



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110520112 A

(43)申请公布日 2019.11.29

(21)申请号 201880025311.X

(22)申请日 2018.03.14

(30)优先权数据

62/471,204 2017.03.14 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.10.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/022496 2018.03.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/170172 EN 2018.09.20

(71)申请人 贝勒医学院

地址 美国得克萨斯

(72)发明人 T·蒙洛 J·里奇 J·F·马丁

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

代理人 刘晓东

(51)Int.Cl.

A61K 9/50(2006.01)

A61K 9/127(2006.01)

A61K 38/00(2006.01)

C12N 5/02(2006.01)

权利要求书2页 说明书28页

序列表8页 附图42页

(54)发明名称

作为Hippo效应子的显性活性Yap诱导染色质可及性和心肌细胞更新

(57)摘要

本公开涵盖用一种或多种Yap突变变体从现有细胞产生细胞或组织的方法。在具体实施方案中,本公开涉及用一种或多种Yap突变变体治疗现有心肌细胞,所述治疗使所述现有心肌细胞分裂并产生新的心肌细胞。在特定情况下,所述Yap突变变体在Yap的1、2、3、4、5、6个或更多个丝氨酸处具有丝氨酸到丙氨酸的置换。

1. 一种使个体中的细胞再生的方法,所述方法包括向所述个体提供治疗有效量的Yap突变变体的步骤。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所再生的细胞是心肌细胞、视网膜细胞或耳部毛细胞。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述突变变体在丝氨酸处包含一个或多个氨基酸置换。

4. 如权利要求1、权利要求2或权利要求3所述的方法,其中在丝氨酸处存在2、3、4、5、6、7个或更多个氨基酸置换。

5. 如权利要求1、权利要求2或权利要求3所述的方法,其中在被Lats激酶磷酸化的丝氨酸处存在1、2、3、4或5个氨基酸置换。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中一个或多个氨基酸置换是置换为丙氨酸。

7. 如权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述Yap突变变体包含K265R突变。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述个体患有心脏病症、视网膜病症或耳科病症。

9. 如权利要求8所述的方法,其中所述个体的所述心脏病症导致所述个体需要心肌细胞更新。

10. 如权利要求8或权利要求9中任一项所述的方法,其中所述个体的心脏具有心肌细胞凋亡、坏死和/或自噬。

11. 如权利要求8-10中任一项所述的方法,其中所述心脏病症是选自由以下组成的组的心脏病症:心脏病、心肌病、心瓣膜问题、心包炎、心律不齐、心搏停止、先天性心脏缺损、心力衰竭、心脏疾病、心脏中毒、充血性心力衰竭、缺血性心脏病、急性心肌梗塞、心房纤维性颤动、冠状动脉疾病、缺血性心脏病、瓣膜性心脏病、高血压性心脏病和心律失常。

12. 如权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述个体患有杜兴氏肌营养不良。

13. 如权利要求1-12中任一项所述的方法,其中不止一次地向所述个体提供所述组合物。

14. 如权利要求1-13中任一项所述的方法,其中向所述个体全身性地提供所述组合物。

15. 如权利要求1-14中任一项所述的方法,其中向所述个体局部性地提供所述组合物。

16. 如权利要求1-15中任一项所述的方法,其中将所述Yap突变变体在体外暴露于细胞中以产生体外来源的细胞。

17. 如权利要求16所述的方法,其中向所述个体提供有效量的所述体外来源的细胞。

18. 如权利要求5-15中任一项所述的方法,其中向所述个体提供针对病症的附加疗法。

19. 一种治疗个体的医学病症的方法,所述方法包括向所述个体提供治疗有效量的Yap突变变体的步骤。

20. 如权利要求19所述的方法,其中所述Yap突变变体在丝氨酸处包含一个或多个氨基酸置换。

21. 如权利要求19或权利要求20所述的方法,其中在丝氨酸处存在2、3、4、5、6、7个或更多个氨基酸置换。

22. 如权利要求19、权利要求20或权利要求21所述的方法,其中在被Lats激酶磷酸化的丝氨酸处存在1、2、3、4或5个氨基酸置换。

23. 如权利要求19-22中任一项所述的方法, 其中在丝氨酸处存在5个氨基酸置换。
24. 如权利要求19-23中任一项所述的方法, 其中一个或多个氨基酸置换是置换为丙氨酸。
25. 如权利要求19-24中任一项所述的方法, 其中所述Yap突变变体包含K265R突变。
26. 如权利要求19-25中任一项所述的方法, 其中所述医学病症是心脏病症。
27. 如权利要求26所述的方法, 其中所述个体的所述心脏病症导致所述个体需要心肌细胞更新。
28. 如权利要求19-27中任一项所述的方法, 其中所述个体的心脏具有心肌细胞凋亡、坏死和/或自噬。
29. 如权利要求19-28中任一项所述的方法, 其中所述医学病症是选自以下组成的组的的心脏病症: 心脏病、心肌病、心瓣膜问题、心包炎、心律不齐、心搏停止、先天性心脏缺损、心力衰竭、心脏疾病、心脏中毒、充血性心力衰竭、缺血性心脏病、急性心肌梗塞、心房纤维性颤动、冠状动脉疾病、缺血性心脏病、瓣膜性心脏病、高血压性心脏病和心律失常。
30. 如权利要求19-29中任一项所述的方法, 其中所述个体患有杜兴氏肌营养不良。
31. 如权利要求19-30中任一项所述的方法, 其中不止一次地向所述个体提供所述组合物。
32. 如权利要求19-31中任一项所述的方法, 其中向所述个体全身性地提供所述组合物。
33. 如权利要求19-32中任一项所述的方法, 其中向所述个体局部性地提供所述组合物。
34. 如权利要求19-33中任一项所述的方法, 其中将所述Yap突变变体在体外暴露于细胞中以产生体外来源的细胞。
35. 如权利要求34所述的方法, 其中向所述个体提供有效量的所述体外来源的细胞。
36. 如权利要求19-35中任一项所述的方法, 其中向所述个体提供针对所述医学病症的附加疗法。

作为Hippo效应子的显性活性Yap诱导染色质可及性和心肌细胞更新

[0001] 本申请要求2017年3月14日提交的美国临时专利申请62/471,204的优先权,该临时专利申请通过引用整体并入本文。

[0002] 关于联邦政府资助的研究或开发的声明

[0003] 本发明是在国立卫生研究院 (NIH) 授予的HL 127717下受政府支持完成的。政府享有本发明的某些权利。

技术领域

[0004] 本公开的实施方案至少涉及细胞生物学、分子生物学、生物化学、心脏病学和医学领域。

背景技术

[0005] C¹⁴年代测定实验表明,人类心肌细胞的完整来源建立在出生的第一个月内并且成体心肌细胞以每年约1%的速率更新¹。成体小鼠心肌细胞具有类似低的更新速率²。Hippo通路是进化上保守的激酶级联,该激酶级联导致转录辅助激活因子Yap被大肿瘤抑制因子 (Lats) 1和2激酶磷酸化且抑制³。出生后缺失Hippo通路组分可适度地增加CM更新,就如同表达具有单个丝氨酸(S)到丙氨酸(A)突变的活性形式的Yap可增加CM更新一样⁴⁻⁷。

[0006] Lats1/2通过使5个共有NDR(核Dbf2相关)激酶家族基序HXRXXS的S残基磷酸化来抑制Yap。体外报告基因测定显示,虽然许多Hippo抑制是通过S127磷酸化(在人类中为S127,在小鼠中为S112)进行的,但其他S磷酸化事件也有助于Yap抑制⁸。

[0007] 本公开满足心肌细胞更新领域的长期需求,包括对心脏修复的长期需求。

发明内容

[0008] 本公开的实施方案包括用于任何类型的组织更新的方法和组合物,所述任何类型的组织更新包括例如在心脏、视网膜、中枢神经系统的神经元和耳部毛细胞中的组织更新。本公开的实施方案包括与细胞再生相关的方法和组合物,包括用于治疗哺乳动物个体(诸如人、狗、猫、马等)的一种或多种病症的方法和组合物。本公开的实施方案包括用于使一个或多个有需要的个体中的细胞再生的方法和组合物。所述个体可能患有需要细胞再生的任何种类的病症或易患所述病症或存在患所述病症的风险。在具体实施方案中,提供了与心肌细胞、视网膜细胞、中枢神经系统的神经元或耳部(包括内耳或外耳)的毛细胞的再生相关的方法和组合物,包括用于治疗哺乳动物个体的一种或多种病症的方法和组合物。在针对视网膜的特定情况下,将Yap突变体暴露于米勒胶质细胞(Muller glial cell)中,使这些细胞分化成视网膜神经元。在心肌细胞再生的情况下,个体可能患有心脏病症或有心脏病症的风险。个体可能因以下因素而有患心脏病症的风险:个人和/或家族病史、其为吸烟者、肥胖或超重,以及这些因素的组合等等。

[0009] 在具体实施方案中,所述方法和组合物涉及一种或多种Yap突变体。在某些实施方

案中,一种或多种Yap突变体具有促进细胞(包括心肌细胞视网膜细胞、中枢神经系统的神经元或耳部毛细胞)更新的活性,所述细胞更新使得任何相关医学病症得到改善。在替代实施方案中,所述一种或多种Yap突变体可改善任何医学病症但无法可检测地促进细胞更新。然而,在具体实施方案中,一种或多种Yap突变体刺激整体染色质重构以促进细胞更新。在特定情况下,所述突变体是具有1、2、3、4、5、6个或更多个氨基酸置换的Yap突变体。置换可以在或可以不在丝氨酸处,并且在一些情况下置换是某一种氨基酸置换为丙氨酸。在特定方面中,作为实例,成体心肌细胞中在Lats激酶的主要磷酸化位点处具有五个丝氨酸到丙氨酸的置换的突变体Yap5SA刺激整体染色质重构,从而促进心肌细胞更新。此类Yap突变体或其他Yap突变体可类似地用于促进视网膜或毛细胞更新。Yap突变体可以作为多核苷酸或多肽提供给个体。

[0010] 前面已经相当广泛地概述了本发明的特征和技术优势,以便可以更好地理解后面对本发明的详细描述。下文将会描述构成本发明权利要求的主题的本发明的其他特征和优点。本领域的技术人员应该认识到,所公开的概念和具体实施方案可以容易地用作修改或设计用于实现本发明相同目的的其他结构的基础。本领域的技术人员还应该意识到,此类等同构造并不脱离如所附权利要求中所阐述的本发明的精神和范围。当结合附图考虑时,根据以下描述可以更好地理解被认为是本发明特色的有关其组织和操作方法的新颖特征,以及其他目的和优点。然而,应该清楚地理解,提供每幅附图仅仅是为了说明和描述的目的,而非旨在作为对本发明的限制的定义。

附图说明

[0011] 为了更全面地理解本发明,现结合附图对以下描述进行参考,附图中:

[0012] 图1A-1E. Yap5SA转基因的设计和表达。图1A. (上) 条件Yap5SA等位基因的结构。(下) 过表达的Yap变体的人蛋白序列,其中加下划线的丝氨酸残基突变为丙氨酸。图1B. 在发育中的心脏中具有GFP表达的代表性e9.5 Tg (Jojo_Flag::Yap5SA) 5JFM小鼠。图1C. 取自P0新生小鼠的对照和转基因心脏中GFP荧光的图像。图1D. (左上) 在成体CM中表达Yap5SA的繁育和诱导策略。(左下) 显示FlagYap5SA表达的蛋白质印迹(Western Blot)。左侧为分子量标记。(右) 通过蛋白质印迹对Yap表达的定量显示为平均值 \pm SEM。 $n=3$ 只小鼠/基因型。图1E. 用抗Yap抗体和DAPI染色的经分离的对照和Yap5SA OE心肌细胞的免疫荧光图像。(右) Yap免疫荧光的核/细胞溶质比的定量显示为平均值 \pm SEM。所有统计数据通过ANOVA与Bonferroni事后检验获得。对照 $n=3$ 个心脏,60个细胞。Yap5SA $n=3$ 个心脏,67个细胞;

[0013] 图2A-2J. Yap5SA OE小鼠的向心性心力衰竭和死亡。图2A. 代表对照($n=8$)和Yap5SA OE($n=7$)小鼠的Kaplan Meier存活率分析。统计数据通过Mantel-Cox检验来计算。图2B. 来自对照和濒死期Yap5SA心脏的Masson三色染色(第7天)。图2C. 在第四次注射他莫昔芬(tamoxifen)之前和一天之后同一动物中左心室的代表性B型图像。图2D-2E. 在收缩期(图2D)和舒张期(图2E),左心室后游离壁厚度。图2D-2E显示为平均值 \pm SEM。(之前Yap5SA $n=7$,之前对照 $n=6$,之后Yap5SA $n=10$,之后对照 $n=9$)通过ANOVA与Bonferroni事后检验来计算统计数据。图2F. 在第四次注射他莫昔芬之前和一天之后,对照和Yap5SA OE心脏的代表性M模式超声心动图(M-mode echocardiography)。图2G. 收缩末期左心室腔直径。图2H. 舒张末期左心室腔直径。图2I. 缩短分数。图2J. 射血分数。图2G-2J数据显示为平均值

+/-SEM。(之前Yap5SA n=4,之前对照n=3,之后Yap5SA n=7,之后对照n=7)通过ANOVA与Bonferroni事后检验来计算统计数据。

[0014] 图3A-3K. 分化的心肌细胞的增殖。图3A. 表示分离的CM的面积直方图。n=3只小鼠/组。~100个细胞/心脏。图3B. 不同组织深度处的左心室的切片和面积, n=6/组。平均值+/-SEM。*指示 $P<0.05$ 。图3C. 左心室容积。图3D. 左心室腔室容积n=6/组。平均值+/-SEM。图3E. 左心室重量与体重比(每种条件下n=6)。平均值+/-SEM。图3F. (左) 左心室中的肌细胞数量。(n=5只/组) 平均值+/-SEM。(右) PCM1 (+) CM细胞核(用黄色箭头指示的实例)。图3G. CM成核。6个心脏/组。400-500个CM/心脏。平均值+/-SEM。图3H. (左) 含EdU的示例CM。(右) 诱导/EdU标记策略及EdU掺入的定量。平均值+/-SEM。n=4个心脏/组。200-300个CM/心脏。图3I. 代表性的AuroraB染色切片(用黄色箭头指示的阳性细胞)。(右) AuroraB (+) CM的定量。平均值+/-SEM。n=3只小鼠/组。200-300个CM/心脏。图3J. 示例PHH3染色切片(用黄色箭头指示的阳性细胞)。(右) PHH3 (+) CM的定量。平均值+/-SEM。n=3只小鼠/组, 200-300个CM/心脏。图3A-3J的统计数据通过ANOVA与Bonferroni事后检验获得。图3A-3J表示来自他莫昔芬方案后2天的小鼠。图3K. 在单次低剂量他莫昔芬后不同时间点的Yap5SA OE lacz (+) CM的数量,以log2形式(左)和原始形式(右)显示。平均值+/-SEM。 $N(t) = \text{lacz} (+) \text{细胞数量} / \text{心肌面积}$, $t = \text{时间(天)}$ 。 $tD = \text{倍增时间}$, n=3只小鼠/时间点。log2变换后线性拟合 $R^2 = 0.96$;

[0015] 图4A-4G. CM增殖基因程序的表观遗传激活。图4A. (上) CM细胞核富集方案。(左下) Yap5SA RNA-seq相对于对照的火山图。1,352个基因上调,748个基因下调(调整后的 P 值 <0.1)。(右下) Yap5SA ATAC-seq与对照相比的火山图。通过Yap5SA中的显著log2倍数变化,16,189个峰升高,13,353个峰下降。两份样品/基因型。图9中的再现性。图4B. (左) 顶部Yap5SA富集的ATAC-seq基序。(右) 介于0至1之间归一化的所有TEAD基序峰的核小体信号(图4C)。下列的增强子与启动子比例:总基因间ATAC-seq峰(图12);Yap5SA富集的基因间ATAC-seq峰;和Yap5SA ChIP-seq峰。*相对于对照比例 $P<0.001$,卡方检验(Chi-squared test)、耶茨校正(Yates correction)。图4D. 在对照或Yap5SA OE CM中,来自正在发育的和成体心脏的H3K27Ac片段覆盖集中在顶部ATAC-seq峰周围(调整后的 $p \leq 0.035$)。n为询问峰的数量。图4E. (左) 映射到Yap5SA上调的ATAC-seq峰(调整后的 p 值 $<1e-5$)和Yap5SA ChIP-seq峰(HOMER峰值得分截止值为20)的高置信度Yap5SA OE上调基因(RNA-seq调整后的 p 值 <0.01)。(右) 来自每个类别的高度富集的GO术语。图4F. 整个Yap5SA上调基因上的ATAC-seq信号(T标记TEAD基序;Y标记Yap ChIP-seq峰)。图4G. Yap5SA上调基因的启动子中的ChIP-seq和ATAC-seq信号。用绿色箭头指示的启动子的ChIP-seq峰。

[0016] 图5A-5F. Yap5SA OE肌细胞具有正常生理机能并且与不表达转基因的CM偶联。图5A. 在他莫昔芬之前和之后来自对照和Yap5SA OE小鼠的代表性ECG迹线。显示出倒置的T波。图5B. (上) 倒置T波小鼠的比例 $*P = .0286$ (Fisher精确检验)。(下) T波曲线下相对面积。平均值+/-SEM。通过ANOVA与Bonferroni事后检验来计算统计数据。对照n=3, Yap5SA n=4。图5C. β -半乳糖苷酶(浅绿色)和连接蛋白43(红色)的免疫染色,显示重组的 β -gal (+) CM通过间隙连接与未重组的CM(无染色,黑色)偶联。黄色箭头指示与Yap5SA OE CM成合胞体的 β -gal (-) CM。插图是近距离视图。图5D. (左) 肌节缩短的代表图。(中) 静息CM肌节长度。显示为平均(右) 肌节缩短百分比。图5E-5F. 显示为平均值+/-SEM。无统计差异,对照n=5只动

物,27个细胞。Yap5SA OE n=5只动物,31个细胞。ANOVA与Bonferroni事后检验。

[0017] 图6A-6C.细胞周期阶段的流式细胞术分析。图6A.来自对照和Yap5SA OE心脏的用于DAPI染色的经分离的心脏细胞核的流式细胞术分析的代表性直方图。饼状图对照n=4, Yap5SA OE n=4。饼状图中的数据显示为平均值,P值是通过ANOVA,然后通过Bonferroni事后检验计算。 $P<.05$ 用一个星号标示。图6B.通过A中提到的FACS得到的CM DNA含量的代表性点图。图6C.FACS DNA含量分析平均值和SEM,n=4/基因型。通过ANOVA,然后通过Bonferroni事后检验来计算统计学数据。

[0018] 图7.在Yap5SA OE CM中没有细胞凋亡增加的迹象。TUNEL染色显示对照和Yap5SA OE心脏之间没有显著差异(n=4个心脏/基因型)。显示为通过成对ANOVA,然后通过Bonferroni事后检验计算的平均值 \pm SEM统计数据。

[0019] 图8.在Yap 5SA OE心脏中没有纤维化的迹象。天狼猩红染色显示Yap5SA OE心脏和对照均无纤维化表型。还显示了具有纤维化损伤的代表性心脏以供比较

[0020] 图9.测序质量控制。(上)两个ATAC-seq集合中的高再现性。(下)RNA-seq集合间的高再现性。将来自每个指定实验的读数用正则化对数变换进行变换并显示为散点图,从而显示重复数据集的关系。注意:数据集是样本匹配的(例如对照-1ATAC-seq和对照-1核RNA来自同一生物样本)。

[0021] 图10A-10B.图10A.对Yap5SA OE心脏中的上调和下调基因的基因本体论分析($p<0.01$)。图10B.选自RNA-seq的基因的热图

[0022] 图11A-11B.Yap5SA诱导无效负反馈回路。图11A.通过RNA-seq指示的对Yap5SA OE CM中上调的基因的通路富集分析。突出显示了Hippo通路。(用g:Profiler进行通路分析)图11B.(左)蛋白质印迹显示Yap5SA OE心脏中内源性Yap磷酸化增加。(右)条带强度的定量,显示为平均值 \pm SEM(对照n=4,Yap5SA OE n=3,通过ANOVA与Bonferroni事后检验确定 $P<.01$)。

[0023] 图12A-12B.相对于TSS,基因间ATAC-seq峰的几何点图。图12A.两种基因型间与TSS的总基因间ATAC-seq峰距离(对照:34738个峰;Yap5SA OE:40,333个峰)。图12B.上调的基因间ATAC-seq和ChIP-seq峰与TSS的距离。

[0024] 图13A.1-13A.3和图13B-13D.高置信度Yap5SA靶标(图13A1-13A3)(左)在染色质已经开放的区域中被Yap5SA直接上调的97个基因的列表。(中)具有新开放染色质和上调的RNA的106个基因的列表。(右)随着开放染色质增加而被Yap5SA直接上调的76个基因的列表。图B.A中列表的最富集的基因本体论术语。图C.平均ATAC-seq和RNA-seq读数集中于76个显示开放染色质增加的Yap靶基因的TSS。图C.H3K27Ac ChIP-seq片段覆盖集中于映射到显示开放染色质增加的76个Yap靶基因的ATAC-seq峰。

[0025] 图14A-14C.Yap5SA激活心肌细胞增殖的模型。图14A.在某些情况下,Yap直接与靶基因的开放启动子结合,从而增加转录。此类过程不会产生新的开放染色质读数。图14B.首先,Yap5SA与增强子区结合,从而募集在染色质重塑因子,诸如SWI/SNF复合物中,以打开靶基因的基因组邻域。然后,Yap本身或其他转录因子自由促进转录。图14C.(左图)在这两种直接激活方案之间,Yap5SA通过三个过程促进增殖:1.通过Kruppel样因子、E2F转录因子、细胞周期蛋白(Cyclin)和Polo样激酶激活细胞周期。2.重排细胞骨架并通过甲胺精(Formin)、蛋白激酶C δ 、Ect2、Incenp和Ephexin4促进胞质分裂。3.重新出现与胎儿心

脏发育相关的基因,例如蛋白激酶D1、Alcam和Disabled同源物2。(右图)单独地,这三个过程具有最小或有害的功能。为简洁起见,左图中仅包括直接ChIP-seq靶标,用颜色指示。右图包括用颜色指示的直接上调的基因,以及间接调节(上调或下调)的转录物(根据图4A和图4D包括的基因)。

[0026] 图15A-15B.Yap K265R不如WT Yap稳定。图15A,用20ug/ml放线菌酮处理WT P19细胞和具有YapK265R突变的P19细胞(13号)0、2、4和6小时并用0.5%NP40裂解缓冲液收获。如所示的对抗体进行免疫印迹。图15B,用指定的抗体分析来自P19细胞和具有YapK265R突变免疫印迹的两个不同P19集落的裂解物。

[0027] 图16.展示了Yap突变蛋白稳定性的测定。用20ug/ml放线菌酮处理WT P19细胞和具有YapK265R突变的P19细胞0、2、4和8小时并用0.5%NP40裂解缓冲液收获。如所示的对抗体进行免疫印迹。

[0028] 图17A-17B.Yap突变蛋白稳定性的测定。图17A,用20ug/ml放线菌酮处理WT P19细胞和具有YapK265R突变的P19细胞(11号)0、2、4和8小时并用0.5%NP40裂解缓冲液收获。如所示的对抗体进行免疫印迹。图17B,通过密度测定法(densitometry)来定量Yap的相对量,将该相对量归一化为GAPDH,并作图。

[0029] 图18A-18C.Yap突变蛋白周转率的测定。图18A,用20uM/ml Mg132处理WT P19细胞和具有YapK265R突变的P19细胞(11号)0、1、2和4小时并用0.5%NP40裂解缓冲液收获。如所示的对抗体进行免疫印迹。图18B和图18C,通过密度测定法定量Yap和P-连环蛋白的相对量,归一化为GAPDH,并作图。

[0030] 图19A-19D.Yap突变蛋白核定位的测定。图19A和图19B,将 2.0×10^6 个细胞接种在10cm培养皿中,18小时后,收获细胞并分级分离,以进行蛋白质印迹分析。图19C和图19D,通过密度测定法定量Yap的相对量,将该相对量归一化为HDAC2(对于核级分)或GAPDH(对于细胞溶质级分),并作图。

具体实施方式

[0031] 与长期存在的专利法公约一致,词语“一个/种”在本说明书(包括权利要求)中与词语包含一起使用时,表示“一个/种或多个/种”。本公开的一些实施方案可以由或基本上由本公开的一个或多个要素、方法步骤和/或方法组成。预期本文所述的任何方法或组合物可相对于本文所述的任何其他方法或组合物实施。

[0032] 如本文所用,术语“约”或“大约”是指变化多达参考量值、水平、数值、数量、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度的30%、25%、20%、25%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的量值、水平、数值、数量、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度。在特定实施方案中,当在数值之前时,术语“约”或“大约”指示该值加上或减去15%、10%、5%或1%的范围。

[0033] 在本说明书全篇,除非上下文另有要求,否则词语“包含”将被理解为暗示包括陈述的步骤或要素或一组步骤或要素但不排除任何其他步骤或要素或其他组的步骤或要素。“由.....组成”意指包括并限于短语“由.....组成”之后的任何内容。因此,短语“由.....组成”表示所列要素是必需或强制性的,并且可不存在其他要素。“基本上由.....组成”意指包括在该短语之后列出的任何要素,并且限于不干扰或有助于本公开

中针对所列要素指定的活性或作用的其他要素。因此,短语“基本上由.....组成”表示所列要素是必需或强制性的,但没有其他要素是任选的,可能存在或者可能不存在,这取决于它们是否影响所列要素的活性或作用。

[0034] 在本说明书全篇提到“一个实施方案”、“一实施方案”、“一个特定实施方案”、“一个相关实施方案”、“某个实施方案”、“另外的实施方案”或“另一实施方案”或其组合意指结合该实施方案描述的特定特征、结构或特性包括在本发明的至少一个实施方案中。因此,前述短语在本说明书全篇各处的出现不一定都指同一实施方案。此外,特定特征、结构或特性可以在一个或多个实施方案中以任何合适的方式组合。

[0035] 如本文所用,术语“治疗有效量”与“治疗有效剂量”或“有效剂量”同义,并且是指Yap突变蛋白或多肽将在有需要的个体中引起从业者所寻求的生物或临床反应的量。作为非限制性实例,有效量是足以使细胞或组织再生的量。

[0036] I.Yap突变体的实例

[0037] 本公开的实施方案包括一种或多种Yap突变体及其用于临床和/或研究目的用途。所述一种或多种突变体可包含例如以下中的一项或多项:一个或多个氨基酸置换;一个或多个缺失;一个或多个插入;其组合;等等。在具体实施方案中,Yap的一个或多个氨基酸被另外的一个或多个氨基酸置换。可以采用一个或多个特定突变来减小突变Yap的生物活性。此类突变可以或不连同另一突变一起用于同一突变Yap蛋白中。本公开所涵盖的任何突变Yap蛋白都可以是非天然的。与任何Yap突变体相关的任何蛋白或DNA都可以从自然界中分离得到。

[0038] Yap突变蛋白可以在蛋白质中的一个或多个丝氨酸处具有置换。在特定情况下,置换作为Lats激酶的主要磷酸化位点的1、2、3、4或5个丝氨酸。尽管任何丝氨酸都可以被任何其他氨基酸置换,但在特定情况下它们被丙氨酸置换。

[0039] 如本文所用,在具体实施方案中,人Yap的突变变体包含至少在下面的这个野生型序列中其中一个加有下划线的丝氨酸处的突变。已知这些加有下划线的丝氨酸残基被Lats磷酸化,或预计会被Lats磷酸化。(SEQ ID NO:1):

[0040]

```
1  MDPGQQPPPPQAPQGGQPPSQPPQGGQPPSGPGQPAPAATQAAPQAPPAGHQIVHVRGD
61  SETDLEALFNAVMNPKTANVPQTVPMRLRKLPSFFKPPEPKSHSRQASTDAGTAGALT
121 QHVRAHSSPASLQLGAVSPGTLTPTGVVSGPAATPTAQHLRQSSFEIPDDVPLPAGWEMA
181 KTSSGQRYFLNHIDQTTTWQDPRKAMLSQMNVTAPTSPPVQNMNNSASGPLPDGWEQAM
241 TQDGEIYYINHKNKTTSWLDPRLDPRFAMNQRISSAPVKQPPPLAPQSPQGGVMGGSNS
301 NQQQMRLQQLQMEKERLRLKQQELLRQELALRSQLPTLEQDGGTQNPVSSPGMSQELRT
361 MTTNSSDPFLNSGTYHSRDESTDSGLSMSSYSVPRTPDDFLNSVDEMDTGDITINQSTLPS
421 QQNRFPDYLEAIPGTNVDLGTLEGDMNIEGELMPSLQEALSSDILNDMESVLAATKLD
481 KESFTWL
```

[0041] 除了或替代在上述序列中的一个或多个丝氨酸处的一个或多个突变,序列中还可存在一个或多个不在丝氨酸处的突变。此类突变可以是氨基酸置换(无论是否是保守性的)、缺失和/或倒位等。在具体实施方案中,突变形式的Yap具有五个突变,每个突变均以单个氨基酸置换形式在丝氨酸处发生。在特定情况下,一个或多个丝氨酸突变为丙氨酸,但一

个或多个丝氨酸也可以突变为不同的氨基酸,诸如组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、色氨酸、缬氨酸、精氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、脯氨酸、酪氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸和谷氨酸。在任何情况下,单个突变Yap蛋白中有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个丝氨酸可以是突变的。

[0042] 突变Yap蛋白的一个实例如下(下划线指示丝氨酸被丙氨酸置换的位点,粗体指示Lats识别序列):

```
1 MDPGQQPPPPQAPQGGQPPSQPPQGGQPPSGPGQPAPAATQAAPQAPPAGHQIVHVRGD
61 AETDLEALFNAVMPKNTANVPQTVPMLRLKLPDSFFKPPPEPKSHSRQAATDAGTAGALTP
121 QHVRHAHAAPAALQLGAVSPGTLTPTGVVSGPAATPTAQHLRQAAFEIPDDVPLPAGWEMA
181 KTSSGQRYFLNHIDQTTTWQDPRKAMLSQMNVTAPTSPPVQQNMMNSASGPLPDGWEQAM
[0043] 241 TQDGEIYYINHKNKTTSWLDPRLDPRFAMNQRISQSAPVKQPPPLAPQSPQGGVMGGSNS
301 NQQQQMRLQQLQMEKERLRLKQELLRQELALRSQLEQDGGTQNPVSSPGMSQELRT
361 MTTNSSDPFLNSGTYHSRDEATDSGLSMSSYSVPRTPDFFLNSVDEMDTGDTINQSTLPS
421 QQNRFPDYLEAIPGTNVDLGTLEGDGMNIEGEELMPSLQEALSSDILNDMESVLAATKLD
481 KESFLTWL (SEQ ID NO:2)
```

[0044] SEQ ID NO:2没有任何形式的标签,诸如Flag标签。

[0045] 具有Flag标签的Yap突变蛋白的一个实例(SEQ ID NO:3)如下:

```
MDYKDDDDKLAAANSSLATMDYKDDDDKARLESVP
KDPGQQPPPPQAPQGGQPPSQPPQGGQPPSGPGQPAPAATQA
APQAPPAGHQIVHVRGDAETDLEALFNAVMPKNTANVPQTVP
MRLRLKLPDSFFKPPPEPKSHSRQAATDAGTAGALTPQHVRHAHA
APAALQLGAVSPGTLTPTGVVSGPAATPTAQHLRQAAFEIPDD
VPLPAGWEMAKTSSGQRYFLNHIDQTTTWQDPRKAMLSQMNV
[0046] TAPTSPPVQQNMMNSASGPLPDGWEQAMTQDGEIYYINHKNK
TTSWLDPRLDPRFAMNQRISQSAPVKQPPPLAPQSPQGGVMGG
SNSNQQQQMRLQQLQMEKERLRLKQELLRQELALRSQLEQDGGTQNPVSSPGMSQELRTMTTNSSDPFLNSGTYHSRDEAT
DSGLSMSSYSVPRTPDFFLNSVDEMDTGDTINQSTLPSQQNRFP
PDYLEAIPGTNVDLGTLEGDGMNIEGEELMPSLQEALSSDILN
DMESVLAATKLDKESFLTWL
```

[0047] 编码Yap突变蛋白的DNA的一个实例如下(SEQ ID NO:4):

ATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGCTTGCGGCCGCGAATTCAAGCTTAG
CCACCATGGACTACAAAGACGATGACGATAAAGCAAGGCTCGAATCGGTACCTAAG
GATCCCGGGCAGCAGCCGCCGCTCAACCGGCCCCCAGGGCCAAGGGCAGCCGCC
TTCGCAGCCCCCGCAGGGGCAGGGCCCCGCGTCCGGACCCGGGCAACCGGCACCCG
CGGCGACCCAGGCGGCGCCGCAGGCACCCCCCGCCGGGCATCAGATCGTGACGTC
CGCGGGGACGCGGAGACCGACCTGGAGGCGCTCTTCAACGCCGTCATGAACCCCAA
GACGGCCAACGTGCCCCAGACCGTGCCCATGAGGCTCCGGAAGCTGCCCCACTCCT
TCTTCAAGCCGCGGAGCCCAAATCCCACTCCCGACAGGCCGCTACTGATGCAGGC
ACTGCAGGAGCCCTGACTCCACAGCATGTTCGAGCTCATGCCGCTCCAGCTGCTCTG
CAGTTGGGAGCTGTTTCTCCTGGGACACTGACCCCCACTGGAGTAGTCTCTGGCCCA
GCAGCTACACCCACAGCTCAGCATCTTCGACAGGCTGCTTTTGAGATACCTGATGAT
GTACCTCTGCCAGCAGGTTGGGAGATGGCAAAGACATCTTCTGGTCAGAGATACTTC
TTAAATCACATCGATCAGACAACAACATGGCAGGACCCCAGGAAGGCCATGCTGTC
[0048] CCAGATGAACGTCACAGCCCCACCAGTCCACCAGTGCAGCAGAATATGATGAACT
CGGCTTCAGGTCCTCTTCCTGATGGATGGGAACAAGCCATGACTCAGGATGGAGAA
ATTTACTATATAAACCATAAGAACAAGACCACCTCTTGGCTAGACCCAAGGCTTGAC
CCTCGTTTTTGCCATGAACCAGAGAATCAGTCAGAGTGCTCCAGTGAAACAGCCACC
ACCCCTGGCTCCCCAGAGCCCACAGGGAGGCGTCATGGGTGGCAGCAACTCCAACC
AGCAGCAACAGATGCGACTGCAGCAACTGCAGATGGAGAAGGAGAGGCTGCGGCT
GAAACAGCAAGAACTGCTTCGGCAGGAGTTAGCCCTGCGTAGCCAGTTACCAACAC
TGGAGCAGGATGGTGGGACTCAAAATCCAGTGTCTTCTCCCGGGATGTCTCAGGAAT
TGAGAACAATGACGACCAATAGCTCAGATCCTTTCTTAAACAGTGGCACCTATCACT
CTCGAGATGAGGCTACAGACAGTGGACTAAGCATGAGCAGCTACAGTGTCCCTCGA
ACCCAGATGACTTCCTGAACAGTGTGGATGAGATGGATACAGGTGATACTATCAA
CCAAAGCACCCCTGCCCTCACAGCAGAACCGTTTCCAGACTACCTTGAAGCCATTCC
TGGGACAAATGTGGACCTTGAACACTGGAAGGAGATGGAATGAACATAGAAGGA
GAGGAGCTGATGCCAAGTCTGCAGGAAGCTTTGAGTTCTGACATCCTTAATGACATG
GAGTCTGTTTTGGCTGCCACCAAGCTAGATAAAGAAAGCTTTCTTACATGGTTATAG

[0049] 在一些实施方案中，Yap突变体具有一个或多个突变，因此与不具有所述一个或多个突变相比，它的稳定性较差。

[0050] 在一个实施方案中，Yap突变体具有在265位处的突变，诸如265位赖氨酸（人280位赖氨酸）的突变。在具体实施方案中，265位（人280位）处的赖氨酸突变为另一种氨基酸，该氨基酸可以是任何其他氨基酸，但在特定情况下该突变为K265R，这与人类序列中的280位赖氨酸突变类似。

[0051] 本公开涵盖蛋白和编码蛋白（包括Yap突变体）的核酸。在一些情况下，突变Yap蛋白以多肽形式递送，并且在一些情况下，突变Yap蛋白作为编码所述蛋白的多核苷酸递送。当以多核苷酸形式递送时，多核苷酸可包含在合适载体中的表达构建体。所述载体可以是任何合适的种类，诸如非病毒的或病毒的。在载体为非病毒的情况下，载体可以是RNA的质粒或线性序列。在载体为病毒的情况下，载体可以是腺病毒、慢病毒、腺相关病毒、逆转录

病毒等。当受表达构建体中的启动子调节时,启动子可以是例如组成型、诱导型或组织特异性的启动子。在特定实施方案中,Yap突变变体将在腺相关病毒构建体中或作为经修饰的RNA递送⁹。

[0052] II. 使用方法的实例

[0053] 本公开的实施方案包括在目标组织中(包括至少在心脏、视网膜和耳部毛细胞中)的组织更新方法。在特定实施方案中,向需要细胞再生或组织更新的个体提供有效量的一种或多种Yap突变变体。

[0054] 成体哺乳动物心肌细胞(CM)更新是低效的。受损的CM无法增殖,而是激活增加倍性的核内复制。因而,心脏倾向于衰竭,这是人类死亡的主要原因。在特定实施方案中,发明人使不受Hippo抑制影响的某种形式的Hippo效应子Yap(称为Yap5SA)表达在成体CM中。Yap5SA诱导CM增殖,倍增时间为33小时,心室壁增生并且超过15%的CM重新启动有丝分裂。染色质可及性的全基因组表征揭示,Yap5SA促进远端增强子的开放和稳健的有丝分裂基因程序的表达。本文揭示的促进CM增殖的基因和增强子可用于刺激心脏再生。因此,本公开的实施方案包括用于更新心肌细胞(包括通过靶向Hippo通路更新心肌细胞)的方法和组合物。在特定实施方案中,向需要心肌细胞更新的个体提供有效量的一种或多种Yap突变变体。在某些实施方案中,存在一种使个体中的所需位置处的细胞再生的方法,所述方法包括向所述位置递送有效量的一种或多种Yap突变蛋白和/或编码Yap突变蛋白的多核苷酸的步骤。

[0055] 在特定实施方案中,提供通过向个体递送治疗有效量的一种或多种Yap突变变体来治疗医学病症的方法。在施用一种或多种突变Yap蛋白和/或编码突变Yap蛋白的核酸时,任何医学病症的至少一种症状可以得到改善。

[0056] 本公开的某些实施方案包括通过向个体提供治疗有效量的一种或多种Yap突变变体来使个体中的心肌细胞再生的方法。在至少一些情况下,突变变体在丝氨酸处包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个氨基酸置换,并且所述置换可以是或可以不是置换为丙氨酸。在突变Yap中可以包括其他非丝氨酸突变。可以对需要心肌细胞再生的一个或多个个体,诸如心脏受损或有心脏受损风险的个体执行某些方法。个体可能具有需要再生心肌细胞的受损心肌组织。在特定实施方案中,施用一种或多种突变Yap蛋白和/或一种或多种编码它们的核酸可使个体中的现有心肌细胞再生出心肌细胞。

[0057] 本公开的实施方案包括例如用于心肌再生和心肌缺血性损伤逆转的方法和/或组合物。在特定实施方案中,提供刺激哺乳动物心脏中的驻留性成体心脏祖细胞或心肌细胞增殖的方法,所述哺乳动物心脏例如已患有心脏病症,诸如急性缺血性损伤。在某些实施方案中,通过向个体施用包含一种或多种Yap突变变体的组合物实现此类方法。

[0058] 本公开的实施方案涉及与治疗 and/或预防一种或多种心脏病症有关的方法和/或组合物。本公开的实施方案涉及组织(包括肌肉组织,诸如心肌组织)的再生。某些实施方案涉及心脏病症的逆转(或其至少一种症状的改善),所述心脏病症至少包括心脏病、心肌病、心瓣膜问题、心包炎、心律不齐、心搏停止、先天性心脏缺损、心力衰竭、心脏疾病、心脏中毒、充血性心力衰竭、缺血性心脏病、急性心肌梗塞、心房纤维性颤动、冠状动脉疾病、缺血性心脏病、瓣膜性心脏病、高血压性心脏病和心律失常。可以治疗或预防特定类型的心血管疾病,诸如冠状动脉疾病(也称为冠心病和缺血性心脏病);心肌病(心肌疾病);心力衰竭;

肺心病;心脏节律障碍;炎症性心脏病;心内膜炎;炎症性心脏肥大;心肌炎;瓣膜性心脏病;脑血管疾病;外周动脉疾病;先天性心脏病;和风湿性心脏病。本公开的实施方案的特定但示例性的适应症至少包括针对以下的应用:1) 充血性心力衰竭;2) 预防心室重塑或心肌梗塞动脉瘤;和/或3) 心肌病。在具体实施方案中,本公开的方法和组合物提供心肌细胞再生,其足以逆转已建立的心脏病症或预防心脏病症或延迟发作或降低严重程度。

[0059] 在心肌病的情况下,该病症可以是由药物,诸如化疗药物(如阿霉素(Adriamycin))或单克隆抗体所引起的^{10,11}。心肌病可以是缺血性或非缺血性心肌病。心肌病可能由长期高血压、心瓣膜问题、先前心脏病发作引起的心脏组织损伤、慢性心率加速、代谢紊乱、营养缺乏、妊娠、酗酒、药物滥用、化疗药物、病毒感染、血色素沉着、遗传病、胆固醇水平升高、肺动脉高压或其组合引起。

[0060] 本公开的特定方面涉及将Yap突变多核苷酸、蛋白、肽或其混合物递送至某种组织以用于组织中某些细胞的增殖、细胞死亡(凋亡)的抑制和/或分化。所述组织可以是任何种类,但在特定情况下,是肌肉组织(包括心脏组织)、视网膜组织或耳部毛细胞。在特定实施方案中,本公开的方法和组合物允许预先存在的成体心肌细胞再生。在一些情况下,递送一种或多种本发明的组合物导致细胞对病理性重塑更具抗性,并且它们可抵抗在初始损害后的进一步损伤。

[0061] 本公开的实施方案包括递送一种或多种Yap突变多核苷酸和/或多肽,所述多核苷酸和/或多肽刺激细胞(诸如肌细胞,包括心肌细胞)和/或组织(包括心脏组织)的再生。此类实施方案的特定方面使得一种或多种心脏相关的医学病症发生逆转。此类实施方案的某些方面使得医学病症,诸如心脏相关的医学病症、眼科医学病症或耳科医学病症的至少一种症状得到改善。

[0062] 在具体实施方案中,例如Yap突变多核苷酸、蛋白、肽或其混合物靶向特定的目标组织,包括肌肉组织,诸如心脏组织。

[0063] 在一些情况下,本公开的方法和组合物用于预防一种或多种心脏相关的医学病症或延迟一种或多种心脏相关的医学病症的发作或降低一种或多种心脏相关的医学病症的一种或多种症状的程度。在特定情况下,对一种或多种症状的此类预防、发作的延迟或程度的降低,出现在有心脏相关医学病症风险的个体中。示例性风险因素包括以下一项或多项:年龄、性别(男性,但也在女性中发生)、高血压、高血清胆固醇水平、吸烟、过量饮酒、糖消耗、家族史、肥胖、缺乏身体活动、心理社会因素、糖尿病、超重、遗传易感性和/或暴露于空气污染。

[0064] 所治疗的任何个体可以是成人、青少年、儿童、婴儿,或者治疗可以在子宫内进行。

[0065] 向个体递送突变Yap蛋白和/或编码突变Yap蛋白的核酸可以是全身性的或者可以是局部性的。在具体实例中,在使用Yap突变蛋白或多核苷酸后,向个体递送体外来源的心肌细胞。在其他情况下,在体内心脏内递送Yap突变蛋白或多核苷酸。例如,这可以通过以下方式实现:在移植到患者体内之前使用Yap在培养物中扩增患者来源(或非患者来源)的诱导多能干细胞来源的心肌细胞(或胚胎干细胞来源的心肌细胞);或者在使用小分子驱动的启动子或工程改造为干细胞来源的心肌细胞的其他Yap诱导方案移植到患者体内之后,使用Yap扩增干细胞来源的心肌细胞。

[0066] 接受本文所涵盖的治疗的个体可能已经或可能未被诊断出患有医学病症,例如包

括心脏医学病症。例如,没有先前的诊断,个体可能表现出或可能不表现出患有心脏医学病症的一种或多种症状。

[0067] III. 药物制剂

[0068] 本发明的药物组合物包含溶解或分散在药学上可接受的载体中的有效量的一种或多种Yap突变蛋白和/或编码Yap突变蛋白或另外的剂的多核苷酸。短语“药学上或药理学上可接受的”是指当视情况施用给动物(例如人)时不会产生不利的、过敏性或其他不良反应的分子实体和组合物。含有至少一种Yap突变蛋白和/或编码Yap突变蛋白或另外的活性成分的多核苷酸的药物组合物的制备将根据本公开内容为本领域技术人员所知,如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第21版,Lippincott Williams and Wilkins,2005所举例说明的,其通过引用并入本文。此外,对于动物(例如人)的施用,应理解制剂应满足FDA生物标准办公室要求的无菌性、产热原性、一般安全性和纯度标准。

[0069] 如本文所用,“药学上可接受的载体”包括任何及所有溶剂、分散介质、包衣、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂(例如,抗细菌剂、抗真菌剂)、等渗剂、吸收延迟剂、盐、防腐剂、药物、药物稳定剂、凝胶、粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、染料、类似物质及其组合,如本领域普通技术人员所知(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,Mack Printing Company,1990,第1289-1329页,其通过引用并入本文)。除非任何常规载体与活性成分不相容,否则考虑将其用于药物组合物中。

[0070] Yap突变蛋白和/或编码Yap突变蛋白的多核苷酸可以包含不同类型的载体,这取决于其是以固体、液体还是气溶胶形式施用,以及对于诸如注射这样的施用途径是否需要是无菌的。本发明可以经静脉内、皮内、透皮、鞘内、动脉内、腹膜内、鼻内、阴道内、直肠内、外用、肌肉内、皮下、经粘膜、经口、外用、局部性、吸入(例如,气溶胶吸入)、注射、输注、连续输注、局部灌注浸浴靶细胞的途径,直接地、通过导管、通过灌洗,以霜剂,以脂质组合物(例如,脂质体)形式施用,或通过如本领域普通技术人员已知的其他方法或前述方法的任何组合(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,Mack Printing Company,1990,其通过引用并入本文)来施用。

[0071] Yap突变蛋白和/或编码Yap突变蛋白的多核苷酸可以配制成游离碱、中性形式或盐形式的组合物。药学上可接受的盐包括酸加成盐,例如与蛋白质组合物的游离氨基形成的酸加成盐,或与无机酸(例如盐酸或磷酸)或诸如乙酸、草酸、酒石酸或扁桃酸的有机酸所形成的酸加成盐。与游离羧基形成的盐也可以源自无机碱,例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁;或诸如异丙胺、三甲胺、组氨酸或普鲁卡因(procaine)这样的有机碱。在配制时,溶液将以与剂量配方相容的方式并以治疗有效的量施用。调配物易于以多种剂型施用,诸如配制用于肠胃外施用的剂型,诸如注射液,或用于递送至肺部的气溶胶,或配制用于消化道施用的剂型,诸如药物释放胶囊等。

[0072] 进一步根据本发明,适合施用的本发明组合物在有或无惰性稀释剂的药学上可接受的载体中提供。载体应该是可同化的,包括液体、半固体(即糊剂)或固体载体。除非任何常规介质、药剂、稀释剂或载体对受者或其中所含组合物的治疗有效性有害,否则其在用于实施本发明方法的可施用组合物中的使用是合适的。载体或稀释剂的实例包括脂肪、油、水、盐水溶液、脂质、脂质体、树脂、粘合剂、填充剂等,或其组合。所述组合物还可包含各种抗氧化剂以阻止一种或多种组分的氧化。另外,可以通过防腐剂诸如各种抗细菌剂和抗真

菌剂,包括但不限于对羟基苯甲酸酯(例如对羟基苯甲酸甲酯,对羟基苯甲酸丙酯)、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞或其组合来防止微生物的作用。

[0073] 根据本公开,所述组合物以任何方便和实用的方式,即通过溶解、悬浮、乳化、混合、包封、吸收等与载体组合。此类程序对于本领域技术人员来说是常规的。

[0074] 在本公开的一个具体实施方案中,将组合物与半固体或固体载体充分组合或混合。所述混合可以任何方便的方式进行,诸如研磨。还可以在混合过程中添加稳定剂以便保护组合物免于治疗活性的丧失,即在胃中变性。用于组合物的稳定剂的实例包括缓冲剂、氨基酸(诸如甘氨酸和赖氨酸)、碳水化合物(诸如葡萄糖、甘露糖、半乳糖、果糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、山梨糖醇、甘露糖醇等)。

[0075] 在其他实施方案中,本发明可涉及药物脂质媒介物组合物的用途,所述药物脂质媒介物组合物包含Yap突变蛋白和/或编码Yap突变蛋白的多核苷酸,一种或多种脂质和水性溶剂。如本文所用,术语“脂质”将定义为包括特征性地不溶于水并且可用有机溶剂萃取的多种物质中的任一种。这类广泛的化合物是本领域技术人员熟知的,并且当术语“脂质”在本文中使用时,不限于任何特定的结构。实例包括含有长链脂族烃的化合物及其衍生物。脂质可以是天然存在的或合成的(即,由人设计或产生的)。然而,脂质通常是生物物质。生物脂质是本领域熟知的,包括例如中性脂肪、磷脂、磷酸甘油酯、类固醇、萜烯、血溶性脂类、鞘糖脂、糖脂、硫脂、具有醚和酯连接的脂肪酸的脂质和可聚合脂质,及其组合。当然,本领域技术人员理解为脂质的除本文具体描述的化合物之外的化合物也涵盖在本发明的组合物和方法中。

[0076] 本领域的普通技术人员将熟悉可用于将组合物分散在脂质媒介物中的技术范围。例如,可以通过本领域的普通技术人员已知的任何方法将Yap突变蛋白和/或编码Yap突变蛋白的多核苷酸分散在含有脂质的溶液中,用脂质溶解,用脂质乳化,与脂质混合,与脂质组合,与脂质共价键合,作为悬浮液包含在脂质中,使其含有胶束或脂质体或与胶束或脂质体复合,或以其他方式与脂质或脂质结构缔合。分散可能会或可能不会导致脂质体的形成。

[0077] 施用给动物患者的本发明组合物的实际剂量可以通过物理和生理因素确定,诸如体重、病症的严重程度、所治疾病的类型、先前或同时的治疗干预、患者的特发症以及施用途径。根据剂量和施用途径,优选剂量和/或有效量的施用次数可根据受试者的反应而变化。在任何情形下,负责施用的从业者将确定组合物中活性成分的浓度以及个体受试者的适当剂量。

[0078] 在某些实施方案中,药物组合物可包含,例如,至少约0.1%的活性化合物。在其他实施方案中,例如活性化合物可占单位重量的约2%至约75%,或约25%至约60%,和其中可推导的任何范围。当然,每种治疗上有用的组合物中一种或多种活性化合物的量可以被制备成使得合适的剂量将以所述化合物的任何给定单位剂量形式获得。制备此类药物调配物的领域中的技术人员将考虑到诸如溶解度、生物利用度、生物半衰期、施用途径、产品保质期等因素以及其他药理学考虑因素,因此,各种剂量和治疗方案可能是可取的。

[0079] 在其他非限制性实例中,剂量还可以包含每次施用约1微克/千克/体重、约5微克/千克/体重、约10微克/千克/体重、约50微克/千克/体重、约100微克/千克/体重、约200微克/千克/体重、约350微克/千克/体重、约500微克/千克/体重、约1毫克/千克/体重、约5毫克/千克/体重、约10毫克/千克/体重、约50毫克/千克/体重、约100毫克/千克/体重、约200

毫克/千克/体重、约350毫克/千克/体重、约500毫克/千克/体重至约1000毫克/千克/体重或更多,以及其中可引出的任何范围。在由本文所列数字可引出的范围的非限制性实例中,基于上述数字,可施用范围为约5毫克/千克/体重至约100毫克/千克/体重,约5微克/千克/体重至约500毫克/千克/体重等。

[0080] A. 消化性组合物和调配物

[0081] 在本发明的优选实施方案中,将Yap突变蛋白和/或编码Yap突变蛋白的多核苷酸配制成通过消化途径施用。消化途径包括组合物与消化道直接接触的所有可能的施用途径。具体地,本文公开的药物组合物可以经口、经颊、直肠或舌下施用。因此,这些组合物可以用惰性稀释剂或用可同化的可食用载体配制,或者可以将其包封在硬壳或软壳明胶胶囊中,或者可以将其压成片剂,或者可以将其直接掺入膳食中。

[0082] 在某些实施方案中,活性化合物可以与赋形剂混合并以可摄取的片剂、口含片、锭剂、胶囊、酏剂、悬浮液、糖浆、糯米纸囊剂等形式使用^{12,13}(美国专利第5,641,515、5,580,579和5,792,451号,各自明确地通过引用整体并入本文)。片剂、锭剂、丸剂、胶囊等也可含有下列物质:粘合剂诸如黄蓍胶、阿拉伯树胶、玉米淀粉、明胶或其组合;赋形剂,诸如磷酸二钙、甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁或其组合;崩解剂,诸如玉米淀粉、马铃薯淀粉、海藻酸或其组合;润滑剂,诸如硬脂酸镁;甜味剂,诸如蔗糖、乳糖、糖精或其组合;调味剂,诸如薄荷、冬青油、樱桃调味剂、橙子调味剂等。当剂量单位形式为胶囊时,除上述类型的物质外,还可以含有液体载体。各种其他物质可以作为包衣存在或以其他方式改变剂量单位的物理形式。例如,片剂、丸剂或胶囊可以包被有虫胶、糖或两者包衣。当剂型为胶囊时,除上述类型的物质外,还可以含有载体诸如液体载体。明胶胶囊、片剂或丸剂可以有肠溶包衣。肠溶包衣防止组合物在pH为酸性的胃或肠上段中变性。参见,例如,美国专利第5,629,001号。在到达小肠时,其中的碱性pH使包衣溶解并容许组合物释放并且被特化细胞,例如肠上皮细胞和淋巴集结(Peyer's patch) M细胞吸收。糖浆或酏剂可含活性化合物,作为甜味剂的蔗糖,作为防腐剂的羟苯甲酸甲酯和羟苯甲酸丙酯、染料和调味剂(诸如樱桃或柑橘调味料)。当然,用于制备任何剂量单位形式的任何物质均应是药用纯的并且在采用的量下基本上无毒。另外,活性化合物可以掺入缓释制剂和调配物中。

[0083] 对于经口施用,本发明的组合物可以可替代地以嗽口水、洁齿剂、口含片、口腔喷雾剂或舌下经口施用调配物的形式掺入有一种或多种赋形剂。例如,可以制备漱口水,将所需量的活性成分掺入到适当的溶剂,诸如硼酸钠溶液(多贝耳氏溶液(Dobell's Solution))中。可替代地,可将活性成分掺入到经口用溶液,诸如含有硼酸钠、甘油和碳酸氢钾的溶液中,或分散在洁齿剂中,或以治疗有效量添加到可包括水、粘合剂、研磨剂、调味剂、发泡剂和保湿剂的组合物中。可替代地,可将组合物制成可置于舌下或以其他方式在口中溶解的片剂或溶液形式。

[0084] 适于其他消化道施用模式的其他调配物包括栓剂。栓剂是不同重量和形状,通常是含药的,用于插入直肠内的固体剂型。插入后,栓剂软化、融化或溶解在腔液中。一般而言,对于栓剂,传统载体可包括例如聚亚烷基二醇、甘油三酯或其组合。在某些实施方案中,栓剂可以由含有例如在约0.5%至约10%,优选约1%至约2%范围内的活性成分的混合物形成。

[0085] B. 肠胃外组合物和调配物

[0086] 在其他实施方案中,Yap突变蛋白和/或编码Yap突变蛋白的多核苷酸可以通过肠胃外途径施用。如本文所用,术语“肠胃外”包括绕过消化道的途径。具体地,本文公开的药物组合物可以例如但不限于经静脉内、皮内、肌肉内、动脉内、鞘内、皮下或腹膜内施用,美国专利第6,7537,514、6,613,308、5,466,468、5,543,158、5,641,515和5,399,363号(各自通过引用整体并入本文)。

[0087] 可以在适当地混有表面活性剂诸如羟丙基纤维素的水中制备呈游离碱或药理学上可接受的盐的活性化合物的溶液。也可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物中和在油中制备分散液。在普通储存和使用条件下,这些制剂含有防腐剂以防止微生物生长。适于注射用的药物形式包括无菌水溶液或分散液和用于临时制备无菌注射液或分散液的无菌粉末(美国专利5,466,468,其明确地通过引用整体并入本文)。在所有情况下,该形式必须无菌并且就易于注射而言必须为流体。它在制备和储存条件下必须稳定,并且必须防止诸如细菌和真菌等微生物的污染作用。所述载体可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(即,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其合适的混合物,和/或植物油。可以例如通过使用包衣诸如卵磷脂,就分散液而言通过维持所需的粒度以及通过使用表面活性剂来维持适当流动性。预防微生物的作用可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等等)来实现。在许多情况下,将优选包括等渗剂,例如糖或氯化钠。注射用组合物的延长吸收可以通过在组合物中使用延迟吸附的药剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来实现。

[0088] 例如,对于以水溶液进行肠胃外施用,如果需要,溶液应适当地缓冲,并且首先用足够的盐水或葡萄糖使液体稀释剂等渗。这些特定的水溶液特别适于静脉内、肌肉内、皮下和腹膜内施用。就此而论,根据本公开内容,可以使用的无菌水性介质将为本领域技术人员所知。例如,可以将一个剂量溶解在等渗NaCl溶液中并且添加皮下输注液体或者在建议的输注部位注射(参见例如,“Remington’s Pharmaceutical Sciences”第15版,第1035-1038和1570-1580页)。根据所治疗的受试者的状况,必然会发生剂量的一些变化。在任何情形下,负责施用的人员将确定个体受试者的适当剂量。而且,对于人类施用,制剂应满足FDA生物标准办公室要求的无菌性、产热原性、一般安全性和纯度标准。

[0089] 无菌注射用溶液通过将所需量的活性化合物掺入具有上文列举的各种其他成分适当的溶剂中,然后根据需要进行过滤灭菌来制备。通常,通过将各种灭菌的活性成分掺入无菌媒介物中来制备分散液,所述媒介物含有碱性分散介质和来自以上列举的那些成分的其他所需成分。在用于制备无菌注射液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,其从其先前的无菌过滤溶液产生活性成分以及任何其他所需成分的粉末。将粉末状组合物与有或无稳定剂的液体载体,例如水或盐水溶液混合。

[0090] C. 其他药物组合物和调配物

[0091] 在本发明的其他优选实施方案中,活性化合物Yap突变蛋白和/或编码Yap突变蛋白的多核苷酸可以被配制成通过各种其他途径,例如外用(即透皮)施用、粘膜施用(鼻内、阴道等)和/或吸入施用。

[0092] 用于外用施用的药物组合物可包括配制用于用药涂敷的活性化合物,例如膏剂、糊剂、霜剂或粉末。膏剂包括所有用于外用涂敷的油脂、吸收、乳剂和基于水溶性的组合物,而霜剂和洗剂是仅包含乳剂基质的那些组合物。外用施用的药物可含有渗透增强剂以

促进活性成分通过皮肤吸附。合适的渗透增强剂包括甘油、醇、烷基甲基亚砷、吡咯烷酮和月桂氮卓酮(luarocapram)。用于外用涂敷的组合物的可能基质包括聚乙二醇、羊毛脂、雪花膏和凡士林以及任何其他合适的吸收、乳剂或水溶性膏剂基质。必要时,外用制剂还可包括乳化剂、胶凝剂和抗微生物防腐剂,以保存活性成分并提供均匀混合物。本发明的透皮给药还可包括使用“贴剂”。例如,贴剂可以在固定的时间段内以预定速率并且以连续的方式供给一种或多种活性物质。

[0093] 在某些实施方案中,药物组合物可通过滴眼剂、鼻内喷雾剂、吸入剂和/或其他气溶胶递送媒介物递送。通过气溶胶鼻喷雾剂将组合物直接递送至肺部的方法已在例如美国专利第5,756,353和5,804,212号中进行了描述(各自明确地通过引用整体并入本文)。同样,使用鼻内微粒树脂¹⁴和溶血磷脂酰-甘油化合物递送药物(美国专利第5,725,871号,其明确地通过引用整体并入本文)在制药领域中也是熟知的。同样,以聚四氟乙烯支撑基质形式的经粘膜药物递送在美国专利第5,780,045号(明确地通过引用整体并入本文)中进行了描述。

[0094] 术语气溶胶是指分散在液化或加压气体推进剂中的细碎固体或液体颗粒的胶体体系。用于吸入的本发明的典型气溶胶由活性成分在液体推进剂中的悬浮液或液体推进剂与合适溶剂的混合物组成。合适的推进剂包括烃和烃醚。合适的容器将根据推进剂的压力要求而变化。气溶胶的施用将根据受试者的年龄、体重以及症状的严重程度和反应而变化。

[0095] IV. 本公开的试剂盒

[0096] 本文描述的任何组合物均可包含在试剂盒中。在非限制性实例中,突变Yap多肽和/或多核苷酸(或用于产生突变Yap多肽的寡核苷酸)可包含在试剂盒中。

[0097] 试剂盒的组分可以以水性介质或冻干形式包装。试剂盒的容器装置通常将包括至少一个小瓶、试管、烧瓶、瓶子、注射器或可以将组分置于其中并且优选地将组分适当等分的其他容器装置。在试剂盒中存在多于一种组分的情况下,试剂盒通常也会包括第二、第三容器或其他另外的容器,可以将另外的组分单独放置在所述容器中。然而,在小瓶中可包含组分的各种组合。本公开的试剂盒通常还将包括用于以密闭的方式容纳所述一种或多种组合物以便商业销售的装置。此类容器可包括将所需小瓶保持在其中的注塑成型或吹塑成型的塑料容器。

[0098] 可将组合物配制成可注射的组合物。在这种情况下,容器装置本身可以是注射器、移液管和/或其他类似设备,可以从容器装置中将调配物施加到身体的感染区域,注射到动物体内,和/或甚至施加到试剂盒的其他组分中/或与试剂盒的其他组分混合。然而,试剂盒的组分可以作为干粉提供。当试剂和/或组分作为干粉提供时,可以通过添加合适的溶剂使粉末重构。可以设想也可以在另一容器装置中提供溶剂。

[0099] 本公开的试剂盒通常还包括用于以密闭的方式容纳小瓶以便商业销售的装置,例如,注塑成型和/或注塑成型的塑料容器,将所需小瓶保持在其中。

[0100] 在特定实施方案中,试剂盒包含用于确定个体患有心脏相关的医学病症的试剂和/或工具。在一些实施方案中,试剂盒包含一种或多种用于心脏相关的医学病症的附加治疗剂,诸如以下的一种或多种:ACE抑制剂、醛固酮抑制剂、血管紧张素II受体阻滞剂(ARB); β 阻滞剂、钙通道阻滞剂、降胆固醇药物、地高辛(digoxin)、利尿剂、变力性治疗剂、钾、镁、血管扩张剂、抗凝药物、阿司匹林及其组合。

[0101] 实施例

[0102] 包括以下实施例以证明本发明的优选实施方案。本领域技术人员应认识到,以下实施例中公开的技术代表发明人发现在本发明的实践中很好地起作用的技术,因此可以认为构成了其实践的优选模式。然而,根据本公开,本领域的技术人员应认识到,在不脱离本发明的精神和范围的前提下,可以在公开的具体实施方案中进行许多改变,并且仍然获得相同或相似的结果。

[0103] 实施例1

[0104] 显性活性YAP诱导染色质可及性和心肌细胞更新

[0105] 为了表征YapS127A突变无法解释所有Lats依赖性Yap抑制并且无法模拟无Hippo活性的心脏,产生了条件性过表达的五个Lats1/2磷酸化位点全部突变为A的Yap5SA的转基因小鼠系⁸。

[0106] CAG驱动的诱导型Yap5SA转基因含有LoxP-侧翼-STOP eGFP,然后是Flag标记的Yap5SA和IRES LacZ(图1A)。转基因在重组之前指导胚胎和出生后心脏中的eGFP表达(图1B、图1C)。发明人将Yap5SA小鼠与他莫昔芬可诱导的心肌细胞特异性Cre驱动子 α MyHC-Cre-ERT2杂交(图1D)¹⁵以产生Yap5SA过表达(OE)小鼠。通过4天连续注射他莫昔芬(40 μ g/g)在成体CM中诱导重组。成体心脏提取物的蛋白质印迹显示Yap5SA OE心脏中的Yap水平有5倍的增加(图1D)。免疫荧光研究揭示相对于Yap5SA OE CM的细胞溶质,具有2.5倍的Yap核富集。对照CM在细胞溶质和细胞核中均表达Yap(图1E)。

[0107] 在最后一次他莫昔芬注射后72小时,Yap5SA OE小鼠死亡(图2A)。组织学分析揭示左心室壁厚度增加,左心室腔室几乎被肌肉阻塞(图2B)。来自他莫昔芬之前和一天之后的超声心动图显示体内Yap5SA OE心脏的心室壁增厚,腔室大小减小和射血分数增加(图2C-2J及多个视频)。这种表型与对照 α MHC-merCremer小鼠在他莫昔芬后的心脏中毒性心室扩张形成对比¹⁶。

[0108] 为了监测心律失常,将遥测装置植入同窝对照和Yap5SAOE小鼠体内。在Yap5SA OE小鼠中未检测到心律失常,而是在研究的所有 α MyHC-Cre-ERT2小鼠中均观察到对他莫昔芬诱导的心律失常的防护(T波倒置)(图5A、图5B;n=3)。进一步地,表达Yap5SA(β -半乳糖苷酶阳性)的心肌细胞通过间隙连接与对照CM连接,如连接蛋白43免疫荧光所示(图5C),表明表达Yap5SA的CM与野生型CM电偶联。在最后一次他莫昔芬注射后24小时分离心肌细胞,并在个体细胞水平上研究CM收缩性。与施用了他莫昔芬的对照CM相比,Yap5SA OE CM更小但具有相似的静息肌节长度和响应于现场刺激的收缩性(图3A、图5D)。

[0109] 为了通过体视学测定CM数量,将舒张期固定的心脏在他莫昔芬注射后2天从心尖到主动脉以7 μ m增量切片,并且发明人直接测量了不同组织深度的左心室面积。通过根据在心脏内的位置的变化对左心室面积绘图并对曲线下面积进行积分来计算参考左心室容积。因为可能难以明确地鉴定CM,发明人使用中心粒周物质1(PCM-1)标记来鉴定左心室中的CM细胞核¹。与对照心脏相比,Yap5SA OE心脏具有增加的左心室壁面积,增加的心肌容积和减小的腔室容积(图3B-3D)。Yap5SA OE心脏也增加了左心室重量与体重比(图3E)。

[0110] 为了估计左心室总CM数量,发明人计算了对照(72,100 \pm 2300个CM细胞核/mm³)和Yap5SA OE心脏(70,600 \pm 1300个CM细胞核/mm³)中的PCM-1阳性CM细胞核密度^{1,17}。CM细胞核密度与近期来自Alkass等人的小鼠体视学数据一致(参见图1B¹⁷)。为了获得CM数

量,发明人将CM密度乘以总心脏容积并针对CM成核进行校正(见下文)^{1,17}。与对照相比,Yap5SA OE左心室的CM数量大大增加(对照:1,880,000+/-78,000vs.Yap5SA:2,680,000+/-54,000;ANOVA与Bonferoni事后分析 $p<.0001$;图3F)。对照CM数量数据也与先前公开的小鼠数据一致¹⁸。

[0111] 通过流式细胞术定量分离的PCM-1阳性CM细胞核的DNA含量,并且Yap5SA OE CM的4N细胞核增加较小但高于4N DNA含量的细胞核没有增加,正如在有丝分裂障碍模型中所见¹⁹(图6)。因为G2/M中的二倍体细胞具有与四倍体细胞相同的4N DNA含量,所以有数据表明Yap5SA 4N细胞核的增加是由于正常细胞周期进展而不是超倍化(hyper-ploidization)²⁰。在分离的CM上测量CM细胞核的数量,并且在Yap5SA OE心脏中单核CM增加但双核CM没有变化(图3G)。还注意到Yap5SA心脏中具有4个细胞核的CM的比例减少,表明非生产性核分裂较少(图3G)。

[0112] 发明人在Yap5SA诱导后在饮用水中任意提供EdU两天,并在分离的CM上对EdU染色以研究未受损的成体CM中的S期进入情况(图3H)。与先前的观察结果类似,在未受损的对照CM中无法检测到EdU掺入(图3H)²。相反,大约16%的Yap5SA OE CM为EdU阳性(图3H)。而且,Yap5SA CM表达有丝分裂标记物,其中约11%的Yap5SA CM Aurkb阳性和6%PHH3阳性(图3I-3J)。为了计算CM倍增时间(t_D),用单个低剂量的他莫昔芬诱导稀有重组,并且在不同时间点对LacZ阳性CM计数。在转换成对数形式后,发明人发现Yap5SA OE CM的 t_D 为1.37天(图3K)。重要的是,Yap5SA不诱导CM凋亡或间质纤维化(图7、图8)。总的来说,数据表明,随着新CM的产生,Yap5SA诱导成体CM增殖。

[0113] 为了在成体CM更新的背景下深入了解Yap5SA靶基因,在他莫昔芬注射后48小时进行CM特异性核RNA-seq^{21,22}。在Yap5SA CM中总共1,352个基因显著上调和748个基因下调(调整后的 p 值 <0.01) (图4A、图9)。无偏基因本体论分析揭示基因表达变化与增殖性CM表型一致(图10A)。上调的转录物包括着丝粒基因Cenpe和Cenpf,以及细胞周期蛋白Ccnd1和Ccna2。其他基因包括Dock2,一种Rho家族鸟嘌呤核苷酸交换因子,其促进细胞骨架重塑和细胞增殖²³。下调的基因包括编码肌球蛋白和离子通道的基因,其表征分化的CM表型(图10B)。有趣的是,Hippo通路基因是Yap5SA CM中最显著增加的转录物之一(图11)。Hippo通路核心基因Lats 2和Kibra(Wwc1)上调,编码Yap抑制剂的基因Crb2、Amot和Vgll2-4也上调(图10B、图11)。

[0114] 为了研究Yap5SA OE CM染色质景观(chromatin landscape),对PCM-1分离的CM细胞核上的转座酶可及性染色质(ATAC)-seq进行测定²⁴。在Yap5SA CM中总共有16,189个峰显示出可及性增加,而与对照CM相比13,353个ATAC峰减少(图4A、图9)。新生基序发现揭示Yap5SA OE CM中新开放的ATAC峰内的前三个富集基序全部属于转录因子TEAD(图4B),即熟知的Yap相互作用因子²⁵。其他富集基序是与先前的Yap ChIP-seq数据一致的AP-1元件和在预防病理性心脏重塑中具有作用的Atf3²⁶⁻²⁸。应用Nucleo-ATAC算法来说明染色质相对于TEAD DNA结合基序的开放状态,并且发现TEAD基序处的核小体消耗与转录因子占用的增加一致²⁹(图4B)。

[0115] 相对于最近的转录起始位点(TSS)绘制基因间ATAC峰,并且在对照和Yap5SA OE CM中都存在含有启动子区(距TSS <1 kb)和远端基因座(>10 kb)的双峰分布(图12A)。Yap5SA OE CM中上调的、新的可及性ATAC峰(调整后的 p 值 $<1e-5$)主要位于假定增强子的远端²⁴。同

样,映射到活性转录基因的ATAC峰也在远端区富集(图4C、图12B)。先前的工作揭示,Yap-Tead结合位点富集H3K27Ac,即活性染色质的标记物⁵。ATAC-seq数据与来自正在发育的和成体心脏的现有H3K27Ac ChIP-seq数据的比较揭示,来自Yap5SA OE CM的ATAC-seq峰(调整后的p值 ≤ 0.035)富集胚胎H3K27Ac染色质标记物。相反,来自对照CM的ATAC-seq峰(调整后的p值 ≤ 0.035)显示富集成体H3K27Ac染色质标记物³⁰(图4D)。这些数据表明Yap5SA促进了发育增强子的染色质可及性。

[0116] 使用针对Yap5SA Flag表位的抗体进行ChIP-seq以下拉(pulldown)Yap5SA结合的染色质。与ATAC-seq数据一致,Yap5SA ChIP-seq揭示Yap5SA以大约6.3:1的比率优先结合远端增强子区(图4C)^{26,31}。Yap还结合可及启动子以正调控正常沉默基因的转录³¹。

[0117] 将Yap5SA CM中的转录上调基因与Yap5SA ChIP-seq数据进行比较,并且有173个基因是直接的Yap5SA靶基因。在直接的Yap5SA靶基因座中,正如通过ATAC-seq测定的,76个基因座也具有增加的染色质可及性,而其他Yap5SA靶基因座已经具有开放的染色质特征标记(chromatin signature)(图4E、图13A)。绘制以每个基因的TSS为中心的1kb窗口周围的RNA-seq和ATAC-seq的平均片段深度,揭示了高启动子可及性和在那些基因座处转录增加的模式(图13C)。

[0118] 76个基因中被Yap5SA直接调控的是Hippo通路组分,表明Yap直接激活负反馈回路以防止CM增殖(图4G、图11A-11B)。Hippo通路基因包括Lats2、Vgll2、Vgll3和Wwc1^{8,32}(图4F;图13A)。蛋白质印迹揭示内源性、较低分子量的Yap具有增加的丝氨酸112磷酸化,表明Hippo活性上调(图11)。被Yap5SA直接调控的其他基因包括有丝分裂和胞质分裂基因诸如Pkcι³³。可及性Yap5SA靶标的主要类别是编码内体分选组分的基因。该类别包括编码逆转复合体(retromer)组分的Snx2、Snx7。编码内吞衔接蛋白的Dab2起到Wnt抑制剂的作用,而Wls是Wnt配体的内体运输所必需的^{34,35}(图13A1-13A3、图13B)。

[0119] 促进粘附连接组装的基因,诸如Nectin1、Plekha7、Mtss1和Ctnnd1,也是可及性Yap5SA靶标,进一步支持新CM功能性整合到心脏中的发现³⁶。在可及性Yap5SA靶标中也发现了调控肌动蛋白细胞骨架的多个基因。Ephexin和Pak3编码对增强Rho活性很重要的蛋白质。其他基因,诸如编码肌动蛋白成核剂的Cobl,和在伤口愈合期间在应力纤维的形成中很重要的Cnn3。(图13A1-13A3、图13B)

[0120] 图14C汇总了受Yap5SA差异性调控的直接参与细胞周期的基因,以及汇总了描述会或试图在成体心肌细胞中引发细胞周期的先前文献。关键指出正如通过RNA-seq所确定的Yap5SA心肌细胞中差异性上调或下调的(符号)基因;通过Yap5SA染色质免疫沉淀,然后通过测序(即ChIP-seq(+))确定为Yap5SA直接靶标的基因;以及通过对转座酶可及染色质的测定(即ATAC-seq(+))所确定的,在对照心肌细胞中受表观遗传抑制但在Yap5SA存在下不受抑制的基因。

[0121] 研究结果揭示,停用的远端调控元件有效阻碍了分化的CM增殖能力。通过过表达Yap5SA,确定Yap可以激活通过有丝分裂促进进展的遗传程序。重要的是,Yap5SA靶基因包括细胞周期基因,但也包括编码内体分选蛋白的基因,内体分选蛋白对于生产性细胞分裂很重要。

[0122] 由发明人制作的影片显示了在他莫昔芬施用之前的Yap5SA OE心脏以及相同的但在他莫昔芬施用之后一天和之后4天的心脏的短轴B型超声心动图。影片还展示了最后一个

他莫昔芬剂量后2天和动物死亡前24小时的Yap5SA OE心脏的短轴B型超声心动图。心室腔减小。在他莫昔芬之前的Yap5SA OE心脏以及相同的但在他莫昔芬之后两天和之后5天的心脏的长轴B型超声心动图。心肌增厚明显。

[0123] 补充材料

[0124] 材料和方法

[0125] 实验动物

[0126] 根据贝勒医学院 (Baylor College of Medicine) 的机构动物护理和使用委员会进行小鼠研究。发明人利用来自Kunliang Guan的pCMV-flag YAP2 5SA (Addgene质粒#27371), 作为实例将其克隆到CAG-loxP-eGFP-Stop-loxP-IRES-βGal表达构建体中。该构建体编码人Yap变体, 该Yap变体在五个经典Lats依赖性磷酸化基序处有八个丝氨酸残基突变为丙氨酸 (S61A、S109A、S127A、S128A、S131A、S163A、S164A、S381A)。通过将编码转基因的线性化DNA (图1A) 原核注射到来自FVB/N小鼠的受精卵母细胞中, 然后将所述卵母细胞植入假孕ICR小鼠中, 产生Yap5SA OE (Tg (Jojo-Flag::Yap5SA) 5JFM) 小鼠。与纯合αMyHC-Cre-ERT2小鼠进行单交, 将其保持在C57B1/6背景下。所有对照动物都是同窝小鼠或年龄匹配的同胞小鼠。通过尾部皮肤中的eGFP表达和通过PCR基因分型可视化地测定基因型 (F: AAGCCTTGACTTGAGGTTAG (SEQ ID NO:5), R: CGTCATCGTCTTTGTAGTCC; SEQ ID NO:6)。所有成体实验均在7-10周龄的雄性和雌性小鼠中进行。类似于Heallen等人先前的出版物, 腹膜内注射 (40mg/kg), 每天一次持续四天⁴), 实现他莫昔芬对Cre的诱导。

[0127] 超声波超声心动描记

[0128] 根据在贝勒医学院小鼠表型分析中心 (Baylor College of Medicine Mouse Phenotyping Core) 建立的方案, 在VisualSonics 770系统上使用30MHz扫描头 (RMV7007B) 进行M型和B型超声心动描记。

[0129] 单细胞形态学和生理学测量

[0130] 第四次他莫昔芬注射后第二天, 通过胶原酶A (Roche) 的逆行灌注来分离心肌细胞, 如别处所述,³⁷。将一部分细胞固定 (10% 福尔马林, 10分钟) 用于细胞大小量化, 细胞大小量化是通过以下方式实现的: 拍摄接种细胞的静态图像 (Nikon Eclipse 80i显微镜, 配备有Nikon DSFi1相机) 并在imageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) 中描画其轮廓以量化CM 2D曲线面积。对图像进行量化的人员对基因型不知情。使用IonOptix肌细胞钙和收缩性记录系统 (IonOptix, Westwood, MA) 进行活体生理成像。将心肌细胞接种于含有1.8mM Ca²⁺的Tyrode溶液 (经HEPES缓冲, pH 7.4) 中, 选择不存在或最少的GFP (重组后), 并使用MyoPacer (IonOptix, Westwood, MA) 以20V/cm进行现场刺激; 在2分钟、1Hz起搏方案的最后20秒期间, 使用Ionoptix IonWizard软件, 通过肌节周期的傅里叶变换量化肌节缩短。

[0131] 光学映射

[0132] 向手术麻醉平面用异氟烷将小鼠麻醉, 并在颈椎脱位前腹膜内注射肝素 (100单位)。然后取出心脏并在含氧 (95% O₂、5% CO₂) 的冷Tyrode溶液中洗涤。然后将21号插管插入主动脉。插管后, 用Tyrode溶液逆行灌注心脏, 将主动脉压维持在80mmHg和120mmHg之间。将电极 (Harvard Apparatus, MA, USA) 置于右心房表面以进行起搏刺激 (10Hz、12Hz和14Hz), 起搏刺激是通过PowerLab 26T (AD Instruments, Sydney, Australia) 产生的。为了消除收缩假象, 向心脏装载布雷他汀 (blebbistatin) (Sigma-Aldrich, B0560-5mg, 50ul的2.5mg/

ml的DMSO溶液)。然后,发明人用电压敏感染料di-4-ANEPS (Invitrogen,D-1199,20ul的2.5mg/ml的DMSO溶液)灌注心脏。使用LED灯进行激发(波长:530nm)。荧光发射(表示Vm)经过长通滤波(>590nm,590FG05-50,Andover Corporation滤光器)并用MiCAMOCMOS相机(SciMedia,CA,USA)测量。在实验期间使用LabChart监测表面ECG (ADInstruments)。用Rhythm软件计算传导速度和激活图³⁸。

[0133] 组织学、免疫荧光、冷冻切片和EdU成像

[0134] 将新解剖的胚胎和出生后的心脏进行解剖并在配备有Zeiss AxioCam Hrc的Zeiss SterEO Discovery.V12上对内源荧光进行成像。为了固定,将心脏用心脏停搏液20mM KCl-PBS逆行灌注,之后灌注10%中性缓冲福尔马林,然后包埋在石蜡中。切割7微米的横切片并将其固定在带电聚赖氨酸载玻片(Denville UltraClear Plus,白色磨砂)上。一部分用Masson三色染色法染色,一部分用Picro-天狼星红染色。通过首先将切片脱蜡和再水合,然后进行抗原修复来进行免疫组织化学分析。将切片封闭(10%的驴血清PBS溶液,0.1%吐温-20),然后染色(单独、连续地)过夜,之后进行成像(一抗:抗CX43,Sigma兔1:200;抗 β -gal,Abcam鸡1:200)(二抗:标准的荧光偶联的Life technologies Alexa抗体)。用DAPI对细胞核进行染色。使用DeadEnd Fluorometric TUNEL系统(Promega)在石蜡包埋的组织上进行TUNEL染色。对图像进行量化的人员对基因型不知情。所有成像均在贝勒医学院的光学成像和重要显微镜检查中心(Optical Imaging and Vital Microscopy core)的Zeiss LSM 780共聚焦显微镜上进行。

[0135] 为了切割冷冻切片,对心脏进行提取,用30%蔗糖、20mM KCl-PBS灌注,然后置于Tissue-Tek®O.C.T.化合物中,之后在干冰上冷冻。然后切割16微米的切片并固定在载玻片上。对于免疫荧光染色,通过以下方式进行抗原修复:将切片温热至42°,然后置于-20°丙酮中20分钟,之后用驴血清封闭,然后在4°下与一抗(PHH3,兔Cell Signaling 1:400;AuroraB,兔Abcam 1:200;cTnT,小鼠Thermo 1:200)一起孵育过夜,然后在室温下与二抗(Life Technologies Alexa抗兔;抗小鼠载体实验室生物素化1:200,然后是Life Technologies链霉抗生物素蛋白-Alexa)抗体孵育30分钟。用DAPI对细胞核进行染色。对图像进行量化的人员对基因型不知情。所有成像均在贝勒医学院的光学成像和重要显微镜检查中心(Optical Imaging and Vital Microscopy core)的Zeiss LSM 780共聚焦显微镜上进行。

[0136] 使用标准方案进行免疫细胞化学分析。简言之,将Langendorff分离的CM在室温下在10%福尔马林中固定10分钟。用0.5%triton-100透化20分钟并用2%FBS和2%BSA封闭后,在成像之前将抗体孵育(单独、连续地)过夜(抗Yap,兔Novus 1:200,cTnT,小鼠Thermo 1:200)(二抗:标准的荧光偶联的Life Technologies Alexa抗体)。通过Life Technologies的Click-it Alexa Fluor 647成像试剂盒(C10340),使用Click-it技术进行EdU染色。通过共聚焦z-堆栈确定个体心肌细胞中真正存在EdU。在这些分离的心肌细胞中通过用DAPI染色并通过共聚焦Z-堆栈对每个细胞的细胞核数量计数而量化细胞核数量。对图像进行量化的人员对基因型不知情。所有成像均在Zeiss LSM 780共聚焦显微镜上进行。

[0137] 蛋白质印迹分析

[0138] 通过将心脏在HEPES、EDTA、triton缓冲液中进行珠粒匀化来进行蛋白质印迹分析。然后向裂解物中装载基于还原性tris的SDS样品缓冲液(80 μ g/孔),并转移至PVDA膜上,

并使用Li-Cor Odyssey成像系统成像。一抗:Novus兔抗Yap(1:1000);Sigma小鼠抗M2flag(1:1000);Millipore小鼠抗GAPDH(1:5000);Cell Signaling Technologies抗P-Yap(S127-小鼠同源物S112)), (1:1000)。Li-Cor荧光二抗:山羊抗兔IgG、山羊抗小鼠IgG(1:5000)。使用Fiji(ImageJ)的凝胶分析特征进行定量。

[0139] 体内电生理学分析

[0140] 如先前所述³⁹,跨越Yap5SA OE诱导方案连续记录心电图5天。将遥测发射器(Data Sciences International)植入能走动的小鼠的腹腔中。将s.c.电极以引脚II形式放置,并使用4.1版Dataquest软件记录。通过计算曲线下面积来进行T波测量。

[0141] 左心室大小和肌细胞总数的定量

[0142] 为了测定左心室中心肌细胞的总数,发明人首先切除心脏并通过用KCl逆行灌注,接着用10%福尔马林灌注,然后在10%福尔马林中点滴固定(drop fixing)而将心脏固定在舒张期。将心脏包埋在石蜡中,并从心尖到主动脉切割成7微米的切片。然后发明人通过在显微镜载玻片上根据组织深度的变化绘制左心室心肌的面积来计算每个心脏中左心室的容积,然后对该区域下面积进行积分。由该容积,通过使用1.053g/mL的肌肉密度将容积转换为质量来计算左心室重量与体重的比率⁴⁰。然后用抗PCM1、DAPI和WGA对不同组织深度处的7微米切片进行染色以标记:CM细胞核、所有细胞核和细胞边界。使用共聚焦显微镜术对每个切片的整个厚度进行成像,然后发明人对成像帧中PCM1(+)细胞核的数量进行计数。未对帧底部和左侧边缘上的部分细胞核进行计数,而对顶部和右侧边缘上的部分细胞核进行了计数。从不同组织深度的整个切片中随机拍摄Z-堆栈(40个Z-堆栈/心脏)。仅当细胞核为PCM1和DAPI阳性,其中PCM1环绕DAPI时才对其计数(图3F)。为了找到CM的总数,将每容积计数的细胞核数量计算为成核密度,然后将其外推至心肌的整个容积,然后针对来自每种基因型的肌细胞的平均成核进行校正(对照:2.04个细胞核/CM;Yap5SA:1.92个细胞核/CM,图3G),如别处所述⁴¹。对图像进行量化的人员对基因型不知情。

[0143] 通过流式细胞术进行DNA含量分析

[0144] 通过Langendorff灌注分离心肌细胞,然后在10%福尔马林中固定。如先前所述,分离细胞核⁴²。将细胞悬浮在HB缓冲液(pH 7.415mM Tris-HCl、0.34M蔗糖、15mM NaCl、60mM KCl、0.2mM EDTA、0.2mM EGTA和蛋白酶抑制剂)中并进行杜恩斯(dounce)匀化30次。然后在PBTB缓冲液(0.1%Triton X-100、5%BSA的PBS溶液)中通过18-G针15次而释放细胞核。为了标记CM特异性细胞核,将细胞核与PCM1抗体(1:1000,Sigma;二抗:Life Technologies Alexa抗兔546)一起孵育,并用DAPI标记DNA。然后使细胞核通过细胞分选仪(BD Biosciences FACSARIA II SORP),并将PCM1(+)心肌细胞核DNA含量量化为DAPI荧光强度,并使用FlowJo软件(Tree Star)分析细胞周期阶段。

[0145] LacZ报告基因倍增时间分析

[0146] 解剖出心脏,用20%在20mM KCl中的甘油灌注,包埋在O.C.T.化合物中,并在干冰上冷冻。然后将它们切成16μm的切片,在0.02%的戊二醛PBS溶液中固定15分钟。使与x-gal的反应在37°下进行48小时。

[0147] 由细胞分裂产生的细胞数量可以用 $N(t) = N_0 2^{t/t_D}$ 来描述,其中N(t)是给定时间的细胞数量,N₀是起始细胞数量,t是从N₀到N(t)所花费的时间量,t_D是倍增时间。进行单次低剂量(10μg/g)他莫昔芬注射,然后根据时间处死Yap5SA OE小鼠。然后发明人将心脏切

片并量化每个切片的LacZ(+)细胞数量。然后将该总数除以切片的面积。然后发明人绘制了那些值的 \log_2 ,并将数据拟合为用 $\log_2(N(t)) = \log_2(N_0) + \frac{2t}{t_D}$ ($R^2 = 0.96$)描述的线性函数。通过插入 N_0 和 $N(t)$ 的数据,重新排列并对 t_D 求解,确定倍增时间(t_D)。在配备有Nikon DSFi1相机)的Nikon Eclipse 80i显微镜上进行成像。对图像进行量化的人员对时间点不知情。

[0148] 针对ATAC-seq和RNA-seq的PCM1核分离:

[0149] 根据Mo等人所述,并做以下修改进行核分离⁴³。简言之,在冰上收获新鲜心脏组织,并立即用Biogen Series PR0200 (PRO Scientific)匀化,之后再进行杜恩斯匀化。使用optiprep密度梯度介质(Sigma)通过密度梯度离心分离细胞核。从30%至40%界面分离的所有细胞核用Protein-G Dynabeads (Life technologies)预先净化。接下来,用抗PCM1 (Sigma,HPA023370)抗体和Protein-G Dynabeads使细胞核免疫沉淀以富集心肌细胞细胞核²¹。

[0150] ATAC-seq

[0151] 使用大约50,000个珠粒结合的PCM1+细胞核作为ATAC-seq的输入。根据(Buenrostro等人,2013)产生ATAC-seq文库²⁴。在Illumina Nextseq仪器(DNA Link)上进行配对末端2×75bp测序。使用具有默认配对末端设置的Bowtie2将读段(read)映射到小鼠基因组(mm10)⁴⁴。接下来,丢弃所有非核读段和不正确配对的读段。接下来用picard MarkDuplicates去除重复读段。用MACS2 (检峰-不构建模型-宽)进行峰检测(peak calling)。将黑名单区域从mm9提升到小鼠基因组mm10,并与低测序质量的峰一起移除(要求>q30)。使用bedtools (multicov模块)由综合峰值文件(合并的Yap5SA和对照重复)计算每种情况的读段数⁴⁵。用CQN进行ATAC-seq数据集的分位数归一化⁴⁶,并且将偏移量馈入DESeq2中以量化差异可及性⁴⁷。用NucleoATAC进行核小体检测²⁹。用Homer (findMotifsGenome.pl)进行基序富集分析。

[0152] RNA-seq

[0153] 使用RNEasy Plus Micro试剂盒(Qiagen)收集来自珠粒结合的PCM1+细胞核的RNA。用带有Ribo Erase (Kapa Biosystems)和定制Y形衔接子的Stranded RNA-seq试剂盒构建核RNA-seq文库。在Illumina Nextseq仪器(DNA Link)上对RNA-seq文库进行配对末端2x75 bp测序。首先使用STAR将读段映射到小鼠基因组(mm10)⁴⁸。然后用DESeq2进行差异表达分析⁴⁷。使用Metascape进行基因本体论分析。使用g:Profiler进行从头通路分析^{49,50}。

[0154] H3K27Ac ChIP-seq

[0155] 使用bowtie2默认参数将公开可用的数据:GSM1264370、GSM1264372、GSM1264372和GSM1264372映射到小鼠基因组(构建mm10)。映射之后,在分析之前合并心脏E11.5 H3K27Ac重复GSM1264370和GSM1264372。使用UCSC基因组浏览器显示基因轨迹。

[0156] Yap ChIP-seq

[0157] 将心室解剖到冷DPBS中以去除血液,然后在补充有0.1%TritonX-100的PBS中切碎。然后用BioGen Pro200和5mm发生器快速将其匀化。在室温下于1%甲醛中在旋转器上实现交联10分钟,并在室温下用150mM甘氨酸淬灭10分钟。使细胞团块化并用0.1%Triton-PBS冲洗两次。然后通过5mL细胞裂解缓冲液(5mM Tris pH 8.0、140mM NaCl、1mM EDTA、10%甘油、0.5%NP-40、0.25%TritonX-100、0.5%Igepal CA-630、50mM HEPES、完全无

EDTA的Roche蛋白酶抑制剂) 中在冰上孵育20分钟而使细胞裂解, 然后进行杜恩斯匀化。使裂解物团块化, 重新悬浮于细胞裂解缓冲液中, 并进行超声处理。然后, 发明人在4℃下以2kG使细胞和细胞核团块化10分钟, 然后重新悬浮在600μL核裂解缓冲液(10mM Tris、1mM EDTA、0.5mM EGTA、0.3% SDS、完全无EDTA的Roche蛋白酶抑制剂) 中并进行超声处理。在4℃下将15μg剪切的染色质用于用Flag抗体(Sigma, F1804) 或IgG(Milipore 12-371) 和Protein-G磁珠(Pierce) 在旋转器上进行ChIP过夜。在4℃下将珠粒在旋转器上洗涤5分钟, 洗涤、去交联并纯化DNA。使用Kappa文库制备试剂盒(Ion Torrent, KK8301) 制备测序文库。使用Torrent Suite aligner Tmap(0.2.3) (Life Technologies) 将在Ion Torrent Proton上测序的YAP5SA-FLAG ChIP-seq文库映射到mm10小鼠基因组装配体。进行三次生物学重复, 仅保留唯一映射读段。从YAP5SA ChIP-seq组合数据集中检测峰并用HOMER(findPeaks和annotatePeaks.pl) 进行注释。使用UCSC基因组浏览器显示基因轨迹。

[0158] 实施例2

[0159] YAPK265R稳定性

[0160] 发明人产生了两个具有Yap K265R(在Yap的265氨基酸上赖氨酸突变为精氨酸) 纯合突变的P19细胞系(11号和13号)。为了检查YapK265R突变体的半衰期, 在6孔板中接种WT P19细胞和具有Yap K265R突变的P19细胞(13号)。第二天, 当细胞达到~60%-70%融合时, 用20μg/ml放线菌酮(CHX) 处理细胞2、4或6小时(用DMSO处理的细胞为0小时)。处理后, 用冰冷的PBS洗涤细胞两次, 然后用100μl 0.5% NP40裂解缓冲液(50mM Tris-HCl、150mM NaCl、0.5% NP40及蛋白酶抑制剂和磷酸化抑制剂) 收获细胞。通过蛋白质印迹法分析细胞裂解物以测试Yap、具有S127磷酸化的Yap(p-Yap) 和β-连环蛋白的表达。将GAPDH表达用作内部对照(图15A)。CHX可以抑制蛋白合成, 因为在处理后没有新生蛋白补充, Yap、p-Yap和β-连环蛋白的蛋白水平随时间而下降。与WT Yap相比, YapK265R下降得更快, 这意味着具有K265R突变的Yap不太稳定(图15A)。p-Yap和β-连环蛋白在YapK265R突变体P19细胞中也不太稳定(图15A)。在没有CHX处理的情况下, 与WT P19细胞相比, YapK265R突变体P19细胞中Yap和p-Yap的基础水平略低(图1B)。有趣的是, 在具有YapK265R突变的P19细胞中β-连环蛋白表达增加(图1A和1B)。

[0161] 将这些研究重复两次, 结果一致(图16和图17), 统计结果如图17B所示。为了测试Yap蛋白周转率, 用20μg/ml为蛋白酶体抑制剂的MG132处理细胞; 由于不能降解, 蛋白水平随时间的推移而增加。在YapK265R突变体P19细胞中更多的Yap蛋白积聚表明与WT Yap相比, YapK265R具有更高的周转率; 换句话说, YapK265R不如WT Yap稳定(图18A和图18B)。然而, 在YapK265R突变细胞中β-连环蛋白的周转率没有变化(图18A和图18C)。

[0162] Yap是一种转录辅助因子, 其与核中的DNA结合配偶体一起调控基因表达。为了测试YapK265R突变体的核定位, 裂解P19细胞, 并收获核和细胞溶质级分用于蛋白质印迹分析。核级分中的Yap蛋白量较少, 但在YapK265R突变细胞的细胞溶质级分中没有变化, 这表明YapK265R的核定位较少(图19)。将该实验进行两次, 总共重复三次(图19A和图19B)。统计结果如图19C和图19D所示。

[0163] 抗体的实例: Yap(1:1000, Novas Biologicals, NB110-58358); β-连环蛋白(1:1000, Santa Cruz, sc-7963); p-Yap(S127)(1:1000, Cell Signaling, #4911); p-Yap(S381)(1:1000, Cell Signaling, #13619); GAPDH(1:3000, Abcam, ab9485); HDAC2(1:5000, Thermo

Scientific,PA 1-861)

[0164] 参考文献

[0165] 本文引用的所有专利、专利申请和出版物特此通过引用整体并入本文。

[0166] 1 Bergmann,O.et al.Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart.Cell 161,1566-1575,doi:10.1016/j.cell.2015.05.026(2015) .

[0167] 2 Soonpaa,M.H.&Field,L.J.Assessment of cardiomyocyte DNA synthesis in normal and injured adult mouse hearts.The American journal of physiology 272, H220-226(1997) .

[0168] 3 Yu,F.X.,Zhao,B.&Guan,K.L.Hippo Pathway in Organ Size Control,Tissue Homeostasis,and Cancer.Cell 163,811-828,doi:10.1016/j.cell.2015.10.044(2015) .

[0169] 4 Heallen,T.et al.Hippo signaling impedes adult heart regeneration.Development 140,4683-4690(2013) .

[0170] 5 Morikawa,Y.et al.Actin cytoskeletal remodeling with protrusion formation is essential for heart regeneration in Hippo deficient mice.submitted(2015) .

[0171] 6 Xin,M.et al.Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration.Proc Natl Acad Sci U SA 110,13839-13844,doi:10.1073/pnas.1313192110(2013) .

[0172] 7 Lin,Z.et al.Cardiac-specific YAP activation improves cardiac function and survival in an experimental murine MI model.Circulation research 115,354-363,doi:10.1161/circresaha.115.303632(2014) .

[0173] 8 Zhao,B.,Li,L.,Tumaneng,K.,Wang,C.Y.&Guan,K.L.A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP) .Genes&development 24,72-85,doi:10.1101/gad.1843810(2010) .

[0174] 9 Sultana,N.et al.Optimizing Cardiac Delivery of Modified mRNA.Mol Ther 25,1306-1315,doi:10.1016/j.ymthe.2017.03.016(2017) .

[0175] 10 Chatterjee,K.,Zhang,J.,Honbo,N.&Karliner,J.S.Doxorubicin cardiomyopathy.Cardiology 115,155-162,doi:10.1159/000265166(2010) .

[0176] 11 Florido,R.,Smith,K.L.,Cuomo,K.K.&Russell,S.D.Cardiotoxicity From Human Epidermal Growth Factor Receptor-2(HER2) Targeted Therapies.J Am Heart Assoc 6,doi:10.1161/JAHA.117.006915(2017) .

[0177] 12 Mathiowitz El,J.J.,Jong YS,Carino GP,Chickering DE,Chaturvedi P,Santos CA,Vijayaraghavan K,Montgomery S,Bassett M,Morrell C.Biologically erodable microspheres as potential oral drug delivery systems.Nature 386,410-414,doi:10.1038/386410a0(1997) .

[0178] 13 Hwang SJ1,P.H.,Park K.Gastric retentive drug-delivery systems.Critical reviews in therapeutic drug carrier systems 15,243-284(1998) .

[0179] 14 Mitsuko Takenaga*,Y.S.,Yasutaka Azechi,Akira Ochiai,Yasuo Kosaka,&

Rie Igarashi,Y.M.Microparticle resins as a potential nasal drug delivery system for insulin.Journal of controlled release 52,81-87(1996) .

[0180] 15 Sohal,D.S.et al.Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein.Circulation research 89,20-25(2001) .

[0181] 16 Bersell,K.et al.Moderate and high amounts of tamoxifen in alphaMHC-MerCreMer mice induce a DNA damage response.leading to heart failure and death.Disease models &mechanisms 6,1459-1469,doi:10.1242/dmm.010447 (2013) .

[0182] 17 Alkass,K.et al.No Evidence for Cardiomyocyte Number Expansion in Preadolescent Mice.Cell 163,1026-1036,doi:10.1016/j.cell.2015.10.035(2015) .

[0183] 18 Bersell,K.,Arab,S.,Haring,B.&Kuhn.B.Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury.Cell 138,257-270,doi:10.1016/j.cell.2009.04.060(2009) .

[0184] 19 Castedo,M.et al.Cell death by mitotic catastrophe:a molecular definition.Oncogene 23,2825-2837,doi:10.1038/sj.onc.1207528(2004) .

[0185] 20 Baildam,A.D.et al.DNA analysis by flow cytometry,response to endocrine treatment and prognosis in advanced carcinoma of the breast.British journal of cancer 55,553-559(1987) .

[0186] 21 Gilsbach,R.et al.Dynamic DNA methylation orchestrates cardiomyocyte development,maturation and disease.Nature communications 5, 5288,doi:10.1038/ncomms6288(2014) .

[0187] 22 Preissl,S.et al.Deciphering the Epigenetic Code of Cardiac Myocyte Transcription.Circulation research 117,413-423,doi:10.1161/circresaha.115.306337(2015) .

[0188] 23 Guo,X.&Chen,S.Y.Dedicator of Cytokinesis 2 in Cell Signaling Regulation and Disease Development.Journal of cellular physiology,doi:10.1002/jcp.25512(2016) .

[0189] 24 Buenrostro,J.D.,Giresi,P.G.,Zaba,L.C.,Chang,H.Y.&Greenleaf, W.J.Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin,DNA-binding proteins annd nucleosome position.Nature methods 10,1213-1218,doi:10.1038/nmeth.2688(2013) .

[0190] 25 Halder,G.&Johnson,R.L.Hippo signaling:growth control and beyond.Development 138,9-22,doi:10.1242/dev.045500(2011) .

[0191] 26 Zanconato,F.et al.Genome-wide association between YAP/TAZ/TEAD and AP-1 at enhancers drives oncogenic growth.Nature cell biology 17,1218-1227, doi:10.1038/ncb3216(2015) .

[0192] 27 Stein,C.et al.YAP1 Exerts Its Transcriptional Control via TEAD-Mediated Activation of Enhancers.PLoS genetics 11,e1005465,doi:10.1371/

journal.pgen.1005465 (2015) .

[0193] 28 Kalfon,R.et al.ATF3 expression in cardiomyocytes preserves homeostasis in the heart and controls peripheral glucose tolerance.Cardiovascular research 113,134-146,doi:10.1093/cvr/cvw228 (2017) .

[0194] 29 Schep,A.N.et al.Structured nucleosome fingerprints enable high-resolution mapping of chromatin architecture within regulatory regions.Genome research 25,1757-1770,doi:10.1101/gr.192294.115 (2015) .

[0195] 30 Nord,A.S.et al.Rapid and pervasive changes in genome-wide enhancer usage during mammalian development.Cell 155,1521-1531,doi:10.1016/j.cell.2013.11.033 (2013) .

[0196] 31 Galli,G.G.et al.YAP Drives Growth by Controlling Transcriptional Pause Release from Dynamic Enhancers.Molecular cell 60,328-337,doi:10.1016/j.molcel.2015.09.001 (2015) .

[0197] 32 Lin,Z.et al.Acetylation of VGLL4 Regulates Hippo-YAP Signaling and Postnatal Cardiac Growth.Developmental cell 139,466-479,doi:10.1016/j.devcel.2016.09.005 (2016) .

[0198] 33 Passer,D.,van de Vrugt,A.,Atmanli,A.&Domian,I.J.Atypical Protein Kinase C-Dependent Polarized Cell Division Is Required for Myocardial Trabeculation.Cell reports 14,1662-1672,doi:10.1016/j.celrep.2016.01.030 (2016) .

[0199] 34 Hofsteen,P.,Robitaille,A.M.,Chapman,D.P.,Moon,R.T.&Murry,C.E.Quantitative proteomics identify DAB2 as a cardiac developmental regulator that inhibits WNT/heta-catenin signaling.Proc Natl Acad Sci U S A 113,1002-1007,doi:10.1073/pnas.1523930113 (2016) .

[0200] 35 Hausmann,G.,Banziger,C.&Basler,K.Helping Wingless take flight:how WNTproteins are secreted.Nature reviews.Molecular cell biology 8,331-336,doi:10.1038/nrm2141 (2007) .

[0201] 36 Saarikangas,J.et al.Missing-in-metastasis MIM/MTSS1 promotes actin assembly at intercellular junctions and is required for integrity of kidney epithelia.Journal of cell science 124,1245-1255,doi:10.1242/jcs.082610 (2011) .

[0202] 37 Reynolds,J.O.et al.Junctophilin-2 gene therapy rescues heart failure by normalizing RyR2-mediated Ca (2+) release.Int J Cardiol 225,371-380, doi:10.1016/j.ijcard.2016.10.021 (2016) .

[0203] 38 Laughner,J.I.,Ng,F.S.,Sulkin,M.S.,Arthur,R.M.&Efimov,I.R.Processing and analysis of cardiac optical mapping data obtained with potentiometric dyes.Am J Physiol Heart Circ Physiol303,H753-765,doi:10.1152/ajpheart.00404.2012 (2012) .

[0204] 39 Wang,J.et al.Pitx2-microRNA pathway that delimits sinoatrial node development and inhibits predisposition to atrial fibrillation.Proc Natl Acad

Sci U S A 111,9181-9186,doi:10.1073/pnas.1405411111 (2014) .

[0205] 40 Vinnakota,K.C.&Bassingthwaighte,J.B.Myocardial density and composition:a basis for calculating intracellular metabolite concentrations.American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 286,doi:10.1152/ajpheart.00478.2003 (2004) .

[0206] 41 Br  el,A.&Nyengaard,J.R.Design-based stereological estimation of the total number of cardiac myocytes in histological sections.Basic research in cardiology 100,311-319,doi:10.1007/s00395-005-0524-9 (2005) .

[0207] 42 Bonn,S.et al.Cell type-specific chromatin immunoprecipitation from multicellular complex samples using BiTS-ChIP.Nature protocols 7,978-994,doi:10.1038/nprot.2012.049 (2012) .

[0208] 43 Mo,A.et al.Epigenomic Signatures of Neuronal Diversity in the Mammalian Brain.Neuron 86,1369-1384,doi:10.1016/j.neuron.2015.05.018 (2015) .

[0209] 44 Langmead,B.,Trapnell,C.,Pop,M.&Salzberg,S.L.Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome.Genome Biology 10,1-10,doi:10.1186/gb-2009-10-3-r25 (2009) .

[0210] 45 Quinlan,A.R.BEDTools:the Swiss army tool for genome feature analysis.Current protocols in bioinformatics,doi:10.1002/0471250953.bil112s47 (2014) .

[0211] 46 Hansen,K.D.,Irizarry,R.A.&Wu,Z.Removing technical variability in RNA-seq data using conditional quantile normalization.Biostatistics (Oxford, England) 13,204-216,doi:10.1093/biostatistics/kxr054 (2012) .

[0212] 47 Love,M.I.,Huber,W.&Anders,S.Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2.Genome biology 15,550,doi:10.1186/s13059-014-0550-8 (2014) .

[0213] 48 Dobin,A.et al.STAR:ultrafast universal RNA-seq aligner.Bioinformatics (Oxford,England) 29,15-21,doi:10.1093/bioinformatics/bts635 (2013) .

[0214] 49 Reimand,J.,Kull,M.,Peterson,H.,Hansen,J.&Vilo,J.g:Profiler--a web-based toolset for functional profiling of gene lists from large-scale experiments.Nucleic acids research 35,200,doi:10.1093/nar/gkm226 (2007) .

[0215] 50 Reimand,J.et al.g:Profiler-a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update).Nucleic acids research 44,9,doi:10.1093/nar/gkw199 (2016) .

[0216] 虽然已经详细描述了本发明及其优点,但应该理解,在不脱离由所附权利要求所限定的本发明的精神和范围的情况下,可以进行各种变化、替换和改变。而且,本申请的范围不旨在限于说明书中描述的工艺、机器、制造、物质组成、装置、方法和步骤的特定实施方案。本领域普通技术人员从本发明的公开内容将容易理解目前存在或稍后开发的执行与可以根据本发明利用本文描述的相应实施方案的基本上相同的功能或实现基本上相同的结

果的工艺、机器、制造、物质组成、装置、方法或步骤。因此,所附权利要求旨在在其范围内包括此类工艺、机器、制造、物质组成、装置、方法或步骤。

序列表

<110> 贝勒医学院 (Baylor College of Medicine)

<120> 作为Hippo效应子的显性活性Yap诱导染色质可及性和心肌细胞更新

<130> BAYM.P0223W0

<140> 62/471,204

<141> 2017-03-14

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 488

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成蛋白

<400> 1

```

Met Asp Pro Gly Gln Gln Pro Pro Pro Gln Pro Ala Pro Gln Gly Gln
1           5           10           15
Gly Gln Pro Pro Ser Gln Pro Pro Gln Gly Gln Gly Pro Pro Ser Gly
          20           25           30
Pro Gly Gln Pro Ala Pro Ala Ala Thr Gln Ala Ala Pro Gln Ala Pro
        35           40           45
Pro Ala Gly His Gln Ile Val His Val Arg Gly Asp Ser Glu Thr Asp
        50           55           60
Leu Glu Ala Leu Phe Asn Ala Val Met Asn Pro Lys Thr Ala Asn Val
65           70           75           80
Pro Gln Thr Val Pro Met Arg Leu Arg Lys Leu Pro Asp Ser Phe Phe
          85           90           95
Lys Pro Pro Glu Pro Lys Ser His Ser Arg Gln Ala Ser Thr Asp Ala
        100          105          110
Gly Thr Ala Gly Ala Leu Thr Pro Gln His Val Arg Ala His Ser Ser
        115          120          125
Pro Ala Ser Leu Gln Leu Gly Ala Val Ser Pro Gly Thr Leu Thr Pro
        130          135          140
Thr Gly Val Val Ser Gly Pro Ala Ala Thr Pro Thr Ala Gln His Leu
145          150          155          160
Arg Gln Ser Ser Phe Glu Ile Pro Asp Asp Val Pro Leu Pro Ala Gly
          165          170          175
Trp Glu Met Ala Lys Thr Ser Ser Gly Gln Arg Tyr Phe Leu Asn His

```


180							185					190					
Ile	Asp	Gln	Thr	Thr	Thr	Trp	Gln	Asp	Pro	Arg	Lys	Ala	Met	Leu	Ser		
195							200					205					
Gln	Met	Asn	Val	Thr	Ala	Pro	Thr	Ser	Pro	Pro	Val	Gln	Gln	Asn	Met		
210							215					220					
Met	Asn	Ser	Ala	Ser	Gly	Pro	Leu	Pro	Asp	Gly	Trp	Glu	Gln	Ala	Met		
225					230			235							240		
Thr	Gln	Asp	Gly	Glu	Ile	Tyr	Tyr	Ile	Asn	His	Lys	Asn	Lys	Thr	Thr		
245							250					255					
Ser	Trp	Leu	Asp	Pro	Arg	Leu	Asp	Pro	Arg	Phe	Ala	Met	Asn	Gln	Arg		
260							265					270					
Ile	Ser	Gln	Ser	Ala	Pro	Val	Lys	Gln	Pro	Pro	Pro	Leu	Ala	Pro	Gln		
275							280					285					
Ser	Pro	Gln	Gly	Gly	Val	Met	Gly	Gly	Ser	Asn	Ser	Asn	Gln	Gln	Gln		
290							295					300					
Gln	Met	Arg	Leu	Gln	Gln	Leu	Gln	Met	Glu	Lys	Glu	Arg	Leu	Arg	Leu		
305					310			315							320		
Lys	Gln	Gln	Glu	Leu	Leu	Arg	Gln	Glu	Leu	Ala	Leu	Arg	Ser	Gln	Leu		
325							330					335					
Pro	Thr	Leu	Glu	Gln	Asp	Gly	Gly	Thr	Gln	Asn	Pro	Val	Ser	Ser	Pro		
340							345					350					
Gly	Met	Ser	Gln	Glu	Leu	Arg	Thr	Met	Thr	Thr	Asn	Ser	Ser	Asp	Pro		
355							360					365					
Phe	Leu	Asn	Ser	Gly	Thr	Tyr	His	Ser	Arg	Asp	Glu	Ser	Thr	Asp	Ser		
370							375					380					
Gly	Leu	Ser	Met	Ser	Ser	Tyr	Ser	Val	Pro	Arg	Thr	Pro	Asp	Asp	Phe		
385					390			395							400		
Leu	Asn	Ser	Val	Asp	Glu	Met	Asp	Thr	Gly	Asp	Thr	Ile	Asn	Gln	Ser		
405							410					415					
Thr	Leu	Pro	Ser	Gln	Gln	Asn	Arg	Phe	Pro	Asp	Tyr	Leu	Glu	Ala	Ile		
420							425					430					
Pro	Gly	Thr	Asn	Val	Asp	Leu	Gly	Thr	Leu	Glu	Gly	Asp	Gly	Met	Asn		
435							440					445					
Ile	Glu	Gly	Glu	Glu	Leu	Met	Pro	Ser	Leu	Gln	Glu	Ala	Leu	Ser	Ser		
450							455					460					
Asp	Ile	Leu	Asn	Asp	Met	Glu	Ser	Val	Leu	Ala	Ala	Thr	Lys	Leu	Asp		
465					470			475							480		
Lys	Glu	Ser	Phe	Leu	Thr	Trp	Leu										
485																	

<210> 2

<211> 488

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成蛋白

<400> 2

```

Met Asp Pro Gly Gln Gln Pro Pro Pro Gln Pro Ala Pro Gln Gly Gln
1           5           10           15
Gly Gln Pro Pro Ser Gln Pro Pro Gln Gly Gln Gly Pro Pro Ser Gly
           20           25           30
Pro Gly Gln Pro Ala Pro Ala Ala Thr Gln Ala Ala Pro Gln Ala Pro
           35           40           45
Pro Ala Gly His Gln Ile Val His Val Arg Gly Asp Ala Glu Thr Asp
           50           55           60
Leu Glu Ala Leu Phe Asn Ala Val Met Asn Pro Lys Thr Ala Asn Val
65           70           75           80
Pro Gln Thr Val Pro Met Arg Leu Arg Lys Leu Pro Asp Ser Phe Phe
           85           90           95
Lys Pro Pro Glu Pro Lys Ser His Ser Arg Gln Ala Ala Thr Asp Ala
           100          105          110
Gly Thr Ala Gly Ala Leu Thr Pro Gln His Val Arg Ala His Ala Ala
           115          120          125
Pro Ala Ala Leu Gln Leu Gly Ala Val Ser Pro Gly Thr Leu Thr Pro
           130          135          140
Thr Gly Val Val Ser Gly Pro Ala Ala Thr Pro Thr Ala Gln His Leu
145          150          155          160
Arg Gln Ala Ala Phe Glu Ile Pro Asp Asp Val Pro Leu Pro Ala Gly
           165          170          175
Trp Glu Met Ala Lys Thr Ser Ser Gly Gln Arg Tyr Phe Leu Asn His
           180          185          190
Ile Asp Gln Thr Thr Thr Trp Gln Asp Pro Arg Lys Ala Met Leu Ser
           195          200          205
Gln Met Asn Val Thr Ala Pro Thr Ser Pro Pro Val Gln Gln Asn Met
           210          215          220
Met Asn Ser Ala Ser Gly Pro Leu Pro Asp Gly Trp Glu Gln Ala Met
225          230          235          240
Thr Gln Asp Gly Glu Ile Tyr Tyr Ile Asn His Lys Asn Lys Thr Thr
           245          250          255

```

Ser Trp Leu Asp Pro Arg Leu Asp Pro Arg Phe Ala Met Asn Gln Arg
 260 265 270
 Ile Ser Gln Ser Ala Pro Val Lys Gln Pro Pro Pro Leu Ala Pro Gln
 275 280 285
 Ser Pro Gln Gly Gly Val Met Gly Gly Ser Asn Ser Asn Gln Gln Gln
 290 295 300
 Gln Met Arg Leu Gln Gln Leu Gln Met Glu Lys Glu Arg Leu Arg Leu
 305 310 315 320
 Lys Gln Gln Glu Leu Leu Arg Gln Glu Leu Ala Leu Arg Ser Gln Leu
 325 330 335
 Pro Thr Leu Glu Gln Asp Gly Gly Thr Gln Asn Pro Val Ser Ser Pro
 340 345 350
 Gly Met Ser Gln Glu Leu Arg Thr Met Thr Thr Asn Ser Ser Asp Pro
 355 360 365
 Phe Leu Asn Ser Gly Thr Tyr His Ser Arg Asp Glu Ala Thr Asp Ser
 370 375 380
 Gly Leu Ser Met Ser Ser Tyr Ser Val Pro Arg Thr Pro Asp Asp Phe
 385 390 395 400
 Leu Asn Ser Val Asp Glu Met Asp Thr Gly Asp Thr Ile Asn Gln Ser
 405 410 415
 Thr Leu Pro Ser Gln Gln Asn Arg Phe Pro Asp Tyr Leu Glu Ala Ile
 420 425 430
 Pro Gly Thr Asn Val Asp Leu Gly Thr Leu Glu Gly Asp Gly Met Asn
 435 440 445
 Ile Glu Gly Glu Glu Leu Met Pro Ser Leu Gln Glu Ala Leu Ser Ser
 450 455 460
 Asp Ile Leu Asn Asp Met Glu Ser Val Leu Ala Ala Thr Lys Leu Asp
 465 470 475 480
 Lys Glu Ser Phe Leu Thr Trp Leu
 485

<210> 3

<211> 523

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成蛋白

<400> 3

Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Leu Ala Ala Ala Asn Ser Ser
 1 5 10 15

Leu	Ala	Thr	Met	Asp	Tyr	Lys	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	Ala	Arg	Leu	Glu
20				25				30							
Ser	Val	Pro	Lys	Asp	Pro	Gly	Gln	Gln	Pro	Pro	Pro	Gln	Pro	Ala	Pro
35				40				45							
Gln	Gly	Gln	Gly	Gln	Pro	Pro	Ser	Gln	Pro	Pro	Gln	Gly	Gln	Gly	Pro
50				55				60							
Pro	Ser	Gly	Pro	Gly	Gln	Pro	Ala	Pro	Ala	Ala	Thr	Gln	Ala	Ala	Pro
65				70				75				80			
Gln	Ala	Pro	Pro	Ala	Gly	His	Gln	Ile	Val	His	Val	Arg	Gly	Asp	Ala
85				90				95							
Glu	Thr	Asp	Leu	Glu	Ala	Leu	Phe	Asn	Ala	Val	Met	Asn	Pro	Lys	Thr
100				105				110							
Ala	Asn	Val	Pro	Gln	Thr	Val	Pro	Met	Arg	Leu	Arg	Lys	Leu	Pro	Asp
115				120				125							
Ser	Phe	Phe	Lys	Pro	Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	His	Ser	Arg	Gln	Ala	Ala
130				135				140							
Thr	Asp	Ala	Gly	Thr	Ala	Gly	Ala	Leu	Thr	Pro	Gln	His	Val	Arg	Ala
145				150				155				160			
His	Ala	Ala	Pro	Ala	Ala	Leu	Gln	Leu	Gly	Ala	Val	Ser	Pro	Gly	Thr
165				170				175							
Leu	Thr	Pro	Thr	Gly	Val	Val	Ser	Gly	Pro	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ala
180				185				190							
Gln	His	Leu	Arg	Gln	Ala	Ala	Phe	Glu	Ile	Pro	Asp	Asp	Val	Pro	Leu
195				200				205							
Pro	Ala	Gly	Trp	Glu	Met	Ala	Lys	Thr	Ser	Ser	Gly	Gln	Arg	Tyr	Phe
210				215				220							
Leu	Asn	His	Ile	Asp	Gln	Thr	Thr	Thr	Trp	Gln	Asp	Pro	Arg	Lys	Ala
225				230				235				240			
Met	Leu	Ser	Gln	Met	Asn	Val	Thr	Ala	Pro	Thr	Ser	Pro	Pro	Val	Gln
245				250				255							
Gln	Asn	Met	Met	Asn	Ser	Ala	Ser	Gly	Pro	Leu	Pro	Asp	Gly	Trp	Glu
260				265				270							
Gln	Ala	Met	Thr	Gln	Asp	Gly	Glu	Ile	Tyr	Tyr	Ile	Asn	His	Lys	Asn
275				280				285							
Lys	Thr	Thr	Ser	Trp	Leu	Asp	Pro	Arg	Leu	Asp	Pro	Arg	Phe	Ala	Met
290				295				300							
Asn	Gln	Arg	Ile	Ser	Gln	Ser	Ala	Pro	Val	Lys	Gln	Pro	Pro	Pro	Leu
305				310				315				320			
Ala	Pro	Gln	Ser	Pro	Gln	Gly	Gly	Val	Met	Gly	Gly	Ser	Asn	Ser	Asn

325	330	335
Gln Gln Gln Gln Met Arg Leu Gln Gln Leu Gln Met Glu Lys Glu Arg		
340	345	350
Leu Arg Leu Lys Gln Gln Glu Leu Leu Arg Gln Glu Leu Ala Leu Arg		
355	360	365
Ser Gln Leu Pro Thr Leu Glu Gln Asp Gly Gly Thr Gln Asn Pro Val		
370	375	380
Ser Ser Pro Gly Met Ser Gln Glu Leu Arg Thr Met Thr Thr Asn Ser		
385	390	395
Ser Asp Pro Phe Leu Asn Ser Gly Thr Tyr His Ser Arg Asp Glu Ala		
405	410	415
Thr Asp Ser Gly Leu Ser Met Ser Ser Tyr Ser Val Pro Arg Thr Pro		
420	425	430
Asp Asp Phe Leu Asn Ser Val Asp Glu Met Asp Thr Gly Asp Thr Ile		
435	440	445
Asn Gln Ser Thr Leu Pro Ser Gln Gln Asn Arg Phe Pro Asp Tyr Leu		
450	455	460
Glu Ala Ile Pro Gly Thr Asn Val Asp Leu Gly Thr Leu Glu Gly Asp		
465	470	475
Gly Met Asn Ile Glu Gly Glu Glu Leu Met Pro Ser Leu Gln Glu Ala		
485	490	495
Leu Ser Ser Asp Ile Leu Asn Asp Met Glu Ser Val Leu Ala Ala Thr		
500	505	510
Lys Leu Asp Lys Glu Ser Phe Leu Thr Trp Leu		
515	520	

<210> 4

<211> 1572

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成DNA

<400> 4

```

atggactaca aagacgatga cgacaagctt gcggccgcga attcaagctt agccaccatg 60
gactacaaag acgatgacga taaagcaagg ctccaatcgg tacctaagga tcccgggcag 120
cagccgccgc ctcaaccggc cccccagggc caagggcagc cgccttcgca gccccgcag 180
gggcagggcc cgccgtccgg acccgggcaa ccggcacccg cggcgaccca ggcggcgccg 240
caggcacccc ccgccgggca tcagatcgtg cacgtccgcg gggacgcgga gaccgacctg 300
gaggcgctct tcaacgccgt catgaacccc aagacggcca acgtgcccc aaccgtgccc 360
atgaggctcc ggaagctgcc cgactccttc ttcaagccgc cggagcccaa atcccactcc 420

```

cgacaggccg ctactgatgc aggcactgca ggagccctga ctccacagca tgttcgagct 480
 catgccgctc cagctgctct gcagttggga gctgtttctc ctgggacact gacccccact 540
 ggagtagtct ctggcccagc agctacaccc acagctcagc atcttcgaca ggctgctttt 600
 gagatacctg atgatgtacc tctgccagca ggttgggaga tggcaaagac atcttctggt 660
 cagagatact tcttaaataca catcgatcag acaacaacat ggcaggaccc caggaaggcc 720
 atgctgtccc agatgaacgt cacagcccc accagtccac cagtgcagca gaatatgatg 780
 aactcggctt caggtcctct tcctgatgga tgggaacaag ccatgactca ggatggagaa 840
 atttactata taaaccataa gaacaagacc acctcttggc tagaccaag gcttgaccct 900
 cgttttgcca tgaaccagag aatcagtcag agtgcctcag tgaaacagcc accaccctg 960
 gctccccaga gcccacaggg aggcgtcatg ggtggcagca actccaacca gcagcaacag 1020
 atgcgactgc agcaactgca gatggagaag gagaggtgc ggctgaaaca gcaagaactg 1080
 cttcggcagg agttagccct gcgtagccag ttaccaacac tggagcagga tgggtgggact 1140
 caaaatccag tgtcttctcc cgggatgtct caggaattga gaacaatgac gaccaatagc 1200
 tcagatcctt tccttaacag tggcacctat cactctcgag atgaggctac agacagtgga 1260
 ctaagcatga gcagctacag tgtccctcga accccagatg acttctgaa cagtgtggat 1320
 gagatggata caggtgatac tatcaaccaa agcacctgc cctcacagca gaaccgtttc 1380
 ccagactacc ttgaagccat tcctgggaca aatgtggacc ttggaacact ggaaggagat 1440
 ggaatgaaca tagaaggaga ggagctgatg ccaagtctgc aggaagcttt gagttctgac 1500
 atccttaatg acatggagtc tgttttggct gccaccaagc tagataaaga aagctttctt 1560
 acatggttat ag 1572

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成引物

<400> 5

Ala Ala Gly Cys Cys Thr Thr Gly Ala Cys Thr Thr Gly Ala Gly Gly

1 5 10 15

Thr Thr Ala Gly

20

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

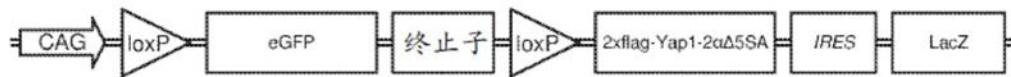
<220>

<223> 合成引物

<400> 6

Cys Gly Thr Cys Ala Thr Cys Gly Thr Cys Thr Thr Thr Gly Thr Ala

1	5	10	15
Gly Thr Cys Cys			
20			



1 MDPGQQPPQPAPQGGQPPSQPPQGGQPPSGPGQPAPAATQAAPQAPPAGHQIVHVRGD
 61 SETDLEALFNAVMNPKTANVPQTVPMLRLKLPDSFFKPEPKSHSRQASTDAGTAGALTP
 121 QHVRAHSSPASLQLGAVSPGTLTPTGVVSGPAATPTAQHLRQSSFEIPDDVPLPAGWEMA
 181 KTSSGQRYFLNHIDQTTTWQDPRKAMLSQMNVTAPTSPPVQQNMMNSASGPLPDGWEQAM
 241 TQDGEIYYINHKNKTTSWLDPRLDPRFAMNQRISQSAPVKQPPPLAPQSPQGGVMGGSNS
 301 NQQQMRLQQLQMEKERLRLKQOELLROELALRSQLEQDGGTQNPVSSPGMSQELRT
 361 MTTNSSDPFLNSGTYHSRDESDSGLSMSSYSVPRTPDFFLNSVDEMDTGDITNQSTLPS
 421 QQNRFPDYLEAIPGTNVDLGTLEGDGMNIEGEELMPSLQEALSSDILNDMESVLAATKLD
 481 KESFLTWL

Lats磷酸化基序: HXRXXS

图1A

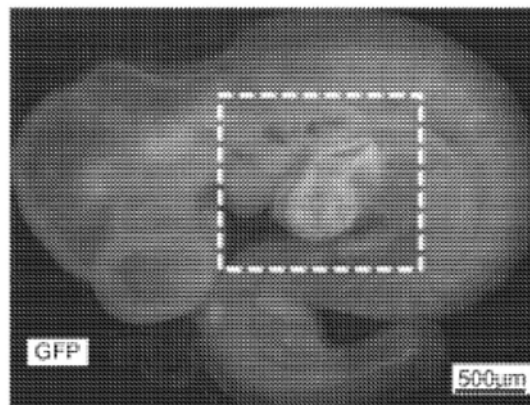


图1B

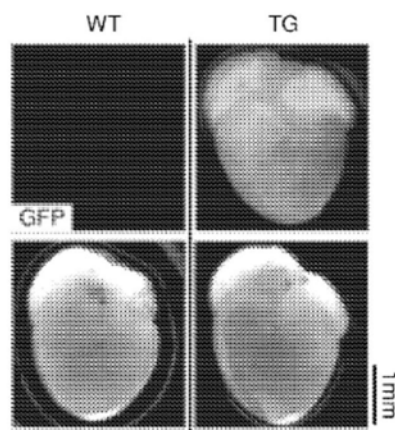


图1C

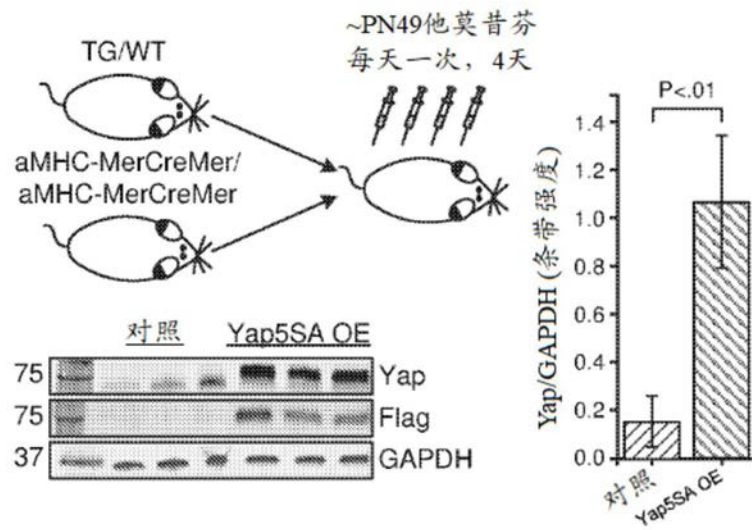


图1D

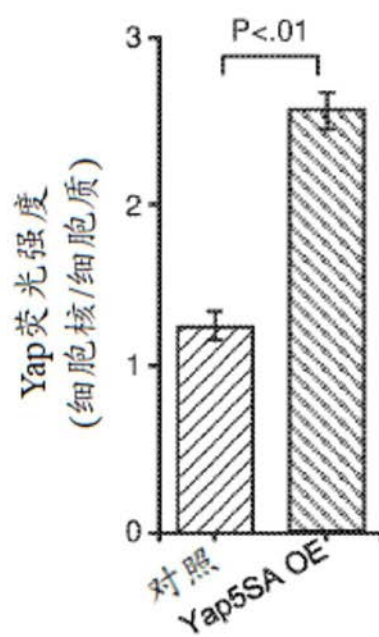
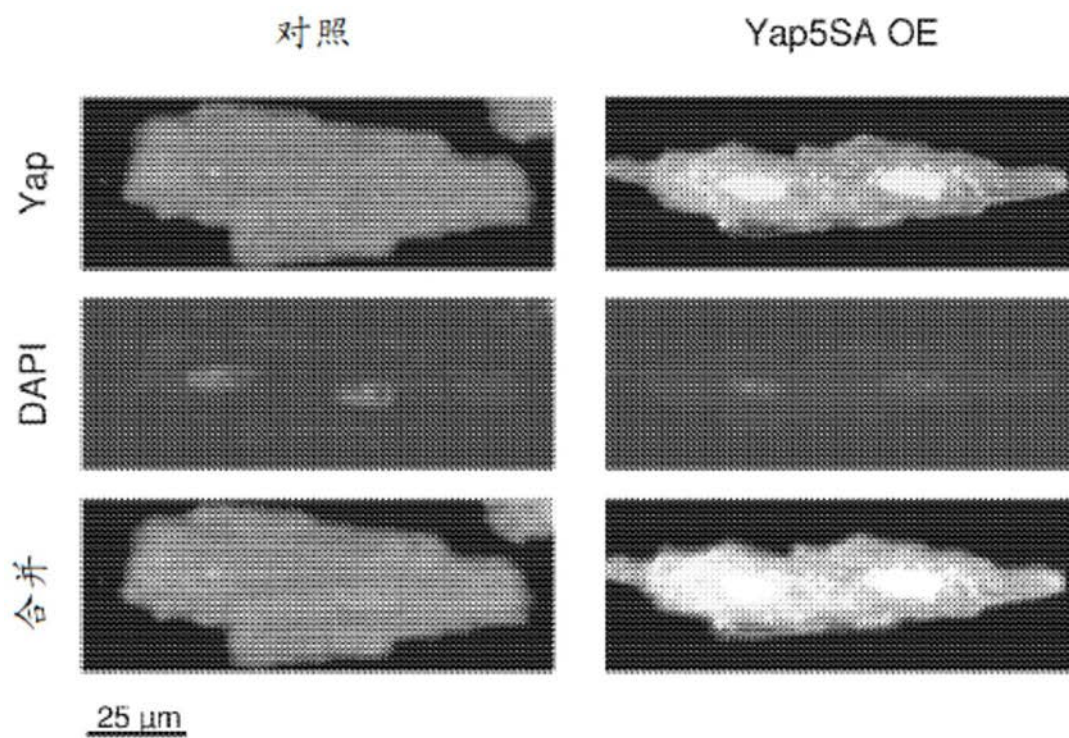


图1E

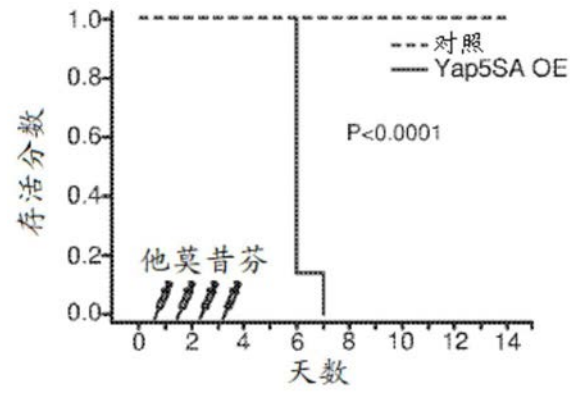


图2A

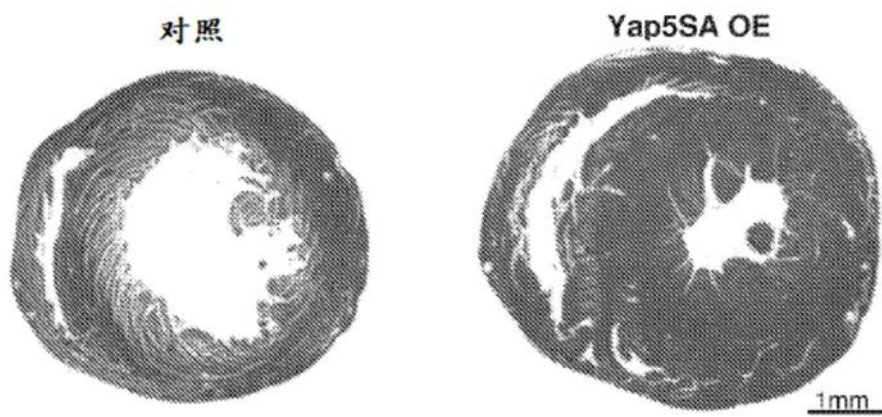


图2B

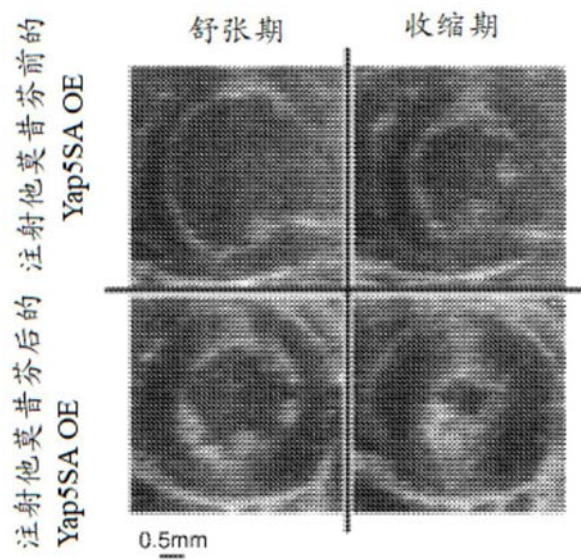


图2C

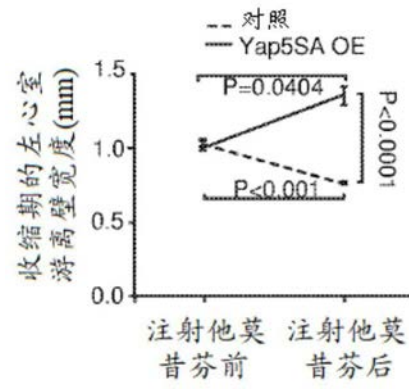


图2D

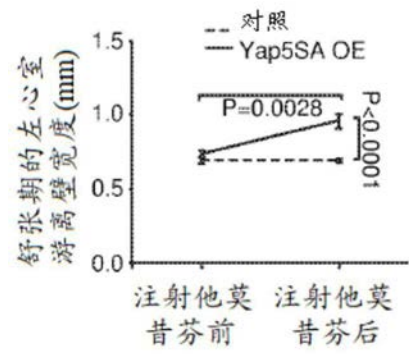


图2E

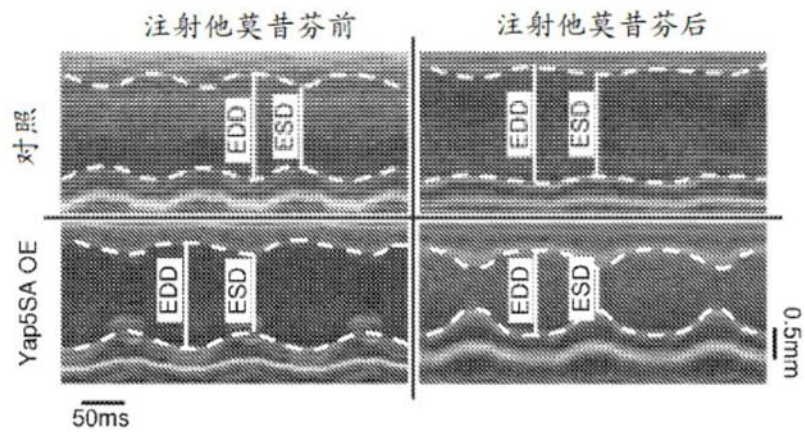


图2F

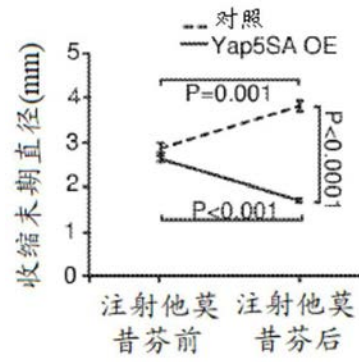


图2G

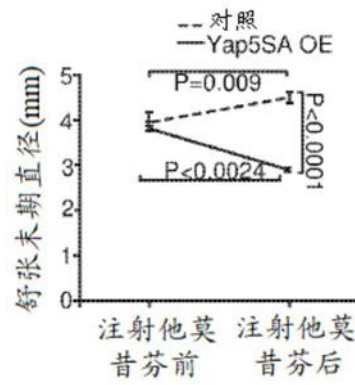


图2H

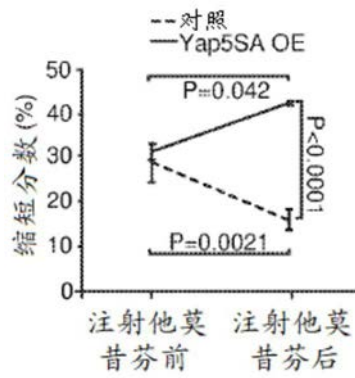


图2I

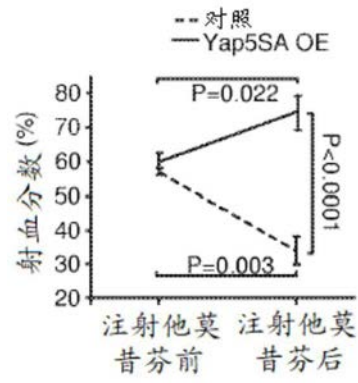


图2J

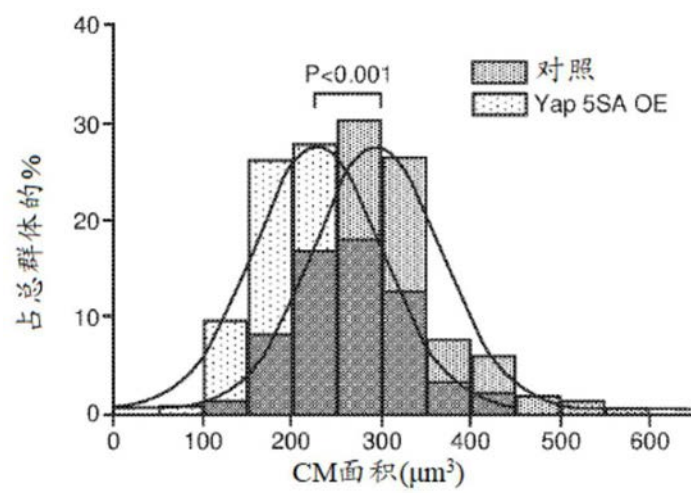


图3A

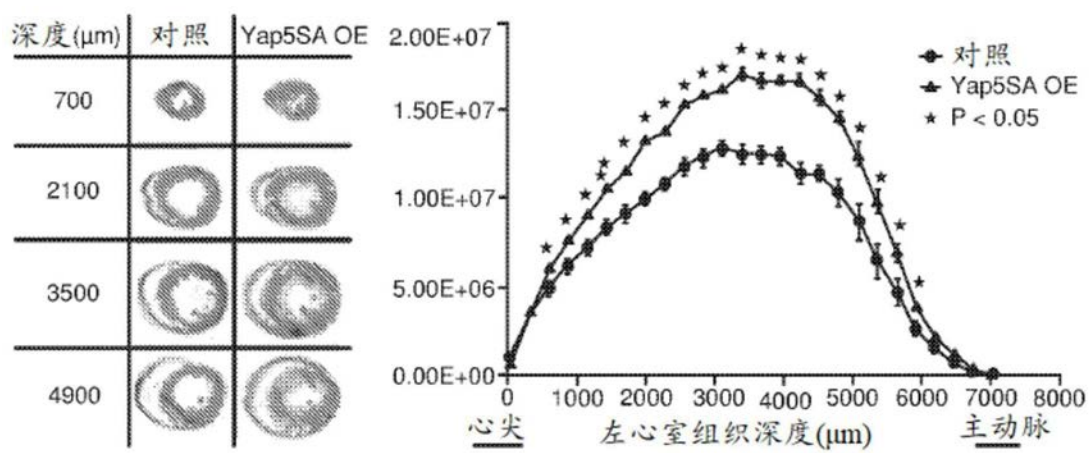


图3B

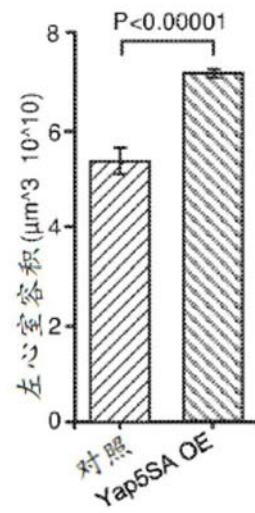


图3C

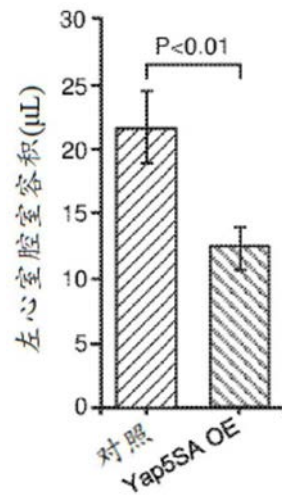


图3D

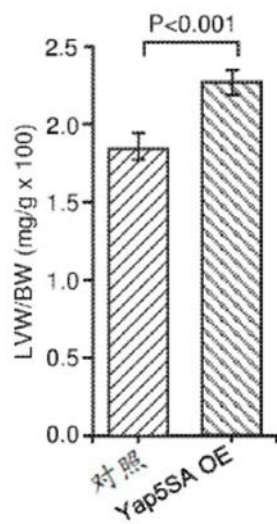


图3E

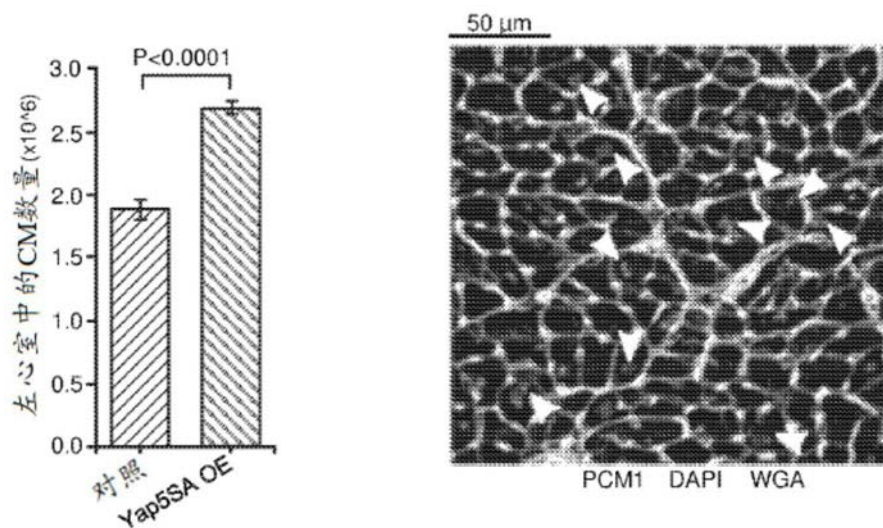


图3F

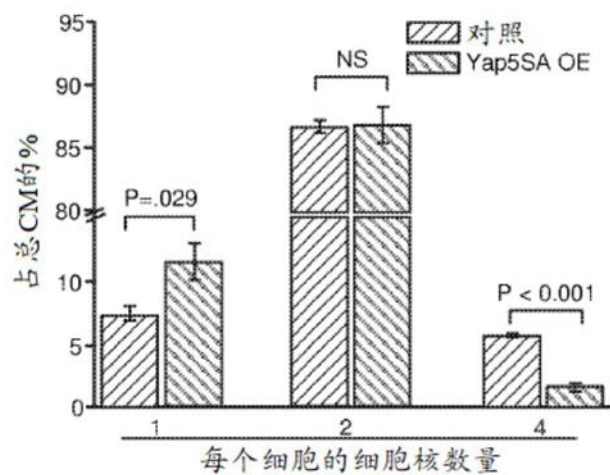


图3G

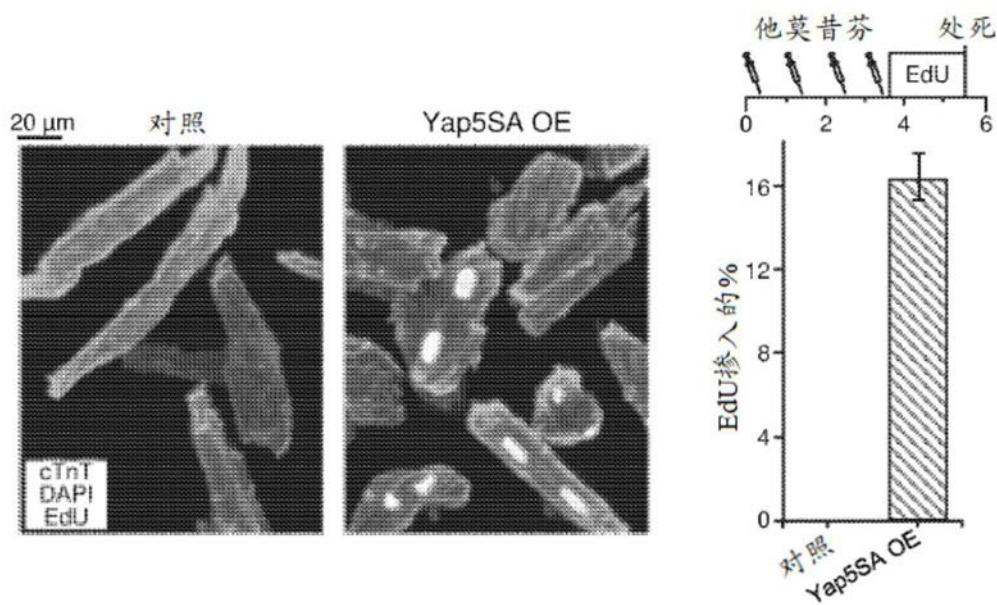


图3H

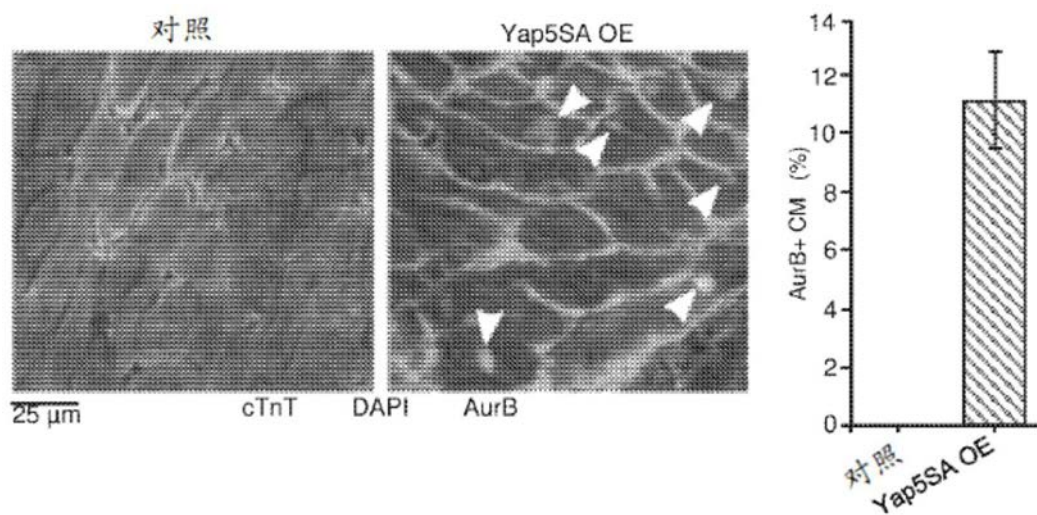


图3I

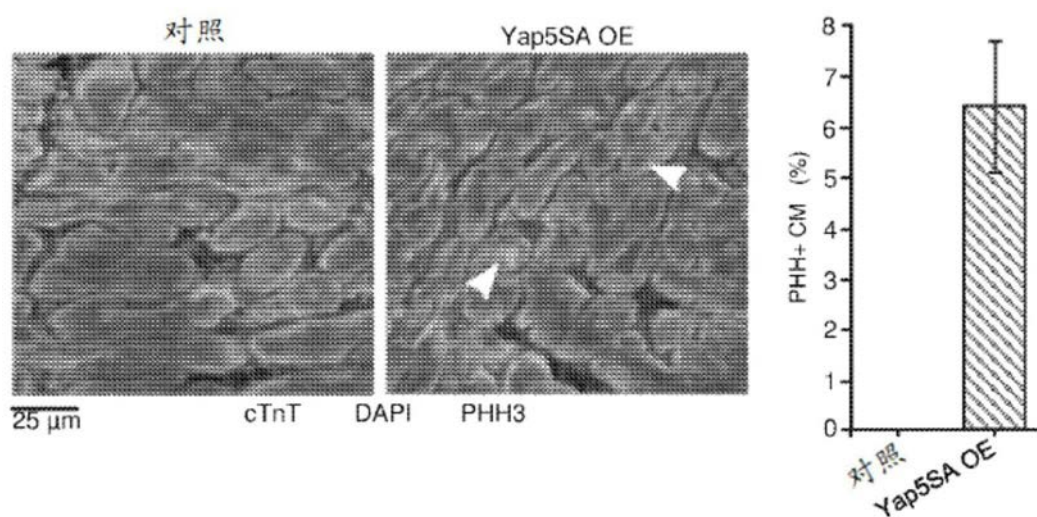


图3J

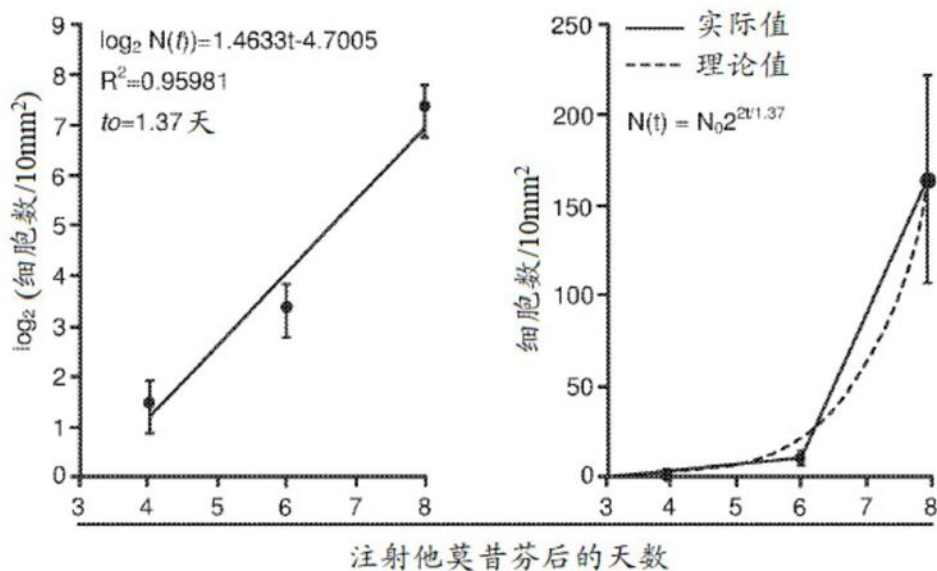


图3K

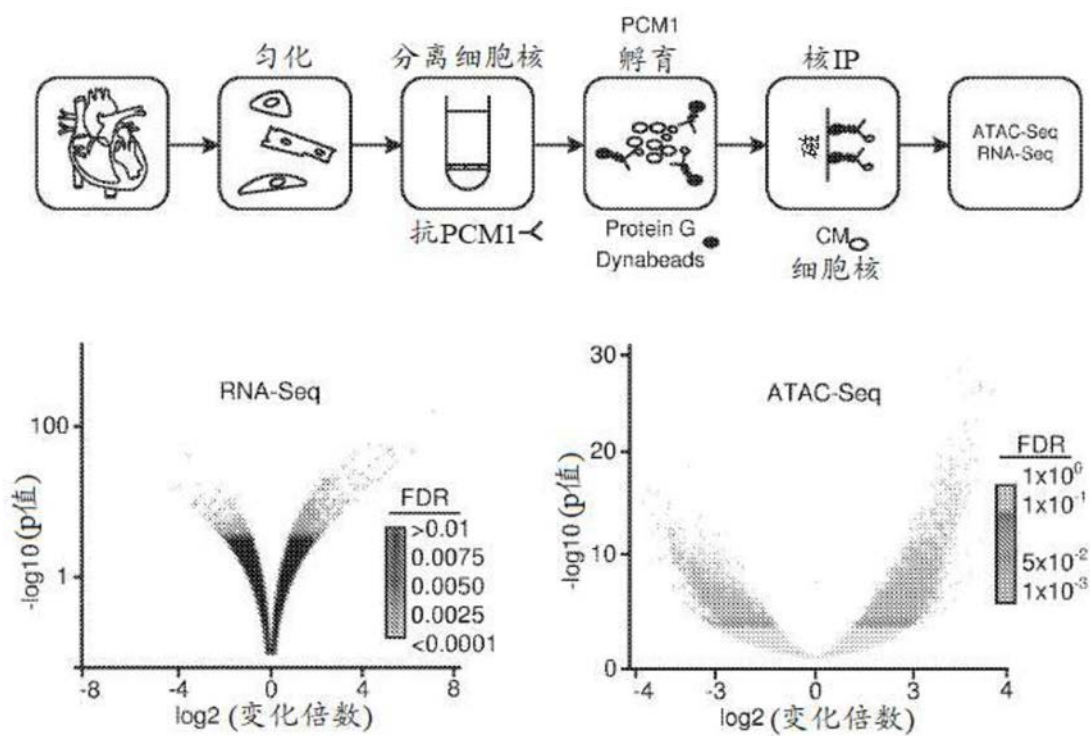


图4A

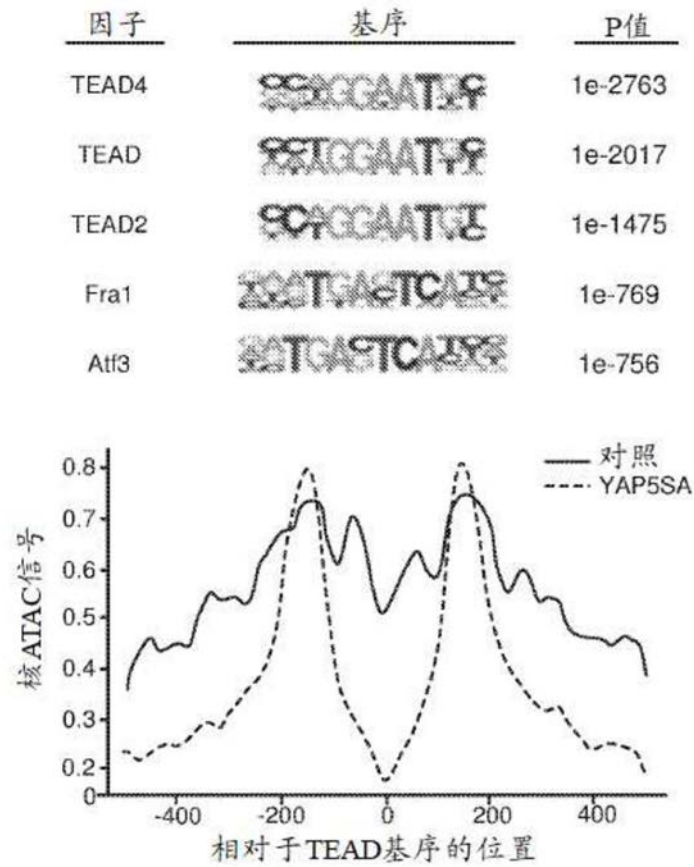


图4B

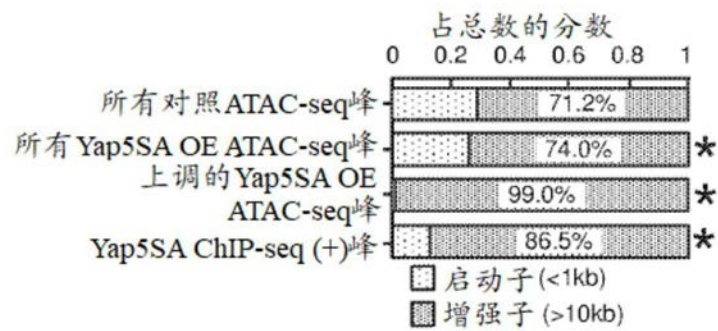


图4C

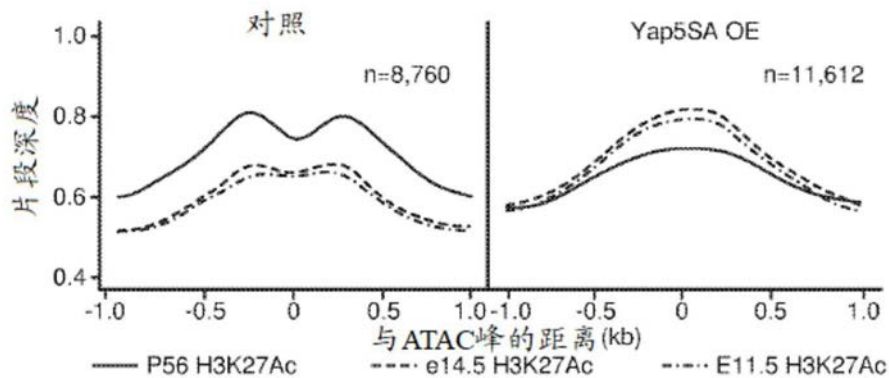


图4D

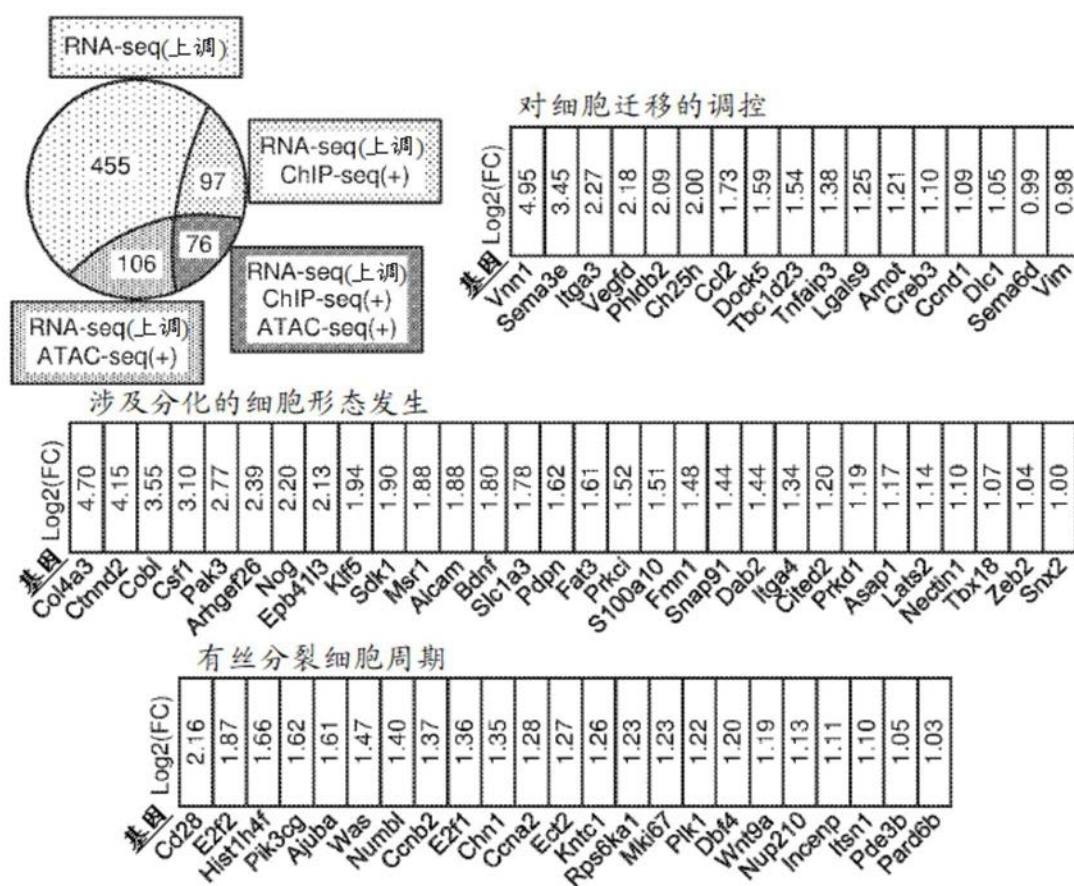


图4E

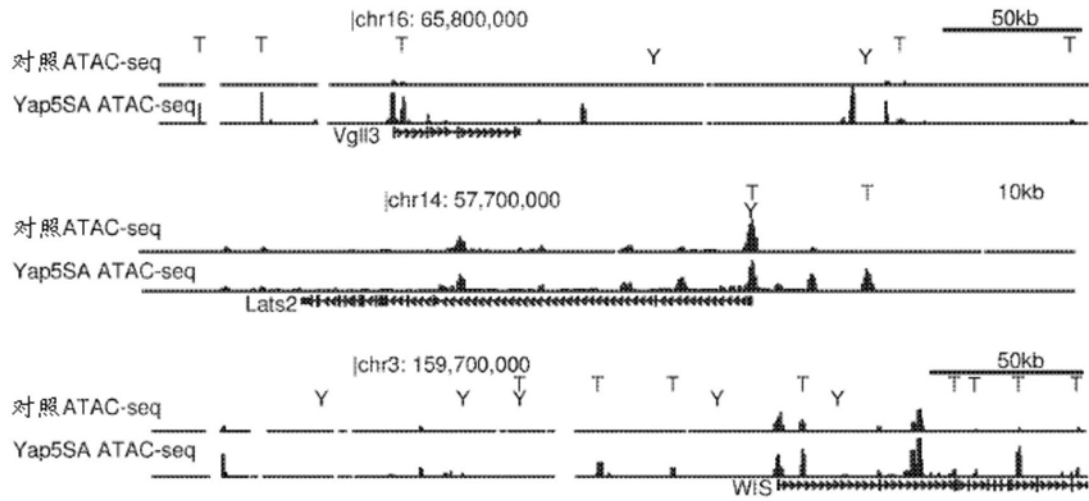


图4F

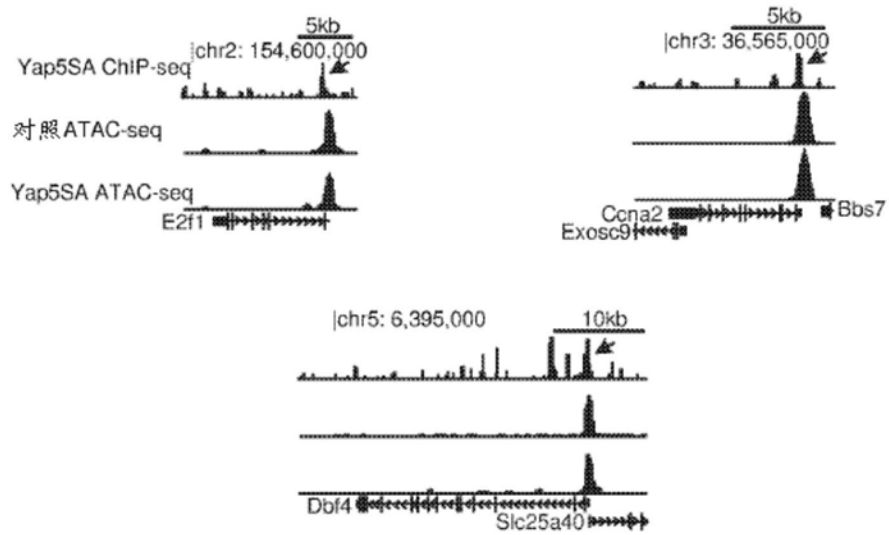


图4G

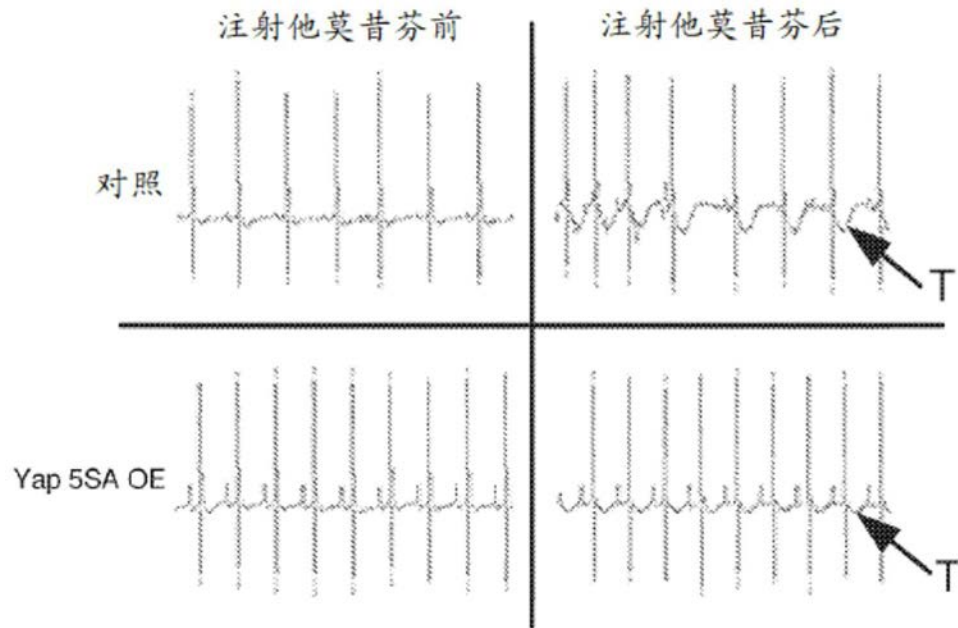


图5A

具有倒置T波的比例

	对照	Yap5SA OE
注射他莫昔芬前	0/3	0/4
注射他莫昔芬后	3/3*	0/4

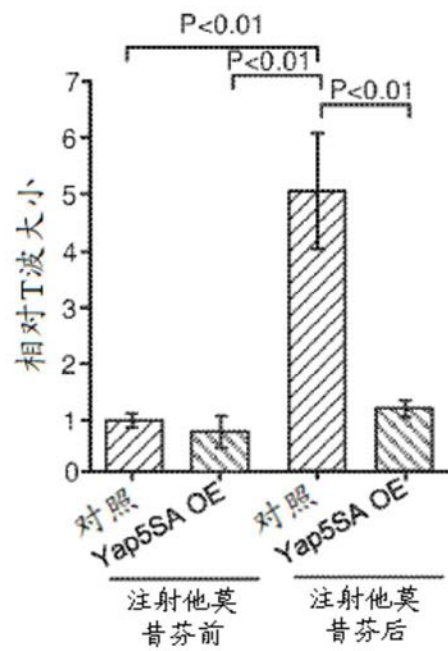


图5B

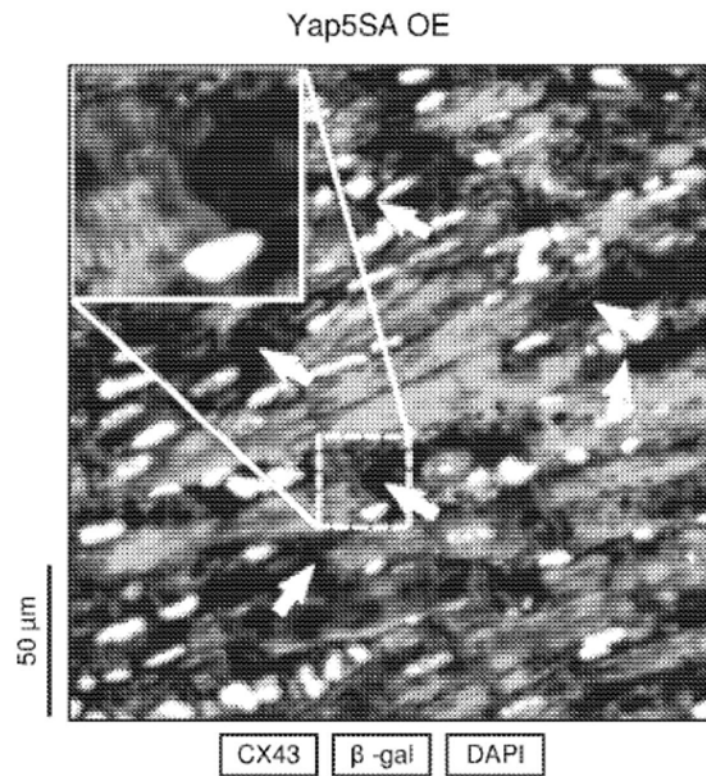


图5C

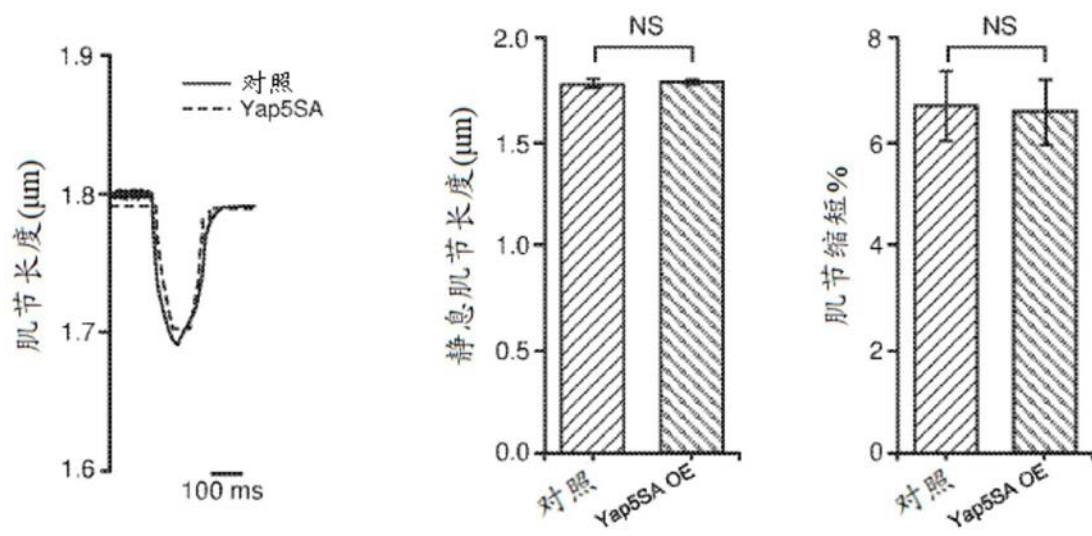


图5D

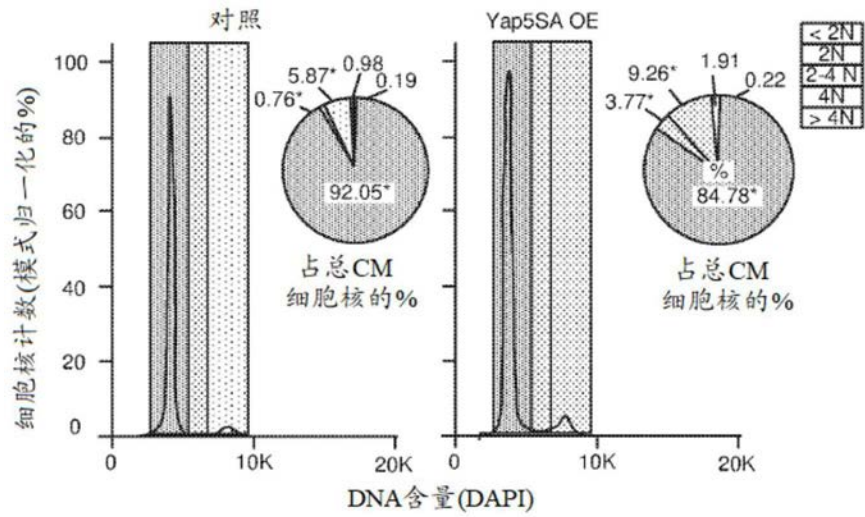


图6A

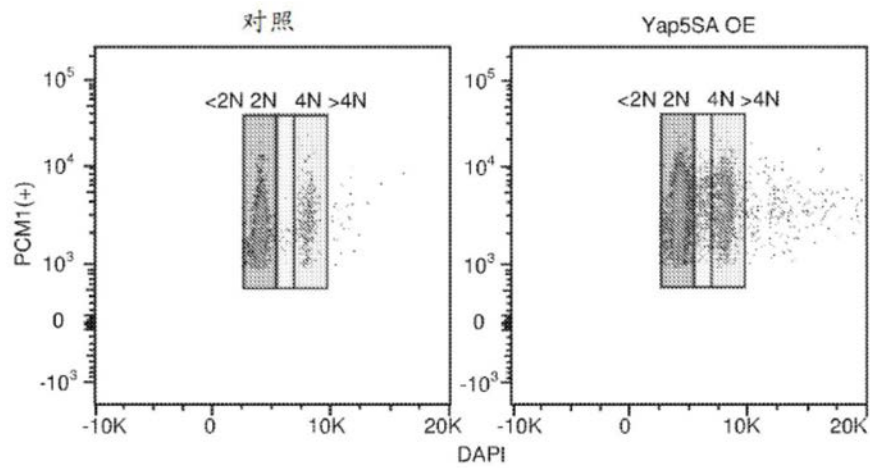


图6B

	<2N的细胞核%	+/-	2N细胞核%	+/-	2-4N细胞核%	+/-	4N细胞核%	+/-	>4N的细胞核%	+/-
对照	0.19	0.01	92.05	0.24	0.76	0.38	5.87	0.04	0.98	0.65
Yap5SA OE	0.22	0.70	84.78	0.46	3.77	0.31	9.26	0.96	1.91	0.62
P	0.63		0.001		0.005		0.005		0.11	

图6C

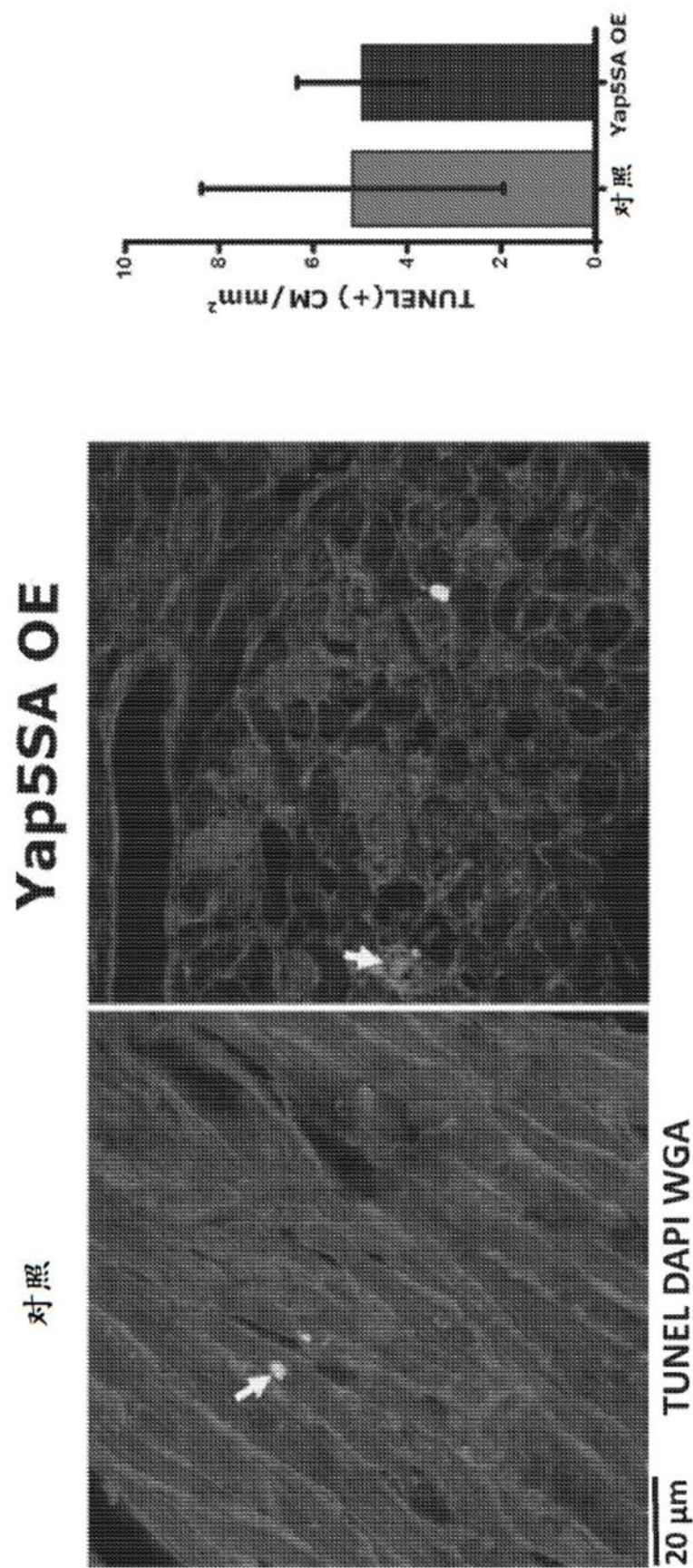


图7

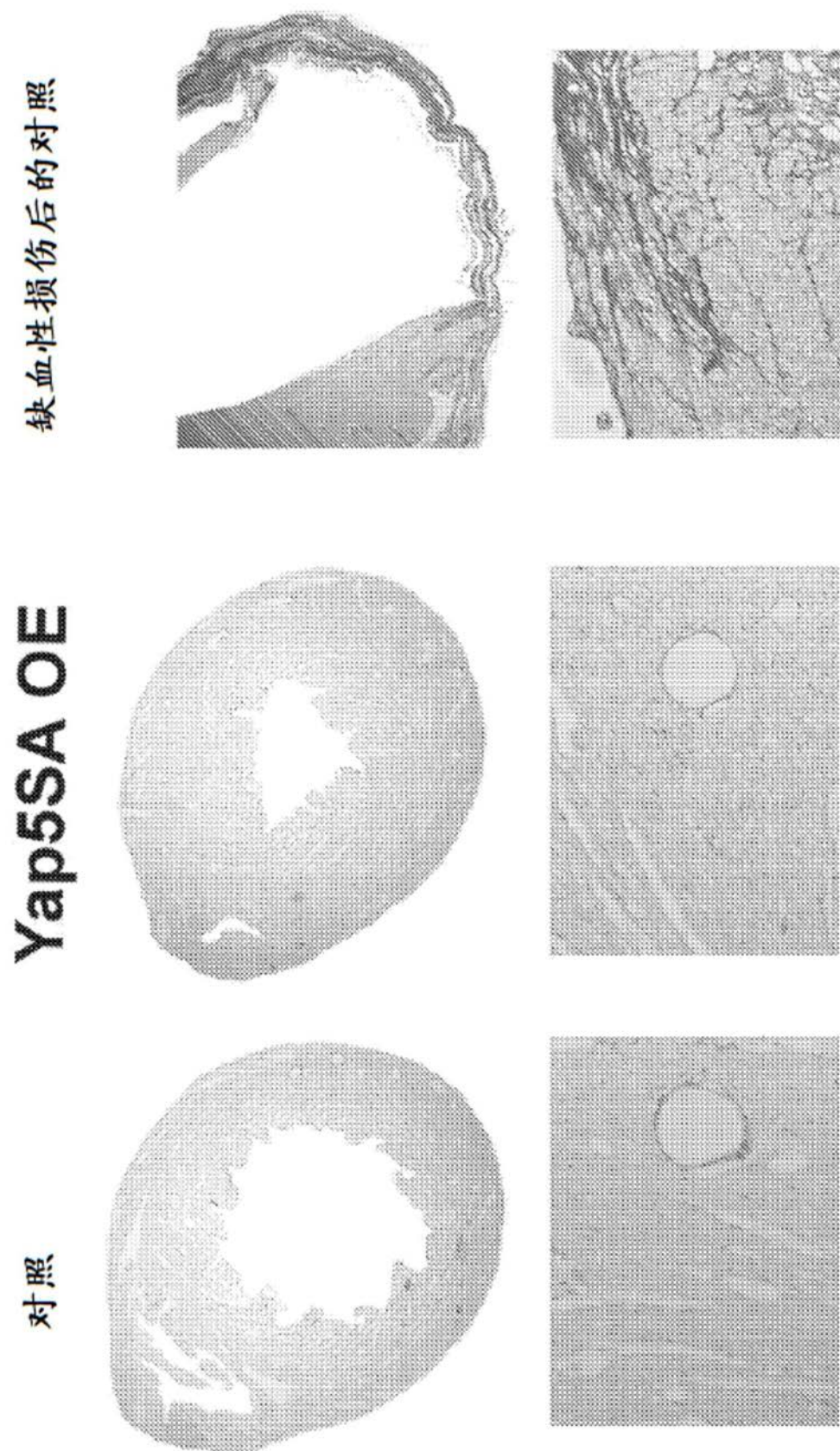


图8

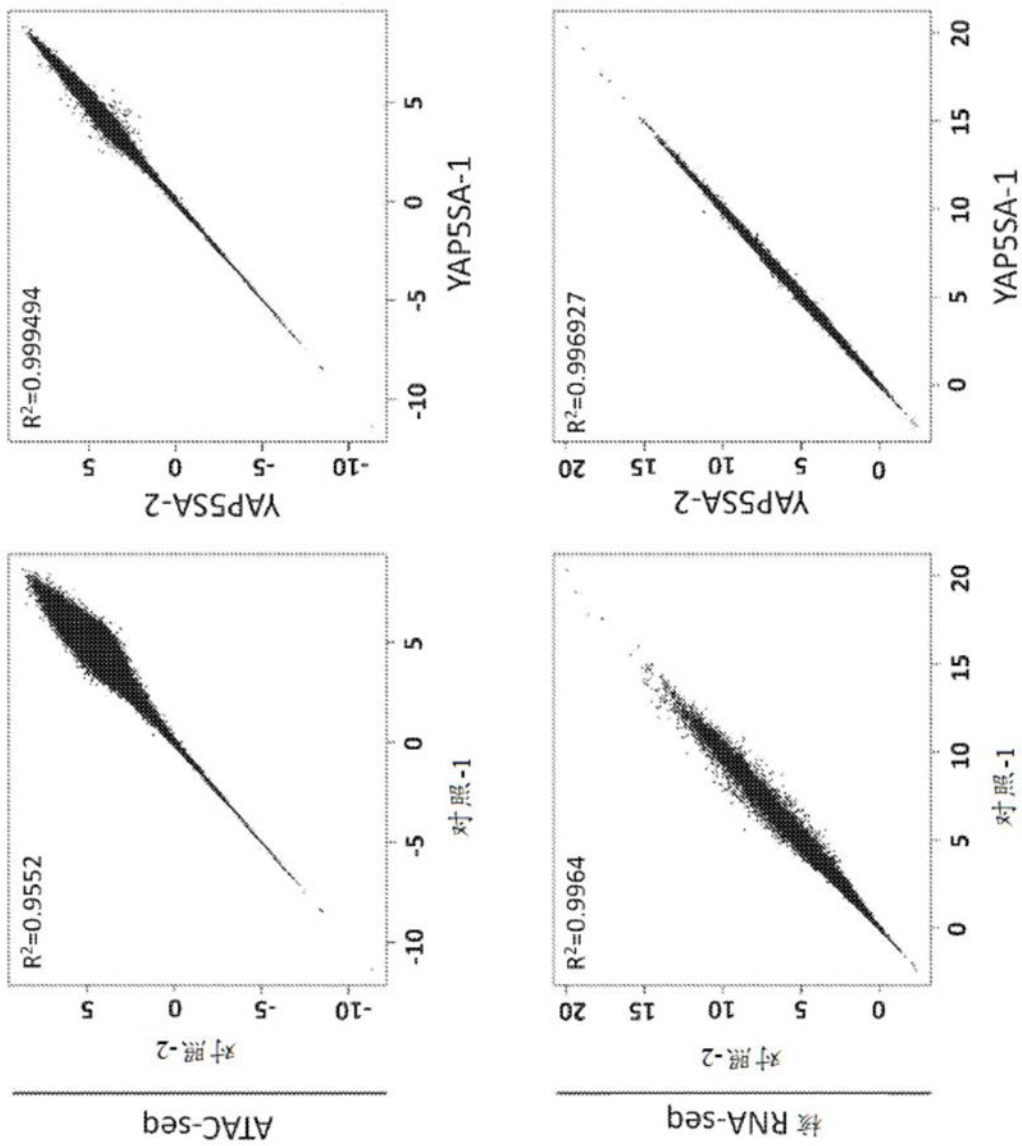


图9

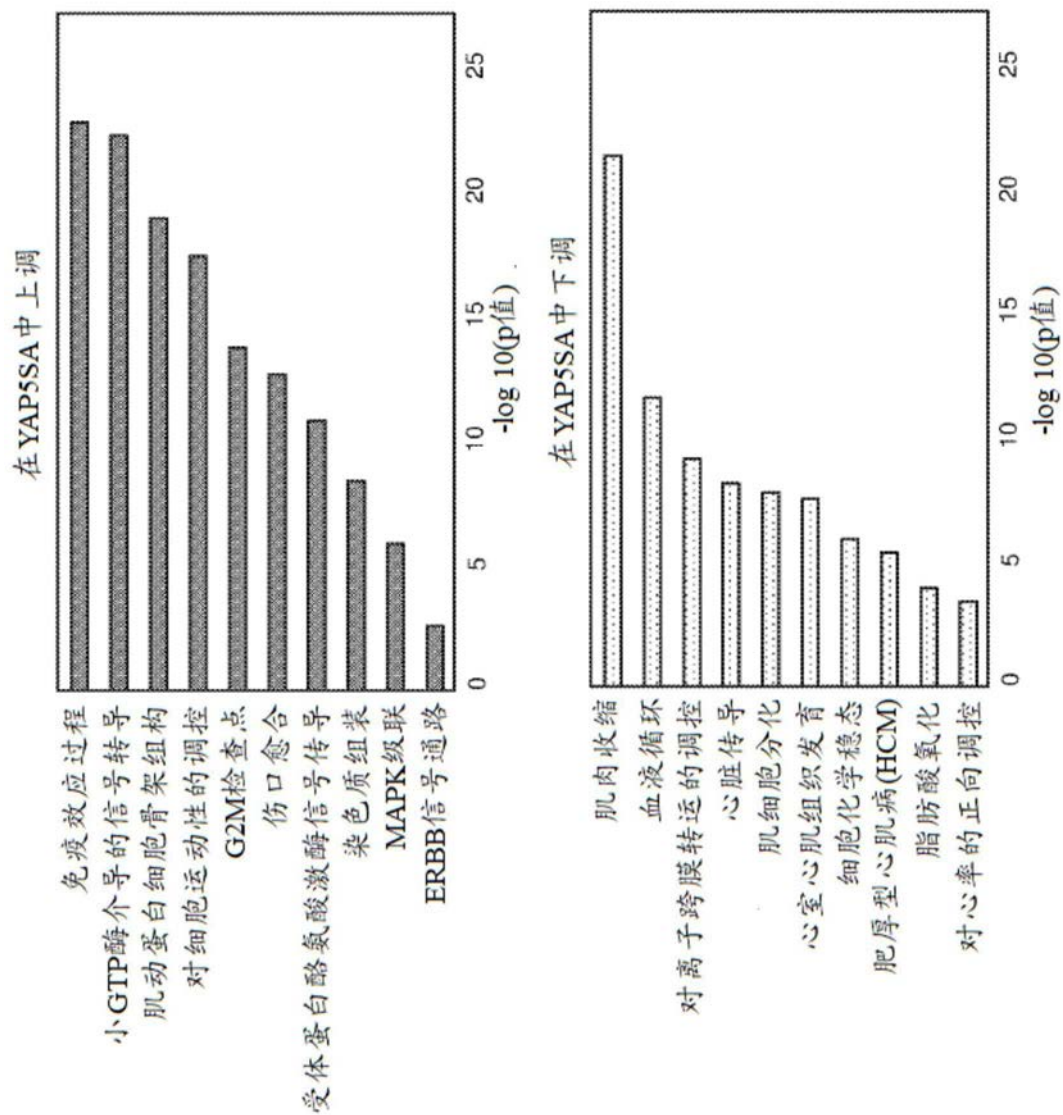


图10A

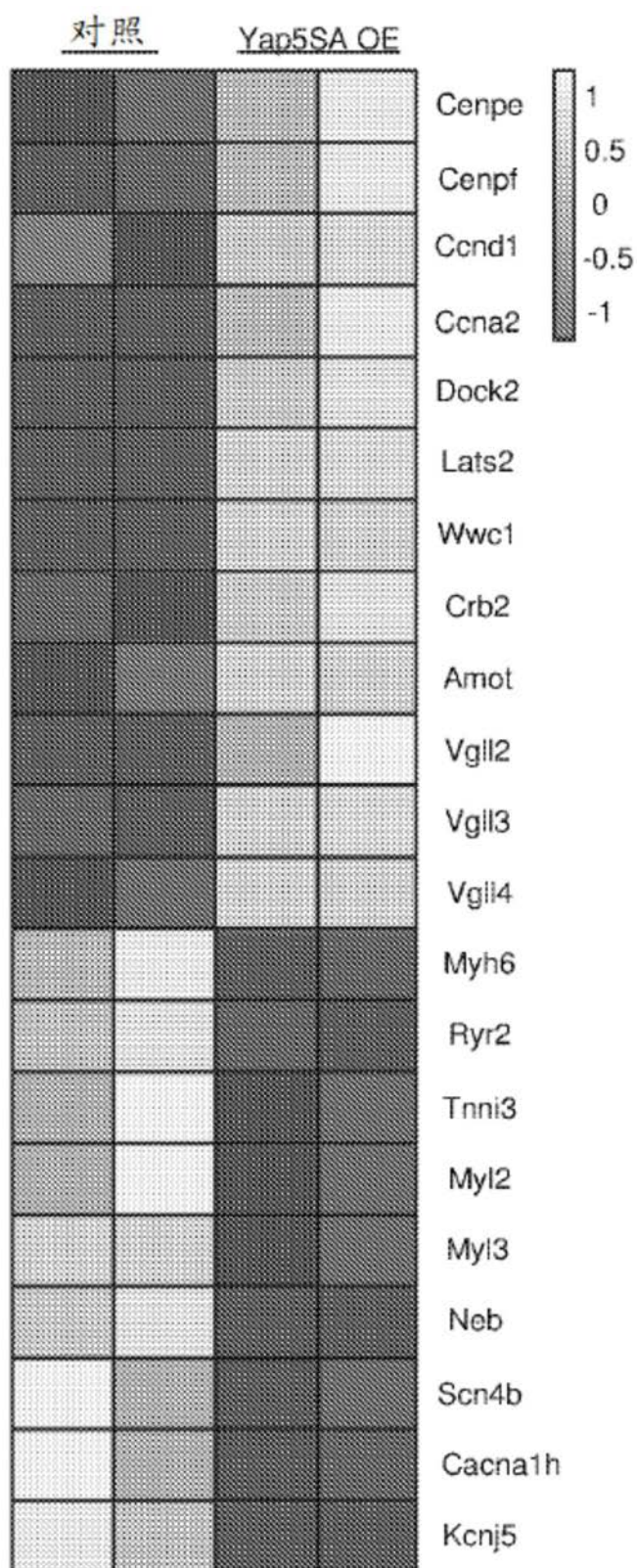


图10B

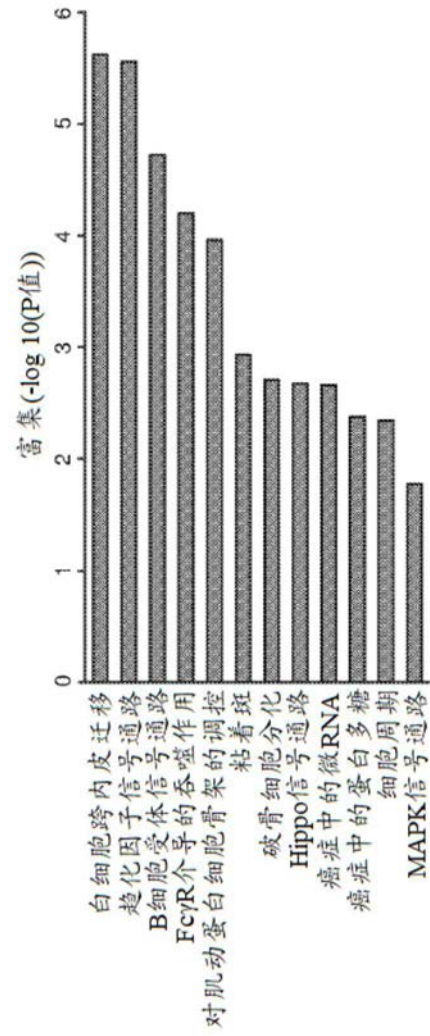


图11A

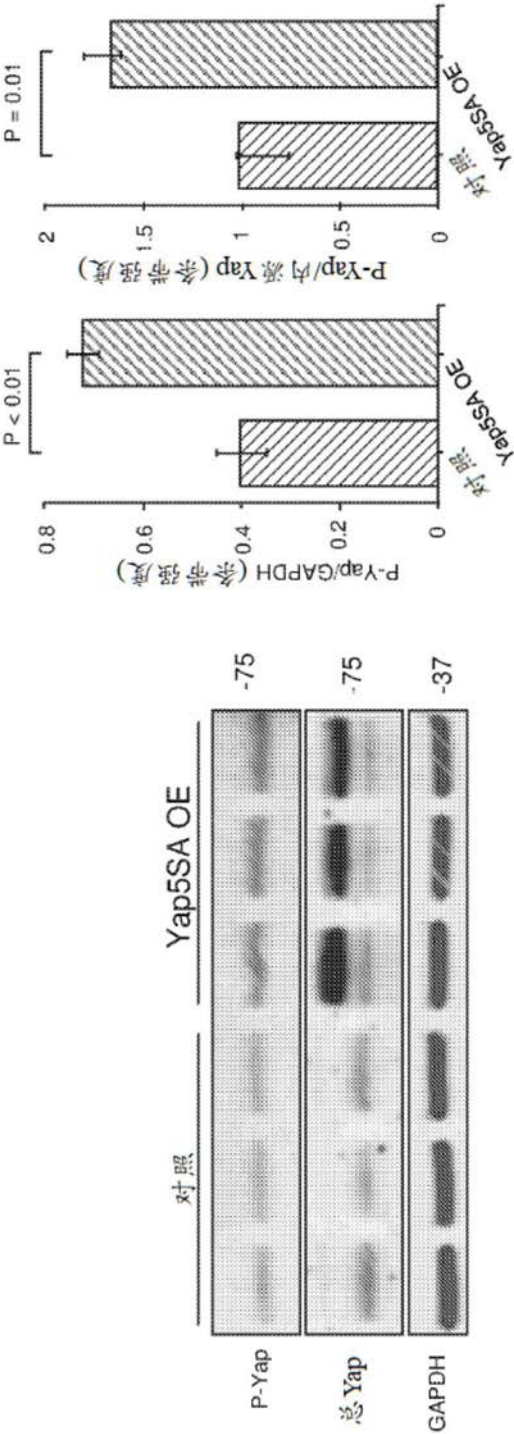


图11B

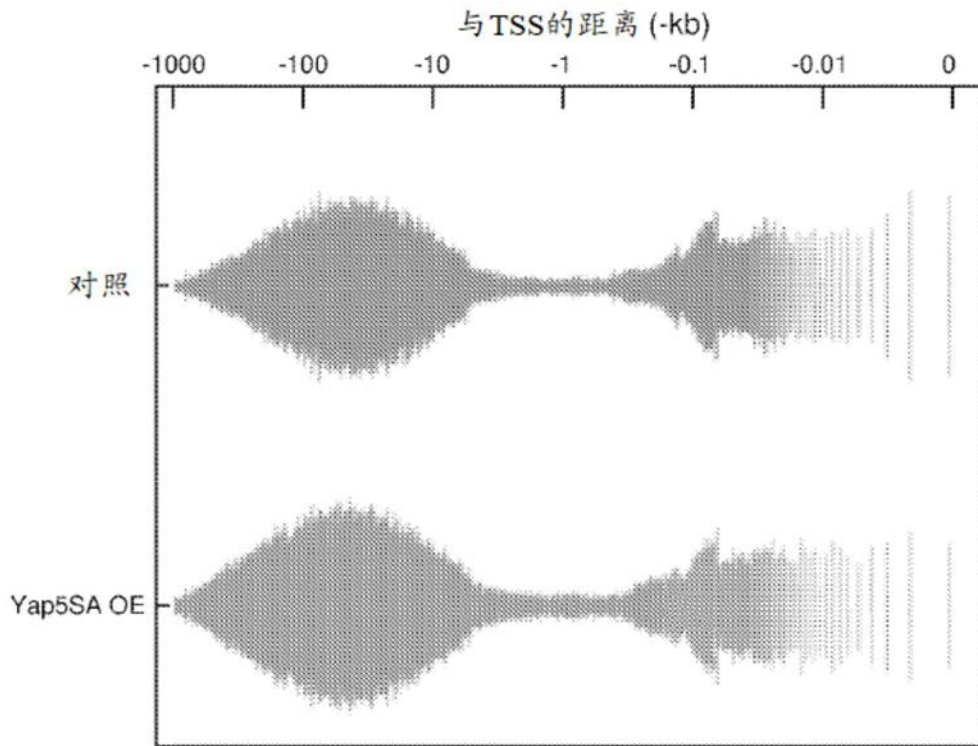


图12A

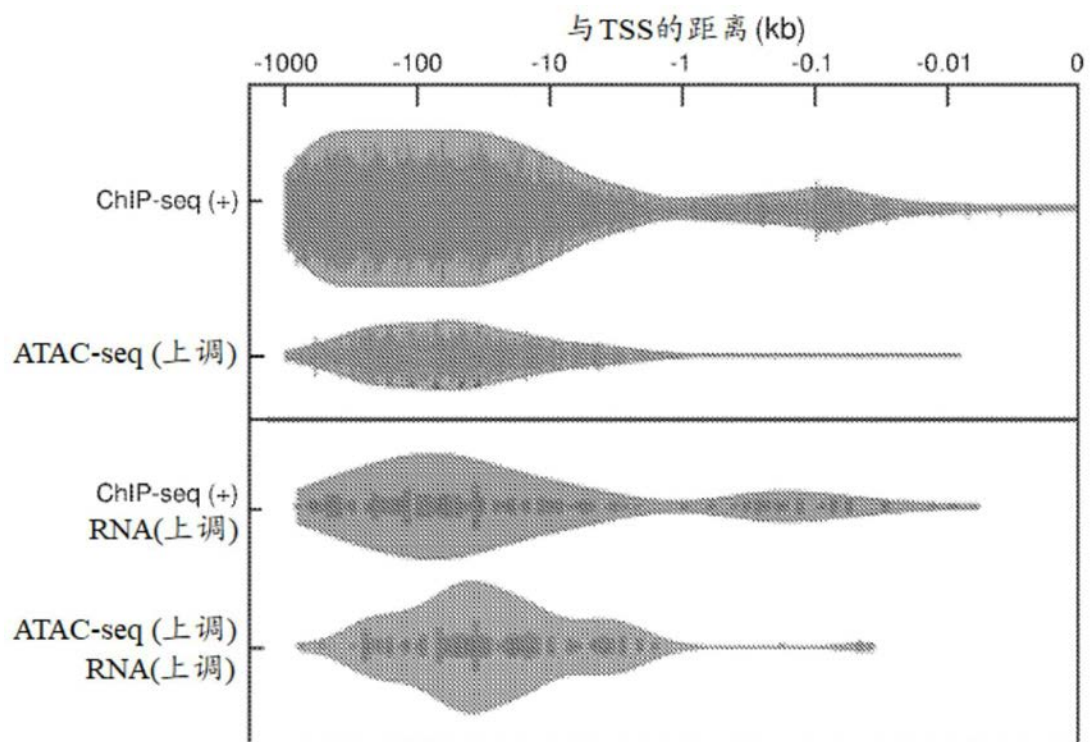


图12B

RNA-seq (上调)、ChIP-seq (+)、ATAC-seq (无变化)

log2(FC)	基因	log2(FC)	调整后的P值	基因	log2(FC)	调整后的P值
0.00	Adams5	2.48	5.98E-19	Dbf4	1.20	1.29E-03
10.00	Tmem97	2.68	1.28E-15	Sulf1	1.05	1.36E-03
	Actn1	1.75	2.55E-12	Pacsin2	0.97	1.73E-03
	Usp31	1.68	9.68E-09	Il17ra	1.33	1.96E-03
	Z310022B05	1.75	3.28E-08	Piezo1	0.95	1.97E-03
	Wsb1	1.58	3.80E-08	Miana	1.90	2.07E-03
	Ajuba	1.61	3.81E-08	Was	1.47	2.11E-03
	Gria3	2.09	3.90E-08	Hes1	1.06	2.71E-03
	Peak1	1.43	4.49E-08	Mhas1	1.00	2.83E-03
	S100a7a	3.05	2.68E-07	Spry2	1.02	2.86E-03
	Prkcz	2.28	3.68E-07	Ryr3	1.68	2.94E-03
	Fcgr1	1.77	1.25E-06	Fzd2	1.28	3.02E-03
	Kcnab2	1.77	1.64E-06	Numb1	1.40	3.13E-03
	Hist1h4f	1.66	1.95E-06	Pard8b	1.03	3.25E-03
	Ret	2.19	3.30E-06	Irsn1	1.10	3.34E-03
	Adgre1	1.55	3.99E-06	Capg	1.18	3.58E-03
	Etfmp1	1.76	7.17E-06	Lacc1	1.33	3.80E-03
	Pik3cg	1.62	1.18E-05	Fam105a	1.33	4.36E-03
	Lyn	1.33	1.20E-05	Sptb	0.98	4.37E-03
	Plod2	1.92	1.51E-05	Incnp	1.11	4.52E-03
	Ms4a7	1.99	1.73E-05	Vnt9a	1.19	4.62E-03
	Cpox	1.44	2.67E-05	Atic	1.03	4.71E-03
	Dock8	1.33	2.82E-05	Aprt	1.10	4.78E-03
	Rras2	1.49	5.06E-05	Kntc1	1.26	4.78E-03
	Clap43	1.36	8.15E-05	Hexb	1.07	4.79E-03
	Chn1	1.35	8.76E-05	Tnfrap6	1.38	4.80E-03
	Basp1	1.61	1.34E-04	Amhr2	1.77	5.07E-03
	Rhobtb3	1.12	1.45E-04	Sic7a2	1.13	5.11E-03
	Phldb3	2.16	1.48E-04	Ifi44	1.87	5.39E-03
	Nhlre1	1.68	1.75E-04	Pik1	1.22	5.69E-03
	Ddb1	1.19	1.76E-04	Map4k3	0.91	5.69E-03
	Ppp1r3a	1.15	1.77E-04	E2f1	1.36	5.69E-03
	Noct	1.09	2.35E-04	Epdr1	1.14	5.70E-03
	Hik3	1.62	2.49E-04	Rcan2	1.38	5.76E-03
	Abca4	1.37	2.52E-04	Bmp2k	0.88	6.31E-03
	Rgna	1.17	2.66E-04	1600014C10	1.14	6.97E-03
	Prep	1.15	3.08E-04	Dusp10	1.35	6.99E-03
	Ifngg2	1.13	4.30E-04	Iqsec1	0.91	7.24E-03
	Mki67	1.23	5.28E-04	P4ha1	1.07	7.27E-03
	Atp8b4	1.47	5.56E-04	Pde3b	1.05	7.79E-03
	E2f2	1.67	5.56E-04	Rap1b	0.68	8.12E-03
	Cd53	1.27	6.75E-04	Fap	1.35	8.25E-03
	Ect2	1.27	6.79E-04	Tarc	1.52	8.82E-03
	Myo1g	1.45	6.98E-04	Nup210	1.13	9.70E-03
	Endod1	1.15	7.66E-04			
	Rock2	0.95	9.05E-04			
	Cd28	2.16	9.73E-04			
	Rps6ka5	1.28	9.93E-04			
	Ccnb2	1.37	1.05E-03			
	Ccna2	1.28	1.06E-03			
	Itih3	1.29	1.09E-03			
	Atp13a3	1.00	1.28E-03			
	Rps6ka1	1.23	1.54E-03			

图13A.1

RNA-seq (上调)、ChIP-seq (-)、ATAC-seq (+)

log2(FC)	基因	log2(FC)	调整后的P值	基因	log2(FC)	调整后的P值
0.00	Pknox2	4.21	3.48E-07	Pvt1	1.79	9.91E-05
10.00	Serpinc6b	5.16	1.20E-49	Tnfrsf3	1.38	1.17E-04
	Tnfrsf15	6.14	1.73E-44	Klrf18	1.26	1.22E-04
	Lrtm2	5.24	1.25E-40	Stard13	1.43	1.34E-04
	Fmpd1	5.40	4.05E-32	Cdc42se2	1.15	1.55E-04
	Tnfrsf18	4.26	4.19E-28	Cacul1	1.16	1.57E-04
	Slc24a3	3.64	3.72E-24	Trpc	1.14	1.58E-04
	Vnn1	4.95	8.58E-23	Lgals9	1.25	2.28E-04
	Krt7	3.95	9.37E-22	Cacnals	2.16	2.47E-04
	Gpc4	2.62	4.23E-21	Sipal13	1.15	2.98E-04
	Ilg3	2.27	5.98E-19	Mras	1.60	3.41E-04
	Prss23	2.46	1.86E-18	A43010511S	1.09	4.21E-04
	Abhd17c	2.37	8.26E-18	Sned1	1.15	4.48E-04
	Dcun1d4	2.46	5.08E-17	Tamm41	1.38	5.23E-04
	Tsk1	2.35	8.58E-17	Mmp39	1.15	5.93E-04
	Morc4	2.73	4.31E-16	1700037HC	1.37	6.70E-04
	Sema3e	3.45	1.26E-15	Dse	1.21	8.24E-04
	Amotl2	1.93	3.24E-15	Dlc1	1.05	1.18E-03
	Rln4r	2.86	6.83E-14	Lpcat2	1.55	1.22E-03
	Plekng2	2.05	2.50E-13	Slc35b4	1.10	1.28E-03
	Cldspi	2.07	2.22E-12	Srx30	1.53	1.58E-03
	Ngtrap1	2.47	2.70E-10	Ergic1	0.99	1.71E-03
	Map6	2.30	3.92E-10	Rrm1	1.10	1.81E-03
	Nhs	2.17	3.81E-08	Capn2	1.10	1.98E-03
	Tbc1d23	1.54	4.78E-08	Lrtm1	1.04	2.08E-03
	Dock5	1.59	7.30E-08	Upk3b	1.48	2.14E-03
	Tmem37	2.76	8.97E-08	Cenpe	1.21	2.21E-03
	Figf	2.18	1.09E-07	Sema6d	0.99	2.42E-03
	Padc1	1.59	1.93E-07	Sh3gl1	1.02	2.47E-03
	Cdc42ep3	1.63	3.22E-07	Gis	0.80	2.71E-03
	Erc2	2.48	9.38E-07	Ube2e1	1.07	2.90E-03
	Hs6st2	1.95	1.11E-06	Cret3	1.10	3.02E-03
	Sdpr	1.59	1.15E-06	Arhgap1	1.21	3.21E-03
	Ube2q1	1.47	1.21E-06	Amot	1.21	3.26E-03
	Insc	2.99	1.20E-06	Sih2	1.11	3.52E-03
	Serpinc5b	1.91	1.29E-06	Cebpl5	1.00	3.65E-03
	Mprp	1.29	1.59E-03	Mv1	1.09	3.77E-03
	Tns3	1.30	1.64E-06	Fam72a	1.76	3.79E-03
	Ccl2	1.73	2.28E-06	Apl3	1.94	3.80E-03
	Mbp	1.89	3.66E-06	Irf2	1.17	3.82E-03
	Slc7a8	1.91	5.65E-06	Dram1	1.25	4.34E-03
	Arl5a	1.31	6.07E-06	Cacnb4	1.41	4.79E-03
	Gm4841	2.81	6.34E-06	Fam134b	0.67	5.07E-03
	Phldb2	2.09	7.42E-06	A330016K0	1.81	5.35E-03
	Prep	1.42	7.65E-06	Vim	0.98	6.10E-03
	Rnd3	1.38	8.16E-06	Zdhc14	1.06	6.83E-03
	Fgfr1	1.57	8.66E-06	Ras11a	1.47	6.99E-03
	Adams13	1.51	1.31E-05	Lig1	1.05	7.16E-03
	Vgll4	1.36	2.70E-05	A1467506	1.71	7.23E-03
	Spg20	1.21	3.15E-05	Rprd1a	1.04	7.63E-03
	Acp4	2.13	4.64E-05	Nuak2	1.05	7.82E-03
	Ch25h	2.00	7.04E-05	Ccnd1	1.09	8.45E-03
	Ddr1	1.22	8.60E-05	Bank1	1.71	8.82E+00

图13A.2

RNA-seq (上调)、ChIP-seq (-)、ATAC-seq (+)

log2(FC)	基因	log2(FC)	调整后的P值	基因	log2(FC)	调整后的P值
0.00	Cemip	7.03	2.24E-159	Snap91	1.44	1.71E-03
10.00	Col4a3	4.70	1.45E-54	Bdnf	1.80	2.13E-03
	Col4a4	3.88	1.47E-54	Nog	2.20	2.42E-03
	Cobl	3.55	1.38E-37	C1galt1	0.86	2.60E-03
	Vhwc1	4.80	6.50E-36	Ccdc71l	1.08	2.64E-03
	Csf1	3.10	3.68E-27	Secisbp2l	0.92	2.79E-03
	Ahrgef18	3.89	1.37E-21	Rbms3	0.95	3.13E-03
	Kihdc8a	2.82	1.54E-19	Zfx3	0.91	3.31E-03
	Ctnd2	4.15	2.27E-19	Mtss1	1.13	3.32E-03
	Ii23r	4.39	1.98E-17	Fndc1	0.97	3.61E-03
	Ildr2	2.57	1.07E-16	Cnn3	1.09	4.00E-03
	Plekha7	2.40	9.16E-16	Prickle1	1.01	4.05E-03
	Igf2p2	4.14	5.85E-15	Snx2	1.00	4.13E-03
	Gng12	2.17	1.07E-13	Veph1	2.06	4.57E-03
	Ahrgef26	2.39	1.07E-13	Prkd1	2.08	4.57E-03
	Ctsc	1.85	6.71E-11	Sptan1	0.85	7.18E-03
	Adcy8	2.60	1.08E-09	Tbx18	1.07	7.34E-03
	Eph4l13	2.13	1.67E-09	Atp10a	1.15	7.34E-03
	Pak3	2.77	2.24E-09	Dcbld2	0.83	7.48E-03
	Vgll3	1.76	3.05E-09	Ankrd44	0.96	7.56E-03
	Pgrmc2	1.68	6.33E-08	Vgll2	1.95	8.09E-03
	Dab2	1.44	1.00E-07	Fat3	1.61	9.04E-03
	Sic1a3	1.78	1.96E-07	Pyr11	1.10	9.05E-03
	1180002N15	2.45	3.37E-07			
	Fam178a	1.43	3.38E-07			
	Nav3	1.51	3.65E-07			
	Msr1	1.88	3.95E-07			
	Crim1	1.59	5.64E-07			
	Prkci	1.52	1.05E-06			
	Alcam	1.88	2.26E-06			
	Ptchd4	2.72	3.16E-06			
	Htra1	1.75	3.55E-06			
	Fmn1	1.48	3.89E-06			
	Frmf4a	1.48	8.35E-06			
	Tmsb10	1.40	1.26E-05			
	Pdpn	1.62	1.30E-05			
	Cpne2	1.70	1.87E-05			
	Asap1	1.17	4.35E-05			
	Lats2	1.14	5.11E-05			
	Scik1	1.90	5.49E-05			
	Amt2	2.10	1.08E-04			
	Snx7	1.30	1.68E-04			
	Txnec5	1.13	3.14E-04			
	Pappa	1.26	5.36E-04			
	Irgb6	1.69	5.44E-04			
	S100a10	1.51	5.45E-04			
	Cited2	1.20	5.63E-04			
	Mme	1.48	6.91E-04			
	Iiga4	1.34	8.24E-04			
	Wis	1.10	9.03E-04			
	Klf5	1.94	1.24E-03			
	Zeb2	1.04	1.58E-03			
	Spc24	1.54	1.63E-03			

图13A.3

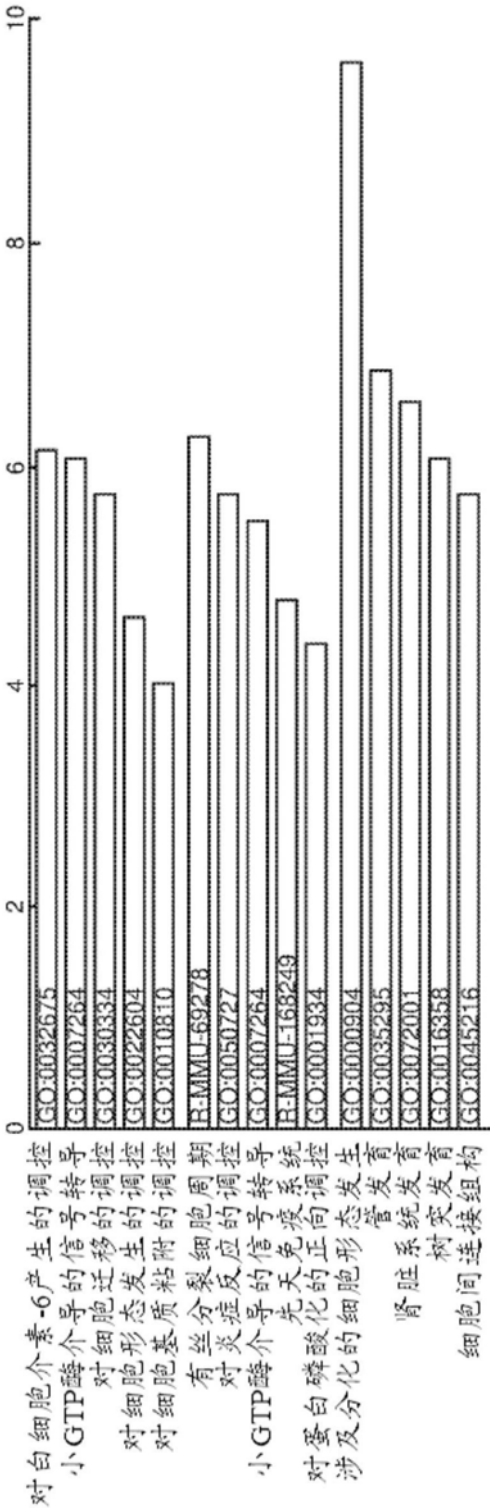


图13B

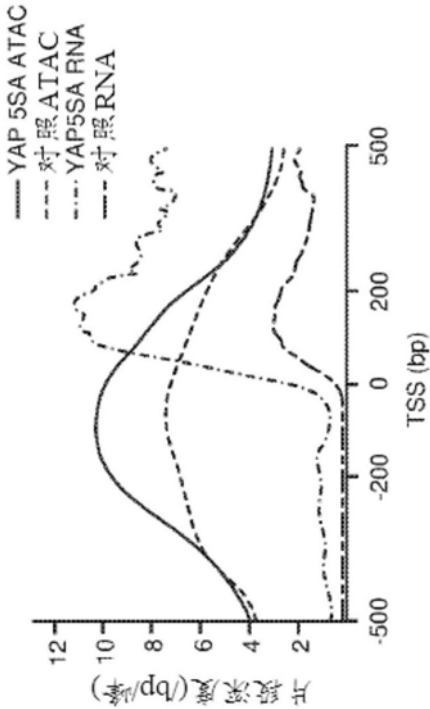


图13C

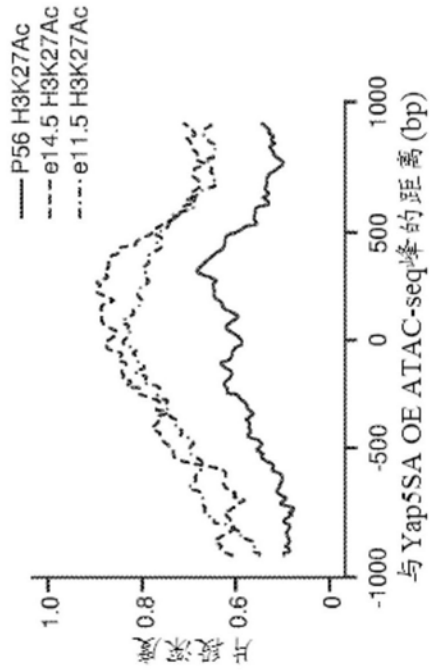


图13D

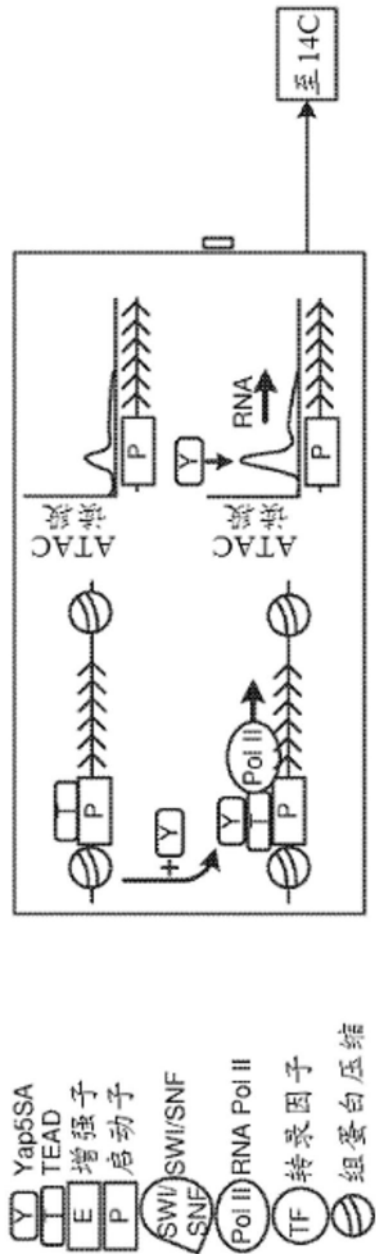


图14A

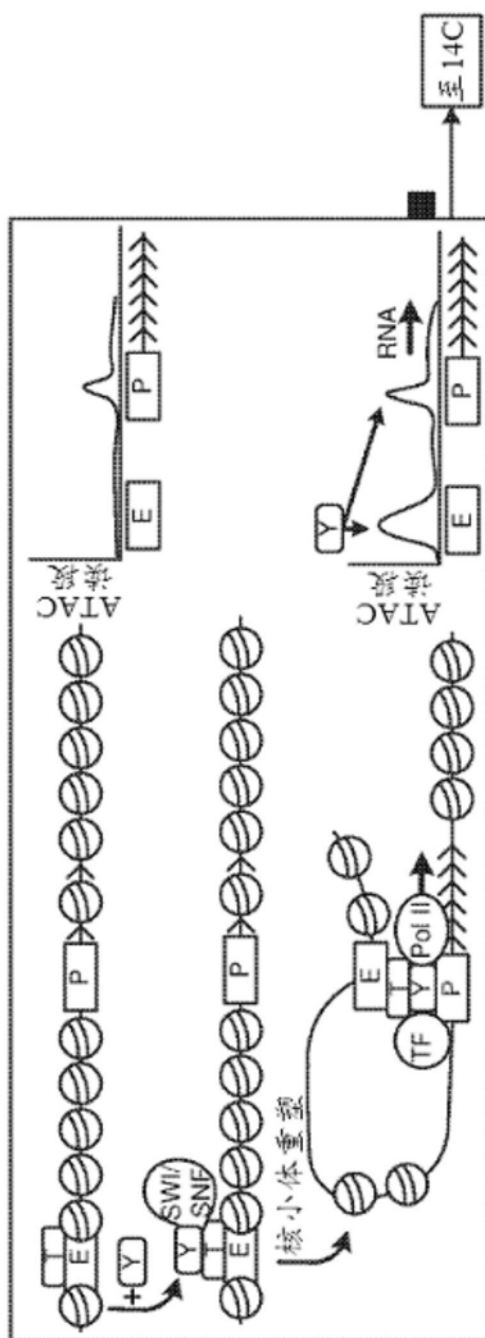


图14B

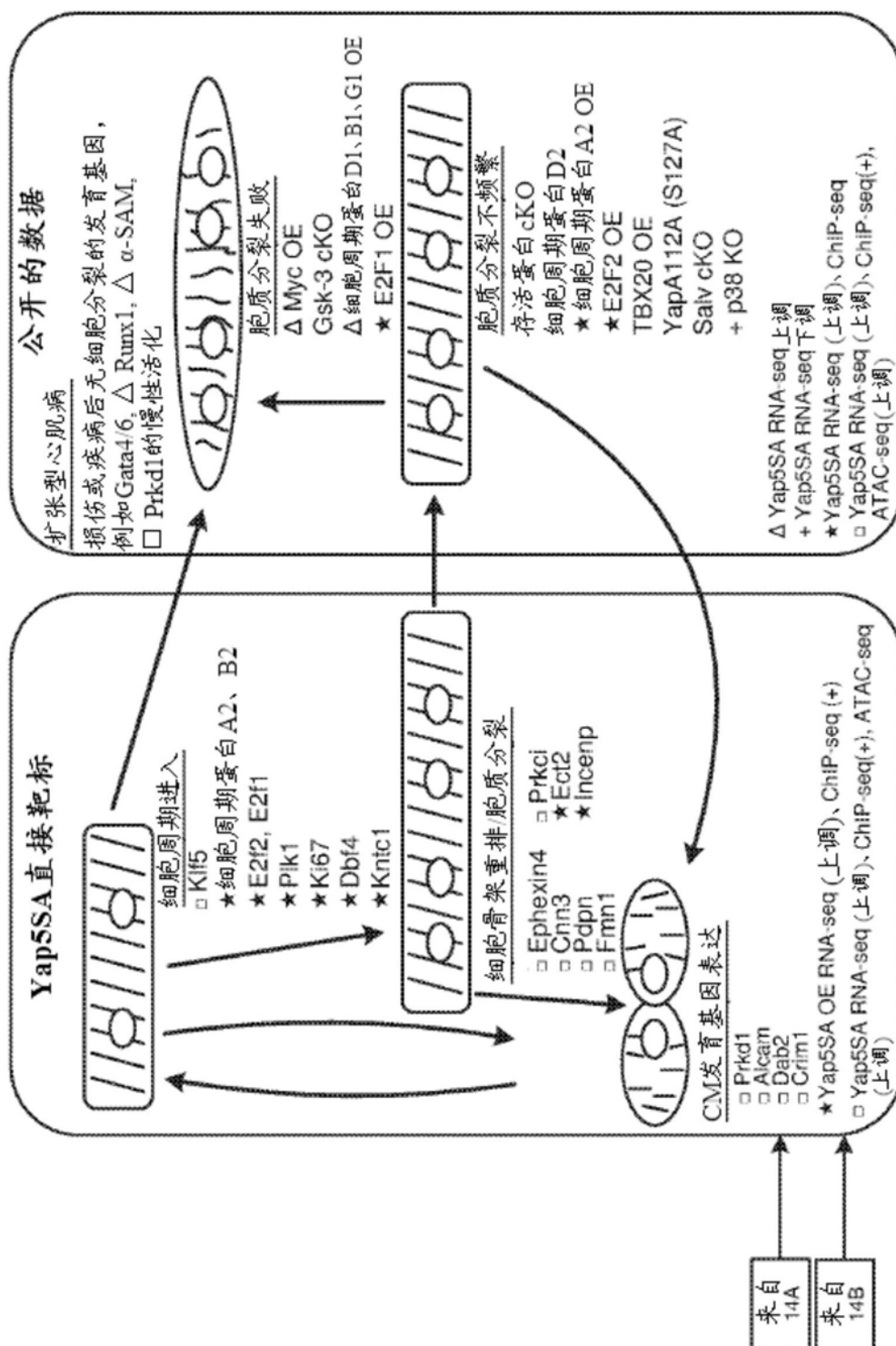


图14C

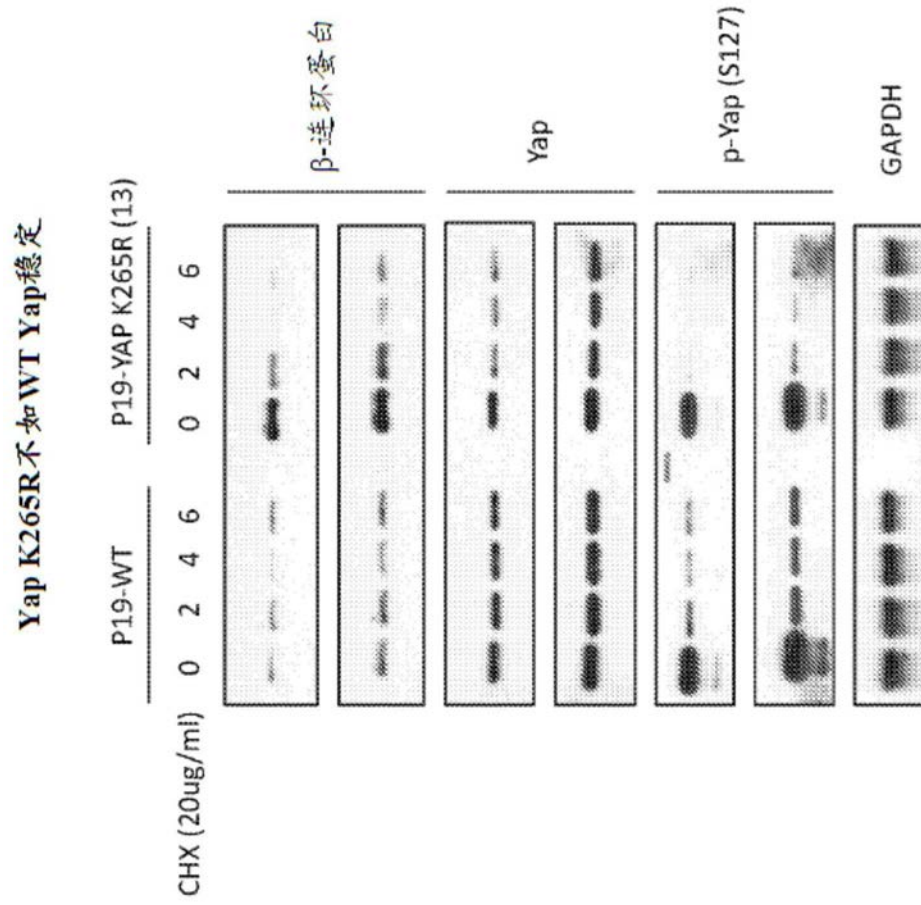


图15A

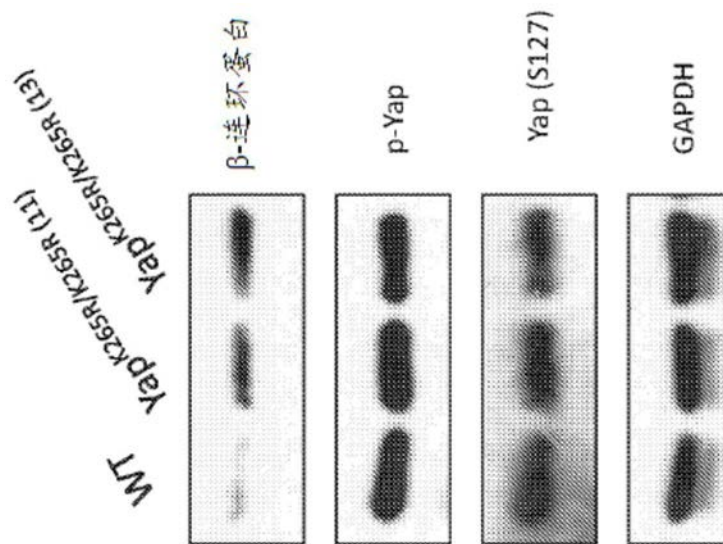


图15B

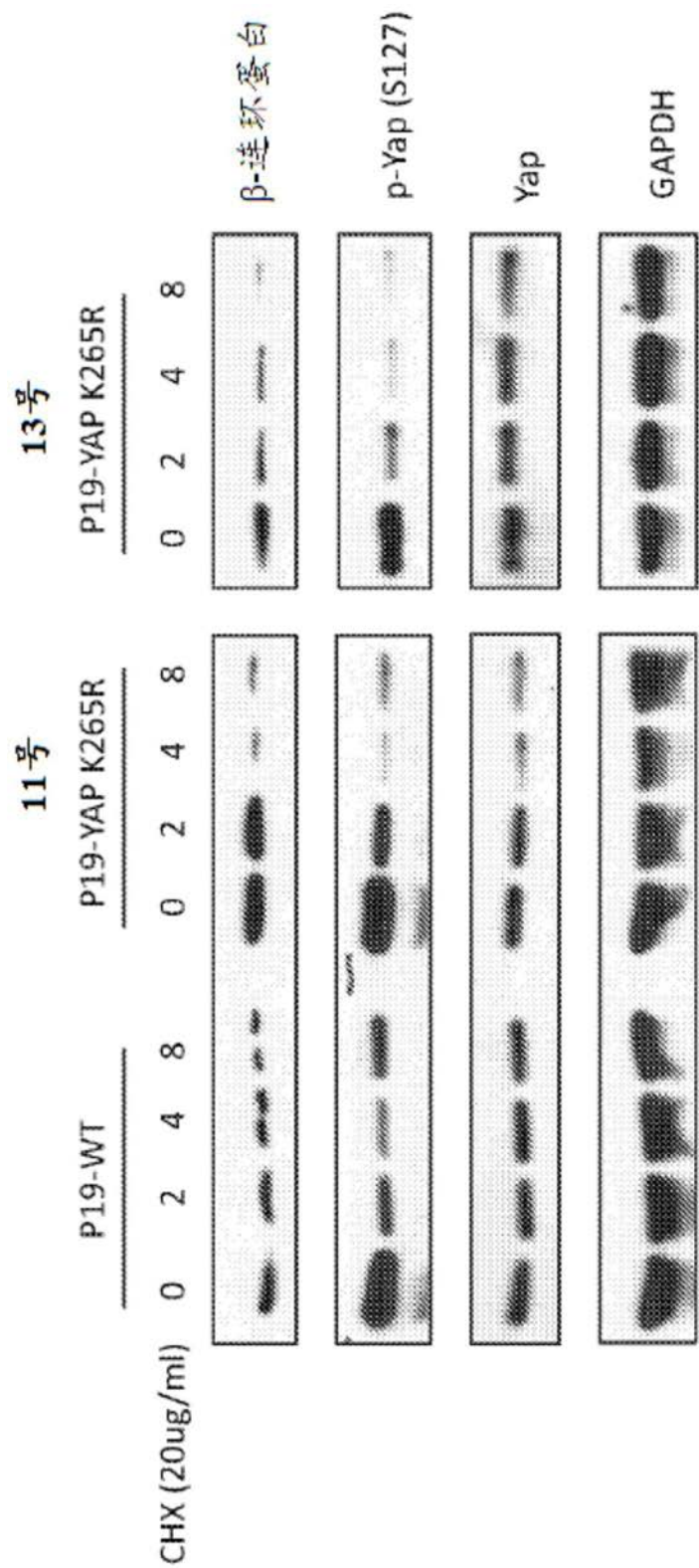


图16

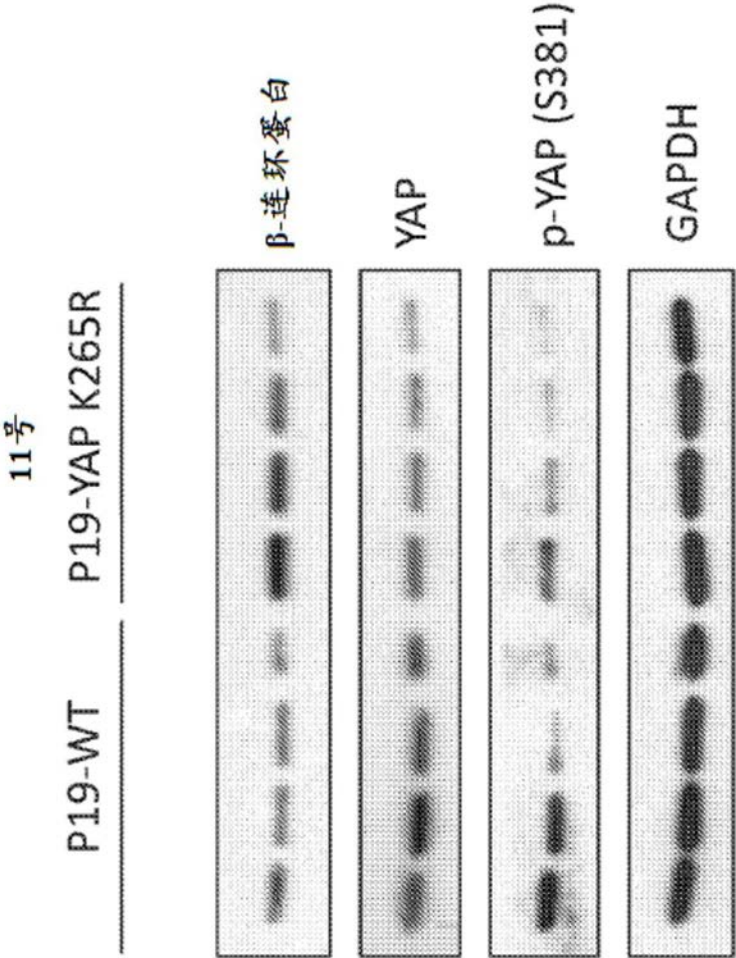


图17A

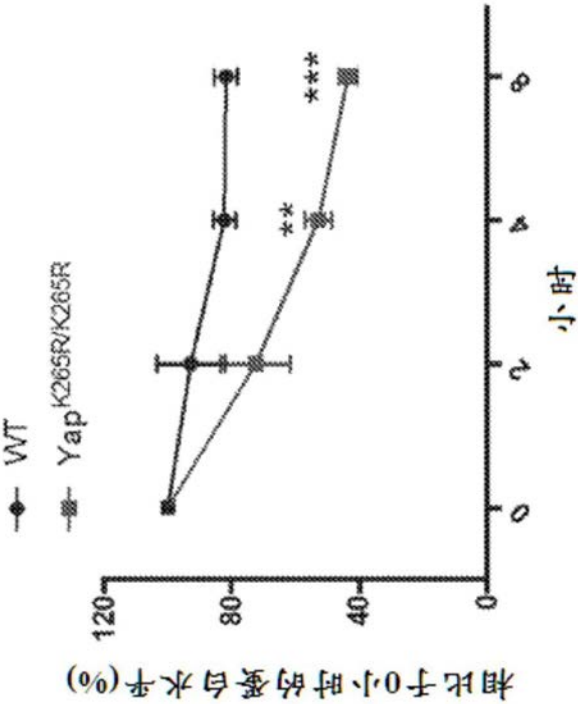


图17B

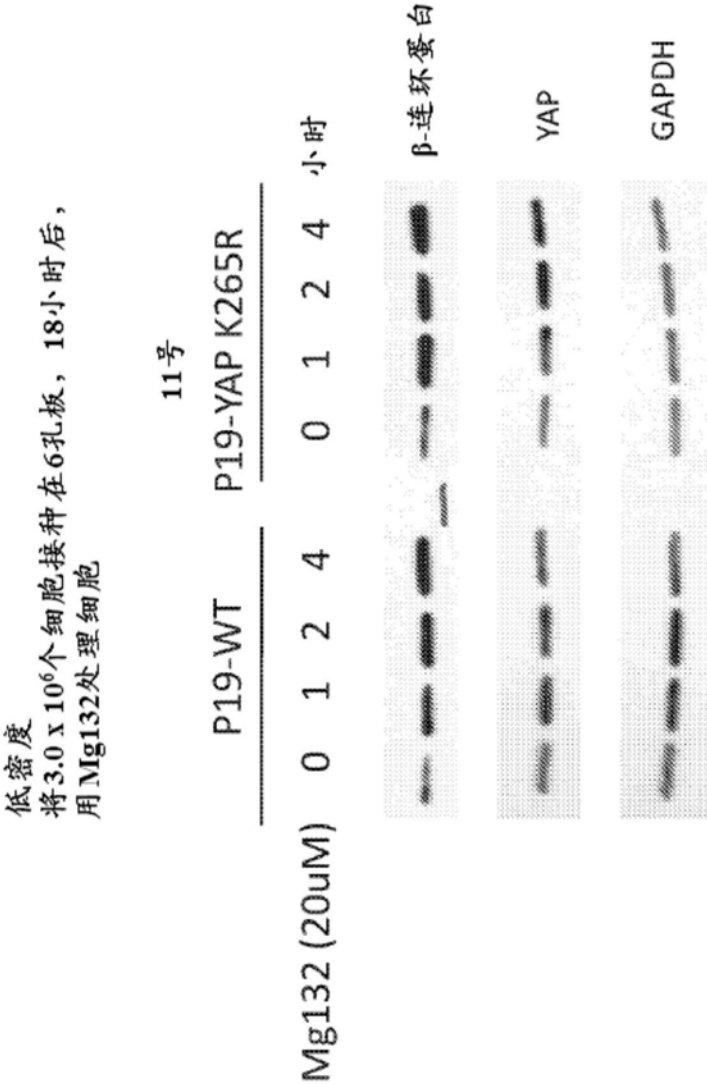


图18A

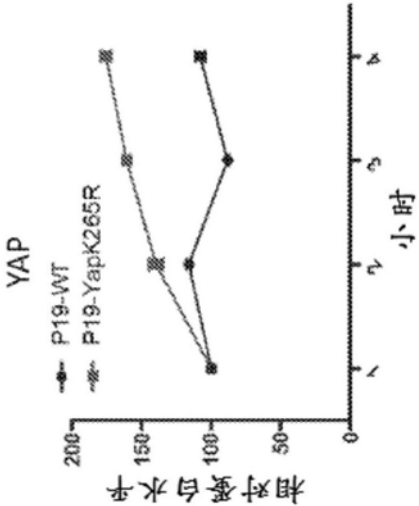


图18B

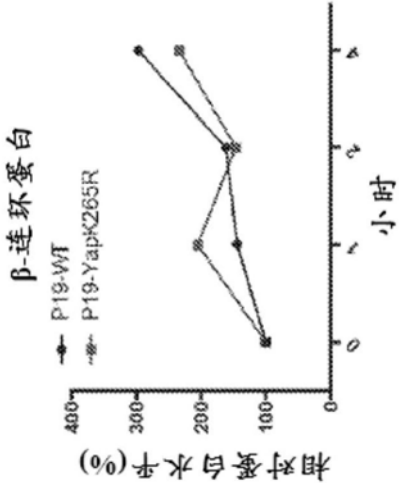


图18C

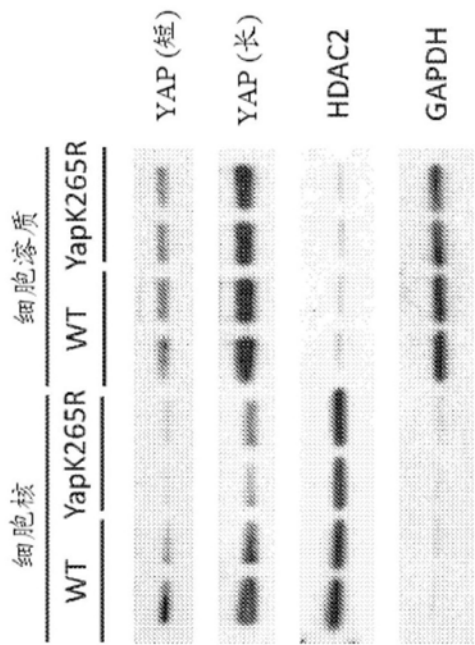


图19A

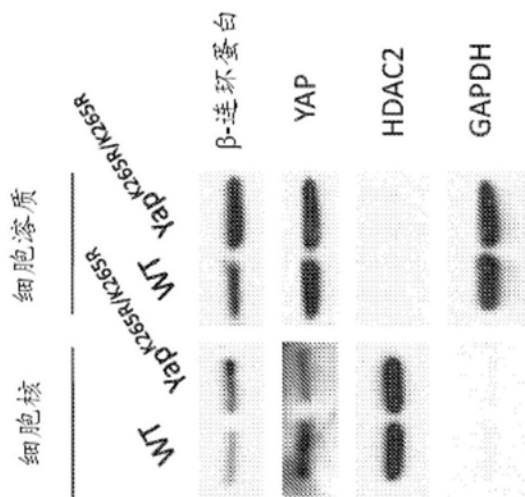


图19B

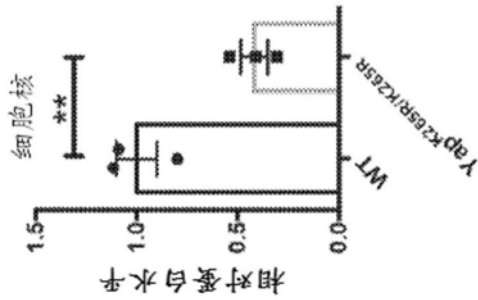


图19C

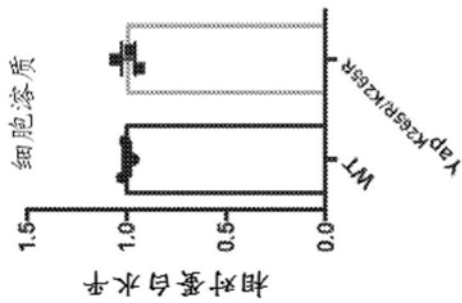


图19D