



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108289929 A

(43)申请公布日 2018.07.17

(21)申请号 201680059070.1

(22)申请日 2016.09.23

(30)优先权数据

15306482.9 2015.09.23 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.04.09

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/072675 2016.09.23

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/071889 EN 2017.05.04

(71)申请人 国家科学研究中心

地址 法国巴黎

申请人 国立健康与医学研究所

法兰西公学院 索邦大学

(72)发明人 阿兰·浦勒昌斯

(74)专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有限公司 11270

代理人 王子晔 姚开丽

(51)Int.Cl.

A61K 38/17(2006.01)

A61P 25/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书22页

序列表15页 附图37页

(54)发明名称

用于治疗神经退行性障碍的同源异型蛋白

(57)摘要

本发明涉及同源异型蛋白或编码所述蛋白的重组载体用于治疗或预防DNA损伤和/或细胞老化的用途。特别地,本发明涉及Engrailed用于治疗帕金森氏病的用途。

1. 同源异型蛋白或其肽衍生物, 用于治疗 and/或预防神经退行性障碍。
2. 根据权利要求1所述的同源异型蛋白或其肽衍生物, 其用途如权利要求1中所限定, 其中, 所述同源异型蛋白选自Engrailed蛋白、Gbx2和Lhx9。
3. 根据权利要求1或2所述的同源异型蛋白或其肽衍生物, 其用途如权利要求1或2中所限定, 其中, 所述神经退行性疾病选自帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化、亨廷顿氏病、肌萎缩性侧索硬化以及影响眼睛或耳朵的退行性疾病。
4. 根据权利要求3所述的同源异型蛋白或其肽衍生物, 其用途如权利要求3中所限定, 其中, 所述神经退行性障碍是帕金森氏病。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的同源异型蛋白或其肽衍生物, 其用途如权利要求1至4中任一项所限定, 其中, 所述同源异型蛋白是Engrailed蛋白。
6. 根据权利要求5所述的同源异型蛋白或其肽衍生物, 其用途如权利要求5中所限定, 其中, 所述Engrailed蛋白直接施用于SNpc区。
7. 根据权利要求1至5中任一项所述的同源异型蛋白或其肽衍生物, 其用途如权利要求1至5中任一项所限定, 其中, 所述同源异型蛋白或其肽衍生物施用一次。
8. 根据权利要求1或2所述的同源异型蛋白或其肽衍生物, 其用途如权利要求1或2中所限定, 其中, 所述同源异型蛋白是Engrailed蛋白, 并且与DNA损伤相关的疾病或障碍是肌萎缩性侧索硬化。
9. 根据权利要求1或2所述的同源异型蛋白或其肽衍生物, 其用途如权利要求1或2中所限定, 其中, 所述同源异型蛋白是Gbx2蛋白, 并且与DNA损伤相关的疾病或障碍是亨廷顿氏病。
10. 根据权利要求1或2所述的同源异型蛋白或其肽衍生物, 其用途如权利要求1或2中所限定, 其中, 所述同源异型蛋白是Lhx9蛋白, 并且与DNA损伤相关的疾病或障碍是亨廷顿氏病。

用于治疗神经退行性障碍的同源异型蛋白

技术领域

[0001] 本发明涉及同源异型蛋白或编码该蛋白的重组载体在治疗或预防与DNA损伤和/或细胞老化相关的病症中的用途,更特别地涉及同源异型蛋白或编码该蛋白质的重组载体在预防和/或治疗与DNA损伤相关的疾病或障碍及与年龄相关的疾病或障碍尤其是神经退行性障碍中的用途。特别地,本发明涉及Engrailed在治疗帕金森氏病中的用途。

背景技术

[0002] 对老化过程的研究是重要的,一部分原因是许多疾病或病症在老年人中更为普遍,这些疾病或病症例如癌症、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、中风、青光眼、心血管疾病(仅仅举一些例子),其中的许多仍然缺乏有效的预防或治疗方法。尽管大量文献有助于理解老化过程,但对该过程的充分理解仍然是一个重大挑战。鉴于世界范围老龄人口的增加以及与此相关的医疗保健负担和花费不断攀升,对老化过程进行研究以使得有效发现用于预防或治疗与年龄相关的疾病或障碍的抗老化剂变得越来越重要。

[0003] 细胞DNA持续受到外源和内源的遗传毒性应激(例如,氧化应激、毒性副产物、线粒体功能降低)的攻击,所述外源和内源遗传毒性应激通过碱基修饰或错误掺入来修饰DNA,从而导致DNA损伤。DNA损伤是DNA结构的物理异常,例如单链和双链断裂。DNA损伤可被特定的酶识别,因而可通过DNA损伤应答(DDR)来正确地修复。丧失该天然DNA修复能力导致遗传不稳定性,这可能导致细胞功能障碍和细胞死亡。已经进一步示出,染色质重塑和DDR途径相互关联,因为DNA损伤诱导染色质变化,而染色质变化本身是进入DNA修复机制所必需的(Soria等,2012,Mol Cell 46,722-734)。

[0004] DNA损伤的积累与老化过程及与年龄相关的疾病的发作相关,所述与年龄相关的疾病包括神经退行性障碍,例如共济失调、阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化、亨廷顿氏病和帕金森氏病(Canugovi等,2013,12,578-587;Madabhushi等,2014,Neuron 83,266-282)。

[0005] 此外,在诸如局部缺血和阿尔茨海默氏病的神经退行性障碍中,神经元表现出异常的细胞周期活性、表达细胞周期标志物例如细胞周期蛋白-A,并经历有限程度的DNA重塑。考虑到人类神经元在发育过程中最终分化并且在这些事件发生之前数十年保持静息(quiescent),该行为是值得注意的。虽然潜在机制尚不清楚,但多条证据表明这些活动在神经元死亡中起着早期促进作用(Andorfer等,2005,J.Neurosci.,1,25,5446-54)。

[0006] 已进一步示出,所述DNA损伤和重新进入细胞周期可构成神经疾病中细胞凋亡的常见途径(Kim和Tsai,2009,Ann NY Acad Sci.,1170,674-9或Pizarro等,2009,Free Radic.Res.,43,985-994)。

[0007] 因此,迫切需要开发能够预防和/或治疗DNA损伤和/或与细胞老化相关的障碍和/或调节细胞周期的促进DNA修复的新治疗剂。

[0008] 同源异型蛋白或同源结构域蛋白是在形态发生所涉及的细胞迁移和分化过程中起主要作用的转录因子。它们的特征在于存在60个氨基酸的序列,即同源结构域,其为具有

螺旋/转角/螺旋结构的DNA结合结构域。已经表明,果蝇的触角足蛋白的分离的结构域跨越培养的神经元的膜,在细胞核中累积并促进神经突生长(EP0485578)。同源结构域高度保守并为大量同源异型蛋白赋予内化特性(Spatazza等,2013,Pharmacol.Rev.65,90-104)。

[0009] Engrailed蛋白(Engrailed-1和Engrailed-2)是具有相似生物活性的同源异型蛋白,在下文中统称为一般术语Engrailed(EN用于人或者En1/2用于小鼠)。在新生儿和成体中,Engrailed在小脑颗粒细胞和中脑多巴胺能(DA)核中表达,所述中脑多巴胺能核包括黑质致密部(在帕金森氏病中退化的SNpc)和腹侧被盖区(VTA)。En1/2在中脑和在在中脑中的中脑多巴胺能(mDA)神经元的发育中起着重要作用(Joyner,1996,Trends Genet 12,15-20)。En1/2对位于中脑的SNpc和腹侧部分的VTA中的成体mDA神经元的存活也起着重要作用(Alberi等,2004,Development 131,3229-3236),因此提出En1/2用于预防或治疗帕金森氏病中DA神经元的丧失。在WO 2013/128239中,据报道,通过在中脑中输注来局部施用En1/2增加了DA神经元的DA合成及相关运动活性。Prochiantz等(2011,FEBS Letters,278,52 (Abstract,Brunet等,Nature 438:94-98,2005和Alvarez-Fisher等,Nature Neurosci 14:1260-1266,2011)报道了Engrailed不仅是转录因子,而且是翻译调节因子,其增强在核中转录的线粒体mRNA的翻译,并且表明Engrailed转导使两种线粒体复合物I的蛋白Ndufs1和Ndufs3的翻译上调并增加ATP合成(另参见Alvarez-Fischer等,2011,Nature Neuroscience,14,1260-1266,Stettler等,2012)。或者,W02007/099227表明,向小鼠全身施用En1/2诱导了纹状体中DA周转率增加,这反映为DA代谢物3,4-二羟基苯基乙酸(DOPAC)的产生增加而多巴胺水平未发生改变。

[0010] Otx2(orthodenticle同系物2)是含有bicoid型同源结构域的另一同源异型蛋白(Simeone等,1993,EMBO J 12,2735-2747)。它属于Otx蛋白家族,在脑胚胎发生过程中起着主要作用(Acampora等,1995;Simeone等,2002)。还已经表明,Otx2参与视网膜形成和成体视网膜神经节细胞存活及生理学(Bernard等,2013;Torero Ibad等,2011)。因此提出了使用bicoid家族、特别是Otx家族的同源异型蛋白例如Otx2来改善体外培养的成体视网膜神经节神经元(RGC)的存活以及在体内预防或治疗RGC退化(WO 2009/106767)。

发明内容

[0011] 发明人现已表明,同源异型蛋白能够保护细胞免受DNA损伤和染色质重塑、减少DNA链断裂的数量、恢复所有核和核仁异染色质标记、调节细胞周期并保护细胞免受老化样兴奋毒性(包括细胞凋亡)。特别地,他们表明,Engrailed在被施用于SNpc区时能够修复由强氧化应激引起的导致细胞死亡的损伤。特别地,Engrailed通过恢复异染色质标记(包括核仁完整性)以及通过消除急性氧化应激模型中的双链断裂来激活抗凋亡途径并促进长期存活。这些结果使得可以提出在发生DNA损伤的病理学中(例如,在帕金森氏病中)使用同源异型蛋白,特别是Engrailed。

[0012] 根据本发明,术语“DNA损伤”总体上涵盖DNA损伤、DNA链(单链和双链)断裂以及核和核仁异染色质破坏。

[0013] 因此,本发明涉及至少一种同源异型蛋白或其肽衍生物在治疗或预防DNA损伤和/或细胞老化中的用途。本发明进一步涉及至少一种同源异型蛋白或其肽衍生物在治疗或预防与DNA损伤和/或细胞老化相关的病症中的用途,并且更特别地在预防和/或治疗与DNA损

伤相关的疾病或障碍和与年龄相关的疾病或障碍中的用途。

[0014] 或者,本发明涉及编码所述蛋白质或肽的重组载体在治疗或预防DNA损伤和/或细胞老化和在治疗或预防与DNA损伤和/或细胞老化相关的病症中的用途,并且更特别地在预防和/或治疗与DNA损伤相关的疾病或障碍以及与年龄相关的疾病或障碍中的用途。

[0015] 本文所使用的术语“同源异型蛋白”和“同源结构域蛋白”是同义的,并且是指在本领域中通常以这些定义已知的基因产物、蛋白质和多肽。这些术语涵盖发现的任何生物体的这样的基因产物、蛋白质和多肽,所述生物体特别是动物,优选脊椎动物,更优选哺乳动物,包括非人哺乳动物,甚至更优选人。更特别地,“同源异型蛋白”涉及包含同源结构域的蛋白质。同源异型蛋白包括天然的同源异型蛋白和重组的同源异型蛋白或合成的同源异型蛋白。

[0016] 本发明涵盖包括等位基因的天然的同源异型蛋白、以及非天然变体、合成的同源异型蛋白、其片段,以及涉及同源异型蛋白的全部或部分的融合蛋白、其片段或变体。优选地,本发明的同源异型蛋白包含全长同源结构域。根据特定实施方案,本发明的同源异型蛋白包含与转录阻遏结构域融合或者在一些情况下与激活结构域融合的分离的同源结构域(融合蛋白)。阻遏结构域或激活结构域可以来自与同源结构域相同的蛋白质、同源异型蛋白家族的另一种蛋白质或并非来自同源异型蛋白家族的蛋白质。融合蛋白不同于全长的同源异型蛋白。

[0017] 除了可能存在于群体中的同源异型蛋白实体的天然等位基因变体之外,本领域技术人员将进一步理解,可以通过采用经典或重组技术进行突变来引入变化(即,一个或更多个氨基酸的一个或更多个缺失、添加和/或替换)以产生随机诱变或靶向诱变。用于本发明的合适的变体优选地具有与相应的天然同源异型蛋白的氨基酸序列具有高度同源性的氨基酸序列。在一个实施方案中,用于本发明的变体同源异型蛋白的氨基酸序列与相应的天然序列具有至少70%、至少约75%、至少约80%、至少约90%、优选至少约95%、更优选至少约97%、甚至更优选至少约99%的一致性。

[0018] 氨基酸(或核酸)序列之间的一致性百分比可以使用本领域技术人员已知的标准方法来确定。例如,为了确定两条氨基酸序列之间的同源性百分比,将序列进行比对以达到最佳比较目的。然后比较在相应氨基酸位置处的氨基酸残基。可以在一条或两条氨基酸序列中引入空位以实现最佳比对,而且为了比较的目的可以忽略非同源序列。当第一序列中的位置被与第二序列相应位置处的氨基酸残基相同的氨基酸残基占据时,则在该位置处,这两条序列是一致的。考虑进为了最佳比对而引入的空位的数量和每个空位的长度,两条序列之间的一致性百分比是由这两条序列共有的相同位置的数量的函数。两条序列之间的序列比较和一致性百分比及相似性可以使用数学算法来确定。

[0019] 用于本发明的同源异型蛋白的合适的变体具有生物学活性并且保留本文所述的与相应的天然同源异型蛋白相关的活性中的至少一种。优选地,保留了对DNA损伤和/或染色质改变的作用,但是天然的同源异型蛋白的给定功能可能在某种程度上受到正面或负面影响,例如,变体表现出降低的生物学活性。为给定功能所必需的氨基酸可以通过本领域中已知的方法来鉴定,例如通过定点诱变来鉴定。例如,在一类功能性变体中,一个或更多个氨基酸残基被保守地替换。在“保守性氨基酸替换”中,天然多肽中的氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基所替代。在本领域中,已经对具有相似侧链的氨基酸残基家族进行了

定义。通常,当彼此替代在以下之间进行时,认为替换是保守性的:脂肪族氨基酸Ala、Val、Leu和Ile;羟基残基Ser和Thr;酸性残基Asp和Glu;酰胺残基Asn和Gln;碱性残基Lys和Arg;或芳香族残基Phe和Tyr。

[0020] 根据本发明使用的蛋白质可以通过本领域技术人员已知的常规技术来制备,特别是通过在合适的细胞体系(真核细胞体系或原核细胞体系)中表达重组DNA或者通过固相或液相合成来制备。更具体地,蛋白质及其衍生物通常由包含编码该蛋白质的序列的DNA多核苷酸产生,该DNA多核苷酸通过本领域技术人员已知的任何方式获得,包括通过PCR或RT-PCR扩增核酸序列、通过与同源探针杂交来筛选基因组DNA文库或者全部或部分化学合成。利用本领域中已知的常规重组DNA和基因工程技术构建重组载体并将其导入宿主细胞中。将DNA多核苷酸克隆到真核或原核表达载体中,并通过任何合适的手段、特别是通过亲和层析来纯化经重组载体修饰的细胞中产生的蛋白质。肽及其衍生物通常根据最初由Merrifield等描述的Fmoc技术(J. Am. Chem. Soc., 1964, 85: 2149-2154)固相合成并通过反相高效液相色谱来纯化。

[0021] 根据更优选的实施方案,所述术语指包含如下氨基酸序列(同源结构域)的蛋白质和多肽:

[0022] RRRKRTA-YTRYQLLE-LEKEFLF-NRYLTRRRRIELAHSL-NLTERHIKIWFQN-RRMK-WKKEN[典型的插入位点以破折号示出](SEQ ID NO:1)(参见<http://homeobox.biosci.ki.se/>)。

[0023] 可用于本发明的同源异型蛋白的非限制性实例包括在成体神经元的不同亚组中表达的全部同源异型蛋白,例如:Engrailed蛋白(Engrailed-1或Engrailed-2);来自bicoid家族特别是Otx亚家族的同源异型蛋白,如Otx2;来自配对家族(Pax)、Lhx家族的蛋白质,例如Lhx9和Gbx2。

[0024] 同源异型蛋白基因序列及推导出的氨基酸序列在本领域中是公知的并且可得自序列数据库。

[0025] 示例性En1/2蛋白或多肽包括但不限于具有如下氨基酸一级序列(SEQ ID NO:2)的小鼠En1/2蛋白或多肽:

[0026] musEn1:NP_034263(401aa)

[0027]

MEEQQPEPKSQRDSGLGAVAAAAPSGLSLSLSPGASGSSGSDGDSVPVSPQPAPPSPPAAPCLPPLAHHPLPPHPP
 PPPPPPPPPQHLLAAPAHQPQPAALHRTTNFF IDNILRPDFGCKKEQPLPQLLVA SAAAGGGAAAGGSRVERDRG
 QTGAGRDPVHSLGTRASGAASLLCAPDANCGPPDGSQPATAVAGAGASKAGNPA AAAAAAAAAAAAAVAAAAAASKP
 SDSGGGSGGNAGSPGAQGAKEFPEHNPA1LLMGSANGGPVVKTDSSQQPLVWPAWVYCTRYSDRPSSGPRTRK LKKKK
 EKEDKRPRTAFTAELQLRLKAEFQANRYITEQRRQTLAQELSLNESQIKIWFQNKRAKIKKATG IKNGLALHLMAQG
 LYNHSTTTVQDKDESE

[0028] 示例性的Gbx2蛋白或多肽包括但不限于具有如下氨基酸一级序列(SEQ ID NO:3)的小鼠Gbx2蛋白或多肽:

[0029] musGbx2:NP_034392(最长变体,348aa)

[0030] MSAAFPPSLMMQRPLGSSTAFSIDS LIGSPPQPSPGHFVYTGYPMPYRPVVLPPPPPPPPALPQAA
 LQPALPPAHPHHQIPSLPTGFCSSLAQGMALTSTLMATLPGGFSASPQHQA AAAAAARKFAPQLPGGGNFDKAEALQA
 DAEDGKAFLAKEGSLLAFAAEAVQASLVGAVRGQGKDESKVEDDPKGKEESFSLESDVDYSSDDNLPQTAKHEED

PGHALEETPQSGGAAGSTTSTGKNRRRRRTAFTSEQLLELEKEFHCKKYLSTLTERSQIAHALKLSEVQVKIWFQNRRA
KWKRKAGNANSKTGEP SRNP KIVVPIPVHVS RFAIRS QHQLEQARP

[0031] 示例性的Lhx9蛋白或多肽包括但不限于具有如下氨基酸一级序列(SEQ ID NO:4)的小鼠Lhx9蛋白或多肽:

[0032] musLhx9:NP_001036042(最长变体,397aa)

[0033] MEIVGCRAENNSCFRPPAMLFHG I SGGHI QG IMEEMERRSKTEARLTKGTQLNGRDAGMPPLSPEKPA
LCAGCGGKISDRYLLAVDKQWHLRCLKCCECKLALESELTCFAKDGSIYCKEDYRRFSVQRCARHLGISASEMV
MRARDSVYHLSCFTCSTCNKTLTTGDHFGMKDSLVCRAHFETLLQGEYPPQLSYTELAAKSGGLALPYFNGTGTVQ
KGRPRKRKSPALGVDIVNYNSGCNENEADHLDRDQQPYPPSQTKRMRTSFKHHQLRTMKSYFAINHNPDADLK

[0034] 示例性的En1蛋白或多肽包括但不限于具有如Genbank登记号AAA53502.2或NCBI NP_001417.3所示出的氨基酸一级序列的人EN1蛋白或多肽。

[0035] 示例性的En2蛋白或多肽包括但不限于具有如Genbank登记号AAA53504.2或NCBI NP_001418.2所示出的氨基酸一级序列的人EN2蛋白或多肽。

[0036] 示例性的Gbx2蛋白或多肽包括但不限于具有如Genbank登记号EAW71084.1所示出的氨基酸一级序列的人Gbx2蛋白或多肽。

[0037] 示例性的Lhx9蛋白或多肽包括但不限于具有如Genbank登记号NP_001014434.1或NP_064589.2所示出的氨基酸一级序列的人Lhx9蛋白或多肽。

[0038] 根据本发明的一个优选实施方案,所述同源异型蛋白是Engrailed蛋白(Engrailed-1或Engrailed-2)或包括与阻遏结构域或激活结构域相融合的共同源结构域的融合蛋白。融合的结构域可以来自Engrailed蛋白或另一种蛋白质,例如上文所定义的同源异型蛋白。Engrailed阻遏结构域可以是位于Engrailed-1氨基酸序列的第1至298位或其亚结构域例如eh1结构域(Engrailed-2氨基酸序列的第46至67位)的结构域。

[0039] 根据本发明的另一优选实施方案,所述同源异型蛋白不同于Engrailed蛋白(Engrailed-1或Engrailed-2)和bicoid家族的同源异型蛋白。根据本发明的另一优选实施方案,所述同源异型蛋白是如上所定义的包含与阻遏结构域相融合的同源结构域的融合蛋白。

[0040] 根据本发明的另一优选实施方案,所述同源异型蛋白是脊椎动物的同源异型蛋白。

[0041] 根据本发明使用的同源异型蛋白或相关核酸编码序列能够在体内保护细胞免受DNA损伤,特别是DNA链断裂,特别是DNA双链断裂(DSB);形成和染色质重塑,特别是染色质松弛,尤其是那些由应激因子或老化诱导的那些。应激因子特别是指氧化应激或兴奋毒性应激。

[0042] 同源异型蛋白对DNA损伤的作用不限于神经元或特定类型的神经元(例如,中脑DA神经元或RGC),因此可以应用于其他类型的细胞,例如运动神经元、成纤维细胞、上皮细胞。

[0043] 本文所使用的术语“与DNA损伤相关的障碍”包括神经退行性障碍和疾病,例如因暴露于氧化应激、致癌物、毒素、诸如氧自由基的自由基或诸如电离辐射和UV辐射的DNA损伤性辐射引起的DNA损伤所导致的癌症、老化及其他障碍。虽然实施本发明并不要求理解机制,但是认为施用本发明的同源异型蛋白防止DNA损伤、抑制DNA损伤的作用、减少DNA链断裂的数量和/或刺激对DNA损伤的细胞修复应答。

[0044] 根据特定实施方案,DNA损伤可以呈染色体功能障碍例如DNA链断裂或DNA化学修饰(例如,烷基化)的形式。根据优选的实施方案,DNA损伤是指DNA链断裂,包括单链和双链断裂,优选双链断裂。

[0045] 根据优选的实施方案,术语“与DNA损伤相关的障碍”涉及神经退行性病症,包括共济失调、阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化、亨廷顿氏病和帕金森氏病。然而,重要的病理特征是DNA损伤。因此,抑制或限制DNA损伤和/或减少DNA链断裂的量提供了用于减少神经元细胞死亡和/或治疗/预防与DNA损伤相关的神经障碍的方法。

[0046] 因此,根据特定实施方案,本发明涉及至少一种同源异型蛋白或其肽衍生物或编码所述蛋白质/肽的重组载体在制备用于抑制神经元细胞中的DNA损伤和治疗与DNA损伤相关的神经障碍的药物中的用途。本发明还涉及所述治疗与DNA损伤相关的神经障碍的方法。

[0047] 根据本发明的另一特定实施方案,所述退行性疾病是神经退行性疾病,特别是帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化、亨廷顿氏病和影响眼睛或耳朵(即,视力或听力)的退行性疾病,例如青光眼。在一个优选的实施方案中,所述神经退行性障碍是帕金森氏病。

[0048] 根据本发明的另一特定实施方案,所述退行性疾病与任意特定类型的神经元或甚至多种神经元的丧失无关或者并非由任意特定类型的神经元或甚至多种神经元的丧失导致。例如,所述退行性疾病可以选自肌营养不良症或早衰症。

[0049] 根据另一优选的实施方案,术语“与年龄相关的疾病或障碍”包括例如肾功能障碍、脊柱后凸、椎间盘突出、虚弱、脱发、听力丧失、视力丧失(失明或视力受损)、肌肉疲劳、皮肤病症、皮肤痣、糖尿病、代谢综合征和少肌症。视力丧失是指以前有视力的受试者没有了视力。已经开发出多种度量来基于视觉敏锐度描述视力和视力丧失的程度。与年龄相关的疾病和病症还包括皮肤病学病症,例如但不限于治疗以下病症中的一种或更多种:皱纹,包括表面细纹;色素沉着过度;疤痕;瘢痕瘤;皮炎;银屑病;湿疹(包括脂溢性湿疹);红斑痤疮;白斑;寻常性鱼鳞癣;皮肤肌炎;以及光化性角化病。

[0050] 根据另一特定实施方案,本发明涉及至少一种同源异型蛋白或其肽衍生物在制备用于减少细胞中、更特别是神经元细胞中DNA链断裂的量的药物中的用途。

[0051] 根据另一特定实施方案,本发明涉及同源异型蛋白或其肽衍生物在制备用于治疗/或预防与DNA损伤相关及与年龄相关的疾病或障碍的药物中的用途,其中所述同源异型蛋白是Engrailed蛋白并且所述与DNA损伤相关的疾病或障碍是帕金森氏病。

[0052] 根据另一特定实施方案,本发明涉及同源异型蛋白或其肽衍生物在制备用于治疗/或预防与DNA损伤相关及与年龄相关的疾病或障碍的药物中的用途,其中所述的同源异型蛋白是Engrailed蛋白,并且所述与DNA损伤相关的疾病或障碍是肌萎缩性侧索硬化病。

[0053] 根据另一特定实施方案,本发明涉及同源异型蛋白或其肽衍生物在制备用于治疗/或预防与DNA损伤相关及与年龄相关的疾病或障碍的药物中的用途,其中所述同源异型蛋白是Gbx2蛋白并且所述与DNA损伤相关的疾病或病症是亨廷顿氏病。

[0054] 根据另一特定实施方案,本发明涉及同源异型蛋白或其肽衍生物在制备用于治疗/或预防与DNA损伤相关及与年龄相关的疾病或障碍的药物中的用途,其中所述同源异型蛋白是Gbx2蛋白,并且所述与DNA损伤相关的疾病或障碍是帕金森氏病。

[0055] 根据另一特定实施方案,本发明涉及同源异型蛋白或其肽衍生物在制备用于治疗

和/或预防与DNA损伤相关及与年龄相关的疾病或障碍的药物中的用途,其中所述同源异型蛋白是Lhx9蛋白并且所述与DNA损伤相关的疾病或障碍是亨廷顿氏病。

[0056] 根据另一特定实施方案,本发明涉及同源异型蛋白或其肽衍生物在制备用于治疗/或预防与DNA损伤相关及与年龄相关的疾病或障碍的药物中的用途,其中所述同源异型蛋白是Lhx9蛋白,并且所述与DNA损伤相关的疾病或障碍是帕金森氏病。

[0057] 或者,本发明涉及编码所述同源异型蛋白的重组载体而非该蛋白质或肽本身的用途。本文所使用的术语“载体”是指载剂,优选核酸分子或病毒颗粒,所述病毒颗粒包含使得一个或更多个核酸分子在宿主细胞或生物体中递送、扩增和/或表达所必需的元件。该术语涵盖用于维持的载体(克隆载体)或用于在各种宿主细胞或生物体中表达的载体(表达载体)、染色体外载体(例如,多拷贝质粒)或整合载体(例如,被设计为整合到宿主细胞基因组中并且在宿主细胞复制时产生额外的核酸分子拷贝)以及穿梭载体(例如,在原核宿主和/或真核宿主中起作用)和转移载体(例如,用于在病毒基因组中转移核酸分子)。为了本发明的目的,载体可以是天然遗传来源的载体、合成的载体或人造的载体、或者天然和人造遗传元件的某种组合。

[0058] 在本发明的上下文中,将术语“载体”广泛地理解为包括质粒和病毒载体。本文所使用的“质粒载体”是指可复制的DNA构建体。通常,质粒载体含有选择性标志物基因,所述选择性标志物基因使得能够在相应的选择性药物的存在下选择携带质粒载体的宿主细胞。在本领域中是已知多种阳性选择性标志物基因和阴性选择性标志物基因。举例来说,抗生素抗性基因可以被用作阳性选择性标志物基因,其使得能够在相应的抗生素的存在下选择宿主细胞。本文所使用的术语“病毒载体”是指包含病毒基因组的至少一个元件并且可以被包装成病毒颗粒或者被包装到病毒颗粒中的核酸载体。术语“病毒”、“病毒颗粒”、“病毒颗粒”和“病毒载体颗粒”可互换地用于指在使得产生感染性病毒颗粒的合适的条件下将核酸载体转导到合适的细胞或细胞系中时形成的病毒颗粒。在本发明的上下文中,将术语“病毒载体”广泛地理解为包括核酸载体(例如,DNA病毒载体)以及由其产生的病毒颗粒。术语“感染性”是指病毒载体进入并感染宿主细胞或生物体的能力。可以使病毒载体具有复制或选择性复制(例如,被改造为在特定宿主细胞中更好地复制或选择性复制),或者可以使病毒载体具有遗传缺陷以成为复制缺陷型或复制受损型。在本发明的上下文中适用的载体包括但不限于用于在原核宿主细胞例如细菌(例如,大肠杆菌、枯草芽孢杆菌或李斯特菌)中表达的噬菌体、质粒或粘粒载体;用于在酵母(例如,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*Saccharomyces pombe*)、巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*))中表达的载体;用于在昆虫细胞系统(例如,Sf9细胞)中表达的杆状病毒载体;用于在植物细胞系统中表达的病毒和质粒载体(例如,Ti质粒、花椰菜花叶病毒CaMV;烟草花叶病毒TMV);以及用于在高等真核细胞或生物体中表达的病毒和质粒载体。通常,这样的载体可商购(例如,购自Invitrogen、Stratagene、Amersham Biosciences、Promega等)或者可从保藏机构例如美国典型培养物保藏中心(ATCC, Rockville, MD)获得或者已经成为许多出版物的主题,这些出版物描述这些载体的序列、结构和生成方法,从而使得本领域技术人员能够应用它们。合适的质粒载体的代表性实例包括但不限于pREP4、pCEP4(Invitrogen)、pCI(Promega)、pVAX(Invitrogen)和pgWiz(Gene Therapy System Inc)。合适的病毒载体的代表性实例由各种不同的病毒(例如,逆转录病毒、腺病毒、腺病毒相关病毒(AAV)、痘病

毒、疱疹病毒、麻疹病毒、泡沫病毒、甲病毒、水泡性口炎病毒等)产生。如上所述,术语“病毒载体”涵盖载体DNA、基因组DNA以及由其产生的病毒颗粒。本发明还涵盖与脂质或聚合物复合以形成颗粒结构的载体(例如,质粒DNA),所述颗粒结构例如脂质体、脂质复合物或纳米颗粒。根据本发明,包含在本发明的载体中的一个或多个核酸分子为适于在宿主细胞或生物体中表达的形式,这意味着核酸分子在适当的调控序列的控制之下。本文所使用的术语“调控元件”是指在给定的宿主细胞或生物体中允许、促进或调节核酸分子表达的任何元件,包括核酸或其衍生物(即,mRNA)的复制(replication)、加倍(duplication)、转录、剪接、翻译、稳定性和/或转运。本领域技术人员将理解,调控序列的选择可取决于诸如载体本身、宿主细胞、期望的表达水平等因素。适于哺乳动物细胞中的组成型表达的启动子包括但不限于巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子、RSV启动子、腺病毒主要晚期启动子、磷酸甘油激酶(PGK)启动子、单纯疱疹病毒(HSV)-1的胸苷激酶(TK)启动子和T7聚合酶启动子。本领域技术人员将理解,控制本发明核酸分子的表达的调控元件可以进一步包含用于以下的另外的元件:转录的适当启动、调控和/或终止(例如,polyA转录终止序列)、mRNA转运(例如,核定位信号序列)、加工(例如,剪接信号)和稳定性(例如,内含子和5'和3'非编码序列)、翻译(例如,引发因子Met、三联前导序列、IRES核糖体结合位点、Shine-Dalgarno序列等)到宿主细胞或生物体中以及纯化步骤(例如,标签)。

[0059] 另一方面,本发明提供了一种用于治疗受试者的与DNA损伤相关的障碍的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用包含至少一种同源异型蛋白或其肽衍生物或者编码所述蛋白质的重组载体,以及药学上可接受的载剂的组合物。

[0060] 本文所使用的“药学上可接受的载剂”旨在包括与药物施用相容的任何和全部载体、溶剂、稀释剂、赋形剂、佐剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、以及吸收延迟剂等。

[0061] 对本发明的组合物进行合适的缓冲以适合于在生理pH或弱碱性pH(例如,从约pH7至约pH9)下用于人类使用。合适的缓冲液包括但不限于磷酸盐缓冲液(例如,PBS)、碳酸氢盐缓冲液、HEPES和PIPES缓冲液和/或Tris缓冲液。本发明的组合物可以进一步包含适合人类或动物使用的稀释剂。所述稀释剂优选是等渗的、低渗的或弱高渗的,并且具有相对低的离子强度。代表性实例包括无菌水、生理盐水(例如,氯化钠)、林格氏溶液、葡萄糖、海藻糖或蔗糖溶液、Hank氏溶液以及其他生理平衡盐水溶液(参见,例如最新版的Remington:The Science and Practice of Pharmacy,A.Gennaro,Lippincott,Williams&Wilkins)。包含在本发明的组合物中的药学上可接受的载剂还必须允许在制造或诸如冷冻(例如,-70℃、-20℃)、冷藏(例如,4℃)或环境温度下的长期储存(即,至少一个月、优选至少一年)条件下保持其稳定性。其他药学上可接受的载剂可用于提供期望的特性,包括例如改变或维持pH、渗透压、粘度、澄清度、颜色、无菌性、稳定性、制剂溶解速率、改变或维持人或动物有机体中的释放或吸收、促进转运跨过血液屏障或穿透入特定器官(例如,大脑)。

[0062] 包含本文所述的任意一种同源异型蛋白的组合物可配制用于持续释放或缓慢释放(也称为定时释放或控制释放)。一般而言,可以采用公知的技术来制备这样的组合物,并通过例如经口、直肠、皮内、鼻内或皮下植入或者通过在期望的靶部位植入来施用。持续释放制剂可以含有分散在载体基质中和/或包含在由速率控制膜包围的储器中的化合物。

[0063] 该组合物可以有利地包含至少另一种药物,例如:生长因子、复合糖(糖胺聚糖、聚唾液酸)、sirtuin或sirtuin活化剂、抗胆碱酯酶或逆转录酶抑制剂,特别是核苷转录酶抑

制剂。

[0064] 或者,本发明涉及一种用于治疗或预防接受了癌症治疗的受试者的与DNA损伤相关的障碍的方法。

[0065] 本发明进一步涉及一种用于治疗或预防DNA损伤应答途径或染色质变化或改变的方法。

[0066] 本发明进一步涉及一种用于治疗或预防响应于暴露于阳光或暴露于DNA损伤性化学品的DNA损伤的方法。本发明的所述方法可以减少皮肤老化、预防皮肤癌并改善外貌。

[0067] 本发明进一步涉及一种用于预防或减轻有此需要的受试者的细胞老化影响的方法,该方法包括向有此需要的受试者施用有效量的至少一种同源异型蛋白或其肽衍生物或编码所述蛋白质的重组载体。本发明的同源异型蛋白还可用于治疗或预防(即,降低发生的可能性)作为自然老化过程的一部分发生或者在受试者暴露于诱发剂或诱发因素(例如,辐射、化疗、吸烟、高脂肪/高糖饮食、其他环境因素)时发生的“与年龄相关的疾病和障碍”或“老化”。

[0068] 如医疗领域的技术人员所理解的,术语“治疗”是指对受试者(即,患者)的疾病、障碍或病症的医学管理。一般而言,适当的剂量和治疗方案提供足以提供治疗和/或预防益处量的同源异型蛋白。对施用了本文所述的同源异型蛋白的受试者的治疗益处包括例如改善的临床结果,其中目的是预防或减慢或延缓与疾病相关的非期望的生理变化,或者预防或减慢或延缓该疾病的发展或严重程度。如本文所讨论的,一种或更多种同源异型蛋白的有效性可以包括有益的或期望的临床结果,所述临床结果包括但不限于减少、减轻或缓解由待治疗的疾病引起的或与其相关的症状;减少症状的发生;改善生活质量;更长的无疾病状态(即,降低受试者呈现症状(据此对疾病进行诊断)的可能性或倾向);降低疾病程度;稳定化(即不恶化)的疾病状态;延缓或减慢疾病进展;改善或减轻疾病状态;和缓解(无论是部分还是全部),无论是可检测的还是无法检测的;和/或总体存活期。本文所述的同源异型蛋白的有效性还可以意指与在受试者未接受本发明的同源异型蛋白的情况下预期的细胞存活期相比延长细胞存活期,更特别是神经元的存活期。

[0069] 需要治疗的受试者包括已经患有所述疾病或障碍的受试者以及倾向于患有所述疾病或障碍或者有患所述疾病或障碍的风险的受试者,以及待预防性地治疗所述疾病、病症或障碍的受试者。受试者可能有产生将受益于本发明方法的疾病或障碍的倾向,或者可能为一定年龄,在该年龄,接受本发明方法将提供延迟发生或降低疾病严重程度的临床益处,所述疾病包括与DNA损伤相关的疾病或障碍和/或与年龄相关的疾病或障碍。

[0070] 本发明同源异型蛋白的用于治疗与DNA损伤相关的疾病或障碍和/或与年龄相关的疾病或障碍的剂量可以取决于受试者的病症,即,疾病的阶段、由疾病引起的症状的严重程度、一般健康状况以及年龄、性别和体重以及医学领域技术人员显而易见的其他因素。药物组合物可以以如医学领域技术人员所确定的适合于待治疗的疾病的方式施用。除了本文和上文涉及使用同源异型蛋白来治疗与DNA损伤相关的疾病或障碍和/或与年龄相关的疾病或障碍所述的因素之外,还可以通过诸如患者的状况、患者疾病的类型和严重程度、活性成分的特定形式以及施用方法的因素来确定或调整同源异型蛋白的合适的施用持续时间和频率。一般可以使用实验模型和/或临床试验确定同源异型蛋白的最佳剂量。最佳剂量可以取决于受试者的体质(body mass)、重量或血容量。通常优选使用足以提供有效治疗的最

小剂量。本文所述同源异型蛋白的临床前研究和临床研究的设计和实施(包括用于预防益处的施用时间)在相关领域技术人员的技能范围内。当施用两种或更多种同源异型蛋白时,每种同源异型蛋白的最佳剂量可以不同,例如比单独施用任一种药剂作为单一药剂疗法时低。通常,所述同源异型蛋白可以以如下浓度范围使用:0.001至100 μ M,或更优选0.005至100 μ M,有利地0.005至10 μ M,并且特别有利地0.001至0.10 μ M。每天可以施用的同源异型蛋白的量可以是例如约0.01mg/kg至100mg/kg(例如,约0.1至1mg/kg、约1至10mg/kg、约10至50mg/kg、约50至100mg/kg体重)。在另一些实施方案中,可以每天施用的同源异型蛋白的量为约0.01mg/kg至1000mg/kg、约100至500mg/kg、或约500至1000mg/kg体重。如Rekaik等,(2015, Cell Reports)中所述,对于脑内注射,可以以10pmol至100pmol、例如25pmol的剂量施用同源异型蛋白,尤其是Engrailed。在另一实施方案中,可以通过眼内注射施用同源异型蛋白,尤其是Otx2。

[0071] 对于待治疗的与DNA损伤相关的疾病或障碍和/或与年龄相关的疾病或障碍而言的最佳剂量(每天或每疗程)可能不同,并且该最佳剂量还可以随施用途径和/或治疗方案而改变。

[0072] 将药物组合物配制为通过多种途径施用,包括但不限于经口、肠胃外和局部施用。药学上可接受的载剂是常规使用的那些。

[0073] 药物组合物可以通过本领域技术人员已知的数种途径中的任意一种递送至有此需要的受试者。作为非限制性实例,组合物可以经口、静脉内、腹膜内、通过输注(例如,推注输注)、皮下、肠内、直肠、鼻内、吸入、口腔、舌下、肌内、透皮、皮内、局部、眼内、阴道、直肠或通过颅内注射、或其任意组合来递送。在某些特定实施方案中,如上所述,一剂的施用是通过静脉内、腹膜内直接进入靶组织或器官,或皮下途径。在某些实施方案中,递送方法包括包覆药物或遍布药物的支架,其中药物是同源异型蛋白或编码同源异型蛋白的核酸。

[0074] 对于神经退行性疾病的治疗,可以局部施用同源异型蛋白,特别是通过注射或输注入靶向的脑区中。该同源异型蛋白也可以使用控制释放装置来施用,所述控制释放装置例如连接至植入脑中的套管的渗透微型泵。

[0075] 根据本发明的一个优选实施方案,将同源异型蛋白直接施用于SNpc区,尤其用于治疗帕金森氏病。在一个特别优选的实施方案中,通过该程序施用的同源异型蛋白是Engrailed。在一个特别优选的实施方案中,将单次注射的Engrailed施用于有此需要的个体。

[0076] 因此,在一个特定实施方案中,本发明涉及Engrailed作为用于治疗帕金森氏病的药物的用途,其中Engrailed在有此需要的受试者的SNpc区中施用一次。

[0077] 另外,可以将所述同源异型蛋白的施用与非药物疗法相结合。例如,可以将所述同源异型蛋白的施用与丘脑底核刺激相结合用于治疗帕金森氏病。

[0078] 上文中引用的专利、出版物和数据库条目的全部公开内容均明确地通过引用整体并入本文,其程度如同指出每个这样的单独专利、出版物或条目被明确且单独地通过引用并入。

附图说明

[0079] 除了上文的布置之外,本发明还包括其他布置,将从参考附图对的示例性实施方

案进行的描述中呈现这些布置,在附图中:

[0080] 图1. En1+/-小鼠中DNA损伤和异染色质标记的变化的表达

[0081] (A) 利用p值对属于DNA损伤、染色质重塑和细胞凋亡组的En1+/-SNpc TH+神经元中差异表达的基因进行了排列。

[0082] (B) 野生型小鼠的SNpc中的TH+神经元显示出 γ -H2AX染色的单环; En1+/-TH+神经元示出散布在细胞核中的额外的 γ -H2AX聚点。比例尺:10 μ m。

[0083] (C) SNpc中具有>2个 γ -H2AX聚点的TH+神经元百分比从野生型中的2%增加到8周龄En1+/-小鼠中的16% (n=3; Student's t检验)。En1+/-小鼠和野生型小鼠的VTA中的TH+神经元的 γ -H2AX染色相似。在每种情况下计数110至162个神经元。

[0084] (D) 在En1+/-SNpc mDA神经元中,核仁外周和核周H3K27me3染色减少。比例尺:10 μ m。

[0085] (E) 通过沿着虚线测量荧光强度(左)量化H3K27me3核仁外周染色。在En1+/-小鼠中具有密集染色的细胞的百分比下降(右) (n=3; Student's t检验; 在野生型小鼠和En1+/-小鼠中分别计数129和159个神经元)。

[0086] (F) 如降低的核纤层/核质荧光强度所示, En1+/-TH+神经元的核周H3K27me3染色减少 (n=3; Student's t检验; 在假注射和6-OHDA情况下计数30和30个神经元)。

[0087] (G) DAPI密集区的表面量化。频率分布表明在En1+/-小鼠中转向更小的DAPI密集区 (n=162-211; Kolmogorov-Smirnov检验; 对3只野生型和En1+/-小鼠进行了分析)。另参见图S1和表S1。

[0088] 图2. 在注射6-OHDA之后SNpc TH+神经元中的DNA损伤和染色质改变(A, B) 在野生型小鼠的SNpc中注射6-OHDA导致6小时后在约25%的TH+神经元中出现 γ -H2AX聚点 (n=3-6; Student's t检验)。En1+/-小鼠更敏感, 有50%的神经元示出多个 γ -H2AX聚点 (n=3-6; Student's t检验; 针对每种情况分别计数130、210和146个神经元)。比例尺:10 μ m。在野生型小鼠和En1+/-小鼠中, 6-OHDA注射分别引起约30%和60%的TH+神经元丧失 (n=3; Student's t检验)。将对侧的未注射侧作为参考。针对每种情况计数1534和2034个神经元。

[0089] (C) 中脑切片对利用 γ -H2AX、H3k27me3和TH进行染色, 并通过共焦显微镜进行分析。注射6-OHDA后, 核仁外周和核周H3K27me3染色减少。在注射后6小时对小鼠进行分析。比例尺:10 μ m。

[0090] (D) 在注射了6-OHDA的小鼠中, 如图1E、1F中所定量的显示出密集H3K27me3核仁外周染色和核周染色的TH+神经元的百分比显著下降(左) (n=3; Student's t检验; 在假注射和6-OHDA情况下分别计数148和91个神经元)。在注射6-OHDA后, TH+神经元中的核周H3K27me3染色也减少(右) (n=3; Student's t检验; 在假注射和6-OHDA情况下分别计数40和47个神经元)。

[0091] (E) 中脑切片对 γ -H2AX、核仁素和TH继续努力染色, 并通过共焦显微镜进行分析。在注射6-OHDA后6小时, 假注射小鼠中的核仁素核仁定位丧失。NCL: 核仁素。比例尺:10 μ m。

[0092] (F) 在注射6-OHDA后, 具有核仁核仁素的TH+神经元的百分比显著降低 (n=3; Student's t检验; 在假注射和6-OHDA情况下分别计数161和97个神经元)。NCL: 核仁素。

[0093] (G) 在SNpc纯化核中注射6-OHDA后, 通过qRT-PCR分析的45S rRNA前体上调 (n=3; Student's t检验)。

[0094] (H) 通过共聚焦显微镜分析对来自(1岁龄动物)的中脑切片的核仁素和TH染色。在野生型TH+神经元中,核仁素呈现出核仁定位,而在En1+/-小鼠中,40%的TH+神经元呈现出分散染色模式(箭头)。比例尺:50 μ m。虚线正方形区的更高放大倍数图像显示在最右侧的图中。比例尺:10 μ m。在En1+/-小鼠中,具有核仁核仁素的TH+神经元的百分比显著降低(n=3; Student's t检验;在野生型小鼠和En1+/-小鼠中分别计数99和87个神经元)。NCL:核仁素。另参见图S2。

[0095] 图3. Engrailed使TH+细胞免受6-OHDA诱导的细胞死亡

[0096] (A) 对在SNpc中注射了6-OHDA的小鼠在30分钟后以假注射或En2注射进行再次注射,并在24h时进行分析。与假注射相比,En2注射防止同侧SNpc中6-OHDA诱导的TH细胞丧失。比例尺:500 μ m。

[0097] (B) 在注射后6小时、24小时和7天,利用同侧相对于对侧SNpc中TH+细胞计数的比率评定的En2的保护作用(n=3-5; Student's t检验)。在每种情况下,所计数的神经元数量介于1670和2275之间。

[0098] (C) 在24h时,在注射了6-OHDA的小鼠中通过En2拯救TH+神经元与细胞周期蛋白A消失相对应。比例尺:100 μ m。

[0099] (D) H3K27me3免疫染色示出En2注射后的逐步恢复。核仁核仁素的恢复在24h时几乎完成。在注射后24小时至7天,具有 γ -H2AX聚点的TH+神经元的百分比恢复正常。对于每个分析,n=3。单因素方差分析,随后进行Dunetts' s检验(相对于假注射)。在每种情况下,所计数的神经元的数量介于102和150之间。

[0100] (E) 在注射后6小时分析的6-OHDA/假注射小鼠和6-OHDA/En2小鼠的SNpc中与细胞凋亡和细胞周期相关的选定基因的表达(n=5; Student's t检验)。

[0101] (F) Otx2保护TH+神经元免受6-OHDA诱导的细胞死亡。在注射6-OHDA后30分钟注射Otx2,24h后对小鼠进行分析。针对En2注射评定保护作用(n=3; Student's t检验)。对于每种情况,所计数的神经元的数量介于1268和1495之间。另参见图S3。

[0102] 图4. RNA-seq分析揭示了Engrailed抗细胞凋亡活性

[0103] (A, B) 利用p值对6-OHDA相对于6-OHDA/En2的SNpc中与DNA损伤、染色质重塑、细胞凋亡和细胞周期相关的差异表达的基因进行了排列。

[0104] (C) 通过qRT-PCR确认了6-OHDA和6-OHDA/En2的SNpc中的选定基因的表达(n=5; Student's t检验)。

[0105] (D) 左图:在6h时,通过qRT-PCR测量6-OHDA和6-OHDA/En2的SNpc中的Gadd45b和Pml转录物(注射放线菌酮,CHX;n=5; Student's t检验)。右图:8周龄野生型小鼠和En1+/-小鼠的SNpc中的Gadd45b转录物(n=4; Student's t检验)。

[0106] (E) 对来自假注射、6-OHDA/假注射和6-OHDA/En2的中脑切片进行p-JNK和TH染色并通过共聚焦显微镜进行分析。比例尺:50 μ m。虚线正方形的更高放大倍数图像示于最右侧的图中。比例尺:10 μ m。

[0107] (F) En2使具有p-JNK染色的SNpc TH+神经元的百分比显著降低(n=3;单因素方差分析,随后进行Tukey多重比较检验;对于每种情况,所分析的神经元的数量介于227和351之间)。另参见图S4。

[0108] 图S1(与图1相关)。En1+/-小鼠的mDA神经元中改变的基因表达

[0109] (A) 对来自野生型小鼠和En1+/-小鼠的SNpc进行激光显微切割以用于RNA-seq分析。示出了读取的总数量和差异表达的基因 ($p < 0.05$)。通过RNA-seq确认了En1+/-SNpc中En1的表达减少。

[0110] (B) RNA-seq数据分析 (Pathway Studio) 揭示了野生型和En1+/-同窝出生仔畜之间参与DNA损伤和染色质重塑的自体基因亚组的显著富集 ($p < 0.005$)。采用细胞处理途径 (Cell Process Pathway) 进行的分析还示出细胞凋亡相关基因的差异表达。

[0111] (C) 利用Pathway Studio对来自Engrailed获得功能实验的RNA-seq数据进行了分析。示出了富集的基因亚组 ($p < 0.01$) ($n = 5$)。

[0112] (D) 利用p值对野生型和En1+/-SNpc的通过Pathway Studio进行的RNA-seq分析中差异表达的转录因子进行排序。

[0113] (E) 使用来自6周龄野生型小鼠和En1+/-小鼠的SNpc RNA通过qRT-PCR确认与DNA损伤、染色质重塑和细胞凋亡相关的选择的基因的改变的表达 ($n = 3-6$; Student's t检验)。

[0114] (F) 在SNpc中具有 >2 个 γ -H2AX聚点的TH+神经元的百分比从野生型小鼠中的5%增加到24周龄En1+/-小鼠中的17% ($n = 3$; Student's t检验; 在野生型和En1+/-情况下分别计数107和94个神经元)。

[0115] (G) 与野生型相比,通过qRT-PCR分析的En1+/-小鼠的SNpc中的LINE-1转录物增加 ($n = 5$; Student's t检验)。

[0116] (H) 在En1+/-小鼠 (8周龄) 的SNpc中检测到活化的半胱天冬酶-3阳性TH+神经元。比例尺: 50 μ m。

[0117] 图S2 (与图2相关)。在注射了6-OHDA的小鼠中TH细胞死亡和染色质变化

[0118] (A) 蛋白质印迹分析示出在注射了6-OHDA的同侧SNpc中,6h时的TH蛋白质水平降低50% ($n = 3$)。

[0119] (B) 在注射了6-OHDA的SNpc中,TH和En1的mRNA水平分别降低 (6h时) 70%和50% ($n = 6$; Student's t检验)。

[0120] (C) 在注射了6-OHDA的一侧的TH+神经元中,于6h时检测到活化的半胱天冬酶-3,但在对侧未检测到。比例尺: 100 μ m。

[0121] (D) 对中脑切片的 γ -H2AX、H3K9me3和TH三重免疫染色示出注射了6-OHDA的小鼠在假注射情况下失去H3K9me3与DAPI的共定位。类似地,在注射了6-OHDA的小鼠中,失去了假注射小鼠的TH+神经元中的MeCP2与DAPI的共定位。比例尺: 10 μ m。

[0122] (E) 在注射了6-OHDA的小鼠中,具有密集H3K9me3或MeCP2标记的TH+神经元的百分比显著降低 ($n = 3$; Student's t检验)。对于H3K9me3,所计数的神经元的数量为161 (假注射) 和97 (6-OHDA); 对于MeCP2,所计数的神经元的数量为150 (假注射) 和128 (6-OHDA)。

[0123] (F) 注射了6-OHDA的小鼠的SNpc的TH+神经元中的核周lamin B2染色丧失。比例尺: 20 μ m。

[0124] (G) 假注射小鼠或注射了6-OHDA的小鼠的TH+神经元中DAPI密集区的表面量化。与假注射对照相比,相对频率的分布表明注射了6-OHDA的小鼠的TH+神经元转向更小的DAPI密集区 ($n = 137-177$; Kolmogorov-Smirnov检验; 每种情况3只小鼠)。

[0125] (H) 使用来自注射了6-OHDA的小鼠或假注射小鼠的SNpc的总RNA通过qRT-PCR对

p53和p21mRNA进行定量(n=6;Student's t检验)。

[0126] (I) 在注射了6-OHDA的SNpc中重复元件的表达更高。在注射了6-OHDA的小鼠中使用总SNpc RNA通过qRT-PCR分析的LINE-1转录物的水平增加。还使用了来自SNpc纯化核的RNA来分析LINE-1RNA的水平(n=3-5;Student's t检验)。

[0127] 图S3(与图2至图3相关)。参与TH神经元保护的Engrailed转录活性

[0128] (A) 在小鼠的SNpc中单侧假注射或输注EnHD-VP64并在7天时进行分析。对中脑切片进行的TH免疫染色示出EnHD-VP64输注引起同侧SNpc中TH细胞丧失(但假注射并非如此)。比例尺:500 μ m。

[0129] (B) 通过比较在输注后7天同侧相对于对侧SNpc中TH+细胞计数的比率来评定EnHD-VP64诱导的TH细胞丧失(n=6;Student's t检验)。在每种情况下,所计数的神经元的数量介于1902和2118之间。

[0130] (C) 对 γ -H2AX染色的定量示出在输注EnHD-VP64之后,SNpc中具有>2个 γ -H2AX聚点的TH+神经元的百分比增加(n=3;Student's t检验;在假注射和EnHD-VP64的情况下分别计数138和129个神经元)。

[0131] (D) 对RNA-seq数据的分析还揭示了在En1+/-小鼠的SNpc中与核仁组织和生物发生相关的Pathway Studio本体基因亚组中差异表达的基因(p<0.1)。

[0132] (E) 通过qRT-PCR分析了野生型小鼠和En1+/-小鼠(8周龄动物)的SNpc中45S rRNA前体的水平(n=4;Student's t检验)。

[0133] (F) Engrailed在6-OHDA模型中促进TH+神经元存活。如果在注射6-OHDA后24小时(当丧失大多数TH+神经元时)注射Engrailed并且在6小时后评定恢复情况,则观察不到Engrailed的存活作用(n=3)。

[0134] 图S4(与图4相关)。急性氧化应激后TH+神经元中细胞周期标志物的体内检测及Engrailed介导的针对H₂O₂诱导的DSB的体外保护

[0135] (A) 检测注射了6-OHDA的一侧的TH+神经元中的PCNA和pH3细胞周期标志物。比例尺:20 μ m。

[0136] (B) 对中脑切片的免疫染色揭示仅在注射了6-OHDA的小鼠的同侧表达细胞周期蛋白A的TH+神经元。在注射后6小时对小鼠进行分析。比例尺:100 μ m。

[0137] (C) 检测pH3染色呈阳性的TH+神经元中活化的半胱天冬酶-3。比例尺:50 μ m。

[0138] (D) 对注射6-OHDA后表达细胞周期蛋白A的TH+神经元的百分比进行定量(左图,n=3;Student's t检验)并通过蛋白质印迹分析确认(右图,n=4;Student's t检验)。

[0139] (E) Engrailed处理保护中脑神经元免受H₂O₂诱导的DSB。在用NaCl或En1(15nM)孵育24小时后,用5 μ M的H₂O₂处理E14.5小鼠胚胎的原代中脑神经元培养物。在H₂O₂处理后固定细胞1小时,对 γ -H2AX进行染色并对聚点的数量进行定量(n=68-137;单因素方差分析,随后进行Tukey多重比较检验)。通过根据Trevigen CometAssay试剂盒说明书进行的彗星测定评定使用中脑神经元培养物进行的针对H₂O₂诱导的DSB的En2介导的保护,并使用OpenComet插件进行分析,比例尺:100 μ m。对具有彗星尾的神经元的数量进行定量(n=39-46;单因素方差分析,随后进行Tukey多重比较检验)。

[0140] (F) 注射了En2的小鼠相对于假注射小鼠的SNpc中差异表达的基因。利用p值对与DNA损伤、染色质重塑、细胞凋亡相关的基因进行排列。

[0141] 图5:En1/GBX2/LHX9

[0142] 5.1:Engrailed的剂量反应;5.2:Gbx2的剂量反应;5.3:Lhx9的剂量反应。

具体实施方案

[0143] 实施例

[0144] 实验规程

[0145] 动物

[0146] 根据实验室动物护理和使用指南(美国国家卫生研究院)和欧洲指令86/609(EEC实验研究和其他科学利用动物保护委员会)对小鼠进行处理。在常规动物设施中维持Swiss OF1野生型(Janvier)小鼠和En1+/-小鼠(Hanks等,1995Science 269,679-682)。实验组由6至9周龄的小鼠组成。

[0147] 体内处理

[0148] 为了进行6-OHDA注射,将小鼠置于立体定位仪器中,并在距前卤尾部3.3mm和外侧1mm处的颅骨钻孔。将针头相对于颅骨表面降低4mm,并进行4分钟的6-OHDA注射(2 μ l;0.8 μ g/ μ l Sigma)或假注射(NaCl 0.9%)。该过程将同源异型蛋白靶向SNpc组织。对于Engrailed拯救实验,在注射6-OHDA 30分钟后使用相同的坐标注射细菌重组En2(300ng;4 μ M)和多聚乙酰神经氨酸(3 μ g)(Sonnier等,2007J Neurosci 27,1063-1071)或载体(NaCl 0.9%)溶液(2 μ l)。当指出时,加入放线菌酮(0.1 μ g/ μ l,sigma)。对于Otx2蛋白注射,使用含有300ng蛋白质的2 μ l溶液。在指定的时间将小鼠处死以用于分析。通过对2mm厚的冷冻冠状切片进行1mm冲击得到用于qRT-PCR和蛋白质印迹分析的SNpc组织。

[0149] 对于EnHD-VP64,用渗透迷你泵(Alzet 1002,Charles River Laboratories)向小鼠输注7天,该渗透迷你泵与在与上述相同的立体定位坐标处放置的4mm长的套管相连接。用含有En-VP64(400nM,0.9%NaCl或相当体积的含空质粒的细菌提取物)和多聚乙酰神经氨酸(1.5 μ g/ μ l)的100 μ l来填充泵。

[0150] 图像量化

[0151] 用ImageJ分析图像。对于免疫荧光,所有量化均使用60X放大率和0.7 μ m厚的连续焦平面进行。对于H3K27me3核仁模式分析,创建了沿着通过核仁定位的线的像素强度的图。通过测量细胞核周围和核质中的像素密度来测定核周/核H3K27me3荧光强度的比率。通过测量每个TH+细胞中的独立的DAPI表面积并将它们绘制为相对频率分布直方图来量化假注射小鼠和注射了6-OHDA的小鼠中的DAPI密集区。

[0152] 统计分析

[0153] 如所示出的,使用适当的检验来确定统计学显著性。数据表示为平均值 \pm SEM。在所有实验中,*p<0.5,**p<0.01,***p<0.001,****p<0.0001。

[0154] RNA-seq分析

[0155] 通过激光捕获显微切割(LMD7000,Leica)分离野生型小鼠和En1+/-小鼠的SNpc中的使用快速TH-染色方案(Chung等,2005,Hum Mol Genet 14,1709-1725)标记的mDA神经元。合并来自每组4只动物的样品,并使用AllPrep DNA/RNA Micro Kit(Qiagen)提取总RNA,接着使用RNeasy MinElute Cleanup方案用DNase I进行柱上DNase I处理。通过Ecole Normale Supérieure 基因组平台(巴黎)进行cDNA文库(Ovation RNA-seq系统V2)的构建

和Illumina RNA-seq。使用DESeq软件包(Anders等,2010,Genome Biol 11,R106)计算野生型和En1+/-样品之间差异表达基因的p值。将标准化读数计数注入基因集富集分析算法(Pathway Studio,Elsevier)来测试统计富集。选择Pathway Studio本体和细胞过程途径集合作为基因集分类进行分析。还使用从以下中提取的RNA进行RNA-Seq分析:在野生型小鼠的SNpc中输注Engrailed(Alvarez-Fischer等,2011,Nat Neurosci 14,1260-1266)后的激光捕获显微切割的mDNA神经元;和在6-OHDA/假注射和6-OHDA/En2注射后6小时收集的SNpc组织冲击物(tissue punches)。

[0156] qRT-PCR

[0157] 使用RNeasy脂质组织试剂盒(Qiagen)从SNpc组织提取总RNA,随后进行DNase I(Thermo)消化。使用QuantiTect反转录试剂盒(Qiagen)转录RNA(200ng)。使用SYBR-Green(Roche Applied Science)进行qRT-PCR,并将值归一化为Gapdh和/或Hprt。采用ddCt方法分析数据。在一些实验中, RNA是专门从SNpc细胞核(亚细胞蛋白质分级试剂盒(Subcellular Protein Fractionation Kit),Thermo)中分离的。

[0158] 补充方法表:用于qRT-PCR分析的引物列表

[0159] (参考实验规程)

[0160]

基因	正向引物	反向引物
<i>Casp9</i>	TGGCTCCTGGTACATCGAGA SEQ ID NO. 5	AGCATTGGCAACCCTGAGAA SEQ ID NO.6
<i>CcnA1</i>	GGGCCTGCTCAGGCTGT SEQ ID NO. 7	GTTCTCTGTGGGGGATCCTG SEQ ID NO. 8
<i>CcnA2</i>	CTCGCTGCATCAGGAAGACC SEQ ID NO. 9	TAAGAGGAGCAACCCGTCG SEQ ID NO. 10
<i>Cdk5</i>	GCCAGACTATAAGCCCTACCC SEQ ID NO. 11	GCTGCACAGGGTTACTTC SEQ ID NO. 12
<i>En1</i>	CCGGTGGTCAAGACTGACTC SEQ ID NO. 13	CTGGTGCGTGGACCAGAG SEQ ID NO. 14
<i>En2</i>	CCTTCTTCAGGTCCCAGGTC SEQ ID NO. 15	AACTCAGCCTTGAGCCTCTG SEQ ID NO. 16
<i>Fen1</i>	ATTCCTCTTCGCCGCCATT SEQ ID NO. 17	GAGGCATCGATGGCCACTTT SEQ ID NO. 18
<i>Gadd45b</i>	TCTCTAGAGGAACGCTGAGACC SEQ ID NO. 19	GTAGGGTAGCCTTTGAGGGATT SEQ ID NO. 20
<i>Hdac7</i>	CCCACCTGTCAGACCCAAGT SEQ ID NO. 21	AGTCATAGACCAGCCCTGTAGCA SEQ ID NO. 22
LINE-1 5'UTR	CTGGGAACTGCCAAAGCAAC SEQ ID NO. 23	CCTCCGTTTACCTTTCGCCA SEQ ID NO. 24
LINE-1 ORF2	AATCGACAAATGGGACCTAATGA SEQ ID NO. 25	GTAAAGATCCTTTCCCAATCTGTTG SEQ ID NO. 26
<i>Nfkb2</i>	GGTGGAAGACAAGGAGGAAG SEQ ID NO. 27	AGGAGGAGAAAAAGCCGAG SEQ ID NO. 28
<i>p21 (Cdkn1a)</i>	GGCCCGGAACATCTCAGG SEQ ID NO. 29	AAATCTGTCAGGCTGGTCTGC SEQ ID NO. 30
<i>p53</i>	GGCGTAAACGCTTCGAGATG SEQ ID NO. 31	CTTCAGGTAGCTGGAGTGAGC SEQ ID NO. 32
<i>Parp3</i>	GACCCAGCTTGAAGAGTCC SEQ ID NO. 33	CTGCCATCCAGTTCGAGTT SEQ ID NO. 34
<i>Phf1</i>	CTATCCGGATGTTGCCTCC	GAGGTGACCTATCTGGGGGT

	SEQ ID NO. 35	SEQ ID NO. 36
<i>Pml</i>	ATAGCAGCAGTGAGTCCAGC SEQ ID NO. 37	GCTGGCTAATTTTCTGGGTTTCA SEQ ID NO. 38
<i>Polk</i>	CACAGCACTTGCAGGAAAGG SEQ ID NO. 39	CCTGTCTGGGTGTGTCGATT SEQ ID NO. 40
45S rRNA 前体	CGTGTAAGACATTCTATCTCG SEQ ID NO. 41	GCCCGCTGGCAGAACGAGAAG SEQ ID NO. 42
[0161] <i>Rad1</i>	TACTGCTTAGTGGCCAGCCT SEQ ID NO. 43	AGGCATTGCTTGCACACAC SEQ ID NO. 44
<i>Th</i>	GTACTGGACAGTCCTCACACCA SEQ ID NO. 45	GGTGGTACCCTATGCATTAGC SEQ ID NO. 46
<i>Uaca</i>	AGAGGTCAAGAAGGGCAAGC SEQ ID NO. 47	TGCCACTCAACGCTCTTTCT SEQ ID NO. 48
<i>Xpa</i>	GCGTGGCCAGTGAAAAGCA SEQ ID NO. 49	CGCATCTTCACAGATGGTGT SEQ ID NO. 50

[0162] 免疫染色

[0163] 用PBS中的4%多聚甲醛灌注小鼠,对脑进行后固定1小时并在15%蔗糖中冷冻保护。在-80℃下储存之前,嵌入Tissue-Tek O.C.T.中的组织(Sakura Finetek)在异戊烷中冷冻。将大脑以SNpc水平切成18μm厚的切片。对于免疫荧光,将切片在PBS中的1%Triton X-100中通透化20分钟,并在100℃下于柠檬酸盐缓冲液(10mM柠檬酸,0.05%吐温20,pH 6.0)中孵育20分钟。封闭1小时(PBS中的10%正常山羊血清,0.05%Triton X-100)后,在4℃下用在封闭液中稀释的第一抗体(小鼠抗-γ-H2AX,1:200,Millipore;鸡抗TH,1:500,Abcam;兔抗活化的半胱天冬酶3,1:200,Abcam;兔抗核仁素,1:200,Sigma;兔抗纤维蛋白,1:200,Cell Signaling;兔抗H3k27me3,1:200,Millipore;兔抗H3k9me3,1:200,Abcam;来自Edith Heard的慷慨礼物;兔抗Lamin B2,1:100,Santa Cruz;兔抗Mecp2,1:300,Abcam;兔抗PCNA,1:200,Cell Signaling;兔抗细胞周期蛋白A,1:200,Santa Cruz;小鼠抗pH3,1:100,Cell Signaling;小鼠抗p-JNK,1:200,Santa Cruz)将该组织孵育过夜。在室温下,用合适的第二抗体(488抗鸡、647抗鸡、488抗小鼠、546抗小鼠和546抗兔Alexa Fluor,Life Technologies)孵育切片1小时。通过共聚焦显微镜(SP5,Leica)对被标记的切片进行成像。对于TH免疫组织化学,将切片在1%TritonX-100中通透化,并在4℃下用含有抗TH的兔多克隆抗体(1:1000;Pel-Freez Biologicals)的PBS中的10%正常山羊血清孵育过夜。用生物素化的第二抗体处理切片,并用抗生物素蛋白-生物素化的辣根过氧化物酶复合物(ABC system,Vectastain)孵育。使用DAB过氧化物酶(HRP)底物试剂盒(Vectastain)显示过氧化物酶并用Nokon Eclipse i90显微镜成像。

[0164] 结果

[0165] 实施例1:En1+/-小鼠的SNpc中的mDA神经元基因表达

[0166] 对野生型小鼠和En1+/-小鼠进行显微切割的SNpc的RNA-seq分析。针对989个差异表达的基因,野生型小鼠和En1+/-小鼠获得了可比的读数(p<0.05)(图S1A)。当全部神经元仍然存在于En1+/-小鼠中时,对6周龄动物进行分析。Pathway Studio本体(基因组集富集

分析,Pathway Studio软件)表明,三个最具代表性且最显著的组为DNA修复($p=0.002$)、染色质重塑($p=0.004$)和转录因子($p=0.007$);细胞过程途径分析还揭示了差异性细胞凋亡调节基因($p=0.01$) (图S1B)。按增加的 p 值对这些本体和途径中的基因进行排列;图1A突出显示了读数有显著差异的那些基因。

[0167] 转录因子基因代表丰度最高的组(图S1B);图S1D通过 p 值对En1+/-小鼠中具有经修饰的表达式的那些转录因子基因进行排列。对野生型小鼠的SNpc进行的En2输注也改变转录因子基因,但是非常少,因此,在本研究的上下文中对DNA损伤应答和染色质修饰因子进行了进一步研究(图S1C)。定量RT-PCR(图S1E)确认了,6周龄En1+/-小鼠显示出与DNA损伤、染色质重塑和细胞凋亡相关的数个基因的表达改变。

[0168] 实施例2:En1+/-mDA神经元中DNA链断裂和改变的染色质标记

[0169] 通过跟踪DNA链断裂(DSB)标志物 γ -H2AX(Lobrich等,2010Cell Cycle9,662-669),检测En1+/-小鼠(6至8周龄之间)的SNpc中的mDA神经元的DNA损伤迹象。这揭示了在SNpc中约16%的TH+神经元中存在多个 γ -H2AX聚点(图1B,C)。值得注意的是,即使在24周时16%的细胞具有多个 γ -H2AX聚点,在24和48周之间,在En1+/-突变体中,如不存在显著的死亡所示,DSB不必然导致细胞快速死亡(图S1F)。在野生型小鼠中,约98%的mDA神经元显示出在核仁周围的 γ -H2AX单环(图1B),该单环也存在于整个大脑的神经元中。与VTA mDA神经元对一个En1等位基因缺失的较低敏感性一致,在野生型小鼠和En1+/-小鼠的VTA中, γ -H2AX染色相似(图1C)。

[0170] En1+/-小鼠也有染色质改变的迹象。如图1D至1F所示,在En1+/-TH+神经元的显著级分中,核仁外周和核周H3K27me3(K27三甲基化组蛋白H3)染色的模式发生改变。异染色质的DAPI密集区的大小分布(Guenatri等,2004J Cell Biol 166,493-505)也示出En1+/-小鼠中大斑点的百分比的减少(图1G)。异染色质的变化通常与长的常散在核元件(LINE)的表达变化相关,因此,在En1+/-突变体的SNpc中LINE表达增加(图S1G)。通过在En1+/-小鼠的SNpc中TH/活化的半胱天冬酶-3共染色确认了细胞凋亡基因的诱导(图1A),在野生型同窝出生仔畜中从未见过该诱导(图S1H)。

[0171] 实施例3:En1+/-mDA神经元对急性氧化应激的增强的敏感性

[0172] 通过将6-OHDA(由mDA神经元特异性捕获的产生超氧化物的药物)直接注射到SNpc中来对mDA神经元施加急性氧化应激。这在6h内仅在同侧SNpc中诱导35%的TH+神经元丧失和在约26%的其余TH+神经元诱导形成多个异常 γ -H2AX聚点(图2A,B)。神经元丧失对应于TH蛋白和mRNA(以及En1mRNA)减少(图S2A,B)以及存在多种活化的半胱天冬酶-3阳性mDA神经元(图S2C)。在En1+/-小鼠中注射6-OHDA导致在注射了6-OHDA的一侧较高百分比的具有 γ -H2AX聚点的TH+神经元(51%),和相应的TH+神经元丧失增加(60%)(图2A,B)。EnHD-VP64输注事实上导致mDA细胞死亡(图S3A,B)并且导致 γ -H2AX聚点的数量增加(图S3C)。

[0173] 实施例4:氧化应激诱导异染色标记发生变化

[0174] 在野生型小鼠中注射6-OHDA后6h,异染色质标记也被改变。假注射的小鼠的TH+神经元中的密集核仁外周和核周H3K27me3染色在注射了6-OHDA的小鼠中改变为弥散性核质染色(图2C)。通过测量沿一个直径的核仁外周荧光强度对核仁中的该变化进行量化(图2D,左)。相似地,外周核纤层和核基质之间H3K27me3荧光强度的比率从1.4降低至1.0(图2D,右)。急性6-OHDA还扰乱H3K9me3(K9三甲基化组蛋白H3)和MeCP2的染色(图S2D,E),同时丧

失纯核纤层蛋白B2染色(图S2F)并且DAPI密集点的尺寸分布发生变化(图S2G)。MeCP2与甲基化CpG相结合,其染色变化可能反映鸟嘌呤氧化。

[0175] 通过具有密集核仁素染色的mDA细胞从70% (假注射)降低至30% (6-OHDA) (图2E, F) 验证了由6-OHDA后丧失核仁外周 γ -H2AX(图2A)所表明的核应激。该变化伴随着核糖体45S rRNA前体的显著上调(图2G),表明核仁损伤。相比之下,在6周时在En1+/-TH+神经元中正常的核仁素染色在一年时示出破坏的迹象(图2H)。然而,参与核仁组织的基因的表达(RNA-seq)和对45S rRNA前体的qRT-PCR分析表明6至8周龄的En1+/-小鼠中的核仁生理学的改变(图S3D,E)。

[0176] 实施例5:Engrailed使由H₂O₂诱导的DSB的数量减少

[0177] 为了验证Engrailed是否能够调节由氧化应激诱导的DNA损伤,对野生型小鼠单侧注射6-OHDA,并在30分钟后用载体(假注射)或En2再次注射。在注射后6小时、24小时或7天进行分析。与注射了6-OHDA/假注射的小鼠相比,注射了6-OHDA/En2的小鼠的SNpc中的TH+细胞在24小时的显著丧失大大降低(图3A)。在7天时仍可见保护作用,在注射了En2的小鼠和假注射的小鼠中分别有40%和20%的存活神经元(图3B)。在6-OHDA后24h(而不是30分钟)注射En2并在6小时后分析显示未恢复,这表明TH染色对应于真实存活而非TH再表达(图S3F)。

[0178] 6-OHDA诱导的细胞凋亡与细胞周期标志物的表达相对应(图S4A-D)。因此,在注射后6小时在经En2处理的TH+细胞中检测到的细胞周期蛋白A表达在24h时几乎消失(图3C)。En2的神经元拯救与H3K27me₃、核仁素和 γ -H2AX的正常染色模式的再现相关(图4D)。具有“野生型”核仁外周H3K27me₃染色的TH+细胞的百分比在6h时从20%增加到37%,在24h和7天时分别达到60%和80%。野生型核仁素模式用了更长的时间再现,原因是仅在24小时观察到恢复,而在24小时与一周之间几乎没有变化。最后, γ -H2AX聚点的数量减少速度较慢,仅在7天时才完全恢复。

[0179] 拯救与En2注射后6h的TH mRNA表达显著增加和45S rRNA前体表达降低相关(图3E)。在6-OHDA/En2小鼠的SNpc中,在En1+/-小鼠中或注射6-OHDA后上调的与细胞周期和细胞凋亡相关的选定基因的表达受到抑制(图3E)。在6h时进行分析,此时假注射动物和注射了En2的动物仍然具有相似数量的mDA神经元(图3B)。

[0180] 在使用或不使用En2的情况下,将表达Engrailed但其中只有1-2%是多巴胺能的E14.5中脑神经元暴露于H₂O₂。图S4E说明En2使由H₂O₂诱导的DSB的数量减少,相应地使指示DNA损伤的彗尾的形成减少。

[0181] 实施例6:Engrailed激活短期和长期存活途径

[0182] En2的保护需要在24小时之前将其注射(图S3F)。为了鉴定该早期存活途径中的基因,对来自6-OHDA/假注射小鼠或6-OHDA/En2小鼠(6h)的SNpcRNA进行测序,并根据Pathways Studio分析染色质重塑、DNA损伤、细胞凋亡和细胞周期途径中的基因。图4A,B按照显著性顺序排列读数中差异最大的基因,图4C提供了对4种分析途径中具有最高代表性基因的增强表达的qRT-PCR确认。凋亡途径中的基因比En1+/-小鼠中的基因更具代表性(图1)。这并非由于En2注射本身(图S4F),这表明En2的抗凋亡途径的快速上调具体地发生在急性氧化应激之后。

[0183] 对应于Gadd45b在8周龄的En1+/-小鼠中的表达减少,在拯救实验中加入放线菌酮

证实与作为对照的Pml相反,Gadd45b不需要翻译间插蛋白,因此是Engrailed的直接靶标(图4D)。Gadd45b/g和NF- κ B的高诱导表明c-Jun N端激酶(JNK)信号传导的作用,该信号转导途径隐含于包括PD在内的数种神经退行性疾病中(Coffey,2014,Nat Rev Neurosci 15,285-299)。图4E,F确认6-OHDA后6小时p-JNK染色显著增加被En2拮抗(图4F)。

[0184] 实施例7:Engrailed及另外两种同源异型蛋白Gbx2和Lhx9使由H₂O₂诱导的DSB的数量减少

[0185] 考虑到同源异型蛋白的高度结构和功能保守性,发明人预期其他同源异型蛋白将具有与Engrailed相似的作用。因此他们将另外两种同源异型蛋白Gbx2(Lin等,1996,Genomics,3,335-342)和Lhx9(Rétaux等,1999,J.of Neuroscience,19(2),783-793)与Engrailed对由H₂O₂诱导的DNA损伤的作用进行了比较。

[0186] 使用胰蛋白酶解离E14.5中脑细胞,并在补充有谷氨酰胺、天冬氨酸、谷氨酸和抗生素/抗真菌混合物的Neurobasal培养基中在聚-D-赖氨酸/层粘连蛋白玻璃盖玻片上培养6天。然后用指定浓度的同源异型蛋白处理细胞24小时,然后用100 μ M H₂O₂攻击1h并在4%多聚甲醛中固定。用 γ 2HAX免疫荧光使DNA断裂可视化。图中的每个数据点表示细胞核中的中到大聚点的数量。每种条件有4个盖玻片,且每个盖玻片有5至10个细胞。不包括没有聚点的细胞。

[0187] 使用非参数Kruskal-Wallis接着Dunn's多重比较检验评估各组之间的差异。

[0188] 7.1 Engrailed1的剂量反应(图5.1)

[0189] 用100 μ M H₂O₂处理使聚点数量从1.9个/细胞显著增加到8.3个/细胞(p<0.01)。用En1预处理以剂量依赖性方式降低聚点的数量。1ng/ml(0.25nM)部分地但显著地(p<0.01)降低由H₂O₂导致的聚点的数量。5ng/ml(1.25nM)和20ng/ml(0.5nM)甚至进一步降低聚点的数量(p<0.01),但仍大于经载体处理的对照条件(p<0.01)。100ng/ml(2.5nM)与经对照处理的细胞无法区分,因此完全防止了由H₂O₂导致的DNA断裂。

[0190] 7.2 Gbx2的剂量反应(图5.2)

[0191] 与经载体处理的对照相比,用H₂O₂处理使 γ 2HAX聚点的数量显著加倍(p<0.01)。1ng/ml(0.027nM)部分地但显著地降低聚点的数量(p<0.01)。20ng/ml(0.54nM)在某种程度上进一步降低了聚点的数量,100ng/ml(2.68nM)阻断了H₂O₂的作用。

[0192] 7.3.Lhx9的剂量反应(图5.3)

[0193] 与经载体处理的对照相比,用H₂O₂处理使 γ 2HAX聚点的数量显著加倍(p<0.01)。5ng/ml(0.022nM)显著地降低聚点的数量,而且在20ng/ml(0.54nM)的条件下该降低更显著但并未完全阻断,100ng/ml(2.68nM)完全阻断了H₂O₂的作用。

[0194] 结论

[0195] Engrailed同源异型蛋白在成体黑质的多巴胺能神经元中表达。在Engrailed1杂合小鼠中,这些神经元在6周开始死亡,对氧化应激更敏感,并逐渐产生与在对野生型神经元的急性和强烈氧化应激之后所观察到的特征相似的特征。这些变化包括DNA链断裂和数个核和核仁异染色质标记的改变(强度和分布)。Engrailed1和Engrailed2是生化等价转导蛋白,以前用于在Engrailed1杂合小鼠和帕金森氏病小鼠模型中拮抗多巴胺能神经元死亡。

[0196] 因此,我们表明,在急性氧化应激之后,一次Engrailed2注射可以恢复所有的核和

核仁异常染色质标记、减少DNA链断裂的数量,并且保护多巴胺能神经元免受凋亡。这些结果支持这样一个事实,即Engrailed不仅能够预防存在于黑质多巴胺能神经元中的多巴胺能神经元的损伤,而且还能够氧化应激造成损伤时拯救这些神经元。

[0197] 高水平的活性氧类(ROS)是有毒的,特别是在它们直接诱导DDR的DNA水平下。因此,具有高代谢活性的神经元,例如产生大量的ATP和ROS的SNpcmDA神经元处于退化的风险中。染色质重塑和DDR途径是相互关联的,因为DNA损伤诱导染色质变化,而染色质变化本身是进入DNA修复机制所必需的。这项研究将Engrailed基因作为mDA神经元中伴随慢性和急性氧化应激形式的DNA损伤和染色质变化的关键调节因子。

[0198] 其中mDA神经元显示出进行性但比野生型小鼠更快的死亡率的En+/-慢性氧化应激模型表明,与成体视网膜中的Otx2剂量相似,Engrailed剂量对于成体SNpc是重要的。事实上,鉴于En1和En2在生物化学上相当,失去四个等位基因中的仅一个足以加速细胞死亡。在老化和神经疾病的情况下,这表明En1+/-小鼠中的mDA神经元老化更快并且对PD的动物模型中使用的毒素6-OHDA更敏感。

[0199] PD甚至以其家族形式在生命的相当晚的时期呈现,这强调了与年龄相关的风险。即使Engrailed不是PD基因,它的抗老化特性也可能解释EN1多态性与患PD的风险之间的关联。在这种情况下,值得注意的是,在En1+/-小鼠或急性6-OHDA模型中观察到的数种表型使人联想到在PD患者或模型中进行的观察。例如,SNpc mDA神经元中MeCP2的丧失危及黑质纹状体多巴胺能途径;在PD中存在JNK和细胞周期蛋白途径,并且已报道在PD患者中的核仁素扩散。

[0200] 在此前的一项研究中,示出了Engrailed在三种PD小鼠模型中保护mDA神经元(Alvarez-Fischer等,2011)。这项研究在将6-OHDA注射到纹状体中而不是直接注射到SNpc的意义上是非常不同的,这是一种急性和严格的程序,可防止长期的继发性作用。更重要的是,在此前的研究中,在纹状体损伤前3周将Engrailed输注于SNpc中,而非在注射6-OHDA后30分钟注射Engrailed。最后,与此前的研究相比,本研究确定了Engrailed不仅在蛋白质翻译水平上作为转录和表观遗传调节因子的作用,甚至两种作用模式可以同时发生以挽救细胞。这种转录和表观遗传活性非常重要,因为它表明Engrailed可以对mDA神经元存活具有长期作用。此外,与此前的研究相比,本研究表明,Engrailed可用于拯救多巴胺能神经,而不仅仅是可以预防其氧化应激诱导的损伤。

[0201] 因此,可以提出一种基于短期和长期作用的机制。短期作用包括编码线粒体蛋白的mRNA的翻译(Alvarez-Fischer等,2011;Stettler等,2012),并且特别地但不仅仅是抗凋亡基因的转录(本研究)和如已提出的对细胞凋亡的抑制(Alberi等,2004;Beltran等,2014),其似乎主要为GADD45b/g、NF-kB和JNK途径。我们基于在我们最初的比较野生型SNpc和En1+/-SNpc的转录组的RNA-seq研究中强调的基因的调节提出长期作用涉及允许染色质重塑和DNA修复这两种高度相互关联的途径的转录和表观遗传机制。

[0202] 总之,Engrailed在PD模型中的保护作用(Alvarez-Fischer等,2011)以及目前的数据证明,使用Engrailed作为一种治疗性蛋白质的构思在mRNA翻译水平和直接或间接基因转录水平两者上起作用。

370	375	380
Gly Leu Tyr Asn His Ser Thr Thr Thr Val Gln Asp Lys Asp Glu Ser		
385	390	395
Glu		400
<210> 3		
<211> 348		
<212> PRT		
<213> 小鼠		
<400> 3		
Met Ser Ala Ala Phe Pro Pro Ser Leu Met Met Met Gln Arg Pro Leu		
1	5	10
Gly Ser Ser Thr Ala Phe Ser Ile Asp Ser Leu Ile Gly Ser Pro Pro		
	20	25
		30
Gln Pro Ser Pro Gly His Phe Val Tyr Thr Gly Tyr Pro Met Phe Met		
	35	40
		45
Pro Tyr Arg Pro Val Val Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ala		
	50	55
		60
Leu Pro Gln Ala Ala Leu Gln Pro Ala Leu Pro Pro Ala His Pro His		
65	70	75
		80
His Gln Ile Pro Ser Leu Pro Thr Gly Phe Cys Ser Ser Leu Ala Gln		
	85	90
		95
Gly Met Ala Leu Thr Ser Thr Leu Met Ala Thr Leu Pro Gly Gly Phe		
	100	105
		110
Ser Ala Ser Pro Gln His Gln Glu Ala Ala Ala Ala Arg Lys Phe Ala		
	115	120
		125
Pro Gln Pro Leu Pro Gly Gly Gly Asn Phe Asp Lys Ala Glu Ala Leu		
	130	135
		140
Gln Ala Asp Ala Glu Asp Gly Lys Ala Phe Leu Ala Lys Glu Gly Ser		
145	150	155
		160
Leu Leu Ala Phe Ser Ala Ala Glu Ala Val Gln Ala Ser Leu Val Gly		
	165	170
		175
Ala Val Arg Gly Gln Gly Lys Asp Glu Ser Lys Val Glu Asp Asp Pro		
	180	185
		190
Lys Gly Lys Glu Glu Ser Phe Ser Leu Glu Ser Asp Val Asp Tyr Ser		
	195	200
		205
Ser Asp Asp Asn Leu Pro Gly Gln Thr Ala His Lys Glu Glu Asp Pro		
	210	215
		220
Gly His Ala Leu Glu Glu Thr Pro Gln Ser Gly Gly Ala Ala Gly Ser		
225	230	235
		240

Thr Thr Ser Thr Gly Lys Asn Arg Arg Arg Arg Thr Ala Phe Thr Ser
 245 250 255
 Glu Gln Leu Leu Glu Leu Glu Lys Glu Phe His Cys Lys Lys Tyr Leu
 260 265 270
 Ser Leu Thr Glu Arg Ser Gln Ile Ala His Ala Leu Lys Leu Ser Glu
 275 280 285
 Val Gln Val Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Ala Lys Trp Lys Arg
 290 295 300
 Val Lys Ala Gly Asn Ala Asn Ser Lys Thr Gly Glu Pro Ser Arg Asn
 305 310 315 320
 Pro Lys Ile Val Val Pro Ile Pro Val His Val Ser Arg Phe Ala Ile
 325 330 335
 Arg Ser Gln His Gln Gln Leu Glu Gln Ala Arg Pro
 340 345

<210> 4

<211> 397

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 4

Met Glu Ile Val Gly Cys Arg Ala Glu Asn Asn Ser Cys Pro Phe Arg
 1 5 10 15
 Pro Pro Ala Met Leu Phe His Gly Ile Ser Gly Gly His Ile Gln Gly
 20 25 30
 Ile Met Glu Glu Met Glu Arg Arg Ser Lys Thr Glu Ala Arg Leu Thr
 35 40 45
 Lys Gly Thr Gln Leu Asn Gly Arg Asp Ala Gly Met Pro Pro Leu Ser
 50 55 60
 Pro Glu Lys Pro Ala Leu Cys Ala Gly Cys Gly Gly Lys Ile Ser Asp
 65 70 75 80
 Arg Tyr Tyr Leu Leu Ala Val Asp Lys Gln Trp His Leu Arg Cys Leu
 85 90 95
 Lys Cys Cys Glu Cys Lys Leu Ala Leu Glu Ser Glu Leu Thr Cys Phe
 100 105 110
 Ala Lys Asp Gly Ser Ile Tyr Cys Lys Glu Asp Tyr Tyr Arg Arg Phe
 115 120 125
 Ser Val Gln Arg Cys Ala Arg Cys His Leu Gly Ile Ser Ala Ser Glu
 130 135 140
 Met Val Met Arg Ala Arg Asp Ser Val Tyr His Leu Ser Cys Phe Thr
 145 150 155 160

Cys Ser Thr Cys Asn Lys Thr Leu Thr Thr Gly Asp His Phe Gly Met
 165 170 175
 Lys Asp Ser Leu Val Tyr Cys Arg Ala His Phe Glu Thr Leu Leu Gln
 180 185 190
 Gly Glu Tyr Pro Pro Gln Leu Ser Tyr Thr Glu Leu Ala Ala Lys Ser
 195 200 205
 Gly Gly Leu Ala Leu Pro Tyr Phe Asn Gly Thr Gly Thr Val Gln Lys
 210 215 220
 Gly Arg Pro Arg Lys Arg Lys Ser Pro Ala Leu Gly Val Asp Ile Val
 225 230 235 240
 Asn Tyr Asn Ser Gly Cys Asn Glu Asn Glu Ala Asp His Leu Asp Arg
 245 250 255
 Asp Gln Gln Pro Tyr Pro Pro Ser Gln Lys Thr Lys Arg Met Arg Thr
 260 265 270
 Ser Phe Lys His His Gln Leu Arg Thr Met Lys Ser Tyr Phe Ala Ile
 275 280 285
 Asn His Asn Pro Asp Ala Lys Asp Leu Lys Gln Leu Ala Gln Lys Thr
 290 295 300
 Gly Leu Thr Lys Arg Val Leu Gln Val Trp Phe Gln Asn Ala Arg Ala
 305 310 315 320
 Lys Phe Arg Arg Asn Leu Leu Arg Gln Glu Asn Gly Gly Val Asp Lys
 325 330 335
 Ala Asp Gly Thr Ser Leu Pro Ala Pro Pro Ser Ala Asp Ser Gly Ala
 340 345 350
 Leu Thr Pro Pro Gly Thr Ala Thr Thr Leu Thr Asp Leu Thr Asn Pro
 355 360 365
 Thr Val Thr Val Val Thr Thr Val Thr Ser Asn Met Asp Ser His Glu
 370 375 380
 Pro Gly Ser Pro Ser Gln Thr Thr Leu Thr Asn Leu Phe
 385 390 395

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 5

tggtcctgg tacatcgaga 20

<210> 6

<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 6
agcattggca accctgagaa 20
<210> 7
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 7
gggcctgctc aggctgt 17
<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 8
gttctctgtg ggggatcctg 20
<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 9
ctcgtgcat caggaagacc 20
<210> 10
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 10
taagaggagc aaccgctcg 19

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 11
gccagactat aagccctacc c 21
<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 12
gctgcacagg gttacacttc 20
<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 13
ccggtggtca agactgactc 20
<210> 14
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 14
ctggtgcgtg gaccagag 18
<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 15

ccttcttcag gtcccaggtc 20
<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 16
aactcagcct tgagcctctg 20
<210> 17
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 17
attcctcttc gccgccatt 19
<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 18
gaggcatcga tggccacttt 20
<210> 19
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 19
tctctagagg aacgctgaga cc 22
<210> 20
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 20
gtaggtagc ctttgaggga tt 22
<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 21
cccacctgtc agacccaagt 20
<210> 22
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 22
agtcatagac cagccctgta gca 23
<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 23
ctgggaactg ccaaagcaac 20
<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 24
cctccgttta cctttcgcca 20
<210> 25
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成寡核苷酸
<400> 25
aatcgacaaa tgggacctaa tga 23
<210> 26
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 26
gtaaagatcc tttcccaate tgttg 25
<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 27
ggtggaagac aaggaggaag 20
<210> 28
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 28
aggaggagaa aaagccgag 19
<210> 29
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 29
ggcccgaac atctcagg 18
<210> 30
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核甘酸
<400> 30
aaatctgtca ggctggtctg c 21
<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核甘酸
<400> 31
ggcgtaaacg cttcgagatg 20
<210> 32
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核甘酸
<400> 32
cttcaggtag ctggagtgag c 21
<210> 33
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核甘酸
<400> 33
gaccccagct tgaagagtcc 20
<210> 34
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核甘酸
<400> 34
ctgcccattcc agttcgagtt 20
<210> 35
<211> 20
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 35
ctatccggat gttcgcctcc 20
<210> 36
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 36
gaggtgacct atctgggggt 20
<210> 37
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 37
atagcagcag tgagtccagc 20
<210> 38
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 38
gctggctaatt tttctggggt tca 23
<210> 39
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 39
cacagcactt gcaggaaagg 20
<210> 40
<211> 20

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 40
cctgtctgagg tgtgtcgatt 20
<210> 41
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 41
cgtgtaagac attcctatct cg 22
<210> 42
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 42
gcccgctggc agaacgagaa g 21
<210> 43
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 43
tactgcttag tggccagcct 20
<210> 44
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 44
aggcatttgc ttgcacacac 20
<210> 45

<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 45
gtactggaca gtcctcacac ca 22
<210> 46
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 46
ggtggtacc tatgcattta gc 22
<210> 47
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 47
agaggtcaag aaggcaagc 20
<210> 48
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 48
tgccactcaa cgctctttct 20
<210> 49
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 49
gcgtggccag tgtaaaagca 20

<210> 50

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 50

cgcattcttc acagatggtg t 21

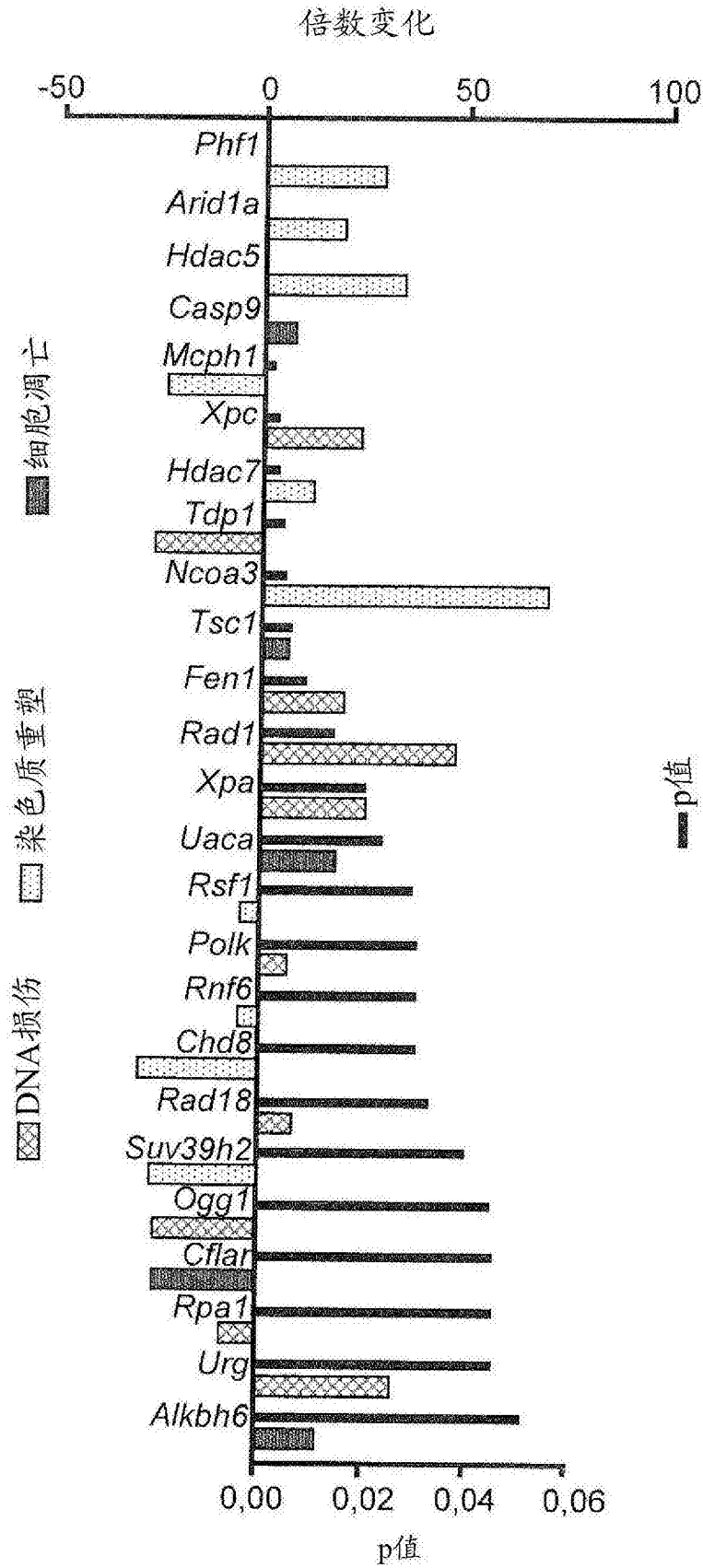


图1A

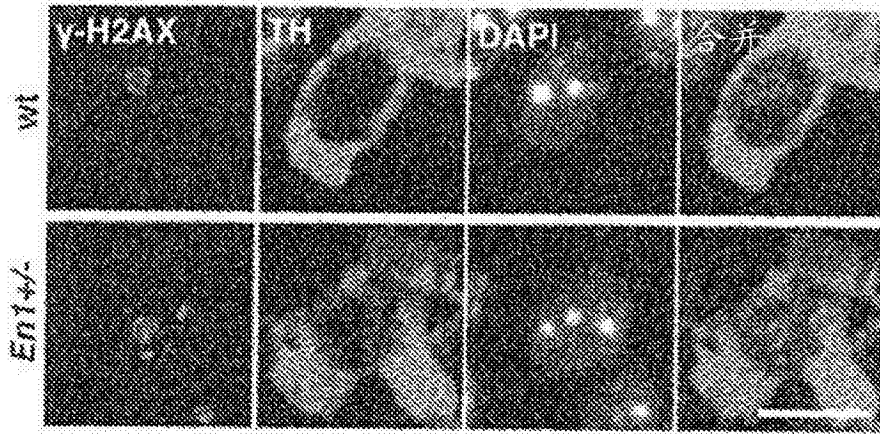


图1B

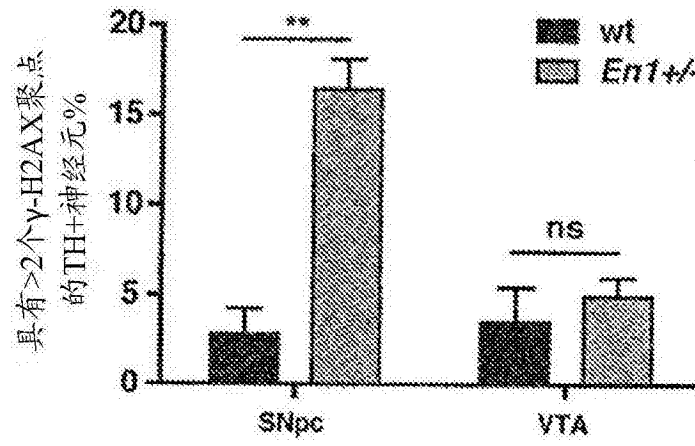


图1C

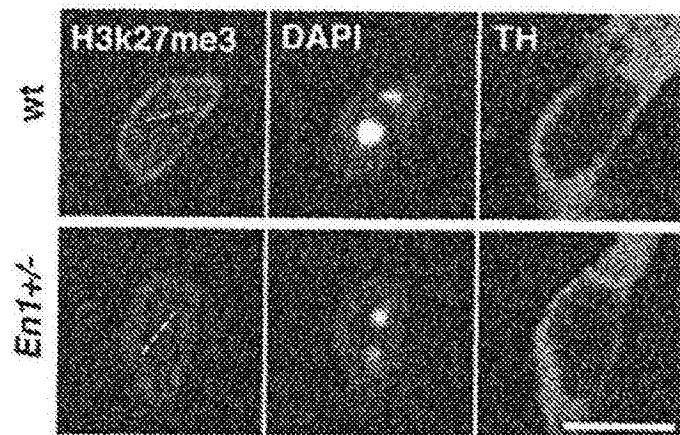


图1D

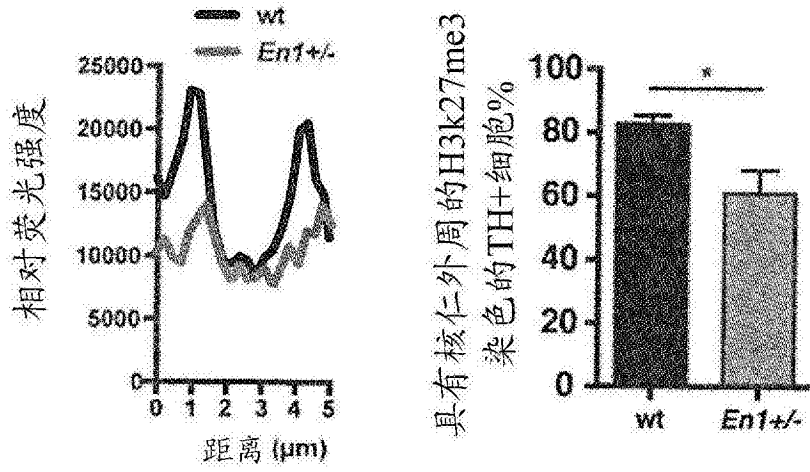


图1E

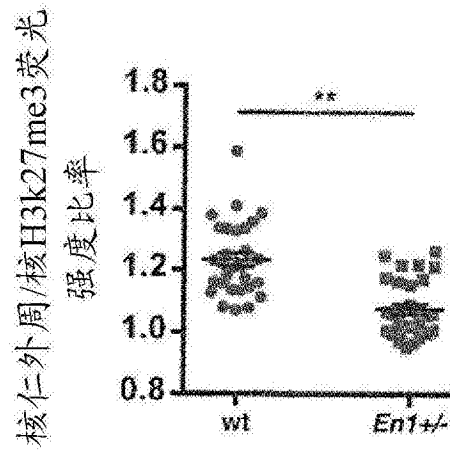


图1F

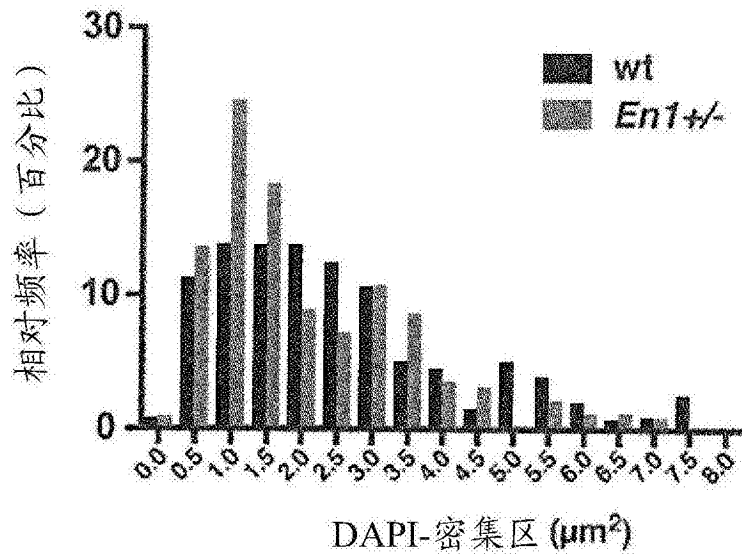


图1G

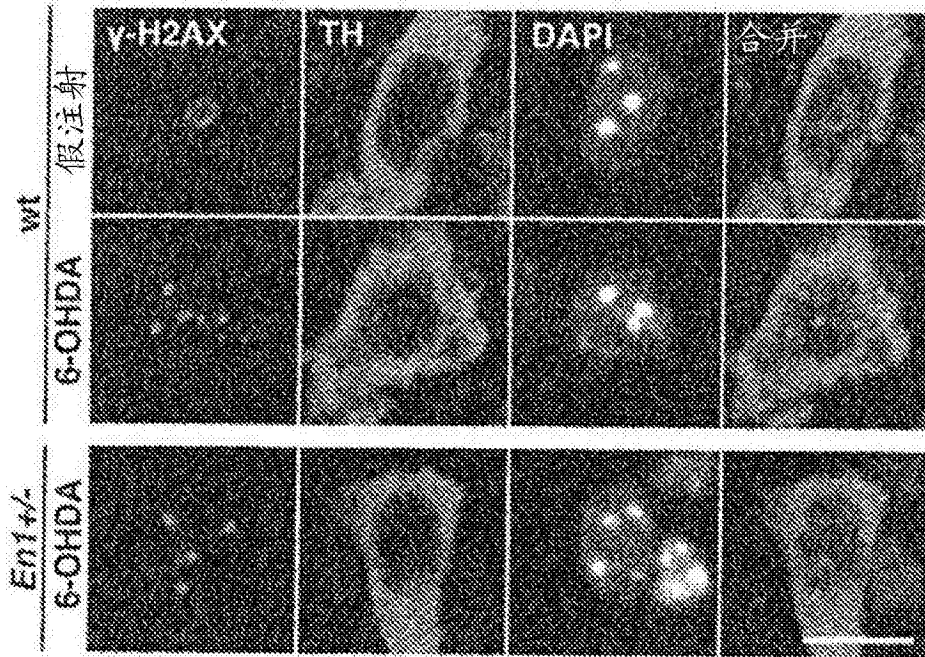


图2A

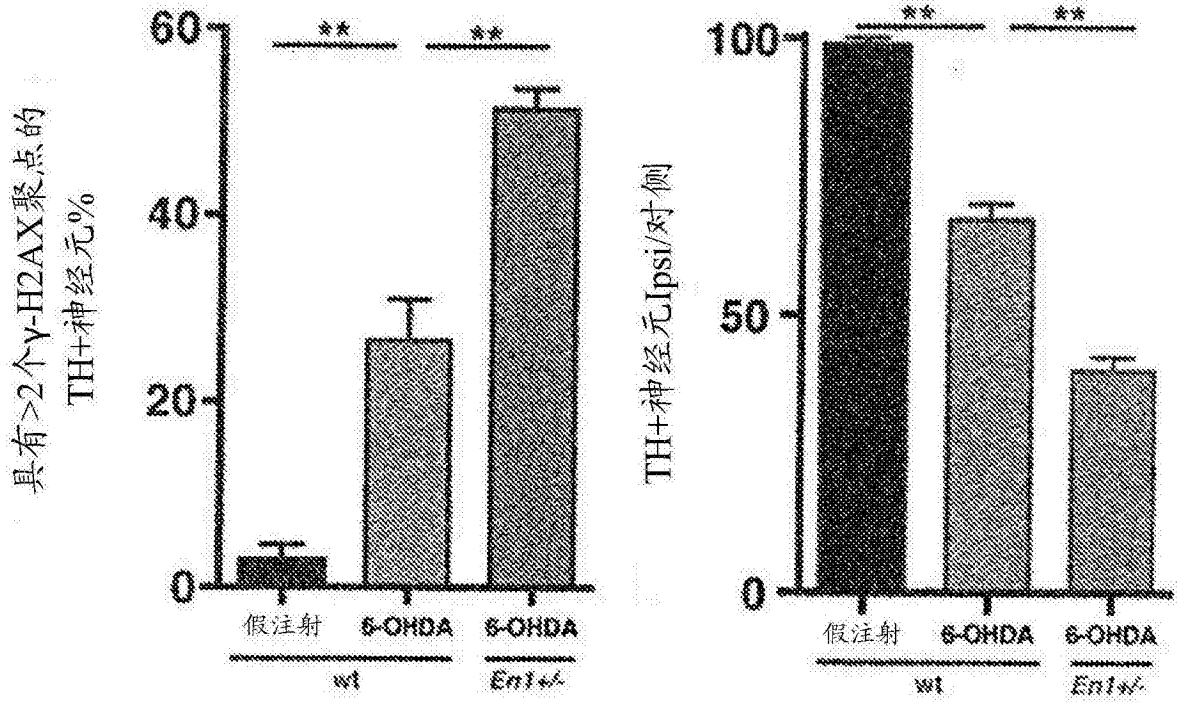


图2B

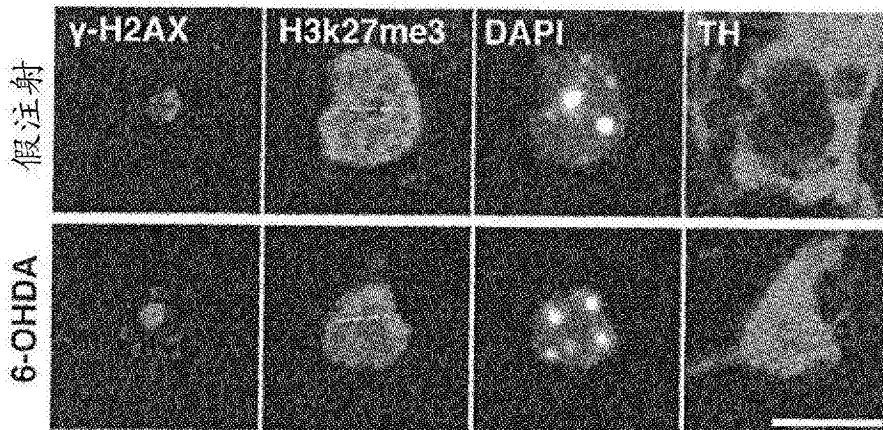


图2C

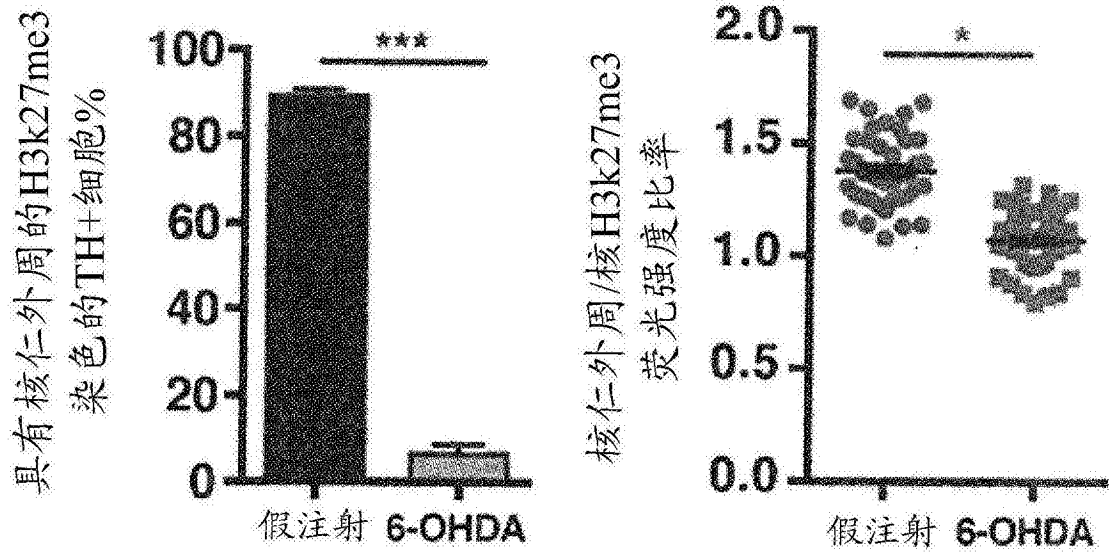


图2D

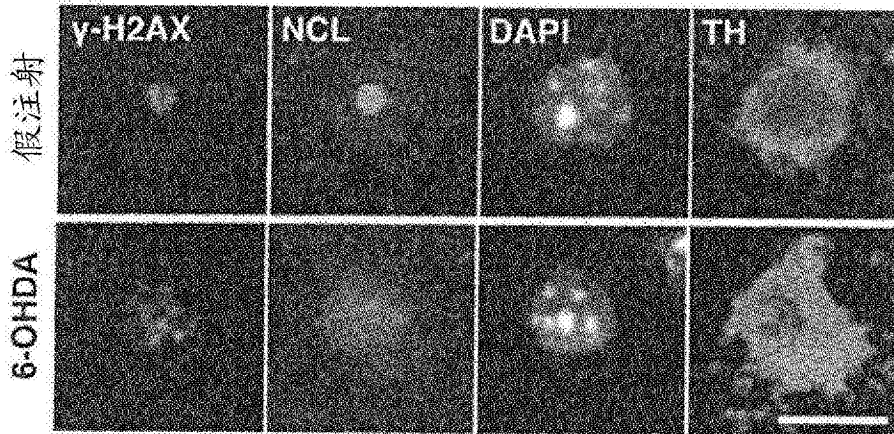


图2E

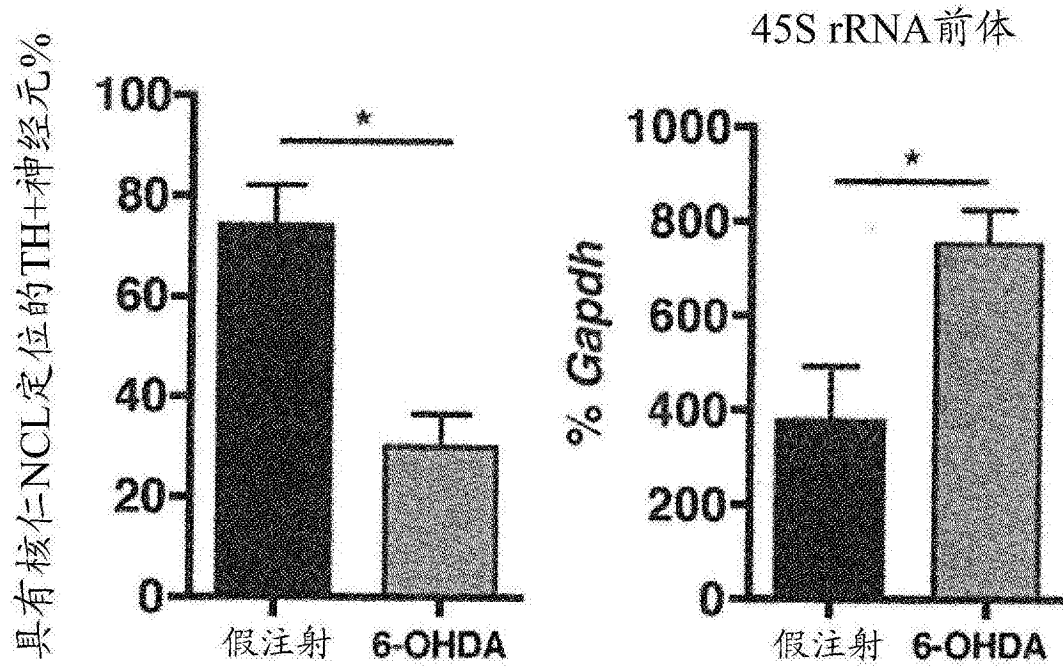


图2F

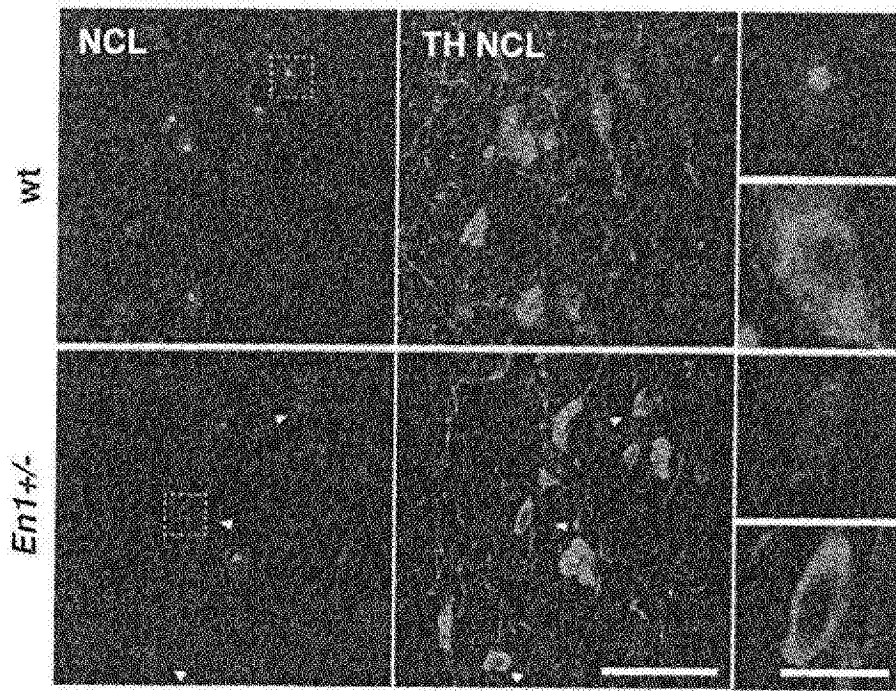


图2H

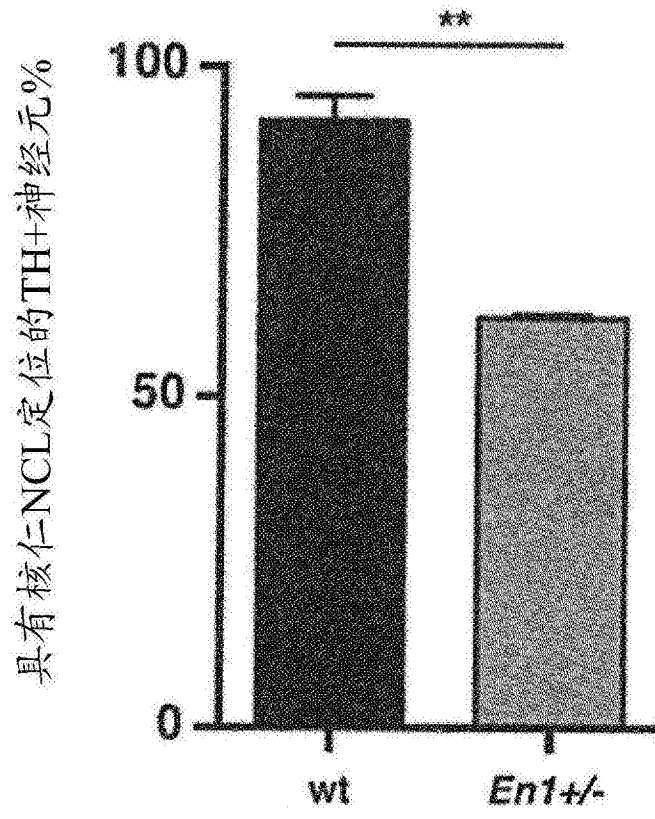


图2H

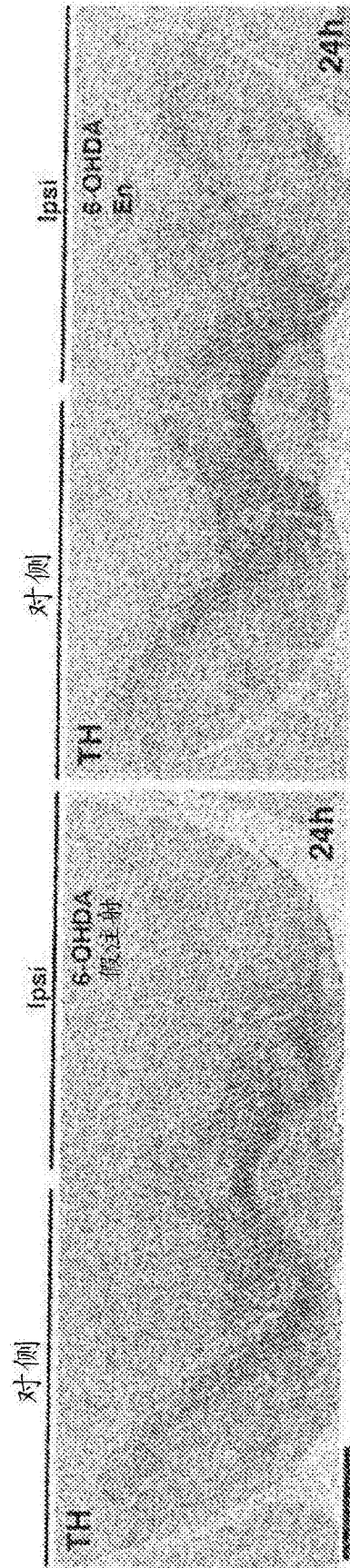


图3A

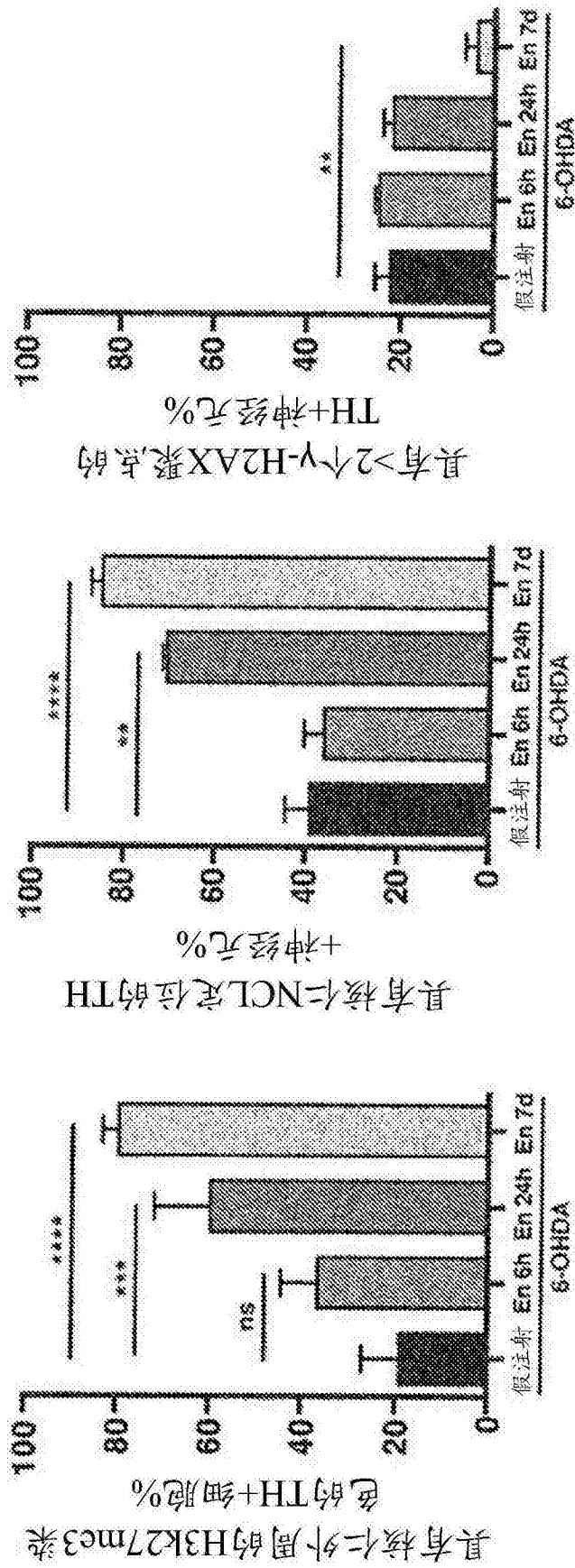


图3D

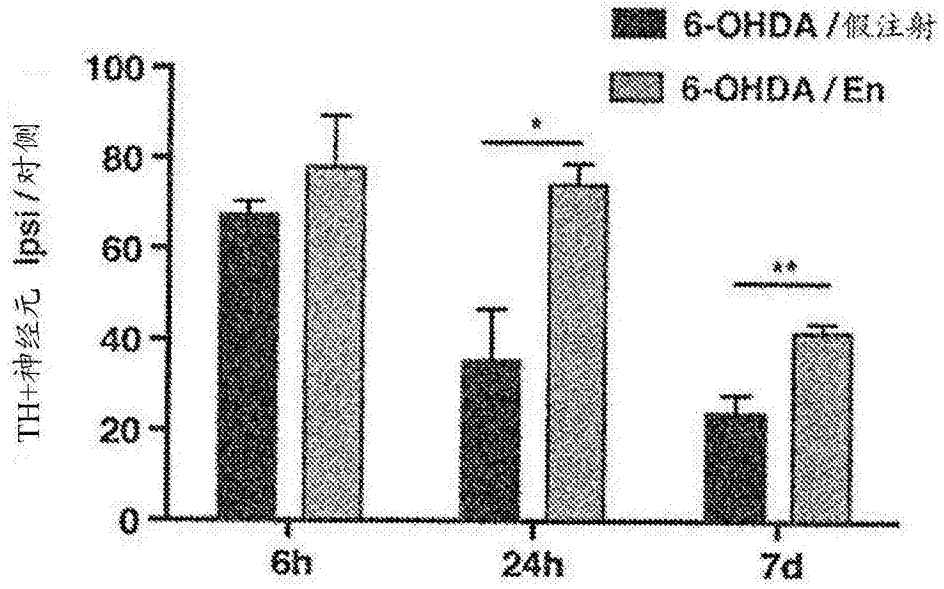


图3B

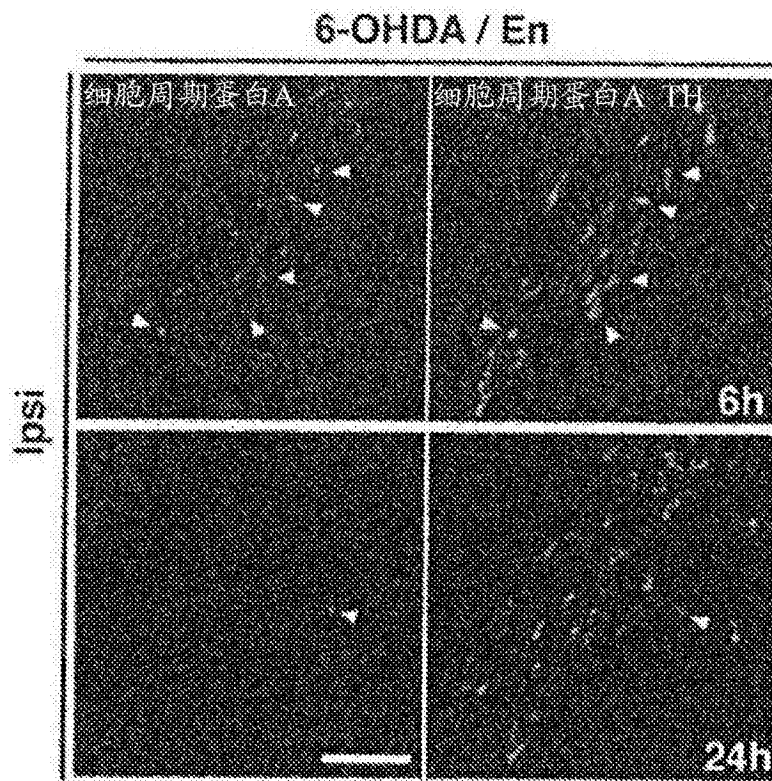


图3C

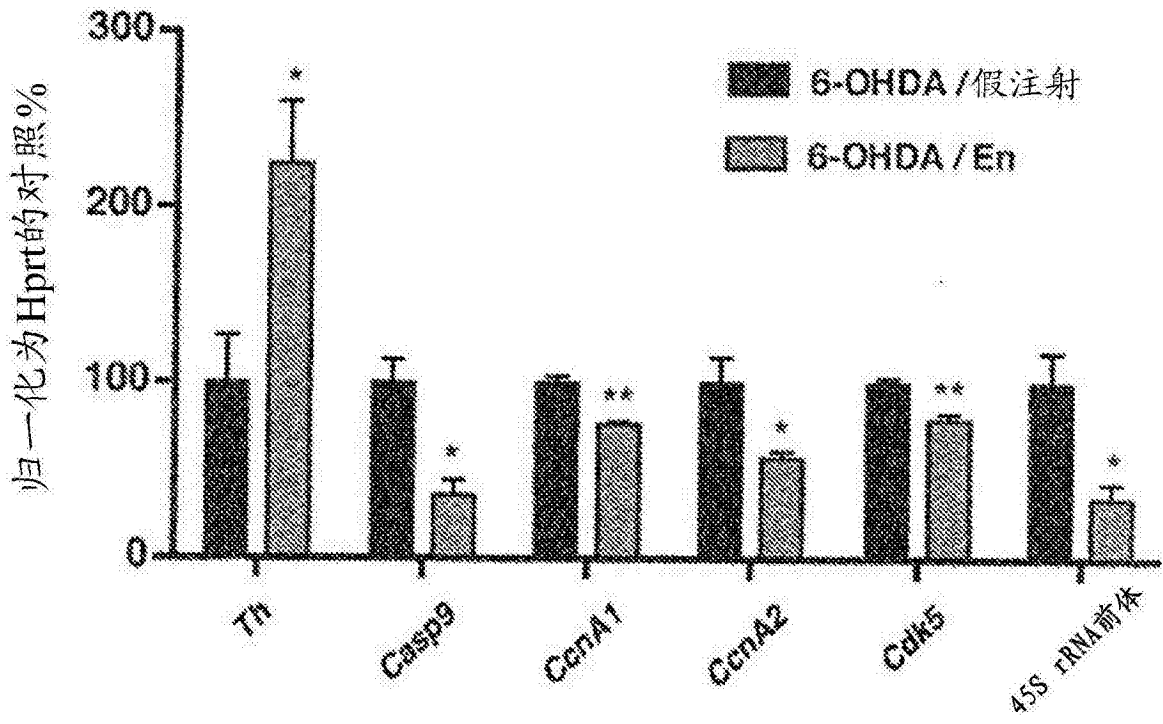


图3E

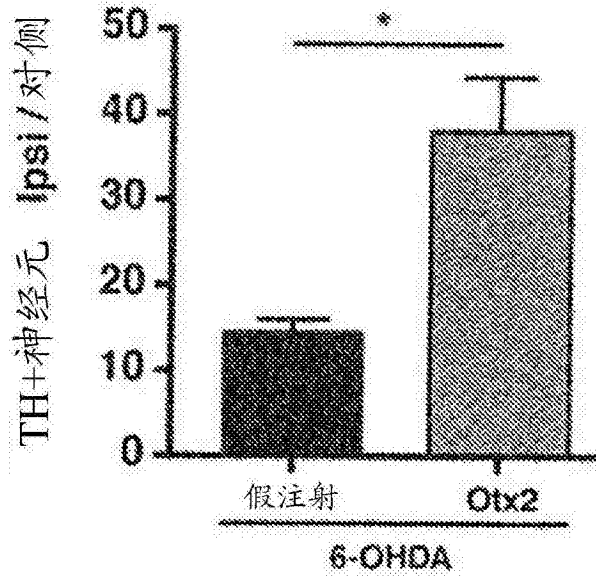


图3F

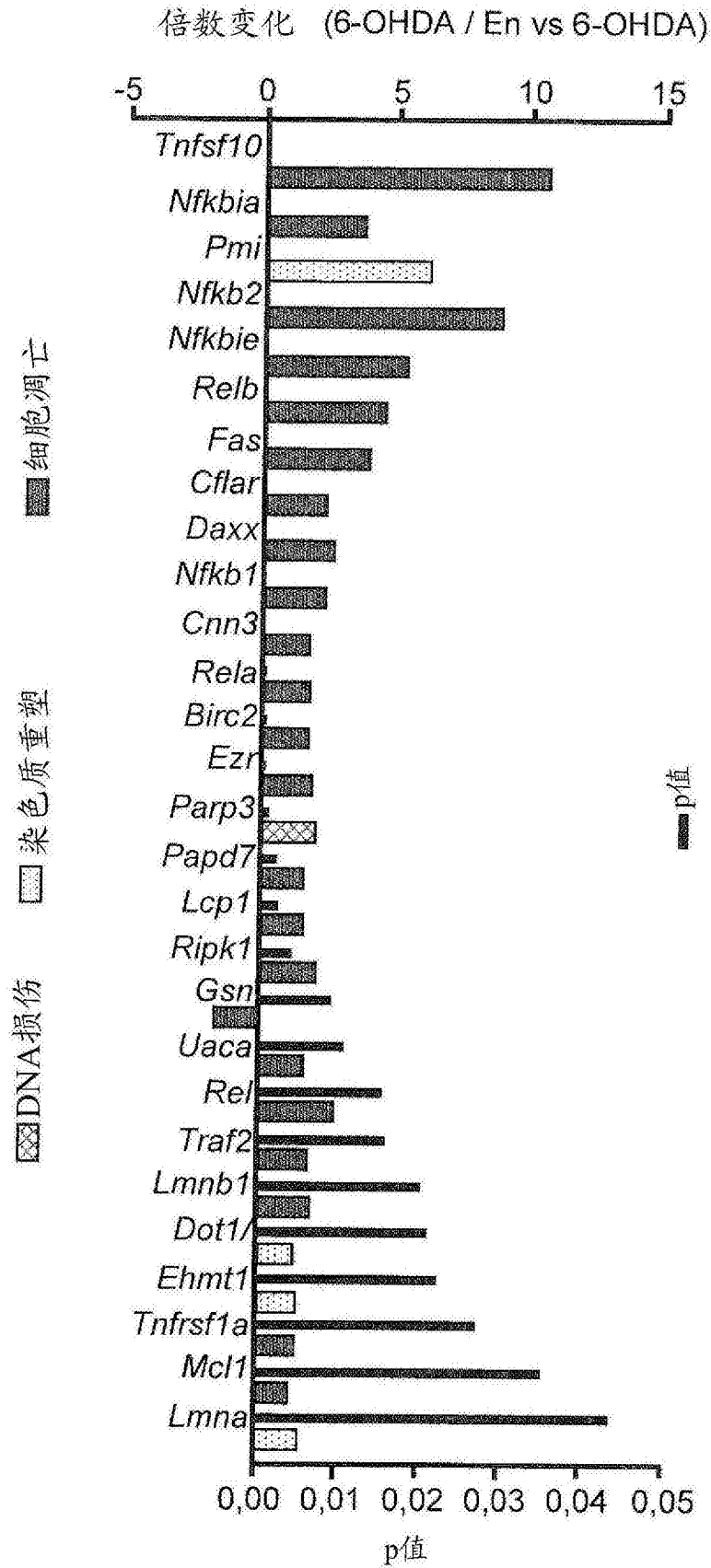


图4A

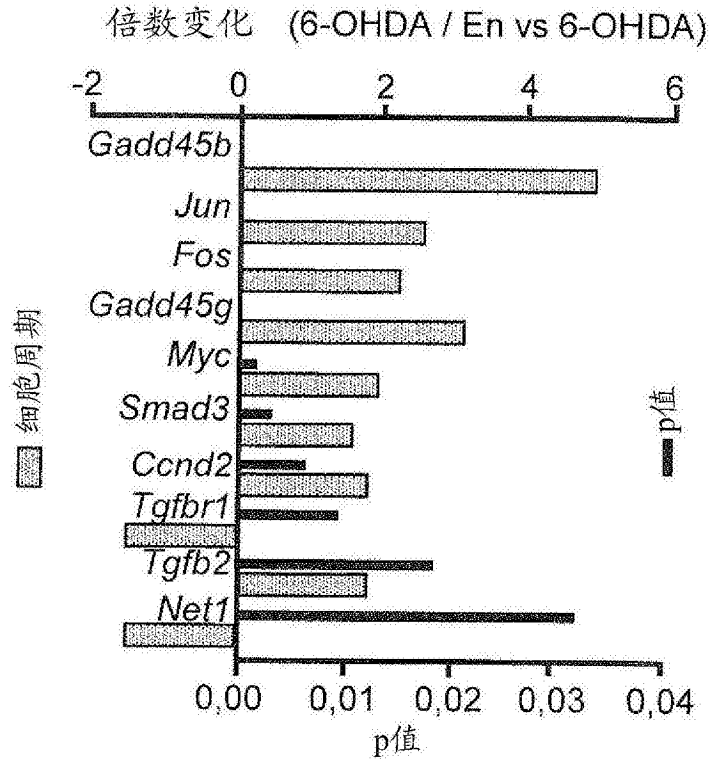


图4B

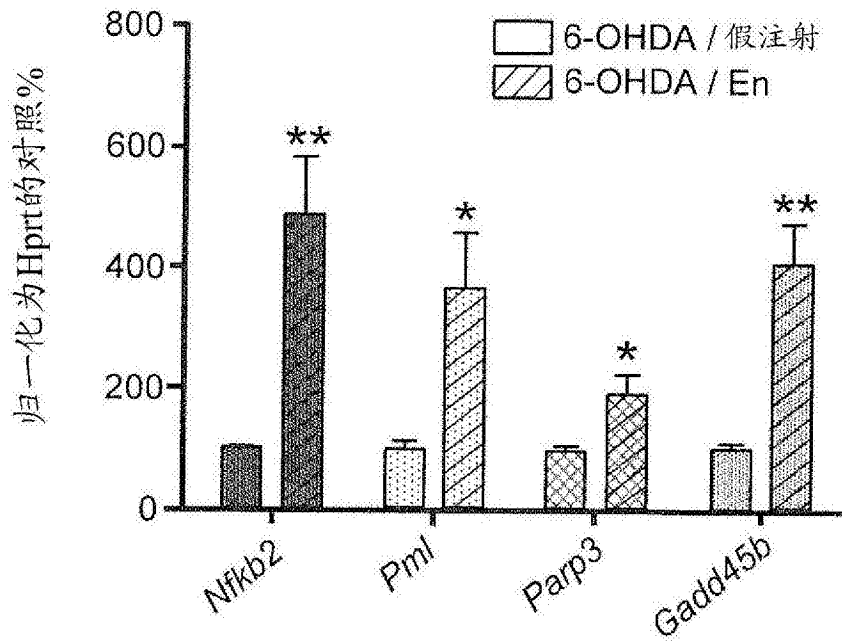


图4C

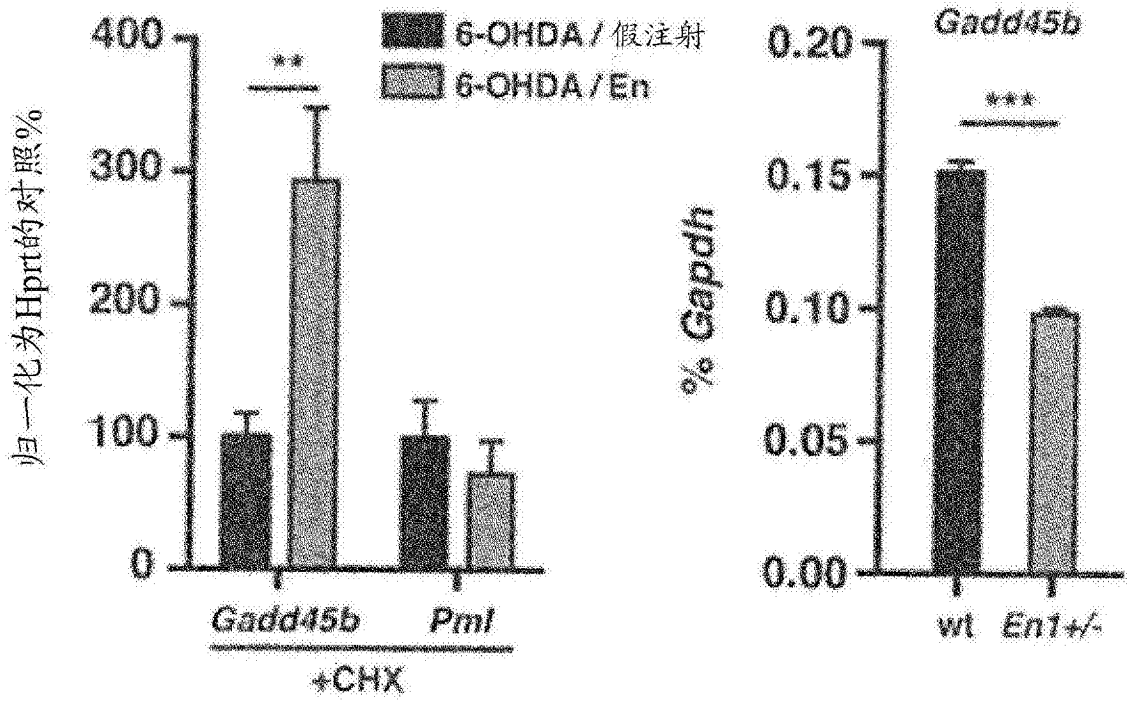


图4D

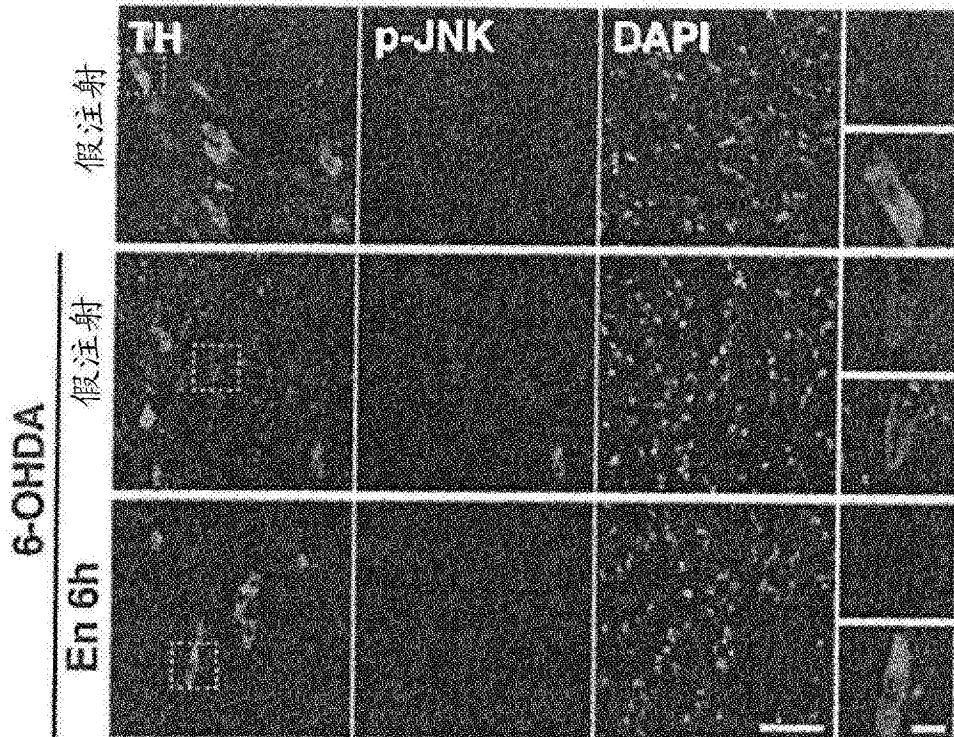


图4E

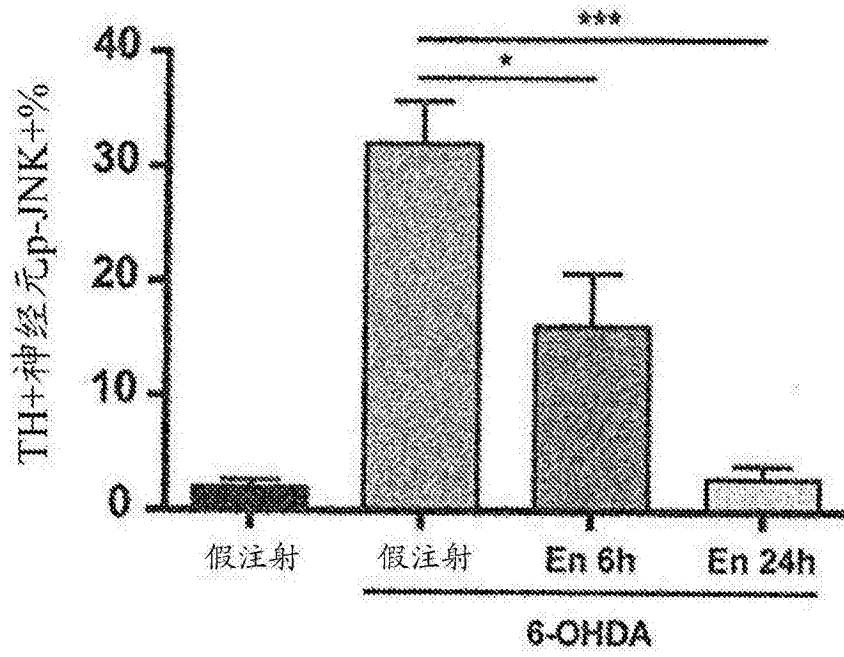


图4F

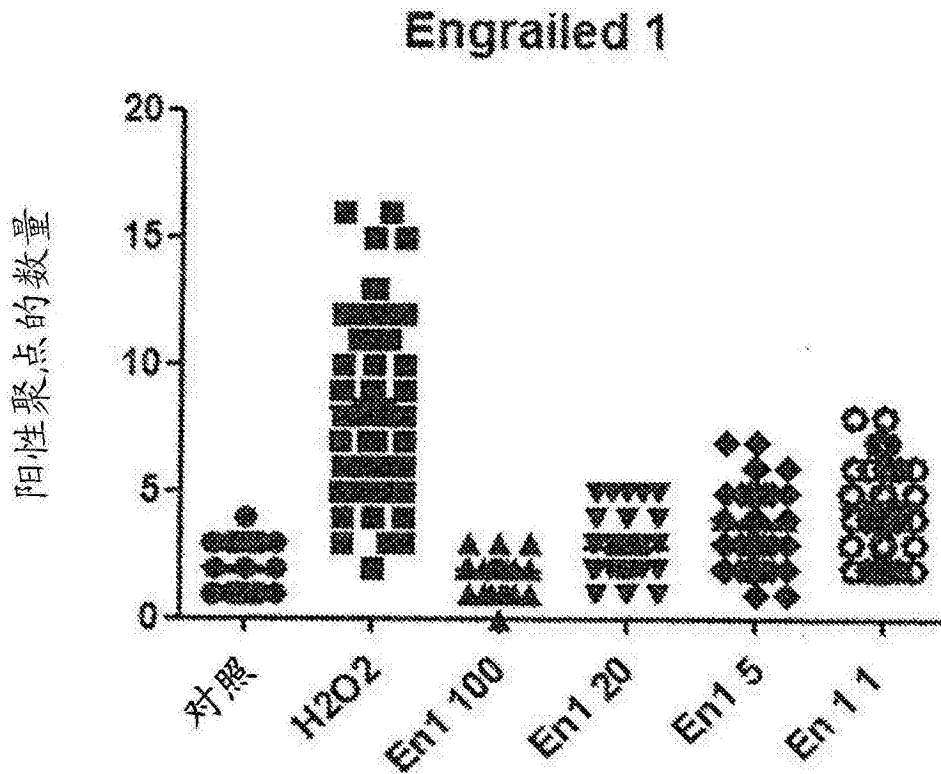


图5.1

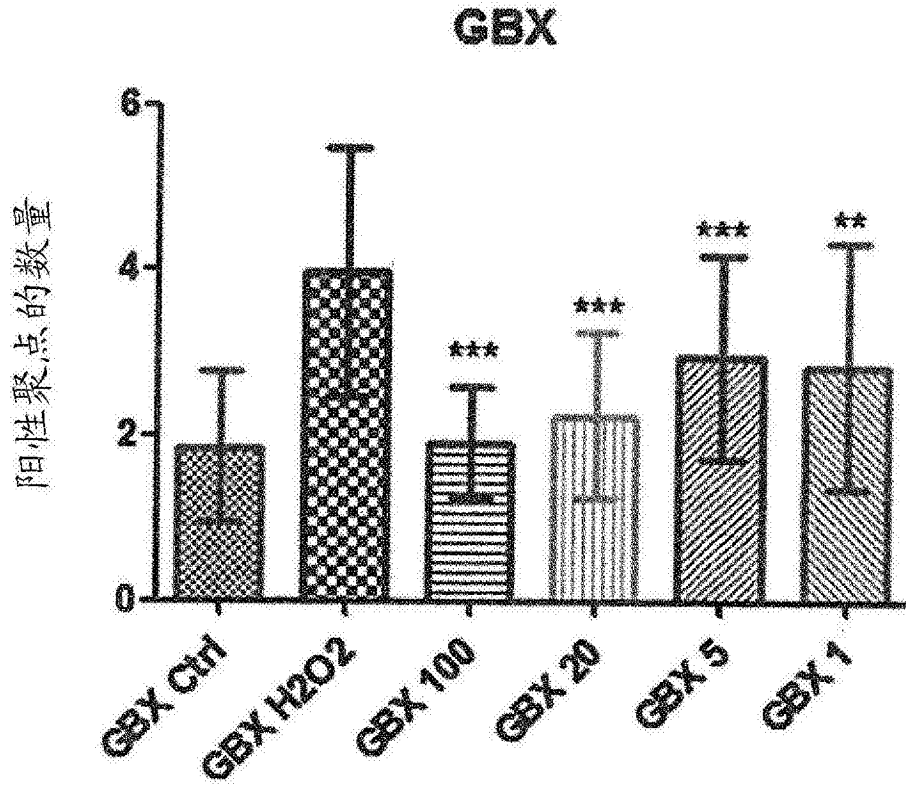


图5.2

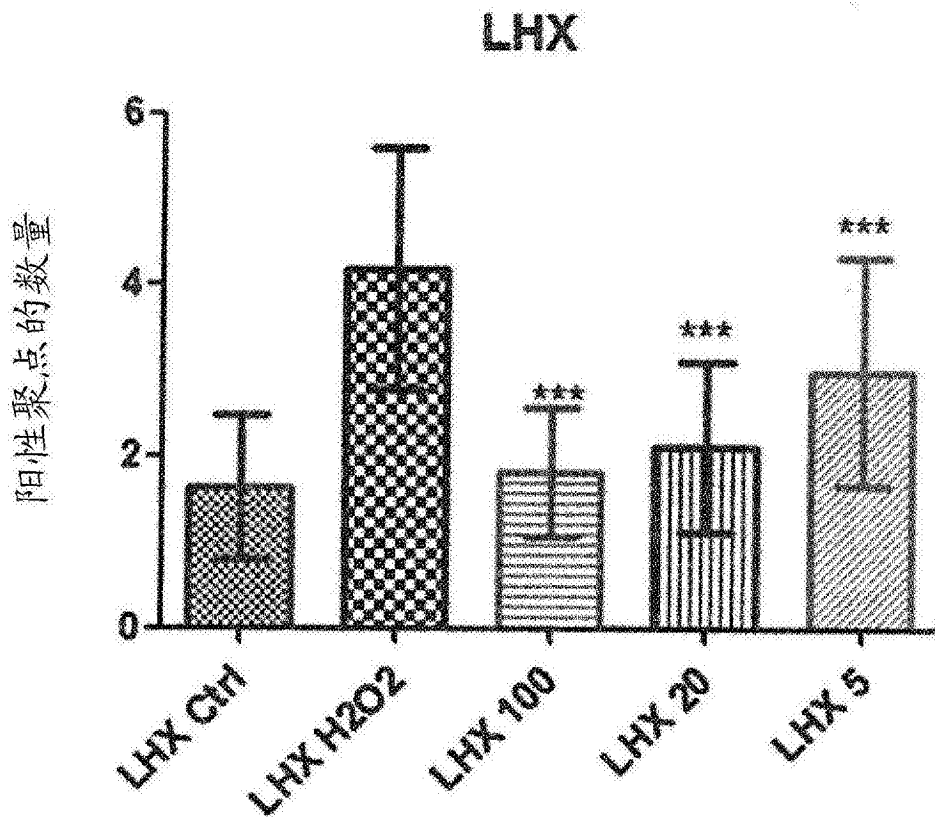
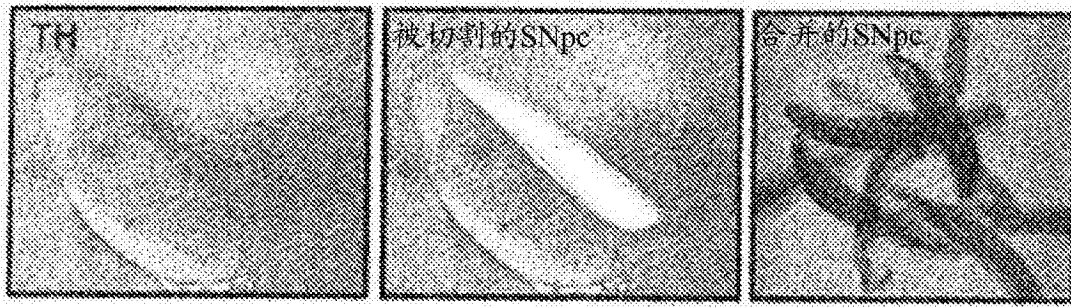
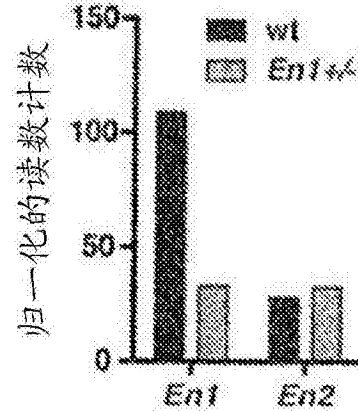


图5.3



RNA测序	读数 (以百万计)
wt	43
<i>En1</i> ^{+/-}	55.9

差异表达的基因	
在 <i>En1</i> ^{+/-} 中上调	588
在 <i>En1</i> ^{+/-} 中下调	401



图S1A

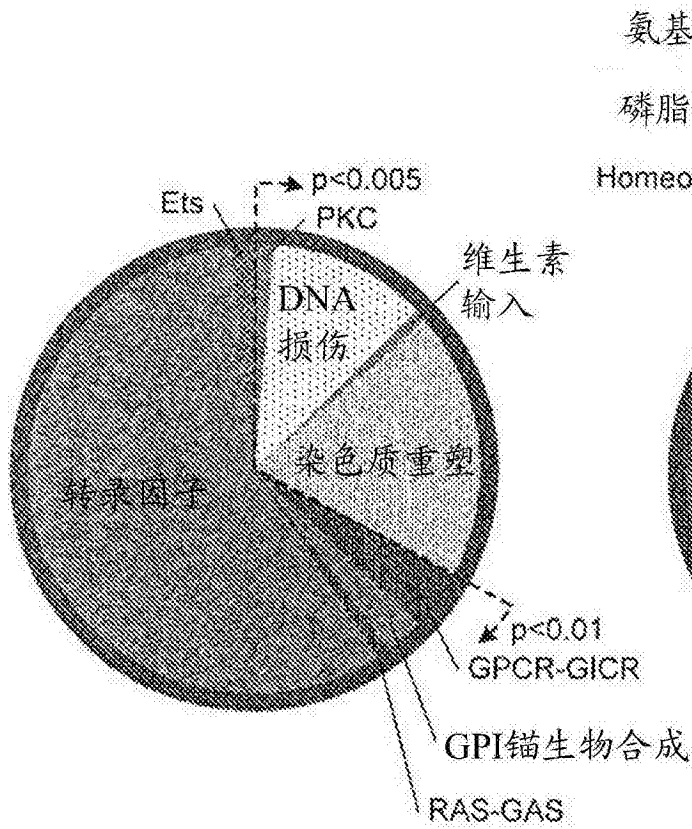


图 S1B

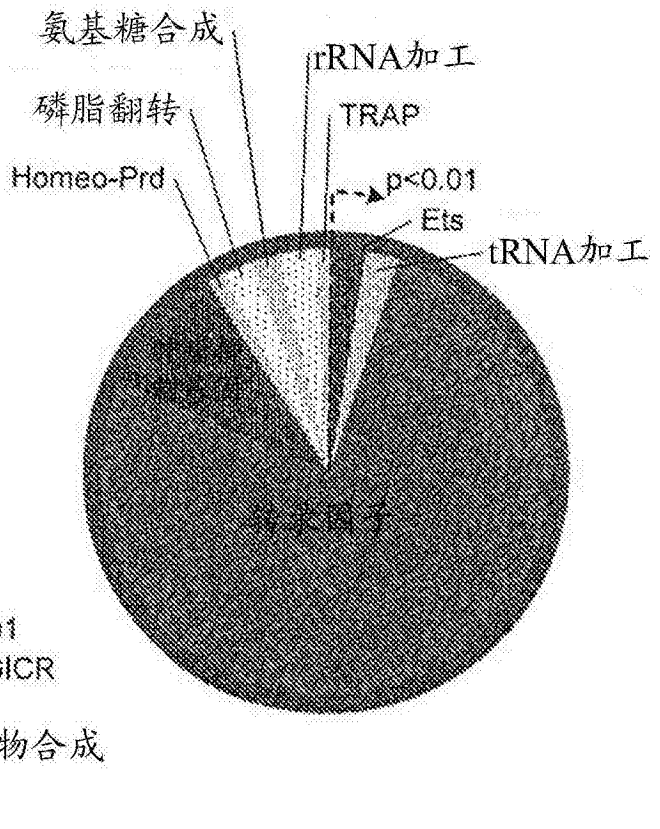
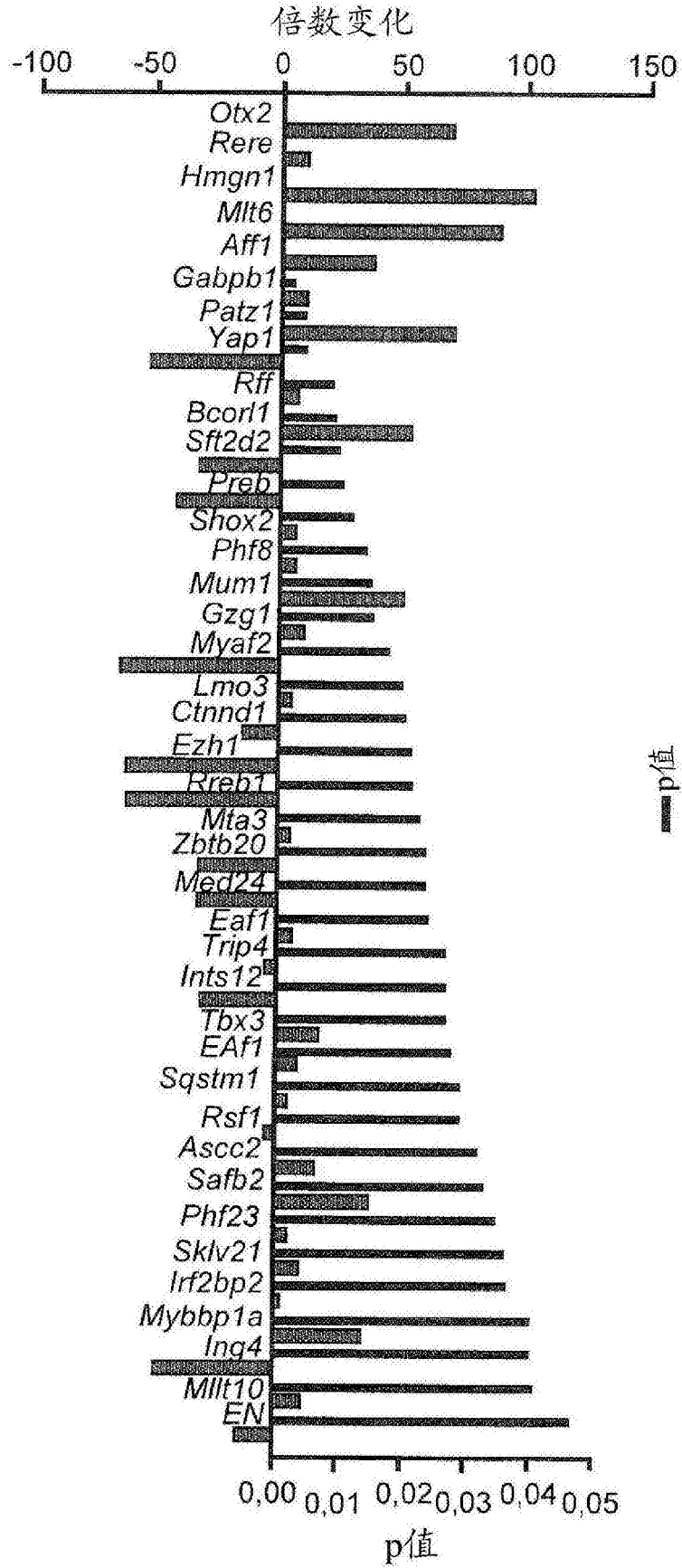
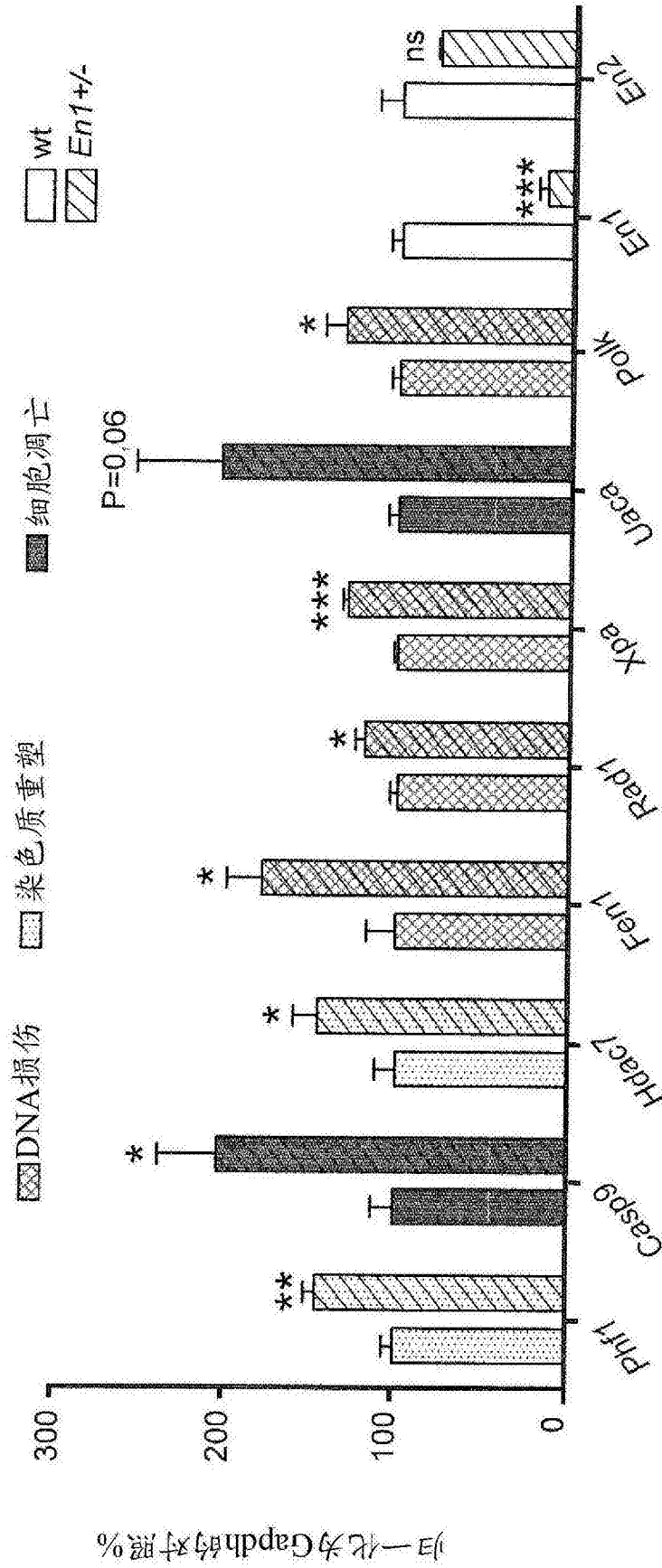


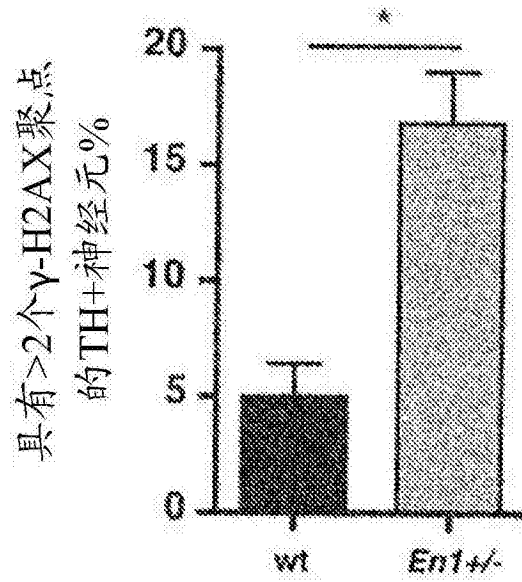
图 S1C



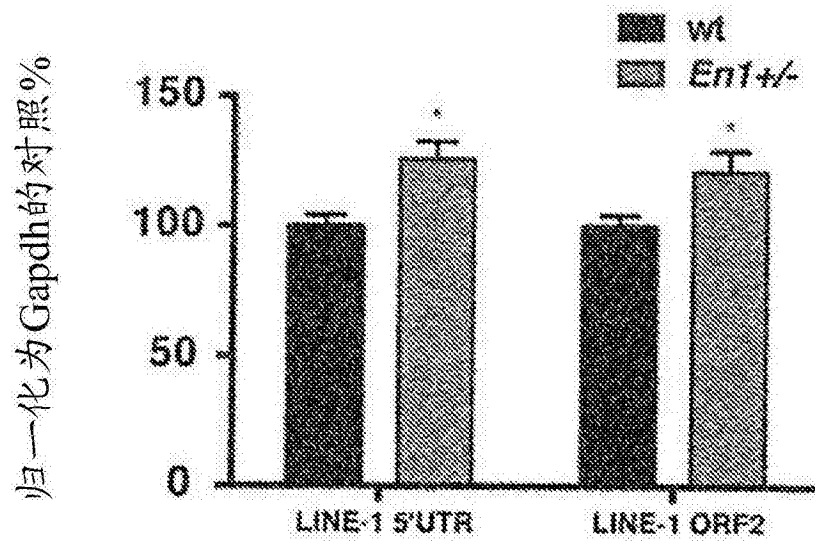
图S1D



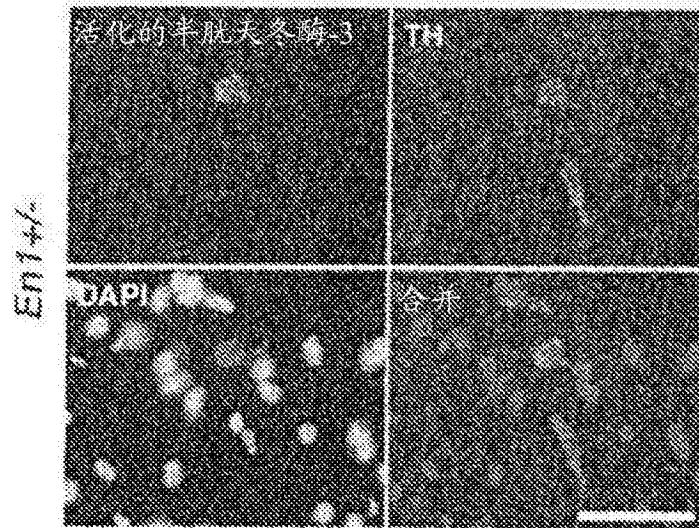
图S1E



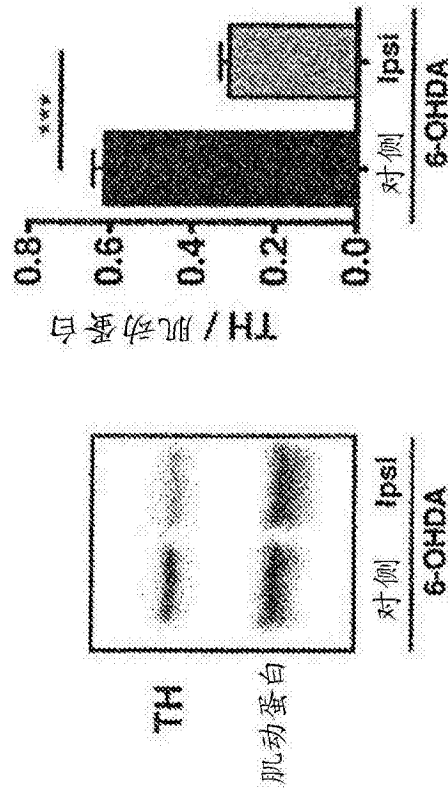
图S1F



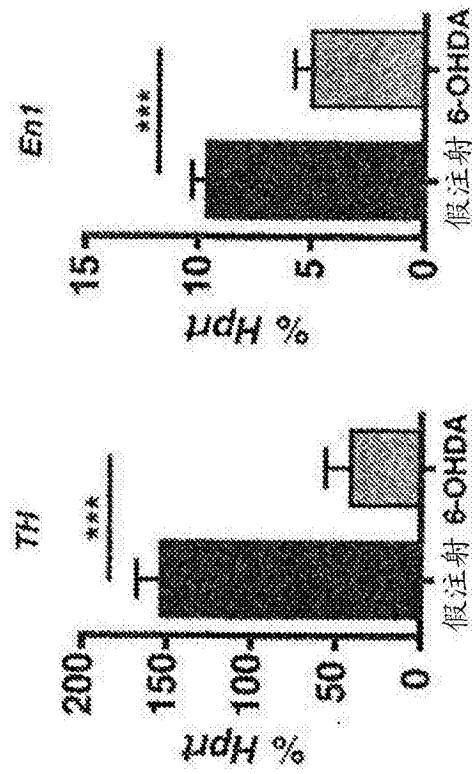
图S1G



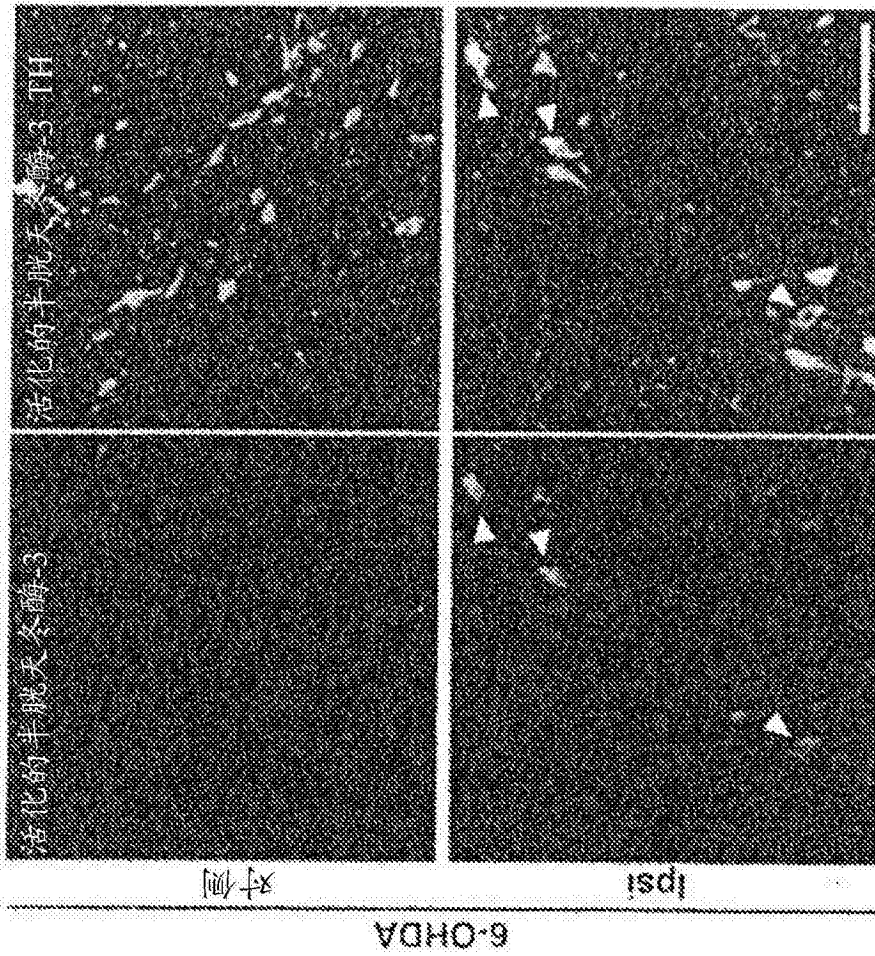
图S1H



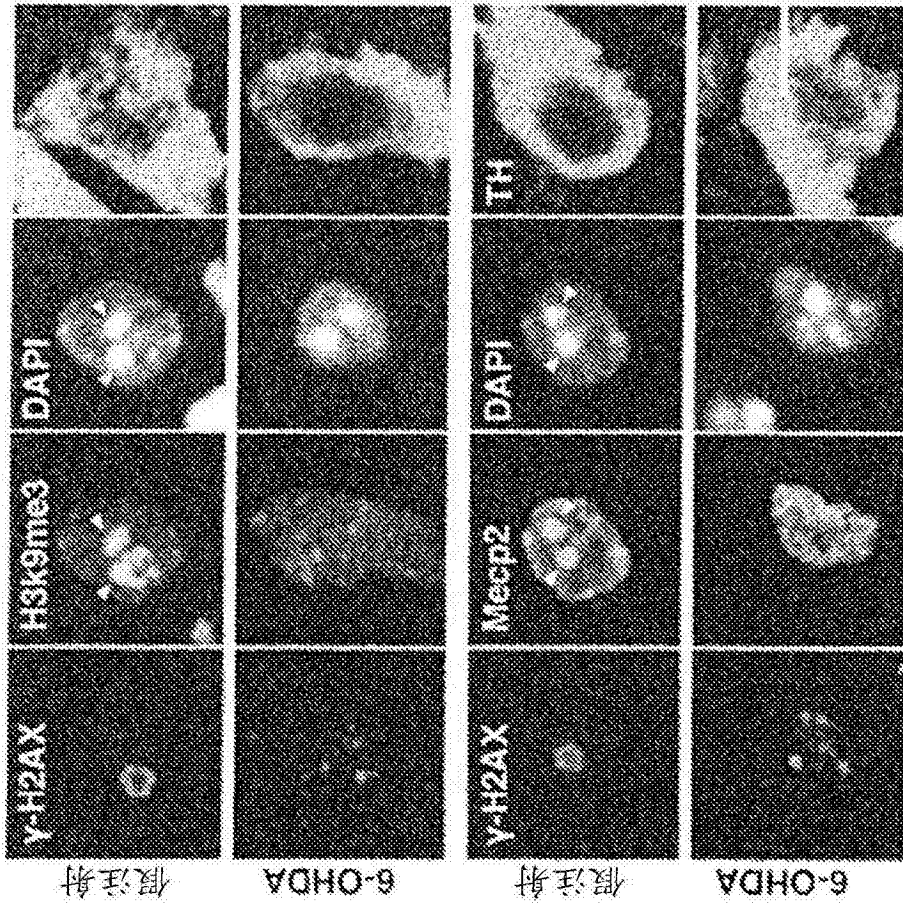
图S2A



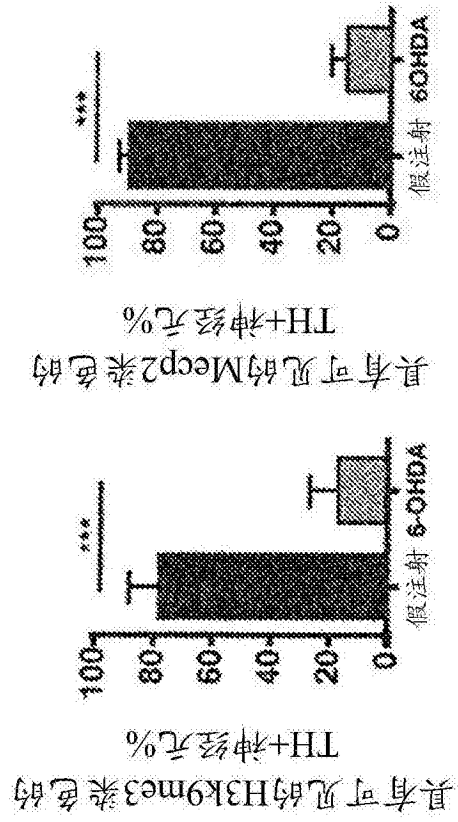
图S2B



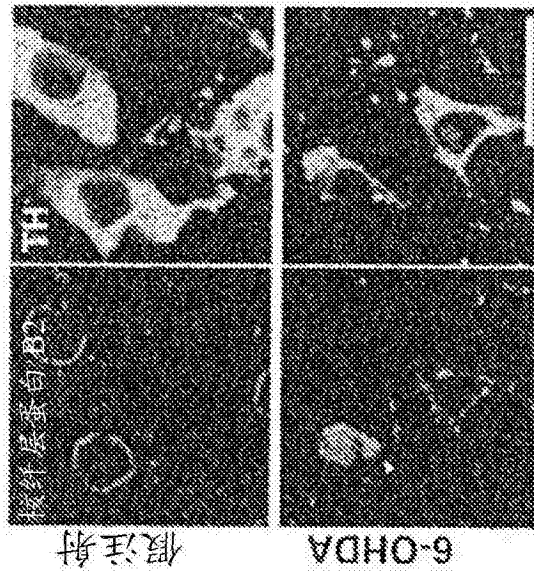
图S2C



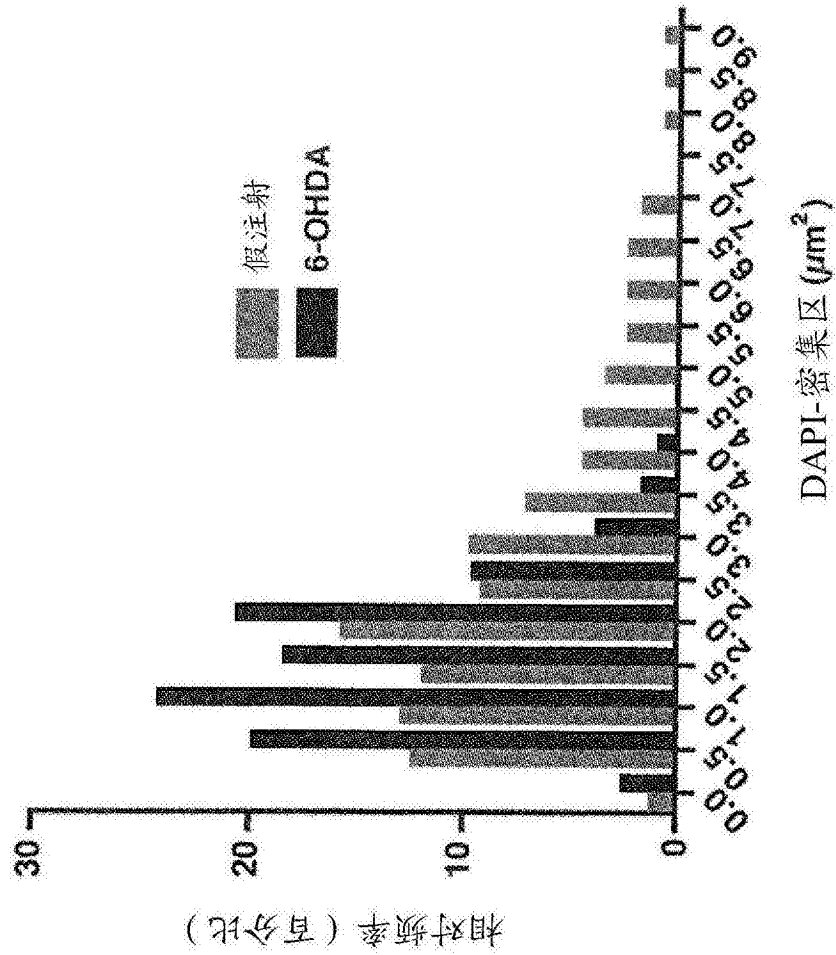
图S2D



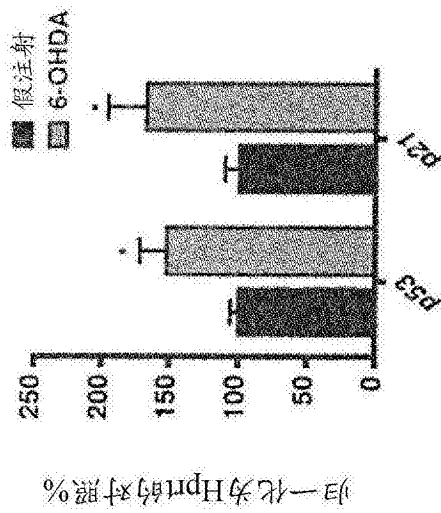
图S2E



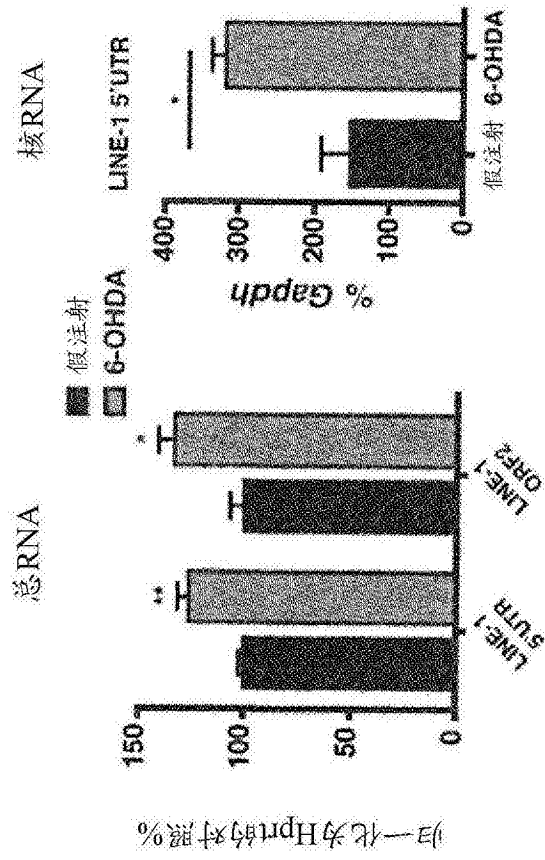
图S2F



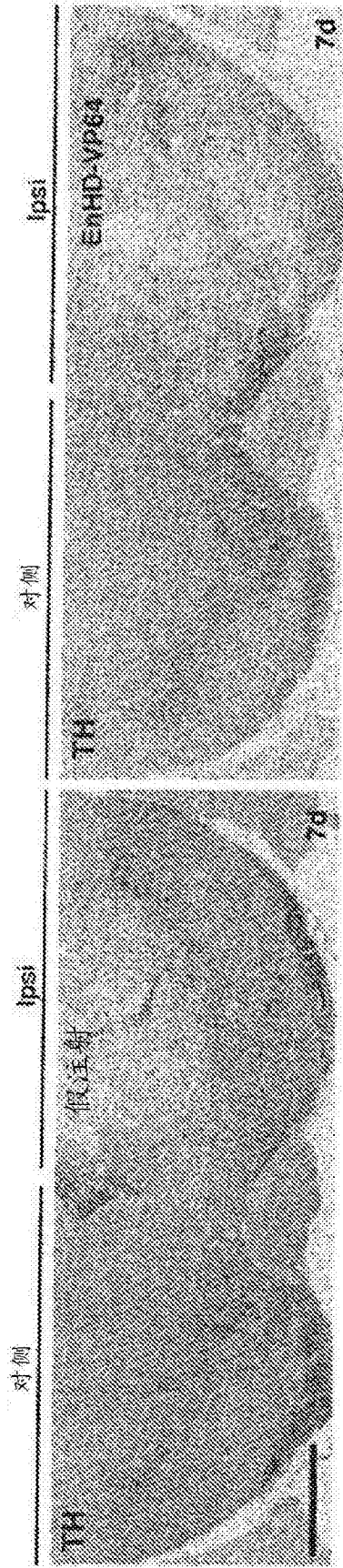
图S2G



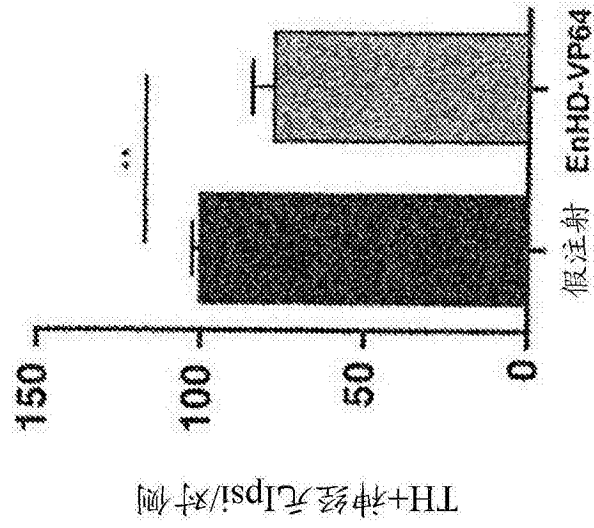
图S2H



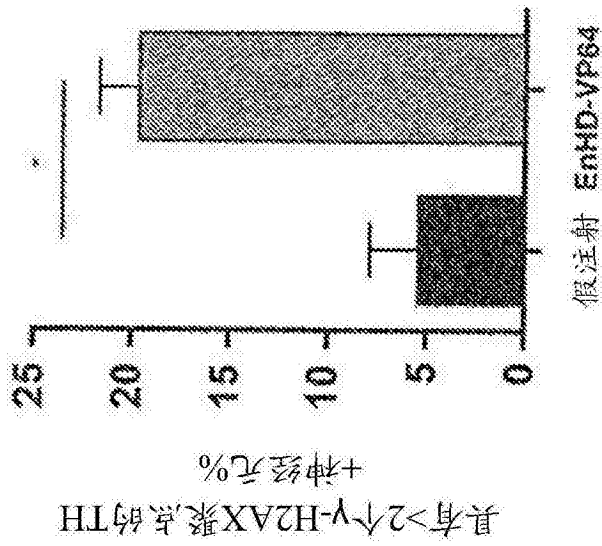
图S2I



图S3A

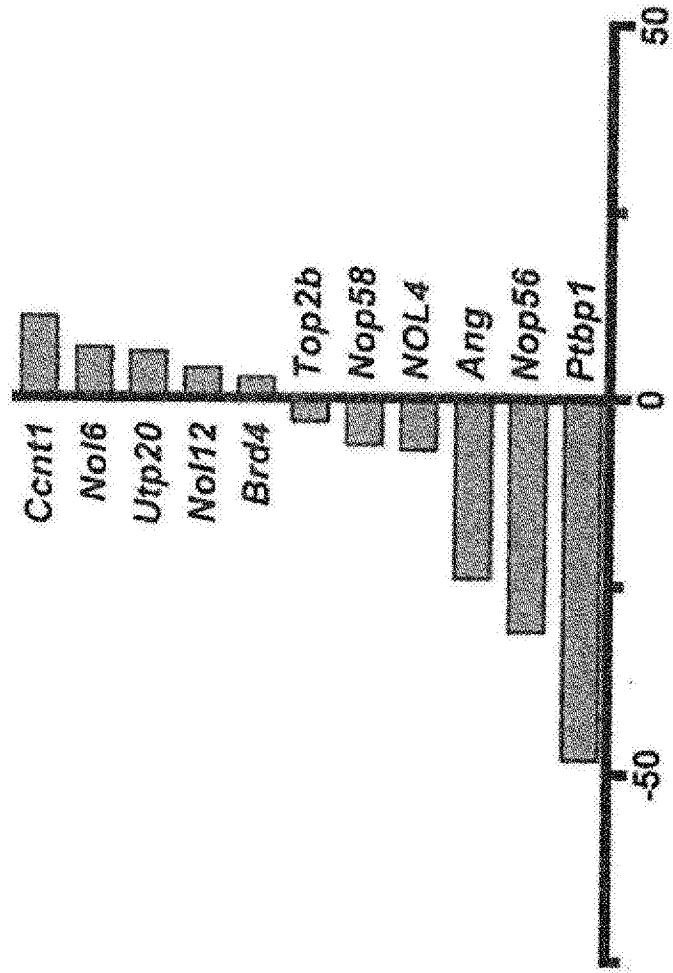


图S3B

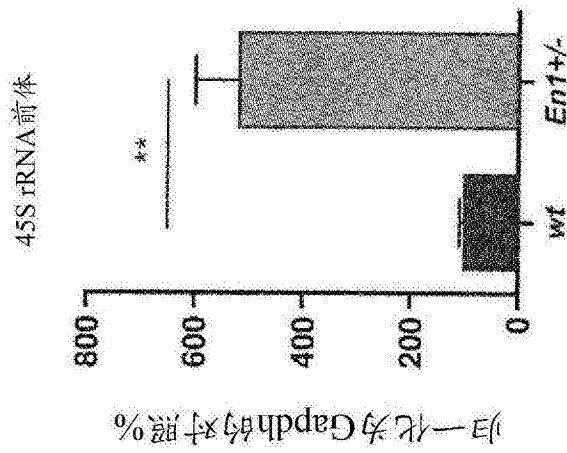


图S3C

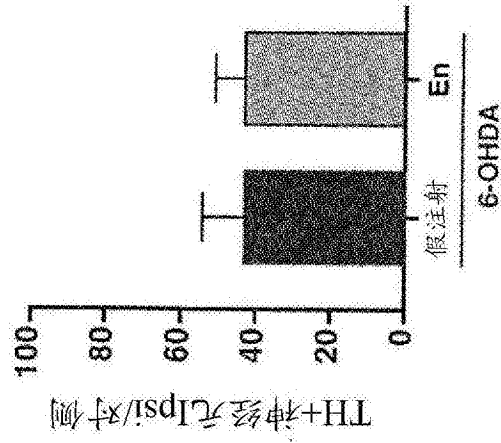
核仁组织和生物发生



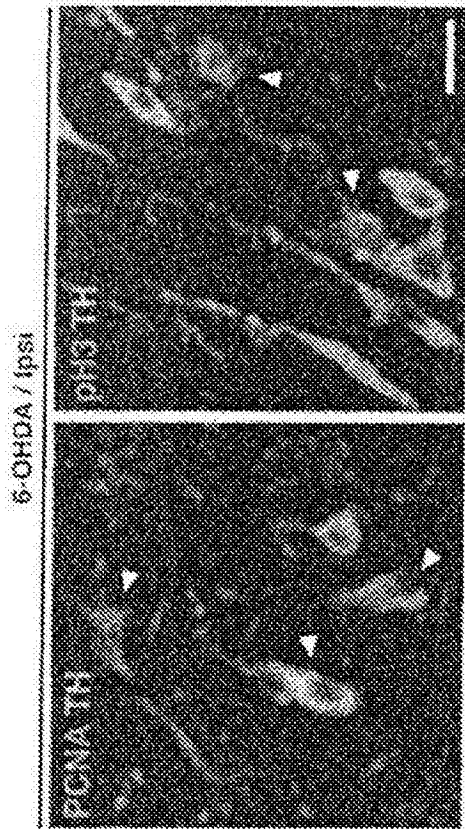
图S3D



图S3E



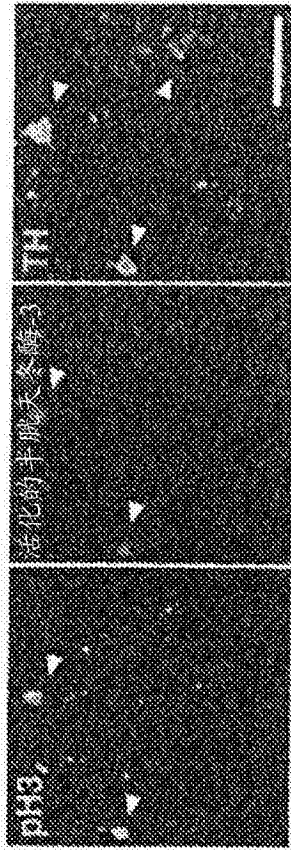
图S3F



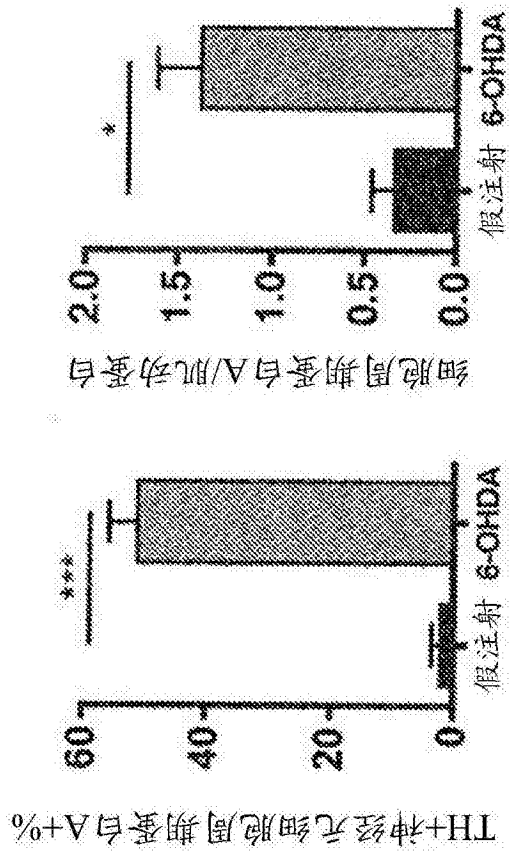
图S4A



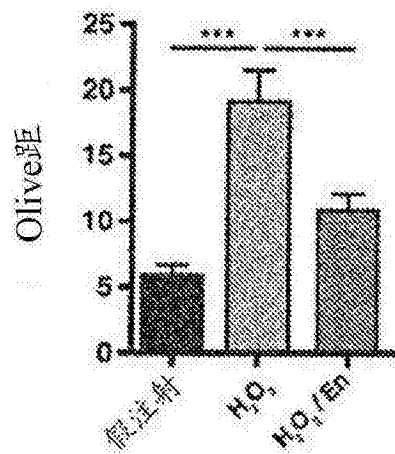
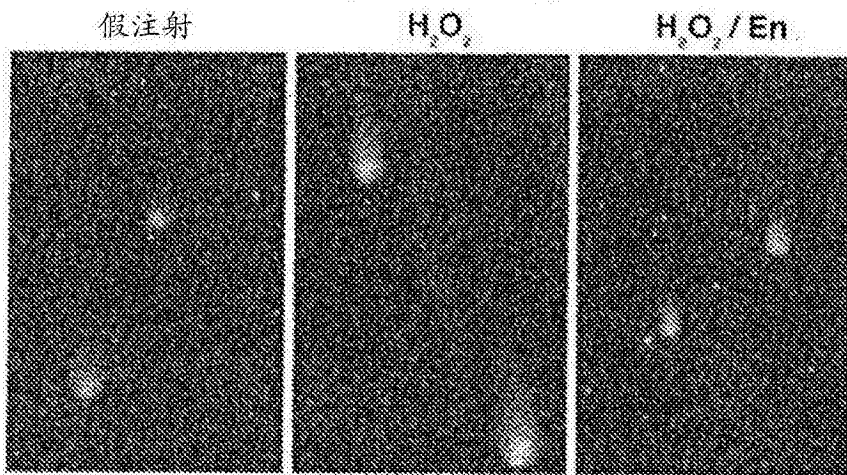
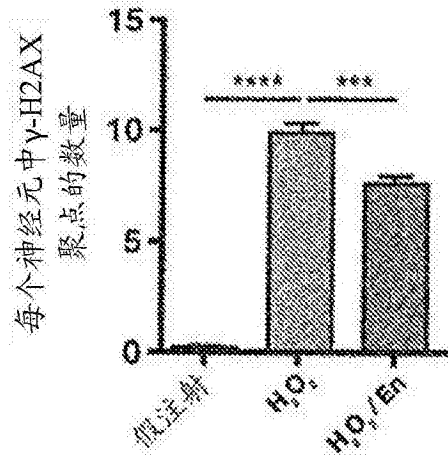
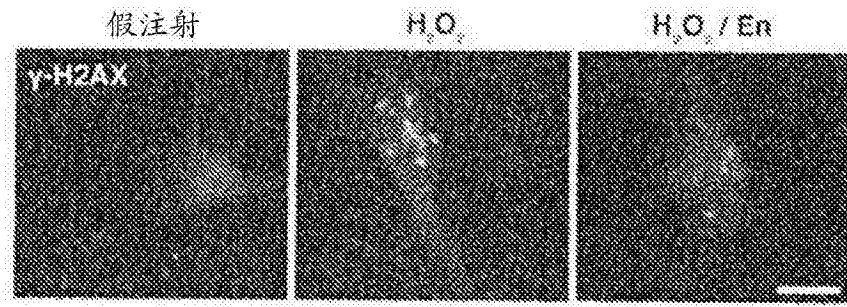
图S4B



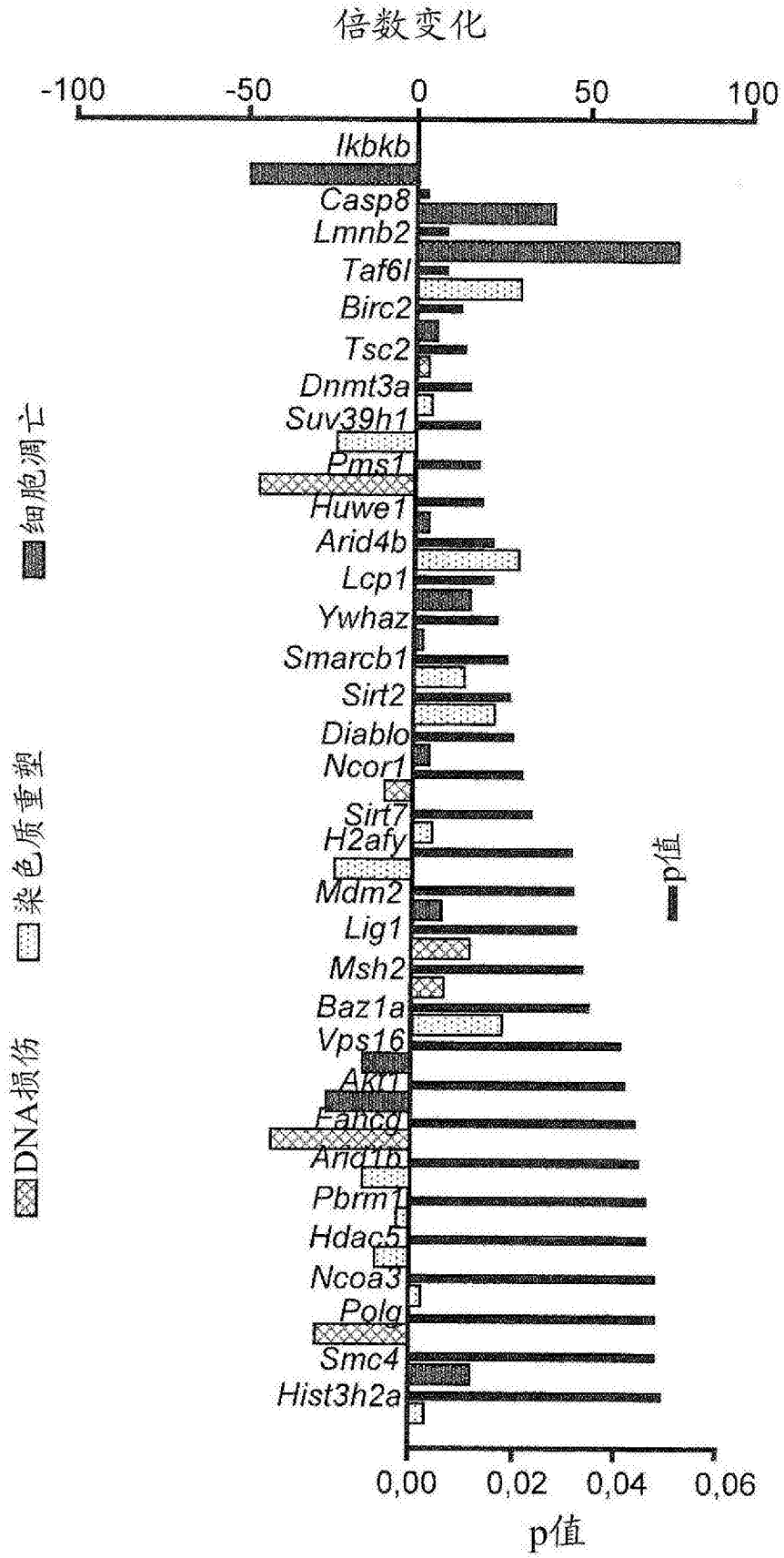
图S4C



图S4D



图S4E



图S4F