

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510026282.3

[51] Int. Cl.

C12Q 1/25 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/43 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 12 月 6 日

[11] 公开号 CN 1873018A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

[22] 申请日 2005.5.30

[21] 申请号 200510026282.3

[71] 申请人 上海睿星基因技术有限公司

地址 201203 上海市浦东张江松涛路 647 弄 1
幢 5-6 号

共同申请人 北京诺赛基因组研究中心有限公司
中国医学科学院基础医学研究所

[72] 发明人 罗 楹 王 勇

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 陶家蓉

权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图 7 页

[54] 发明名称

新药物靶点基因 CK1 α

[57] 摘要

公开了 CK1 α 的拮抗剂在治疗疾病中的用途以及用 CK1 α 筛选可能的治疗药物的用途。

- 1.一种筛选 NF- κ B 通道受体的方法，其特征在于，该方法包括：
 - a)使 CK1 α 和可能的受体在细胞中接触；
 - b)测定 NK- κ B 表达的上调。
2. CK1 α 蛋白拮抗剂在制备下调 NF- κ B 的药物中的用途。
- 3.如权利要求 2 所述的用途，其特征在于，所述药物用于治疗 TNF α 异常引起的炎症性疾病。
- 4.如权利要求 3 所述的用途，其特征在于，所述炎症性疾病选自败血症、休克、糖尿病、移植排斥、多发性硬化、类风湿性关节炎和免疫性肠病。
- 5.如权利要求 2 所述的用途，其特征在于，所述 CK1 α 蛋白拮抗剂是 CK1 α 蛋白的 46 位赖氨酸突变为丙氨酸的突变体。
- 6.如权利要求 2 所述的用途，其特征在于，所述 CK1 α 拮抗剂作用与 CK1 α 竞争 RIP 受体位点。
7. CK1 α 蛋白拮抗剂在制备抑制 p53 基因的药物中的用途。
- 8.如权利要求 7 所述的用途，其特征在于，所述 CK1 α 蛋白拮抗剂是 CK1 α 蛋白的 46 位赖氨酸突变为丙氨酸的突变体。

新药物靶点基因 CK1 α

技术领域

本发明涉及生物药物领域，特别是涉及 CK1 α 的拮抗剂在治疗疾病中的用途以及用 CK1 α 筛选可能的治疗药物的用途。

背景技术

“高质量”的药物靶点基因(简称药靶)是新药开发的源头。人类基因组计划的完成虽然为人类带来了治疗疾病的令人向往的前景，但除大分子蛋白药外，基因产物本身并不一定是药靶。从基因到新药，这一链条仍然缺少许多必不可少的环节。其中，基因功能研究，因其可以在分子层面上揭示人类健康和疾病的奥秘，寻找出最重要的致病基因，而成为确定基因产物能否成为药靶的关键步骤。

国外大型制药厂已发现，单靠基因序列数据和生物信息分析虽然能够找到大量潜在药物靶点基因，但这类基因只能被归类为“低质量”药靶。药物开发人员面对数目巨大的低质量药靶变得无所适从，迫切需要大量的基因功能研究加以验证，才能筛选出新药开发可以依赖的“高质量”靶点。所以，功能基因组学研究蕴藏着巨大的应用价值和商业前景。

在目前可以作为靶点的 5,000 个基因中，磷酸激酶(kinase)的序列有很大的保守性(conservativity)，是公认的药物筛选基因靶点，与磷酸酶(phosphatase)、蛋白酶(protease)以及各类受体统称为一类靶点。磷酸激酶(kinase)将 ATP 或 GTP 位的磷酸基转移到底物蛋白质氨基酸残基上，催化蛋白质磷酸化，蛋白质的磷酸化和去磷酸化是蛋白质调节其功能/活性的一种重要方式。如 MAPK 和转录因子 CREB, Jun 等，在磷酸化状态时具有活性，而在非磷酸化状态时没有活性；而抑制因子 I κ B 等则相反，在磷酸化状态时被降解而失去活性，而在非磷酸化状态时具有活性。蛋白质的磷酸化-去磷酸化是细胞信号转导过程中的重要环节。细胞信号转导是指细胞通过位于胞膜或胞内的受体，感受细胞外信息分子的刺激，经复杂的细胞内信号转导系统的转换，发挥生物学效应，进而几乎调节着生命活动的所有过程，包括细胞的增殖、发育和分化，神经活动，肌肉收缩，新陈代谢，肿瘤发生等。人类很多疾病都与信号转导通路密切相关，如在肿瘤坏死因子(TNF)导致的炎症(inflammation)反应中，肿瘤坏死因子通过结合受体激活一系列蛋白磷酸激酶之间

的相互作用，最终激活 NF- κ B 而引起炎症反应。生物化学家以及不少公司都在通过研究蛋白之间的相互作用来揭示信号传递通路的关键部位，并开发影响信号传递的药物，以达到治疗疾病的目的。信号转导过程的顺利进行有赖于多种蛋白底物的磷酸化，包括酪氨酸磷酸化、苏氨酸残基磷酸化及丝氨酸残基磷酸化，而这个过程正是由磷酸激酶催化完成的。

鉴于信号转导通路在细胞增殖、分化和多种疾病发生过程中的重要、甚至决定性的作用，以及磷酸激酶在信号转导通路极其重要的地位，设计和开发以磷酸激酶为靶点的新药，通过调节、控制信号转导通路治疗疾病，无疑是一种针对性强、高效的理想途径，具有治疗多种疾病的潜在前景。目前针对激酶的药物包括 PKC 活性调节剂、PKA 抑制剂、PTK 抑制剂和受体介导的钙通道调节剂等，其中部分已经进入临床试验。但现有的激酶药物靶点尚远远不能满足人类战胜疾病、攻克肿瘤的需求，我们仍需更特异、更有效的新的激酶作为药靶，从而有效拓宽治疗疾病的途径，增进人类的健康。

肿瘤坏死因子(TNF α)是一个多功能的细胞因子，主要参与体内炎症反应和免疫功能的调节，也能够调控某些肿瘤细胞的凋亡过程。TNF α 与受体结合后，在效应细胞中可以激活不同的细胞内信号通路，包括 NF- κ B、JNK 及细胞凋亡途径的活化，从而表现出不同的细胞效应。异常的 TNF α 产生和持续活化与多种人类疾病有关，如：败血症，休克，糖尿病，移植排斥，以及多发性硬化、类风湿关节炎和免疫性肠病等多种自身免疫疾病。在 TNF α 异常引起的炎症性疾病中，NF- κ B 通路的活化是一个关键环节。后者是一类细胞转录因子，调节多种炎症相关靶基因的转录。最近的研究也显示，在慢性炎症进展至癌前病变，导致肿瘤发生的过程中，NF- κ B 起了非常重要的促进作用。因此，在临床治疗当中，开发 TN α 的阻断剂，或者拮抗 TNF α 激活 NF- κ B 环节的药物，是未来抑制炎症药物的研究开发方向。对于前者，全球最大生物技术公司 Amgen 的 Enbrel，制药巨头强生公司的 Remicade 和雅培公司的 Humira，这些药物都是 TNF α 的基因工程可溶性受体，可以阻断与细胞受体的结合；这些药物的年销售额突破了十亿美金，已经成为药物界名副其实的新型“重磅炸弹”药物。针对于阻断 TNF α 细胞内信号通路的药物开发，已成为下一步药物开发的重点，目前尚无有针对性的药物报道。

因此，目前对于寻找 TNF α 细胞内信号通道的抑制剂及其作用机制有迫切的需要。

发明内容

为了这种需求, 本发明人通过研究, 发现 CK1 α 能够对 NF- κ B 通路的活性产生影响, 并利用该机制确定了在该通路中与其作用的受体蛋白为 RIP(receptor interacting protein 受体结合蛋白)。

因此, 在本发明的一个方面, 提供了一种筛选 NF- κ B 通道受体的方法, 该方法包括:

- a)使 CK1 α 和可能的受体在细胞中接触;
- b)测定 NF- κ B 表达的上调。

在本发明的另一个方面, 提供了 CK1 α 蛋白拮抗剂在制备下调 NF- κ B 的药物中的用途。优选该药物用于治疗 TNF α 异常引起的炎症性疾病。更优选的, 炎症性疾病选自败血症、休克、糖尿病、移植排斥、多发性硬化、类风湿性关节炎和免疫性肠病。

在该方面的一个实施例中, CK1 α 蛋白拮抗剂是 CK1 α 蛋白的 46 位赖氨酸突变为丙氨酸。

在该方面的另一个实施例中, CK1 α 拮抗剂作用与 CK1 α 竞争 RIP 受体位点。

在本发明的另一个方面, 提供了 CK1 α 蛋白拮抗剂在制备抑制 p53 基因的药物中的用途。优选 CK1 α 蛋白拮抗剂是 CK1 α 蛋白的 46 位赖氨酸突变为丙氨酸的突变体。

在此, “拮抗剂”指能够抑制 CK1 α 功能的那些物质。如本领域技术人员已知的, 包括竞争性抑制蛋白, 其可以是突变的无活性蛋白质, 与野生型蛋白竞争结合位点; 或与 CK1 α 蛋白结合使其失活的化合物; 还包括核酸水平上的反义核酸; 能够表达 CK1 α 失活蛋白的表达载体等。

附图说明

图 1 是应用荧光素酶报告基因系统研究 CK1 α 对 NF- κ B 活性的影响的结果。用加入的各种样品对 NF- κ B-Luc 的表达活性作图。图 1A 显示了 CK1 α 能增强 TNF α 对 NF- κ B 报告基因的激活作用, 而 CK1 α M 可以抑制该效应。图 1B 显示了 CK1 α 对 NF- κ B 报告基因有激活作用。

图 2 是实施例 2 的蛋白质印迹分析结果。

图 3 是实施例 3 的反向及半内源性免疫共沉淀的结果。图 3A 是在 293T 细胞中共表达 FLAG-RIP 与 MYC 空载体或 MYC-CK1 α , 用抗 MYC 免疫沉淀表达蛋白, 用抗 FLAG 检测。图 3B 是内源性 RIP 结合于细胞内过表达的 FLAG-CK1 α 。在 293T 细胞中表达 FLAG-CK1 α , 用 FLAG 抗体和对照 MYC 抗体免疫沉淀, 用 RIP 抗体检测。

图 4A 是 RIP 的结构域组成及其分段克隆策略的示意图。

图 4B 是实施例 4 的蛋白质印迹分析结果。

图 5A 是实施例 5 的蛋白质印迹分析结果。

图 5B 是实施例 5 中的体外磷酸化实验的放射性自显影分析结果。

图 6 是应用荧光素酶报告基因系统研究 CK1 α 对 RIP 对 NF- κ B 报告基因的激活作用的结果。用加入的各种样品对 NF- κ B-Luc 的表达活性作图。图 6 A 显示在 293T 细胞中, CK1 α 能增强 RIP 对 NF- κ B 报告基因的激活作用, 而 CK1 α M 可以抑制该效应。图 6B 显示在 HeLa 细胞中, CK1 α 增强 RIP-IM 对 NF- κ B 报告基因的激活作用, 而 CK1 α M 可以抑制该效应。

图 7A 显示了突变体 CK1 α M 抑制 p53 介导的荧光素酶报告基因转录活性的结果。

图 7B 显示了不同剂量的野生型 CK1 α W 和突变体 CK1 α M 对 p53 介导的荧光素酶报告基因转录活性的影响。

图 7C 是蛋白质印迹分析结果, 显示了不同剂量野生型 CK1 α W 和突变体 CK1 α M 转染 HeLa 细胞, 用蛋白质印迹分析细胞裂解液中的蛋白含量的结果。

具体实施方式

我们的研究重点为, 寻找 TNF α 激活 NF- κ B 的信号传导通路中新的药靶分子。为此, 我们首先建立了应用荧光素酶作为报告基因检测哺乳动物细胞 NF- κ B 活性的筛选平台, 即将含有 NF- κ B 启动子的报告基因质粒与目标蛋白质粒共转入哺乳动物细胞, 在目标蛋白表达后一定时间, 通过检测荧光素酶的活性即可判断目标蛋白是否能够活化或者抑制 NF- κ B 通路。在对一批功能未明确的蛋白激酶的筛选过程中, 我们发现野生型(WT)CK1 α [其核酸序列 genebank 登录号: NM_001892] 能增强 TNF α 对 NF-KB 报告基因的激活作用, 而磷酸激酶功能域中一个点突变(Mut)所致的激酶失活的突变体 CK1 α M 就能达到抑制 TNF α 效应的 50%, 说明 CK1 α 确实对 NF-KB 的通路有影响。

我们的功能学研究显示, CK1 α 能够对 NF-KB 通路的活性产生影响, 但因为细胞信号传导通路的复杂性, 要确立 CK1 α 对 NF-KB 通路的作用不是一种非特异性的现象, 则必需寻找其在 NF-KB 通路上的相互作用蛋白以证实 CK1 α 是 NF-KB 通路上的一个新的成员, 这也有助于阐明 CK1 α 在 NF- κ B 活化通路中的作用机制。我们选取了该通路中的一些关键成员 TNFR1(胞内区)、TRAF2、RIP 和 TRAF6 与 CK1 α 进行了哺乳动物过表达免疫共沉淀实验研究。结果发现, CK1 α 可与 TNFR1(胞内区)、

RIP 和 TRAF6 免疫共沉淀, 而与 TRAF2 未能共沉淀, 这提示 CK1 α 与 TNFR1、RIP 和 TRAF6 间有相互作用关系, 而与 TRAF2 无相互作用, 表明 CK1 α 确实是 TNF α 引起的 NF- κ B 活化通路中一个新的成员。发现 CK1 α 与 RIP[其核酸序列的 genbank 获取号: NM_003804]间的相互作用是很令人兴奋的, 因为基因敲除实验显示, RIP 对 TNF 引起的 NF- κ B 激活是不可或缺的, RIP 敲除细胞在 TNF α 刺激时完全丧失了 NF- κ B 转录活化效应(见参考文献 1), 而 TRAF2 敲除后仍然保留大部分活化效应。这意味着抑制或阻断 RIP 的功能就可以成为一种抑制 NF- κ B 活化的新方法。同时, 我们的实验也观察到 CK1 α 与 RIP 间的相互作用非常强, 故此我们进一步研究了 CK1 α 与 RIP 的相互关系以及两者之间的功能上的影响。

我们应用反向免疫共沉淀实验研究也证实, RIP 能够与免疫沉淀的 CK1 α 相结合; 为验证两者在细胞生理状态下是否结合, 我们采取了更为严谨、接近生理状态的半内源性免疫共沉淀的实验方法, 也能够确认 CK1 α 与 RIP 间的相互作用关系。为明确 CK1 α 与 RIP 的结合区段, 我们进行了 RIP 分段的免疫共沉淀研究。根据 RIP 的功能结构域, 我们将其分为三段, 即激酶结构域(KD)、死亡结构域(Death domain; DD)以及两者之间的中间区(Intermediate domain; IM), 与 CK1 α 全长进行了免疫共沉淀实验。结果发现, CK1 α 不能与死亡结构域结合, 而与另两个区段都可以结合。就 RIP 结构域的功能来看, 中间区(Intermediate domain)是激活 NF- κ B 的重要区域, 而死亡结构域则主要介导 RIP 引起的细胞凋亡。我们在利用在哺乳动物细胞中共转染过表达的方法分别观察了 CK1 α 及其 CK1 α M 对 RIP 和 RIP-IM 引起的 NF- κ B 激活的影响。结果显示: 转染 RIP 及其中间区均可引起 NF- κ B 报告基因的显著活化, 前两者分别与 CK1 α 共转染时, 都能够增加 NF- κ B 报告基因的活化; 而与 CK1 α M 共转染时, 则表现为相反的效应, 都能够抑制 NF- κ B 报告基因的活化。这表明, CK1 α 不仅与 RIP 有确实的相互作用, 而且存在功能上的影响。

有关 CK1 α 的多项研究显示它影响多种细胞信号通路的传导。以往文献研究表明, 其作用的通常方式为与细胞信号通路的关键蛋白相互作用, 并且磷酸化后者, 改变了后者的生物学活性, 从而对细胞信号传导产生影响(见参考文献 2)。我们前述研究显示了 CK1 α 与 CK1 α M 对 NF- κ B 活性效应表现为相反的影响, 这说明其对 NF- κ B 的效应是与其激酶活性密切相关的。这提示, RIP 可能是 CK1 α 作用的底物, 我们又进一步进行了细胞内及体外磷酸化研究。因为 RIP 本身也是一种激酶, 为排除其自身磷酸化的影响, 我们构建了激酶失活的突变体 RIP-M。RIP-M 与 CK1 α 或 CK1 α M 共转染哺乳动物细胞时, 进行蛋白表达的分析, 可以发现 RIP-M 与 CK1 α 共转的反应中, RIP-M 蛋白表达有一条类似于磷酸化的电泳延迟带(supershift), 而

CK1 α M 和空对照质粒未见此条带,表明 CK1 α 可以使 RIP 获得某种方式的修饰。我们又进行了体外磷酸化实验研究, RIP-M 与 CK1 α (或 CK1 α M) 共转染 293T 细胞,将表达产物免疫共沉淀,加入 [γ - 32 P]-ATP 体外反应后放射自显影分析,与 CK1 α 共转的反应中有 RIP-M 的放射性条带,而 RIP-M 与 CK1 α M 和空载体共转的样品中没有该条带,表明发现 RIP-M 确实可以特异地被 CK1 α 所磷酸化。我们在大肠杆菌中表达并纯化了 RIP 激酶结构域、死亡结构域(Death domain)以及两者之间的中间区(Intermediate domain)的 GST 融合蛋白,将其作为底物分别与免疫沉淀纯化的 CK1 α , CK1 α M 蛋白进行体外磷酸化实验研究,结果显示 RIP 中间区的 GST 融合蛋白磷酸化最为显著。

我们的实验研究表明, CK1 α 能够影响 NF- κ B 的通路信号传导,野生型 CK1 α 能增强 TNF α 对 NF- κ B 的激活作用,而激酶失活的突变体 CK1 α M 对此有抑制作用。我们观察到 CK1 α 跟 TNFR1、RIP 间存在相互作用关系,而与 TRAF2 没有相互作用;进一步研究表明 CK1 α 可以和 RIP 的激酶结构域(KD)和中间区(IM)结合,而与死亡结构域(DD)间不结合。同时这种相互作用也有功能上的影响,对于 RIP 及其中间区过表达所引起 NF- κ B 报告基因的活化,与 CK1 α 共转染时,都能够增加该效应;而与 CK1 α M 共转染时,则能表现为该效应的抑制。我们进一步的研究显示, CK1 α 可以磷酸化 RIP。这种修饰可能跟 RIP 引起 NF- κ B 激活的活性有关。

应用荧光素酶报告基因系统研究发现,野生型(WT)CK1 α (CK1 α W)能增强 p53 的激活作用,而磷酸激酶功能域中一个点突变(Mut)所致的激酶失活的突变体 CK1 α M(K46A),就能达到抑制 p53 功能的 50%。

P53 基因是人类恶性肿瘤中最常见的基因改变,位于 17 号染色体短臂 1 区 4 带,有两种构型。野生型 P53 是抗癌基因,正常情况下,致突变因子引起 DNA 破坏,迅速诱导野生型 p53,它激活 p21 的转录,从而阻滞细胞周期于 G1 期,并结合增殖细胞核抗株(PCNA)而抑制 DNA 复制,使破坏的 DNA 在复制之前有修复的时间;突变型 p53 则丧失了 DNA 破坏后细胞周期停顿的能力,还具有促进恶性转化的活性。缺乏野生型 p53 的肿瘤细胞不能凋亡,维持了肿瘤细胞的生存,也增加了对化疗和放疗的耐药性。p53 基因突变率高达 50%以上,在大多数的人类癌症如白血病、淋巴瘤、肉瘤、脑瘤、乳腺癌、胃肠道癌及肺癌等癌症中常呈失活状态。因此,CK1 α (CK1 α W)对 p53 的激活作用,在肿瘤的诊治领域具有重要的研究应用价值。

综上所述,我们的研究结果提示,CK1 α 在 NF- κ B 和 P53 通路信号传导中有重要的价值,而且我们的研究也初步确立了 CK1 α 的作用机制。从中可以看出,CK1 α 可以作为一个新的药物靶点,设计、筛选针对性抑制 CK1 α 激酶的药物或治疗方

法,能够抑制 NF- κ B 的过度活化、并激活 P53 功能。这一点,为治疗临床 NF- κ B 的过度活化所致的炎性疾病,防止慢性炎症癌变,以及肿瘤药物筛选,提供了新的药物开发途径。

实施例 1、应用荧光素酶报告基因系统研究 CK1 α 对 NF- κ B 活性的影响:

我们构建了在 5' 侧含有 NF- κ B 启动子的荧光素酶报告基因质粒(pNF- κ B-Luc),将该质粒转入哺乳动物细胞后,荧光素酶的表达及活性就会依赖于细胞内 NF- κ B 基因的激活。在此基础上,我们建立了应用荧光素酶作为报告基因检测哺乳动物细胞 NF- κ B 活性的筛选平台,并应用此平台对一批功能未明确的蛋白激酶进行了活性筛选。我们选用了 HeLa 和 293T 细胞株进行相应的研究。研究中发现野生型(WT)CK1 α 能增强 TNF 对 NF-KB 报告基因的激活作用,而磷酸激酶功能域中一个点突变(Mut) 所至的激酶失活的突变体 CK1 α M 就能达到抑制 TNF α 功能的 50%。具体实施如下:

将 HeLa 细胞以 5×10^4 /500 μ l 的密度接种(293T 细胞为 8×10^4 /500 μ l)至 24 孔皿,培养 24 小时后用 Lipofectamine2000 试剂及推荐方法进行转染。每孔总的转染质粒量 0.5 μ g,包括 0.05 μ g pNF- κ B-Luc 质粒和不同剂量的目的质粒,不足者用 pEF-BOS 空质粒补齐;每个样品作 3 个重复孔以消除实验误差;设立 pEF-BOS 空质粒作为空白对照(MOCK)。转染后 24 小时,每孔换液,加入 200 μ l 含 TNF α (20ng/ml)的含 10%FBS 的 DMEM 培养液。刺激 12 小时后,吸干培养液,24 孔板中每孔加入 100 μ l 的 $1 \times$ PBL 缓冲液裂解液,在摇床上振荡 10-15 分钟。置于冰上后,取出 5 μ l 裂解液,加入发光管中,在生物发光检测仪上进行检测。另外,我们也单独转染了不同剂量的 CK1 α ,24 小时后,观察分析了它对 NF- κ B 报告基因活性的影响。PBL 缓冲液与荧光素酶检测底物均来自“Promega Dual-luciferase assay system”。

结果显示:TNF α 刺激能显著增加 NF- κ B 报告基因活性,而野生型(WT)CK1 α 能增强 TNF α 对 NF-KB 报告基因的激活作用,而 CK1 α M 在 400ng 剂量时就能达到抑制 TNF α 激活 NF- κ B 报告基因活性的 50%以上。而单转 CK1 α 也能够刺激 NF-KB 报告基因的活化。(见图示 1A, 1B。)

实施例 2、筛选与 CK1 α 相互作用 NF- κ B 途径上的关键分子:

我们选取了该通路中的一些关键成员 TNFR1(胞内区)、TRAF2 和 RIP 与 CK1 α 进行了哺乳动物过表达免疫共沉淀实验研究。具体实施如下:

以 3×10^6 /10cm 培养皿的 293T 细胞铺板培养 24 小时后,用磷酸钙方法进行转

染。其中每个样品加 CK1 α 质粒(带 HA 表达标签)6 μ g, 另一带 FLAG 表达标签的共转质粒 6 μ g(RIP 质粒为 4 μ g 加 CrmA 质粒 2 μ g)。转染 24 小时后收获 293T 细胞, 加入 1ml 含 1% NP40 的裂解液, 4 $^{\circ}$ C 振荡 30min。4 $^{\circ}$ C 12,000rpm 15min 离心, 吸取上清。取 500 μ l 上清用于免疫共沉淀研究, 加入 2 μ g 的小鼠抗 FLAG 抗体, 混匀后置于 4 $^{\circ}$ C 振荡 1 小时。加入 20 μ l 的 50% protein G beads 悬液, 混匀后置于 4 $^{\circ}$ C 振荡过夜。4 $^{\circ}$ C 2,000rpm 2 min 离心, 弃上清。用预冷裂解液洗三次, 再用含 500mM 氯化钠预冷的预冷高盐裂解液洗两次, 最后加预冷 TBS 洗三次, 弃上清, 加入 20 μ l 2 $\times$ 蛋白上样缓冲液, 电泳后进行转膜, 用抗 HA 抗体蛋白质印迹分析检测。

结果显示: 带 HA 表达标签 CK1 α 蛋白可存在于 FLAG- TNFR1(胞内区)、FLAG-RIP 和 FLAG-TARF6 的抗体免疫沉淀产物中, 而在 FLAG-TARF2 的免疫沉淀产物中不存在(见图 2)。表明 CK1 α 与 TNFR1、RIP 和 TARF6 间有相互作用, 而与 TRAF2 无相互作用[注: 图中 IP 指用相应的抗体进行免疫沉淀; WB 指用相应的抗体进行免疫印迹检测]。

实施例 3、用反向及半内源性免疫共沉淀的方法确认 RIP 与 CK1 α 的相互作用:

为了确认 RIP 与 CK1 α 间的相互作用, 我们又用 CK1 α 质粒所携带的标签抗体进行了免疫沉淀, 用 RIP 质粒的标签进行了蛋白质印迹分析检测, 即反向免疫共沉淀, 发现 RIP 确实存在于 CK1 α 的免疫沉淀中。

我们又采取了更严谨的半内源性免疫共沉淀的实验方法。以 3×10^6 /10cm 培养皿的 293T 细胞铺板培养 24 小时后, 用磷酸钙方法进行转染。每个 10cm 培养皿转染 12 μ gFLAG 表达标签 CK1 α 质粒, 转染 24 小时后收获细胞, 加入 1ml 含 1% NP40 的裂解液, 4 $^{\circ}$ C 振荡 30min。4 $^{\circ}$ C 12,000rpm 15min 离心, 吸取上清。取 1ml 上清用于免疫共沉淀研究, 加入 2 μ g 的小鼠抗 FLAG 抗体, 设另一管加 2 μ g 的小鼠抗 MYC 抗体作为阴性对照, 混匀后置于 4 $^{\circ}$ C 振荡 1 小时。后续免疫沉淀方法同上述实施例 2, 最后样品用抗 RIP 的小鼠单抗进行检测。

结果显示, 抗 FLAG 抗体免疫沉淀的产物中, 细胞内源性的 RIP 可与过表达 FLAG-CK1 α 共沉淀; 而作为对照的抗 MYC 抗体免疫沉淀产物中, 无 RIP 蛋白。说明, 细胞内源性的 RIP 可与过表达的 FLAG-CK1 α 相互作用。(见图 3)

实施例 4、确认 RIP 与 CK1 α 结合的结构域:

在结构上, RIP 蛋白可以分为三个显著的功能结构域, 即激酶结构域

(17-289AA)、死亡结构域(583-669AA) (Death domain)以及两者之间的中间区(Intermediate domain)。三种结构域介导不同的细胞效应, 激酶结构域决定 RIP 的蛋白激酶活性, RIP 所引起的 NF- κ B 的活化主要由中间区介导, 而 RIP 的死亡结构域与 RIP 引起的细胞凋亡相关。为了确认与 CK1 α 相互作用的结构域, 并以此来判断 CK1 α 对 RIP 的主要功能影响, 我们分段表达了 RIP 的三个结构域, 并与全长的 RIP 进行了免疫共沉淀研究。

RIP 的分段克隆策略:

引物设计(实线下为 *sfi*I 酶切位点)

F:RIP-1 ACAGC GGCCAATCCGGCC CAACCAGACATGTCCTTGAATGT

R:RIP-301 TCGAG GGCCTCTAAGGCC TTACACGTCCTCTTCTACACTTTCTTC

F:RIP-293 ACAGC GGCCAATCCGGCC GAAGAAAGTGTAGAAGAGGACGTG

R:RIP-558 TCGAG GGCCTCTAAGGCC TTAGTCTAGTAGTGATGAACTCGTCCC

F:RIP-550 ACAGC GGCCAATCCGGCC GGGACGAGTTCATCACTACTAGAC

R:RIP-671 TCGAG GGCCTCTAAGGCC GTTCTGGCTGACGTAAATCAAGCTG

以引物 F:RIP-1, R:RIP-301; F:RIP-293, R:RIP-558; F:RIP-550, R:RIP-671 配对, 以包含 RIP 全长的 pEF-BOS-FLAG-RIP 质粒为模板, 进行 PCR 扩增, 扩增产物在琼脂糖凝胶电泳, 回收正确的扩增片段, 用 *sfi*I 酶切, 回收酶切片段, 与经过 *sfi*I 酶切的 pEF-BOS 质粒连接, 转化, 提取质粒。经过测序验证, 我们获得了带有 FLAG 表达标签的 RIP 分段表达载体: 即 pEF-BOS-FLAG-RIP(1-301AA); pEF-BOS-FLAG-RIP(293-558AA); pEF-BOS-FLAG-RIP(550-671AA) (图 4A)。

含有不同 RIP 片段的质粒与带 HA 标签的 CK1 α 质粒共转染 293T 细胞, 细胞裂解产物用 FLAG 抗体免疫沉淀, 用抗 HA 抗体进行蛋白质印迹分析检测(图 4B)。

结果显示: HA-CK1 α 可与存在于 pEF-BOS-FLAG-RIP(1-301AA)及 pEF-BOS-FLAG-RIP(293-558AA)的免疫沉淀产物中, 而不在 pEF-BOS-FLAG-RIP(550-671AA)的免疫沉淀产物中, 表明 CK1 α 可与 RIP 的激酶结构域和中间区(Intermediate domain)结合, 而与死亡结构域间没有相互作用(见图 4B)。

实施例 5、用体外磷酸化方法研究 CK1 α 对 RIP 的磷酸化作用

CK1 α 是一种蛋白激酶, 多项研究显示它影响多种细胞信号通路的传导。从以往文献看, 其作用的通常方式为与细胞信号通路的关键蛋白相互作用, 并且磷酸化后者, 改变了后者的生物学活性, 从而对细胞信号传导产生影响。鉴于 CK1 α 与 RIP

的相互作用,为证实它们之间是否存在彼此磷酸化的修饰,我们又进行了相应的磷酸化实验研究。因为 RIP 本身也是一种激酶,为排除其自身化的影响,我们突变了激酶结构域中结合 ATP 的氨基酸位点,将其 45 位的赖氨酸(K)突变为丙氨酸(A),获得了激酶失活的突变体 RIP-M。在 RIP-M 与 CK1 α 共同转染 293T 细胞,进行蛋白表达的分析的研究中,我们发现 RIP 与 CK1 α 共转的反应中, RIP 蛋白表达有一条磷酸化的电泳延迟带(supershift band),而 CK1 α M 和空对照质粒未见此条带,表明 CK1 α 可以使 RIP 获得某种方式的修饰。在体外磷酸化实验研究中,我们发现 CK1 α 可以磷酸化 RIP-M。

以 1.6×10^4 /1ml 的密度铺 293T 至 12 孔皿,培养 24 小时后用 Lipofectamine 2000 试剂及推荐方法进行转染。每孔转染 0.25 μ g FLAG-RIP-M 及等量的 CrmA 质粒,分别 1.1 μ g pEF-BOS 空质粒, FLAG-CK1 α 和 FLAG-CK1 α M 共同转染 293T 细胞,转染 24 小时后,加入含有 1%磷酸酶抑制剂的 $1 \times$ PBL 缓冲液裂解液,4 $^{\circ}$ C 振荡 30min,取样加相同量的 $2 \times$ 蛋白上样缓冲液,电泳后转膜,用抗 FLAG 抗体蛋白质印迹分析检测,可见 FLAG-RIP-M 与 CK1 α 共转染蛋白电泳分析有一电泳延迟条带。(图 5A)。

体外磷酸化实验:本实验中,首先 FLAG-RIP-M 与 FLAG-CK1 α 质粒共转染 293T 细胞,并设立 FLAG-RIP-M 与 pEF-BOS 空质粒; FLAG-RIP-M 与 FLAG-CK1 α M 为对照, FLAG-RIP-M 加量 4 μ g,另一质粒为 6 μ g,每个样品中均加入 2 μ g CrmA 质粒。裂解收获蛋白后用抗 FLAG 进行免疫沉淀。293T 细胞的铺板、转染和免疫沉淀方法参见实施例 2。免疫沉淀产物依次用裂解液、高盐裂解液和激酶缓冲液(配方见附录 2)洗涤,均于冰上操作,各洗三遍。取 1/3 的免疫沉淀产物用于蛋白质印迹分析检测,其余样品用于激酶分析。临用前在激酶缓冲液中加入终浓度为 1mM 的 $MnCl_2$,和 1%的磷酸酶抑制剂(来自 sigma 公司)。每个样品中加入 20 μ l 激酶缓冲液和 5 微居的(μ Ci)的 [γ - ^{32}P]-ATP,30 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟,其间每隔五分钟混匀一次。加入 4 μ l 的 $6 \times$ 蛋白上样缓冲液终止反应,95 $^{\circ}$ C 保温 5 分钟,冷却后离心,取 10 μ l 在 8%的 SDS-PAGE 胶上进行蛋白电泳,转膜,进行放射自显影分析。图 5B 显示,在 HeLa 细胞中,CK1 α 增强 RIP-IM 对 NF- κ B 报告基因的激活作用,而 CK1 α M 可以抑制该效应(见图 5B)。

实施例 6、观察 CK1 α 对 RIP 激活 NF- κ B 的影响:

前述实验证实 CK1 α 可与 RIP 全长及 RIP 的激酶结构域和中间区结合,这种结合是否有功能上的相互影响,我们又进行了相应的研究。对于 RIP 的功能,目前已经确认的主要是介导 NF- κ B 激活,另外 RIP 在哺乳动物细胞中过表达也会引起细

胞凋亡。我们利用在哺乳动物细胞中共转染过表达的方法分别观察了 CK1 α 及其 CK1 α M 对 RIP 和 RIP-IM 对 NF- κ B 激活的改变。

RIP 及 RIP-IM 和 CK1 α /CK1 α M 共转染的报告基因实验方法参见实施例 1，其中 RIP 与 RIP-IM 的转染剂量为 25ng, 加同等剂量的 CrmA 质粒，其共转质粒 pEF-BOS/CK1 α /CK1 α M 剂量为 0.4 μ g，转染 24 小时后裂解细胞，分析其发光值。结果见图 6。

实施例 7、应用荧光素酶报告基因系统研究 CK1 α 对 P53 活性的影响：

我们构建了在 5' 侧含有 p53 启动子的荧光素酶报告基因质粒 (p53-luciferase reporter plasmid)，将该质粒转入哺乳动物细胞后，荧光素酶的表达及活性就会依赖于细胞内 p53 基因的激活。在此基础上，我们建立了应用荧光素酶作为报告基因检测哺乳动物细胞 p53 活性的筛选平台，并应用此平台对一批功能未明确的蛋白激酶进行了活性筛选。我们选用了 HeLa 和 293T 细胞株进行相应的研究。研究中发现野生型 (WT) CK1 α (CK1 α W) 能增强 p53 对 p53 报告基因的激活作用，而磷酸激酶功能域中一个点突变 (Mut) 所至的激酶失活的突变体 CK1 α M (K46A) 就能达到抑制 p53 功能的 50%。具体实施如下：

将 HeLa 细胞以 5×10^4 / 500 μ l 的密度接种 (293T 细胞为 8×10^4 / 500 μ l) 至 24 孔皿，培养 24 小时后用 Lipofectamine2000 试剂及推荐方法进行转染。每孔总的转染质粒量 0.525 μ g，包括 0.0255 μ g pCDEF-p53，pP53-Luc 质粒和不同剂量的目的质粒，不足者用 pEF-BOS 空质粒补齐；每个样品作 3 个重复孔以消除实验误差；设立 pEF-BOS 空质粒作为空白对照 (MOCK)。转染后 5 小时，每孔换液，转染后 24 小时，吸干培养液，24 孔板中每孔加入 100 μ l 的 $1 \times$ PBL 缓冲液裂解液，在摇床上振荡 10-15 分钟。置于冰上后，取出 30 μ l 裂解液，加入发光管中，在生物发光检测仪上进行检测。另外，我们也单转了不同剂量的 CK1 α ，24 小时后，观察分析了它对 p53 报告基因活性的影响。PBL 缓冲液与荧光素酶检测底物均来自 “Promega Dual-luciferase assay system”。

结果显示：野生型 CK1 α W 能增强 p53 报告基因的激活作用，而 CK1 α M 以剂量依赖的方式抑制 p53 介导的转录报告基因活性。而单转 CK1 α M 也能够抑制 p53 报告基因的活化。(见图示 7。)

实验中涉及主要试剂来源：

细胞转染试剂 Lipofectamine2000 为 Invitrogen 公司产品

荧光素酶检测底物来自 Promega Dual-luciferase assay system

实验中涉及载体来源:

报告基因质粒 pNF- κ B-Luc, pP53-Luc 由上海睿星公司生产提供

细菌蛋白表达载体 pGEX-4T-1 为 Pharmacia Biotech Inc 产品

真核细胞表达载体为: pEF-BOS; pEF-BOS-FLAG; pCDEF-MYC; pCDEF-HA 均由上海睿星公司生产提供

含有相应基因的载体均是将目的基因克隆入上述带有不同表达标签的载体中构建获得。如 pEF-BOS-FLAG-RIP 质粒表示在 pEF-BOS-FLAG 载体上有 RIP 基因。

实验中涉及抗体来源:

抗-RIP 单克隆抗体 购自 BD biosciences 公司

抗-FLAG; 抗-FLAG-HRP 单克隆抗体 购自 Sigma 公司

抗-MYC; 抗-HA; 抗-MYC-HRP; 抗-HA-HRP 单克隆抗体均由上海睿星公司生产提供

实验中涉及细胞说明及来源:

Hela 人宫颈癌上皮细胞

293T 人胚肾细胞, 包含 SV40 病毒的大 T 抗原

以上细胞均由从 ATCC 获得, 由上海睿星公司冷冻保存

参考文献:

- (1) Kelliher, M.A., Grimm, S., Ishida, Y., Kuo, F. and Leder, P. The death domain kinase RIP mediates the TNF- α induced NF- κ B signal. *Immunity*, 1998, 8: 297-303
- (2) Knippschild U, Gocht A, Wolff S, Huber N, Lohler J, Stoter M. The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal*. 2005 Jun;17(6):675-89.

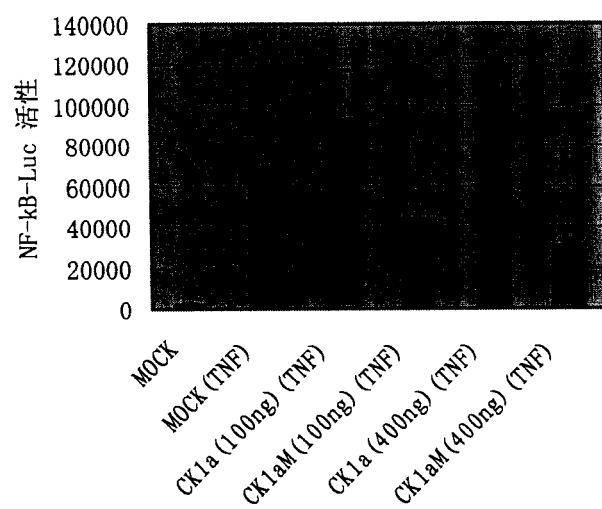


图 1A

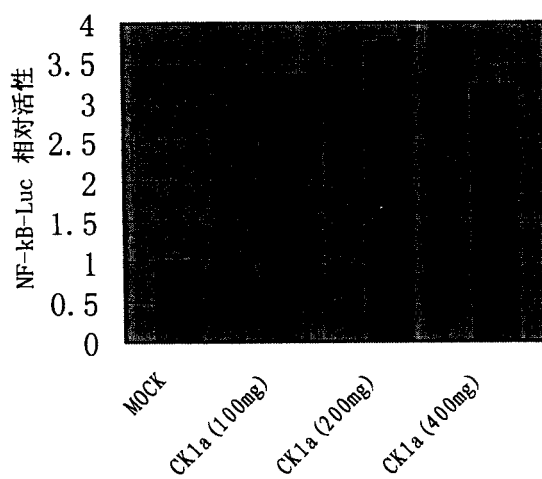


图 1B

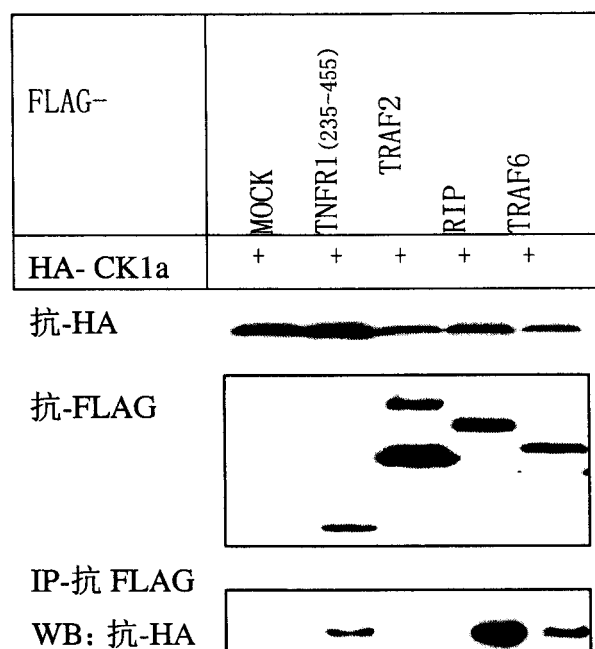


图 2

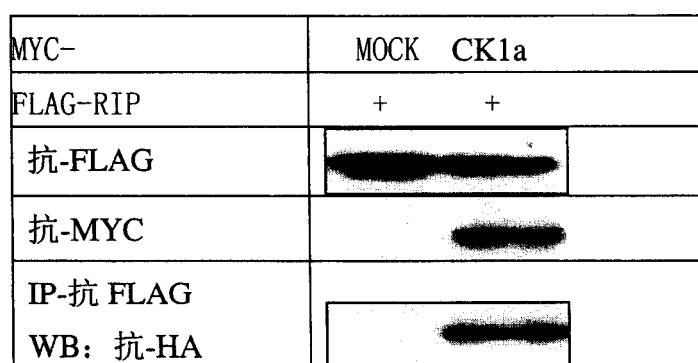


图 3A

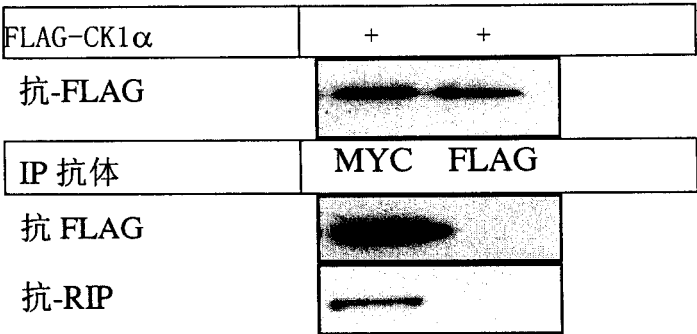


图 3B

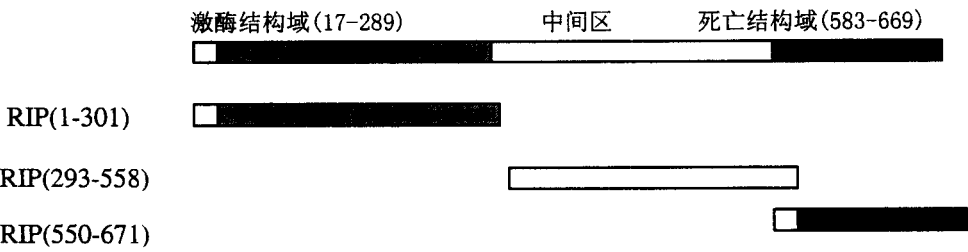


图 4A

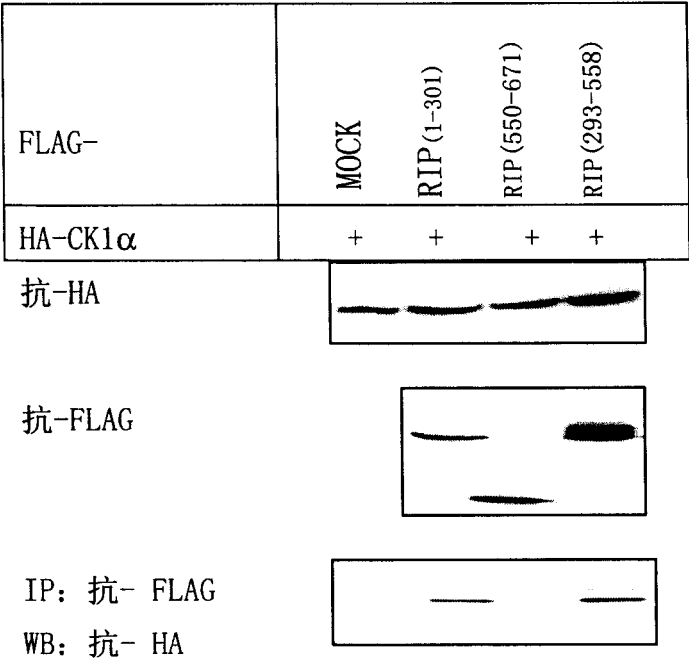


图 4B

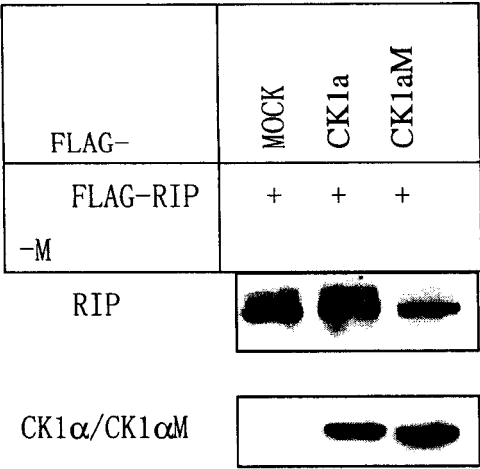


图 5A

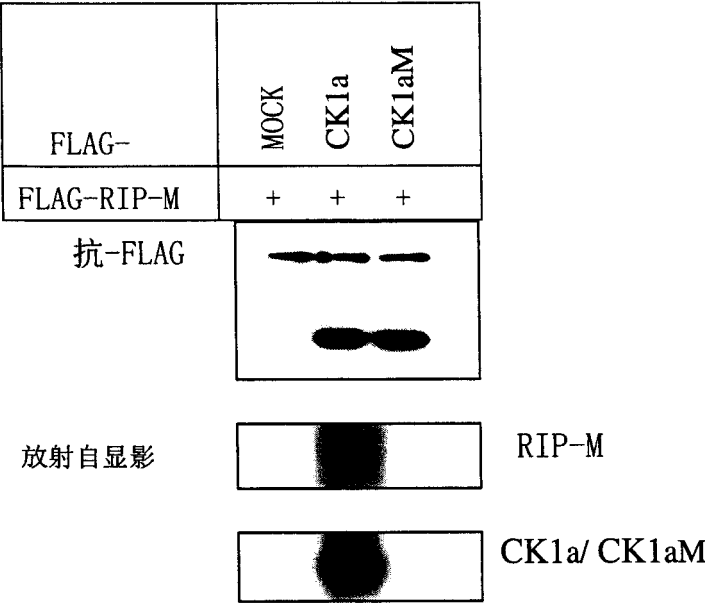


图 5B

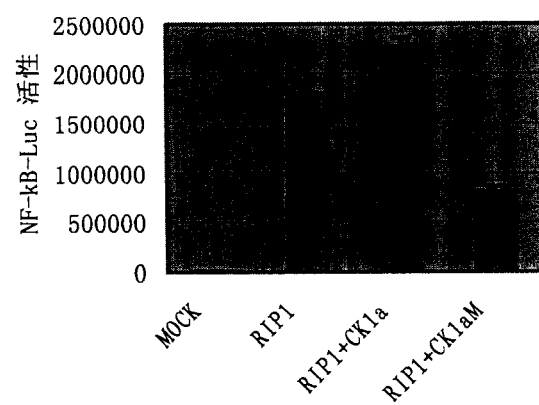


图 6A

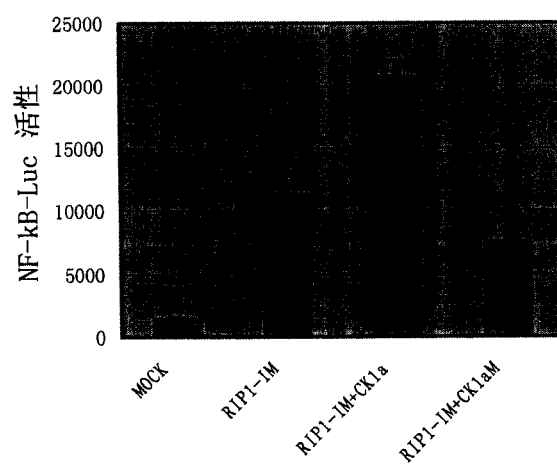
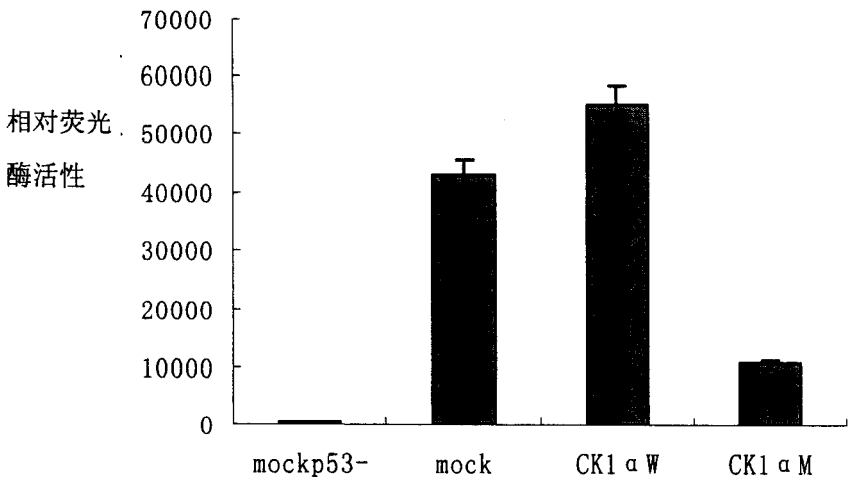
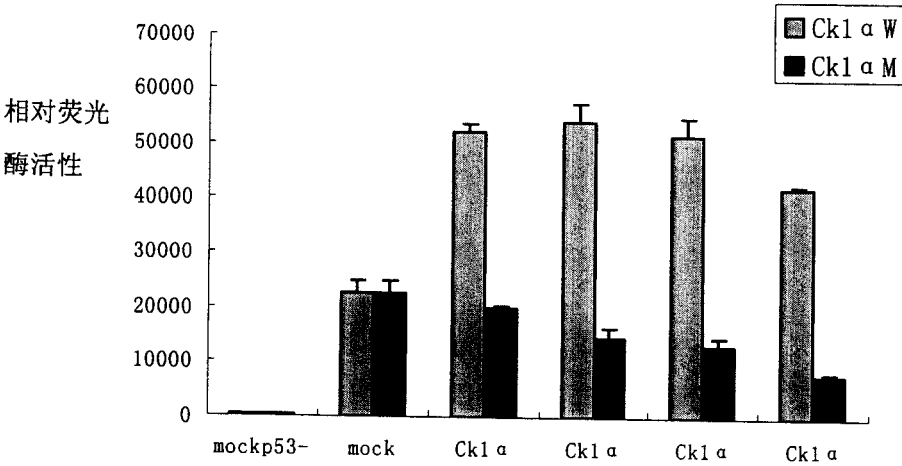


图 6B



pCDEF(ug)	0.025	-	-	-
pCDEF-P53(ug)	0.000	0.025	0.025	0.025
pEF-BOS(ug)	0.4	0.4	-	-
pP53-luc(ug)	0.1	0.1	0.1	0.1
CK1 α W(ug)	-	-	0.4	-
CK1 α M(ug)	-	-	-	0.4
总计(ug)	0.525	0.525	0.525	0.525

图 7A



pCDEF(ug)	0.025	-	-	-	-	-
pCDEF-P53(ug)	0.0	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
pEF-BOS(ug)	1.5	1.5	1.3125	1.125	0.750	-
pP53-luc(ug)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
CK1 α W(ug) □	-	-	0.1875	0.375	0.750	1.500
CK1 α M(ug) ■	-	-	0.1875	0.375	0.750	1.500
总计(ug)	1.625	1.625	1.625	1.625	1.625	1.625

图 7B

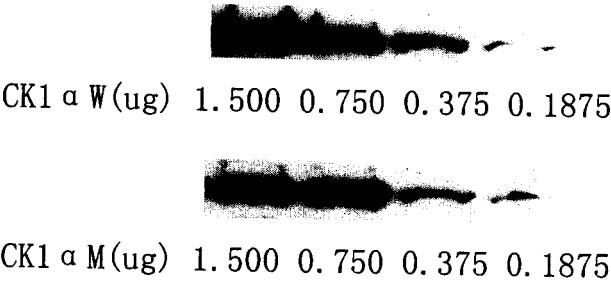


图 7C

专利名称(译)	新药物靶点基因CK1α		
公开(公告)号	CN1873018A	公开(公告)日	2006-12-06
申请号	CN200510026282.3	申请日	2005-05-30
[标]申请(专利权)人(译)	上海睿星基因技术有限公司 北京诺赛基因组研究中心有限公司 中国医学科学院基础医学研究所		
申请(专利权)人(译)	上海睿星基因技术有限公司 北京诺赛基因组研究中心有限公司 中国医学科学院基础医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	上海睿星基因技术有限公司 北京诺赛基因组研究中心有限公司 中国医学科学院基础医学研究所		
[标]发明人	罗楹 王勇		
发明人	罗楹 王勇		
IPC分类号	C12Q1/25 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/68 A61K38/17 A61K38/43 A61P29/00 A61P19/02 A61P7/00 A61P3/10 A61P37/06 A61P1/00 A61P43/00		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

公开了CK1α的拮抗剂在治疗疾病中的用途以及用CK1α筛选可能的治疗药物的用途。

