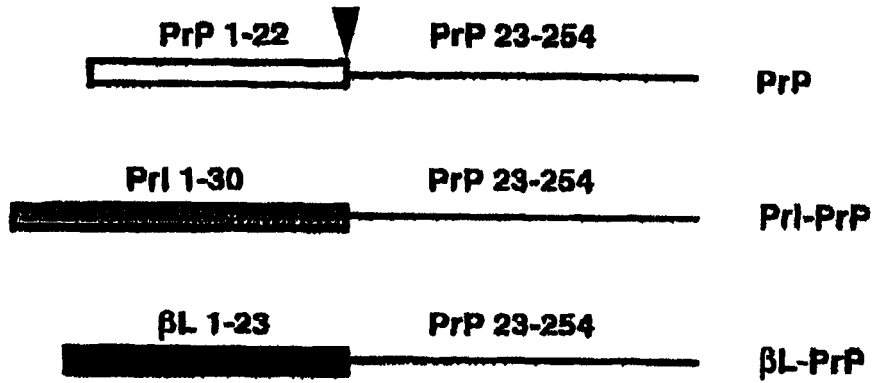
上述结果还表明，用具有不同遗传组成的不同的物种制备的微粒体膜，提供了用于正常表达微量构象异构体的有效工具。在这种情况下，25 海胆微粒体膜被证实是一种高效转运的成分，但它只能产生 PrP 的一种构象异构体 Ctm-PrP，这种形式在有哺乳动物微粒体膜的情况下通常是微量成分。与生物化学方法相比，该方法的潜在优势是，该方法不大容易使不稳定成分失活，并且，可以根据不同膜中不同的部分活性的存在区分多种成分。另外，用原始生物的组织制备膜更合算，30 至少对于初步筛选来说是这样，而用更昂贵的生物化学纯度的试剂证实阳性结果。

所提供的用于制备分离的和重建的蛋白脂质体的新方法，利用了

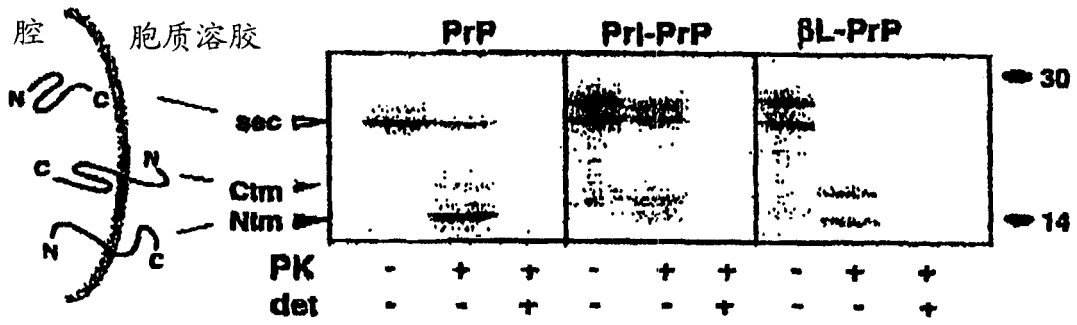
与离子交换层析兼容的相对廉价的洗涤剂，可以进一步分离在去掉了 ConA 的重建中初步鉴定的活性，以及其初步鉴定需要进一步分离 ConA 流通物的活性。本发明所提供的方法的另一个新的优点是，它使得在投入大的精力之前，对新的 TrAFs 的初步筛选比较节省劳动力。在以下可能的情况下，这一点是尤其重要的：某些 TrAF 活性可能包括一种以上成分，并且在某些场合下，一种成分的过量可以部分弥补另一种成分的缺乏。

尽管为了便于理解业已通过说明和举例方式对上述发明的某些细节进行了说明，但很显然，在所附权利要求书的范围内，可以对它进行某些改变和改进。本文所引用的所有文献都被收作本文的参考，就如同被全文收录一样。

A



B



C

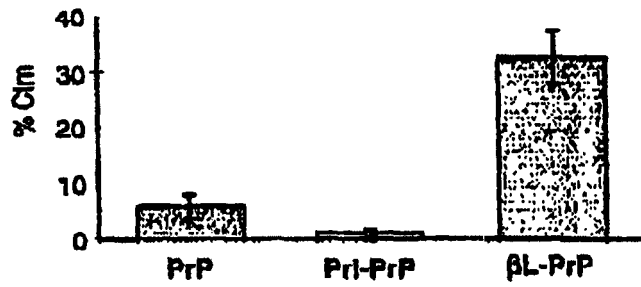


图 1

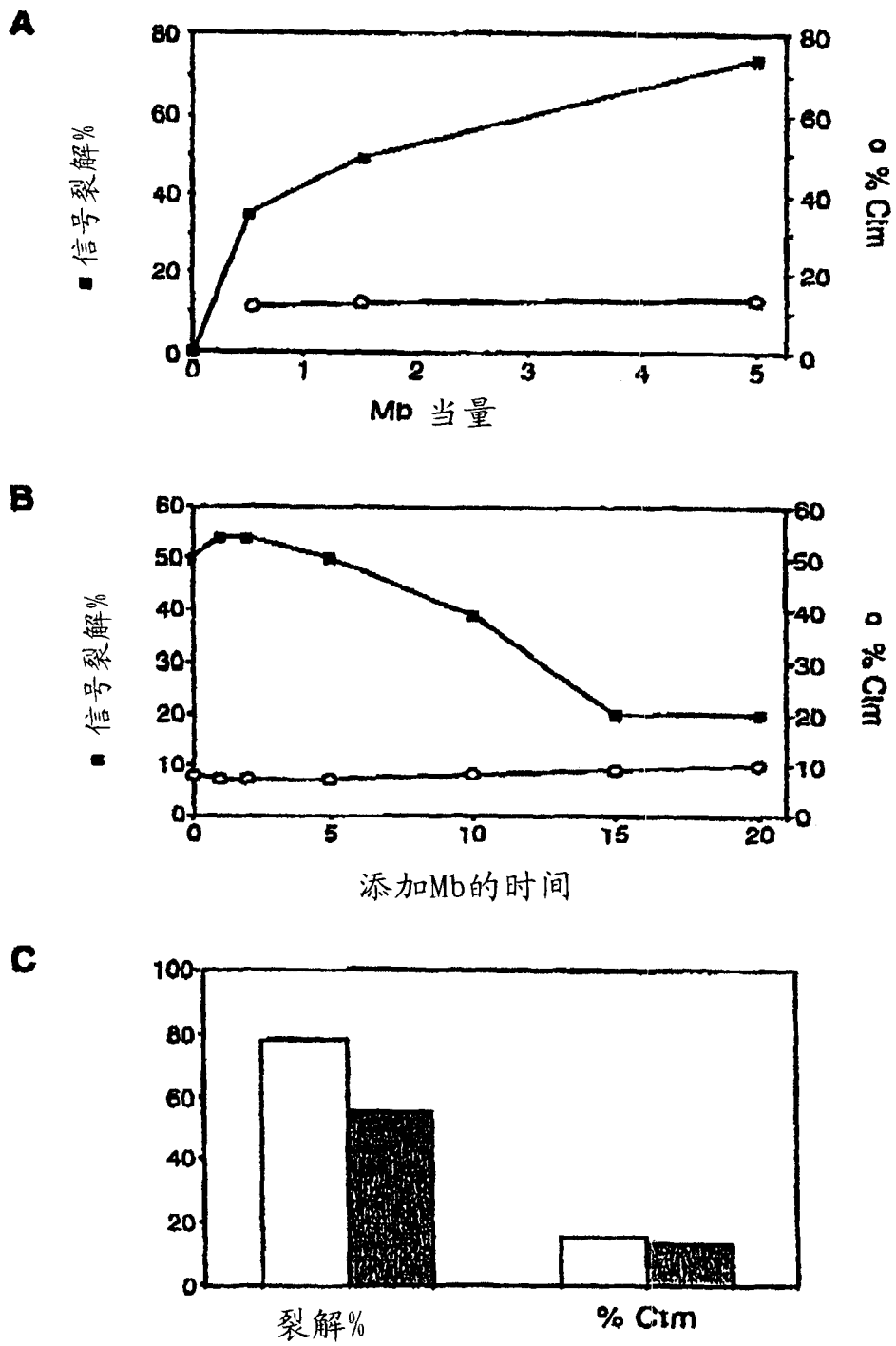


图 2

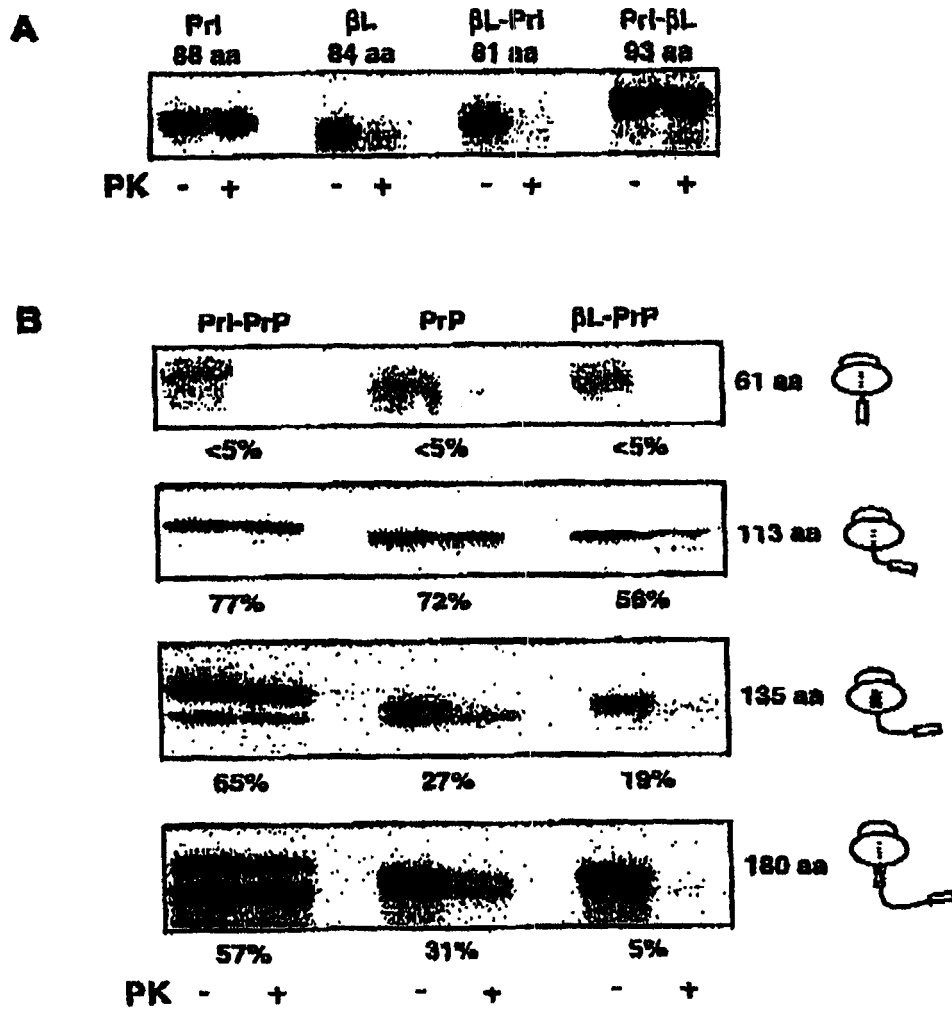


图 3

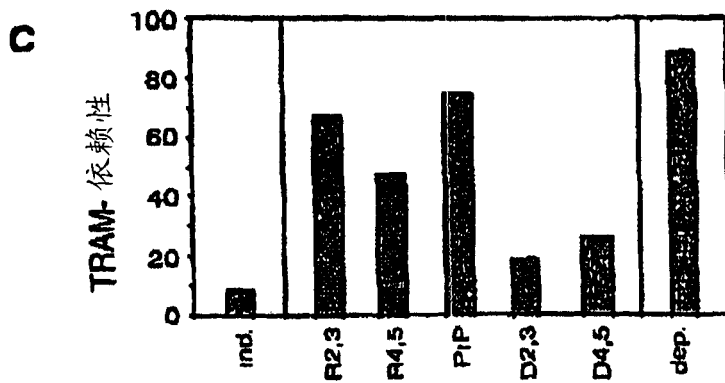
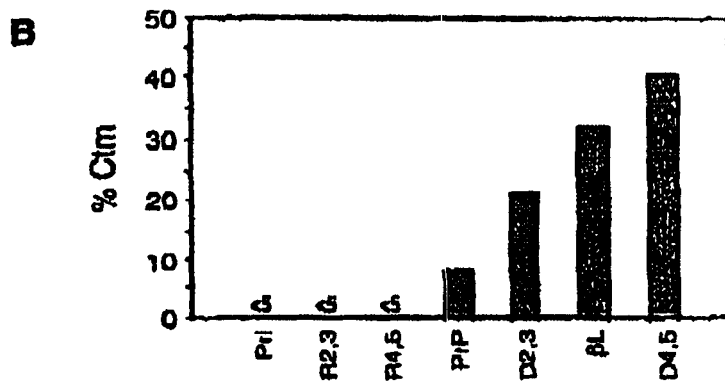
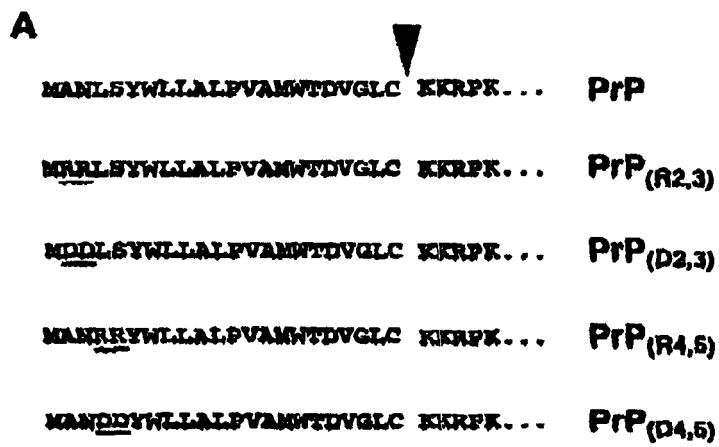


图 4

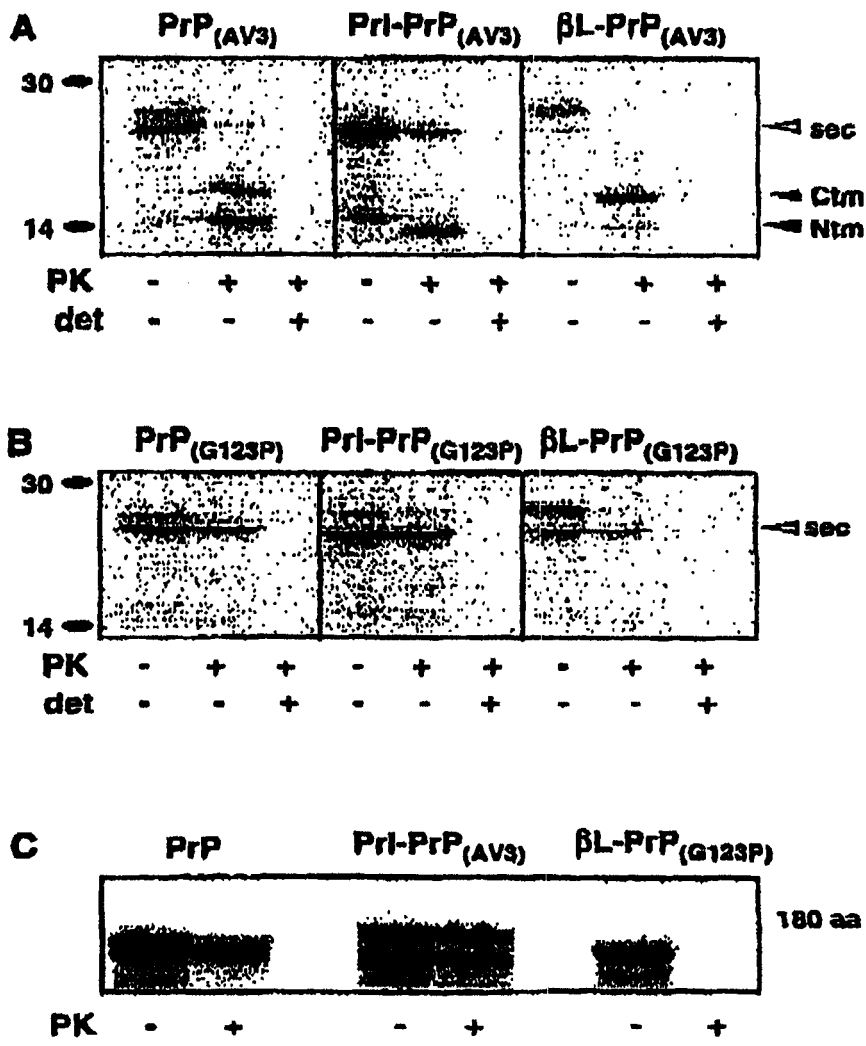


图 5

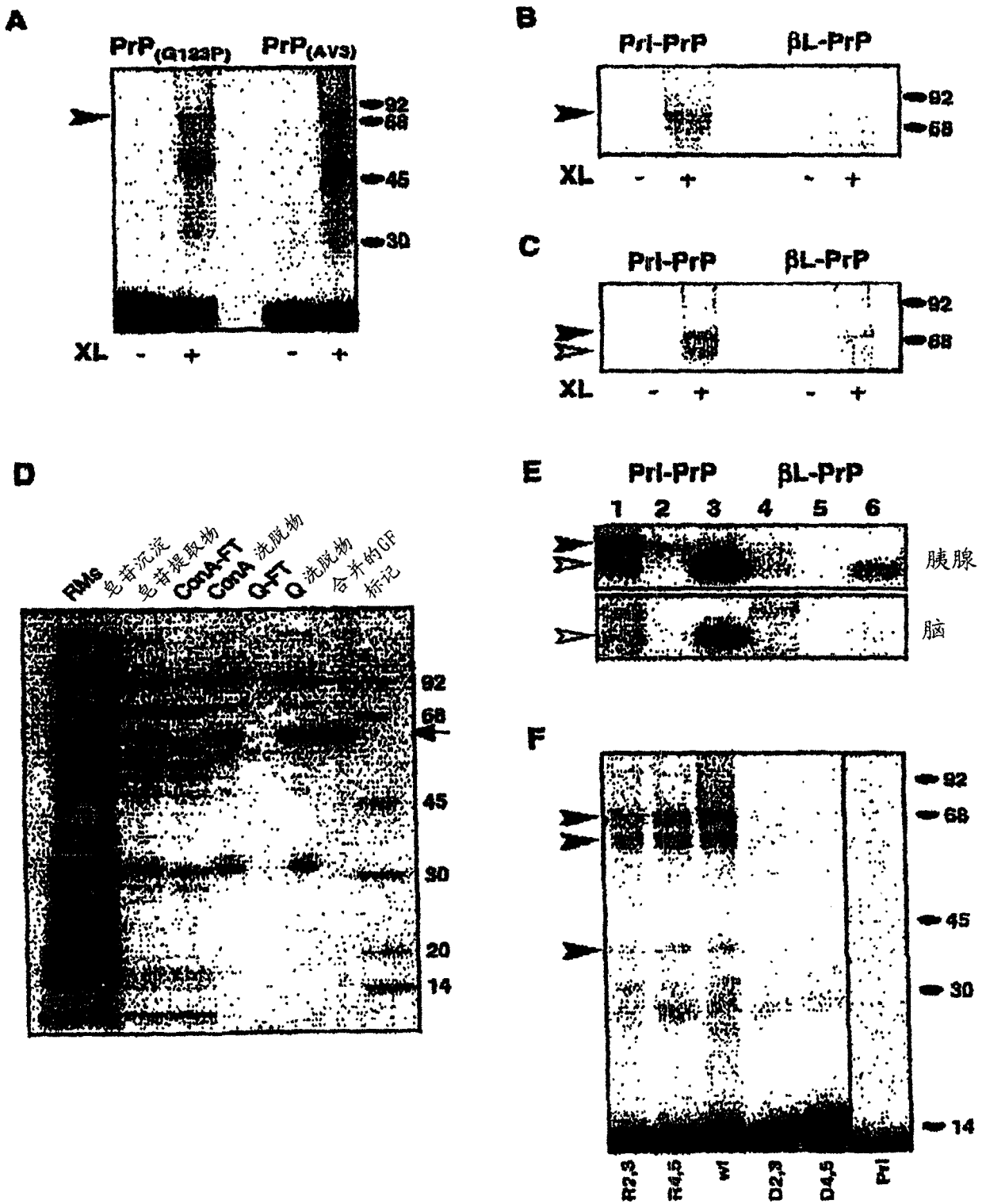


图 6

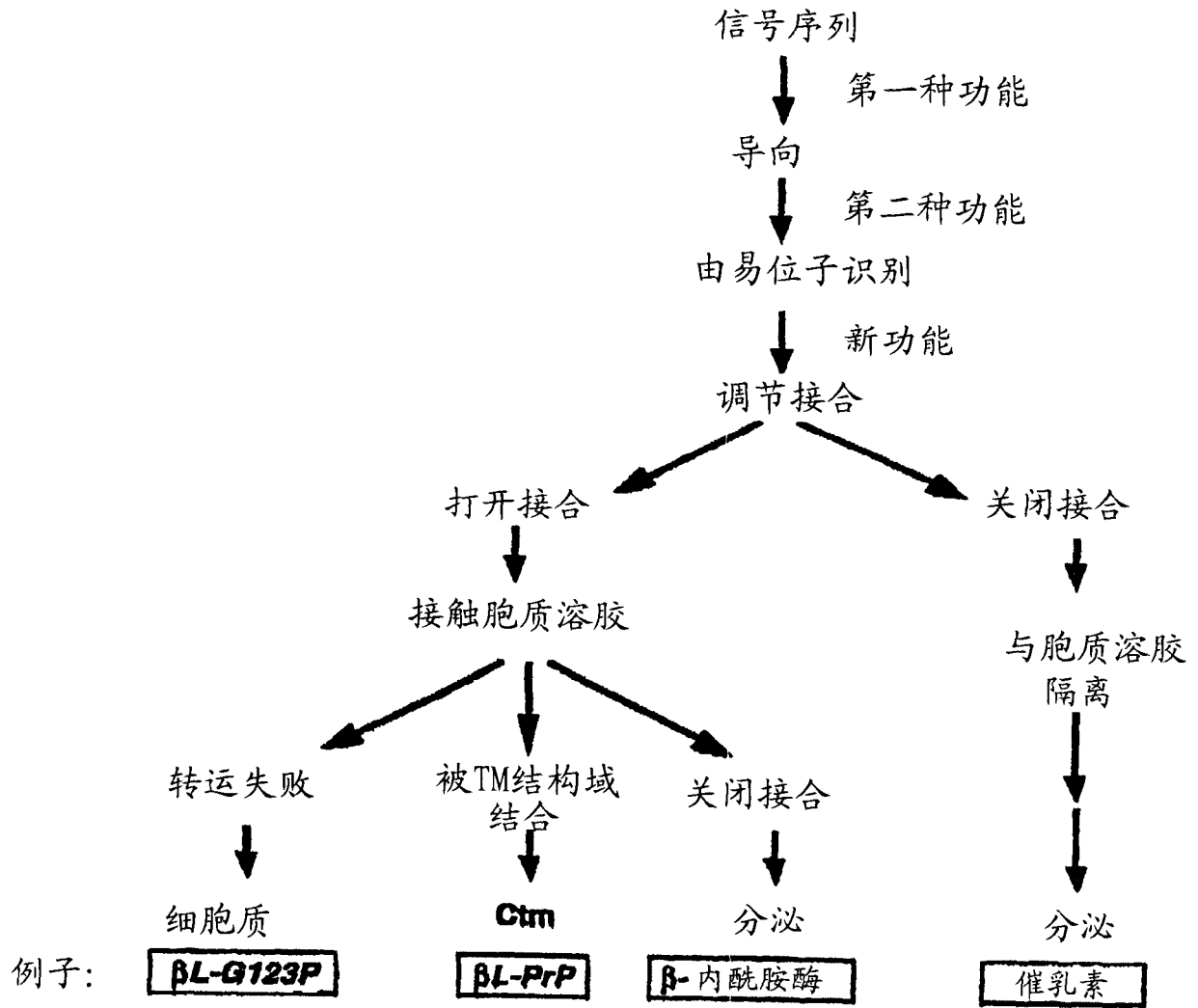


图 7

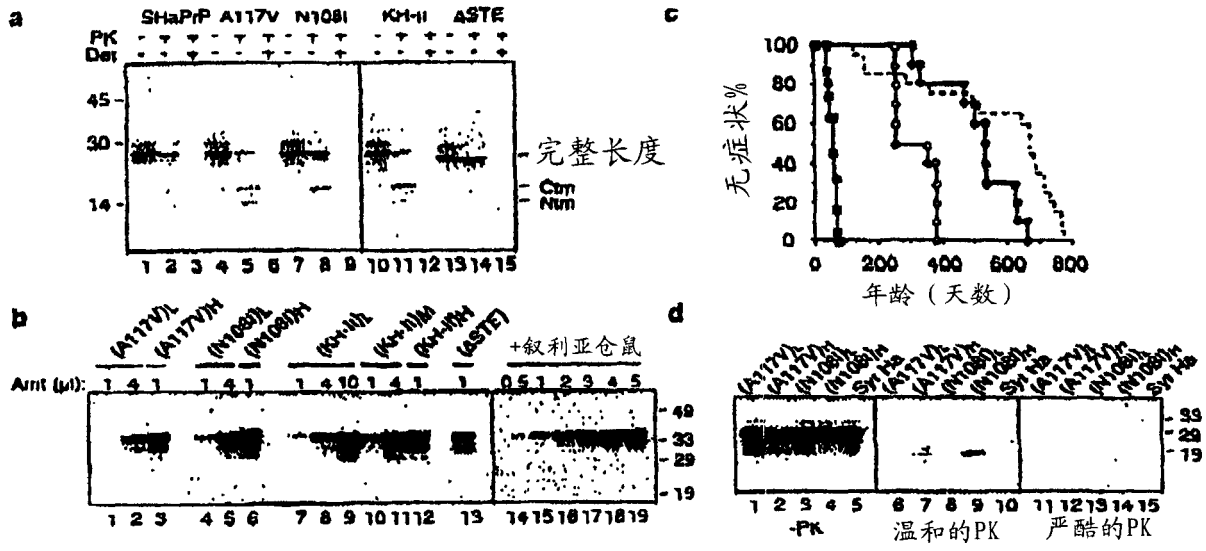


图 8

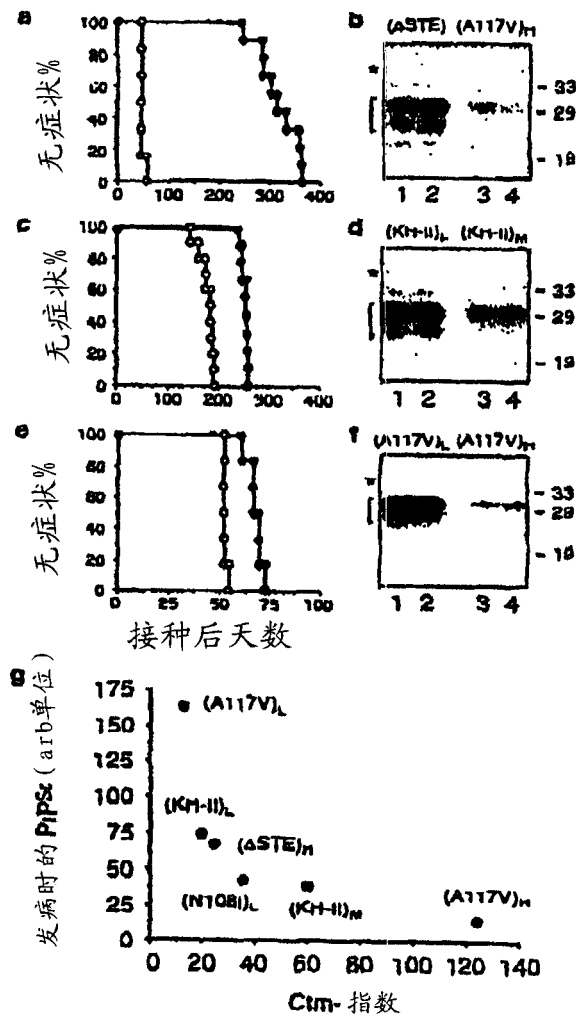


图 9

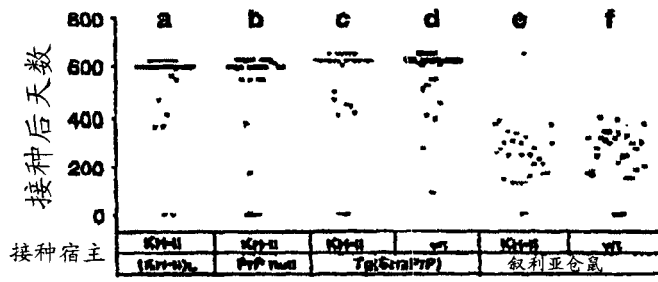


图 10

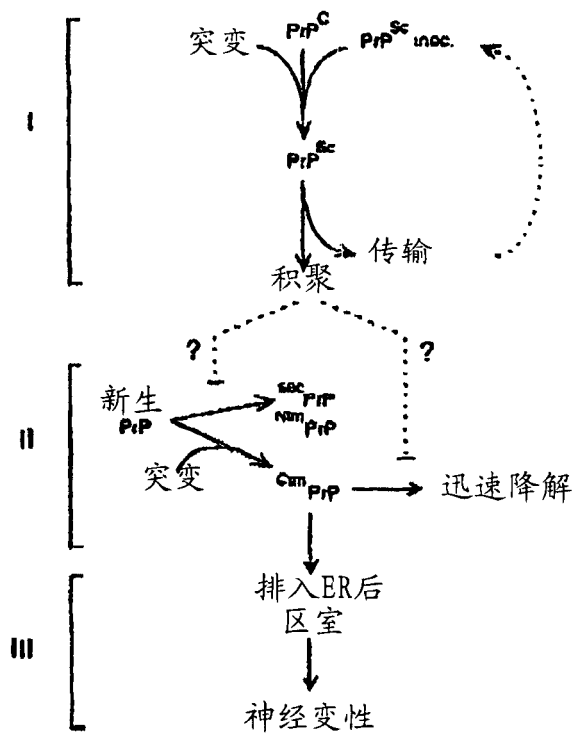


图 12

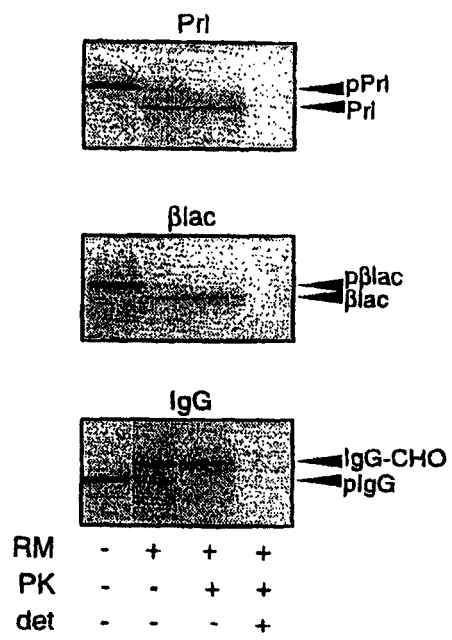


图 13

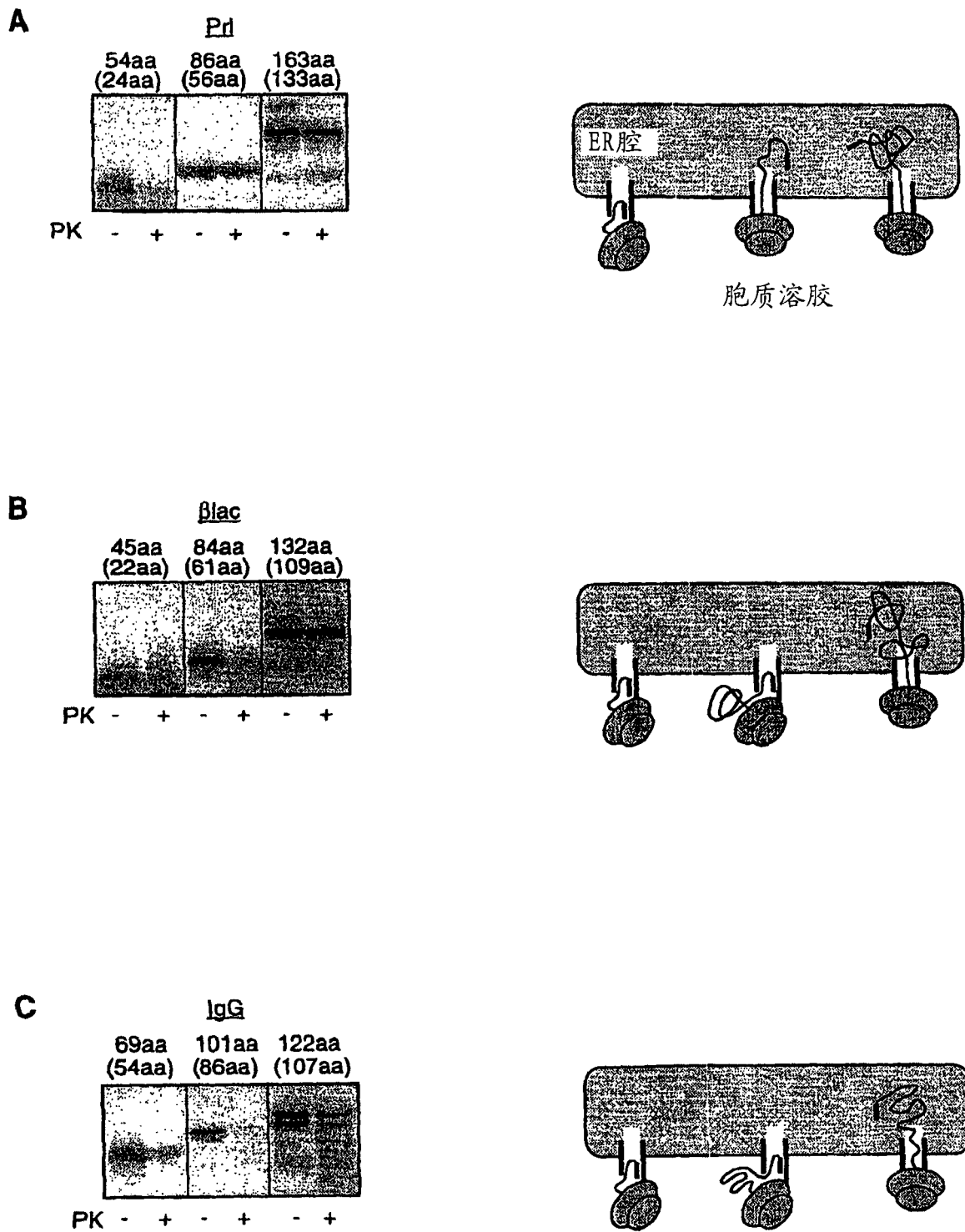


图 14

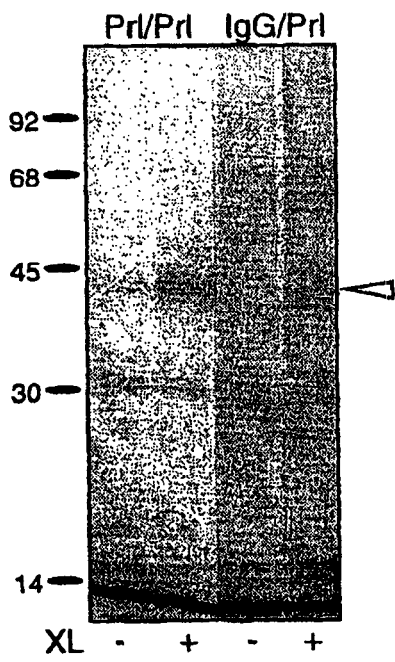
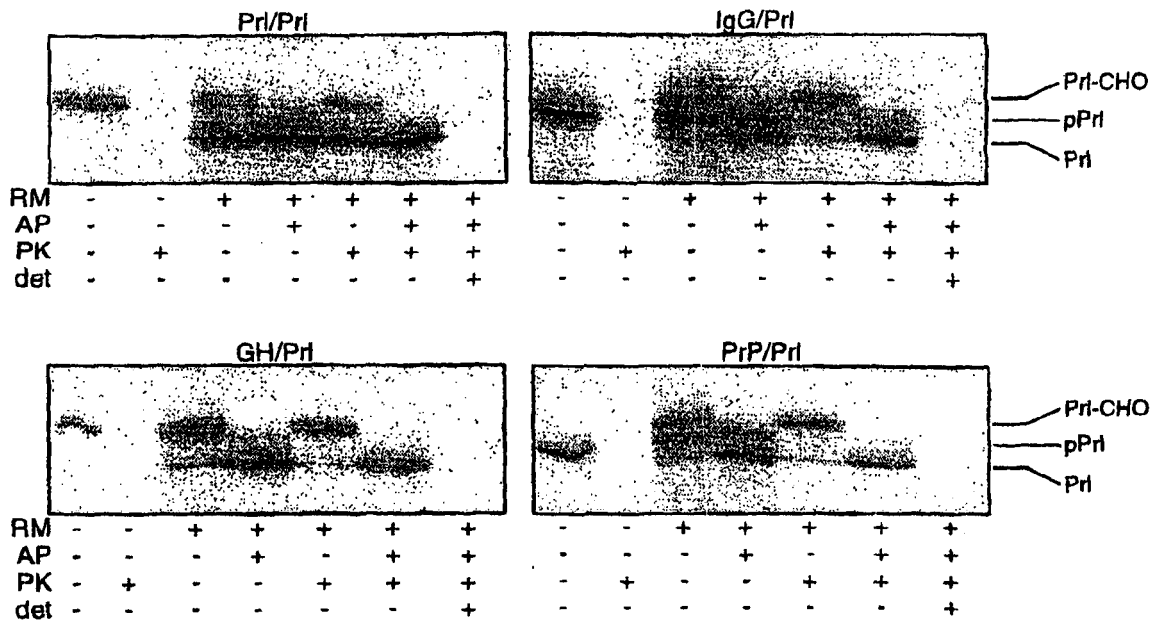
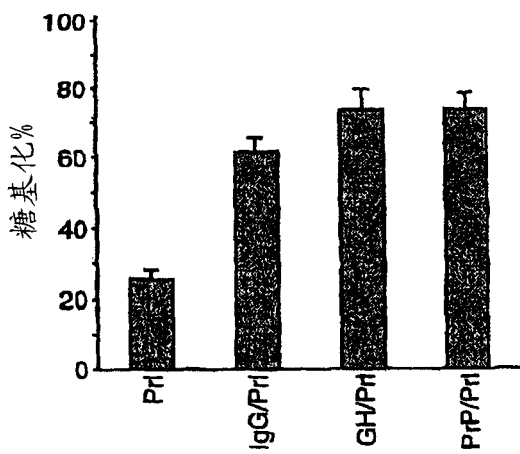


图 15

A



B



C

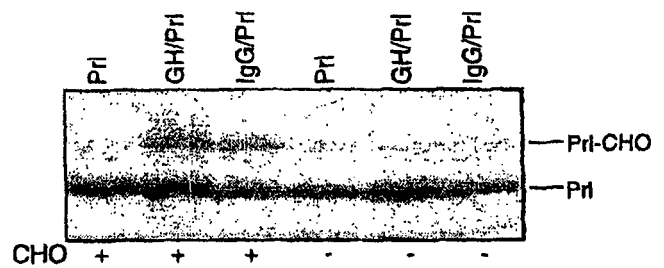


图 16

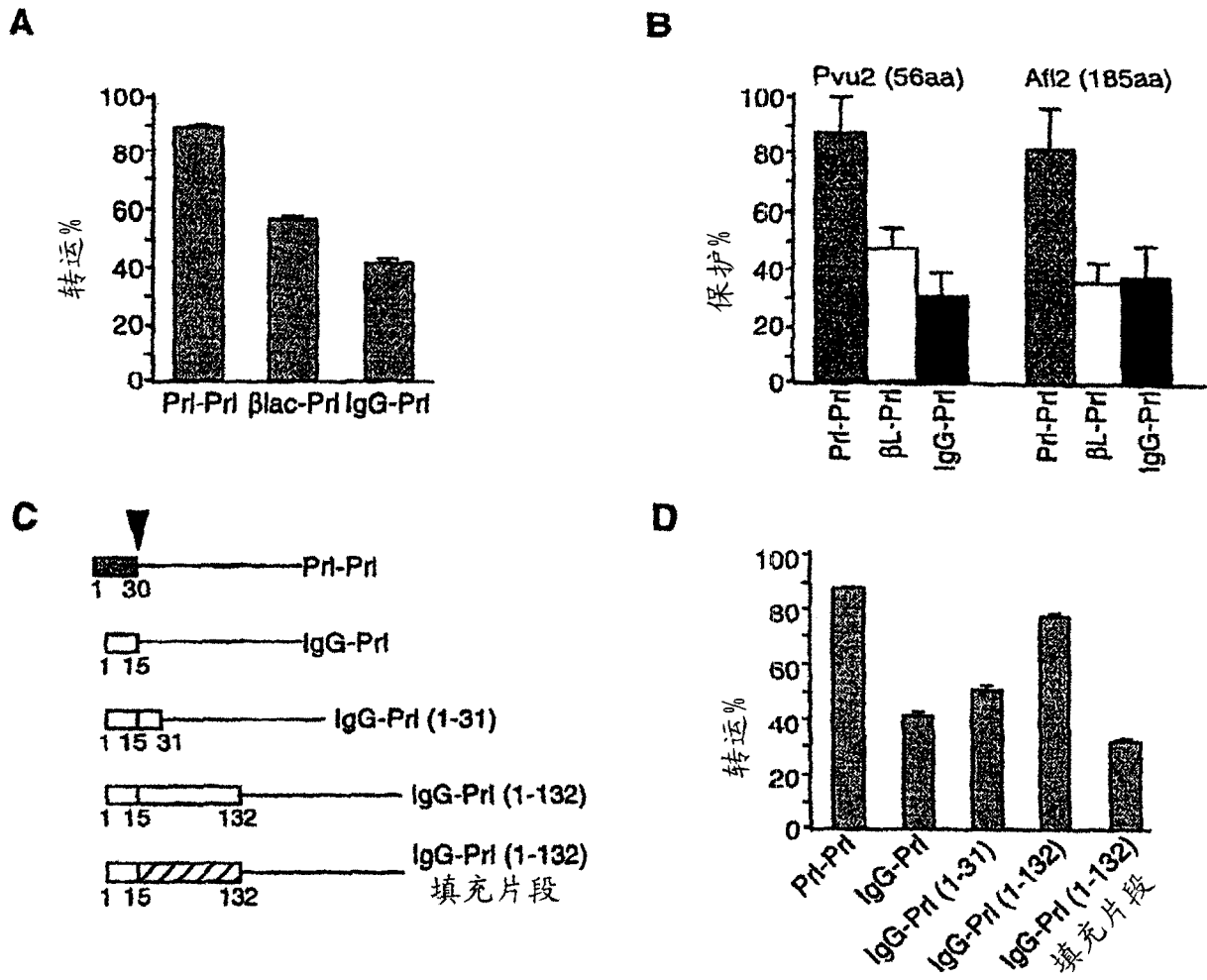


图 17

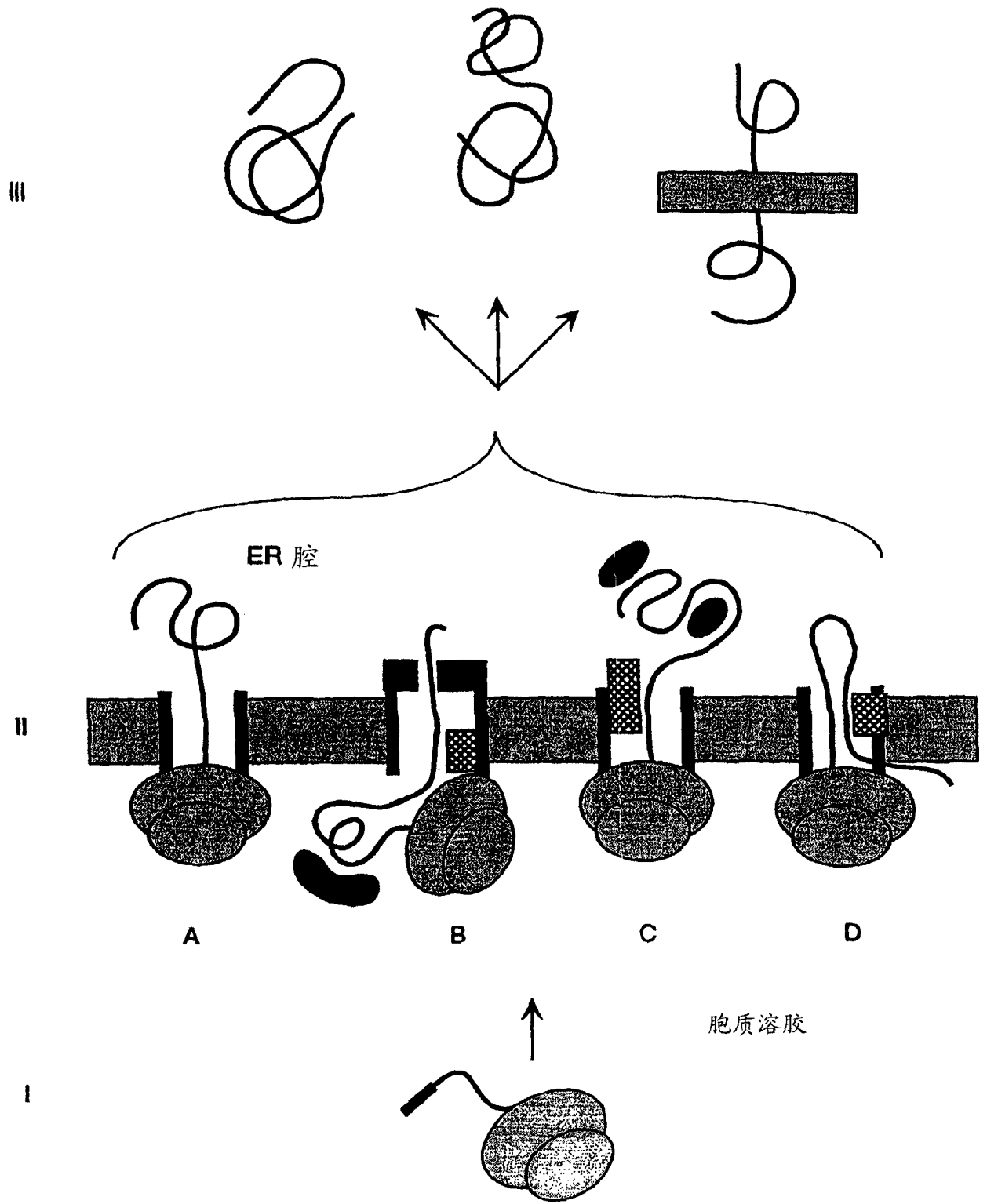


图 18

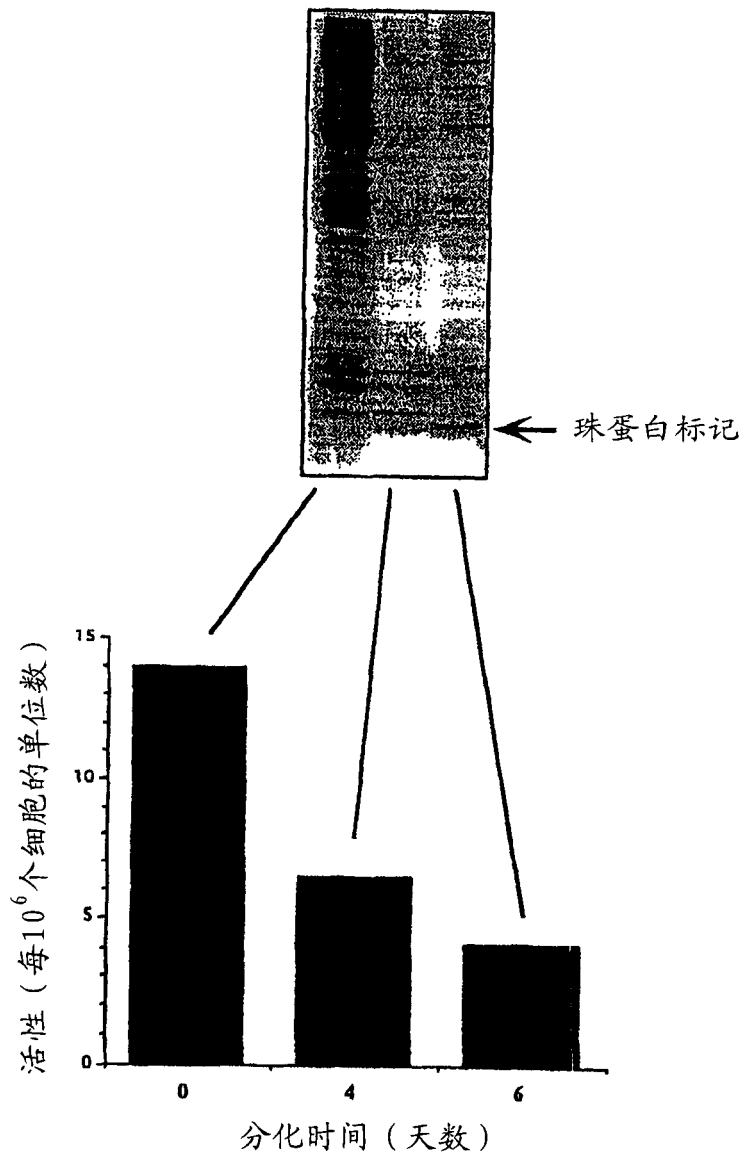


图 19

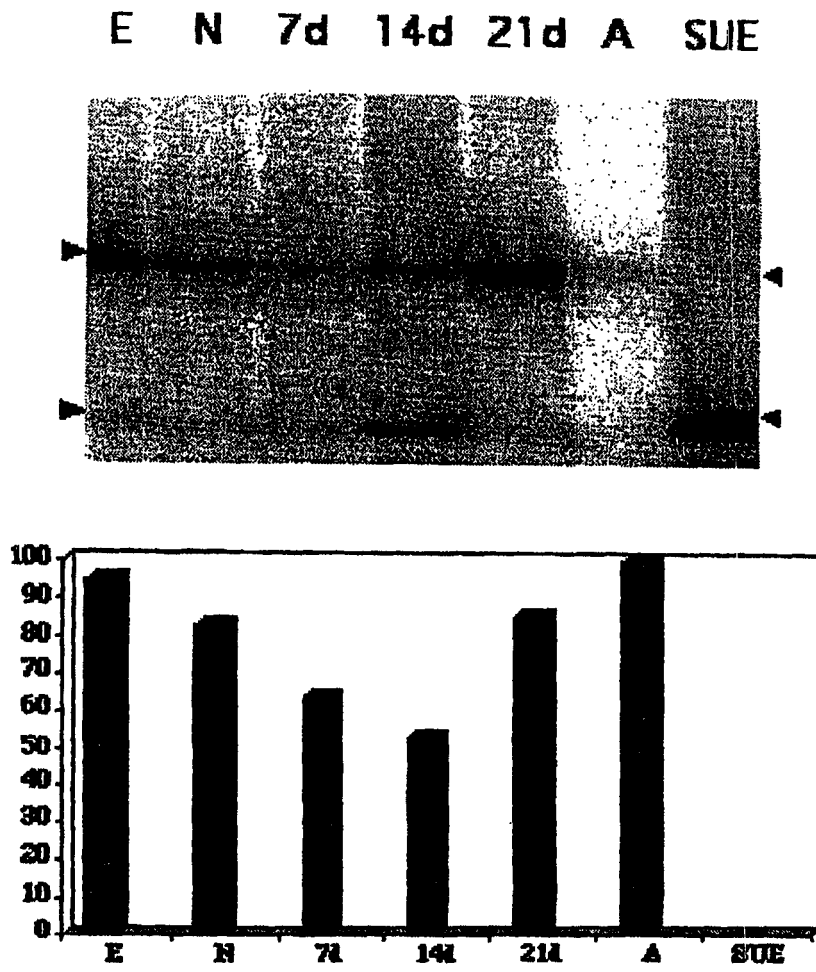


图 20

专利名称(译)	构象和拓扑学蛋白调控		
公开(公告)号	CN1434923A	公开(公告)日	2003-08-06
申请号	CN00819028.3	申请日	2000-12-15
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	加州大学评议会		
当前申请(专利权)人(译)	加州大学评议会		
[标]发明人	VR林加帕 TD鲁特科夫斯基 RS赫奇		
发明人	V· R· 林加帕 T· D· 鲁特科夫斯基 R· S· 赫奇		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/00 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/62 C12N15/63 C12Q1/02 G01N30/88 G01N33/68 C07K16/18 C12N15/00 C12N5/00		
CPC分类号	C07K2319/02 G01N33/5088 A01K2227/105 C07K14/47 G01N33/5008 A01K2217/05 G01N33/6878 C07K2319/04 G01N33/6845 A01K2267/0343 C07K2319/61 C07K2319/75 G01N33/5076 G01N33/5047 G01N33/6896 C12N15/625 G01N33/502 A01K2267/0356 C12N15/8509 C07K2319/033 C12N15/635 G01N33/6842 A61K39/00 A01K67/0275 G01N33/68		
代理人(译)	姜建成		
优先权	60/172350 1999-12-16 US 60/171012 1999-12-15 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供了用于鉴定未知的、作为不同构象异构体存在的、蛋白的新型构象异构体的方法和组合物。通过利用嵌合基因，用不同的信号序列取代天然信号序列导致产生一种构象异构体，就可以对天然蛋白和该嵌合基因的产物进行比较。如果构象不同，可以将不同的蛋白用于生产抗体，解释与天然和不同构象异构体蛋白相关的机理，分析不同构象异构体在生理学样品中的存在，鉴定与该构象异构体特异性结合的化合物，特别是药物等。如果所述构象异构体的形成与疾病状态相关，该构象异构体就可用于筛选，以便鉴定作为药物候选物的化合物。

