(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 104582715 A
(43)申请公布日 2015.04.29

(21)申请号 201380042721.2
(22)申请日 2013.07.10
(30)优先权数据
61/670,345 2012.07.11 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.02.11
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/049885 2013.07.10
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/011742 EN 2014.01.16
(71)申请人 佛蒙特大学及州农业学院
地址 美国佛蒙特州
(72)发明人 梅塞德斯·林孔
凯特基·M·哈特莱
(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 郑斌 彭鲲鹏
(51)Int.Cl.
A61K 38/17(2006.01)
A61K 38/16(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
A61P 3/10(2006.01)
A61P 3/00(2006.01)

权利要求书4页 说明书35页
序列表6页 附图13页

(54)发明名称

用于代谢调节的方法和组合物

(57)摘要

本发明部分地涉及可用于在体内或体外调节细胞代谢功能的方法和组合物。在一些方面中，本发明包括提高细胞、组织、器官和/或对象中的代谢的方法和/或组合物。在某些方面中，本发明包括可用于降低细胞、组织、器官和/或对象中的代谢的方法和/或组合物。

CN 104582715 A

1. 一种用于治疗对象中的代谢疾病或状况的方法，所述方法包括向需要这种治疗的对象施用有效量的 MCJ 调节化合物以治疗所述对象中的所述代谢疾病或状况。

2. 权利要求 1 所述的方法，其中所述 MCJ 调节化合物降低所述对象中的 MCJ 多肽活性并且提高所述对象中的线粒体代谢活性。

3. 权利要求 2 所述的方法，其中降低 MCJ 多肽活性包括降低 MCJ 多肽水平或功能。

4. 权利要求 1 所述的方法，其中所述 MCJ 调节化合物提高所述对象中的 MCJ 多肽活性并且降低所述对象中的线粒体代谢活性。

5. 权利要求 4 所述的方法，其中提高 MCJ 多肽活性包括提高 MCJ 多肽水平或功能。

6. 权利要求 1 所述的方法，其还包括降低所述对象的热量摄取水平。

7. 权利要求 6 所述的方法，其中在向所述对象施用所述 MCJ 调节化合物之前、同时和 / 或之后降低热量摄取水平。

8. 权利要求 1 至 3 中任一项所述的方法，其中所述代谢疾病或状况是超重、体重增加、肥胖、非酒精性脂肪肝疾病、糖尿病、胰岛素抗性、酒精性脂肪肝疾病、血脂异常、脂肪变性（例如，肝脂肪变性、心脏脂肪变性、肾脂肪变性、肌肉脂肪变性）、无 β 脂蛋白血症、糖原贮积病、韦 - 克病、脂肪营养不良 ；肝疾病，肝炎症、肝炎、脂肪肝炎、丙型肝炎、基因型 3 丙型肝炎、α 1- 抗胰蛋白酶缺乏、妊娠期急性脂肪肝、威尔逊病 ；肾病 ；心脏病，高血压、局部缺血、心力衰竭、心肌病 ；中毒 ；HIV ；神经退行性疾病，帕金森病、阿尔茨海默病 ；癌症，或体育锻炼。

9. 权利要求 1、4 或 5 中任一项所述的方法，其中所述代谢疾病或状况是进食障碍、厌食症、饥饿、营养不良、全肠胃外营养、严重的体重下降、体重不足、再喂养综合征 ；胃肠道手术介导的代谢改变、空肠 - 髂骨旁路术、胃旁路术 ；以及炎性 / 感染性状况、细菌过度生长的空肠憩室病以及炎性肠病。

10. 权利要求 1 所述的方法，其中所述对象是禁食对象。

11. 权利要求 1 所述的方法，其中治疗代谢疾病或状况包括增强或抑制细胞毒 T 细胞活性。

12. 权利要求 1 至 11 中任一项所述的方法，其中在药物组合物中施用所述 MCJ 调节化合物。

13. 权利要求 12 所述的方法，其中所述药物组合物还包含可药用载体。

14. 权利要求 12 或 13 所述的方法，其中所述药物组合物还包含靶向剂。

15. 权利要求 14 所述的方法，其中所述靶向剂是线粒体靶向剂。

16. 权利要求 1 至 15 中任一项所述的方法，其中所述 MCJ 调节化合物包括 MCJ 分子、抗 MCJ 多肽抗体或其功能片段、小分子 MCJ 抑制剂或小分子 MCJ 增强剂。

17. 权利要求 16 所述的方法，其中所述 MCJ 分子是 MCJ 多肽或者编码 MCJ 多肽的核酸。

18. 权利要求 1 至 17 中任一项所述的方法，其中所述对象未患癌症。

19. 权利要求 1 至 18 中任一项所述的方法，其中所述代谢疾病或状况不是癌症。

20. 权利要求 1 所述的方法，其还包括提高所述对象的热量摄取水平。

21. 权利要求 20 所述的方法，其中在向所述对象施用所述 MCJ 调节化合物之前、同时和 / 或之后提高热量摄取水平。

22. 一种改变细胞中线粒体代谢的方法，所述方法包括使所述细胞与有效量的外源

MCJ 调节化合物接触以改变所述细胞中的线粒体代谢，其中提高 MCJ 多肽活性的 MCJ 调节化合物降低所述细胞中的线粒体代谢，而降低 MCJ 多肽活性的 MCJ 调节化合物提高所述细胞中的线粒体代谢。

23. 权利要求 22 所述的方法，其中提高 MCJ 多肽活性包括提高所述细胞中 MCJ 多肽的水平或功能。

24. 权利要求 22 所述的方法，其中降低 MCJ 多肽活性包括降低所述细胞中 MCJ 多肽的水平或功能。

25. 权利要求 22 至 24 中任一项所述的方法，其中线粒体代谢是线粒体呼吸。

26. 权利要求 22 至 25 中任一项所述的方法，其中所述细胞在体外。

27. 权利要求 22 至 25 中任一项所述的方法，其中所述细胞在体内。

28. 权利要求 27 所述的方法，其中所述细胞在对象中，并且所述接触包括向所述对象施用所述 MCJ 调节化合物。

29. 权利要求 28 所述的方法，其中所述对象是禁食对象。

30. 权利要求 28 所述的方法，其中所述对象是具有提高的热量摄取水平的对象。

31. 权利要求 28 或 29 所述的方法，其中在药物组合物中施用所述 MCJ 调节化合物。

32. 权利要求 31 所述的方法，其中所述药物组合物还包含可药用载体。

33. 权利要求 31 或 32 所述的方法，其中所述药物组合物还包含靶向剂。

34. 权利要求 33 所述的方法，其中所述靶向剂是线粒体靶向剂。

35. 权利要求 22 至 34 中任一项所述的方法，其中所述 MCJ 调节化合物包括 MCJ 分子、抗 MCJ 多肽抗体或其功能片段、小分子 MCJ 抑制剂或小分子 MCJ 增强剂。

36. 权利要求 35 所述的方法，其中所述 MCJ 分子是 MCJ 多肽或者编码 MCJ 多肽的核酸。

37. 权利要求 22 至 36 中任一项所述的方法，其中所述 MCJ 调节化合物包含线粒体靶向剂。

38. 权利要求 28 至 37 中任一项所述的方法，其中所述对象患有代谢疾病或状况。

39. 权利要求 38 所述的方法，所述代谢疾病或状况是超重、体重增加、肥胖、非酒精性脂肪肝疾病、糖尿病、胰岛素抗性、酒精性脂肪肝疾病、血脂异常、脂肪变性（例如，肝脂肪变性、心脏脂肪变性、肾脂肪变性、肌肉脂肪变性）、无 β 脂蛋白血症、糖原贮积病、韦－克病、脂肪营养不良；肝疾病，肝炎症、肝炎、脂肪肝炎、丙型肝炎、基因型 3 丙型肝炎、α 1- 抗胰蛋白酶缺乏、妊娠期急性脂肪肝、威尔逊病；肾病；心脏病，高血压、局部缺血、心力衰竭、心肌病；中毒；HIV；神经退行性疾病，帕金森病、阿尔茨海默病；癌症，或体育锻炼。

40. 权利要求 38 所述的方法，其中所述代谢疾病或状况是进食障碍、厌食症、饥饿、营养不良、全肠胃外营养、严重的体重下降、体重不足、再喂养综合征；胃肠道手术介导的代谢改变、空肠－髂骨旁路术、胃旁路术；以及炎性 / 感染性状况、细菌过度生长的空肠憩室病或炎性肠病。

41. 权利要求 28 至 40 中任一项所述的方法，其中所述对象未患癌症。

42. 权利要求 39 或 40 所述的方法，其中所述代谢疾病或状况不是癌症。

43. 一种调节对象中的细胞毒 T(CD8 $^{+}$T) 细胞功能的方法，所述方法包括向需要这种治疗的对象施用有效提高或降低 CD8^{+}T 细胞中 MCJ 多肽的活性之量的 MCJ 调节化合物，其中提高 MCJ 多肽活性提高 CD8^{+}T 细胞中线粒体的去极化，而降低 MCJ 多肽活性降低 CD8^{+}T 细胞

中线粒体的去极化，并且其中线粒体去极化的提高或降低调节所述对象中的细胞毒 T 细胞功能。

44. 权利要求 43 所述的方法，其中提高 MCJ 多肽活性包括提高所述细胞中 MCJ 多肽的水平或功能。

45. 权利要求 43 所述的方法，其中降低 MCJ 多肽活性包括降低所述细胞中 MCJ 多肽的水平或功能。

46. 权利要求 43 至 45 中任一项所述的方法，其中在药物组合物中施用所述 MCJ 调节化合物。

47. 权利要求 46 所述的方法，其中所述药物组合物还包含可药用载体。

48. 权利要求 46 或 47 所述的方法，其中所述药物组合物还包含靶向剂。

49. 权利要求 48 所述的方法，其中所述靶向剂是线粒体靶向剂。

50. 权利要求 43 至 49 中任一项所述的方法，其中所述 MCJ 调节化合物包括 MCJ 分子、抗 MCJ 多肽抗体或其功能片段、小分子 MCJ 抑制剂或小分子 MCJ 增强剂。

51. 权利要求 50 所述的方法，其中所述 MCJ 分子是 MCJ 多肽或者编码 MCJ 多肽的核酸。

52. 权利要求 43 至 51 中任一项所述的方法，其中所述对象未患癌症。

53. 一种组合物，其包含 MCJ 调节化合物和可药用载体。

54. 权利要求 53 所述的组合物，其还包含线粒体靶向剂。

55. 权利要求 53 或 54 所述的组合物，其中所述 MCJ 调节化合物包括 MCJ 分子、抗 MCJ 多肽抗体或其功能片段、小分子 MCJ 抑制剂或小分子 MCJ 增强剂。

56. 权利要求 55 所述的组合物，其中所述 MCJ 分子是 MCJ 多肽或者编码 MCJ 多肽的核酸。

57. 一种确定对象中存在或不存在代谢疾病或状况的方法，所述方法包括：

获得来自对象的生物样品；

测量所述生物样品中 MCJ 分子的水平；以及

将 MCJ 分子的测量水平与对照水平进行比较，其中与所述对照水平相比所述生物样品中改变的 MCJ 分子水平指示了所述对象中存在或不存在代谢疾病或状况。

58. 权利要求 57 所述的方法，其中所述 MCJ 分子是 MCJ 多肽或者编码 MCJ 多肽的核酸。

59. 权利要求 57 或 58 所述的方法，其中与对照水平相比，所述生物样品中 MCJ 分子的水平降低。

60. 权利要求 57 或 58 所述的方法，其中与对照水平相比，所述生物样品中 MCJ 分子的水平提高。

61. 权利要求 57 所述的方法，其中测量 MCJ 分子水平包括测量 MCJ 分子的量和 / 或功能。

62. 权利要求 57 所述的方法，其还包括至少部分地基于对所述对象中代谢疾病或状况存在或不存在进行确定来为所述对象选择治疗策略。

63. 权利要求 62 所述的方法，其中所述治疗策略包括向所述对象施用用于代谢疾病或状况的药物或者行为治疗。

64. 权利要求 62 所述的方法，其中所述治疗策略包括停止向所述对象施用用于代谢疾病或状况的药物或者行为治疗。

65. 权利要求 60 所述的方法，其中所述代谢疾病或状况是超重、体重增加、肥胖、非酒精性脂肪肝疾病、糖尿病、胰岛素抗性、酒精性脂肪肝疾病、血脂异常、脂肪变性（例如，肝脂肪变性、心脏脂肪变性、肾脂肪变性、肌肉脂肪变性）、无 β 脂蛋白血症、糖原贮积病、韦 - 克病、脂肪营养不良；肝疾病，肝炎症、肝炎、脂肪肝炎、丙型肝炎、基因型 3 丙型肝炎、α 1- 抗胰蛋白酶缺乏、妊娠期急性脂肪肝、威尔逊病；肾病；心脏病，高血压、局部缺血、心力衰竭、心肌病；中毒；HIV；神经退行性疾病，帕金森病、阿尔茨海默病；癌症，或体育锻炼。

66. 权利要求 59 所述的方法，其中所述代谢疾病或状况是进食障碍、厌食症、饥饿、营养不良、全肠胃外营养、严重的体重下降、体重不足、再喂养综合征；胃肠道手术介导的代谢改变、空肠 - 髂骨旁路术、胃旁路术；以及炎性 / 感染性状况、细菌过度生长的空肠憩室病或炎性肠病。

67. 权利要求 57 至 66 中任一项所述的方法，其还包括治疗所述对象中确定存在的代谢疾病或状况。

用于代谢调节的方法和组合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据 35 U.S.C. §119(e) 要求于 2012 年 7 月 11 日提交的美国临时申请 No.61/670345 的权益，其内容通过引用整体并入本文。

[0003] 政府利益

[0004] 本发明是在国立卫生研究院授予的 R21 CA 127099 的政府支持下完成的。政府具有本发明的某些权益。

技术领域

[0005] 本发明部分地涉及可用于调节代谢功能的方法和组合物。

背景技术

[0006] 共伴侣分子 (co-chaperone) 直接地或通过募集其他蛋白质间接地调节伴侣分子 (主要是热休克蛋白 (HSP)) 的活性 (Walsh 等，2004，EMBORep 5，567-571)。虽然已经对伴侣分子的调节和作用进行了广泛研究，但对于大量经鉴定的共伴侣分子的功能依然所知甚少。DnaJ 家族共伴侣分子是最大的并且是最多样化的，在人中具有 49 种经鉴定的成员。其特征为存在高度保守的 70 个 aa 的 J 结构域，所述结构域包含与 HSP70 家族成员的 ATP 酶结构域结合并且促进其 ATP 酶活性的 His-Pro-Asp 基序 (Walsh 等，2004，EMBO Rep 5，567-571 ；Mitra 等，2009，Clin Exp Metastasis 26，559-567 ；Sterrenberg 等，2011，Cancer Lett 312，129-142)。根据是否存在 J 结构域以外的序列以及所述序列的性质，该家族的成员被分为三个亚家族 (DnaJA、DnaJB 和 DnaJC 亚家族)(Kampinga 等，2009，Cell Stress Chaperones 14，105-111)。DnaJA 亚家族包含 Gly/Phe(G/F) 富含区域和 Cys 重复区域，而 DnaJB 亚家族包含 G/F 区域，但是缺少 Cys 重复区域。DnaJC 亚家族成员高度多样化。其缺少 G/F 和 Cys 重复区域二者，而其 J 结构域可位于蛋白质中的任何位置。但是，大部分 DnaJC 成员具有较少表征的非经典结构域，这些结构域似乎提供了用于伴侣结合的特异性和功能。

[0007] DnaJ 共伴侣分子能够以不依赖于 DnaJ 结构域的方式与 HSP 以外的蛋白质相互作用以介导特定功能 (Sterrenberg 等，2011 Cancer Lett 312，129-142)。但是，仅鉴定了少量靶标。在线粒体内，已经表明 DNA 聚合酶 γ (Polga) 与 Tid1 相互作用 (Hayashi 等，2006Nat Med12，128-132)，最近的研究还鉴定出 p53 是另一种潜在靶标 (Ahn 等，2010 Oncogene 29，1155-1166)。最近发现 DnaJA1 与 B 细胞中的腺苷诱导脱氨酶 (Adenosin Induced Deaminase，AID) 相互作用并在类别转换重组期间调节其活性 (Orthwein 等，EMBO J 2011 Nov 15 ；31(3) ：679-91)。DnaJ 共伴侣分子在癌症中的作用在于已经开始研究的这些蛋白质的功能方面，虽然主要是在细胞系中 (Mitra 等，2009，Clin Exp Metastasis 26，559-567)。另外，在小鼠中仅鉴定出了人 DnaJ 蛋白质的少量直系同源物 (例如，DnaJC10/ERdj5、DnaJB6/Mrj 和 DnaJA3/Tid1、DnaJA1/DjA1)(Terada 等，2005，EMBO J 24，611-622 ；Hosoda 等，2010，Biochem J 425，117-125 ；Lo 等，2004，Mol Cell Biol24，2226-2236 ；

Hunter 等,1999,Development126,1247-1258)。

[0008] 缺少已知结构域以及存在很少表征的非经典结构域使得难以对大部分 DnaJC 家族成员的功能进行表征。因此,尽管在人中鉴定了大量的 DnaJ 共伴侣分子,但是对于其在正常状况和疾病状况下的功能依然所知不多。

发明内容

[0009] 根据本发明的一个方面,提供了用于治疗对象中的代谢疾病或状况的方法。所述方法包括向需要这种治疗的对象施用有效量的 MCJ 调节化合物以治疗所述对象中的代谢疾病或状况。在一些实施方案中,MCJ 调节化合物降低对象中的 MCJ 多肽活性并且提高对象中的线粒体代谢活性。在一些实施方案中,降低 MCJ 多肽活性包括降低 MCJ 多肽水平或功能。在一些实施方案中,MCJ 调节化合物提高对象中的 MCJ 多肽活性并且降低对象中的线粒体代谢活性。在一些实施方案中,提高 MCJ 多肽活性包括提高 MCJ 多肽水平或功能。在某些实施方案中,所述方法还包括降低对象的热量摄取水平。在一些实施方案中,在向对象施用 MCJ 调节化合物之前、同时和 / 或之后降低热量摄取水平。在一些实施方案中,代谢疾病或状况是超重、体重增加、肥胖、非酒精性脂肪肝疾病、糖尿病、胰岛素抗性、酒精性脂肪肝疾病、血脂异常、脂肪变性 (例如,肝脂肪变性、心脏脂肪变性、肾脂肪变性、肌肉脂肪变性)、无 β 脂蛋白血症 (abeta-lipoproteinemia)、糖原贮积病、韦 - 克病 (Weber-Christian disease)、脂肪营养不良 ;肝疾病,肝炎症、肝炎、脂肪肝炎、丙型肝炎、基因型 3 丙型肝炎、α 1- 抗胰蛋白酶缺乏、妊娠期急性脂肪肝、威尔逊病 (Wilson disease) ;肾病 ;心脏病,高血压、局部缺血、心力衰竭、心肌病 ;中毒 ;HIV ;神经退行性疾病,帕金森病 (Parkinson's disease)、阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease) ;癌症,或体育锻炼。在本发明的一些实施方案中,代谢疾病或状况是高胆固醇,并且降低 MCJ 活性可用在减少细胞、组织或对象中的胆固醇的方法中。在某些实施方案中,代谢疾病或状况是进食障碍、厌食症、饥饿 (starvation)、营养不良、全肠胃外营养、严重的体重下降、体重不足、再喂养综合征 (re-feeding syndrome) ;胃肠道手术介导的代谢改变、空肠 - 髂骨旁路术 (jejuno-ilial bypass)、胃旁路术 ;以及炎性 / 感染性状况、细菌过度生长的空肠憩室病 (juiunal diverticulosis) 以及炎性肠病。在一些实施方案中,对象是禁食对象。在一些实施方案中,治疗代谢疾病或状况包括增强或抑制细胞毒 T 细胞活性。在一些实施方案中,在药物组合物中施用 MCJ 调节化合物。在某些实施方案中,药物组合物还包含可药用载体。在一些实施方案中,药物组合物还包含靶向剂 (targeting agent)。在一些实施方案中,靶向剂是线粒体靶向剂。在一些实施方案中,MCJ 调节化合物包括 MCJ 分子、抗 MCJ 多肽抗体或其功能片段、小分子 MCJ 抑制剂、或小分子 MCJ 增强剂。在某些实施方案中,MCJ 分子是 MCJ 多肽或者编码 MCJ 多肽的核酸。在一些实施方案中,所述对象未患癌症。在一些实施方案中,代谢疾病或状况不是癌症。在某些实施方案中,所述方法还包括提高对象的热量摄取水平。在一些实施方案中,在向对象施用 MCJ 调节化合物之前、同时和 / 或之后提高热量摄取水平。

[0010] 根据本发明的另一个方面,提供了改变细胞中线粒体代谢的方法。所述方法包括使细胞与有效量的外源 MCJ 调节化合物相接触以改变细胞中的线粒体代谢,其中提高 MCJ 多肽活性的 MCJ 调节化合物降低细胞中的线粒体代谢,而降低 MCJ 多肽活性的 MCJ 调节化

合物提高细胞中的线粒体代谢。在一些实施方案中，提高 MCJ 多肽活性包括提高细胞中 MCJ 多肽的水平或功能。在某些实施方案中，降低 MCJ 多肽活性包括降低细胞中 MCJ 多肽的水平或功能。在一些实施方案中，线粒体代谢包括线粒体呼吸。在一些实施方案中，细胞在体外。在一些实施方案中，细胞在体内。在某些实施方案中，细胞在对象中，并且所述接触包括向对象施用 MCJ 调节化合物。在一些实施方案中，所述对象是禁食对象。在一些实施方案中，所述对象是具有提高的热量摄取水平的对象。在某些实施方案中，在药物组合物中施用 MCJ 调节化合物。在一些实施方案中，药物组合物还包含可药用载体。在一些实施方案中，药物组合物还包含靶向剂。在一些实施方案中，靶向剂是线粒体靶向剂。在某些实施方案中，MCJ 调节化合物包括 MCJ 分子、抗 MCJ 多肽抗体或其功能片段、小分子 MCJ 抑制剂，或小分子 MCJ 增强剂。在一些实施方案中，MCJ 分子是 MCJ 多肽或者编码 MCJ 多肽的核酸。在一些实施方案中，MCJ 调节化合物包含线粒体靶向剂。在某些实施方案中，所述对象患有代谢疾病或状况。在一些实施方案中，所述代谢疾病或状况是超重、体重增加、肥胖、非酒精性脂肪肝疾病、糖尿病、胰岛素抗性、酒精性脂肪肝疾病、血脂异常、脂肪变性（例如，肝脂肪变性、心脏脂肪变性、肾脂肪变性、肌肉脂肪变性）、无 β 脂蛋白血症、糖原贮积病、韦－克病、脂肪营养不良；肝疾病，肝炎症、肝炎、脂肪肝炎、丙型肝炎、基因型 3 丙型肝炎、α 1- 抗胰蛋白酶缺乏、妊娠期急性脂肪肝、威尔逊病；肾病；心脏病，高血压、局部缺血、心力衰竭、心肌病；中毒；HIV；神经退行性疾病，帕金森病、阿尔茨海默病；癌症，或体育锻炼。在本发明的一些实施方案中，代谢疾病或状况是高胆固醇，并且降低 MCJ 活性可用在降低细胞、组织或对象中的胆固醇的方法中。在一些实施方案中，代谢疾病或状况是进食障碍、厌食症、饥饿、营养不良、全肠胃外营养、严重的体重下降、体重不足、再喂养综合征；胃肠道手术介导的代谢改变、空肠－髂骨旁路术、胃旁路术；以及炎性 / 感染性状况、细菌过度生长的空肠憩室病或炎性肠病。在某些实施方案中，所述对象未患癌症。在一些实施方案中，所述代谢疾病或状况不是癌症。

[0011] 根据本发明的另一个方面，提供了调节对象中的细胞毒 T($CD8^+T$) 细胞功能的方法。所述方法包括向需要这种治疗的对象施用有效提高或降低 $CD8^+T$ 细胞中 MCJ 多肽的活性之量的 MCJ 调节化合物，其中提高 MCJ 多肽活性提高了 $CD8^+T$ 细胞中线粒体的去极化，而降低 MCJ 多肽活性降低了 $CD8^+T$ 细胞中线粒体的去极化，并且其中线粒体去极化的提高或降低调节对象中的细胞毒 T 细胞功能。在一些实施方案中，提高 MCJ 多肽活性包括提高细胞中 MCJ 多肽的水平或功能。在某些实施方案中，降低 MCJ 多肽活性包括降低细胞中 MCJ 多肽的水平或功能。在一些实施方案中，在药物组合物中施用 MCJ 调节化合物。在一些实施方案中，药物组合物还包含可药用载体。在某些实施方案中，药物组合物还包含靶向剂。在一些实施方案中，靶向剂是线粒体靶向剂。在一些实施方案中，MCJ 调节化合物包括 MCJ 分子、抗 MCJ 多肽抗体或其功能片段、小分子 MCJ 抑制剂，或小分子 MCJ 增强剂。在一些实施方案中，MCJ 分子是 MCJ 多肽或者编码 MCJ 多肽的核酸。在某些实施方案中，所述对象未患癌症。

[0012] 根据本发明的另一个方面，提供了包含 MCJ 调节化合物和可药用载体的组合物。在一些实施方案中，组合物还包含线粒体靶向剂。在一些实施方案中，MCJ 调节化合物包括 MCJ 分子、抗 MCJ 多肽抗体或其功能片段、小分子 MCJ 抑制剂，或小分子 MCJ 增强剂。在一些实施方案中，MCJ 分子是 MCJ 多肽或者编码 MCJ 多肽的核酸。

[0013] 根据本发明的又一个方面，提供了确定对象中存在或不存在代谢疾病或状况的方法。所述方法包括获得来自对象的生物样品；测量所述生物样品中 MCJ 分子的水平；以及将 MCJ 分子的测量水平与对照水平进行比较，其中与对照水平相比生物样品中改变的 MCJ 分子水平指示着对象中存在或不存在代谢疾病或状况。在一些实施方案中，MCJ 分子是 MCJ 多肽或者编码 MCJ 多肽的核酸。在某些实施方案中，与对照水平相比，生物样品中 MCJ 分子的水平降低。在一些实施方案中，与对照水平相比，生物样品中 MCJ 分子的水平提高。在一些实施方案中，测量 MCJ 分子水平包括测量 MCJ 分子的量和 / 或功能。在一些实施方案中，所述方法还包括，至少部分地基于对所述对象中代谢疾病或状况存在或不存在进行确定来为所述对象选择治疗策略。在某些实施方案中，治疗策略包括向对象施用用于代谢疾病或状况的药物或者行为治疗。在一些实施方案中，治疗策略包括停止向对象施用用于代谢疾病或状况的药物或者行为治疗。在一些实施方案中，代谢疾病或状况是超重、体重增加、肥胖、非酒精性脂肪肝疾病、糖尿病、胰岛素抗性、酒精性脂肪肝疾病、血脂异常、脂肪变性（例如，肝脂肪变性、心脏脂肪变性、肾脂肪变性、肌肉脂肪变性）、无 β 脂蛋白血症、糖原贮积病、韦 - 克病、脂肪营养不良；肝疾病，肝炎症、肝炎、脂肪肝炎、丙型肝炎、基因型 3 丙型肝炎、α 1- 抗胰蛋白酶缺乏、妊娠期急性脂肪肝、威尔逊病；肾病；心脏病，高血压、局部缺血、心力衰竭、心肌病；中毒；HIV；神经退行性疾病，帕金森病、阿尔茨海默病；癌症，或体育锻炼。在本发明的一些实施方案中，代谢疾病或状况是高胆固醇。在一些实施方案中，代谢疾病或状况是进食障碍、厌食症、饥饿、营养不良、全肠胃外营养、严重的体重下降、体重不足、再喂养综合征；胃肠道手术介导的代谢改变、空肠 - 髂骨旁路术、胃旁路术；以及炎性 / 感染性状况、细菌过度生长的空肠憩室病或炎性肠病。在某些实施方案中，所述方法还包括治疗对象中确定存在的代谢疾病或状况。

[0014] 本发明并未旨在局限于必须满足本发明所提及的任何目的或特征中的一个或更多个的系统和方法。同样重要的是应注意，本文不限于本发明所述示例性或原始实施方案。本领域普通技术人员进行的修改和替换被认为包含在本发明的范围内。

[0015] 序列简述

[0016] SEQ ID NO：1 是GENBANK®登记号 AAD38506.1 给出的人含 DNAJ 结构域之蛋白质 MCJ 的氨基酸序列。

[0017] SEQ ID NO：2 是GENBANK®登记号 AF126743.1 给出的人含 DNAJ 结构域之蛋白质 MCJ 的 mRNA 序列。

[0018] SEQ ID NO：3 是小鼠含 DNAJ 结构域之蛋白质的氨基酸序列。

[0019] SEQ ID NO：4 是GENBANK®登记号 AAH95400.1 给出的人 DnaJ(Hsp40) 亚家族 C 同系物的氨基酸序列。

[0020] SEQ ID NO：5 是GENBANK®登记号 BC095400.1 给出的人 DnaJ(HSP40) 亚家族 C 同系物的核苷酸序列。

[0021] SEQ ID NO：6 来自 MCJ 内含子 1 的区域的正向引物。

[0022] SEQ ID NO：7 来自 MCJ 内含子 1 的区域的反向引物。

[0023] SEQ ID NO：8MCJ 的正向引物。

[0024] SEQ ID NO：9MCJ 的反向引物。

[0025] SEQ ID NO:10MCJ 的探针。

[0026] SEQ ID NO:11 :MCJ 的正向引物。

[0027] SEQ ID NO:12MCJ 的反向引物。

[0028] 附图简述

[0029] 图 1 示出了小鼠和人 MCJ/DnaJC15 的氨基酸序列、印迹图像以及说明特定组织分布的图。图 1A 示出了人 MCJ/DnaJC15 的蛋白质序列(上方序列)SEQ ID NO:1 及其小鼠中的直系同源物的蛋白质序列(下方序列)SEQ ID NO:3 的比对。两个序列的氨基酸的差异以比对比较示出。图 1B 示出了使用特异性小鼠 mcj 探针的小鼠正常组织聚 A mRNA 的 Northern 印迹分析。图 1C 示出了使用特异性人 mcj 探针的人正常组织聚 A mRNA 的 Northern 印迹分析。图 1D 是示出了使用来自小鼠 B 细胞、CD4T 细胞和 CD8T 细胞的 RNA 通过针对 mcj 的实时 RT-PCR 获得的相对 MCJ 表达的图。mRNA 水平相对于 β-2 微球蛋白归一化。图 1E 示出了来自用小鼠 mcj 表达质粒 (mMCJ) 或空质粒 (Cont) 转染的 293T 细胞的全细胞提取物的印迹,其通过 Western 印迹分析检查小鼠 MCJ 表达 (MCJ)。检查肌动蛋白作为上样对照。图 1F 示出了表示通过 Western 印迹分析检查的小鼠肝脏、心脏、肾和肺中内源 MCJ 蛋白表达的印迹。检查肌动蛋白表达作为上样对照。图 1G 是表示通过 Western 印迹分析检查的小鼠 CD4T 细胞和 CD8T 细胞中内源 MCJ 蛋白表达的印迹。

[0030] 图 2 示出了显微照相图像和印迹,其证明内源 MCJ 定位于线粒体。图 2A 和 B 示出了来自野生型小鼠的纯化 CD8T 细胞(图 2A)和心脏(图 2B)中内源 MCJ 的免疫电子显微镜分析。电子致密金颗粒代表 MCJ(箭头指向典型的免疫反应性)。图 2A 和图 2B 右侧小图表示左图中更高放大率的插图区域,m =线粒体 ;mf =肌原纤维。20,000× 放大率。条形指示 200nm 比例。图 2C 示出了 MCJ 转染的 293T 细胞中 MCJ 的免疫电子显微镜分析结果。电子致密金颗粒代表 MCJ。条形指示 200nm 比例。示出了膨胀线粒体 (m)。图 2 还示出了 MCJ 感染的 293T 细胞中 MCJ(图 2D)和 mitotracker(图 2E)的共聚焦显微术分析,图 2F 示出了 MCJ 和 mitotracker 的重叠。细胞核用 TOPRO(蓝色)染色。图 2G-I 是示出了来自(图 2G)小鼠心脏、(图 2H)小鼠 CD8T 细胞和(图 21)人 MCF7 细胞的纯化的细胞溶质 (Cyt) 和线粒体 (Mito) 提取物中通过 Western 印迹以及分析检查的 MCJ 表达的印迹。使用 GAPDH 作为细胞溶质部分的标记物,CoxIV 作为线粒体部分的标志物。

[0031] 图 3 提供了表明 MCJ 使线粒体去极化并且降低 ATP 水平的图。图 3A 是示出了在培养基中孵育的 MCF7 细胞和 MCF7/siMCJ 细胞 (10^4细胞)中胞内 ATP 水平的图。图 3B 是示出了在培养基或鱼藤酮 (Roten)(10 μM) 中孵育 (4 小时)后 MCF7/siMCJ 细胞中胞内 ATP 水平的图。图 3C 是示出了用 MCJ 表达构建体 (MCJ) 或对照 (Cont) 转染 (16 小时)的 293T 细胞中胞内 ATP 水平的图。图 3D 是示出了通过四甲基若丹明、乙酯、高氯酸盐 / 酯 (TMRE) 染色并且通过流式细胞术分析测定的用 MCJ 表达构建体(第一个,示为无阴影)或对照构建体(第二个,示为阴影)转染 (16、时)的 293T 细胞之膜电位的图。图 3E 是示出了通过 TMRE 染色以及流式细胞术分析测定的新鲜分离的 WT CD8T 细胞(填充的直方图)和 WT CD4T 细胞(实线直方图)中 MMP 的结果的图。图 3F 是示出了通过**MitoSox®-Red** 染色以及流式细胞术分析测定的新鲜分离的 WT CD8T 细胞(填充的直方图)和 WT CD4T 细胞(实线直方图)中 mROS 的结果的图。图 3G 是示出了如图 3E 中测定的新鲜分离的 WT CD8T 细胞(填充的直方图)和 MCJ KO CD8T 细胞(实线直方图)中 MMP 的结果的图。图 3H 是

示出了如图 3F 中测定的新鲜分离的 WT CD8T 细胞（填充的直方图）和 MCJ KO CD8T 细胞（实线直方图）中 mROS 的结果的图。图 3I 是示出了新鲜分离的 WT CD4T 细胞（填充的直方图）和 MCJ KO CD4T 细胞（实线直方图）中 MMP 的结果的图。图 3J 是示出了新鲜分离的 WT CD4T 细胞（填充的直方图）和 MCJKO CD4T 细胞（实线直方图）中如上所述测定的 mROS 的结果的图。数据代表了三个独立实验。

[0032] 图 4 提供了示出 Southern 印迹分析的结果（图 4A）的印迹图，示出了野生型 (+/+)、杂合体 (+/-) 和 MCJ KO(-/-) 小鼠中 MCJ 靶向（～ 11Kb）和野生型（～ 16Kb）等位基因。图 4B 示出了来自野生型 (WT) 和 MCJ 敲除 (KO) 小鼠的肝脏、心脏、CD4 和 CD8T 细胞的全细胞提取物中来自针对 MCJ 的 Western 印迹分析的印迹。分析肌动蛋白作为上样对照。图 4C 示出了使用分离自 WT、MCJ KO 和 MCJ 杂合小鼠的 CD8T 细胞的 RNA 通过针对 MCT 使用的 RT-PCR 获得的印迹。检测了次黄嘌呤转磷酸核糖基酶 (HPRT) 表达作为对照。

[0033] 图 5 在图 5A 中示出了通过流式细胞术分析证明来自野生型 (WT) 和 MCJ 敲除 (KO) 小鼠的淋巴结中 CD4 和 CD8T 细胞的分布的图。数值标识了每个象限群中细胞的相对百分比。图 5B 是示出用抗 CD3 和抗 CD28Ab 活化 (3 天）后的野生型 (WT)（粗线）和 MCJ 敲除 (KO)（细线）CD8T 细胞的生存力的图，在流式细胞术分析中使用 UV-Blue 染色。

[0034] 图 6 提供了证明在休眠的效应 CD8T 细胞中 MCJ 的损失维持了高的线粒体代谢的图。图 6A 是示出了通过 ^{3}H- 胸苷掺入测定的响应于抗 CD3 和抗 CD28Ab 的来自野生型 (WT) 和 MCJ 敲除 (KO) 小鼠的纯化 CD8T 细胞的增殖的图。图 6B 示出了通过 TMRE 染色确定的在用抗 CD3 和抗 CD28Ab 活化 1 天（左）或 2 天（右）后 WT CD 8T 细胞（细线）、MCJ KO CD8T 细胞（实线）和 WT CD4T 细胞（填充高的直方图）中 MMP 的图。图 6C 和 6D 是示出了来自用抗 CD3 和抗 CD28Ab 活化 2 天、洗涤并且在培养基中单独孵育 0 小时（左图）、24 小时（中图）或 48 小时（右图）的 WT CD8T（填充的直方图）和 MCJ KO CD8T 细胞（实线）的结果的图形。如图 3 中所述检查 MMP（图 6C）和 mROS（图 6D）。图 6E 是示出了用抗 CD3 和抗 CD28Ab 活化 (2 天）、洗涤、计数并且在培养基中孵育 12 小时的野生型 (WT) 和 MCJ 敲除 (KO)CD8T 细胞的图。测定了 10^{4}个细胞中的胞内 ATP 水平。图 6F 是示出了活化 2 天、洗涤并且将相等数目的细胞在培养基中单独孵育 0、24 或 48 小时的野生型 (WT) 和 MCJ 敲除 (KO)CD8T 细胞的结果的图。通过在培养基中不同时间段得到的活细胞数相对于第 2 天布板的细胞数来测定细胞存活率。图 6G 是用抗 CD3 和抗 CD28 抗体活化 2 天、在 IL-2(25U/ml) 的存在下扩增额外 2 天的来自 Thy1.1^{+} OT-1(WT) 和 MCJ KOThy1.1/1.2^{+}OT-I(KO) 小鼠的 CD8T 细胞的结果的图。将相等数目的细胞混合并转移到 Thy1.2^{+}野生型小鼠中。15 天后，收获淋巴结 (LN) 和脾并且通过流式细胞术测定供体细胞的频率。示出了相应供体细胞之间大细胞的百分比。符号表示单个小鼠。＊表示 $p < 0.05$。通过 student t 检验确定 WT 和 KO 淋巴结 (LN) 之间或 WT 和 KO 脾之间的统计学显著性。这里给出的数据代表了至少 2 个或 3 个独立实验。

[0035] 图 7 提供了示出通过MitoSox® Red 染色确定的用抗 CD3 和抗 CD28Ab 活化 1 天（左）或 2 天（右）后野生型 (WT)CD8T 细胞（细线）、MCJ 敲除 (KO)CD8T 细胞（实线）和 WT CD4T 细胞（填充的直方图）中 mROS 结果的图。

[0036] 图 8 提供了证明禁食期间 MCJ 缺陷增强肝脂质代谢的显微照相图像和图。图 8A 示出了通过 H&E 染色的来自正常或禁食 (36、时）条件下野生型 (WT) 和 MCJ 敲除 (KO) 小鼠的

肝组织形态图。条形指示200μm(正常条件,100×放大率)、100μm(正常条件,200×放大率)、100μm(禁食条件,100×放大率)和50μm(禁食条件,200×放大率)。图8B示出了用用于检测脂质的Oil Red O染色禁食(36h)的野生型(WT)和MCJ敲除(KO)小鼠的冷冻肝脏的显微切片。深色内容物指示脂质,与KO样品相比,在WO中看到了更高的水平。图8C和8D是示出了禁食的WT和MCJ KO小鼠(n=4)中血清甘油三酯水平(图8C)和FFA(图8D)的图。*表示p<0.05。通过Student t检验确定统计学显著性。。

[0037] 图9示出了正常喂食的野生型和MCJ敲除(KO)小鼠中褐色脂肪的摄像图像和显微照相图像。图9A示出了正常喂食条件下野生型和MCJKO小鼠中褐色脂肪(箭头)的图,图9B示出了正常喂食条件下野生型和MCJ KO小鼠中褐色脂肪的组织形态。条形指示100μm比例。

[0038] 图10示出了禁食36小时的野生型和MCJ敲除(KO)小鼠中褐色脂肪的摄像图像和显微照相图像。图10A示出了野生型和MCJ KO小鼠中褐色脂肪(箭头)的图,图10B示出了野生型和MCJ KO小鼠中褐色脂肪的组织形态。条形指示100μm比例。

[0039] 图11示出了表明MCJ缺陷在禁食期间促进糖原生成的图和显微照相截图。图11A示出了野生型(WT)和MCJ敲除(KO)小鼠(n=3)中禁食36小时后总体重减轻相对于初始体重的百分比。图11B示出了禁食前WT和MCJ KO小鼠的总体重。图11C示出了禁食后12小时WT和MCJ KO小鼠血液中葡萄糖水平的比较。图11D示出了禁食前和禁食期间WT和MCJ KO血液中葡萄糖水平的比较。图11E示出了禁食(36小时)后来自WT和MCJ KO小鼠的肝脏提取物中ATP浓度的比较。图11F示出了禁食后来自WT和MCJ KO小鼠的肝脏切片中的PAS染色。图11G示出了禁食(36h)或正常喂食后来自WT和MCJ KO小鼠(n=3)的肝脏提取物中糖原浓度的比较。图11H示出了禁食(36h)或正常喂食后WT和MCJ KO小鼠的肝脏重量相对于总体重的百分比。图11I示出了来自正常喂食(Cont)或禁食(Fast)36小时后的WT和MCJ KO小鼠的肝脏中糖原合成酶(GS)和PEPCK的Western印迹分析。示出了禁食状态下来自两种小鼠的肝脏。图11J示出了在4周的高胆固醇饮食之后WT和MCJ KO小鼠(n=5)的肝脏中的胆固醇含量。图11K是示出了用正常饮食喂养的WT和MCJ KO小鼠(n=4)的肝脏中胆固醇含量。*,P<0.05。通过Student t检验确定统计学显著性。误差线表示标准差。

[0040] 图12提供了证明在MCJ缺陷小鼠中延缓乳腺肿瘤生长的印迹、显微照相图像和图。图12A是示出了使用全细胞提取物通过Western印迹分析所检查的来自野生型(WT)雌性小鼠的正常乳腺(N)中或者分离自两只MMTV-PyMT小鼠(T1和T2)的乳腺肿瘤中MCJ表达的印迹。图12B是示出了使用来自MMTV-PyMT肿瘤的全细胞提取物(WE)、细胞溶质提取物(Cyt)和线粒体提取物(Mito)通过Western印迹分析所检查的MCJ表达结果的印迹。还检查了CoxIV和GAPDH。图12C是示出了使用全细胞提取物通过Western印迹分析所检查的来自正常乳腺组织(N)或来自MMTV-PyMT肿瘤(T)的线粒体提取物中MCJ表达结果的印迹。图12D是MMTV-PyMT野生型(WT)和MCJ KOMMTV-PyMT[MCJ敲除(KO)]小鼠(n=8)的Kaplan-Meier存活曲线。通过logrank检验确定统计学显著性。图12E提供了显微照相图像,其示出了来自MMTV-PyMT和MCJ KO MMTVPyMT小鼠的乳腺肿瘤的组织形态(H&E)。图12F是示出了来自MMTV-PyMT野生型(WT)小鼠(n=5)和MCJ MMTVPyMT敲除(KO)小鼠(n=6)的肿瘤的线粒体提取物中ATP水平相对于细胞溶质提取物中ATP水平的比例的

图。＊表示 $p < 0.05$。通过 student t 检验确定统计学显著性。

[0041] 图 13 提供了证明 MCJ 是线粒体呼吸链复合体 I 活性的阻遏物的印迹和结果图。图 13A 是示出了通过 Western 印迹分析检查的来自由 WT 和 MCJ KO 心脏产生的线粒体提取物的复合体 I 免疫沉淀物中的 MCJ、NDUFA9 和 NDUFS3 存在的印迹。图 13B 是示出了来自野生型 (WT) 和 MCJ 敲除 (KO) 小鼠心脏的线粒体提取物中的相对复合体 I 活性的图。图 13C 是示出了通过 Western 印迹分析检查的来自野生型 (WT) 和 MCJ 敲除 (KO) 小鼠的心脏线粒体提取物中 NDUFA9 和 MCJ 表达的印迹。图 13D 是示出了来自新鲜分离的野生型 (WT)CD4、野生型 (WT)CD8 和 MCJ 敲除 (KO)CD8T 细胞的线粒体提取物 (5μg) 中相对复合体 I 活性的图。图 13E 是示出了通过 Western 印迹分析检查的来自野生型 (WT)CD4、野生型 (WT)CD8 和 MCJ 敲除 (KO)CD8T 细胞的线粒体提取物中 MCJ、NDUFA9、NDUFS3 和肌动蛋白表达的印迹。图 13F 是通过 Western 印迹分析检验的印迹，其示出了来自 MCF7 细胞和 MCF7/siMCJ 细胞 (siMCJ) 的线粒体提取物中 NDUFA9 和 MCJ 的表达。图 13G 是纯化自 MCF7 细胞和 MCF7/siMCJ 细胞的线粒体提取物中相对复合体 I 活性的图。

[0042] 发明详述

[0043] 现已发现调节 MCJ 多肽活性的方法和化合物可用于治疗以代谢调节异常为特征之疾病和状况。MCJ/DnaJC15 充当了独特的线粒体共伴侣分子，其负调节线粒体呼吸链复合体 I 和 ATP 产生。并且已经确定了这种负反馈响应于选择性代谢压力而减弱线粒体呼吸。因此，MCJ 缺陷阻碍响应于禁食的代谢慢化，并且 MCJ 缺陷增强了线粒体脂质氧化，这导致肝脏中脂质积累降低并且防止脂肪变性。MCJ 缺陷引起的提高的线粒体呼吸还表现出延缓乳腺肿瘤生长。

[0044] DnaJ 家族共分子伴侣是最大的，在人中具有超过 49 种经鉴定成员。虽然 DnaJ 结构域在进化中高度保守，但是该家族的成员在非保守结构域、其组织表达及细胞定位方面不同。大部分脊椎动物 DnaJ 成员在初生组织中的功能依然有待阐明。在本研究中，现在首次描述了人 MCJ 的小鼠直系同源物 (DnaJC15) 及其在两种物种之间保守的特定组织分布。现已证明，MCJ 通过干扰复合体 I 活性来为线粒体呼吸链和 ATP 产生提供负反馈。更重要的是，本结果表明 MCJ 是体内代谢切换的关键调节物，这是之前对于任何其他 DnaJ 家族成员未曾报道的新功能。细胞定位影响 DnaJ 家族成员的特定功能。在多种原代 (primary) 组织和细胞中使用免疫 -EM 和生物化学分析，现已表明 MCJ 定位于线粒体，接近内膜。

[0045] 甲基化控制的 J 蛋白 (MCJ)/DnaJC15 是共伴侣分子 DnaJC 亚家族的成员。MCJ 是具有 150 个氨基酸的小蛋白质，是 DnaJC 家族的独特成员。与常见的 N 末端位置相反，其包含位于 C 末端的 J 结构域，并且其 N 末端区域与任何其他已知蛋白质都没有同源性。另外，MCJ 还包含跨膜结构域，而大部分 DnaJ 蛋白是可溶的。系统发生研究已表明，MCJ 仅存在于脊椎动物中，在脊椎动物中其高度保守 (Hatle 等，2007)。GENBANK® 登记号 AAD38506.1 的人含 DNAJ 结构域之蛋白质 MCJ 的氨基酸序列在本文中以 SEQ ID NO:1 给出。SEQ ID NO:2 是 GENBANK® 登记号 AF 126743.1 给出的人含 DNAJ 结构域之蛋白质 MCJ 的 mRNA 序列。

[0046] GENBANK® 登记号 AAH95400.1 提供了 C 亚家族的人 DnaJ(Hsp40) 同系物的氨基酸序列，其在本文中以 SEQ ID NO:4 提供。SEQ ID NO:5 是 GENBANK® 登记号

BC095400.1 给出的 C 亚家族的人 DnaJ(HSP40) 同系物的核苷酸序列。

[0047] MCJ/DnaJC15 是第一种示出在人和小鼠二者中均停留在线粒体中的 DnaJ 跨膜成员。另外，现已表明 MCJ 的功能之一是为复合体 I 提供负反馈以便在需要时降低其活性。因此，在不存在 MCJ 的情况下，复合体 I 的活性显著提高。已经鉴定了完全激活复合体 I 所必需的若干相关蛋白质 (McKenzie 和 Ryan，2010IUBMB Life62，497-502)，MCJ 是抑制其活性的少数分子之一。有趣的是，复合体 I 在进化过程中的显著变化是在脊椎动物中获得失活和活性两种形式，但在原核生物中仅鉴定到活性形式 (Clason 等，2009 J Struct Biol 169，81-88；Ohnishi 等，1998 Biochim Biophys Acta 1365，301-308)。因此，哺乳动物复合体 I 是活性形式和失活形式二者的混合物。调节这两种形式之间平衡的机制依然不清楚。由于 MCJ 来源于脊椎动物并且抑制复合体 I 活性，所以假设 MCJ 调节复合体 I 活性形式和失活形式之间的平衡。

[0048] 在其他发现之中，现已表明：(1)MCJ/DnaJC15 是线粒体复合体 I 的新的内源负调节物；(2)MCJ 缺陷导致线粒体呼吸和 ATP 的产生增强；(3)MCJ 缺陷加速肝中脂质代谢，并且防止了脂肪变性的发生；以及 (4)MCJ 对线粒体氧化磷酸化的负调控影响癌症进展。

[0049] 本发明部分涉及调节 MCJ/DnaJC15（本文也称为 MCJ 多肽）的活性（例如，水平和 / 或功能），以调节细胞、组织、器官和对象中的代谢活性。本发明的组合物、化合物和方法可用于治疗患有或有风险患上可能以异常的 MCJ 活性水平或不期望的 MCJ 多肽活性水平为特征的代谢疾病或状况的对象。本发明还部分涉及诊断和评估可能以异常的 MCJ 多肽活性为特征的代谢疾病和状况之状态的方法。因此，本发明的方法和化合物可用于治疗和评估对象中这样的代谢疾病和状况。本发明还部分涉及将对象中的 MCJ 多肽活性从初始活性水平调节到有效降低或消除代谢疾病或状况的症状和 / 或防止代谢疾病或状况的症状出现的活性水平。

[0050] 如本文使用的，对象应意指人或脊椎哺乳动物，包括但不限于狗、猫、马、山羊和灵长类动物（如猴）。因此，本发明可用于治疗人和非人对象中的疾病或状况。例如，本发明的方法和组合物可用在兽医应用中以及人的预防和治疗方案中。在本发明的一些实施方案中，对象是人。在本发明的一些实施方案中，对象未患癌症。在本发明的某些实施方案中，对象患有癌症。在某些实施方案中，对象经历热量减少，例如禁食。如本文使用的，术语“禁食”意指降低的热量摄取，其可以包括在预定时间段使给定对象的正常的热量摄取降低达 5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。在本发明的一些实施方案中，预定时间段可以是 1、2、3、4、5、6、7 天或更多天；1、2、3、4 周或更多周；1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 个月或更多个月；和 / 或 1、2、3、4、5 年或更多年。本领域技术人员能够使用本领域中已知的标准和推荐（例如，身高 / 体重表等）来评估给定对象的正常热量摄取水平和降低的热量摄取水平。如本文使用的，禁食可以被认为是用于以异常的 MCJ 多肽活性为特征的代谢疾病或状况的行为治疗。

[0051] 可以应用本发明之对象的非限制性实例是被诊断患有、怀疑患有或有风险患上代谢疾病或状况的对象。本发明的方法可以应用于在治疗之时已经被诊断患有代谢疾病或状况的对象或者被认为有风险患上患上或出现代谢疾病或状况的对象。

[0052] 在本发明的一些方面，患有代谢疾病或状况的对象是与正常对照相比具有可检测的代谢异常的对象。在本发明的某些方面，对象与正常对照相比可能不具有显著差异，但是

希望使用本文提供的方法改变对象的代谢活性。例如，与未患糖尿病或脂肪肝疾病的正常对照相比，对象可具有与对象的代谢活性异常相关联的代谢疾病，例如糖尿病或脂肪肝疾病。在另一个实例中，对象可患有希望提高对象之代谢的代谢状况，例如增加的锻炼。

[0053] 在本发明的一些方面，对象有风险患上或发生代谢疾病或状况。有风险发生代谢疾病或状况的对象是与发生代谢疾病或状况的对照风险相比发生疾病或状况的可能性提高的对象。在本发明的一些实施方案中，风险水平可能是与对照风险水平相比统计学上显著的。有风险的对象可以包括：例如，具有遗传异常的对象，所述遗传异常的存在已经被证明与更高的发生代谢疾病或状况的可能性相关；具有代谢疾病或状况的家族和/或个人病史的对象；暴露于试剂（如化学毒素）或活性（activity）的对象；和/或之前已经对代谢疾病或状况进行过治疗并且表观上缓解的对象。

[0054] 在一些代谢疾病或状况中，细胞、组织或对象中的MCJ多肽活性相对于未患代谢疾病或状况的细胞、组织或对象中的MCJ多肽活性来说可能更高。因此，在一些可以利用本发明的方法和化合物治疗的疾病和状况中，比正常高的MCJ多肽活性可以是代谢疾病或状况的特征，也可用于诊断代谢疾病或状况。某些代谢疾病或状况的特征可能不是细胞、组织或对象中比正常高的MCJ活性水平，但是可以通过降低给定对象中的MCJ多肽活性来治疗。例如，与来自未患代谢疾病或状况的样品、组织或对象的对照水平相比，对象可能具有正常的MCJ多肽活性水平，但是降低对象中的水平可能治疗该对象中的代谢疾病或状况。

[0055] 因此，本发明的一些实施方案包括以有效降低细胞、组织或对象中MCJ多肽活性的量来向细胞、组织或对象施用化合物作为对疾病或状况的治疗的方法。可以通过降低细胞、组织或对象中的MCJ多肽活性治疗以下代谢疾病和状况，例如：超重、体重增加、肥胖、非酒精性脂肪肝疾病、糖尿病、胰岛素抗性、酒精性脂肪肝疾病、血脂异常、脂肪变性（例如，肝脂肪变性、心脏脂肪变性、肾脂肪变性、肌肉脂肪变性）、无β脂蛋白血症、糖原贮积病、韦-克病、脂肪营养不良；肝疾病，包括但不限于：肝炎症、肝炎、脂肪肝炎、丙型肝炎、基因型3丙型肝炎、α1-抗胰蛋白酶缺乏、妊娠期急性脂肪肝和威尔逊病；肾病；心脏病，包括但不限于：高血压、局部缺血、心力衰竭、心肌病；中毒；HIV；神经退行性疾病，包括但不限于：帕金森病、阿尔茨海默病；体育锻炼；和癌症。

[0056] 在一些代谢疾病或状况中，细胞、组织或对象中的MCJ多肽活性相对于未患所述代谢疾病或状况的细胞、组织或对象中的MCJ多肽活性来说可能更低。因此，在一些可利用本发明发方法和化合物治疗的疾病或和状况中，比正常低的MCJ多肽活性可以是所述代谢疾病或状况的特征，也可用于诊断所述代谢疾病或状况。某些代谢疾病或状况的特征可能不是细胞、组织或对象中比正常低的MCJ活性水平，但是可以通过提高给定对象中的MCJ多肽活性来治疗。例如，与来自未患代谢疾病或状况的样品、组织或对象的对照水平相比，对象可能具有正常的MCJ多肽活性水平，但是提高对象中的水平可能治疗所述对象中的代谢疾病或状况。

[0057] 因此，本发明的一些实施方案包括以有效提高细胞、组织或对象中MCJ多肽活性的量来向细胞、组织或对象施用化合物作为对疾病或状况的治疗的方法。可以通过提高细胞、组织或对象中的MCJ多肽活性治疗以下代谢疾病和状况，例如：进食障碍，包括但不限于厌食症、饥饿、营养不良、全肠胃外营养、严重的体重下降、体重不足、再喂养综合征；胃肠道手术介导的代谢改变，包括但不限于空肠-髂骨旁路术、胃旁路术；以及炎性/感染性状

况，包括但不限于细菌过度生长的空肠憩室病和炎性肠病。

[0058] 可以根据本发明测定 MCJ 多肽活性（例如，MCJ 多肽的水平和 / 或 MCJ 多肽的功能）并且与 MCJ 多肽活性的对照值相比较。对照可以是预定值，所述预定值可以是多种形式。其可以是单截止值，例如中位数或平均值。其可以基于比较组来确定，例如具有正常的 MCJ 多肽活性量的组以及具有异常的 MCJ 多肽活性量的组。比较组的另一个实例可以是具有代谢疾病或状况的一种或更多种症状或诊断的组，以及不具有代谢疾病或状况的一种或更多种症状或诊断的组。另一种比较组可以是具有代谢疾病或状况的家族病史的组，以及不具有这种家族病史的组。可以如下设置预定值，例如，在将测试群体等分（或不等分）成多个组（如低风险组、中度风险组和高风险组）或者四分位数或五分位数时，最低四分位数或五分位数是具有最低风险（例如代谢疾病或状况的风险）和最低的 MCJ 多肽活性量的个体，最高象限或五分相位是具有最高风险（例如代谢疾病或状况的风险）和最高的 MCJ 多肽活性量的个体。

[0059] 当然，预定值将取决于所选择的特定群体。例如，与已知患有异常 MCJ 蛋白表达或存在相关的状况的群体相比，表观健康的群体将具有不同的“正常”范围。因此，选择的预定值可考虑个体或细胞所落入的类别。本领域普通技术人员仅通过常规实验就能选择合适的范围和类别。如本文使用过的，“异常”意指与正常对照相比显著不同。异常高的 MCJ 多肽活性意指相对于所选择对照高，并且可以包括与正常对照水平相比对象或细胞中的活性升高至少 0.1％、0.5％、1％、5％、10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％、150％、200％或更多。异常低的 MCJ 多肽活性意指相对于所选正常对照低，并且可以包括与正常对照水平相比对象或细胞中降低至少 0.5％、1％、5％、10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％。通常，对照是基于合适年龄段的表观健康的正常个体，或者表观健康的细胞。

[0060] 在本发明的一些方面，所确定的对象的 MCJ 多肽活性值可用作随后确定同一对象中的 MCJ 多肽活性的对照值，从而使得能够评估与对象中“基线”MCJ 多肽活性的偏离。因此，可以确定对象中的初始 MCJ 多肽活性水平，并且利用本发明的方法和化合物来降低对象中的 MCJ 多肽活性水平，以初始水平作为所述对象的对照水平。使用本发明的方法和化合物，随着对象中代谢疾病或状况的治疗，对象中的 MCJ 多肽活性相对于初始水平可降低至少 0.5％、1％、5％、10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％或更多。相似地，可以确定对象中的初始 MCJ 多肽活性水平，并且利用本发明的方法和化合物来提高对象中的 MCJ 多肽活性水平，以初始水平作为所述对象的对照水平。使用本发明的方法和化合物，随着对象中代谢疾病或状况的治疗，对象中的 MCJ 多肽活性相对于初始水平可提高至少 0.5％、1％、5％、10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％或更多。

[0061] 应理解，除了预定值外，根据本发明的对照可以是与实验材料平行测试的材料样品。实例包括来自待与实验样品平行测试的通过制备产生的对照群体或对照样品的样品。

[0062] 现在已经确定，细胞线粒体 MCJ 多肽活性水平与是否存在代谢疾病或状况相关，提高的 MCJ 多肽活性量相当于提高了对象中代谢疾病或状况的风险。与对象细胞具有较高的 MCJ 多肽活性水平时的预后相比，对象中细胞线粒体中较低的 MCJ 多肽活性水平现在也已经与对象更积极的预后相关。例如但是并不意在限于，较低的 MCJ 多肽活性水平提高了肝脏中的脂质代谢速率，并且避免了脂肪变性的发生，这导致与较高的 MCJ 多肽活性水平

相比对象中更好的预后。因此，细胞中较高的 MCJ 表达和功能水平与对象中更高可能发生代谢疾病和异常以及更坏的预后相关。本领域普通技术人员将意识到，术语较高、较低、降低、升高可表示与对照水平或值相比的相对水平或值。

[0063] 尽管未旨在受任何特定理论的束缚，认为 MCJ 停留在线粒体中，在那里其充当了线粒体呼吸链的复合体 I 的负调节物。MCJ 的损失导致复合体 I 活性升高、线粒体超极化以及 ATP 的产生增加。在不存在 MCJ 的情况下，增强的线粒体氧化磷酸化作为能量来源在饥饿期间加速了脂肪酸氧化，避免了脂质在肝脏中的积累。另外，还已发现 MCJ 缺陷延缓乳腺肿瘤的生长，这与无法减弱线粒体功能相关。

[0064] 另外，尽管未旨在受任何特定理论的束缚，认为调节 MCJ 多肽活性还与调节细胞、组织和对象中的细胞毒 T($CD8^+T$) 细胞功能相关。在一些实施方案中，本发明的方法可包括向需要这种治疗的对象施用有效提高或降低 $CD8^+T$ 细胞中 MCJ 多肽活性之量的 MCJ 调节化合物。已经发现提高 MCJ 多肽活性提高 $CD8^+T$ 细胞中线粒体的去极化，而已经发现降低 MCJ 多肽活性降低 $CD8^+T$ 细胞中线粒体的去极化。因此，施用调节 MCJ 多肽活性的化合物可用于提高或降低线粒体的去极化，从而调节对象中细胞毒 T 细胞的功能。

[0065] 治疗

[0066] 本发明在一些方面中涉及用于调节细胞、组织和 / 或对象中 MCJ 多肽活性的方法。本文使用的术语“调节”意指改变细胞中 MCJ 多肽活性的水平（例如，MCJ 多肽水平和 / 或功能）。在本发明的一些实施方案中，改变 MCJ 多肽活性包括改变细胞或组织中 MCJ 多肽的水平。因此，提高细胞中 MCJ 多肽的活性可包括提高细胞中 MCJ 多肽的水平（例如，量）。相似地，降低细胞中 MCJ 多肽的活性可包括降低细胞中 MCJ 多肽的水平（例如，量）。在本发明的一些实施方案中，可以通过提高 MCJ 多肽的表达来改变或调节 MCJ 多肽的水平。因此，本发明方法的一些实施方案可包括提高或降低细胞、组织或对象中 MCJ 多肽编码核酸的水平，这可导致细胞、组织或对象中 MCJ 多肽活性的提高。本发明方法的某些实施方案可包括通过例如向细胞、组织或对象中递送 MCJ 多肽直接提高或降低细胞、组织或对象中 MCJ 多肽的水平，以治疗以异常的 MCJ 多肽活性为特征的代谢疾病或状况。如本文其他地方所述，在本发明的一些实施方案中，可以通过本发明方法的治疗来提高或降低 MCJ 多肽或其活性的水平的细胞可包括但不限于：肝细胞、肌肉细胞、心肌细胞、循环细胞、神经元细胞、胶质细胞、脂肪细胞、皮肤细胞、造血细胞、上皮细胞、精子、卵母细胞、肌肉细胞、脂肪细胞、肾脏细胞、肝细胞或胰腺细胞。在本发明的一些实施方案中，细胞是癌细胞，其一个实例可以是肿瘤细胞。

[0067] 如本文使用的，术语“治疗”在用在疾病（如以异常的 MCJ 多肽活性为特征的代谢疾病或状况）时，可以指降低对象发生疾病或状况的可能性的预防性治疗，也可以指在对象发生疾病或状况之后为了消除疾病或状况或者降低疾病或状况的水平、防止疾病或状况恶化（例如更严重）和 / 或与不存在治疗时相比减缓疾病的进展的治疗。

[0068] 在本发明的某些实施方案中，改变 MCJ 多肽活性包括提高或降低细胞、组织或对象中 MCJ 多肽的功能。在一些这样的实施方案中，不改变 MCJ 多肽的水平，但是可改变（例如提高或降低）细胞中一种或更多种 MCJ 多肽的功能。可改变 MCJ 多肽之功能的方法的实例可以包括但不限于使 MCJ 多肽与结合 MCJ 多肽并改变其功能的抗体或其功能片段接触。例如，在本发明的一些实施方案中，可以将抑制 MCJ 功能的抗体递送到细胞中作为治疗方

案的一部分。相似地，在本发明的一些实施方案中，可以将增强或抑制 MCJ 功能的化合物施用到细胞或对象中而导致调节 MCJ 多肽活性。增强或抑制 MCJ 多肽功能和 / 或增强或抑制 MCJ 多肽水平的化合物在本文中可以称为 MCJ 调节化合物。

[0069] 在本发明的一些实施方案中，MCJ 调节化合物可以包括 MCJ 分子、抗 MCJ 多肽抗体或其功能片段、小分子 MCJ 抑制剂或小分子 MCJ 增强剂。MCJ 分子的实例包括 MCJ 多肽或编码 MCJ 多肽的核酸。如本文使用的，MCJ 调节化合物可以是调节（例如，提高或降低）细胞、组织和 / 或对象中 MCJ 多肽活性的化合物。减小或降低 MCJ 多肽活性的 MCJ 调节化合物可称为 MCJ 抑制剂化合物，而提高或增强 MCJ 多肽活性的 MCJ 调节化合物可称为 MCJ 增强剂化合物。

[0070] 因此，可以向需要治疗代谢疾病或状况的对象施用有效量的提高或降低 MCJ 多肽活性的化合物。向对象施用提高 MCJ 多肽活性的化合物或降低 MCJ 多肽活性的化合物可降低对象中的代谢疾病或状况。

[0071] 在希望使用本发明的治疗和 / 或化合物来降低 MCJ 多肽活性的某些代谢疾病和 / 或状况中，可施用 MCJ 抑制化合物。这样的代谢疾病或状况的非限制性实例包括但不限于：超重、体重增加、肥胖、非酒精性脂肪肝疾病、糖尿病、胰岛素抗性、酒精性脂肪肝疾病、血脂异常、脂肪变性（例如，肝脂肪变性、心脏脂肪变性、肾脂肪变性、肌肉脂肪变性）、无 β 脂蛋白血症、糖原贮积病、韦 - 克病、脂肪营养不良；肝疾病，包括但不限于：肝炎症、肝炎、脂肪肝炎、丙型肝炎、基因型 3 丙型肝炎、α 1- 抗胰蛋白酶缺乏、妊娠期急性脂肪肝和威尔逊病；肾病；心脏病，包括但不限于：高血压、局部缺血、心力衰竭、心肌病；中毒；HIV；神经退行性疾病，包括但不限于：帕金森病、阿尔茨海默病；体育锻炼；和癌症。在本发明的一些实施方案中，代谢疾病或状况是高胆固醇，可使用本发明的降低 MCJ 活性的方法来减少细胞、组织或对象中的胆固醇。

[0072] 在希望使用本发明的治疗和 / 或化合物来提高 MCJ 多肽活性的某些代谢状况中，可施用 MCJ 增强化合物。这样的代谢疾病或状况的非限制性实例包括但不限于：进食障碍，包括但不限于厌食症、饥饿、营养不良、全肠胃外营养、严重的体重下降、体重不足、再喂养综合征；胃肠道手术介导的代谢改变，包括但不限于空肠 - 髂骨旁路术、胃旁路术；以及炎性 / 感染性状况，包括但不限于细菌过度生长的空肠憩室病和炎性肠病。

[0073] 在本发明的一些实施方案中，用于治疗希望改变或调节 MCJ 多肽活性的代谢疾病或状况的化合物可以是 MCJ 多肽或编码 MCJ 多肽的核酸。因此，本发明方法可包括向对象施用外源 MCJ 多肽或外源 MCJ 多肽编码核酸。

[0074] 如本文使用的，术语“蛋白质”和“多肽”可互换使用，因此术语多肽可用于指全长蛋白质，也可用于指全长蛋白质的片段。如本文关于多肽、蛋白质或其片段，以及编码该多肽的核酸所使用的，术语“外源”意指向细胞或对象施用化合物，并且所述化合物并非天然存在于细胞或对象中。应理解，外源 MCJ 多肽或 MCJ 多肽编码核酸可能分别与内源 MCJ 多肽或 MCJ 多肽编码核酸在其序列方面相同，但是被施用于细胞或对象。

[0075] 根据本发明的一些方面，可以在本发明的方法中施用全长 MCJ 多肽或者全长 MCJ 多肽的片段。本发明的片段可以是保留了多肽的独特功能能力的片段。可保留在片段中的功能能力包括与抗体的相互作用以及与其他多肽或其片段的相互作用。多肽片段可以是天然片段，或者可以使用本领域已知方法合成，并且使用本文示例的方法测试功能。可用在本

发明的方法和组合物中的全长 MCJ 和 MCJ 的片段可以是重组多肽。

[0076] 全长 MCJ 多肽的片段可以包含全长 MCJ 多肽的至多 n-1 个连续氨基酸，所述全长 MCJ 多肽具有野生型 MCJ 多肽或本文所述经修饰的 MCJ 多肽序列（其中“n”等于全长 MCJ 多肽中氨基酸的数目）中发现的连续序列。因此，例如，长 150 个氨基酸之 MCJ 多肽的片段可以是 150 个氨基酸之 MCJ 多肽的至少 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140 或 149（包括之间的每个整数）个连续氨基酸。在一些实施方案中，片段包含 MCJ 多肽的 C 末端区域。作为全长 MCJ 多肽之片段的这些 MCJ 多肽可用于多种目的，包括作为 MCJ 调节化合物施用以及用于制备 MCJ 调节化合物，例如特异性结合合成和天然 MCJ 多肽的抗体。

[0077] “经修饰的”野生型或突变体全长 MCJ 多肽或者作为其片段的多肽可包括缺失、点突变、截短、氨基酸替换和 / 或氨基酸或非氨基酸部分的添加。可通过修饰编码多肽之核酸来修饰本发明的多肽，或者替选地，可直接修饰多肽，例如通过切割、添加接头分子、添加可检测部分（例如，荧光标记）等。修饰还包括含多肽氨基酸序列的全部或一部分的融合蛋白。

[0078] 一般来说，经修饰的多肽（例如，经修饰的 MCJ 野生型或突变体多肽）可包括进行了特定修饰以改变与其生理活性无关的多肽特性的多肽。例如，可替换或缺失半胱氨酸残基以避免不需要的二硫键。可在多肽的 N 末端或 C 末端添加残基，例如可以在 MCJ 多肽的 C 末端尽头处添加半胱氨酸 (C) 或其他氨基酸残基。可以合成具有修饰的 MCJ 多肽和 / 或通过选择并引入氨基酸替换、缺失或添加来在 MCJ 多肽中进行修饰。然后测试经修饰多肽的一种或更多种活性（例如，调节细胞或对象中 MCJ 多肽的活性、治疗代谢疾病或状况、改变线粒体膜的去极化等）以确定哪种修饰提供了具有期望特性的经修饰多肽。

[0079] 本领域技术人员还将认识到，可以在多肽中进行保守氨基酸替换以提供功能等效的多肽，即，保留了未经修饰的 MCJ 多肽在本发明治疗方法中的功能能力的经修饰 MCJ 多肽。本文使用的“保守氨基酸替换”是指不改变进行了氨基酸替换之多肽的相对电荷或尺寸特性的氨基酸替换。可根据改变多肽序列的方法和本领域普通技术人员已知的方法制备经修饰 MCJ 多肽。示例性功能等效的 MCJ 多肽包括 MCJ 多肽或其片段的保守氨基酸替换，例如，经修饰的 MCJ 多肽。氨基酸的保守替换包括在以下组内氨基酸之间进行的替换 :(a) M、I、L、V ;(b)F、Y、W ;(c)K、R、H ;(d)A、G ;(e)S、T ;(f)Q、N ;和 (g)E、D。

[0080] 通常通过改变编码多肽的核酸来进行 MCJ 多肽中的保守氨基酸替换。这种替换可通过本领域普通技术人员已知的多种方法进行。例如，可以通过 PCR 定向突变、定点诱变或通过化学合成编码 MCJ 多肽的基因来进行氨基酸替换。当对小的多肽片段进行氨基酸替换时，可通过直接合成多肽来进行替换。可如下测试 MCJ 多肽的功能等效片段的活性 :将编码经改变之多肽的基因克隆到细菌或哺乳动物表达载体中，将载体引入到合适的宿主细胞中，表达改变的多肽，并且如本文所公开测试多肽的功能能力。

[0081] 在本发明的一些实施方案中，可通过在遗传上将 MCJ 多肽引入到细胞和 / 或线粒体中来调节 MCJ 多肽的水平或功能，并且提供了遗传靶向地表达 MCJ 多肽的试剂和方法。可使用遗传靶向来将 MCJ 多肽递送到特定细胞类型、特定细胞亚型、生物体内的特定空间区域以及细胞内的亚细胞区域。遗传靶向还涉及控制所表达 MCJ 多肽的量和表达时间。本发明的一些实施方案包括用于遗传靶向地表达 MCJ 多肽的试剂，其中所述试剂包含有含编码

MCJ 多肽或编码 MCJ 多肽功能片段之核酸的载体。

[0082] 如本使用的，术语“载体”是指能够在不同遗传环境之间转运已与之有效连接的另一核酸的核酸分子。术语“载体”还指能够转运核酸分子的病毒或生物体。一种载体类型是附加体 (episome)，即能够在染色体外复制的核酸分子。一些有用的载体是能够自主复制和 / 或表达与之连接的核酸的那些载体。能够指导与之有效连接之基因的表达的载体在本文中称为“表达载体”。另一些有用的载体包括但不限于 :病毒，例如慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和噬菌体。可用在本发明的一些方法中的载体可以在遗传学上将 MCJ 多肽插入到分裂和未分裂的细胞中，并且可以将 MCJ 多肽插入到为体内、体外或离体细胞的细胞中。

[0083] 可用在本发明的方法中的载体可包括另外的序列，包括但不限于一种或更多种信号序列和 / 或启动子序列或其组合。表达载体及其使用方法是本领域中周知的。在本发明的某些实施方案中，载体可以是包含编码本发明 MCJ 多肽或其变体之核酸或基因的慢病毒。慢病毒是可用于产生稳定细胞系的载体的非限制性实例。本文使用的术语“细胞系”是指已建立的细胞培养物，其在给予合适培养基时将持续增殖。

[0084] 可用在本发明的方法和载体中的启动子包括但不限于 :细胞特异性启动子或通用启动子。选择和使用细胞特异性和通用启动子的方法是本领域中周知的。通用目的启动子的非限制性实例允许在广泛种类细胞类型中表达 MCJ 多肽，因此可使用在多种细胞类型中广泛表达之基因（例如，管家基因）的启动子来在多种细胞类型中表达 MCJ 多肽。在本文其他地方提供了通用启动子的非限制性实例，合适的可替选启动子是本领域中周知的。在本发明的某些实施方案中，启动子可以是诱导型启动子，其实例包括但不限于四环素开或四环素关等。

[0085] 本发明的某些方面包括施用特异性结合 MCJ 多肽的抗体或其抗原结合片段以改变 MCJ 多肽活性（例如降低 MCJ 多肽活性）的方法。在本发明的一些实施方案中，可以向细胞和 / 或对象施用这样的抗体或其抗原结合片段以抑制细胞和 / 或对象中的 MCJ 多肽活性。本文使用的术语抗体的“抗原结合片段”是指保留了特异性结合抗原（例如，MCJ 多肽）之能力的抗体的一个或更多个部分。可使用已知的方法和常规程序来制备和测试用于本发明方法的 MCJ 调节抗体的抗原结合片段。在本发明的一些实施方案中，抗体是重组抗体、多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体或嵌合抗体，或者这些抗体的混合物。

[0086] 已知特异性结合本文 SEQ ID NO :1 所示 MCJ 多肽的抗体的实例包括但不限于单克隆抗体 :i) WN.F3，由杂交瘤 N-MCJ 3C1.3F3 产生，所述细胞以 ATCC no.#PTA-8135 保藏 ;ii) WN.A12，由杂交瘤细胞系 N-MCJ3C1.5A12 产生，所述细胞以 ATCC no.#PTA-8133 保藏 ;以及 iii) 由杂交瘤细胞系 N-MCJ 2A2.5E4 产生，所述细胞以 ATCC no.#PTA-8134 保藏（参见美国专利公开 US20100129931，公开于 2010 年 5 月 27 日，其通过引用并入本文）。可以用在本发明方法中作为 MCJ 调节化合物的抗体的实例是 WN.F3、WN.A12 和 WN.E4 抗体。用于本发明方法的另外的抗体可使用本领域中已知的方法并结合本文公开内容以及美国专利公开 US20100129931 中的公开内容产生并测试。

[0087] 可在本发明治疗方法中施用的另外的化合物包括抑制 MCJ 多肽活性的小分子或化学物质，以及增强 MCJ 多肽活性的小分子或化学物质。鉴别和测试这些小分子和化学物质的方法可包括使用本领域已知的文库筛选和测试程序，并结合本文提供的教导。

[0088] 本发明的 MCJ 多肽调节化合物可单独施用，或与一种或更多种另外的化合物组合

施用。在一些实施方案中，本发明化合物可与一种或更多种其他治疗剂或治疗协同作用，并且提高一种或更多种治疗剂或活性的效果。因此，例如，结合热量减少治疗来施用抑制 MCJ 多肽活性的化合物可增强热量减少治疗的效果。因此，MCJ 抑制剂化合物可协同作用以提高可施用以治疗代谢疾病或状况的一种或更多种药剂或治疗的效果。

[0089] 应理解，可在本发明方法中鉴别并使用另外的 MCJ 调节化合物。例如，可使用本文所述测定和方法测试候选化合物提高 MCJ 多肽活性（水平和 / 或功能）的能力以及其治疗代谢疾病或状况的能力。

[0090] 在本发明的治疗方法中，本文所述本发明的 MCJ 调节化合物（例如，包含 MCJ 分子、抗 MCJ 多肽抗体或其功能片段、小分子 MCJ 抑制剂或小分子 MCJ 增强剂等的化合物）可单独使用或结合其他分子使用，例如靶向剂、标记试剂 (labeling agent) 和 / 或细胞毒素剂。

[0091] 可根据本发明方法使用的靶向剂是将本发明化合物导向特定的待治疗细胞类型或细胞器的那些试剂，所述细胞类型例如肝细胞、肌肉细胞、心肌细胞、循环细胞、神经元细胞、胶质细胞、脂肪细胞、皮肤细胞、造血细胞、上皮细胞、精子、卵母细胞、肌肉细胞、脂肪细胞、肾脏细胞、肝细胞或胰腺细胞，所述细胞器例如线粒体。靶向化合物的选择将取决于代谢疾病或状况的性质。在一些情况下，可能希望将试剂靶向骨骼肌、心肌、肾、肝、脑等。本领域普通技术人员将知道并且能够选择和使用用于本发明方法的合适的靶向剂。用于线粒体的靶向剂的非限制性实例是基于短杆菌肽 S 的线粒体靶向剂，这是使用肉碱 - 酰基肉碱移位酶系统、细胞色素、苹果酸脱氢酶的试剂。可用在本发明的一些实施方案中的靶向信号的实例由以下文献给出 :Diekert,K. 等,PNAS(1999)，第 96 卷，No.21,11752-11757 ;Addya,S. 等,J.Cell Biology,(1997) 第 139 卷，No.3,589-599 ;Del Gaizo,M 等,(2003)Mol.Gen. and Metabol. 第 80 卷，170-180，其通过引用并入本文。

[0092] 在本发明方法中可使用标记试剂以确定 MCJ 多肽在细胞和组织中的定位，其还可用于评估已施用的治疗化合物的细胞、组织或细胞器位置。附接并使用标记试剂如酶标记、染料、放射性同位素标记等的方法是本领域中周知的。

[0093] 可通过利用与其他治疗代谢疾病或状况的方法组合来增强本发明的组合物、化合物和方法。在一些情况下，治疗方法可包括施用另外的治疗剂或另外的治疗，例如药物和 / 或行为治疗、热量限制、手术等。因此，在本发明的一些实施方案中，可结合用于治疗代谢疾病或状况的疗法（例如，热量限制、增加身体活动、手术等）来施用本发明化合物（例如，施用抗 MCJ 抗体或其功能片段、MCJ 多肽编码核酸、MCJ 多肽或者小分子 MCJ 增强剂或抑制剂）。包括施用 MCJ 调节化合物的本发明治疗方法可用在代谢疾病或状况之前的任何阶段，或当代谢疾病或状况处于随后的阶段时，包括但不限于代谢疾病或状况的早期阶段、中期阶段和晚期阶段，包括任意这些阶段之前和之后的所有时间。本发明方法也可用于之前已经利用一种或更多种其他药物或行为治疗方法进行了治疗但是所述治疗在减缓或停止对象中代谢疾病或状况的进展方面不成功、最低限度地成功和 / 或不再成功的对象。

[0094] 治疗有效量

[0095] 以治疗代谢疾病或状况的有效量向对象施用本发明的 MCJ 调节化合物（例如抗 MCJ 抗体或其功能片段、MCJ 多肽编码核酸、MCJ 多肽或者小分子 MCJ 增强剂或抑制剂等）。“治疗代谢疾病或状况的有效量”是对于实现期望的生物效应而言必要的或足够的量。例

如，本发明化合物的有效量可以是（i）减缓或停止代谢疾病或状况的进展；或（ii）逆转代谢疾病或状况的一种或更多种症状的必要的量。根据本发明的一些方面，有效量是本发明化合物在单独或与另一种药物或治疗组合时的量，在预防或治疗代谢疾病或状况中，当组合或共施用或单独施用时，所述量导致对代谢疾病或状况的治疗响应。生物效应可以是改善或绝对消除代谢疾病或状况引起的症状。在另一个实施方案中，生物效应是完全消除代谢疾病或状况，如通过指示对象不具有所述疾病或状况的诊断测试所证明的。

[0096] 通常，在临床试验中确定提高 MCJ 多肽活性之化合物或药物或者降低 MCJ 多肽之化合物或药物的有效量，所述试验在盲性研究中建立受试群体相对于对照群体的有效剂量。在一些实施方案中，有效量是导致期望响应的量，例如使患有代谢疾病或状况的对象的细胞或组织中的代谢疾病或状况降低的量。因此，治疗以降低的 MCJ 多肽活性为特征的代谢疾病或状况和 / 或希望提高 MCJ 多肽活性的代谢疾病或状况的有效量可以是当施用时使对象中 MCJ 多肽活性量提高到比未施用组合物时对象或组织中发生的量高的量。相似地，治疗以提高的 MCJ 多肽活性为特征的代谢疾病或状况和 / 或希望降低 MCJ 多肽活性的代谢疾病或状况的有效量可以是当施用时使细胞、组织和 / 或对象中 MCJ 多肽活性降低到比未施用组合物或药物时对象或组织中发生的量低的量。在治疗代谢疾病或状况的情况下，期望的响应可能是降低或消除细胞、组织和 / 或对象中代谢疾病或状况的一种或更多种症状。降低或消除可以是暂时的或可以是永久性的。可使用测定 MCJ 多肽活性或编码 MCJ 多肽之核酸的水平的方法来监测代谢疾病或状况的状态。在本发明的一些方面，治疗代谢疾病或状况的期望响应也可能是延迟代谢疾病或状况的发作或甚至阻止代谢疾病或状况的发作。

[0097] 还可通过评估施用对于细胞或对象的生理作用（例如，施用后代谢疾病或状况降低）来确定调节（提高或降低）MCJ 多肽活性的化合物（在本文中也称为药物化合物）的有效量。适于确定本发明药物化合物的效力的测定是本领域技术人员已知的，并且可用于测量对于治疗的响应水平，以及可至少部分地根据这些测量值来改变向对象施用的药物化合物的量。治疗量可通过例如增加或减少治疗组合物的量、改变所施用的治疗组合物、改变施用途径、改变给药时间等而不同。有效量将随着以下因素而改变：被治疗的特定状况、被治疗对象的年龄和身体状况；状况的严重程度、治疗的持续时间、共同治疗（如有的话）的性质、特定施用途径以及健康从业者的知识和专业技术内的其他因素。例如，有效量可取决于个体具有异常低或异常高 MCJ 多肽活性水平的程度，和 / 或获得对代谢疾病或状况的有效治疗所期望的 MCJ 多肽活性水平。

[0098] 本发明化合物在治疗代谢疾病或状况或降低发生代谢疾病或状况的风险方面的有效量可根据所使用的特定化合物、化合物的递送方式以及是单独使用还是组合使用而改变。用于任何特定应用的有效量也可根据这些因素而改变，例如被治疗的代谢疾病或状况、所施用的特定化合物、对象的体型或代谢疾病或状况的严重程度。技术人员可根据经验确定本发明特定化合物的有效量，而不需要过多实验。结合本文提供的教导，通过在各种活性化合物和加权因子之间选择，可以计划出不造成大量毒性而对治疗特定对象完全有效的有效预防或治疗性治疗方案，所述加权因子例如效力、相对生物利用度、患者体重、不利副作用的严重程度和优选施用方式。

[0099] 可由个人卫生保健提供者或兽医调节药物化合物剂量，特别是在任何并发症的情

况下。治疗有效量通常在 0.01mg/kg 至约 1000mg/kg、约 0.1mg/kg 至约 200mg/kg、或约 0.2mg/kg 至约 20mg/kg 之间变化，每天施用 1 次或更多次给药，持续一天或更多天。绝对量取决于多种因素，包括同时进行的治疗、给药次数和个体对象参数，包括年龄、身体状况、体型和体重。这些是本领域普通技术人员周知的因素，仅通过常规实验就能确定。在一些实施方案中，可使用最大剂量，即，根据合理医学判断的最高安全剂量。

[0100] 还构想了本发明化合物的多次剂量。在一些情况下，本发明化合物（例如，抗 MCJ 抗体或其功能片段、MCJ 多肽编码核酸、MCJ 多肽或者小分子 MCJ 增强剂或抑制剂等）可以至少每天、每隔一天、每周、每隔一周、每月等施用。该剂量可以每天施用一次或每天超过一次，例如在一个 24 小时周期中施用 2、3、4、5 或更多次。

[0101] 本发明的药物化合物可单独施用、彼此组合和 / 或与向患有代谢疾病或状况的对象施用的其他药物治疗或其他治疗方案组合。在前述方法中使用的药物组合物优选是无菌的，并且包含有效量的治疗化合物，所述化合物在适于向对象施用的单位重量或体积下将 MCJ 多肽活性调节到足以产生期望的响应的水平。

[0102] 可根据不同参数选择向对象施用的调节 MCJ 多肽活性之组合物的剂量，特别是根据所使用的施用方式和对象的状态。其他因素包括期望的治疗时期。在施用初始剂量时对象中的响应不足的情况下，可在患者耐受允许程度内使用更高剂量（或通过不同的更加局域化的递送途径的有效更高剂量）。

[0103] 施用方法

[0104] 对于 MCJ 调节化合物，可以使用多种施用途径。所选择的特定递送方式无疑将取决于被治疗的特定状况和治疗效力所需的剂量。一般来说，本发明方法可使用任何医学上可接受的施用方式来实施，意指产生有效的保护水平而不造成临床上不可接受的副作用的方式。在本发明的一些实施方案中，可经口、肠、粘膜、经皮和 / 或肠胃外途径来施用本发明的化合物。术语“肠胃外”包括皮下、静脉内、肌内、腹膜内和胸骨内注射或输注技术。其他途径包括但不限于鼻（例如，通过胃 - 鼻管）、真皮、阴道、直肠和舌下。本发明的递送途径可包括鞘内、心室内或颅内。在本发明的一些实施方案中，可将本发明化合物放置在缓释基质中并通过将基质放置在对象中来施用。在本发明的一些方面，可使用包被有靶向特定细胞或细胞器（非限制性实例是线粒体）的递送剂 (delivery agent) 的纳米颗粒来将化合物（例如，抗 MCJ 抗体或其功能片段、MCJ 多肽编码核酸、MCJ 多肽或者小分子 MCJ 增强剂或抑制剂等）递送到对象细胞。

[0105] 可以在制剂中施用本发明化合物，所述制剂可以在可药用溶液剂中施用，所述溶液剂通常可包含可药用浓度的盐、缓冲剂、防腐剂、相容载体、佐剂和任选的其他治疗成分。根据本发明方法，可以在药物组合物中施用所述化合物。通常，药物组合物包含本发明的化合物和可药用载体。可药用载体是本领域普通技术人员周知的。如本文使用的，可药用载体意指不干扰活性成分的生物活性效力的无毒材料，例如化合物（例如，抗 MCJ 抗体或其功能片段、MCJ 多肽编码核酸、MCJ 多肽或者小分子 MCJ 增强剂或抑制剂等）治疗代谢疾病或状况的能力。

[0106] 可药用载体包括稀释剂、填充剂、盐、缓冲剂、稳定剂、增溶剂和其他本领域中周知的材料。示例性可药用载体描述在美国专利 No. 5,211,657 中，其他的是本领域技术人员已知的。这些制剂通常可包含盐、缓冲剂、防腐剂、相容载体和任选地其他治疗剂。当在药物

中使用时，盐应是可药用盐，但是非可药用盐可方便地用于制备其可药用盐，其并未排除于在本发明的范围之外。这些药理学上和药学上可接受的盐包括但不限于由以下酸制备的那些：盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、马来酸、乙酸、水杨酸、柠檬酸、甲酸、丙二酸、琥珀酸等。另外，可由碱金属盐或碱土金属盐制备可药用盐，例如钠盐、钾盐或钙盐。

[0107] 本发明化合物可直接向组织施用。在一些实施方案中，施用化合物的组织是可能出现代谢疾病或状况的组织。直接的组织施用可通过直接注射来实现。化合物可施用一次，或替选地其可施用多次。如果施用多次，化合物可通过不同途径施用。例如，第一次（或开始几次）施用可直接施用到受影响的组织中，而随后的施用可以是全身性的。

[0108] 当希望全身性递送时，可将化合物配制成用于通过注射肠胃外施用，例如，通过快速浓注或持续输注。用于注射的制剂可以单位剂型（例如，在安瓿中或在多剂量容器中）存在，添加或不添加防腐剂。组合物可采取以下形式：如在油或水性载体中的混悬剂、溶液剂或乳剂，并且可包含配制剂，例如助悬剂、稳定剂和 / 或分散剂。

[0109] 用于肠胃外施用的制剂包括无菌水性或非水性溶液剂、混悬剂和乳剂。非水性溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油（如橄榄油）和注射用有机酯（例如油酸乙酯）。水性载体包括水、醇 / 水溶液剂、乳剂或混悬剂，包含盐和缓冲介质。肠胃外载剂包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格液或不挥发油。静脉内载剂包括液体和营养补充物、电解质补充物（例如基于林格氏葡萄糖的那些）等。还可存在防腐剂和其他添加剂，例如抗菌剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。由其他施用形式（例如静脉内施用）将产生较低剂量。在患者对所施用的初始剂量响应不足的情况下，可在患者耐受允许程度之内使用更高剂量（或通过不同的更加局域化的递送途径实现的有效更高剂量）。可根据需要每天使用多个剂量以获得合适的全身或局部化合物水平。

[0110] 在另一些实施方案中，递送载体是适合于植入到哺乳动物接受者中的生物相容性微粒或植入物。可根据该方法使用的示例性生物可腐蚀植入物描述在 PCT 公开 No. WO 95/24929（通过引用并入本文）中，其描述了用于包含生物大分子的生物相容性生物可降解聚合物基质。这些递送方式是本领域技术人员周知的，并且可用于在对象中实现得本发明化合物的持续释放，并且可选择为不降解而是通过扩散在延长的时间段内释放。

[0111] 可使用非生物可降解和生物可降解聚合物基质二者来向对象递送本发明化合物。在一些实施方案中，基质可以是生物可降解的。基质聚合物可以是天然或合成聚合物。可基于所希望的释放时间段（通常为数小时至一年或更久）来选择聚合物。通常，可使用数小时和三至十二个月之间的释放时期。聚合物可选地为水凝胶形式，其可吸收高达其重量的约 90％的水，并且任选地，进一步与多价离子或其他聚合物交联。

[0112] 通常，可使用生物可腐蚀植入物通过扩散或通过聚合物基质的降解来递送本发明化合物。用于这些用途的示例性合成聚合物是本领域中周知的。可使用生物可降解聚合物和非生物可降解聚合物使用过本领域已知方法来递送本发明的化合物。可使用生物粘附聚合物（如生物可腐蚀水凝胶）（参见，H. S. Sawhney，C. P. Pathak 和 J. A. Hubell，Macromolecules 中，1993，26，581-587，其教导并入本文）递送本发明化合物用于治疗。另外的合适递送系统可包括时间释放、延迟释放或持续释放递送系统。这些系统可避免重复施用本化合物，提高对象和医师的便利性。许多类型的释放递送系统是可获得并且是本领域技术人员已知的（参见，例如，美国专利 No. 5，075，109；4，452，775；4，675，189；

5,736,152 ;3,854,480 ;5,133,974 ;和 5,407,686(其教导通过引用并入本文)。另外,可使用基于泵的硬件递送系统,其中一些被改造用于植入。

[0113] 长期持续释放植入物的使用可尤其适合于对象的预防性治疗和处于发生复发的代谢疾病或状况风险之下的对象。本文使用的长期释放意指植入物被构建和设置为递送治疗水平的活性成分至少 30 天、60 天、90 天或更久。长期持续的释放植入物是本领域普通技术人员周知的,并且包括上述释放系统中的一些。

[0114] 本发明化合物的治疗性制剂可被制备成通过将具有期望纯度的化合物与任选地可药用载体、赋形剂或稳定剂混合 (Remington's Pharmaceutical Sciences 21 版,(2006)) 以冻干制剂或水溶液的形式储存。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在使用剂量和浓度下对接受者无毒,并且包括缓冲剂如磷酸、柠檬酸和其他有机酸 ;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸 ;防腐剂 (例如,十八烷基二甲基苄基氯化铵 ;氯化六烃季铵 ;苯扎氯铵、苄索氯铵 ;苯酚、丁醇或苯甲醇 ;烷基对羟基苯甲酸酯,例如甲基或丙基对羟基苯甲酸酯 ;邻苯二酚 ;间苯二酚 ;环己醇 ;3- 戊醇 ;和间甲酚) ;低分子量 (小于约 10 个残基) 多肽 ;蛋白质,例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白 ;亲水聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮 ;氨基酸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸 ;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精 ;螯合剂,例如 EDTA ;糖,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇 ;盐形成反离子,例如钠 ;金属配合物,(例如,Zn_ 糖蛋白复合体) ;和 / 或非离子表面活性剂,例如 TWEEN®、PLURONICS® 或聚乙二醇 (PEG)。

[0115] 检测试验和诊断

[0116] 本发明的某些方面包括评估以异常 MCJ 多肽活性为特征的代谢疾病或状况之状态的方法。这样的方法可包括测定 MCJ 多肽的水平或功能,并将所测得的水平或功能与对照水平或功能比较。在本发明的一些实施方案中,方法包括在检测细胞和 / 或对象中 MCJ 多肽或编码 MCJ 多肽之核酸的水平的测定中使用特异性结合 MCJ 多肽的抗体或抗原结合片段。这样的测定可包括获得来自对象的生物样品,测定生物样品中 MCJ 分子的水平,以及将所述水平与对照水平比较。本文使用的生物样品可以是体外生物样品或者可以是在体内检测 (例如,获得) 的样品。本文使用的生物样品可以是细胞样品、组织样品、血液样品、体液样品、亚细胞样品等。生物样品可包括细胞、组织或细胞器,并且可包含多种细胞类型,例如但不限于 :肝细胞、肌肉细胞、心肌细胞、循环细胞、神经元细胞、胶质细胞、脂肪细胞、皮肤细胞、造血细胞、上皮细胞、精子、卵母细胞、肌肉细胞、脂细胞、肾脏细胞、肝细胞、胰腺细胞等。在本发明的一些实施方案中,生物样品可包含一种或更多种癌细胞。在本发明的某些实施方案中,生物样品不包含癌细胞。

[0117] 用于评估以异常的 MCJ 多肽活性为特征的代谢疾病或状况的测定可包括但不限于 :(1) 表征对象中 MCJ 多肽活性对代谢疾病或状况的治疗的影响 ;(2) 评估治疗对对象中 MCJ 多肽活性 (例如,水平和 / 或功能) 的改变 ;(3) 至少部分地基于在对象细胞中测定的 MCJ 多肽活性来选择用于代谢疾病或状况的治疗 ;以及 (4) 确定对象中代谢疾病或状况的状态。因此,使用本发明方法的一些实施方案可表征对象、可监测治疗方案、可选择治疗以及可更好地理解疾病状态。例如,本发明的抗体或其抗原结合片段以及本发明的其他方法可用于测量或确定细胞和 / 或对象中的 MCJ 多肽活性,其可直接指示细胞和 / 或对象中的代谢疾病或状况。

[0118] 本发明在一些方面包括测定MCJ多肽活性的多种测定。本发明方法的可用于测定细胞、组织、对象和样品（例如，来自对象、在培养物中等）中的MCJ多肽活性（MCJ多肽的水平和/或功能）的方法，包括但不限于：结合测定，例如使用特异性结合MCJ多肽的抗体或其抗原结合片段；凝胶电泳；质谱；NMR等。可根据本发明使用的免疫测定包括但不限于：夹心型测定（sandwich-type）、竞争性结合测定、一步直接测试（one-step direct test）和两步测试，例如本领域通常使用过的那些。也可使用本领域已知的可检测标记和合适的体内方法在体内（在活的对象中）进行对特异性结合MCJ多肽的抗体之结合的评估。

[0119] 本发明的方法和测定（例如，结合测定、凝胶电泳、质谱、NMR等）可用于确定对象或细胞样品（例如，细胞培养物）中MCJ多肽活性随时间的改变。这允许监测将要进行代谢疾病或状况之治疗的对象中的MCJ多肽活性，并且还能够监测当前正进行代谢疾病或状况的治疗的对象。因此，本发明方法可用于诊断或评估对象中的代谢疾病或状况，还可用于评估代谢疾病或状况的治疗性治疗的效力，以评估不同时间点对象中MCJ多肽的活性。例如，可在开始治疗方案之前（预防或治疗代谢疾病或状况）、治疗方案期间和/或治疗方案之后测定对象的MCJ多肽活性，从而提供对象中代谢疾病或状况的状态信息。

[0120] 也可使用本发明测定在来自培养物的细胞中对提高或降低细胞或组织中MCJ多肽编码核酸或MCJ多肽的表达的候选MCJ调节化合物的效力进行评估，例如，作为筛选测定来评估调节MCJ多肽活性的候选MCJ调节化合物。改变细胞、组织或对象中MCJ多肽活性的MCJ调节化合物可用于治疗代谢疾病或状况或作为代谢疾病或状况的预处理（例如，制备用于随后处理的细胞或对象）。

[0121] 应理解，治疗方案可以是预防或治疗对象中的代谢疾病或状况。本发明在一些方面提供了可用于监测对象对于提供给对象的代谢疾病或状况之预防性治疗和/或处理的响应的方法。本发明的方法（例如，结合测定、凝胶电泳、质谱、NMR等）还可用于监测处于发生代谢疾病或状况的风险下的对象中代谢疾病或状况的发作、进展或消退。可测定在间隔的时间获自对象的两个、三个、四个或更多个生物样品中的MCJ多肽活性。可对样品中测定的MCJ多肽活性进行比较并可将活性随时间的变化用于评估对象（或者细胞或组织样品）中代谢疾病或状况的状态和阶段，和/或治疗策略对于对象（或者细胞或组织样品）中代谢疾病或状况的影响。通过提供代谢疾病或状况的指标，可用特异性结合MCJ多肽的抗体或其片段获得有用的预后信息，并且可用于为对象选择治疗，例如选择药物治疗、行为治疗、手术治疗等。

[0122] 本文所述测定可包括测定MCJ多肽活性，包括但不限于测定细胞、组织和对象中编码MCJ多肽的核酸的水平和/或测定MCJ多肽的水平。当实施本发明的多种方法时，可以多种方式测定MCJ多肽编码核酸和多肽的水平。在本发明的一些实施方案中，分别相对于MCJ多肽编码核酸或多肽的对照水平测量细胞、组织或对象中MCJ多肽编码核酸或多肽的水平。一种MCJ多肽编码核酸或多肽水平的可能测量是测量MCJ多肽编码核酸或多肽的绝对水平。这可表示为例如每细胞或组织单位中的MCJ多肽编码核酸或多肽。另一种MCJ多肽编码核酸或多肽水平的测量是测量MCJ多肽编码核酸或多肽的水平随时间的变化。这可表示为绝对量或可表示为随时间提高或降低的百分比。特异性结合MCJ多肽的抗体或抗原结合片段或其他化合物或者编码MCJ多肽的核酸可用于单独用于诊断方法，或者结合本领域已知的某些抗体或结合化合物。已知抗体可包括特异性结合与代谢疾病或状况相关的

其他蛋白质或可用于量化每细胞单位的 MCJ 多肽编码核酸或多肽水平的其他细胞标志物蛋白等的抗体。

[0123] 如上所述，也可使用本发明化合物（例如，抗 MCJ 抗体或其功能片段、MCJ 多肽编码核酸、MCJ 多肽或者小分子 MCJ 增强剂或抑制剂等）通过监测 MCJ 多肽活性随时间的变化来表征 MCJ 多肽活性。例如，在某些代谢疾病和状况中，MCJ 多肽活性的提高与细胞和 / 或组织中提高的代谢疾病或状况的可能性有关，而在某些代谢疾病和状况中，MCJ 多肽活性的降低与细胞和 / 或组织中提高的代谢疾病或状况的可能性有关。另外，某些代谢疾病和状况可能不直接以异常的 MCJ 多肽活性为特征，但可通过调节（一些情况下提高，而另一些情况下降低）MCJ 多肽活性进行治疗。在每一种代谢疾病或状况中，可能希望评估经治疗细胞、组织或对象中的 MCJ 多肽活性。

[0124] 因此，可监测随时间的 MCJ 多肽活性水平以确定对象或细胞培养物中代谢疾病或状况的状态是否改变。MCJ 多肽活性的改变，例如 MCJ 多肽活性的提高或降低超过基线活性水平、之前活性水平或对照活性水平的 0.1％，可分别作为本发明治疗对于降低或提高 MCJ 多肽活性的效力或需要进行本发明治疗的指标。

[0125] 在本发明的一些实施方案中，细胞或组织中 MCJ 多肽活性的提高可以是比对象中之前的 MCJ 多肽活性提高超过 0.2％、超过 0.5％、超过 1.0％、2.0％、3.0％、4.0％、5.0％、7.0％、10％、15％、20％、25％、30％、40％、50％或更多。在本发明的一些实施方案中，细胞或组织中 MCJ 多肽活性水平的降低可以是降低超过 0.2％、超过 0.5％、超过 10％、2.0％、3.0％、4.0％、5.0％、7.0％、10％、15％、20％、25％、30％、40％、50％或更多。MCJ 多肽活性测定值随时间的提高或降低可指示样品或对象中代谢疾病或状况状态的改变，代谢疾病或状况的治疗效力，或代谢疾病或状况中期望的 MCJ 多肽活性水平的获得。

[0126] 对于代谢疾病或状况状态的确定，本发明方法可用于测定在不同时间采集的两个或更多个样品中的 MCJ 多肽活性，并且将彼此的测定值和 / 或与对照 MCJ 多肽活性水平进行比较。这些比较可用于确定对象中代谢疾病或状况的状态并允许评估代谢疾病或状况的治疗。对在不同时间和 / 或不同天从对象获得的生物样品中所测量的对象 MCJ 多肽活性的比较，可用作对对象中代谢疾病或状况任何治疗之效力的测量。本领域普通技术人员将认识到，通过评估响应于使细胞与用于治疗代谢疾病或状况的候选药剂或用于调节 MCJ 多肽活性的候选药剂相接触所发生的细胞 MCJ 多肽活性的任何变化，可在体外测试治疗方法和候选治疗的效力。

[0127] 本领域普通技术人员将理解，也可根据对代谢疾病或状况的症状或临床终点的评价来评价治疗，这种评价可结合本发明方法来评估代谢疾病或状况的状态和 / 或代谢疾病或状况之治疗的效力。

[0128] 试剂盒

[0129] 本发明范围内还具有包括本发明组合物和使用说明书的试剂盒。本发明试剂盒可包括可用于治疗代谢疾病或状况或者在本发明一些方面中用于诊断或监测代谢疾病或状况的一种或更多种化合物，例如抗 MCJ 抗体或其功能片段、MCJ 多肽编码核酸、MCJ 多肽或者小分子 MCJ 增强剂或抑制剂等。可制备包含化合物如抗 MCJ 抗体或其功能片段、MCJ 多肽编码核酸、MCJ 多肽或者小分子 MCJ 增强剂或抑制剂等的试剂盒，以用于治疗方法、体外诊断、预后和 / 或使用任何合适的组织学、细胞学、血清学或其他方法来监测细胞、组织和 /

或对象中的MCJ多肽活性水平。本发明试剂盒的组分可包装在水性介质中或包装为冻干形式。本发明试剂盒可包括被划区以在其中紧密容纳一个或更多个容器装置或容器装置系列（如试管、小瓶、烧瓶、瓶、注射器等）的载体。第一容器装置或容器装置系列可包含一种或更多种化合物，例如化合物抗MCJ抗体或其功能片段、MCJ多肽编码核酸、MCJ多肽或者小分子MCJ增强剂或抑制剂等。第二容器装置或容器装置系列可包含能够将化合物递送到细胞或组织的靶向标签或接头－标签中间物。

[0130] 本发明试剂盒还可包括说明书。说明书通常是书面形式，并且提供用于通过试剂盒进行具体化测定或治疗的指导以及用于根据测定或治疗进行确定的指导。

[0131] 鉴定候选化合物的方法

[0132] 本发明的一些方面包括鉴定和／或筛选调节细胞、组织和／或对象中的MCJ多肽活性之候选药剂的方法。方法可包括将候选药剂与细胞或组织混合或混合到对象中，并且测定在与候选药剂接触之前和接触之后的MCJ多肽活性。与适当的对照相比，MCJ多肽活性量的提高表明药剂能够提高MCJ水平。与适当的对照相比，MCJ多肽活性量的降低表明药剂能够降低MCJ水平。

[0133] 可用来评估用于代谢疾病或状况之候选治疗的测定混合物包含候选药剂。候选药剂可以是抗体、小有机化合物、小分子、多肽、核酸等，因此可选自组合抗体文库、组合蛋白质文库、小有机分子文库或任何其他合适的来源。通常，平行进行具有不同药剂浓度的多个反应混合物的测定，以获得对于多种浓度的不同响应。通常，这些浓度中的一种作为阴性对照，即，药剂浓度为0或低于检测限的药剂浓度。

[0134] 可进行测试以便确定是否可用于调节MCJ多肽活性以及是否可用于治疗代谢疾病或状况的候选药剂可包括众多类化学物质、核酸、蛋白质等。在本发明的一些实施方案中，候选药剂是小有机化合物，即分子量超过50，但小于约2500，优选小于约1000，以及更优选小于约500的那些。候选药剂包含对于与多肽和／或核酸结构性相互作用所必需的化学官能团，并且通常包含至少氨基、羰基、羟基或羧基，优选包含至少两个所述化学官能团，更优选至少3个所述化学官能团。候选药剂可包含被一个或更多个上述官能团取代的环碳或杂环结构和／或芳烃或聚芳烃结构。候选药剂也可以是生物分子如多肽、糖、脂肪酸、固醇、类异戊二烯、嘌呤、嘧啶，上述物质的衍生物或结构类似物，或者它们的组合等。

[0135] 候选药剂获自多种来源，包括合成或天然化合物的文库。例如，多种手段可用于随机和定向合成多种有机化合物和生物分子，包括表达随机化寡核苷酸、合成有机组合文库、随机或非随机多肽的噬菌体展示文库、蛋白质或抗体的组合文库等。或者，细菌、真菌、植物和动物提取物形式的天然化合物文库是可获得的或容易产生的。另外，可通过常规化学、物理和生物化学方法很容易地对天然和合成产生的文库和化合物进行修饰。另外，可对已知试剂进行定向或随机地化学抑修饰，例如酰化、烷基化、酯化、脒化（amidification）以产生药剂的结构类似物。

[0136] 测定混合物中也可包含多种其他试剂以测试候选化合物。这些可包括试剂如盐、缓冲剂、中性蛋白质（例如，白蛋白）、洗涤剂等，其可用于帮助优化蛋白质－蛋白质和／或蛋白质－试剂的结合。这样的试剂也可减少反应组分的非特异性或背景相互作用。也可使用另一些提高测定效力的试剂，例如蛋白酶抑制剂、核酸酶抑制剂、抗微生物剂等。添加组分的顺序、孵育温度、孵育时间和其他测定参数可容易地确定。这样的实验仅涉及优化测定

参数，而不是测定的基本组合物。孵育温度通常为4℃至40℃。可使孵育时间最小化以有利于快速、高通量地筛选，通常为0.1至10小时。在孵育后，可通过使用者可用的常规方法检测变量，如MCJ多肽的存在或不存在以及MCJ多肽活性。例如，可使用标准方法以及如本文所述通过测量可检测标记来确定MCJ多肽活性。

[0137] 提供了以下实施例来说明实施本发明的特定实例，其并未旨在限制本发明的范围。对于本领域普通技术人员而言显然的是，本发明将发现在多种组合物和方法中的应用。

[0138] 实施例

[0139] 实施例1

[0140] 方法

[0141] 小、鼠。

[0142] C57B1/6J小鼠购自Jackson Laboratories(Bar Harbor,ME)。靶向MCJ的胚胎干细胞(RRN 226)获自Baygenomics[University of California San Francisco(UCSF),San Francisco,CA]。在佛蒙特大学(University of Vermont)转基因小鼠设施中，将基因捕获ES细胞注射到C57B1/6J囊泡中，并植入到假孕雌性中。获得了6只雄性嵌合体，其中5只显示出超过95％嵌合性。使嵌合体与C57B1/6J雌性杂交，其全部导致种系传递(100％)。使小鼠进一步与C57B1/6回交至少7代。使杂合体雄性和雌性杂交，以产生MCJ纯合体敲除。MCJKO小鼠也与之前描述的OT-ITCR转基因小鼠(Hogquist等，1994 Cell 76,17-27)和MMTV-PyMT小鼠(Guy等，1992Mol Cell Biol12,954-961)杂交。使用的小鼠为10至14周龄。对于饥饿研究，向小鼠提供水但是不提供食物36小时。收获血液、肝脏、肾脏和褐色脂肪。对于肝脏胆固醇积累研究，向小鼠提供高胆固醇食物(Harlan Keklad TD.902221)4周，如参见Plavinskaya,T.等，Pulm Pharmacol Ther.Effects of acute and chronic low denslty lipoprotein exposure on neutrophil function,Epub 2012,10月17日中所述。所有小鼠以无菌条件安置于佛蒙特大学的动物饲养设施中。所述程序获得了佛蒙特大学动物饲养和使用委员会(Universlty of Vermont Institutional Animal Care and Use Committee)的批准。

[0143] 细胞制备、培养条件、增殖和试剂。

[0144] 如之前的描述(Auphan等，1998 J Immunol 160,4810-4821;Conze等，2002 J Exp Med195,811-823)通过阴性选择，以及使用MACS系统根据制造商(Miltenyi Biotec,Cambridge,MA)推荐通过阳性选择由脾和淋巴结纯化CD8T细胞和CD4T细胞。用板结合的抗CD3(2C11)(5μg/ml)和可溶的抗CD28(1μg/ml)(BD BioSciences,Sparks,MD)mAb刺激纯化的T细胞。使用经抗CD3和抗CD28激活并且如之前描述(Conze等，2002 J Exp Med 195,811-823)用[^{3}H]-胸苷标记的纯化CD8T细胞(10^{5}细胞/孔)进行增殖测定。如之前的描述(Hatle等，2007 Mol Cell Biol27,2952-2966)培养MCF7、MCF7/siMCJ和293T细胞系。鱼藤酮(以10μM使用)购自Sigma Aldrich(St.Louis,MO)。如之前的描述(Hatle等，2007 Mol Cell Biol27,2952-2966)通过磷酸钙进行293T细胞的转染。

[0145] Northern印迹分析。

[0146] 人和小鼠多组织Northern印迹(MTN)购自Clontech Laboratories,Inc.(Mountain View,CA)，并且包含来自不同组织的归一化的聚A(PolyA)RNA水平。如所描述的(Rincón等，1988Eur J Immunol Nov;18(11):1791-6)进行小鼠和人二者MCJ探针的放

射性标记，并且根据制造商说明书进行 Northern 印迹分析。

[0147] Southern 印迹分析。

[0148] 使用经 NcoI 消化的 10 μg 尾基因组 DNA。在琼脂糖凝胶上分离 DNA 片段，将其转移到 Hybond™ 尼龙膜上，并且用来自 MCJ 内含子 1[5'-gtggg ggtgtctgtgaagtagttt-3'(SEQ ID NO:6) 和 5'-ctgggatttaaggagttcacaa-3'(SEQ ID NO:7)] 的 PCR 扩增区域进行放射性标记探测。

[0149] RNA 分离和 RT-PCR。

[0150] 使用 Qiagen mini RNeasy® 试剂盒根据制造商 (Qiagen, Valencia, CA) 的推荐分离总 RNA。通过如之前的描述 (Hatle 等，2007Mol Cell Biol27,2952-2966) 进行逆转录来获得第一链 cDNA。使用 cDNA 通过常规 PCR 或实时 RT-PCR 检测小鼠 HPRT、MCJ、β2 微球蛋白。对于实时 RT-PCR 分析 (Applied Biosystems™, Carlsbad, CA)，将以下引物 / 探针设计组用于小鼠 MCJ[正向 5'-ccg aat acc tgc ctc ctt ctg-3'(SEQ ID NO:8)，反向 5'-aca cag cgg gga gaa ggt t-3'(SEQ ID NO:9)，探针 5'-ccaaag gtc gga cgc cga cat c-3'(SEQ ID NO:10)]。通过使用次黄嘌呤转磷酸核糖基酶 (HPRT) 或 β_2- 微球蛋白作为看家基因比较 CT 分析确定相对值。使用以下引物进行 MCJ 的常规 RT-PCR 扩增 [5,-aag taa tca cgg caa cag caa gg-3'(SEQ ID NO:11) 和 5'-faat aaa agc ctg gca gcc ttg c-3'(SEQ ID NO:12)]。

[0151] Western 印迹分析。

[0152] 如之前描述 (Hatle 等，2007 Mol Cell Biol27,2952-2966) 在 triton 裂解缓冲液中制备全细胞提取物。使用 Cell Fractionation Kit Standard(MitoSciences®, Eugene,OR) 纯化 CD8T 细胞和 MCF7 细胞的线粒体和细胞溶质提取物，或使用 Mitochondrial Fractionation Kit(Active Motif®, Carlsbad, CA) 纯化心脏、肿瘤和其他组织的线粒体和细胞溶质提取物。用月桂基麦芽糖苷 (1%) 或 (指定时) 洋地黄皂苷 (2%) 溶解线粒体提取物。如之前描述 (参见 Da Cruz, S. 等，2003 J.Biol.Chem.278:41566-41571) 使用来自心脏的纯化线粒体提取物对线粒体内膜级分进行分离。如之前描述 (Hatle 等，2007Mol Cell Biol27,2952-2966) 进行 Western 印迹分析。在亲和免疫纯化 (Cocalico Biologicals, Inc.™, Reamstown, PA) 之后，用小鼠 MCJ 的 N 末端肽 (35 个氨基酸) 进行免疫来产生抗小鼠 MCJ 兔多克隆。已经对抗人 MCJ 小鼠单克隆 Ab 进行了描述 (Hatle 等，2007 Mol Cell Biol27,2952-2966)。使用的其他抗体是 : 抗肌动蛋白、抗甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶 (抗 -GAPDH)、抗兔 IgG、抗山羊 IgG、抗小鼠 IgG(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz,CA)、抗 -CoxIV(Cell Signaling Technology®, Danvers,MA)、抗 -NDUFA9 和抗 -NDUFS3(MitoSciences®, Eugene,OR) 以及复合体 III Corel 蛋白 (MitoSciences) ; 抗糖原合成酶 (Cell Signaling Technology®) ; 抗 - 磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 (抗 PEPCK) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) ; 钙网蛋白 (Enzo Life Science, Farmingdale, NY) ; 和 sintaxin 11(BDBioscience, San Jose, CA)。使用 LumiGLO® 化学发光底物系统 (KPL, Gaithersburg, MD) 观察蛋白质。使用如上述产生的线粒体提取物和复合体 I 免疫捕

获单克隆抗体（MitoSciences®，Eugene，OR）根据制造商（MitoSciences®，Eugene，OR）推荐对复合体 I 进行免疫沉淀。使用如上述产生并用麦芽糖苷（1％）作为洗涤剂溶解的线粒体提取物和复合体 I 或复合体 III 免疫捕获单克隆抗体（Mito Sciences）根据制造商推荐对复合体 I 和复合体 III 进行免疫沉淀。然后通过 Western 印迹检查免疫沉淀物中 MCJ 的存在，或检查复合体 I、III 或 IV 亚单位。然后通过 Western 印迹分析检查免疫沉淀物中 MCJ 以及复合体 I 和 III 亚单位的存在。

[0153] 流式细胞术分析。

[0154] 使用针对 CD4、CD8、Thy 1.1、Thy 1.2、Vα2 的即时（directly）标记抗体［BD Biosciences（Sparks，MD）和 BioLegend®（San Diego，CA）］进行细胞表面染色。使用 UV- 蓝（UV-Blue）染料［Molecular Probes®，Inc，Life Technologies，（Beverly，MA）］根据制造商推荐进行细胞活力染色。用四甲基若丹明、乙酯、高氯酸盐 / 酯（TMRE）［Molecular Probes®，Inc，Life Technologies，（Beverly，MA）］（10μM）根据制造商推荐在 37℃染色 20 分钟来进行线粒体膜电位分析。通过用 Mito-SOX™-Red（Invitrogen®，Life Technologies，Beverly，MA）（2.5μM）根据制造商推荐在 37℃染色 10 分钟来进行线粒体 ROS 分析。使用 LSRII 流式细胞仪（BD Biosciences，Sparks，MD）和 FLOWJO®软件（Flowjo，Ashland，OR）通过流式细胞术分析检查所有样品。

[0155] 通过用针对 CD4、CD8 和 B220（B 细胞标志物）的 Ab 进行染色以及 Aria Flow Cell Sorter（BD Biosciences，Sparks，MD）对表达 MCJ 的外周 CD4T 细胞、CD8T 细胞和 B 细胞进行细胞分选纯化。

[0156] 共聚焦显微镜分析。

[0157] 如之前的描述（Hatle 等，2007Mol Cell Biol27，2952-2966）对转染的 293T 细胞进行用于共聚焦显微镜分析的细胞准备和免疫染色。使用 Mito Tracker® 和 TO-PRO®｜［Molecular Probes®，Life Technologies，（Beverly，MA）］分别作为线粒体和细胞核的标志物。使用抗 HA 标签 Ab（Cell Signaling Technology®，Danvers，MA）检测 HA 标记的 MCJ，然后是抗兔二级 Ab［Molecular Probes®，Life Technologies，（Beverly，MA）］）。使用 Zeiss LSM 510 META 共聚焦激光扫描成像系统（Carl Zeiss Microimaging，Thornwood，NY）通过共聚焦显微镜检查样品。

[0158] 免疫电子显微镜分析。

[0159] 如之前描述（Hatle 等，2007 Mol Cell Biol 27，2952-2966）使用 MCJ 转染 293T 细胞、新分离的 CD8T 细胞或心脏组织的经固定包埋制备物进行 MCJ 的免疫电子显微镜分析。使用抗小鼠 MCJ 兔多克隆 Ab 检测 MCJ。

[0160] 组织学和血清生物化学分析。

[0161] 对于组织学分析，收获肝、肾、褐色脂肪和乳腺肿瘤，固定在福尔马林中并用石蜡包埋。根据常规程序用 H&E 对来自石蜡包埋块的组织切片进行染色。用具有来自 Optronics®（Goleta，CA）的 Magnafire®数码相机或具有 EVOS® XL Core 显微镜

(AMG, Life Technologies, Grand Island, NY) 的Olympus® BX50 光学显微镜获得图像。为了分析肝脏中的脂质积累,将新鲜收获的肝脏冰冻在 OCT 中并用 Oil Red O 对冰冻切片染色。对于糖原的组织学分析,对石蜡包埋的肝和肾切片进行过碘酸 - 希夫 (PAS) 染色。使用 Glucose(HK) 测定试剂盒根据制造商 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) 推荐测定肝提取物 (相当于 1mg) 中的糖原水平。使用甘油三酯比色试剂盒 (Bio Vision, Milpitas, CA) 和酮体试剂盒 (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI) 根据制造商推荐测定血清中甘油三酯的水平。使用游离脂肪酸定量试剂盒 (Free Fatty Acid quantification kit, Cayman Chemical®, Ann Arbor, MI) 和 / 或游离脂肪酸定量试剂盒 (Bio Vision, Milpitas, California) 根据制造商推荐测定血清和肝脏提取物中的游离脂肪酸 (FFA) 水平。使用 Abeam 试剂盒 (Abeam, Cambridge, MA) 测定肝脏提取物 (相当于 1mg) 中胆固醇的水平。使用葡萄糖监测系统 (LifeScan, Milpitas, California) 测定血液中的葡萄糖水平。

[0162] 复合体 I 活性。

[0163] 使用根据纯化复合体 I 的方案 (MitoSciences®, Eugene, OR) 产生的线粒体提取物进行复合体 I 活性的分析。使用来自 MitoSciences® (Eugene, OR) 的复合体 I 酶活性微板测定试剂盒并根据制造商推荐进行活性测定。线粒体提取物在样品之间归一化,并且使用总计 1μg(心脏)、5-20μg(MCF7 和 MCF7/siMCJ 细胞) 或 1.8μg(T 细胞) 进行测定。细胞内 ATP 水平测定。

[0164] 使用每份样品 104 个细胞 (CD8T 细胞、MCF7 细胞和 293T 细胞) 和 ATPlite® 冷光 ATP 检测分析系统 (PerkinElmer®, Waltham, MA) 以及 TD-20/20 光度计 (Turner Biosystems, Promega®, Madison, WI) 根据制造商推荐测定细胞内 ATP 水平。为了分析乳腺肿瘤组织中 ATP 的水平,如上所述产生细胞溶质和线粒体提取物,并使用 ATPlite® 试剂盒 (PerkinElmer®, Waltham, MA) 测定量等于 10μg 之蛋白质的 ATP 含量。

[0165] 现在已经表明,MCJ 停留在线粒体中,在那里其作为线粒体呼吸链的复合体 I 的负调节物。MCJ 的损失导致复合体 I 活性升高、线粒体超极化以及 ATP 的产生增加。在不存在 MCJ 的情况下,增强的线粒体氧化磷酸化作为能量来源在饥饿期间加速脂肪酸氧化,并防止脂质在肝脏中的积累。另外,MCJ 缺陷还延缓乳腺肿瘤的生长,这与不能减弱线粒体功能相关。因此,MCJ 是线粒体代谢的必要负调节物。

[0166] 结果

[0167] 小鼠 MCJ/DnaJC15 的鉴定揭示了与人直接同源物保守的组织表达模式。

[0168] 之前已经在人卵巢和乳腺癌细胞中检查了 MCJ/DnaJC15 表述 (Hatle 等,2007 Mol Cell Biol 27,2952-2966 ;Lindsey 等,2005 IntJ.Cancer Jan15 ;118(2) :346-52. ; Shridhar 等,2001 Cancer Res 61,4258-4265 ;Strathde 等,2004 Carcinogenesis 25, 693-701)。之前报道 MCJ 起源于脊椎动物,在脊椎动物中,其高度保守 (Hatle 等,2007 Mol Cell Biol 27,2952-2966),但是没有研究报道其小鼠中对应物。人和小鼠 MCJ 蛋白质序列

的比较分析表现出整体75％的同一性（图1A），具有几乎相同的跨膜和C末端DnaJ结构域区，以及高度保守（57％）的N末端区（1-35位氨基酸）。为了鉴定小鼠MCJ基因的组织表达模式，使用上述方法进行Northern印迹分析。MCJ mRNA在心脏中高度丰富，然后是肝和肾（图1B）。尽管MCJ在一些人癌细胞中表达，但是正常人组织中MCJ表达的特定分布依然未知。非恶性人组织的Northern印迹分析表明人mcj基因表达的分布与小鼠mcj基因类似（图1C）。之前使用CD8 T细胞进行的微阵列分析表明MCJ还存在于这种免疫细胞类型中（数据未示出）。为了进一步研究免疫系统不同群体中MCJ的表达，由小鼠脾和淋巴结分离CD4和CD8T细胞以及B细胞，并进行实时逆转录酶(RT)PCR。有趣的是，mcj基因在CD8T细胞中的表达非常高，但是在CD4T细胞和B细胞中几乎不可检测（图1D）。

[0169] 产生了特异性识别小鼠MCJ的N末端区域的抗体(Ab)，如通过小鼠MCJ转染之293T细胞的Western印迹分析确认的（图1E）。使用这种Ab通过Western印迹分析检查小鼠组织中内源MCJ蛋白的表达。与mRNA表达分析一致，MCJ蛋白存在于心脏、肝和肾中，但在肺中几乎不可检测（图1F）。MCJ蛋白在CD8T细胞中也很丰富，但是在CD4T细胞中含量低（图1G）。因此，鉴定出MCJ/DhaJC15具有受限的组织和细胞分布。

[0170] MCJ/DnaJC15是新的线粒体停留共伴侣分子。

[0171] 系统发育分析已表明MCJ的祖先是存在于酵母中的Tim14(Mokraniac等，2003 Embo J 22，4945-4956)。Tim14定位于线粒体内膜中，是TIM23移位酶的组分(Mokraniac等，2005 J Biol Chem 280，31608-31614)。之前已经报道，基于293T细胞（不表达内源MCJ）中MCJ的过表达分析以及使用共聚焦显微镜的Mito Tracker®染色，MCJ并不定位于线粒体中(Hatle等，2007 Mol Cell Biol 27，2952-2966)。另外，在转染的293T细胞中，通过免疫电子显微镜(IEM)在界限明确的线粒体中未发现MCJ免疫染色，但是在其他电子致密的不典型囊泡/细胞器中观察到了MCJ免疫反应性(Hatle等，2007 Mol Cell Biol 27，2952-2966)。为了更精确地剖析MCJ在正常组织中的潜在功能，在生理条件下通过IEM检查内源MCJ在心脏中的定位。大部分MCJ免疫反应性发现于清楚限定的线粒体中，主要在内膜上（图2A）。还通过IEM检查了纯化的CD8T细胞中MCJ的表达。结果表明MCJ几乎仅定位于CD8T细胞的线粒体（图2B）。在过表达MCJ(24小时）的293T细胞中通过IEM对MCJ进行的更详细的分析表明了MCJ免疫反应性存在于不典型的细胞器中，其可能是已失去其内膜形成的脊并经受了降解的未定界的溶胀线粒体中（图2C）。在转染有MCJ的293T细胞(24h)中，MCJ和Mito Tracker®的共聚焦显微镜分析表明Mito Tracker®染色限定了未经转染细胞中的线粒体，而在MCJ过表达细胞中线粒体染色几乎不可检测（图2D-F）。因此，在生理条件下发现MCJ定位于线粒体，但是在该细胞器中持久的过表达导致明显的形态损伤。

[0172] 为了进一步证明内源MCJ的线粒体定位，在小鼠心脏线粒体和细胞溶质级分中进行MCJ的Western印迹分析。在线粒体级分中发现了高水平的MCJ，而在细胞溶质级分中几乎不可检测（图2G）。通过作为线粒体标志物的呼吸链复合体IV(CoxIV)以及作为细胞溶质级分的标志物的GAPDH的表达来测定级分的纯度（图2G）。MCJ还几乎仅存在于纯化CD8T细胞的线粒体级分中（图2H）。在细胞核级分中未检测到MCJ（数据未示出）。另外，乳腺癌MCF7细胞系中内源人MCJ的Western印迹分析也表明MCJ主要存在于线粒体中（图

2I)。因此，内源 MCJ 优先定位于线粒体中，并且在线粒体内，其似乎锚定在内膜的嵴上。

[0173] MCJ 作为线粒体膜电位和 ATP 产生的负调节物的功能。

[0174] 线粒体的主要功能是通过氧化磷酸化为细胞提供 ATP 作为能量来源。除了转移电子外，线粒体电子转移链 (ETC) 的复合体 I、III 和 IV 还通过促进 H+ 从线粒体基质向膜间隙的跨膜转运而有助于线粒体膜电位 (MMP) 的建立。复合体 V(ATP 合成酶) 使用 H+ 流回到线粒体基质中所产生的能量来产生 ATP。为了确定 MCJ 是否可调节线粒体功能，将已知表达 MCJ 的 MCF7 乳腺癌细胞 (Hatle 等，2007 Mol Cell Biol27，2952-2966) 中的 ATP 水平与 MCF7/siMCJ 细胞中的水平进行比较，MCF7/siMCJ 细胞是通过 MCJ shRNA 敲减了 MCJ 表达的 MCF7 细胞 (Hatle 等，2007Mol Cell Biol 27，2952-2966)。有趣的是，MCF7/siMCJ 细胞中 ATP 的水平显著高于 MCF7 细胞中 (图 3A)。MCF7/siMCJ 细胞中升高的 ATP 量主要来源于线粒体，因为鱼藤酮对 ETC 复合体 I 的抑制降低了 ATP 水平 (图 3B)。这些结果表明，MCJ 是线粒体 ATP 合成的负调节物。为了进一步确认这些结果，在表达 MCJ 后检查 293T 细胞中 ATP 的水平。293T 细胞仅转染 16 小时以避免 24 小时后观察到的线粒体损伤 (图 2)。在表达 MCJ 的细胞中，ATP 水平相对于质粒对照细胞极大降低 (图 3C)，进一步证明了 MCJ 对 ATP 产生的负调控。

[0175] 由于 MCJ 定位于线粒体内膜中，研究了 MCJ 是否可损害 MMP 作为限制线粒体 ATP 合成的机制。用 MCJ 或对照质粒转染 (16 小时)293T 细胞，通过 TMRE 染色和流式细胞分析检查 MMP。如通过较低的 TMRE 强度 (图 3D) 确定的，MCJ 的表达明显地使线粒体去极化，表明 MCJ 表达可消耗 MMP。持久的线粒体去极化可能造成线粒损伤，如在转染更长时间段的 293T 细胞中观察到的 (图 2)。由于与 CD4T 细胞相比，MCJ 在 CD8T 细胞中的表达丰富，还分析了从野生型小鼠中新鲜分离的这两种细胞类型之间 MMP 的差异。有趣地，与 MCJ 在 CD8T 细胞中的选择性存在相关，与 CD4T 细胞中的线粒体相比，大部分 CD8T 细胞中的线粒体被去极化 (图 3E)。由于电子主要从复合体 III 逃逸，ETC 还可有助于产生线粒体活性氧物质 (mitochondrial reactive oxygen species，mROS)(Hamanaka 和 Chandel，2010Trends Biochem Sci 35，505-513)。与 MMP 不同，通过用 **MitoSox®-Red** 染色以及流式细胞术对线粒体 ROS(mROS) 进行的分析表明 CD4 和 CD8T 细胞之间 mROS 水平没有差异 (图 3F)。为了进一步剖析 MCJ 在线粒体功能中的作用并确定 CD8T 细胞的去极化状态是否是由 MCJ 的存在引起的，产生了 MCJ 缺陷小鼠。

[0176] 通过 Southern 印迹分析确认 MCJ 缺陷小鼠的基因型 (图 4A)。为了确证 MCJ 表达的损失，通过 Western 印迹分析检查不同组织中内源 MCJ 蛋白的水平。在来自野生型小鼠的心脏和肝中检出了 MCJ，但是在 MCT 敲除 (KO) 小鼠中未检测到 (图 4B)。在来自 MCJ KO 小鼠的 CD8T 细胞中 MCJ 的表达同样被消除 (图 4B)。在来自野生型或 MCJ KO 小鼠的 CD4T 细胞中均未能检测到 MCJ(图 4B)。另外，MCJ 靶向的小鼠中，未能检测到 MCJ mRNA，确证了 MCJ 表达的损失 (图 4C)。与野生型 CD8T 细胞相比，杂合体小鼠中的 MCJ mRNA 的水平同样被降低 (图 4C)，表明 CD8T 细胞的 MCT 表达依赖于等位基因拷贝数。MCJ 表达的中断不影响小鼠的生存能力，一直到检验年龄 (约 1 年)。雄性和雌性 MCJ 缺陷小鼠二者均可育，并且未表现出任何明显的畸形或行为异常 (数据未示出)。因此，在生理条件下，MCJ 对于发育和 / 或正常器官功能不是必需的。为了证明 MCJ 有助于维持线粒体的去极化状态，检查分离自野生型和 MCJ KO 小鼠的 CD8T 细胞中的 MMP。相对于野生型 CD8T 细胞，来自 MCJ KO

小鼠的 CD8T 细胞被超极化至比得上野生型 CD4T 细胞的水平（图 3G）。在野生型和 MCJ KO CD8T 细胞之间，未观察到 mROS 的差异（图 3H）。不出所料，对来自野生型和 MCJ KO 小鼠的 CD4T 细胞的分析未表现出 MMP（图 3I）或 mROS（图 3J）的差异，与 MCJ 在 CD4T 细胞中低表达一致。

[0177] 总之，结果证明，MCJ 是线粒体电子传递链的负调节物，MCJ 的存在用以维持线粒体的去极化状态，并且限制线粒体产生 ATP。因此，MCJ 的损失导致线粒体超极化。

[0178] MCJ 在效应 CD8T 细胞的消退阶段（contraction phase）减弱线粒体代谢。

[0179] 检查了相对于野生型 CD8T 细胞，MCJ KO CD8T 细胞中线粒体的超极化是否影响其发育。在 MCJ 敲除小鼠中，淋巴结（图 5A）和脾（数据未示出）中 CD8T 细胞的百分比和数目未受影响。相似地，在 MCT KO 小鼠中也未在胸腺细胞群中观察到差异（数据未示出）。因此，MCJ 对于外周免疫系统中 CD8T 细胞发育或内稳态似乎不是必不可少的。还检查了 MCJ 的损失对于 CD8T 细胞的增殖反应可能具有的影响。用抗 CD3 和抗 CD28 抗体激活纯化的 CD8T 细胞。通过引入 [^{3}H]- 胸苷来测量增殖。在 MCJ KO 和对照野生型小鼠之间，没有观察到 CD8T 细胞增殖反应中的显著差异（图 6A）。另外，尽管线粒体中存在 MCJ，但是在激活期间来自 MCJ 缺陷小鼠的 CD8T 细胞并不经历更迅速的细胞死亡（图 5B）。激活期间野生型和 MCJ KO CD8T 细胞之间活化标志物（例如，CD69、CD44、CD25）的表达也是相当的（数据未示出）。因此，MCJ 对于 CD8T 细胞的活化或克隆扩增似乎是不必需的。进一步检查了在用抗 CD3 和抗 CD28Ab 激活 CD8T 细胞期间 MMP 的调节。在野生型 CD8T 细胞中，活化期间 MMP 逐渐增多（图 6B）。虽然在 MCJ KO CD8T 细胞和野生型 CD4T 细胞中 MMP 也随着活化稍微增多，但是由于在活化前已经是高度超极化阶段，影响不太明显（图 6B）。2 天后，野生型 CD8T 细胞中的 MMP 水平达到了与活化的 MCJ KOCD8T 细胞和野生型 CD4T 细胞中类似的水平（图 4B）。活化两天后，野生型和 MCJ KO CD8T 细胞之间的 mROS 水平也相差不多（图 7）。

[0180] 在免疫应答的消退阶段，大部分效应 CD8T 细胞死亡，但是最终存活变成记忆细胞的那些细胞经历了改变，以使其代谢恢复至在非活化幼稚 CD8T 细胞中发现的基础水平。检查了在 CD8T 细胞从效应阶段向休眠阶段过渡期间的 MMP 调节。在用抗 CD3 和抗 CD28Ab 活化两天后，洗涤野生型和 MCJ KO CD8T 细胞，并单独在培养基中孵育 24 小时或 48 小时。24 小时后，野生型和 MCJ KO CD8T 细胞二者均保持超极化，但是在 MCJ KO CD8T 细胞中 MMP 保持为略微更高（图 6C）。但是，有趣的是，在 48 小时后，很大一部分野生型 CD8T 细胞已经去极化至在幼稚 CD8T 细胞中发现的水平，但是大部分 MCJ KO CD8T 保持超极化（图 6C）。因此，发现 MCJ 是效应 CD8T 细胞的休眠阶段以及在 MMP 恢复至存在于幼稚细胞中的低水平的过程中线粒体去极化所必需的。mROS 的水平也随着时间降低，但是在野生型和 MCJ KO CD8T 细胞之间没有显著差异（图 6D）。还观察到，尽管在休眠时期野生型 CD8T 细胞的大小降低到了与幼稚细胞相差无几的大小，但是 MCJ KO CD8T 细胞保持为较大（数据未示出），表明 MCJ 缺陷诱导的持续线粒体代谢导致持续活跃的细胞代谢。为了支持这种持续的活跃代谢，在休眠时期，MCJ 缺陷的 CD8T 细胞中保持比野生型 CD8T 细胞高的 ATP 水平（图 6E）。为了在体外确定 MCJ 缺陷对于代谢的影响是否影响细胞存活，测量肝细胞的恢复。在体外 2 天休眠时期后，发现野生型 CD8T 细胞存活的极少，而几乎 100％的 MCJ KO CD8T 细胞保持存活（图 6F），表明 MCJ 有助于活化时 CD8T 细胞群的消退。

[0181] 为了在体内进一步研究效应阶段向休眠阶段过渡期间 MCJ 在抗原特异性 CD8T 细

胞的代谢中的作用，使 MCJ KO 小鼠与表达识别卵白蛋白之 TCR 的 OT-I TCR 转基因小鼠 (Hogquist 等，1994 Cell 76，17-27) 杂交，产生单克隆 T 细胞群。对由野生型和 MCJ KO 纯化的 OT-I CD8T 细胞进行活化和体外扩增。将等量的每一种类型细胞混合并共转移到野生型宿主小鼠中。15 天后，使用 Thy 1.1 和 Thy 1.2 标志物通过流式细胞术分析检查来自宿主小鼠的淋巴结和脾中供体细胞的存在，并且通过尺寸散射 (size scatter) 确定细胞大小。虽然两种供体回收的百分比相差无几 (数据未示出)，但是如所预期的，大部分野生型供体 OT-1 CD8T 细胞 (Thy1.1+) 较小，而大部分 MCJ KO OT-1 CD8T 细胞 (Thy1.1+Thy1.2+) 展示出大尺寸 (图 6G)。因此，结果表明 MCJ 缺陷导致在不存在抗原的情况下体内效应 CD8T 细胞延长的活化代谢阶段，表明 MCJ 有助于 CD8T 细胞在从效应阶段向休眠阶段过渡期间减弱线粒体代谢。

[0182] 通过 MCJ 损失增强线粒体代谢阻止了饥饿期间的肝脂肪变性。

[0183] MCJ 减弱线粒体代谢的作用与基础 (生理) 条件下 MCJ 缺陷小鼠中异常表型的缺少有关。但是，与效应 CD8T 细胞的休眠阶段的诱导类似，MCJ 缺陷可能会影响代谢平衡被破坏的状态。禁食造成剧烈的代谢改变，因为缺少足够的葡萄糖会引发储存在脂肪组织中的甘油三酯水解成游离脂肪酸 (FFA)，游离脂肪酸然后被调动到血浆中并运输到肝。在肝中，FFA 进入线粒体 β 氧化并被用作能源。由于 MCJ 在肝中高表达，假设在缺乏 MCJ 的情况下提高 / 保持的线粒体代谢可加速 FFA 的 β 氧化并最小化其在肝中的积累。还检查了 MCJ 在禁食代谢中的作用。正常 (进食) 条件下肝的组织学分析表明野生型和 MCJ 缺陷小鼠之间没有可检测差异 (图 8A)。禁食 36 小时的野生型小鼠的肝中表现出明显的脂肪变性迹象，如通过富含液泡之细胞的存在所确定的 (图 8A)。相比之下，在来自禁食 MCJ KO 小鼠的肝脏中检测到了最小化的脂肪变性迹象 (图 8A)。对通过 Oil Red O 染色的肝冰冻切片中脂质积累的分析进一步确证了在禁食的野生型小鼠中存在大量脂质，而 MCJ KO 小鼠肝中以低水平存在 (图 8B)。这些结果表明 MCJ KO 小鼠中 FFA 的持续线粒体氧化最小化了脂质在肝脏中的积累。还检查了血清甘油三酯和 FFA 水平。与野生型小鼠相比，禁食 MCJ KO 小鼠中甘油三酯 (图 8C) 和 FFA(图 8D) 二者的水平均降低，进一步证明了存在储存脂质的加速消耗。同样地，在禁食 MCJ KO 小鼠中观察到保留了最少的白色脂肪量 (数据未示出)。另外，尽管正常条件 (进食)(图 9A 和 9B) 下未发现野生型和 MCJ KO 小鼠之间褐色脂肪的明显差异，但是禁食后褐色脂肪的全量分析 (图 10A) 和组织学分析 (图 10B) 揭示在 MCJ KO 小鼠中其几乎完全不存在。因此，作为线粒体功能的负调节物，该结果表明 MCJ 在禁食期间具有调节代谢的作用。MCJ 损失阻止了响应于代谢改变的肝中脂质积累和脂肪变性。

[0184] 尽管鉴定了禁食期间小鼠中代谢加速，但是 MCJ KO 小鼠中禁食导致的体重减轻与野生型小鼠中的体重减轻之间没有统计学差异 (图 11A)；甚至在两个组中初始重量相差无几 (图 11B)。另外，禁食期间血液中葡萄糖水平的分析表明，MCJ KO 和野生型小鼠之间没有统计学显著差异，无论是葡萄糖初始降低期间 (12 小时)(图 11C) 还是恢复期间 (图 11D)。这些结果表明存在平衡无 MCJ 时肝中加速的脂质代谢的机制。通过线粒体对肝中游离脂肪酸 (FFA) 的 β 氧化增加可导致脂质分解产生的 ATP(通过 β 氧化) 和甘油的水平增加。ATP 和甘油的积累可作为信号被肝脏觉察，开始糖原生成 (能量消耗过程) 以储存过多的能量。在禁食后对肝脏中的 ATP 水平进行分析，确证了相对于野生型小鼠的肝脏，MCJ KO 小鼠肝脏中 ATP 的水平提高 (图 11E)。通过 PAS 染色检查肝脏中的糖原水平。如预期

的，在禁食的野生型小鼠中，肝脏中的糖原几乎不可检测（图 11F）。但是，禁食 MCJ KO 小鼠的肝脏中糖原以高水平积累（图 11F）。除了肝脏外，在肾脏的皮质中也可发生较低程度的糖原生成。通过 PAS 染色，还在禁食 MCJ KO 小鼠肾脏的一些区域中发现了糖原的积累。肝提取物中糖原的生化分析进一步证明了禁食 MCJ KO 小鼠中糖原的选择性积累（图 11G）。在未禁食野生型小鼠和未禁食 MCJ KO 小鼠中，未发现肝脏中糖原基础水平之间的差异（图 11G）。禁食 MCJ KO 小鼠的肝脏中糖原而非脂质的积累与相对于野生型小鼠肝脏占体重的增加比相关（图 11H）。糖原是使用 UDP 葡萄糖作为底物通过糖原合成酶合成的。相对于野生型小鼠，禁食 MCJ KO 小鼠的肝脏中的糖原合成酶水平上调（图 11I）。相比之下，禁食的 WT 和 MCJ KO 小鼠中磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 (PEPCK) 的水平相差不大（图 11I），表明 MCJ KO 小鼠肝脏中存在的糖原可能是由甘油三酯水解产生的葡萄糖产生的，磷酸烯醇丙酮酸羧激酶是由丙酮酸合成葡萄糖的过程中必不可少的糖异生酶。

[0185] 根据其在线粒体呼吸中的负作用，这些结果表明 MCJ 是禁食期间肝代谢的重要调节物，MCJ 的缺失有助于脂质降解和肝脏中的糖原生成。为了研究 MCJ 是否还有可能在响应于其他改变的饮食条件的调节机制中具有作用，还研究了其响应于高胆固醇饮食的作用。高胆固醇是全世界主要的健康问题。用高胆固醇饮食喂养野生型和 MCJ KO 小鼠 4 周 [参见 Plavinskaya, T. 等，Pulm Pharmacol Ther. 2013Aug ;26(4) :405-11. doi :10. 1016/j. pupt. 2012. 10. 002. Epub 2012 Oct 17 ;Teratani, T. 等，Gastroenterology. 2012 Jan ;142(1) :152-164(Epub 2011Oct 10)]。在用高胆固醇饮食喂养的野生型小鼠的肝脏中，积累了高水平的胆固醇（图 11J）。在用正常饮食喂养的野生型和 MCJ KO 小鼠的肝脏中，存在类似的低的胆固醇水平（图 11K）。因此，结果表明 MCJ 调节多种代谢疾病所造成的影响。

[0186] MCJ 缺陷延缓肿瘤生长。

[0187] 虽然线粒体呼吸是产生 ATP 的最有效机制，但是在一些情况下，细胞选择糖酵解，尽管其效率较低。因此，癌细胞通过糖酵解而非通过线粒体氧化来产生其 ATP，即使是在有助于肿瘤生长的需氧条件下也是如此。这种现象被称为 Warburg 效应，其似乎是癌细胞由于受损的线粒体氧化磷酸化而进行的代谢适应 (Cairns 等，2011Nat Rev Cancer 11, 85-95 ;Koppenol 等，2011 Nat Rev Cancer 11,325-337 ;Warburg,1956 JMol Biol272, 477-483)。由于 MCJ 是 MMP 和 ATP 的负调节物，对体内的 MCJ 缺陷是否会影响肿瘤进展进行了研究。在来自 MMTVPyMT 转基因小鼠的肿瘤中检查了 MCJ 表达，其中在 MMTV(Mouse Mammary Tumor Virus，小鼠乳腺肿瘤病毒）启动子 / 增强子的控制下表达多瘤病毒的中间 T(MT) 抗原，所述启动子 / 增强子在乳腺上皮细胞中特异性驱动表达 (Guy 等，1992 Mol Cell Biol 12,954-961)。MCJ 在正常乳腺和乳腺肿瘤二者中均表达，但是肿瘤中水平显示出略微更高（图 12A）。通过 Western 印迹分析对 MMTV-PyMT 肿瘤中 MCJ 细胞定位的分析进一步证实了乳腺肿瘤中 MCJ 的线粒体定位（图 12B）。对来自正常乳腺和乳腺肿瘤的线粒体提取物中 MCJ 的分析也证实，与正常乳腺线粒体相比，来自肿瘤的线粒体中 MCJ 的表达提高（图 12C）。使 MCJ KO 小鼠与 MMTV-PyMT 小鼠杂交，然后进行乳腺肿瘤发生。有趣的是，尽管 MMTV-PyMT/MCJKO 小鼠发生了肿瘤，但是与 MMTV-PyMT 幼崽相比其动力学被延迟。与之前的研究一致 (Guy 等，1992Mol Cell Biol12,954-961)，在 MMTV-PyMT 幼崽中，10-12 周龄为止可清楚检测到肿瘤，但是在 MMTV-PyMT/MCJ KO 小鼠中，在 18-20 周之前一直没有明显的肿瘤可感知。在由于肿瘤尺寸太大而不得不对小鼠进行安乐死时，使用此时的小鼠年龄

建立存活曲线。与 MMTV-PyMT 小鼠相比，MMTV-PyMT/MCJ KO 小鼠中肿瘤的生长显示出明显延迟（图 12D）。组织学分析表明，在 MMTV-PyMT 和 MMTV-PyMT/MCJ KO 小鼠的类似大小的肿瘤之间没有明显差异（图 12E）。为了研究肿瘤生长的延迟是否与作为能量来源的线粒体呼吸相对于细胞溶质糖酵解之平衡的改变有关，检验产生自野生型和 MCJ KO 肿瘤的细胞溶质和线粒体提取物中的 ATP 水平。与来自野生型小鼠的肿瘤中的比例相比，来自 MCJ KO 小鼠的肿瘤中线粒体 / 细胞溶质 ATP 水平的相对比例明显提高（图 12F）。因此，MCJ 缺失时所发现的增强的线粒体代谢与减弱的乳腺肿瘤生长有关。

[0188] MCJ 是线粒体电子传递链中复合体 I 的内源抑制剂。

[0189] 为了研究 MCJ 能够调节线粒体膜电位的分子基质并发现潜在的相关蛋白，使用 MCJ 的 N 末端区域作为诱饵进行噬菌体展示筛选。筛选的结果揭示了线粒体 ETC 内复合体 I 的一个亚基 (NDUFv1) 为与 MCJ 潜在相互作用的蛋白质（数据未示出）。哺乳动物复合体 I(NADH 泛醌氧化还原酶）包含 49 个已鉴别亚基、黄素单核苷酸 (FMN) 基团和 8 个 Fe-S 簇 (Clason 等，2009JStruct Biol 169,81-88)。尽管 MCJ 未被描述为复合体 I 的实际亚基，但是可能的是 MCJ 可与复合体 I 相互作用并调节其活性。为了确定 MCJ 是否与复合体 I 缔合，从野生型和 MCJ KO 小鼠的心脏线粒体提取物免疫沉淀复合体 I。通过 Western 印迹分析检查免疫沉淀物中 MCJ 的存在。在来自野生型小鼠的复合体 I 免疫沉淀物中，存在对应于 MCJ 的分子量的条带，而在来自 MCJ KO 小鼠中不存在（图 13A）。作为免疫沉淀的对照，还检查了两种良好表征的复合体 I 亚基 NDUFA9 和 NDUFS3 的表达（图 13A）。因此，MCJ 与线粒体复合体 I 缔合。

[0190] 为了确定 MCJ 是否可能是复合体 I 的调节物，检查来自野生型和 MCJ 缺陷小鼠的心脏线粒体提取物中复合体 I 的活性。与野生型心脏相比，MCJ 缺陷心脏中检测到了较高的复合体 I 活性（图 13B）。但是，MCJ 缺陷不影响线粒体中复合体 I 的总量，如通过 Western 印迹分析对于 NDUFA9 所测定的（图 13C）。相对于 CD4T 细胞，MCJ 在 CD8T 细胞中的选择性存在也表明了这两种细胞类型之间复合体 I 活性的潜在差异。对由新鲜分离的 CD8 和 CD4T 细胞获得的线粒体提取物中复合体 I 活性的分析确实表明 CD8T 细胞中复合体 I 的活性显著更低（图 13D）。在 CD4 和 CD8T 细胞之间，线粒体提取物中 NDUFA9 和 NDUFS3 的水平相当（图 13E）。更重要的是，与野生型 CD8T 细胞相比，对 MCJ KOCD8T 细胞中复合体 I 活性的分析表明复合体的活性升高（图 13D）。在野生型和 MCJ KO CD8T 细胞之间，未能检测到线粒体中 NDUFA9 或 NDUFS3 的水平差异（图 13E）。因此，相对于 CD4T 细胞，CD8T 细胞中复合体 I 的失活和线粒体的去极化是通过 CD8T 细胞中存在的 MCJ 介导的。还在人 MCF7 细胞中检查了 MCJ 缺陷对于复合体 I 活性的影响。尽管两种细胞类型中线粒体中复合体 I 的水平相当（图 13F），但是与 MCF7 细胞相比，MCF7/siMCJ 细胞（缺少 MCJ）中存在更高的复合体 I 活性水平（图 13G）。总之，这些结果表明 MCJ 是线粒体中呼吸链复合体 I 的内源负调节物。

[0191] 本文所述研究揭示了 MCJ/DnaJC15 共伴侣分子作为复合体 I 的负调节物的新作用。这是迄今首次表明 MCJ/DnaJC15 具有减弱线粒体代谢的作用，并且 MCJ 的损失改变不同组织中的体内代谢切换。因此 MCJ 可作为调节细胞中的能量平衡的靶标。

[0192] 如上文已经部分概括的，现已经表明 MCJ 与复合体 I 以物理方式缔合。MCJ 与复合体 I 的缔合可能是动态的，并且可能是一种在需要降低线粒体代谢活性的情况下（例如，饥饿、压力等）快速调节线粒体呼吸的机制。复合体 I 的这种失活机制可能在线粒体在作为

能量来源方面发挥重要作用的那些组织（例如，心脏）中具有作用。

[0193] 与 MCJ 对复合体 I 活性的抑制作用一致，现在已经证明 MCJ 的缺失导致线粒体膜电位升高和 ATP 水平增加。线粒体代谢的相对升高在生理条件下可能不具有明显作用。在这一点上，在生理条件下，MCJ 缺陷小鼠不表现出改变的表型。但是，在压力 / 病理情况下，没有 MCJ 的情况下增强线粒体代谢可能影响代谢切换，并影响正常响应的过程。通过本文给出的实验，现已经证明 MCJ 缺陷在禁食条件下改变代谢，并且其降低脂质在肝脏中的积累并防止脂肪变性。

[0194] 尽管不希望受到任何特定机制的约束，减少肝脏中脂质的积累和防止脂肪变性可通过增强脂质 β 氧化而实现。与加速的脂类分解相关，在禁食后观察到 MCJ 缺陷小鼠中白色脂肪的含量减少，并且仅剩余褐色脂肪。因此，在禁食的初始阶段，MCJ 损失引起的增强的线粒体代谢可能有益。但是，由于可利用“燃料”的快速消耗，认为在没有 MCJ 的情况下较长的禁食时间段可能非常不利。在进化上，脊椎动物中 MCJ 的获得可能是一种响应于不足的食物摄取而通过抑制复合体 I 的活性减慢线粒体呼吸和延长脂质储能的一种适应现象。

[0195] 代谢也成为了可能影响 T 细胞存活和 / 或功能的重要因素。脂肪酸的氧化和代谢速率影响记忆 CD8T 细胞的存活 (Araki 等，2009Nature 460，108-112 ；Maines 等，2009 Science 325，484-487 ；Finlay 和 Cantrell，2010Nat Rev Immunol 11，109-117)。另外，最近的研究已经表明，记忆 CD8T 细胞的周知的存活因子 IL-15 通过增强线粒体生物发生促进记忆细胞中的线粒体氧化代谢和 ATP 产生 (van der Windt 等，2012 Immunity 36，68-78)。提高线粒体脂肪酸氧化与记忆 CD8T 细胞提高的存活和功能有关。这里我们表明 MCJ 有助于复合体 I 的失活，并因此促进 CD8T 细胞中线粒体的去极化。更重要的，现已经表明效应 CD8T 细胞休眠期间 MCJ 的不存在在体外和体内维持了这些细胞中活跃的线粒体代谢。因此，MCJ 还可调节记忆 CD8T 细胞功能。历史上已经认识到了在活化之前 CD4 和 CD8T 细胞彼此非常类似。本文提出的研究首次示出相对于 CD4T 细胞，MCJ 在 CD8T 细胞中优势表达，并且在这些细胞中，CD8T 细胞中剧烈的线粒体去极化通过 MCJ 的存在得以保持。这些揭示性发现证明了 CD4 和 CD8T 细胞之间在线粒体代谢方面的明显差异。

[0196] 尽管在生理条件下大部分细胞使用线粒体呼吸作为产生 ATP 的机制，但是肿瘤细胞切换到糖酵解作为获得 ATP 的机制，尽管其效率低下，这种现象被称为 Warburg 效应。Warburg 假设癌细胞中代谢切换到糖酵解可能是由于线粒体呼吸受损，但是实际机制依然不清楚。近年来，已经根据来自基础和临床研究的结果对 Warburg 效应进行了广泛的重新思考 (Cairns 等，2011 Nat Rev Cancer 11，85-95 ；Koppenol 等，2011 Nat Rev Cancer 11，325-337 ；Levine 和 Puzio-Kuter，2010 Science 330，1340-1344)。因此，虽然增强或延长的线粒体呼吸可能对于许多细胞有益，但是其也可能干扰肿瘤生长。在这里，现在表明 MCJ 缺陷延迟体内乳腺肿瘤生长，其与倾向线粒体呼吸作为能量来源的调整平衡有关。若干体外和 / 或异种移植研究已经阐明了共伴侣分子（例如，Tid1、MRJ、HLAJ1）在癌症中的作用，并通过干扰细胞侵袭、迁移和 / 或转移而具有了主要的肿瘤抑制功能 (Sterrenberg 等，2011 Cancer Lett 312，129-142)。这些共伴侣分子均与肿瘤细胞中代谢状态的改变无关。本文描述的工作包括揭示了体内共伴侣分子由于代谢状态的改变而影响肿瘤进展的首次研究。之前已经表明 MCJ 的损失与乳腺癌和卵巢癌 (Hatle 等，2007 Mol Cell Biol 27，2952-2966 ；Strathdee 等，2005 Gynecol Oncol 97，898-903) 中的化学抵抗有关。基于本

文描述的发现，似乎可能的是在没有 MCJ 的情况下增强的复合体 I 活性和线粒体代谢也可能赋予对特定癌症药物的抵抗。

[0197] 虽然本文已经描述和说明了本发明的多个实施方案，但是本领域普通技术人员将容易想到用于实施本文所述功能和 / 或获得所述结果和 / 或一个或更多个优点的各种其他手段和 / 或结构，并且每一个这样的变化和 / 或修改均被认为包括在本发明的范围内。更普遍地，本领域技术人员将容易理解，本文描述的所有参数、尺寸、材料和构型均意在示例，实际参数、尺寸、材料和 / 或构型将取决于本发明教导所使用的特定应用。本领域技术人员将认识或者能够仅利用常规实验就能确定针对本文描述的具体发明实施方案的许多等效方案。因此，应理解，前述实施方案仅以示例的方式呈现，并且在所附权利要求及其等同方案的范围内；本发明可以以不同于具体描述并且要求保护的方式来实现。本发明涉及本文描述的每个单独特征、系统、制品、材料和 / 或方法。另外，如果这些特征、系统、制品、材料和 / 或方法没有互相矛盾，则两种或更多种的这些特征、系统、制品、材料和 / 或方法的任意组合也包括在本公开的发明范围内。

[0198] 本文限定和使用的所有定义应理解为优先于其在字典中的定义、通过引用并入的文献中的定义和 / 或所限定术语的通常含义。

[0199] 本说明书和权利要求中，未用数量词限制的名词应理解为“至少一个 / 种”，除非明确提到相反情况。

[0200] 本文在说明书和权利要求中使用的短语“和 / 或”应理解为所连接要素的“任一个或两个”，即，在一些情况下要素同时存在，在另一些情况单独存在。除了“和 / 或”条款明确提到的要素外，还可能任选地存在其他要素，无论其与这些明确提到的要素相关还是不相关，除非明确提到相反情况。

[0201] 本申请中引用或参考的所有参考文献、专利和专利申请以及公开均通过引用整体并入本文。

[0001]

序列表

<110> 佛蒙特大学及州农业学院
Rincon, Mercedes
Hatle, Ketki

<120> 用于代谢调节的方法和组合物

<130> UVM70114WO

<150> US 61/670345
<151> 2012-07-11

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 150
<212> PRT
<213> 智人

<400> 1

Met Ala Ala Arg Gly Val Ile Ala Pro Val Gly Glu Ser Leu Arg Tyr
1 5 10 15

Ala Glu Tyr Leu Gln Pro Ser Ala Lys Arg Pro Asp Ala Asp Val Asp
20 25 30

Gln Gln Gly Leu Val Arg Ser Leu Ile Ala Val Gly Leu Gly Val Ala
35 40 45

Ala Leu Ala Phe Ala Gly Arg Tyr Ala Phe Arg Ile Trp Lys Pro Leu
50 55 60

Glu Gln Val Ile Thr Glu Thr Ala Lys Lys Ile Ser Thr Pro Ser Phe
65 70 75 80

Ser Ser Tyr Tyr Lys Gly Gly Phe Glu Gln Lys Met Ser Arg Arg Glu
85 90 95

Ala Gly Leu Ile Leu Gly Val Ser Pro Ser Ala Gly Lys Ala Lys Ile
100 105 110

Arg Thr Ala His Arg Arg Val Met Ile Leu Asn His Pro Asp Lys Gly
115 120 125

Gly Ser Pro Tyr Val Ala Ala Lys Ile Asn Glu Ala Lys Asp Leu Leu
130 135 140

Glu Thr Thr Thr Lys His
145 150

<210> 2
<211> 1074
<212> DNA
<213> 智人 (homo sapiens)

<220>
<221> misc_feature
<223> 智人含DNAJ结构域之蛋白质MCJ (MCJ) mRNA,
全cds

[0002]

<400> 2
ggtcaggaaa gctcaggcaa gcccaccctc aggcattaca gctagactcc gagcttactg 60

ggcagtcatc tgattcgacc aacatcagtt cgcagggctt aagcccagtc ccttacggcg 120

gctggggagg gaccaggccc aagtatataa agctccctga gggtccgcgt tggctttgcg 180

cctgtgagtg tgattcaaga acgtcccagt gcccttggct cctttcggag tgtgaccccg 240

tgcttgcacg ggacacgtta cccagctcgg gtgagaaggg tatcttccgg gaacctcgcc 300

tttaatagca caacgagcgc agagtccact ggatctgcga gaagaaaccg cgctaactag 360

tttgtcccta cggccgcctc gtagtcactg ccgcggcgcc ttgagtctcc gggccgcctt 420

gccatggctg cccgtggtgt catcgctcca gttggcgaga gtttgcgcta cgctgagtac 480

ttgcagccct cggccaaacg gccagacgcc gacgtcgacc agcagggact ggtaagaagt 540

ttgatagctg taggactggg tgttgcagct cttgcatttg caggtcgcta cgcatttcgg 600

atctggaaac ctctagaaca agttatcaca gaaactgcaa agaagatttc aactcctagc 660

ttttcatcct actataaagg aggatttgaa cagaaaatga gtaggcgaga agctggtctt 720

attttaggtg taagcccatc tgctggcaag gctaagatta gaacagctca taggagagtc 780

atgattttga atcacccaga taaaggtgga tctccttacg tagcagccaa aataaatgaa 840

gcaaaagact tgctagaaac aaccaccaaa cattgatgct taaggaccac actgaaggaa 900

aaaaaaagag gggacttcga aaaaaaaaaa agccctgcaa aatattctaa aacatggtct 960

tcttaatttt ctatatggat tgaccacagt cttatcttcc accattaagc tgtataacaa 1020

taaaatgtta atagtcttgc tttttattat ctttaaaga tctccttaaa ttct 1074

<210> 3
<211> 149
<212> PRT
<213> 小鼠 (Mus muscula)

<400> 3

Met Ala Thr Gly Gly Gly Val Thr Ser Arg Glu Ser Leu Arg Tyr Ala
1 5 10 15

Glu Tyr Leu Pro Pro Ser Ala Gln Arg Ser Asp Ala Asp Ile Asp His
20 25 30

Thr Ala Gly Arg Arg Leu Ile Ala Val Gly Leu Gly Val Ala Ala Val
35 40 45

Ala Phe Ala Gly Arg Tyr Ala Phe Gln Ile Trp Lys Pro Leu Glu Gln
50 55 60

Val Ile Thr Ala Thr Ala Arg Lys Ile Ser Ser Pro Ser Phe Ser Ser
65 70 75 80

Tyr Tyr Lys Gly Gly Phe Glu Gln Lys Met Ser Lys Arg Glu Ala Ser
85 90 95

Leu Ile Leu Gly Val Ser Pro Ser Ala Gly Lys Ala Lys Ile Arg Thr
100 105 110

Ala His Lys Arg Ile Met Ile Leu Asn His Pro Asp Lys Gly Gly Ser
115 120 125

[0003]

Pro Tyr Val Ala Ser Lys Ile Asn Glu Ala Lys Asp Leu Leu Glu Ala
130 135 140

Ser Ser Lys Ala Asn
145

<210> 4
<211> 150
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

Met Ala Ala Arg Gly Val Ile Ala Pro Val Gly Glu Ser Leu Arg Tyr
1 5 10 15

Ala Glu Tyr Leu Gln Pro Ser Ala Lys Arg Pro Asp Ala Asp Val Asp
20 25 30

Gln Gln Arg Leu Val Arg Ser Leu Ile Ala Val Gly Leu Gly Val Ala
35 40 45

Ala Leu Ala Phe Ala Gly Arg Tyr Ala Phe Arg Ile Trp Lys Pro Leu
50 55 60

Glu Gln Val Ile Thr Glu Thr Ala Lys Lys Ile Ser Thr Pro Ser Phe
65 70 75 80

Ser Ser Tyr Tyr Lys Gly Gly Phe Glu Gln Lys Met Ser Arg Arg Glu
85 90 95

Ala Gly Leu Ile Leu Gly Val Ser Pro Ser Ala Gly Lys Ala Lys Ile
100 105 110

Arg Thr Ala His Arg Arg Val Met Ile Leu Asn His Pro Asp Lys Gly
115 120 125

Gly Ser Pro Tyr Val Ala Ala Lys Ile Asn Glu Ala Lys Asp Leu Leu
130 135 140

Glu Thr Thr Thr Lys His
145 150

<210> 5
<211> 2404
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<223> 智人DnaJ (Hsp40) 同系物C亚家族, 成员15, mRNA
(cDNA 克隆 MGC:110875 IMAGE:30530999), 全cds

<400> 5
agtctccggg ccgccttgcc atggctgccc gtggtgtcat cgctccagtt ggcgagagtt 60

tgcgctacgc tgagtacttg cagccctcgg ccaaacggcc agacgccgac gtcgaccagc 120

agagactggt aagaagtttg atagctgtag gcctgggtgt tgcagctctt gcatttgcag 180

[0004]

gtcgctacgc atttcggatc tggaaacctc tagaacaagt tatcacagaa actgcaaaga 240

agatttcaac tcctagcttt tcatcctact ataaaggagg atttgaacag aaaatgagta 300

ggcgagaagc tggtcttatt ttaggtgtaa gcccatctgc tggcaaggct aagattagaa 360

cagctcatag gagagtcatg attttgaatc accagataa aggtggatct ccttacgtag 420

cagccaaaat aaatgaagca aaagacttgc tagaaacaac caccaaacat tgatgcttaa 480

ggaccacact gaaggaaaaa aaaagagggg acttcaaaaa aaaaaaaaaa gccctgcaaa 540

atattctaaa acatggtctt cttaattttc tatatggatt gaccacagtc ttatcttcca 600

ccattaagct gtataacaat aaaatgttaa tagtcttgct ttttattatc ttttaaagat 660

ctccttaaat tctataactg atctttttte ttattttgtt tgtgacattc atacattttt 720

aagatttttg ttatgttctg aattcccccc tacacacaca cacacacaca cacacacaca 780

cgtgcaaaaa atatgatcaa gaatgcaatt gggatttgtg agcaatgagt agacctctta 840

ttgtttatat ttgtaccctc attgtcaatt ttttttagg gaatttggga ctctgcctat 900

ataaggtgtt ttaaatgtct tgagaacaag cactggctga tacctcttgg agatatgatc 960

tgaaatgtaa tggaatttat taaatggtgt ttagtaaagt aggggttaag gacttgttaa 1020

agaacccccac tatctctgag accctatagc caaagcatga ggacttggag agctactaaa 1080

atgattcagg tttacaaaat gagccctgtg aggaaaggtt gagagaagtc tgaggagttt 1140

gtatttaatt atagtcttcc agtactgtat attcattcat tactcattct acaaatattt 1200

attgacccct tttgatgtgc aaggcactat cgtgcgtccc ctgagagttg caagtatgaa 1260

gcagtcatgg atcatgaacc aaaggaactt atatgtagag gaaggataaa tcacaaatag 1320

tgaatactgt tagatacaga tgatatattt taaaagttca aaggaagaaa agaatgtgtt 1380

aaacacfgca tgagaggagg aataagtggc atagagctag gctttagaaa agaaaaatat 1440

tccgatacca tatgattggt gaggtaagtg ttattctgag atgagaatta gcagaaatag 1500

atatatcaat cggagtgatt agagtgcagg gtttctggaa agcaaggttt ggacagagtg 1560

gtcatcaaag gccagccctg tgacttacac tgcattaaat taatttctta gaacatagtc 1620

cctgatcatt atcactttac tattccaaag gtgagagaac agattcagat agagtgccag 1680

cattgtttcc cagtattcct ttacaaatct tgggttcatt ccaggtaaac tgaactactg 1740

cattgtttct atcttaaaat acttttaga tatcctagat gcatctttca acttctaaca 1800

ttctgtagtt taggagttct caaccttggc attattgaca tgttaggcca aataattttt 1860

tttgtgggag gtctcttgtg cgttttagat gattagcaat aatccctgac ctgttatcta 1920

ctaaagacta gtcgtttctc atcagttgtg acaacaaaaa tggttccaga tattgccaaa 1980

tgcccctttag aggacagtaa tcgcccccag ttgagaacca tttcagtaaa actttaatta 2040

ctatttttc ttttggttta taaaataatg atcctgaatt aaattgatgg aaccttgaag 2100

tcgataaaat atatttcttg ctttaaagtc cccatacgtg tcctactaat tttctcatgc 2160

tttagtgttt tcacttttct cctgttatcc ttgtacctaa gaatgccatc ccaatcccca 2220

gatgtccacc tgcccaaagt ctaggcatag ctgaaggcca agctaaaatg tatcccctctt 2280

tttctggtac atgcagcaaa agtaatatga attatcagct ttctgagagc aggcattgta 2340

tctgtcttgt ttggtgttac attggcaccc aataaaatatt tgttgagcga aaaaaaaaaa 2400

aaaa 2404

[0005]

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 6
gtgggggtgt ctgtgaagta gttt 24

<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 7
ctgggattta aggagttcac aa 22

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 8
ccgaatacct gcctccttct g 21

<210> 9
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 9
acacagcggg gagaaggtt 19

<210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 10
ccaaaggtcg gacgccgaca tc 22

<210> 11
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 11
aagtaatcac ggcaacagca agg 23

<210> 12

[0006]

<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 12
aataaaagcc tggcagcctt gc 22

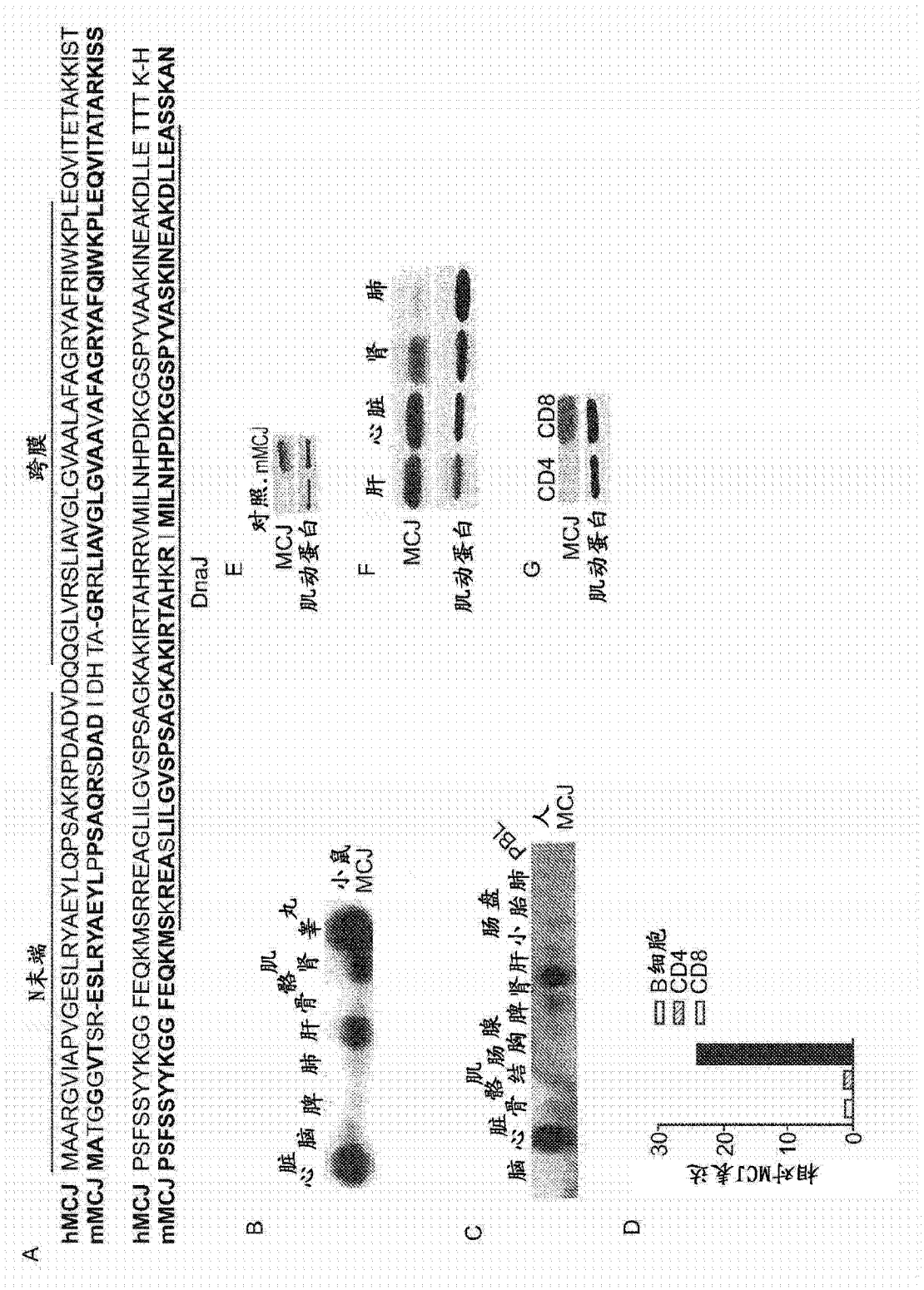
A
N末端
跨膜
hMCJ MAARGVIAPVGESLRYAEYLQPSAKRPDADVDQQGLVRSLIAVGLGVAALAFAGRYAFRIWKPLEQVITETAKKIST
mMCJ MATGGGVTSR-ESLRYAEYLPPSAQRSDAD I DH TA-GRRLIAVGLGVAAVAFAGRYAFQIWKPLEQVITATARKISS
hMCJ PSFSSYYKGG FEQKMSRREAGLILGVSPSAGKAKIRTAHRRVMILNHPDKGGSPYVAAKINEAKDLLE TTT K-H
mMCJ PSFSSYYKGG FEQKMSKREASLILGVSPSAGKAKIRTAHKR I MILNHPDKGGSPYVASKINEAKDLLEASSKAN
DnaJ
B
脑 心 脾 肺 肝 骨骼肌 肾 睾丸
小鼠MCJ
C
脑 心脏 骨骼肌 结肠 胸腺 脾 肾 肝 小肠 胎肺 肠盘 PBL
人MCJ
D
B细胞
CD4
CD8
相对MCJ表达
30
20
10
0
E
对照. mMCJ
MCJ
肌动蛋白
F
肝 心脏 肾 肺
MCJ
肌动蛋白
G
CD4 CD8
MCJ
肌动蛋白

图 1

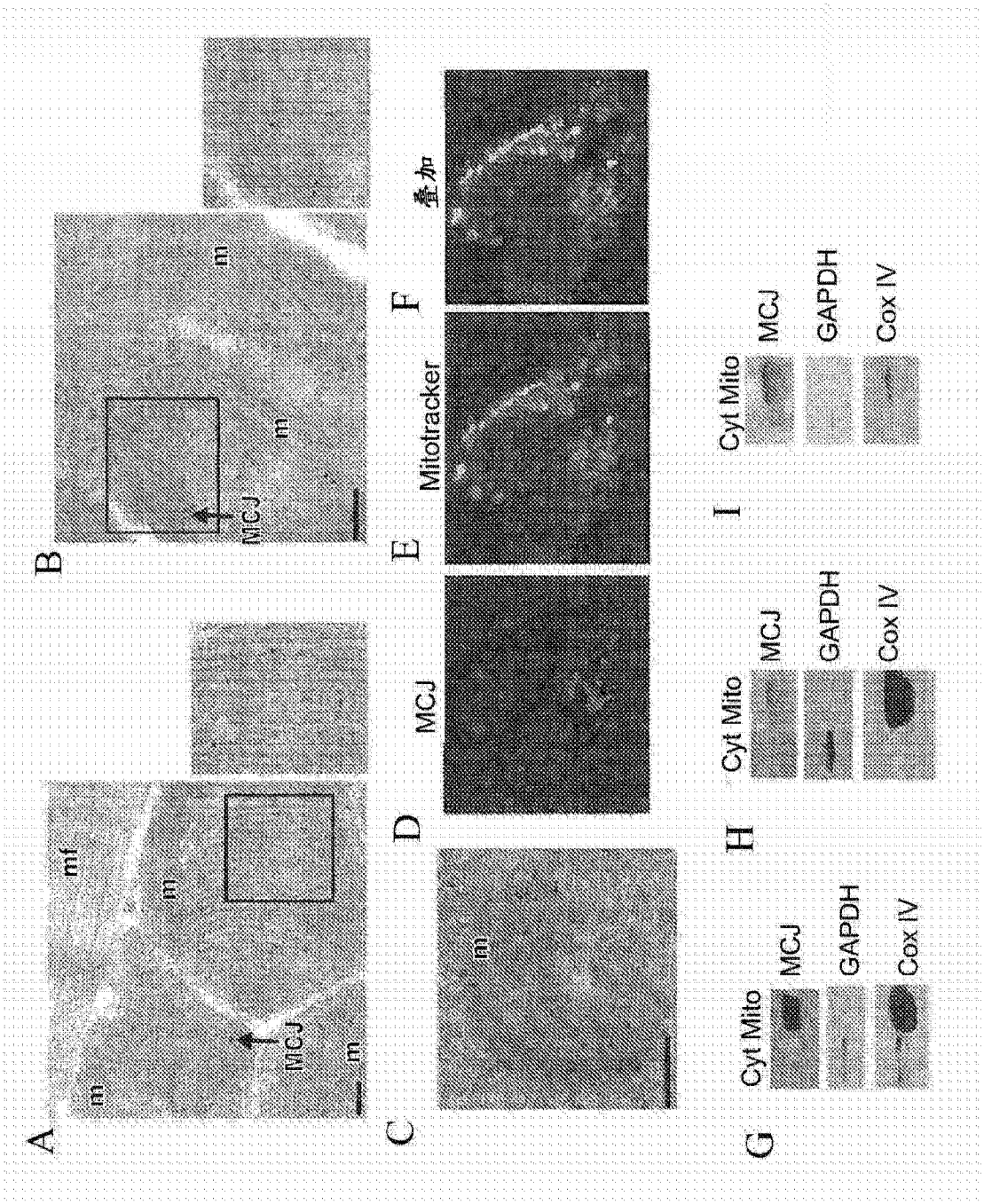
A
mf
m
MCJ
m
B
m
m
MCJ
C
m
D
MCJ
E
Mitotracker
F
叠加
G
Cyt Mito
MCJ
GAPDH
Cox IV
H
Cyt Mito
MCJ
GAPDH
Cox IV
I
Cyt Mito
MCJ
GAPDH
Cox IV

图 2

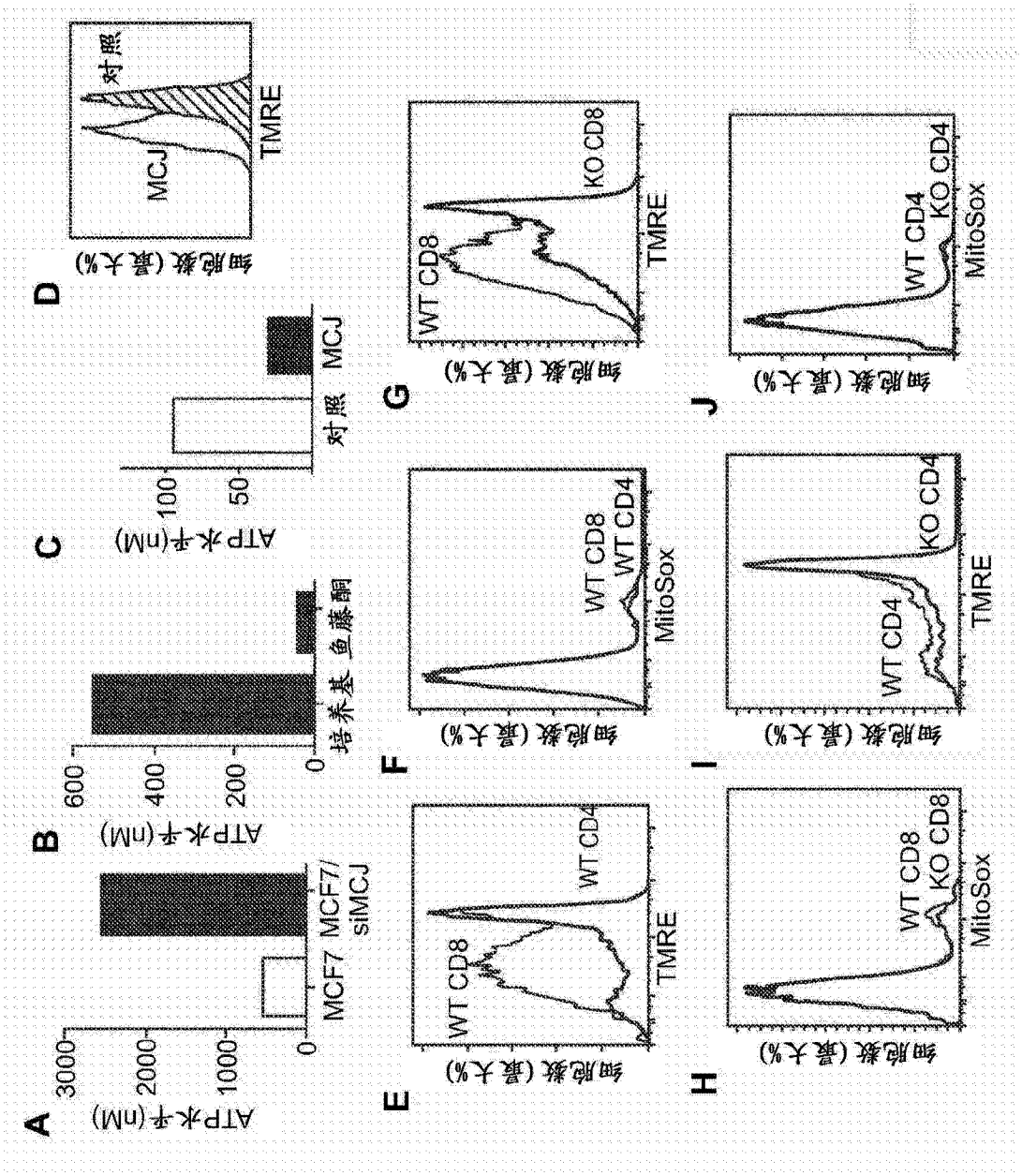
A
ATP水平(nM)
3000
2000
1000
0
MCF7
MCF7/siMCJ
B
ATP水平(nM)
600
400
200
0
培养基
鱼藤酮
C
ATP水平(nM)
100
50
对照
MCJ
D
细胞数(最大%)
MCJ
对照
TMRE
E
细胞数(最大%)
WT CD8
WT CD4
TMRE
F
细胞数(最大%)
WT CD8
WT CD4
MitoSox
G
细胞数(最大%)
WT CD8
KO CD8
TMRE
H
细胞数(最大%)
WT CD8
KO CD8
MitoSox
I
细胞数(最大%)
WT CD4
KO CD4
TMRE
J
细胞数(最大%)
WT CD4
KO CD4
MitoSox

图 3

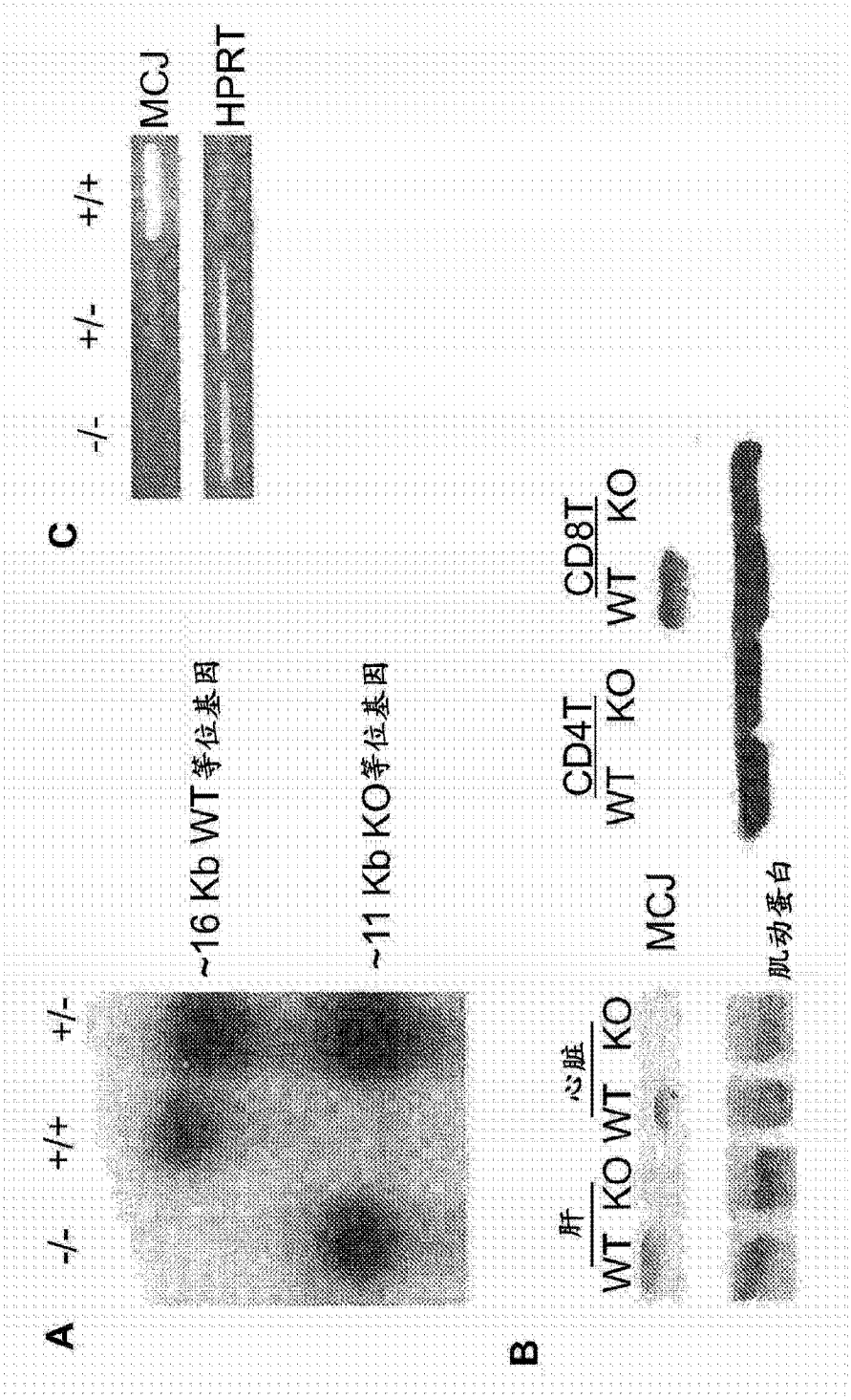
A
-/-
+/+
+/-
~16 Kb WT等位基因
~11 Kb KO等位基因
B
肝
心脏
WT KO WT KO
MCJ
CD4T
WT KO
CD8T
WT KO
肌动蛋白
C
-/-
+/-
+/+
MCJ
HPRT

图 4

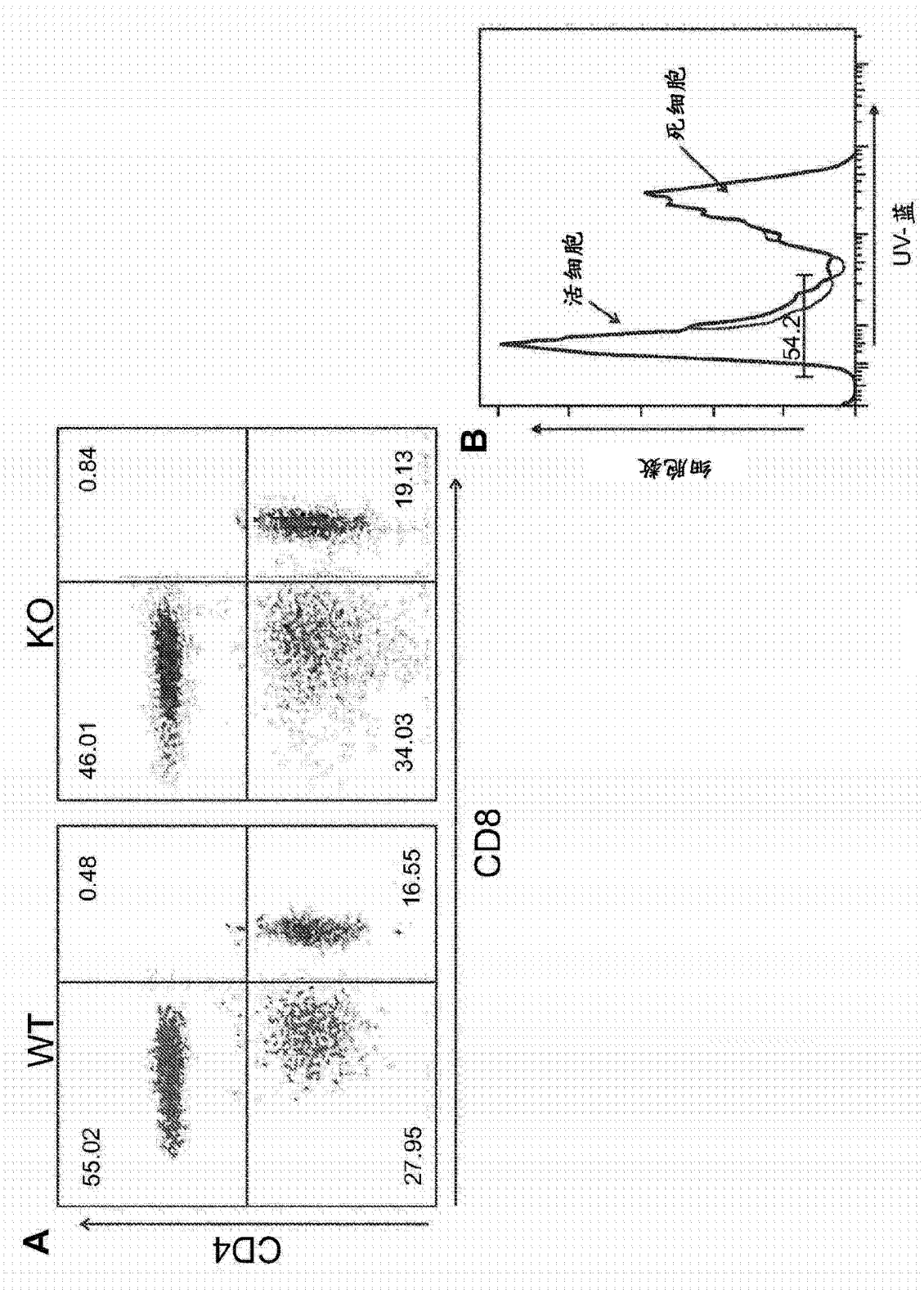
A
WT
KO
CD4
CD8
55.02
0.48
27.95
16.55
46.01
0.84
34.03
19.13
B
细胞数
活细胞
死细胞
54.2
UV-荧

图 5

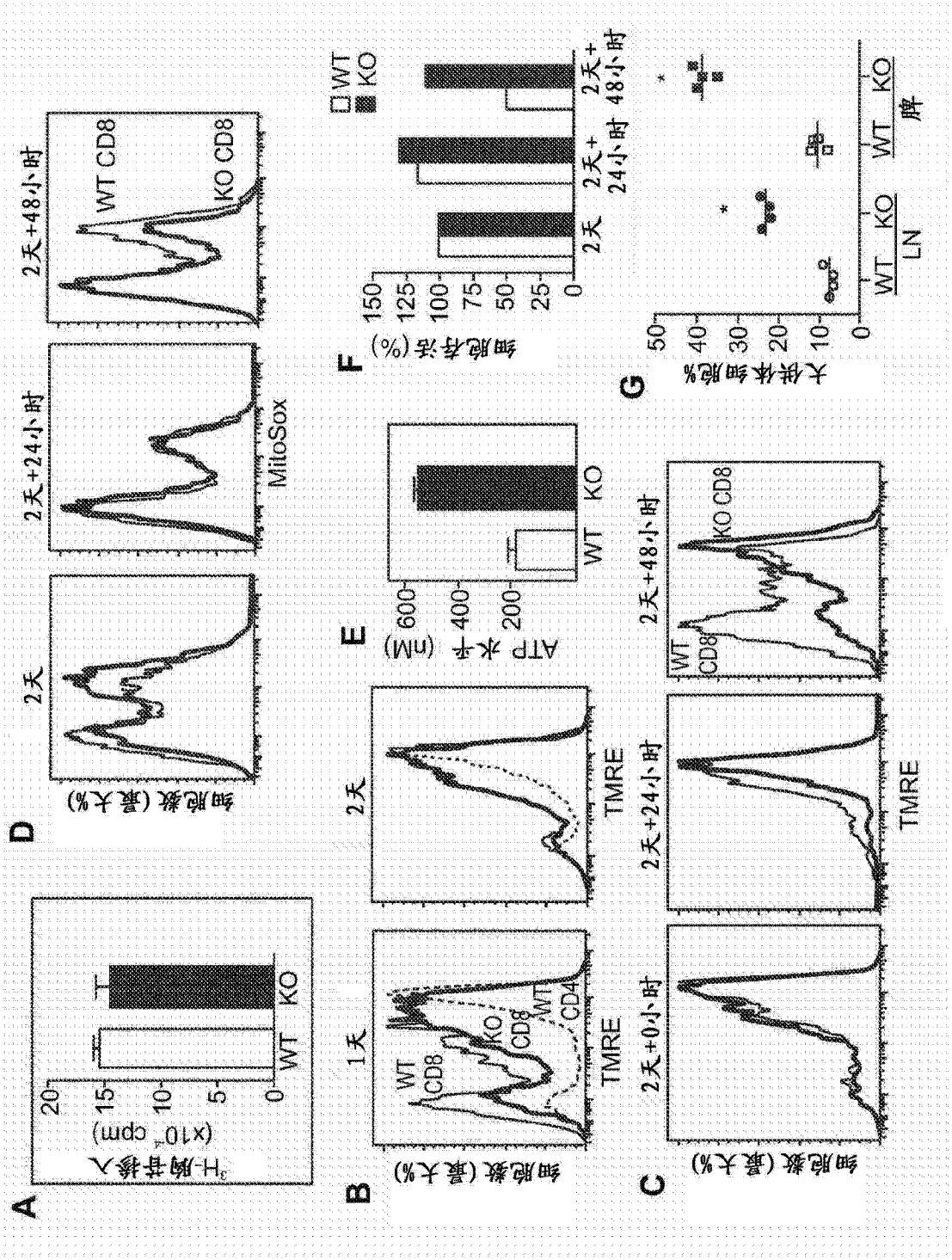
A
3H-胸苷掺入
(x10⁴ cpm)
WT
KO
B
1天
2天
细胞数 (最大%)
WT CD8
KO CD8
CD4
TMRE
C
2天+0小时
2天+24小时
2天+48小时
D
2天
2天+24小时
2天+48小时
MitoSox
E
ATP 水平 (nM)
F
细胞存活(%)
2天
2天+24小时
2天+48小时
G
大供体细胞%
LN
脾

图 6

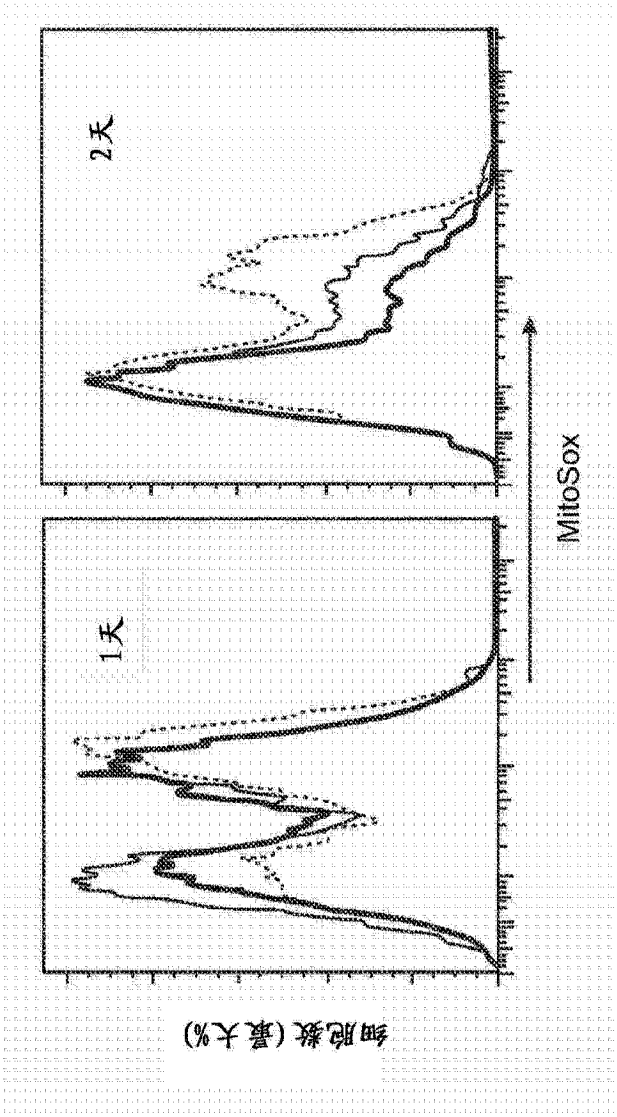

图 7

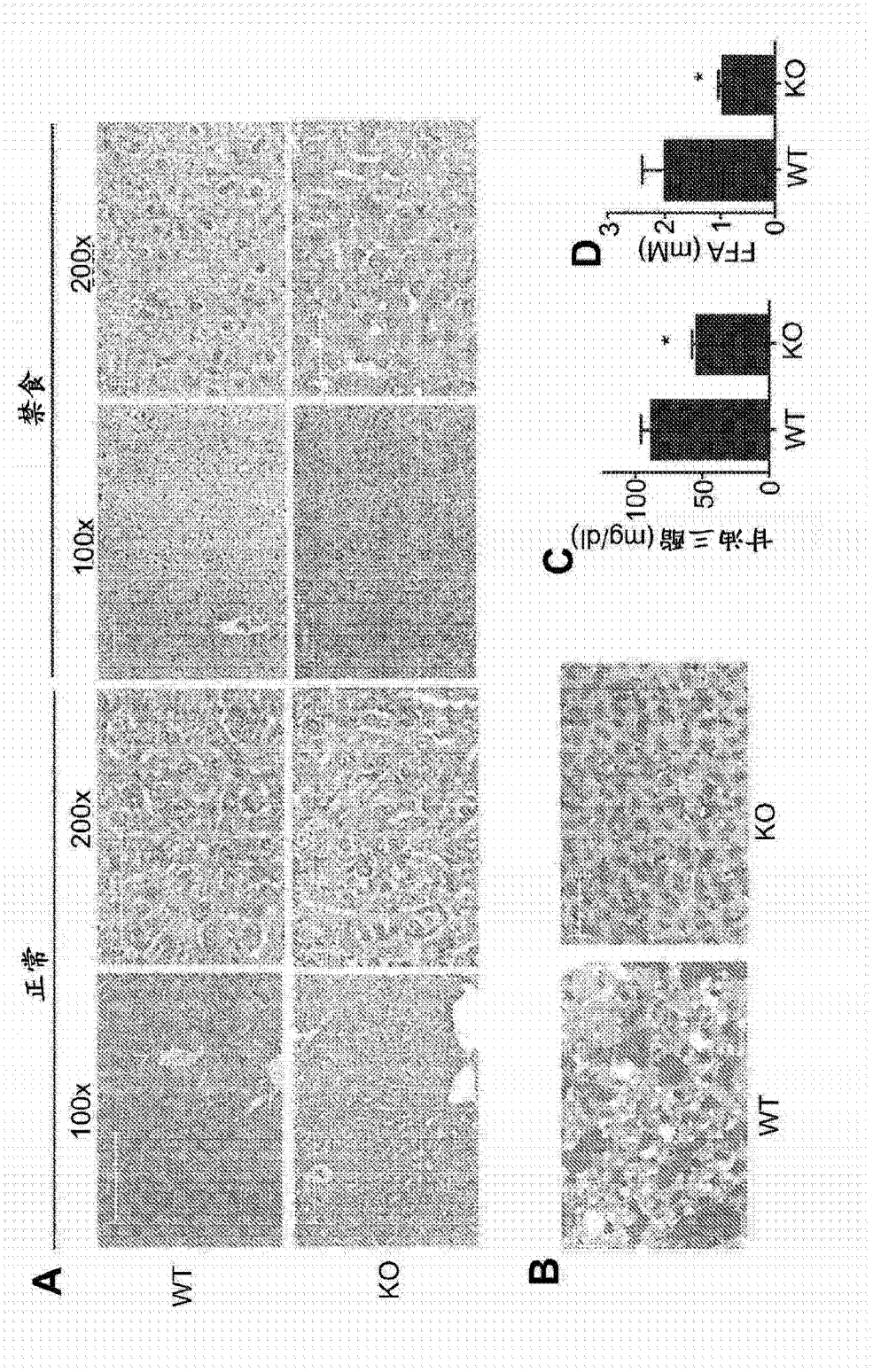
A
正常
禁食
100x
200x
100x
200x
WT
KO
B
WT
KO
C
甘油三酯 (mg/dl)
100
50
0
WT
KO
*
D
FFA (mM)
3
2
1
0
WT
KO
*

图 8

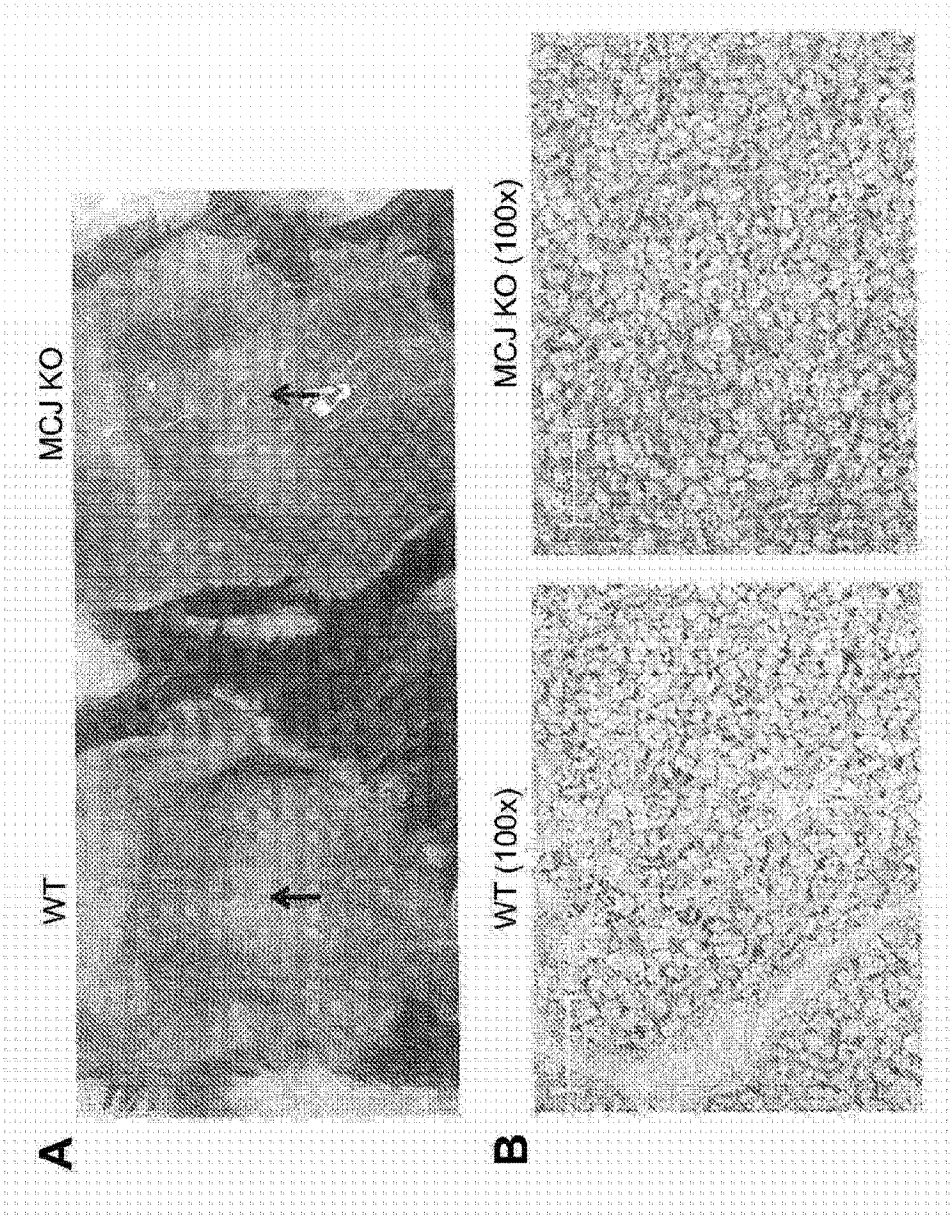

图 9

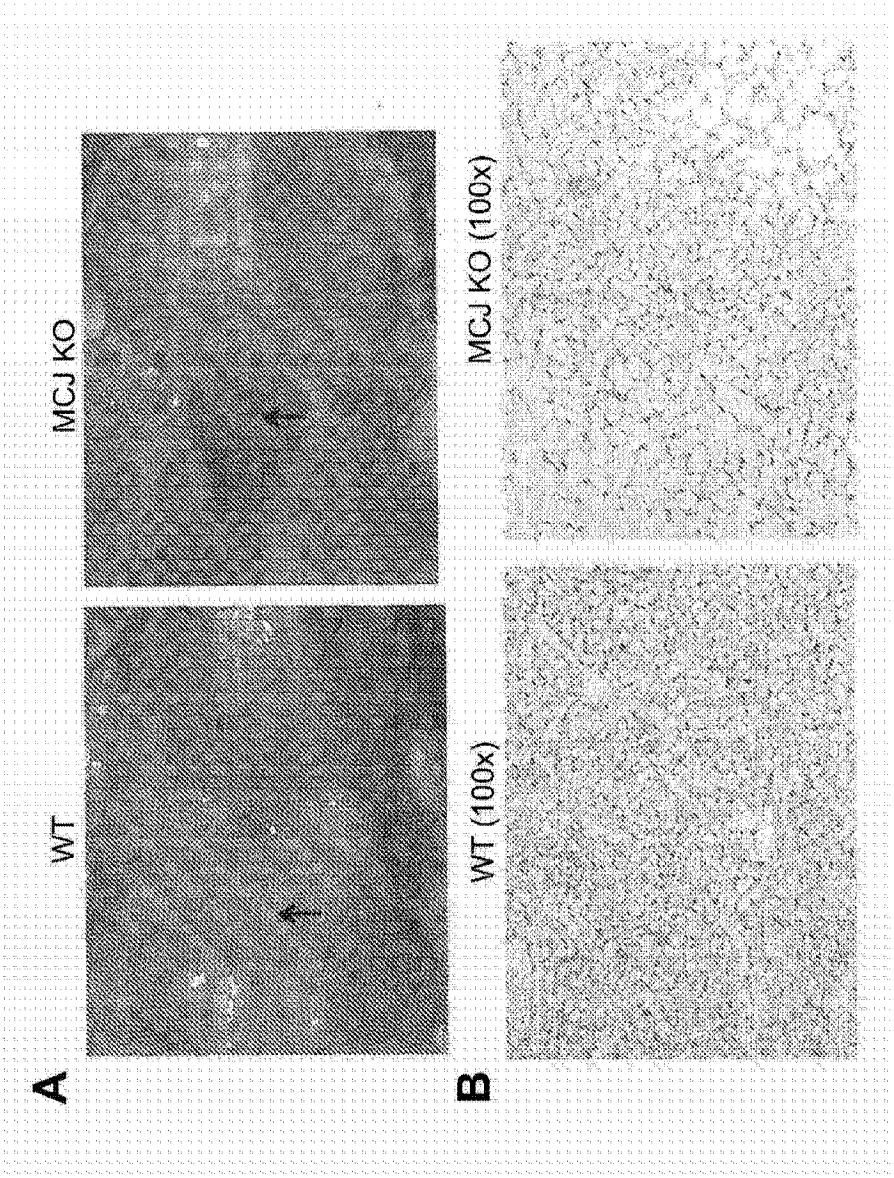

图 10

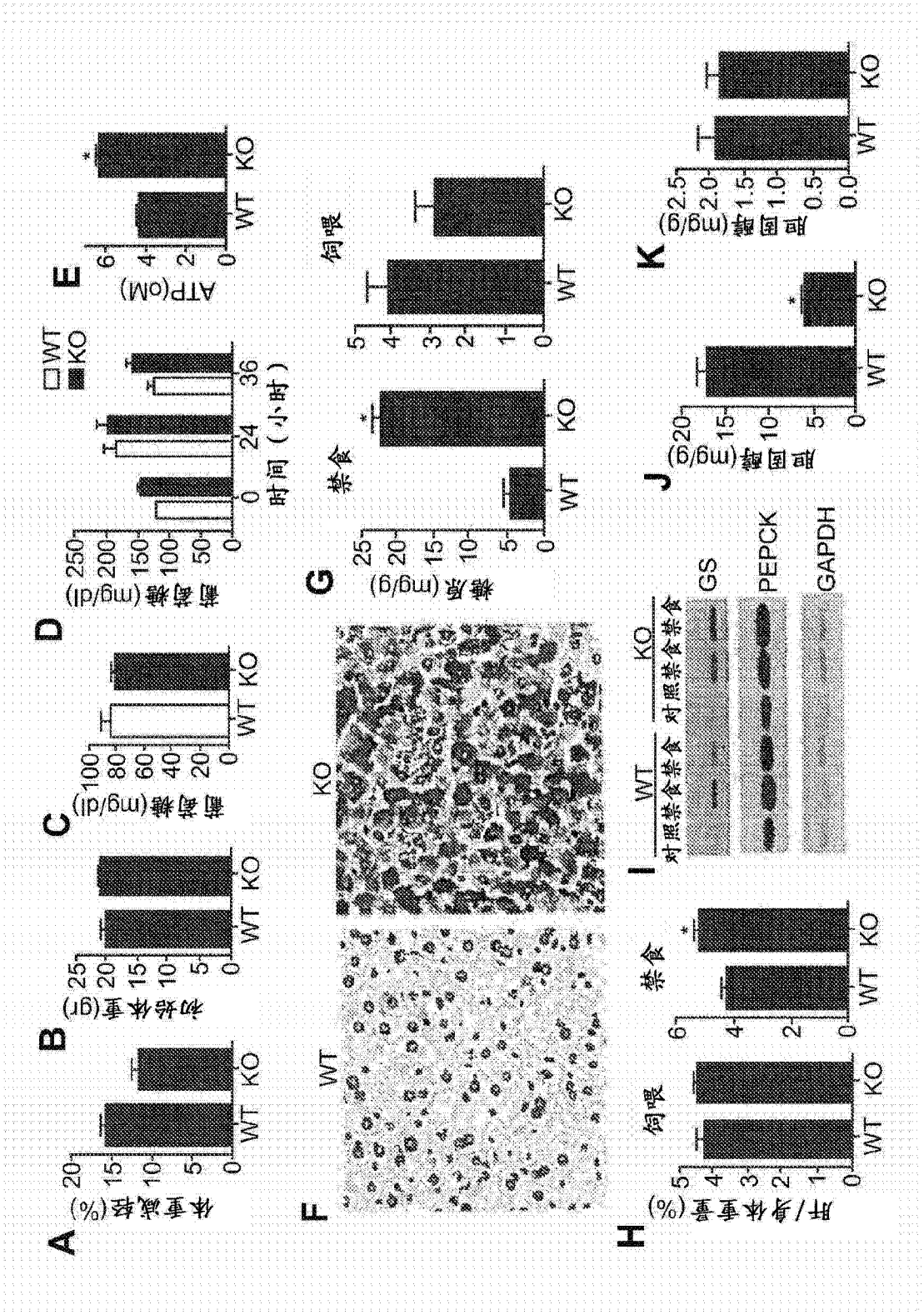
A
体重减轻(%)
B
初始体重(gr)
C
葡萄糖(mg/dl)
D
葡萄糖(mg/dl)
时间（小时）
WT
KO
E
ATP(oM)
F
WT
KO
G
禁食
饲喂
糖原 (mg/g)
H
肝/身体重量(%)
饲喂
禁食
I
对照禁食禁食
对照禁食禁食
GS
PEPCK
GAPDH
J
胆固醇(mg/g)
K
胆固醇(mg/g)

图 11

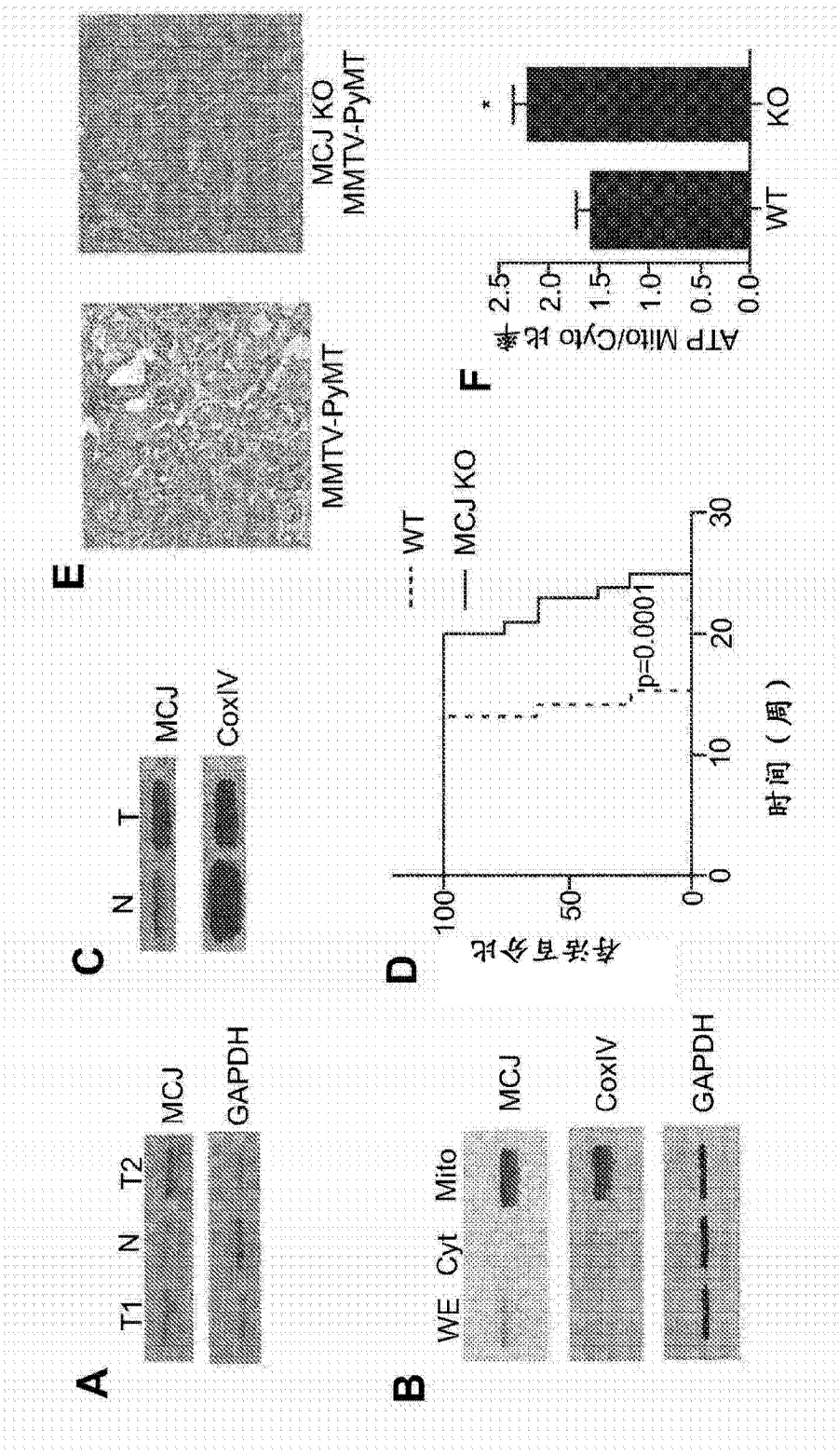
A
T1
N
T2
MCJ
GAPDH
B
WE
Cyt
Mito
MCJ
CoxIV
GAPDH
C
N
T
MCJ
CoxIV
D
WT
MCJ KO
p=0.0001
存活百分比
时间（周）
E
MMTV-PyMT
MCJ KO
MMTV-PyMT
F
ATP Mito/Cyto 比率
WT
KO

图 12

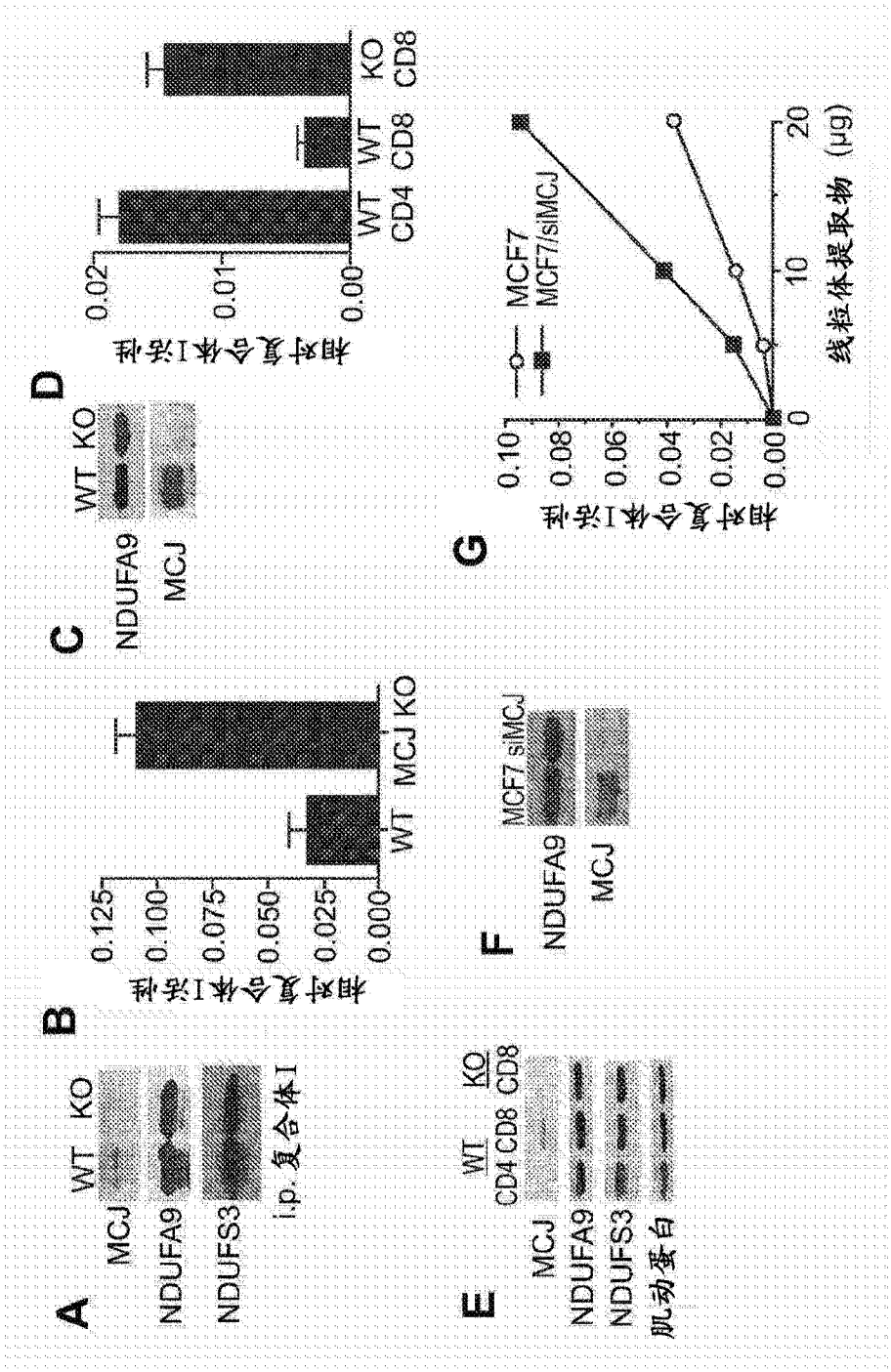
A
WT KO
MCJ
NDUFA9
NDUFS3
i.p. 复合体I
B
相对复合体I活性
0.125
0.100
0.075
0.050
0.025
0.000
WT MCJ KO
C
WT KO
NDUFA9
MCJ
D
相对复合体I活性
0.02
0.01
0.00
WT CD4
WT CD8
KO CD8
E
WT KO
CD4 CD8 CD8
MCJ
NDUFA9
NDUFS3
肌动蛋白
F
MCF7 siMCJ
NDUFA9
MCJ
G
相对复合体I活性
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
MCF7
MCF7/siMCJ
0
10
20
线粒体提取物 (μg)

图 13