

(19)中华人民共和国国家知识产权局



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105950557 A

(43)申请公布日 2016.09.21

(21)申请号 201610298170.1

(22)申请日 2016.05.06

(66)本国优先权数据

201610258486.8 2016.04.22 CN

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72)发明人 薛愿超 付向东

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

11245

代理人 关畅 陈晓庆

(51)Int.Cl.

C12N 5/0793(2010.01)

C12N 15/85(2006.01)

权利要求书3页 说明书22页

序列表2页 附图10页

(54)发明名称

一种控制人神经细胞重编程的信号通路及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种控制人神经细胞重编程的信号通路及其应用。所述nPTB-BRN2-miR-9信号通路为:nPTB的下调诱导BRN2活化;被激活的BRN2上调miR-9;miR-9下调nPTB。该应用为一种诱导神经细胞成熟的方法,包括如下步骤:激活未成熟的神经细胞中的nPTB-BRN2-miR-9信号通路。本发明的信号通路、以及激活信号通路的方法和物质在制备神经类疾病,特别是神经退行性疾病和脑肿瘤的药物中具有重要应用价值。

1. 一种诱导神经细胞成熟的方法,包括如下步骤:激活未成熟的神经细胞中的nPTB-BRN2-miR-9信号通路;

所述nPTB-BRN2-miR-9信号通路为:nPTB的下调诱导BRN2活化;被激活的BRN2上调miR-9;miR-9下调nPTB。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述未成熟的神经细胞为具有如下至少一种特征的细胞:

(1)具备神经元细胞类似的细长突触;

(2)表达神经元细胞早期标志物TuJ1,不表达成熟神经元相关标志物;

(3)不具备神经细胞特异的动作电位和钠离子电流。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于:所述激活未成熟的神经细胞中的nPTB-BRN2-miR-9信号通路的方法为如下至少一种:

(1)下调nPTB;

(2)活化BRN2;

(3)上调miR-9。

4. 根据权利要求1-3中任一所述的方法,其特征在于:所述下调nPTB是指敲低或敲除nPTB基因。

5. 根据权利要求1-4中任一所述的方法,其特征在于:所述敲低或敲除nPTB基因时使用的质粒为如任一种:

(1)将序列1所示DNA片段插入pripz质粒的EcoRI和XhoI位点中间,即得shnptb质粒1;

(2)将序列2所示DNA片段插入pripz质粒的EcoRI和XhoI位点中间,即得shnptb质粒2;

(3)将序列3所示DNA片段插入pripz质粒的EcoRI和XhoI位点中间,即得shnptb质粒3;

(4)将序列4所示DNA片段插入pripz质粒的EcoRI和XhoI位点中间,即得shnptb质粒4;

(5)shnptb质粒1、shnptb质粒2、shnptb质粒3和shnptb质粒4的混合物。

6. 根据权利要求1-5中任一所述的方法,其特征在于:所述活化BRN2的方法为过表达BRN2。

7. 根据权利要求1-6中任一所述的方法,其特征在于:所述过表达BRN2的过程中使用如下重组载体:在骨架载体pTRIPZ的Xho I至EcoR I位点间插入序列5所示DNA,得到中间载体;再向中间载体的AgeI至C1a1位点间用BRN2的编码基因取代RFP,即得重组载体。

8. 一种将人体细胞重编程得到成熟神经细胞的方法,包括如下步骤:

(1)将人体细胞重编程得到未成熟的神经细胞;

(2)按照权利要求1-7中任一所述方法,将所述未成熟的神经细胞转变为成熟神经细胞。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于:所述将人体细胞重编程得到未成熟的神经细胞的方法为:下调所述人体细胞中的PTB基因。

10. 根据权利要求8或9所述的方法,其特征在于:所述下调PTB是指敲低或敲除PTB基因。

11. 根据权利要求8-10中任一所述的方法,其特征在于:所述人体细胞为非神经细胞,具体为人成纤维细胞。

12. 一种将人成纤维细胞重编程得到成熟神经细胞的方法,包括如下步骤:

(1)敲低/敲除人成纤维细胞中的PTB基因,培养,得到未成熟的神经细胞;

(2)再将步骤(1)所得未成熟的神经细胞中的nPTB基因敲低/敲除,培养,得到成熟的神经细胞。

13. 根据权利要求12所述的方法,其特征在于:所述步骤(1)中敲低/敲除人成纤维细胞中的PTB基因中使用如下(1)或(2)所示重组载体:(1)在骨架载体pTRIPZ的Xho I至EcoR I位点间插入序列5所示DNA,得到中间载体;再向中间载体的AgeI至ClaI位点间用BRN2的编码基因取代RFP,即得重组载体;(2)在骨架载体plko.1-hygromycin的AgeI至EcoRI位点间插入序列5所示DNA得到的重组载体;

所述步骤(2)中敲低/敲除nPTB基因时使用的质粒为如下任一所示:

(1)将序列1所示DNA片段插入ptripz质粒的EcoRI和XhoI位点中间,即得shnptb质粒1;

(2)将序列2所示DNA片段插入ptripz质粒的EcoRI和XhoI位点中间,即得shnptb质粒2;

(3)将序列3所示DNA片段插入ptripz质粒的EcoRI和XhoI位点中间,即得shnptb质粒3;

(4)将序列4所示DNA片段插入ptripz质粒的EcoRI和XhoI位点中间,即得shnptb质粒4;

(5)shnptb质粒1、shnptb质粒2、shnptb质粒3和shnptb质粒4的混合物。

14. 一种将人成纤维细胞重编程得到成熟神经细胞的方法,为如下(1)或(2)所示:

(1)敲低/敲除人成纤维细胞中的PTB基因,培养,得到未成熟的神经细胞;再在未成熟的神经细胞中过表达BRN2,培养,得到成熟的神经细胞;

(2)在人成纤维细胞中同时敲低/敲除PTB基因和过表达BRN2,得到成熟的神经细胞。

15. 根据权利要求14所述的方法,其特征在于:所述方法(1)中,敲低/敲除人成纤维细胞中的PTB基因的过程中使用如下重组载体:在骨架载体plko.1-hygromycin的AgeI至EcoRI位点间插入序列5所示DNA得到的重组载体;所述方法(1)中,过表达BRN2的过程中使用如下重组载体:在骨架载体pTRIPZ的Xho I至EcoR I位点间插入序列5所示DNA,得到中间载体;再向中间载体的AgeI至ClaI位点间用BRN2的编码基因取代RFP,即得重组载体;

所述方法(2)中使用如下重组载体:在骨架载体pTRIPZ的Xho I至EcoR I位点间插入序列5所示DNA,得到中间载体;再向中间载体的AgeI至ClaI位点间用BRN2的编码基因取代RFP,即得重组载体。

16. 根据权利要求1-15中任一所述的方法,其特征在于:在细胞培养过程中添加权利要求19所述的产品。

17. 将人体细胞重编程得到成熟神经细胞过程中使用的产品,为如下(A)或(B):

(A)如下任一种敲低或敲除nPTB基因时使用的质粒:

(1)将序列1所示DNA片段插入ptripz质粒的EcoRI和XhoI位点中间,即得shnptb质粒1;

(2)将序列2所示DNA片段插入ptripz质粒的EcoRI和XhoI位点中间,即得shnptb质粒2;

(3)将序列3所示DNA片段插入ptripz质粒的EcoRI和XhoI位点中间,即得shnptb质粒3;

(4)将序列4所示DNA片段插入ptripz质粒的EcoRI和XhoI位点中间,即得shnptb质粒4;

(5)shnptb质粒1、shnptb质粒2、shnptb质粒3和shnptb质粒4的混合物;

(B)敲低/敲除PTB基因和过表达BRN2时使用的质粒:

在骨架载体pTRIPZ的Xho I至EcoR I位点间插入序列5所示DNA,得到中间载体;再向中间载体的AgeI至ClaI位点间用BRN2的编码基因取代RFP,即得重组质粒。

18. 如下任一所述应用:

(1)nPTB-BRN2-miR-9信号通路在诱导神经细胞成熟中的应用,或nPTB-BRN2-miR-9信号通路作为靶标在制备诱导神经细胞成熟的产品中的应用;

(2)激活nPTB-BRN2-miR-9信号通路的物质在诱导神经细胞成熟中的应用,或激活nPTB-BRN2-miR-9信号通路的物质在制备诱导神经细胞成熟的产品中的应用;

(3)下调nPTB的物质在诱导神经细胞成熟中的应用,或下调nPTB的物质在制备诱导神经细胞成熟中的应用;

(4)活化BRN2的物质在诱导神经细胞成熟中的应用,或活化BRN2的物质在制备诱导神经细胞成熟中的应用;

(5)上调miR-9的物质在诱导神经细胞成熟中的应用,或上调miR-9的物质在制备诱导神经细胞成熟中的应用;

(6)下调nPTB的物质在诱导BRN2活化中的应用,或下调nPTB的物质在制备诱导BRN2活化的产品中的应用;

(7)被激活的BRN2在诱导miR-9转录中的应用,激活BRN2的物质在诱导miR-9转录中的应用,或激活BRN2的物质在制备诱导miR-9转录的产品中的应用;

(8)miR-9在下调nPTB中的应用,或miR-9在制备下调nPTB的产品中的应用。

19.一种用于提高体细胞向神经细胞转分化效率的产品,为如下至少一种;

(1)SB431542;

(2)CHIR99021;

(3)Db-cAMP;

(4)SB431542、CHIR99021和Db-cAMP;

(5)shPTB和SB431542;

(6)shPTB和CHIR99021;

(7)shPTB和Db-cAMP;

(8)shPTB和SB431542、CHIR99021和Db-cAMP;

shPTB按照如下方法构建:在骨架载体p1ko.1-hygromycin的AgeI至EcoRI位点间插入序列5所示DNA得到的重组载体shPTB。

20.一种用于提高体细胞向神经细胞转分化效率的方法,包括如下步骤:在由体细胞向未成熟神经细胞转分化过程中向使用的培养基中添加权利要求19所述的产品,和在由未成熟神经细胞向成熟神经细胞转化过程中向使用的培养基中添加权利要求19所述的产品。

21.权利要求1-16任一所述的方法、权利要求17所述的产品、权利要求18所述的应用、权利要求19所述的产品或权利要求20所述的方法在治疗神经类疾病中的应用。

## 一种控制人神经细胞重编程的信号通路及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种控制人神经细胞重编程的信号通路及其应用。

### 背景技术

[0002] 神经系统从最初的形态发生到随后发育形成不同的细胞亚型过程中,经历了一系列的细胞重编程事件<sup>[1,2]</sup>。这些循序性事件可能被特异的形态发生信号诱导,并被细胞自主基因表达程序诱导分步活化或抑制,这些事件发生过程中往往存在谱系特异的转录因子的表达波<sup>[3]</sup>和它们不同的功能<sup>[4]</sup>。在哺乳动物中,我们对于神经发生的大部分知识来自于遗传追踪系统,尤其是小鼠,然而我们对于人类的神经发生过程了解较少,小鼠和人类在脑的大小和神经发育所需的时间完全不同,因而有不同的调节机制参与神经发育<sup>[5]</sup>,理解这些关键的差异对于使用小鼠作为研究人神经发育和神经退行性疾病的模型十分重要<sup>[6,7]</sup>。

[0003] 近年来,再生医学通过使用患者来源的细胞研究具体的人类疾病取得了巨大的突破,通过重编程<sup>[8-10]</sup>,例如人成纤维细胞可转化为诱导性多能干细胞<sup>[11,12]</sup>,这些诱导性多能干细胞能够再分化为特定类型的细胞,如神经元。另外,异位表达神经元特异的转录因子也能够将成纤维细胞直接转分化为神经元<sup>[13-17]</sup>。许多研究已证实这种转分化的方法在小鼠和人胚胎成纤维细胞中具有可行性,但是普遍的共识认为人体细胞更难以转分化,尤其是来自老年患者的细胞<sup>[18]</sup>,这表明直接用病人来源的成纤维细胞研究疾病发生机制存在显著的障碍。

[0004] 大多数细胞分化和转分化程序的建立在诱导多能干细胞定向分化的基础上,多能干细胞分化到定向的目的细胞能够表达一系列特异的转录因子<sup>[19]</sup>,然后利用这些特异的转录因子或转录因子组合尝试转分化,虽然最近的一些研究通过推断关键的发育调控基因网络寻找可行性的方法<sup>[20,21]</sup>,但是这些方法在很大程度上是尝试-错误的反复过程。原则上,任何细胞重新编程需要退出现有的稳态程序并随之建立一个新的自我维持的程序,其中可能涉及不同的反馈控制中的连续开关。值得注意的是,一些特异的小分子抑制剂能够替代转录因子诱导细胞重编程<sup>[22,23]</sup>。然而,我们对大部分的多能性诱导或转分化的机制知之甚少。

[0005] 研究发现改变调节性RNA和RNA结合蛋白的表达通常伴随着特异性转录因子表达的转换,提示调节性RNA和RNA结合蛋白在细胞重编程过程中具有重要的功能<sup>[24,25]</sup>。事实上,一些特定的microRNA,如miR-124已被证实能够促进特定的转录因子介导的成纤维细胞转分化为神经元<sup>[26,27]</sup>。我们之前建立了一个调节环路,转录抑制因子REST抑制miR-124,miR-124反过来抑制REST复合物中的多个关键组份,并且RNA结合蛋白PTB既作为miR-124的底物又是miR-124对靶位点识别的关键抑制因子。我们的结果表明PTB敲低能够强有力的激活该通路并且将小鼠成纤维细胞转分化为功能性的神经元<sup>[28]</sup>。

### 发明内容

[0006] 本发明发现了与神经细胞成熟相关的信号通路,进一步的本发明还发明了基于该

信号通路的一系列应用和相应的产品,如调控神经细胞成熟的方法、基于该信号通路的体细胞重编程获得神经细胞的方法等。任何基于本发明的信号通路的关于神经细胞成熟的发明都属于本发明的保护范围。

[0007] 本发明中所述的信号通路为nPTB-BRN2-miR-9信号通路,其为:nPTB的下调诱导BRN2活化;被激活的BRN2上调miR-9;miR-9下调nPTB。

[0008] 进一步对所述nPTB-BRN2-miR-9信号通路的解释为:nPTB的下调诱导BRN2活化;被激活的BRN2诱导miR-9转录水平提高,表达量增加的miR-9反过来又可下调nPTB的mRNA和/或蛋白质水平。

[0009] 上述信号通路中,“nPTB的下调诱导BRN2活化”中的“nPTB的下调”指从DNA水平、RNA水平和/或蛋白水平下调;所述“下调”可以是降低或者完全抑制。如在DNA水平进行基因敲除、在RNA水平或蛋白水平进行表达量的抑制。

[0010] 上述信号通路中,“BRN2活化”是指转录因子BRN2的RNA水平或是蛋白水平的提高。

[0011] 上述信号通路中,“被激活的BRN2上调miR-9”中的“上调miR-9”是指使miR-9的编码基因转录出更多的miR-9。

[0012] 上述信号通路中,“miR-9下调nPTB”中的“下调nPTB”是指从RNA水平和/或蛋白水平下调,所述“下调”可以是降低或者完全抑制。

[0013] 本发明提供了诱导神经细胞成熟的方法。

[0014] 本发明所提供的诱导神经细胞成熟的方法,包括如下步骤:激活未成熟的神经细胞中的nPTB-BRN2-miR-9信号通路;所述nPTB-BRN2-miR-9信号通路为:nPTB的下调诱导BRN2活化;被激活的BRN2上调miR-9;miR-9下调nPTB。

[0015] 上述诱导神经细胞成熟的方法中,所述未成熟的神经细胞为具有如下至少一种特征的细胞:

[0016] (1)具备神经元细胞类似的细长突触;

[0017] (2)表达神经元细胞早期标志物Tuj1,不表达成熟神经元相关标志物,如Map2、NeuN和NF等;

[0018] (3)不具备神经细胞特异的动作电位和钠离子电流。

[0019] 上述诱导神经细胞成熟的方法中,所述激活未成熟的神经细胞中的 nPTB-BRN2-miR-9信号通路的方法为如下至少一种:

[0020] (1)下调nPTB;

[0021] (2)活化BRN2;

[0022] (3)上调miR-9。

[0023] 上述激活未成熟的神经细胞中的nPTB-BRN2-miR-9信号通路的方法中,“下调nPTB基因”指从DNA水平、RNA水平和/或蛋白水平下调;所述“下调”可以是降低或者完全抑制。如在DNA水平进行基因敲除或敲低、在RNA水平或蛋白水平进行表达量的抑制。

[0024] 上述激活未成熟的神经细胞中的nPTB-BRN2-miR-9信号通路的方法中,当敲低或敲除nPTB基因时,使用的质粒为如下任一种:

[0025] (1)将序列1所示DNA片段插入ptripz质粒的EcoRI和XhoI位点中间,即得shnptb质粒1;

[0026] (2)将序列2所示DNA片段插入ptripz质粒的EcoRI和XhoI位点中间,即得shnptb质

粒2;

[0027] (3)将序列3所示DNA片段插入ptripz质粒的EcoRI和XhoI位点中间,即得shnptb质粒3;

[0028] (4)将序列4所示DNA片段插入ptripz质粒的EcoRI和XhoI位点中间,即得shnptb质粒4;

[0029] (5)shnptb质粒1、shnptb质粒2、shnptb质粒3和shnptb质粒4的混合物。

[0030] 上述激活未成熟的神经细胞中的nPTB-BRN2-miR-9信号通路的方法中,所述“活化BRN2”可以利用本领域技术人员所熟知的常规技术手段实现,以达到活化BRN2的目的。所述技术手段具体可以是BRN2在蛋白水平或RNA水平表达量提高或者利用CRISPR等基因编辑手段激活转录。

[0031] 上述激活未成熟的神经细胞中的nPTB-BRN2-miR-9信号通路的方法中,所述活化BRN2的方法为过表达BRN2。

[0032] 上述激活未成熟的神经细胞中的nPTB-BRN2-miR-9信号通路的方法中,所述过表达BRN2的过程中使用如下重组载体:在骨架载体pTRIPZ的Xho I至EcoR I位点间插入序列5所示DNA,得到中间载体;再向中间载体的AgeI至ClaI位点间用BRN2的编码基因取代RFP,即得重组载体。

[0033] 上述诱导神经细胞成熟的方法中,所述成熟神经细胞是按照本领域技术人员的常识判断的,具体可为具有如下至少一种特征的细胞:

[0034] (1)表达成熟神经元的标志物蛋白Map2、NeuN、Syn1、vGLUT1、NF、NCAM等;

[0035] (2)具备神经细胞特异的钠离子电流和动作电位;

[0036] (3)与胶质细胞共培养后能够形成突触后电流。

[0037] 上述诱导神经细胞成熟的方法中还包括细胞培养的步骤,细胞培养过程中使用下述任一小分子化合物:(1)SB431542;(2)CHIR99021;(3)Db-cAMP;(4)SB431542、CHIR99021和Db-cAMP。

[0038] 本发明还提供了一种将人体细胞重编程得到成熟神经细胞的方法。

[0039] 本发明所提供的将人体细胞重编程得到成熟神经细胞的方法,包括如下步骤:

[0040] (1)将所述人体细胞重编程得到未成熟的神经细胞;

[0041] (2)按照上述任一所述诱导神经细胞成熟的方法,将所述未成熟的神经细胞转变为成熟神经细胞。

[0042] 上述将人体细胞重编程得到成熟神经细胞的方法中,所述将所述人体细胞重编程得到未成熟的神经细胞的方法为:下调所述人体细胞中的PTB基因。

[0043] 其中,“下调PTB基因”指从DNA水平、RNA水平和/或蛋白水平下调;所述“下调”可以是降低或者完全抑制。如在DNA水平进行基因敲除、在RNA水平或蛋白水平进行表达量的抑制。

[0044] 上述将人体细胞重编程得到成熟神经细胞的方法中,所述下调PTB是指敲低或敲除PTB基因。

[0045] 可以通过本领域技术人员所掌握的手段来达到下调PTB的目的。具体的,可使用如下(1)或(2)所示重组载体:(1)在骨架载体pTRIPZ的Xho I至EcoR I位点间插入序列5所示DNA,得到中间载体;再向中间载体的AgeI至ClaI位点间用BRN2的编码基因取代RFP,即得重

组载体。(2)在骨架载体p1ko.1-hygromycin的Age I至EcoR I位点间插入序列5所示DNA得到的重组载体。

[0046] 上述将人体细胞重编程得到成熟神经细胞的方法中,所述未成熟的神经细胞为具有如下至少一种特征的细胞:

[0047] (1)具备神经元细胞类似的细长突触;

[0048] (2)表达神经元细胞早期标志物Tuj1,不表达成熟神经元相关标志物,如Map2、NeuN和NF等;

[0049] (3)不具备神经细胞特异的动作电位和钠离子电流。

[0050] 上述将人体细胞重编程得到成熟神经细胞的方法中,所述成熟神经细胞是按照本领域技术人员的常识判断的,具体可为具有如下至少一种特征的细胞:

[0051] (1)表达成熟神经元的标志物蛋白Map2、NeuN、Syn1、vGLUT1、NF、NCAM等;

[0052] (2)具备神经细胞特异的钠离子电流和动作电位;

[0053] (3)与胶质细胞共培养后能够形成突触后电流。

[0054] 上述将人体细胞重编程得到成熟神经细胞的方法中,所述人体细胞为人的非神经细胞,具体为人成纤维细胞。所述人体细胞可为离体的人体细胞。

[0055] 上述将人体细胞重编程得到成熟神经细胞的方法中还包括细胞培养的步骤,细胞培养过程中使用下述任一小分子化合物:(1)SB431542;(2)CHIR99021;(3)Db-cAMP;(4)SB431542、CHIR99021和Db-cAMP。

[0056] 本发明的将人体细胞重编程得到成熟神经细胞的具体一个例子是:(1)敲低/敲除人成纤维细胞中的PTB基因,培养,得到未成熟的神经细胞;(2)再将步骤(1)所得未成熟的神经细胞中的nPTB基因敲低/敲除,培养,得到成熟的神经细胞。

[0057] 该具体例子中,所述步骤(1)中敲低/敲除人成纤维细胞中的PTB基因中使用如下(1)或(2)所示重组载体:(1)在骨架载体pTRIPZ的Xho I至EcoR I位点间插入序列5所示DNA,得到中间载体;再向中间载体的Age I至Cla I位点间用BRN2的编码基因取代RFP,即得重组载体;(2)在骨架载体p1ko.1-hygromycin的Age I至EcoR I位点间插入序列5所示DNA得到的重组载体;

[0058] 该具体例子中,所述步骤(2)中敲低/敲除nPTB基因时使用的质粒为如下任一所示:

[0059] (1)将序列1所示DNA片段插入ptripz质粒的EcoRI和XhoI位点中间,即得shnptb质粒1;

[0060] (2)将序列2所示DNA片段插入ptripz质粒的EcoRI和XhoI位点中间,即得shnptb质粒2;

[0061] (3)将序列3所示DNA片段插入ptripz质粒的EcoRI和XhoI位点中间,即得shnptb质粒3;

[0062] (4)将序列4所示DNA片段插入ptripz质粒的EcoRI和XhoI位点中间,即得shnptb质粒4;

[0063] (5)shnptb质粒1、shnptb质粒2、shnptb质粒3和shnptb质粒4的混合物。

[0064] 该具体例子中,所述步骤(1)中未成熟的神经细胞具有如下特征中至少一种:

[0065] (1)形态上已经具有神经元类似的细长和发散型的突触;



[0066] (2)表达神经元细胞早期标志物Tu j1,不表达成熟神经元相关标志物如Map2、NeuN和NF等

[0067] (3)不具备神经细胞特异的动作电位和钠离子电流。

[0068] 该具体例子中,所述步骤(1)中培养的时间为3天。

[0069] 本发明的另一个将人成纤维细胞重编程得到成熟神经细胞的具体例子是如下(1)或(2)所示:

[0070] (1)敲低/敲除人成纤维细胞中的PTB基因,培养,得到未成熟的神经细胞;再在未成熟的神经细胞中过表达BRN2,培养,得到成熟的神经细胞;

[0071] (2)在人成纤维细胞中同时敲低/敲除PTB基因和过表达BRN2,得到成熟的神经细胞。

[0072] 在先敲低/敲除PTB基因再过表达BRN2的例子中:敲低/敲除人成纤维细胞中的PTB基因的过程中使用如下重组载体:在骨架载体p lko.1-hygromycin的Age I至EcoR I位点间插入序列5所示DNA得到的重组载体;过表达BRN2使用如下重组载体:在骨架载体pTRIPZ的Xho I至EcoR I位点间插入序列5所示DNA,得到中间载体;再向中间载体的Age1至Cla1位点间用BRN2的编码基因取代RFP,即得重组载体。

[0073] 在人成纤维细胞中同时敲低/敲除PTB基因和过表达BRN2的例子中,所述方法中使用如下重组载体:在骨架载体pTRIPZ的Xho I至EcoR I位点间插入序列5所示DNA,得到中间载体;再向中间载体的Age1至Cla1位点间用BRN2的编码基因取代RFP,即得重组载体。

[0074] 上述将人成纤维细胞重编程得到成熟神经细胞的具体例子中,所述步骤(1)中未成熟的神经细胞具有如下特征中至少一种:

[0075] (1)形态上已经具有神经元类似的细长和发散型的突触;

[0076] (2)表达神经元细胞早期标志物Tu j1,不表达成熟神经元相关标志物如Map2、NeuN和NF等

[0077] (3)不具备神经细胞特异的动作电位和钠离子电流。

[0078] 上述两个具体例子中,还包括细胞培养的步骤,细胞培养过程中使用下述小分子化合物:SB431542、CHIR99021和Db-cAMP。

[0079] 本发明提供了将人体细胞重编程得到成熟神经细胞过程中使用的产品,为如下(A)或(B):

[0080] (A)如下任一种敲低或敲除nPTB基因时使用的质粒:

[0081] (1)将序列1所示DNA片段插入ptripz质粒的EcoRI和XhoI位点中间,即得shnptb质粒1;

[0082] (2)将序列2所示DNA片段插入ptripz质粒的EcoRI和XhoI位点中间,即得shnptb质粒2;

[0083] (3)将序列3所示DNA片段插入ptripz质粒的EcoRI和XhoI位点中间,即得shnptb质粒3;

[0084] (4)将序列4所示DNA片段插入ptripz质粒的EcoRI和XhoI位点中间,即得shnptb质粒4;

[0085] (5)shnptb质粒1、shnptb质粒2、shnptb质粒3和shnptb质粒4的混合物;

[0086] (B)敲低/敲除PTB基因和过表达BRN2时使用的质粒:

- [0087] 在骨架载体pTRIPZ的Xho I至EcoR I位点间插入序列5所示DNA,得到中间载体;再向中间载体的AgeI至ClaI位点间用BRN2的编码基因取代RFP,即得重组质粒。
- [0088] 由上述任一所述方法得到的成熟神经细胞也属于本发明的保护范围。
- [0089] 如下任一所述应用也属于本发明的保护范围:
- [0090] (1)nPTB-BRN2-miR-9信号通路在诱导神经细胞成熟中的应用,或nPTB-BRN2-miR-9信号通路作为靶标在制备诱导神经细胞成熟的产品中的应用;
- [0091] (2)激活nPTB-BRN2-miR-9信号通路的物质在诱导神经细胞成熟中的应用,或激活nPTB-BRN2-miR-9信号通路的物质在制备诱导神经细胞成熟的产品中的应用;
- [0092] (3)下调nPTB的物质在诱导神经细胞成熟中的应用,或下调nPTB的物质在制备诱导神经细胞成熟中的应用;
- [0093] (4)活化BRN2的物质在诱导神经细胞成熟中的应用,或活化BRN2的物质在制备诱导神经细胞成熟中的应用;
- [0094] (5)上调miR-9的物质在诱导神经细胞成熟中的应用,或上调miR-9的物质在制备诱导神经细胞成熟中的应用;
- [0095] (6)下调nPTB的物质在诱导BRN2活化中的应用,或下调nPTB的物质在制备诱导BRN2活化的产品中的应用;
- [0096] (7)被激活的BRN2在诱导miR-9转录中的应用,激活BRN2的物质在诱导miR-9转录中的应用,或激活BRN2的物质在制备诱导miR-9转录的产品中的应用;
- [0097] (8)miR-9在下调nPTB中的应用,或miR-9在制备下调nPTB的产品中的应用。
- [0098] 上述任一应用均指在人体细胞中的应用,具体是非神经体细胞,再具体可为人成纤维细胞。
- [0099] 本发明还提供了用于提高体细胞向神经细胞转分化效率的产品,为如下至少一种;
- [0100] (1)SB431542;
- [0101] (2)CHIR99021;
- [0102] (3)Db-cAMP(N6,2'-O-Dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt)。
- [0103] (4)SB431542、CHIR99021和Db-cAMP(N6,2'-O-Dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt)。
- [0104] (5)shPTB和SB431542;
- [0105] (6)shPTB和CHIR99021;
- [0106] (7)shPTB和Db-cAMP(N6,2'-O-Dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt)。
- [0107] (8)shPTB和SB431542、CHIR99021和Db-cAMP(N6,2'-O-Dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt)。
- [0108] shPTB按照如下方法构建:在骨架载体plko.1-hygromycin的Age I至EcoR I位点间插入序列5所示DNA得到的重组载体shPTB。
- [0109] SB431542是一种强效的小分子抑制剂,选择性抑制转化生长因子 $\beta$ (TGF- $\beta$ )I型受体活化素受体样激酶ALK5,ALK4和ALK7。所述CHIR99021是肝糖原合成激酶3 $\beta$ (GSK3 $\beta$ )受

体的选择性抑制剂。所述Db-cAMP的化学名为N6-2'-O-双丁酰-3',5'-环磷酸腺苷,别称二丁酰环磷酸腺苷钙。

[0110] 本发明还提供了一种用于提高体细胞向神经细胞转分化效率的方法,包括如下步骤:在由体细胞向未成熟神经细胞转分化过程中向使用的培养基中添上述用于提高体细胞向神经细胞转分化效率的产品中的小分子化合物,和在由未成熟神经细胞向成熟神经细胞转化过程中向使用的培养基中添加用于提高体细胞向神经细胞转分化效率的产品中的小分子化合物。

[0111] 上述用于提高体细胞向神经细胞转分化效率的方法中,由体细胞向未成熟神经细胞转分化中,先利用shPTB将体细胞中的PTB基因敲除或敲低,然后再进行培养得到未成熟神经细胞。

[0112] 上述任一所述方法、由上述任一所述方法获得的成熟神经细胞、任一所述应用、任一所述的产品在治疗神经类疾病中的应用也属于本发明的保护范围。

[0113] 所述神经类疾病为神经退行性疾病和脑肿瘤。其中所述神经退行性疾病包括阿兹海默病,肌肉萎缩性侧索硬化症,帕金森氏病等;其中脑肿瘤主要包括脑胶质瘤等。

[0114] 本发明的发明人在研究过程中发现,敲除PTB能够将人成纤维细胞有效地转化为具有复杂形态的神经元样细胞,尤其是当与一些小分子抑制剂联用时,但是所有诱导得到的神经元都是未成熟的,提示PTB敲低足以激活小鼠完整的神经元程序,但是在人类中不能够完全激活。进一步的,本发明的发明人揭示了人类细胞中促进神经成熟的第二条环路,这个环路包含PTB的旁系同源基因nPTB;另一个神经元特异性的miRNA,miR-9;转录活化剂BRN2。在这个环路中,BRN2转录激活的miR-9,miR-9反过来转录后减少nPTB。试验证明,该环路调控人的神经细胞的重编程。本发明的信号通路、以及激活信号通路的方法和物质在制备神经类疾病,特别是神经退行性疾病和脑肿瘤的药物中具有重要应用价值。

## 附图说明

[0115] 图1为人成熟纤维母细胞中shPTB和小分子抑制剂介导的定量神经诱导。(a)左,应答PTB减少的EdU脉冲标记;右,EdU信号定量(shCtrl组、shPTB组)(b)PTB抑制(人成熟纤维母细胞系在N3培养基培养14天)(c)PTB抑制的同时筛选在人成熟纤维母细胞转分化为类神经细胞过程中的小分子抑制剂小分子抑制剂:CHIR,SB,dibutyryl cyclin AMP,FSK,Ng,LDN(D)人成熟纤维母细胞对照shRNA,shPTB分别处理三天后额外添加3SM处理3小时,6小时,9小时,18小时,36小时,72小时,168小时Tuj1/红,纤维母细胞标记分子-纤连蛋白(绿),DAPI(蓝)(e)不同时间点Tuj1和纤连蛋白阳性细胞百分比。

[0116] 图2为HAF细胞通过连续地敲低PTB和PTB产生功能神经元。(a)HAF细胞经过PTB敲低诱导产生的神经类似细胞中Tuj1(红)高表达而MAP2(绿)几乎不表达。 $n=3$ 次独立的生物学重复。细胞核染色染料为DAPI(蓝)。(b,c)在PTB敲除处理的MEFs(b)HAFs(c)中利用western-blot对nPTB表达量随时间变化的分析.PTB和nPTB通过western-blot检测, $\beta$ -actin作为上样对照; $n=2$ 次独立实验。所有未处理的原始western-blot版本在Supplementary Figure 7中。(d)通过连续的敲低PTB和nPTB的重编程策略:HAFs首先被包含有表达shnPTB和红色荧光蛋白(RFP)的可诱导性慢病毒以及shPTB表达型慢病毒感染。经过潮霉素筛选后,用3种小分子处理细胞。shnPTB的表达是通过在不同时间向培养基中添加

强力霉素诱导的。FGF2:纤维母细胞生长因子2;NTF:神经营养因子。(e)HAFs中不同时间点nPTB敲低诱导的神经样细胞代表图;顶端,不同时间强力霉素处理细胞;在第14天Tuj1(绿)染色。底端,在2-9天用强力霉素处理细胞;在第14天MAP2(绿)染色。红色荧光蛋白信号表明慢病毒成功感染细胞。两次生物学重复展现出相似的结果。(f)顶端,在电压钳记录模式下的全细胞电流代表曲线。经典的电压依赖性Na<sup>+</sup>通道被可逆的抑制通过钠离子通道抑制剂TTX(中间);在药物洗脱后部分的恢复(底端)。10个被检测的细胞均呈现出记录活性。(g)电流注入诱导的持续动作电位的代表曲线。11个被检细胞中8个呈现出记录活性。(h)GABAA受体——通过GABA的聚焦应用介导电流引起的反应(蓝),可以被GABAA受体特异性封闭物PiTX完全封闭。10个被检测的细胞均呈现出记录活性(i-k)自发的突触后电流(PSCs)记录红色荧光蛋白标记的神经元和绿色荧光蛋白标记的神经胶质细胞。(i)快速动力突触后电流。EPSCs被NBQX+APV封闭(j)GABA诱导型抑制PSCs,被PiTX封闭。11个被检细胞中9个呈现出记录活性。

[0117] 图3为PTB敲除和Brn2表达可促进转分化的神经细胞成熟。(a)敲低PTB之后,RT-qPCR检测主要的转录因子的mRNA表达量(b)依次敲低PTB和nPTB之后,诱导BRN2的表达量(c)强力霉素诱导的PTB敲低和BRN2高表达系统(上);成熟神经细胞相关标志物的免疫荧光检测(下),BRN2(红),NCAM(红),vGlut1(绿),NeuN(绿)and MAP2(绿).Nuclei were stained with DAPI(蓝).(d)诱导得到的神经元具备钠离子电流。(e)通过电流诱导得到的神经元重复性的动作电位。(f)检测到自发的动作电位。(g)EPSCs的代表踪迹。(h)强力霉素诱导的神经元与GFP诱导的神经胶质共培养50天。(i-k)神经胶质共培养的神经元检测到自发的突出后电流,(i)检测 AMPA电流的动力学。(j)20 $\mu$ M NBQX和50 $\mu$ M APV阻断AMPA电流。(k)在此基础上,50 $\mu$ M PiTX进一步阻断AMPA电流。。

[0118] 图4为BRN2对hNPCs神经元成熟和激活成熟神经元特异的miRNA是很关键的。(a)BRN2敲低的hNPCs分化形成的神经元免疫荧光分析,细胞核由DAPI染色(蓝色)。(b)BRN2敲除的hNPCs中SOX2表达(白色),而MAP2不表达(绿色),细胞核由DAPI染色(蓝色)。(c)左侧:hNPCs分化形成的神经元(表达和不表达BRN2)整个细胞的电流记录;右侧:在敲低BRN2和分化前(上面)后(下面)产生电流细胞所占比率。(d)hNPCs分化前后,BRN2ChIP-seq在MIR124-3和MIR9-2位点具有代表性的信号。两种anti-BRN2抗体(小鼠单克隆抗体IgG B-2和山羊IgG C-20)用于构建ChIP-seq文库。(e)hNPCs分化前后,ChIP-qPCR分析BRN2与MIR124位点(上面)和MIR9位点(下面)的结合(IgG作为阴性对照)。(f)RT-qPCR分析在shPTB处理的HAFs诱导表达BRN26天(上面)和12天(下面)时miR-124和miR-9的表达情况,U6作为内参。(g)在HAF分化形成的神经元中连续敲低PTB和nPTB之后,运用RRN2的ChIP-qPCR分析MIR124和MIR9位点的富集情况(IgG作为阴性对照)。(h)在连续敲低PTB和nPTB的HAFs中,运用RT-qPCR分析miR-124和miR-9的表达,U6作为内参。。

[0119] 图5为在神经元分化过程中特异的miRNAs抑制nPTB。(a)miR-9和miR-124在nPTB 3'UTR区的把位点。举例推测碱基配对可能性、自由能的计算、和特异突变位点的诱导(绿色)。(b,c)通过RT-qPCR(顶部)和免疫印迹法(IB,底部)检测nPTB在应答miR-124(b)或者miR-9(c)转染HAFs过程中的表达量变化。GAPDH and $\beta$ -actin(ACTB)作为对照。(d,e)在分化了的hNPCs中通过过表达miR-124(d)or miR-9(e)来观察nPTB蛋白(顶部)和表达量的改变的应答反应。GAPDH作为对照。(f)顶部,nPTB表达应答在shPTB和BRN2表达诱导的HAF源的神

神经元中过表达miR-124或者miR-9的反应。GAPDH作为上样对照;Kd,敲除。底部为定量结果。(g)荧光素酶报告基因活性应答HEK293T细胞共转染野生型和突变型miRNA。hPTBP2或者mPTBP2,荧光素酶报告基因分别包含人源或者鼠源nPTB 3'UTR区。NC,非特异性对照组。(h)PTB敲除或者PTBP1和nPTB连续敲除及异位表达含有抗shRNA和Flag标签的nPTB的HAF源的神经元中MAP2和NeuN的表达。。

[0120] 图6为成人成纤维细胞中PTB敲低后抑制细胞增殖并且细胞转分化为神经元谱系。(a)通过免疫荧光染色鉴定HAFs中各种细胞类型的标记物,结果显示HAFs细胞中只有成纤维细胞相关标记物Fibronectin和Vimentin为阳性。角质细胞标记物K5和P63,黑素细胞标记物MITF和P75,以及神经元的标记物都为阴性。(b)流式细胞术分析EdU标记的PTB敲除及对照组HAFs细胞,DAPI染色细胞核,Alexa Fluor 647染色EdU阳性细胞。(c)TUJ1阳性细胞(绿色)EdU(红色)染色则为阴性。(d)免疫荧光显示PTB单独敲除或与特异的小分子抑制剂联用诱导的神经元样细胞。红色:TUJ1,蓝:DAPI。比例尺:20微米(e)相衬图像显示PTB敲除组和对照组细胞与小分子化合物联用处理不同时间点的HAFs细胞。(f)PTB敲除诱导的神经元细胞,免疫荧光标记神经嵴相关标记物Nestin和Sox2。比例尺:100微米。

[0121] 图7为实时定量荧光PCR和蛋白印迹效验nPTB抑制效率。(a)不同时间PTB抑制细胞NeuN,NF免疫染色;(b)RNA-seq检测由人成熟纤维母细胞转分化的神经细胞中PTB,nPTB表达量;(c,d)nPTB mRNA和蛋白表达水平,通过时定量荧光PCR检测shPTB处理的人成熟纤维母细胞强力霉素处理4天诱导shnPTB的表达。

[0122] 图8为通过ChIP-qPCR分析在shPTB和多种神经系统特异性的转录因子诱导的神经细胞中REST的靶点和对于膜去极化应答钙流入的特性。(a)ChIP-qPCR分析在人成熟纤维母细胞中REST结合在神经转录因子的启动子和miRNA的基因位点(b)PTB抑制的人成熟纤维母细胞中筛选能促进MAP2表达的转录因子(c)由人成熟纤维母细胞通过shPTB和BRN2共同诱导产生的神经细胞中的钙流入。

[0123] 图9为BRN2通过调节不同的靶标来控制神经元的成熟。(a)免疫染色揭示hNPCs特征,Nestin(绿色),BRN2(红色)和SOX2(红色)。(b)hNPCs分化形成神经元BRN2敲低后的免疫荧光分析。(c)hNPCs分化形成神经元BRN2敲低后对MAP2(绿色)和SOX2(红色)表达的影响。(d)PTB,PTB和BRN2敲低后的BRN2和NeuN免疫染色。(e)hNPCs分化形成神经元BRN2敲低后对钠离子流(红色)和钾离子流(蓝色)的损伤。(f)分化的hNPCs中MAP2,Tuj1和BRN2的蛋白印迹分析,GAPDH作为内参。(g)免疫沉淀反应测试4中商业化可用的BRN2抗体。C-20和B-2被用于ChIP-seq文库构建。GAPDH作为阳性对照。(h,i)BRN2靶基因的GO分析。生物过程(h)和生物组分(i)的GO分析表明BRN2对于神经元的成熟时很重要的。背景为hNPCs表达的所有基因。

[0124] 图10为BRN2对nPTB的调节。(a)hNPC分化的神经元在BRN2去除后的PTB和nPTB表达量的western blot分析。 $\beta$ -actn作为上样对照。(b)BRN2异常表达后的nPTB表达量的western blot分析。 $\beta$ -actn作为上样对照。

### 具体实施方式

[0125] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0126] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0127] 实验方法:

[0128] 细胞培养,病毒包装及感染:

[0129] 实验中共用到两株原代人成纤维细胞,一株购买于ATCC,这株细胞源于一位42岁的男性;另一株由Dr. John Ravits博士馈赠,源于一位86岁的女性。

[0130] 原代人皮肤成纤维细胞购买于ATCC,源于一位42岁的男性。可在DMEM/F12(含20%胎牛血清,1×青霉素/链霉素)或成纤维细胞培养基(DMEM/F12,含5ng/ml重组碱性成纤维细胞生长因子,1μg/ml氢化可的松,50μg/ml抗坏血酸,5μg/ml重组人胰岛素,2%胎牛血清)中扩大培养。

[0131] 原代人成纤维细胞由Dr. John Ravits博士馈赠,源于一位86岁的女性。

[0132] HEK293细胞培养在DMEM(含10%胎牛血清、100U青霉素/链霉素)培养液中。人神经前体细胞(Human neural progenitor cells, hNPC)在神经生长培养基(DMEM/F12, Glutamax, 0.5×N2, 0.5×B27和1×青霉素/链霉素)中扩大培养,用Accutase酶(购于Life Technologies)分离hNPCs。用于培养NPC细胞的培养板依次用10ug/ml多聚赖氨酸处理过夜,2.5ug/ml层黏连蛋白处理3小时。

[0133] 包含转录因子ASCL1, Brn2, myt1l和NeuroD1CDS序列的质粒购于addgene(#27150, 27151, 27152, 30129)。将转录因子Neurog2(Ngn2)编码序列插入tet-o-eGFP编码区的EcoRI位点。这几个质粒在图8b的筛选中用到,发现只有BRN2能够促进神经成熟。

[0134] 用于敲除人PTB基因<sup>[28]</sup>的重组载体:在骨架载体p1ko.1-hygromycin(addgene, #24150)的AgeI至EcoRI位点间插入序列5所示DNA(shPTB的靶序列)得到的重组载体,记作重组载体p1ko.1/shPTB。

[0135] 为了实现神经细胞重编程,首先用重组载体p1ko.1/shPTB慢病毒感染成人成纤维细胞16小时,利用hygromycin筛选3天,随后将细胞培养介质更换为N3培养液(DMEM/F12中加25μg/ml胰岛素,50ug/ml转铁蛋白、30nm亚硒酸钠,20nm孕酮,100nm的putrescine)培养2周,诱导细胞出现神经元形态。

[0136] 用小分子增加转分化效率的方法(即人成纤维细胞中敲除PTB的方法):①用上述重组载体p1ko.1/shPTB感染成人成纤维细胞16小时;利用hygromycin筛选3天。②将细胞培养在N3/基础培养基(1:1混合的DMEM/F12培养液和Neurobasal, 25μg/ml胰岛素,50ug/ml转铁蛋白、30nm亚硒酸钠,20nm孕酮,100nm putrescine, 0.4%B27)中培养2天。③在加入小分子1um CHIR99021、10um SB431542、10ng/mlFGF2和1mM Db-cAMP的N3/基础培养基中培养2天。④将细胞培养至包含1um CHIR99021、10um SB431542、1mM Db-cAMP、10ng/ml FGF2、10ng/ml BDNF、10ng/ml GDNF、10ng/ml NT3、10ng/ml CNTF和2%FBS的N3/basal培养基中培养。每隔一天换一次液。

[0137] 用于敲除nPTB的重组载体:将序列1-4所示DNA(靶序列)分别插入ptripz质粒的EcoRI和XhoI位点中间,得到四个重组载体,记作ptripz/shnPTB1、ptripz/shnPTB2、ptripz/shnPTB3、ptripz/shnPTB4。

[0138] 连续敲除PTB和nPTB的方法:①将上述重组载体ptripz/shnPTB1-4等比例混合,再和psPAX2和pMD.2G质粒在293T细胞中包装成可表达shnPTB的可诱导性慢病毒,然后感染成人成纤维细胞得到可诱导敲低nPTB的细胞系;②再用重组载体p1ko.1/shPTB感染细胞16小时,并利用hygromycin筛选3天;③在N3/FGF2/3SM培养基中培养2天;④在N3/FGF2/3SM/2%

serum培养基中培养5天,期间在不同的时间点进行强力霉素诱导(不同的实验组诱导时间点不同);⑤在N3/FGF2/NTF/B27/Db-Camp/2%serum培养基中培养7天。

[0139] 其中,N3/FGF2/3SM培养基:N3培养液(DMEM/F12中加25 $\mu$ g/ml胰岛素,50 $\mu$ g/mL转铁蛋白、30nm亚硒酸钠,20nm孕酮,100nm的putrescine,10ng/ml FGF2,1 $\mu$ m CHIR99021、10 $\mu$ m SB431542、10ng/ml FGF2、1mM Db-cAMP)。

[0140] N3/FGF2/3SM/2%serum培养基:加入小分子1 $\mu$ m CHIR99021、10 $\mu$ m SB431542、10ng/ml FGF2、1mM Db-cAMP的N3/基础培养基,2%FBS。N3/基础培养基(1:1混合的DMEM/F12培养液和Neurobasal,25 $\mu$ g/ml胰岛素,50 $\mu$ g/mL转铁蛋白、30nm亚硒酸钠,20nm孕酮,100nm putrescine,0.4%B27)

[0141] N3/FGF2/NTF/B27/Db-Camp/2%serum培养基:加1 $\mu$ m CHIR99021、10 $\mu$ m SB431542、1mM Db-cAMP、10ng/ml FGF2、10ng/ml BDNF、10ng/ml GDNF、10ng/ml NT3、10ng/ml CNTF和2%FBS的N3/basal培养基。

[0142] 敲除PTB再过表达Brn2中使用的载体的构建:用于敲除PTB和过表达BRN2的强力霉素-依赖性重组载体:在出发载体pTRIPZ的Xho I至EcoR I位点间插入序列5所示DNA(shPTB的靶序列),得到中间载体;再向中间载体的AgeI至ClaI位点间用BRN2的编码基因取代RFP,即得重组载体,记作重组载体pTRIPZ/ $\Delta$ PTB/BRN2。

[0143] 敲除PTB再过表达Brn2的方法:①用上述重组载体pTRIPZ/ $\Delta$ PTB/BRN2感染成人成纤维细胞16小时;②利用puromycin在含有强力霉素的成纤维细胞培养基中筛选3天得到可同时敲低PTB和过表达BRN2的可诱导细胞系;③将细胞培养在N3/基础培养基(1:1混合的DMEM/F12培养液和Neurobasal,25 $\mu$ g/ml胰岛素,50 $\mu$ g/mL转铁蛋白、30nm亚硒酸钠,20nm孕酮,100nm putrescine,0.4%B27)中2天。④在加入小分子1 $\mu$ m CHIR99021、10 $\mu$ m SB431542、10ng/ml FGF2和1mM Db-cAMP的N3/基础培养基中培养2天。⑤将细胞培养至包含1 $\mu$ m CHIR99021、10 $\mu$ m SB431542、1mM Db-cAMP、10ng/ml FGF2、10ng/ml BDNF、10ng/ml GDNF、10ng/ml NT3、10ng/ml CNTF和2%FBS的N3/basal培养基中培养。每隔一天换一次液。

[0144] 单独使用重组载体pTRIPZ/ $\Delta$ PTB/BRN2时PTB的敲除效率只能达到70%。如果先用p1ko.1/shPTB慢病毒处理一下细胞,则PTB的敲除效率更好。

[0145] 为了测量突触电流,诱导的神经元被接种到铺有单层胶质细胞(来自于P1代GFP转基因大鼠)的培养板中培养2-3周。为了将hNPC分化为皮层神经元,将FGF2从NG培养液去除,然后用10 $\mu$ M ROCK抑制剂Y27632处理24小时,将细胞培养在NG培养液中2-6个星期。将收集的病毒上清在sw-28贝克曼转子内以20000转离心浓缩2小时产生病毒颗粒,然后加入NG培养液中,同时加入终浓度为1 $\mu$ g/mL的polybrene。

[0146] 小分子抑制剂的滴定测量:为了增强nPTB敲除引起的重编程效率,我们检测了几个利于神经元分化的小分子以不同浓度和不同组合带来的影响。SB431542是ALK5特定的抑制剂,我们检测了SB431542四种不同浓度的影响(1 $\mu$ m,2 $\mu$ m,4 $\mu$ m,10 $\mu$ m),发现10 $\mu$ M为最适浓度,与文献中报道的浓度基本一致<sup>[29]</sup>。CHIR99021是糖原合成酶激酶3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ )最特异的抑制剂。我们选择了四种不同浓度(0.5 $\mu$ m,1 $\mu$ m,2 $\mu$ m,4 $\mu$ m),结果发现1 $\mu$ M为最适浓度,略低于文献中报道的最适浓度<sup>[30,32]</sup>。Db-cAMP和毛喉素是cAMP依赖的蛋白激酶(PKA)特异性的激动剂,我们选择了四个浓度(0.1mM,0.2mM,0.5mM,1mM),发现最适工作浓度为1mM。同时,我们测试了三种不同浓度(5 $\mu$ m,10 $\mu$ m和20 $\mu$ m)的毛喉素,发现最佳工作浓度为20 $\mu$ M,这与文

献中报道的工作浓度略有不同。Noggin是BMP-4的拮抗剂,但它也可以调节其他BMPs的活力,包括BMP-2、-7、-13、-14。而且我们发现这种抑制剂在任何浓度(50ng/ml,100ng/ml,200ng/ml,500ng/ml)都无法增强神经细胞重编程效率。LDN-193189是ALK2和ALK3的拮抗剂,我们在不同的测试浓度(0.05mM,0.1mM,0.2mM,0.5mM)没有观察到任何影响。在单独测量以上抑制剂影响的基础上,我们发现同时加入1 $\mu$ M CHIR99021,10 $\mu$ M SB431542和1mM db-cAMP能达到最佳的重编程效率。此处三个小分子是在PTB敲低后,转分化为初始神经元细胞阶段加入。

[0147] 双荧光素酶检测、Western blot和实时荧光定量PCR:为了构建特定的miRNA的荧光素酶报告载体,我们克隆了小鼠和人nPTB的3' UTR区域,将其插入psicheck2质粒的XhoI和NotI位点之间。将1-5ng的报告载体和30pm的miRNA mimics共转染24小时后,用双荧光素酶检测试剂盒(Promega)检测荧光素酶活力。为了检测蛋白表达情况,用不含溴酚蓝的SDS裂解缓冲液裂解细胞,定量后,加入溴酚蓝至终浓度为0.1%,25 $\mu$ g总蛋白在10%Bis-Tris胶中被分离,同时利用以下抗体检测蛋白表达:鼠抗-ptbp1(单克隆抗体BB7,ATCC,cr1-2501),兔抗-ptbp2IS2(由UCLA的Dr. Douglas Black赠予)<sup>[35]</sup>、ptbp2单克隆抗体(M01,Abnova),鼠ptbp2单克隆抗体(ab57619,Abcam),兔抗-BRN2(Cell Signaling Technology,12137)和抗GAPDH(14c10,Cell Signaling Technology),抗Flag(Sigma,F3165)和鼠抗-ACTB(A2228,Sigma)。利用Trizol法提取总RNA(Life Technology),同时可以加入10 $\mu$ g/ml糖原于沉淀丰富的小RNAs。提取的总RNA首先用DNase I(Promega)处理,然后用反转录试剂盒(Life Technology)进行反转录。最后利用基因特定的引物及SYBR Green(Roche)染料,通过Step-One Plus PCR(Applied Biosystems)仪检测基因表达。三次重复实验的t检验计算统计学差异。质粒构建和PCR反应的所有引物如下。





抗-vglut1(Synaptic Systems,135-303,1:200),兔抗GABA(Sigma,A2052,1:1000),兔抗-brn2(Cell Signaling Technology,12137,1:500),鼠抗纤维连接蛋白(DSHB,13G3B7,1:500)、鼠抗vimentin-594(Abcam,EPR3776,1:1,000),鼠抗p63(Thermo Fisher,MA1-21871,1:300),羊抗MITF(Santa Cruz,sc-10999,1:100),兔抗-k5(Thermo Fisher,RM2106S0,1:300),兔抗NGF受体p75(Millipore,AB 1554,1:100),山羊抗-sox2(Santa Cruz,sc-17319,1:200),鼠抗-pax3(DSHB,PAX3,1:250),鼠抗-pax7(DSHB,PAX7-c,1:250),鼠抗-nkx2.2(DSHB,74.5A5,1:100),鼠抗NCAM(DSHB,5A5-c,1:100),鼠抗Olig1(Neuromab,75-180,1:100),鼠抗GFAP(Neuromab,75-240,1:100),兔抗-tbr1(Millipore,AB10554,1:300),鼠抗GFP(Life Technologies,A-11120,1:400),兔抗-sox10(Abgent,AP5854c,1:50),兔抗-brn3a(Bioss USA,bs-3669R,1:50)。荧光标记的二抗和DAPI分别(Life Technologies,A-21207,A-21202,A-21203,and A-21206)孵育细胞1h和20分钟。PBS洗六次,用fluoromount-g封片剂封片,最后在奥林巴斯FluoView FV1000显微镜下拍照统计。

[0151] ChIP-seq鉴定BRN2靶基因:首先,将人NPC细胞用1%甲醛交联,然后用2.5M甘氨酸终止交联。用预冷的PBS洗三次,将细胞从培养皿上刮下于离心管中,2500rpm离心收集细胞,细胞沉淀重悬在1ml细胞裂解液中,混匀,冰上孵育10-15分钟,每两分钟颠倒一下。3,500rpm离心5分钟,弃上清,将沉淀重悬到500ul核裂解液中(1%SDS,10mM EDTA,50mM Tris-Cl,pH 8.1,蛋白酶抑制剂),冰上孵育10分钟。将重悬液按最大功率超声(Branson, Sonifer cell disruptor 185)破碎7次,间隔为10s。4℃,14,000rpm离心10分钟,收集上清于15ml离心管中。取上清用缓冲液(1%Triton X-100,2mM EDTA,150mM NaCl,20mM Tris-Cl,pH 8.1,蛋白酶抑制剂)稀释10倍产生可溶性染色质,每个染色质免疫共沉淀反应需要100-200ug。裂解液中加入20ul蛋白A/G磁珠(Pierce,88802),4℃旋转孵育1小时。加5ug抗Brn-2抗体于裂解上清中,4℃孵育过夜。同时,将蛋白A/G磁珠加入含有5mg/ml BSA-fraction V的PBS中4℃孵育4小时。通过磁力架收集磁珠,于4℃按如下顺序清洗磁珠:0.7ml TSE I(0.1%SDS,1%Triton X-100,2mM EDTA,20mM Tris-HCl,pH 8.1,150mM NaCl)两次;TSE II两次(0.1%SDS,1%Triton X-100,2mM EDTA,20mM Tris-HCl,pH 8.1,500mM NaCl);buffer III(0.25M LiCl,1%NP-40,1%deoxycholate,1mM EDTA,10mM Tris-HCl,pH 8.0)两次;1ml TE buffer两次。最后,清洗过的磁珠用150ul洗脱缓冲液(TE buffer,1%SDS)在70℃,1,000rpm振动洗脱两次,离心10分钟取上清。将洗脱液置于65℃孵育过夜解交联。150ul可溶性染色质作为阳性对照,利用QIAquick(Qiagen,CA)PCR回收试剂盒回收DNA。

[0152] 构建ChIP-seq文库的试剂盒为TruSeq ChIP Sample Prep Kit(Illumina)。为了获取spike-in的严格对照,在免疫共沉淀步骤中,分别加700ng果蝇的可溶性染色体至200ug hNPC分化前后的可溶性染色体中。随后加入5ug Brn2抗体和1ug果蝇特异性的H2AV抗体(Active Motif,39716)。高通量测序后,果蝇的测序tag被用来作为spike-in对照。ChIP-seq所得的数据被比对到人的genome上,利用SAM工具去掉重复及低质量的reads,通过MACS软件<sup>[54]</sup>识别结合区域,由此得到的BRN2靶基因数据。

[0153] 统计分析:用SigmaPlot 12软件中的双尾T检验来评估统计学差异,将第一组实验次数加上第二组的实验次数再减去2定义为自由度。两组数据之间的方差是接近的,数据的分布符合正态分布,但是没有被检验过。所有的数据采集和分析都是严格按照不同处理条

件来区分。图像在20倍镜下随机采集获取,本研究并未采用统计方法确定样本大小,但我们的样本规格符合本领域通常采用的标准。

[0154] 结果:

[0155] 人源细胞神经转化的起始障碍物

[0156] 我们前期的研究发现一旦敲除PTB便可激活自立的PTB-miR124-REST环路,由于这个环路是保守的,我们利用相同的策略尝试重编程两株分别来源于42岁男性和86岁女性皮肤的成纤维细胞。这两株细胞系都表达Fibronectin、FSP1和Vimentin等成纤维细胞标志物,而不表达神经元、神经嵴和神经嵴来源的细胞标志物(图6a)。PTB敲除后可高效的使这些细胞停止增殖并使细胞周期停滞在G2期(图1a和图6b),9-15%的细胞转变为神经细胞特异的形状并且表达Tuj1,该转化效率与我们在鼠成纤维细胞MEF中观测到的效率类似<sup>[28]</sup>。

[0157] 为了增加转分化的效率,我们尝试添加已经报道过的可增加神经细胞转分化的小分子化合物来测试<sup>[29-33]</sup>。这些小分子化合物单独处理细胞并不能引起神经细胞转分化,可是当把它们和PTB敲低同时处理的话发现有几个小分子可促进转分化,我们进而通过组合优化筛选发现了三个小分子化合物组合可显著的提高神经细胞转分化的效率。通过监测转化动力学,发现PTB敲低3天后,三个小分子(3SM)能够提升TUJ1阳性细胞的数量,最早3小时即可观测到TUJ1,1天后达到顶峰,而纤维原细胞标志物fibronectin逐渐下降,4天后几乎检测不到,并取得了超高效的转化率(90%)。对于对照shRNA处理的细胞,3SM没有任何效果,长期的处理会导致细胞形态的短期改变,但很快回归正常。与此相反,PTB敲低后迅速诱导持久的神经元形态,3SM短暂处理3小时,可显著提高转分化效率,3SM的持续存在会产生更强大的增强(图6e)。这些数据表明3SM单独处理没有效果,但它与PTB敲低组合可高效的诱导细胞命运改变。细胞增殖的显著下降和SOX2及Nestin的负染表明该神经细胞重编程跳过了干细胞阶段是直接的细胞转分化。值得注意的是如果我们将建立的策略应用与鼠源细胞会导致细胞的快速死亡,说明了人和鼠的细胞存在着显著的差别。

[0158] 第二个人源细胞特异的障碍物控制神经细胞成熟

[0159] 我们还发现PTB敲除/3SM处理得到的神经元细胞缺乏成熟细胞特异的标志物,比如MAP2、NF、NeuN等,暗示得到的神经细胞被停滞在神经细胞的早期阶段(图2a和图7a)。与预测相同,我们不能检测到任何神经细胞的活性,比如细胞膜去极化后的钙火花以及动作电位。即使培养更长的时间,细胞也很难成熟。这些数据提示存在第二个障碍物来调控神经细胞成熟,而且这个障碍物在鼠成纤维细胞转分化过程中主动被移除<sup>[28]</sup>,但是在人源细胞中难以去除<sup>[28]</sup>。

[0160] 为了寻找这个潜在的障碍物,我们进行了RNA-seq分析。我们注意到了大量REST的靶标基因被激活,但是,与MEF细胞不同,我们发现PTB的神经同源蛋白nPTB维持在高水平的表达状态(图7b)。我们假设nPTB的表达与调控可能是人源细胞和鼠源细胞在转分化过程中的关键区别。为了验证这个假说,我们在MEF和HAF转分化过程中监测了PTB敲除后的nPTB表达情况,我们发现nPTB在HAF分化为神经元类似细胞的过程中持续高表达(图2b,c),这提示nPTB可能是人与鼠之间的关键区别。

[0161] 通过连续的敲低PTB/nPTB来克服两种屏障(HAF细胞通过连续地敲低PTB和nPTB产生功能神经元)

[0162] 感染四种经过验证的针对nPTB的慢病毒shRNA构建可诱导敲低的细胞系(图7c,

d)。将含有如下靶序列(gaagagaggatctgacgaacta, taagaaagacagcgctctaata, ttttaagaaacctggatccaaa, 和cgaggaagcagctattactatg)的pTRIPZ重组载体利用psPAX2和pMD.2G质粒在293T细胞中包装成慢病毒,然后感染人成纤维细胞得到可诱导敲低nPTB的细胞系。结果显示,PTB和nPTB在MEFs和HAFs中被同时敲除会导致细胞死亡,表明一个连续的过程对于神经元的分化是很重要的,尽管在小鼠和人的细胞中存在时间上的差异。

[0163] 先敲低PTB,随后使用潮霉素筛选3天,然后通过在不同时间点添加强力霉素来敲除nPTB(由shnPTB表达模式中的REP表达表明的)(图2d)。

[0164] 结果显示,在不同的培养基中培养PTB敲低的细胞2天或者更长一段时间后(此时细胞已经转分化成具有神经细胞形态的初始神经细胞,但是未成熟),nPTB敲低的细胞中产生了健康的MAP2阳性(14天时染色)的细胞(图2e)。产生的神经元类似细胞在培养3个月时依然保持健康,4个月时也是健康的。

[0165] 接下来确定通过连续的敲低PTB和nPTB得到的神经元类似细胞是否具有神经元特有的细胞膜特性。在强力霉素处理4周后与带有GFP标签的神经胶质细胞共培养2周后,检测快速活化和失活的内部钠离子电流信号和外部钾离子电流信号(图2f)。钠离子电流信号可以被电压门控的钠离子通道特异的抑制剂:河豚毒素(TTX)封闭,洗除抑制剂后可以被部分的解除抑制,表明这是一个主动结合,被动解离的过程(图2f)。通过电流注入,可以观察到反复的电位活动(图2g)。细胞同样也表达功能性GABAA受体,依赖于GABA的刺激,这个过程可以被苦毒素(PiTX)特异性抑制,苦毒素是一种GABAA受体特异性的抑制剂(图2h)。还检测到不同振幅和频率的自发性突触后电流,它可以被兴奋型(NBQX+APV)和抑制型(NBQX+APV+PiTX)受体的抑制剂连续的封闭(图2i-k)。总的来说,这些数据证明了在神经胶质细胞存在时,通过连续性PTB和nPTB敲低的HAFs的诱导的神经元细胞是具有功能的。

[0166] 在神经元成熟过程中nPTB调节BRN2

[0167] 以上数据表明nPTB的敲除足以克服神经元成熟障碍,预示着一个新的调节途径的激活。为了了解其内在机制,我们在人类细胞中检测了之前已经被证明的,在产生功能神经元中重要调节因子的表达。实验表明,除了BRN2之外,在HAF中,这些基因在敲低PTB后与这些基因成为REST靶标的效应一致(图8a)。而BRN2是一个在PTB敲低的HAF细胞中仍然被抑制的皮质特异性转录因子<sup>[37]</sup>(图3a)。值得注意的是,依次敲低PTB和nPTB后有效的诱导了BRN2的表达(图3b)。

[0168] 之后我们确认了激活的BRN2在神经元成熟过程中的潜在促进作用。首先我们在PTB敲低的同时表达不同的转录调节因子,发现BRN2的存在对于MAP2的表达和引起Ca<sup>2+</sup>的内流是非常必要的(图8b)。之后我们在一个稳定的HAF细胞系中构建了一个可诱导的多顺反子的质粒来同时敲低PTB和高表达BRN2(图3c)。强力霉素处理后诱导PTB的迅速敲低和BRN2逐渐的表达,处理两周之后,我们检测到多种成熟神经元的表面标记,包括MAP2,NCAM,NCAM, vGLUT1和NeuN(图3c)。

[0169] 为了证明这些神经元的功能性,我们利用培养一周后的带有GFP标记的神经胶质细胞来记录TTX敏感的钠通道电流(图3d),电流引起的持续的动作电位,偶然的自发动作电位,和功能性的AMPA和NMDA电流通过特殊的抑制物来区分(图3g)。在带有GFP标记的神经胶质细胞培养3到4周后(图3h),我们检测了可变幅度和频率的自发突触活动(图3i-k)。通过连续的敲低PTB和nPTB诱导或通过敲低PTB和BRN2过表达诱导而成的神经元在一些重要的

电生理特性方面具有相似性(Supplementary Table1)。综上,这些数据表明PTB敲低之后再过表达BRN2对HAF转分化为功能性的神经元是足够的。

[0170] BRN2对hNPC分化必不可少

[0171] 我们接下来希望研究建立在不同生理条件背景下,BRN2在神经元成熟过程中的功能。也就是,通过去除培养基中成纤维细胞生长因子,将人源的神经前体细胞(hNPCs)分化成大脑皮层神经元<sup>[38]</sup>。这些hNPCs会表达特异的神经元干细胞标记,例如nestin, Sox2和BRN2(图9a)。通过将BRN2敲除,我们发现,早期神经元分化事件不受影响,如Tuj1的正常表达(图4a);而更多的成熟神经元相关的标记-MAP2,其表达量则严重的受到影响(图4b和图9b,c)。在BRN2敲除的hNPCs细胞中,内部Na<sup>+</sup>流很少能被检测到(图9d)。这些数据表明BRN2对于NPC分化形成功能性神经元是必须的。

[0172] BRN2激活神经元特异的miRNAs

[0173] 为了解BRN2如何介导神经元的成熟,我们进一步利用hNPC系统,收集hNPC分化前后的样品,使用2种相互独立的BRN2抗体(抗体C-20和抗体B-2)进行ChIP-seq(图9f,g)。在3987个基因中,我们检测到了大约5000个BRN2结合峰。利用GO注释分析所有表达基因,表明BRN2调节大部分在神经发生和成熟过程中至关重要的基因(图9h,i)。

[0174] 在BRN2所有的靶基因中,我们注意到了BRN2直接结合在20号染色体的MIR124-3基因和5号染色体的MIR9-2基因上(图4d)。以MIR124-3基因位点作为对照,在hNPC分化前和分化后,BRN2的结合能力都没有改变,而BRN2在MIR9-2基因位点上的多重结合位点只有在hNPC分化后被检测到了(图4d)。我们进一步通过CHIP和qPCR证实了这一结果(图4e)。在PTB敲除处理的HAFs中,通过以miR-21作为负对照,检测成熟的miR-124和miR-9,在BRN2过表达的第6天,我们再次检测到了miR-9的诱导,而非miR-124;然而将BRN2表达延长到第12天,2种miRNAs都被诱导(图4f)。这些数据表明,在hNPCs中BRN2结合和调节MIR124基因的表达;但是最适度的miR-124转录水平不足以诱发神经元的分化。相比之下,BRN2调节的miR-9似乎驱动了神经元的分化,miR-9-2前体在E12.5和E13.5之间的时期被大量诱导相一致,这个时期BRN2基因在小鼠大脑中开始表达<sup>[39-41]</sup>。

[0175] 我们也证实了在PTB敲除和nPTB敲除处理的HAFs中BRN2能够结合MIR9和MIR124基因位点(图4g)。在应答PTB和nPTB相继敲除的HAFs中,MIR9被持续的诱导(图4h)。相比之下,MIR124在应答PTB敲除的HAFs中被高度诱导;但是由于未知的原因,在应答PTB敲除和nPTB敲除处理的HAFs中,MIR124被抑制表达(图4h)。无论如何,这些数据表明MIR124的诱导可能作用于神经元的转分化,而随后的MIR9的激活可能作用诱导的类神经元细胞到功能性的神经元过程。

[0176] nPTB-BRN2-miR9环对神经细胞成熟的作用

[0177] BRN2能够诱导产生miR-9为神经细胞成熟提供了新的研究方向,同时我们注意到nPTB的3'非翻译区存在典型的配对区可能是miR-9和miR-124的靶定位点,即mRNA的种子序列(图5a)。接着我们又进一步探索这两个在神经系特异性表达的miRNAs是否能减少内源性nPTB的表达。前期研究表明miR-124能有效地抑制PTB表达并且能在一定程度上降低nPTB的表达量<sup>[42]</sup>。在PTB抑制表达的HAFs中,我们发现miR-9和miR-124都能在mRNA和蛋白水平使nPTB水平下调(图5b,c)。正如我们所预测,shBRN2抑制了nPTB的下调,同时BRN2过表达减少了PTB敲除处理HAFs中nPTB表达减少(图10a,b)。为进一步探索miR-9和miR-124在对nPTB

转录后调节的作用,在人神经前体细胞中我们特异性表达了miR-9和miR-124的海绵体,发现nPTB的表达水平显著提高(图5d,e)。在HAF诱导的神经细胞中,这些特异的海绵体同样能够阻止nPTB基因的下调并且减少NeuN的表达,这与我们早期的研究结果,在分化的人神经前体细胞中miR-9,miR-124对于维持神经细胞的分裂能力是必要的<sup>[43,44]</sup>。

[0178] 我们又接着证实了nPTB3'非翻译区的预测靶定位点,我们构建了一个有nPTB3'非翻译区的荧光素酶报告基因载体与miRNAs同时转染,发现miR-9和miR-124两者都可以抑制报告载体荧光蛋白的表达,同时在预测的靶定位点特异性突变能削弱miRNA对报告基因表达的下调(图5g)。在nPTB 3'非翻译区预测的两个miR-124靶定位点中,第一个预测位点序列的突变能够更有效地阻止对于miR-124导致的nPTB下调(图5g)。虽然miR-124过表达或抑制表达能影响nPTB的表达量,但在生理条件下BRN2-miR-9-nPTB对神经细胞的成熟至关重要,因为由shPTB诱导的未成熟的神经细胞miR-124表达量较高。为进一步说明nPTB表达量的减少对于神经细胞的成熟至关重要,我们构建了由shPTB、shnPTB诱导的由HAFs转分化的shRNA-抵抗的神经细胞系,此细胞系中MAP2的表达量降低到本底水平,更重要的是,NeuN的表达完全受到抑制(图5h)。

[0179] 综合分析,图3-5表明在PTB表达降低的HAFs在诱导神经细胞成熟的过程中存在一个未知的环路,在分子环中,nPTB下调直接或间接诱导BRN2活化;被激活的BRN2结合并诱导miR-9转录,最终表达量增加的miR-9在转录后减少nPTB。因此,如同PTB-REST-miR-124环路对神经细胞的转分化的作用,nPTB-BRN2-miR-9环路一旦被激活,在神经细胞的成熟中自我维持。

[0180] 顺序调节环路的生理关联性

[0181] 神经分化通过依次表达转录和转录后的调节因子受到严格的控制,我们已阐明了两个独立但高度交织的环路与体内的神经发生程序是一致的。众所周知,PTB维持神经干细胞库,缺失PTB导致小鼠过早的神经分化和神经干细胞的大量缺失<sup>[45]</sup>。PTB敲除的效果在很大程度上与REST敲除小鼠表型相似,这表明它们在神经元诱导中作用于相同的通路。PTB和REST在非神经细胞中组成型表达,很可能在发育的神经元中它们的失活通过诱导MIR 124的表达触发<sup>[42]</sup>。我们以前的工作揭示了包括PTB,miR-124 和REST的双负反馈回路<sup>[28]</sup>,一旦触发,该回路将自我维持,并拆除REST,产生大量的神经元特异性基因来驱动神经发生。重要的是,miR-124诱导的REST拆解从根本上与REST基因敲除小鼠不同,残留量的REST似乎是确保分化的神经元的健康状态所必须的<sup>[46]</sup>。

[0182] 在神经发育的早期阶段,由于nPTB包含一个PTB抑制外显子,PTB失活的一个关键功能是nPTB的去阻遏<sup>[34,42,47,35]</sup>。我们的新数据显示,miR-124负性调节nPTB,这可能会抵消PTB敲除诱导的nPTB表达,因而从不成熟到成熟的神经元维持相对稳定nPTB表达。瞬时nPTB表达与E13.5诱导的BRN2和MIR-9是一致的,然而,我们一直不清楚nPTB如何在神经发育过程中被关闭<sup>[39,40]</sup>。我们现在建立由三个组分形成的一个前馈回路,并且在成熟的神经元中,nPTB逐渐关闭是该回路完全活化的基础<sup>[36,48]</sup>。仍然需要确定人类大脑中激发此通路的发育触发器。

[0183] 小鼠和人类神经程序之间的主要区别

[0184] 小鼠一直是人类神经学和神经退行性疾病研究的主要模型。然而,小鼠和人在进化上存在很多方面不同。其中的一个基本差异是大脑皮层扩张<sup>[49]</sup>,大脑皮层扩张主要是由

于胚胎大脑皮层发育期间神经祖细胞的增加。严格控制神经元的转分化和成熟环路,确保在大脑发育过程中以连续的方式程序性开关,如同时敲除PTB和nPTB产生了致死的表型。值得注意的是,在小鼠细胞优化的神经元转分化程序,在人的细胞中不足以产生有功能的神经元,而在人类细胞中优化的转分化程序将导致小鼠细胞致死,这表明来自不同哺乳动物的细胞可能具有其自己的内置的定时机制。

[0185] 小鼠和人细胞之间,由PTB和nPTB介导的环路为基础的分离定时机制似乎在小鼠细胞中自动连接,但在人类细胞中需要分别被激活。虽然我们还处于理解这些具体种类的机制的早期阶段,一个潜在的机制可能是由于小鼠和人类之间用于诱导的miR-124和miR-9表达的不同调节程序。miR-124被认为在神经发生过程中逐渐被诱导,而miR-9在神经元成熟中被诱导表达<sup>[25]</sup>。因此可以想象,起始诱导表达的miR-124可能在小鼠细胞中负责下调PTB和nPTB,但在人类细胞主要下调PTB。即使在小鼠细胞,miR-124很可能靶向PTB比nPTB更高效的,当同时失活PTB和nPTB将严重危及分化的神经元的生存力。

[0186] BRN2表达调控是神经元成熟的一个明显的贡献者,但其他神经元特异性转录因子,如NEUROD1也可能参与其中<sup>[14]</sup>。其中一个成熟神经元特异的转录因子将进一步促进miR-124的表达,在神经发生的后期阶段与BRN2诱导的miR-9一起调节神经元成熟。因此,根据实验测定的不同组合的转录因子可能都能够部分的激活神经元转分化和成熟过程,但是不能够在所有的细胞中激活这些过程。如人细胞的神经元重编程似乎被一些关键的gatekeepers严格控制,包括两个在本研究中阐明的环路,神经程序的这种机会性活化因而导致人类细胞低的转分化效率。

[0187] PTB和nPTB调节基因表达的机制

[0188] PTB和nPTB是公认的剪切调节因子<sup>[34,36,42,47,48,50]</sup>,尽管它们在RNA结合中具有相似的生物化学特性,在调节剪切中具有相似的生物学功能,但在基因敲除小鼠的研究中发现它们在发育过程具有非冗余的功能<sup>[36,45,48]</sup>。我们最近的研究表明,除了调节剪切的功能之外,PTB也结合在许多基因的3'非翻译区,或者与miRNA竞争结合靶位点,或者改变RNA的二级结构促进miRNA的靶向结合,从而双向调节miRNA的功能<sup>[28]</sup>。我们的早期工作证实PTB的这些新功能很大程度上归功于神经元转分化的过程中miR-124介导的REST复合体的拆除<sup>[28]</sup>。

[0189] 在神经元成熟中,我们发现调节nPTB表达的重要功能,之前的研究已阐明nPTB在调节神经元特异性可变剪接事件中的作用,进而产生与成熟神经元相关的各种表型<sup>[34,36,48]</sup>。我们证明了通过活化nPTB-BRN2-miR-9环路,nPTB下调在驱动神经元成熟中的关键作用,在这个环路中,BRN2可能从激活MIR9转录开始,诱导的miR-9反过来通过结合在nPTB的3'端非编码区,从而使nPTB失活,但目前还不清楚nPTB的下调如何导致BRN2的活化。接下来的研究中,我们将继续探讨nPTB下调导致的BRN2活化的途径,无论是直接通过一个转录去阻遏机制或间接通过诱导成熟神经元的其它基因的剪接事件。

[0190] 参考文献:

[0191] 1.Hobert,0.Regulation of terminal differentiation programs in the nervous system.*Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*27,68-696(2011).

[0192] 2.Molyneaux,B.J.,Arlotta,P.,Menezes,J.R.&Macklis,J.D.Neuronal subtype specification in the cerebral cortex.*Nat.Rev.Neurosci.*8,427-437(2007).

- [0193] 3. Guillemot, F. Spatial and temporal specification of neural fates by transcription factor codes. *Development* 134, 3771–3780 (2007).
- [0194] 4. Bang, A.G. & Goulding, M.D. Regulation of vertebrate neural cell fate by transcription factors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 25–32 (1996).
- [0195] 5. Florio, M. et al. Human-specific gene ARHGAP11B promotes basal progenitor amplification and neocortex expansion. *Science* 347, 1465–1470 (2015).
- [0196] 6. Herculano-Houzel, S. The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Front. Hum. Neurosci.* 3, 31 (2009).
- [0197] 7. Lepski, G. et al. Delayed functional maturation of human neuronal progenitor cells in vitro. *Mol. Cell. Neurosci.* 47, 36–44 (2011).
- [0198] 8. Takahashi, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872 (2007).
- [0199] 9. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676 (2006).
- [0200] 10. Yu, J. et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917–1920 (2007).
- [0201] 11. Dimos, J.T. et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321, 1218–1221 (2008).
- [0202] 12. Wernig, M. et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 5856–5861 (2008).
- [0203] 13. Caiazzo, M. et al. Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature* 476, 224–227 (2011).
- [0204] 14. Pang, Z.P. et al. Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature* 476, 220–223 (2011).
- [0205] 15. Pfisterer, U. et al. Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 10343–10348 (2011).
- [0206] 16. Son, E.Y. et al. Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons. *Cell Stem Cell* 9, 205–218 (2011).
- [0207] 17. Vierbuchen, T. et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463, 1035–1041 (2010).
- [0208] 18. Broccoli, V., Caiazzo, M., & Dell'Anno, M.T. Setting a highway for converting skin into neurons. *J. Mol. Cell Biol.* 3, 322–323 (2011).
- [0209] 19. Amamoto, R. & Arlotta, P. Development-inspired reprogramming of the mammalian central nervous system. *Science* 343, 1239882 (2014).
- [0210] 20. Cahan, P. et al. CellNet: network biology applied to stem cell engineering. *Cell* 158, 903–915 (2014).



- [0211] 21. Morris, S.A. et al. Dissecting engineered cell types and enhancing cell fate conversion via CellNet. *Cell* 158, 889–902 (2014).
- [0212] 22. Hou, P. et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science* 341, 651–654 (2013).
- [0213] 23. Li, Y. et al. Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, Oct4, and small molecules. *Cell Res.* 21, 196–204 (2011).
- [0214] 24. Cimadamore, F., Amador-Arjona, A., Chen, C., Huang, C.T. & Terskikh, A.V. SOX2-LIN28/let-7 pathway regulates proliferation and neurogenesis in neural precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, E3017–E3026 (2013).
- [0215] 25. Li, X. & Jin, P. Roles of small regulatory RNAs in determining neuronal identity. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 329–338 (2010).
- [0216] 26. Ambasudhan, R. et al. Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions. *Cell Stem Cell* 9, 113–118 (2011).
- [0217] 27. Yoo, A.S. et al. MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature* 476, 228–231 (2011).
- [0218] 28. Xue, Y. et al. Direct conversion of fibroblasts to neurons by reprogramming PTB-regulated microRNA circuits. *Cell* 152, 82–96 (2013).
- [0219] 29. Chambers, S.M. et al. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat. Biotechnol.* 27, 275–280 (2009).
- [0220] 30. Li, W. et al. Rapid induction and long-term self-renewal of primitive neural precursors from human embryonic stem cells by small molecule inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 8299–8304 (2011).
- [0221] 31. Liu, M.L. et al. Small molecules enable neurogenin 2 to efficiently convert human fibroblasts into cholinergic neurons. *Nat. Commun.* 4, 2183 (2013).
- [0222] 32. Ladewig, J. et al. Small molecules enable highly efficient neuronal conversion of human fibroblasts. *Nat. Methods* 9, 575–578 (2012).
- [0223] 33. Prasad, K.N. & Hsie, A.W. Morphologic differentiation of mouse neuroblastoma cells induced in vitro by dibutyl adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. *Nat. New Biol.* 233, 141–142 (1971).
- [0224] 34. Boutz, P.L. et al. A post-transcriptional regulatory switch in polypyrimidine tract-binding proteins reprograms alternative splicing in developing neurons. *Genes Dev.* 21, 1636–1652 (2007).
- [0225] 35. Zheng, S. et al. PSD-95 is post-transcriptionally repressed during early neural development by PTBP1 and PTBP2. *Nat. Neurosci.* 15, 381–388 (2012).
- [0226] 36. Li, Q. et al. The splicing regulator PTBP2 controls a program of embryonic splicing required for neuronal maturation. *Elife* 3, e01201 (2014).
- [0227] 37. Hagino-Yamagishi, K. et al. Predominant expression of Brn-2 in the

- postmitotic neurons of the developing mouse neocortex. *Brain Res.* 752, 261–268 (1997).
- [0228] 38. Marchetto, M.C. et al. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* 143, 527–539 (2010).
- [0229] 39. Dominguez, M.H., Ayoub, A.E. & Rakic, P. POU-III transcription factors (Brn1, Brn2, and Oct6) influence neurogenesis, molecular identity, and migratory destination of upper-layer cells of the cerebral cortex. *Cereb. Cortex* 23, 2632–2643 (2013).
- [0230] 40. Shibata, M., Nakao, H., Kiyonari, H., Abe, T. & Aizawa, S. MicroRNA-9 regulates neurogenesis in mouse telencephalon by targeting multiple transcription factors. *J. Neurosci.* 31, 3407–3422 (2011).
- [0231] 41. Krichevsky, A.M., King, K.S., Donahue, C.P., Khrapko, K. & Kosik, K.S. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA* 9, 1274–1281 (2003).
- [0232] 42. Makeyev, E.V., Zhang, J., Carrasco, M.A. & Maniatis, T. The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Mol. Cell* 27, 435–448 (2007).
- [0233] 43. Åkerblom, M. et al. MicroRNA-124 is a subventricular zone neuronal fate determinant. *J. Neurosci.* 32, 8879–8889 (2012).
- [0234] 44. Giusti, S.A. et al. MicroRNA-9 controls dendritic development by targeting REST. *Elife* 3 (2014).
- [0235] 45. Shibasaki, T. et al. PTB deficiency causes the loss of adherens junctions in the dorsal telencephalon and leads to lethal hydrocephalus. *Cereb. Cortex* 23, 1824–1835 (2013).
- [0236] 46. Gao, Z. et al. The master negative regulator REST/NRSF controls adult neurogenesis by restraining the neurogenic program in quiescent stem cells. *J. Neurosci.* 31, 9772–9786 (2011).
- [0237] 47. Spellman, R., Llorian, M. & Smith, C.W. Crossregulation and functional redundancy between the splicing regulator PTB and its paralogs nPTB and ROD1. *Mol. Cell* 27, 420–434 (2007).
- [0238] 48. Licatalosi, D.D. et al. Ptbp2 represses adult-specific splicing to regulate the generation of neuronal precursors in the embryonic brain. *Genes Dev.* 26, 1626–1642 (2012).
- [0239] 49. Rakic, P. Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 724–735 (2009).
- [0240] 50. Xue, Y. et al. Genome-wide analysis of PTB-RNA interactions reveals a strategy used by the general splicing repressor to modulate exon inclusion or skipping. *Mol. Cell* 36, 996–1006 (2009).

## 序列表

<110>中国科学院生物物理研究所  
 <120>一种控制人神经细胞重编程的信号通路及其应用  
 <160>5

<210>1

<211>22

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>1

gaagagagga tctgacgaac ta

22

<210>2

<211>22

<212>DNA

[0001]

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>2

taagaaagac agcgctetaa ta

22

<210>3

<211>22

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>3

LLLaagasa cclggatcca aa

22

<210>4

<211>22

<212>DNA

---

	<213>人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400>4	
	cgaggaagca gctattacta tg	22
[0002]	<210>5	
	<211>22	
	<212>DNA	
	<213>人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400>5	
	tcgacataat ctctgtatta ta	22

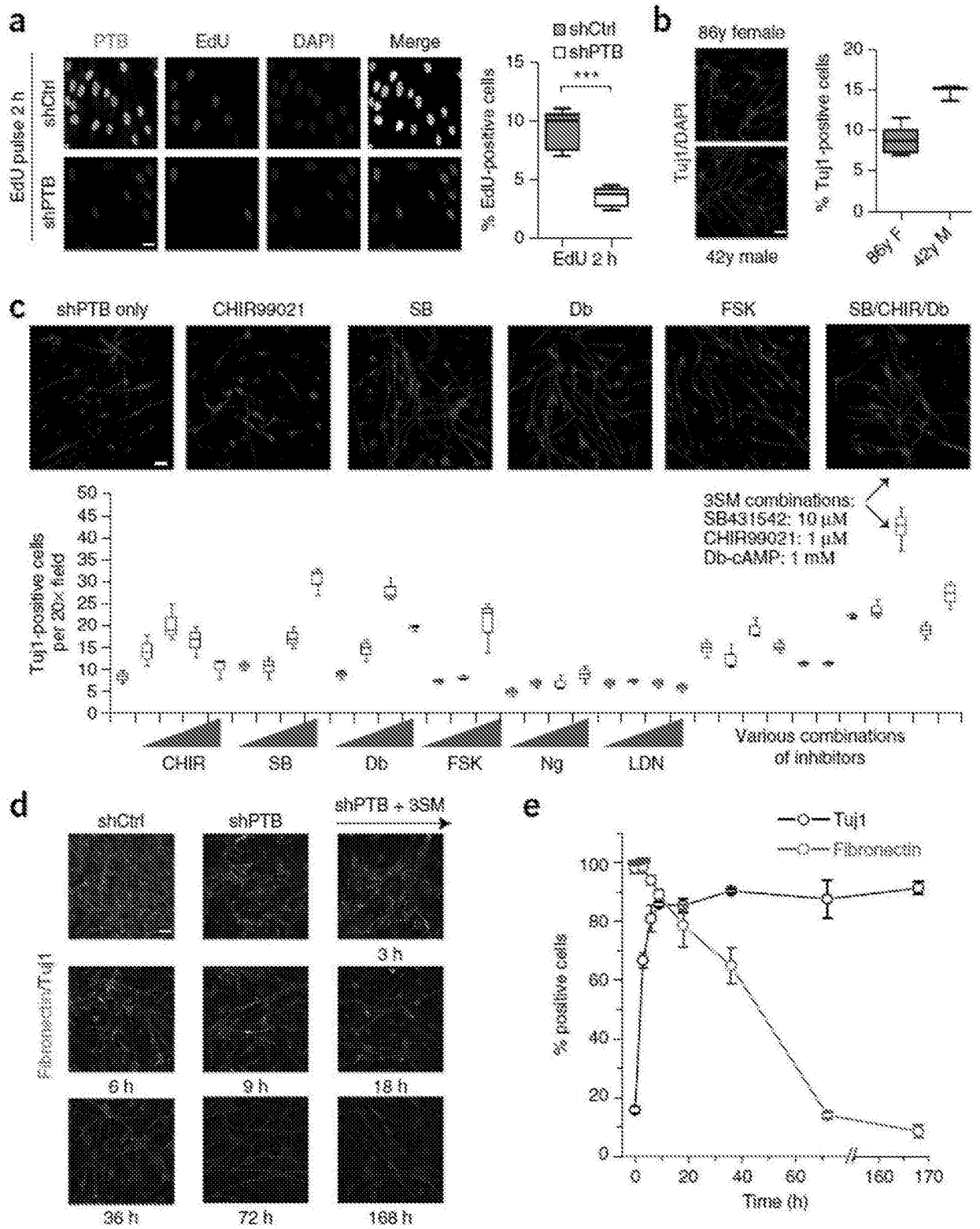


图1

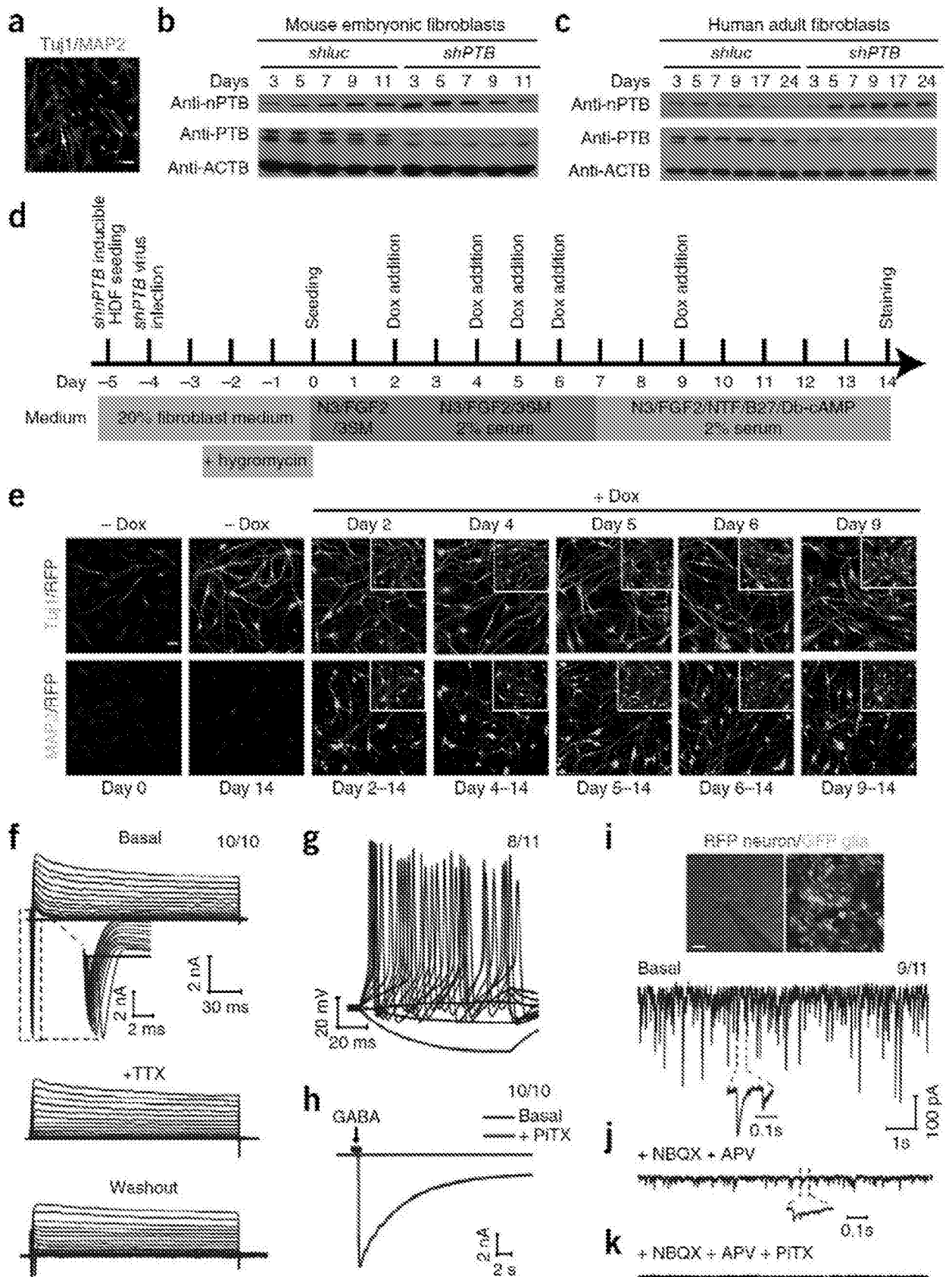


图2

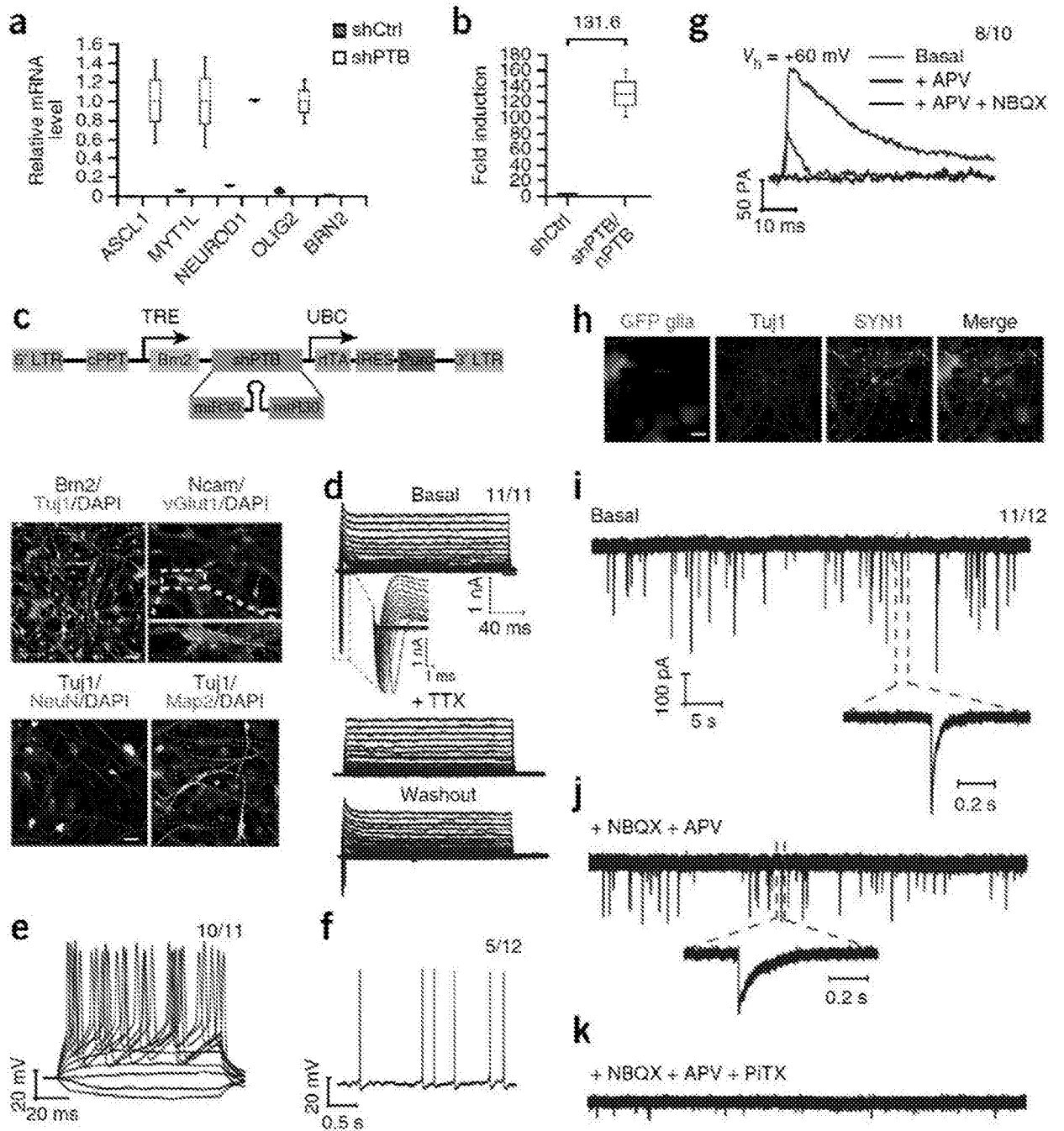


图3

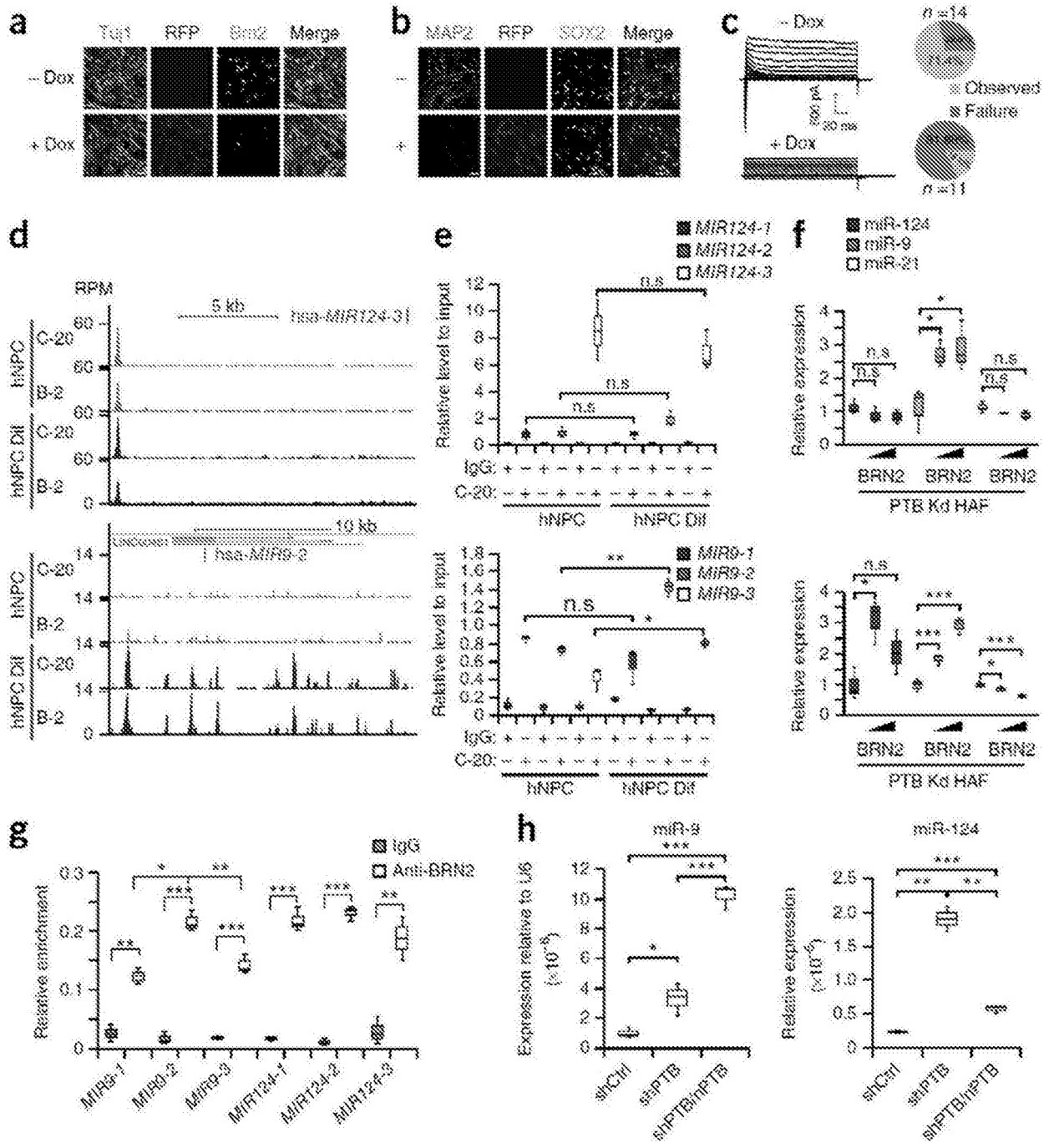


图4



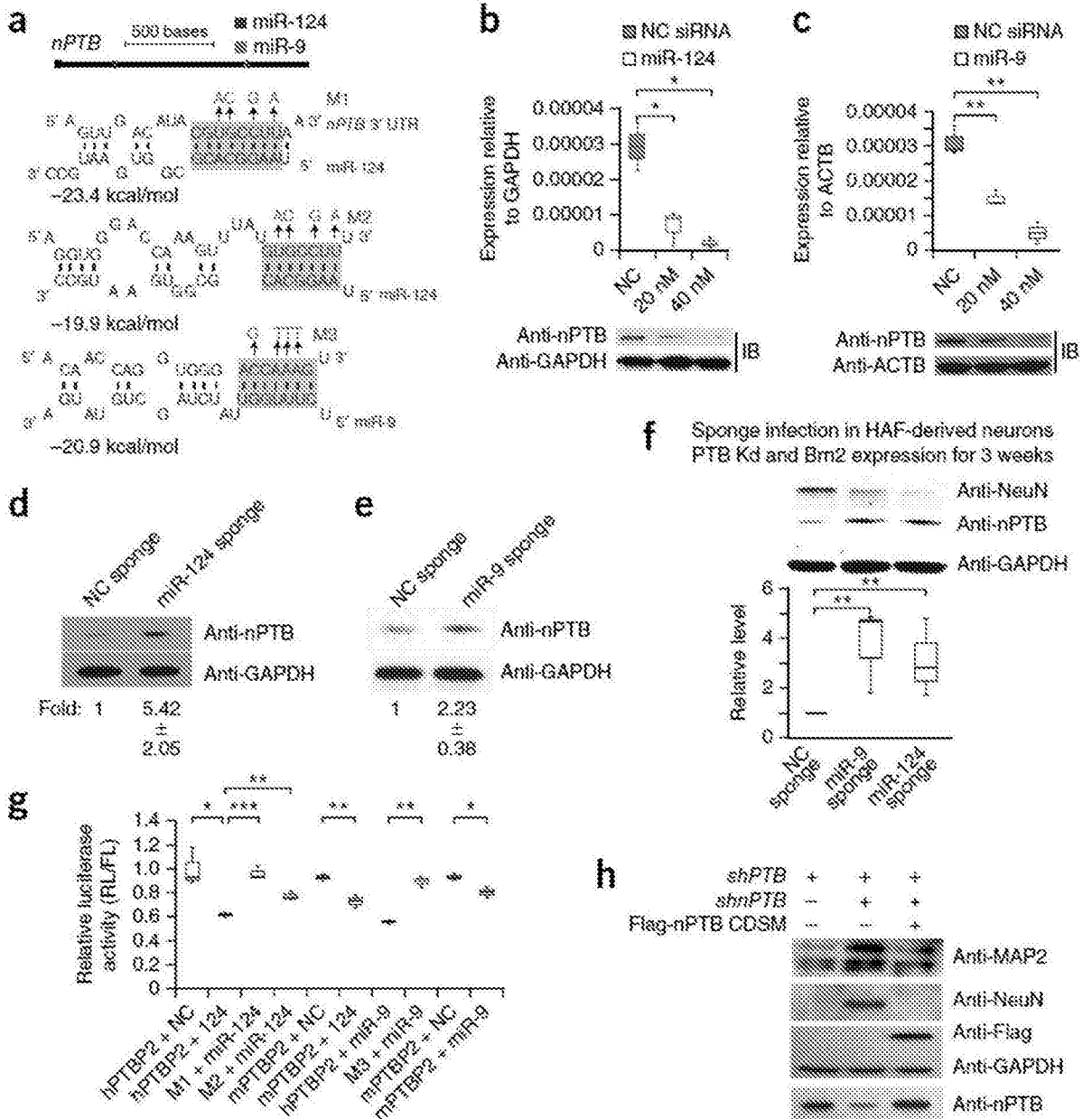


图5

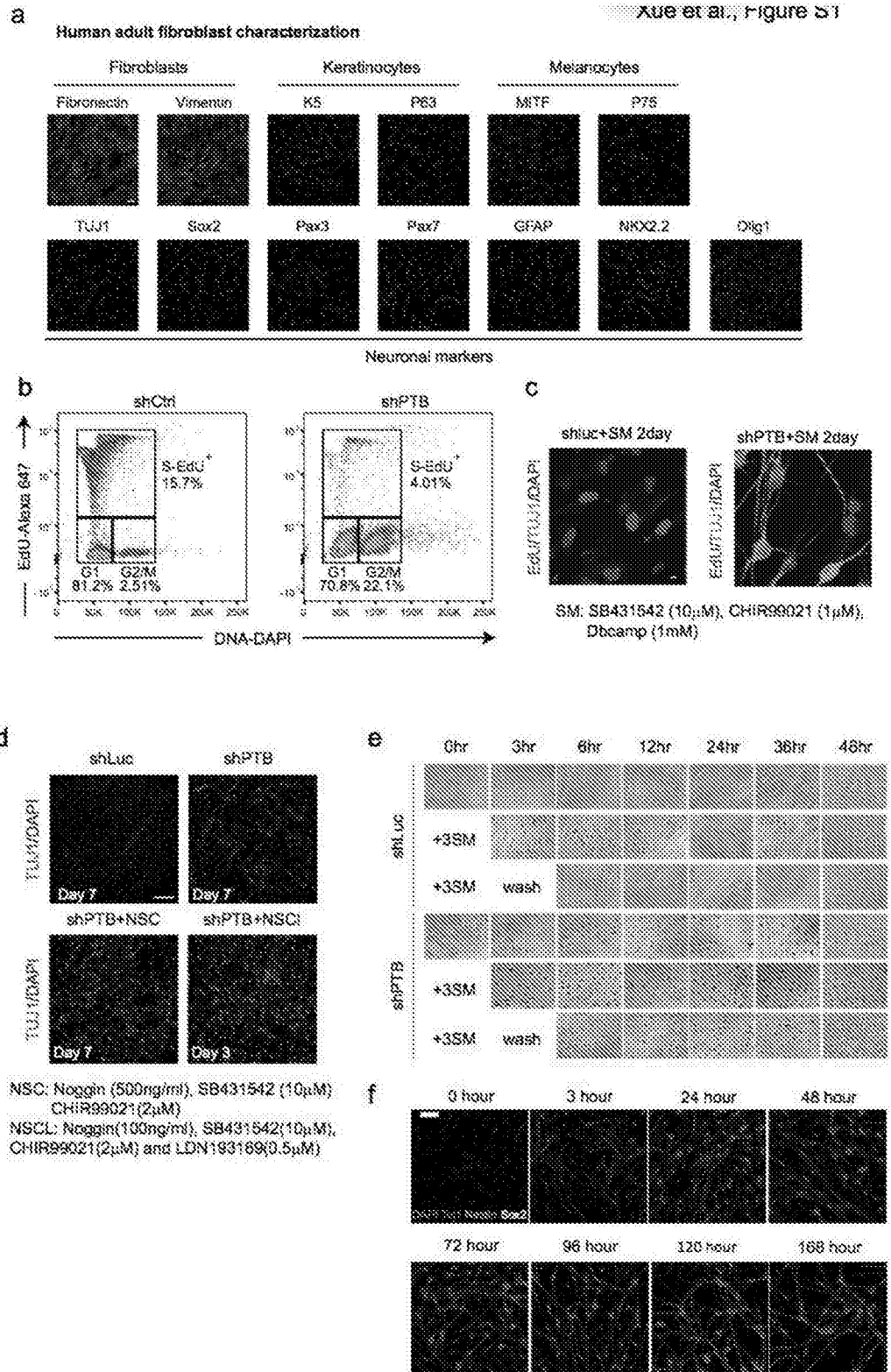


图6

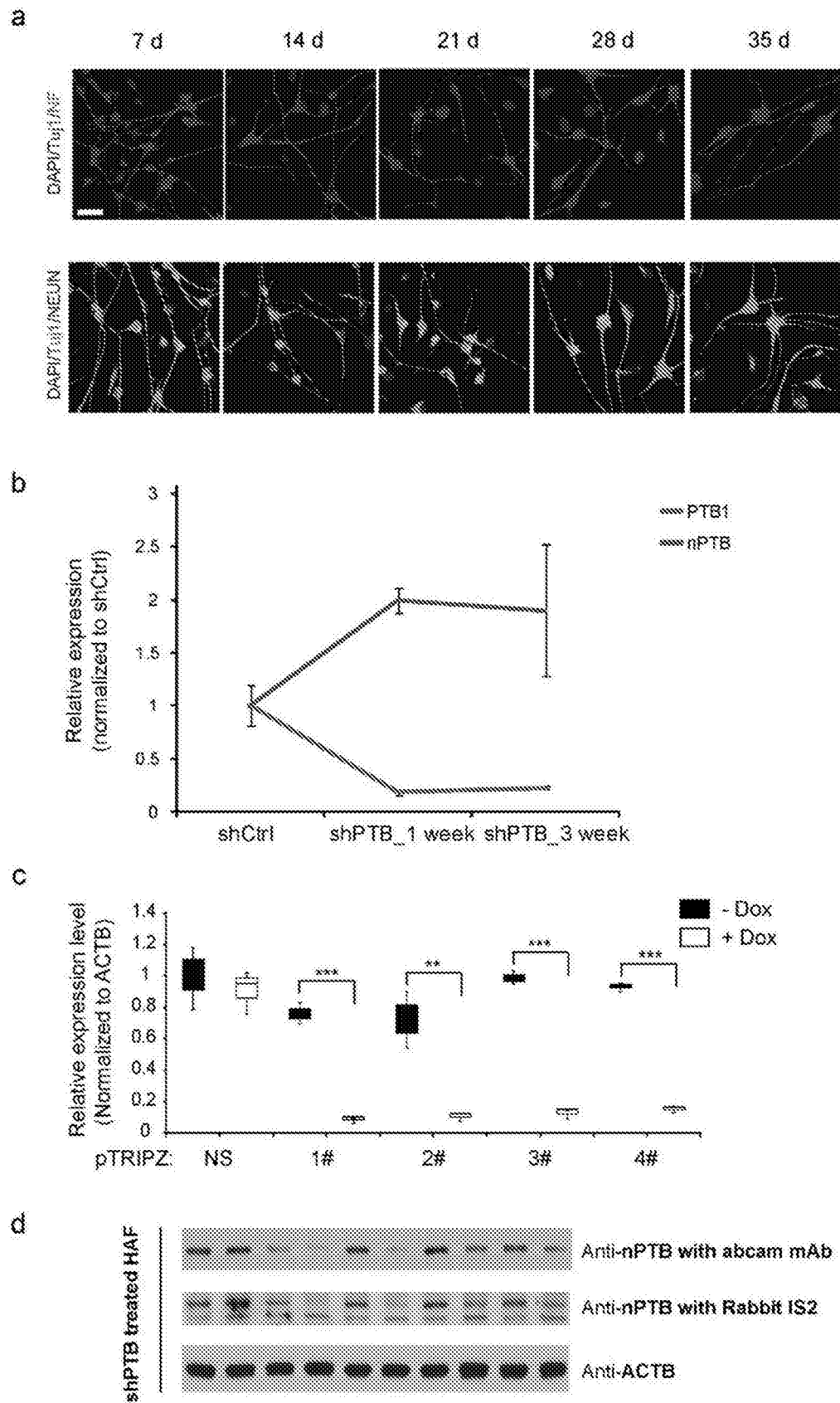


图7

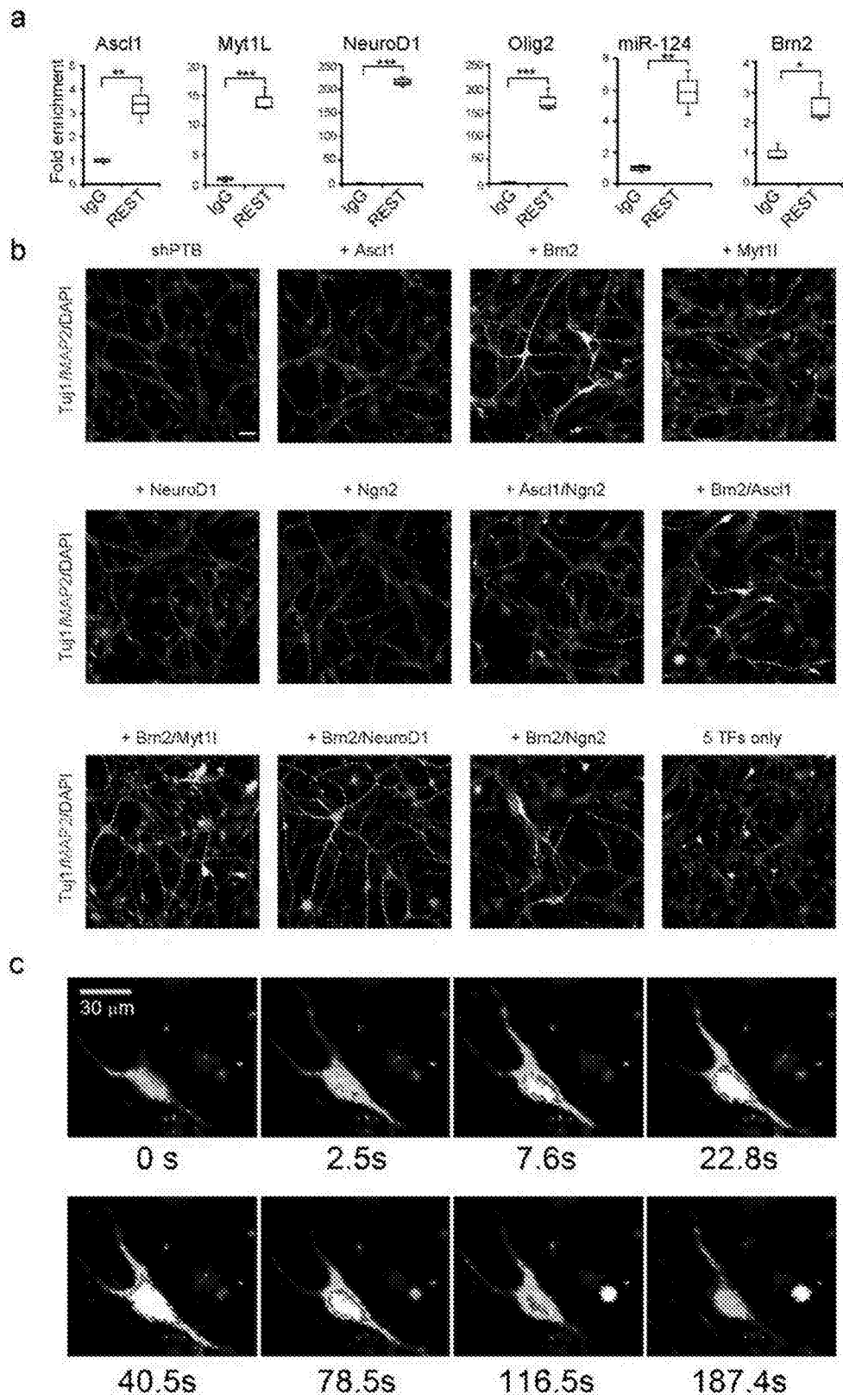


图8

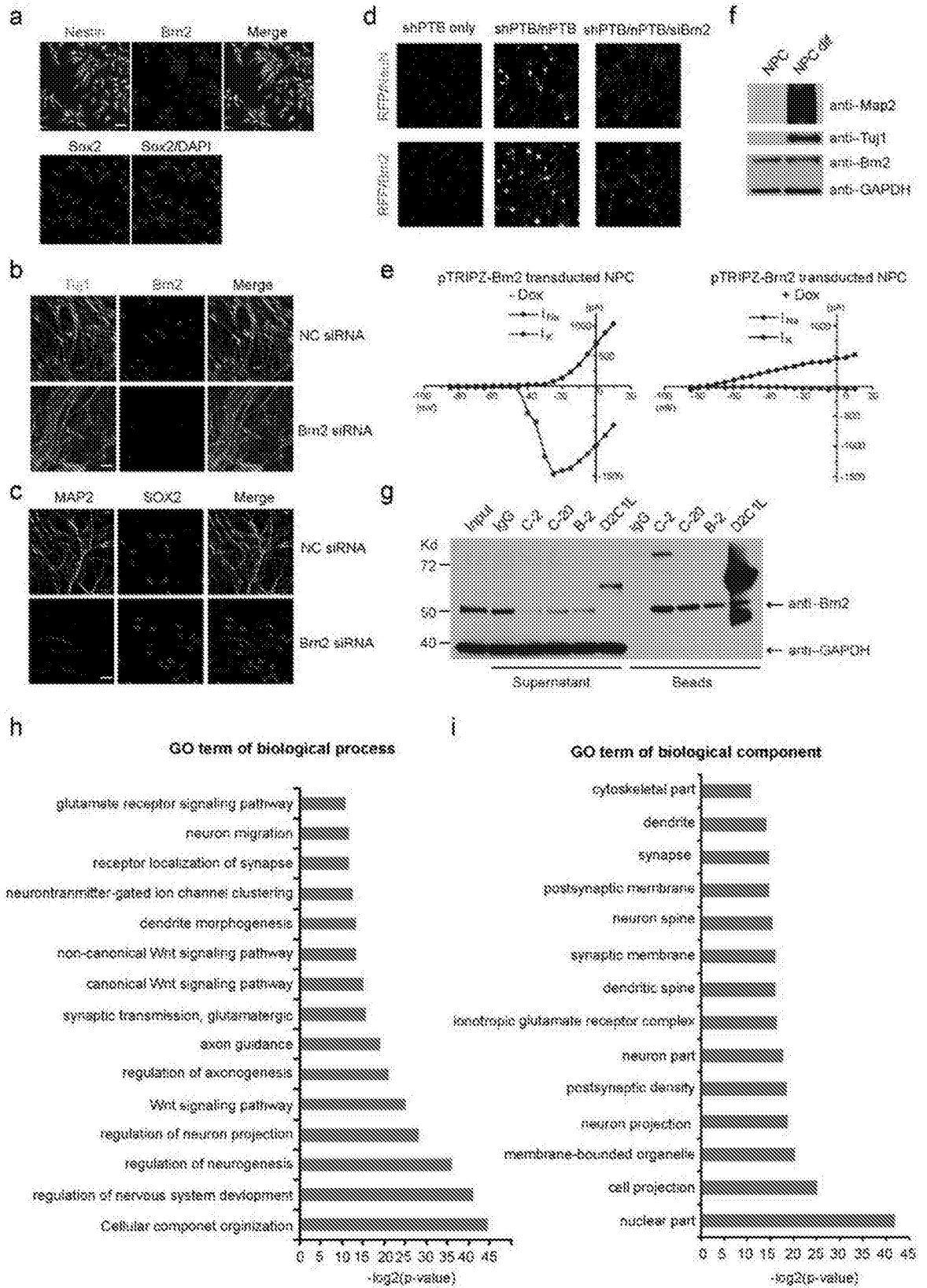


图9

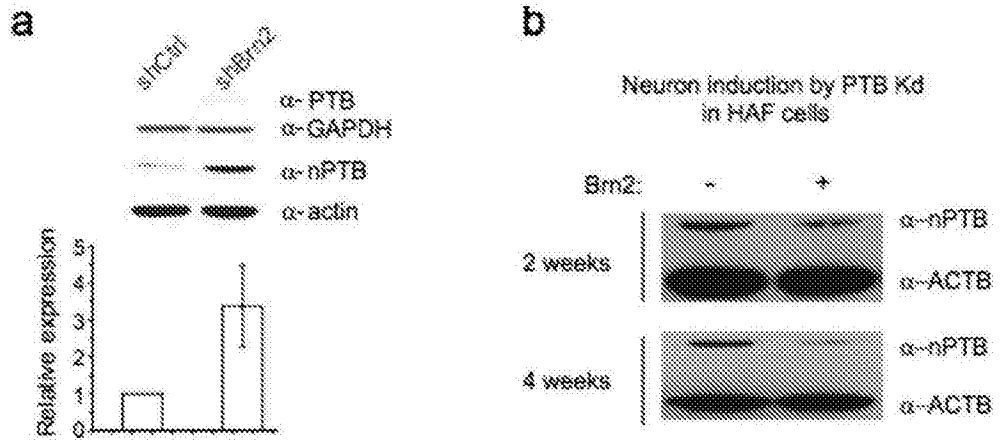


图10