



(10) 授权公告号 CN 110770336 B

(45) 授权公告日 2023.09.12

(21) 申请号 201780091089.9

(22) 申请日 2017.03.22

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110770336 A

(43) 申请公布日 2020.02.07

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.11.21

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2017/077708 2017.03.22

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/170794 EN 2018.09.27

(73) 专利权人 神济昌华(北京)生物科技有限公
司
地址 100085 北京市海淀区开拓路5号5层
519-22

(72) 发明人 张雪 贾怡昌

(74) 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事
务所(普通合伙) 11201
专利代理师 蒋松

(51) Int.Cl.
C12N 5/10 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 106350521 A, 2017.01.25
US 2016177389 A1, 2016.06.23
WO 2012167086 A2, 2012.12.06
Haiyan Qiu等. ALS-associated mutation
FUS-R521C causes DNA damage and RNA
splicing defects.《The Journal of Clinical
Investigation》. 2014, 第124卷(第3期),

审查员 白鸽

权利要求书1页 说明书10页 附图6页

(54) 发明名称

用于ALS的突变型FUS模型

(57) 摘要

一种ALS模型,一种筛选用于治疗ALS的药物的方法以及一种构建ALS模型的方法,其中所述ALS模型表达突变型FUS,并且所述突变型FUS是FUS-R521C。

1. 一种构建ALS模型的方法,所述方法包括如下步骤:

(1) 将供体DNA、特异性靶位点导向RNA (gRNA) 和Cas9 mRNA共同注入到小鼠胚胎中,将野生型对应体中的FUS基因突变成ALS患者的突变型FUS基因获得KI突变型小鼠;

(2) 野生型小鼠繁殖KI突变型创建者,确认正确的基因组插入和种系传递;和

(3) 将KI突变型小鼠回交至C57BL/6J至少5代,

其中所述gRNA的核苷酸序列为gcgagcacagacaggatcgcAGG,

其中所述供体DNA片段包含FUS基因突变以及分别在其两侧的包含PSTI切割位点的左右同源臂,所述供体DNA片段长度为1kb,并且

其中所述FUS基因突变是FUS-R521C。

2. 根据权利要求1的所述方法,其中FUS-R521C通过定向突变的方式获得。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中通过以下技术中的至少一种来实现所述定向突变:

CRISPR-Cas9和小鼠受精卵或胚胎干细胞同源重组。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述供体DNA包含一个用于基因分型的PSTI切割位点。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述gRNA核苷酸序列gcgagcacagacaggatcgcAGG中3'端的AGG为PAM位点。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述野生型小鼠为C57BL/6J野生型小鼠。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述ALS模型为KI突变型小鼠和/或分离自所述小鼠的组织或细胞。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的方法获得的ALS模型或其后代在用于筛选ALS相关疾病的药物中的应用。

用于ALS的突变型FUS模型

技术领域

[0001] 本公开的实施方案总体上涉及生物学,更具体地,涉及一种ALS模型,一种筛选用于治疗ALS的药物的方法以及一种构建ALS模型的方法。

背景技术

[0002] 新出现的证据表明, RNA代谢异常,包括RBP功能获得、RNA解旋酶功能丧失以及pre-mRNA剪接的错误加工,均会导致神经退行性疾病。其中,编码两个结构相似的RBP(TDP-43和FUS)的基因中的突变与ALS和FTD相关,这两个神经退行性疾病具有遗传和病理重叠。更引人注目的是,尽管其中许多不携带这两个RBP突变,但在大部分ALS和FTD中发现了泛素阳性且错误定位的TDP-43和FUS,这突显了RBP功能障碍在发病机理中的关键作用。然而,由这些RBP的功能障碍引起的神经退行性变疾病的疾病机理在很大程度上仍是未知的。

[0003] 近来,在众多其它RBP之中,包含低复杂性结构域(LCD)(也被称为内在无序区(IDR))的TDP-43和FUS均已在非翻译细胞质mRNA复合物(也被应激颗粒(SG))中被鉴定出来,该应激颗粒(SG)是这样的结构:其通常在应激条件下出现以暂时性停止胞质mRNA翻译的起始。与TDP-43和FUS一样,另一些RBP基因中的突变也与包括ALS和FTD在内的神经退行性疾病有关。在ALS和FTD患者标本中,错误定位的TDP-43与SG标志物共定位,而在培养细胞中,在应激诱导的SG中发现了过表达的突变型TDP-43和FUS。VCP(一种编码参与自噬清除SG的蛋白质的基因)中的突变也与ALS和FTD密切相关。综上所述,这些数据表明SG的错误加工可能是造成疾病的病因。然而,目前尚不清楚野生型和突变型RBP的内源水平在SG形成和相变中,特别是在面临应激攻击的疾病靶神经元中如何表现和起作用,部分原因是由于迫切需要合理的细胞和动物模型。

[0004] 过去,已经做出了巨大的努力来通过过量表达携带在ALS家族中发现的突变的重组DNA来产生ALS的动物模型。尽管这些转基因动物模型极大地加深了我们对疾病机理的了解,但人们可能会争辩说,在疾病模型中由突变蛋白的异位过量表达所驱动的潜在假象,如人类SOD1-G93A在小鼠中40倍过量表达,这是最受欢迎的ALS小鼠模型之一。类似的转基因策略已应用于生成TDP-43和FUS ALS模型。但是,野生型TDP-43和FUS的过量表达也产生与许多动物物种(包括苍蝇、小鼠和大鼠)中的突变型转基因相似的运动表型,表明这些模型中发病机理的潜在假象。此外,转基因策略还有其它注意事项,包括不确定的基因组插入位点、不稳定的拷贝数、潜在的基因组完整性破坏、外源启动子驱动的异位表达模式以及缺乏内源的剪接调节。

[0005] 因此,需要做出巨大的努力来产生用于ALS的动物模型。

发明内容

[0006] 本公开的实施方案寻求至少在某种程度上解决现有相关技术中存在的问题中的至少一个,或者为消费者提供有用的商业选择。

[0007] 本公开的第一广泛方面的实施方案提供一种ALS模型。根据一些实施方案,其中该

ALS模型表达突变型FUS。本文所述的ALS模型具有确定基因组插入位点、稳定的拷贝数、基因组完整性、内源剪接调节,并且没有由外源启动子驱动的异位表达模式。该ALS模型可广泛用于ALS疾病机理研究和筛选用于治疗ALS的药物。

[0008] 根据一些实施方案,ALS模型可以进一步包括以下附加技术特征中的至少一个。

[0009] 根据一些实施方案,突变型FUS为FUS-R521C,其中FUS-R521的突变是人ALS中最常见的FUS突变。该ALS模型可更广泛地用于人ALS疾病机理研究和筛选用于治疗人ALS的药物。

[0010] 根据一些实施方案,ALS模型为动物、组织或细胞。根据本发明的具体实施方案,作为该ALS模型的动物、组织或细胞可广泛用于ALS疾病机理研究和筛选用于治疗ALS的药物。

[0011] 根据一些实施方案,组织或细胞分离自动物。根据本发明的具体实施方案,动物表达突变型FUS,分离自动物的组织或细胞也表达突变型FUS。作为该ALS模型的动物、分离自动物的组织或细胞可广泛用于ALS疾病机理研究和筛选用于治疗ALS的药物。

[0012] 根据一些实施方案,按如下获得细胞:将质粒引入受体细胞,其中所述质粒携带表达FUS-R521突变的核苷酸,其中所述受体细胞分离自人。如上所述获得的细胞可广泛用于ALS疾病机理研究和筛选用于治疗ALS的药物。

[0013] 根据一些实施方案,这些细胞是原代细胞或胚胎干细胞。根据本发明的具体实施方案,原代细胞和胚胎干细胞在应激处理下均具有ALS样的应激反应。原代细胞和胚胎干细胞均可广泛用于ALS的疾病机理研究和筛选用于治疗ALS的药物。

[0014] 根据一些实施方案,原代细胞为神经元细胞。肌萎缩性侧索硬化症(ALS)是一种会导致控制自主肌肉的神经元死亡特定疾病。因此,神经元细胞的ALS样应激反应更为典型。

[0015] 根据一些实施方案,这些动物为C57BL/6J型小鼠。C57BL/6J小鼠品系背景已广泛用于生成小鼠疾病模型、疾病机理研究、药物安全性评估和药效评估。

[0016] 根据一些实施方案,按如下获得动物:将所述FUS-R521C KI突变型小鼠与C57BL/6J野生型小鼠回交至少5代。由于发明人用来生成FUS-R521C KI突变型小鼠ALS模型的Crispr/Cas9手段可能产生的脱靶效应,发明人将KI突变型品系回交到C57BL/6J野生型,以最大限度地避免Crispr/Cas9手段引入的潜在脱靶。五代回交将驱动约KI突变型小鼠97%的基因组至C57BL/6J野生型背景。

[0017] 根据一些实施方案,按如下获得动物:将FUS-R521C KI突变型小鼠回交至C57BL/6J野生型小鼠10代。由于发明人用来生成FUS-R521C KI突变型小鼠ALS模型的Crispr/Cas9手段可能产生的脱靶效应,发明人将KI突变型品系回交到C57BL/6J野生型,以最大限度地避免Crispr/Cas9手段引入的潜在脱靶。十代回交将驱动约KI突变型小鼠99.9%的基因组至C57BL/6J野生型背景。

[0018] 本公开的第二广泛方面的实施方案提供了一种筛选用于治疗ALS的药物的方法。根据一些实施方案,该方法包括:应激处理上述ALS模型;以及使候选试剂与经过应激处理的ALS模型接触;基于接触前后ALS模型的变化,判断候选试剂为治疗ALS的药物。根据本发明实施方案的方法,可以有效地筛选出用于治疗ALS的药物。

[0019] 根据一些实施方案,该方法可以进一步包括以下附加技术特征中的至少一者。

[0020] 根据一些实施方案,应激处理包括氧化应激、内质网应激和线粒体应激中的至少一种。更具体地,氧化应激反映了反应性氧物质的全身表现与生物系统易于对活性中间体

进行解毒或修复所造成的损伤的能力之间的不平衡。细胞正常氧化还原状态的紊乱可通过产生过氧化物和自由基而引起毒性作用,这些过氧化物和自由基会破坏细胞的所有成分,包括蛋白质、脂质和DNA。内质网应激响应于内质网腔中未折叠或错误折叠的蛋白质的积累而被激活。线粒体应激是导致线粒体功能障碍的情况(遗传、环境因素、衰老),包括由于线粒体来源的ROS产生增加引起的氧化应激、细胞能量代谢下降以及凋亡反应中断,都是导致观察到的基于线粒体疾病的一些主要下游细胞病变结果。

[0021] 根据一些实施方案,ALS模型为细胞模型,经过接触的细胞具有下述至少一种变化表明候选试剂是用于治疗ALS的药物:(1)细胞存活率提高;(2)细胞质中突变型FUS减少;(3)应激颗粒数量和尺寸减少;和(4)泛素阳性包涵体减少。发明人意外地发现,在应激处理下,突变型FUS在细胞溶质中易于错误定位。在细胞溶质中错误定位的突变型FUS形成应激颗粒,甚至泛素阳性包涵体。上述分子机理导致细胞死亡和一系列ALS疾病。因此,如果候选试剂可以提高细胞存活率或减少细胞质中的突变型FUS,例如清除掉细胞溶质中错误定位的突变型FUS或阻止突变型FUS脱离细胞核,或阻止形成应激颗粒甚至泛素阳性包涵体,则可以判断候选试剂可以阻断ALS进程,也可以判断为用于治疗ALS的药物。实际上,本申请的发明人也通过实验证实了这一点。

[0022] 根据一些实施方案,ALS模型为动物模型,经过接触的动物自主活动增多、后肢力量增强、外围运动神经元的轴突数目增多或运动和学习能力增强表明候选试剂是用于治疗ALS的药物。发明人发现,在应激处理下,ALS动物模型的自主活动和后肢肌肉力量降低,并且焦虑增加。因此,如果候选试剂可以增强动物的自主活动和后肢肌肉力量,或减轻焦虑行为,则该候选试剂可以被判断为将用于治疗ALS的药物。实际上,本申请的发明人也通过实验证实了这一点。

[0023] 本公开的第二广泛方面的实施方案提供一种构建ALS模型的方法。根据一些实施方案,该方法包括:将野生型对应体中的FUS基因突变成ALS患者的突变型FUS基因。使用本公开的方法构建的ALS模型具有确定基因组插入位点、稳定的拷贝数、基因组完整性、内源剪接调节,并且没有由外源启动子驱动的异位表达模式。该ALS模型可广泛用于ALS疾病机理研究和筛选用于治疗ALS的药物。

[0024] 根据一些实施方案,该方法可以进一步包括以下附加技术特征中的至少一者。

[0025] 根据一些实施方案,FUS基因突变为FUS-R521C。FUS-R521C是人ALS中最常见的突变。表达FUS-R521C的ALS模型更为典型。

[0026] 根据一些实施方案,通过定向突变的方式获得FUS-R521C。将FUS定向突变为FUS-R521C,可以避免非定向突变。使用该方法构建的ALS模型具有更确定的基因组插入位点、更稳定的拷贝数。该ALS模型可以更广泛地用于ALS疾病机理研究和筛选用于治疗ALS的药物。

[0027] 根据一些实施方案,通过以下技术中的至少一种,CRISPR-Cas9和小鼠受精卵或胚胎干细胞同源重组实现定向突变。CRISPR-Cas9和同源重组可以更成功地获得FUS-R521C定向突变。

[0028] 根据一些实施方案,当发明人引入FUS-R513C突变时,他们还引入了另外的同义突变以产生构建在基因座中的新的PstI切割位点,这使得将来的基因分型更容易。

[0029] 本公开的以上概述并非旨在描述本公开的每个公开的实施方案或每种实施方式。随后的附图和具体实施方式更具体地举例说明了示例性实施方案。

[0030] 本公开的实施方案的附加方面和优点将在以下描述中部分地给出,部分从以下描述中变得明显,或者从本公开的实施方案的实践中得知。

附图说明

[0031] 从以下参考附图的描述中,本公开的实施方案的这些和其他方面以及优点将变得显而易见,并且将更容易理解,其中:

[0032] 图1示出了利用CRISPR/Cas9产生ALS的mFUS-R513C KI突变型小鼠,

[0033] 其中,

[0034] A示出了不同哺乳动物物种中FUS的最后12个氨基酸的排列。这些氨基酸从啮齿动物到人类都是高度保守的。NCBI登录号:H.sapiens (NP_004951.1)、B.Taurus (XP_005224884.1)、R.norvegicus (Np_001012137)、以及M.musculus (NP_631888.1)。人FUS序列被用作氨基酸定位的参考。R521标有星号。

[0035] B示出了FUS基因的小鼠基因组结构。小鼠FUS R513对应于人R521。将红色标记的两个核苷酸突变引入小鼠PAM位点上游2bp的FUS基因座(深黑色3个大写字母)。带下划线的基因组DNA序列对应于gRNA序列。

[0036] C示出了DNA色谱图;

[0037] D示出了凝胶电泳。包括插入的PCR产物用PstI处理。+/+表示野生型C57BL/6J小鼠,C/+和C/C表示杂合和纯合mFUS-R513C KI小鼠;以及

[0038] E示出了FUS在小鼠各种组织中的表达。用自制的FUS抗体将来自8月龄的野生型(+/+)小鼠和mFUS-R513C KI突变型(C/C)小鼠的组织进行了印迹。

[0039] 图2显示了衰老的mFUS-R513C突变型KI小鼠表现出运动减退和运动神经纤维数量减少,

[0040] 其中,

[0041] A示出了通过旷场(美国CleverSys.TopScan行为分析系统)测量的行进距离,并且证明了在衰老的杂合(C/+)和纯合(C/C)KI突变型行进距离的显著下降(6.5个月),但在年轻(4月龄)的突变型动物中则没有下降。4月龄,n=9(分别为+/+和C/+) ,雄性。6.5月龄,n=25(+/+) ,n=16(C/+) ,n=12(C/C) ,雄性。在旷场测试中,计算了衰老(6.5月龄)小鼠后肢的站立时间(10分钟间隔内的数秒)。该值表示为平均值±SEM。*p<0.05,**p<0.01(单方差分析或t检验,SPSS)。NS,无统计学意义;

[0042] B示出了与野生型(+/+)组相比,6.5月龄的杂合(C/+)和纯合(C/C)KI突变型组的站立时间显著减少。该值表示为平均值±SEM。*p<0.05,**p<0.01(单方差分析或t检验,SPSS)。NS,无统计学意义;

[0043] C和D示出了4月龄(C)和6.5月龄(D)的野生型(+/+) ,杂合(C/+)和/或纯合(C/C)KI突变型小鼠在转杆实验中的表现(4天间隔,美国Med Associates Inc.)。在衰老的KI突变型(C/+和C/C,6.5月龄)小鼠中,在转杆上的停留时间显著减少,而在较年轻的(4月龄)突变型动物中则没有减少。4月龄,n=8(分别为+/+和C/+) ,雄性。6.5月龄,n=25(+/+) ,n=14(C/+) ,n=15(C/C) ,雄性。该值表示为平均值±SEM。*p<0.05,**p<0.01(单方差分析或t检验,SPSS)。NS,无统计学意义;

[0044] E示出了8月龄野生型(+/+)和KI突变型(C/C)动物的股神经运动支的甲苯胺蓝染

色横截面。轴突退行性变(箭头)在高倍放大图像中示出。比例尺,低放大倍率图像为50 μm ,高放大倍率图像为100 μm 。低放大倍率图像中红点的直径为5 μm ,其用于测量纤维尺寸;和

[0045] F示出了与野生型(+ / +)同窝对照动物相比,KI突变型(C / C,8月龄)动物中股运动支的较大尺寸(直径 $\geq 5\mu\text{m}$) (而非较小尺寸($< 5\mu\text{m}$))的神经纤维数量显著减少。在(A,B,C和D)中,该值表示为平均值 \pm SEM。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ (单方差分析,SPSS)。NS,无统计学意义。该值表示为平均值 \pm SEM($n = 3$)。 $**p < 0.01$ (t检验,SPSS),以及

[0046] 图3示出了当培养的运动神经元面对应激攻击时,突变型R513C FUS(而非野生型)移入SG,并导致突变型SG分解缺陷,

[0047] 其中,

[0048] A示出了野生型(+ / +)或KI突变型(C / C)培养的运动神经元(3DIV)的代表性免疫染色图像,这些神经元经过AS处理(亚砷酸钠,1mM,1小时)或从AS处理中恢复(更改为无AS培养基,并在AS处理后再培养一小时)。经AS处理后,野生型和KI突变型神经元中均形成TIA1阳性SG。然而,仅突变型SG在AS处理后或恢复后均为TIA1和FUS阳性。比例尺为20 μm 。MOCK,溶媒对照组;

[0049] B示出了AS处理(AS)或恢复后(AS+1小时)包含TIA1阳性SG的细胞百分比。恢复后,野生型组中的百分比显著降低,但在KI突变型组中没有显著差异,这表明在含有突变型FUS的SG中存在SG分解缺陷。该值表示为平均值 \pm SEM($n \geq 3$)。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ (t检验,SPSS)。NS,无统计学意义;

[0050] C示出了SG在AS处理后或恢复后TIA1和FUS均为阳性的百分比。每个AS诱导的突变型SG均为双阳性。相反,AS诱导的野生型SG都不是双阳性。该值表示为平均值 \pm SEM($n \geq 3$)。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ (t检验,SPSS)。NS,无统计学意义;

[0051] D示出了每个细胞的SG计数。恢复后,野生型神经元中的SG数量显著减少,但在突变型组中没有显著差异,这进一步支持了突变型SG分解缺陷。该值表示为平均值 \pm SEM($n \geq 3$)。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ (t检验,SPSS)。NS,无统计学意义;以及

[0052] E示出了不同尺寸类别的AS诱导的SG。我们将SG的尺寸分为三组:小尺寸($< 1\mu\text{m}$)、中尺寸(≥ 1 且 $< 2\mu\text{m}$)和大尺寸($\geq 2\mu\text{m}$)。恢复后,在野生型组中清除了大尺寸的SG和大部分小尺寸的SG。相反,在恢复之后,突变型SG的大小并没有被有效分解。该值表示为平均值 \pm SEM($n \geq 3$)。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ (t检验,SPSS)。NS,无统计学意义。

[0053] 图4示出了百草枯(paraquat)处理显著增加了突变型SG的形成,并使突变型FUS重定位到SG中,

[0054] 其中,

[0055] A示出了将野生型(+ / +)和KI突变型(C / C)培养的运动神经元(3DIV)用百草枯(Para.,1mM,8小时)处理,并用TIA1和FUS抗体染色。请注意,大多数TIA1阳性突变型SG为FUS阳性。比例尺为20 μm 。

[0056] B示出了来自(A)中显示的实验的统计结果。百草枯处理显著增加了突变型SG的形成,并使突变型FUS在培养的运动神经元中重新定位到SG中。该值表示为平均值 \pm SEM($n \geq 3$)。 $**p < 0.01$ (t检验,SPSS)。

[0057] 图5示出了长时间的应激攻击将SG转化为泛素阳性包涵体,

[0058] 其中,

[0059] A示出了野生型 (+/+) 或KI突变型 (C/C) 培养的运动神经元 (3DIV) 的用AS (亚砷酸钠, 1mM) 处理4小时和6小时 (4和6hr) 的代表性免疫染色图像。经过长时间的应激处理后, 野生型FUS仍保持其核定位。相反, AS处理后, KI突变型神经元中显示出泛素阳性包涵体, 且这些包涵体也为FUS阳性。星号表示DAPI阴性细胞碎片中泛素阳性包涵体。比例尺为20 μ m;

[0060] B示出了在1小时、2小时和4小时AS处理后包含FUS和泛素均为阳性包涵体的细胞百分比。双阳性包涵体仅出现在KI突变型运动神经元中, 而没有出现在野生型运动神经元中。该值表示为平均值 \pm SEM ($n \geq 3$);

[0061] C示出了每个细胞的包涵体计数。长时间的应激攻击增加了突变型 (C/C) 运动神经元 (MN) 中泛素阳性包涵体的数量。该值表示为平均值 \pm SEM ($n \geq 3$);

[0062] D示出了不同尺寸类别的包涵体数目。发明人将包涵体的尺寸分为三组: 小尺寸 (<1 μ m)、中尺寸 (≥ 1 且<2 μ m) 和大尺寸 ($\geq 2\mu$ m)。长时间的应激攻击增加了突变型MN包涵体的尺寸。该值表示为平均值 \pm SEM ($n \geq 3$); 以及

[0063] E示出了含有FUS且泛素阳性包涵体的细胞碎片。发明人注意到, 面对长时间应激攻击 (AS, 1mM, 2小时或4小时) 的突变型MN中, DAPI阴性的细胞碎片呈现出FUS和泛素均为阳性。这些点代表了至少三个独立实验的各个图像中归一化至细胞总数的泛素阳性碎片百分比。

[0064] 图6示出了应激处理在突变型脊髓中诱导的运动急剧减退、FUS错误定位、泛素上调以及FUS阳性应激颗粒形成,

[0065] 其中,

[0066] A示出了在小鼠中胃内施用亚砷酸盐 (AS) 的时间表;

[0067] B示出了暴露于AS之前和之后在旷场中后肢的站立时间 (10分钟间隔内的数秒)。AS胃内施用一个月后, mFUS-R513C KI小鼠的站立时间显著下降, 这证明了运动的急剧减退。 $n=5$ (分别对于+/+和C/C), 雄性。该值表示为平均值 \pm SEM。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。(t检验, SPSS);

[0068] C示出了应激处理诱导的KI突变型动物中ChAT阳性运动神经元中的FUS错误定位和泛素上调。箭头标记了具有FUS错误定位和泛素上调的典型神经元。腰椎第4节-第6节脊髓的切面。比例尺, 低放大倍率图像为50 μ m, 高放大倍率图像为20 μ m;

[0069] D示出了应激处理诱导了KI突变型脊髓前角中eIF3g、应激颗粒标志物以及FUS和eIF3g双阳性应激颗粒的形成均上调。腰椎第4节-第6节脊髓的切面。比例尺为20 μ m; 以及

[0070] 图7示出了用于筛选能够逆转FUS错误定位的化合物而建立的FUS报告细胞系。

[0071] 其中,

[0072] A示出了GFP标记的野生型 (hFUS) 和突变型FUS (FUS-R521C) 在被慢病毒颗粒感染的HeLa细胞中的稳定表达;

[0073] B示出了未经应激处理的情况下, 野生型FUS如实地定位于细胞核中, 而突变型FUS显示出细胞质错误定位。在亚砷酸盐处理后, 野生型和突变型FUS均显示出细胞质定位。比例尺为20 μ m。

具体实施方式

[0074] 将详细描述本公开的实施方案。本文中参考附图描述的实施方案是说明性的、例

示性的,并且用于总体地理解本公开。实施方案不应被理解为限制本公开。在整个说明书中,相同或相似的元件以及具有相同或相似功能的元件由类似的附图标记表示。

[0075] 提供以下实施例,以便可以更充分地理解本发明。然而,应当理解,这些实施方案仅提供了实施本发明的方法,并且本发明不限于这些实施方案。

[0076] 相关方法如下所述

[0077] 材料和方法:

[0078] 小鼠、小鼠行为测试和胃内施用

[0079] 为了生成FUS-R513C KI小鼠品系,发明人PCR扩增了C57BL/6J (JAX,库存号000664)小鼠基因组DNA中的靶序列。供体DNA片段包含R513C突变(tcg至ctg)以及分别在其两侧的左右同源臂(约1kb)。将供体DNA、gRNA(gcgagcacagacaggatcgcAGG,PAM位点以大写字体示出)并将Cas9 mRNA注入C57BL/6J胚胎中。将经过注射的胚胎转移到假孕ICR (JAX,库存号009122)雌性受体的输卵管壶腹中。将正确的基因型后代与C57BL/6J回交至少五代,以建立该品系。

[0080] 对于旷场行为测试,将单只动物放在旷场区域(60cm×60cm)的中心,并通过TopScan行为分析系统(CleverSys.,美国)以10分钟为间隔,用多个参数跟踪,包括总距离、平均速度和在中心区域行进的距离。通过中心区域的行进距离除以总行进距离来衡量焦虑水平。在旷场测试的10分钟间隔内,用后肢的总站立时间来测量垂直跳跃活性。

[0081] 通过自动系统(Med Associates,Inc)来测量转杆实验中的表现。简而言之,将动物放置在加速纺锤体上(4rpm-40rpm),每次持续5分钟,每天连续试验3次。每次试验之间设置20分钟的休息时间。重复该测试四天。当小鼠在5分钟的间隔内从纺锤体上跌落时,系统会自动计算出从纺锤体上跌落的时间。停留时间是通过从5分钟减去跌落时间来计算的,每天3次连续试验的停留时间的平均值用于统计分析。

[0082] 对于胃内施用,首先要给小鼠称重,然后轻轻地将小鼠头向后握住,以形成一条从颈部到食道的直线。亚砷酸钠溶液由圆形尖端喂食管以2μg/g体重的剂量给药,每周4次。每次给药后,将小鼠放回笼子并监测至少5分钟。动物每周进行一次旷场测试以监测其运动。

[0083] 自2014年以来,清华大学的动物设施已获得国际实验室动物保护评估与鉴定协会(AAALAC)的全面认证。所有的动物实验方案均由清华大学动物保护与使用委员会(IACUC)根据《实验室动物保护与使用指南》(第八版,NHR)批准的。C57BL/6J和ICR小鼠均购自中国北京的查尔斯河实验室。

[0084] 细胞培养和压激诱导

[0085] 对于运动神经元培养,如前所述,简而言之,从E13.5小鼠胚胎中解剖脊髓,并在37°C的Neurobasal(Invitrogen)中用木瓜蛋白酶(Sigma,1:200)和EDTA(1mM)消化30分钟。消化过程中,在最后10分钟内加入DNase I(Sigma,10μg/ml)。消化后,将组织混悬液通过40μm过滤器。将得到的细胞沉淀重悬于含EDTA(0.5mM)的1ml HBSS(Invitrogen)中,并在混悬液层顶部叠加一层5ml Optiprep(Sigma,10%)。在400×g下离心25分钟后,运动神经元富集在顶部1ml体积中。将运动神经元培养在含有B27(Invitrogen)、马血清(10%v/v;Sigma)、谷氨酰胺-1(1×;Invitrogen)的Neurobasal中,并且其特征在于用抗ChAT(兔,Millipore)和抗-Tuj-1(小鼠,Beyotime,中国)抗体进行免疫染色。为了诱导应激颗粒,根据实验目的,将培养的运动神经元(3DIV)用亚砷酸钠(AS,1mM)和百草枯(1mM)处理一定时

间。

[0086] 股神经解剖和轴突计数

[0087] 如前所述进行股神经解剖。解剖前,在处死的小鼠中暴露股神经并短暂固定(含有2%戊二醛/2%多聚甲醛的0.1M的椰油酸酯缓冲液)。将分离出的神经在相同的固定剂中过夜后固定。通过标准程序对解剖的神经进行塑料包埋和透射电子显微镜观察。神经截面用甲苯胺蓝染色并通过光学显微镜检查。

[0088] 实施例

[0089] ALS的mFUS-R513C小鼠模型的生成

[0090] 发明人采用了基于CRISPR-Cas9的敲入(KI)方法。他们选择hFUS-R521C生成KI ALS小鼠模型有三个原因。首先,R521C突变位于FUS C端,这是一个非典型的PY核定位信号(NLS),在该处中聚集了一半以上的ALS相关FUS突变。在这些突变中,R521C是最常见的突变,占总数的30%的量。其次,在高疾病发病率的家族散发性ALS患者中均已发现了R521C突变。第三,FUS R521C转基因小鼠和大鼠模型表现出很强的ALS样病变特征。

[0091] 为了生成KI小鼠品系,发明人首先分析了FUS蛋白跨物种的保守性(图1A)。小鼠FUS最后一个外显子编码的C端NLS与人(515GEHRQDRRERPY526)的C端NLS相同。与人R521的小鼠对应位置是R513。在小鼠R513三联体密码子的下游,出现了一个Cas9识别的PAM位点(图1B)。发明人PCR扩增了C57BL/6J(JAX,库存号000664)小鼠基因组DNA的靶序列。供体DNA片段包含R513C突变(tcg至ctg)以及分别在其两侧的左右同源臂(约1kb)。将供体DNA、gRNA(gcgagcacagacaggatcgcAGG,PAM位点以大写字体示出)并将Cas9 mRNA注入C57BL/6J胚胎中。将经过注射的胚胎转移到假孕ICR(JAX,库存号009122)雌性受体的输卵管壶腹中。通过用C57BL/6J野生型小鼠繁殖KI创建者,确认了正确的基因组插入和种系传递(图1C和图1D)。同时,发明人将KI突变型小鼠回交至C57BL/6J至少5代,以减少由CRISPR/Cas9引入的潜在脱靶效应。将正确的基因型后代与C57BL/6J回交至少五代,以建立该品系。发明人观察到,突变型FUS的表达水平在脊髓中略有上调(图1E),表明人R521C突变可增加蛋白质稳定性和/或降低靶组织的周转率。

[0092] 衰老的mFUS-R513C小鼠表现出运动减退和外周轴突退化

[0093] 与先前报道的野生型和突变型FUS转基因小鼠中看到的早发型的运动障碍和死亡不同,发明人未能在我们的老年KI动物中观察到进行性麻痹和较短的寿命(数据未显示)。然而,在4月龄的FUS KI杂合组中,通过旷场试验检测到的自主活动有轻微减退,并且在6.5月龄的杂合突变型小鼠和纯合突变型小鼠中均记录到明显的运动减退(图2A)。运动能力减退也通过后肢站立时间记录,这是对后肢无力的一种更灵敏测量方法。与野生型组相比,FUS KI杂合组和纯合组在6.5月龄时均显示站立时间显著下降(图2B)。运动能力减退进一步证实了突变型组转杆实验中的表现。与野生型同窝动物相比,尽管在4月龄FUS KI杂合组在转杆上的停留时间略有减少(图2C),但是6.5月龄杂合突变型小鼠和纯合突变型小鼠在第2天和第3天显著下降均显示出在转杆上的停留时间进一步下降(图2D)。

[0094] 衰老的KI小鼠的运动能力减退进一步由运动轴突的减少印证。在8月龄时,在纯合KI突变型动物中观察到了股神经的退化运动轴突(图2E)。通过计数轴突数目,发明人发现在纯合KI突变型小鼠中大直径($\geq 5\mu\text{m}$)纤维的数目显著减少而小直径($< 5\mu\text{m}$)纤维的数目却没有显著减少(图2E和图2F),这表明传导速度快的纤维主要受突变型FUS的表达影响。

[0095] 培养的KI突变型运动神经元模拟了该疾病

[0096] 新出现的证据表明,FUS与其它RBP一起是SG的蛋白质成分,并且这些RBP中的突变与其它神经退行性疾病中的ALS有关,这表明SG的错误加工具有致病性。为了检验该假设,发明人培养了E13.5纯合KI及其野生型同窝动物的脊髓中的同基因运动神经元。SG的形成是根据具体情况而定的,并且是由各种应激条件(包括ER应激、氧化应激和线粒体应激)诱导的。在我们的运动神经元培养物中,发明人观察到在亚砷酸钠(AS)处理一小时后,野生型组和纯合KI突变型组中TIA1呈阳性的细胞溶质应激颗粒的形成(TIA1是细胞毒性颗粒相关的RBP,一种SG标志物)(图3A)。作为阴性对照,在未经AS处理的野生型运动神经元或KI突变型运动神经元中均未见到SG形成,也未见到FUS细胞溶质错误定位(图3A和图3B)。但是,KI突变型运动神经元中含有SG的细胞百分比增加,表明该突变型运动神经元易于形成SG(图3B)。最引人注目的是,在KI突变型培养物中,每个单个SG的TIA1和FUS均呈阳性,但在野生型培养物组中,没有一个SG为双阳性,表明应激诱导的突变型FUS重新定位到SG中(图3C)。

[0097] 从AS处理中恢复(用无AS的培养基代替含AS的培养基)后,SG的分解进一步证实了AS诱导的SG的动态。在野生型培养物中,含有SG的神经元百分比和SG本身的数目在恢复1小时后显著降低(图3B和图3D)。但是,在KI突变型运动神经元培养物中,这些数字在恢复后没有显示出显著的下降(图3B和图3D),这表明含有突变型FUS的SG携带着明显SG分解缺陷。在AS处理和恢复后,通过计数野生型和突变型FUS神经元中SG的不同尺寸,进一步证明了突变型SG的分解缺陷。在AS处理后,发明人仅观察到突变型神经元中中等尺寸(≥ 1 ,且 $< 2\mu\text{m}$)的SG略有增加(图3E)。然而,在恢复1小时后,尽管野生型神经元清除了所有大尺寸($\geq 2\mu\text{m}$)和大部分小尺寸($< 1\mu\text{m}$)的SG,但是KI突变型神经元未能分解大尺寸SG和大部分小尺寸SG(图3E)。与AS处理相似,当用百草枯处理运动神经元时,发明人观察到突变型SG形成增加,突变型FUS重新定位到SG中增多(图4A和图4B),百草枯是一种在世界范围内广泛使用的应激诱导剂和除草剂。

[0098] ALS病变的标志是含有TDP-43和FUS的泛素阳性包涵体的形成。但是,该病变是否与SG错误加工有关尚不清楚。有趣的是,当我们将AS处理延长至4小时甚至6小时时,发明人不仅观察到突变型FUS错误定位于细胞溶质SG中,而且还观察到突变型FUS与泛素的共定位,泛素是蛋白酶体介导降解的关键调控因子(图5A)。泛素阳性包涵体的形成仅出现在突变型运动神经元中,而没有出现在野生型运动神经元中,并且包涵体形成的程度随处理时间的增加而增加(图5B和5C)。此外,包涵体的尺寸也随着处理时间的增加而增加,AS处理后,大部分包涵体的尺寸都超过 $1\mu\text{m}$ (图5D)。引人注目的是,通过长时间的应激处理,发明人观察到包涵体不仅出现在神经元内部,而且还出现在一些细胞碎片样结构(图5A和图5D),并且这些碎片中包涵体的程度随处理时间的增加而增加(图5E),让人想起ALS晚期的顽固包涵体。

[0099] 应激处理诱导了受到应激攻击的KI小鼠中运动急剧减退、ALS样病变、以及突变型FUS阳性SG的形成

[0100] 为了检验突变型FUS是否在体内发病机理中破坏SG加工,发明人在衰老的mFUS-R513C KI小鼠中进行了亚砷酸盐的胃内给药(图6A)。尽管在亚砷酸盐暴露1或2个月后,野生型和突变型KI组中后肢的站立时间都减少了,但在暴露1个月后突变型KI组中的后肢无力更为严重(图6B)。重要的是,在mFUS-R513C KI脊髓运动神经元中应激暴露诱导了明显的

FUS错误定位和泛素上调,但是暴露于与KI突变型小鼠相同剂量的亚硝酸盐的野生型动物中没有这种现象(图6C)。为了检查错误定位的突变型FUS是否移入SG以破坏SG加工,发明人用真核翻译起始因子3(eIF3)复合体的关键亚基eIF3g抗体对野生型和KI突变型脊髓切片进行了染色,并且该抗体也经常用作SG标志物。令人兴奋的是,在暴露于亚硝酸盐的衰老KI小鼠的前角中,eIF3g上调,并且该信号在很大程度上与错误定位的突变型FUS共定位(图6D),表明该突变型FUS在应激暴露后移入SG,这与我们在培养的运动神经元中的主要观察结果相似。在未进行应激处理的衰老对照mFUS-R513C小鼠中,脊髓中没有明显的eIF3g上调与ALS样病变相结合,发明人得出结论,mFUS-R513C与应激协同作用,以通过破坏SG加工导致体内病变。

[0101] 建立FUS亚细胞定位报告细胞系

[0102] 为了筛选能够逆转FUS的错误定位的化合物,发明人生成了HeLa细胞系,其稳定表达N末端融合有荧光蛋白GFP的、野生型和突变型FUS-R521C。通过GFP和FUS两种抗体的蛋白质印迹检测了带有GFP标记的野生型FUS和FUS-R521C的表达(图7A)。外源性GFP标记的FUS的表达水平与内源性FUS相当。通过GFP荧光证实了稳定表达的FUS的亚细胞定位。通过GFP荧光测量,在未经应激处理的情况下野生型FUS的亚细胞分布如实地定位在细胞核中(图7B)。但是,FUS-R521C主要定位于细胞质中。0.25mM亚硝酸盐处理1小时后,观察到野生型和突变型FUS均移入了SG中。

[0103] 模型应用实施例

[0104] 发明人建立的FUS-R513C敲入ALS小鼠模型(图2)、和源自KI小鼠品系的细胞(图3-图5)以及FUS亚细胞定位报告细胞系(图7)是用于测试ALS的潜在药效、用于筛选作为ALS潜在药物的化合物、以及用于评估ALS的环境风险因素等的合理疾病模型。对于KI ALS小鼠模型,可以将旷场中的行进距离、后肢站立时间、在转杆上的停留时间以及运动轴突数量计数用于上述目的。对于源自KI小鼠品系的细胞(例如运动神经元),SG中突变型FUS的存在、应激诱导的TIA1阳性SG的形成以及恢复诱导的SG分解可用作上述目的评估参数。对于ALS的潜在药物,可以使用抑制突变型FUS移入SG以及恢复分解缺陷来进行药效评估。对于潜在的ALS风险因素,突变型FUS阳性SG的诱导、SG的形成和分解缺陷可用于风险估计。对于已建立的FUS亚细胞定位报告细胞系,野生型和突变型FUS的亚细胞位置可用于上述目的。对于潜在的ALS药物,可以使用抑制突变型FUS错误定位和减少SG形成来进行药效评估。对于潜在的ALS风险因素,突变型FUS阳性SG的诱导、SG形成和分解缺陷可用于风险估计。

[0105] 在整个说明书中,对“实施方案”,“一些实施方案”,“一个实施方案”,“另一个实施例”,“实施例”,“具体实施例”或“一些实施例”的引用是指结合该实施方案或实施例描述的特定特征、结构、材料或特性被包括在本公开的至少一个实施方案或实施例中。因此,诸如“在一些实施方案中”,“在一个实施方案中”,“在实施方案中”,“在另一实施例中”,“在实施例中”,“在具体实施例中”或“在一些实施例中”的短语的出现在整个说明书中的各个地方不一定都指本公开的相同实施方案或实施例。此外,可以在一个或多个实施方案或实施例中以任何合适的方式来组合特定特征、结构、材料或特性。

[0106] 尽管已经示出和描述了说明性实施方案,但是本领域技术人员将理解,上述实施例不能被解释为限制本公开,并且在不脱离本公开的实质、原理和范围的情况下,可以对实施方案进行改变、替换和修改。

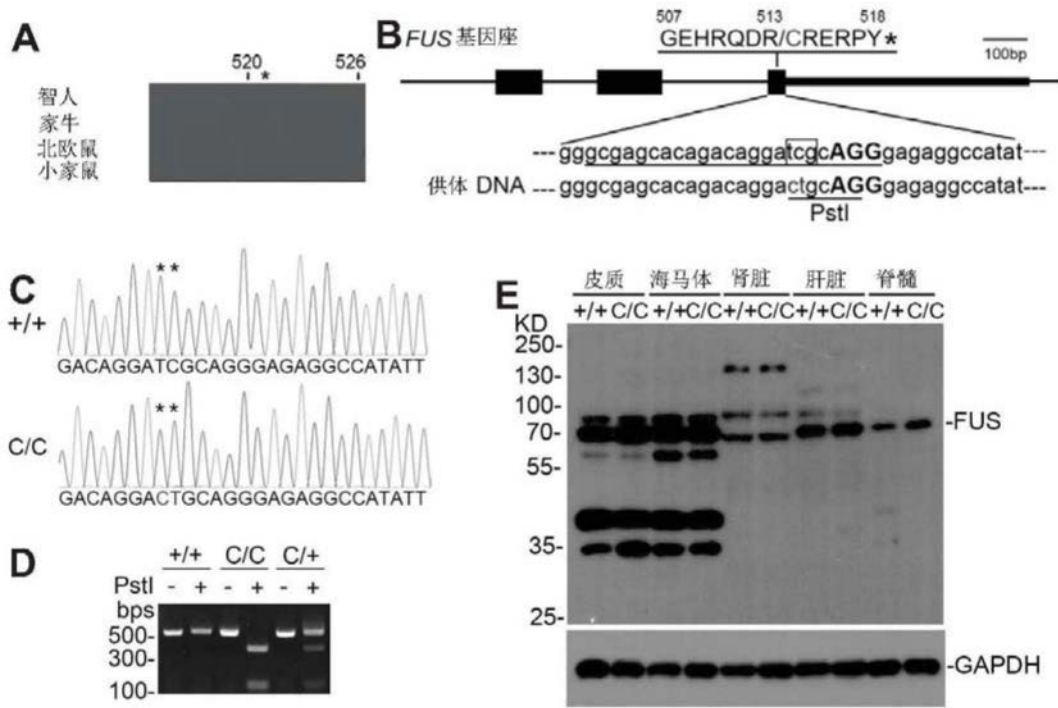


图1

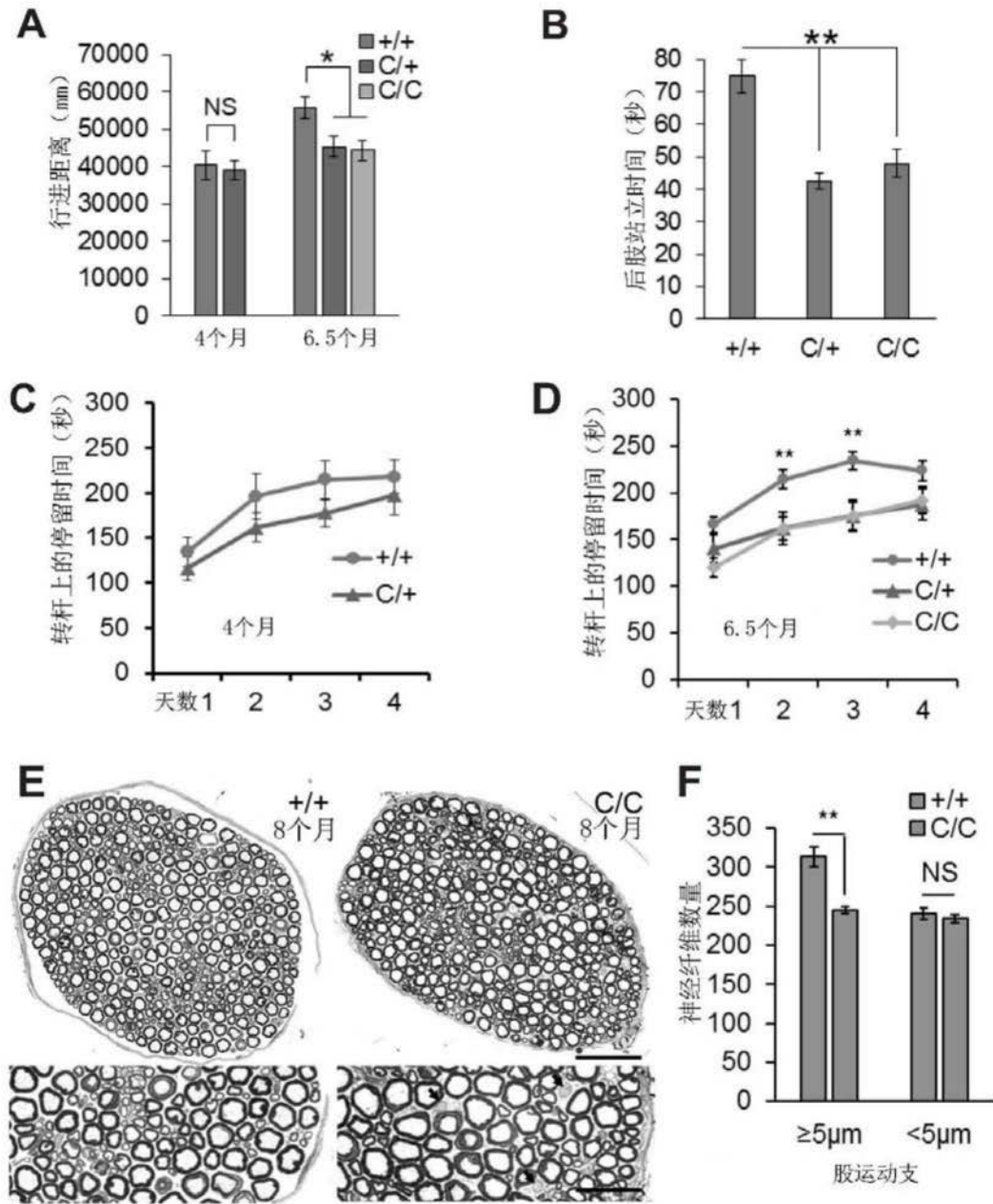


图2

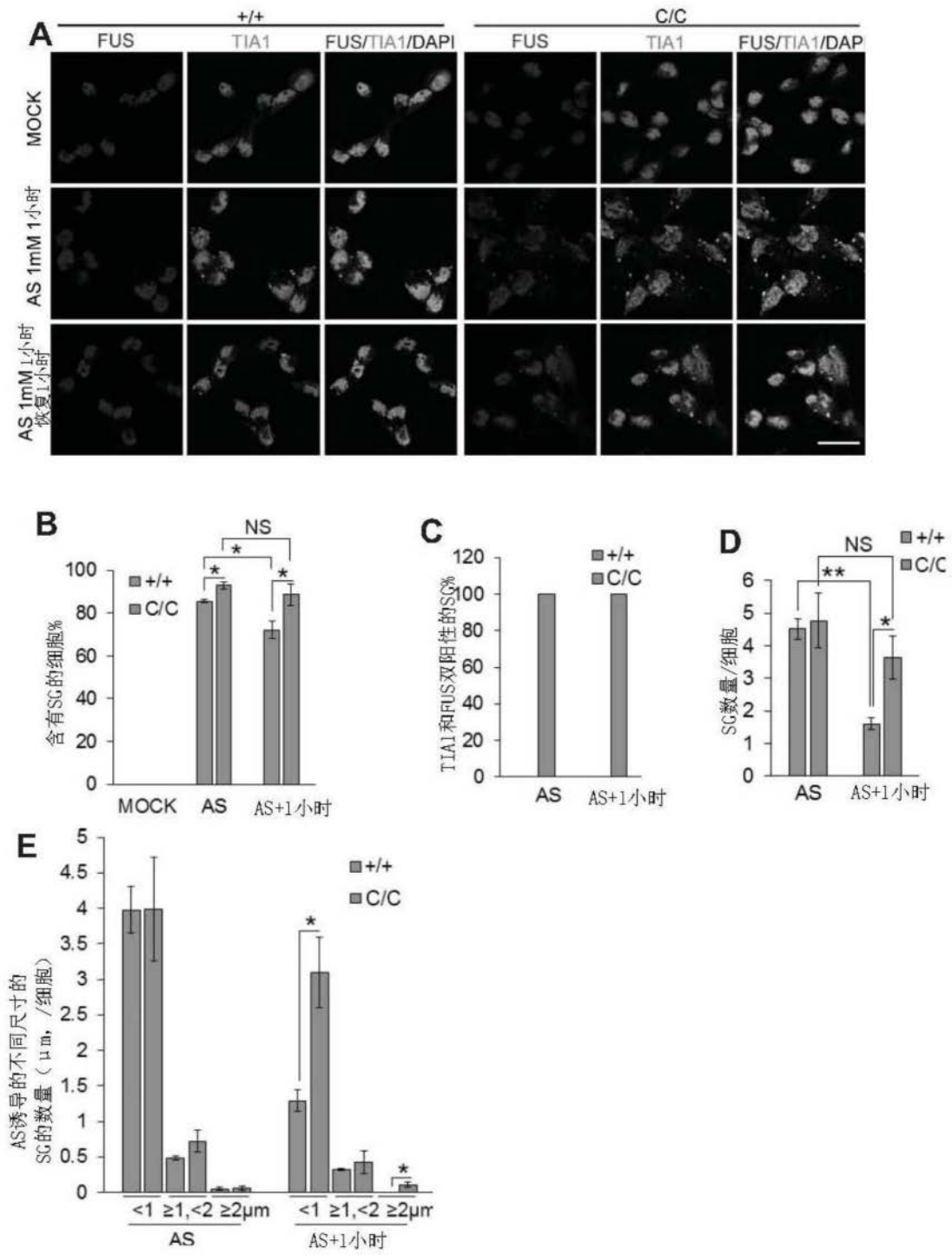


图3

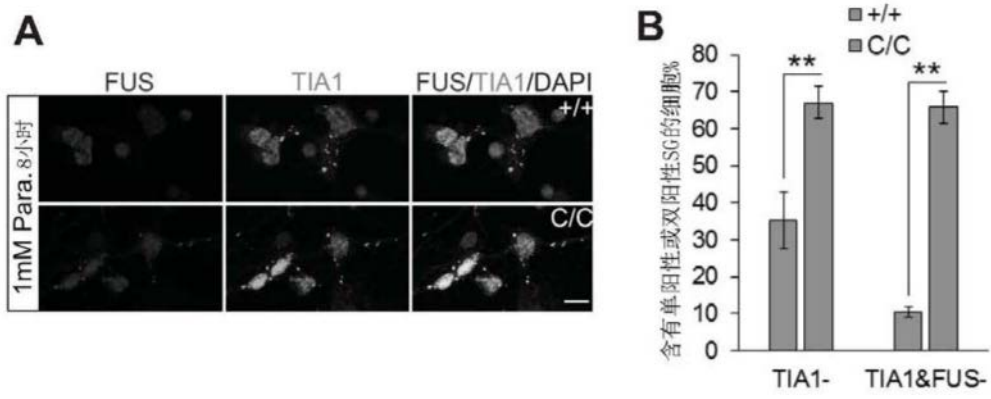


图4

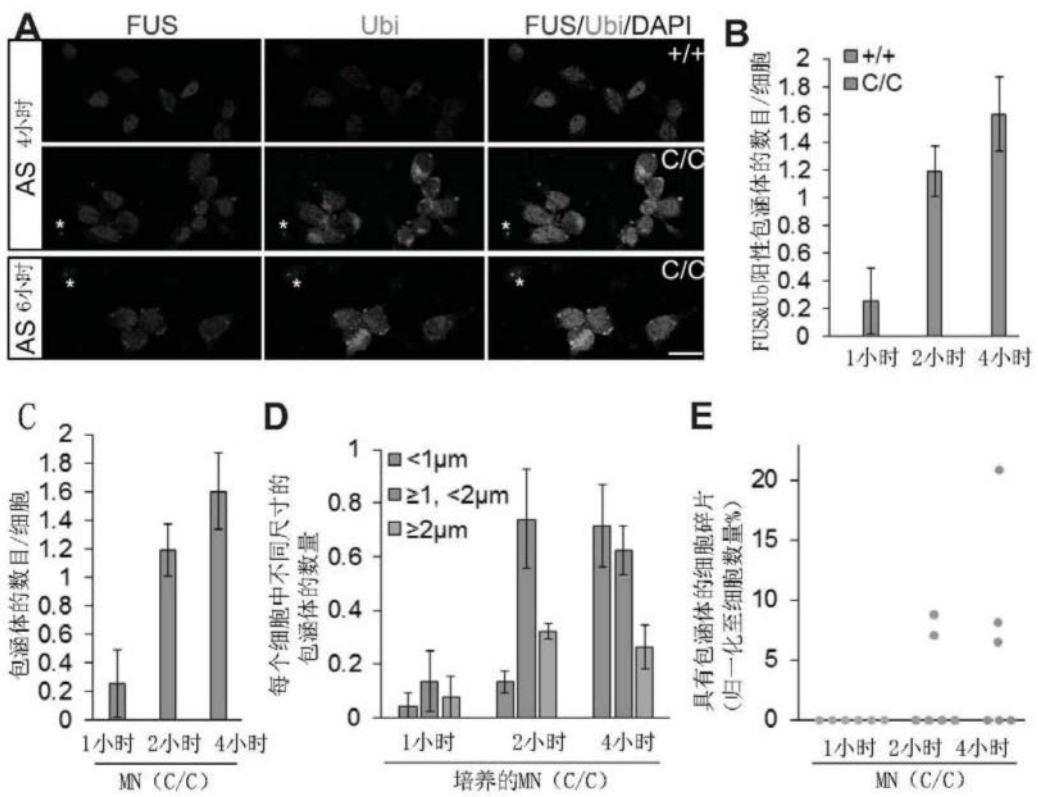


图5

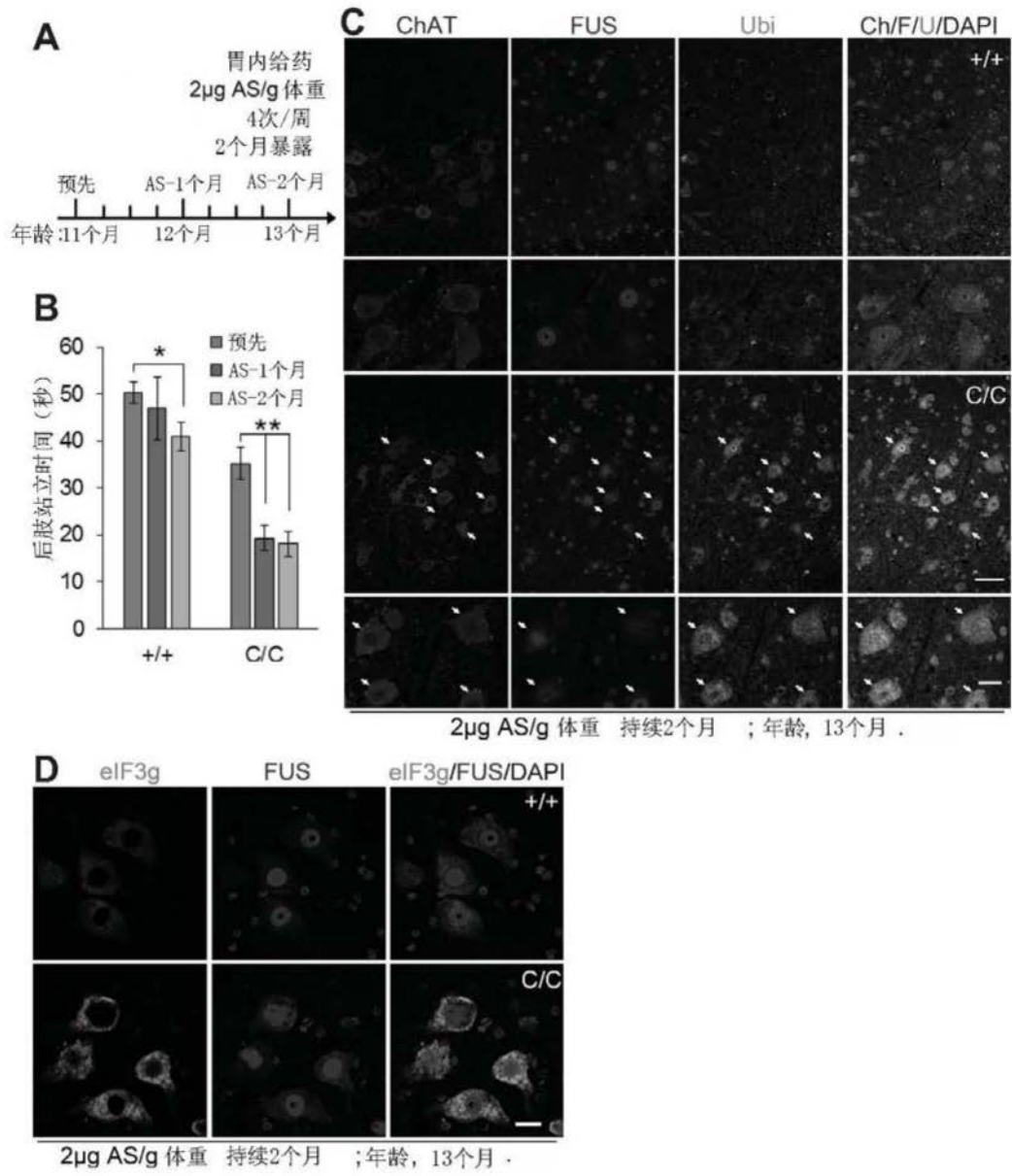


图6

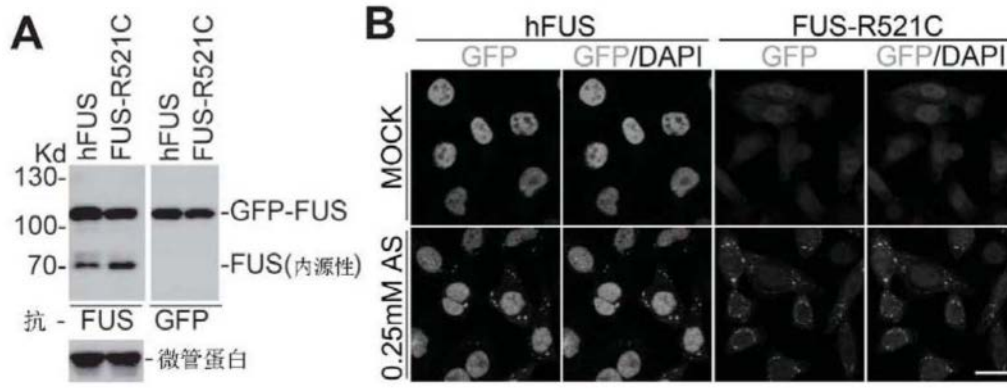


图7