



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119768506 A

(43) 申请公布日 2025. 04. 04

(21) 申请号 202380032535.4	(74) 专利代理机构 深圳市百瑞专利商标事务所 (普通合伙) 44240 专利代理师 金辉
(22) 申请日 2023.02.03	
(30) 优先权数据 63/306,677 2022.02.04 US	(51) Int.Cl. C12N 5/077 (2010.01) C12N 15/113 (2010.01) A61K 35/35 (2015.01) A61K 35/28 (2015.01) A61K 35/33 (2015.01) A61K 35/32 (2015.01) A61K 48/00 (2006.01) A61P 19/08 (2006.01) A61P 19/02 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2024.09.30	
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/US2023/012331 2023.02.03	
(87) PCT国际申请的公布数据 W02023/150305 EN 2023.08.10	
(71) 申请人 金成镇 地址 韩国 申请人 金平刚 朴珍娜	
(72) 发明人 金成镇 金平刚 朴珍娜	

权利要求书2页 说明书50页 附图34页

(54) 发明名称
制造骨骼和软骨的方法

(57) 摘要
本申请描述了通过控制细胞中MAST4的表达水平来产生软骨或骨骼的方法。

1. 用于生成骨骼的方法,包括在其中希望形成骨骼的骨缺损位点处或在骨缺损位点附近向有需要的受试者施用真核细胞,其中相对于正常细胞,所述真核细胞中的微管相关丝氨酸/苏氨酸激酶家族成员4 (MAST4) 蛋白或其片段的表达或活性稳定或增加。

2. 根据权利要求1所述的方法,包括在细胞中重组表达MAST4。

3. 根据权利要求1的方法,其中所述细胞是结缔组织细胞。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述细胞是间充质干细胞、成纤维细胞、成骨祖细胞、骨细胞、前成骨细胞、成骨细胞或破骨细胞。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中相对于宿主,所述细胞是同种异体的。

6. 根据权利要求2所述的方法,包括在细胞中重组过表达MAST4。

7. 根据权利要求2所述的方法,其中重组表达的MAST4是受病毒启动子控制的。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述病毒启动子可以来自慢病毒或腺相关病毒。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述细胞与包含以下的组合物接触:(1) 特异性结合到编码MAST4抑制蛋白的核酸从而抑制MAST4抑制蛋白的表达的化合物;或(2) 特异性结合到MAST4抑制蛋白从而阻止其结合到MAST4的化合物。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述MAST4抑制蛋白为GSK-3家族。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述化合物是化学物质、多肽或多核苷酸,或其组合。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述多肽是抗体或抗原结合分子。

13. 根据权利要求11所述的方法,其中所述化合物是微小RNA (miRNA)、小干扰RNA (siRNA)、短发夹RNA (shRNA)、Piwi相互作用RNA (piRNA)、小核RNA (snRNA) 或反义寡核苷酸,或其组合。

14. 根据权利要求11所述的方法,其中所述化合物是CRISPR-Cas,所述CRISPR-Cas包含对编码MAST4抑制蛋白(或其片段)的核酸具有特异性的向导RNA。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述向导RNA是双RNA或单链向导RNA,所述双RNA包含CRISPR RNA (crRNA) 和反式激活crRNA (tracrRNA),所述双RNA对编码MAST4抑制蛋白(或其片段)的核酸具有特异性,所述单链向导RNA包含crRNA和tracrRNA的一部分并且与编码MAST4抑制蛋白(或其片段)的核酸杂交。

16. 根据权利要求1的方法,其中所述细胞是结缔组织细胞。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述细胞是间充质干细胞、成纤维细胞、成骨祖细胞、骨细胞、前成骨细胞、成骨细胞或破骨细胞。

18. 根据权利要求9所述的方法,其中相对于宿主,所述细胞是同种异体的。

19. 根据权利要求9所述的方法,其中所述细胞还包括表达MAST4的重组构建体。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述重组构建体过表达MAST4。

21. 用于从真核细胞中产生细胞外基质的方法,包括将真核细胞与组合物接触,所述组合物包含能够特异性结合到编码微管相关丝氨酸/苏氨酸激酶家族成员4 (MAST4) 蛋白或其片段的核酸并且抑制MAST4蛋白的表达或活性的化合物,其中所述化合物能够特异性结合到编码MAST4蛋白或其片段的核酸,其中所述真核细胞是软骨细胞、成纤维细胞或间充质干细胞。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述化合物是微小RNA (miRNA)、小干扰RNA

(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)、Piwi相互作用RNA(piRNA)、小核RNA(snRNA)或反义寡核苷酸,或其组合。

23. 预防、治疗或改善关节疾病的方法,所述方法包括

(i) 在真核细胞中施用化合物来抑制微管相关丝氨酸/苏氨酸激酶家族成员4(MAST4),从而抑制MAST4蛋白的表达或活性;和

(ii) 在需要形成软骨的关节处或关节附近向有需要的受试者施用由此获得的真核细胞。

制造骨骼和软骨的方法

发明背景

1. 发明领域:

[0002] 本发明涉及用于根据MAST4蛋白的调节产生软骨或骨骼的治疗组合物。

[0003] 2. 一般背景和现有技术:

[0004] 间充质基质细胞(mesenchymal stromal cell, MSC)是多能细胞,能够分化成间充质细胞类型(包括软骨细胞、成骨细胞和脂肪细胞)的各种谱系¹。MSC定型(commitment)和分化为每个单独细胞类型取决于多种信号传导通路,包括Wnt、TGF- β 、BMP和FGF²。在分化过程中,转录因子的协调上调和抑制是通过特定的信号传导通路以及与其他作为共同调控因子的许多转录因子的相互作用触发的。

[0005] Sox9是高迁移率族(HMG)结构域转录因子家族的成员,是软骨生成的激活因子并且从软骨前凝结(pre-cartilaginous condensation)的开始到软骨细胞的终末分化进行调控³⁻⁵。Sox9通过直接结合在其增强子和启动子上来激活胶原蛋白基因(Col2、Col9、Col11)和软骨基质基因(Acan和Comp)^{6,7}。考虑到Sox9是软骨发生的关键调控因子,Sox9受到多种机制的严格调控⁸。若干项研究已经报告了调控软骨细胞中的Sox9的磷酸化事件⁹⁻¹¹。

[0006] TGF- β 信号传导参与软骨发育和维持,特别是在软骨形成的早期阶段刺激软骨细胞分化^{12,13}。动物研究表明,Smad3是TGF- β 1信号传导的关键介质,是维持关节软骨所必需的,而具有Smad3缺乏或Smad3的软骨细胞特异性耗竭(depletion)的小鼠导致关节软骨的退化^{14,15}。此外,先前的研究已经表明,TGF- β 1信号传导通过以Smad3依赖性和非依赖性方式调控Sox9来促进软骨生成¹⁶⁻¹⁸,意味着TGF- β 1-Sox9轴在调控软骨生成方面至关重要。

[0007] Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)信号传导通过调节成骨细胞分化和成熟在软骨内成骨中发挥着至关重要的作用¹⁹。Wnt诱导的细胞内 β -连环蛋白稳定和随后的核移位(translocation)导致Runx2的激活,Runx2是成骨细胞分化的主要转录因子,特别是在间充质细胞中发育成骨骼²⁰。此外,GSK-3 β 是典型的Wnt/ β -连环蛋白信号传导的关键负调控因子,其已经证明在成骨过程中降低Runx2活性,从而表明GSK-3 β 是治疗骨骼疾病的潜在分子靶点²¹。

[0008] 在这项工作中,考虑到蛋白激酶在信号转导中发挥着至关重要的作用,我们已经寻求确定可能参与将间充质祖细胞切换到TGF- β 或Wnt信号的特定谱系下游的调控中的基因。在本文中,我们发现微管相关丝氨酸/苏氨酸激酶4(Mast4)在决定MSC变成软骨细胞或成骨细胞分化的细胞命运中发挥着至关重要的作用,该微管相关丝氨酸/苏氨酸激酶4(Mast4)在MSC的软骨生成过程中由TGF- β 1抑制并且在MSC的成骨过程中由Wnt介导的GSK-3 β 抑制增强。我们示出在丝氨酸494残基处Mast4诱导的Sox9磷酸化导致Sox9的蛋白酶体降解。我们进一步证明,Mast4缺乏导致Sox9稳定性和Smad3-Sox9缔合增加,导致Sox9的转录活性增加和随后软骨细胞标记基因的表达,从而最终促进MSC的软骨分化。另一方面,我们发现GSK-3 β 诱导的Mast4磷酸化触发E3连接酶Smurf1的Mast4募集,从而导致Mast4降解。然后,我们发现由Wnt介导的GSK-3 β 抑制所稳定的Mast4促进 β -连环蛋白核定位,从而最终增加Runx2转录活性和随后的MSC成骨分化。Mast4对间充质祖细胞的软骨生成的影响在体内

通过显示Mast4^{-/-}小鼠中过度的软骨合成但是骨质疏松性骨骼形成或减少的骨骼形成而得到证实。有趣的是, MSC中Mast4耗竭促进体内软骨形成和再生。总之, 我们的研究结果揭示了Mast4在决定MSC发育成软骨或骨骼的命运方面的重要作用。

发明内容

[0009] 本发明涉及在细胞中操纵MAST4表达使得最终产物导致软骨或骨骼的产生的方法。例如, 如果操纵细胞使得抑制MAST4, 则所得细胞将产生额外的细胞基质材料, 并且如果将细胞施用于受试者的感兴趣位点, 则会产生软骨。相反, 如果操纵细胞使得MAST4高度表达, 并且将此类细胞施用于受试者的感兴趣位点, 则会产生骨骼。

[0010] 在一个方面, 本发明涉及产生骨骼的方法, 包括在其中希望形成骨骼的骨缺损位点处或在骨缺损位点附近向有需要的受试者施用真核细胞, 在其中相对于正常细胞, 微管相关丝氨酸/苏氨酸激酶家族成员4 (MAST4) 蛋白或其片段的表达或活性稳定或增加。该方法包括在细胞中重组表达MAST4。

[0011] 该细胞可以是结缔组织细胞。真核细胞可以是间充质干细胞、成纤维细胞、骨祖细胞、骨细胞、前成骨细胞、成骨细胞或破骨细胞。相对于宿主, 真核细胞可以是同种异体的或自体的。该细胞可以在细胞中重组过表达MAST4。表达的MAST4可以受到病毒启动子的控制。病毒启动子可以来自慢病毒或腺相关病毒。

[0012] 在本发明的另一方面, 细胞可以与包含以下的组合物接触: (1) 特异性结合到编码MAST4抑制蛋白的核酸从而抑制MAST4抑制蛋白的表达的化合物; 或 (2) 特异性结合到MAST4抑制蛋白从而阻止其结合到MAST4的化合物。在不受任何限制的情况下, MAST4抑制蛋白可以是GSK-3。抑制性化合物可以是化学物质、多肽或多核苷酸, 或其组合。多肽可以是抗体或抗原结合分子。GSK-3 α 或GSK-3 β 的抑制化合物可以是微小RNA (miRNA)、小干扰RNA (siRNA)、短发夹RNA (shRNA)、Piwi相互作用RNA (piRNA)、小核RNA (snRNA) 或反义寡核苷酸, 或其组合。该化合物还可以是CRISPR-Cas, 其包含对编码MAST4抑制蛋白 (或其片段) 的核酸具有特异性的向导RNA。向导RNA可以是双RNA和单链向导RNA, 该双RNA包含CRISPR RNA (crRNA) 和反式激活crRNA (tracrRNA), 该双RNA对编码MAST4抑制蛋白 (或其片段) 的核酸具有特异性, 该单链向导RNA包含crRNA和tracrRNA的一部分并且与编码MAST4抑制蛋白 (或其片段) 的核酸杂交。该细胞可以是结缔组织细胞。该细胞可以是间充质干细胞、成纤维细胞、骨祖细胞、骨细胞、前成骨细胞、成骨细胞或破骨细胞。相对于宿主, 该细胞可以是自体的或同种异体的。该细胞还可以包含表达MAST4的重组构建体。该重组构建体可以过度表达MAST4。

[0013] 在另一方面, 本发明涉及从真核细胞中产生细胞外基质的方法, 包括将真核细胞与组合物接触, 该组合物包含能够特异性结合到编码微管相关丝氨酸/苏氨酸激酶家族成员4 (MAST4) 蛋白或其片段的核酸并且抑制MAST4蛋白的表达或活性的化合物, 其中, 该化合物能够特异性结合到编码MAST4蛋白或其片段的核酸, 其中真核细胞是软骨细胞、成纤维细胞或间充质干细胞。抑制性化合物是微小RNA (miRNA)、小干扰RNA (siRNA)、短发夹RNA (shRNA)、Piwi相互作用RNA (piRNA)、小核RNA (snRNA) 或反义寡核苷酸, 或其组合。

[0014] 在另一方面, 本发明涉及预防、治疗或改善关节疾病的方法, 该方法包括: (i) 在真核细胞中施用化合物以抑制微管相关丝氨酸/苏氨酸激酶家族成员4 (MAST4) 从而抑制MAST4蛋白的表达或活性; 和 (ii) 在需要形成软骨的关节处或附近向有需要的受试者施用

由此获得的真核细胞。

[0015] 从以下的本发明描述、本文所附的参考附图和本文所附的权利要求书中,将更全面地理解本发明的这些和其他目的。

附图说明

[0016] 专利或申请文档至少包含一张以彩色执行的附图。在请求和支付必要的费用后,专利局会提供本专利或专利申请公布的副本以及彩色附图。

[0017] 从下面给出的详细描述中,以及仅作为说明给出的附图,将对本发明有更全面的理解,因此不对本发明进行限制,并且其中:

[0018] 图1a-1f示出了Mast4基因的靶向缺失增强了软骨基质基因的表达,并且减少了体外成骨基因的表达。a在BMP-2的存在下对从至少三个独立实验中获得的C3H10T1/2细胞进行高密度微团培养(micromass culture)的代表性RT-PCR结果。b分化野生型和Mast4耗竭的C3H10T1/2细胞中软骨细胞标记基因表达的代表性qRT-PCR结果。在软骨分化过程中,蛋白质免疫印迹法证实了Mast4蛋白的表达。c按照软骨/软骨细胞发育和成骨分类的软骨分化野生型和Mast4耗竭的C3H10T1/2细胞持续6天的DEG热图。d在分化为软骨细胞持续6天的野生型和Mast4耗竭的C3H10T1/2细胞中通过RNA测序鉴定的Sox9靶向基因和Mmp9/13的代表性qRT-PCR结果。e在分化为成骨细胞持续10天的野生型和Mast4耗竭的C3H10T1/2细胞中在c中鉴定的成骨细胞标记基因和成骨相关基因的代表性qRT-PCR结果。f在分化为软骨细胞持续6天的野生型和Mast4耗竭的C3H10T1/2细胞中与软骨和软骨细胞发育、TGF- β 信号传导和BMP信号传导相关的DEG的转录网络。节点尺寸是基于节点的连通性设置的。红色圆圈表示在Mast4耗竭的C3H10T1/2细胞中显示差异表达的基因。b、d和e数据是三个独立实验的代表性平均值 $\pm$ SD,每个实验重复三次($n=3$)。采用非配对双尾学生t检验($P<0.05$)和用于多重检验的Benjamini-Hochberg校正进行所有统计学分析。P值是与在相应日期的WT比较。

[0019] 图2a-2l显示Mast4通过Sox9的翻译后调控来调节软骨生成。aC3H10T1/2细胞的阿尔新蓝染色结果。b将 2×10^5 的hBMSC分化为软骨细胞持续21天,然后从团块中提取蛋白质。c将C3H10T1/2细胞分化为软骨细胞持续6天,然后在Col2a1基因上进行Sox9ChIP (TGF- β 1 (5ng/ml) 和TGF- β I型受体激酶抑制剂Vactosertib (0.5 μ M),持续48h)。d在野生型和Mast4耗竭的C3H10T1/2细胞中瞬时地过表达4xCol2a1-luc、Sox9和Mast4-PDZ,然后进行TGF- β 1处理 (3ng/ml,持续24h)。e将Mast4-PDZ和Sox9转染到C3H10T1/2细胞,然后进行免疫沉淀测定。f在C3H10T1/2细胞中Sox9稳定性的蛋白质印迹分析。g将野生型和Mast4耗竭的C3H10T1/2细胞分化为软骨细胞持续6天,然后进行TGF- β 1 (5ng/ml,持续48h) 和MG-132 (10 μ M,持续6h) 处理,以及Sox9免疫沉淀。代表pSerine和Sox9的条带强度 (band intensity) 使用ImageJ通过密度测定法进行转换。数据报告为三个独立实验的平均值 $\pm$ SD ($n=3$)。采用非配对双尾学生t检验 ($P<0.05$) 进行统计学分析。h在MG-132存在下将Sox9和Mast4-PDZ转染到C3H10T1/2细胞 (10 μ M持续6h)。进行了两项独立的MASS SPEC分析。i将Mast-4PDZ与Sox9野生型 (WT)、S494A或S494D突变体共转染到C3H10T1/2细胞中。j 4xCol2a1-luc和Sox9WT/S494A/S494D共转染到C3H10T1/2细胞,然后是TGF- β 1处理 (3ng/ml持续24h)。k在微团培养物中稳定地过表达Sox9WT、S494A和S494D持续6天的C3H10T1/2细胞的代表性阿尔新蓝染色。l将野生型和稳定地过表达Sox9WT、S494A、S494D的C3H10T1/2细胞分化为软骨细胞

持续6天。通过RT-PCR检测mRNA表达。c、d和j数据是三个独立实验的代表性平均值 $\pm$ SD,每个实验重复三次($n=3$)。采用非配对双尾学生t检验($P<0.05$)和用于多重检验的Benjamini-Hochberg校正进行所有统计学分析。a、b、e-g、i和l从至少三个独立实验获得代表性结果。TCL:总细胞裂解物。

[0020] 图3a-3g显示TGF- β 1诱导的Mast4抑制通过增加Sox9-Smad3缔合来增强软骨生成。a将Sox9和Smad3共转染到野生型和Mast4耗竭的C3H10T1/2细胞,然后是TGF- β 1处理(5ng/ml,持续30分钟)。使用HA抗体对Sox9进行免疫沉淀。使用ImageJ软件通过密度测定法将表示免疫沉淀物中GFP-Smad3和HA-Sox9表达水平的条带强度转换为Smad3与Sox9的比例。数据报告为三个独立实验的平均值 $\pm$ SD($n=3$)。采用非配对双尾学生t检验($P<0.05$)进行统计学分析。b在分化C3H10T1/2细胞中进行Col2a1上的Smad3ChIP基因检测持续6天。c采用蛋白质免疫印迹法和RT-PCR法对使用TGF- β 1处理48h的C3H10T1/2细胞检测Mast4表达。d在未分化的C3H10T1/2细胞中进行荧光素酶检测。Vactosertib(0.5 μ M)预处理持续2h,然后是TGF- β 1(5ng/ml)处理持续24h。e在经历软骨分化持续6天的C3H10T1/2细胞中对Mast4基因进行Smad3ChIP检测。在收获前,分别处理TGF- β 1(5ng/ml)和Vactosertib(0.5 μ M)持续48h和50h。f通过蛋白质印迹法在分化C3H10T1/2细胞中检测内源性Mast4和Sox9蛋白表达。g将TGF- β 1(5ng/ml)进行处理持续24h和48h,将Vactosertib(0.5 μ M)进行处理持续48h至人类原代软骨细胞。b、d和e数据是三个独立实验的代表性平均值 $\pm$ SD,每个实验重复三次($n=3$)。采用非配对双尾学生t检验($P<0.05$)和用于多重检验的Benjamini-Hochberg校正进行所有统计学分析。a、c、f和g从至少三个独立实验中获得代表性结果。TCL:总细胞裂解物。

[0021] 图4a-4l显示Wnt通过抑制GSK-3 β 来增强Mast4的稳定性,从而诱导成骨。a从至少三个独立实验获得的成骨分化C3H10T1/2细胞的代表性ALP染色结果。b使用Wnt3a条件培养基处理MC3T3-E1前成骨细胞持续指定时间。c将野生型和Mast4-PDZ过表达的C3H10T1/2细胞分化为成骨细胞持续10天。d将Mast4-PDZ和GSK-3 β 转染到C3H10T1/2细胞,然后是CHIR-99021处理(10 μ M持续9h)。e将Mast4-PDZ和GSK-3 β 转染到C3H10T1/2细胞,然后是免疫沉淀测定。通过磷酸丝氨酸(phospho-serine)抗体识别条带,随后使用HA抗体重新探测条带。f将Smurf1、Mast4-PDZ和GSK-3 β 转染到使用CHIR-99021处理(10 μ M持续9h)处理的C3H10T1/2细胞,然后是免疫沉淀测定。g将Smurf1和GSK-3 β 转染到野生型和GSK-3 β 耗竭的Mast4-PDZ过表达的C3H10T1/2细胞。h将Mast4-PDZ WT、P628A/Y634A和Smurf1转染到野生型和GSK-3 β 耗竭的C3H10T1/2细胞。i将各个Mast4激酶结构域缺失突变体和GSK-3 β 转染到C3H10T1/2细胞。j在不存在或存在Smurf1和GSK-3 β 的情况下,将Flag-Mast4-PDZ WT和 Δ 632-636与HA-泛素一起转染到C3H10T1/2细胞中。使用Flag抗体对细胞裂解物进行免疫沉淀,并且使用指定抗体对细胞裂解物进行免疫印迹。k使用Mast4-PDZ WT和 Δ 632-636转染MC3T3-E1细胞,然后是Wnt3a条件培养基的处理(2.5h)。l将6xOSE-Luc、Mast4-PDZ WT和 Δ 632-636转染到C3H10T1/2细胞,然后使是Wnt3a条件培养基的处理(18h)。数据是三个独立实验的代表性平均值 $\pm$ SD,每个实验重复三次($n=3$)。采用非配对双尾学生t检验($P<0.05$)和用于多重检验的Benjamini-Hochberg校正进行所有统计学分析。b-k从至少三个独立实验获得代表性结果。TCL:总细胞裂解物。

[0022] 图5a-5h示出了Mast4耗竭诱导在发育过程中的软骨生成和成骨改变。a、b在PN 1天时Mast4^{+/+}和Mast4^{-/-}小鼠的生长板中Sox9和Col2a1的免疫荧光图像($n=3$)。c、d(c)1日

龄和(d) 3周龄Mast4^{+/+}和Mast4^{-/-}小鼠的胫骨生长板的五色染色(n=5)。黑色箭头表示肥大细胞层(hypertrophic zone)。e Mast4^{+/+}和Mast4^{-/-}小鼠的胫骨中的小梁骨的 μ CT图像。从 μ CT图像测量小梁骨的总骨骼体积和骨骼矿物质密度(BMD)(Mast4^{+/+}小鼠为n=8, Mast4^{-/-}小鼠为n=10)。f在处死前7d和2d通过钙黄绿素双标记观察骨骼形成,并且在每个胫骨3个点处测量标记之间的距离(Mast4^{+/+}小鼠为n=10个胫骨和Mast4^{-/-}小鼠为n=5个胫骨)。MAR:矿化沉积率(mineral apposition rate)。g 6周龄Mast4^{+/+}和Mast4^{-/-}小鼠(n=3)的近端胫骨中接近干骺端血管(CD31)的Osterix和Mmp13的免疫荧光染色的代表性图像。GP:生长板,MP:干骺端。h使用从5周龄Mast4^{+/+}和Mast4^{-/-}小鼠(n=5)分离的骨骼干细胞进行体外菌落形成测定获得的代表性阿尔新蓝和茜素红S染色结果。e,f,数据报告为平均值 $\pm$ SD。采用非配对双尾学生t检验(P<0.05)进行所有统计学分析。

[0023] 图6a-6e显示了小鼠软骨和骨骼中Mast4调控的基因的鉴定。a、b通过收集和合并从在PN 1天时Mast4^{+/+}和Mast4^{-/-}小鼠(每组3只小鼠)的胫骨的软骨和骨骼中获得的RNA进行RNA测序。a Mast4^{-/-}小鼠的软骨中与软骨发育相关的上调基因的富集。预测了20个上调基因作为富集基因集的前沿子集(leading-edge subset)。b Mast4^{+/+}小鼠骨骼中与骨骼系统发育和Wnt信号传导通路相关的上调基因的富集。在绘图中,上调20个和12个基因作为在Mast4^{+/+}小鼠中的富集基因集的前沿子集。采用背景数据集进行基因集富集分析,该背景数据集由Mast4^{+/+}和Mast4^{-/-}小鼠的胫骨软骨和骨骼分析的所有DEG组成。c Mast4调控的Sox9和Runx2靶标的转录网络在软骨和骨骼中显示出差异表达。Sox9和Runx2靶标与骨骼系统发育功能(包括软骨和骨骼发育、TGF- β 信号传导、BMP信号传导和Wnt信号传导)相关的基因有关。d在PN 1天时Mast4^{+/+}和Mast4^{-/-}小鼠的软骨组织中的Col2a1和Sox9蛋白的蛋白质印迹分析。e在PN 1天时Mast4^{+/+}和Mast4^{-/-}小鼠的软骨组织中的Runx2、Mmp13和 β -连环蛋白的蛋白质印迹分析。d、e从至少三个独立实验获得代表性结果。

[0024] 图7a-7d显示了Mast4耗竭的MSC移植改善体内软骨形成和修复。a在具有软骨分化培养基的150mm培养皿中培养的野生型和Mast4耗竭的C3H10T1/2细胞的100个微团培养物经皮下注射到无胸腺裸鼠两侧的每侧(n=4;WT在左侧,KO在右侧)。在植入后2周取回异位团块。给出值是来自4只小鼠的移植物的体积的平均值 $\pm$ SD。采用非配对双尾学生t检验(P<0.05)进行(a)的所有统计学分析。b通过对Col2a1和Sox9的免疫荧光染色,证实了在野生型和Mast4耗竭的C3H10T1/2细胞移植植物中发现的多个软骨结构。以黄色显示Sox9和TOPRO-3的合并。从由野生型C3H10T1/2细胞形成的1个软骨结节和由Mast4耗竭的C3H10T1/2细胞形成的7个不同软骨结节的免疫染色获得代表性图像。c移植后12周时兔模型中的滑车沟(trochlear groove)中的全层软骨缺损的肉眼和微观外观。媒介剂(vehicle):没有hBMSC移植的PBS处理。d再生软骨的Wakitani软骨修复评分。数据表示为平均值 $\pm$ SD。c、d媒介剂处理组为n=3,原始(naive)组和MAST4耗竭hBMSC移植组为n=5。使用用于多重比较的单因素ANOVA与Dunnett校正进行(d)的统计学分析。

[0025] 图8示出了ATDC5细胞的软骨形成过程中的基因表达。使用胰岛素100ng/ml处理ATDC5细胞持续6天和9天以诱导软骨生成,并且进行RT-PCR。从至少三个单独实验获得代表性结果。

[0026] 图9a-9e示出了Mast4耗竭对软骨细胞标记基因的mRNA表达的影响。(a)在C3H10T1/2细胞中的CRISPR/Cas9介导的Mast4外显子1和外显子2缺失的分析。扩增Mast4位

点的外显子1和外显子2以区分基因型,并且使用PCR产物进行测序。外显子1的两条链均缺失了两个碱基,从而诱导了在外显子1中的无义突变以及翻译终止。在外显子2中发现7个碱基缺失和1个碱基插入,从而诱导外显子中的双等位基因突变以及翻译终止。(b)使用未分化的细胞通过蛋白质免疫印迹法确认Mast4蛋白的耗竭。(c和d)在未分化的(c)野生型和Mast4耗竭、(d)对照和shRNA介导的Mast4敲低C3H10T1/2细胞中软骨细胞标记基因的表达。(d)数据是三个独立实验的代表性平均值 $\pm$ SD,每个实验重复三次($n=3$)。采用非配对双尾学生t检验($P<0.05$)和用于多重检验的Benjamini-Hochberg校正进行统计学分析。P值是与WT比较。(e)在诱导至软骨分化持续6天的野生型和Mast4耗竭的C3H10T1/2细胞中检测软骨细胞标记基因的表达。(b、c和e)从至少三个单独实验获得代表性结果。

[0027] 图10a-10b示出了在野生型和Mast4耗竭的C3H10T1/2细胞中的Sox9表达。(a)在未分化的野生型和Mast4耗竭的C3H10T1/2细胞中检测内源性Sox9蛋白表达。使用ImageJ软件通过密度测定法将代表Sox9表达水平的条带强度转换为Sox9与 α -肌动蛋白的比例。从至少三个单独实验获得代表性结果。(b)通过qRT-PCR检测未分化的野生型和Mast4耗竭的C3H10T1/2细胞中的Sox9的mRNA表达。数据是三个独立实验的代表性平均值 $\pm$ SD,每个实验重复三次($n=3$)。采用非配对双尾学生t检验($P<0.05$)和用于多重检验的Benjamini-Hochberg校正进行所有统计学分析。

[0028] 图11a-11b示出了在C3H10T1/2细胞中的截短的Mast4蛋白的强制表达。(a)全长和截短的Mast4构建体的示意图结构。(b)使用对照(LPCX)和Mast4-PDZ过表达的C3H10T1/2细胞进行RT-PCR,以分析软骨细胞标记基因的mRNA表达。从至少三个单独实验获得代表性结果。

[0029] 图12示出了WT和Mast4耗竭的C3H10T1/2细胞的DEG和GO富集分析。在密度微团培养物中,在BMP-2刺激下,将野生型和Mast4耗竭(KO#1)C3H10T1/2细胞分化为软骨细胞持续6天,然后进行RNA测序分析。进行差异表达基因(DEG)分析和基因本体(GO)富集分析。

[0030] 图13示出了野生型和Mast4耗竭的C3H10T1/2细胞中胶原基因家族的表达。RNA测序示出了野生型和Mast4耗竭的C3H10T1/2细胞中胶原基因家族的表达中的变化。

[0031] 图14a-14e示出了C3H10T1/2细胞中的Mast4耗竭对体外软骨形成的影响。(a)高密度微团培养系统中C3H10T1/2细胞的软骨分化的示意图。(b)将 5×10^3 的未分化的野生型细胞和Mast4耗竭的C3H10T1/2细胞接种在6孔板上。在BMP-2刺激下软骨分化后,将两个微团培养物(每个质量: $1 \times 10^5/10\text{ml}$ 液滴)接种在12孔板上。在指定的时间点使用Countess II自动细胞计数仪对细胞数量进行计数。数据是三个独立实验的代表性平均值 $\pm$ SD,每个实验重复三次($n=3$)。采用非配对双尾学生t检验($P<0.05$)和用于多重检验的Benjamini-Hochberg校正进行所有统计学分析。P值是与WT比较。(c)从使用软骨分化C3H10T1/2细胞的至少三个独立实验中获得代表性阿尔新蓝染色结果。(d)在软骨分化持续8天后,将50ml体积中 1×10^5 的野生型和Mast4耗竭的C3H10T1/2细胞接种在低结合96孔板上。从至少三个独立的实验中获得3D球体的代表性相差显微镜图像。(e)从在(d)中所示的球体中分离出mRNA,并且通过RT-PCR分析软骨生成标记基因的表达。(c和e)从至少三个单独实验获得代表性结果。

[0032] 图15a-15b示出了人骨髓来源的干细胞(hBMSC)的软骨分化。(a)在团块培养系统中的人骨髓来源的干细胞(hBMSC)的软骨分化示意图。(b)在团块培养系统下将 2×10^5 的

hBMSC分化为软骨细胞持续21天,然后从聚集体中分离mRNA。通过qRT-PCR检测Col2a1和Acan的mRNA表达。Undif.:未分化的hBMSC。数据是三个独立实验的代表性平均值 $\pm$ SD,每个实验重复三次($n=3$)。采用非配对双尾学生t检验($P<0.05$)和用于多重检验的Benjamini-Hochberg校正进行所有统计学分析。

[0033] 图16a-16e示出了Mast4调控Sox9与Col2a1和Sox9结合稳定性。(a)将指示的C3H10T1/2细胞分化为软骨细胞持续6天,然后在Col2a1基因进行Sox9ChIP。(b)在LPCX对照和Mast4PDZ过表达的C3H10T1/2细胞中瞬时过表达4xCol2a1-luc,然后进行TGF- β 1处理(3ng/ml持续24h)。(a和b)数据是三个独立实验的代表性平均值 $\pm$ SD,每个实验重复三次($n=3$)。采用非配对双尾学生t检验($P<0.05$)和用于多重检验的Benjamini-Hochberg校正进行所有统计学分析。P值是与WT比较。(c)将全长(HA-Mast4-FULL)和截短的Mast4(HA-Mast4-PDZ)与靶向外源性Mast4(人)的siMAST4(50pmol)与Myc-Sox9一起共转染到C3H10T1/2细胞中。由于使用HA抗体检测全长Mast4的效率低,因此使用识别C末端的Mast4抗体。(d)将指示的C3H10T1/2细胞分化为软骨细胞持续6天,然后进行MG-132(10mM持续6h)处理。对内源性Sox9进行免疫沉淀,并且使用磷酸化丝氨酸和Sox9抗体通过蛋白质印迹分析法分析复合物。(e)将Myc-Sox9和Mast4-PDZ构建体转染到C3H10T1/2细胞,然后进行MG-132(10mM持续6小时)处理。(c-e)使用ImageJ软件通过密度测定法将代表Myc-Sox9或丝氨酸磷酸化Sox9表达水平的条带强度转换为免疫沉淀物中Myc-Sox9或pSerine与 β -肌动蛋白或Sox9的比例。从至少三个单独实验获得代表性结果。

[0034] 图17示出了Mast4通过在Sox9的丝氨酸494处的磷酸化来调控Sox9。如上所述,在野生型和Mast4耗竭的C3H10T1/2细胞中瞬时过表达4xCol2a1-luc、Sox9WT/S494A/S494D和Mast4-PDZ。数据是三个独立实验的代表性平均值 $\pm$ SD,每个实验重复三次($n=3$)。采用非配对双尾学生t检验($P<0.05$)和用于多重检验的Benjamini-Hochberg校正进行统计学分析。

[0035] 图18a-18c示出了Mast4与Smad3的相互作用及其对TGF- β 1/Smad3诱导的转录激活的影响。(a)将指示的质粒共转染到C3H10T1/2细胞,然后进行免疫沉淀测定。从至少三个单独实验获得代表性结果。(b和c)通过(b)CAGA和(c)SBE报告基因测定法在野生型和Mast4耗竭的C3H10T1/2细胞中检测Smad3/4诱导的转录激活。数据是三个独立实验的代表性平均值 $\pm$ SD,每个实验重复三次($n=3$)。采用非配对双尾学生t检验($P<0.05$)和用于多重检验的Benjamini-Hochberg校正进行所有统计学分析。

[0036] 图19a-19b示出了Mast4对Smad3结合至Smad7和TGF- β 1靶标基因表达的影响。(a)在野生型和Mast4耗竭的分化C3H10T1/2细胞中进行Smad3ChIP测定,该测定检查Smad3与Smad7的结合。数据是三个独立实验的代表性平均值 $\pm$ SD,每个实验重复三次($n=3$)。采用非配对双尾学生t检验($P<0.05$)和用于多重检验的Benjamini-Hochberg校正进行所有统计学分析。(b)在野生型(WT)、Mast4耗竭的(KO;KO#1)和Mast4-PDZ过表达(OE)的C3H10T1/2细胞中检查TGF- β 1靶标基因的mRNA表达。

[0037] 图20a-20b示出了通过Smad3ChIP测定检查Mast4启动子活性和Smad3结合至Mast4启动子的TGF- β 1调控。(a)使用PROMO v3.0.2软件预测Smad3/4、p300、c-Jun、Nkx2.1和E2F-4转录因子在Mast4启动子中的预期结合位点。(b)在存在或不存在TGF- β 1(5ng/ml持续48h)的分化(在软骨分化培养基中6天)C3H10T1/2细胞中对Mast4基因进行Smad3ChIP测定。数据

是三个独立实验的代表性平均值 $\pm$ SD,每个实验重复三次($n=3$)。采用非配对双尾学生t检验($P<0.05$)和用于多重检验的Benjamini-Hochberg校正进行所有统计学分析。

[0038] 图21示出了使用vactosertib处理的分化C3H10T1/2细胞中Mast4和软骨细胞标记基因的mRNA表达。Vactosertib(0.5mM)在分化C3H10T1/2细胞中处理3天和6天。通过RT-PCR检测软骨细胞标记基因表达的mRNA表达。从至少三个单独实验获得代表性结果。

[0039] 图22a-22e示出了成骨过程中Mast4的诱导和Mast4表达的GSK-3 β 调控。(a) C3H10T1/2细胞的成骨分化的示意图。(b)将指示的C3H10T1/2细胞分化为成骨细胞持续10天,然后进行茜素红S染色。(c)将C3H10T1/2细胞分化为成骨细胞持续10天,然后对Mast4和关键Wnt信号传导分子的表达进行蛋白质印迹分析。(d)在不存在或存在CHIR-99021的情况下,使用环己酰亚胺(CHX;10mg/ml)处理Mast4-PDZ过表达的C3H10T1/2细胞持续指定时间(10mM持续9h)。(e)使用MG-132(10mM持续4h)和CHIR-99021(10mM持续9h)处理野生型和GSK-3 β 耗竭的HA-Mast4-PDZ过表达的C3H10T1/2细胞。(b-d)从至少三个单独实验获得代表性结果。

[0040] 图23a-23c示出了GSK-3 β 和Smurf1与Mast4激酶结构域的结合。(a)Mast4-PDZ缺失突变体的示意图。将(b)GFP-GSK-3 β 、(c)GFP-Smurf1和Mast4的各种缺失突变体共转染到C3H10T1/2细胞中,然后进行免疫沉淀检测。从至少三个单独实验获得代表性结果。

[0041] 图24a-24b示出了通过Mast4-PDZ过表达和GSK-3 β 耗竭增强Runx2活性和成骨分化。(a)将6xOSE-Luc转染到野生型和GSK-3 β 耗竭的野生型和Mast4-PDZ过表达的C3H10T1/2细胞中,然后使用Wnt3a条件培养基处理18h。(b)将野生型和GSK-3 β 耗竭的野生型和Mast4-PDZ过表达的C3H10T1/2细胞分化为成骨细胞持续10天,然后检查成骨细胞标记基因的mRNA表达。(a和b)数据是三个独立实验的代表性平均值 $\pm$ SD,每个实验重复三次($n=3$)。采用非配对双尾学生t检验($P<0.05$)和用于多重检验的Benjamini-Hochberg校正进行所有统计学分析。

[0042] 图25a-25e示出了CRISPR/Cas9介导的Mast4外显子1和外显子15缺失的分析。(a)使用外显子盒(boxes of exons)描绘小鼠Mast4位点。示出了Mast4^{-/-}等位基因的结构。(b-c)扩增Mast4位点的外显子1和外显子15以区分基因型,并且使用PCR产物进行测序。如测序结果所示,在外显子1中缺失71个碱基,导致外显子1出现无义突变以及翻译终止;同时在外显子15中缺失3个碱基,从而移除1个精氨酸。(d)通过年轻小鼠的大脑和肌肉中的蛋白质印迹分析法证实了Mast4^{-/-}小鼠中Mast4蛋白的损失。(e)显示6周龄Mast4^{+/+}、Mast4^{+/-}和Mast4^{-/-}小鼠的身体尺寸的代表性图像。(b和d)从至少三个单独实验获得代表性结果。

[0043] 图26a-26e示出了Mast4^{+/+}和Mast4^{-/-}小鼠的Mast4表达模式、胫骨生长板厚度和肥大细胞区比例。(a)在PN 1天Mast4^{+/+}和Mast4^{-/-}小鼠的胫骨中的Mast4的表达模式($n=3$)。白色虚线示出增殖区(proliferating zone)、肥大细胞层和成骨区(ossification zone)之间的边界。P:增殖区,H:肥大细胞层,O:成骨区。(b)胫骨生长板的五色染色和H&E染色图像($n=3$)。(a和b)从Mast4^{+/+}和Mast4^{-/-}小鼠($n=3$)的免疫染色获得代表性图像。(c-e)在每个样本的3个随机场中测量总生长板厚度和肥大细胞层厚度(Mast4^{+/+}和Mast4^{-/-}小鼠的PN 1天: $n=4$,PN 3周: $n=5$,PN 6周: $n=3$)。肥大细胞层比例计算为肥大细胞层厚度/生长板厚度。数据报告为平均值 $\pm$ SD。采用非配对双尾学生t检验($P<0.05$)进行(c、d、e)的统计学分析。P值是与WT比较。

[0044] 图27a-27d示出了mCT分析、通过电子探针显微分析仪的元素映射和Mast4^{+/+}和Mast4^{-/-}小鼠的肢体长度。(a) 重构的胫骨3维mCT图像。从Mast4^{+/+}、Mast4^{+/-}和Mast4^{-/-}小鼠(n=3)的免疫染色获得的代表性图像。(b) 使用mCT图像检查6周龄Mast4^{+/+}和Mast4^{-/-}小鼠的胫骨的骨骼体积、骨密度和皮质骨的厚度。(c) 6周龄Mast4^{+/+}和Mast4^{-/-}小鼠的胫骨中钙(Ca)、磷(P)和镁(Mg)的元素映射。红色的部分表示高元素浓度,而深蓝色的部分表示低浓度。BEI:背散射电子图像。(d) 使用mCT图像检查6周龄Mast4^{+/+}和Mast4^{-/-}小鼠的肢体长度。设置包括穿过离骨骼最远的两个点的轴线的横截面,并且测量最长的长度。(b和d) 数据报告为平均值±SD(Mast4^{+/+}小鼠为n=8和Mast4^{-/-}小鼠为n=10)。采用非配对双尾学生t检验(P<0.05)进行(b、d)的统计学分析。P值是与WT比较。

[0045] 图28a-28b示出了6周龄Mast4^{+/+}和Mast4^{-/-}小鼠的近端胫骨和远端股骨中的成骨细胞标记蛋白的表达。(a) 在Mast4^{+/+}和Mast4^{-/-}小鼠的近端胫骨干骺端中的Runx2的表达。GP:生长板,MP:干骺端。示出Osterix和Mmp13的表达的图像对应于图5g。(b) 在6周龄Mast4^{-/-}小鼠远端股骨的骨膜中Runx2、Osterix和Mmp13表达降低。P:骨膜,C:皮质,M:髓质。(a和b) 从Mast4^{+/+}和Mast4^{-/-}小鼠(n=3)的免疫染色获得代表性图像。

[0046] 图29a-29b示出了从5周龄Mast4^{+/+}和Mast4^{-/-}小鼠中的小鼠骨骼干细胞的分离。(a) 如在BD FACS Aria II上生成并且由FlowJo v10.7.1和BD FACSDiva v.9.0.1软件分析的代表性FACS图,其中包含每个群体的亲本门百分比。(b) 用于分离小鼠骨骼干细胞的抗体和浓度。

[0047] 图30a-30c示出了从Mast4^{+/+}和Mast4^{-/-}小鼠中分离的小鼠骨骼干细胞的功能评估。(a) 小鼠骨骼干细胞的体外集落形成测定的示意图。(b和c) 通过使用克隆环(cloning cylinder)提取染色的集落进行吸光度测量以区分每个集落。分别通过在630nm和405nm处的吸光度测量对阿尔新蓝和茜素红S染色进行定量。数据报告为三个染色集落的平均值±SD(n=3)。采用非配对双尾学生t检验(P<0.05)进行(b、c)的统计学分析。

[0048] 图31a-31d示出了小鼠骨髓来源的间充质干细胞(mBMSC)的软骨生成和成骨分化。(a) 分化为软骨细胞或骨细胞的小鼠骨髓来源的间充质干细胞(mBMSC)的示意图。(b) 从Mast4^{+/+}和Mast4^{-/-}小鼠的胫骨骨髓隔室(tibia marrow compartment)收获的骨髓抽吸物中分离出小鼠BMSC,然后通过诱导软骨分化持续21天并且随后进行阿尔新蓝染色(n=3)。(c) 在(b)所示的分化BMSC中的软骨细胞标记基因的表达。(d) 从Mast4^{+/+}和Mast4^{-/-}小鼠中分离的mBMSC在成骨细胞培养基中培养,并且使用碱性磷酸酶(ALP)染色。(c和d) 从至少三个单独实验获得代表性结果。

[0049] 图32a-32b示出了小鼠软骨和骨骼中通过Mast4调控的基因的鉴定。(a) 基于软骨和骨骼中基因表达的变化,将DEG分类为5个簇。(b) 5个簇内DEG的GO富集分析。A~M表示富集的GO项(P<0.001)。在(a)中的箱形图示出了(b)中描述的GO项的富集分数。在(a)中的灰度热图表示与GO项相关的DEG。

[0050] 图33a-33d分别示出了小鼠软骨和骨骼中Sox9靶标基因和成骨相关基因的Mast4调控。在PN 1天时Mast4^{+/+}和Mast4^{-/-}小鼠的胫骨的软骨组织中Sox9靶标基因的mRNA表达和骨骼组织中成骨相关基因的mRNA表达的(a和c)热图和(b和d)qRT-PCR验证。(b和d) 数据是三个独立实验的代表性平均值±SD,每个实验重复三次(n=3)。采用非配对双尾学生t检验(P<0.05)和用于多重检验的Benjamini-Hochberg校正进行所有统计学分析。

[0051] 图34a-34b示出了C3H10T1/2细胞中的Mast4耗竭对体内软骨形成的影响。(a) 用于皮下注射到4只无胸腺裸鼠(6周龄雌性)侧面的分化C3H10T1/2细胞的制备的示意图。2周后处死小鼠,并且取回移植物进行进一步分析。(b) 通过五色染色,证实了在由Mast4耗竭的C3H10T1/2细胞形成的团块中发现的多个软骨结构。每个矩形中的图像以更大的放大倍率呈现。比例尺=100mm。从由野生型C3H10T1/2细胞形成的1个软骨结节和由Mast4耗竭的C3H10T1/2细胞形成的7个不同软骨结节的免疫染色获得代表性图像。

[0052] 图35a-35c示出了在兔模型中将hBMSC移植到全层软骨缺损中。(a) 兔模型中全层软骨缺损的肉眼外观和H&E、番红O、马松三色的微观外观,以及移植后12周时滑车沟中的缺损的II型胶原和人HLA 1类ABC的免疫组织化学检测。媒剂:没有hBMSC移植的PBS处理。从媒剂处理组为n=3,原始组为n=5和MAST4耗竭hBMSC移植组为n=5获得的代表性图像。(b) 使用马松三色染色的组织评估胶原面积占整个软骨缺损区域的平均百分比。(c) II型胶原染色面积占整个软骨缺损面积的平均百分比。(b和c) 媒剂为n=3,原始和CRISPR/Cas9介导的MAST4K0(池)人骨髓来源的干细胞为n=5。数据表示为平均值±SD。使用单因素方差分析(ANOVA)和用于多重比较的Dunnett校正法进行(b、c)的统计学分析。

[0053] 图36a-36b示出了兔膝关节中全层关节软骨缺损位点处的再生软骨的组织学分级。(a) Wakitani软骨修复评分系统。(b) 使用Wakitani评分对切片进行半定量分析。(媒剂为n=3,原始和MAST4K0(池)人骨髓来源的干细胞为n=5)。数据表示为平均值±SD。使用单因素方差分析(ANOVA)和用于多重比较的Dunnett校正法进行(b)的统计学分析。

[0054] 图37示出了Mast4在确定MSC发育成软骨或骨骼的细胞命运中的作用的示意图。在软骨形成过程中,TGF- β 1介导的Mast4抑制通过减少S494处的Sox9磷酸化导致Sox9蛋白增加,导致Sox9转录活性增加,从而最终导致MSC以牺牲骨骼形成为代价促进软骨形成。在成骨过程中,Wnt介导的GSK-3 β 抑制阻断了GSK-3 β 诱导的Mast4磷酸化和随后的Smurf1介导的Mast4降解。稳定的Mast4诱导b-连环蛋白和Runx2活性增加,从而导致MSC的成骨增强。

具体实施方式

[0055] 在本申请中,“一(a/an)”用于指代单个和多个对象。

[0056] 如本文所用,“与”一种或多种另外治疗剂“组合”施用包括以任何顺序同时地(并存地)或连续地施用。

[0057] 如本文所用,关于核酸、蛋白质、蛋白质片段或其衍生物,术语“生物活性”定义为核酸或氨基酸序列模仿由核酸或蛋白质的野生型形式引发的已知生物学功能的能力。

[0058] 如本文所用,术语“骨骼生长”与骨骼质量有关。这是由于成骨细胞的数量和尺寸的增加,以及全身施用后类骨质内膜骨骼表面沉积的增加。

[0059] 如本文所用,“载剂(carrier)”包括药学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂,在所采用的剂量和浓度下这些载剂、赋形剂或稳定剂对暴露于其中的细胞或哺乳动物是无毒的。通常,药学上可接受的载剂是pH缓冲溶液。药学上可接受的载剂的示例包括但不限于缓冲液,例如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸;低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、双糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;EDTA等螯合剂;糖醇,例如甘露醇或山梨糖醇;形成盐

的反离子,例如钠;和/或非离子表面活性剂,例如TWEEN®、聚乙二醇(PEG)和PLURONICS®。

[0060] 如本文所用,术语“结缔组织”是连接和支持其他组织或器官的任何组织,包括但不限于哺乳动物宿主的韧带、软骨、肌腱、骨骼或滑膜。

[0061] 本文所用的术语“结缔组织细胞”或“结缔组织的细胞”包括存在于结缔组织中的细胞,例如成纤维细胞、软骨细胞(cartilage cell)(软骨细胞,chondrocyte)和骨骼细胞(成骨细胞/骨细胞),以及脂肪细胞(fat cell)(脂肪细胞,adipocyte)和平滑肌细胞。优选地,结缔组织细胞是成纤维细胞、软骨细胞和骨细胞。更优选地,结缔组织细胞是成纤维细胞。或者,结缔组织细胞是成骨细胞或骨细胞。将认识到,本发明可以使用结缔组织细胞的混合培养物以及单个类型的细胞进行实践。人们还认识到,组织细胞可以进行(例如化学或辐射)处理,以便细胞稳定地表达感兴趣的基因。优选地,结缔组织细胞在注射到宿主生物体中时不会引起负免疫应答。据了解,同种异体细胞可用于此方面,以及自体细胞可用于细胞介导的基因治疗或体细胞治疗。

[0062] 如本文所用,“结缔组织细胞系”包括来源于共同亲本细胞的多个结缔组织细胞。

[0063] 如本文所用,“宿主细胞”包括单个细胞或细胞培养物,其可以是或曾经是本发明载体(vector)的接受者。宿主细胞包括单个宿主细胞的后代,并且由于自然的、偶然的或故意的突变和/或变化,后代不一定与原始亲本细胞完全相同(在形态或总DNA互补方面)。

[0064] 如本文所用,术语“低骨量”是指其中骨量水平低于世界卫生组织“Assessment of Fracture Risk and its Application to Screening for Postmenopausal Osteoporosis(1994).Report of a World Health Organization Study Group.World Health Organization Technical Series 843”(其通过引用并入本文以提及骨量的正常和骨质疏松水平)标准中定义的年龄特定正常值的情况。此外,术语“骨量”是指每单位面积的骨量,有时也称为骨矿物质密度。

[0065] 如本文所用,术语“哺乳动物宿主”包括动物界的成员,包括但不限于人类。

[0066] 如本文所用,术语“成熟骨骼”涉及经矿物化的骨骼,与非矿物化的骨骼(例如类骨骼)相反。

[0067] 如本文所用,术语“成骨有效的”是指影响成熟骨骼的形成和发育的量。

[0068] 如本文所用,术语“骨祖细胞(osteoprogenitor cells/bone progenitor cells)”是具有成为骨骼细胞的潜力并且存在于骨膜和骨髓中的细胞。骨祖细胞来源于结缔组织祖细胞,这些结缔组织祖细胞也存在于周围组织(肌肉)中。

[0069] 如本文所用,术语“患者”包括动物界的成员,包括但不限于人类。

[0070] 如本文所用,如果受体动物可以耐受其施用并且在其他方面适合于给该动物施用,则组合物是“药理学或生理学上可接受的”。如果施用量在生理上是显著的,则称此类药物以“治疗有效量”施用。如果药剂的存在导致受体患者的生理机能发生可检测的变化,则该药剂具有生理意义。

[0071] 如本文所用,“药学上可接受的载剂和/或稀释剂”包括任何和所有溶剂、分散介质、涂层、抗菌和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。将这种介质和试剂用于药物活性物质是本领域众所周知的。除非任何常规介质或试剂与活性成分不相容,否则考虑在治疗组合物中使用它们。补充活性成分也可以掺入到组合物中。

[0072] 如本文所用,“启动子”可以是任何具有活性并且控制真核细胞中的转录的DNA序列。启动子可以在真核细胞和原核细胞中都具有活性。优选地,启动子在哺乳动物细胞中具有活性。启动子可以是结构性表达或可诱导的。优选地,启动子是可诱导的。优选地,启动子可由外部刺激诱导。更优选地,启动子可以通过激素或金属诱导。同样,也可以将控制转录的“增强子组件”插入到DNA载体构建体中,并且与本发明的构建体一起使用以增强目的基因的表达。

[0073] 如本文所用,“受试者”是脊椎动物,优选是哺乳动物,更优选是人类。

[0074] 如本文所用,“剂量”是指规定一次或在规定的间隔内服用的指定量的治疗剂。

[0075] 如本文所用,“治疗”是用于获得有益或期望的临床结果的方法。出于本发明的目的,有益或期望的临床结果包括但不限于症状的缓解、疾病程度的减轻、疾病的稳定(即不恶化)状态、疾病进展的延迟或减慢、疾病状态的改善或缓和,以及缓解(无论是部分还是全部),无论是可检测的还是不可检测的。“治疗”也可以意味着与在不接受治疗的情况下的预期生存期相比,延长生存期。“治疗”既指治疗性治疗和防治性或预防性措施。需要治疗的人包括已经患有病症的那些以及需要预防病症的那些。“缓和(palliating)”疾病是指与未经治疗的情况相比,疾病状态的程度和/或不良临床表现减轻和/或进展的时间进程减慢或延长。

[0076] 如本文所用,“载体(vector)”、“多核苷酸载体”、“构建体”和“多核苷酸构建体”在本文可互换使用。本发明的多核苷酸载体可以是若干种形式中的任何一种,包括但不限于RNA、DNA、包封在逆转录病毒包衣中的RNA、包封在腺病毒包衣中的DNA、包装在另外病毒或病毒样形式(例如单纯疱疹和腺相关病毒(AAV))中的DNA、包封在脂质体中的DNA、与聚赖氨酸络合、与合成的聚阳离子分子络合、与化合物(例如聚乙二醇(PEG))络合以在免疫学上“掩盖”分子和/或延长半衰期、或者与非病毒蛋白偶联的DNA。优选地,多核苷酸是DNA。如本文所用,“DNA”不仅包括碱基A、T、C和G,而且还包括它们的类似物中任一种或这些碱基的修饰形式(例如甲基化核苷酸)、核苷酸间修饰(例如不带电荷的键和硫代酸盐)、糖类似物的使用,以及修饰的和/或替代的骨架结构(例如聚酰胺)。

[0077] 术语“抗体”是指针对抗原位点的特异性免疫球蛋白。将感兴趣的基因(例如编码GSK-3 α 或GSK-3 β a)克隆到表达载体中以获得由该基因编码的蛋白质,并且可以根据本领域常用的方法从蛋白质中制备抗体。抗体的类型包括多克隆抗体或单克隆抗体,并且包括所有免疫球蛋白抗体。该抗体不仅包括具有两条全长轻链和两条全长重链的完整形式,还包括具有针对抗原位点的特异性抗原结合位点(结合结构域)以保留抗原结合功能的抗体分子的功能片段,尽管它们不具有含有两条轻链和两条重链的完整抗体结构。

[0078] 除非另有说明,否则术语“多核苷酸”可以与核苷酸或核酸具有相同的含义,并且是指脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸。除非另有说明,多核苷酸可以包括天然核苷酸的类似物和具有修饰的糖或碱基部分的类似物。多核苷酸可以根据需要通过本领域已知的各种方法进行修饰。修饰的示例可以包括甲基化、加帽、用一种或多种同系物取代天然核苷酸,以及核苷酸之间的修饰,例如,修饰为不带电荷的键联(例如,甲基膦酸酯、磷酸三酯、氨基磷酸盐、氨基甲酸酯等)或带电荷的键联(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)。

[0079] 在具体实施例中,作为能够特异性结合到编码感兴趣的蛋白或其片段的核酸的化合物,能够特异性结合到编码感兴趣的蛋白或其片段的核酸的多核苷酸可以是微小RNA

(miRNA)、小干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)、Piwi相互作用RNA(piRNA)、小核RNA(snRNA)或反义寡核苷酸,其中每个都对编码感兴趣的蛋白或其片段的核酸具有特异性,或其组合。

[0080] 在另一个具体实施例中,能够特异性地结合到编码感兴趣的蛋白或其片段的核酸的化合物可以包括能够特异性结合到编码感兴趣的蛋白或其片段的核酸的多核苷酸,并且可以是CRISPR-Cas,CRISPR-Cas包括对编码感兴趣的蛋白或其片段的核酸具有特异性的向导RNA。在具体实施例中,Cas可以是Cas9。

[0081] 成簇的规律间隔的短回文重复序列(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats,CRISPR)是指在细菌或古细菌的基因组中发现的许多短直接重复序列的位点,揭示了其中的基因序列。CRISPR-Cas系统包括作为必要蛋白质组件的Cas9,其与向导RNA(特别是两种RNA,称为CRISPR RNA(crRNA)和反式激活crRNA(tracrRNA),包含在向导RNA中)形成络合物,并且它作为活性核酸内切酶。

[0082] 在具体实施例中,为了使CRISPR-Cas系统特异性地作用于感兴趣的靶标基因,向导RNA可以具有双RNA或单链向导RNA的形式,所述双RNA包括对编码感兴趣的蛋白的核酸具有特异性的CRISPR RNA(crRNA)和反式激活crRNA(tracrRNA),所述单链向导RNA包括crRNA和tracrRNA的一部分并且与编码感兴趣的蛋白的核酸杂交。双RNA和单链向导RNA可以与编码感兴趣的蛋白的多核苷酸至少部分杂交。

[0083] 具体地,向导RNA可以是双RNA或单链向导RNA,所述双RNA包括与选自编码感兴趣的蛋白的核苷酸序列的靶序列杂交的crRNA和tracrRNA,所述单链向导RNA包括crRNA和tracrRNA的一部分并且与编码感兴趣的蛋白的核苷酸杂交。作为靶标序列的感兴趣的基因包括与crRNA或sgRNA至少部分互补的多核苷酸序列,以及包括原间隔序列邻近基序(protospacer-adjacent motif,PAM)的序列。PAM可以是本领域公知的序列,其可以具有适合于由核酸酶蛋白识别的序列。由CRISPR-Cas系统靶向的感兴趣的基因可以是内源性DNA或人工DNA。编码感兴趣的蛋白的核苷酸可以是真核细胞的特异性内源性DNA,更具体地,是软骨细胞的内源性DNA。

[0084] 在具体实施例中,crRNA或sgRNA可以包括与靶标DNA互补的二十个连续的多核苷酸。编码Cas9蛋白的核酸或Cas9蛋白可以是来源于链球菌属的微生物。链球菌属的微生物可以是化脓性链球菌(streptococcus pyogenes)。PAM可以表示5'-NGG-3'三核苷酸,Cas9蛋白还可以包括在C端或N端的核定位信号(NLS)以提高效率。

[0085] 在本公开的用于促进从真核细胞中产生骨骼的组合物中,真核细胞可以是酵母细胞、真菌细胞、原生动物细胞、植物细胞、高等植物细胞、昆虫细胞、两栖动物细胞或哺乳动物细胞。哺乳动物可以是不同的,例如人类、猴子、牛、马、猪等。真核细胞可以包括从个体中分离的培养细胞(体外)、移植细胞、体内细胞或重组细胞,但不限于此。从个体中分离出来的真核细胞可以是注射从真核细胞制备的产物(包括骨骼)的个体相同的个体中分离出来的真核细胞。在这种情况下,它是有利的,因为可以防止副作用,例如不必要的超免疫反应或排斥反应,包括由注射由不同个体制备的产物产生的移植物抗宿主反应。

[0086] 在具体实施例中,真核细胞可以是成纤维细胞或软骨细胞或间充质干细胞或骨祖细胞(MC3T3-E1;前成骨细胞)。

[0087] MAST4

[0088] MAST4是源自人类(智人)或小鼠(小家鼠(*Mus musculus*))的蛋白质,但相同蛋白质也可以在其他哺乳动物(例如猴子、牛、马等)中表达。

[0089] 人源性MAST4可以包括存在于人类细胞中的十二个同种型中的任一个。十二个同种型可以包括如下氨基酸序列。同种型序列基于NCBI参考序列。

[0090] 同种型1-NP_055998.1

```
1MDESSILRRR GLQKELSLPR RGLSIDSQKW NCLVKRCRTS NRKSLIGNGQ SPALPRPHSP
61LSAHAGNSPQ DSPRNFSPSA SAHFSFARRT DGRRWLASL PSSGYGTNTP SSTVSSSCSS
121QEKLHQLPYQ PTPDELHFLS KHFCCTESIA TENRCRNTPM RPRSRSLSPG RSPACCDHEI
181IMMNHVYKER FPKATAQMEE RLKEIITSYS PDNLVPLADG VLSFTHHQII ELARDCLDKS
241HQGLITSRYF LELQHKLDKL LQEAHDRSES GELAFIKQLV RKILIVIARP ARLLECLEFD
301PEEFYLLLEA AEGHAKGQG IKTDIPRYII SQLGLNKDPL EEMAHLGNYD SGTAETPETD
361ESVSSSNASL KLRRKPRESF FETIKLISNG AYGAVYFVRH KESRQRFAMK KINKQNLILR
421NQIQQAFVER DILTFAENPF VVSMYCSFET RRHLCMVMEY VEGGDCATLM KNMGPLPVDM
481ARMYFAETVL ALEYLHNYGI VHRDLKPDNL LVTSMGHIK TDFGLSKVGL MSMTNLYEG
541HIEKDAREFL DKQVCGTPEY IAEVILRQG YGKPVDDWAM GIILYEFLVG CVPFFGDTPE
601ELFGQVISDE INWPEKDEAP PPDAQDLITL LLRQNPLERL GTGGAYEVKQ HRFFRSLDWN
661SLLRQKAEFIPQLESEDDTS YFDTRSEKYH HMETEEEDDT NDEDFNVEIR QFSSCSHRFS
721KVFSIDRIT QNSAEKEDS VDKTKSTTLP STETLSWSSE YSEMQLSTS NSSDTESNRH
781KLSSGLPKL AISTEGEQDE AASCPGDPHE EPGKALPPE ECAQEEPEVT TPASTISSST
841LSVGSFSEHL DQINGRSECV DSTDNSSKPS SEPASHMARQ RLESTEKKKI SGKVTKSLSA
901SALSMLIPGD MFAVSPLGSP MSPHSLSSDP SSSRDSSPSR DSSAASASPH QPIVIHSSGK
961NYGFTIRAIR VYVGDSDIYT VHHIVWNVEE GSPACQAGLK AGDLITHING EPVHGLVHTE
1021VIELLLKSGN KVSITTTTPE NTSIKTGPARG RNSYKSRMVR RSKKSKKKES LERRRSLFKK
1081LAKQSPPLLH TSRSFSLNR SLSSGESLPG SPTHSLSPRS PTPSYRSTPD FPSGTNSSQS
1141SSPSSAPNS PAGSGHIRPS TLHGLAPKLG GQRYRSGRRK SAGNIPLSPL ARTSPSTPQP
1201TSPQRSPSPL LGHSLGNSKI AQAFPSKMHS PPTIVRHIVR PKSAEPPRSP LLKRVQSEEK
1261LSPSYGSDKK HLCSRKHSLE VTQEEVQREQ SQREAPLQSL DENVCVPL SRARPVEQGC
1321LKRPVSRKVG RQESVDDLDR DKLKAKVVVK KADGFPEKQE SHQKSHGPGS DLENFALFKL
1381EEREKKVYPK AVERSSTFEN KASMQEAPPL GSLLKDALHK QASVRASEGA MSDGRVPAEH
1441RQGGGDFRRA PAPGTLQDGL CHSLDRGISG KGEGTEKSSQ AKELLRCEKL DSKLANIDYL
1501RKKMSLEDKE DNLCPVLKPK MTAGSHECLP GNPVRPTGGQ QEPPPAESR AFVSSTHAAQ
1561 MSAVSFVPLK ALTGRVDSGT EKPGLVAPES PVRKSPSEYK LEGRSVSCLK
PIEGTLDIAL
1621 LSGPQASKTE LPSPESAQSP SPSGDVRASV PPVLPSSSGK KNDTTSAREL
SPSSLKMNKS
1681 YLLEPWFLPP SRGLQNSPAV SLPDPEFKRD RKGPHPTARS PGTVMESNPQ
QREGSSPKHQ
1741 DHTTDPKLLT CLGQNLHSPD LARPRCPLPP EASPSREKPG LRESSERGPP
TARSERSAAR
```

1801 ADTCREPSME LCFPETAKTS DNSKNLLSVG RTHPDFYTQT QAMEKAWAPG
GKTNHKDGPG

1861 EARPPPRDNS SLHSAGIPCE KELGKVRRGV EPKPEALLAR RSLQPPGIES
EKSEKLSSFP

1921 SLQKDGAKEP ERKEQPLQRH PSSIPPPPLT AKDLSSPAAR QHCSSPSHAS
GREPGAKPST

1981 AEPSSSPQDP PKPVAAHSES SSHKPRPGPD PGPPKTKHPD RSLSSQKPSV
GATKGKEPAT

2041 QSLGGSSREG KGHSKSGPDV FPATPGSQNK ASDGIGQGEG GPSVPLHTDR
APLDAKPQPT

2101 SGGRPLEVLE KPVHLPRPGH PGPSEPADQK LSAVGEKQTL SPKHPKPSTV
KDCPTLCKQT

2161 DNRQTDKSPS QPAANTDRRA EGKKCTEALY APAEGDKLEA GLSFVHSENR
LKGAERPAAG

2221 VGKGFPEARF KGPQPQKPPT EADKPNGMKR SPSATGQSSF RSTALPEKSL
SCSSSFPETR

2281 AGVREASAAS SDTSSAKAAG GMLPAPSN RDHRKAQPAG EGRTHMTKSD
SLPSFRVSTL

2341 PLESHHPDPN TMGGASHRDR ALSVTATVGE TKGKDPAPAQ PPPARKQNVG
RDVTKPSPAP

2401 NTDRPISLSN EKDFVVRQRR GKESLRSSPH KKAL (SEQ ID NO:1) ,

[0091] 同种型2-NP_942123.1

1 MGEKVSEAPE PVPRGCSHG SRTPASALVA ASSPGASSAE SSSGSETLSE EGEPGGFSRE
61 HQPPPPPLG GTLGARAPAA WAPASVLLER GVLALPPPLP GGAVPPAPRG SSASQEEQDE
121 ELDHILSPPP MPFRKCSNPD VASGPGKSLK YKRQLSEDGR QLRRGSLGGA LTGRYLLPNP
181 VAGQAWPASA ETSNLVRMRS QALGQSAPSL TASLKELSLP RRGSLIDSQK WNCLVKRPVC
241 PNAGRTSPLG (SEQ ID NO:2) ,

[0092] 同种型3-NP_001158136.1

1 MGEKVSEAPE PVPRGCSHG SRTPASALVA ASSPGASSAE SSSGSETLSE EGEPGGFSRE
61 HQPPPPPLG GTLGARAPAA WAPASVLLER GVLALPPPLP GGAVPPAPRG SSASQEEQDE
121 ELDHILSPPP MPFRKCSNPD VASGPGKSLK YKRQLSEDGR QLRRGSLGGA LTGRYLLPNP
181 VAGQAWPASA ETSNLVRMRS QALGQSAPSL TASLKELSLP RRGSFRTSN RKSLIGNGQS
241 PALPRPHSPL SAHAGNSPQD SPRNFSPSAS AHFSFARRTD GRRWSLASLP SSGYGTNTPS
301 STVSSSCSSQ EKLHQLPYQP TPDELHFLSK HFCTTESIAT ENRCRNTPMR PRSRSLSPGR
361 SPACCDHEII MMNHVYKERF PKATAQMEER LKEIITSYSP DNVLPADGV LSFTHHQIIE
421 LARDCLDKSH QGLITSRYFL ELQHKLDKLL QEAHDRSESG ELAFIKQLVR KILIVARPA
481 RLLECLEFDP EEFYILLEAA EGHAKGQGI KTDIPRYIIS QLGLNKDPLE EMAHLGNYDS
541 GTAETPETDE SVSSSNASLK LRRKPRESDF ETIKLISNGA YGAVYFVRHK ESRQRFAMKK
601 INKQNLILRN QIQQAFVERD ILTFAENPFV VSMYCSFETR RHLCMVMEYV EGGDCATLMK

661 NMGPLPVDMA RMYFAETVLA LEYLHNYGIV HRDLKPDNLL VTSMGHIKLT DFGLSKVGLM
721 SMTTNLYEGH IEKDAREFLD KQVCGTPEYI APEVILRQGY GKPVDWWAMG I
ILYEFLVGC
781 VPFFGDTPEE LFGQVISDEI NWPEKDEAPP PDAQDLITLL LRQNPLERLG TGGAYEVKQH
841 RFFRSLDWNS LLRQKAEFIP QLESEDDTSY FDTRSEKYHH METEEEDDTN DEDFNVE
IRQ
901 FSSCSHRFSK VFSSIDRITQ NSAEEKEDSV DTKSTTLPS TETLSWSSEY SEMQQSTSN
961 SSDTESNRHK LSSGLLPKLA ISTEGEQDEA ASCPGDPHEE PGKPALPPEE CAQEEPEVTT
1021 PASTISSSTL SVGSFSEHLD QINGRSECVD STDNSSKPSS EPASHMARQR LESTEKKKI
S
1081 GKVTKSLSAS ALSLMIPGDM FAVSPLGSPM SPSLSSDPS SSRDSSPSRD
SSAASASPHQ
1141 PIVIHSSGKN YGFTIRAIRV YVGSDIYTV HHIVWNVEEG SPACQAGLKA
GDLITHINGE
1201 PVHGLVHTEV IELLKSGNK VS ITTTPFEN TS IKTGPARR NSYKSRMVR
SKKSKKKESL
1261 ERRRSLFKKL AKQPSPLLHT SRSFSLNRS LSSGESLPGS PTHSLSPRSP
TPSYRSTPDF
1321 PSGTNSSQSS SPSSSAPNSP AGSGHIRPST LHGLAPKLGG QRYRSGRRKS AGNI
PLSPLA
1381 RTPSPTPQPT SPQRSPSPLL GHSLGNSKIA QAFPSKMHSPTIVRHIVRP
KSAEPPRSPL
1441 LKRVQSEEKL SPSYGSDKKH LCSRKHSLEV TQEEVQREQS QREAPLQSLD
ENVCDVPPLS
1501 RARPVEQGCL KRPVSRKVGR QESVDDLDRD KLKAKVVVKK ADGFPEKQE S
HQKSHGPGSD
1561 LENFALFKLE EREKKVYPKA VERSSTFENK ASMQEAPPLG SLLKDALHKQ
ASVRASEGAM
1621 SDGRVPAEHR QGGGDFRRAP APGTLQDGLC HSLDRGI SGK GEGTEKSSQA
KELLRCEKLD
1681 SKLANI DYLR KKMSLEDKED NLCPVLKPKM TAGSHECLPG NPVRPTGGQQ
EPPPASESRA
1741 FVSSTHAAQM SAVSFVPLKA LTGRVDSGTE KPGLVAPESP VRKSPSEYKL
EGRSVSCLKP
1801 IEGTLDIALL SGPQASKTEL PSPESAQSPS PSGDVRASVP PVLPSSSGKK
NDTTSARELS
1861 PSSLMNKSY LLEPWFLPPS RGLQNSPAVS LPDPEFKRDR KGPHTARSP
GTVMESNPQQ
1921 REGSSPKHQD HTTDPKLLTC LGQNLHSPDL ARPRCPLPE ASPSREKPGL

RESSERGPPT

1981 ARSERSAARA DTCREPSMEL CFPETAKTSD NSKNLLSVGR THPDFYTQTQ
AMEKAWAPGG

2041 KTNHKDGPGE ARPPPRDNSS LHSAGIPCEK ELGKVRRGVE PKPEALLARR
SLQPPGIESE

2101 KSEKLSSFPS LQKDGAKEPE RKEQPLQRHP SSIPPPPLTA KDLSSPAARQ
HCSSPSHASG

2161 REPGAKPSTA EPSSSPQDPP KPVAAHSESS SHKPRPGPDP GPPKTKHPDR
SLSSQKPSVG

2221 ATKGKEPATQ SLGGSSREGK GHKSGPDVF PATPGSQNKA SDGIGQGEGG
PSVPLHTDRA

2281 PLDAKPQPTS GGRPLEVLEK PVHLPRPGHP GPSEPADQKL SAVGEKQTLS
PKHKPKSTVK

2341 DCPTLCKQTD NRQTDKSPSQ PAANTDRRAE GKKCTEALYA PAEGDKLEAG
LSFVHSENRL

2401KAERPAAGV GKGFPPEAR GKPGQKPTE ADKPNGMKRS PSATGQSSFR STALPEKSLS

2461CSSSFPETRA GVREASAASSDTSSAKAAGG MLELPAPSNR DHRKAQPAGE GRTHMTKSDS

2521LPSFRVSTLP LESHHPDPNT MGGASHRDRA LSVTATVGET KGKDPAPAPQ PPARKQNVGR

2581DVTKPSPAPN TDRPISLSNE KDFVVRQRRG KESLRSSPHK KAL (SEQ ID NO:3),

[0093] 同种型4-NP_001277155.1

1MKAQRERLQIPGLTDCRTS NRKSLIGNGQ SPALPRPHSP LSAHAGNSPQ DSPRNFSPSA

61SAHFSFARRN DRTDGRRWSL ASLPSSGYGT NTPSSTVSSS CSSQEKHLQL PYQPTPDELH

121FLSKHFCTTE SIATENRCRN TPMRPRSRL SPGRSPACCD HEIIMNHVY KERFPKATAQ

181MEERLKEIIT SYSPDNVLPL ADGVLSFTHH QIIELARDCL DKSHQGLITS RYFLELQHL

241DKLLQEAHDR SESGELAFIK QLVKILIVI ARPALLECL EFDPEEFYYL LEAAEGHAKE

301GQGIKTDIR YIISQLGLNK DPLEEAMHLG NYDSGTAETP ETDESVSSEN ASLKLRRKPR

361ESDFETIKLI SNGAYGAVYF VRHKESRQRF AMKKINKQL ILRNQIQAF VERDILTFAE

421NPFVVS MYCS FETRRHLCMV MEYVEGGDCA TLMKNMGPLP VDMARMYFAE TVLALEYLHN

481YGIVHRDLKP DNLLVTSMGH IKLTDGFLSK VGLMSMTNL YEGHIEKDAR EFLDKQVCGT

541PEYIAPEVIL RQGYGKPDW WAMGIILYEF LVGCVFFGD TPEELFGQVI SDEINWPEKD

601EAPPPDAQDL ITLLLRQNPL ERLGTGGAYE VKQHRFFRSL DWNSLLRQKA EFIPQLESED

661DTSYFDTRSE KYHHMETEEE DDTNDEDFNV EIRQFSSCSH RFSKVFSID RITQNSAEEK

721EDSVDKTKST TLPSTETLSW SSEYSEMQL STSNSSDTE NRHKLSSGLL PKLAISTEGE

781QDEAASCPGD PHEEPGKPAL PEECAQEEP EVTTPASTIS SSTLSVGSFS EHLDQINGRS

841ECVDSTDNSS KPSSEPASHM ARQRLSTEK KKISGKVTKS LSASALSLMI PGDMFAVSPL

901GSPMSPHLSLSSDPSSSRDSS PSRDSSAASA SPHQPIVIHS SGKNGFTIR AIRVYVGSD

961IYTVHHIVWN VEEGSPACQA GLKAGDLITH INGEVHGLV HTEVIELLLK SGNKVSITTT

1021PFENTSITKG PARRNSYKSR MVRRSKSKK KESLERRRSL FKKLAKQPSP LLHTSRSFSC

1081LNRSLSSGES LPGSPHLS PRSPTPSYRS TPDFPSGTNS SQSSSPSSSA PNSPAGSGHI

1141RPSTLHGLAP KLGGQRYRSG RRKSAGNIPL SPLARTPSPT PQPTSPQRSP SPLLGHS LGN
1201SKIAQAFPSK MHSPTIVRH IVRPKSAEPP RSPLLKRVQS EEKLSPSYGS DKKHLCSRKH
1261SLEVTQEEVQ REQSQREAPL QSLDENVC DV PPLSRARPVE QGCLKRPVSR KVGRQESVDD
1321LDRDKLKAKV VVKKADGFPE KQESHQKSHG PGSDLENFAL FKLEEREKKV YPKAVERSST
1381FENKASMQEA PPLGSLLKDA LHKQASVRAS EGAMSDGRVP AEHRQGGGDF RRAPAPGTLQ
1441DGLCHSLDRG ISGKGEGTEK SSQAKELLRC EKLD SKLANI DYLRKKMSLE DKEDNLCPVL
1501KPKMTAGSHE CLPGNPVRPT GGQQEPPPAS ESRA FVSSTH AAQMSAVSFV PLKALTGRVD
1561SGTEKPGLVA PESPV RKSPS EYKLEGRSVS CLKPIEGTLD IALLSGPQAS KTELPSPE SA
1621QSPSPSGDVR ASVPPVLPSS SGKKNDTTSA RELSPSSLKM NKSYPLEPWF LPPSRGLQNS
1681PAVSLPDPEF KRDRKGPHPT ARSPGTVMES NPQQREGSSP KHQDHTTDPK LLTCLGQNLH
1741SPDLARPCP LPPEASPSRE KPGLRESSER GPPTARSERS AARADTCREP SMELCFPETA
1801KTSDNSKNLL SVGRTHPDFY TQTQAMEKAW APGGKTNHKD GPGEARPPPR DNSSLHSAGI
1861PCEKELGKVR RGVEPKPEAL LARRSLQPPG IESEKSEKLS SFPSLQKDGA KEPERKEQPL
1921QRHPSSI PPP PLTAKDLSSP AARQHCS SPS HASGREPGAK PSTAEPSSSP QDPPKPVA AH
1981SESSSHKPRP GPDPGPPKTK HPDRSLSSQK PSVGATKGKE PATQSLGGSS REGKGHSKSG
2041PDVFPATPGS QNKASDGIGQ GEGGPSVPLH TDRAPLDAKP QPTSGGRPLE VLEKPVHLPR
2101PGHPGPSEPA DQKLSAVGEK QTLSPKHPKP STVKDCPTLC KQTDNRQTDK SPSQPAANTD
2161RRAEGKKCTE ALYAPAEGDK LEAGLSFVHS ENRLKGAERP AAGVGKGFPE ARGKGPGPQK
2221PPTADKPNG MKRSPSATGQ SSFRSTALPE KSLSCSSSFP ETRAGVREAS AASDTS SAK
2281AAGGMELEPA PSNRDHRKAQ PAGEGRTHMT KSDSLPSFRV STLPLESHHP DPNTMG GASH
2341RDRALSVTAT VGETKGKDPA PAQPP PARKQ NVGRDVT KPS PAPNTDRPIS LSNEKDFVVR
2401QRRGKESLRS SPHKAL (SEQ ID NO:4) ,

[0094] 同种型5-NP_001277156.1

1MDMSDPNFWT VLSNFTLPHL RSGNRLRRTQ SCRTSNR KSL IGNGQSPALP RPHSPLSAHA
61GNSPQDPRN FSPSASAHFS FARRTDGRRW SLASLPSSGY GTNTPSSTVS SSCSSQEK LH
121QLPYQPTPDE LHFLSKHFCT TESIATENRC RNTPMRPRSRLSPGRSPAC CDHEIIMN H
181VYKERFPKAT AQMEERLKEI ITSYS PDNL PLADGVLSFT HHQI IELARD CLDKSHQGLI
241TSRYFLELQH KLDKLLQEAH DRSESGELAF IKQLVRKILI VIARPARLLE CLEFDPEEFY
301YLLEAAEGHA KEGQGIKTDIPRYIISQLGL NKDPLEEMAH LGNYDSGTAE TPETDES VSS
361SNASLKLRRK PRESDFETIK LISNGAYGAV YFVRHKESRQ RFAMKKINKQ NLILRNQIQQ
421AFVERDILTF AENPFVVS MY CSFETRRLHC MVMEYVEGGD CATLMKNMGP LPVDMARMYF
481AETVLALEYL HNYGIVHRDL KPDNLLVTSM GHIKLTDFGL SKVGLMSMTT NLYEGHIEKD
541AREFLDKQVC GTPEYIAPEV ILRQGYGKPV DWWAMGIILY EFLVGCVPFF GDTPEELFGQ
601VISDEINWPE KDEAPPPDAQ DLITLLLRQN PLERLGTGGA YEVKQHRFFR SLDWNSLLRQ
661KA EFIPQLES EDDTSYFDTR SEKYHHMETE EEDDTNDEDF NVEIRQFSSC SHRF SKVFSS
721IDRITQNSAE EKEDSV DTK STTL PSTETL SWSSEYSEM QQLSTSNSSDT ESNRHLKSSG
781LLPKLAISTE GEQDEAASCP GDPHEEPGKP ALPPEECAQE EPEVTT PAST ISSSTLS DMF
841AVSPLGSPMS PHSLS SDPSS SRDSSPSRDS SAASASPHQP IVIHSSGKNY GFTIRAIRVY
901VGDSDIYTVH HIVWNVEEGS PACQAGLKAG DLITHINGEP VHGLVHTEVI ELLKSGNKV

961SITTTTFENT SIKTGPARRN SYKSRMVRRS KKSkkkesle RRRSLFKKLA KQPSPllhts
 1021RSFSCLNRSL SSGESLPGSP THSLSPRSPT PSYRSTPDFP SGTNSSQSSS PSSSAPNSPA
 1081GSGHIRPSTL HGLAPKLGGQ RYRSGRRKSA GNIPLSPLAR TPSPTPQPTS PQRSPSPllG
 1141HSLGNSKIAQ AFPSKMHSPP TIVRHIVRPK SAEPPRSPLL KRVQSEEKLS PSYGSDKKHL
 1201CSRKHSLEVT QEEVQREQSQ REAPLQSLDE NVCDVPPLSR ARPVEQGCLK RPSVRKVGQR
 1261ESVDDLDRDK LKAKVVVKA DGFPEKQESH QKSHGPGSDL ENFALFKLEE REKKVYPKAV
 1321ERSSTFENKA SMQEAPPLGS LLKDALHKQA SVRASEGAMSDGRVPAEHRQ GGGDFRRAPA
 1381PGTLQDGLCH SLDRGISGKG EGTEKSSQAK ELLRCEKlds KLANIDYLRK KMSLEDKEDN
 1441LCPVLKPKMT AGSHECLPGN PVRPTGGQQE PPPASESRAF VSSTHAAQMS AVSFVPLKAL
 1501TGRVDSGTEK PGLVAPESPV RKSPSEYKLE GRSVSCLKPI EGTLDIALLS GPQASKTELP
 1561SPESAQSPSP SGDVRASVPP VLPSSSGKKN DTTSARELSP SSLKMNSYL LEPWFLPPSR
 1621GLQNSPAVSL PDPEFKRDRK GPHPTARSPG TVMESNPQQR EGSSPKHQDH TTDPKLLTCL
 1681GQNLHSPDLA RPRCPLPEA SPSREKPLR ESSERGPTA RSERSAARAD TCREPSMELC
 1741FPETAkTSDN SKNLLSVGRT HPDFYTQTQA MEKAWAPGGK TNHKDGPGEA RPPPRDNSSL
 1801HSAGIPCEKE LGKVRRGVEP KPEALLARRS LQPPGIESEK SEKLSSFFPSL QKDGAKEPER
 1861KEQPLQRHPS SIPPPPLTAK DLSSPAARQH CSSPSHASGR EPGAKPSTAE PSSSPQDPPK
 1921PVAAHSESSS HKPRPGPDGP PPKTKHPDRS LSSQKPSVGA TKGKEPATQS LGGSSREGKG
 1981HSKSGPDVFP ATPGSQNKASDGIGQEGGSPVPLHTDRAP LDAKPQPTSG GRPLEVLEKP
 2041VHLPRPGHPGPSEPADQKLS AVGEKQTLSP KHPKPSTVKD CPTLCKQTDN RQTDKSPSQP
 2101AANTDRRAEG KKCTEALYAP AEGDKLEAGL SFVHSENRLK GAERPAAGVG KGFPEARHGK
 2161PGPQKPTEA DKPNGMKRSP SATGQSSFRS TALPEKSLSC SSSFPETRAG VREASAASSD
 2221TSSAKAAGGM LELPAPSNRD HRKAQPAGEG RTHMTKSDSL PSFRVSTLPL ESHHPDPNTM
 2281GGASHRDAL SVTATVGETK GKDPAPAQPP PARKQNVGRD VTKPSPAPNT DRPISLSNEK
 2341DFVVRQRRGK ESLRSSPHKK AL (SEQ ID NO:5) ,

[0095] 同种型6-NP_001277157.1

1MGEKVSEAPE PVPRGCSHG SRTPASALVA ASSPGASSAE SSSGSETLSE EGEPGGFSRE
 61HQPPPPPLG GTLGARAPAA WAPASVLLER GVLALPPPLP GGAVPPAPRG SSASQEEQDE
 121ELDHILSPPP MPFRKCSNPD VASGPGSLK YKRQLEDGR QLRRGSLGGA LTGRYLLPNP
 181VAGQAWPASA ETSNLVRMRS QALGQSAPSL TASLKELSLP RRGSFVPCPN AGRTSPLG

(SEQ ID NO:6) ,

[0096] 同种型7-NP_001284580.1

1 MDMSDPNFWT VLSNFTLPHL RSGNRLRRTQ SCRtSNRKSL IGNGQSPALP RPHSPLSAHA
 61 GNSPQDSPRN FSPSASAHFS FARRTDGRW SLASLPSSGY GTNTPSSTVS SSCSSQEKHL
 121 QLPYQPTPDE LHFLSKHFCT TESIATENRC RNTPMRPRS SLSPGRSPAC CDHE I

IMMNH

181 VYKERFPKAT AQMEERLKE I ITSYPDNVL PLADGVLSFT HHQIIELARD
 CLDKSHQLI

241 TSRYFLELQH KLDKLLQEAH DRSESGELAF IKQLVRKILI VIARPARLLE CLEFDPEEFY
 301 YLLEAAEGHA KEGQGIKTDI PRYIISQLGL NKDPLEEMAH LGNYDSGTAE TPETDESvss

361 SNASLKLRRK PRESDFETIK LISNGAYGAV YFVRHKESRQ RFAMKKINKQ NLILRNQIQQ
421 AFVERDILTF AENPFVVS MY CSFETRRHLC MVMEYVEGGD CATLMKNMGP LPVDMARMYF
481 AETVLALEYL HNYGIVHRDL KPDNLLVTSM GHIKLTDFGL SKVGLMSMTT NLYEGHIEKD
541 AREFLDKQVC GTPEYIAPEV ILRQGYGKPV DWWAMGIILY EFLVGCVPFF GDTPEELFGQ
601 VISDEINWPE KDEAPPPDAQ DLITLLLRQN PLERLGTGGA YEVRQHRFFR SLDWNSLLRQ
661 KAEFIPQLES EDDTSYFDTR SEKYHHMETE EDDTNDDEF NVEIRQFSSC SHRFQSKVFSS
721 IDRITQNSAE EKEDSVDKTK STTLPTSTETL SWSSEYSEM QQLSTNSSDT ESNRHLSSG
781 LLPKLAISTE GEQDEAASCP GDPHEEPGKP ALPPEECAQE EPEVTTTAST I
SSSTLSVGS
841 FSEHLDQING RSECVDSTDN SSKPSSEPAS HMARQRLEST EKKKISGKVT KSLSASALS
901 MIPGDMFAVS PLGSPMSPHS LSSDPSSSRD SSPSRDSSAA SASPHQPIVI HSSGKNYGFT
961 IRAIRVYVGD SDIYTVHHIV WNVEEGSPAC QAGLKAGDLI THINGEPVHG LVHTEVIELL
1021 LKSGNKVSIT TTPFENTS IK TGPARRNSYK SRMVRRSKKS KKESLERRR
SLFKKLAKQP
1081 SPLHTSRSF SCLNRSLSG ESLPGSPTHS LSPRSPTPSY RSTPDFPSGT
NSSQSSSPSS
1141 SAPNSPAGSG HIRPSTLHGL APKLGGQRYR SGRRKSAGNI PLSPLARTPS
PTPQPTSPQR
1201 SPSPLLGHSL GNSKIAQAFP SKMHSPPTIV RHIVRPKSAE PPRSPLLKRV
QSEEKLSPSY
1261 GSDKKHLCSR KHSLEVTQEE VQREQSQREA PLQSLDENVC DVPPLSRARP
VEQGCLKRPV
1321 SRKVGRQESV DDLDRDKLKA KVVVKKADGF PEKQESHQKS HPGSDLENF
ALFKLEEREK
1381 KVYPKAVERS STFENKASM Q EAPPLGSLK DALHKQASVR ASEGAMSDGR
VPAEHRQGGG
1441 DFRRAPAPGT LQDGLCHSLD RGISGKGEGT EKSSQAKELL RCEKLD SKLA NI
DYLKMKMS
1501 LEDKEDNLCP VLKPKMTAGS HECLPGNPVR PTGGQQEPPP ASESRAVSS
THAAQMSAVS
1561 FVPLKALTGR VDSGTEKPGL VAPESPVRKS PSEYKLEGRS VSCLKPIEGT
LDIALLSGPQ
1621 ASKTELPSPE SAQSPSPSGD VRASVPPVLP SSSGKKNDTT SARELSPSSL
KMNKSYLLEP
1681 WFLPPSRGLQ NSPAVSLPDP EFKRDRKGPH PTARSPGTVM ESNPQQREGS
SPKHQDHTTD
1741 PKLLTCLGQN LHSPDLARPR CPLPPEASPS REKPGLRESS ERGPPTARSE
RSAARADTCR
1801 EPSMELCFPE TAKTSDNSKN LLSVGRTHPD FYTQTQAMEK AWAPGGKTNH

KDGPGEARPP

1861PRDNSSLHSA GIPCEKELGK VRRGVEPKPE ALLARRSLQP PGIESEKSEK LSSFPSSLQKD
1921GAKEPERKEQ PLQRHPSSIP PPPLTAKDLS SPAARQHCSS PSHASGREPG AKPSTAEPSS
1981SPQDPPKPVA AHSESSSHKP RGPDPGPPK TKHPDRSLSS QKPSVGATKG KEPATQSLGG
2041SSREGKGHSK SGPDVFPATP GSQNKASDGI GQEGGGSVP LHTDRAPLDA KPQPTSGGRP
2101LEVLEKPVHL PRPGHPGPSE PADQKLSAVG EKQTLSPKHP KPSTVKDCPT LCKQTDNRQT
2161DKSPSQPAAN TDRRAEGKKC TEALYAPAEG DKLEAGLSFV HSENRLKGAE RPAAGVGKGF
2221PEARKGPGP QKPPTADKP NGMKRSPSAT GQSSFRSTAL PEKSLSCSSS FPETRAGVRE
2281ASAASDTS AKAAGGMLEL PAPSNDHRK AQPAGEGRTH MTKSDSLPSF RVSTLPLESH
2341HPDPNTMGGA SHRDRLSVT ATVGETKGKD PAPAQPPPAR KQNVGRDVT K PSPAPNTDRP
2401ISLSNEKDFV VRQRRGKESL RSSPHKKAL (SEQ ID NO:7),

[0097] 同种型8-NP_001380453.1

1MGEKVSEAPE PVPRGCSHG SRTPASALVA ASSPGASSAE SSSGSETLSE EGEPPGFSRE
61HQPPPPPLG GTLGARAPAA WAPASVLLER GVLALPPPLP GGAVPPAPRG SSASQEEQDE
121ELDHILSPPP MPFRKCSNPD VASGPGKSLK YKRQLEDGR QLRRGSLGGA LTGRYLLPNP
181VAGQAWPASA ETSNLVRMRS QALGQSAPSL TASLKELSLP RRGSEFCRTSN RKSLIGNGQS
241PALPRPHSPL SAHAGNSPQD SPRNFSPSAS AHFSFARRND RTDGRRWSLA SLPSSGYGTN
301TPSSTVSSSC SSQEKHLQLP YQPTDELHF LSKHFCTTES IATENRCRNT PMRPRSRLS
361PGRSPACCDH EIIMNHVYK ERFPKATAQM EERLKEIITS YSPDNVLPLA DGVLSFTHHQ
421IIELARDCLD KSHQGLITSR YFLELQHKLD KLLQEAHDRS ESGELAFIKQ LVRKILIVIA
481RPARLLECLE FDPEEFYLL EAAEGHAKEG QGIKTDIPRY IISQLGLNKD PLEEMAHGN
541YDSGTAETPE TDESVSNSA SLKLRRKPRE SDFETIKLIS NGAYGAVYFV RHKESRQRFA
601MKKINKQLI LRNQQQAFV ERDILTFAEN PFVVMYCSF ETRRHLCMVM EYVEGGDCAT
661LMKNMGPLPV DMARMYFAET VLALEYLHNY GIVHRDLKPD NLLVTSMGHI KLTDGFLSKV
721GLMSMTTLY EGHIEKDARE FLDKQVCGTP EYIAPEVILR QGYGKPVDDW AMGIILYEF
781VGCVPFFGDT PEELFGQVISDEINWPEKDE APPDAQDLI TLLLRQNPLE RLGTGGAYEV
841KQHRFFRSLD WNSLLRQKAE FIPQLESEDD TSYFDTRSEK YHMETEEED DTNDEDFNVE
901IRQFSSCSHR FSKVFSSIDR ITQNSAEEKE DSVDTKSTT LPSTETLSWS SEYSEMQQLS
961TSNSSDTESN RHLSSGLLP KLAISTEGEQ DEAASCPGDP HEEPGKPALP PEECAQEEPE
1021VTTTPASTISS STLSVGSFSE HLDQINGRSE CVDSTDNSSK PSSEPASHMA RQRLESTEKK
1081KISGKVTSL SASALSLMIP GDMFAVSPLG SPMSPHSLSSDPSSSRDSSP SRDSSAASAS
1141PHQPIVIHSS GKNYGFTIRA IRVYVGSDI YTVHHIVWNV EEGSPACQAG LKAGDLITHI
1201NGEPVHGLVH TEVIELLLKS GNKVSITTP FENTSIKTGP ARRNSYKSRM VRRSKSKSKK
1261ESLERRRSLF KKLAKQPSPL LHTSRFSCL NRSLSGSEL PGSPTHSLSP RSPTPSYRST
1321PDFPSGTNSS QSSSPSSSAP NSPAGSGHIR PSTLHGLAPK LGGQRYRSGR RKSAGNIPLS
1381PLARTPSPTP QPTSPQRSPS PLLGHSLGNS KIAQAFPSKM HSPPTIVRHI VRPKSAEPPR
1441SPLLKRVQSE EKLSPSYGSD KKHLCRKHLS LEVTQEEVQR EQSQREAPLQ SLDENVCDVP
1501PLSRARPVEQ GCLKRPVSRK VGRQESVDDL DRDKLKAKVV VKKADGFPEK QESHQKSHGP
1561GSDLENFALF KLEEREKKVY PKAVERSSTF ENKASMQEAP PLGSLKDAL HKQASVRASE

1621GAMSDGRVPA EHRQGGGDFR RAPAPGTLQD GLCHSLDRGI SGKGEGTEKS SQAPELLRCE
 1681KLDSKLANID YLRKKMSLED KEDNLCPVLK PKMTAGSHEC LPGNPVRPTG GQQEPPPPASE
 1741SRAVSVSTHA AQMSAVSFVP LKALTGRVDS GTEKPGLVAP ESPVRKSPSE YKLEGRSVSC
 1801LKPIEGTLDI ALLSGPQASK TELPSPESAQ SPSPSGDVRA SVPPVLPSSS GKKNDDTSAR
 1861ELSPSSLKMN KSYLLEPWFL PPSRGLQNSP AVSLPDPEFK RDRKGPHPTA RSPGTVMESN
 1921PQQREGSSPK HQDHTTDPKL LTCLGQNLHS PDLARPCPL PPEASPSREK PGLRESSERG
 1981PPTARSERSA ARADTCREPS MELCFPETAK TSDNSKNLLS VGRTHPDFYT QTQAMEKAWA
 2041PGGKTNHKDG PGEARPPPRD NSSLHSAGIP CEKELGKVRR GVEPKPEALL ARRSLQPPGI
 2101ESEKSEKLSS FPSLQKDGA EPERKEQPLQ RHPSSIPIPP LTAKDLSSPA ARQHCCSSPSH
 2161ASGREPGAKP STAEPSSSPQ DPPKPVAHS ESSSHKPRPG PDPGPPKTKH PDRSLSSQKP
 2221SVGATKGKEP ATQSLGGSSR EGKGHSKSGP DVFPATPGSQ NKASDGIGQG EGGPSVPLHT
 2281DRAPLDAKPQ PTSGGRPLEV LEKPVHLPRP GHPGPSEPAD QKLSAVGEKQ TLSPKHPKPS
 2341TVKDCPTLCK QTDNRQTDKS PSQPAANTDR RAEGKKCTEA LYAPAEQDKL EAGLSFVHSE
 2401NRLKAERPA AGVGKGFPEA RGKGPQPQKP PTEADKPNGM KRSPSATGQS SFRSTALPEK
 2461SLSCSSSFPE TRAGVREASA ASSDTSSAKA AGGMLLPAP SNRDHRKAQP AGEGRTHMTK
 2521SDSLPSFRVS TLPLESHHPD PNTMGGASHR DRALSVTATV GETKGKDPAP AQPPPPARKQN
 2581VGRDVTKPSP APNTDRPISL SNEKDFVVRQ RRGKESLRSS PHKKAL (SEQ ID NO:8) ,

[0098] 同种型9-NP_001380454.1

1MGEKVSEAPE PVPRGCSHG SRTPASALVA ASSPGASSAE SSSGSETLSE EGEPPGGSRE
 61HQPPPPPPPLG GTLGARAPAA WAPASVLLER GVLALPPPLP GGAVPPAPRG SSASQEEQDE
 121ELDHILSPPP MPFRKCSNPD VASGPGKSLK YKRQLEDGR QLRRGSLGGA LTGRYLLPNP
 181VAGQAWPASA ETSNLVRMRS QALGQSAPSL TASLKELSLP RRGSF CRTSN RKSLIGNGQS
 241PALPRPHSPL SAHAGNSPQD SPRNFSPSAS AHFSFARRTD GRRWSLASLP SSGYGTNTPS
 301STVSSSCSSQ EKLHQLPYQP TPDELHFLSK HFCTTESIAT ENRCRNTPMR PRSRSLSPGR
 361 SPACCDHEII MMNHVYKERF PKATAQMEER LKEIITSYSP DNVLPADGV LSFTHHQIIE
 421 LARDCLDKSH QGLITSRYFL ELQHKLDKLL QEAHDRSESG ELAFIKQLVR KILIVIARPA
 481 RLLECLEFDP EEFYLLLEAA EGHAKGQGI KTDIPRYIIS QLGLNKDPLE EMAHLGNYDS
 541 GTAETPETDE SVSSSNASLK LRRKPRESDF ETIKLISNGA YGAVYFVRHK ESRQRFAMKK
 601 INKQNLILRN QIQQAVERD ILTFAENPFV VSMYCSFETR RHLCMVMEYV EGGDCATLMK
 661 NMGPLPVDMA RMYFAETVLA LEYLHNYGIV HRDLKPDNLL VTSMGHIKLT DFGLSKVGLM
 721 SMTTNLYEGH IEKDAREFLD KQVCGTPEYI APEVILRQGY GKPVDWWAMG I

ILYEFLVGC

781 VPFFGDTPEE LFGQVISDEI NWPEKDEAPP PDAQDLITLL LRQNPLERLG TGGAYEVKQH
 841 RFFRSLDWNS LLRQKAEFIP QLESEDDTSY FDTRSEKYHH METEEEDDTN DEDFNVE

IRQ

901 FSSCSHRFSK VFSSIDRITQ NSAEKEDSV DTKSTTLPS TETLSWSSEY SEMQQLSTSN
 961 SSDTESNRHK LSSGLLPKLA ISTEGEQDEA ASCPGDPHEE PGKPALPPEE CAQEEPEVTT
 1021 PASTI SSSTL SDMFAVSPLG SPMSPHSLSS DPSSSRDSSP SRDSSAASAS

PHQPIVIHSS

1081 GKNYGFTIRA IRVYVGSDI YTVHHIVWNV EEGSPACQAG LKAGDLITHI
NGEPVHGLVH

1141 TEVIELLLKS GNKVS ITTTP FENTS IKTGP ARRNSYKSRM VRRSKKSKKK
ESLERRSLF

1201 KKLAKQPSPL LHTSRFSCL NRSLSGESL PGSPTHSLSP RSPTPSYRST
PDFPSGTNSS

1261 QSSSPSSSAP NSPAGSGHIR PSTLHGLAPK LGGQRYRSGR RKSAGNI PLS
PLARTPSPTP

1321 QPTSPQRSPS PLLGHSLGNS KIAQAFPSKM HSPPTIVRHI VRPKSAEPPR
SPLLKRVQSE

1381 EKLSPSYGSD KKHLC SRKHS LEVTQEEVQR EQSQREAPLQ SLDENVCDVP
PLSRARPVEQ

1441 GCLKRPVSRK VGRQESVDDL DRDKLKAKVV VKKADGFPEK QESHQKSHGP
GSDLENFALF

1501 KLEEREKKVY PKAVERSSTF ENKASMQEAP PLGSLKDAL HKQASVRASE
GAMSDGRVPA

1561 EHRQGGGDFR RAPAPGTLQD GLCHSLDRGI SGKGEGTEKS SQAKELLRCE KLDSKLANI
D

1621 YLRKKMSLED KEDNLCPVLK PKMTAGSHEC LPGNPVRPTG GQQEPPPAE
SRAVVSSTA

1681 AQMSAVSFVP LKALTGRVDS GTEKPGLVAP ESPVRKSPSE YKLEGRSVSC
LKPIEGTLDI

1741 ALLSGPQASK TELPSPESAQ SPSPSGDVRA SVPPVLPSSS GKNDTTSAR
ELSPSSLKMN

1801 KSYLLEPWFL PPSRGLQNSP AVSLPDPEFK RDRKGPHPTA RSPGTVMESN
PQQREGSSPK

1861 HQDHTTDPKL LTCLGQNLHS PDLARPRCPL PPEASPSREK PGLRESSER
PPTARSERSA

1921 ARADTCREPS MELCFPETAK TSDNSKNLLS VGRTHPDFYT QTQAMEKAWA
PGGKTNHKDG

1981 PGEARPPPRD NSSLHSAGI P CEKELGKVRR GVEPKPEALL ARRLQPPGI
ESEKSEKLSS

2041 FPSLQKDGA EPERKEQPLQ RHPSSI PPP LTAKDLSSPA ARQHCSSPSH
ASGREPGAKP

2101 STAEPSSSPQ DPPKPVAHS ESSHKPRPG PDPGPPKTKH PDRSLSSQKP
SVGATKGKEP

2161 ATQSLGGSSR EGKGHSKSGP DVFPATPGSQ NKASDGIGQG EGGPSVPLHT
DRAPLDAKPQ

2221PTSGGRPLEV LEKPVHLPRP GHPGPSEPAD QKLSAVGEKQ TLSPKHPKPS TVKDCPTLCK

2281QTDNRQTDKS PSQPAANTDR RAEGKKCTEA LYAPAECDKL EAGLSFVHSE NRLKGAERPA
2341AGVGKGFPEA RGKGGPGQKP PTEADKPNGM KRSPSATGQS SFRSTALPEK SLSCSSSFPE
2401TRAGVREASA ASSDTSSAKA AGGMLELPAP SNRDHRKAQP AGEGRTHMTK SDSLPSFRVS
2461TLPLESHHPD PNTMGGASHR DRALSVTATV GETKGKDPAP AQPPPARKQN VGRDVTKPSP
2521APNTDRPISL SNEKDFVVRQ RRGKESLRSS PHKKAL (SEQ ID NO:9),

[0099] 同种型10-NP_001380455.1

1MDESSILRRR GLQKELSLPR RGLIDSQKW NCLVKRCRTS NRKSLIGNGQ SPALPRPHSP
61LSAHAGNSPQ DSPRNFPSA SAHFSFARRT DGRRWSLASL PSSGYGTNP SSTVSSSCSS
121QEKLHQLPYQ PTPDELHFLS KHFCCTESIA TENRCRNTPM RPRSRLSPG RSPACCDHEI
181IMMNHVYKER FPKATAQMEE RLKEIITSYS PDNVLPLADG VLSFTHHQII ELARDCLDKS
241HQGLITSRYF LELQHKLDKL LQEAHDRSES GELAFIKQLV RKILIVARP ARLLECLEFD
301PEEFYYLLEA AEGHAKGQG IKTDIPRYII SQLGLNKDPL EEMAHLGNYD SGTAETPETD
361ESVSSSNASL KLRRKPRES FETIKLISNG AYGAVYFVRH KESRQRFAMK KINKQNLILR
421NQIQQAFVER DILTFAENPF VVSMYCSFET RRHLCMVMEY VEGGDCATLM KNMGPLPVD
481ARMYFAETVL ALEYLHNYGI VHRDLKPDNL LVTSMGHIK TDFGLSKVGL MSMTNLNIEG
541HIEKDAREFL DKQVCGTPEY IAEVILRQG YGKPVDDWAM GIILYEFLVG CVPFFGDTPE
601ELFGQVISDE INWPEKDEAP PPDAQDLITL LLRQNPLERL GTGGAYEVKQ HRFFRSLDWN
661SLLRQKAEIFPQLESEDDTS YFDTRSEKYH HMETEEEDDT NDEDFNVEIR QFSSCSHRFS
721KVFSIDRIT QNSAEEKEDS VDKTKSTTLP STETLSWSSE YSEMQLSTS NSSDTESNRH
781KLSSGLLPKL AISTEGEQDE AASCPGDPHE EPGKPALPE ECAQEEPEVT TPASTISSST
841LSDMFAVSPL GSPMSPHSLSSDPSSSRDSS PSRDSSAASA SPHQPIVIHS SGKNYGFTIR
901AIRVYVGSD IYTVHHIVWN VEEGSPACQA GLKAGDLITH INGEVHGLV HTEVIELLLK
961SGNKVSITT PFENTSITG PARRNSYKSR MVRRSKSKK KESLERRRSL FKKLAKQPS
1021LLHTRSRSFSC LNRSLSSGES LPGSPTHLS PRSPTPSYRS TPDFPSGTNS SQSSSPSSSA
1081PNPAGSGHI RPSTLHGLAP KLGGQRYRSG RRKSAGNIPL SPLARTPSPT PQPTSPQRSP
1141SPLLGHSLGN SKIAQAFPSK MHSPPTIVRH IVRPKSAEPP RSPLLKRVQS EEKLSPSYGS
1201DKKHLCSRKH SLEVTQEEVQ REQSQREAPL QSLDENVCV PPLSRARPVE QGCLKRPVSR
1261KVGRQESVDD LDRDKLKAKV VVKKADGFPE KQESHQKSHG PGSDLENFAL FKLEEREKKV
1321YPKAVERSST FENKASMGEA PPLGSLLKDA LHKQASVRAS EGAMSDGRVP AEHRQGGGDF
1381RRAPAPGTLQ DGLCHSLDRG ISGKGEGTEK SSQAKELLRC EKLDKLANIDYLRKKMSLE
1441DKEDNLCPVL KPKMTAGSHE CLPGNPVRPT GGQGEPPPAS ESRAFVSSTH AAQMSAVSFV
1501PLKALTGRVD SGTEKPGLVA PESPVKSPS EYKLEGRSVS CLKPIEGTLD IALLSGPQAS
1561KTELPSPEA QSPSPSGDVR ASVPPVLPSS SGKKNDTTSA RELSPSSLKM NKSYPLEPWF
1621LPPSRGLQNS PAVSLPDPEF KRDRKGPHPT ARSPGTMES NPQQREGSSP KHDHTTDPK
1681LLTCLGQNLH SPDLARPCP LPPEASPSRE KPGLRESSER GPPTARSERS AARADTCREP
1741SMELCFPETA KTSDNSKNLL SVGRTHPDFY TQTQAMEKAW APGGKTNHKD GPGEARPPPR
1801DNSSLHSAGIPCEKELGKVR RGVEPKPEAL LARRSLQPPG IESEKSEKLS SFPSLQKDGA
1861KEPERKEQPL QRHPSSIPPP PLTAKDLSSP AARQHCSSPS HASGREPGAK PSTAEPSSSP
1921QDPPKPVAH SESSHKPRP GPDPGPPKTK HPDRSLSSQK PSVGATKGKE PATQSLGGSS

1981REGKGHSKSG PDVFPATPGS QNKASDGIGQ GEGGPSVPLH TDRAPLDAKP QPTSGGRPLE
2041VLEKPVHLPR PGHPGPSEPA DQKLSAVGEK QTLSPKHPKP STVKDCPTLC KQTDNRQTDK
2101SPSQPAANTD RRAEGKKCTE ALYAPAEGDK LEAGLSFVHS ENRLKGAERP AAGVGKGFPE
2161ARGKGPGPQK PPTADKPNG MKRSPSATGQ SSFRSTALPE KSLSCSSSFP ETRAGVREAS
2221AASSDTSSAK AAGGMLELPA PSNRDHRKAQ PAGEGRTHMT KSDSLPSFRV STLPLESHHP
2281DPNTMGGASH RDRALSVTAT VGETKGKDPA PAQPPPARKQ NVGRDVTKPS PAPNTDRPIS
2341LSNEKDFVVR QRRGKESLRS SPHKAL (SEQ ID NO:10) ,

[0100] 同种型11-NP_001380456.1

1MDMSDPNFWT VLSNFTLPHL RSGNRLRRTQ SCRTSNRKSL IGNGQSPALP RPHSPLSAHA
61GNSPQDSPRN FSPSASAHFS FARRTDGRRW SLASLPSSGY GTNTPSSTVS SSCSSQEKHLH
121QLPYQPTPDE LHFLSKHFCT TESIATENRC RNTPMRPSR SLSPGRSPAC CDHEIIMMNH
181VYKERFPKAT AQMEERLKEI ITSYSNDNL PLADGVLSFT HHQIIEIARD CLDKSHQGLI
241TSRYFLELQH KLDKLLQEAH DRSESGELAF IKQLVRKILI VIARPARLLE CLEFDPEEFY
301YLLEAAEGHA KEGQGIKTDIPRYIISQLGL NKDPLEEMAH LGNYDSGTAE TPETDESVS
361SNASLKLRRK PRESDFETIK LISNGAYGAV YFVRHKESRQ RFAMKKINKQ NLILRNQIQQ
421AFVERDILTF AENPFVVS MY CSFETRRHLC MVMEYVEGGD CATLMKNMGP LPVDMARMYF
481AETVLALAYL HNYGIVHRDL KPDNLLVTSM GHIKLTDFGL SKVGLMSMTT NLYEGHIEKD
541AREFLDKQVC GTPEYIAPEV ILRQGYGKPV DWWAMGIILY EFLVGCVPFF GDTPEELFGQ
601VISDEINWPE KDEAPPPDAQ DLITLLLRQN PLERLGTGGA YEVKQHRFFR SLDWNSLLRQ
661KAEFIPQLES EDDTSYFDTR SEKYHHMETE EEDDTNEDF NVEIRQFSSC SHRFSSKVFSS
721IDRITQNSAE EKEDSVDKTK STTLPTSTETL SWSSEYSEM QQLSTSNSSDT ESNRHLSSG
781LLPKLAISTE GEQDEAASCP GDPHEEPGKP ALPPEECAQE EPEVTTTAST ISSSTLSDMF
841AVSPLGSPMS PHSLSDDPSS SRDSSPSRDS SAASASPHQP IVIHSSGKNY GFTIRAIRVY
901VGDSDIYTVH HIVWNVEEGS PACQAGLKAG DLITHINGEP VHGLVHTEVI ELLKSGNKKV
961SITTTTFENT SIKTGPARRN SYKSRMVRSS KSKKKESLE RRRSLFKKLA KQPSPLLHTS
1021RSFSLNRSL SSGESLPGSP THSLSPRSPT PSYRSTPDFP SGTNSSQSSS PSSAPNSPA
1081GSGHIRPSTL HGLAPKLGGQ RYRSGRRKSA GNIPLSPLAR TPSPTQPTS PQRSPSPLL
1141HSLGNSKIAQ AFPSKMHSP TIVRHIVRPK SAEPPRSPLL KRVQSEEKLS PSYGSDKKHL
1201CSRKHSLEVT QEEVQREQSQ REAPLQSLDE NVCDVPPLSR ARPVEQGCLK RPSRKVGRQ
1261ESVDDLDRDK LKAKVVVKA DGFPEKQESH QKSHGPGSDL ENFALFKLEE REKKVYPKAV
1321ERSSTFENKA SMQEAPPLGS LLKDALHKQA SVRASEGAMSDGRVPAEHRQ GGGDFRRAPA
1381PGTLQDGLCH SLDRGISGKG EGTEKSSQAK ELLRCEKLD KLANIDYLRK KMSLEDKEDN
1441LCPVLKPKMT AGSHECLPGN PVRPTGGQQE PPPASESRAF VSSTHAAQMS AVSFVPLKAL
1501TGRVDSGTEK PGLVAPESPV RKSPSEYKLE GRSVSLKPI EGTLDIALLS GPQASKTELP
1561SPESAQSPSP SGDVRAVPP VLPSSSGKKN DTTSARELSP SSLKMNKSYL LEWFLPPSR
1621GLQNSPAVSL PDPEFKRDRK GPHPTARSPG TVMESNPQQR EGSSPKHQDH TTDPKLLTCL
1681GQNLHSPDLA RPRCPLPEA SPSREKPLR ESSERGPPTA RSERSAARAD TCREPSMELC
1741FPETAKTSDN SKNLLSVGRT HPDFYTQTQA MEKAWAPGGK TNHKDGPGEA RPPPRDNSSL
1801HSAGIPCEKE LGKVRRGVEP KPEALLARRS LQPPGIESEK SEKLSSFPSL QKDGAKEPER

1861KEQPLQRHPS SIPPPPLTAK DLSSPAARQH CSSPSHASGR EPGAKPSTAE PSSSPQDPPK
1921PVAHSESSS HKPRPGDPG PPKTKHPDRS LSSQKPSVGA TKGKEPATQS LGGSSREGKG
1981HSKSGPDVFP ATPGSQNKASDGIGQGEGGPSVPLHTDRAP LDAKPQPTSG GRPLEVLEKP
2041VHLPRPGHPGPSEPADQKLS AVGEKQTLSP KHPKPSTVKD CPTLCKQTDN RQTDKSPSQP
2101AANTDRRAEG KKCTEALYAP AEGDKLEAGL SFVHSENRLK GAERPAAGVG KGFPEARARGK
2161PGPQKPTEA DKPNGMKRSP SATGQSSFRS TALPEKSLSC SSSFPETRAG VREASAASSD
2221TSSAKAAGGM LELPAPSNRD HRKAQPAGEG RTHMTKSDSL PSFRVSTLPL ESHHPDPNTM
2281GGASHRDAL SVTATVGETK GKDPAPAPPP PARKQNVGRD VTKPSPAPNT DRPISLSNEK
2341DFVVRQRRGK ESLRSSPHKK AL (SEQ ID NO:11), 或

[0101] 同种型12-NP_001380457.1

1MDESSILRRR GLQKELSLPR RGSFCRTSNR KSLIGNGQSP ALPRPHSPLS AHAGNSPQDS
61PRNFSPSASA HFSFARRTDG RRWSLASLPS SGYGTNTPSS TVSSSCSSQE KLHQLPYQPT
121PDELHFLSKH FCTTESIATE NRCRNTPMRP RSRSLSPGRS PACCDHEIIM MNHVKERFP
181KATAQMEERL KEIITSYSPD NVLPLADGVL SFTHHQIIEI ARDCLDKSHQ GLITSRYFLE
241 LQHKLDKLLQ EAHDRSESGE LAFIKQLVRK ILIVIARPAR LLECLEFDPE EFYYLLEAAE
301 GHAKGQGIK TDIPRYIISQ LGLNKDPLEE MAHLGNYDSG TAETPETDES VSSSNASLKL
361 RRPRESDFE TIKLISNGAY GAVYFVRHKE SRQRFAMKKI NKQNLILRNQ IQQAFVERDI
421 LTFAENPFVV SMYCSFETRR HLCMVMEYVE GGDCATLMKN MGPLPVDMAR MYFAETVLAL
481 EYLHNYGIVH RDLKPDNLLV TSMGHIKLTG FGLSKVGLMS MTTNLYEGHI EKDAREFLDK
541 QVCGTPEYIA PEVILRQGYG KPVDDWAMGI ILYEFLVGCV PFFGDTPEEL FGQVISDEIN
601 WPEKDEAPP DAQDLITLLL RQNPLERLGT GGAYEVKQHR FFRSLDWNSL LRQKAEFIPQ
661 LESEDDTSYF DTRSEKYHHM ETEEEEDTND EDFNVE IRQF SSCSHRFSKV

FSSIDRITQN

721 SAEKEDSVD KTKSTTLPST ETLSWSSEYS EMQQLSTSNS SDTESNRHKL SSGLLPKLAI
781 STEGEQDEAA SCPGDPHEEP GKPALPEEC AQEEPEVTTP ASTISSSTLS DMFAVSPLGS
841 PMSPHSLSSD PSSSRDSSPS RDSSAASASP HQPIVIHSSG KNYGFTIRAI RVYVGDSDIY
901 TVHHIVWNVE EGSPACQAGL KAGDLITHIN GEPVHGLVHT EVIELLLKSG NKVS

ITTTTF

961 ENTS IKTGPA RRNSYKSRMV RRSKSKKKKE SLERRRSLFK KLAQPS PLL

HTSRSFCLN

1021 RSLSSGESLP GSPTHSLSPR SPTPSYRSTP DFPSGTNSSQ SSSPSSSAPN
SPAGSGHIRP

1081 STLHGLAPKL GGQRYRSGRR KSAGNI PLSP LARTPSPTPQ PTSPQRSPSP
LLGHSLGNSK

1141 IAQAFPSKMH SPPTIVRHIV RPKSAEPPRS PLLKRVQSEE KLSPSYGSDK
KHLCSRKHSK

1201 EVTQEEVQRE QSQREAPLQS LDENVCDVPP LSRARPVEQG CLKRPVSRKV
GRQESVDDLD

1261 RDKLKAKVVV KKADGFPEKQ ESHQKSHGPG SDLENFALFK LEEREKKVYP

KAVERSSTFE

1321 NKASMQEAPP LGSLLKDALH KQASVRASEG AMSDGRVPAE HRQGGGDFRR
APAPGTLQDG

1381 LCHSLDRGI S GKGEKTEKSS QAKELLRCEK LDSKLANI DY LRKKMSLE DK
EDNLCPVLKP

1441 KMTAGSHECL PGNPVRPTGG QQEPPPASES RAFVSSTHAA QMSAVSFVPL
KALTGRVDSG

1501 TEKPGLVAPE SPVRKSPSEY KLEGRSVSCL KPIEGTLDIA LLSGPQASKT
ELPSPESAQS

1561 PSPSGDVRAS VPPVLPSSSG KKNDTTSARE LSPSSLKMNK SYLLEPWFLP
PSRGLQNSPA

1621 VSLPDPEFKR DRKGPHTAR SPGTVMESNP QQREGSSPKH QDHTTDPKLL
TCLGQNLHSP

1681 DLARPRCPLP PEASPSREKP GLRESSERGP PTARSERSAA RADTCREPSM
ELCFPETAKT

1741 SDNSKNLLSV GRTHPDFYTQ TQAMEKAWAP GGKTNHKDGP GEARPPPRDN
SSLHSAGIPC

1801 EKELGKVRRG VEPKPEALLA RRSLOPPGIE SEKSEKLSSF PSLQKDGAK
PERKEQPLQR

1861 HPSSIPPPPL TAKDLSSPAA RQHCSSPSHA SGREPGAKPS TAEPSSSPQD
PPKPVAHSE

1921 SSSHKPRPGP DPGPPKTKHP DRSLSSQKPS VGATKGKEPA TQSLGGSSRE
GKGHSKSGPD

1981 VFPATPGSQN KASDGIGQGE GGPSVPLHTD RAPLDAKPQP TSGGRPLEVL
EKPVHLPRPG

2041 HPGPSEPADQ KLSAVGEKQT LSPKHPKPST VKDCPTLCKQ TDNRQTDKSP
SQPAANTDRR

2101AEGKKCTEAL YAPAEGDKLE AGLSFVHSEN RLKGAERPAA GVGKGFPEAR GKGPQPQKPP

2161TEADKPNGMK RSPSATGQSS FRSTALPEKS LSCSSSPET RAGVREASAA SSDTSSAKAA

2221GGMLELPAPS NRDRHKAQPA GEGRTHMTKSDSLPSFRVST LPLESHHPDP NTMGASHRD

2281RALSVTATVG ETGKDPAPA QPPARKQNV GRDVTKPSA PNTDRPISLS NEKDFVVRQR

2341RGKESLRSSP HKKAL (SEQ ID NO:12)

[0102] 具有生物学等效活性的氨基酸序列或多核苷酸序列,即使它与SEQ ID NO:1至12的氨基酸序列不同,也可以被视为MAST4蛋白或其mRNA。

[0103] 因此,在具体实施例中,MAST4蛋白可以包括SEQ ID NO:1至12和编码MAST4蛋白的核苷酸序列中的任一个序列。

[0104] MAST4蛋白或多肽可以包括与SEQ ID NO:1至12具有60%或更多,例如,70%或更多、80%或更多、90%或更多、95%或更多、99%或更多、或100%序列同一性的氨基酸序列。此外,MAST4蛋白可以具有在SEQ ID NO:1至12的氨基酸序列中具有1个或更多个氨基酸、2

个或更多个氨基酸、3个或更多个氨基酸、4个或更多个氨基酸、5个或更多个氨基酸、6个或更多个氨基酸、或7个或更多个氨基酸的修饰的氨基酸序列。

[0105] 编码MAST4的每个多核苷酸可以具有与编码MAST4蛋白中的任一个的序列具有60%或更多,例如70%或更多、80%或更多、90%或更多、95%或更多、99%或更多、或100%的序列同一性的序列。此外,编码MAST4的多核苷酸可以是在编码SEQ ID NO:1至12的序列中具有1个或更多个核苷酸、2个或更多个核苷酸、3个或更多个核苷酸、4个或更多个核苷酸、5个或更多个核苷酸、6个或更多个核苷酸、或7个或更多个核苷酸的不同序列的多核苷酸。

[0106] 本发明人首次说明,通过增加真核细胞(例如间充质干细胞或骨祖细胞)中MAST4基因的表达或稳定MAST4基因的表达,可以增加骨骼的产生。

[0107] 此外,在具体实施例中,用于促进从真核细胞中产生细胞外基质的组合物可以用于组织再生或抗衰老。

[0108] 术语“药学上可接受的盐”是指本公开组合物中化合物的任何有机或无机加成盐,其浓度具有有效作用,因为它对患者相对地无毒且无害,并且其副作用不会降低本公开组合物的有益功效。这些盐可以选自本领域技术人员已知的任一种。

[0109] 本公开的组合物还可以包括药学上可接受的载剂。包括药学上可接受的载剂的组合物可以具有用于肠胃外施用的各种制剂。在配制时,可以使用常用的稀释剂或赋形剂(例如填充剂、增量剂(extender)、粘合剂、润湿剂、崩解剂、表面活性剂等)来制备组合物。

[0110] 用于肠胃外施用的制剂可以包括灭菌的水性溶液、非水性溶剂、悬浮液、乳剂、冻干制剂、栓剂(suppository)等。非水性溶剂和悬浮液可以包括丙二醇、聚乙二醇、植物油(例如橄榄油)、可注射酯(例如油酸乙酯)等。作为栓剂的基础,可以使用witepsol、macrogol、吐温61、可可脂、月桂酸脂、甘油、明胶等。

[0111] 如本文所用,“稳定MAST4”意味着防止MAST4降解或防止抑制MAST4的活性。例如,MAST4可以通过泛素化并且经由蛋白酶体进行蛋白水解而不稳定或降解。因此,本发明考虑了靶向MAST4进行降解的药剂的抑制剂。

[0112] GSK-3的抑制

[0113] 糖原合成酶激酶-3(GSK-3)是脯氨酸导向的丝氨酸-苏氨酸激酶。存在两个同种型(GSK-3 α 和 β),它们是高度相关的并且在很大程度上是冗余的。它们的许多底物范围从细胞代谢的调节剂到控制生长和分化的分子。GSK-3 β 抑制剂的样本包括但不限于Laduviglusib(CHIR-99021)、HCl(CAS号:1797989-42-4)、SB216763(CAS号:280744-09-4)、AT7519(CAS号:844442-38-2)、CHIR-98014(CAS号:252935-94-7)、TWS119(CAS号:601514-19-6),它们是可以用于抑制GSK-3 β 活性的一些化合物。参见Selleck Chemicals, Houston, TX (2023)。还存在特异性抑制GSK-3 β 或GSK-3 α 的抗体。

[0114] 用于骨骼生成的疗法

[0115] 本发明公开了涉及培养真核细胞的离体技术,在其中抑制MAST4产生或活性的蛋白质被抑制表达或在翻译后被抑制,然后将修饰的真核细胞移植到哺乳动物宿主的靶标骨缺损区域,从而影响骨骼的生成。替代地或者同时地,导致细胞中MAST4表达增加。

[0116] 普通技术人员会理解,用于治疗人类患者的优选细胞来源是患者自身的结缔组织细胞或间充质干细胞,例如自体成纤维细胞或成骨祖细胞(骨祖细胞)、骨细胞、前成骨细

胞、成骨细胞或破骨细胞,但也可以使用同种异体细胞。

[0117] 更具体地说,该方法可以包括使用GSK-3的抑制剂,包括GSK-3 α 或GSK-3 β 。

[0118] 本发明的另一实施例提供用于以预防有效量向患者胃肠外施用的化合物,该化合物包括修饰的细胞和合适的药物载剂。

[0119] 在本申请中,提供通过注射适当的哺乳动物细胞来生成或再生骨骼的方法,其中使用过表达的编码MAST4的基因转染或转导该哺乳动物细胞。

[0120] 在本发明的实施例中,应理解,在具有或没有支架材料或任何其他辅助材料(例如外来细胞或其他生物相容性载剂)的情况下,可以将细胞注射到在其中将要生成或再生骨骼的区域。

[0121] 本发明的方法可以应用于体内所有类型的骨骼,包括但不限于不愈合骨折(无法愈合的骨折)、颅面重建、由于肿瘤移除引起的节段性缺损、髋关节植入物修正周围骨骼的增加(即,由于髋关节植入物的使用寿命为仅约10年,25%的髋关节植入物是现有植入物的替代)、用于牙科目的的颌骨重建。其他靶标骨骼包括脊柱上用于脊柱融合的椎骨、大骨骼等。此外,本发明可以用于通过向有需要的受试者施用本发明的细胞来治疗(特别是老年人的)股骨、胫骨、髋关节、髋关节骨折中的破裂(fracture)或缺损(defect)等。

[0122] 待修饰的细胞包括任何适当的哺乳动物细胞,包括间充质干细胞和有助于骨骼形成的结缔组织细胞,该结缔组织细胞包括但不限于成纤维细胞、成骨祖细胞、前成骨细胞、成骨细胞、骨细胞和破骨细胞,并且还可以包括软骨细胞。然而,应理解,其他非遗传修饰细胞也可以包含在用于接触骨骼缺损位点的组合中,例如前成骨细胞、成骨细胞、骨细胞、破骨细胞、软骨细胞等。

[0123] 在提及“骨骼缺损”或“缺损的骨骼”时,应理解为此类缺陷可以包括骨骼的破裂、断裂和/或退化,包括由损伤或疾病引起的此类情况,并且还可以包括脊柱椎骨中的缺损和椎骨之间的椎间盘区域的进一步退化。在本发明的一个方面,由椎骨之间的椎间盘空间的退化引起的疼痛可以通过融合围绕已经退化的椎间盘空间的椎骨来治疗。

[0124] 本说明书中公开的一种用于治疗破裂或缺损的骨骼的离体方法包括初始生成重组病毒或质粒载体,其含有编码蛋白质或其生物活性片段的DNA序列。然后使用该重组载体感染或转染体外培养细胞群,从而产生含有该载体的细胞群。然后将这些细胞移植到哺乳动物宿主的靶标骨骼缺损区域,从而影响缺损区域内蛋白质或蛋白质片段的后续表达。这种感兴趣的DNA序列的表达在实质性地修复破裂或缺损是有用的。

[0125] 更具体地,该方法包括采用编码MAST4的基因,或其生物活性衍生物或片段。

[0126] 本发明的另一实施例提供用于将至少一个编码产物的基因引入到至少一个细胞中,以用于治疗哺乳动物宿主的方法。该方法包括采用病毒或非病毒手段将编码产物的基因引入到细胞中。更具体地说,该方法包括脂质体包封、磷酸钙共沉淀、电穿孔或DEAE-葡聚糖介导,并且包括使用能够编码MAST4家族成员或生物活性衍生物或其片段,以及选择性标志物或其生物活性衍生物或片段的基因作为基因。

[0127] 本发明的另一实施例提供用于将至少一个编码产物的基因引入到至少一个细胞中,以用于治疗哺乳动物宿主的额外方法。这种额外的方法包括采用利用病毒以递送DNA载体分子至靶细胞或组织的生物学手段。优选地,该病毒是假病毒,已经改变其基因组使得假病毒只能在靶细胞内递送和稳定维持,优选不保留在靶细胞或组织内复制的能力。通过重

组DNA技术进一步操纵改变的病毒基因组,使得病毒基因组作为DNA载体分子,该病毒基因组包含要在靶细胞或组织中表达的感兴趣的异源基因。

[0128] 本发明的优选实施例是用于递送表达MAST4蛋白的细胞至靶标缺损区域的方法,所述方法通过使用腺相关病毒载体或慢病毒载体以及本说明书中公开的离体技术将MAST4基因递送至哺乳动物宿主的组织。换言之,将编码功能性MAST4蛋白或蛋白片段的感兴趣DNA序列亚克隆到选定的病毒载体中,然后将重组病毒载体培养到足够的滴度并且用于感染体外培养的细胞,并且将转导的细胞移植到骨骼缺损区域或附近治疗有效的区域。

[0129] 本发明的另一优选方法涉及通过使用腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体或单纯疱疹病毒(HSV)载体将MAST4基因直接体内递送至哺乳动物宿主的结缔组织。换言之,将编码功能性MAST4蛋白或蛋白片段的感兴趣DNA序列亚克隆到对应的病毒载体中。然后将含有MAST4的病毒载体培养至足够的滴度,并且直接进入骨骼缺损区域或附近成骨有效的区域。

[0130] 用于治疗骨质疏松性骨折的疗法

[0131] 骨质疏松是由骨骼形成、骨骼吸收或两者中不平衡导致的骨量损失引起的骨骼结构退化,使得再吸收在骨形成阶段占主导地位,从而降低受影响的骨骼的承重能力。在健康的成年人中,骨骼形成和吸收的速度是紧密协调的,以维持骨骼的更新。然而,在骨质疏松的个体中,这些骨骼重塑周期的不平衡会发展,从而导致骨量损失和骨骼的连续性中微结构缺损的形成。由重塑顺序的微小变化(perturbation)产生的这些骨骼缺损会累积并且最终达到一点,在这点上,骨骼的结构完整性受到严重损害并且可能导致骨折。尽管随着年龄的增长(“老年性骨质疏松症”),这种不平衡在大多数人身上逐渐发生,但它在绝经后妇女中要严重得多并且发生率很高。此外,骨质疏松也可以由营养和内分泌失调、遗传性病症和一些恶性转化引起。

[0132] 用于制造软骨或骨骼的方法

[0133] 尽管间充质干细胞得到深入研究,旨在用于再生性疗法,但是尚未充分了解控制间充质干细胞分化的分子机制。我们的结果表明,Mast4是关键分子,其决定了MSC向软骨或成骨细胞命运的定型和分化。我们已经证明,TGF- β 1介导的Mast4基因转录抑制导致Sox9蛋白和Smad3-Sox9缔合增加,从而导致Sox9转录活性增加,最终启动MSC以牺牲骨形成为代价促进软骨生成。在成骨方面,我们已经表明,Wnt介导的通过抑制GSK-3 β 活性来抑制Mast4蛋白降解,导致 β -连环蛋白和Runx2转录活性增加,最终启动MSC有利于成骨(图37)。

[0134] 几十年来,已经描绘出TGF- β 的背景相关性。特别是,TGF- β 的细胞抑制作用已被证明是由CDK抑制剂的转录激活和c-Myc的压制所协调的,突出了其在癌症治疗中的作用³¹。许多研究还已经确定TGF- β 在决定发育过程中多能干细胞命运的功能。关于骨骼发育过程中的软骨内成骨,TGF- β 促进间充质凝结和软骨生成,但是抑制软骨细胞成熟和分化为骨细胞,表明其按照特定谱系的顺序调控³²。在动物模型中的观察结果支持骨骼发育过程中TGF- β 信号的双功能性^{15,33}。我们观察到TGF- β 在体外软骨形成过程中对Mast4的抑制,以及体内肥大软骨细胞中Mast4的主要表达。这些观察结果推测,TGF- β 通过在不同阶段对Mast4的特定性调控对骨骼发生产生不同的调控影响。此外,我们对Mast4的观察对TGF- β 的细胞抑制作用没有影响,这提供了令人信服的证据,支持Mast4是TGF- β 诱导的MSC软骨形成分化的关键介质。

[0135] 各种转录辅助因子作为Smad配偶体(partner),从而帮助靶标基因识别和转录调

控³⁴。关于Smad介导的基因抑制,Smad3通过直接相互作用抑制Runx2活性,从而最终减少成骨细胞分化³⁵。E2F4/5已被证明是TGF- β 诱导的c-Myc抑制的共阻遏因子(co-repressor)³⁶。TGF- β 诱导的SpB抑制与Smad3与Nkx2.1的相互作用相关³⁷。有趣的是,通过分析Mast4启动子区域,可以识别出在Smad3结合位点附近的E2F4和Nkx2.1的预期结合位点。因此,研究这些共转录因子是否参与TGF- β /Smad3介导的Mast4调控也很重要。此外,发现在软骨/成骨分化的顺序阶段调控Mast4表达的新型共转录因子会有助于理解软骨和骨骼发育及其调控。

[0136] 翻译后修饰(PTM)调节蛋白质功能和稳定性,并且精细调整信号转导³⁸。本文中,我们证明了PTM在软骨形成过程中对TGF- β 1-Mast4-Sox9轴的影响。许多信号传导通路和PTM已被证明可以通过在早期控制软骨相关ECM基因库来调控Sox9,Sox9是软骨细胞分化过程中的主转录因子^{10,16,39,40}。我们的观察结果表明,Mast4通过诱导Sox9在丝氨酸494位点磷酸化来促进Sox9降解。尽管Mast4诱导的Sox9磷酸化是否被E3连接酶中任一个识别以进行随后的Sox9和Mast4降解仍有待阐明,但我们的研究表明Mast4可能是控制Sox9活性的重要因素。E6-AP/UBEA是E3连接酶,其在软骨内骨化过程中诱导肥大软骨细胞中泛素介导的Sox9蛋白酶体降解⁴¹。考虑到Mast4主要在肥大软骨细胞中表达,检查Mast4是否与E6-AP/UBEA协作以调控肥大软骨细胞中Sox9的稳定性可能值得研究。此外,在未来的研究中,有必要检查Mast4通过体内在丝氨酸494处的磷酸化对Sox9稳定性的调控以及随后的软骨分化能力。此外,先前的研究表明,MSC中Sox9活性的微妙平衡对于适当分化非常重要。我们观察到的在Mast4^{-/-}小鼠的软骨内骨骼所示的大多数终末分化肥厚状态中的软骨细胞积累及其从生长板的延迟退出,可以通过Mast4缺陷介导的Sox9和胶原蛋白的过表达以及Mmp9和Mmp13的减少来解释。

[0137] 关于Wnt/ β -连环蛋白,已经报道有不同的机制来解释Wnt介导的 β -连环蛋白稳定化⁴²。值得注意的是,Wnt以各种方式抑制GSK3对 β -连环蛋白的活性。鉴于GSK3的磷酸化通常标记泛素化和蛋白水解的靶标蛋白,我们发现GSK-3 β 抑制Mast4磷酸化提高Mast4的稳定性,随后的 β -连环蛋白增强Wnt/ β -连环蛋白信号传导在MSC选择成骨细胞命运中的作用^{24,43}。此外,在GSK-3 β 缺陷的小鼠和施用GSK-3 β 抑制剂的小鼠中检查Mast4蛋白水平是值得的,这些小鼠表现出增加的骨骼形成和骨量^{21,44,45}。

[0138] Mast4属于MAST激酶家族,其由Mast1-4和Mast1组成⁴⁶。Mast1至4具有相似的结构域组织,该结构域组织具有激酶结构域、PDZ结构域和未知功能结构域(DUF)。目前,人们对MAST激酶家族的生物学作用知之甚少。若干项研究表明Mast1、2和3与癌症相关^{47,48}。除了作为神经保护介质的作用外⁴⁹⁻⁵¹,已经报道,Mast4经历了O-GlcNAc修饰,其中在成骨细胞分化过程中经常观察到整体升高⁵²。此外,研究表明,通过诱导在丝氨酸367残基处的ERM磷酸化在Sertoli细胞中的Mast4介导的FGF-2信号传导(已知在骨骼形成中发挥作用)⁵³。同时,微管细胞骨架已被证明有助于间充质干细胞的成骨分化⁵⁴。由于MAST激酶家族在被认为是结构和功能构建块的蛋白质结构域中具有高度的相似性,因此很可能MAST激酶家族成员是正常和疾病状态下各种信号转导的关键细胞介质。此外,检查在间充质干细胞分化为各种谱系(包括成骨细胞或脂肪细胞)中的Mast4调控可能值得进一步研究。

[0139] 总之,我们已经证明Mast4是MSC向软骨成骨分化途径定型的关键介质。我们的研究暗示Masts4在限制Sox9转录活性方面的功能,从而决定MSC发育成为软骨或骨骼的命运。因此,在细胞治疗的背景下,Mast4将是潜在MSC治疗的理想靶点。

[0140] 治疗性组合物

[0141] 治疗性化合物的制剂是本领域中通常已知的,并且可以方便地参考Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., USA。例如,每天每公斤体重可以施用约0.05 μ g至约20mg。可以调整剂量方案以提供最佳的治疗反应。例如,根据治疗情况的紧急性,可以每天施用若干个分开的剂量,或者可以按比例减少剂量。可以以方便的方式施用活性化合物,例如通过静脉内(在其中水溶性)、肌肉内、皮下、鼻内或皮内施用。

[0142] 适于可注射使用的药物形式包括无菌水性溶液(在其中水溶性)或用于临时制备无菌可注射溶液或分散剂的分散剂和无菌粉末。在所有情况下,形式必须是无菌的,并且必须具有流动性到容易注射的程度。它必须在制造和储存条件下保持稳定,并且必须防止微生物(例如细菌和真菌)的污染作用。载剂可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等)、其合适混合物和植物油的溶剂或分散介质。例如,通过使用包衣(例如卵磷脂),通过在分散的情况下保持所需的粒径以及通过使用表面活性剂,可以保持适当的流动性。可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂(例如,三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等)来实现微生物作用的预防。在许多情况下,优选包括等渗剂,例如糖或氯化钠。通过在组合物中使用延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝和明胶)可以引起可注射组合物的延长吸收。

[0143] 无菌注射溶液是通过将所需量的活性化合物与上面列举的各个其他成分掺入到适当的溶剂中,然后根据需要进行过滤灭菌来制备的。通常,分散体是通过将各种无菌活性成分掺入到无菌载剂中来制备的,该载剂包含基本分散介质和上述列举的必需的其他成分。在用于制备无菌注射溶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,其从先前无菌过滤的溶液中产生活性成分以及任何额外的所需成分的粉末。

[0144] 特别有利的是,以剂量单位形式配制肠胃外组合物,以便于施用和剂量的均匀性。本文所使用的剂量单位形式是指适合作为待治疗的哺乳动物受试者的单位剂量的物理离散单元;含有预定量的活性物质的每个单位被计算出产生与所需的药物载剂相关的所需的治疗效果。本发明的剂量单位形式的规格由以下决定并且直接取决于以下:(a) 活性物质的独特特性和待实现的特定治疗效果,和(b) 在复配这种活性材料用于治疗具有在其中身体健康受损的疾病状况的有生命的受试者的疾病的领域中固有的局限性。

[0145] 本发明在范围上不受本文所述的具体实施例的限制。事实上,除了本文所描述的那些之外,对于本领域技术人员来说,从前述描述和附图中本发明的各种修改将变得显而易见。此类修改旨在落入所附权利要求书的范围。以下实施例是作为本发明的说明而提供的,而不是限制本发明。

示例

[0146] 所有动物研究均获得KNOTUS Co., Ltd的实验动物管理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee)以及表型基因组学动物研究中心(Center for Phenogenomics Animal Research Facility)和Woojung BSC的实验动物管理和使用委员会的批准,并且按照道德和程序准则进行。将实验室小鼠在室温(20-22 $^{\circ}$ C)和恒定湿度(40 $\pm$ 10%)下维持12h光照/黑暗循环。

[0147] 示例1-通过CRISPR/Cas9技术生成Mast4基因敲除小鼠

[0148] 为了通过CRISPR/Cas9介导的基因靶向生成Mast4敲除小鼠,我们靶向Mast4(参考

序列登记号:175171)的外显子1和外显子15:5'-GGAACTCTGTCGGAGGAAG-3'(SEQ ID NO:13)(外显子1)和5'-GGCACAAGAGTCCCGCCAG-3'(SEQ ID NO:14)(外显子15)。然后,我们将每个序列插入到pX330质粒中,该质粒携带向导RNA和Cas9表达单元,其由Feng Zhang博士(Addgene,#42230)⁵⁵接收。我们将这些载体命名为pX330-Mast4-E1和pX330-Mast4-E15。

[0149] 将孕马血清促性腺激素(5个单位)和人绒毛膜促性腺激素(5个单位)以48h的间隔腹腔内注射到雌性C57BL/6J小鼠(日本,神奈川,查士利华实验室(Charles River Laboratories))中,然后该雌性C57BL/6J小鼠与雄性C57BL/6J小鼠交配。将pX330-Mast4-E1和pX330-Mast4-E15(圆形,每个5ng/ μ l)共显微注射到从交配的雌性小鼠输卵管收集的231个受精卵中。将存活的225个经注射的受精卵移植到假孕ICR雌性的输卵管中,并且获得47例新生小鼠。我们从31只存活的创始小鼠(founder mice)的尾巴中收集了基因组DNA。

[0150] 为了确认CRISPR/Cas9诱导的插入/缺失突变(indel mutations),我们通过PCR扩增了包括靶标位点的基因组区域,其中使用外显子1靶标的引物(MAST4-1基因型F:5'-GTAGGGACTCCACGCTCCAG-3'(SEQ ID NO:15);MAST4-1基因型R:5'-CCGGACCCTAGTCTCTTCG-3'(SEQ ID NO:16))和外显子15靶标的引物(MAST4-15基因型F:5'-GGGTTCTCTGCGAAAGTCAG-3'(SEQ ID NO:17);MAST4-15基因型R:5'-ATCCCTGTGTTCCGTTTCAG-3'(SEQ ID NO:18(SEQ ID NO:18)))。通过使用BigDye Terminator v3.1循环测序试剂盒(Thermo Fisher Scientific)、MAST4-1基因型F引物和MAST4-15基因型F引物对PCR产物进行测序。在雄性创始小鼠#38中,我们在外显子1和外显子15中都发现了插入/缺失突变,没有pX330随机整合。为了鉴定插入/缺失序列以及外显子1和外显子15的插入/缺失突变是否发生在相同染色体上(顺式方式),将创始小鼠#38与野生型雌性进行交配,并且对F1中的插入/缺失突变进行测序。获得17例F1新生小鼠,其中它们中的12例以顺式方式在外显子1中缺失71bp(chr13:103,333,981-103,334,051;GRCm38/mm10),在外显子15中缺失3bp(chr13:102,774,360-102,774,362)。

[0151] 示例2-在C3H10T1/2和人骨髓来源的干细胞中的CRISPR/Cas9介导的Mast4耗竭

[0152] 对于C3H10T1/2细胞,使用BsmBI消化lentiCRISPRv2载体(Addgene,#52961),并且连接到靶向Mast4外显子1(5'-TACCCTGCCGCTGCCGCACC-3'(SEQ ID NO:19))(LentiCRISPRv2-Mast4Ex1)和外显子2(5'-AGCAACCCAGATGTGGCCTG-3'(SEQ ID NO:20))(LentiCRISPRv2-Mast4Ex2)的退火寡核苷酸。为了生成慢病毒,在70%的汇合度时使用聚乙烯亚胺,使用LentiCRISPRv2-Mast4Ex1和包装载体(pVSVG和psPAX2,Addgene#8454,#12260)转染HEK293T细胞。在转染后48h收获病毒上清液,通过0.45 μ m过滤器过滤并且应用于C3H10T1/2细胞。在嘌呤霉素介导的选择后,单细胞克隆在96孔板中生长。从基因组DNA中,使用AccuPowerTMPCR预混合物(Bioneer)扩增Mast4基因的外显子1和外显子2区域。通过测序证实了导致移码介导的Mast4蛋白耗竭的插入/缺失突变。对于人骨髓来源的干细胞(hBMSC),我们根据制造商的方案使用GeneArtTMPrecision gRNA合成试剂盒(Invitrogen)生成了向导RNA(gRNA)。在第5至6代传代时,根据制造商的方案,使用Neon转染系统,使用靶向外显子5的gRNA(正向:5'-TAATACGACTCACTATAGAGCAACCGGAAAAGCTTAAT-3'(SEQ ID NO:21);反向:5'-TTCTAGCTCTAAACATTAAGCTTTTCCGTTGCT-3'(SEQ ID NO:22))和Cas9蛋白(Toolgen)转染人骨髓来源的干细胞。由于hBMSC无法从单个细胞形成集落,因此编辑的细胞池用于进一步的软骨分化、蛋白质和mRNA分离。通过ICE敲除分析测定了hBMSC中CRISPR/

Cas9介导的Mast4基因敲除效率(www.synthego.com)。Mast4耗竭的hBMSC获得了>70的ICE和KO评分,这表明分别使用了插入/缺失百分比和具有移码或21+bp插入/缺失的细胞比例。

示例3-慢病毒shRNA产生/感染

[0153] 设计了靶向Mast4的外显子15和外显子22(shMast4外显子15F:CCGGCCAGTTGATATGGCCAGAATCTCGAGATTCTGGCCATATCAACTGGGTT TTTG (SEQ ID NO:23)、shMast4外显子22F:CCGGCCGAAGTTTCTCTGCTTAACTCGAGTTTAAGCAGGAGAACTTCGGTT TTTG (SEQ ID NO:24))的两个不同shRNA,并且将退火的寡核苷酸插入到pLK0.1载体中。为了生成shRNA慢病毒,使用pLK0-shMast4(#1和#2)或加扰对照pLK0-pGL2以及慢病毒包装质粒psPax2和VSV-G一起转染293T细胞。转染后48h,收获病毒上清液并且进行过滤。使用shRNA慢病毒和聚凝胺(8μg/ml)感染C3H10T1/2细胞持续24h,然后是嘌呤霉素选择(4μg/ml)。

[0154] 示例4-细胞培养和软骨生成/成骨分化

[0155] 在含有10%胎牛血清(FBS;S001-01,WELGENE)和1%青霉素-链霉素(P/S;LS202-02,WELGENE)的杜氏改良伊格尔培养基(DMEM;LM001-05,WELGENE)中培养C3H10T1/2细胞(克隆8,CCL-2260,ATCC)、小鼠骨髓来源的间充质基质细胞(mBMSC)和人胚胎肾细胞系HEK293T(CRL-3216,ATCC)。在含有5%FBS和1%P/S的DMEM/F-12(11320033,Gibco)中培养ATDC5(RCB0565,RIKEN BRC)细胞。hBMSC由SCM Lifescience(韩国,仁川)友情提供,在其中通过亚分级培养方法创建了hBMSC系⁵⁶。简而言之,在获得仁荷大学医院机构审查委员会(Inha University Hospital Institutional Review Board)批准的书面知情同意书(IRB编号10-51)后从三名健康捐赠者的髂嵴中抽吸的人骨髓与分离培养基混合并且孵育。将含有漂浮的骨髓细胞的上清液(没有沉降到底部的细胞)反复转移到新的100mm培养皿中。在孵育10至14天后,对分离良好的菌落进行分离、扩增和表征。在含10%FBS和1%P/S的DMEM(低葡萄糖;LM001-11,WELGENE)中培养这些细胞。人类原代软骨细胞也由SCM Lifescience友情提供,该人类原代软骨细胞是通过染色从1岁人类女性供体获得的胶原酶处理的软骨组织收集的⁵⁷。在含有10% FBS(26140-079,Gibco)、20mM L-谷氨酰胺(25030-081,Gibco)和10μg/ml庆大霉素(15700-060,Thermo fisher)的DMEM(17-205-CVR,Corning)中培养这些细胞。在不含抗坏血酸(LM008-53,WELGENE)且含有10%FBS和1%P/S的α最低必需培养基(α-MEM)中培养MC3T3-E1细胞(亚克隆4,CRL-2593,ATCC)。在湿润的5% CO₂孵育器中在37℃下培养所有细胞。对于C3H10T1/2细胞的微团培养,在正常生长培养基的10μl液滴中的1×10⁵个细胞中接种到培养皿上,然后是2h的附着期。然后,将含有BMP-2(150ng/ml;PeproTech)的培养基添加到培养皿,并且每48至72h更换培养基。对于hBMSC的沉淀培养,将2×10⁵细胞接种到15ml锥形管上,并且在含有1%P/S、10⁻⁷M的地塞米松(Sigma Aldrich)、1/100的ITS+预混合通用培养补充剂(Premix Universal Culture Supplement,Corning)、50ng/ml抗坏血酸(Sigma Aldrich)、10ng/ml的TGF-β1和TGF-β3(R&D系统)和40ng/ml的L-脯氨酸(Sigma Aldrich)的α-MEM中培养21天。每48至72h更换培养基。对于mBMSC,从胫骨髓隔室收获的骨髓抽吸物中分离细胞,并且在含有10% FBS的DMEM中培养3h。仔细地移除非附着的细胞,并且重新供应新鲜培养基。根据制造商的说明书,使用StemPro软骨生成分化试剂盒(StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit,Thermo Fisher Scientific)将培养的BMSC分化为软骨细胞。对于C3H10T1/2细胞的成骨分化,将汇合细胞在补充有50μg/ml抗坏血酸(Sigma Aldrich)、10mMβ-甘油磷酸盐(Sigma Aldrich)和200ng/ml BMP-2的

维持培养基中培养10天。每48至72h更换培养基。

[0156] 示例5-阿尔新蓝和碱性磷酸酶 (ALP) 染色

[0157] 将分化的细胞使用PBS洗涤两次,并且在室温下固定在4%多聚甲醛中持续5至10分钟。用阿尔新蓝溶液(在0.1M HCl溶液中的1%阿尔新蓝,pH 1.0;Sigma Aldrich)过夜,然后用0.1M HCl洗涤一次,并且使用PBS洗涤两次,对成骨分化细胞染色。在37℃时使用5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸盐/硝基蓝四唑溶液(BCIP/NBT;Merck)对成骨分化细胞染色持续30min。

[0158] 示例6-3D球体形成测定

[0159] 如先前所报道,使用低结合板进行C3H10T1/2细胞的3D球体形成²³。简而言之,圆底超低附着96孔微孔板(Corning)涂覆有明胶(0.1%;Sigma Aldrich)。然后,将50μl的含有BMP-2(150ng/ml)的培养基中的 1×10^5 个细胞加入到经涂覆的微孔板的每个孔中并且培养8天。每48至72h更换培养基。

[0160] 示例7-RNA-Seq和生物信息学分析

[0161] 对于使用分化C3H10T1/2细胞进行RNA测序的样本制备,将从野生型和Mast4耗竭的(KO#1)C3H10T1/2细胞的三次单独诱导软骨分化(10个团块/每次诱导)中获得的总共30个高密度微团培养物合并在一起进行RNA测序。对于使用小鼠软骨和骨骼的RNA测序,按照以下解剖软骨和骨骼。在CO₂腔室中在PN 1天时对Mast4^{+/+}和Mast4^{-/-}小鼠实施安乐死后,切开支骨的中间部分。去除皮肤后,使用镊子去除所有肌肉。在膝关节和胫踝关节的关节软骨切断后移除腓骨。使用30G针沿钙化区域的边界从胫骨体分离骨髓。将分离的骨髓软骨和胫骨放入Trizol®(Invitrogen)中。在Trizol®中将胫骨切成对半并且使用剃须刀片切碎。使用等量的0.5mm不锈钢珠均质化每个样本。然后,通过使用氯仿进行层分离并使用异丙醇进行沉淀来获得RNA。由于在PN 1天时从每只小鼠获得的RNA总量不足以进行RNA测序分析,因此合并并在PN 1天时从Mast4^{+/+}和Mast4^{-/-}小鼠的胫骨软骨或骨髓中获得的RNA(每组n=3)。在每个样本中使用1μg合格RNA,根据制造商手册(加利福尼亚州,圣地亚哥,Illumina,Inc.),使用TruSeq RNA样本制备试剂盒制备RNA-Seq库。在qPCR验证后,使用Illumina HiSeq 2500平台,以100bp的读取长度,将库进行双端测序,从而产生平均每个库5770万个读数。使用FastQC(版本0.11.9)评估原始读数的质量。使用TopHat⁵⁸和基因模型注释组,将在其中平均质量得分大于Q30的每个样本的清晰读数与小鼠参考基因组GRCm38.p4mm10对齐。使用Cufflinks将基因表达计算为FPKM。使用Cuffdiff⁵⁹进行野生型和Mast4耗竭的样本之间的差异表达分析,其中临界值设置为P<0.05以及与Sox9靶向基因的qPCR验证相比 ≥ 1.5 差异倍数。通过DAVID⁶⁰对DEG数据集进行基因本体(GO)富集分析,其中截止值P<0.001。使用STRING数据库(<https://string-db.org/>)以高置信度(≥ 0.7)搜索与软骨和/或骨骼发育、BMP信号传导、TGF-β信号传导和Wnt信号传导相关的基因的相互作用,并且根据节点的连通程度使用Cytoscape(www.cytoscape.org)进一步分析。使用背景数据集进行基因集富集分析(GSEA)(www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp)⁶¹,该背景数据集由从在PN 1天时Mast4^{+/+}和Mast4^{-/-}小鼠的胫骨软骨和骨髓中分析的所有DEG组成,Mast4^{+/+}和Mast4^{-/-}小鼠表达>0.3FPKM,其平衡了Mast4^{+/+}或Mast4^{-/-}小鼠的假阳性和假阴性⁶²数量。

[0162] 示例8-逆转录PCR(RT-PCR)和实时RT-PCR

[0163] 使用EasyBlue(Boca Scientific)制备了总RNA。根据制造商的说明书,使用M-MLV

逆转录酶(Promega)逆转录2 μ g的RNA。使用具有特异性引物对的AccuPowerTMPCR预混合物(Bioneer)进行RT-PCR。在QuantStudio 5实时PCR仪器(Applied Biosystems)上使用Power SYBR Green PCR预混合物(Applied Biosystems)进行定量实时PCR。各个基因的mRNA水平重复测量三次,并且使用Gapdh进行归一化。有关本研究中使用的寡核苷酸的信息如下。

[0164] 示例9-组织学分析

[0165] 对于软骨免疫荧光染色,在4℃时使用0.01M PBS (pH 7.4) 中的4%多聚甲醛(Wako)将组织固定过夜,然后使用10% EDTA溶液脱钙。在嵌入在石蜡(Leica Biosystems)中后,以6 μ m的厚度将样本切片。将组织切片与针对Mast4(Bioworld Technology)、Col2a1(Abcam)和Sox9(Cell Signaling Technology)的初级抗体在4℃时孵育过夜。在PBS中洗涤后,在室温下将组织切片在AlexaFluor488(Invitrogen)中连续地孵育2h。然后使用T0-PROTM-3(Invitrogen)对组织切片进行复染色(counter-stain)持续15分钟。使用共聚焦显微镜DMi8(Leica)拍摄图像。为了检测胶原组织,根据制造商的方案,使用新鲜制备的Russell-Movat改良五色染色(美国MasterTech)对切片进行染色。在标准阈值下将图像制作成二元,并且使用徕卡显微系统CTR 6000(Leica)对正像素进行计数。对于骨骼免疫荧光染色,将小鼠麻醉并且使用4% PFA灌注固定以收集股骨和胫骨。在4℃时使用2% PFA将样本固定过夜。将样品在0.5M EDTA溶液中脱钙持续6天。然后,将样本嵌入5%低熔点琼脂糖(Invitrogen)中,并且通过振动切片机(Leica,CT1200S)切成150 μ m切片。从切片中移除琼脂糖后,使用PBST(在磷酸盐缓冲盐水中的0.3%Triton X-100)渗透切片持续20分钟,并且在PBST中使用5%山羊血清封闭持续30分钟。使用在封闭溶液中稀释的初级抗体将切片在室温下孵育2h,使用PBS洗涤3次,并且在室温下使用二级抗体在封闭溶液中处理75分钟。在PBST中洗涤切片3次和在PBS中洗涤切片3次后,使用荧光封片介质(DAKO)将切片安装在显微镜载玻片上。用于免疫荧光的初级抗体和试剂如下:CD31(Millipore,MAB1398Zm,1:150)、MMP13(Abcam,1:150)、Osterix(Abcam,1:300)、Runx2单克隆抗体(Cell Signaling Technology,1:150)。用于IF的二级抗体和试剂如下:FITC偶联的抗仓鼠IgG(Jackson ImmunoResearch,1:300)、Cy3偶联的抗兔IgG(Jackson ImmunoResearch,1:300)。使用Zeiss LSM 880共聚焦显微镜(Carl Zeiss)以高分辨率分析染色的骨骼切片。使用Zen软件处理图像的Z堆栈(Z-stack)。

[0166] 示例10-通过EPMA的元素映射

[0167] 使用电子探针显微分析仪(EPMA-1610;日本,东京,Shimadzu)进行Ca、P和Mg的元素映射。将未脱钙的6周龄小鼠胫骨嵌入在环氧树脂中,并且用金刚石盘修剪,直到暴露于矢状平面。抛光后,在元素分析之前,对样本进行溅射涂覆碳。对于每个实验,都进行了256 $\times$ 256像素映射。加速电压和束流电流分别设置为15kV和0.03 μ A,并且每个像素的积分时间为0.05s。

[0168] 示例11-显微CT

[0169] 通过使用MicroCT Skyscan 1076(Antwerp)扫描钙化的SPC生成的骨骼区域获得三维重建计算机断层扫描图像。然后使用图像采集卡将数据进行数字化,并且将生成的图像传输到计算机,使用Comprehensive TeX Archive Network(CTAN)地形重建软件进行分析。

[0170] 示例12-体内钙黄绿素标记

[0171] 对3周龄小鼠进行腹膜内注射在5%碳酸氢钠溶液中的50mg/kg钙黄绿素(密苏里州,圣路易斯,Sigma-Aldrich)。在处死前7天和2天对小鼠进行标记。在室温时将股骨固定在4%甲醛中持续1天。如先前所描述,将样本在10% (v/v) KOH中孵育96h并且嵌入在石蜡中⁶³。将嵌入的样品切片为5 μ m厚度,并且使用共聚焦显微镜(德国,Leica,DMi8)观察。在每个样本的3个点处测量皮质骨上标记之间的距离。

[0172] 示例13-生长板形态学测量

[0173] 对于形态学测量分析,在H&E染色切片图像或五色染色切片图像处测量每个胫骨近端处的生长板软骨的总厚度,其沿与生长板的横向平面成90°的轴线等距间隔并且平行于骨骼的纵轴。从每个骨骺生长板获得三个测量值,使用图像分析软件(美国,国立卫生研究院(NIH),ImageJ,版本1.38e)对个体动物的最终厚度测定表明了这些值的平均值。通过相同的方法测量肥大软骨细胞所占据的层的宽度。此外,还计算了肥大细胞层占生长板总厚度的百分比。每组使用三个左侧和右侧胫骨。

[0174] 示例14-使用流式细胞术分离小鼠骨骼干细胞

[0175] 参考方案²⁷,进行了FACS分离。简而言之,处死5周龄的雄性Mast4^{+/+}和Mast4^{-/-}小鼠(n=5),然后解剖肱骨、股骨和胫骨。通过机械消化和化学消化的组合分离细胞,并且通过铵-氯-钾(ACK)裂解缓冲液去除红细胞。采用磁激活细胞分选(MACS)过滤TER119⁺CD45⁺造血细胞。然后对剩余细胞进行以下抗体染色:CD45、TER119、TIE2、ITGAV、CD202B、THY1.1、THY1.2、CD105和6C3。使用7-AAD辨别活细胞/死细胞。在FACS Aria 11仪器(BD Biosciences)上进行FACS分析,并且通过FlowJo v10.7.1和BD FACSDiva v9.0.1软件进行分析。

[0176] 示例15-体内软骨形成测定

[0177] 将对照细胞和Mast4耗竭的C3H10T1/2细胞在包括BMP-2(150ng/ml)的软骨生成分化培养基中以微团培养物培养4天。将细胞重新悬浮在PBS中(每次注射100 μ l中100个微团培养物)并且皮下注射到无胸腺裸鼠(6周龄雌性;n=4)的侧面。2周后,对小鼠实施安乐死,并且收集移植物进行IHC评价。测量和使用公式 $V = (A \cdot B^2) / 2$ 计算含有软骨的移植物的体积,其中V是体积(mm³),A是长直径(mm),B是短直径(mm)。按照Woojung BSC的表型基因组学动物研究中心的实验动物管理和使用委员会(韩国,水原,实验动物管理评估和认可协会认证机构)提供的指南进行所有实验。

[0178] 示例16-全层软骨缺损兔模型的体内移植

[0179] 如先前所报道⁶⁴,制备了全层软骨缺损模型。简而言之,在实验前4周获得了13只健康的新西兰白雄兔(体重3.0-3.5kg)。使用Zoletil和甲苯噻嗪麻醉兔子。在无菌条件中,在右膝上做髌旁皮肤切口皮肤切口,并且髌骨外侧脱位。通过钻孔在滑车沟(trochlear groove)的中心形成全层软骨缺损(直径3mm,深度3mm)。去除软骨和骨碎屑,并且用生理盐水仔细清洗缺损位点。将媒剂(PBS 50 μ l)、原始的或MAST4耗竭的hBMSC(50 μ l中的2 $\times$ 10⁶个细胞;第6-7代)移植到缺损位点(媒剂为n=3、原始的的和MAST4耗竭的hBMSC为n=5),然后重新定位髌骨。使用4-0尼龙缝合线闭合伤口。按照KNOTUS Co.,Ltd的实验动物管理和使用委员会(韩国,仁川)提供的指南进行所有步骤。

[0180] 示例17-染色质免疫沉淀

[0181] 在室温下将细胞与1%甲醛交联10分钟。将甘氨酸加入到最终浓度为125mM持续5

分钟以淬灭甲醛交联。使用冰冷的磷酸盐缓冲盐水洗涤细胞,通过刮取收获、沉淀并且重新悬浮在含有完全蛋白酶抑制剂混合物(Roche)的SDS裂解缓冲液(50mM Tris-HCl[pH 8.1]、1% SDS、10mM EDTA)中。使用Bioruptor TOS-UCW-310-EX(输出,250W;23个超声循环,30秒间隔;Cosmo Bio)超声处理细胞提取物。在4℃时将样本以18,472x g离心10分钟,并且将上清液在稀释缓冲液(20mM Tris-HCl[pH 8.0]、2mM EDTA、1% Triton X-100、150mM NaCl和完全蛋白酶抑制剂混合物)中稀释10倍。使用蛋白A-琼脂糖珠(Santa Cruz)预清除染色质样本2小时,然后在4℃时针对Sox9和Smad3(Abcam)抗体进行免疫沉淀过夜。使用蛋白A-琼脂糖珠收集了免疫复合物。将样本洗涤五次(第一次使用低盐免疫复合物洗涤缓冲液[20mM Tris-HCl,pH.8.0,2mM EDTA,1% Triton X-100,0.1% SDS和150mM NaCl]洗涤,第二次使用高盐免疫复合物洗涤缓冲液[20mM Tris-HCl,pH.8.0,2mM EDTA,1% Triton X-100,0.1% SDS和500mM NaCl]洗涤,第三次使用LiCl免疫复合物洗涤缓冲液[10mM Tris-HCl,pH.8.0,1mM EDTA,250mM LiCl,1% NP-40和1%脱氧胆酸钠]洗涤,最后使用TE缓冲液洗涤两次)。在室温下使用含有1% SDS和100mM NaHCO₃的缓冲液洗脱免疫沉淀样本。在65℃时将洗出液加热过夜,以在加入NaCl到最终浓度为100mM后逆转交联。使用PCR纯化试剂盒(GeneA11)提取基因组DNA。通过实时PCR沉淀染色质,并且针对每个样本使用5%输入染色质对读数进行归一化。实验重复两次或更多次。使用正向引物5'-AACCCTGCCCCGTATTTATTT-3'(SEQ ID NO:25)和反向引物5'-TGTGCATTGTGGGAGAGG-3'(SEQ ID NO:26)检测Sox 9与Col2a1基因的结合。使用正向引物5'-TGCTGACACTTTATTTTGCTCT-3'(SEQ ID NO:27)和反向引物5'-CATCTCCAAGCCTCTTTCTG-3'(SEQ ID NO:28)检测Smad3与Mast4基因的结合。

[0182] 示例18-泛素化测定

[0183] 将Flag-MAST4-PDZ、GFP-Smruf1、GFP-GSK-3 β 和HA-Ub质粒转染到C3H10T1/2细胞中,然后用MG-132处理(10 μ M持续6h)。在SDS裂解缓冲液[10mM Tris-HCl(pH 8.0)、150mM NaCl、1% SDS、5mM NEM、蛋白酶抑制剂]中通过煮沸10min来裂解细胞,然后使用稀释缓冲液[10mM Tris-HCl(pH 8.0)、150mM NaCl、1% Triton X-100]稀释10倍。使用Flag抗体(Sigma-Aldrich)免疫沉淀裂解样本过夜,并且使用Dynabeads沉淀抗体结合蛋白。使用洗涤缓冲液A[10mM Tris-HCl(pH 8.0)、150mM NaCl、1% Triton X-100、0.1% SDS]和B[10mM Tris-HCl(pH 8.0)、150mM NaCl、1% Triton X-100]洗涤沉淀样本,然后进行蛋白质免疫印迹法。

[0184] 示例19-荧光素酶测定

[0185] 通过使用聚乙烯亚胺(Polysciences)来使用4xCol2a1-luc、Smad3/4-响应启动子(CAGA)₁₂-luc、SBE-luc、6xOSE-luc、MAST4-启动子荧光素酶报告质粒、HA-MAST4PDZ、Myc-Sox9WT/S494A/S494D质粒瞬时转染C3H10T1/2细胞。使用TGF- β 1(3ng/ml持续24h)(R&D Systems)和Vactosertib(500nM持续26小时)处理细胞。根据制造商的方案,使用荧光素酶测定系统试剂盒(Promega)分析荧光素酶活性。所有测定重复三次完成,并且归一化所有值,以测定针对 β -半乳糖苷酶活性的转染效率。

[0186] 示例20-免疫沉淀测定和蛋白质免疫印迹分析

[0187] 对于免疫沉淀测定,在4℃时将细胞提取物与指定的初级抗体一起孵育过夜。使用Dynabeads蛋白G(Invitrogen)沉淀抗体结合蛋白。在含有蛋白酶抑制剂混合物(Complete; Roche)的RIPA缓冲液中裂解细胞。通过SDS-PAGE分离样本,然后电转印(electrotransfer)

到聚偏二氟乙烯膜(PVDF;Millipore)。在室温时将膜封闭1h,并且在4℃下与初级抗体孵育过夜。使用辣根过氧化物酶偶联抗体(Millipore)作为二级抗体。使用WESTZOL(内含子)可视化过氧化物酶反应产物。所有信号均由Amersham Imager 600(GE Healthcare Life Sciences)检测。

[0188] 示例21-用于质谱分析样本制备的凝胶内消化

[0189] 切除对应于Myc-Sox9尺寸的凝胶条带,并且依次使用在25mM碳酸氢铵和100mM碳酸氢铵中制备的50%(v/v)乙腈(ACN)对凝胶条带脱色15min。在60℃时使用20mM DTT还原蛋白质1h,然后在黑暗中在室温时使用55mM碘乙酰胺烷基化蛋白质45min。脱水后,在37℃时使用在50mM碳酸氢铵中制备的质谱级胰蛋白酶/Lys-C混合物(美国,威斯康星州,麦迪逊,Promega)消化蛋白质过夜。使用在5%甲酸中制备的50%(v/v)乙腈从凝胶碎片中提取肽,在Centrivap浓缩器(美国,密苏里州,堪萨斯城,Labconco)下干燥,并且在-20℃时储存直至使用。

[0190] 示例22-用于检测Sox9磷酸化的质谱法

[0191] 通过凝胶内消化提取的肽样本悬浮于20μl溶剂A(在水中制备的0.1%甲酸,Optima LC/MS级,ThermoFisher Scientific)中。此后,将4μl样本负载到EASYSpray C18柱(75μm×50cm,2μm)中,并且使用2至35%梯度的溶剂B(在ACN中制备的0.1%甲酸)以300nL/min的流速分离65min。质谱记录在Q Exactive混合四极杆Orbitrap质谱仪(Thermo Fisher Scientific)上,该质谱仪与纳米超HPLC系统(Easy-nLC1000;Thermo Scientific)接口。喷射电压设置为1.5kV,并且加热毛细管的温度设置为250℃。在数据依赖模式下运行Q-Exactive,并且每个调查周期由质量范围为300-1400m/z的全MS扫描和10个最强离子的MS/MS扫描组成。先前碎片化的肽的排除时间为20sec。使用高能碰撞解离对肽进行碎片化,并且归一化碰撞能量值设定为27%。全MS扫描和MS/MS扫描的分辨率分别为70,000和17,500。高级增益控制目标为 5×10^4 ,最大注射时间为120ms,隔离窗口设置为3m/z。

[0192] 使用Trans-Proteomic Pipeline(v4.8.0PHILAE)处理原始数据,以转化为可搜索格式的mzXML文档。经测序的肽的数据库搜索是具有Uniprot人类数据库的SORCERER(Sage-N Research,Milpitas)平台中的Sequest(版本27)算法。亲本和碎片离子公差分别设置为10ppm(单同位素)和1Da(单同位素)。对57Da的半胱氨酸(脲甲基化)进行固定修饰。对16Da的蛋氨酸(氧化)和80Da的丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸(磷酸化)进行了各种不同的修饰。选定胰蛋白酶为具有最大允许为最高达两次错过裂解的酶。使用支架软件包(美国,俄勒冈州,波特兰,Proteome Software Inc.,版本3.4.9)验证基于MS/MS的肽和蛋白质鉴定。肽和蛋白质鉴定的阈值分别为95%最小值和95%最小值,最少2个肽。肽和蛋白FDR分别为0.2%(诱饵)和0.6%(诱饵)。

[0193] 示例23-统计学分析

[0194] 所有定量实验重复三次和/或重复至少三次。数据表示为平均值±SD。使用GraphPad Prism版本5(GraphPad Software Inc.)进行学生t检验。P<0.05被认为是统计学上显著的。在P<0.05时实现显著性。

[0195] 示例24-结果

[0196] 示例24.1-Mast4调控MSC的软骨成骨基因表达

[0197] 我们发现微管相关丝氨酸/苏氨酸激酶4(Mast4)是C3H10T1/2小鼠间充质基质细

胞和ATDC5小鼠软骨生成细胞软骨分化过程中下调的基因之一(图1a和图8)。为了研究Mast4在MSC分化中的作用,我们使用CRISPR/Cas9系统破坏了C3H10T1/2细胞中的Mast4基因,C3H10T1/2细胞在加入BMP-2或TGF- β 1时经历软骨分化(图9a、9b)²²。我们观察到,在未分化的C3H10T1/2细胞中,通过CRISPR/Cas9介导的Mast4耗竭和shRNA介导的Mast4敲低,软骨特异性基因的表达增加,并且基质金属蛋白酶(Mmp)-9/13的表达降低(图9c、9d)。此外,在高密度微团培养物中,在BMP-2刺激下分化为软骨细胞时,软骨基质基因的诱导发生得更早,并且在Mast4耗竭的C3H10T1/2细胞中增强(图1b和图9d)。有趣的是,我们注意到Mast4耗竭介导的Sox9蛋白表达增加比Sox9mRNA表达更明显,这意味着Mast4对Sox9的翻译后调控(图10)。由于Sox9是软骨细胞特异性基因的关键转录因子,因此Mast4耗竭诱导的Sox9蛋白量增加可能有助于维持C3H10T1/2细胞的软骨细胞特性。接下来,我们生成了Mast4过表达的C3H10T1/2细胞,以检查Mast4是否抑制软骨生成。由于高分子量(>285kDa)和全长Mast4的相对较低表达,我们替代地使用包含DUF、激酶和PDZ结构域的截短Mast4构建体(Mast4-PDZ)(图11a)。我们发现Mast4-PDZ蛋白的强迫表达有效地抑制了软骨细胞标记基因的表达(图11b)。

[0198] 通过使用经BMP-2处理6天的野生型和Mast4耗竭的C3H10T1/2微团培养物进行RNA测序,我们进一步表征了Mast4耗竭诱导的软骨生成增强。差异表达基因(DEG)分析在Mast4耗竭的C3H10T1/2细胞中鉴定出151个上调基因和220个下调基因(图12)。基因本体富集分析和热图分析表明,与软骨细胞分化($FDR=1.01 \times 10^{-3}$)和软骨发育($FDR=5.05 \times 10^{-6}$)相关的基因在Mast4耗竭细胞中显著地富集(图12和图1c)。qRT-PCR分别证实了软骨发育中的上调基因(图1d)和骨骼形成中的下调基因(图1e)在软骨生成和成骨分化的Mast4耗竭细胞中的表达。此外,在胶原基因中,在Mast4耗竭下特异性上调软骨特异性胶原基因(Col2a1、Col9a1、Col9a2、Col9a3、Col11a1和Col11a2)(图13)。特别是,在Mast4耗竭的细胞中,与软骨和软骨细胞发育相关的21个显著上调的基因和与BMP和TGF- β 信号传导通路相关的基因高度相互作用,这些基因在软骨生成中发挥重要作用,除了在转录网络中的软骨发育外(图1f)。有趣的是,Sox9直接与BMP2和TGF- β 1相互作用,似乎在两个信号传导通路中作为更大的节点作为网络的枢纽。综上所述,我们的数据表明,Mast4可以在调控MSC的软骨分化中发挥关键作用。

[0199] 示例24.2-Mast4通过调控Sox9稳定性来调节软骨生成

[0200] 接下来,我们验证了Mast4对MSC软骨生成的影响(图13a)。野生型细胞和Mast4耗竭细胞之间的细胞生长差异不显著,而Mast4-PDZ过表达C3H10T1/2细胞的细胞生长显著增加(图13b)。然而,阿尔新蓝染色表明,Mast4耗竭细胞中的软骨分化增强,而Mast4-PDZ的过表达抑制了软骨分化(图2a和图13c)。使用低结合板的3D球体形成测定²³还显示,由于Mast4耗竭,球体尺寸和软骨特异性基因的表达增加(图13d、13e)。此外,MAST4耗竭的人骨髓来源干细胞(hBMSC)的软骨分化显著增加了软骨聚集体的尺寸,并且增加了COL2A1和ACAN的mRNA表达(图2b和图15)。染色质免疫沉淀(ChIP)分析进一步揭示,在软骨形成分化过程中,Mast4缺失显著增加了Sox9蛋白与Col2a1基因的启动子区域的结合,而Mast4过表达降低了Sox9蛋白与Col2a1基因的启动子区域的结合(图16a)。值得注意的是,即使在没有通过Sox9激活Col2a1基因转录¹⁸的TGF- β 1处理的情况下,Mast4耗竭也足以显著增加Sox9蛋白与Col2a1基因的启动子区域的结合(图2c)。另一方面,Mast4-PDZ过表达降低了基础和TGF- β 1

诱导的Col2a1启动子活性以及提高Sox9诱导的Col2a1启动子活性,这在Mast4缺陷细胞中更为明显(图16b和图2d)。

[0201] 我们观察到Mast4耗竭导致Sox9蛋白表达增加(图10),这促使我们研究Mast4对Sox9蛋白稳定性的翻译后调控。鉴于Mast4具有丝氨酸/苏氨酸激酶的功能,我们检查了Mast4是否诱导Sox9蛋白磷酸化,从而导致其蛋白质降解。我们发现Mast4与Sox9结合,并且不仅全长的Mast4而且截短的Mast4过表达都会降低Sox9蛋白的表达,而siRNA阻断Mast4表达以剂量依赖性方式恢复Sox9蛋白表达(图2e、2f和图16c)。正如预期的那样,在Mast4缺陷细胞中,Sox9丝氨酸磷酸化显著降低,而基础Sox9蛋白表达增加,表明Mast4可以通过诱导Sox9磷酸化来促进Sox9降解(图2g和图16d)。事实上,通过MG-132处理恢复了Mast4诱导的Sox9降解(图16e)。为了鉴定Sox9蛋白中Mast4介导的磷酸化位点,我们在MG-132的存在下,在C3H10T1/2细胞中瞬时过表达Sox9和Mast4-PDZ蛋白,以防止Mast4介导的Sox9降解。然后对Sox9进行免疫沉淀,然后进行MASS SPEC分析。MASS SPEC分析显示丝氨酸494的磷酸化状态受Mast4调控(图2h)。特别是,我们观察到Mast4诱导的Sox9降解在使用Sox9WT和模拟磷酸化的Sox9蛋白的S494D替换突变体的C3H10T1/2细胞中更为明显,而Sox9蛋白的S494A替换突变体几乎没有被Mast4降解(图2i)。我们进一步发现,在野生型细胞中,Sox9S494A的Sox9诱导的Col2a1启动子报告基因的荧光素酶活性增加,与Sox9WT在Mast4耗竭细胞中的荧光素酶活性相当(图2j)。有趣的是,在没有Mast4的情况下,Sox9WT、S494A和S494D在Col2a1启动子活性上的差异不显著。此外,在Sox9S494A转染的细胞中,Mast4-PDZ介导的Col2a1活性降低不显著(图17)。我们进一步观察到稳定过表达Sox9S494A的C3H10T1/2细胞的软骨生成增加,并且通过阿尔新蓝染料染色和软骨细胞标记基因的RT-PCR减少Sox9S494D过表达细胞的软骨生成(图2k、2l)。这些结果表明,Mast4介导的Sox9蛋白在丝氨酸494处的磷酸化可以在MSC的软骨分化中发挥重要作用。

[0202] 示例24.3-TGF- β 1诱导的Mast4抑制增强Sox9-Smad3缔合

[0203] 我们观察到Mast4蛋白和Smad3蛋白之间的相互作用以及Mast4缺陷细胞中TGF- β 1/Smad3诱导的转录活性增加(图18)。此外,先前的报道表明,Smad3通过与Sox9的相互作用增强软骨形成过程中Sox9依赖性转录激活¹⁸。因此,我们假设Mast4可以通过促进Sox9蛋白降解来抑制TGF- β 1/Smad3诱导的Sox9转录活性,从而导致Smad3-Sox9复合物形成减少。事实上,Sox9蛋白稳定性和Smad3-Sox9缔合均随着Mast4耗竭而增加(图3a)。此外,我们发现Mast4耗竭提高了Col2a1基因的Sox9结合位点处的Smad3占有率(图3b)。重要的是,Smad3与Smad7启动子的结合以及TGF- β 1细胞抑制靶标基因(例如Cdkn1a、c-myc和Smad7)的表达水平不受Mast4表达状态的影响,表明TGF- β 1诱导的软骨生成分化可以依赖于控制Sox9蛋白稳定性的Mast4水平(图19)。

[0204] 考虑到TGF- β 1信号传导在软骨生成分化中的作用¹²,我们研究了TGF- β 1是否通过调控Mast4的表达来诱导软骨生成。有趣的是,TGF- β 1处理显著抑制了Mast4的mRNA和蛋白质表达(图3c)。TGF- β 1处理也抑制了Mast4启动子的活性,但TGF- β 1处理显著增加了Mast4启动子处的Smad3占有率,这意味着TGF- β 1/Smad3信号传导可以负向调控Mast4转录(图3d、3e和图20)。特别是,在C3H10T1/2细胞的软骨分化过程中和使用TGF- β 1处理的人类原代软骨细胞中,分别观察到Mast4蛋白和mRNA表达水平逐渐降低(图3f、3g)。这些与Sox9蛋白表达增加和软骨细胞标记基因的mRNA表达增加很好地相关,加强了我们对Mast4缺陷细胞的

软骨生成增强的发现。此外,使用TGF- β 受体激酶抑制剂Vactosertib处理C3H10T1/2细胞抑制TGF- β 信号传导,阻止Mast4基因下调并且阻断软骨细胞标记基因的诱导,从而表明TGF- β 1抑制Mast4表达对于MSC的软骨分化至关重要(图21)。综上所述,我们的观察结果表明,TGF- β 1/Smad3信号传导通过抑制Mast4基因表达促进软骨生成,从而导致随后Sox9蛋白的积累。

[0205] 示例24.4-Wnt诱导的Mast4稳定增加MSC的成骨

[0206] 人们普遍认为,通过控制间充质基质细胞的谱系定型和分化为成骨细胞,Wnt/ β -连环蛋白信号传导在骨骼发育中发挥关键作用¹⁹。我们观察到,通过在C3H10T1/2细胞中的Mast4耗竭下调与成骨相关的基因,导致我们研究了Mast4是否介导Wnt/ β -连环蛋白诱导的成骨。事实上,茜素红S染色证明了,通过稳定过表达Mast4-PDZ增强C3H10T1/2细胞的成骨分化(图4a和图22a、22b)。有趣的是,在未分化的MC3T3-E1前成骨细胞中,Wnt3a刺激提高了Mast4的表达(图4b)。此外,MC3T3-E1细胞的成骨分化导致Mast4表达增加以及Wnt信号传导增加,其显示为活性 β -连环蛋白和非活性GSK-3 β 水平升高(图22c)。我们进一步观察到,在C3H10T1/2细胞成骨分化过程中,Mast4-PDZ的稳定过表达显著增加了 β -连环蛋白表达和随后的Runx2表达(图4c)。这些观察得到了RNA-seq分析的支持,表明显著下调在Mast4耗竭的C3H10T1/2细胞中与成骨相关的基因(图1c)。

[0207] 有证据表明Mast4作为Wnt/ β -连环蛋白诱导的祖细胞成骨分化的有效介质发挥作用,我们发现GSK-3 β 以剂量依赖性方式降低Mast4蛋白表达,并且GSK-3 β 抑制剂处理显著增加Mast4表达(图4d)。此外,GSK-3 β 抑制和GSK-3 β 耗竭显著延迟了Mast4的降解(图22d、22e)。由于已发现GSK-3 β 诱导的磷酸化调控许多靶标蛋白的稳定性²⁴,因此我们接下来讨论了GSK-3 β 是否与Mast4相互作用以通过磷酸化Mast4来诱导其降解。我们观察到GSK-3 β 结合到与Mast4的激酶结构域并且诱导Mast4丝氨酸磷酸化(图23a、23b和图4e)。此外,在以GSK3磷酸化依赖性方式²⁴募集到靶标蛋白的报告E3泛素连接酶中,Smurf1表现出与Mast4激酶结构域的相互作用,其强度受GSK-3 β 状态的调控(图23c和图4f)。我们进一步观察到,GSK-3 β 过表达增强了Smurf1介导的Mast4降解,但是由GSK-3 β 耗竭阻断(图4g)。考虑到含有WW结构域的E3连接酶(包括Smurf1)识别共识PY基序(PPxY)²⁵,我们发现Mast4激酶结构域(P628A/Y634A)中PY样基序的突变阻止了Smurf1介导的Mast4降解,而Mast4降解不再受到GSK-3 β 耗竭的影响(图4h)。为了绘制负责GSK-3 β 介导的Mast4和Smurf1降解的区域,我们生成了Mast4-PDZ的系列缺失突变体(a.a.1-a.a.1229)。如图4i所示,在GSK-3 β 存在下,含有Mast4-PDZ的a.a.620和a.a.1229之间的区域的Mast4耗竭突变体的表达水平显著低于短于a.a.620的Mast4耗竭突变体的表达水平,表明a.a.620和a.a.1229之间的区域可以含有预期的GSK3共识磷酸化位点(SxxxS^P)。有趣的是,残基S632-S636处的氨基酸缺失减少了Smurf1介导的Mast4聚泛素化,其被GSK-3 β 增加,同时增强了Mast4的稳定性(图4j)。最终,Mast4过表达增加了 β -连环蛋白核定位和Runx2转录活性,并且通过S632-S636缺失阻断了Mast4的GSK3 β 调节而进一步增强了 β -连环蛋白核定位和Runx2转录活性(图4k、4l)。此外,Mast4-PDZ过表达或GSK-3 β 耗竭导致Runx2转录活性显著增加,并且导致随后的C3H10T1/2细胞成骨分化(图24)。综上所述,我们的数据表明,通过Wnt介导的GSK-3 β 抑制稳定的Mast4可以作为Wnt/ β -连环蛋白诱导的成骨的重要介质发挥作用。

[0208] 示例24.5-Mast4^{-/-}小鼠的骨骼异常

[0209] 为了研究Mast4在MSC分化中的作用,我们使用CRISPR/Cas9介导的敲除系统生成了Mast4^{-/-}小鼠(图25a-25d)。尽管Mast4^{-/-}小鼠是能存活的,但与野生型同窝出生小鼠相比,它们的体型变得更小(图25e)。虽然我们不能排除Mast4对其他器官的影响也会导致小鼠的小尺寸的可能性,但是我们聚焦于研究Mast4基因的破坏是否会影响在长骨中软骨内骨化期间MSC的分化,因为MSC存在于成年小鼠的许多内脏器官中。在出生后(PN)1天时,在Mast4^{+/+}小鼠的整个胫骨生长板中观察到Mast4的表达(图26a)。有趣的是,在肥大软骨细胞中观察到Mast4的表达增加,而较小部分定位在胫骨中的增殖软骨细胞中。这一观察结果支持我们关于Mast4耗竭增强C3H10T1/2细胞的软骨生成分化的发现,并且表明软骨细胞分化终末阶段中Mast4在介导向骨骼生长的转变中的作用。事实上,在PN 1天时Mast4^{-/-}小鼠生长板中观察到Sox9和Col2a1蛋白(软骨细胞的两个关键标志物)的表达更强(图5a、5b)。五色染色还显示,在PN 1天时Mast4^{-/-}小鼠的近端骨骺中的肥大细胞层增加(图5c和图26b、26c)。此外,在PN 3周时在Mast4^{-/-}小鼠的生长板中检测到更多的淡黄色五色染色,表明Mast4耗竭可以有助于生长板中胶原蛋白的合成(图5d)。Mast4^{-/-}小鼠的胫骨生长板厚度在PN 1d和3周时Mast4^{+/+}小鼠之间没有显示出显著差异,而在PN 6周时显著减少(图26b、26d)。然而,在PN 3和6周时,Mast4^{-/-}小鼠的肥大细胞层与生长板总厚度的比例显著增加(图26e)。这一观察结果表明,Mast4^{-/-}小鼠生长板肥大细胞层中的过度软骨合成导致生长板增殖减少,从而导致异常成骨。由于肥大细胞层的增加是在Mmp9^{-/-}和Mmp13^{-/-}小鼠中观察到的主要表型²⁶,因此Mast4^{-/-}小鼠中肥大细胞层的增加可能与在Mast4耗竭的C3H10T1/2细胞中观察到的Mmp9和Mmp13的下调有关(图1d和图9c)。

[0210] 另一方面,Mast4^{-/-}小鼠的μCT分析显示骨质疏松表型,该表型具有显著减少的干骺端小梁骨、更多孔且更薄的皮质骨,以及降低的骨体积和矿物质密度(图5e和图27a、27b)。此外,电子探针显微分析仪(EPMA)在6周龄Mast4^{-/-}小鼠的胫骨中显示出较低水平的骨骼发育和骨骼健康的关键矿物质离子,例如镁(Mg)、磷酸盐(P)和钙(Ca)(图27c)。特别是,我们观察到,与Mast4^{+/+}小鼠相比,通过双钙黄绿素标记测量的Mast4^{-/-}小鼠显示出骨骼形成显著减少,并且肢体长度较短(图5f和图27d)。一致地,在PN 1天时,在Mast4^{-/-}小鼠的近端胫骨和远端股骨观察到Osterix(对骨骼形成至关重要的成骨细胞标志物)和Mmp13(成熟成骨细胞的标志物和Osterix靶标)的表达降低(图5g和图28)。

[0211] 我们使用细胞表面标记物的表达²⁷进一步从Mast4^{+/+}和Mast4^{-/-}小鼠中分离了骨骼干细胞,即CD45⁻TER119⁻TIE2⁻ITGAV⁺THY1⁻6C3⁻CD105⁻的纯化群体(图29)。通过体外菌落形成测定对这些干细胞的功能评估揭示了增强的软骨生成分化(显示为较强的阿尔新蓝染色强度)但抑制的成骨分化(显示为较弱的茜素红S染色强度),Mast4^{-/-}小鼠的骨骼干细胞能力(图5h和图30)。我们还分离了骨髓来源的干细胞(BMSC)并且诱导了软骨生成和成骨分化。一致地,在Mast4^{-/-}小鼠的BMSC中观察到软骨生成增强但成骨分化减少(图31)。总体而言,我们的数据表明,Mast4调控体内MSC分化为软骨或骨骼的命运。

[0212] 示例24.6-Mast4^{-/-}小鼠的胫骨中软骨的表型

[0213] 为了更好地了解Mast4在MSC分化中的作用,我们通过收集和合并从PN 1天时Mast4^{-/-}小鼠的胫骨的骨骼和软骨获得的RNA与野生型小鼠的RNA进行RNA测序(每组3只小鼠)。差异表达(DE)分析表现出组织特异性表达,其中Mast4^{-/-}小鼠的骨骼中具有175个上调(CL1)基因和181个下调(CL2)基因,以及软骨中具有108个上调(CL4)基因和327个下调

(CL5) 基因 (图32a)。基因本体 (GO) 富集分析揭示与骨骼系统发育高度相关 (图32b中的D; 以CL2、CL3和CL4表示; $P=4.5 \times 10^{-8} \sim 9.3 \times 10^{-4}$)。值得注意的是, 120个常见差异表达基因 (DEG; CL3) 中的17个主要地鉴定为Sox9靶标基因, Sox9靶标基因对骨骼系统发育具有软骨特异性, 在骨骼和软骨之间的表达上显示出明显的转变 (图32b), 从而表明功能参与MSC分化。DEG的基因集富集分析还揭示了, 软骨中大量的DEG分配到软骨发育 ($FDR=0.001$), 而骨骼中的DEG分配到骨骼系统发育 ($FDR=0.004$) 和Wnt信号传导通路 ($FDR=0.002$) (图6a、6b)。特别是, 大多数Sox9靶基因在Mast4^{-/-}小鼠的软骨中上调, 但在骨骼中没有上调。分析了在Mast4^{-/-}小鼠的软骨和/或骨骼中显示差异表达的Sox9和Runx2靶标基因网络。这些Sox9和Runx2靶标与骨骼系统发育 (包括软骨和骨骼发育、TGF- β 信号传导、BMP信号传导和Wnt信号传导) 相关的基因高度相互作用 (图6c)。与软骨发育相关的基因与Sox9靶标基因 (即Tgfb1、Bmp7和Bgn; 软骨中的DE) 高度相互作用。然而, 与骨骼发育和Wnt信号传导相关的基因主要地与Sox9和Runx2的共同靶标基因 (即Nog、Bmp2和Sox9; 骨骼中的DE) 或Runx2靶标 (即Smad6; 骨骼中的DE) 相互作用。有趣的是, Sox9靶标基因网络显示了骨骼和软骨中胶原家族和CL3开关基因的调控。总体而言, 我们的结果表明, Mast4是与骨骼系统发育相关的转录网络的关键调控因子。

[0214] 接下来, 通过qRT-PCR在PN 1天时从野生型和Mast4^{-/-}小鼠的胫骨分离的软骨组织中进一步检测转录网络中选定的软骨基质基因和Sox9靶标基因的表达 (图33a、33b)。特别是, 下调胶原酶基因 (Mmp9和Mmp13), 支持我们的Mast4^{-/-}小鼠肥大细胞层增加的观察 (图5c)。我们还发现, 在Mast4^{-/-}小鼠的骨骼组织中, 与成骨细胞分化相关的基因的mRNA表达降低 (图33c、33d)。与这些观察结果一致, 在Mast4^{-/-}小鼠的软骨和骨骼组织中分别观察到Sox9和Col2a1的增加以及 β -连环蛋白、Runx2和Mmp13蛋白表达的减少 (图6d、6e)。综上所述, 我们对Mast4^{-/-}小鼠的分子表型的研究结果支持Mast4通过调节Sox9来调控前述基因的表达, 从而最终促进体内软骨形成。

[0215] 示例24.7-Mast4耗竭促进软骨的形成和修复

[0216] 为了进一步研究Mast4耗竭对体内软骨生成的影响, 将分化的野生型和Mast4耗竭的C3H10T1/2微团培养物经皮下植入裸鼠中, 以评估软骨形成 (图34a)。2周后, 由Mast4耗竭细胞形成的移植组织显示出体积显著增加 (图7a)。先前的报道显示, 通过皮下植入几乎无法观察到MSC的植入的软骨形成, 而更常见的是通过使用扩散腔室²⁸或植入到软骨缺损内²⁹来观察到。与这些报道类似, 由野生型和Mast4耗竭的C3H10T1/2细胞形成的移植物不包含高比例的软骨结节。然而, 我们发现由Mast4耗竭细胞形成的移植物中软骨结节形成的发生率增加。为了确认结节是否由软骨组成, 使用五色色素染色组织切片 (图34b)。在由Mast4耗竭细胞形成的移植物中, 显示出结节周围的胶原沉积增加。此外, Col2a1 (软骨生成标记蛋白) 和Sox9蛋白在由Mast4耗竭细胞形成的移植物中高度表达 (图7b)。综上所述, 这些结果表明, Mast4的耗竭可以增强在体内MSC的软骨形成定型。

[0217] 接下来, 我们在兔全层软骨缺损模型中评估了人骨髓来源干细胞 (hBMSC) 中MAST4耗竭对软骨修复的影响。由于hBMSC无法从单个细胞形成集落, 因此使用CRISPR/Cas9介导的MAST4耗竭的细胞池显示至少70%的插入/缺失、移码或21+bp插入/缺失。没有观察到异常发现或严重的炎症性反应。虽然使用媒介剂 (PBS) 处理或使用原始的hBMSC移植的膝关节中的缺损是空的并且与周围组织不同, 但使用MAST4耗竭的hBMSC移植的膝关节表现出平滑的

白色修复组织,这些组织覆盖了缺损,而没有与正常的周围软骨一起显示明显的边缘(图7c和图35)。MAST4耗竭的hBMSC移植的膝关节的修复组织结构与正常周围软骨的结构相似,而原始的hBMSC移植的膝关节的修复组织则表现出不规则的表面和边界区域的明显间隙。此外,在MAST4耗竭的hBMSC移植的膝关节的修复组织中,注意到番红素O和马松三色染色增加,而没有明显的间隙,从而分别表明软骨组织和胶原基质的产生增加。针对II型胶原的免疫组织化学染色进一步揭示了通过移植MAST4耗竭的hBMSC与周围正常组织显著强烈的表达和相似的密度。总体而言,改良的Wakitani评分分析³⁰表明,将MAST4耗竭的hBMSC移植到缺损位点显著改善软骨修复和再生(图7d和图36)。总体地,这些结果表明,Mast4耗竭可以用于软骨再生的基于MSC的疗法的有用策略。

参考文献

- [0218] 1Pittenger,M.F.et al.Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.Science(New York,N.Y.)284,143-147(1999) .
- [0219] 2Chen,Q.et al.Fate decision of mesenchymal stem cells:adipocytes or osteoblasts?Cell Death&Differentiation 23,1128-1139,doi:10.1038/cdd.2015.168 (2016) .
- [0220] 3Bell,D.M.et al.SOX9directly regulates the type-11 collagen gene.Nature Genetics 16,174-178,doi:10.1038/ng0697-174(1997) .
- [0221] 4Lefebvre,V.,Huang,W.D.,Harley,V.,Goodfellow,P.N.&de Crombrughe,B.SOX9is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the Pro α 1 (II)collagen gene.Molecular and cellular biology 17,2336-2346,doi:10.1128/MCB.17.4.2336(1997) .
- [0222] 5Bi,W.,Deng,J.M.,Zhang,Z.,Behringer,R.R.&de Crombrughe,B.Sox9is required for cartilage formation.Nature Genetics 22,85-89,doi:10.1038/8792 (1999) .
- [0223] 6Sekiya,I.et al.SOX9enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line,TC6.The Journal of biological chemistry 275,10738-10744(2000) .
- [0224] 7Liu,C.J.et al.Transcriptional activation of cartilage oligomeric matrix protein by Sox9,Sox5,and Sox6transcription factors and CBP/p300coactivators.Frontiers in bioscience:a journal and virtual library 12, 3899-3910,doi:10.2741/2359(2007) .
- [0225] 8Lefebvre,V.&Dvir-Ginzberg,M.SOX9and the many facets of its regulation in the chondrocyte lineage.Connect Tissue Res 58,2-14,doi:10.1080/03008207.2016.1183667(2017) .
- [0226] 9Chikuda,H.et al.Cyclic GMP-dependent protein kinase II is a molecular switch from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes.Genes&development 18,2418-2429,doi:10.1101/gad.1224204(2004) .
- [0227] 10Huang,W.,Chung,U.I.,Kronenberg,H.M.&de Crombrughe,B.The chondrogenic transcription factor Sox9is a target of signaling by the

parathyroid hormone-related peptide in the growth plate of endochondral bones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98,160-165,doi:10.1073/pnas.011393998(2001) .

[0228] 11 Haudenschild,D.R.,Chen,J.,Pang,N.,Lotz,M.K.&D'Lima,D.D.Rho kinase-dependent activation of SOX9 in chondrocytes. *Arthritis and rheumatism* 62,191-200,doi:10.1002/art.25051(2010) .

[0229] 12 Joyce,M.E.,Roberts,A.B.,Sporn,M.B.&Bolander,M.E.Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *The Journal of cell biology* 110,2195-2207(1990) .

[0230] 13 Kawakami,Y.,Rodriguez-León,J.&Izpisúa Belmonte,J.C.The role of TGFbetas and Sox9 during limb chondrogenesis. *Current opinion in cell biology* 18,723-729,doi:10.1016/j.ceb.2006.10.007(2006) .

[0231] 14 Chen,C.G.,Thuillier,D.,Chin,E.N.&Alliston,T.Chondrocyte-intrinsic Smad3 represses Runx2-inducible matrix metalloproteinase 13 expression to maintain articular cartilage and prevent osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism* 64,3278-3289,doi:10.1002/art.34566(2012) .

[0232] 15 Yang,X.et al.TGF-beta/Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage. *The Journal of cell biology* 153,35-46(2001) .

[0233] 16 Coricor,G.&Serra,R.TGF- β regulates phosphorylation and stabilization of Sox9 protein in chondrocytes through p38 and Smad dependent mechanisms. *Scientific Reports* 6,38616,doi:10.1038/srep38616(2016) .

[0234] 17 Chavez,R.D.,Coricor,G.,Perez,J.,Seo,H.S.&Serra,R.SOx9 protein is stabilized by TGF- β and regulates PAPSS2 mRNA expression in chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage* 25,332-340, (2017) .

[0235] 18 Furumatsu,T.,Tsuda,M.,Taniguchi,N.,Tajima,Y.&Asahara,H.Smad3 induces chondrogenesis through the activation of SOX9 via CREB-binding protein/p300 recruitment. *The Journal of biological chemistry* 280,8343-8350, doi:10.1074/jbc.M413913200(2005) .

[0236] 19 Baron,R.&Rawadi,G.Targeting the Wnt/beta-catenin pathway to regulate bone formation in the adult skeleton. *Endocrinology* 148,2635-2643, doi:10.1210/en.2007-0270(2007) .

[0237] 20 Gaur,T.et al.Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *The Journal of biological chemistry* 280,33132-33140,doi:10.1074/jbc.M500608200(2005) .

[0238] 21 Kugimiya,F.et al.GSK-3beta controls osteogenesis through regulating Runx2 activity. *PLoS One* 2,e837,doi:10.1371/journal.pone.0000837 (2007) .

[0239] 22 Denker,A.E.,Haas,A.R.,Nicol1,S.B.&Tuan,R.S.Chondrogenic

differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: I.Stimulation by bone morphogenetic protein-2 in high-density micromass cultures.Differentiation;research in biological diversity 64,67-76,doi:10.1046/j.1432-0436.1999.6420067.x(1999) .

[0240] 23 Redondo-Castro,E.et al.Generation of Human Mesenchymal Stem Cell 3D Spheroids Using Low-binding Plates.Bio Protoc 8,doi:10.21769/BioProtoc.2968(2018) .

[0241] 24 Xu,C.,Kim,N.G.&Gumbiner,B.M.Regulation of protein stability by GSK3 mediated phosphorylation.Cell Cycle 8,4032-4039,doi:10.4161/cc.8.24.10111(2009) .

[0242] 25 Huang,S.S.,Hsu,L.J.&Chang,N.S.Functional role of WW domain-containing proteins in tumor biology and diseases:Insight into the role in ubiquitin-proteasome system.FASEB Bioadv 2,234-253,doi:10.1096/fba.2019-00060(2020) .

[0243] 26 Stickens,D.et al.Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice.Development 131,5883,doi:10.1242/dev.01461(2004) .

[0244] 27 Gulati,G.S.et al.Isolation and functional assessment of mouse skeletal stem cell lineage.Nature Protocols 13,1294-1309,doi:10.1038/nprot.2018.041(2018) .

[0245] 28 Ashton,B.A.et al.Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo.Clin Orthop Relat Res,294-307(1980) .

[0246] 29 Noel,D.et al.Short-term BMP-2 expression is sufficient for in vivo osteochondral differentiation of mesenchymal stem cells.Stem Cells 22,74-85,doi:10.1634/stemcells.22-1-74(2004) .

[0247] 30 Lee,J.et al.Fully Dedifferentiated Chondrocytes Expanded in Specific Mesenchymal Stem Cell Growth Medium with FGF2 Obtains Mesenchymal Stem Cell Phenotype In Vitro but Retains Chondrocyte Phenotype In Vivo.Cell Transplant 26,1673-1687,doi:10.1177/0963689717724794(2017) .

[0248] 31 Siegel,P.M.&Massague,J.Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer.Nature reviews.Cancer 3,807-821,doi:10.1038/nrc1208(2003) .

[0249] 32 Wu,M.,Chen,G.&Li,Y.P.TGF-beta and BMP signaling in osteoblast, skeletal development,and bone formation,homeostasis and disease.Bone research 4,16009,doi:10.1038/boneres.2016.9(2016) .

[0250] 33 Matsunobu,T.et al.Critical roles of the TGF- β type I receptor ALK5 in perichondrial formation and function,cartilage integrity,and osteoblast differentiation during growth plate development.Developmental Biology 332, 325-338, (2009) .

- [0251] 34 Massague,J.,Seoane,J.&Wotton,D.Smad transcription factors.Genes& development 19,2783-2810,doi:10.1101/gad.1350705(2005) .
- [0252] 35 Kang,J.S.,Alliston,T.,Delston,R.&Derynck,R.Repression of Runx2 function by TGF-beta through recruitment of class II histone deacetylases by Smad3.The EMBO journal 24,2543-2555,doi:10.1038/sj.emboj.7600729(2005) .
- [0253] 36 Chen,C.R.,Kang,Y.,Siegel,P.M.&Massague,J.E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGFbeta receptor to c-myc repression.Cell 110,19-32 (2002) .
- [0254] 37 Minoo,P.et al.SMAD3 prevents binding of NKX2.1 and FOXA1 to the SpB promoter through its MH1 and MH2 domains.Nucleic acids research 36,179-188,doi:10.1093/nar/gkm871(2008) .
- [0255] 38 Deribe,Y.L.,Pawson,T.&Dikic,I.Post-translational modifications in signal integration.Nature structural&molecular biology 17,666-672,doi: 10.1038/nsmb.1842(2010) .
- [0256] 39 Hong,X.et al.SOX9 is targeted for proteasomal degradation by the E3 ligase FBW7 in response to DNA damage.Nucleic acids research 44,8855-8869, doi:10.1093/nar/gkw748(2016) .
- [0257] 40 Akiyama,H.,Chaboissier,M.C.,Martin,J.F.,Schedl,A.&de Crombrughe, B.The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6.Genes&development 16,2813-2828,doi:10.1101/gad.1017802(2002) .
- [0258] 41 Hattori,T.et al.E6-AP/UBE3A protein acts as a ubiquitin ligase toward SOX9 protein.The Journal of biological chemistry 288,35138-35148,doi: 10.1074/jbc.M113.486795(2013) .
- [0259] 42 Clevers,H.&Nusse,R.Wnt/beta-catenin signaling and disease.Cell 149,1192-1205,doi:10.1016/j.cell.2012.05.012(2012) .
- [0260] 43 Sutherland,C.What Are the bona fide GSK3 Substrates?Int J Alzheimers Dis 2011,505607,doi:10.4061/2011/505607(2011) .
- [0261] 44 Clement-Lacroix,P.et al.Lrp5-independent activation of Wnt signaling bylithium chloride increases bone formation and bone mass in mice.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102,17406-17411,doi:10.1073/pnas.0505259102(2005) .
- [0262] 45 Marsell,R.et al.GSK-3 inhibition by an orally active small molecule increases bone mass in rats.Bone 50,619-627,doi:10.1016/j.bone.2011.11.007(2012) .
- [0263] 46 Pearce,L.R.,Komander,D.&Alessi,D.R.The nuts and bolts of AGC protein kinases.Nature reviews.Molecular cell biology 11,9-22,doi:10.1038/nrm2822(2010) .
- [0264] 47 Clay,M.R.,Varma,S.&West,R.B.MAST2 and NOTCH1 translocations in

breast carcinoma and associated pre-invasive lesions. *Human pathology* 44,2837-2844,doi:10.1016/j.humpath.2013.08.001(2013) .

[0265] 48 Valiente,M.et al.Binding of PTEN to specific PDZ domains contributes to PTEN protein stability and phosphorylation by microtubule-associated serine/threonine kinases. *The Journal of biological chemistry* 280, 28936-28943,doi:10.1074/jbc.M504761200(2005) .

[0266] 49 Hibar,D.P.et al.Novel genetic loci associated with hippocampal volume. *Nature communications* 8,13624,doi:10.1038/ncomms13624(2017) .

[0267] 50 Steffens,M.et al.Genome-wide association analysis of genetic generalized epilepsies implicates susceptibility loci at 1q43,2p16.1,2q22.3 and 17q21.32. *Human molecular genetics* 21,5359-5372,doi:10.1093/hmg/dds373(2012) .

[0268] 51 De Simone,R.,Puig,X.S.,Gelisse,P.,Crespel,A.&Genton,P.Senile myoclonic epilepsy:delineation of a common condition associated with Alzheimer's disease in Down syndrome. *Seizure* 19,383-389,doi:10.1016/j.seizure.2010.04.008(2010) .

[0269] 52 Nagel,A.K.,Schilling,M.,Comte-Walters,S.,Berkaw,M.N.&Ball,L.E.Identification of O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc)-modified osteoblast proteins by electron transfer dissociation tandem mass spectrometry reveals proteins critical for bone formation. *Mol Cell Proteomics* 12,945-955,doi:10.1074/mcp.M112.026633(2013) .

[0270] 53 Lee,S.-J.et al.Mast4 knockout shows the regulation of spermatogonial stem cell self-renewal via the FGF2/ERM pathway. *Cell Death& Differentiation* 28,1441-1454,doi:10.1038/s41418-020-00670-2(2021) .

[0271] 54 Meka,S.R.K.,Chacko,L.A.,Ravi,A.,Chatterjee,K.&Ananthanarayanan,V.Role of Microtubules in Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells on 3D Nanofibrous Scaffolds. *ACS Biomaterials Science&Engineering* 3,551-559,doi:10.1021/acsbiomaterials.6b00725(2017) .

[0272] 55 Cong,L.et al.Multiplex genome engineering using CRISPR/Cassystems. *Science (New York,N.Y.)* 339,819-823,doi:10.1126/science.1231143(2013) .

[0273] 56 Yi,T.et al.Manufacture of Clinical-Grade Human Clonal Mesenchymal Stem Cell Products from Single Colony Forming Unit-Derived Colonies Based on the Subfractionation Culturing Method. *Tissue Eng Part C-Me* 21,1251-1262,doi:10.1089/ten.tec.2015.0017(2015) .

[0274] 57 Lee,D.K.et al.Continuous transforming growth factor beta1 secretion by cell-mediated gene therapy maintains chondrocyte redifferentiation. *Tissue Eng* 11,310-318,doi:10.1089/ten.2005.11.310(2005) .

[0275] 58 Kim,D.et al.TopHat2:accurate alignment of transcriptomes in

the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol* 14, R36, doi:10.1186/gb-2013-14-4-r36 (2013).

[0276] 59 Trapnell, C. et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology* 28, 511-515, doi:10.1038/nbt.1621 (2010).

[0277] 60 Huang da, W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4, 44-57, doi:10.1038/nprot.2008.211 (2009).

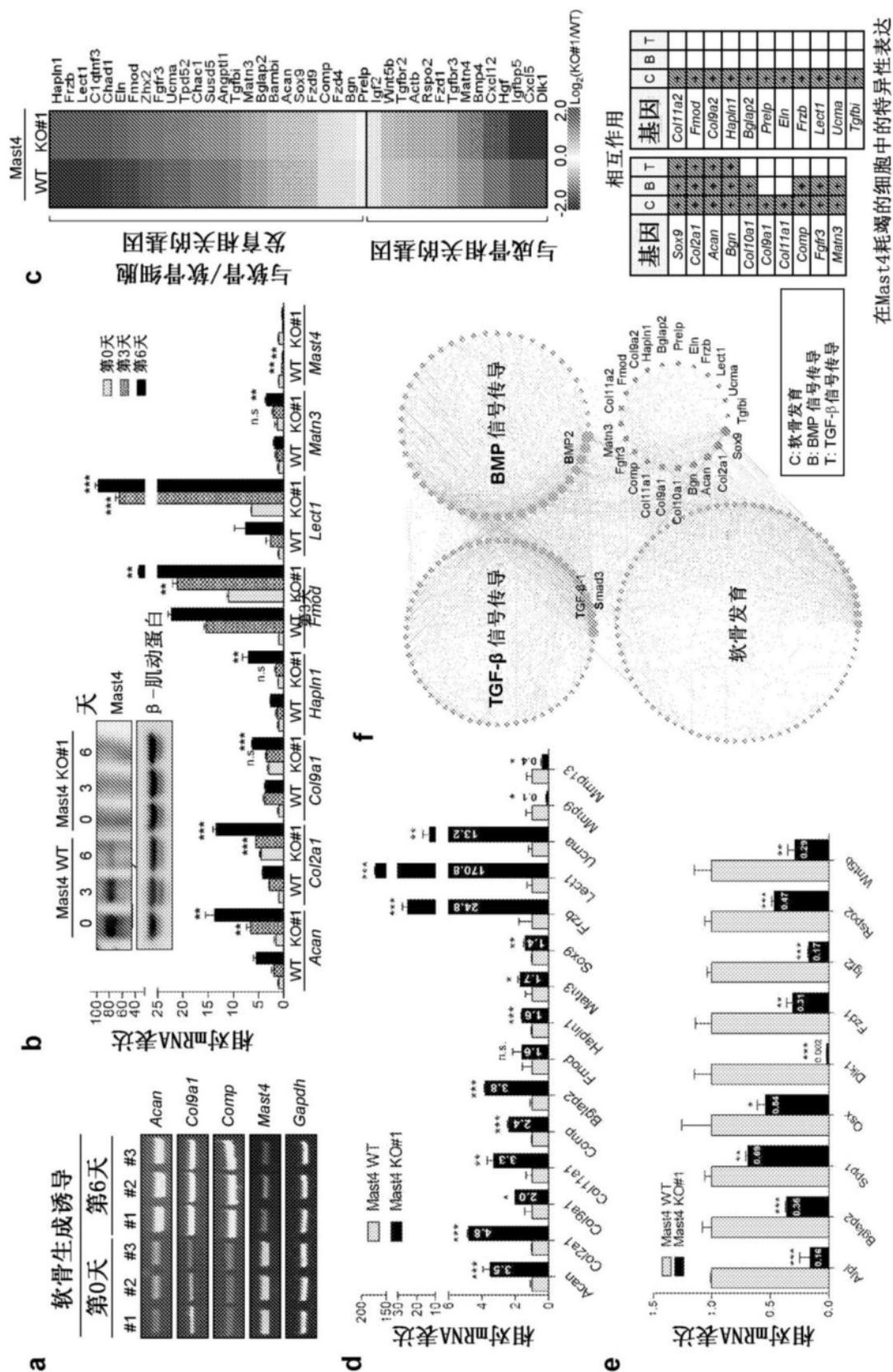
[0278] 61 Subramanian, A. et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 15545-15550, doi:10.1073/pnas.0506580102 (2005).

[0279] 62 Ramskold, D., Wang, E. T., Burge, C. B. & Sandberg, R. An abundance of ubiquitously expressed genes revealed by tissue transcriptome sequence data. *PLoS Comput Biol* 5, e1000598, doi:10.1371/journal.pcbi.1000598 (2009).

[0280] 63 Rauch, D. A. et al. The ARF tumor suppressor regulates bone remodeling and osteosarcoma development in mice. *PloS one* 5, e15755-e15755, doi:10.1371/journal.pone.0015755 (2010).

[0281] 64 Park, Y. B. et al. Single-stage cell-based cartilage repair in a rabbit model: cell tracking and in vivo chondrogenesis of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and hyaluronic acid hydrogel composite. *Osteoarthritis Cartilage* 25, 570-580, doi:10.1016/j.joca.2016.10.012 (2017). 本文中引用的所有参考文献均通过引用全部并入。

[0282] 本领域技术人员会认识到, 或者能够确定使用不超过常规实验的方式能够确定许多等同于本文具体描述的本发明的具体实施例。此类等同物旨在涵盖在所附权利要求书的范围中。



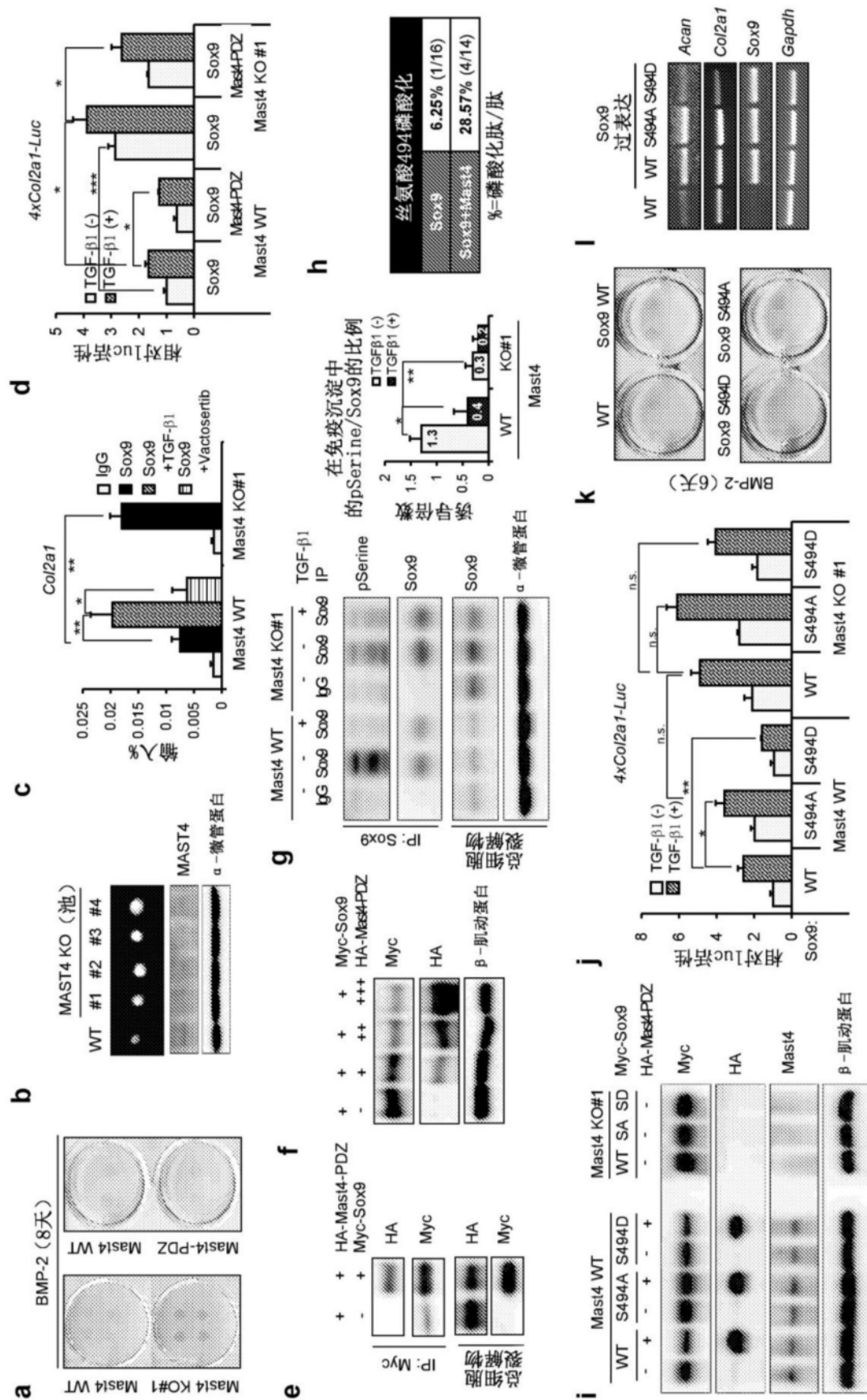


图2

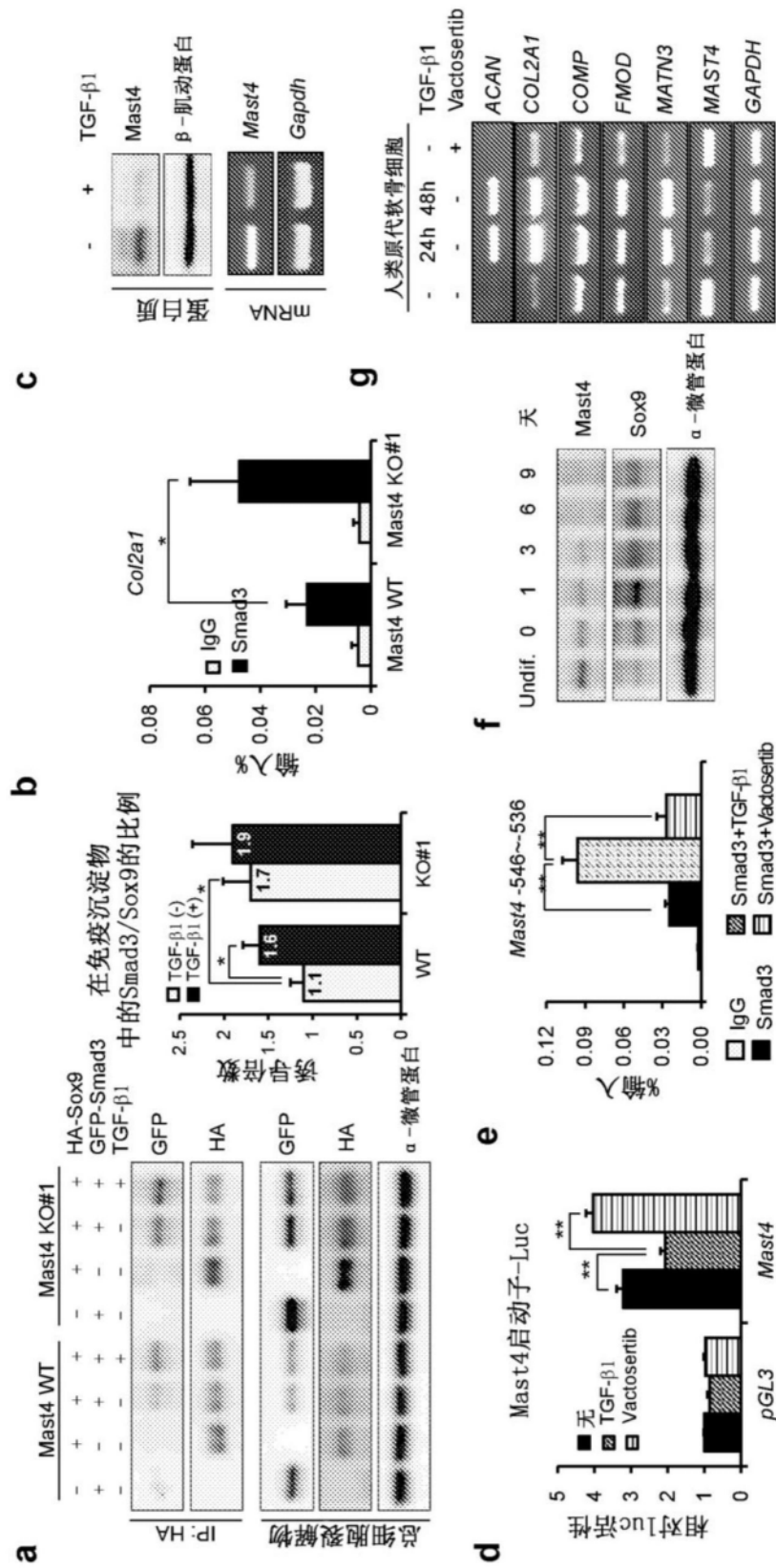


图3

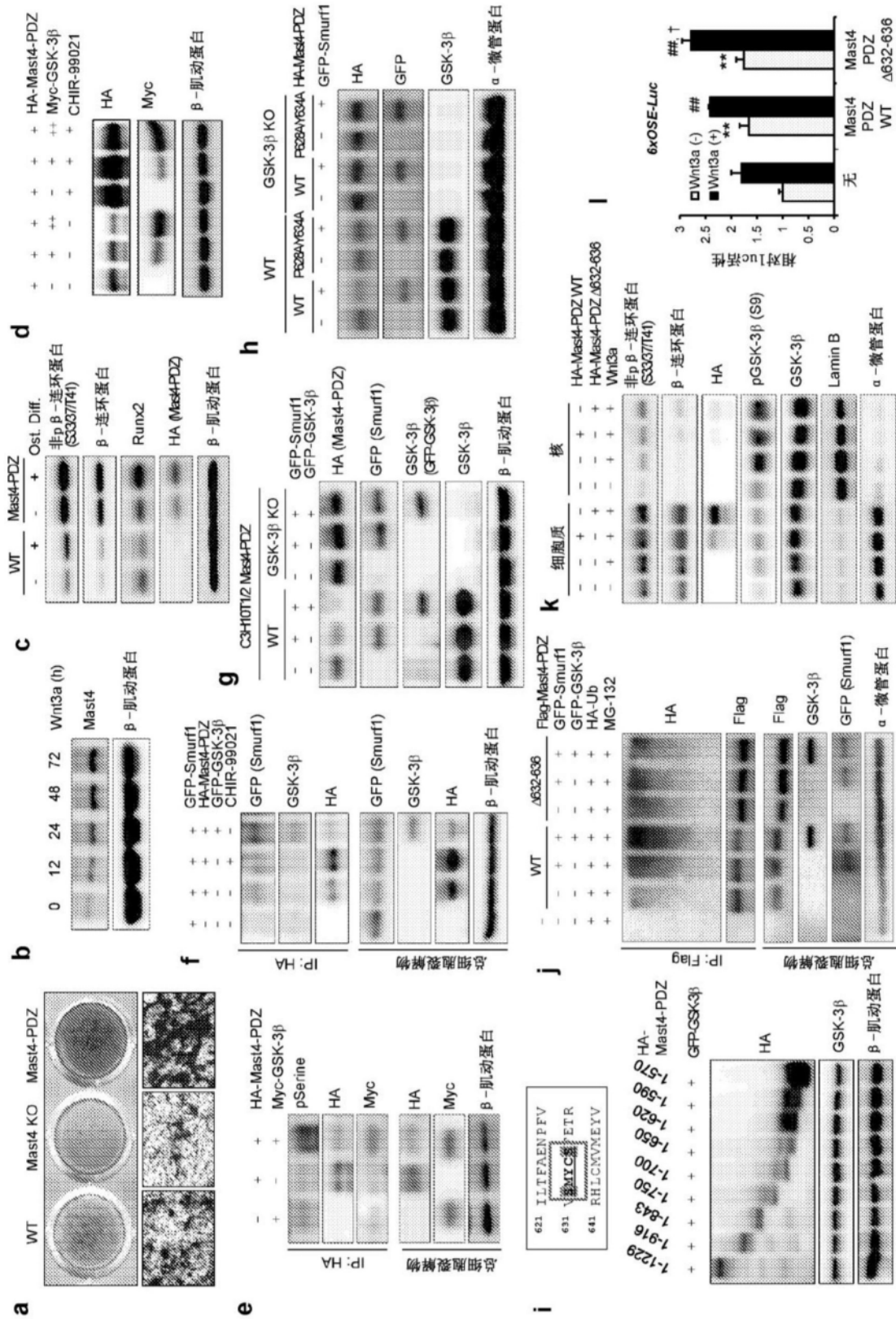


图4

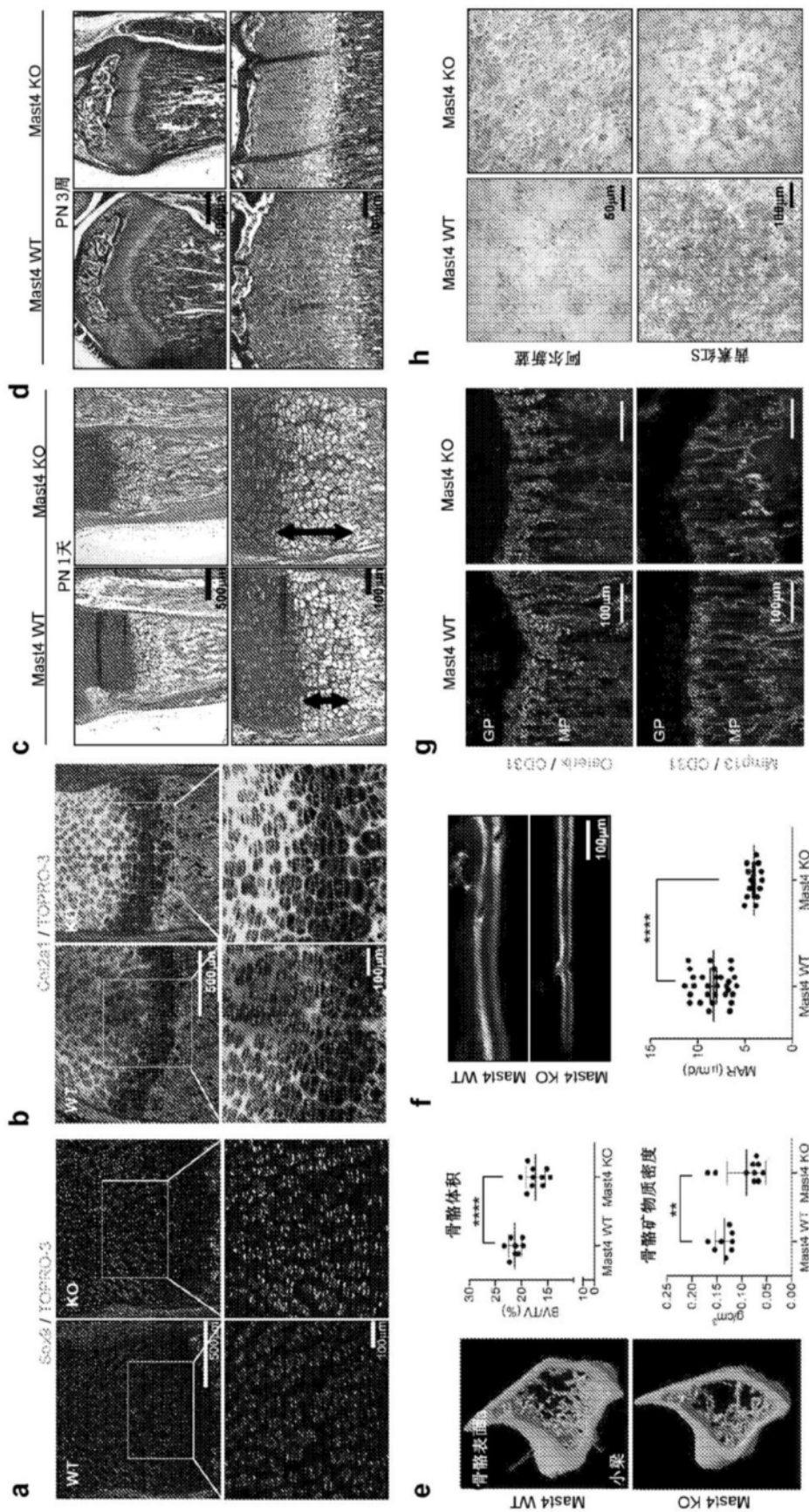


图5

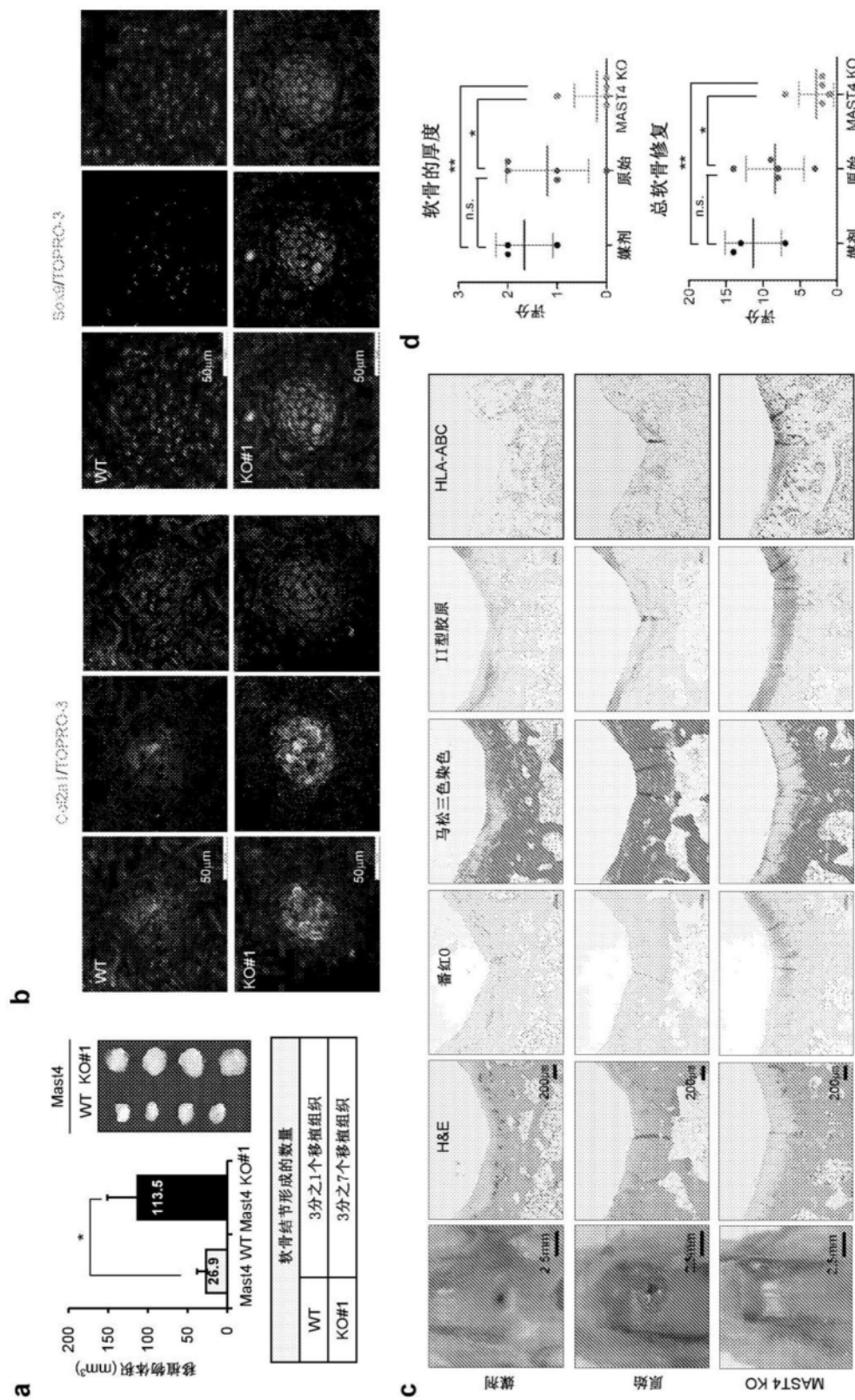


图7

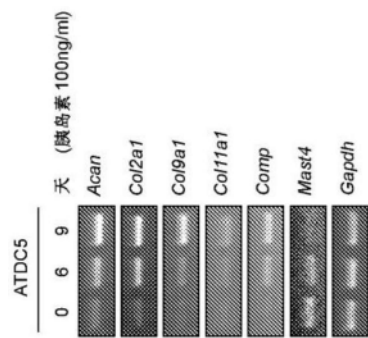


图8

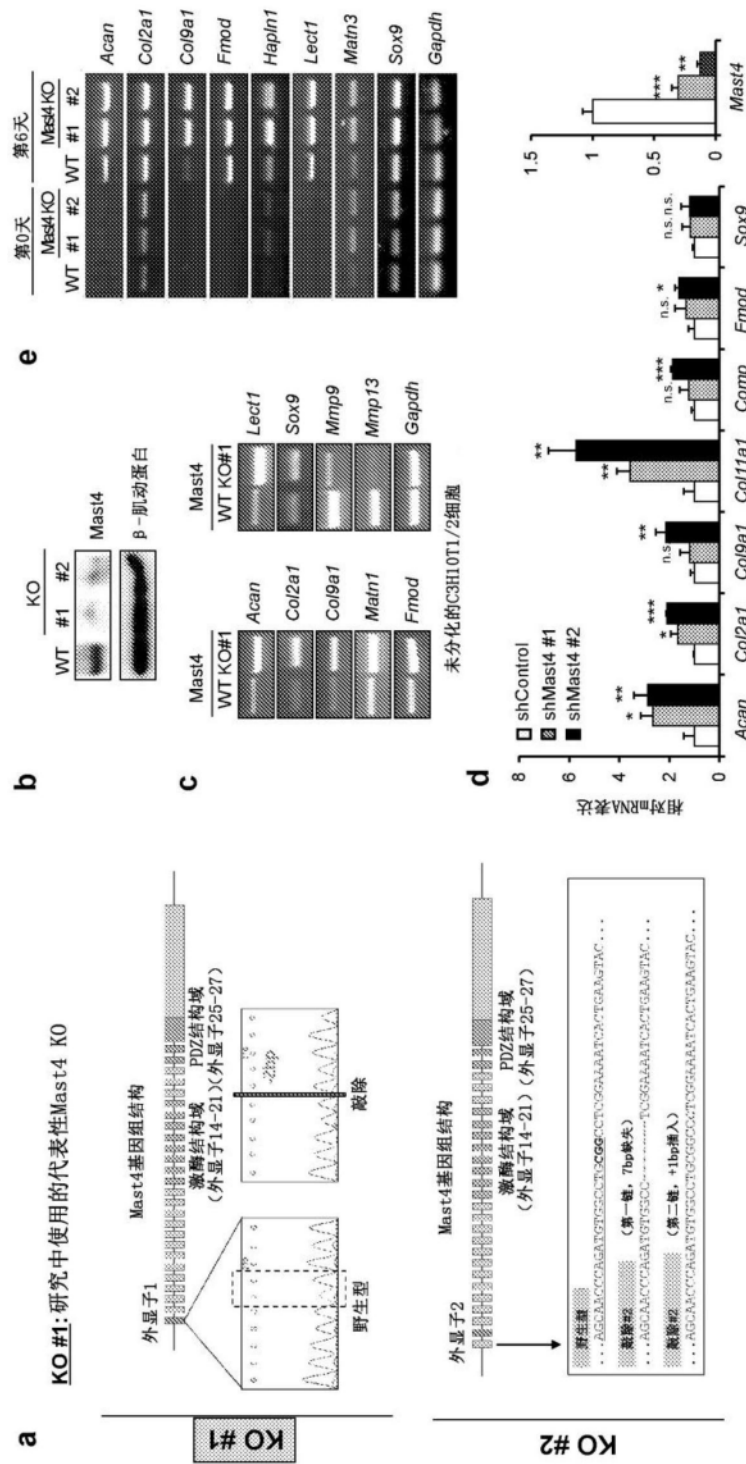


图9

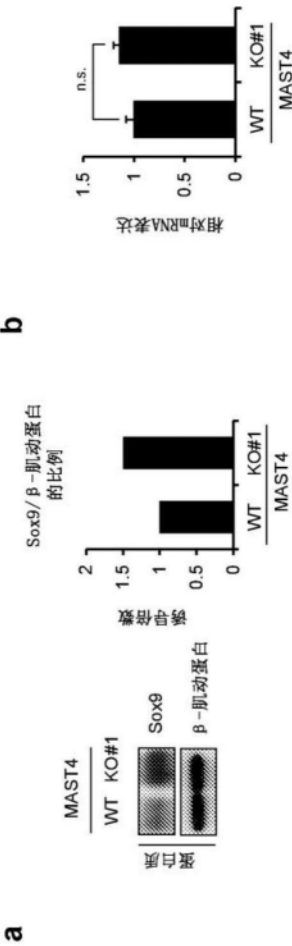


图10

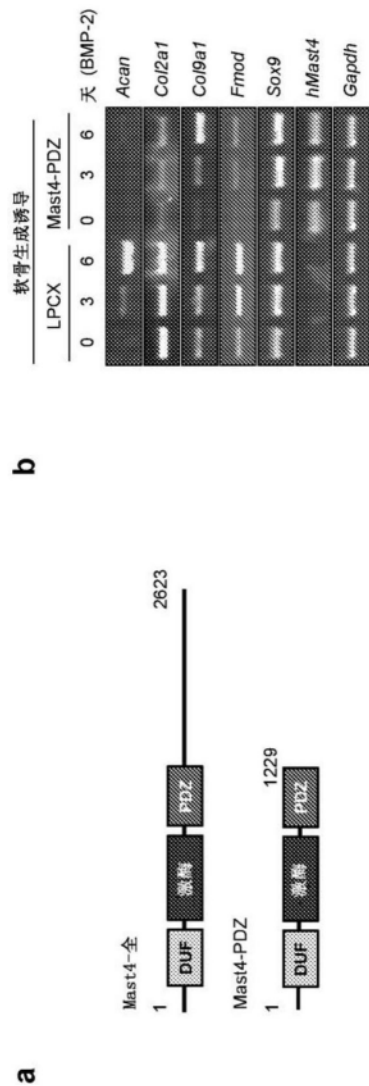


图11

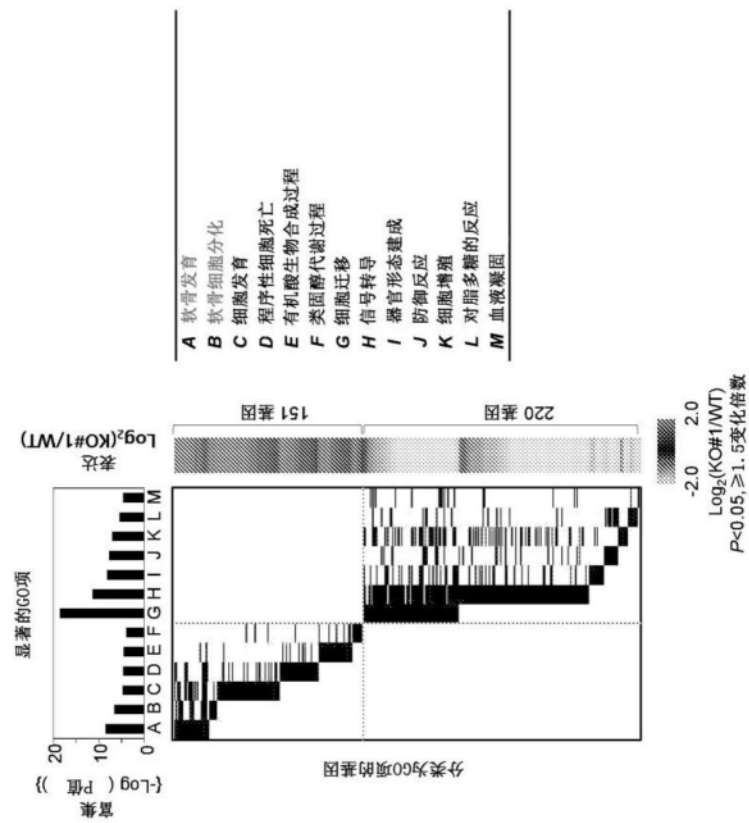


图12

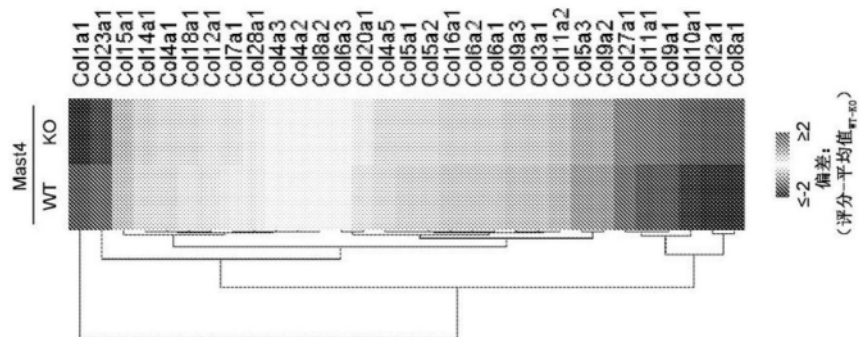


图13

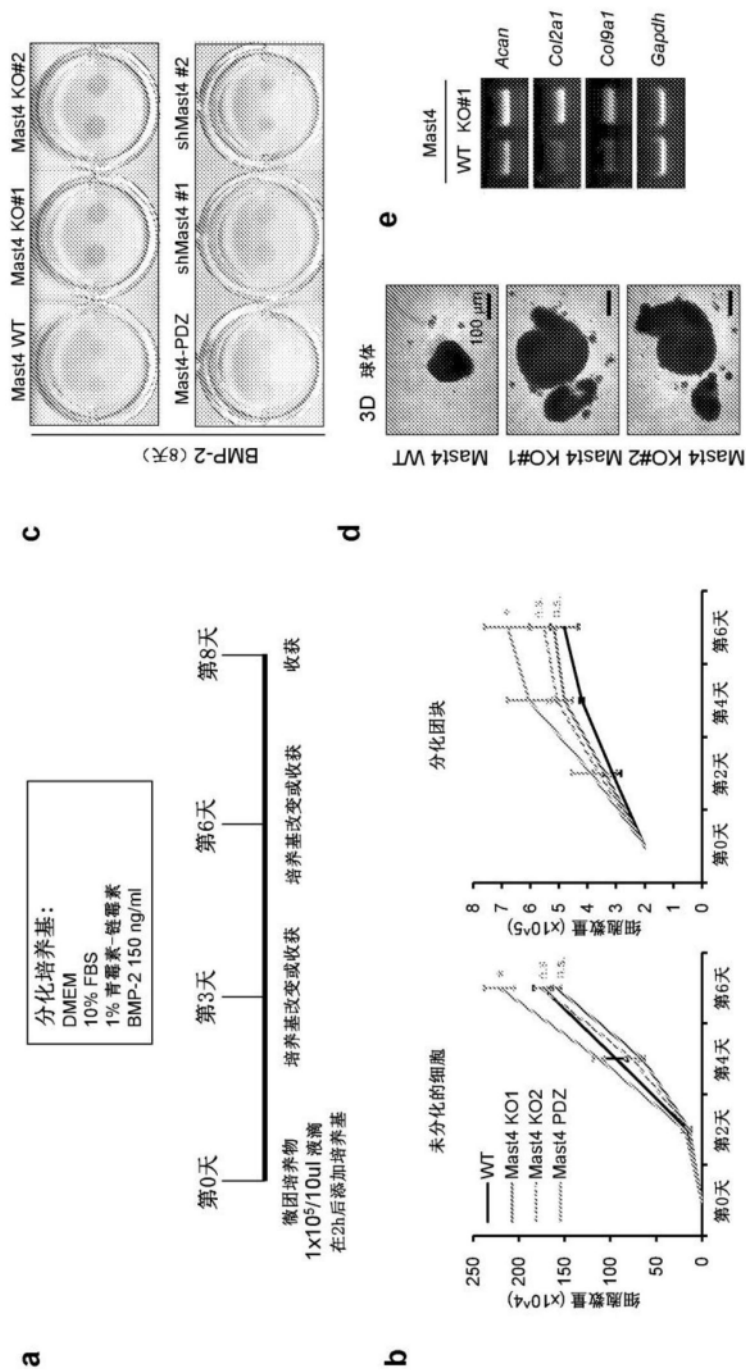


图14

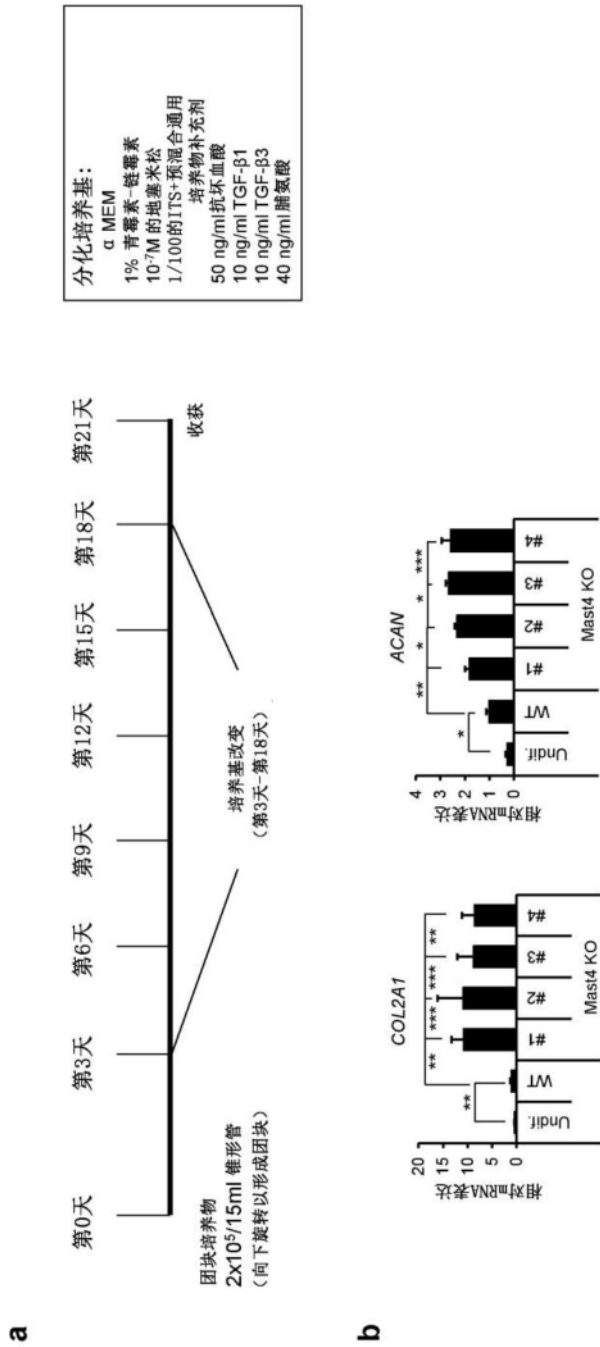


图15

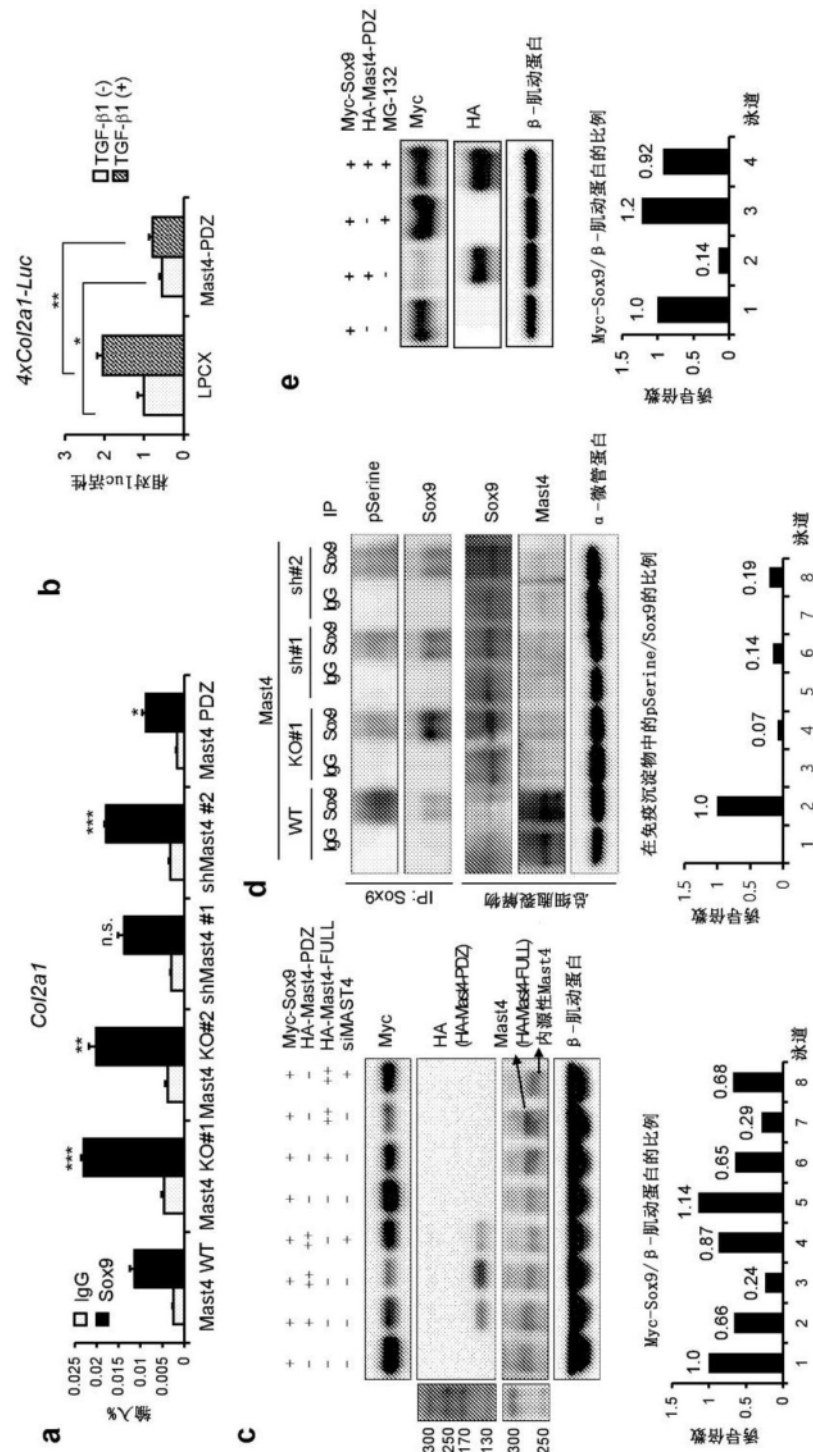


图16

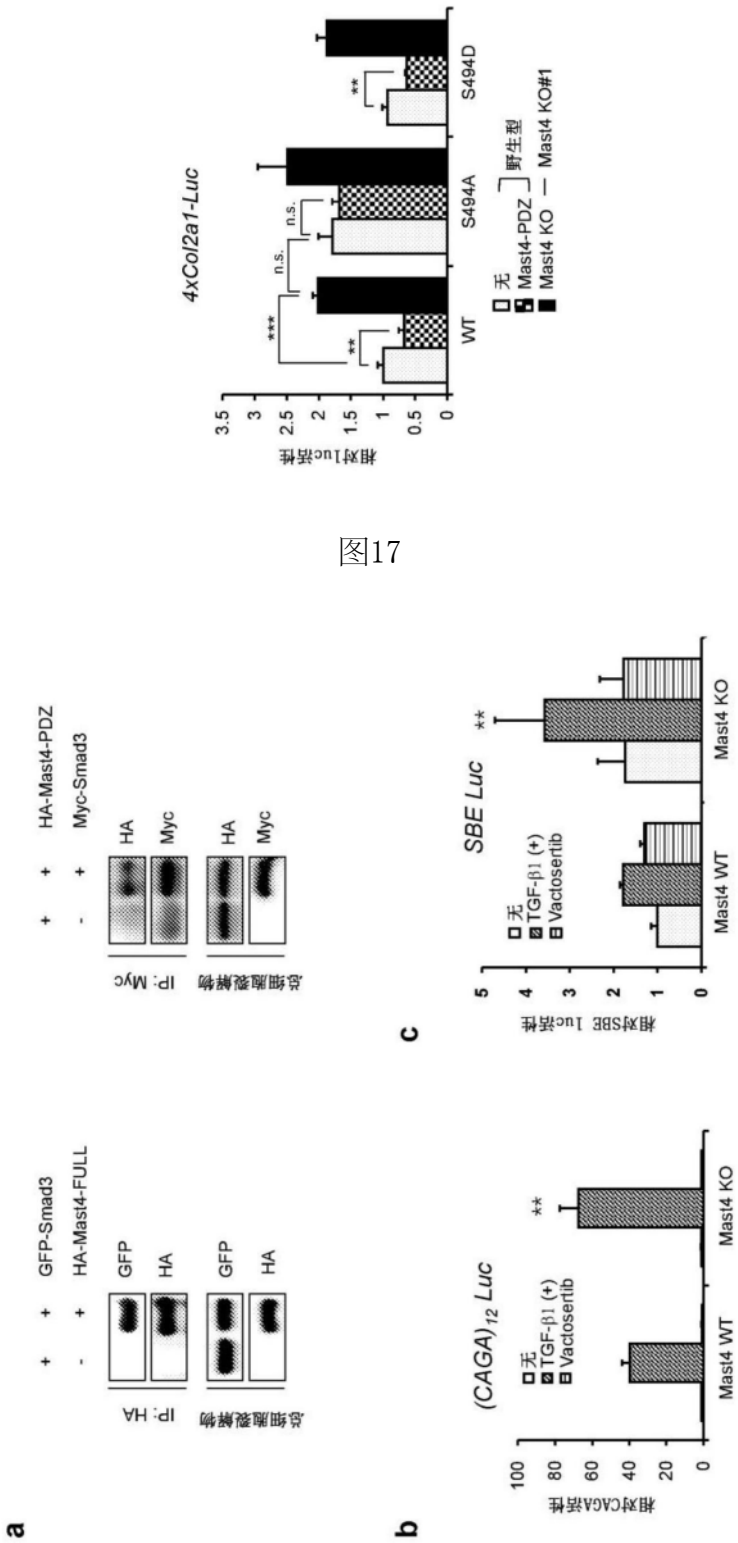


图17

图18

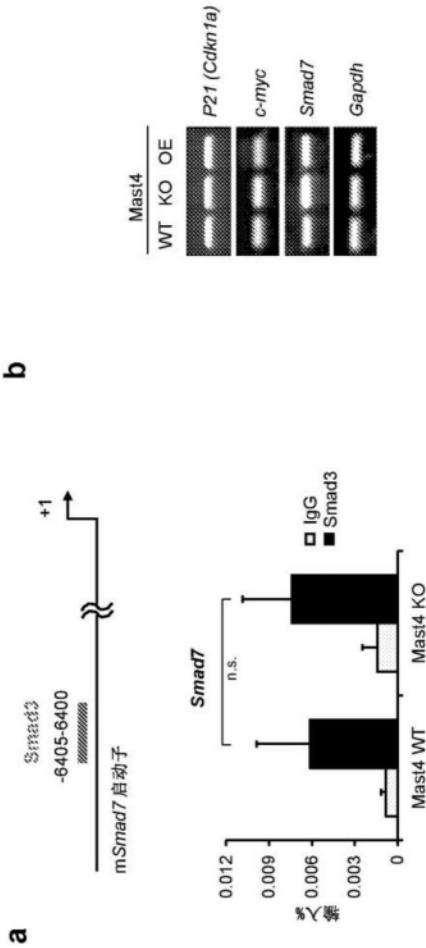


图19

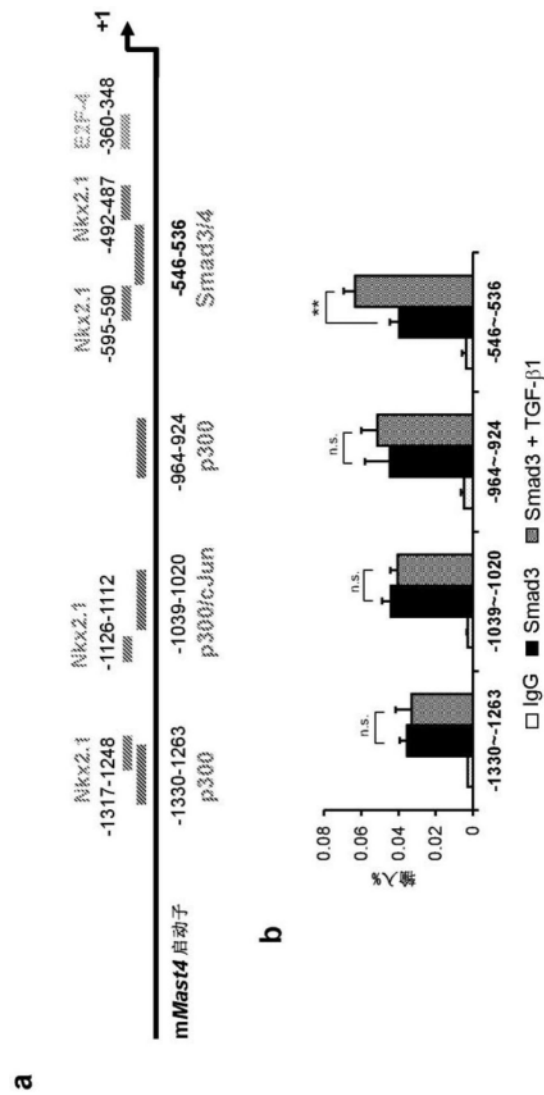


图20

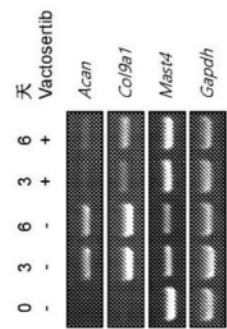


图21

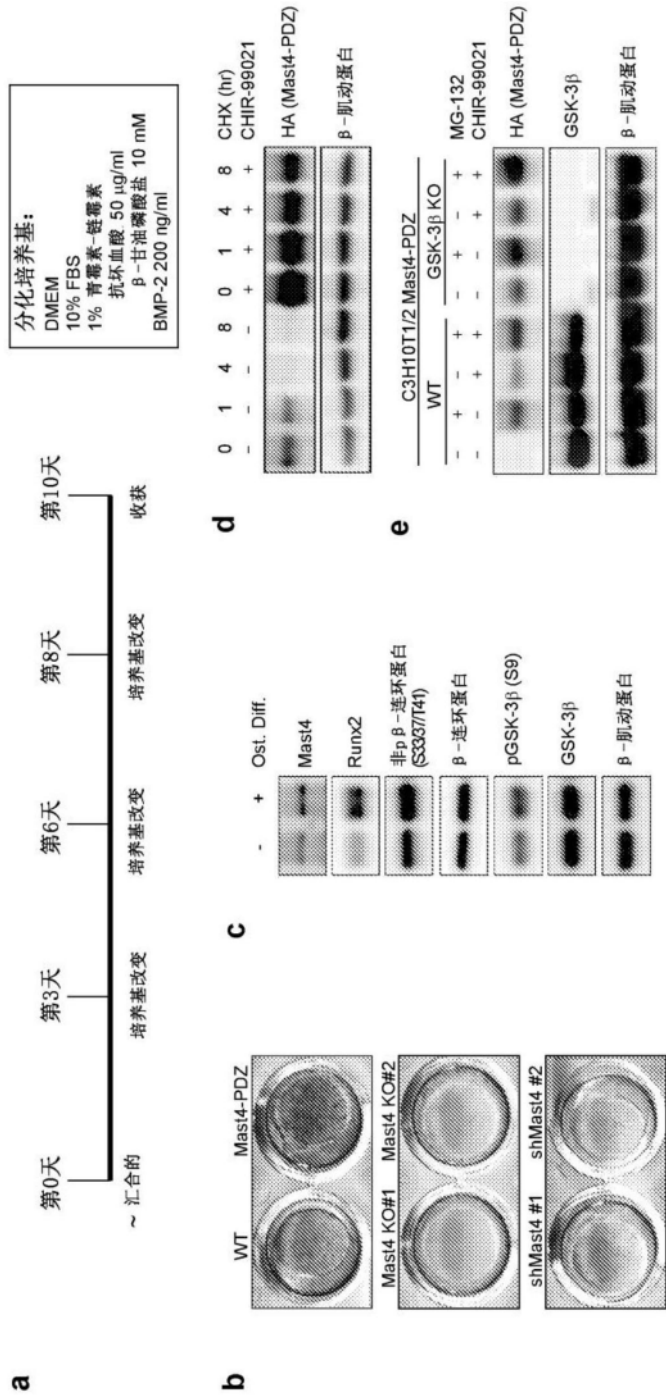


图22

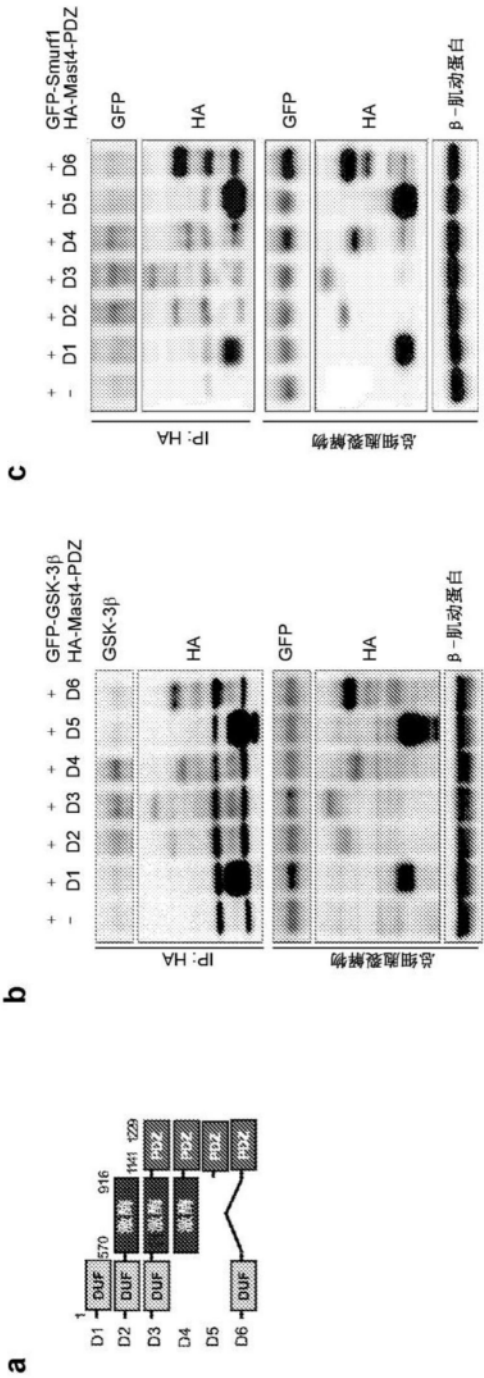


图23

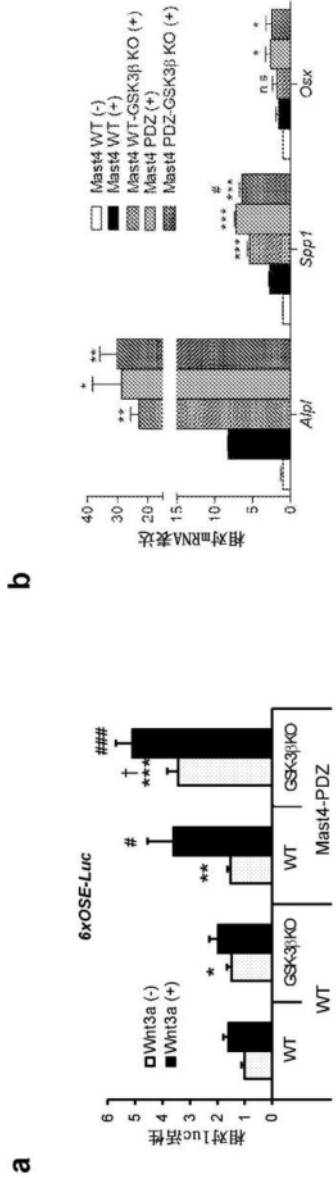


图24

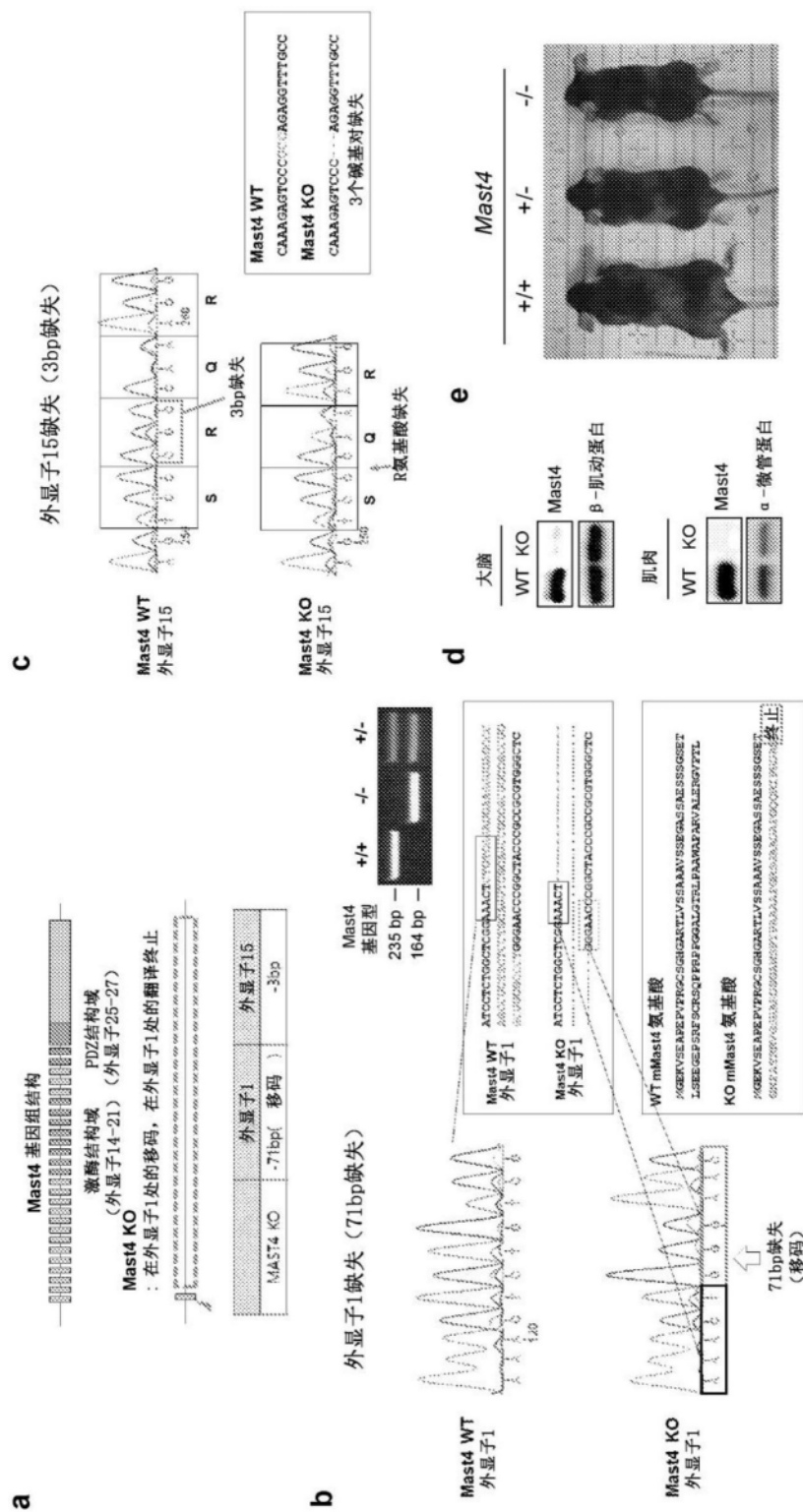


图25

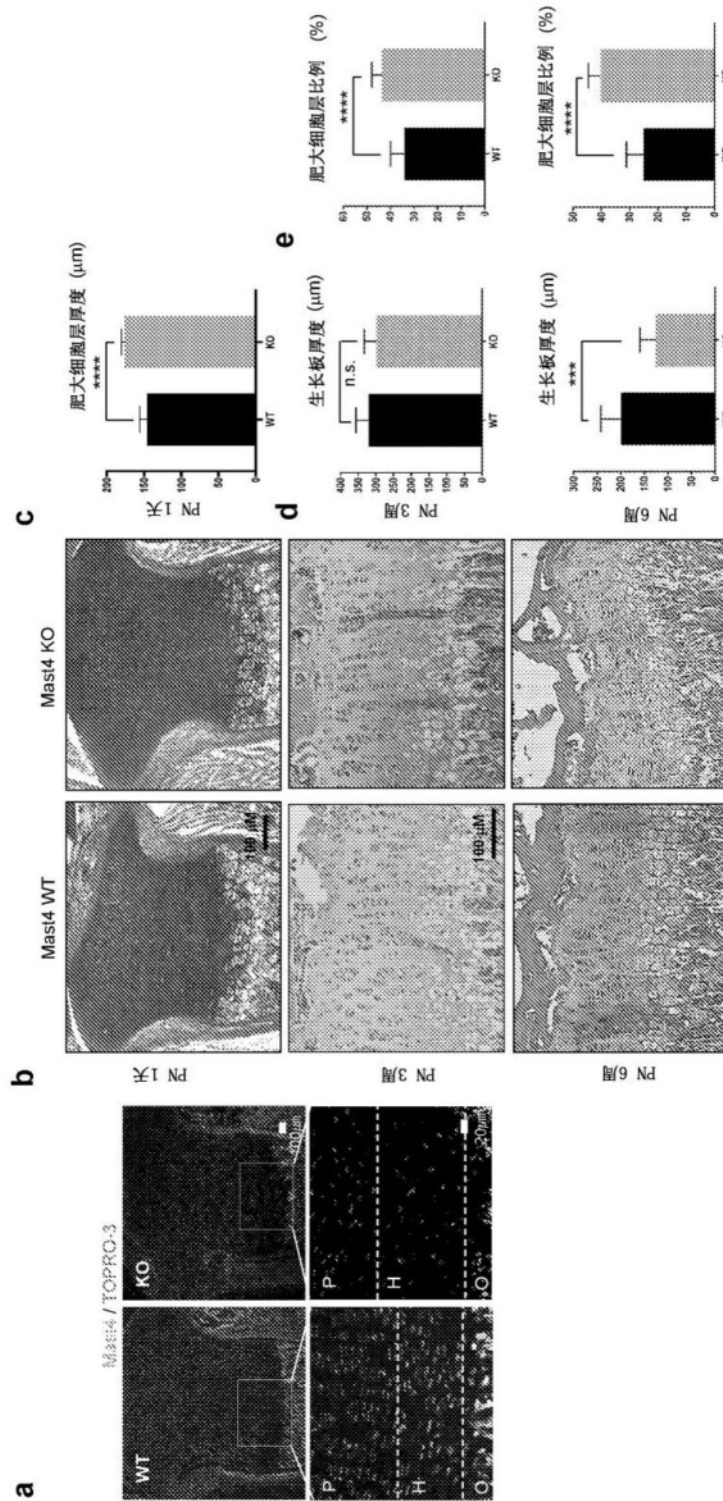


图26

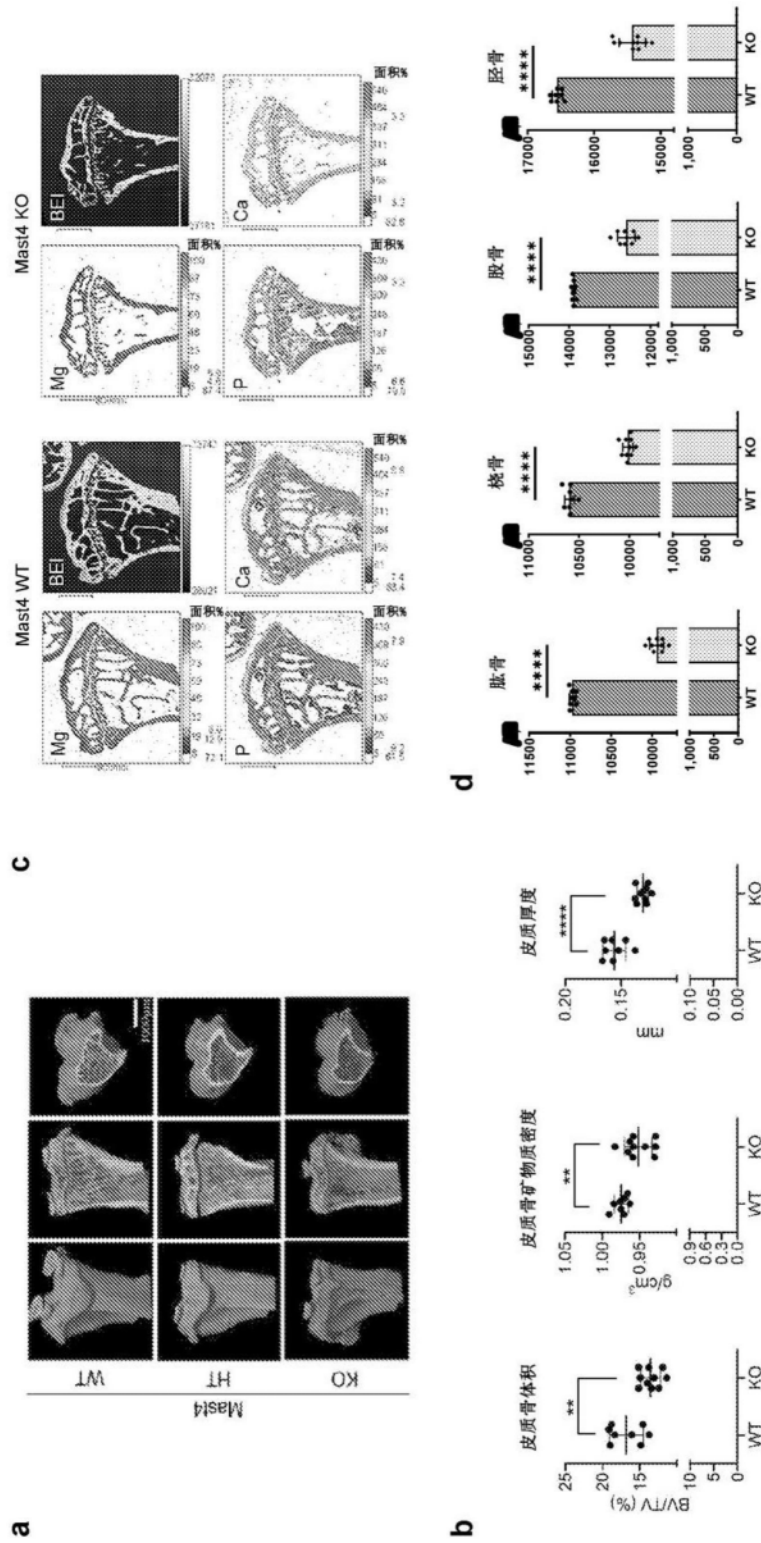


图27

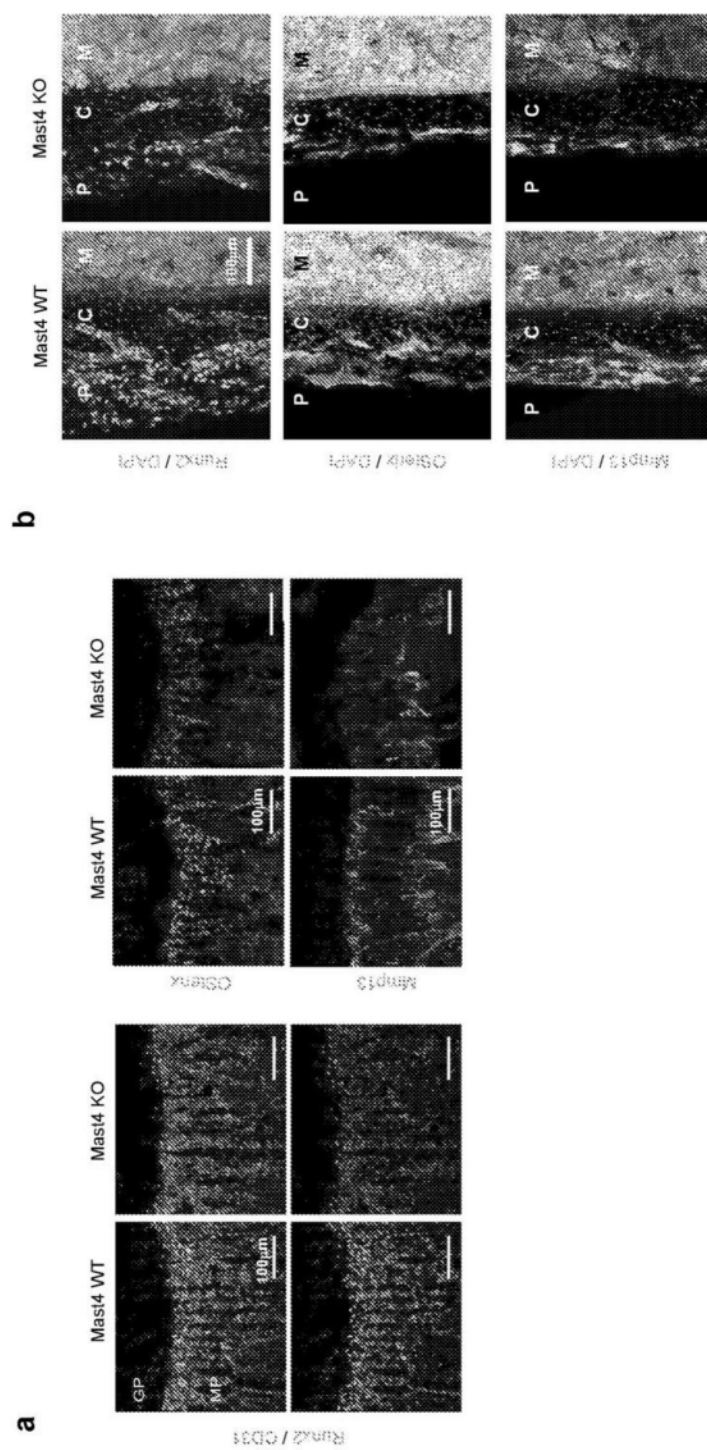


图28

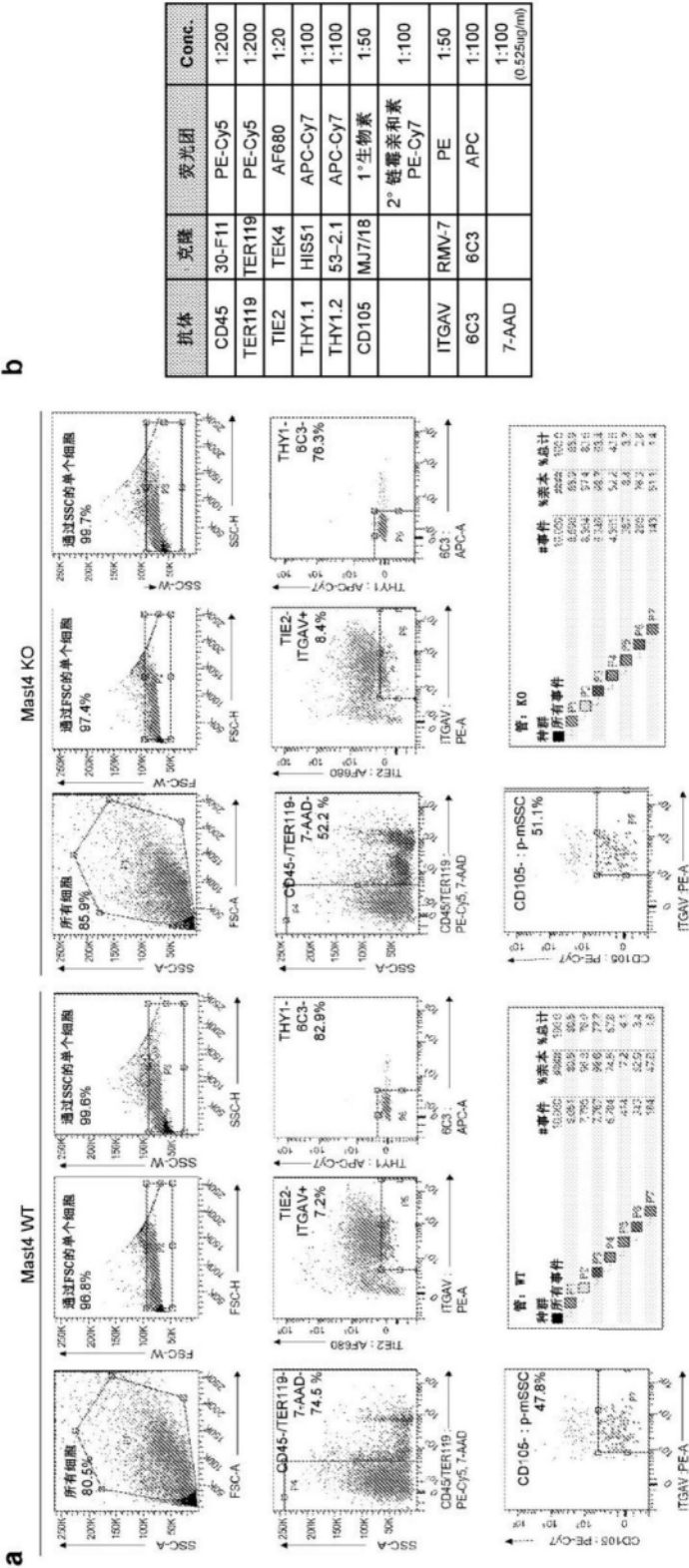


图29

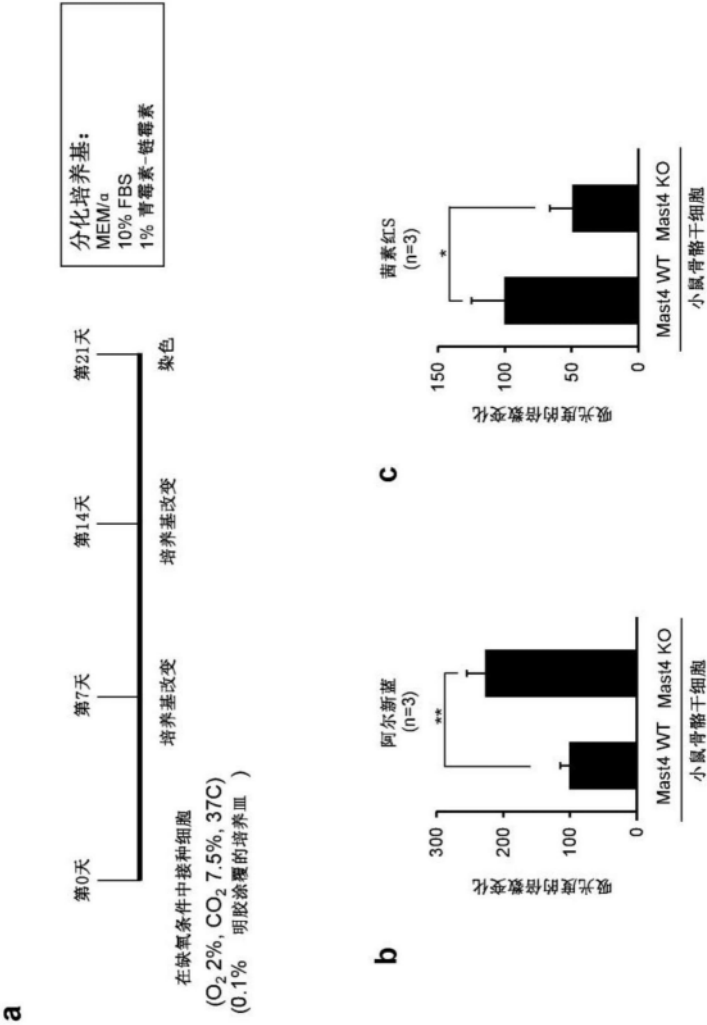


图30

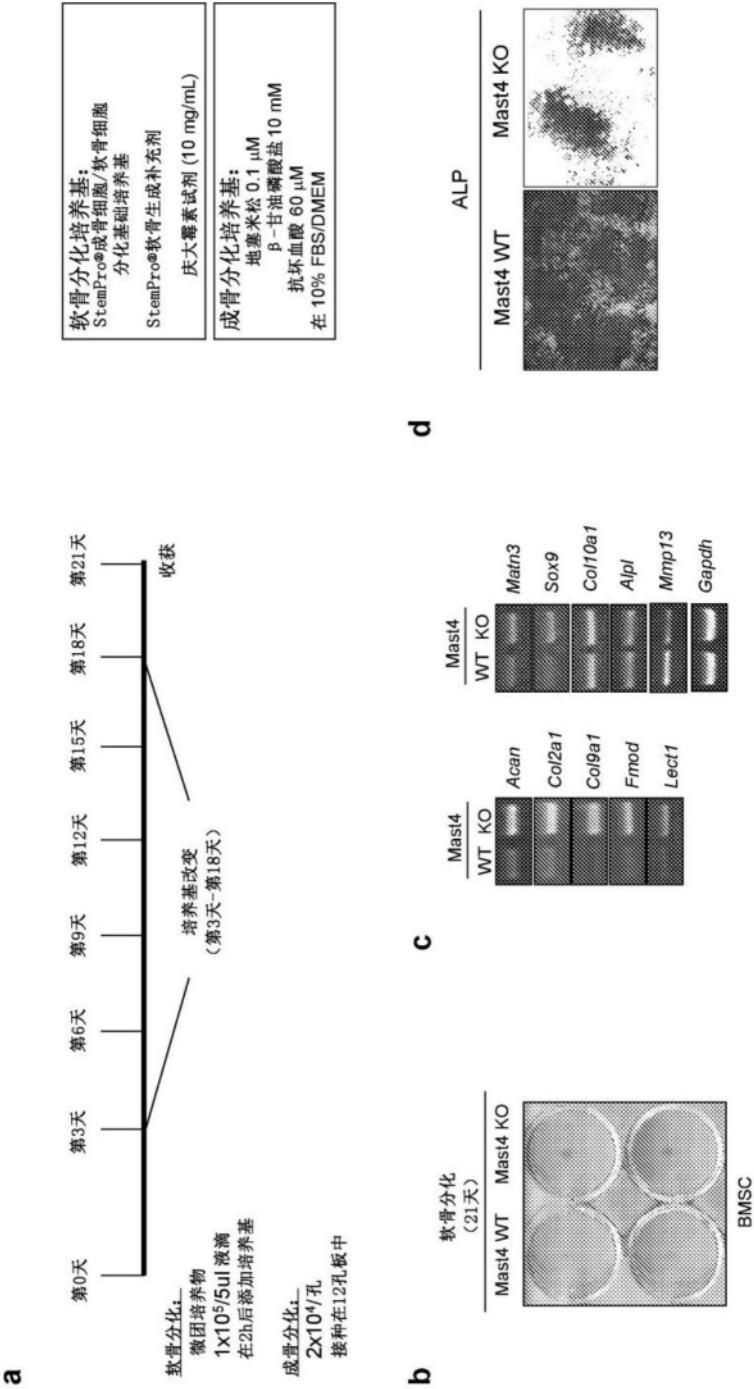


图31

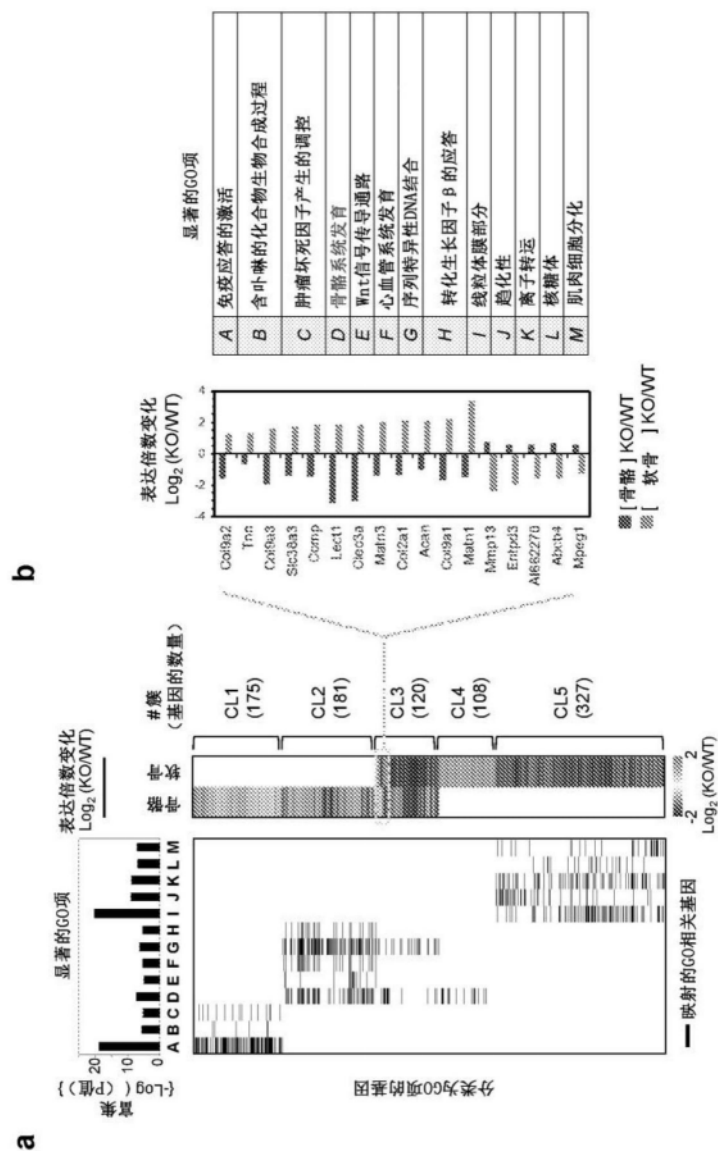


图32

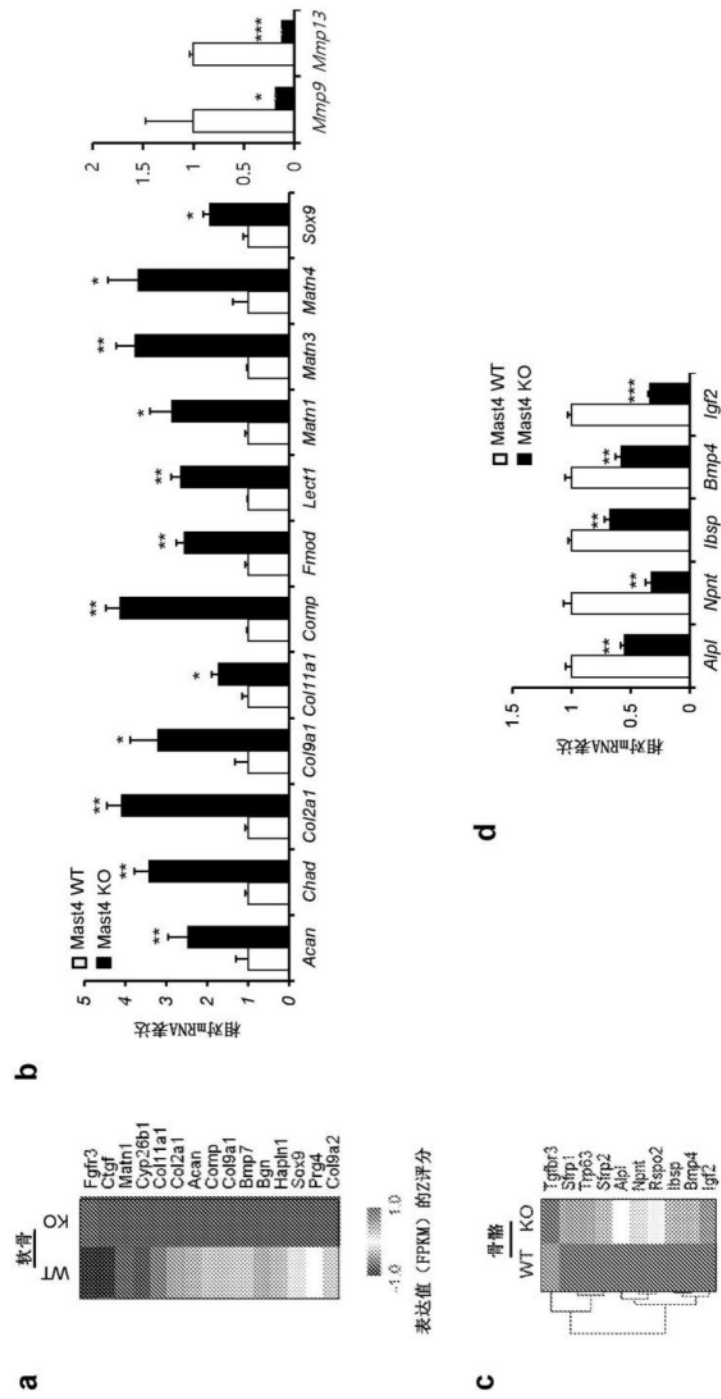


图33

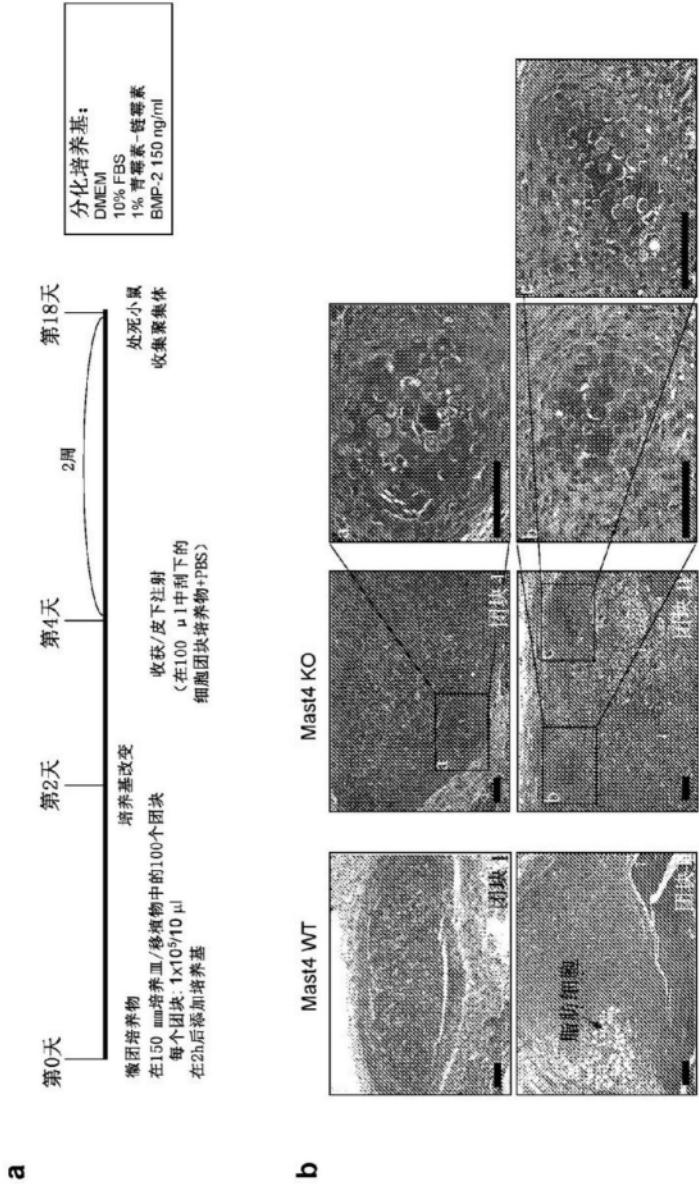


图34

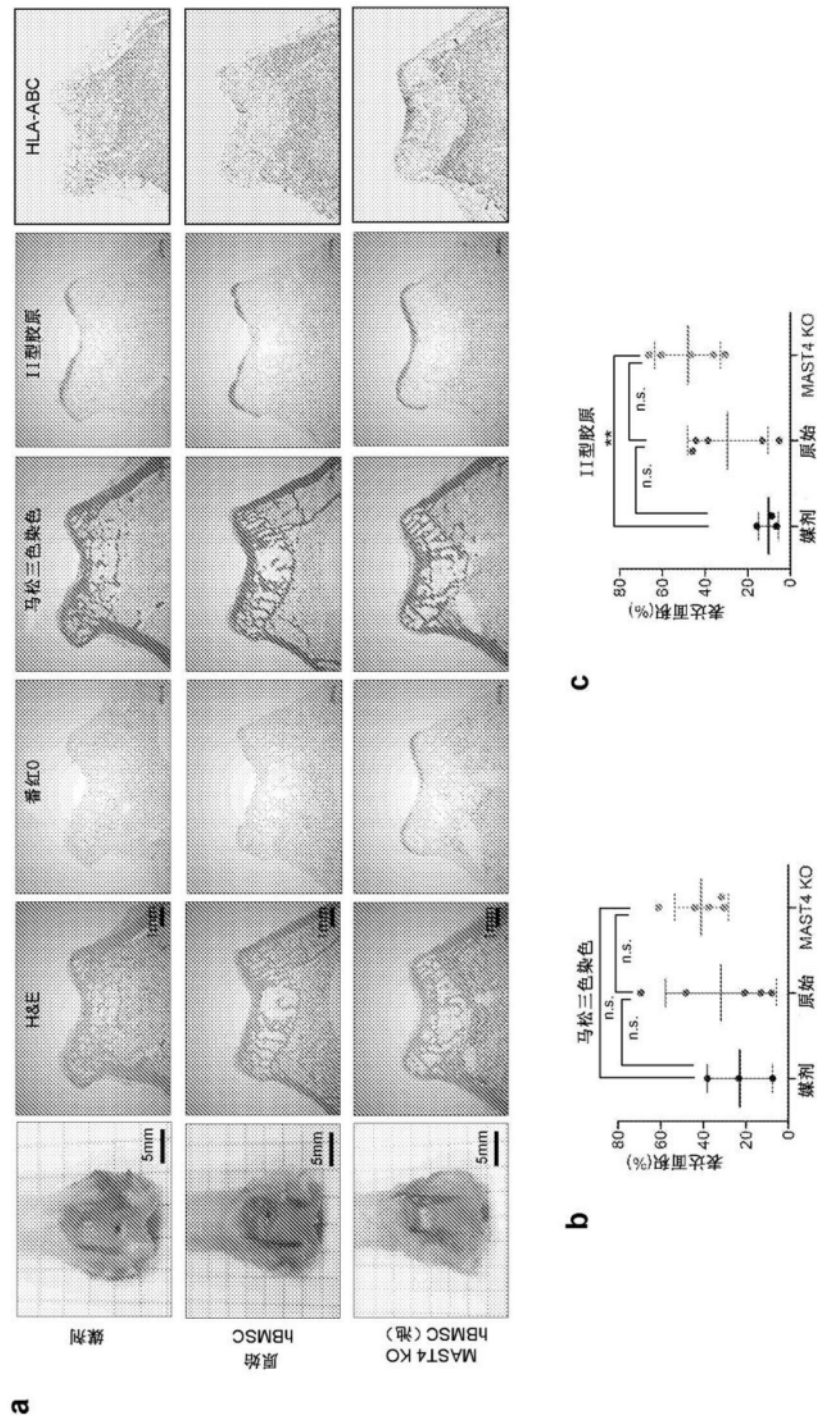


图35

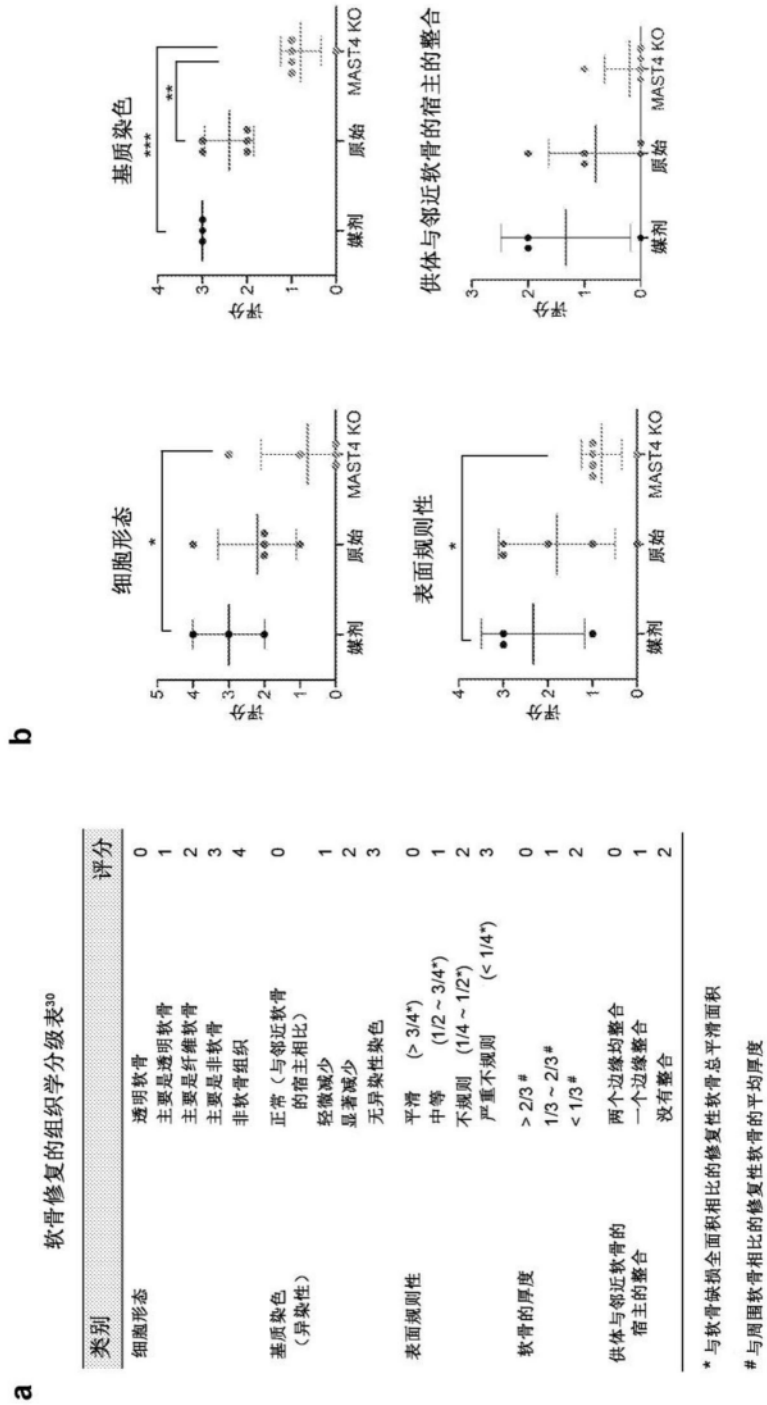


图36

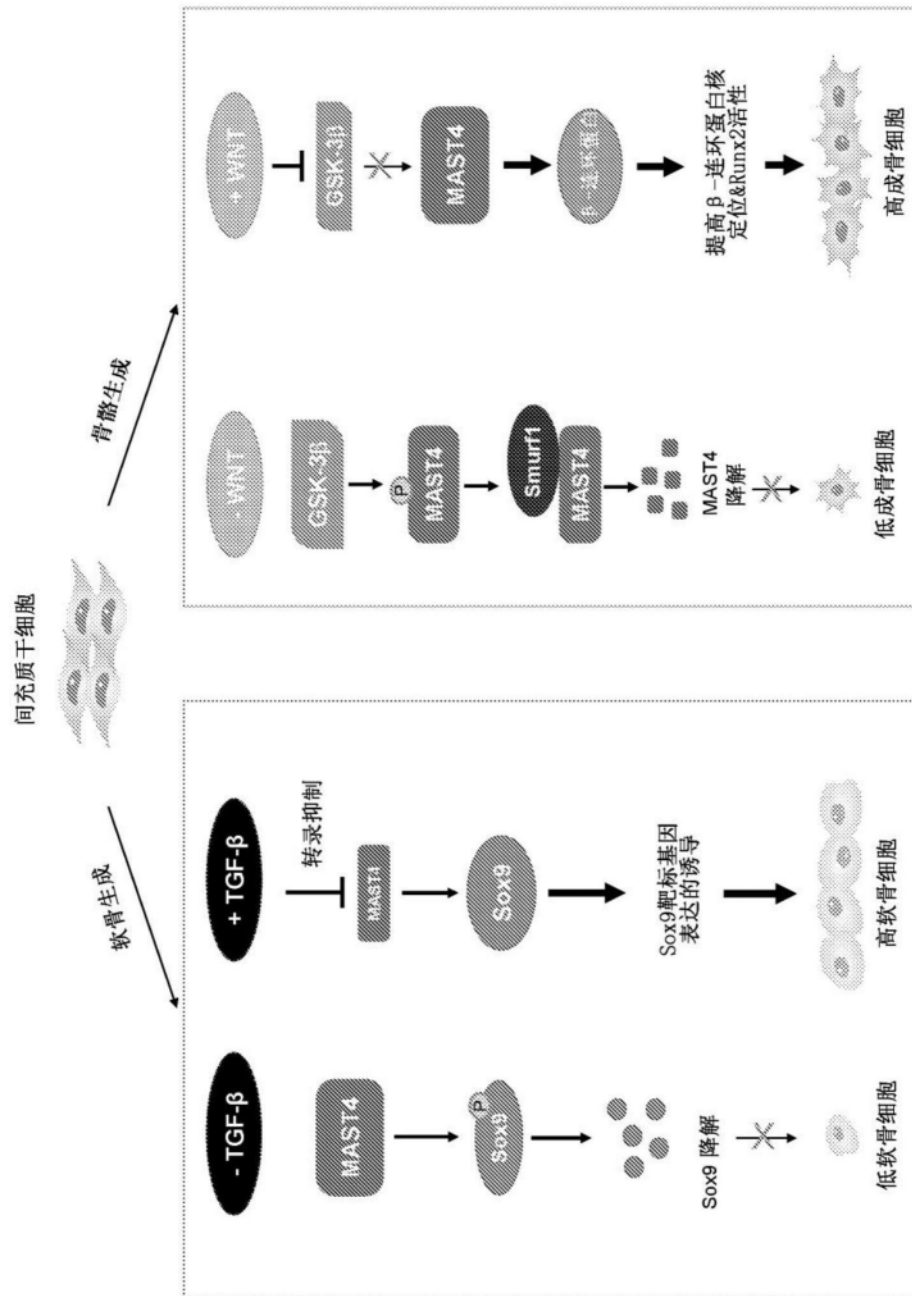


图37