



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101448942 B

(45) 授权公告日 2014. 04. 23

(21) 申请号 200680052681. X

(56) 对比文件

(22) 申请日 2006. 12. 12

Zhao Y et al..Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis.《Nature》.2005, 第 436 卷 214-220.

(30) 优先权数据

60/749, 544 2005. 12. 12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2008. 08. 12

审查员 曹丙洲

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2006/047255 2006. 12. 12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02007/070483 EN 2007. 06. 21

(73) 专利权人 北卡罗来纳大学查珀尔希尔分校

地址 美国北卡罗来纳

(72) 发明人 王大之 陈健夫

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 康健 林晓红

(51) Int. Cl.

C12N 15/11 (2006. 01)

A61P 21/00 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书49页

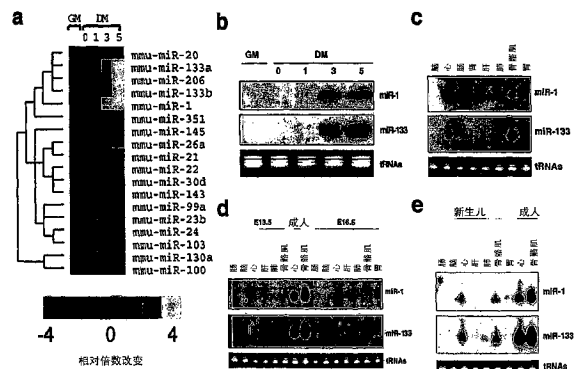
序列表25页 附图36页

(54) 发明名称

调节肌细胞增殖和分化的 MICRORNA

(57) 摘要

本发明提供了调节肌细胞中基因表达的方法和组合物。本发明还提供了包含本发明组合物的细胞。



1. 有效量的 miR-1、miR-1 抑制剂、miR-133、和 miR-133 抑制剂在制备用于治疗对象中肌损伤的药物中的用途,其中在第一时间点将 miR-133 与 miR-1 抑制剂组合给予所述肌损伤部位,并在第二时间点将 miR-1 与 miR-133 抑制剂组合给予所述肌损伤部位。

2. 权利要求 1 的用途,其中所述肌损伤得自机械性肌创伤、肌组织退行性疾病、心肌损伤或者其组合。

3. 权利要求 1 的用途,其中所述 miR-1 是包含 SEQ ID NO:1 的序列的 miRNA 前体分子或者是由 SEQ ID NO:1 的序列组成的核酸分子。

4. 权利要求 1 的用途,其中 miR-133 是包含 SEQ ID NO:2 的序列的 miRNA 前体分子或者是由 SEQ ID NO:2 的序列组成的核酸分子。

5. 权利要求 1 的用途,其中所述 miR-1 的抑制剂是经修饰的多核苷酸,其包含与 miR-1 互补的核苷酸序列。

6. 权利要求 5 的用途,其中所述 miR-1 的抑制剂是 2' -O- 甲基 -miR-1,其序列为 SEQ ID NO:62 所示。

7. 权利要求 1 的用途,其中所述 miR-133 的抑制剂是经修饰的多核苷酸,其包含与 miR-133 互补的核苷酸序列。

8. 权利要求 7 的用途,其中所述 miR-133 的抑制剂是 2' -O- 甲基 -miR-133,其序列为 SEQ ID NO:63 所示。

9. 权利要求 1 的用途,其中 miR-1 和 / 或 miR-133 由载体编码。

10. 权利要求 9 的用途,其中所述载体包含:

- (a) 与编码 miR-1 和 / 或 miR-133 的核酸分子可操纵地连接的启动子;及
- (b) 转录终止序列。

11. 有效量的 miR-1 抑制剂和 miR-133 在制备用于治疗对象中肌损伤的药物中的用途,其中所述 miR-1 抑制剂和 miR-133 在组合给予肌损伤部位时增加损伤部位的肌细胞增殖。

12. 有效量的 miR-133 抑制剂和 miR-1 在制备用于治疗对象中肌损伤的药物中的用途,其中所述 miR-133 抑制剂和 miR-1 在组合给予肌损伤部位时增加损伤部位的肌细胞分化。

13. 一种增加肌细胞分化的体外方法,所述方法包括将肌细胞与 miR-133 抑制剂和 miR-1 接触。

14. 权利要求 13 的体外方法,其中所述 miR-1 是包含 SEQ ID NO:1 的序列的 miRNA 前体分子或者是由 SEQ ID NO:1 的序列组成的核酸分子。

15. 一种增加肌细胞增殖的体外方法,所述方法包括将肌细胞与 miR-1 抑制剂和 miR-133 接触。

16. 权利要求 15 的体外方法,其中所述 miR-133 是包含 SEQ ID NO:2 的序列的 miRNA 前体分子或者是由 SEQ ID NO:2 的序列核酸分子。

17. 权利要求 13 或 15 的方法,其中所述 miR-1 或 miR-133 由载体编码。

调节肌细胞增殖和分化的 MICRORNA

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本文公开的主题要求 2005 年 12 月 12 日申请的美国临时专利申请系列号 60/749,544 的利益,该申请全文并入作参考。

[0003] 资金声明

[0004] 本申请由国立健康研究院的资金 R01-HL075251 资助,因此,美国政府在本文公开的主题中有一些权利。

技术领域

[0005] 本发明一般性涉及调节肌细胞中基因表达的方法和组合物。本发明更特别涉及使用 microRNAs (miRNA) 调节肌细胞中基因表达水平的方法,并涉及包含 miRNA 的组合物。

[0006] 发明背景

[0007] 了解调节细胞增殖和分化的分子机制是发育生物学的核心问题。MicroRNA (miRNA) 是近年来揭示的转录后调节基因表达的大约 22 类核苷酸调节性 RNA 中的一类^{1,2}。越来越多的证据表明 miRNA 在多种生物学进程中的关键作用³⁻⁸。

[0008] 然而,本领域仍长期且持续需要鉴别 miRNA 在生物学进程中的作用。本发明专注于本领域的这种及其它需要。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明概述列出了本发明的一些实施方案,以及在许多情况中这些实施方案的变化和改变。本发明概述只是例证了多个不同的实施方案。同样只是例证了指定实施方案的一或多个特征。这种实施方案可以典型地具有或不具有所提及的特征;同样,那些特征可以用于本发明概述中列出或未列出的本发明的其它实施方案。为了避免重复,本发明概述未列出或提出这种特征的所有可能的组合。

[0011] 在本发明的一个实施方案中,提供了一种治疗对象中肌损伤的方法。在一些实施方案中,所述方法包括给予对象中的肌损伤部位有效量的 miRNA 或者编码 miRNA 的载体或者 miRNA 的抑制剂,其中所述 miRNA 靶向于肌损伤部位的肌细胞中的基因。在一些实施方案中,miRNA 的抑制剂能与靶 miRNA 杂交;在一些实施方案中,所述靶 miRNA 选自 miR-1、miR-133、miR-206、miR-208、miR-22、miR-26、miR-29、miR-30、miR-128、miR-143 和 miR-145 组成的组。在一些特殊的实施方案中,首先将 miRNA-133 和 miRNA-1 的抑制剂组合给予肌损伤部位,其次将 miRNA-1 和 miRNA-133 的抑制剂组合给予肌损伤部位,从而治疗所述肌损伤。在一些实施方案中,所述肌损伤是由于机械性肌组织创伤 (mechanical muscle trauma)、肌退行性病变 (muscular degenerative disorder)、心肌损伤 (cardiac insult) 或者这些原因的组合所致。在一些实施方案中,所述对象是哺乳动物。

[0012] 在本发明的另一个实施方案中,提供了一种调节肌细胞分化、增殖或者这两者的方法。在一些实施方案中,所述方法包括将肌细胞与靶向于所述肌细胞中基因的可调节肌细胞分化、增殖或这二者的 miRNA 或者编码所述 miRNA 的载体接触。在一些实施方案中,所述调节是抑制,且在一些实施方案中,所述 miRNA 抑制基因的翻译。

[0013] 在本发明的再一个实施方案中,提供了一种调节肌细胞中的基因表达的方法。在一些实施方案中,所述方法包括将肌细胞与靶向于所述肌细胞中基因的 miRNA 或者编码 miRNA 的载体接触。在一些实施方案中,所述调节是抑制,且在一些实施方案中,所述 miRNA 抑制所述基因的翻译。

[0014] 在本发明的另一个实施方案中,提供了一种抑制肌细胞中的基因表达的方法。在一些实施方案中,所述方法包括用编码 miRNA 分子的载体转化所述肌细胞,其中所述 miRNA 分子包含与所述基因的 17 个-24 个连续核苷酸的亚序列至少 70% 相同的核苷酸序列,除外的是所述 miRNA 包含尿嘧啶代替在所述基因中发现的任何胸腺嘧啶。在一些实施方案中,所述 miRNA 抑制所述基因的翻译。

[0015] 在本发明揭示的方法的一些实施方案中,所应用的 miRNA 包含选自 SEQ ID NO: 1-11 中任一序列及与 SEQ ID NO: 1-11 至少 70% 相同的任一核苷酸序列组成的组。在一些实施方案中,所述 miRNA 选自 miR-1、miR-133、miR-206、miR-208、miR-22、miR-26、miR-29、miR-30、miR-128、miR-143 和 miR-145 组成的组。另外,在一些实施方案中,所述 miRNA 靶向于所述基因的 3' 未翻译区域。

[0016] 另外,在所述方法的一些实施方案中,由所述 miRNA 靶向的基因选自肌细胞分化基因(例如编码组蛋白脱乙酰酶 4(HDAC4) 多肽的基因,或者编码甲状腺激素受体蛋白 240(TRAP240) 的基因)、肌细胞增殖基因(例如编码血清应答因子(SRF) 多肽的基因)及激素相关蛋白(例如编码甲状腺激素相关蛋白的基因 1(Thrap1))。

[0017] 在本发明的另一个实施方案中,提供了编码 miRNA 的载体。在一些实施方案中,所述载体包含与编码所述 miRNA 分子的核酸分子可操纵地连接的启动子,及包含转录终止序列。另外,在一些实施方案中,所述载体掺入一个试剂盒中,该试剂盒进一步包含将所述载体导入肌细胞中的至少一种试剂。在一些实施方案中,所述试剂盒进一步包含将所述载体导入肌细胞中的说明书。

[0018] 因此,本发明的一个目的是提供一种使用 miRNA 介导的方法操纵肌细胞中基因表达的方法。通过本发明可以全部或部分实现这个目的。

[0019] 本发明的一个目的在上文已经阐述,本领域技术人员在研究了如下发明描述和非限制性实施例之后将显而易见本发明的其它目的。

[0020] 附图简述

[0021] 图 1a-1e 描述了 miR-1 和 miR-133 在发育期间的心肌和骨骼肌中的表达数据。

[0022] 图 1a 示出了在生长培养基(GM) 或者在分化培养基(DM) 中分别培养 0、1、3 和 5 天的 C2C12 肌细胞的 miRNA 阵列表达数据。归一化的 log(以 2 为底) 数据由基因分级聚类,并绘图为热图(heat map)。信号范围为 -4 倍至 +4 倍。黄色表示相对于中值高水平表达,蓝色表示相对于中值低水平表达,并示出了在分化培养基中被上调的唯一 miRNA 节。

[0023] 图 1b 描述了 miR-1 和 miR-133 表达的 Northern 印迹分析,使用分离自在 GM 或 DM 中分别培养 0、1、3 和 5 天的 C2C12 肌细胞的总 RNA。tRNA 用作加样对照。

[0024] 图 1c 描述了 miR-1 和 miR-133 在成年小鼠中表达的 Northern 印迹分析。

[0025] 图 1d 描述了 miR-1 和 miR-133 在胚胎期第 13.5(E13.5) 和 16.5(E16.5) 天的小鼠组织中表达的 Northern 印迹分析。

[0026] 图 1e 描述了 miR-1 和 miR-133 在新生小鼠组织中表达的 Northern 印迹分析。将

来自成年小鼠心肌和骨骼肌的相同量的总 RNA 加样于印迹中, 以与胚胎和新生儿 RNA 进行对比 (图 1d 和 1e)。

[0027] 图 2a-2j 描述了显示出 miR-1 和 miR-133 调节肌细胞增殖和分化的数据。将在生长培养基 (GM) 中培养的 C2C12 肌细胞用 miR-1、miR-133 的双链 miRNA 双链体电穿孔, GFP 作为对照。

[0028] 图 2a-2e 示出实验结果, 其中将转染后的细胞在 GM 中连续培养 24 小时, 然后移至分化培养基 (DM) 中培养 12 小时或 36 小时之后分别对肌形成蛋白 (myogenin) (图 2a) 或 MHC (图 2b) 免疫染色。将在 GM 中培养的 C2C12 肌细胞用 miR-1、miR-133 (或其指定突变体) 或者作为对照的 miR-208 和 GFP 的双链 miRNA 双链体电穿孔, 在培养 24 小时之后使用指定抗体进行 Western 印迹 (图 2c), 将细胞移至 DM 中培养 24 小时, 对指定基因进行 RT-PCR (图 2d); 或者将细胞移至 DM 中培养 24 小时, 使用指定抗体进行 Western 印迹 (图 2e)。

[0029] 图 2f-2h 示出实验结果, 其中将在 GM 中培养的 C2C12 肌细胞用针对 miR-1、miR-133 或者作为对照的 miR-208 和 GFP 的 2'-O- 甲基反义寡核苷酸抑制剂电穿孔。将转染后的细胞在 GM 中培养 24 小时, 然后移至 DM 中进行如下步骤: 12 小时后用磷酸-组蛋白 H3 免疫染色 (图 2f); 24 小时之后对指定基因进行 RT-PCR (图 2g); 或者 24 小时之后用指定抗体进行 Western 印迹 (图 2h)。

[0030] 图 2i 和 2j 示出实验结果, 其中将在 GM 中培养的 C2C12 肌细胞用指定的 miRNA 双链体或者 2'-O- 甲基反义寡核苷酸抑制剂电穿孔。将转染后的细胞在 GM 中培养 24 小时, 然后移至 DM 中培养 12 小时后用肌形成蛋白 (图 2i) 或者磷酸-组蛋白 H3 (图 2j) 免疫染色。计数阳性染色的细胞, 并将数据以相对于 GFP 对照组的表达水平 (100%) 表示。

[0031] 图 3a-3k 描述了 miR-1 和 miR-133 在体内控制心肌和骨骼肌发育的数据。

[0032] 图 3a-3h 示出得自 *Xenopus* 胚胎实验的数据。*Xenopus* 胚胎得自未注射的 (图 3a 和 3b)、注射对照 GFP RNA 的 (图 3c 和 3d)、注射 miR-1 的 (图 3e 和 3f) 或者注射 miR-133 的 (图 3g 和 3h) 抗原肌球蛋白染色的胚胎, 并示出在亮视野 (图 3a、3c、3e 和 3g) 或者荧光 (图 3b、3d、3f 和 3h) 下的第 32 阶段。注意心肌组织无染色 (图 3b 和 3d, H 箭头) 及节段的体节破坏 (图 3f 和 3h, S 箭头)。

[0033] 图 3i-3k 示出 *Xenopus* 胚胎的横切面。*Xenopus* 胚胎的横切面相应于第 32 阶段胚胎的心脏的位置, 所述胚胎为未注射的 (图 3i)、注射 miR-1 的 (图 3j) 或者注射 miR-133 的 (图 3k) 胚胎, 并用抗原肌球蛋白染色以观测体节 (S 箭头) 和心肌组织 (H 箭头) 并用抗磷酸-组蛋白 H3 (红色) 染色以观测 S 期细胞。每组注射单独进行至少两次, 在至少 90% 的最少 50 个胚胎中通过全标本包埋免疫染色评分观测表型。

[0034] 图 4a-4i 示出骨骼肌中 miR-1 和 miR-133 靶基因的鉴别。

[0035] 图 4a 示出 miR-133 和 miR-1 对 SRF 和 HDAC4 3'UTR 的抑制。将含有来自小鼠 SRF 3'UTR (SRF-3'-UTR) 的 miR-133 互补位点、小鼠 HDAC4 3'UTR (HDAC4-3'-UTR) 的 miR-1 互补位点或者 miR-133 (miR-133-luc) 或 miR-1 (miR-1-luc) 的完全反义序列的萤光素酶报道基因与指定的 miRNA 表达载体或者其突变体共转染。在转染 48 小时后确定萤光素酶活性。数据以来自一式两份进行的至少三个独立实验的平均值 \pm 标准误差表示 (* $P < 0.05$)。

[0036] 图 4b 示出转染进 C2C12 肌细胞中的 SRF-3'-UTR、HDAC4-3'-UTR 和 MCK-luc 萤

光素酶报道基因的结果。细胞在 GM 中培养 24 小时,或者移至 DM 中培养 1 天 (DM1) 或 3 天 (DM3),之后确定萤光素酶活性。

[0037] 图 4c-4e 示出在 GM 中培养的并且用指定的双链 miRNA 双链体 (或其突变体) 或者作为对照的 miR-208 和 GFP 电穿孔的 C2C12 肌细胞的结果数据。转染后的细胞在 GM 中培养 24 小时,之后进行如下步骤:使用抗-SRF 和抗-HDAC4 抗体进行 Western 印迹 (图 4c);将细胞移至 DM 中培养 24 小时并对指定基因进行 RT-PCR (图 4d);将细胞移至 DM 中培养 24 小时并使用指定抗体进行 Western 印迹。将在 GM 中培养的 C2C12 肌细胞用指定的 2'-O-甲基反义寡核苷酸抑制剂电穿孔 (图 4e)。

[0038] 图 4f 和 4g 示出将转染后的细胞在 GM 中培养 24 小时,然后移至 DM 中培养 24 小时,之后针对指定基因进行 RT-PCR (图 4f) 及使用指定抗体进行 Western 印迹的结果 (图 4g)。

[0039] 图 4h 示出在 GM 中培养且用指定的双链 miRNA 双链体或者 / 和指定的 SRF 或 HDAC4 的表达质粒电穿孔的 C2C12 肌细胞的结果。将转染后的细胞在 GM 中培养 24 小时。在移至 DM 中之后使用指定抗体进行 Western 印迹。

[0040] 图 4i 示出在 GM 或 DM 中培养 0、1、3 或 5 天的 C2C12 肌细胞的结果。使用指定抗体进行 Western 印迹。

[0041] 图 5 示出 miR-1 和 miR-133 介导的调节骨骼肌增殖和分化的模型。

[0042] 图 6 示出在生长培养基 (GM) 或分化培养基 (DM) 中分别培养 0、1、3 和 5 天的 C2C12 肌细胞的 miRNA 阵列表达数据的分析资料。归一化的 \log_2 (以 2 为底) 数据是基因分级聚类数据,并且绘制为热图。信号范围是从 -4 倍至 +4 倍。淡阴影表示相对于中值的高水平表达,浓阴影表示相对于中值的低水平表达。

[0043] 图 7a-7d 示出 miR-1、miR-133 和骨骼肌分化标记基因在 C2C12 细胞中的表达。

[0044] 图 7a 和 7b 示出对 miR-1 (图 7a) 和 miR-133 (图 7b) 的表达进行的 Northern 印迹分析,使用分离自在 GM 或者在分化培养基 (DM) 中分别培养 0、1、3 和 5 天的 C2C12 肌细胞的总 RNA 进行所述分析。成熟的 miRNA 及其前体 (Pre) 被指明。tRNA 用作加样对照。

[0045] 图 7c 示出骨骼肌分化标记基因的半定量 RT-PCR 分析。GAPDH 用作等量加样的对照。

[0046] 图 7d 示出骨骼肌分化标记基因的表达。将 C2C12 肌细胞在生长培养基 (GM) 或者在分化培养基 (DM) 中培养 0、1、3 和 5 天,使用指定抗体对细胞提取物进行 Western 印迹分析。 β -微管蛋白用作加样对照。

[0047] 图 8a-8f 示出 miR-1 和 miR-133 在成年小鼠及发育中小鼠的心肌和骨骼肌中的表达。图中示出了 miR-1 (图 8a) 和 miR-133 (图 8d) 在成年小鼠组织中表达的 Northern 印迹分析。图中示出了 miR-1 (图 8b) 和 miR-133 (图 8e) 在胚胎第 13.5 天 (E13.5) 和 16.5 天 (E16.5) 小鼠组织中表达的 Northern 印迹分析。另外将等量的成熟心肌和骨骼肌的总 RNA 加样于所述印迹中以进行对比。图中示出了 miR-1 (图 8c) 和 miR-133 (图 8f) 在新生小鼠组织中表达的 Northern 印迹分析。另外将等量的成熟心肌和骨骼肌的总 RNA 加样于所述印迹中以进行对比。成熟 miRNA 及其前体 (Pre) 被指明。tRNA 用作加样对照。

[0048] 图 9a-9e 示出 miR-1 和 miR-133 初级转录物在心肌和骨骼肌中的表达。

[0049] 图 9a 示出在小鼠染色体 2 和 18 上聚集的 miR-1 和 miR-133 基因。图中示出了用

于图 9b-9e 中 Northern 印迹的探针。

[0050] 图 9b-9e 示出对来自染色体 2 (图 9d 和 9e) 和染色体 18 (图 9b 和 9c) 的 miR-1 (图 9c 和 9e) 及 miR-133 (图 9b 和 9d) 的初级转录物的表达进行的 Northern 印迹分析。使用来自指定成年小鼠组织的 20 μ g 总 RNA。

[0051] 图 10a-10g 示出 miR-1 和 miR-133 增强子可以指导心肌和骨骼肌中报道基因表达。

[0052] 图 10a 示出与 dsRed 连接的小鼠 miR-1 和 miR-133 基因组序列的转基因的 *Xenopus laevis* 的数据, 显示第 28 阶段的体节 (S, 箭头) 表达。

[0053] 图 10b 在明视野下第 46 阶段的具有 miR-1 和 miR-133 转基因的转基因 (Tg) *Xenopus laevis* (下面的胚胎) 及阴性对照组 (非转基因, Ct, 上面的胚胎)。

[0054] 图 10c 是图 10b 中相同胚胎在荧光下的照片。

[0055] 图 10d 是图 10b 中所述转基因胚胎在明视野中的高倍显微照片, 示出所述转基因在心肌 (H, 箭头) 和鳃弓 (BA, 箭头) 中的表达。

[0056] 图 10e 是图 10b 中所述转基因胚胎在荧光下的高倍显微照片, 示出所述转基因在心肌 (H, 箭头) 和鳃弓 (BA, 箭头) 中的表达。

[0057] 图 10f 是第 46 阶段转基因胚胎的高倍显微照片, 示出所述转基因在体节中的表达 (S, 箭头)。

[0058] 图 10g 示出小鼠染色体 2 的 miR-1/133 增强子的基因组 DNA 序列 (SEQ ID No :82)。图中标出了推定的 MEF2 位点和 CArG box, 并且示出了导入这些位点中的突变。

[0059] 图 11a-11h 示出在 C2C12 细胞中 miR-133 对 miR-133 感应器 (sensor) 的抑制。将稳定表达 miR-133 感应器的 C2C12 细胞用 GFP (对照)、野生型 miR-133 (miR-133)、其中“种子”序列已经被突变的突变的 miR-133 (miR-133mut) 的表达载体或者 miR-133 表达载体与 2' -0- 甲基反义寡聚体的组合 (miR-133+2' -0- 甲基) 转染。将细胞移至分化培养基中培养 12 小时, 使用相衬 (P/C) (图 11a-11d) 或荧光成像获得图像, 示出 dsRed 报道基因的表达 (图 11e-11h)。收获每种条件下培养的细胞, 使用 FACS 分析量化 dsRed 报道基因的表达 (下组)。线下开放 (Open) 区表示细胞的自身荧光素, 线下划线区表示 ds-Red 表达。

[0060] 图 12 示出 HDAC4 和 SRF 基因的 3' UTR 中 miR-1 和 miR-133 靶位点的序列。上面一组是来自保守的脊椎动物人 (SEQ ID NO :24)、黑猩猩 (SEQ ID NO :25)、小鼠 (SEQ ID NO :26)、大鼠 (SEQ ID NO :27)、狗 (SEQ ID NO :28) 和鸡 (SEQ ID NO :29) 的 HDAC4 3' UTR 序列, 及其与 miR-1 (SEQ ID NO :1) 和 miR-206 (SEQ ID NO :3) 的排列对比。下面一组是人 (SEQ ID NO :30 和 31) 和大鼠 (SEQ ID NO :32 和 33) 的 SRF 3' UTR 序列及其与 miR-133 的排列对比。保守的核苷酸序列以大写字体示出。

[0061] 图 13 描述了 miRNA 生物学发生的模型。(A) pri-miRNA 通过 RNA 聚合酶 II 在细胞核中转录, (B) 通过 Drosha 加工为含有茎-环的 pre-miRNA。(C) Exportin-5 识别 Drosha 左侧的 3' 突出端, 并将 pre-miRNA 输出到细胞质中, 在此 (D) Dicer 裂解茎-环下面的 pre-miRNA, 产生 ~ 22 个核苷酸的双链体。(E) 将单链掺入 RISC 中, 其中 (F) 识别 mRNA 的 3' 非翻译区内的互补序列并通过翻译抑制或 mRNA 裂解而调节基因表达。

[0062] 图 14a-14c 描述了 miR-208 基因组。图 14a 示出小鼠前体 miR-208 序列 (SEQ ID NO :34) 被折叠, 使用 mFold 及成熟 miR-208 (SEQ ID NO :4) 序列向右折叠。图 14b 示出小

鼠 (SEQ ID NO :35)、大鼠 (SEQ ID NO :36) 和人 (SEQ ID NO :37) 前体 miR-208 序列的序列排列对比。成熟 miR-208 序列在图 14A 的右上方示出。星号表示完全的序列保守。图 14c 示出源自 α -MHC 内含子的 miR-208。小鼠 miR-208 位于 α -MHC 的内含子 29 内。相似地, 人 miR-208 位于 α -MHC 的内含子 28 内。

[0063] 图 15a-15c 示出证实 miR-208 受发育调节的资料。对不同小鼠组织的总 RNA 进行印迹并且用与 miR-208 互补的 5'-放射性标记的寡脱氧核苷酸探查。凝胶上总 RNA 的等量加样通过在转移之前进行溴化乙啶染色而核实。

[0064] 图 15a 示出证实了 miR-208 是心肌特异性的资料。上面的信号是 pre-miR-208 转录物, 下面的信号是成熟的 22 个核苷酸形式。

[0065] 图 15b 示出相对于 miR-208 在成熟心肌和骨骼肌中的表达 miR-208 在新生小鼠组织中的表达。

[0066] 图 15c 示出相对于 miR-208 在成熟心肌和骨骼肌中表达 miR-208 在 E13.5 和 E16.5 小鼠不同组织中的表达。

[0067] 图 16a 和 16b 示出 miR-208 在心肌细胞中的异位表达。图 16a 示出使用放射性标记的 miR-208 反义寡核苷酸探查的 Ad-GFP 或 Ad-208 感染的心肌细胞的 Northern 印迹。图 16b 示出 MOI 为 1 和 10 感染的心肌细胞外荧光 (epifluorescent) 显微图。

[0068] 图 17 示出本发明揭示的条件转基因系统的图示。利用两个单独的转基因小鼠品系: 一种在 α -MHC 启动子的控制下表达 tTA-VP16 融合蛋白, 另一种具有在 CMV 最小启动子控制下的 miR-208 转基因。所述 CMV 最小启动子具有位于立即上游的四环素操纵子 (tetO) 的几个重复。交配所述两个品系 (推测是孟德尔遗传模式), 4 只小鼠中产生 1 只双重转基因小鼠。如果将强力霉素 (DOX) 给予双重转基因小鼠, 则 tTA-VP16 蛋白由 DOX 结合, 且 miR-208 的转录被抑制。如果不存在 DOX, 则 tTA 蛋白结合 tetO 多联体, 使得 VP16 结构域诱导 miR-208 从 CMV 最小启动子中转录。心肌特异性靶基因表达可以通过加入或除去 DOX 而被开启或关闭。James et al Am J Physiol 273 :H2105-H2118 在此并入作参考。

[0069] 图 18A-18C 是示出 miR-208 靶向 Thrsp1 的图示和序列排列对比。具有反义 miR-208 序列 (mir-208 感应器) 或者 Hemoglobin- β (Hbb) 的 3'UTRs 及甲状腺激素相关蛋白 1 (Thrsp1) (图 18A) 或者从 Thrsp1 3' UTR 中推定的 miR-208 结合位点的四个拷贝 (图 18B) 的萤光素酶报道基因附着于所述萤光素酶基因的立即下游, 在 293T 细胞中与增加量的 pCDNA3.1 miR-208 共转染。miR-208 感应器、Thrsp1 和 4x Thrsp1 报道基因均以剂量依赖性形式被抑制, 而阴性对照 CSNK 未明显改变。图 18C 示出成熟 miR-208 序列 (SEQ ID NO : 4) 结合推定的人 (SEQ ID NO :38) 和小鼠 (SEQ ID NO :39) Thrsp1 基因的 3'UTR 中 miR-208 靶位点。注意到这两个推定的靶位中完全保守的靶种子区域 (在 miR-208 的 5' 末端在第 2-8 位核苷酸)。

[0070] 图 19 示出 miR-208 调节心肌肌球蛋白重链同种型转变的模型。甲状腺激素核受体 (TR) 结合 α -MHC 和 β -MHC 基因的启动子中甲状腺受体元件 (TREs) 序列。所述 α -MHC 启动子含有由两个 TR 结合的全长 TRE, 而 β -MHC 在 TRE 的一半处由单个 TR 结合。TR 单体和二聚体均能与 TRAP 复合物 (一种 TR 辅因子) 形成异源二聚体。甲状腺激素 (T3) 结合 TR 并抑制 β -MHC 的转录, 同时诱导 α -MHC 表达。miR-208 与 α -MHC 蛋白同时表达, 推测其调节 Thrsp1 (TRAP 复合物的最大亚基)。确信 miR-208 是负反馈环的成分, 通过抑制 T3

信号化而调节心肌肌球蛋白重链同种型表达。

[0071] 图 20A 和 20B 示出损伤的 / 再生的骨骼肌的 miRNA 阵列分析。图 20A 示出在损伤的肌细胞中负调节的 miRNA。图 20B 示出在损伤的肌细胞中上调的 miRNA。

[0072] 图 21 列出了 SEQ ID NO :6-9 的序列。

[0073] 图 22 示出使用 miRNA 感应器 miR-1 在分化的骨骼肌卫星细胞中的表达。通过将稳定表达 miR-1 感应器 (dsRed::miR-1) 或突变的感应器 (dsRed::miR-1-Mut) 的卫星细胞移至除去了 bFGF 的分化培养基中诱导分化,使用荧光成像获得图像,示出 dsRed 报道基因 (dsRed::miR-1) 或者肌细胞分化标记基因肌球蛋白重链 (MF20) 的表达。dsRed 在感应器表达的分化细胞中的低水平表达表示这些细胞中 miR-1 的表达。DAPI 染色细胞核。

[0074] 图 23A 和 23B 示出 miR-1/206 表达系统 (图 23A) 和 miR-1/206 感应器 (图 23B) 的确立。图 23A 示出表达 miR-1/206 和 GFP 蛋白 (图 23A, 左侧) 的表达构建体。Northern 印迹分析示出 miR-1 的表达 (图 23a, 右侧)。图 23B 示出在 293 细胞中 miR-1 抑制 miR-1/206 感应器。将稳定表达 miR-1/206 感应器的 293 细胞用 miR-1/206 (SDSA::miR-1) 的表达载体转染,使用相衬 (293 细胞) 或荧光成像获得图像,以示出 dsRed 报道基因 (dsRed::miR-1) 或者 miRNA::GFP (SDSA::miR-1) 或者这二者的 Overlay 的表达。注意到 dsRed 感应器和 miR-1 的表达是唯一的,表明 miR-1 特异性抑制感应器报道基因的表达。

[0075] 图 24A 和 24B 示出 miR-1/206 对 Pax7 和 BDNF 3'UTRs 的抑制。图 24A 是小鼠 Pax7 UTR (SEQ ID NO :40-41) 与 MiR-1 (SEQ ID NO :1) 和 miR-206 (SEQ ID NO :3) 的序列排列对比。图 24B 示出含有小鼠 Pax7 3' UTR (Luc-Pax7::UTR) 或其突变体 (Luc-Pax7::UTR-M) 或者 BDNF 3'UTR (Luc-BDNF::UTR) 或其突变体 (Luc-BDNF::UTR-M) 的萤光素酶报道基因与指定的 miRNA 表达载体的共转染。在转染 48 小时后确定萤光素酶活性。数据以一式两份进行的至少三个单独的实验的平均值 ± 标准误差表示。注意到 miR-1/206 显著抑制 Pax7 和 BDNF 3' UTR 报道基因的表达。

[0076] 图 25A-25C 示出 miR-1/206 抑制卫星细胞中 Pax7 的表达,但是 不抑制 Pax3 的表达。图 25A 是对 Pax7 表达进行的 Northern 印迹分析,表明 Pax7 mRNA 的转录水平不被 3' UTR 抑制。图 25B 是 Western 印迹分析,表明在 miR-1/206 过表达的卫星细胞中是 Pax7 而非 Pax3 蛋白质水平较低。图 25C 示出使用相衬 (Phase/Contrast panels) 或者荧光成像获得的图像,示出骨骼肌卫星细胞中 Pax7 或 Pax3 蛋白 (Pax7 和 Pax3 组) 或者 miRNA::GFP (SDSA::miR-1/206 组) 或者 overlay (overlay panels) 的表达。注意到是 Pax7 而不是 Pax3 的表达被 miR-1/206 抑制。

[0077] 图 26 示出 miR-1/206 抑制卫星细胞中 BDNF 的表达,但是 不抑制 GDNF 的表达。使用相衬 (Phase/Contrast panels) 或荧光成像获得图像,以示出骨骼肌卫星细胞中 BDNF 或者 GDNF 蛋白 (BDNF 和 GDNF 组) 或者 miRNA::GFP (SDSA::miR-1/206 组) 或者 overlay (overlaypanels) 的表达。注意到是 BDNF 的表达而不是 GDNF 的表达被 miR-1/206 抑制。

[0078] 图 27A 和 27B 示出 miR-1/206 抑制卫星细胞增殖。图 27A 示出使用相衬或荧光成像获得的卫星细胞图像,以示出细胞增殖指数,以 BrdU (BrdU 组) 或者 miRNA::GFP (SDSA::miR-1+206 组) 表示。在 miR-1/206 过表达的卫星细胞中观测到较少的 BrdU 阳性细胞。图 27B 示出实验结果,其中计数对照组及 miR-1/206 过表达的细胞中的

BrdU 阳性染色的细胞,数据以 BrdU 阳性细胞与总细胞的比率表示。

[0079] 图 28A 和 28B 示出 miR-1/206 增强卫星细胞分化。图 28A 和 28B 示出实验结果,其中卫星细胞稳定过表达 miR-1/206 (SDSA-miR-1+206) 或 GFP (对照),然后将其移至除去了 bFGF 的分化培养基中培养 24 小时 (图 28A) 或者 48 小时 (图 28B),之后用肌球蛋白重链 (MyHC) 免疫染色。注意到在 miR-1/206 过表达的细胞中增强的 MyHC 染色。DAPI 标示细胞核。

[0080] 图 29 示出实验结果,其中 miR-1/206 的过表达增强卫星细胞分化动力学。将过表达 miR-1/206 (■) 或者 GFP (对照,◆) 的卫星细胞在不同时间点 (0、12、24、36 和 48 小时) 在生长培养基中培养,或者移至其中除去了 bFGF 的分化培养基中,对肌球蛋白重链 (MyHC) 阳性细胞进行评分。结果以 MyHC 阳性细胞与总细胞的比率表示。

[0081] 图 30 示出 miR-1/206 调节骨骼肌卫星细胞增殖和分化的模型。

[0082] 附表简述

[0083] 表 1 列出了本文所用单字母表示的核苷酸缩写。

[0084] 表 2 示出了 miR-1 和 miR-133 对肌原性 (myogenic) 增殖和分化的作用。将在生长培养基 (GM) 中培养的 C2C12 肌细胞用 miR-1、miR-133 或作为对照的 GFP 的双链 miRNA 双链体或者 2'-O-甲基反义寡聚体电穿孔。36 小时后,用分化培养基 (DM) 取代 GM 培养 8、12 和 24 小时,固定细胞以使用肌形成蛋白、磷酸组蛋白 H3 和肌球蛋白重链 (MHC) 的抗体进行免疫组织化学分析。在随机选择的视野中从 5000 个 DAPI 染色的细胞中计数阳性细胞。使用可比的结果进行三次单独测定。

[0085] 表 3 列出了本发明揭示的寡核苷酸的名称和序列。

[0086] 序列表简述

[0087] 所述序列表示出了各种 miRNA、特别是 miR-1、miR-133、miR-206、miR-208、miR-22、miR-26、miR-29、miR-30、miR-128、miR-143 和 miR-145 (分别为 SEQ ID NO:1-11) 的序列,以及本发明揭示的另外的多核苷酸序列。在一些情况中, RNA 序列以 DNA 形式存在 (即以胸腺嘧啶代替尿嘧啶),应理解这些序列也相应于这些 DNA 序列的 RNA 转录物 (即每个 T 均由 U 取代)。

[0088] 发明详述

[0089] 本发明揭示了可以调节肌细胞中影响所述肌细胞分化和 / 或增殖的特异基因表达的特定 miRNA 的确定。如本文所揭示,这种发现具有治疗性应用,包括治疗各种原因所致的肌损伤,例如机械性肌创伤、肌组织退行性疾病和心肌损伤。本发明揭示的发现的发现的应用进一步包括利用对于所述基因具有特异性的 miRNA 调节肌细胞中一或多个特异基因的表达,由此调节所述肌细胞的功能性,例如所述肌细胞的分化和 / 或增殖。可用于本发明揭示目的的非限制性 miRNA 的例子包括 miRNA-1、miRNA-133、miRNA-206 和 miRNA-208。

[0090] 例如,聚集在相同染色体基因座上的 miRNA-1 (miR-1) 和 miRNA-133 (miR-133) 在发育期间以组织特异性方式一起转录。miR-1 和 miR-133 在体外培养的肌细胞和在体内 *Xenopus* 胚胎中调节骨骼肌增殖和分化中均发挥独特作用。miR-1 通过靶向肌细胞基因表达转录抑制剂 - 组蛋白脱乙酰酶 4 (HDAC4) 而促进肌生成。相反,miR-133 过抑制血清应答因子 (SRF) 而增强肌细胞增殖。这个结果首次揭示了衍生自相同 miRNA 多顺反子并一起转录的两个成熟 miRNA 可发挥不同的生物学功能。本发明因此提供了这样的分子学机制,即

其中 miRNA 参与转录循环,控制肌细胞基因表达和胚胎发育。

[0091] 另一个非限制性例子是 *Thrap1* 表达很可能由 miR-208 调节。*Thrap1* 的 3'UTR 含有两个预测的 miR-208 结合位点(图 18)。所述两个靶位于 *Thrap1* 终止密码子的~80bp 下游,且彼此仅间隔~50bp。这两个靶与 miR-208 的种子区域完全互补。*Thrap1* 基因编码 TRAP240,这是遍在表达的 TRAP(甲状腺激素受体蛋白)复合物的一个 240kd 亚基。TRAP 是一种多亚基蛋白质复合物,是核受体的共激活物,且 TRAP 家族成员对于适当发育很重要。因此,miR-208 可以调节 TRAP240 的产生并促进激素依赖性心肌细胞分化。

[0092] I:总则

[0093] 第一个描述的 miRNA, *lin-4* 基因,其控制 *C. elegans* 幼体发育的时间进程,发现其出乎意料地产生长度为 21 个核苷酸的非编码 RNA,抑制 *lin-14* 蛋白质表达而不显著影响 *lin-14* mRNA 水平。发现这个小 RNA 靶向 *lin-14* 的 3'非翻译区(UTR)中的互补位点^{49,50}。尽管这种现象最初被作为遗传奇特现象进行处理且实际上被忽略,但是现在意识到目前称作 miRNA 的几百个小 RNA 与不同物种的基因组中存在的 *lin-4* 相似,且调节互补 mRNA 的翻译。虽然近来的报道提示少许 miRNA 在明显不同的生物学进程中的作用,但是大多数 miRNA 在很大程度上仍未鉴定。

[0094] I.A:miRNA 生物学发生及机制

[0095] miRNA 生物学发生的一般模型示于图 13。成熟 miRNA 的长度为~22 个核苷酸(nt),是从较长的转录物中加工的^{51,52}。原始的 miRNA(pri-miRNA)可以作为单独的转录单位由 RNA Pol II 转录,或者可以源自宿主基因的剪接内含子⁵³。miRNA 加工途径可以从 RNase III 核酸内切酶 Droscha 使 pri-miRNA 核裂解开始,产生一个长度为~70 个核苷酸的中间前体-miRNA(pre-miRNA),其具有茎-环结构⁵⁴。Exportin-5 识别由 Droscha 裂解的交错切口并以 Ran-GTP 依赖性方式将 pre-miRNA 输出至细胞质中⁵⁴⁻⁶⁰。一旦输出至细胞质中,所述 pre-miRNA 的两个链均可以由另一种 RNase III 酶 Dicer 裂解,大约两个螺旋从茎-环的基底部旋转分离⁶¹⁻⁶³。所得~22mer RNA 双链体由 Dicer 释放,且单链的茎-臂(stem-arm)可以掺入 RISC(RNA-诱导的沉默复合物)。RISC 是一种核糖核蛋白复合物,含有 Argonaute 蛋白质家族成员和辅因子,以及 miRNA 和 mRNA 靶位。据认为所述茎-臂双链体的相对热稳定性决定哪个链掺入 RISC 中:进入 RISC 的链通常是 5'末端不太稳定的链^{64,65}。翻译抑制由互补于靶 mRNA 的 3'UTR 内的靶序列的 miRNA 通过仍未知的机制介导^{66,67}。通常,不完全的互补导致翻译抑制,而完全或接近完全的互补导致 mRNA 裂解⁶⁸。关于 miRNA 的生物发生、通讯、RISC 装配及 RISC 的功能机制尚未明了,然而特异性 miRNA 的功能研究及 miRNA 途径成分的遗传和生物化学分析已经揭示了 miRNA 在不同生物学过程中起重要作用。

[0096] I.B:发育中的 miRNA

[0097] 多细胞生物体的发育需要遗传途径的空间和时间控制。有人提出 miRNA 通过靶基因的转录后调节控制或调整这些复杂的遗传途径。一种确定 miRNA 在动物发育中的必需性的方法已经在 Dicer 中产生突变,这是 miRNA 加工为其成熟活性形式所需要的上游酶。确信脊椎动物仅具有一个 Dicer 拷贝,其很可能是充分处理所有脊椎动物 miRNA 所需要的^{62,63,69}。在小鼠中,Dicer 功能的消除导致(E)7.5 天胚胎致死⁶⁹。Dicer null 小鼠不表达原条标记 T(brachyury),表示在原肠胚形成期间机体成形之前发育很可能被阻抑。由于在小

鼠肢体中胚层中发挥特异性功能的 Dicer 的条件丧失,导致肢体长度减小及细胞凋亡增加⁷⁰。在斑马中通过产生母系合子 Dicer 突变体而完全阻断 miRNA 形成,表明 miRNA 的丧失不影响胚胎轴 (axis) 的形成或者胚胎中许多类型细胞的式样。然而,在原肠胚形成、脑形成、体质发生和心脏发育期间的形态发生均被证实是异常的,导致致死性⁷¹。总之,对 Dicer 功能的遗传分析提示成熟 miRNA 为适当的发育所需要。除去所有 miRNA 功能的研究是有教益的,然而其也是钝工具,未提供关于特异性 miRNA 的精确功能的见识。

[0098] I. C:特异性 miRNA 的生物学作用

[0099] 越来越多的证据提示 miRNA 参与种种生物学过程。在胰岛细胞中,miR-375 的过表达抑制葡萄糖胰岛的胰岛素分泌,同时抑制内源性 miR-375 增强胰岛素分泌⁷²。相似的过表达和抑制策略鉴别了 miR-143 通过调节 ERK5 蛋白质表达而在脂肪细胞分化中的作用⁷³。在另一个例子中,编码 5 个 miRNA 的多顺反子性 miRNA 基因与肿瘤发生相关联⁷⁴。已经提出了 miRNA 在造血作用⁷⁵、神经元分化^{76,77} 和 Hox 基因表达的调节^{78,79} 中的其它功能。

[0100] 目前有超过 300 种已知的人 miRNA,但是仅少数具有已知的生物学功能。对于特异性 miRNA 的研究为理解 miRNA 介导的发育调节和病理学的普遍性和重要性所需要。本发明首次提供了 miRNA 在调节肌细胞分化和增殖中的作用。

[0101] I. D:miRNA 在心脏发育中的作用

[0102] 心脏的发生需要不同遗传程序的精确控制,因此探索不同表达的心脏中富集的 miRNA 也许帮助调节这些复杂途径。本发明揭示了一些 miRNA 的这种组织特异性表达模式。miR-1 和 miR-133 在骨骼肌和心肌组织中均表达,而 miR-208 仅在心肌组织中检测到。在本发明之前,这些肌细胞特异性 miRNA 的功能还不清楚。

[0103] I. E:miRNA 靶的鉴别

[0104] 鉴别特异性 miRNA 的靶便于理解其在调节途径中的精确作用。大多数动物 miRNA 与其靶位点不完全互补,阻碍了使用简便的同源性检索来鉴别动物 miRNA 靶位点。为了克服这个障碍,已经揭示了一些计算方法,其中掺入已知 miRNA 靶的序列保守性和特征作为标准,以预测新的动物 miRNAi 靶⁸⁰⁻⁸⁵。例如,一些算法考虑到大多数 miRNA 在确证的靶位点内的第 2 和第 8 位核苷酸之间呈现高互补性,将其称作“种子”区。其它算法则不是这样,因为在一些情况中,在 miRNA 的 3' 末端的互补性可以补偿较弱的 5' 末端结合。这些算法也分级预测两或多个物种之中相对于侧翼区的靶序列保守。这些类型的计算方法已经成功地预测出一些哺乳动物 miRNA 靶位点。对于任何特定 miRNA 产生的预测几乎均含有假阳性。然而,所述预测非常适用作为假说生成元。任何预测均可以通过实验核实并置于相关的生物学环境中。

[0105] I. F:重要性

[0106] 目前在 miRNA 研究中有一些活跃领域,试图去理解在 miRNA 指导的抑制之后的精确分子学机制、揭示分析 miRNA 表达和鉴别靶位点的更好的工具,及确定调节途径内特异性 miRNA 的生物学相关作用。

[0107] 心脏发育和病理学与复杂遗传途径的调节密切相关,在试图理解这些途径中已经尽力而为。大多数研究针对于为心脏基因转录需要的转录因子和调节增强子序列的作用。已经证实心脏基因表达的调节是非常复杂的,各个心脏基因由多个独立的增强子控制,在心脏中以非常受限的表达模式表达。潜在地,miRNA 显著增加这种复杂性,甚至在转录后水

平加入另一层调节。本发明在某种程度上提供了关于心肌和骨骼肌基因表达怎样被调节的新认识,并揭示了基于这种认识的治疗和研究性应用。另外,本发明关于 miRNA 控制肌细胞分化和增殖的揭示作为理解 miRNA 在其它途径中功能的模型。

[0108] II:定义

[0109] 为方便起见,在此收集了本说明书、实施例和所附权利要求书中应用的某些术语。虽然确信本领域技术人员熟知如下术语的含义,但是为了便于解释本发明而阐述了如下定义。

[0110] 除非另有陈述,本文所用所有技术和科学术语具有本发明所属领域技术人员通常已知的含义。尽管与本发明所述相似或相同的方法、设备和材料均可用于实施或检测本发明,但是在此仍描述了代表性的方法、设备和材料。

[0111] 根据长期存在的专利法规,术语“一个”当用于本说明书、包括权利要求书中时是指“一或多个”。因此,本文中“一个”是指一或多个(即至少一个)对象。例如,“一个元件”是指一或多个元件。

[0112] 如本文所用,术语“大约”当指数值或者质量、重量、时间、体积、浓度或百分比时是指在一些实施方案中与指定量具有 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 及 $\pm 0.1\%$ 的偏差,这种偏差适于实践本发明。除非另有陈述,则本说明书和权利要求书中使用的表示成分、反应条件等的量的所有数字均应理解为是“大约值”。因此,除非相反陈述,则本说明书和所附权利要求书中陈述的值可以根据希望获得的性质而变化。

[0113] 如本文所用,术语“氨基酸”和“氨基酸残基”可互换应用,是指任何 20 种天然发生的氨基酸及其类似物、衍生物和同源物,以及具有变体侧链的氨基酸类似物,及前述任何氨基酸的所有立体异构体。因此,术语“氨基酸”是指包含具有氨基功能性和酸功能性且能包含在天然发生的氨基酸的聚合物中的所有分子,无论是天然还是合成的分子。

[0114] 氨基酸可以基于多肽在其肽键处的化学消化(水解)而形成。本文描述的氨基酸残基在一些实施方案中是 L 异构体形式。然而,D 异构体形式的残基也可以取代任何 L-氨基酸残基,只要所述多肽保留希望的功能性即可。 NH_2 是指在多肽的氨基末端存在的游离氨基基团。 COOH 是指在多肽的羧基末端存在的游离羧基基团。在标准多肽命名法中,氨基酸残基的缩写在上文以表格形式示出。

[0115] 注意本文的所有氨基酸残基序列均以常规的从左至右表示从氨基末端至羧基末端的方式列出。另外,短语“氨基酸”和“氨基酸残基”广义包括修饰的和非寻常的氨基酸。

[0116] 再者,注意在氨基酸残基序列的开始或结束处的破折号表示与一或多个氨基酸残基的进一步序列的肽键连接,或者与氨基末端基团如 NH_2 或者酰基或者与羧基末端基团如 COOH 的共价键连接。

[0117] 如本文所用,术语“细胞”是以其通常的生物学含义使用。在一些实施方案中,细胞在生物体例如脊椎动物对象中存在。细胞可以是真核细胞(例如肌细胞,如骨骼肌细胞或心肌细胞)或者原核细胞(例如细菌)。细胞可以是体细胞或者种系来源,全能细胞,多能细胞,或者分化为任何程度,分裂或未分裂。细胞也可以衍生自或者可以包含生殖细胞或胚胎、干细胞、或者完全分化的细胞。

[0118] 如本文所用,术语“宿主细胞”和“重组宿主细胞”可互换应用,是指其中可以导入本发明的组合物(例如编码 miRNA 的表达载体)的细胞(例如肌细胞)。此外,该术语不仅

是指其中最初导入了表达构建体的特定细胞,而且也包括这种细胞的后代或者潜在后代。由于突变或者环境影响可以在随后的世代中出现某些修饰,事实上这种后代可以与亲代细胞不相同,但是仍包括在本发明的范围内。

[0119] 如本文所用,术语“基因”是指编码 RNA 的核酸,例如包括但非限于编码多肽的结构基因。术语“基因”也广泛用于描述生物功能相关的 DNA 片段。如此,术语“基因”涵盖了包括但非限于如下的序列:编码序列;启动子区域;转录调节序列;是调节性蛋白的特异性识别序列的非表达的 DNA 片段;有助于基因表达的非表达的 DNA 片段,例如可以转录为 mRNA 的 3' 非翻译区的 DNA 片段,其随之由本发明的 miRNA 靶向和结合;设计为具有希望的参数的 DNA 片段;或者这些序列的组合。基因可以通过多种方法获得,包括从生物学样本克隆、基于已知或预测的序列信息合成、及衍生自一或多个现有序列的重组序列。

[0120] 正如本领域所已知,基因典型包含一个编码链和一个非编码链。如本文所用,术语“编码链和“有义链”可互换使用,是指与从中基因产物被翻译的 mRNA 具有相同核苷酸序列的核酸序列。也正如本领域所已知,当编码链和 / 或有义链用于描述 DNA 分子时,所述编码 / 有义链包含胸腺嘧啶代替在相应 mRNA 中发现的尿嘧啶。另外,当该术语用于描述 DNA 分子时,所述编码 / 有义链也可以包含在所述 mRNA 中未发现的另外的元件,包括但非限于启动子、增强子和内含子。相似地,术语“模板链”和“反义链”可互换使用,是指与所述编码 / 有义链互补的核酸序列。然而,应注意对于不编码多肽产物的那些基因例如 miRNA 而言,术语“编码链”用于描述包含所述 miRNA 的链。在这个用法中,包含所述 miRNA 的链对于 miRNA 前体是有义链,但是对于其靶 RNA 则是反义链(即所述 miRNA 与靶 RNA 杂交,因为其包含对于靶 RNA 是反义的序列)。在这个用法中,包含所述 miRNA 的链对于所述 miRNA 前体是有义链,但是对于其靶 RNA 是反义链。

[0121] 如本文所用,术语“互补性”和“互补”是指核酸通过传统 Watson-Crick 或者其它非传统类型的相互作用可以与另一核酸序列形成一或多个氢键。在一些实施方案中,关于本发明的核酸分子,与具有其互补序列的核酸分子的结合自由能足以使得所述核酸的相关功能发挥核糖核酸酶活性。例如,miRNA 前体的有义和反义链之间的互补程度与 miRNA 前体的含有 miRNA 的链与靶核酸序列之间的互补程度可以相同或不同。核酸分子的结合自由能的确定为本领域所熟知。见例如 Freier et al., 1986³¹; Turner et al., 1987³² 所述。

[0122] 如本文所用,短语“互补性百分比”、“相同性百分比”与“相同百分比”可互换使用,是指一个核酸分子中可以与另一个核酸序列形成氢键(例如 Watson-Crick 碱基配对)的连续残基的百分数(例如 10 个残基中有 5、6、7、8、9 或 10 个互补为 50%、60%、70%、80%、90% 和 100% 互补)。术语“100% 互补”、“完全互补”是指一个核酸序列的所有连续残基均可以与另一个核酸序列中相同数目的连续残基形成氢键。由于 miRNA 为大约 17-24 个核苷酸,且在 miRNA 指导的基因表达调节中典型容许至多 5 个错配(例如 1、2、3、4 或 5 个错配),因此 miRNA 与其靶向的 RNA 之间至少为 70% 的互补性应足以使得所述 miRNA 调节从所述靶 RNA 中衍生的基因的表达。

[0123] 术语“基因表达”通常是指细胞过程,通过这种过程生物学活性多肽从 DNA 序列中产生,且在细胞中呈现生物学活性。正是如此,基因表达包括转录和翻译过程,但是也包括可影响基因或基因产物的生物学活性的转录后和翻译后过程。这些过程包括但非限于 RNA 合成、加工和转运,以及多肽合成、转运和多肽的翻译后修饰。另外,影响细胞内蛋白质-蛋

白质相互作用的过程也可以影响所述基因表达。

[0124] 然而,在不编码蛋白质产物的基因例如 miRNA 基因的情况下,术语“基因表达”是指前体 miRNA 从所述基因中产生的过程。典型地,这个过程是指转录,尽管与蛋白质编码基因的 RNA 聚合酶 II 指导的转录不同,但是 miRNA 的转录产物不被翻译产生蛋白质。尽管如此,成熟 miRNA 从 miRNA 基因中的产生仍涵盖在本发明所用术语“基因表达”的含义中。

[0125] 如本文所用,术语“分离”是指基本上没有其它核酸、蛋白质、脂质、碳水化合物和 / 或其通常相关联的其它材料的分子,这种相关联的材料是细胞材料或合成培养基中的材料。因此,术语“分离的核酸”是指天然的或者合成的或者其一些组合的核糖核酸分子或者脱氧核糖核酸分子(例如基因组 DNA、cDNA、mRNA、miRNA 等),其(1)与在其中天然发现所述“分离的核酸”的细胞不相关联,或者(2)与其天然不连接的多核苷酸可操纵地连接。相似地,术语“分离的多肽”在一些实施方案中是指从重组 DNA 或 RNA 中制备的、或者合成的、或者其一些组合的多肽,其(1)与天然发现的蛋白质不相关,(2)分离自其通常出现在其中的细胞,(3)经分离而基本上没有相同细胞来源中的其它蛋白质,(4)由不同物种的细胞表达,或者(5)非天然发生。

[0126] 术语“分离的”当用于描述“分离的细胞”时,是指已经从其天然环境例如器官、组织或生物体的一部分中分离。

[0127] 如本文所用,术语“标记”和“标记的”是指能通过分光法、放射性方法或其它方法检测到的一种组分与探针分子的附着。因此,术语“标记”或者“标记的”是指将一种可检测的标记任选通过共价或非共价方式掺入或者附着于分子如多肽。本领域已知且可以利用多种标记多肽的方法。多肽的标记的例子包括但非限于:放射性同位素、荧光标记、重原子、酶标记或报道基因、化学发光基团、生物素酰基、由二级报道子(例如亮氨酸拉链对序列、抗体结合位点、金属结合结构域、表位标记)识别的预定的多肽表位。在一些实施方案中,标记通过各种长度的间隔臂附着,以降低潜在的位阻。

[0128] 如本文所用,术语“调节”是指增加、降低或者以其它方式改变生物化学实体的任何或全部化学和生物学活性或性质。例如,术语“调节”可以是指基因表达水平或者编码一或多种蛋白质或蛋白质亚基的 RNA 分子或等效 RNA 分子水平的改变;或者一或多种蛋白质或蛋白质亚基的活性被上调或负调节,由此其表达水平或活性高于或低于在没有所述调节物的情况中观测到的水平或活性。例如,术语“调节”可以意味着“抑制”和“阻抑”,但是非限于这个含义。

[0129] 如本文所用,术语“调节”是指对应答的上调(即激活或刺激)和负调节(即抑制或阻抑)。因此,术语“调节”当用于描述功能性质或者生物学活性或过程(例如酶活性或受体结合)时,是指上调(例如激活或刺激)、负调节(例如抑制或阻抑)或者以其它方式改变这种性质、活性或过程的品质的能力。在某些情况中,这种调节可以随特定事件的发生而定,如信号转导途径的激活,和 / 或可以仅在特定细胞类型中出现。

[0130] 术语“调节物”是指能导致调节作用的多肽、核酸、大分子、复合物、分子、小分子、化合物、物质(species)等(天然发生或者非天然发生的),或者从生物学材料如细菌、植物、真菌或动物细胞或组织中产生的提取物。可以通过测定评估调节物作为功能性质、生物学活性或过程或者其组合的抑制剂或激活物(直接或间接)的潜在活性(例如激动剂、拮抗剂、部分拮抗剂、部分激动剂、反向激动剂、拮抗剂、抗微生物制剂、微生物感染或增殖的抑制剂

等)。在这种测定中,可以一次筛选许多调节物。调节物的活性可以是已知、未知或者部分已知的。

[0131] 调节物可以是选择性或非选择性的。如本文所用,术语“选择性”当用于描述调节物(例如抑制剂)时,是指在所述调节物与一种分子(例如感兴趣的 RNA)及与另一种相似但不相同的分子(例如衍生自与所述感兴趣的靶 RNA 相同的基因家族成员的 RNA)相互作用方式中的可测的或者另外生物学相关差异。

[0132] 必须理解对于据认为是选择性调节物的调节物而言,其与靶 RNA 的相互作用的性质不需要完全排除其与所述靶 RNA 相关的其它分子(例如除了靶 RNA 自身之外的家族成员的转录物)的相互作用。换句话说,术语“选择性调节物”不限于仅结合感兴趣的基因的 mRNA 转录物的那些分子及相关家族成员的那些分子。该术语还包括可以与感兴趣的基因及相关家族成员的转录物相互作用的调节物,但是为此可以设计一些条件,在这些条件下与靶 RNA 及与所述家族成员的不同的相互作用具有生物学相关结果。这种条件可包括但非限于所述调节物与所述家族成员的序列相同性程度的不同,及所述调节物在表达一些但非全部家族成员的特定组织或细胞类型中应用。在后者的条件下,如果调节物与靶相互作用导致生物学相关事件,则可以认为调节物对于指定的组织中的指定靶是选择性的,尽管在表达另外的家族成员的另外的组织中所述调节物和所述靶根本不相互作用以产生生物学作用,因为所述调节物由于其它家族成员的存在而被组织“浸出”。

[0133] 当鉴别了选择性调节物后,所述调节物以与结合另一种分子(例如与感兴趣的基因相关的基因的 mRNA 转录物)不同的方式(例如较强的方式)结合一种分子(例如感兴趣的基因的 mRNA 转录物)。如本文所用,所述调节物与所述分子的结合比与所述调节物可以结合的一些其它可能的分子的结合更强,则称作“选择性结合”或者“优先结合”。

[0134] 如本文所用,术语“抑制”、“阻抑”、“负调节”等可互换使用,是指基因产物(例如多肽)的活性、基因表达、多核苷酸例如 miRNA 活性或者编码一或多种基因产物的 RNA 的水平被降低,低于在未执行本发明的方法的情况中观测到的结果。

[0135] 在一些实施方案中,用 miRNA 分子抑制导致靶 RNA 的稳定表达水平的降低。在一些实施方案中,用 miRNA 分子抑制导致靶基因的表达水平低于在存在不能负调节靶基因表达水平的失活或弱化的分子的情况中观测到的水平。在一些实施方案中,用本发明的 miRNA 分子对基因表达的抑制在存在所述 miRNA 分子的情况中高于不存在所述 miRNA 分子的情况。在一些实施方案中,基因表达的抑制与所述基因编码的 mRNA 的降解速度增强相关(例如 miRNA-介导的基因表达抑制)。在一些实施方案中,用本发明的 miRNA 分子抑制导致靶基因的基因产物的表达水平低于在不存在所述 miRNA 的情况中观测到的表达水平。

[0136] 在一些实施方案中,miRNA 例如内源性 miRNA 可以由 miRNA 抑制剂抑制,导致由所述 miRNA 靶向的基因的表达与所述 miRNA 未被抑制时基因表达(例如基因产物的产生)水平相比增加。如本文所用,术语“miRNA 抑制剂”和“miRNA 的抑制剂”可互换应用,是指抑制 miRNA 活性的分子。

[0137] 在一些实施方案中,miRNA 抑制剂是在指定条件下与特定的靶 miRNA 杂交、从而抑制所述靶 miRNA 活性的一种多核苷酸。所述 miRNA 抑制剂可以与靶 miRNA 杂交的条件包括例如生理条件。所述 miRNA 抑制剂基于所述 miRNA 抑制剂多核苷酸序列与所述靶 miRNA 多核苷酸的互补性而可以与靶 miRNA 较高或较低程度杂交。在一些实施方案中,根据本领域

技术人员通常已知的特定应用或在特异性的需要,所述 miRNA 可以与所有或部分靶 miRNA 完全互补,或者不完全互补,包括例如与所述靶 miRNA 具有 99%、98%、97%、96%、95%、90%、80%或 70%互补性。所述 miRNA 抑制剂仅需要与所述靶 miRNA 具有互补性,因为这是在特定系列条件下抑制靶 miRNA 活性的需要量所必需的。可用于本发明中的 miRNA 抑制剂的例子包括但非限于修饰的多核苷酸如 2'-O-甲基多核苷酸。代表性的非限制性例子在表 2 和表 3 中列出,包括 2'-O-甲基-miR-1、2'-O-甲基-miR-133 和 2'-O-甲基-miR-208,其可分别特异性抑制 miR-1、miR-133 或 miR-208 的活性。

[0138] 如本文所用,术语“突变”具有其传统的含义,是指核酸或多肽序列中通过继承、天然发生或者导入的变化,在本文以其本领域技术人员通常已知的含义应用。

[0139] 如本文所用,术语“肌细胞”广义是指在所有发育阶段的所有类别的肌细胞。因此,“肌细胞”涵盖了未分化的肌细胞例如成肌细胞以及分化的肌细胞例如终末分化的肌管。“肌细胞”也涵盖了不同组织学类型的肌细胞,包括但非限于横纹肌细胞(例如骨骼肌细胞)、平滑肌细胞(例如肠肌细胞)和心肌细胞。另外,本文所用术语“肌细胞”不是物种特异性的。

[0140] 术语“天然发生的”当用于描述一个对象时,是指该对象可以在自然界发现。例如,存在于可以从自然来源中分离的生物体(包括细菌)中且未经在实验室中人工有意修饰的多肽或多核苷酸序列是天然发生的。然而,必须意识到人工进行任何处理均可使得“天然发生的”对象成为本文所用术语“分离的”对象。

[0141] 如本文所用,术语“核酸”、“多核苷酸”及“核酸分子”是指任何脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)、寡核苷酸、通过聚合酶链反应(PCR)产生的片段,及通过任何连接、切断、内切核酸酶作用及外切核酸酶作用产生的片段。核酸可以包含天然发生的核苷酸(如脱氧核糖核苷酸和核糖核酸)或者天然发生的核苷酸的类似物(例如天然发生的核苷酸的 α -对映异构体形式),或者这二者组合的单体。修饰的核苷酸在糖成分和/或嘧啶或嘌呤碱基成分中具有修饰。糖成分的修饰包括例如一或多个羟基基团由卤素、烷基、胺和叠氮基置换,或者糖可以官能化为醚或酯。另外,全部的糖成分均可以用空间和电子相似的结构如叠氮糖和碳环形糖类似物置换。碱基成分中修饰的例子包括烷化的嘌呤和嘧啶,酰化的嘌呤和嘧啶,或者其它熟知的杂环取代基。核酸单体可以通过磷酸二酯键或者这种键的类似物连接。磷酸二酯键的类似物包括硫代磷酸酯(phosphorothioate)、二硫代磷酸酯(phosphorodithioate)、硒代磷酸酯(phosphoroselenoate)、二硒代磷酸酯(phosphorodiselenoate)、硫代磷酰苯胺(phosphoroanilothioate)、苯胺磷酰酯(phosphoranilidate)、氨基磷酸酯(phosphoroamidate)等。术语“核酸”还包括所谓的“肽核酸”,其包含与聚酰胺主链附着的天然发生的或者修饰的核酸碱基。核酸可以是单链或双链的。

[0142] 术语“可操纵地连接”当用于描述两个核酸区域之间的关系时,是指所述区域是使它们以指定方式发挥功能的位置关系并列。例如,控制序列与编码序列的“可操纵地连接”可以是这种方式的连接,其中编码序列的表达在与控制序列相容的条件下实现,例如当合适的分子(例如诱导子和聚合酶)与控制或调节序列结合时。因此,在一些实施方案中,短语“可操纵地连接”是指启动子与编码序列的连接,由此所述编码序列的转录由所述启动子控制和调节。可操纵地连接启动子与编码序列的技术为本领域所已知,关于感兴趣的编

码序列的精确定向和定位依赖于所述启动子的特殊性质。

[0143] 因此,术语“可操纵地连接”可以描述与核苷酸序列连接的启动子区域,由此所述核苷酸序列的转录由所述启动子区域控制和调节。相似地,称核苷酸序列在与其可操纵地连接的启动子的“转录控制下”。可操纵地连接启动子区域与核苷酸序列的技术为本领域所已知。

[0144] 术语“可操纵地连接”也是指转录终止序列与核苷酸序列的连接,由此所述核苷酸序列的转录终止由所述转录终止序列控制。在一些实施方案中,转录终止序列包含通过 RNA 聚合酶 III 导致转录在终止子序列 TTTTTT 的第三个或者第四个 T 终止的序列。因此,初始的小转录物典型在 3' 末端具有 3 或 4 个 U。

[0145] 描述两个核酸或蛋白质序列的短语“相同性百分比”和“相同百分比”是指在一些实施方案中当排列对比最大对应的两或多个序列或亚序列时,其具有至少 60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 核苷酸或氨基酸残基相同性,通过使用如下序列对比算法或通过目测进行测量。一些实施方案中的相同性百分比存在于长度为至少大约 10 个、20 个、50 个、100 个及 150 个残基的序列区域中。在一些实施方案中,相同性百分比存在于全长的指定区域中,如编码区或者完整的 miRNA。

[0146] 为了进行序列对比,典型将一个序列作为参考序列以与检测序列进行对比。当使用序列对比算法时,将检测序列和参考序列输入计算机中,如果需要则指定亚序列对应物,并指定序列对比算法参数。然后所述序列对比算法基于指定的程序参数计算检测序列与参考序列的序列相同性百分比。

[0147] 可以进行最佳的序列对比方法,例如 Smith&Waterman,1981³³ 描述的局部同源算法,Needleman & Wunsch,1970³⁴ 描述的同源序列排列对比算法,Pearson & Lipman,1988³⁵ 所述的搜索相似性方法,这些算法的计算机执行程序 (GAP、BESTFIT、FASTA 及 TFASTA in the GCG® WISCONSIN PACKAGE®, 得自 Accelrys, Inc., San Diego, California, United States of America), 或者通过目测。见 Ausubel et al.,1989³⁶ 所述。

[0148] 适于确定序列相同性百分比和序列相似性的算法的一个例子是 Altschul et al.,1990³⁷ 所述 BLAST 算法。进行 BLAST 分析的软件可通过全球信息网公开得自国家生物技术信息中心。这个算法包括首先通过鉴别查询序列中长度 W 的短字而鉴别高分的序列对 (HSP), 当与数据库序列中相同长度的字排列对比时其匹配或满足一些正值的阈值得分 T。T 是指邻域字得分阈值³⁷。这些初始的击中作为种子开始搜索以发现含有其的较长 HSP。然后将所述字击中沿着每个序列的两个方向扩展,直至可以增加序列排列对比的累积得分。对于核苷酸序列,累积得分使用参数 M(一对匹配残基的奖分;总是 > 0) 和 N(错配残基的罚分;总是 < 0) 计算。对于氨基酸序列,使用得分矩阵计算累积得分。当累积序列排列对比得分从其达到的最大值减少数量 X 时,字 hits 在每个方向的延伸停止,累积得分趋于为 0 或低于 0,由于一或多个负分值的残基对比的累积或者每个序列达到终点所致。BLAST 算法参数 W、T 和 X 决定了序列排列对比的灵敏性和速度。BLASTN 程序(对于核苷酸序列)使用默认值,字长度 (W) = 11,期望值 (E) = 10, cutoff = 100, M = 5, N = -4, 两个链均进行对比。对于氨基酸序列, BLASTP 程序使用默认值,字长度 (W) = 3,期望值 (E) = 10, 及 BLOSUM62 得分矩阵³⁸。

[0149] 除了计算序列相同性百分比之外, BLAST 算法对于两个序列之间的相似性也进行

统计学分析。见例如 Karlin & Altschul 1993³⁹ 所述。由 BLAST 算法提供的一种相似性测量是最小和概率 (P(N)), 其提供了两个核苷酸或氨基酸序列之间的匹配将随机发生的概率。例如, 如果检测核酸序列与参考核酸序列对比的最小和概率在一些实施方案中低于大约 0.1、0.01 及 0.001, 则认为所述检测核酸序列与参考序列相似。

[0150] 描述两个核苷酸序列的术语“基本相同”是指两或多个序列或亚序列当最大相应性对比和排列时, 使用如下序列对比算法之一或者通过目测进行测量, 在一些实施方案中具有至少大约 70% 核苷酸相同性, 在一些实施方案中具有至少大约 75% 核苷酸相同性, 在一些实施方案中具有至少大约 80% 核苷酸相同性, 在一些实施方案中具有至少大约 85% 核苷酸相同性, 在一些实施方案中具有至少大约 90% 核苷酸相同性, 在一些实施方案中具有至少大约 95% 核苷酸相同性, 在一些实施方案中具有至少大约 97% 核苷酸相同性及在一些实施方案中具有至少大约 99% 核苷酸相同性。在一个实施例中, 所述基本相同性存在于至少 17 个残基的序列中, 在一些实施方案中存在于至少大约 18 个残基的序列中, 在一些实施方案中存在于至少大约 19 个残基的序列中, 在一些实施方案中存在于至少大约 20 个残基的序列中, 在一些实施方案中存在于至少大约 21 个残基的序列中, 在一些实施方案中存在于至少大约 22 个残基的序列中, 在一些实施方案中存在于至少大约 23 个残基的序列中, 在一些实施方案中存在于至少大约 24 个残基的序列中, 在一些实施方案中存在于至少大约 25 个残基的序列中, 在一些实施方案中存在于至少大约 26 个残基的序列中, 在一些实施方案中存在于至少大约 27 个残基的序列中, 在一些实施方案中存在于至少大约 30 个残基的序列中, 在一些实施方案中存在于至少大约 50 个残基的序列中, 在一些实施方案中存在于至少大约 75 个残基的序列中, 在一些实施方案中存在于至少大约 100 个残基的序列中, 在一些实施方案中存在于至少大约 150 个残基的序列中, 在另一个实施例中存在于包含完整编码序列的核苷酸序列中。在一些实施方案中, 多态性序列可以是基本相同的序列。术语“多态性”是指群体中两或多个遗传确定的备选序列或等位基因的存在。等位基因差异可以仅是一个碱基对。但是, 本领域技术人员意识到所述多态性序列相应于相同基因。

[0151] 两个核苷酸序列是基本相同的另一指征是这两个分子在严格条件下彼此特异性或者充分杂交。在核酸杂交的情况下, 对比的两个核酸序列可以称作“探针序列”和“检测序列”。“探针序列”是参考核酸分子, “检测序列”是检测核酸分子, 通常在核酸分子的异质群体中发现。

[0152] 用于杂交研究或测定的核苷酸序列的一个例子包括探针序列, 其在一些实施方案中互补于或模拟本发明的核酸分子的至少大约 14-40 个核苷酸序列。在一个实施例中, 探针包含 14-20 个核苷酸, 或者当需要时会更长, 例如 30、40、50、60、100、200、300 或 500 个核苷酸或者直至给定基因的全长。这种片段可易于通过例如化学合成直接合成、通过应用核酸扩增技术、或者通过将选择的序列导入重组载体中以重组产生而制备。

[0153] 短语“靶向”包括“特异性杂交”, 是指一种分子仅与特定的核苷酸序列在严格条件下结合、形成双链体或杂交, 所述序列存在于复合的核酸混合物中 (例如总细胞 DNA 或 RNA)。

[0154] 非限制性例如, 杂交可以在 5x SSC、4x SSC、3x SSC、2x SSC、1x SSC 或者 0.2x SSC 中进行至少大约 1 小时、2 小时、5 小时、12 小时或者 24 小时 (见 Sambrook & Russell, 2001 关于 SSC 缓冲液及其它杂交条件的描述)。可以提高杂交温度以调节反应的严格性,

例如从大约 25°C (室温) 提高至大约 45°C、50°C、55°C、60°C 或 65°C。杂交反应也可以包括影响严格性的另一种物质,例如在存在 50% 甲酰胺的条件下进行杂交增加在指定温度下杂交的严格性。

[0155] 杂交反应之后可以跟随一个洗涤步骤,或者两或多个洗涤步骤,所述洗涤可以是相同或不同的盐度和温度。例如,洗涤温度可以从大约 25°C (室温) 提高至大约 45°C、50°C、55°C、60°C、65°C 或更高以调节严格性。洗涤步骤可以在存在洗涤剂例如 SDS 的条件下进行。例如,杂交之后可跟随两个洗涤步骤,每一次洗涤均在 65°C 在 2x SSC、0.1% SDS 中洗涤大约 20 分钟,及任选两个额外洗涤步骤,每次洗涤均在 65°C 在 0.2x SSC、0.1% SDS 中洗涤大约 20 分钟。

[0156] 如下是可用于克隆与本发明的参考核苷酸序列基本相同的同源核苷酸序列的杂交和洗涤的实施例:在一个实施例中探针核苷酸序列与靶核苷酸序列在 7% 十二烷基硫酸钠 (SDS)、0.5M NaPO₄、1mm 乙二胺四乙酸 (EDTA) 中在 50°C 杂交,随后在 2X SSC、0.1% SDS 中在 50°C 洗涤;在一些实施方案中,探针与检测序列在 7% 十二烷基硫酸钠 (SDS)、0.5M NaPO₄、1mm EDTA 中在 50°C 杂交,随后在 1X SSC、0.1% SDS 中在 50°C 洗涤;在一些实施方案中,探针与检测序列在 7% 十二烷基硫酸钠 (SDS)、0.5M NaPO₄、1mm EDTA 中在 50°C 杂交,随后在 0.5X SSC、0.1% SDS 中在 50°C 洗涤;在一些实施方案中,探针与检测序列在 7% 十二烷基硫酸钠 (SDS)、0.5M NaPO₄、1mm EDTA 中在 50°C 杂交,随后在 0.1X SSC、0.1% SDS 中在 50°C 洗涤;在另一个实施例中,探针与检测序列在 7% 十二烷基硫酸钠 (SDS)、0.5M NaPO₄、1mm EDTA 中在 50°C 杂交,随后在 0.1X SSC、0.1% SDS 中在 65°C 洗涤。

[0157] 严格杂交条件的其它例子包括在 42°C 在包含或者由 50% 甲酰胺、10x Denhardt's (0.2% Ficoll、0.2% 聚乙烯吡咯烷酮、0.2% 牛血清白蛋白) 和 200mg/ml 变性载体 DNA 例如剪切的鲑精 DNA 组成的溶液中过夜杂交,随后进行两次洗涤,每次洗涤均在 65°C 在 2x SSC、0.1% SDS 中洗涤大约 20 分钟,及另外两次洗涤,每次洗涤均在 65°C 在 0.2x SSC、0.1% SDS 中洗涤大约 20 分钟。

[0158] 杂交可包括两个核酸于溶液中杂交,或者于溶液中的一个核酸与附着于固体支持物例如滤膜上的一个核酸杂交。当一个核酸位于固体支持物上时,在杂交之前可以进行预杂交步骤。预杂交可以是在与杂交相同溶液、相同温度下(但是无互补多核苷酸链)进行至少大约 1 小时、3 小时或者 10 小时。

[0159] 因此,在回顾现有揭示内容的基础上,严格条件为本领域技术人员所已知,或者可以由本领域技术人员不用进行过多实验而确定^{36, 40-44}。

[0160] 短语“充分杂交”是指探针核酸分子与靶核酸分子之间的互补杂交,且包含最小的错配,可以通过降低杂交的严格性调节以实现希望的杂交。

[0161] 术语“表型”是指例如具有任一种性状或任意性状的细胞或生物体的全部物理、生物化学和生理学组成。由此,表型得自细胞或生物体内基因的表达,并与潜在可观测或可测定的性状相关。

[0162] 如本文所用,术语“多肽”、“蛋白质”和“肽”在本文可互换使用,是指 20 个的氨基酸或氨基酸类似物的聚合物,无论其大小和功能如何。尽管“蛋白质”通常用于描述相对较大的多肽,而“肽”通常用于描述小的多肽,但是这些术语在本领域的应用是重叠和变化的。除非特别指出,则术语“多肽”在本文用于描述肽、多肽和蛋白质。如本文所用,术语“蛋白

质”、“多肽”和“肽”当在本文描述基因产物时可互换应用。术语“多肽”涵盖了所有功能的蛋白质,包括酶。因此,多肽例如包括基因产物、天然发生的蛋白质、共同系物、直向同源物、共生同源物、片段、及其它等价物、变体和类似物。

[0163] 术语“多肽片段”或“片段”当用于描述参考多肽时,是指与所述参考多肽自身相比缺失了氨基酸残基的多肽,但是剩余的氨基酸序列与所述参考多肽中的相应位置通常相同。这种缺失可以发生在参考多肽的氨基末端或者羧基末端或者这两端。片段长度典型为至少 5、6、8 或者 10 个氨基酸,至少 14 个氨基酸,至少 20、30、40 或 50 个氨基酸,至少 75 个氨基酸,或者至少 100、150、200、300、500 或更多个氨基酸。片段可以保留所述参考多肽的一或多种生物学活性。另外,片段可包括特定区域的亚片段,这种亚片段保留其从中产生的区域的功能。

[0164] 如本文所用,术语“引物”是指在一些实施方案中包含外显子或内含子区域的两或多个脱氧核糖核苷酸或者核糖核苷酸的序列,在一些实施方案中包含 3 个以上、8 个以上及在一些实施方案中包含至少大约 20 个核苷酸。这种寡核苷酸在一些实施方案中长度为 10-30 个碱基。

[0165] 术语“纯化的”是指所述对象以优势存在(即在摩尔基础上其较组合物中任何其它各个物质更丰富)。“纯化部分”是指一种组合物,其中所述对象包含至少大约 50% (在摩尔基础上)的所有存在的物质。在确定溶液或分散液中物质的纯度中,其中所述物质溶解或分散于其中的溶剂或基质通常不包括在这种确定中;相反,仅考虑溶解或分散的物质(包括感兴趣的物质之一)。通常地,纯化的组合物具有一种物质,其包含所述组合物中存在的大约 80%、85%、90%、95%、99% 以上或更多的所有物质。所述物质可以纯化为基本同质的(通过常规检测方法在所述组合物中不能检测到污染物),其中所述组合物基本上由一种物质组成。多肽的纯度可以通过本领域技术人员已知的许多方法确定,包括例如氨基末端氨基酸序列分析、凝胶电泳和质谱分析。

[0166] “参考序列”是指用作序列对比基础的指定序列。参考序列可以是较大序列的亚类,例如全长核苷酸或者氨基酸序列的一个节段,或者可以包含完整的序列。由于两个蛋白质均以是(1)包含与所述两个蛋白质相似的一个序列(即完整的蛋白质序列的一部分),及(2)可进一步包含与所述两个蛋白质不同的一个序列,因此两个(或多个)蛋白质之间的序列对比典型通过“对比窗”对比这两个蛋白质的序列(见上述),以鉴别和对比呈现序列相似性的局部区域。

[0167] 术语“调节序列”在本说明书中是一个专业术语,是指为影响编码序列和非编码序列的表达所必需或希望的多核苷酸序列,如起始信号、增强子、调节子、启动子和终止序列,所述调节序列与所述编码序列和非编码序列可操纵地连接。调节序列的例子在 Goeddel, 1990⁴⁵ 中描述,包括例如猿病毒 4040(SV40)的早期和晚期启动子、腺病毒或巨细胞病毒立即早期启动子、CMV 最小启动子、lac 系统、trp 系统、TAC 或 TRC 系统、T7 启动子(其表达由 T7 RNA 聚合酶指导)、噬菌体 λ 的主要操纵子和启动子、fd 外壳蛋白的控制区、3-磷酸甘油酸激酶或者其它糖解酶的启动子、酸性磷酸酶的启动子例如 Pho5、酵母 a- 交配因子的启动子、杆状病毒系统的多角体蛋白启动子,及已知控制原核细胞或真核细胞或其病毒的基因表达的其它序列,以及这些序列的各种组合。这种控制序列的性质和应用根据宿主生物体而可以不同。在原核生物中,这种调节序列通常包括启动子、核糖体结合位点及转录终

止序列。术语“调节序列”最小限度包括其存在可以影响表达的成分,且也可以包括其存在是有利的其它成分,例如前导序列和融合配体序列。

[0168] 在某些实施方案中,多核苷酸序列的转录在启动子序列(或者其它调节序列)的控制下,所述启动子序列控制所述多核苷酸在指定类型细胞中的表达。也应理解所述多核苷酸可以在调节序列的控制下,所述调节序列与控制天然发生形式的多核苷酸的表达的那些序列相同或不同。在一些实施方案中,启动子序列选自 CMV 最小启动子、肌酸激酶(MCK)、及 α -肌球蛋白重链(MHC)启动子。例如,肌酸激酶(MCK)启动子指导骨骼肌中基因表达,可以用于在组织包括骨骼肌组织中表达 miRNA,例如 miR-1、miR-133 或 miR-206,使用目前可以利用的转基因技术进行。应理解不需要应用针对任何启动子鉴别的全部启动子(例如本文列出的启动子),可以使用其功能衍生物。如本文所用,短语“功能衍生物”是指一种核酸序列,其包含足以指导另一个可操纵地连接的核酸分子转录的序列。正是如此,“功能衍生物”可以作为最小启动子而起作用。

[0169] 多核苷酸序列转录的终止典型由可操纵地连接的转录终止序列(例如 RNA 聚合酶 III 终止序列)调节。在某些情况中,转录终止子对于校正 mRNSA 聚腺苷酸化也起作用。所述 3' 非转录的调节 DNA 序列在一些实施方案中包括大约 50-1,000、100-1,000 个核苷酸碱基对,且含有转录和翻译终止序列。在一些实施方案中, RNA 聚合酶 III 终止序列包含核苷酸序列 TTTTTT。

[0170] 术语“报道基因”是指一种核酸,其包含编码可易于检测其存在或活性的蛋白质的核苷酸序列,包括但非限于萤光素酶、荧光蛋白(例如绿色荧光蛋白)、氯霉素乙酰转移酶、 β -半乳糖苷酶、分泌的胎盘碱性磷酸酶、 β -内酰胺酶、人生长激素,及其它分泌的酶报道基因。通常地,报道基因编码不是由宿主细胞产生的一种多肽,其通过细胞分析可以检测到,例如通过对细胞进行直接荧光分析、放射性同位素分析或者分光光度分析,及典型不需要杀死细胞进行的信号分析。在某些情况中,报道基因编码一种酶,其导致宿主细胞的荧光性质发生改变,这可通过定性、定量或者半定量功能或者转录激活而检测。所述酶的例子包括酯酶、 β -内酰胺酶、磷酸酶、过氧化物酶、蛋白酶(组织纤溶酶原激活物或尿激酶),及可以通过本领域技术人员已知的或者未来将揭示的合适的生色或荧光底物检测其功能的其它酶。

[0171] 如本文所用,术语“测序”是指使用常规的人工或自动实验室技术确定 DNA、RNA 或者蛋白质靶样本的核酸或氨基酸的有序线性序列。

[0172] 如本文所用,术语“基本纯的”是指所述多核苷酸或多肽基本上没有与其在天然状态下关联的序列和分子及分离步骤中使用的那些分子。术语“基本没有”是指在一些实施方案中所述样本中至少 50%、70%、80% 和 90% 没有与其自然状态下关联的材料和化合物。

[0173] 如本文所用,术语“靶细胞”是指其中希望插入核酸序列或多肽或者另外在已知未修饰的细胞的标准条件下进行修饰的细胞。导入靶细胞中的核酸序列可以是可变长度。另外,核酸序列可以作为质粒或其它载体的一种成分或者作为裸序列进入靶细胞中。

[0174] 如本文所用,术语“靶基因”是指一种基因,使用本发明的方法和组合物靶向于其加以调节。因此,靶基因包含一个核酸序列,所述核酸序列的表达水平(在 mRNA 或者多肽水平)由 miRNA 负调节。相似地,术语“靶 RNA”或者“靶 mRNA”是指靶基因的转录物, miRNA

与其结合,导致调节靶基因的表达。所述靶基因可以是衍生自细胞的基因、内源基因、转基因、外源基因如病原体基因,例如在感染后存在于细胞中的病毒。含有靶基因的细胞可以衍生自或者包含在任何生物体中,例如植物、动物、原生动物、病毒、细菌或者真菌中。

[0175] 如本文所用,术语“转录”是指一个细胞过程,包括 RNA 聚合酶与基因的相互作用,指导所述基因的编码序列中存在的结构信息的 RNA 表达。所述过程包括但非限于如下步骤:(a) 转录开始;(b) 转录物延长;(c) 转录物剪接;(d) 转录物加帽;(e) 转录终止;(f) 转录物聚腺苷酸化;(g) 转录物的核输出;(h) 转录物编辑;及(i) 稳定所述转录物。

[0176] 如本文所用,术语“转录因子”是指胞质或核蛋白,其结合基因,或者结合基因的 RNA 转录物,或者结合另一种蛋白质,所述蛋白质结合一个基因或 RNA 转录物或者反过来结合基因或 RNA 转录物的另一种蛋白质结合,从而调节所述基因的表达。这种调节可另外通过其它机制实现;“基因的转录因子”的含义是指以一些方式改变所述基因的转录水平的因子。

[0177] 术语“转染”是指在受体细胞中导入核酸,例如表达载体,在某些情况中包括核酸介导的基因转移。术语“转化”是指其中细胞基因型由于细胞吸收外源核酸的结果而改变的过程。例如,转化的细胞可表达本发明的 miRNA。

[0178] 如本文所用,概率的统计学分析中“显著性”或者“显著的”是描述两或多个实体之间存在非随机的关联性。为了确定一种关系是否是“显著性”或者具有“显著性”,可以对数据进行统计学处理,以计算概率,以 p 值表示。这些 p 值低于自定义的截断点则认为是显著的。在一个实施例中,认为 p 值低于或等于 0.05 具有显著性,在一些实施方案中,认为 p 值低于 0.01 具有显著性,在一些实施方案中,认为 p 值低于 0.005 具有显著性,在一些实施方案中,认为 p 值低于 0.001 具有显著性。

[0179] 如本文所用,短语“靶 RNA”是指作为调节靶位的一种 RNA 分子(例如编码基因产物的 mRNA 分子)。在一些实施方案中,所述靶 RNA 由靶基因编码。相似地,短语“靶位点”是指靶 RNA 内的序列,其被“靶向”由 miRNA 构建体介导裂解,所述 miRNA 构建体在其反义链中含有与靶位点互补的序列。也相似地,短语“靶细胞”是指表达靶 RNA 且其中导入指定 miRNA 的细胞。靶细胞在一些实施方案中是肌细胞。

[0180] 如果一种 miRNA 与一种 RNA 分子具有足够的核苷酸相似性,则所述 miRNA “靶向”所述 RNA 分子,预期其在足以使得所述 miRNA 与所述 RNA 分子相互作用的条件下调节所述 RNA 的表达。在一些实施方案中,所述相互作用发生在肌细胞中。在一些实施方案中,所述相互作用在生理学条件下发生。如本文所用,短语“生理学条件”是指在体内肌细胞内条件,无论该肌细胞是对象的一部分还是对象的组织,或者该肌细胞正在体外生长。因此,如本文所用,短语“生理学条件”是指作为对象的一部分或者当在体外生长时的肌细胞内的所述肌细胞可以暴露于其下的任何条件。

[0181] 如本文所用,短语“可检测水平的裂解”是指靶 RNA 的裂解程度(及裂解产物 RNA 的形成),其足以使得可以在靶 RNA 的随机降解产生的 RNA 背景之上检测到裂解产物。miRNA-介导的裂解产物从至少 1-5%的靶 RNA 中的产生足以使得可以在大多数检测方法的背景之上进行检测。

[0182] 术语“microRNA”和“miRNA”可互换应用,是指大约 17-24 个核苷酸的核酸分子,其从 pri-miRNA、pre-miRNA 或者其功能等价物中产生。miRNA 与小干扰 RNA(siRNAs)

相反,尽管在外源供应 miRNA 和 siRNA 的情况中这种差别也许是人为的。所述差别是 miRNA 是核酸酶活性对于如本文已经描述的发夹分子的产物, siRNA 可以从完全双链的 RNA 分子或者发夹分子中产生。关于 miRNA 的进一步的信息以及已知的公开的 miRNA 数据库和该数据库的搜索工具可见于并入本文作参考的 Wellcome Trust Sanger InstitutemiRBase::Sequences website 所述。也见于并入本文作参考的 ThemicroRNA Registry, Griffiths-Jones S., NAR, 2004, 32, Database Issue, D109-D111 所述。

[0183] 如本文所用,术语“RNA”是指包含至少一个核糖核苷酸残基的分子。“核糖核苷酸”是指在 β -D-呋喃核糖成分的 2' 位置具有羟基基团的核苷酸。该术语涵盖了双链 RNA、单链 RNA、具有双链区和单链区的 RNA、分离的 RNA 如部分纯化的 RNA、基本纯的 RNA、合成的 RNA 及重组产生的 RNA。因此, RNA 包括但非限于 mRNA 转录物、miRNA 和 miRNA 前体,及 siRNAs。如本文所用,术语“RNA”也涵盖了改变的 RNA 或者 RNA 类似物,这是通过添加、缺失、取代和/或改变一或多个核苷酸而与天然发生的 RNA 而有所不同的 RNA。这种改变可以包括在如 RNA 的末端或内部例如 RNA 的一或多个核苷酸处添加非核苷酸材料。本发明的 RNA 分子中的核苷酸也可以包含不标准的核苷酸,如非天然发生的核苷酸或者化学合成的核苷酸或者脱氧核苷酸。这些改变的 RNA 可以称作类似物或者天然发生的 RNA 的类似物。

[0184] 如本文所用,短语“双链 RNA”是指一种 RNA 分子,其至少一部分是形成双链体的 Watson-Crick 碱基对。由此,该术语涵盖了完全或者仅部分双链的 RNA 分子。双链 RNA 的例子包括但非限于包含至少两个独特 RNA 链的分子,其通过分子间杂交而部分或全部形成双链。另外,该术语还包括通过分子内杂交可以形成双链区(例如发夹)的一个 RNA 分子。因此,如本文所用,短语“分子间杂交”和“分子内杂交”是指双链分子,其中参与双链体形成的核苷酸分别存在于不同分子或相同分子上。

[0185] 如本文所用,短语“双链区”是指通过核苷酸之间的氢键形成的双链构象的核酸分子的任何区域及本领域技术人员已知的任何其它核酸双链体,所述核苷酸之间的氢键包括但非限于胞嘧啶与鸟苷、腺苷与胸苷、腺苷与尿嘧啶之间的氢键。双链区的长度可以是大约 15 个连续碱基对至几千个碱基对。在一些实施方案中,所述双链区为至少 15 个碱基对,在一些实施方案中是 15 至 300 个、15 至大约 60 个 碱基对。如上文所述,双链区的形成得自互补 RNA 链的杂交(例如有义链与反义链的杂交),通过分子间杂交(即包含 2 或多个独特的 RNA 分子)或者通过分子内杂交形成,当一个 RNA 分子含有能在同一 RNA 分子上彼此杂交的自身互补区时可发生后者的杂交。这些自身互补区典型由一段短核苷酸序列(例如大约 5-10 个核苷酸)分隔,由此形成本领域称作“发夹”或“茎-环结构的”分子内杂交。

[0186] III:核酸

[0187] 本发明中应用的核酸分子包括编码肌细胞基因产物的核酸分子,以及本发明中用于调节肌细胞基因表达的核酸分子(例如 miRNA 核酸分子)。因此,本发明中应用的核酸分子包括但非限于本文描述的核酸分子。例如,本发明中应用的核酸分子包括但非限于: miR-1(UGGAAUGUAAAAGUAUGUA, SEQ ID NO:1), miR-133(UUGGUCCCCUUAACCAGCUGU, SEQ ID NO:2), miR-206(UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG, SEQ ID NO:3), miR-208(AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU, SEQ ID NO:4), miR-22(AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU, SEQ ID NO:5), miR-26(UUCAAGUAAUyCAGGAUAGGy(U), SEQ ID NO:6), miR-29(UAGCACCAUyUGAAAUCrGU(kUU), SEQ ID NO:7), miR-30(ykUwmAswysshswyUvnnv(bC), SEQ ID NO:8),

miR-128(UCACAGUGAACCGGUCUCUUy, SEQ ID NO :9), miR-143(UGAGAUGAAGCACUGUAGCUCA, SEQ ID NO :10) 和 miR-145(GUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCUU, SEQ ID NO :11); 及与这些序列基本相同的序列(例如在一些实施方案中,与 SEQ IDNO :1-11 任一序列至少 70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%相同的序列); 及这些序列的亚序列和延长的序列。本发明还涵盖了包含所述核酸序列的基因、cDNA、钱和基因和载体。

[0188] 上文及本文别处应用的单字母表示的核苷酸代码根据并入本文作参考的 WIPO Standard ST. 25(1998), Appendix 2, Table 1, (M. P. E. P. 2422, Table 1) 而定。特别地,如下表 1 示出了单字母代码表示的相关核苷酸。括号中的核苷酸(例如(n))是指可以存在或不存在的核苷酸。另外,图 21 列出了基于 SEQ ID NO :5-11 核苷酸排列的 SEQ ID NO :5-11 的各个可能序列。

[0189] 表 1 :单字母代码的核苷酸缩写

[0190]

A	腺嘌呤
G	鸟嘌呤
C	胞嘧啶
T	胸腺嘧啶
U	尿嘧啶
k	G 或 U/T
w	U/T 或 A
m	C 或 A
s	G 或 C
h	A, C, 或 U/T
v	G, A, 或 C
b	C, G, 或 U/T
n	A, G, C, 或 U/T
y	C 或 T/U

[0191] 本发明方法中应用的核苷酸序列的一个例子包含彼此互补的序列,所述互补区在一些实施方案中能形成至少大约 15-300、至少大约 15-24 个碱基对的双链体。所述双链体的一个链包含本发明的核酸分子的核酸序列的至少 15 个连续碱基的核酸序列。在一个实施例中,所述双链体的一个链包含具有 15、16、17 或者 18 个核苷酸、或者更长如 19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个核苷酸、或者直至本文所述任何核酸序列全长的核酸序列。这种片段可易于通过例如化学合成方法直接合成所述片段、通过应用核酸扩增技术、或者通过在重组载体中导入选择的序列进行重组产生而制备。短语“特异性杂交”是指一种分子仅与特定的核苷酸序列(当该序列存在于复合的核酸混合物中例如总 DNA 或 RNA 中时)在严格条件下结合、形成双链体或者杂交。

[0192] 术语“亚序列”是指包含较长的核酸或氨基酸序列的一部分的核酸分子或氨基酸分子的序列。亚序列的一个例子是包含 pri-miRNA 或 pre-miRNA(miRNA 前体)的双链体区的一部分的一个序列,包括但非限于在核酸酶作用后成为成熟 miRNA 的核苷酸或者 miRNA 前体中的单链区。

[0193] 术语“延长的序列”是指在所述核酸中掺入额外的核苷酸(或者其它类似分子)。例如,聚合酶(例如 DNA 聚合酶)可以在所述核酸分子的 3' 末端添加序列。另外,所述核苷酸序列可以与其它 DNA 序列组合,如启动子、启动子区、增强子、聚腺苷酸化信号、内含子序列、额外的限制酶位点及其它编码片段。

[0194] 本发明的核酸可以被克隆、合成、重组改变、诱变或者对其组合进行这些技术。用于分离核酸的标准重组 DNA 和分子克隆技术为本领域所已知。例如,非限制性的方法是由 Silhavy et al.,1984⁴⁶、Ausubelet al,1989³⁶、Glover & Hames,1995⁴⁷ 及 Sambrook & Russell,2001⁴⁰ 所述方法。产生碱基对改变、缺失或小的插入的位点特异性诱变方法也为本领域所已知,由出版物例证(见例如 Adelman et al.,1983⁴⁸、Sambrook & Russell,2001⁴⁰)。

[0195] IV:miRNA-表达载体

[0196] 在本发明的一些实施方案中,miRNA 分子或者 miRNA 前体分子是从插入核酸载体中的转录单位表达的(所述载体或者通常称作“重组载体”或者“表达载体”)。载体可用于将编码 miRNA 的核酸分子输送至肌细胞中以靶向特定基因。所述重组载体可以是例如 DNA 质粒或病毒载体。本领域已知多种表达载体。适当的表达载体的选择可以基于一些因素包括但非限于表达所希望的细胞类型而决定。

[0197] 术语“载体”是指能转运与其连接的另一种核酸的核酸。载体包括能自主复制和表达其连接的核酸的那些载体。能指导与其可操纵地连接的基因表达的载体在本文称作“表达载体”。通常地,用于重组技术中的表达载体通常是质粒形式。然而,本发明包括其它形式的表达载体,其发挥相同功能并随后将为本领域所了解。

[0198] 如本文所用,术语“表达载体”是指能指导特定核苷酸序列在适当的宿主细胞中表达的核苷酸序列,其包含与转录终止序列可操纵地连接的感兴趣的核苷酸序列可操纵地连接的启动子。其还典型包含所述核苷酸序列正确翻译所需的序列。包含感兴趣的核苷酸序列的构建体可以是嵌合的。所述构建体也可以是天然发生的,但是已经以重组方式获得以用于异源表达的构建体。感兴趣的核苷酸序列,包括设计为正确表达所述核苷酸序列的任何额外序列,也可以称作“表达盒”。

[0199] 如本文所用,术语“异源基因”、“异源 DNA 序列”、“异源核苷酸序列”、“外源核酸分子”或者“外源 DNA 节段”均是指源自与指定宿主细胞无关的来源,或者如果源自相同来源,则是其原始形式的修饰形式。因此,宿主细胞中的异源基因包括与特定宿主细胞是内源的、但是已经例如通过诱变或者通过分离自天然转录调节序列而修饰的基因。该术语还包括天然发生的核苷酸序列的非天然发生的多个拷贝。因此,该术语是指与所述细胞不相关或异源的 DNA 节段,或者与所述细胞同源、但是在宿主细胞中的不是最初发现其的位置。

[0200] 术语“启动子”或者“启动子区”均是指基因内位于 5' 至编码序列并发挥指导编码序列转录功能的核苷酸序列。启动子区包含一个转录起始位点,且可以另外包含一或多个转录调节元件。在一些实施方案中,本发明的方法应用 RNA 聚合酶 III 启动子。

[0201] “最小启动子”是具有为发生基本水平的转录所需的最小元件的核苷酸序列。如此,最小启动子不是完整的启动子,而是在实验系统中能指导报道构建体基本水平转录的启动子的亚序列。最小启动子包括但非限于巨细胞病毒(CMV)最小启动子、单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-tk)最小启动子、猿病毒 40(SV40)最小启动子、人 β -肌动蛋白最小启动子、人 EF2 最小启动子、腺病毒 E1B 最小启动子,及热激蛋白(hsp)70 最小启动子。最小启动子通常增加一或多个转录调节元件以影响可操纵地连接的基因的转录。例如,细胞类型特异性或者组织特异性转录调节元件可以加入最小启动子中,以产生指导可操纵地连接的核苷酸序列以细胞类型特异性或者组织特异性方式转录的重组启动子。如本文所用,术

语“最小启动子”也涵盖了本文揭示的启动子的功能衍生物,包括但非限于 RNA 聚合酶 III 启动子(例如 H1、7SL、5S 或者 U6 启动子)、腺病毒 VA1 启动子、Vault 启动子、端粒末端转移酶 RNA 启动子和 tRNA 基因启动子。

[0202] 不同的启动子具有不同的转录调节元件组合。基因是否在细胞中表达依赖于组成基因的启动子的特定转录调节元件的组合及所述细胞核中存在的不同转录因子。如此,根据其在体内或者在体外的功能活性,启动子通常被分为“组成型启动子”、“组织特异性启动子”、“细胞特异性启动子”或者“可诱导的启动子”。例如,组成型启动子是能指导基因在生物体的多种类型细胞(在一些实施方案中是在所有类型细胞)中转录的启动子。组成型启动子的例子包括编码某些组成型或者“管家”功能的如下基因的启动子:次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(HPRT)、二氢叶酸还原酶(DHFR,(Scharfmann et al.,1991)、腺苷脱氨酶、磷酸甘油酸激酶(PGK)、丙酮酸激酶、磷酸甘油酸变位酶、 β -肌动蛋白启动子(见例如Williams et al.,1993),及本领域技术人员已知的其它组成型启动子。另一方面,“组织特异性”或者“细胞类型特异性”启动子指导在生物体的一些组织或细胞类型中转录,但是在一些或所有其它组织或者细胞类型中是失活的。组织特异性启动子的例子包括在下文详细描述的那些启动子,以及本领域技术人员已知的其它组织特异性和细胞类型特异性启动子。

[0203] 当用于描述启动子时,如本文所用,术语“连接”是指启动子元件的物理性接近,由此其一起发挥指导可操纵地连接的核苷酸序列转录的功能。

[0204] 如本文所用,术语“转录调节序列”或者“转录调节元件”均是指启动子区域内能应答调节转录因子的一个核苷酸序列。应答可以包含转录产量的增加或减少,由转录因子与包含所述转录调节元件的核苷酸序列的结合而介导。在一些实施方案中,转录调节序列是转录终止序列,或者在本文称作转录终止信号。

[0205] 术语“转录因子”通常是指通过与转录调节元件及进行转录的细胞成分相互作用而调节基因表达的蛋白质,包括 RNA 聚合酶、转录相关因子(TAFs)、染色质重塑蛋白及影响基因转录的任何其它相关蛋白。

[0206] V:调节肌细胞中基因表达的方法

[0207] 本发明提供了调节肌细胞中基因特异性表达的方法。在一些实施方案中,所述方法包括将肌细胞与靶向所述肌细胞中基因的 miRNA 或者编码所述 miRNA 的载体接触。靶向肌细胞中一或多个特定基因可以高水平特异性操纵肌细胞功能或发育(例如分化)。因此,在一些实施方案中,本发明进一步提供了调节肌细胞功能或发育的方法,通过将肌细胞与靶向肌细胞中可调节肌细胞功能或发育的基因的 miRNA 接触。

[0208] 在一些实施方案中,靶向于特定基因的 miRNA 选自 miR-1、miR-133、miR-206、miR-208、miR-22、miR-26、miR-29、miR-30、miR-128、miR-143 和 miR-145(分别为 SEQ ID NO:1-11),包括具有与 SEQ ID NO:1-11 任一序列至少 70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%相同的序列的 miRNA。

[0209] 如果一种 miRNA 与一种 RNA 分子具有足够的核苷酸相似性,期望在足以使得所述 miRNA 与所述 RNA 分子相互作用的条件下调节所述 RNA 分子表达,则所述 miRNA “靶向于”所述 RNA 分子。在一些实施方案中,所述相互作用发生在肌细胞中。在一些实施方案中,所述相互作用在生理学条件下发生。如本文所用,短语“生理学条件”是指在体内肌细胞内的条件,无论所述肌细胞是对象或对象组织的一部分,还是在体外生长的肌细胞。因此,如本

文所用,短语“生理学条件”是指作为生物体的一部分或是在体外生长的肌细胞可以暴露于其的任何条件。

[0210] 在一些实施方案中,靶基因是肌细胞分化基因或者肌细胞组织基因,且当其表达时可以分别调节肌细胞的分化和/或增殖。在一些实施方案中,靶基因可以表达抑制肌细胞分化和/或增殖的基因。因此,所述 miRNA 对一或多个这些分化和/或增殖靶基因表达的靶向抑制可以导致所处理的肌细胞的分化和/或增殖增加。在本发明的非限制性实施方案中,所述肌细胞分化基因可以编码组蛋白脱乙酰酶 4(HDAC4) 多肽或者甲状腺激素受体蛋白 240(TRAP240),所述肌细胞增殖基因可编码血清应答因子(SRF) 多肽。

[0211] 利用本发明揭示的 miRNA 之一可以靶向抑制一或多种肌细胞分化或增殖基因的表达。例如,miRNA miR-1 和 miRNA-133 分别特异性靶向 HDAC4 和 SRF 的 3' 非翻译区,并抑制由这些基因编码的基因产物的表达。因此,在本发明的一些实施方案中,肌细胞的分化可以通过将其与 miR-1 接触而增加,所述 miR-1 靶向编码 HDAC4 的基因,从而充分阻止 HDAC4 的表达并增加肌细胞分化。同样,在本发明的一些实施方案中,肌细胞的增殖可以通过将其与接触而增加,所述 miR-133 靶向编码 SRF 的基因,从而充分阻止 SRF 的表达并增加肌细胞增殖。

[0212] VI: 治疗方法

[0213] 本发明在一些实施方案中提供了治疗对象肌损伤的治疗方法。如本发明所揭示,miRNA 可以靶向基因以调节所述基因的表达。特别地,miRNA 可以靶向发挥抑制肌细胞分化和/或增殖功能的基因表达产物,以抑制这些基因的表达,使得肌细胞分化和/或增殖增加。另外,内源 miRNA 可以靶向 miRNA 抑制剂,以有益于治疗肌损伤的方式促进特定基因产物的表达。另外,miRNA 和/或 miRNA 抑制剂的组合物可以共同给予肌损伤对象,优化损伤的康复。肌细胞分化和/或增殖的增加可以有益于损伤的肌组织康复或者刺激所示损失的肌组织再生。

[0214] 因此,在本发明的一些实施方案中,治疗肌损伤的方法包括给予对象肌损伤部位有效量的 miRNA、编码所述 miRNA 的载体、miRNA 的抑制剂,或者组合给予这些物质,其中所述 miRNA 靶向于所述肌损伤部位肌细胞中的基因。

[0215] 肌组织的发育及可比的肌组织生长和/或康复如损伤后的康复可以同阶段发生。代表性的阶段包括未分化的肌细胞增殖,随后所述肌细胞分化为肌组织的成熟细胞。因此,促进肌损伤部位肌组织的修复可以通过同等给予所述损伤部位增强未分化的肌细胞增殖的 miRNA 和/或 miRNA 抑制剂,给予损伤部位 miRNA 和/或 miRNA 抑制剂增强增殖的肌细胞分化为成熟的功能性肌组织。

[0216] 例如,如本发明所揭示,已经确定 miR-1 和 miR-133 在调节骨骼肌增殖和分化中发挥独特作用。miR-133 通过抑制 SRF 而增强肌细胞增殖。相反,miR-1 通过靶向 HDAC4(一种肌细胞基因表达的转录抑制剂) 而促进肌细胞分化。因此,在本发明的一个非限制性实施方案中,首次将 miR-133 和 miR-1 抑制剂(例如 2'-O-甲基-miR-1) 在第一时间点共同给予肌损伤部位,以增加损伤部位的肌细胞增殖。然后,在第二时间点共同给予 miR-1 和 miR-133 抑制剂(例如 2'-O-甲基-miR-133),增加增殖的肌细胞的分化。暂时同等共同给予多种 miRNA 和/或 miRNA 抑制剂可进一步改善肌损伤的康复。

[0217] 在一些实施方案中,肌损伤得自机械性肌创伤、肌组织退行性疾病、心肌损伤或

者这些损伤的组合。机械性肌创伤可以是例如钝伤如在车祸或者穿刺伤的结果,其中所述肌组织被切开或撕开。非限制性的肌组织退行性疾病的例子包括肌营养不良症(例如 Duchenne 肌营养不良症(DMD))、运动神经元疾病(例如肌萎缩性(脊髓)侧索硬化(ALS))、炎症性肌病(例如皮炎(DM))、神经肌肉接头病变(例如重症肌无力(MG))、内分泌性肌病(例如甲亢肌病(HYPTM)),及代谢性肌病(例如磷酸化酶缺陷(MPD))。非限制性的心肌损伤的例子包括心肌梗塞和心肌再灌注损伤。

[0218] 在一些实施方案中,靶向特定基因的 miRNA 选自 miR-1、miR-133、miR-206、miR-208、miR-22、miR-26、miR-29、miR-30、miR-128、miR-143 和 miR-145(分别为 SEQ ID NO:1-11),包括具有与 SEQ ID NO:1-11 任一序列至少 70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或者 99% 相同的序列的 miRNA。在一些实施方案中,所述基因是肌细胞分化基因(例如编码 HDAC4 或者 TRAP240) 或者肌细胞增殖基因(例如编码 SRF)。

[0219] 关于本发明的治疗方法,优选的对象是脊椎动物对象。优选的脊椎动物是温血动物;优选的温血脊椎动物是哺乳动物。优选的哺乳动物最优选是人。如本文所用,术语“对象”包括人和动物对象。因此,本发明还提供了兽用治疗用途。

[0220] 如此,本发明提供了对哺乳动物的治疗,所述哺乳动物如人以及那些由于濒临灭绝而重要的哺乳动物,如西伯利亚虎;以及具有经济学重要性的哺乳动物如供人类消费的在农场饲养的动物;和/或对于人类具有社会重要性的动物,如宠物或动物园内动物。这种动物的例子包括但非限于食肉动物如猫和狗;猪,包括猪(pig)、猪(hog)及野猪;反刍动物和/或有蹄动物如牛(cattle)、牛(oxen)、绵羊、长颈鹿、梅花鹿、山羊、野牛和骆驼;及马。本发明还提供了对鸟类的治疗,包括治疗濒临灭绝的和/或动物园中的那些鸟类,以及家禽、特别是驯养的家禽即家禽(poultry),如火鸡、鸡、鸭、鹅、珍珠鸡等,其对人类也具有经济学重要性。因此,本发明还提供了对家畜的治疗,包括但非限于驯养的猪、反刍动物、有蹄动物、马(包括赛马)、家禽等。

[0221] 给予对象 miRNA 或者编码所述 miRNA 的载体的适当方法包括但非限于:全身性给予、肠道外给予(包括静脉内、肌内、动脉内给予)、口服、含服、皮下给予、吸入、气管内装置、手术植入、经皮给予、局部注射和超高速注射/轰击。在适当情况下,持续注入可增强药物集中于靶位点。

[0222] 本发明的方法中使用的特定给予模式依赖于多种因素,包括但非限于应用的 miRNA 和/或载体,所治疗的疾病的严重性及活性化合物在给予之后的代谢或清除机制。

[0223] 本文所用术语“有效量”是指所述治疗组合物(例如包含 miRNA 或者编码所述 miRNA 的载体的组合物)足以产生可测生物学应答(例如肌细胞分化和/或增殖增加)的量。本发明治疗组合物中活性化合物的实际剂量水平可以变化,以便给予所述活性化合物的量有效达到针对特定对象和/或应用的希望的治疗应答。选择的剂量水平依赖于多种因素,包括治疗组合物的活性、配方、给予途径、与其它药物或治疗方法的组合、治疗疾病的严重性,及治疗对象的一般状况和病史。优选地,给予最小剂量,在不存在剂量限制毒性的条件下逐步增加剂量,达到最低限度的有效量。有效剂量的确定和调整以及何时及怎样进行如此调整的评估为本领域技术人员所已知。

[0224] 实施例

[0225] 如下实施例例证了本发明。根据本发明的揭示及本领域技术人员的通识,技术人员意识到如下实施例仅是例证了本发明,在不偏离本发明范围的前提下可以对本发明进行各种改变、修改和变化。

[0226] 实施例 1

[0227] 为了理解 microRNAs(miRNA) 在骨骼肌增殖和分化中的参与作用,我们使用确立的微阵列分析方法分析了 miRNA 在骨骼肌分化期间的表达⁹。我们选择使用 C2C12 成肌细胞,因为这种细胞系精确地在体外模拟骨骼肌分化,当从培养基中去除血清时,成肌细胞被诱导成为终末分化的肌管¹⁰⁻¹²。我们发现检测的 miRNA 成分的表达在分化的 C2C12 成肌细胞/肌管中被上调(图 1a 和图 6)。通过 Northern 印迹分析证实 miR-1 和 miR-133 在分化的成肌细胞中表达增加(图 1b 和图 7)。

[0228] 实施例 2

[0229] miR-1 和 miR-133 在成体心肌和骨骼肌组织中特异性表达,但是在测试的其它组织中不是这样(图 1c,图 8)。然而,关于哺乳动物发育期间特异性 miRNA 的时间和空间分布的了解还很少。我们因此检测了 miR-1 和 miR-133 在小鼠胚胎和新生小鼠中的表达。miR-1 和 miR-133 在 E13.5 和 E16.5 胚胎发育中的心脏和骨骼肌中极低水平表达(图 1d 和图 8)。发现在新生小鼠的心脏和骨骼肌中 miR-1 和 miR-133 表达水平增加,但是其仍显著低于在成体中的表达水平(图 1e 和图 8)。这些数据与在斑马中发现的结果一致,在斑马中大多数 miRNA 在胚胎发生期间相对较晚期表达¹⁶。

[0230] 实施例 3

[0231] miR-1 和 miR-133 聚集在小鼠染色体 2(间隔 9.3kb) 和 18(间隔 2.5kb) 上(图 9 和参考文献 14)。我们使用包括 miR-1 或 miR-133 序列的~300bp 基因组探针进行 Northern 印迹分析(图 9a-9e)。来自染色体 18 的 miR-1 和 miR-133 探针从分离自心脏和骨骼肌的总 RNA 中检测到一个~6 kb 初级转录物(图 9b 和 9c),表明 miR-1 和 miR-133 确实一起转录。同时来自染色体 2 的 miR-1 和 miR-133 探针从心脏和骨骼肌中检测到一个~10 kb 转录物,miR-133 探针也与~4.5kb 和~2.2kb 的两个额外的转录物杂交,同时 miR-1 探针也检测到一个~6kb 主要转录物(图 9d 和 9e),提示转录后加工的潜在参与作用。总之,我们的数据表明 miR-1 和 miR-133 的心肌和骨骼肌特异性表达在初始的转录步骤进行。

[0232] 实施例 4

[0233] 我们推论控制染色体 2 和 18 的 miR-1 和 miR-133 簇的转录的调节元件很可能是保守的。因此,我们进行了序列分析并鉴别了高度保守的区域(~2kb),其位于染色体 2 和 18 上的 miR-1/133 簇上游大约 50kb 处(图 10)。当来自染色体 2 的这种基因组片段用于驱动 dsRed 报道基因在转基因 Xenopus 中的表达时,发现所述转基因的心肌和骨骼肌特异性表达(图 10)。

[0234] 实施例 5

[0235] 为了评定 miR-1 和 miR-133 在骨骼肌中的功能,我们首先尝试在哺乳动物细胞中过表达 miR-1 和 miR-133。我们使用印迹分析以及 miR-1 和 miR-133 “感应器”¹⁷ 检测并确认了这两个 miRNA 的表达和活性,所述感应器中 miR-1 或 miR-133 的互补序列克隆在 dsRed 编码序列的下游(图 11,数据未示出)。使用 miR-1 或 miR-133 转染 C2C12 成肌细胞,转染后将细胞维持在生长培养基(GM)中,或者将其移至分化培养基(DM)中。miR-1 显著增强肌

生成,这通过分别为早期和晚期肌原性标记的肌形成蛋白和肌球蛋白重链 (MHC)、以及其它肌原性标记包括 MyoD、Mef2 和骨骼肌 α -肌动蛋白的表达均增加而表明 (图 2a-2e、2i、2j 和表 2)。miR-1 诱导肌原性标记基因在维持在对数期生长条件 (图 2c) 和分化条件 (图 2、2d、2e) 下的细胞中表达。由 miR-1 诱导的肌原性分化加速也伴随着细胞增殖降低,其通过磷酸-组蛋白 H3 的表达显著降低而表明 (图 2、2c、2e 和表 2)。特别需要注意的是,miR-1 诱导的肌生成是特异性的,因为在骨骼肌细胞中不内源表达的 GFP 对照物或 miR-208 的过表达示出无作用 (图 2a-2e)。另外,在 miR-1 “种子”序列中导入突变消除了其激活肌原性基因 表达的能力 (图 2d-2e)。相反,miR-133 的过表达抑制肌形成蛋白和 MHC 的表达 (图 2, a-e 和表 2) 并促进成肌细胞增殖 (图 2c-2e 和表 2)。同样,miR-133 对成肌细胞增殖的作用是特异性的,因为对照组示出无作用且导入的突变消除 miR-133 的功能 (图 2a-2e, 2j)。

[0236]

表 2: miR-1 和 miR-133 过表达和敲除对于肌原性增殖和分化的作用

处理	DM(8 小时)		DM(12 小时)		DM(24 小时)	
	肌形成蛋白 阳性细胞	相对于对照组	肌形成蛋白 阳性细胞	相对于对照组	肌形成蛋白 阳性细胞	相对于对照组
GFP	172	100%	93	100%	118	100%
miR-1	206	121%	230	247.3%	251	212.7%
miR-133	89	51.7%	68	73.1%	93	78.8%
2'-O-甲基 -GFP	146	100%	145	100%	348	100%
2'-O-甲基 -miR-1	120	82.2%	98	67.6%	299	85.9%
2'-O-甲基 -miR-133	205	140.4%	211	145.5%	498	143.1%
				%		%
				100%		100%
				68.9%		55.5%
				124.4		146.7%
				%		54.5%
				100%		100%
				124.4		136.7%
				%		81.8%
				62.2%		200%

[0237] 我们进行了交互实验,其中用 miR-1 或 miR-133 2'-O-甲基反义抑制性寡聚物 (或者对照 GFP 和 miR-208) 转染 C2C 12 成肌细胞,已经示出抑制 miRNA 的功能^{18,19}。用

miR-1 抑制剂转染的细胞示出肌生成抑制及成肌细胞增殖得以促进,这通过肌原性标记减少及磷酸-组蛋白 H3 增加而表明(图 2f-2i 和表 2)。与 miR-133 促进成肌细胞增殖并抑制分化的作用一致,miR-133 的抑制导致相反作用,其中肌生成增强而细胞增殖被抑制(图 2f-2j 和表 2)。相反,对照的 2'-O-甲基抑制剂示出无作用(图 2f-2j)。我们推断 miR-1 和 miR-133 在骨骼肌增殖和分化中具有不同作用:miR-1 促进成肌细胞分化,而 miR-133 刺激成肌细胞增殖。

[0238] 实施例 6

[0239] 在从果蝇到人的大多数动物物种中均已经发现了 miR-1 和 miR-133,提示其是进化保守的。为了检测 miR-1 和 miR-133 对骨骼肌和心脏发育的作用,我们鉴别了 miR-1 和 miR-133 在 *Xenopus* 中的拷贝,并测试其错表达(mis-expression)的功能。在单细胞阶段导入 miR-1 导致轴(axis)显著缩短,伴随着与未注射的或者注射 miGFP 的对照组($n > 45$, 两个单独的实验)相比,前结构(anterior structures)的减少及沿着背-腹轴的身体大小的增加(图 3)。尽管在注射 miR-1 的胚胎中形成体节(图 3),但是全标本包埋抗体染色和系列切片表明所述组织是高度无组织构造的,且不能发育成分节段的结构(图 3e, 3f, 3j)。通过组织学、原肌球蛋白染色(图 3f, 3j)及心肌肌动蛋白染色判断心肌组织完全不存在。除了这些缺陷之外,磷酸-组蛋白 H3 染色显著降低(图 3i-3k),与 miR-1 在调节肌细胞增殖和分化中的基本作用一致。尽管 miR-133 的错表达也导致前结构减少及体节发育缺陷,但是与 miR-1 相反,前-后的长度仅略为减少,且体节缺陷在不能形成体节的胚胎的更前部或后部最严重(图 3g, 3h)。另外,心肌组织经常在 miR-133 胚胎中形成,但是其是高度无组织构造的且不能经历心脏回路或心室形成(图 3g, 3h, 3k)。总之,这些数据提示 miR-1 和 miR-133 的准确时程和水平对于正确的骨骼肌和心脏发育是必需的。

[0240] 实施例 7

[0241] HDAC4 在其 3' UTR 含有两个天然发生的推定的 miR-1 位点,其在脊椎动物物种中是进化保守的(图 12)。相似地,在哺乳动物 SRF 基因的 3' UTR 中发现两个保守的 miR-133 结合位点(图 12),示出在体外和体内肌组织增殖和分化中起重要作用^{11,24,25}。

[0242] 我们将小鼠 SRF 和 HDAC4 的 3' UTR 与萤光素酶报道基因融合,并将这些构建体连同转染对照物一起转染进哺乳动物细胞中。miR-1 的异位过表达显著抑制 HDAC4 3' UTR 萤光素酶报道基因,而 miR-133 抑制 SRF 3' UTR 萤光素酶报道基因的表达(图 4a)。相反,在 miR-1 或 miR-133 “种子”序列中导入突变则消除这种抑制,表示这种作用的特异性(图 4a)。

[0243] 当上述报道基因转染进 C2C12 成肌细胞中且在诱导细胞分化之前和之后测量萤光素酶活性时,发现所述报道基因活性在分化的细胞中显著抑制(图 4b),表示内源 miR-1 和 miR-133 水平增加抑制所述报道基因。通过 miRNA “感应器”监测内源 miR-1 和 miR-133 的作用和特异性(图 11)。相反, MCK-luc 报道基因(一种肌细胞分化的指示剂)的萤光素酶活性在分化的肌细胞中增加(图 4b)。另外,miR-1 的过表达导致在生长条件(图 4c)和分化条件(图 4e)下 C2C12 细胞中内源 HDAC4 蛋白被负调节,而 miR-133 抑制内源 SRF 蛋白的表达(图 4c, 4e)。相反,这些 miRNA 不改变 SRF 和 HDAC4 的 mRNA 水平(图 4d),支持了 miRNA 主要通过抑制翻译而抑制其靶基因功能的观点。当应用 miR-1 或 miR-133 的 2'-O-甲基翻译寡聚物时,其分别减轻对蛋白质水平的 HDAC4 或 SRF 的抑制作用(图 4g),

而对其 mRNA 水平则无作用 (图 4f)。

[0244] 为了进一步证实 HDAC4 和 SRF 在调节骨骼肌基因表达中是 miR-1 或 miR-133 的关联靶,我们测试了共转染 SRF 或 HDAC4 的表达质粒是否能“抑制”miRNA 介导的肌生成。确实,如图 4h 所示,SRF 的过表达部分逆转了由 miR-133 诱导的肌原性基因阻抑。相反,HDAC4 抵消了 miR-1 对骨骼肌基因表达的作用 (图 4h)。

[0245] 与 HDAC4 和 SRF 潜在参与 miR-1 和 miR-133 依赖性骨骼肌增殖和分化一致,内源性 HDAC4 和 SRF 蛋白水平在分化的 C2C12 细胞中被下调,伴随肌原性分化标记表达的增加和有丝分裂指数标记磷酸组蛋白 H3 表达的降低 (图 4i 和图 7d)。SRF 和 HDAC4 蛋白降低的表达伴随着 miR-1 和 miR-133 表达的增加 (对比图 4i 和图 1b)。这些数据加在一起证实 miR-1 和 miR-133 分别特异性阻抑 HDAC4 和 SRF 蛋白水平,这 (至少部分) 导致这些 miRNA 对成肌细胞增殖和分化的调节作用。

[0246] 我们鉴定了心脏和骨骼肌特异性 miR-1 和 miR-133 并且表明了它们在控制骨骼肌增殖和分化中的功能。令人注目地,我们发现 miR-1 和 miR-133 在相同的染色体基因座中簇集并且一起为一个单个转录物,变成两个独立的成熟 miRNA,它们具有不同的生物学功能,抑制不同的靶基因。这暗示 miRNA 参与复杂的分子机制。令人感兴趣地,尽管 miR-1 和 miR-133 的组织特异性表达由 myoD 和 SRF⁸ 控制,但是 SRF 表达由 miR-133 阻抑。因此,这些发现揭示了一负调节环,其中 miRNA 参与调节途径,从而控制细胞增殖和分化 (图 5)。

[0247] 实施例 1-7 的材料和方法

[0248] 经微阵列进行的 MicroRNA 表达分析

[0249] 在不同时间点 (第 0、1、3 和 5 天,转移到 DM 中第一天计为第 0 天) 从在生长培养基 (GM) 或分化培养基 (DM) 中培养的 C2C12 细胞中分离总 RNA,所述生长培养基由含有 10% 胎牛血清 (FBS) (Sigma) 和 1% 青霉素 / 链霉素 (Invitrogen, Carlsbad, California, U. S. A.) 的 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, U. S. A.) 组成,所述分化培养基由含有 2% 马血清 (Sigma) 的 DMEM (Sigma) 组成。如所述⁹ 进行微阵列杂交和数据分析。简而言之,在一次性反应室 (MJ Research, Reno, Nevada, U. S. A.; part number SLF-0601) 中,将 2.5ug 分离的 RNA 使用 RNA 连接酶用 5' - 磷酸 - 胞苷酰 - 尿苷酰 - Cy3-3' (Dharmacon, Inc., Lafayette, Colorado, U. S. A.) 标记,并与 0.5mM 用 ALEXA 647[®] (Cy5) (Molecular Probes, Eugene, Oregon, U. S. A.) 标记的针对 124 个 microRNA 的寡核苷酸探针混合物杂交。归一化的 log (以 2 为底) 数据由基因群集并绘制为热图。信号范围从 -4 倍到 +4 倍。黄色代表相对于中值的高表达,蓝色代表相对于中值的低表达。

[0250] Northern 印迹分析

[0251] 用 TRIZOL[®] 试剂 (Invitrogen) 从 C2C12 细胞、小鼠胚胎或成年组织中提取总 RNA。为进行 miRNA 的 Northern 印迹分析,施加 PEG 以除去大的 RNA。简而言之,将 30 μ g 每种总 RNA 样品与 5XPEG 溶液 1 : 1 混合并置于冰上 10 分钟。在 4°C 以最大速度离心 10 分钟后,将上清转移到新鲜试管中。然后加入 2.5 体积的 100% 乙醇沉淀 RNA 并以最大速度离心 30 分钟。如所述¹³ 进行 miRNA 的 Northern 印迹分析。用作探针的 miR-1 和 miR-133 寡核苷酸序列见表 3 所列。Northern 印迹分析被用于检测 miRNA 的一级转录物,如所述²⁶,使用来自每一样品的 20 μ g 总 RNA 进行所述分析。miR-1 和 miR-133 的基因组片段经 PCR 克隆并

用作探针。

[0252]	表 3	
[0253]	本文描述的寡核苷酸的序列	
[0254]	名称	序列
[0255]	miR-1 探针	TACATACTTCTTTACATTCCA
[0256]	miR-133 探针	ACAGCTGGTTGAAGGGACCAA
[0257]	miR-133a-1- 上	CATGTGACCCCTCACACACA
[0258]	miR-133a-1- 下	ACAAGGGGAGCCTGGATCCC
[0259]	miR-133a-2- 上	GGACATATGCCTAAACACGTGA
[0260]	miR-133a-2- 下	GAAACATCTTTATCCAGTTT
[0261]	miR-1-2- 上	AGACTGAGACACAGGCGACACC
[0262]	miR-1-2- 下	TGCCGGTCCATCGGTCCATTGC
[0263]	miR-1-1- 上	CACTGGATCCATTACTCTTC
[0264]	miR-1-1- 下	TTGGAATGGGGCTGTTAGTA
[0265]	miR-1mut- 上	TGAACATTCAGTGCTATAAAGAAGTATGTATTTTGGGTAGGTA
[0266]	miR-1mut- 下	TACCTACCCAAAATACATACTTCTTTATAGCACTGAATGTTCA
[0267]	miR-133mut- 上	AATCGCCTCTTCAATGGATTTGTCAACCAGCTGTAGCTATGCATTGAT
[0268]	miR-133mut- 下	ATCAATGCATAGCTACAGCTGGTTGACAAATCCATTGAAGAGGCGATT
[0269]	miR-1 双链体	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA
[0270]	CA	UACUUCUUUACAUUCCAUA
[0271]	miR-1-mut 双链体	UUAACCAUAAAGAAGUAUGUA
[0272]		CAUACUUCUUUUAUGGUUAAUA
[0273]	miR-133 双链体	UUGGUCCCCUUAACCAGCUGU
[0274]		AGCUGGUUGAAGGGGACCAAAU
[0275]	miR-133-mut 双链体	UCAAGUAACUUAACCAGCUGU
[0276]		AGCUGGUUGAAGUUACUUGAAU
[0277]	miR-208 双链体	AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU
[0278]		AAGCUUUUUGCUCGUCUUAUAC
[0279]	GFP 双链体	AACUUCAGGGUCAGCUUGCCUU
[0280]		GGCAAGCUGACCCUGAAGUUGG
[0281]	2' -O- 甲基 -miR-1	AAAUACAUACUUCUUUACAUUCCAUAGC
[0282]	2' -O- 甲基 -miR-133	AGCUACAGCUGGUUGAAGGGGACCAAAUCCA
[0283]	2' -O- 甲基 -miR-208	GACCAACAAGCUUUUUGCUCGUCUUAUACGUG
[0284]	2' -O- 甲基 -GFP	AAGGCAAGCUGACCCUGAAGUU
[0285]	HDAC4-UTR- 上	CAGCACTGGTGATAGACTTGG
[0286]	HDAC4-UTR- 下	CTTAAGAATAAGTTCAATAAGAC
[0287]	SRF-UTR- 上	AGATATGGGGGCTTGTGCC
[0288]	SRF-UTR- 下	CTGGGAGAAAGGGGTAGAC
[0289]	肌形成蛋白 F	TGGAGCTGTATGAGACATCCC

[0290]	肌形成蛋白 R	TGGACAATGCTCAGGGGTCCC
[0291]	MyoD F	GCAGGCTCTGCTGCGCGACC
[0292]	MyoD R	TGCAGTCGATCTCTCAAAGCACC
[0293]	骨骼 α -肌动蛋白 F	CAGAGCAAGCGAGGTATCC
[0294]	骨骼 α -肌动蛋白 R	GTCCCCAGAATCCAACACG
[0295]	MEF2D F	CAAGCTGTTCCAGTATGCCAG
[0296]	MEF2D R	AAGGGATGATGTCACCAGGG
[0297]	HDAC4 F	GAGAGAATTCTGCTAGCAATGAGCTCCCAA

[0298] miR-1 和 miR-133 的克隆和表达

[0299] 用小鼠基因组 DNA 作为模板 (PCR 引物见上表 3) 从小鼠染色体 2 和 18(ch2 和 ch18) 经 PCR 扩增 miR-1 和 miR-133 前体的基因组片段。将 PCR 产物克隆进 pcDNATM(+)3.1 载体 (Invitrogen) 并通过将表达载体转染进哺乳动物细胞 (COS7, 10T1/2 或 C2C12) 中而确定 miRNA 的表达并用 Northern 印迹分析检测。

[0300] 细胞培养、体外肌生成分化和萤光素酶报道基因测定

[0301] 如所述¹²培养 C2C12 成肌细胞并诱导肌生成。如所述^{12,26}进行瞬时萤光素酶报道基因测定。miRNA 双螺旋和针对 miR-1, miR-133, miR-208 和 GFP 的 2' -O- 甲基反义寡核苷酸购自 (序列见表 3)。用 LIPOFECTAMINETM(Invitrogen) 转染 (200nM) 或使用 AmaxaBiosystems (Gaithersburg, Maryland, U. S. A.) NUCLEOFECTOR[®]系统 (5 μ g) 的电穿孔而将它们导入哺乳动物细胞。

[0302] 为构建 3' UTR- 萤光素酶报道基因, 切下 pGL3-Control1 载体 (Promega, Madison, Wisconsin, U. S. A.) 的多克隆位点并置于萤光素酶基因的下游。小鼠 HDAC4 和 SRF 的 3' UTR 经 PCR 扩增并克隆进修饰的 pGL3- 对照载体以产生构建体 SRF-3' UTR 和 HDAC4-3' UTR (PCR 引物序列见表 3)。如所述²⁶进行萤光素酶报道基因测定。

[0303] Western 印迹和免疫染色

[0304] Western 印迹根据先前所述²⁷进行。使用下述抗体: 抗肌浆蛋白; SRF; MEF2; HDAC4; 和 β -微管蛋白 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, U. S. A.); 和磷酸组蛋白 H3 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, New York, U. S. A.)。识别横纹肌特异性 MHC 的 MF20 抗体得自 DSHB (University of Iowa, Iowa City, Iowa, U. S. A.)。

[0305] 为进行免疫染色, 12 孔板中的处理的 C2C12 细胞用 4% 甲醛在 37°C 固定 5 分钟并更换到 0.1% NP40/PBS 溶液中, 置于室温 15 分钟。第一抗体在下述浓度下在含有 3% BSA 的 0.1% NP40-PBS 中保温 2 小时: 抗肌浆蛋白 (1 : 20 稀释), 抗磷酸组蛋白 H3 (1 : 100 稀释), MF20 (1 : 10 稀释)。加入在含有 3% BSA 的 0.1% NP40-PBS 中的第二抗体萤光素抗小鼠 / 兔 (1 : 100 稀释; Vector Laboratories, Burlingame, California, U. S. A.), 置于 37°C 1 小时。加入 DAPI, 在室温保持 5 分钟。用 PBS 洗若干次后, 将细胞进行荧光显微镜观察。挑取覆盖完整孔的 10 个视野, 分别计数每孔的绿色荧光阳性细胞和用 DAPI 染色的总细胞。

[0306] RT-PCR 分析

[0307] 基本上如所述²⁷进行 RT-PCR。用 . Total RNA were extracted from C2C12 cells using TRIZOL[®]试剂 (Invitrogen) 从 C2C12 细胞提取总 RNA, 并用随机六聚体和 MMLV 逆转

录酶 (Invitrogen) 将 2.0 μ g 等份逆转录成 cDNA。对于每种情况,使用 2.5% cDNA 库进行扩增并且 PCR 进行 24-28 个循环。PCR 引物的序列可以见表 3。

[0308] Xenopus 胚胎注射和转基因

[0309] 使用标准方法获得和培养 *Xenopus laevis* 胚胎。DNA 构建体用 KpnI 线性化并 Kroll & Amaya²⁸ 描述的方法产生转基因胚胎。在 Leica MZFLIII 显微镜下分析转基因的表达。制备和用 miRNA 注射 *Xenopus* 基本上如先前所述²⁹ 进行。然而, RNA 在注射前未被加帽。如所述³⁰ 进行 whole-mount 免疫组织学分析。

[0310] 实施例 8

[0311] miR-208 是心脏特异性 miRNA,其在人类、小鼠和大鼠之间是保守的(图 14)。Northern 印迹分析揭示 miR-208 表达是发育调节的(图 15)。Northern 印迹从分阶段的小鼠组织中制备并用与 miR-208 互补的放射标记的探针探查。相对于 E13.5, E16.5 和新生儿时期的心脏,miR-208 水平在成年小鼠心脏中显著更高。miR-208 由心肌 α -肌球蛋白重链(α -MHC)基因的内含子容纳(图 14)。两种心脏肌球蛋白重链异构体之一 α -MHC 在小鼠发育过程中弱表达,但是后来变成成年小鼠心脏中的主要异构体。miR-208 和 α -MHC 均是心脏特异性的并且从相反链转录,这提示 miR-208 是由 α -MHC 内含子加工而来并且与 α -MHC 转录平行表达。

[0312] 实施例 9

[0313] 为了研究 miR-208 在心肌细胞中的体外功能,我们选择使用新生大鼠心肌细胞因为其是用于研究心脏细胞的形态学、生物化学和电生理学特征的公认的体外模型。新生心肌细胞不会丧失其在出生后的复制能力;大部分经历有丝分裂并在体外和体内增殖,其中心脏基因表达也被激活。很可能 miR-208 促进心肌细胞分化,因为相对于早期发育其在成年心脏中高表达。为了确定心脏中 miR-208 功能,这一模型系统被用于研究 miR-208 表达和抑制对心脏生成程序的作用。

[0314] 体外模型系统

[0315] 培养的心肌细胞是心脏研究中最广泛使用的实验模型之一。从小的哺乳动物制备心肌细胞相对于完整动物研究是经济的、可靠的并且能进行各种实验。由于经济和技术原因,心肌细胞最通常从新生大鼠中分离。我们经小的改动而基本上如先前所述⁸⁶ 分离了大鼠心肌细胞。

[0316] 功能性成熟 miRNA 可以使用 RNA Pol II 启动子序列介导 miRNA 前体序列加上~150 个侧翼核苷酸的转录而异位表达。所产生的 RNA 转录物由 miRNA 加工机制识别并变成能介导翻译阻抑的完全功能的 miRNA。我们经 PCR 从小鼠基因组 DNA 扩增了 miR-208 前体序列和侧翼区并将这一片段插入到腺病毒载体中产生表达 miR-208 的重组腺病毒(Ad-208)。Northern 印迹分析表明在用增加浓度的 Ad-208 感染的分离的心肌细胞中 miR-208 表达剂量依赖性增加(图 16)。这一工具可以被用于研究 miR-208 过表达对心肌细胞表型的体外作用。

[0317] 异位 miR-208 表达的分析

[0318] 使用细胞计数测定来确定 miR-208 表达的改变是否影响增殖。以低密度铺板心肌细胞并用 Ad-208 感染。尽管腺病毒已成功广泛用于心肌细胞研究中,但是具有 Ad-GFP 的细胞也可以与 Ad-208 相同的感染复数(MOI)被感染以控制由腺病毒感染导致的间

接作用。因为两种病毒均表达绿色荧光蛋白 (GFP), 因此感染效率也通过外荧光显微镜术 (epifluorescence microscopy) 而控制。

[0319] 在感染之前和在感染后 24、48、72 和 96 小时在亮视野照明下计数细胞。在每个时间点两种条件下的 10 个视野的细胞被计数。对细胞计数数据进行统计学分析。可以使用不成对 Student t 检验确定每个特定时间点每个视野的所计数的平均细胞数在 Ad-208 和 Ad-GFP 感染之间显著不同的概率, 而成对 Student t 检验可以确定每种感染所计数的平均细胞数在各个时间点之间显著不同的概率。如果任意两个平均数显著不同的概率大于和等于 95%, 则那些不同被认为是显著的。

[0320] 细胞计数测定由使用磷酸组蛋白 H3 抗体而确定有丝分裂指数和经 BrdU 掺入确定经历 DNA 合成的细胞百分比的研究而补充。固定的细胞被 TUNEL 染色以排除 miR-208 过表达导致细胞死亡的可能性。Ad-208 感染对心肌细胞增殖的潜在结果是细胞数降低、增加或无变化。不希望受理论限制, 很可能 miR-208 表达相对于对照减慢了心肌细胞增殖, 因为 miR-208 在分化的成年心肌细胞中高表达。

[0321] 已经表明一系列心脏转录因子, 包括 Nkx2.5, MEF2C, GATA4, myocardin 和 TBX5 在早期分化中的心肌细胞中表达, 使得它们成为心脏分化的早期遗传标记。心肌特异性收缩蛋白如 α -MHC, β -MHC, α -CA, 和 MLV2V 是心肌细胞的终末分化标记。这些心脏基因中的一些在发育过程中被差异调节。例如, β -MHC 在胚胎心脏中高表达, 但是在新生后变得下调, 而 α -MHC 具有相反的表达模式。为了确定 miR-208 是否具有调节心脏基因表达的作用, 检查了异位 miR-208 表达对新生大鼠心肌细胞中的心脏标记基因表达的作用。不希望受理论限制, 预期 miR-208 表达会降低胎儿基因表达和 / 或促进成年心脏基因的表达。

[0322] 使用半定量逆转录酶-PCR (RT-PCR) 方法, 分析了各种心脏标记基因在 Ad-208 vs. Ad-GFP 感染的新生大鼠心肌细胞中的相对 mRNA 转录物水平。从分离自感染的心肌细胞的 RNA 经常规技术制备 cDNA 文库。在几乎所有组织中高表达的 GAPDH 被扩增并被用于归一化 cDNA 水平。所有 PCR 引物系列设计用于扩增跨越一或多个内含子的产物, 如果存在 DNA 污染其会产生更大的 PCR 扩增产物。另外, 使用市售抗体经 Western 印迹分析检查各种心脏标记的蛋白质表达水平以确定蛋白质表达中检测到的任何变化是否与 mRNA 转录物水平中的变化一致。

[0323] 除了研究 miR-208 对心脏基因表达的作用之外, 还确定了对各种心脏蛋白质 (包括转录因子和结构成分) 的定位的任何作用。对 Ad-208 感染的心肌细胞的观察提示这些细胞显示与 Ad-GFP 感染的心肌细胞不同的形态学 (图 16b)。Ad-208 感染的心肌细胞相对于其 Ad-GFP 感染的对应物似乎更“圆 (rounded)”。

[0324] 将 Ad-208 和 Ad-GFP 感染的心肌细胞固定在盖玻片上, 用核实的第一抗体和第二抗体探查, 进行核染色, 并通过显微镜分析所述玻片。

[0325] 失活 miR-208

[0326] 与 miR-208 过表达研究并行, 使用与 miR-208 反义的 2'-O-甲基寡核苷酸研究了 miR-208 抑制的作用。2'-O-甲基寡核苷酸是序列特异性的且是以化学计量方式不可逆的 miRNA 功能抑制剂。这个 miRNA 抑制系统适合心肌细胞。将反义 miR-208 2'-O-甲基寡核苷酸或者作为对照的随机 2'-O-甲基寡核苷酸通过阳离子脂质试剂或者通过电穿孔转染进心肌细胞中。具有直接附着于萤光素酶基因 3' 末端的反义 miR-208 序列的报道基因

构建体 (luc-miR-208- 感应器) 用作对照, 并检测所述系统阻断 miR-208 功能的效力。如 miR-208 过表达研究所 述, 对 mRNA 和蛋白质水平以及蛋白质定位进行研究。

[0327] 实施例 10

[0328] miR-208 在胚胎心脏中微弱表达, 且其表达在成体心脏中显著增加。这个实施例分析了 miR-208 在发育中的心脏中还是在成体心脏中的基因调节功能更重要。在发育期间, 有人主张 miR-208 可能不重要, 因为其在胚胎中微弱表达。与该主张相反, 适量的 miR-208 对于调节发育期间的某些遗传途径是关键的。另外, 在发育期间比在成体阶段微弱表达的宿主基因 α -MHC 敲除的小鼠, 遭受胚胎致死性, 但是还未知 miR-208 的表达在这些动物中是否受影响⁸⁷。在成体心脏中检测到的 miR-208 高水平表达可表示其在晚期发育中的最重要功能。为了对这些观点加以分类, 开发了两个小鼠模型以研究 miR-208 功能: miR-208 敲除小鼠和条件化过表达 miR-208 的转基因小鼠。

[0329] miR-208 敲除小鼠设计

[0330] 设计并产生对于 miR-208 无功能的小鼠, 不影响其宿主基因 α -MHC 的表达。产生胚胎干细胞衍生的 miR-208 敲除小鼠是一种三阶段方法: 产生靶载体; 通过同源重组向胚胎干细胞中导入 DNA 序列; 产生遗传修饰的衍生自胚胎干细胞的小鼠。基于其种子区内的序列同源性, 将相关 miRNA 分属不同家族。这些家族也许过剩地调节相同基因的表达, 潜在地使得对其在体内的功能进行的遗传分析复杂化。miR-208 的种子区在系统树中与其它已知的 miRNA 不聚类, 使得 miR-208 是一种合适的 miRNA 敲除候选物。

[0331] 使用称作重组工程 (recombineering) 策略构建 miR-208 靶向构建体, 这种策略利用线性 DNA 片段和环状质粒之间的同源重组^{88,89}。所述环状质粒可含有 miR-208 位于其中的 α -MHC 基因的 6-7kb 片段。所述线性 DNA 片段含有两个同源臂, 用来用 floxed 选择盒置换 22nt miR-208 序列。将用所述环状质粒转化的细菌用所述线性 DNA 片段电穿孔, 随后由所述线性片段编码的抗性选择重组集落。所得构建体 用于通过同源重组靶向 ES 细胞。一旦使用基于 PCR 的筛选或者 Southern 印迹鉴别了杂合 ES 细胞, 通过胚泡注射将其用于产生嵌合体。目前揭示的敲除设计仅留下 α -MHC 的内含子内的外源 DNA 的很少的足迹, 并帮助确保 α -MHC 转录或者 α -MHC mRNA 剪接模式保持不受影响。

[0332] 传统转基因小鼠设计

[0333] 传统的基因策略如图 17 所示。传统的转基因方法是由两个转基因组成的二元系统。一个转基因编码 miR-208 (tet208), 另一个转基因编码反式激活物 (tTA), 其通过结合其启动子内的调节序列而激活 miR-208 转基因。当存在强力霉素 (DOX) 时, tTA 结合被抑制 (即 tet-off), 因此可以通过 DOX 处理调节 miR-208 转基因。

[0334] 确立 miR-208 转基因纯合的小鼠群落。将 tet208 小鼠与具有 tTA 转基因的转基因小鼠交配, 产生双重转基因小鼠以进行研究。采用 Mendelian 遗传学, 4 个后代中有 1 个是双重转基因的, 且表达 miR-208, 在此 tTA 被表达。利用 α -MHC 启动子指导 tTA 表达。 α -MHC 启动子已经充分鉴定, 足以在早期发育中正确指导组织特异性表达⁹⁰。使用 α -MHC 启动子在双重转基因动物中表达 tTA 将增加与内源 miR-208 相同组织中的 miR-208 剂量, 因为内源 miR-208 通常源自 α -MHC 基因内的内含子。使用小鼠 α -MHC

启动子指导 tTA 表达的转基因小鼠品系已经存在并成功应用^{91,92}。tet208 转基因小鼠品系使得我们可以研究 miR-208 表达在发育的胚胎或成体小鼠心脏中的独立剂量作用。典型地,常规的转基因建立者中的早期胚胎致死性会严重限制可用于研究的发育阻抑胚胎数并阻碍表型分析。使用传统的策略,我们能延缓双重转基因小鼠中的 miR-208 转基因表达,如果早期 miR-208 过表达证实是致死性的。

[0335] 分析

[0336] 根据表现出的表型进行特异性分析。通常地,可以使用组织学和生物化学方法鉴定发育中的胚胎和 / 或成体中潜在的表型。检查心脏 的总异常性并制成切片进行组织学分析,以鉴别潜在的更微细的发育缺陷。缺陷的可能性是无数的,且可以包括从缺陷的膈形成直至增厚的心房的任何事件。同样可能的是表型可以是收缩性缺陷,可以通过电生理学研究鉴定。

[0337] 实施例 11

[0338] 对 miR-208 的直接分子靶的鉴别促进了对于其生物学功能的了解。靶预测用于补充在体外和体内小鼠模型进行的 miR-208 的功能研究的观测结果。

[0339] 不希望受到理论的限制,推测 *Thrap1* 表达由 miR-208 调节。*Thrap1* 的 3'UTR 含有两个预测的 miR-208 结合位点(图 18)。这两个靶位位于 *Thrap1* 终止密码子下游~80bp,并且彼此间隔仅~50bp。这两个靶均与 miR-208 的种子区完全互补。*Thrap1* 基因编码遍在表达的 TRAP(甲状腺激素受体蛋白)复合物的一个 240kd 亚基⁹³。TRAP 是一种多亚基蛋白质复合物,是核受体的共激活物。TRAP 最初被鉴定为甲状腺激素核受体⁹⁴。*Thrap1* 未被鉴定,但是在其它 TRAP 亚基中的缺陷已经示出影响核受体信号化。小鼠中 TRAP220 基因的消除使得心脏和神经系统发育受损,而 TRAP230 和 TRAP240 的果蝇(*Drosophila*)同系物是正确的眼-触角盘(eye-antennal disc)发育所必需^{95,96}。与 *Thrap1* 高度相似的基因(称作 *Thrap2*)中的突变,在先天性心脏缺陷-大动脉换位(Transposition of the Great Arteries)患者中发现⁹⁷。因此,TRAP 家族成员对于正确发育是重要的。特别感兴趣的是 *Thrap1* 是 miR-208 的靶位,因为已知甲状腺激素对于心肌收缩性发挥重要作用。

[0340] 甲状腺激素与心肌肌球蛋白异构体变换相关联。在心肌细胞中,甲状腺激素导致 α -MHC mRNA 快速累积,同时抑制 β -MHC 表达^{98,99}。一些正向作用甲状腺应答因子(TRE)位于 α -MHC 启动子内,已经鉴别了 β -MHC 启动子内的负向作用 half-TRE^{100,101}。 α -MHC 和 β -MHC 基因串联排列在染色体 14 上,其编码两种心肌肌球蛋白重链异构体,以不同速度将 ATP 转变为机械功,且其蛋白质表达比率影响心肌肌节的收缩性; α -MHC 是“快速的”,而 β -MHC 是“慢速的”。其表达受发育调节。在小鼠和大鼠中, β -MHC 在后期胎儿生命中占优势,但是在出生后不久 α -MHC 成为主要的成体心肌异构体。这种转变很可能由出生后不久发生的循环中的甲状腺激素高涨导致⁹⁸。在较大的哺乳动物如兔和人中, β -MHC 是主要的成体心肌异构体。然而, α -MHC 和 β -MHC 基因的启动子在小鼠与人之间是高度保守的,提示它们被相似调节。鉴于 miR-208 源自 α -MHC 内含子,不受理论的限制,很可能 miR-208 作为负反馈回路中甲状腺激素信号化的组织特异性抑制剂,通过靶向 TRAP 复合物的一种成分而调节心肌肌球蛋白重链异构体的比率(图 19)。

[0341] 最初的筛选策略是查询 miR-208 的过表达是否负调节在 3'UTR 中具有推定靶位点

的报道基因的表达。我们将 Thrap1 3' UTR 直接插入到组成型表达的萤光素酶报道基因的编码序列后面。结果提示 miR-208 靶向 Thrap1 UTR(图 18)。为了证实这种观测结果,我们单独及组合突变了 Thrap1 UTR 内的两个推定靶位点的种子区。可以对突变的多核苷酸进行检测,以确定其是否可以减轻 miR-208 介导的抑制。

[0342] 先前的研究已经证实甲状腺激素经转录激活心肌细胞中 α -MHC 链的表达并抑制 β -MHC 表达^{98,99,102}。用 Ad-208 感染心肌细胞,通过监测 α -MHC 和 β -MHC 的转录物和蛋白质水平以确定 miR-208 表达是否抑制甲状腺激素信号化。miR-208 对于 α -MHC 表达的抑制间接支持了我们的假说,即 miR-208 靶向甲状腺激素信号化途径的一种成分。

[0343] 为了进一步证实预测的靶位,可以确定 miR-208 表达是否降低 miR-208 敲除小鼠和 miR-208 转基因小鼠模型心脏中 mRNA 或蛋白质水平。应用靶向蛋白质的特异性抗体。人 Thrap1 可商购。如果在小鼠研究中无效,则开发小鼠 Thrap1- 特异性抗体。

[0344] miR-208 的其它候选靶位

[0345] 除了 Thrap1 之外,我们将四个其它感兴趣的 miR-208 推定靶的 3' UTR 直接克隆萤光素酶基因,以进行报道基因研究。所述 3' UTR 来自 SP3(Sp3 反式作用转录因子 3)、EYA4(眼缺失同系物(eyes absent homolog)4)、CSNK2A2(酪蛋白激酶 2, alpha prime polypeptide) 和 TTN(Titin)。

[0346] SP3 蛋白质的表达模式与 miR-208 表达模式相反;SP3 是与含有 GC 盒的多种启动子相互作用的转录因子^{103,104,105}。SP3 蛋白质易于在小鼠胚胎心脏中检测到,但是在成年小鼠心脏中几乎不能检测到。SP3 与 miR-208 的相反表达模式证实 miR-208 调节 SP3 翻译。

[0347] EYA4 是 miR-208 的一种感兴趣的潜在靶,确定其与人体心脏病理学相关联。已经鉴别了人 EYA4 中导致扩张型心肌病及相关的心功能衰竭的突变^{106,107}。EYA4 是一种转录共激活物,其与 sine-oculis 家族成员(Six1-Six6)和 Dach 转录因子相互作用,导致基因激活^{108,109}。人 EYA4 中突变的鉴定通过在斑马中进行的研究得到支持,弱化的 EYA4 水平产生心功能衰竭的形态学和血液动力学特征¹⁰⁶。目前,未鉴别出 EYA4 潜在的下流心肌细胞基因。

[0348] CSNK2A2 是一种广泛表达的蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶,参与 DNA 复制、调节基础和可诱导的转录、翻译及控制代谢^{110,111}。我们对于 CSNK2A2 在调节多种遗传途径中的潜力感兴趣。

[0349] 与 EYA4 相似,根据确定的与心血管功能和病理学的相关性,TTN 也是令人感兴趣的 miR-208 候选靶。TTN 是一种在心肌和骨骼肌组织中均表达的大肌节蛋白质,且对于肌节装配和力传递(forcetransmission)很重要¹¹²。TTN 中的突变与肥厚型和扩张型心肌病相关联。推测 TTN 为心肌和骨骼肌功能所必需,我们怀疑 miR-208 强调节 TTN 表达,但是可能的是一种肌节基因(即 α -MHC),可以调整另一基因(即 TTN)的表达,以调节心肌细胞的收缩性质。

[0350] 通过报道基因测定检测预测的靶基因的 3' UTR,以确定其是否授予 miR-208-介导的抑制。候选基因通过突变预测的靶位点并检测 miR-208 抑制是否被消除而进行进一步鉴定。在对候选靶位点进行初始的报道基因筛选之后,使用心肌细胞基于在转录和蛋白质水平候选基因表达分析 miR-208 过表达在体外作用。在体内使用我们的 miR-208 敲除及可诱

导的转基因小鼠模型在体内研究核实的靶的生物学相关性。潜在的 miR-208 靶在体外和体内的分析可以证实靶预测并证实其生物学相关性,以了解 miR-208 在心脏中的调节的遗传途径。

[0351] 实施例 12

[0352] 骨骼肌在一生中反复损伤和修复。肌组织的再生维持老化期间的运动功能并延缓神经肌肉疾病如迪谢内 (Duchenne) 肌营养不良症的临床症状的出现。这种组织修复能力是由位于成熟肌纤维的基底层与肌膜之间的称作卫星细胞的干细胞样细胞的亚类赋予的。在损伤时,卫星细胞重新进入细胞周期、增殖,然后退出细胞周期以更新静态卫星细胞或者分化为成熟肌纤维。细胞增殖和分化程序均是所必需的。

[0353] 本发明提供了证实 miRNA 应答肌细胞增殖和分化的数据。

[0354] 方法:

[0355] 根据 Yan et al.¹¹⁴ 所述,将心脏毒素注射进 6 周龄的雄性 C57BL/6 小鼠胫骨前肌 (TA) 中。在注射 3 天后收获所述肌组织。未注射的 TA 肌组织用作对照。从 TA 肌组织中提取总 RNA,并将其 5 μ g 用于进行 microRNA 微阵列分析。

[0356] 结果:

[0357] 图 20A 和 20B 示出来自注射 (损伤组) 或未注射 (对照组) 心脏毒素的胫骨前肌 (TA) 的 miRNA 阵列表达数据。归一化 log (以 2 为底) 数据根据基因而分级聚类,并绘制为热图。信号范围是 -4 倍至 +4 倍。淡阴影表示相对于中值的高水平表达,浓阴影表示相对于中值的低水平表达。图 20A 示出在损伤的肌组织中负调节的 miRNA,图 20B 示出在损伤的肌组织中上调的 miRNA。

[0358] 实施例 13

[0359] 骨骼肌卫星细胞是位于成熟的多核肌纤维的质膜与周围的基底层之间的一组小单核细胞。长期以来认为卫星细胞是成熟骨骼肌的前体细胞。最近的研究支持了这样的观点,即卫星细胞是异源的且具有干细胞样潜力。将这些细胞维持在静态,但是一旦激活,其将大量增殖形成成肌细胞群,进行分化和再生或修复肌组织。

[0360] 目前正在开始揭示在正常条件下将卫星细胞维持在其失活静态以及其如何应答肌损伤而变成活性状态以促进肌细胞再生的遗传途径和分子机制。Pax3 和 Pax7 是成对的盒 (box) / 同源结构域转录因子家族成员,已经表明它们在介导卫星细胞相关的骨骼肌再生过程中起重要且不同的作用。然而,还不太清楚在卫星细胞维持和激活期间怎样调节 Pax 蛋白的表达。令人感兴趣地,Pax3 和 Pax7 的表达在分化中的成肌细胞中被负调节。更重要地,Pax3 或 Pax7 在 C2C12 成肌细胞中的异位过表达阻断其分化。这些观测结果提示卫星细胞的静止和自我更新状态以及成肌细胞增殖和分化是在转录和转录后的严密控制下。

[0361] 另外,脑衍生的神经营养因子 (BDNF) 在骨骼肌卫星细胞中表达,并抑制肌原性分化。先前发现且现在在本发明中揭示了 Pax7 和 BDNF 均是推定的 miR-1/206 调节性靶,提示 miR-1/206 在骨骼肌卫星细胞调节中起重要作用。

[0362] 在卫星细胞中建立 miRNA 过表达和检测系统

[0363] 为了在卫星细胞中异位有效过表达 miRNA,调试一种基于逆转录病毒的过表达系统。miR-1 和 miR-206 的侧翼基因组序列 (大约 300-400bp) 两侧具有鼠干细胞病毒 (MSCV) - 衍生的逆转录病毒载体内剪接供体 (SD) 和剪接受体 (SA),其中绿色荧光蛋白

(GFP) 编码序列位于 miRNA-SDSA 序列的下游。以这种方式, miR-1/206 和 GFP 将同时表达, 且 GFP 的表达作为 miR-1/206 表达的极佳指征 (图 23)。

[0364] 为了监测 miRNA 在卫星细胞中的表达和抑制作用, 我们制成了“miRNA 感应器”, 其中 dsRed 基因的表达在组成型活性 CMV 启动子的转录控制下。将 miR-1/206 的互补序列与 dsRed 报道基因的 3' 末端连接并插入 MSCV- 衍生的逆转录载体中, 由此功能性 miRNA 将抑制 dsRed 蛋白的翻译 (图 22)。使用这个系统, 我们可以精确地检测 miRNA 在卫星细胞中的表达和抑制作用, 这样为我们提供了进一步研究 miRNA 在骨骼肌中的功能的有力工具。

[0365] Pax7 和 BDNF 是卫星细胞中 miR-1/206 的调节靶

[0366] 我们发现 Pax7 和 BDNF 基因在其 3'UTR 中含有高度保守的 miR-1/206 靶位点 (图 24、25、26)。我们将这些 3'UTR 序列克隆进萤光素酶报道基因中, 并检测其是否被 miRNA 抑制。如图 24 所示, miR-1 和 miR-206 均强力抑制这些报道基因。当保守的 miRNA 结合序列被突变时, miRNA 介导的抑制被消除, 表示所述抑制的特异性。这些资料提示 miR-1/206 通过抑制重要的靶基因而可以控制肌细胞和 / 或其前体细胞的增殖和分化。

[0367] 从单个骨骼肌纤维中分离卫星细胞

[0368] 卫星细胞是应答出生后生长和再生的成熟骨骼肌祖细胞。不希望受理论的限制, 我们推测 miRNA 也是卫星细胞的调节物。为了检测这个假说, 我们开始从新生的或成年小鼠的后足或膈的骨骼肌中分离卫星细胞。我们能从单肌纤维中分离卫星细胞, 产生纯的卫星细胞群并提供重复的结果。当培养基中包含 bFGF 时, 这些卫星细胞可以维持在未分化状态, 可以检测 Pax7 及其它卫星细胞标记的表达。然而, 当除去生长因子 bFGF 时, 它们可被诱导分化为成肌细胞和肌管, 在体外精确地模拟骨骼肌分化过程 (图 28)。

[0369] miR-1/206 抑制卫星细胞的增殖

[0370] 为了解释 miR-1/206 在骨骼肌祖细胞中的功能, 将分离自成年小鼠的单肌纤维的卫星细胞铺板于 24 孔组织培养板上, 使用基于 SDSA 载体的逆转录病毒将 miR-1/206 导入所述细胞中。以如下几种方式监测异位表达的 miRNA 的表达和活性: 应用 Northern 印迹分析检测和定量测量 miR-1 的表达。也使用其中的互补序列在 dsRed 报道基因的 3' 末端被克隆的“感应器”报道基因监测 miR-1/206 的活性。

[0371] 为了进行增殖测定, 将卫星细胞培养物在收获之前 1 小时用 BrdU 标记。然后将细胞固定并通过计数 BrdU 阳性染色的细胞测量增殖的细胞。如图 27 所示, 卫星细胞中 miR-1/206 的过表达抑制其增殖。

[0372] miR-1/206 增强卫星细胞的分化

[0373] 为了进行分化动力学分析, 将单肌纤维的卫星细胞铺板于胶原包被的 24 孔平板中的 DMEM 加上 20% FBS 和 10ng/ml 的 bFGF 中。细胞铺板密度为大约 5×10^3 细胞 / cm^2 , 并用 miR-1/206 逆转录病毒或对照的逆转录病毒感染。一旦从培养基中除去 bFGF, 则卫星细胞自发退出细胞周期并分化。如图 28 和 29 所示, miR-1/206 的过表达增强卫星细胞的分化并促进其分化动力学。

[0374] 总之, 本发明实施例中阐述的资料表明 miR-1 和 miR-206 在控制骨骼肌卫星细胞增殖和分化过程中起重要作用。本发明提供了卫星细胞在骨骼肌再生和修复过程中的关键作用, 不希望受理论的限制, 这提示 miR-1、miR-206 和 miR-133 对于骨骼肌再生是重要的 (图 30)。

[0375] 参考文献

[0376] 下文列出的以及本说明书中引用的所有参考文献均以其全部内容并入本文作参考,提供了本发明应用的技术和 / 或组合物的背景或教导方法学。

[0377] 1. Bartel, D. P. MicroRNAs :genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 116, 281-97 (2004).

[0378] 2. Ambros, V. The functions of animal microRNAs. Nature 431, 350-5 (2004).

[0379] 3. Lee, R. C. , Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell 75, 843-54 (1993).

[0380] 4. Wightman, B. , Ha, I. & Ruvkun, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. Cell 75, 855-62 (1993).

[0381] 5. Chen, C. Z. , Li, L, Lodish, H. F. & Bartel, D. P. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. Science 303, 83-6 (2004).

[0382] 6. He, L. et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. Nature 435, 828-33 (2005).

[0383] 7. Giraldez, A. J. et al. MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. Science 308, 833-8 (2005).

[0384] 8. Zhao, Y. , Samal, E. & Srivastava, D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. Nature 436, 214-20 (2005).

[0385] 9. Thomson, J. M. , Parker, J. , Perou, C. M. & Hammond, S. M. A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression. Nat Methods 1, 47-53 (2004).

[0386] 10. Blau, H. M. et al. Plasticity of the differentiated state. Science 230, 758-66 (1985).

[0387] 11. Soulez, M. et al. Growth and differentiation of C2 myogenic cells are dependent on serum response factor. Mol Cell Biol 16, 6065-74 (1996).

[0388] 12. Lu, J. , McKinsey, T. A. , Zhang, C. L. & Olson, E. N. Regulation of skeletal myogenesis by association of the MEF2 transcription factor with class II histone deacetylases. Mol Cell 6, 233-44 (2000).

[0389] 13. Lee, R. C. & Ambros, V. An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans. Science 294, 862-4 (2001).

[0390] 14. Lagos-Quintana, M. et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. Curr Biol 12, 735-9 (2002).

[0391] 15. Sempere, L. F. et al. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. Genome Biol 5, R13 (2004).

[0392] 16. Wienholds, E. et al. MicroRNA expression in zebrafish embryonic

development. *Science* 309, 310–1 (2005).

[0393] 17. Mansfield, J. H. et al. Micro RNA-responsive 'sensor' transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression. *Nat Genet* 36, 1079–83 (2004).

[0394] 18. Hutvagner, G., Simard, M. J., Mello, C. C. & Zamore, P. D. Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol* 2, E98 (2004).

[0395] 19. Meister, G., Landthaler, M., Dorsett, Y. & Tuschl, T. Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *Rna* 10, 544–50 (2004).

[0396] 20. Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P. & Burge, C. B. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115, 787–98 (2003).

[0397] 21. Kiriakidou, M. et al. A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. *Genes Dev* 18, 1165–78 (2004).

[0398] 22. Krek, A. et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 37, 495–500 (2005).

[0399] 23. McKinsey, T. A., Zhang, C. L., Lu, J. & Olson, E. N. Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature* 408, 106–11 (2000).

[0400] 24. Wang, D. et al. Regulation of cardiac growth and development by SRF and its cofactors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 67, 97–105 (2002).

[0401] 25. Li, S. et al. Requirement for serum response factor for skeletal muscle growth and maturation revealed by tissue-specific gene deletion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1082–7 (2005).

[0402] 26. Wang, D. et al. Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell* 105, 851–62 (2001).

[0403] 27. Cao, D. et al. Modulation of smooth muscle gene expression by association of histone acetyltransferases and deacetylases with myocardin. *Mol Cell Biol* 25, 364–76 (2005).

[0404] 28. Kroll, K. L. & Amaya, E. Transgenic *Xenopus* embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation. *Development* 122, 3173–83 (1996).

[0405] 29. Conlon, F. L., Sedgwick, S. G., Weston, K. M. & Smith, J. C. Inhibition of *Xbra* transcription activation causes defects in mesodermal patterning and reveals autoregulation of *Xbra* in dorsal mesoderm. *Development* 122, 2427–35 (1996).

[0406] 30. Brown, D. D. et al. *Tbx5* and *Tbx20* act synergistically to control vertebrate heart morphogenesis. *Development* 132, 553–63 (2005).

[0407] 31. Freier et al. (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83 :9373–9377.

[0408] 32. Turner et al. (1987) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* LII :123–133.

[0409] 33. Smith & Waterman (1981) *Adv Appl Math* 2 :482–489.

- [0410] 34. Needleman & Wunsch(1970) *J Mol Biol* 48 :443-453.
- [0411] 35. Pearson & Lipman(1988) *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 :2444-2448.
- [0412] 36. Ausubel et al., eds(1989) Current Protocols in Molecular Biology. Wiley, New York, New York, United States of America.
- [0413] 37. Altschul et al. (1990) *J Mol Biol* 215 :403-410.
- [0414] 38. Henikoff & Henikoff(1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 :10915- 10919.
- [0415] 39. Karlin & Altschul(1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 :5873-5877.
- [0416] 40. Sambrook & Russell(2001) Molecular Cloning:A Laboratory Manual, 3rd ed. ColdSpring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- [0417] 41. Agrawal S(ed.) Methods in Molecular Biology, volume 20, Humana Press, Totowa, New Jersey, United States of America.
- [0418] 42. Tijssen(1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology -Hybridization with Nucleic Acid Probes. Elsevier, New York, United States of America.
- [0419] 43. Tibanyenda et al. (1984) *Eur J Biochem* 139 :19-27.
- [0420] 44. Ebel et al. (1992) *Biochem* 31 :12083-12086.
- [0421] 45. Goeddel(1990) *Gene Expression Technology. Methods in Enzymology*, Volume185, Academic Press, San Diego, California, United States of America.
- [0422] 46. Silhavy(1984) Experiments with Gene Fusions. Cold Spring Harbor Laboratory, ColdSpring Harbor, New York, United States of America.
- [0423] 47. Glover & Hames(1995) DNA Cloning;A Practical Approach, 2nd ed. IRL Press atOxford University Press, Oxford ;New York.
- [0424] 48. Adelman et al. (1983) *DNA* 2 :183-193.
- [0425] 49. Lee, R. C. , Feinbaum, R. L. , and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75,843-854.
- [0426] 50. Wightman, B. , Ha, I. , and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of theheterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75,855-862.
- [0427] 51. Lee, Y. , Kim, M. , Han, J. , Yeom, K. H. , Lee, S. , Baek, S. H. , and Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J* 23, 4051-4060.
- [0428] 52. Bracht, J. , Hunter, S. , Eachus, R. , Weeks, P. , and Pasquinelli, A. E. (2004). Trans-splicing and polyadenylation of *let-7* microRNA primary transcripts. *Rna* 10, 1586-1594.
- [0429] 53. Rodriguez, A. , Griffiths-Jones, S. , Ashurst, J. L. , and Bradley, A. (2004). Identificationofmammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14, 1902-1910.
- [0430] 54. Lee, Y. , Ahn, C. , Han, J. , Choi, H. , Kim, J. , Yim, J. , Lee, J. , Provost, P. ,

Radmark, O. , Kim, S. , and Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425,415-419.

[0431] 55. Basyuk, E. , Suavet, F. , Doglio, A. , Bordonne, R. , and Bertrand, E. (2003). Human let-7stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Res* 31,6593-6597.

[0432] 56. Lund, E. , Guttinger, S. , Calado, A. , Dahlberg, J. E. , and Kutay, U. (2004). Nuclearexport of microRNA precursors. *Science* 303,95-98.

[0433] 57. Yi, R. , Qin, Y. , Macara, I. G. , and Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclearexport of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17, 3011-3016.

[0434] 58. Yi, R. , Doehle, B. P. , Qin, Y. , Macara, I. G. , and Cullen, B. R. (2005). Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs. *Rna* 11,220-226.

[0435] 59. Bohnsack, M. T. , Czaplinski, K. , and Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna* 10,185-191.

[0436] 60. Gwizdek, C. , Ossareh-Nazari, B. , Brownawell, A. M. , Evers, S. , Macara, I. G. , and Dargemont, C. (2004). Mini-helix-containing RNAs mediate exportin-5-dependent nuclear export of the double-stranded RNA-binding protein ILF3. *J Biol Chem* 279, 884-891.

[0437] 61. Grishok, A. , Pasquinelli, A. E. , Conte, D. , Li, N. , Parrish, S. , Ha, I. , Baillie, D. L. , Fire, A. , Ruvkun, G. , and Mello, C. C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106,23-34.

[0438] 62. Hutvagner, G. , McLachlan, J. , Pasquinelli, A. E. , Balint, E. , Tuschl, T. , and Zamore, P. D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293,834-838.

[0439] 63. Ketting, R. F. , Fischer, S. E. , Bernstein, E. , Sijen, T. , Hannon, G. J. , and Plasterk, R. H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 15,2654-2659.

[0440] 64. Schwarz, D. S. , Hutvagner, G. , Du, T. , Xu, Z. , Aronin, N. , and Zamore, P. D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199-208.

[0441] 65. Khvorova, A. , Reynolds, A. , and Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115,209-216.

[0442] 66. Pillai, R. S. , Artus, C. G. , and Filipowicz, W. (2004). Tethering of human go proteins to miRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *Rna* 10,1518-1525.

[0443] 67. Doench, J. G. , and Sharp, P. A. (2004). Specificity of microRNA target

selection intranlational repression. *Genes Dev* 18,504–5 11.

[0444] 68. Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs :genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116,281–297.

[0445] 69. Bernstein, E. , Kim, S. Y. , Carmell, M. A. , Murchison, E. P. , Alcorn, H. , Li, M. Z. , Mills, A. A. , Elledge, S. J. , Anderson, K. V. , and Hannon, G. J. (2003). Dicer is essential for mousedevlopment. *Nat Genet* 35,215–217.

[0446] 70. Harfe, B. D. , McManus, M. T. , Mansfield, J. H. , Hornstein, E. , and Tabin, C. J. (2005). The RNaseIII enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

[0447] 71. Giraldez, A. J. , Cinalli, R. M. , Glasner, M. E. , Enright, A. J. , Thomson, J. M. , Baskerville, S. , Hammond, S. M. , Bartel, D. P. , and Schier, A. F. (2005). MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebraftsh. *Science* 308,833–838.

[0448] 72. Poy, M. N. , Eliasson, L. , Krutzfeldt, J. , Kuwajima, S. , Ma, X. , Macdonald, P. E. , Pfeffer, S. , Tuschl, T. , Rajewsky, N. , Rorsman, P. , and Stoffel, M. (2004). A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 432, 226–230.

[0449] 73. Esau, C. , Kang, X. , Peralta, E. , Hanson, E. , Marcusson, E. G. , Ravichandran, L. V. , Sun, Y. , Koo, S. , Perera, R. J. , Jain, R. , et al. (2004). MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 279,52361–52365.

[0450] 74. He, L. , Thomson, J. M. , Hemann, M. T. , Hernando-Monge, E. , Mu, D. , Goodson, S. , Powers, S. , Cordon-Cardo, C. , Lowe, S. W. , Hannon, G. J. , and Hammond, S. M. (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435,828–833.

[0451] 75. Chen, C. Z. , Li, L. , Lodish, H. F. , and Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303,83–86.

[0452] 76. Johnston, R. J. , and Hobert, O. (2003). A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 426,845–849.

[0453] 77. Chang, S. , Johnston, R. J. , Jr. , Frokjaer-Jensen, C. , Lockery, S. , and Hobert, O. (2004). MicroRNAs act sequentially and asymmetrically to control chemosensory laterality in the nematode. *Nature* 430,785–789.

[0454] 78. Yekta, S. , Shih, I. H. , and Bartel, D. P. (2004). MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 304,594–596.

[0455] 79. Mansfield, J. H. , Harfe, B. D. , Nissen, R. , Obenaus, J. , Srineel, J. , Chaudhuri, A. , Farzan-Kashani, R. , Zuker, M. , Pasquinelli, A. E. , Ruvkun, G. , et al. (2004). MicroRNA-responsive ' sensor ' transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression. *Nat Genet* 36,1079–1083.

[0456] 80. Zhao, Y. , Samal, E. , and Srivastava, D. (2005). Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 436,214–220.

- [0457] 81. Lewis, B. P. , Shih, I. H. , Jones-Rhoades, M. W. , Bartel, D. P. , and Burge, C. B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115,787-798.
- [0458] 82. John, B. , Enright, A. J. , Aravin, A. , Tuschl, T. , Sander, C. , and Marks, D. S. (2004). Human MicroRNA targets. *PLoS Biol* 2, e363.
- [0459] 83. Kiriakidou, M. , Nelson, P. T. , Kouranov, A. , Fitziev, P. , Bouyioukos, C. , Mourelatos, Z. , and Hatzigeorgiou, A. (2004). A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. *Genes Dev* 18,1165-1178.
- [0460] 84. Krek, A. , Grun, D. , Poy, M. N. , Wolf, R. , Rosenberg, L. , Epstein, E. J. , MacMenamin, P. , da Piedade, I. , Gunsalus, K. C. , Stoffel, M. , and Rajewsky, N. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 37,495-500.
- [0461] 85. Rajewsky, N. , and Socci, N. D. (2004). Computational identification of microRNA targets. *Dev Biol* 267,529-535.
- [0462] 86. Nicol, R. L. , Frey, N. , Pearson, G. , Cobb, M. , Richardson, J. , and Olson, E. N. (2001). Activated MEK5 induces serial assembly of sarcomeres and eccentric cardiac hypertrophy. *Embo J* 20,2757-2767.
- [0463] 87. Jones, W. K. , Grupp, I. L. , Doetschman, T. , Grupp, G. , Osinska, H. , Hewett, T. E. , Boivin, G. , Gulick, J. , Ng, W. A. , and Robbins, J. (1996). Ablation of the murine alpha myosin heavy chain gene leads to dosage effects and functional deficits in the heart. *J Clin Invest* 98,1906-1917.
- [0464] 88. Liu, P. , Jenkins, N. A. , and Copeland, N. G. (2003). A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome Res* 13,476-484.
- [0465] 89. Cotta-de-Almeida, V. , Schonhoff, S. , Shibata, T. , Leiter, A. , and Snapper, S. B. (2003). A new method for rapidly generating gene-targeting vectors by engineering BACs through homologous recombination in bacteria. *Genome Res* 13, 2190-2194.
- [0466] 90. Subramaniam, A. , Jones, W. K. , Gulick, J. , Wert, S. , Neumann, J. , and Robbins, J. (1991). Tissue-specific regulation of the alpha-myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice. *J Biol Chem* 266,24613-24620.
- [0467] 91. Sanbe, A. , Gulick, J. , Hanks, M. C. , Liang, Q. , Osinska, H. , and Robbins, J. (2003). Reengineering inducible cardiac-specific transgenesis with an attenuated myosin heavy chain promoter. *Circ Res* 92,609-616.
- [0468] 92. Czubryt, M. P. , McAnally, J. , Fishman, G. I. , and Olson, E. N. (2003). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100,1711-1716.
- [0469] 93. Ito, M. , Yuan, C. X. , Malik, S. , Gu, W. , Fondell, J. D. , Yamamura, S. , Fu, Z. Y. , Zhang, X. , Qin, J. , and Roeder, R. G. (1999). Identity between TRAP and SMCC complexes indicates novel pathways for the function of nuclear receptors and diverse

mammalian activators. *Mol Cell* 3,361-370.

[0470] 94. Fondell, J. D., Ge, H., and Roeder, R. G. (1996). Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93,8329-8333.

[0471] 95. Treisman, J. (2001). *Drosophila* homologues of the transcriptional coactivation complex subunits TRAP240 and TRAP230 are required for identical processes in eye-antennal disc development. *Development* 128,603-615.

[0472] 96. Ito, M., Yuan, C. X., Okano, H. J., Darnell, R. B., and Roeder, R. G. (2000). Involvement of the TRAP220 component of the TRAP/SMCC coactivator complex in embryonic development and thyroid hormone action. *Mol Cell* 5,683-693.

[0473] 97. Muncke, N., Jung, C., Rudiger, H., Ulmer, H., Roeth, R., Hubert, A., Goldmuntz, E., Driscoll, D., Goodship, J., Schon, K., and Rappold, G. (2003). Missense mutations and gene interruption in PROSIT240, a novel TRAP240-like gene, in patients with congenital heart defect (transposition of the great arteries). *Circulation* 108,2843-2850.

[0474] 98. Lompre, A. M., Nadal-Ginard, B., and Mahdavi, V. (1984). Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. *J Biol Chem* 259,6437-6446.

[0475] 99. Everett, A. W., Sinha, A. M., Umeda, P. K., Jakovcic, S., Rabinowitz, M., and Zak, R. (1984). Regulation of myosin synthesis by thyroid hormone: relative change in the alpha- and beta-myosin heavy chain mRNA levels in rabbit heart. *Biochemistry* 23,1596-1599.

[0476] 100. Darling, D. S., Carter, R. L., Yen, P. M., Welborn, J. M., Chin, W. W., and Umeda, P. K. (1993). Different dimerization activities of alpha and beta thyroid hormone receptor isoforms. *J Biol Chem* 268,10221-10227.

[0477] 101. Subramaniam, A., Gulick, J., Neumann, J., Knotts, S., and Robbins, J. (1993). Transgenic analysis of the thyroid-responsive elements in the alpha-cardiac myosin heavy chain gene promoter. *J Biol Chem* 268,4331-4336.

[0478] 102. Gustafson, T. A., Markham, B. E., Bahl, J. J., and Morkin, E. (1987). Thyroid hormone regulates expression of a transfected alpha-myosin heavy-chain fusion gene in fetal heart cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84,3122-3126.

[0479] 103. Santalucia, T., Boheler, K. R., Brand, N. J., Sahye, U., Fandos, C., Vinals, F., Ferre, J., Testar, X., Palacin, M., and Zorzano, A. (1999). Factors involved in GLUT-1 glucose transporter gene transcription in cardiac muscle. *J Biol Chem* 274,17626-17634.

[0480] 104. Hagen, G., Muller, S., Beato, M., and Suske, G. (1994). Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *Embo J* 13,3843-3851.

[0481] 105. Hagen, G., Muller, S., Beato, M., and Suske, G. (1992). Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1

related genes. *Nucleic Acids Res* 20, 5519–5525.

[0482] 106. Schonberger, J., Wang, L., Shin, J. T., Kim, S. D., Depreux, F. F., Zhu, H., Zon, L., Pizard, A., Kim, J. B., Macrae, C. A., et al. (2005). Mutation in the transcriptional coactivator EYA4 causes dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss. *Nat Genet* 37, 418–422.

[0483] 107. Wayne, S., Robertson, N. G., DeClau, F., Chen, N., Verhoeven, K., Prasad, S., Tranebjarg, L., Morton, C. C., Ryan, A. F., Van Camp, G., and Smith, R. J. (2001). Mutations in the transcriptional activator EYA4 cause late-onset deafness at the DFNA10 locus. *Hum Mol Genet* 10, 195–200.

[0484] 108. Borsani, G., DeGrandi, A., Ballabio, A., Bulfone, A., Bernard, L., Banfi, S., Gattuso, C., Mariani, M., Dixon, M., Donnai, D., et al. (1999). EYA4, a novel vertebrate gene related to *Drosophila* eyes absent. *Hum Mol Genet* 8, 11–23.

[0485] 109. Bonini, N. M., Leiserson, W. M., and Benzer, S. (1993). The eyes absent gene: genetic control of cell survival and differentiation in the developing *Drosophila* eye. *Cell* 72, 379–395.

[0486] 110. Heanue, T. A., Reshef, R., Davis, R. J., Mardon, G., Oliver, G., Tomarev, S., Lassar, A. B., and Tabin, C. J. (1999). Synergistic regulation of vertebrate muscle development by Dach2, Eya2, and Six1, homologs of genes required for *Drosophila* eye formation. *Genes Dev* 13, 3231–3243.

[0487] 111. Xu, X., Rich, E. S., Jr., and Seldin, D. C. (1998). Murine protein kinase CK2 alpha' : cDNA and genomic cloning and chromosomal mapping. *Genomics* 48, 79–86.

[0488] 112. Pinna, L. A., and Meggio, F. (1997). Protein kinase CK2 (" casein kinase-2 ") and its implication in cell division and proliferation. *Prog Cell Cycle Res* 3, 77–97.

[0489] 113. Granzier, H. L., and Labeit, S. (2004). The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ Res* 94, 284–295.

[0490] 114. Yan et al (2003). *J. Biol. Chem.* 278(10), 8826–8836.

[0491] 应理解在不偏离本发明范围的前提下可以对本发明的各种详细资料进行改变。另外,前文描述只是例证了本发明,而无限制本发明之意。

序列表

<110> 北卡罗来纳大学查珀尔希尔分校 (University of North Carolina at Chapel Hill)

Wang, Da-Zhi

Chen, Jianfu

<120> 调节肌细胞增殖和分化的 MICRORNA

<130>421-166PCT

<150>60/749, 544

<151>2005-12-12

<160>82

<170>Patent In version 3.3

<210>1

<211>21

<212>RNA

<213>Artificial

<220>

<223>Artificially synthesized miRNA

<400>1

uggaauguaa agaaguaugu a

21

<210>2

<211>22

<212>RNA

<213>Artificial

<220>

<223>Artificially synthesized miRNA

<400>2

uugguccccu ucaaccagcu gu

22

<210>3

<211>22

<212>RNA

<213>Artificial

<220>

<223>Artificially synthesized miRNA

<400>3

uggaauguaa ggaagugugu gg

22

<210>4

<211>22

<212>RNA

<213>Artificial

<220>

<223>Artificially synthesized miRNA

<400>4

auaagacgag caaaaagcuu gu

22

<210>5

<211>22

<212>RNA

<213>Artificial

<220>

<223>Artificially synthesized miRNA

<400>5

aagcugccag uugaagaacu gu

22

<210>6

<211>22

<212>RNA

<213>Artificial

<220>

<223>artificially synthesized miRNA

<220>

<221>misc_feature

<222>(11).. (11)

<223>y can be C or U

<220>

<221>misc_feature

<222>(21).. (21)

<223>y can be C or U

<400>6

uucaaguaau ycaggauagg yu

22

<210>7

<211>23

<212>RNA

<213>Artificial

<220>

<223>Artificially synthesized miRNA

<220>

<221>misc_feature

<222>(10).. (10)

<223>y can be C or U

<220>

<221>misc_feature

<222>(18).. (18)

<223>r can be G or A

<220>

<221>misc_feature

<222>(21).. (21)

<223>k can be G or U

<400>7

uagcaccauy ugaaaucrgu kuu

23

<210>8

<211>23

<212>RNA

<213>Artificial

<220>

<223>Artificially synthesized miRNA

<220>

<221>misc_feature

<222>(1)..(22)

<223>y can be C or U ;k can be G or U ;w can be U or A ;m can be C or A ;s can be G or C ;h can be A, C, or U ;v can be G, A, or C ; n can be A, G, C, or U ;b can be C, G, or U

<400>8

ykummaswys shhswyuvnv vbc

23

<210>9

<211>22

<212>RNA

<213>Artificial

<220>

<223>Artificially synthesized miRNA

<220>

<221>misc_feature

<222>(22)..(22)

<223>y can be C or U

<400>9

ucacagugaa ccggucucuu uy

22

<210>10

<211>22	
<212>RNA	
<213>Artificial	
<220>	
<223>Artificially synthesized miRNA	
<400>10	
ugagaugaag cacuguagcu ca	22
<210>11	
<211>24	
<212>RNA	
<213>Artificial	
<220>	
<223>Artificially synthesized miRNA	
<400>11	
guccaguuuu cccaggaauc ccuu	24
<210>12	
<211>21	
<212>RNA	
<213>Artificial	
<220>	
<223>Artificially synthesized miRNA	
<400>12	
uucaaguaau ccaggauagg c	21
<210>13	
<211>22	
<212>RNA	
<213>Artificial	
<220>	
<223>Artificially synthesized miRNA	

<400>13 uucaaguaau ucaggauagg uu	22
<210>14 <211>21 <212>RNA <213>Artificial	
<220> <223>Artificially synthesized miRNA	
<400>14 uagcaccauc ugaaaucggu u	21
<210>15 <211>23 <212>RNA <213>Artificial	
<220> <223>Artificially synthesized miRNA	
<400>15 uagcaccauu ugaaaucagu guu	23
<210>16 <211>20 <212>RNA <213>Artificial	
<220> <223>Artificially synthesized miRNA	
<400>16 uagcaccauu ugaaaucggu	20
<210>17 <211>22	

<212>RNA

<213>Artificial

<220>

<223>Artificially synthesized miRNA

<400>17

cuuucagucg gauguuugca gc

22

<210>18

<211>22

<212>RNA

<213>Artificial

<220>

<223>Artificially synthesized miRNA

<400>18

uguaaacauc cuacacucag cu

22

<210>19

<211>23

<212>RNA

<213>Artificial

<220>

<223>Artificially synthesized miRNA

<400>19

uguaaacauc cuacacucuc agc

23

<210>20

<211>22

<212>RNA

<213>Artificial

<220>

<223>Artificially synthesized miRNA

<400>20	
uguaaacauc cccgacugga ag	22
<210>21	
<211>21	
<212>RNA	
<213>Artificial	
<220>	
<223>Artificially synthesized miRNA	
<400>21	
cuuucagucg gauguuuaca g	21
<210>22	
<211>22	
<212>RNA	
<213>Artificial	
<220>	
<223>Artificially synthesized miRNA	
<400>22	
ucacagugaa ccggucucuu uu	22
<210>23	
<211>22	
<212>RNA	
<213>Artificial	
<220>	
<223>Artificially synthesized miRNA	
<400>23	
ucacagugaa ccggucucuu uc	22
<210>24	
<211>63	
<212>DNA	

<213>Homo sapiens

<400>24

tttttctttt tgatcagaac attcettett tactggteac agccacgtgc tcattccatt 60
ctt 63

<210>25

<211>63

<212>DNA

<213>Pan troglodytes

<400>25

tttttctttt tgatcagaac attcettett tactggteac agccacgtgc tcattccatt 60
ctt 63

<210>26

<211>61

<212>DNA

<213>Mus musculus

<400>26

tgtttctttc ctcagaacat tccttcttca ctggteacag ccacgtgctc attccatcct 60
t 61

<210>27

<211>65

<212>DNA

<213>Rattus rattus

<400>27

tgtttctttc ctcagaacat tccttcttctt ttcactggte ccagccacgt gtcattcca 60
tcctt 65

<210>28

<211>61

<212>DNA

<213>Canis familiaris

<400>28

gttttacttt tcgatcagaa cattcettet ttactgggtca cagccatgtg ctcattccat	60
t	61
<210>29	
<211>64	
<212>DNA	
<213>Gallusgallus	
<400>29	
tttttacttt cgatacggaa cattcctttt ttattagtct cagtcatgta ttcattccat	60
tctt	64
<210>30	
<211>23	
<212>DNA	
<213>Homo sapiens	
<400>30	
gctcctgggt tggagggaac cac	23
<210>31	
<211>22	
<212>DNA	
<213>Homo sapiens	
<400>31	
ttagcttacc caatgggacc gt	22
<210>32	
<211>26	
<212>DNA	
<213>Rattus rattus	
<400>32	
ggggctcttg ggttgaaggg aaccac	26
<210>33	
<211>22	
<212>DNA	

<213>Rattus rattus	
<400>33	
ttagcttacc caatgggacc gt	22
<210>34	
<211>83	
<212>RNA	
<213>Mus musculus	
<400>34	
uuccuugac gggugagcuu uggcccggg uuauaccuga cacucacgua uaagacgagc	60
aaaaagcuug uggucagag gag	83
<210>35	
<211>83	
<212>RNA	
<213>Mus musculus	
<400>35	
uuccuugac gggugagcuu uggcccggg uuauaccuga cacucacgua uaagacgagc	60
aaaaagcuug uggucagag gag	83
<210>36	
<211>83	
<212>RNA	
<213>Rattus rattus	
<400>36	
uuccuugac gggugagcuu uggcccggg uuauaccuga cucucacgua uaagacgagc	60
aaaaagcuug uggucagag gag	83
<210>37	
<211>71	
<212>RNA	
<213>Homo sapiens	
<400>37	
ugacgggcga gcuuuuggcc cggguuauac cugaugcuca cguauaagac gagcaaaaag	60

cuuguugguc a	71
<210>38	
<211>24	
<212>RNA	
<213>Homo sapiens	
<400>38	
cuaaaauaua uguaaucguc uuaa	24
<210>39	
<211>24	
<212>RNA	
<213>Mus musculus	
<400>39	
cuaaaauaua uguaaucguc uuaa	24
<210>40	
<211>32	
<212>DNA	
<213>Mus musculus	
<400>40	
accaaatgca tctctctcca cattccttgc tc	32
<210>41	
<211>31	
<212>DNA	
<213>Mus musculus	
<400>41	
gtcccagcca agggagcaac attccaacgc t	31
<210>42	
<211>21	
<212>DNA	
<213>Artificial	

<220>

<223>miR-1 probe

<400>42

tacatacttc ttacattcc a

21

<210>43

<211>22

<212>DNA

<213>Artificial

<220>

<223>miR-133 probe

<400>43

acagctggtt gaaggggacc aa

22

<210>44

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial

<220>

<223>miR-133a-1-up regulation probe

<400>44

catgtgaccc ctcacacaca

20

<210>45

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial

<220>

<223>miR-133a-1-down regulation probe

<400>45

acaaggggag cctggatccc

20

<210>46	
<211>22	
<212>DNA	
<213>Artificial	
<220>	
<223>miR-133a-2-up probe	
<400>46	
ggacatatgc ctaaacacgt ga	22
<210>47	
<211>20	
<212>DNA	
<213>Artificial	
<220>	
<223>miR-133a-2-down probe	
<400>47	
gaaacatctt tatccagttt	20
<210>48	
<211>22	
<212>DNA	
<213>Artificial	
<220>	
<223>miR-1-2-up probe	
<400>48	
agactgagac acaggcgaca cc	22
<210>49	
<211>22	
<212>DNA	
<213>Artificial	
<220>	

<223>miR-1-2-down probe

<400>49

tgccggtcca tcggtccatt gc

22

<210>50

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial

<220>

<223>miR-1-1-up probe

<400>50

cactggatcc attactcttc

20

<210>51

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial

<220>

<223>miR-1-1-down probe

<400>51

ttggaatggg gctgtagta

20

<210>52

<211>43

<212>DNA

<213>Artificial

<220>

<223>miR-1mut-up probe

<400>52

tgaacattca gtgctataaa gaagtatgta ttttgggtag gta

43

<210>53

- <211>43
<212>DNA
<213>Artificial
- <220>
<223>miR-1mut-down probe
- <400>53
tacctacca aaatacatac ttctttatag cactgaatgt tca 43
- <210>54
<211>48
<212>DNA
<213>Artificial
- <220>
<223>miR-133mut-up probe
- <400>54
aatgcctct tcaatggatt tgtcaaccag ctgtagctat gcattgat 48
- <210>55
<211>48
<212>DNA
<213>Artificial
- <220>
<223>miR-133mut-down probe
- <400>55
atcaatgcat agctacagct ggttgacaaa tccattgaag aggcgatt 48
- <210>56
<211>42
<212>RNA
<213>Artificial
- <220>
<223>artificially synthesized miR-1duplex

<400>56	
uggaauguaa agaaguaugu acauacuucu uuacauucca ua	42
<210>57	
<211>42	
<212>RNA	
<213>Artificial	
<220>	
<223>artificially synthesized miR-1-mut duplex	
<400>57	
uuaaccauaa agaaguaugu acauacuucu uuaugguuaa ua	42
<210>58	
<211>44	
<212>RNA	
<213>Artificial	
<220>	
<223>artificially synthesized miR-133duplex	
<400>58	
uugguccccu ucaaccagcu guagcugguu gaaggggacc aaau	44
<210>59	
<211>44	
<212>RNA	
<213>Artificial	
<220>	
<223>artificially synthesized miR-133-mut duplex	
<400>59	
ucaaguaacu ucaaccagcu guagcugguu gaaguuacuu gaau	44
<210>60	
<211>44	

<212>RNA

<213>Artificial

<220>

<223>artificially synthesized miR-208duplex

<400>60

auaagacgag caaaaagcuu gaaagcuuuu ugcucgucuu auac

44

<210>61

<211>44

<212>RNA

<213>Artificial

<220>

<223>artificially synthesized GFP duplex

<400>61

aacuucaggg ucagcuugcc uuggcaagcu gaccugaag uugg

44

<210>62

<211>28

<212>RNA

<213>Artificial

<220>

<223>artificially synthesized 2' -O-methyl-miR-1

<400>62

aaauacauac uucuuuacau uccauagc

28

<210>63

<211>31

<212>RNA

<213>Artificial

<220>

<223>artificially synthesized 2' -O-methyl-miR-133

<400>63 agcuacagcu gguugaaggg gaccaaaucc a	31
<210>64 <211>32 <212>RNA <213>Artificial	
<220> <223>artificially synthesized 2' -O-methyl-miR-208	
<400>64 gaccaacaag cuuuuugcuc gucuuauacg ug	32
<210>65 <211>22 <212>RNA <213>Artificial	
<220> <223>artificially synthesized 2' -O-methyl-GFP	
<400>65 aaggcaagcu gaccugaag uu	22
<210>66 <211>21 <212>DNA <213>Artificial	
<220> <223>artificially synthesized HDAC4-UTR-up	
<400>66 cagcactggt gatagacttg g	21
<210>67 <211>23 <212>DNA	

<213>Artificial

<220>

<223>artificially synthesized HDAC4-UTR-down

<400>67

cttaagaata agttcaataa gac

23

<210>68

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial

<220>

<223>artificially synthesized SRF-UTR-up

<400>68

agatatgggg gcttgtgccc

20

<210>69

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial

<220>

<223>Artificially synthesized SRF-UTR-down

<400>69

ctgggagaaa ggggtagac

20

<210>70

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial

<220>

<223>Artificially synthesized Myogenin F PCR primer

<400>70

tggagctgta tgagacatcc c	21
<210>71	
<211>21	
<212>DNA	
<213>Artificial	
<220>	
<223>Artificially synthesized Myogenin R PCR primer	
<400>71	
tggacaatgc tcaggggtcc c	21
<210>72	
<211>20	
<212>DNA	
<213>Artificial	
<220>	
<223>Artificially synthesized MyoD F PCR primer	
<400>72	
gcaggctctg ctgcgcgacc	20
<210>73	
<211>23	
<212>DNA	
<213>Artificial	
<220>	
<223>Artificially synthesized MyoD R PCR primer	
<400>73	
tgcagtcgat ctctcaaagc acc	23
<210>74	
<211>19	
<212>DNA	
<213>Artificial	

<220>

<223>Artificially synthesized Skeletal α -actin F PCR primer

<400>74

cagagcaagc gaggtatcc

19

<210>75

<211>19

<212>DNA

<213>Artificial

<220>

<223>Artificially synthesized Skeletal α -actin R PCR primer

<400>75

gtccccagaa tccaacacg

19

<210>76

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial

<220>

<223>Artificially synthesized MEF2D F PCR primer

<400>76

caagctgttc cagtatgcca g

21

<210>77

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial

<220>

<223>Artificially synthesized MEF2D R PCR primer

<400>77

aagggatgat gtcaccaggg

20

<210>78	
<211>30	
<212>DNA	
<213>Artificial	
<220>	
<223>Artificially synthesized HDAC4F PCR primer	
<400>78	
gagagaattc tgctagcaat gagctcccaa	30
<210>79	
<211>34	
<212>DNA	
<213>Artificial	
<220>	
<223>Artificially synthesized HDAC4R PCR primer	
<400>79	
gagactcgag ctatgcaggt tccaagggca gtga	34
<210>80	
<211>21	
<212>DNA	
<213>Artificial	
<220>	
<223>Artificially synthesized SRF F PCR primer	
<400>80	
gtccccatgc agtgatgtat g	21
<210>81	
<211>20	
<212>DNA	
<213>Artificial	

<220>

<223>Artificially synthesized SRF R PCR primer

<400>81

gtagctcggt gaggttgctg 20

<210>82

<211>2620

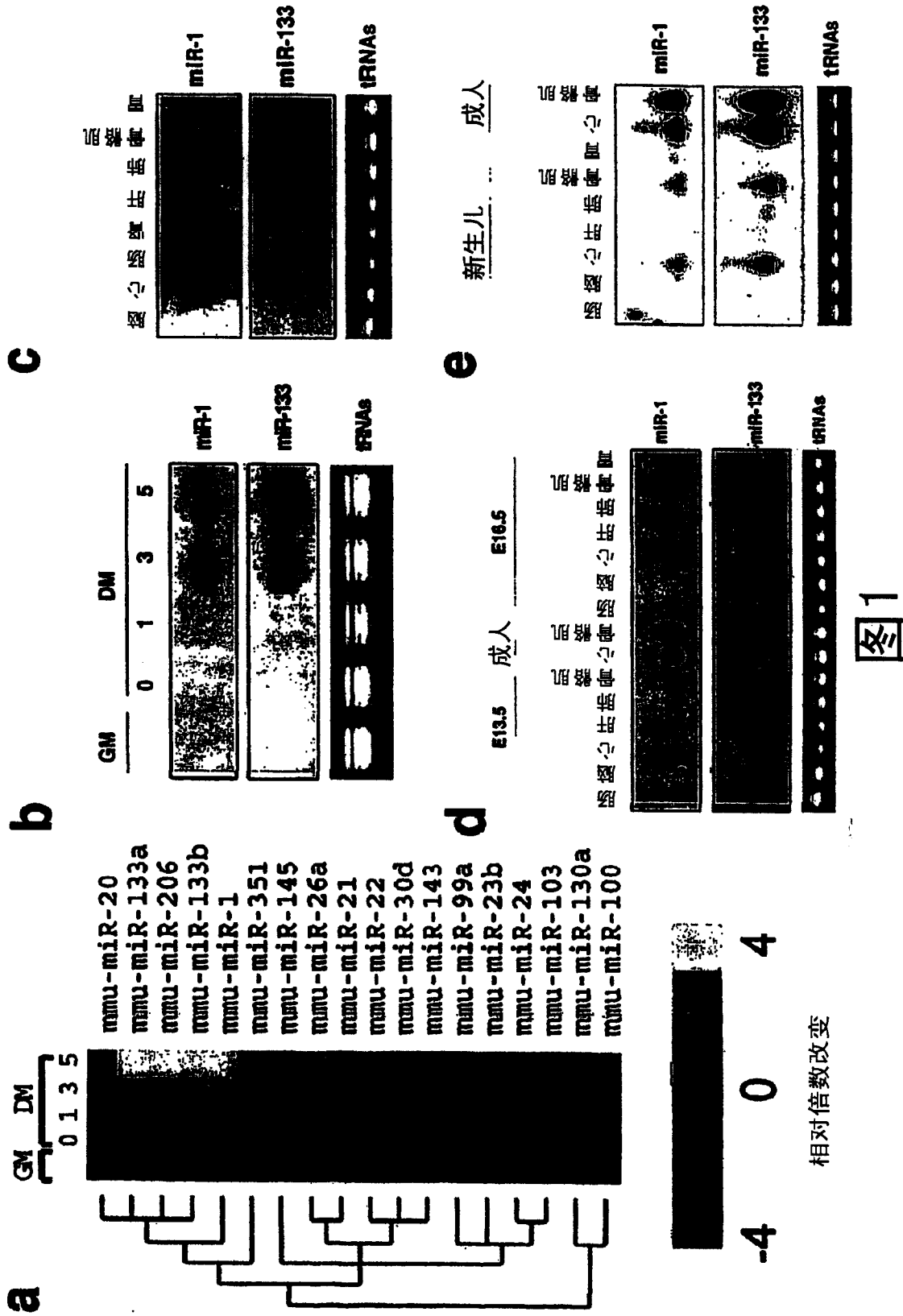
<212>DNA

<213>Mus musculus

<400>82

gagcaagttt cactagggcc acacagtatc attgagcact gagcgtggaa ggagacagat 60
 gggccacggt tctcctccct ctttctagcc ttccttctcc ctcccctttc ttatacatta 120
 tatectggcg gcagttttcc ctccctccac tctctcccagt tctttcccga ctccattct 180
 cccccagatc cttctctctt atgccccccc ccccgaagag caggctttcc atgaataccc 240
 accaaacatg gcataacaag ttacaataag atcaggaaca aaccctcata tcaaggctgg 300
 atgaggcaac ccaacaggag gaaaagggcc ccaagagcag gcaaaaaact cccactgttg 360
 tgtcttctgc tagaacacaa agctacacaa ctataatgta tatgcagagg acccagctca 420
 gtctcatcag ggtecggtgt ttgttgctaca gtttctgtga acctctgtgg gctctgctta 480
 gttggttctg tgggttggtgt tcttgggca tctcaactc ctctggctcc tacaatcttt 540
 cctcccatct tctttggagt tcccctggcc atgcctgatg tttgggtggc ttggctgtgt 600
 gggcctctgc atttatttcc gtcagttgct ggaaagcacc cctctgttga cagttgttcc 660
 atgcactgat ctatgaggat agcagagtat cactaggaat tactttattg tctttttgc 720
 cagtcgtttt tggttctctc ccgagtctct gggctgtcca gtctctgggt cctggccttc 780
 cagacactgt cagttgtggg tccccttttg tgggtttggc ctcaacttgg ccagtcattg 840
 gttggccatt ccacaagtt ctacaccacc attacctag catgtctcgc aggcaggaca 900
 gattgtacgc ggaaggattt atggctgggt tatgtctcag tcccagggtt ggaagccttg 960
 cctggttaaa gaagacagct agttctgact cagtattccc tgttactagc agaattcact 1020
 aggattacce tcaccctcag ggcatttcca cagcactagg gttctgcatt gcctctccaa 1080
 taccctctcc aattccagtc gcctttccca gaactctcct cccccagcct gatccctatt 1140
 gttcccacce ccatccacce ccagtcaccc tacaaagctc tttccccttc ccaagaagat 1200
 ccatgagttt ctctgtgtct gtggattgga gtatgatctg tggatttagc agctaatggt 1260
 cacttaccag tgagtacaca ccgtttgtct tttgggtctg ggttacctca ctcagggttg 1320
 attttgatt tttttttttg agtgcatacc atttgtctgc aaatgtcatg atgtcatttt 1380
 ttttaacage tgaggaattc tctcagaacc acattttctt tatccattat tcagattggt 1440
 cccagtttct ggctattata aggctgctat gaacatggtt gaacaagtggt ccttgtggta 1500
 tcggtacaca ggatgtggca tcccttgggt atatgcctag gagtgggtatc gatgggtctc 1560
 gaggtagatc aattcccgat tttctgagaa actgccatat ctgtttccaa agtggctgtg 1620

taagtttgcg	ctcccaccag	caacggagga	gtgttctcct	tactcctccc	acattatcaa	1680
cagtgtgagc	tgtcacttgt	gtttttgate	ttagcctttc	tgacaggtgt	aagatggaat	1740
ctcaaagtag	ctttgatttg	catttccctg	ctggctaagg	atgttgaaca	tttctttaag	1800
tgtttctcag	ccatttgaga	tttatecatt	gagaattctg	tttagatctg	aactccacct	1860
tctaattgga	ttatttggtt	tttaaaatat	ccactttctc	gagttcttaa	tgggttttgg	1920
atattagccc	tctgtcaaat	gtggagttgg	tgaagatctt	ttcccattcg	gtaggttttg	1980
tcctattgac	agtgtccttt	gcttcacaga	agcttttcag	tttcatgagg	tcccatttat	2040
tgattgttga	atcttgggtc	tcttagtgcc	tgtgctattg	atgtctattc	aggaagttgt	2100
ctcctgtgcc	aatgcgttca	aggetatttc	ccactttctc	ttctattagg	ttcagtgtat	2160
ctcattttat	gttgaggtct	ttgatccact	tagagttgag	ttttgtgcag	agtgatagat	2220
atggatctat	ttgcattctt	ctacatgcag	atatccagta	agaccagcat	catttattgc	2280
ggatgctttt	taaatttttt	cgcttgtgta	tttctggctt	ctttataaaa	atcaggtggt	2340
cactgatttc	attgatcagc	caatgctttt	ctgccgatac	catgtggttt	tattgctata	2400
gctctgaggt	acagcttgag	tcagggatgt	gatgccctcg	gacgtccttt	tattgtacag	2460
gagtatccta	ggtttagcta	tcctaggttt	tttggttttc	cacatggagt	taagtattgt	2520
cctttcaagg	tctatagaga	attgcattgg	gattttggtg	gagattgtat	tgcatttgta	2580
gatttggtag	ggtggccatt	tttactatgg	taatcctacc			2620



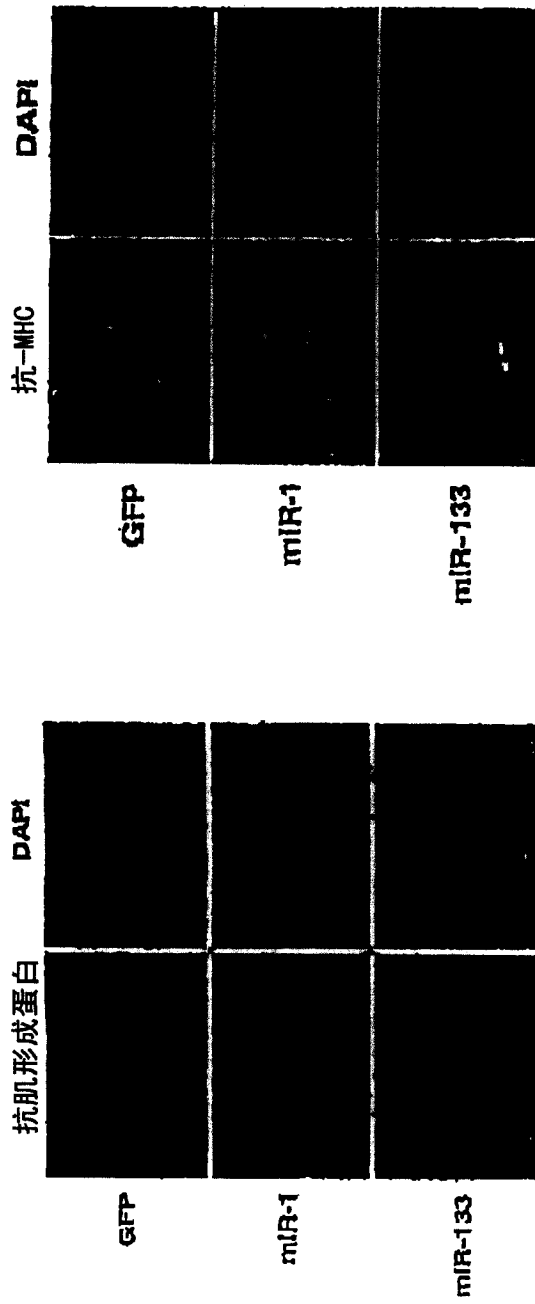


图 2b

图 2a

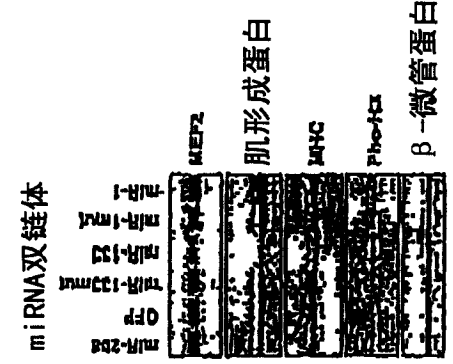


图2c

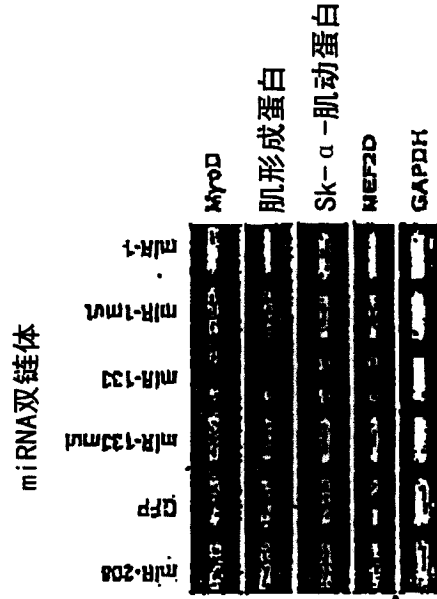


图2d

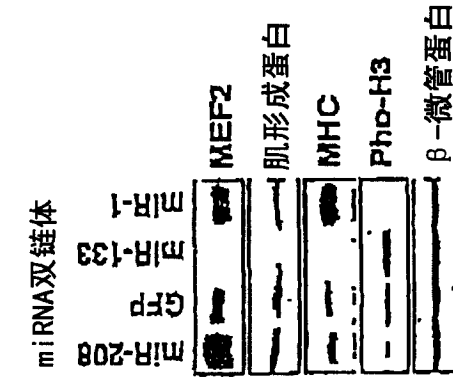


图2e

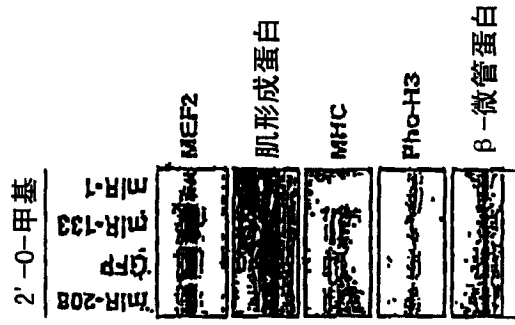


图2h

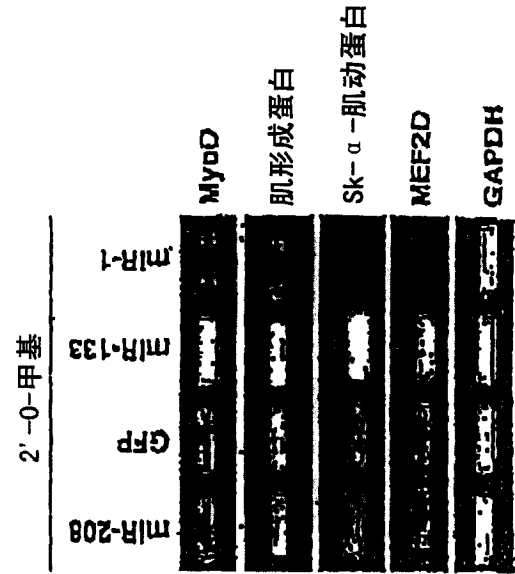


图2g

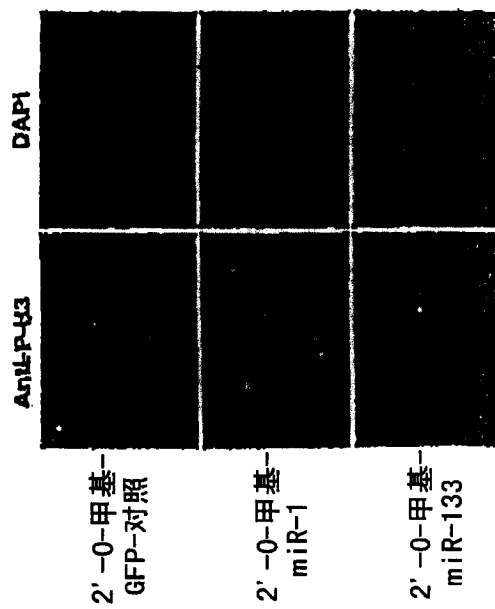


图2f

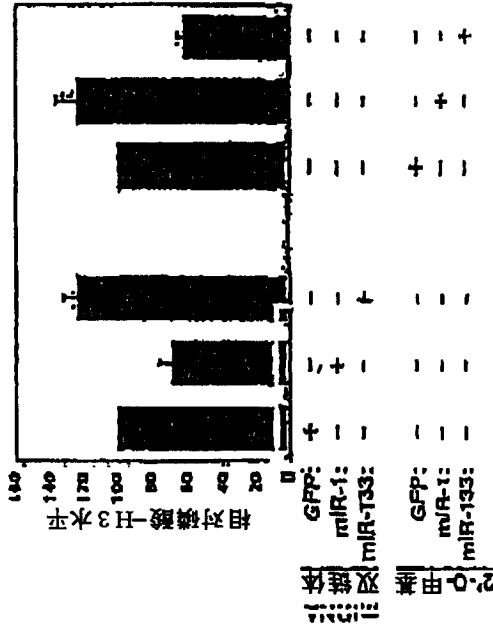


图2j

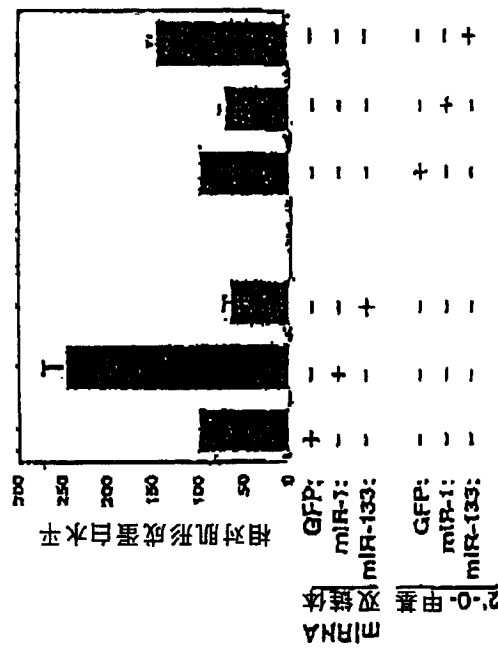


图2i

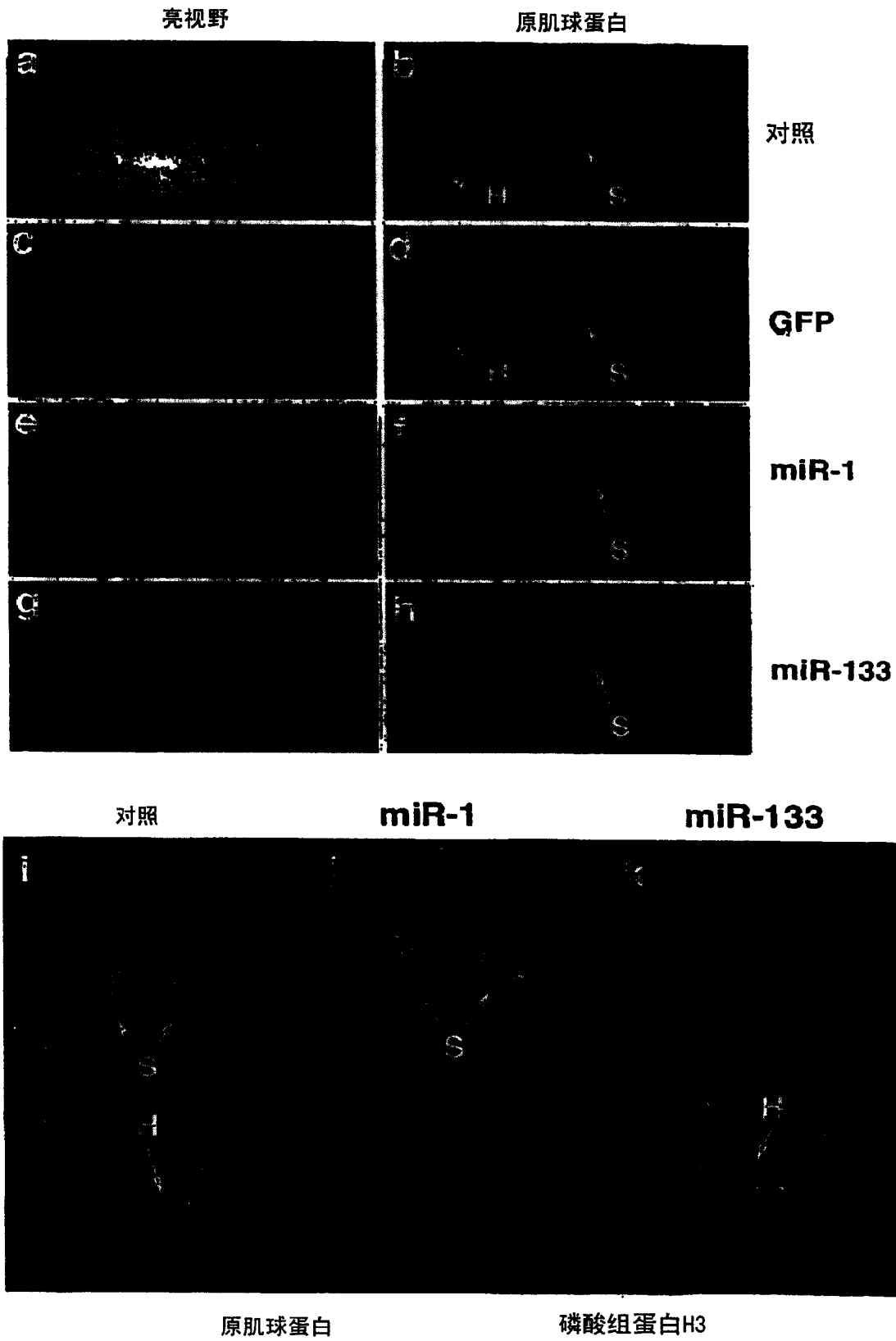


图 3

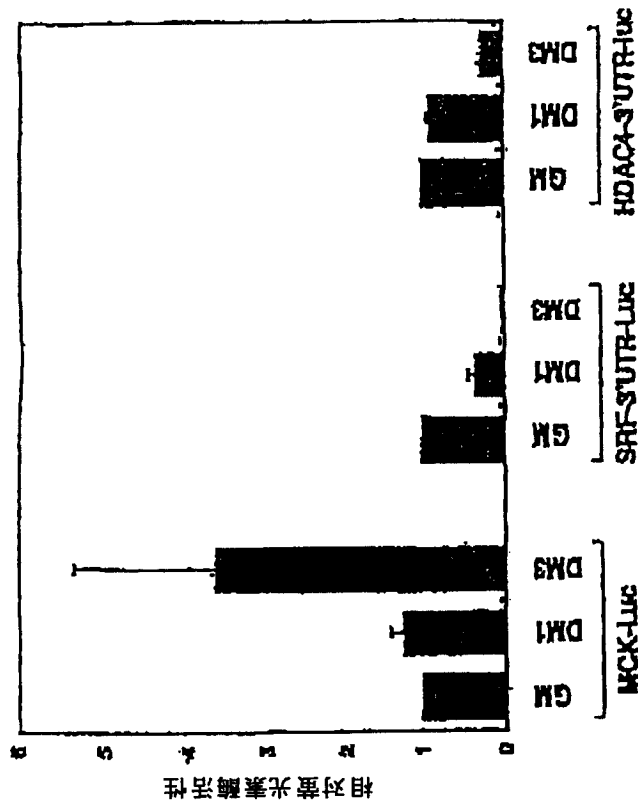


图 4b

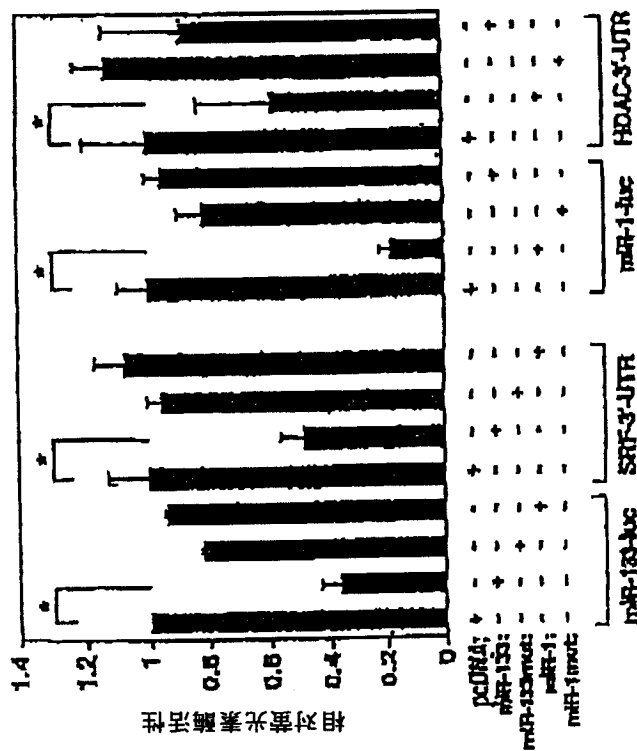


图 4a

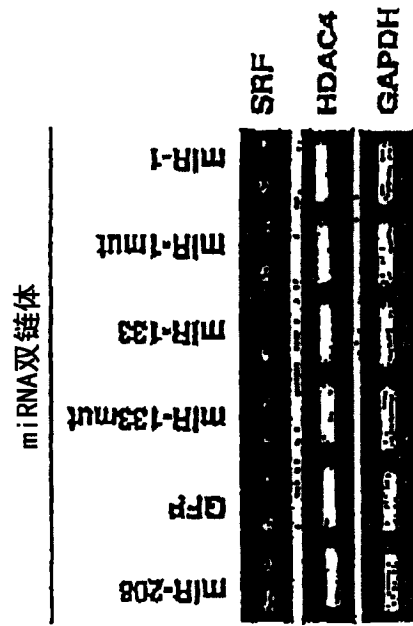


图4d

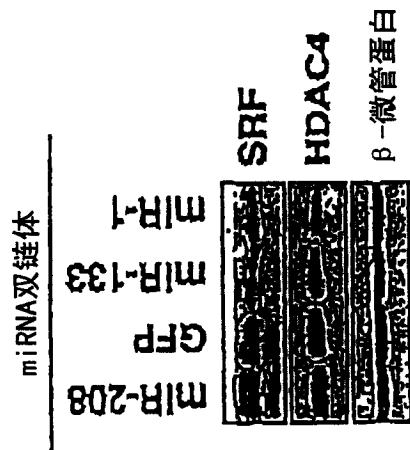
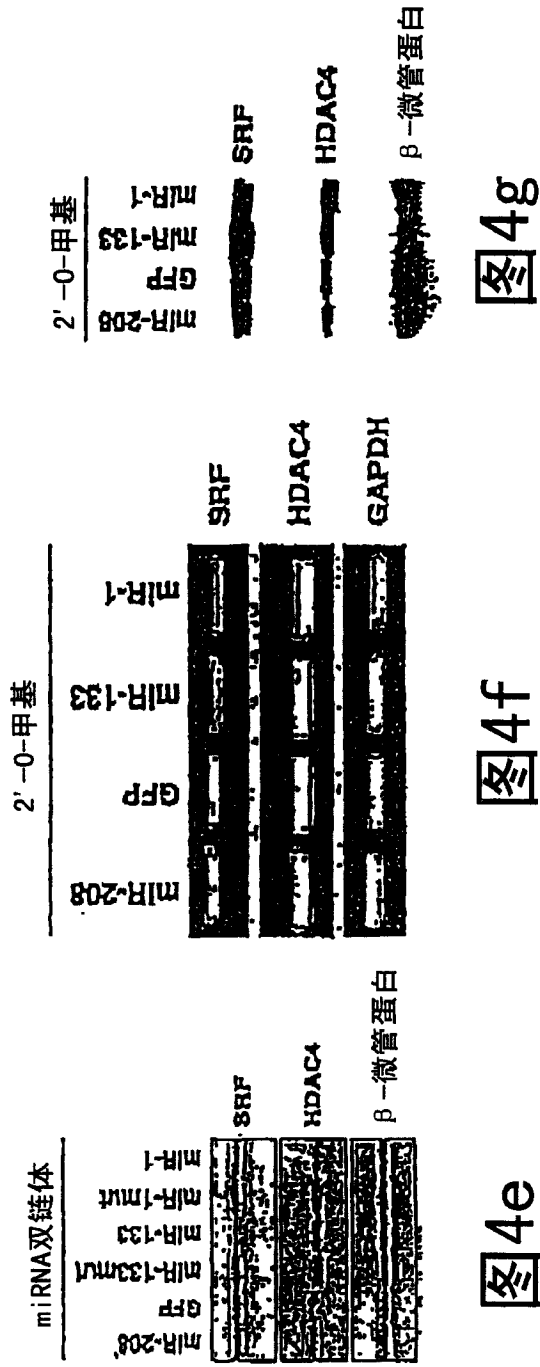


图4c



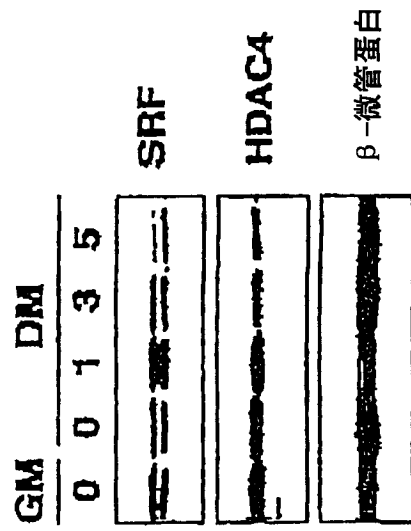


图4i

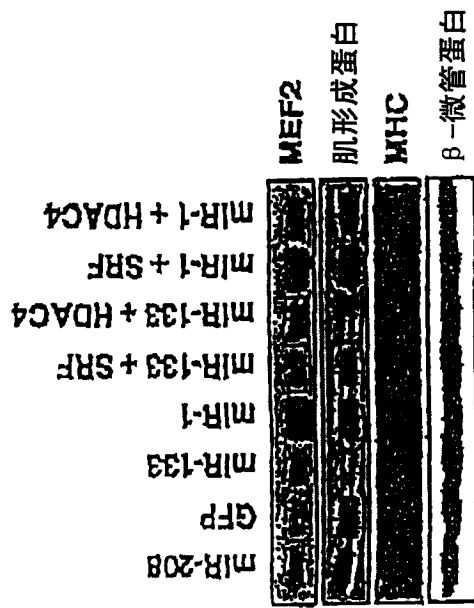


图4h

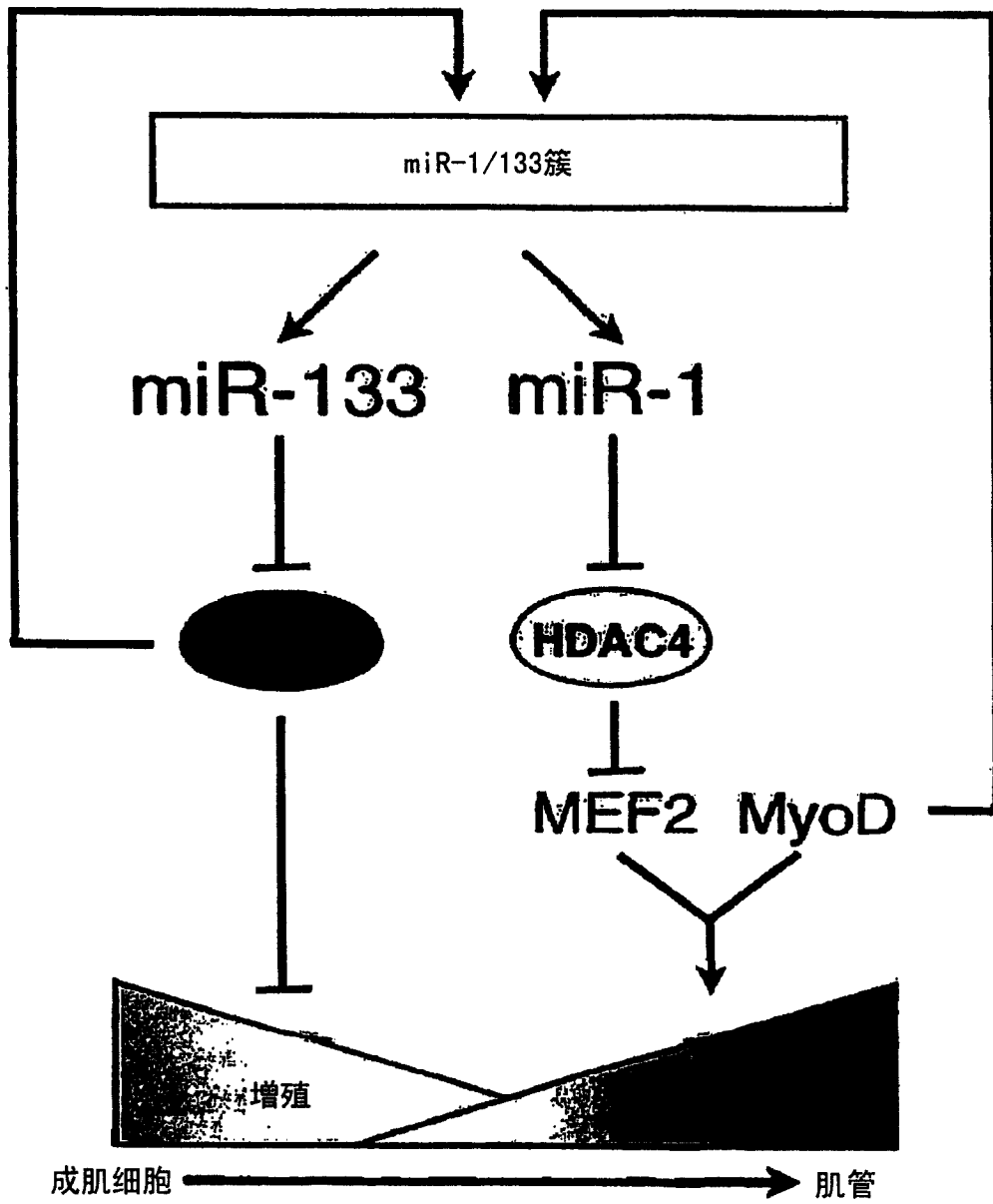


图 5

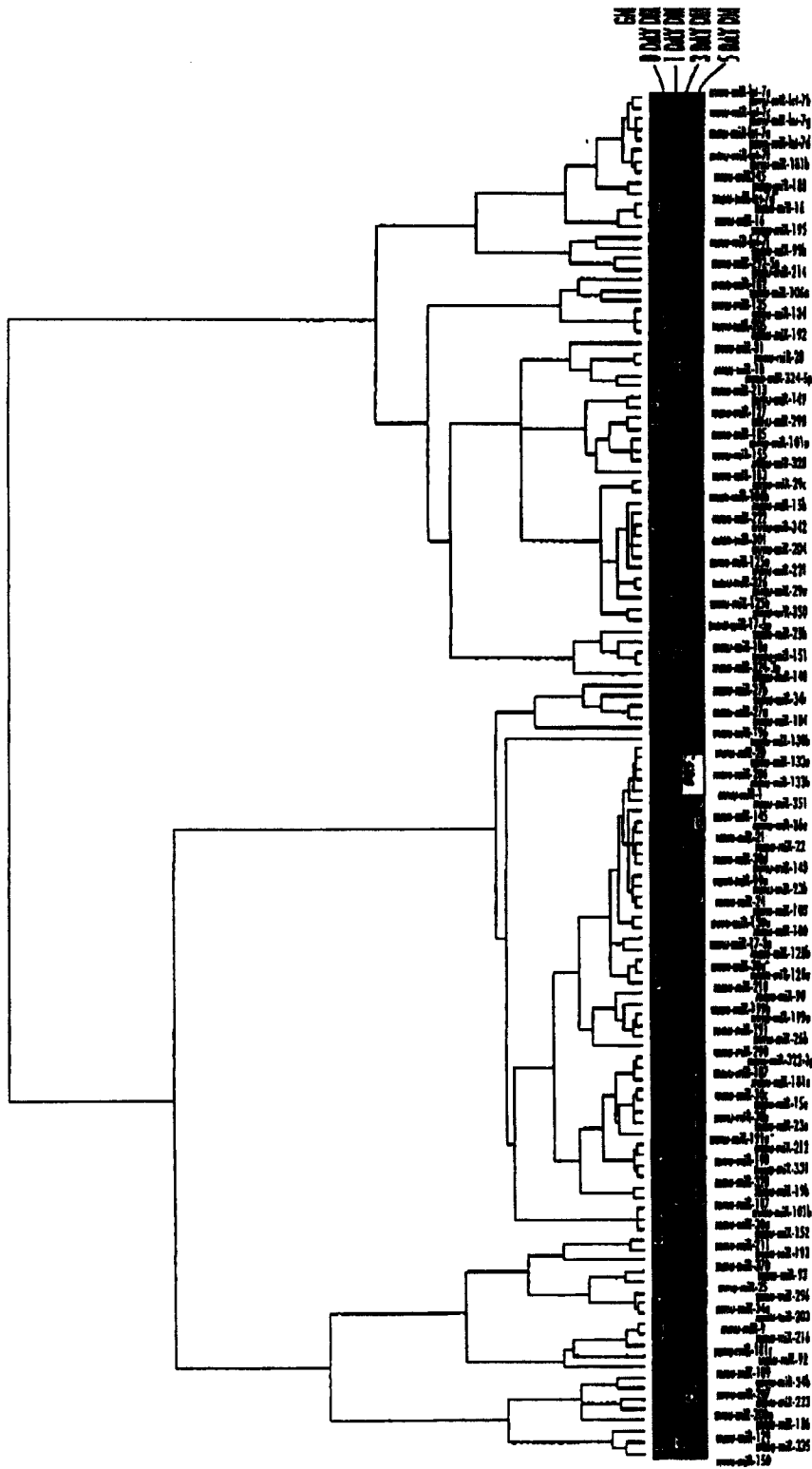


图6

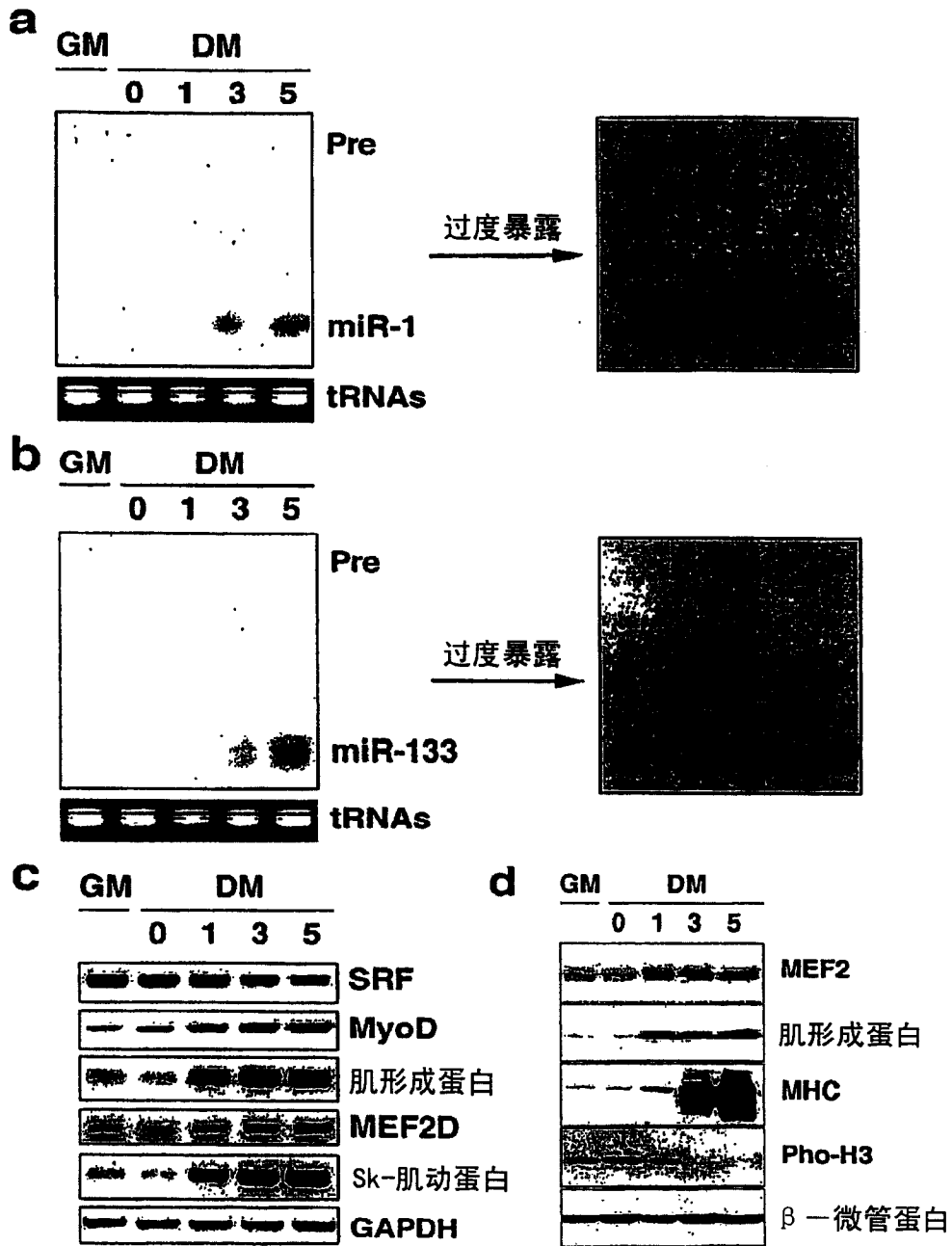


图 7

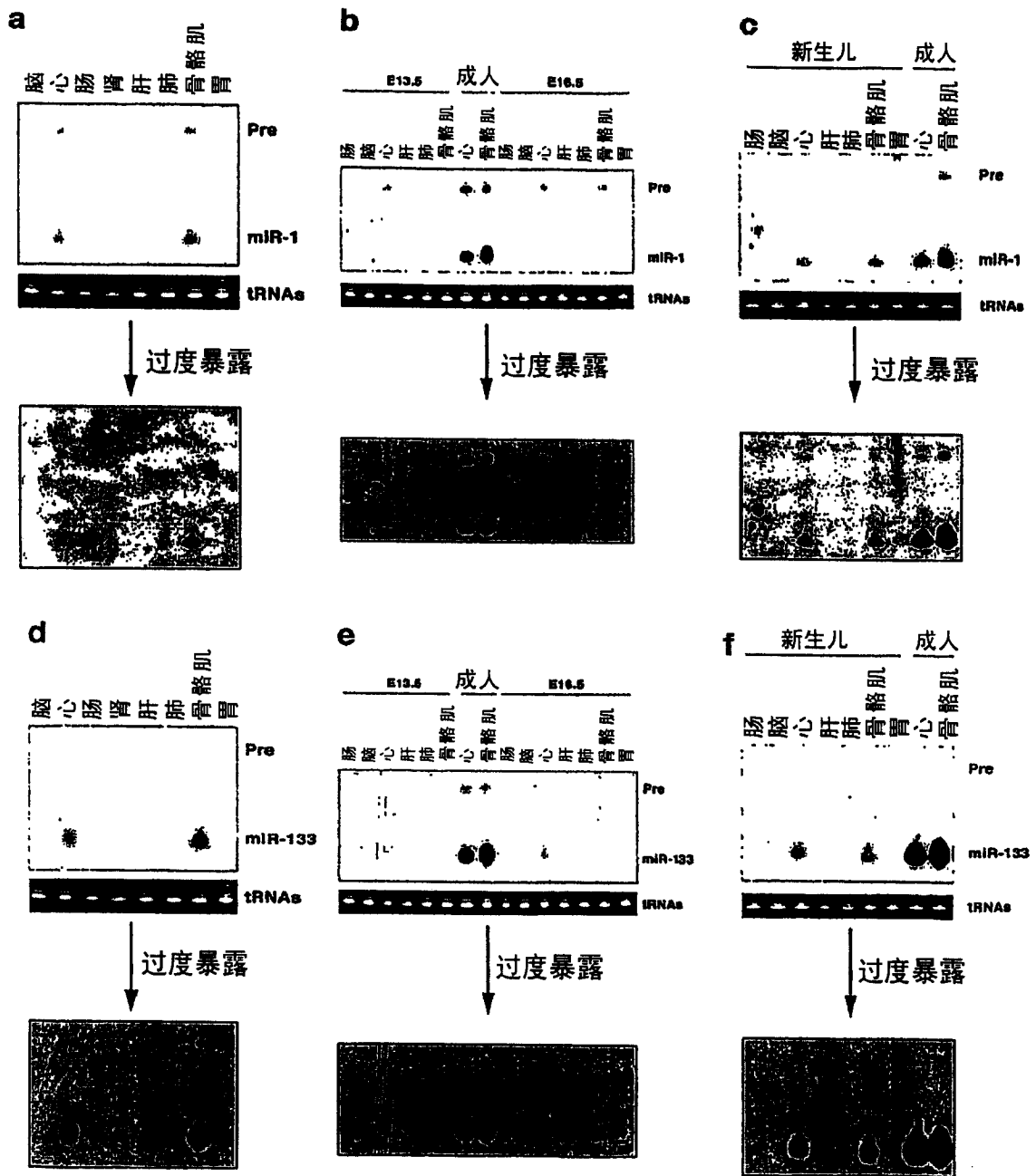


图 8

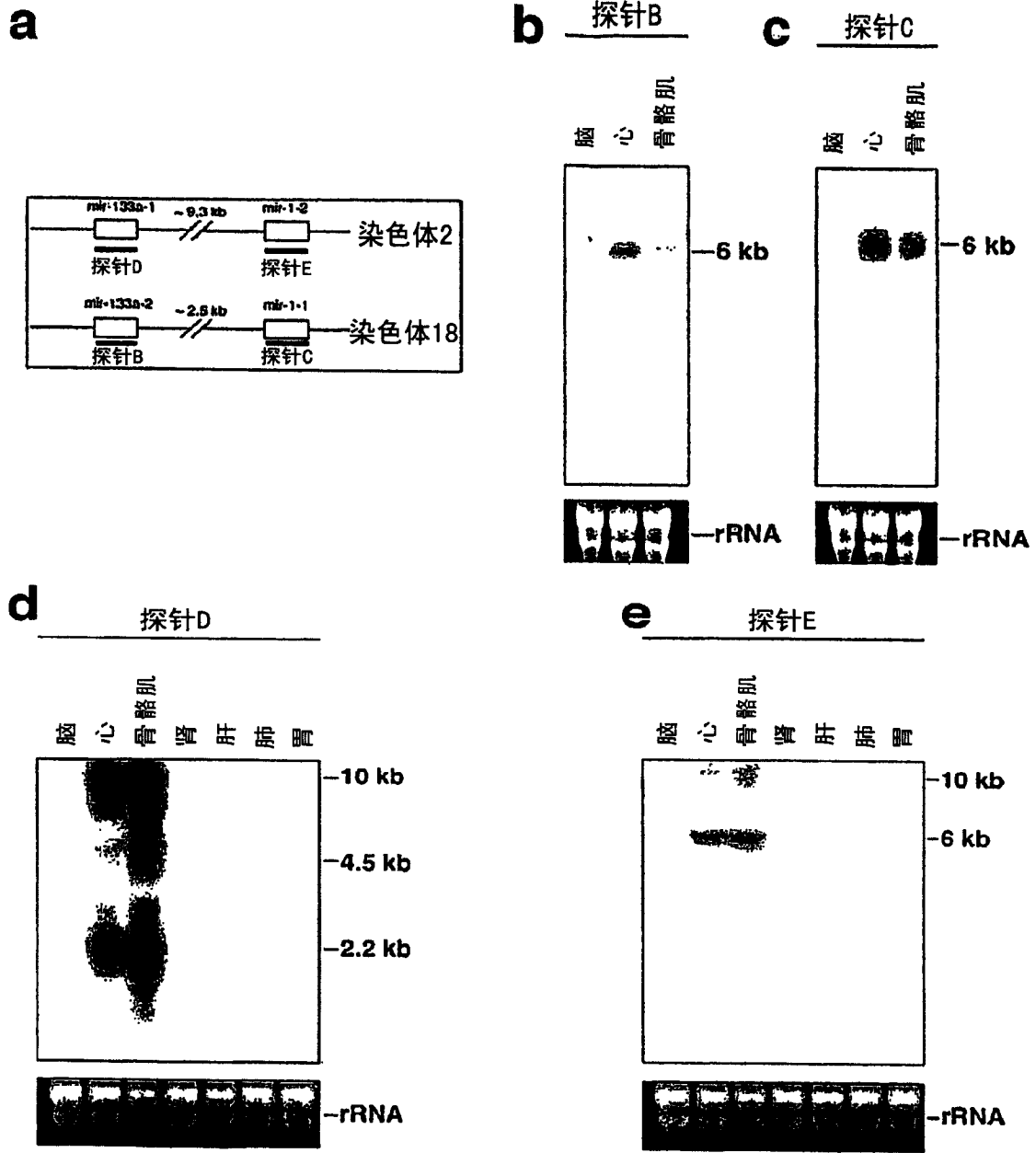


图 9

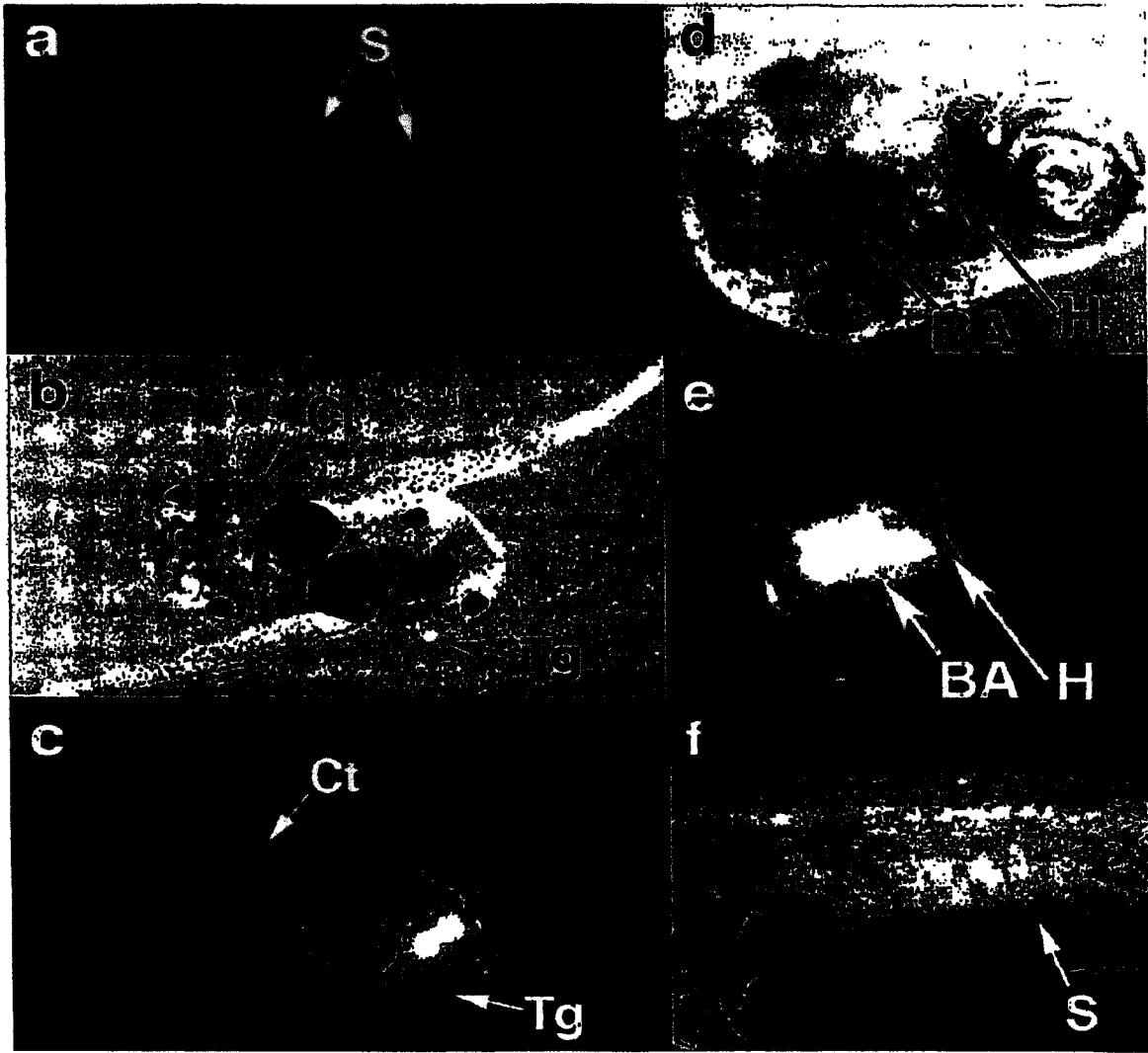


图 10

染色体 2miR-1/133 簇增强子序列

1 GAGCAAGTTT CACTAGGGCC ACACAGTATC ATTGAGCACT GAGCGTGGAA GGAGACAGAT
 61 GGGCCACGTT TCTCCTCCCT CTTTCTAGCC TTCCTTCTCC CTCCCTTTTC TTATACATTA
 121 TATCCTGGCG GCAGTTTTCC CTCCCTCCAC TCCTCCCAGT TCCTTCCCA CTCCATTCT
 181 CCCCAGATC CATTCTCTT ATGCCCCCCC CCCCAGAG CAGGCTTCC ATGAATACCC
 241 ACCAAACATG GCATAACAAG TTACAATAAG ATCAGGAACA AACCTCATA TCAAGGCTGG
 301 ATGAGGCAAC CCAACAGGAG GAAAAGGGCC CCAAGAGCAG GCAAAAAACT CCCACTGTTG
 361 TGTCTTCTGC TAGAACACAA AGCTACACAA CTATAATGTA TATGCAGAGG ACCCAGCTCA
 421 GTCTCATCAG GGTCCGTGTT TGTGCTACA GTTCTGTGA ACCTCTGTGG GCTCTGCTTA
 481 GTTGGTCTG TGGGTGTGT TCTTGTGGCA TCCTCAACTC CTCTGGCTCC TACAATCTTT
 541 CCTCCCATCT TCTTTGGAGT TCCCCTGGCC ATGCCTGATG TTTGGTTGGC TTGGCTGTGT
 601 GGGCCTCTGC ATTTATTTC GTCAGTTGCT GGAAAGCATC CCTCTGTTGA CAGTTGGTCC
 661 ATGCACTGAT CTATGAGGAT AGCAGAGTAT CACTAGGAAT TACTTTATTG TCTTTTTTGC
 721 CAGTCGTTTT TGGTCTCTC CCGAGTCTCT GGGCTGTCCA GTCTCTGGTT CCTGGCCTTC
 781 CAGACACTGT CAGTTGTGGG TTCCCTTTG TGGTGTGGC CTCAACTTGG CCAGTCATTG
 841 GTTGGCCATT CCCACAAGTT CTACACCACC ATTACCCTAG CATGTCTCGC AGGCAGGACA
 901 GATTGTACGC GGAAGGATTT ATGGCTGGGT TATGTCTCAG TCCCAGGGCT GGAAGCCTTG
 961 CCTGGTTAAA GAAGACAGCT AGTCTGACT CAGTATTCCC TGTTACTAGC AGAATTCACT
 1021 AGGATTACCC TCACCCTCAG GGCATTTCCA CAGCACTAGG GTTCTGCATT GCCTCTCCAA
 1081 TACCCCTCC AATCCAGTC GCCTTCCCA GAACTCTCCT CCCCAGCCT GATCCCTATT
 1141 GTTCCCACCC CCATCCACCC CCAGTCCACC TACAAAGCTC TTTCCCCTTC CCAAGAAGAT
 1201 CCATGAGTTT CTCGTGTCCT GTGGATTGGA GTATGATCTG TGGATTAGC AGCTAATGTT
 1261 CACTTACCAG TGAGTACACA CCGTTTGTCT TTTGGGTCTG GGTACCTCA CTCAGGGTGG
 1321 ATTTTGGATT TTTTTTTTG AGTGCTATCC ATTTGTCTGC AAATGTCATG ATGTCATTTT
 1381 TTTAACAGC TGAGGAATTC TCTCAGAACC ACATTTTCTT TATCCATTAT TCAGATTGTT
 1441 CCCAGTTTCT GGCTATTATA AGGCTGCTAT GAACATGGTT GAACAAGTGT CCTTGTGGTA
 MEF2 位点
 tcggTAcA ca
 (MEF 突变)
 1501 GGATGTGGCA TCCTTGGGT ATATGCCTAG GAGTGGTATC GATGGGTCTC GAGGTAGATC
 1561 AATCCCAGT TTTCTGAGAA ACTGCCATAT CTGTTTCCAA AGTGGCTGTG TAAGTTGCG
 1621 CTCCCACCAG CAACGGAGGA GTGTTCTCCT TACTCCTCCC ACATTATCAA CAGTGTGAGC
 1681 TGTCACCTGT GTTTTTGATC TTAGCCTTTC TGACAGGTGT AAGATGGAAT CTCAAAGTAG
 1741 CTTTGATTTG CATTTCCTG CTGGCTAAGG ATGTTGAACA TTTCTTTAAG TGTTTCTCAG
 1801 CCATTGAGA TTTATCCATT GAGAATTCTG TTTAGATCTG AACTCCACCT TCTAATTGGA
 1861 TTATTTGGTT TTTAAAATAT CCACTTCTC GAGTCTTAA TGGGTTTTGG ATATTAGCCC

```

1921 TCTGTCAAAT GTGGAGTTGG TGAAGATCTT TTCCATTCG GTAGGTTTTG TCCTATTGAC
1981 AGTGTCCTTT GCTTCACAGA AGCTTTTCAG TTTCATGAGG TCCCATTAT TGATTGTTGA
      CarG 盒
      atcTtggt ct
      (CarG 盒突变)
2041 TCTTAGTGCC TGTGCTATTG ATGTCTATTC AGGAAGTTGT CTCCTGTGCC AATGCGTTCA
2101 AGGCTATTTT CCACTTTTCTC TTCTATTAGG TTCAGTGTAT CTCATTTTAT GTTGAGGTCT
2161 ATCCA CT TAGAGTTGAG TTTTGTGCAG AGTGATAGAT ATGGATCTAT TTGCATTCTT
2221 CATGCAG ATATCCAGTA AGACCAGCAT CATTATTGC GGATGCTTTT TAAATTTTTT
2281 TTGTGTA TTTCTGGCTT CTTTATAAAA ATCAGGTGTT CACTGATTC ATTGATCAGC
2341 TGCTTTT CTGCCGATAC CATGTGGTTT TATTGCTATA GCTCTGAGGT ACAGCTTGAG
2401 GGGATGT GATGCCCTG GACGTCCTT TATTGTACAG GAGTATCCTA GGTTTAGCTA
2461 TAGGTTT TTTGGTTTT CACATGGAGT TAAGTATTGT CCTTCAAGG TCTATAGAGA
2521 GCATTGG GATTTTGGTG GAGATTGTAT TGCATTTGTA GATTTGGTAG GGTGGCCATT
2581 ACTATGG TAATCCTACC
    
```

图 10G

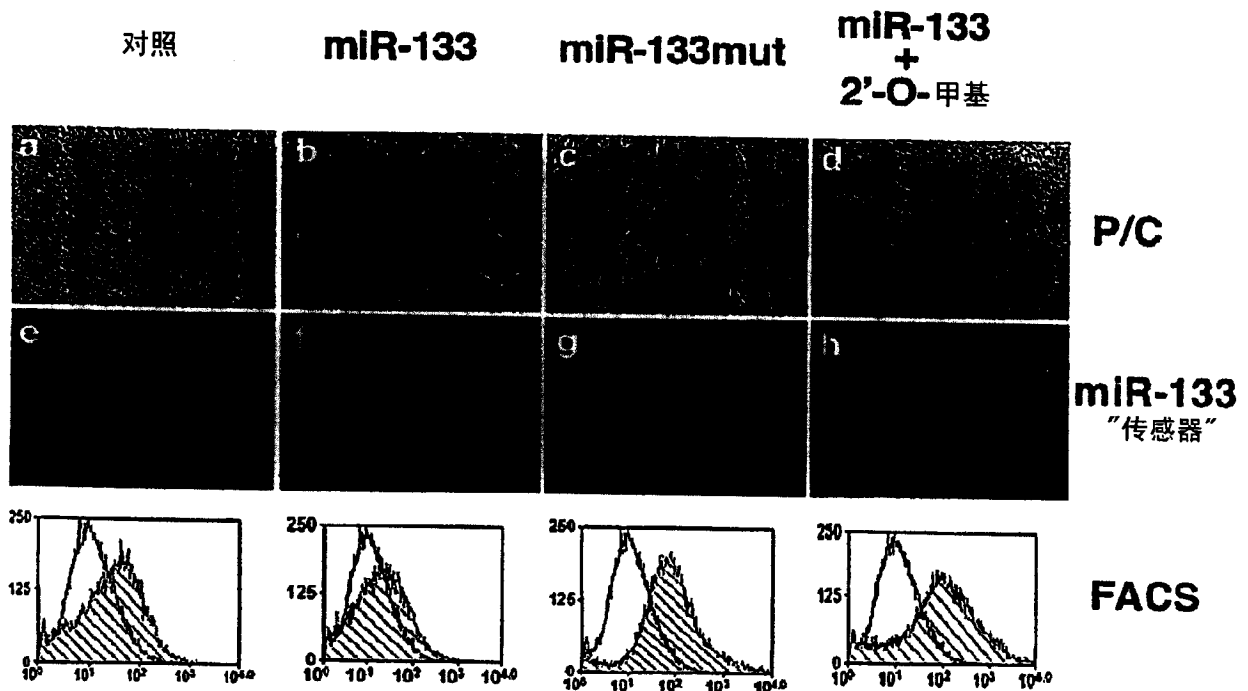


图 11

HDAC4 3' UTR

	3' miR-1 5' SeqID No: 1	3' miR-1 5' SeqID No: 1
	AnguaugAaGaaauGUAAGGu	aUGUauGaaGAAauGUAAGGU
5'	ttttt-cTtttttgAT-CagAACATTCcttc-----tttactggtcACAGcCacgTgctCATTCCAttctt 3'	
人	5'	
熊狸狸	5'	
小鼠	5'	
大鼠	5'	
狗	5'	
鸡	5'	
	ggugugAaGaaUGUAAGGu	ggUGUguGaaGaaauGUAAGGU
	3' miR-206 5' SeqID No: 3	3' miR-206 5' SeqID No: 3

SRF 3' UTR

	mir-133 SeqID No: 2	mir-133 SeqID No:2
3'	u---GucGA-CCAACuUCCcUGGu 5'	3' uUGGACccaCuUcCCcUGGu 5'
5'	g---CtcCTgGGTTgAGGgAACCac 3' ---/-- 5' ttAGCTtacccaAtGGGACCgt 3'	
人	5'	
大鼠	5'	



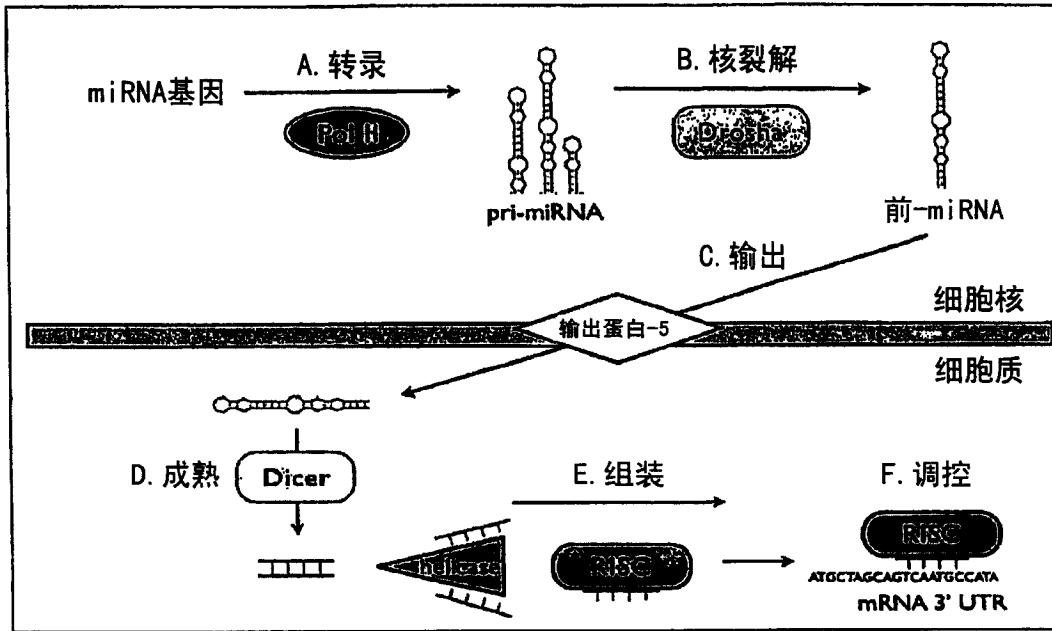


图 13

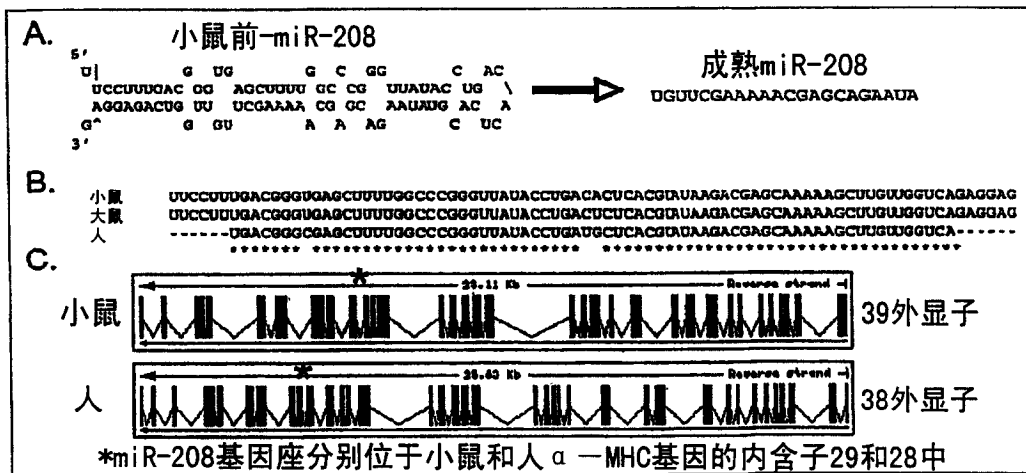


图 14

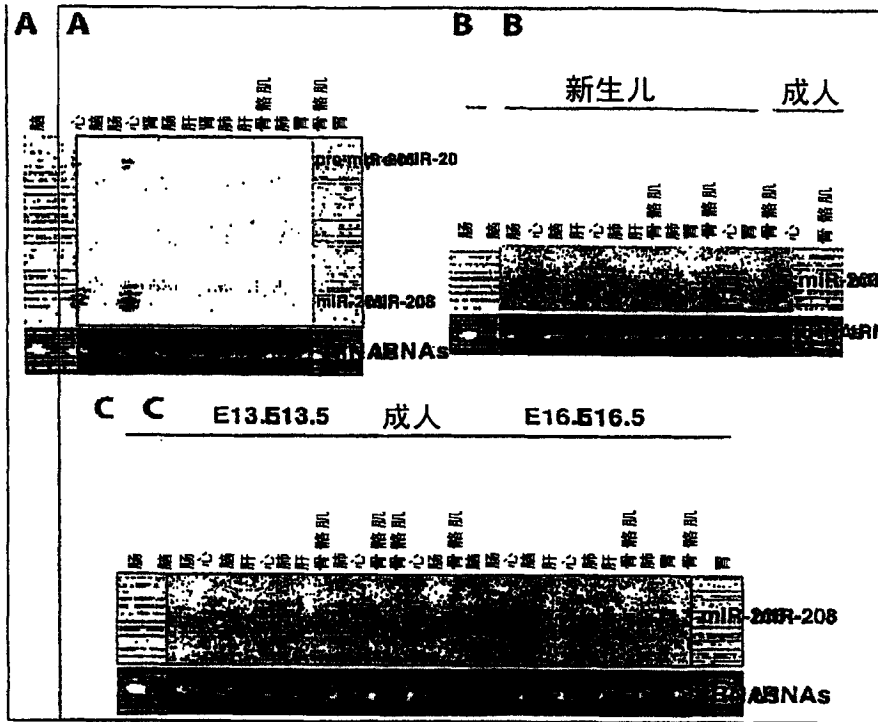


图 15

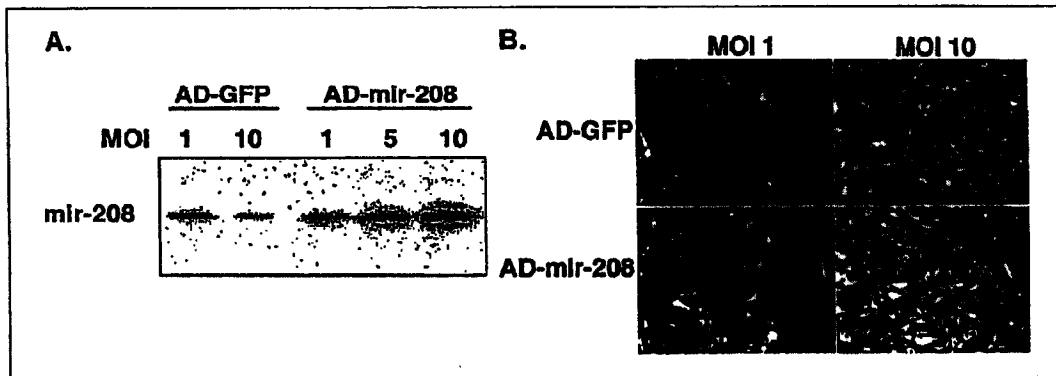


图 16

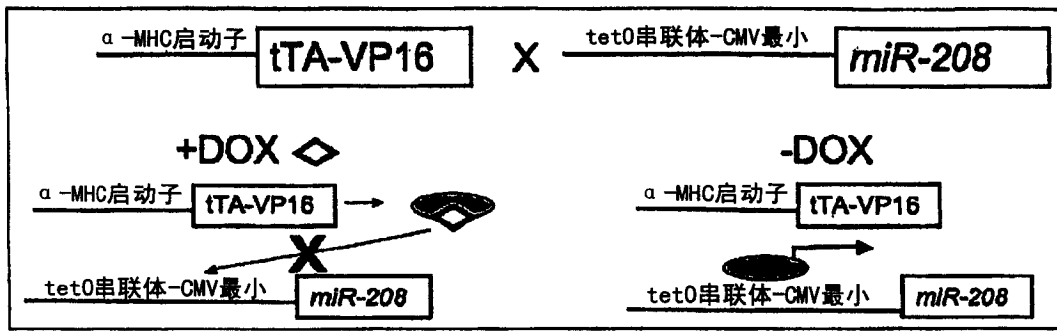


图 17

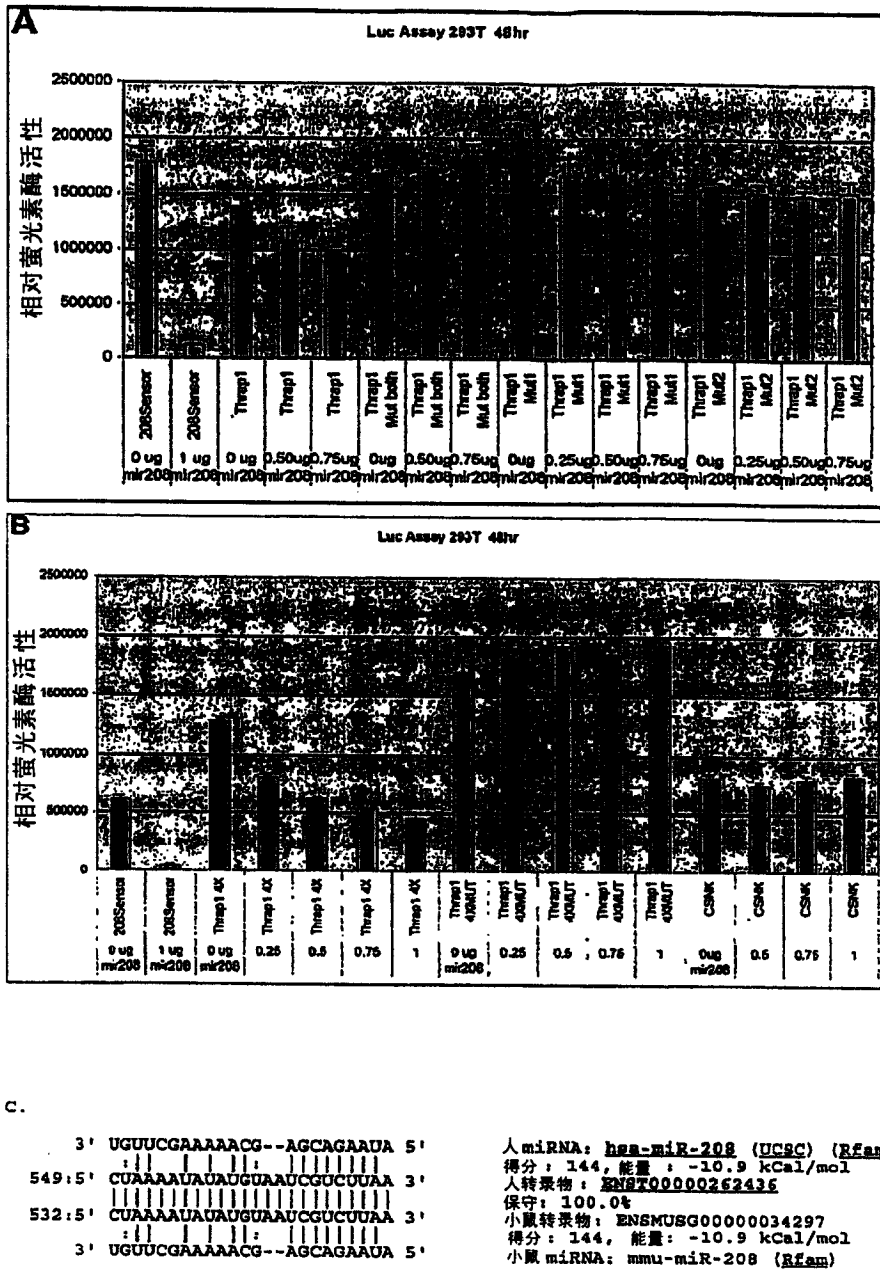


图 18

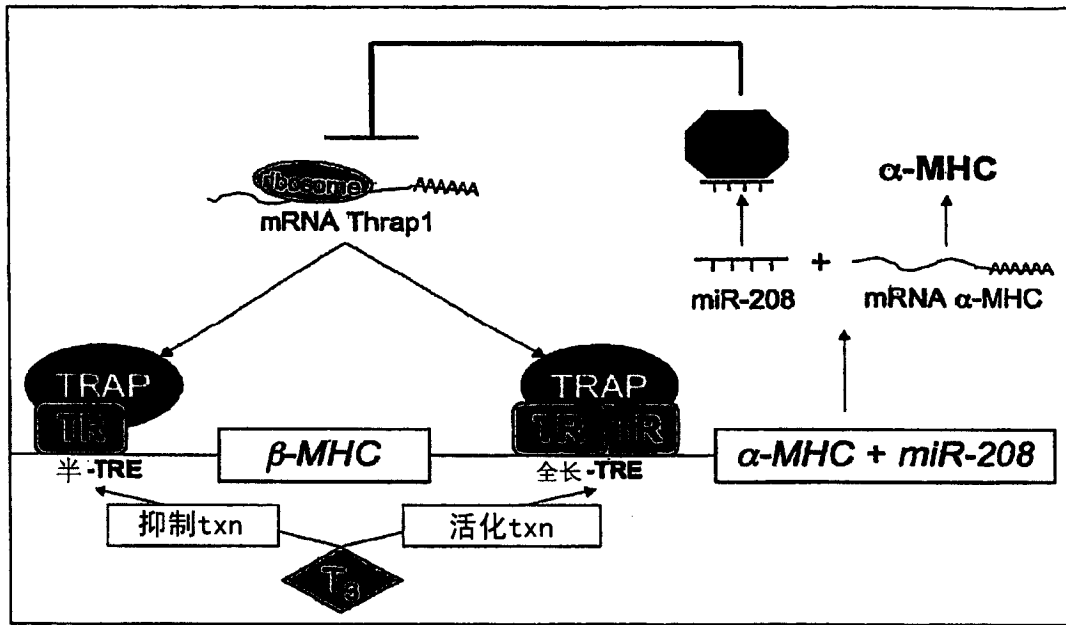


图 19

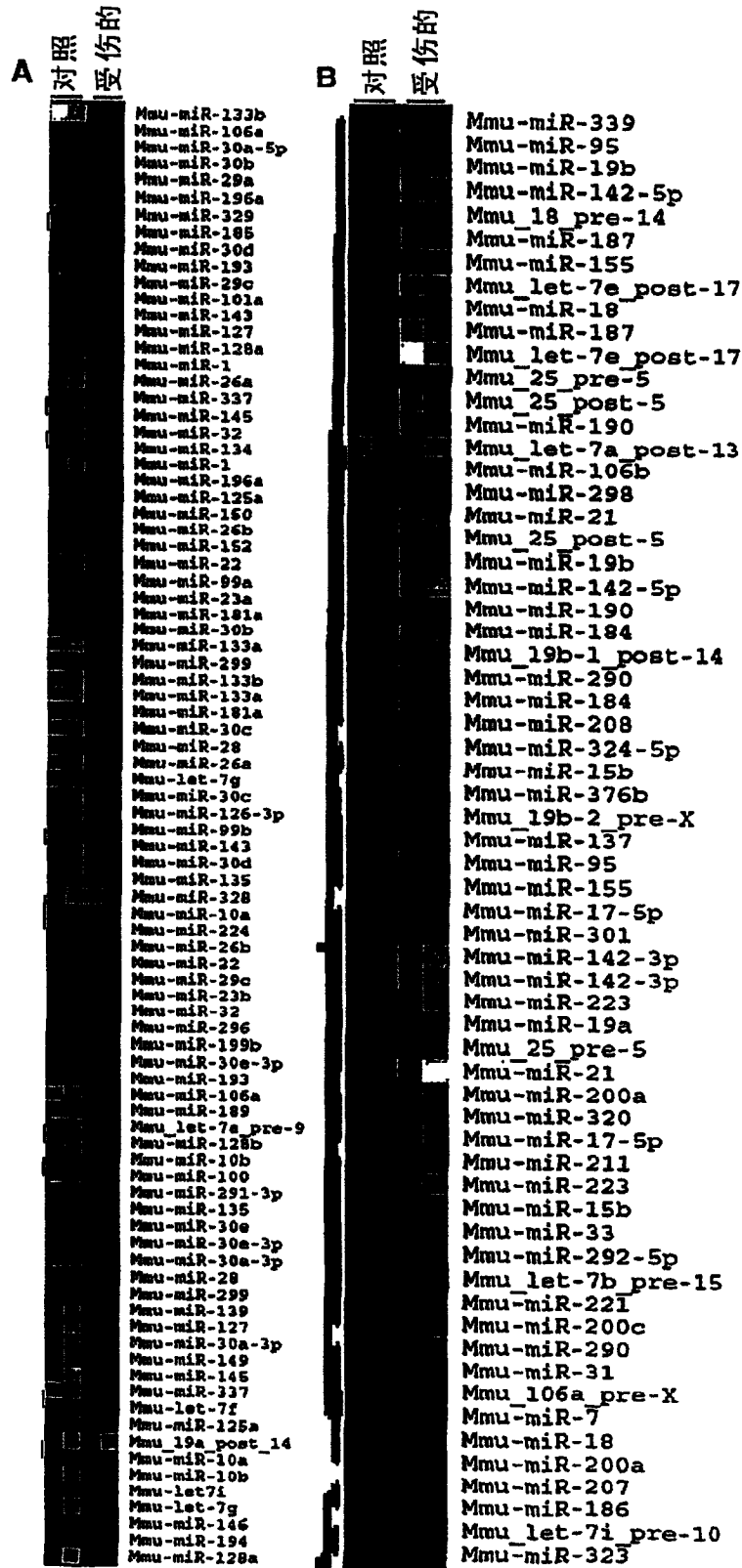


图 20

miR-26 (SEQ ID NO:6)

**mmu-miR-26a MIMAT0000533
UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGC (SEQ ID NO:12)**

**mmu-miR-26b MIMAT0000534
UCAAGUAAUUCAGGAUAGGUU (SEQ ID NO:13)**

miR-29 (SEQ ID NO:7)

**mmu-miR-29a MIMAT0000535
UAGCACCAUCUGAAAUCGGUU (SEQ ID NO:14)**

**mmu-miR-29b MIMAT0000127
UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU (SEQ ID NO:15)**

**mmu-miR-29c MIMAT0000536
UAGCACCAUUUGAAAUCGGU (SEQ ID NO:16)**

miR-30 (SEQ ID NO:8)

**mmu-miR-30a-3p MIMAT0000129
CUUUCAGUCGGAUGUUUGCAGC (SEQ ID NO:17)**

**mmu-miR-30b MIMAT0000130
UGUAAACAUCCUACACUCAGCU (SEQ ID NO:18)**

**mmu-miR-30c MIMAT0000514
UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC (SEQ ID NO:19)**

**mmu-miR-30d MIMAT0000515
UGUAAACAUCCCGACUGGAAG (SEQ ID NO:20)**

**mmu-miR-30e* MIMAT0000249
CUUUCAGUCGGAUGUUUACAG (SEQ ID NO:21)**

miR-128 (SEQ ID NO:9)

**mmu-miR-128a MIMAT0000140
UCACAGUGAACCGGUCUCUUUU (SEQ ID NO:22)**

**mmu-miR-128b MIMAT0000675
UCACAGUGAACCGGUCUCUUUC (SEQ ID NO:23)**

图 21

miR-1在骨骼肌卫星细胞分化过程中逐渐表达

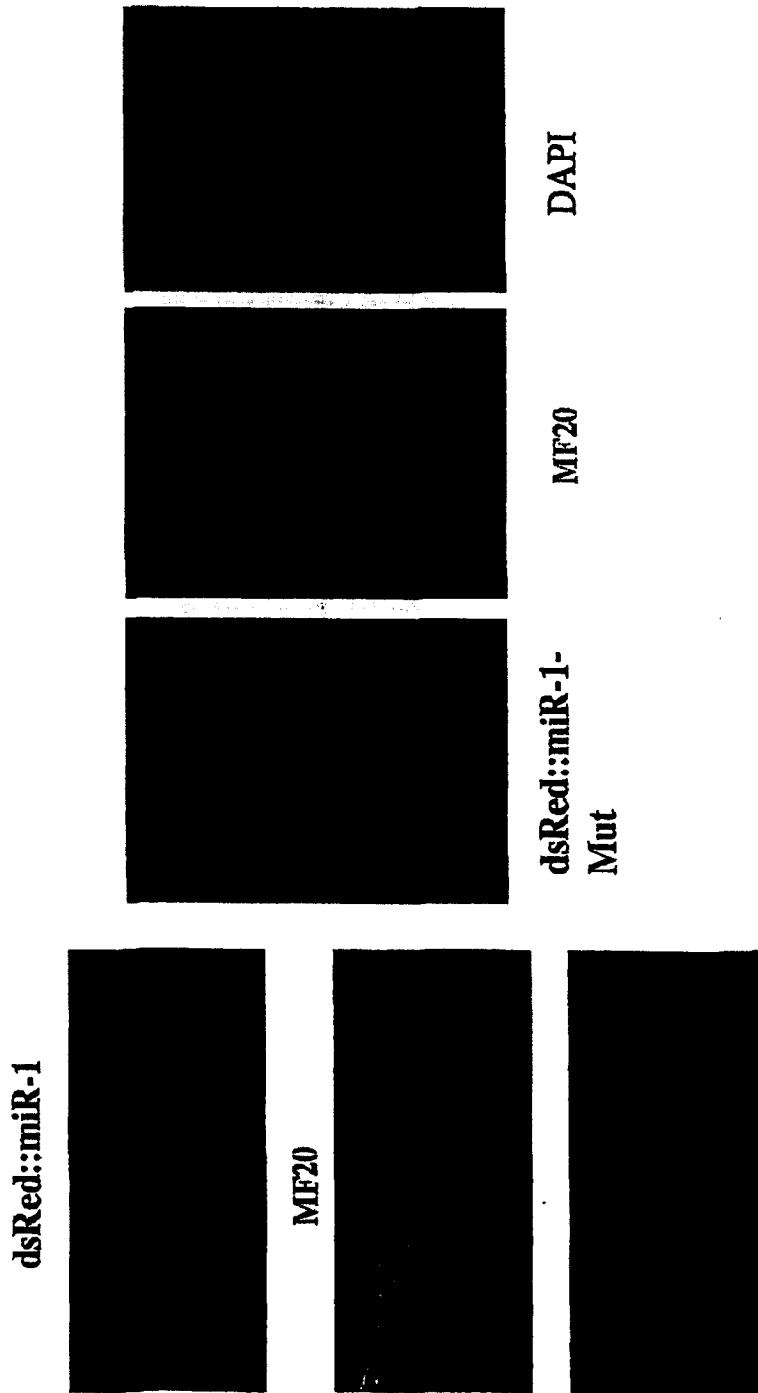


图22

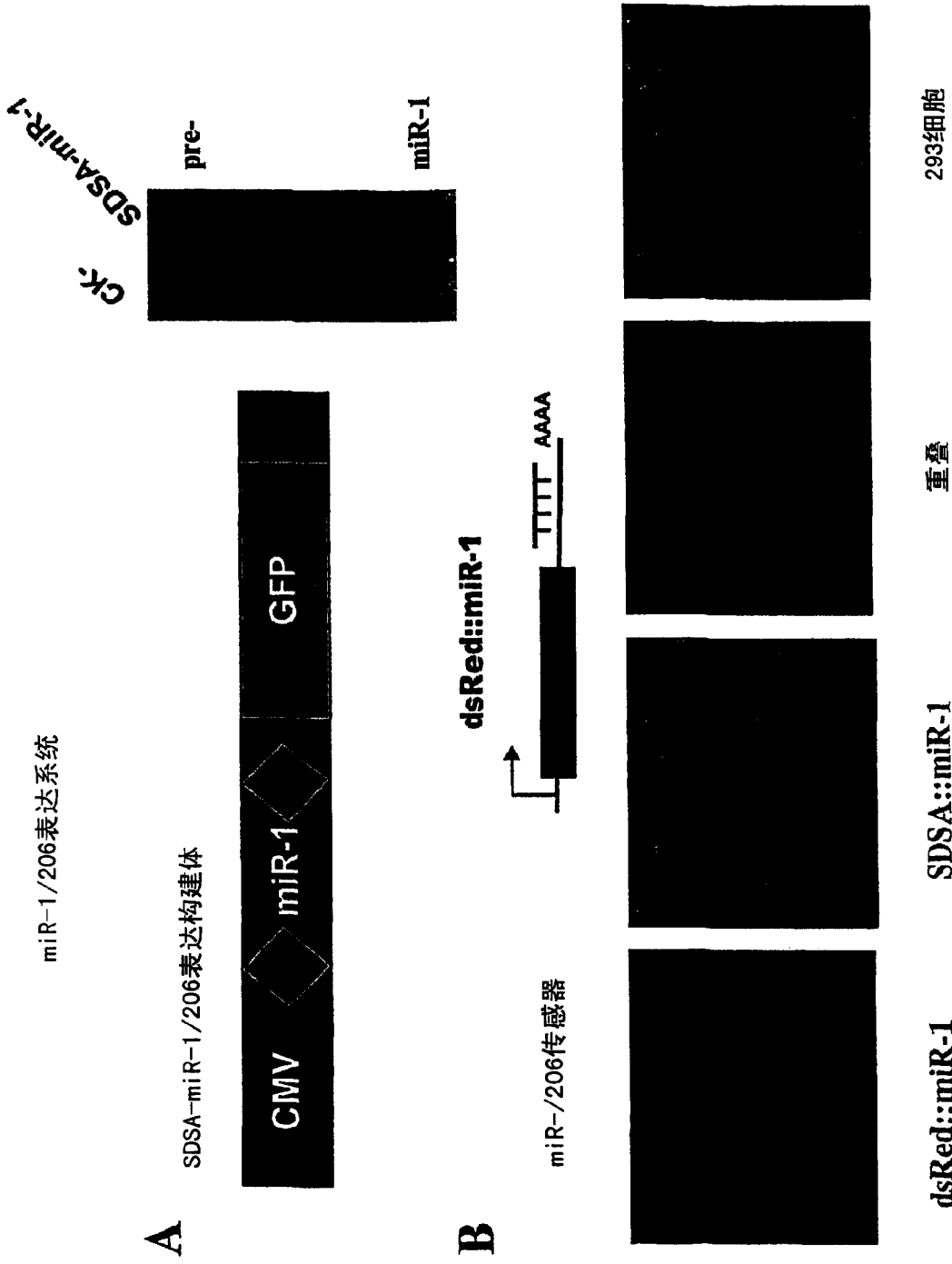


图 23

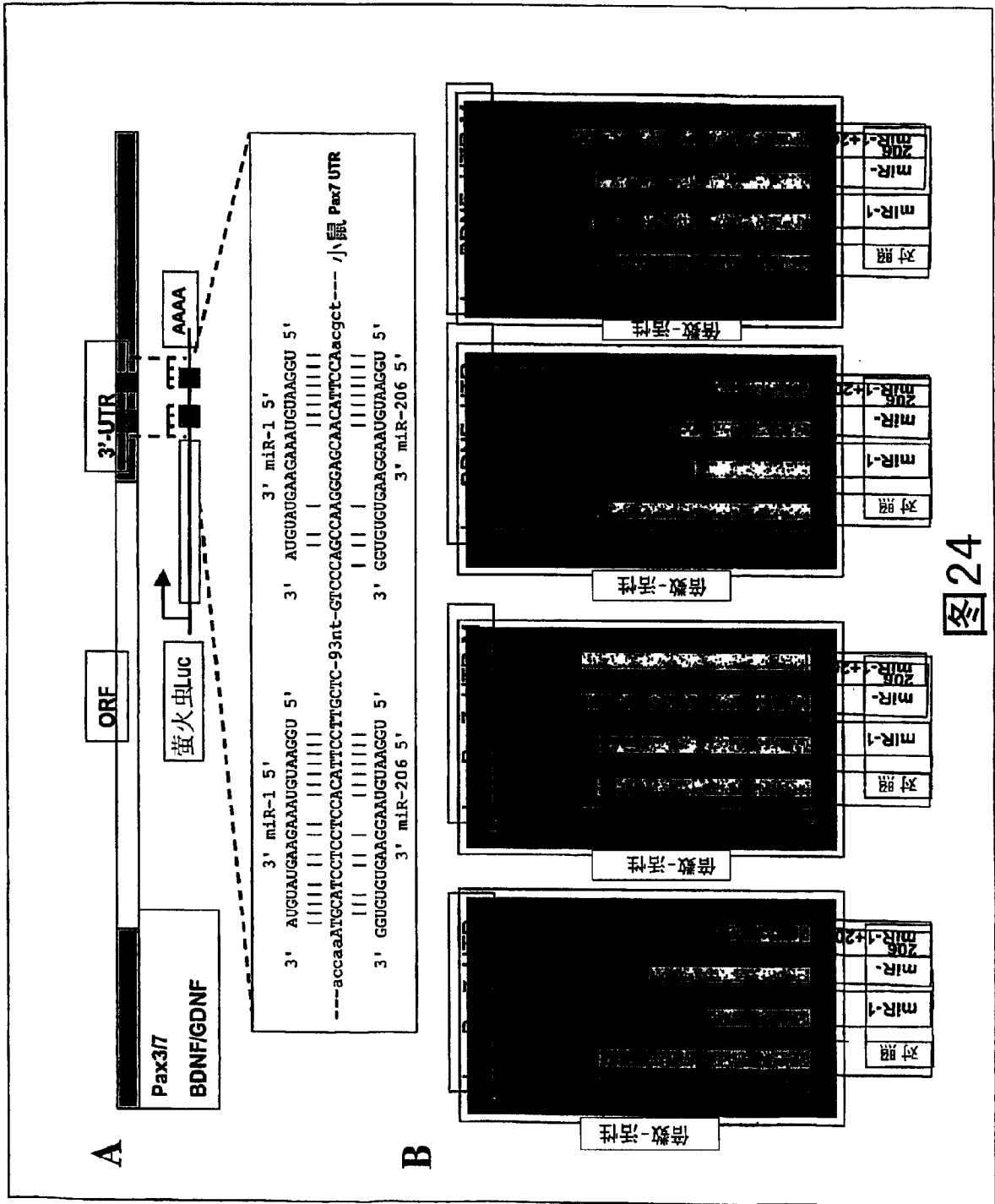


图24

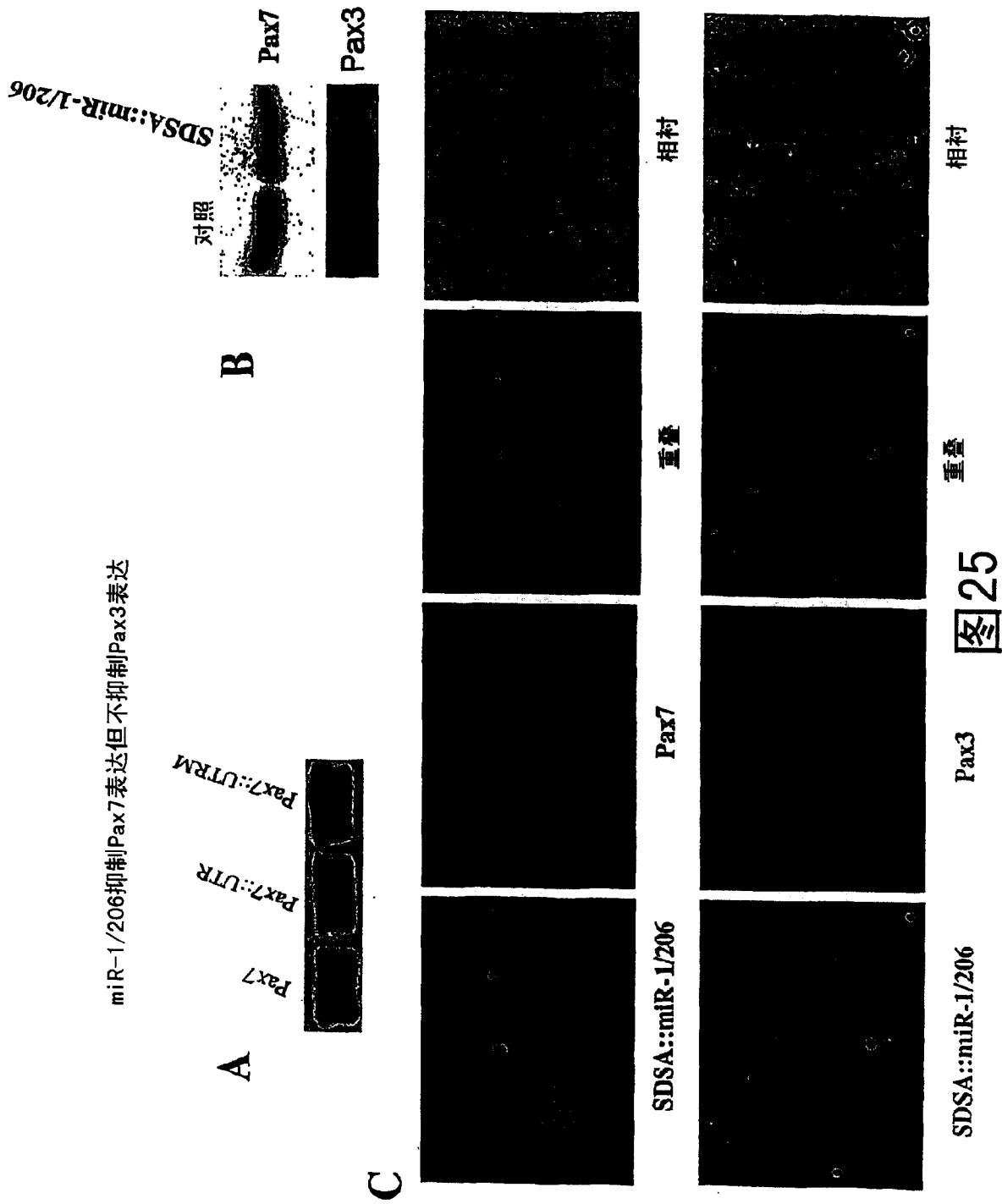


图 25

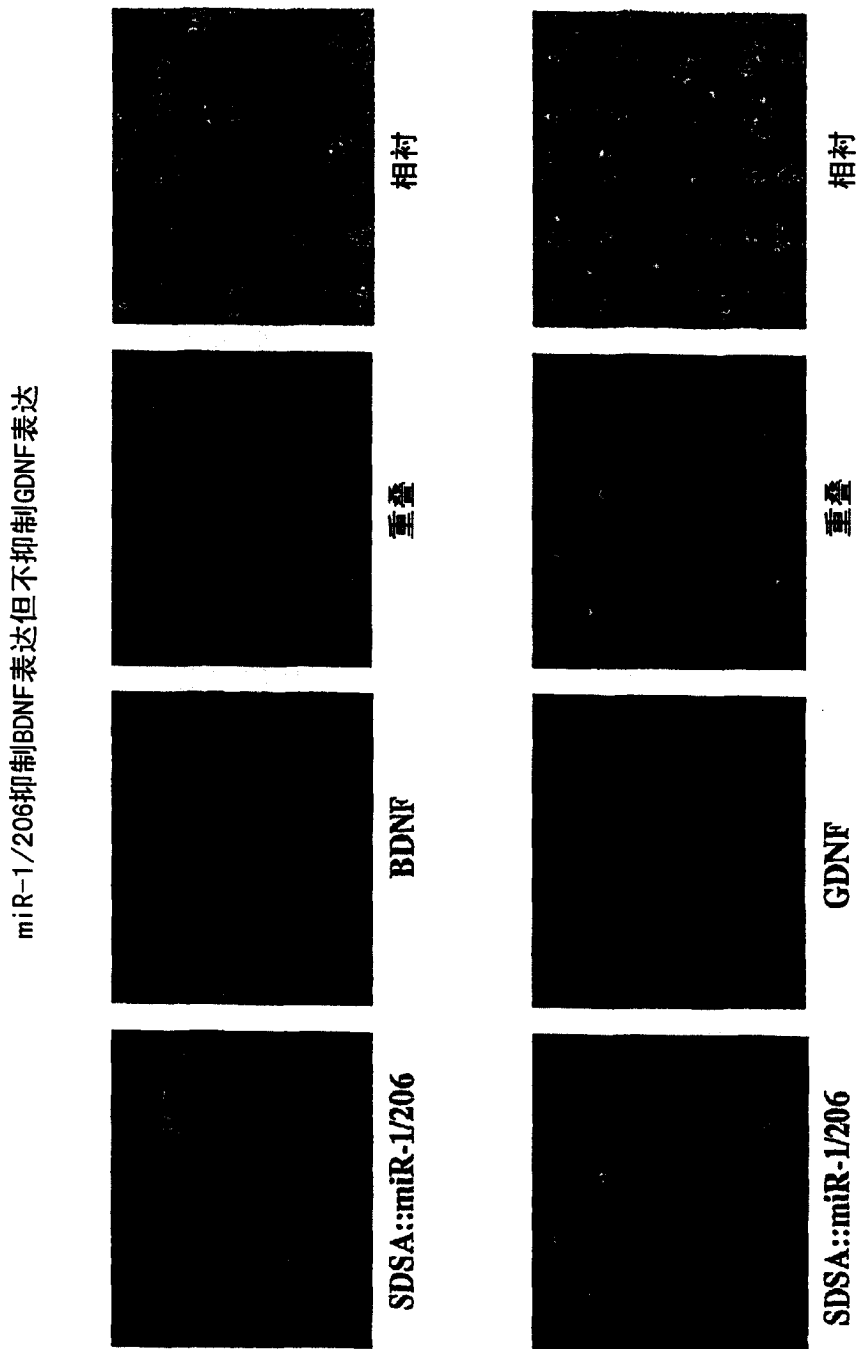
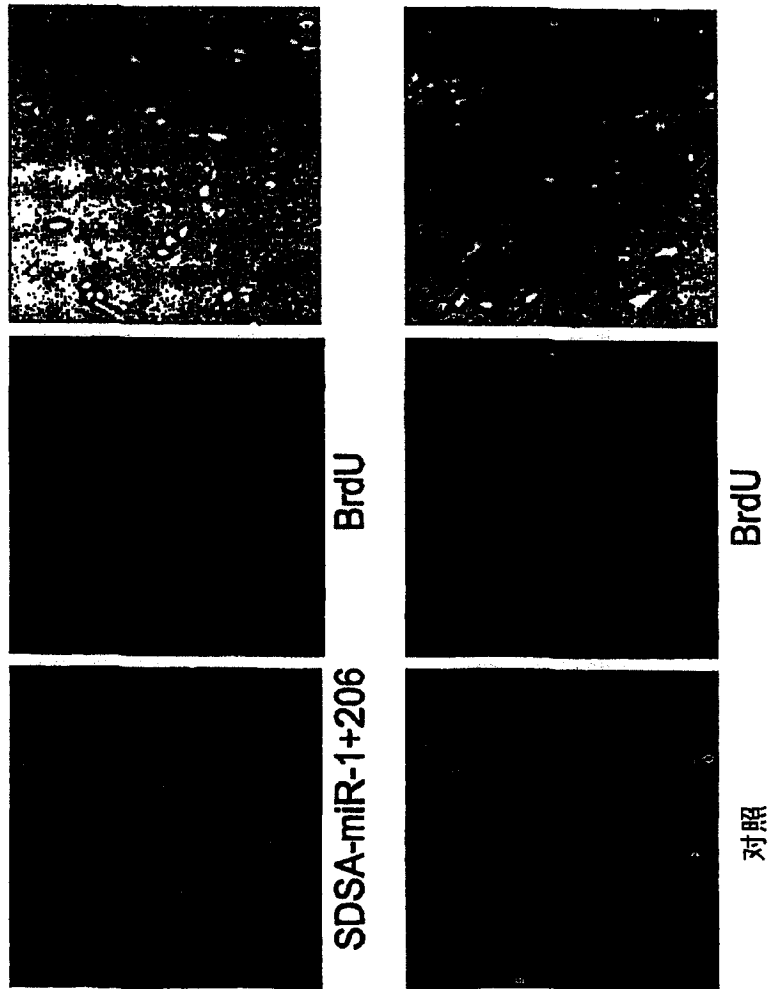


图26

miR-1/206抑制卫星细胞增殖

A



B

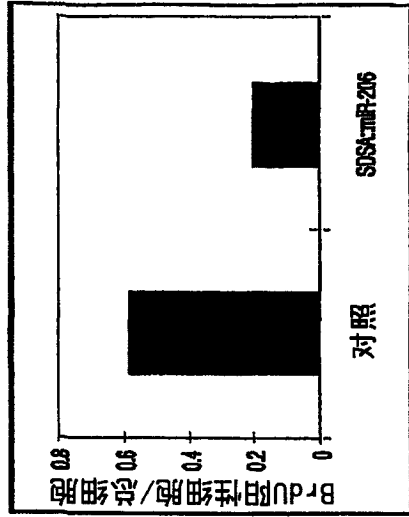


图27

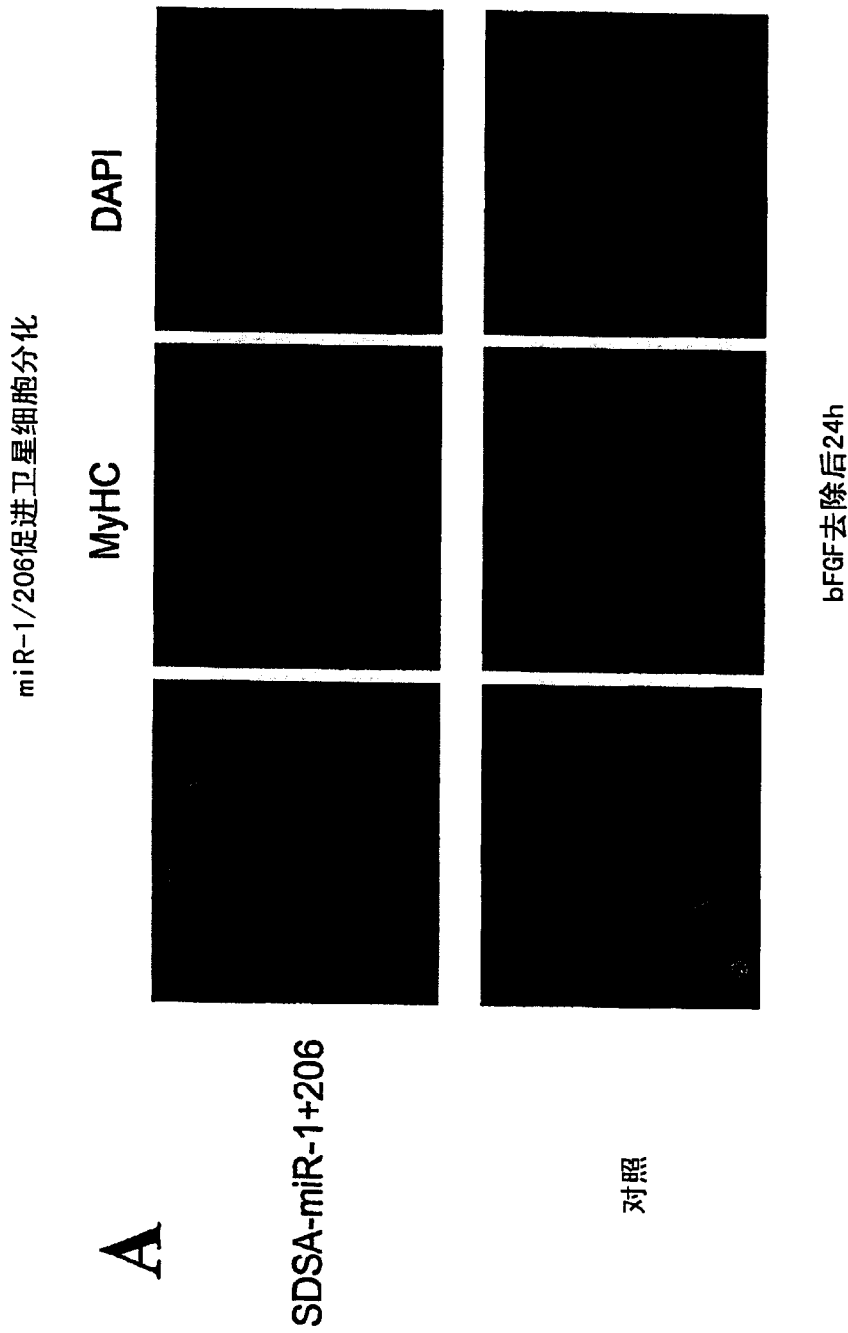


图28

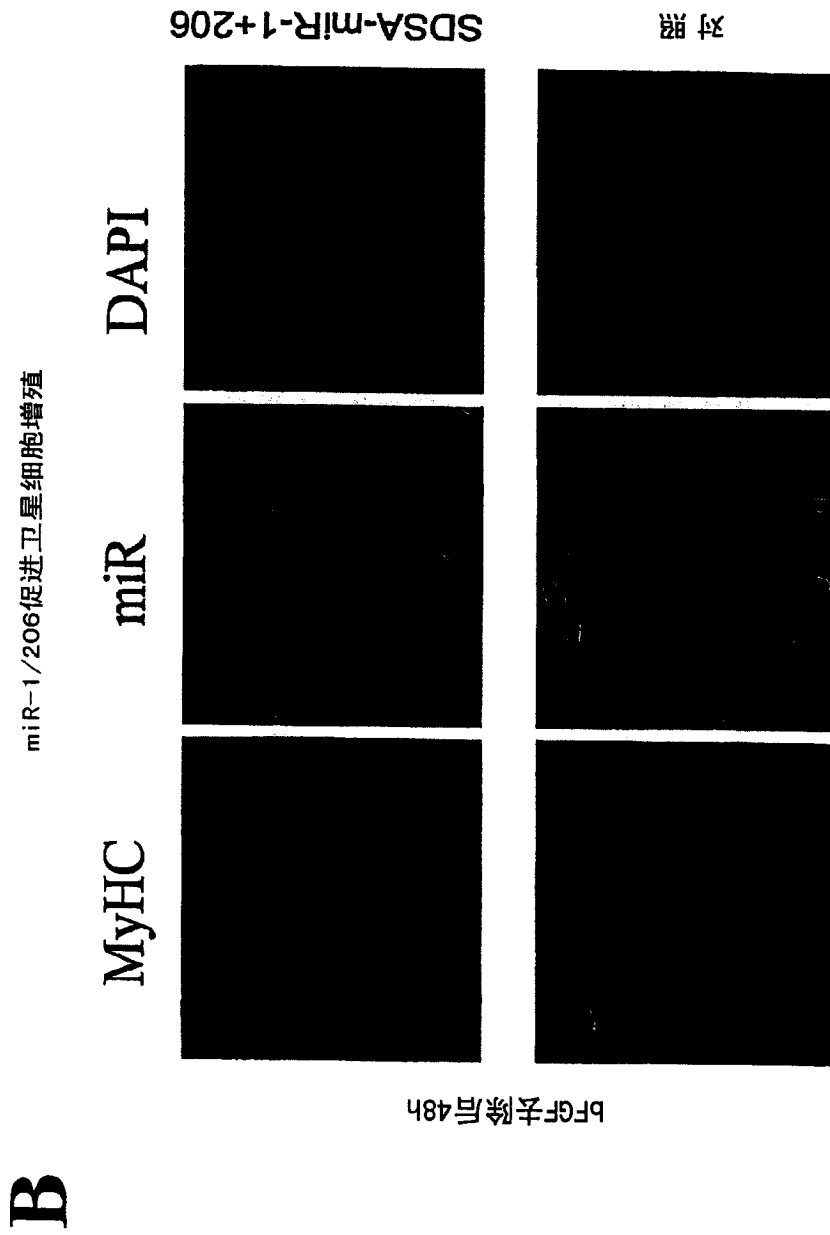


图28

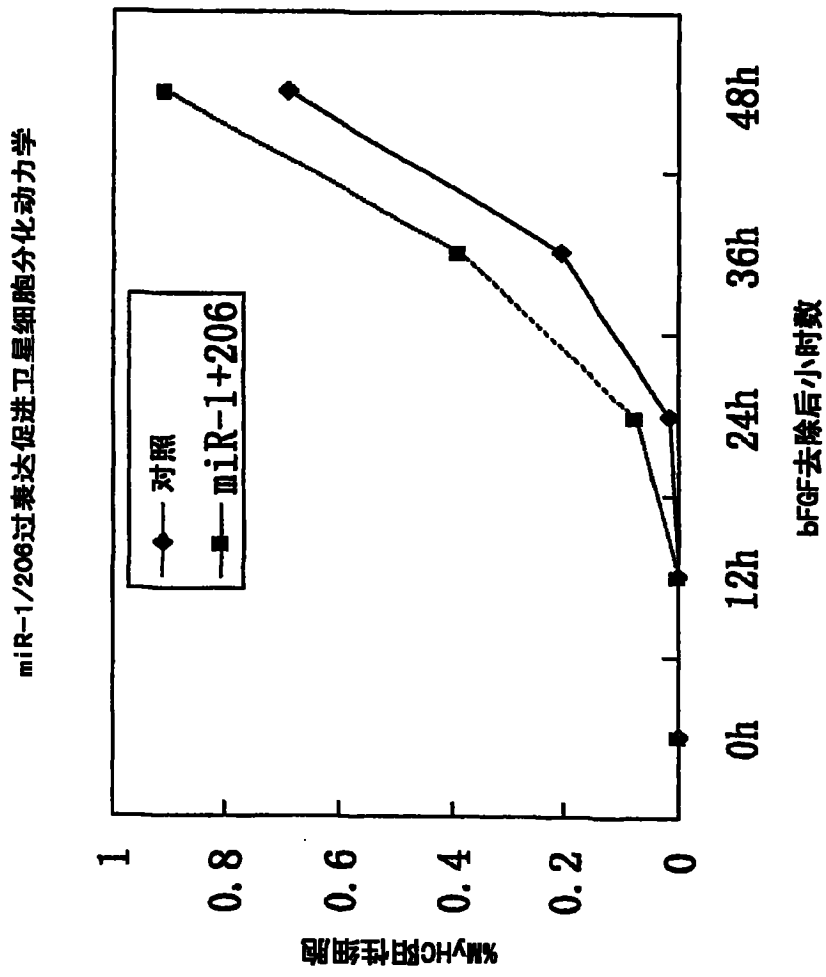


图29

