直接转分化治疗神经系统疾病

技术领域

[01] 本公开内容涉及生物医药领域。更具体地，本公开内容涉及 RE1/NRSE 元件作为靶点用于将非神经元细胞转分化为神经元细胞；以及 RE1/NRSE 阻断剂在预防和/或治疗与神经元功能缺失或死亡相关的疾病中的用途。

背景技术

[02] 抑制元件 1/神经元限制性沉默元件(repressor element 1/neuron-restrictive silencer element，RE1/NRSE)是一段特定的 DNA 序列，长度约为 21bp(20-23bp 不等)，主要与 REST(RE1 沉默转录因子(RE1-silencing transcription factor)，其也称为神经元限制性沉默因子(neuron-restrictive silencer factor，NRSF))结合，调控神经元发育和成熟相关的基因表达。RE1 是神经元成熟相关的负向调节元件，最开始被发现于 NaV1.2 和 SCG10 的启动子 5'端，调控这些基因的表达。在非神经元细胞中，RE1 位点被组蛋白去乙酰化酶和甲基化酶等组成的沉默复合体结合，抑制神经元相关基因的表达。然而，在小鼠和人类中大约有 1800 多个 RE1 元件，导致其很难用现有的一些技术进行调控。比如，CRISPR 介导的基因调控和表观遗传修饰技术，具有非常高的精确性，能精确调控特定的基因表达，但很难通过这种方式对 RE1 其调控的基因进行表达调控。

[03] 帕金森病(PD)是一种与神经元功能缺失或死亡相关的疾病，其特征是中脑黑质多巴胺神经元的丧失。目前，针对帕金森病的治疗手段主要是以左旋多巴等多巴胺类似物为代表的小分子药物。近年发展起来的手术治疗也能在一定程度上改善疾病的症状，如脑深部电极刺激。但这些方法都只能部分的缓解病情，并不能阻止病情的发展，也无法减缓多巴胺神经元的死亡。而转分化治疗概念的提出，给多巴胺神经元的再生带来了希望。通过在胶质细胞中过表达一些基因，或对胶质细胞进行基因编辑，让胶质细胞转分化为多巴胺神经元，以补充缺失或死亡的多巴胺神经元。穆勒胶质细胞(Müller glia，MG)是视网膜组织中的主要神经胶质细胞。视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell，RGC)是位于视网膜最内层的神经细胞，它的树突主要与双极细胞建立突触连接，它的轴突延伸至视神经乳头处，形成视神经，延伸到大脑。视网膜神经节细胞(RGC)损伤或退行性病变是造成永久性失明的主要缘因。RGC 是视网膜中惟一的输出神经元，因此 RGC 损伤或退行性病变将导致永久性失明。重建功能性 RGC 是目前唯一可以帮助失明患者恢复视力的方法，而 RGC 细胞非常难以再生，因此，探究如何再生出 RGC 细胞将为广大 RGC 细胞死亡导致的失明患者带来重见光明的希望。

[04] 感光细胞死亡是导致眼盲的最主要病因，感光细胞分为视杆细胞和视锥细胞，感光细胞死亡原因众多，包括遗传性眼盲、后天性眼盲和老年退行性眼盲。常见的遗传性眼盲，如视网膜色素变性和先天性黑蒙，都是由于视网膜中的感光细胞死亡导致的。在视觉系统中，感光细胞是将光信号转化为神经电信号的唯一细胞，感光细胞与下游双极细胞之间建立联系，将神经电信号传递至双极细胞，双极细胞再与 RGC 或无长途细胞之间建立联系，继续向下游传递神经信号。在感光细胞死亡所导致的眼盲领域，目前没有药物可以用于治疗。随着基因治疗技术的发展，对于遗传因素导致的眼盲逐渐有药物被开发出来，但这一类药物只能用于感光细胞没有死亡的遗传性眼盲，如 Spark 公司开发的治疗 RPE65 基因功能缺失的基因治疗药物。对于感光细胞已经死亡的眼盲病人，目前没有任何药物可以治疗。在此领域，大家把希望寄托于干细胞疗法和再生疗法。

[05] 内耳螺旋神经节细胞死亡是导致神经性耳聋的最主要原因。内耳螺旋神经节细胞是位于内耳螺旋神经节，其一端与内耳毛细胞相连，另一端与中枢神经系统相连，是将听觉信号传递到中枢神经系统的唯一通道。内耳螺旋神经节细胞是一类十分特殊的神经元，其基因表达谱与普通神经元有着非常大的差异。内耳螺旋神经节细胞死亡导致的永久性耳聋，无论是遗传性或非遗传性的，目前尚无任何药物可以用于治疗。由于内耳螺旋神经节的特殊结构，干细胞移植技术，目前也尚未取得进展。而另一项被寄予厚望的技术就是原位再生技术，但由于内耳螺旋神经节细胞的特殊性，目前尚未成功诱导出内耳螺旋神经节细胞。虽然有研究，通过转基因小鼠诱导出内耳螺旋神经节细胞，但是在发育过程中产生的，而内耳螺旋神经节细胞死亡导致的耳聋，往往发生在成年人或老年人中，而在成熟内耳系统中目前还从未诱导产生出内耳螺旋神经节细胞。

[06] 在以往的研究中，科学家们在体外培养体系中，通过添加不同的培养基和小分子，同时配合多个基因和转录因子的表达，成功诱导出了多种特殊类型的神经元，但这些体外实验很难应用于体内。体内的复杂环境，导致体外筛选的多种因子，在体内并不能如体外实验中那样发挥功能，因此许多体外筛选的诱导神经元转分化的因子，在体内并不能诱导胶质细胞转分化为神经元。目前能成功在体内诱导出神经元的因子主要是 AscL1、NgN2、NeuroD1 和 PTBP1。虽然 AscL1、NgN2 和 NeuroD1 能在体内诱导产生神经元，但只能产生普通的谷氨酸能神经元，而不能诱导产生特殊功能的神经元，如：多巴胺神经元、5-羟色胺能神经元、胆碱能神经元、视网膜神经节细胞、感光细胞和耳蜗螺旋神经节细胞等。目前所报道的转分化因子中，只有 Ptbp1 能在体内诱导胶质细胞转分化出特殊类型的神经元，其类型为多巴胺神经元。虽然也有报道表明 AscL1+NeuroD1+Lmx1b+miR218 四个因子同时在胶质细胞中过表达能促进胶质细胞产生多巴胺神经元，但其效率很低，而且受限于多 AAV 共同感染，在实际药物开发中几乎不可能实现。这也表明，在体内实现特殊类型的神经元再生，是一个极具挑战性的研究，但再生特殊类型的神经元又具有十分重要的意义。这些特殊类型的神经元在人类面临的疾病中往往是最为主要的细胞类型。如前所述，这些细胞与诸多疾病相关，而目前无论是干细胞移植技术或转分化再生技术，都有待突破。因此，本领域迫切需要开发出能够再生多巴胺神经元、视网膜神经节细胞、感光细胞或其他功能性神经的方法。

发明内容

[07] 在一方面，本申请提供了一种阻断 RE1/NRSE 元件以调节非神经元细胞中神经元相关基因表达的方法，其包括降低 REST 与 RE1/NRSE 元件的结合、或者降低 REST 的量或活性。

[08] 在一些实施方式中，通过例如基因编辑、小 RNA 干扰或蛋白质加速降解的方法来降低 REST 的量。

[09] 在一些实施方式中，通过例如基因编辑、反义寡核苷酸(ASO)、小 RNA 干扰、miRNA 技术、小分子化合物、或蛋白质加速降解的方法来降低 REST 的量。

[10] 在一些实施方式中，通过基因编辑去除 REST 的抑制活性区或通过 REST 活性抑制剂来降低 REST 的活性。

[11] 在一些实施方式中，通过 REST 结合剂与 REST 结合来阻断 REST 与 RE1/NRSE 元件的结合，所述 REST 结合剂例如 REST 抗体。

[12] 在一些实施方式中，通过 RE1/NRSE 元件阻断剂与 RE1/NRSE 元件结合来阻断 REST 与

RE1/NRSE 元件的结合。

[13] 在一些实施方式中，所述 RE1/NRSE 元件阻断剂是 REST 的竞争性结合蛋白、短肽或基因编辑蛋白或其编码核酸，或核酸及核酸类似物，或者小分子 RE1/NRSE 元件阻断剂。

[14] 在一些实施方式中，所述 RE1/NRSE 元件阻断剂是 REST 变体或其编码核酸。

[15] 在一些实施方式中，所述 REST 变体是 REST 的 DNA 结合结构域，其缺失 REST 的 N 端和 C 端抑制结构域，优选地为 REST 的第 155-420 位氨基酸。

[16] 在一些实施方式中，所述 REST 的 DNA 结合结构域与激活结构域融合。

[17] 在一些实施方式中，所述激活结构域选自：表观遗传修饰蛋白或者基因激活调控元件，例如 VP64、P65-HSF1、VP16、RTA、Suntag、P300、CBP 或其组合，优选 VP64 或 P65-HSF1。

[18] 在一些实施方式中，所述 REST 变体具有 SEQ ID NO: 1, 3, 5 和 9 的氨基酸序列或 SEQ ID NO: 2, 4, 6 和 10 的核苷酸序列，或者与其具有至少 70%、60%、50%同一性百分比的序列。

[19] 在一些实施方式中，所述非神经元细胞包括例如胶质细胞、成纤维细胞、干细胞、神经前体细胞、神经干细胞，其中胶质细胞选自星形胶质细胞、少突胶质细胞、室管膜细胞、施万细胞、NG2 细胞、卫星细胞、穆勒胶质细胞、内耳神经胶质细胞或其组合，优选星形胶质细胞、穆勒胶质细胞和耳蜗神经胶质细胞。

[20] 在一些实施方式中，所述胶质细胞来源于脑、脊髓、眼或耳，其中脑部胶质细胞来源于纹状体、黑质、中脑腹侧被盖区、脊髓、下丘脑、背侧中脑或大脑皮层，优选纹状体和黑质。

[21] 在一些实施方式中，调节所述非神经元细胞中的神经元相关基因表达，以使所述非神经元细胞转分化为神经元细胞，其中所述神经元细胞为哺乳动物神经元，其中优选多巴胺神经元、GABA 神经元、5-HT 神经元、谷氨酸能神经元、ChAT 神经元、NE 神经元、运动神经元、脊髓神经元、脊髓运动神经元、脊髓感觉神经元、感光细胞(视杆细胞和视锥细胞)、双极细胞、水平细胞、无长突细胞、视网膜神经节细胞(RGC)、耳蜗神经细胞(耳蜗螺旋神经节细胞和前庭神经元)、锥体神经元、中间神经元、中型多棘神经元(MSN)、浦肯野细胞、颗粒细胞、嗅感觉神经元、球周细胞或其组合，更优选多巴胺神经元、视网膜神经节细胞、感光细胞和耳蜗螺旋神经节细胞。

[22] 在一些实施方式中，所述非神经元细胞和/或神经元细胞来自例如人、非人灵长类动物、大鼠和小鼠，优选人。

[23] 在另一方面，本申请提供了一种 RE1/NRSE 元件阻断剂用于制备用于预防和/或治疗与神经元功能缺失或死亡相关疾病的药物的用途，其中所述 RE1/NRSE 元件阻断剂降低 RE1/NRSE 内源结合因子与 RE1/NRSE 元件的结合，其中所述 RE1/NRSE 内源结合因子包括 REST 等锌指蛋白。

[24] 在一些实施方式中，所述 RE1/NRSE 元件阻断剂与 RE1/NRSE 元件结合从而阻断 RE1/NRSE 内源结合因子与 RE1/NRSE 元件的结合。

[25] 在一些实施方式中，所述 RE1/NRSE 元件阻断剂是 REST 的竞争性结合蛋白、短肽或基因编辑蛋白或其编码核酸，或核酸及核酸类似物，或者小分子 RE1/NRSE 元件阻断剂。

[26] 在一些实施方式中，所述 RE1/NRSE 元件阻断剂是 REST 变体或其编码核酸。

[27] 在一些实施方式中，所述 REST 变体是 REST 的 DNA 结合结构域，其缺失 REST 的 N 端和 C 端抑制结构域，优选地为 REST 的第 155-420 位氨基酸。

[28] 在一些实施方式中，所述 REST 的 DNA 结合结构域与激活结构域融合。

[29] 在一些实施方式中，所述激活结构域选自：表观遗传修饰蛋白或者基因激活调控元件，例如 VP64、P65-HSF1、VP16、RTA、Suntag、P300、CBP 或其组合，优选 VP64 或 P65-HSF1。

[30] 在一些实施方式中，所述 REST 变体具有 SEQ ID NO: 1, 3, 5 和 9 的氨基酸序列或 SEQ ID NO: 2, 4, 6 和 10 的核苷酸序列，或者与其具有至少 70%、60%、50%同一性百分比的序列。

[31] 在一些实施方式中，所述与神经元功能缺失或死亡相关的疾病选自：帕金森病、阿尔茨海默病、脑卒中(中风)、精神分裂症、亨廷顿舞蹈症、抑郁症、运动神经元病、肌萎缩性侧索硬化、脊髓性肌萎缩症、Pick 病、睡眠失调、癫痫、共济失调、RGC 细胞死亡导致的视力损伤、青光眼、年龄相关的 RGC 病变、视神经损伤、视网膜缺血或出血、Leber 遗传性视神经病变、损伤或退行性病变导致的感光细胞变性或死亡、黄斑变性、视网膜色素变性、糖尿病有关的失明、夜盲症、色盲、遗传性失明、先天性黑蒙症、螺旋神经节细胞死亡导致的耳聋或听觉减退，或其组合。

[32] 在另一方面，本申请提供了一种 RE1/NRSE 元件阻断剂，其为 REST 变体或其编码核酸，或人工设计的 REST 的 DNA 结合结构域类似物。

[33] 在一些实施方式中，所述 REST 变体是 REST 的 DNA 结合结构域，其缺失 REST 的 N 端和 C 端抑制结构域，优选地为 REST 的第 155-420 位氨基酸。

[34] 在一些实施方式中，所述 REST 的 DNA 结合结构域与激活结构域融合。

[35] 在一些实施方式中，所述激活结构域选自：表观遗传修饰蛋白或者基因激活调控元件，例如 VP64、P65-HSF1、VP16、RTA、Suntag、P300、CBP 或其组合，优选 VP64 或 P65-HSF1。

[36] 在一些实施方式中，所述 REST 变体具有 SEQ ID NO: 1, 3, 5 和 9 的氨基酸序列或 SEQ ID NO: 2, 4, 6 和 10 的核苷酸序列，或者与其具有至少 70%、60%、50%同一性百分比的序列。

[37] 在一些实施方式中，所述 REST 变体或 REST 的 DNA 结合结构域来自例如人、非人灵长类动物、大鼠和小鼠，优选人。

[38] 在另一方面，本申请提供了一种药物组合物或药盒或试剂盒，其包含上述阻断剂。

[39] 在一些实施方式中，所述药物组合物或药盒或试剂盒配制成用于注射、颅内给药、眼内给药、耳内给药、吸入、肠胃外施用、静脉内施用、肌内施用、皮内施用、表面施用或经口施用。

[40] 在一些实施方式中，所述药物组合物或药盒或试剂盒还包含用于递送所述 RE1/NRSE 元件阻断剂的载体或运载体，其中所述载体或运载体为病毒载体、脂质体、纳米颗粒、外泌体、类病毒颗粒，其中病毒载体包括重组腺相关病毒载体(rAAV)、腺相关病毒(AAV)载体、腺病毒载体、慢病毒载体、逆转录病毒载体、痘病毒载体、疱疹病毒、SV40 病毒载体、及其组合，其中优选 AAV 和 rAAV。

[41] 在一些实施方式中，所述药物组合物或药盒或试剂盒包含用于表达 REST 变体的表达载体，其中所述表达载体包含编码 REST 变体的核苷酸序列，其与引起其表达的启动子可操作地连接。

[42] 在一些实施方式中，所述药物组合物或药盒或试剂盒用于局部施用至以下至少一种：i)纹状体中的胶质细胞；ii)大脑黑质中的胶质细胞；iii)视网膜中的胶质细胞；iv)内耳中的胶质细胞；v)脊髓中的胶质细胞；vi)前额皮质中的胶质细胞；vii)运动皮质中的胶质细胞；viii)下丘脑中的胶质细胞；以及 ix)腹侧被盖区(VTA)中的胶质细胞。

[43] 在一些实施方式中，所述药物组合物或药盒或试剂盒还包含 i)一种或更多种多巴胺神经元相关因子，或 ii)用于穆勒胶质细胞中表达一种或更多种视网膜神经节细胞相关因子，

1)其中所述一种或更多种多巴胺神经元相关因子选自：FoxA2、Lmx1a、Lmx1b、Nurr1、Pbx1a、Pitx3、Gata2、Gata3、FGF8、BMP、En1、En2、PET1、Pax 家族蛋白(Pax3、Pax6 等)、SHH、Wnt 家族蛋白和 TGF-β 家族蛋白，或其组合；

2)其中所述一种或更多种视网膜神经节细胞相关因子包括：β-catenin、Oct4、Sox2、Klf4、Crx、aCamKII、Brn3a、Brn3b、Brn3C、Math5、Otx2、Ngn2、Ngn1、AscL1、miRNA9、miRNA-124、Nr2e3 和 Nrl 等因子。

[44] 在一些实施方式中，所述启动子是胶质细胞特异性启动子或穆勒胶质细胞(MG)细胞特异性启动子，所述胶质细胞特异性启动子选自 GFAP 启动子、ALDH1L1 启动子、EAAT1/GLAST 启动子、谷氨酰胺合成酶启动子、S100β 启动子 EAAT2/GLT-1 启动子和 Rlbp1 启动子，优选 GFAP 启动子。

[45] 在一些实施方式中，胶质细胞的转分化效率为至少 1%，或至少 10%、20%、30%、40%或 50%。

附图说明

[46] 图 1. 内源性锌指蛋白和抑制系统设计示意图。(A)REST 蛋白结构示意图，REST 蛋白包含 N-端抑制结构域和中间负责与 RE1 结合的 DNA 结合结构，以及 C-端的转录抑制结构域。RZFD-V1 代表 RZFD 的第一种设计，包含人源 REST 蛋白中间负责与 RE1 DNA 结合的 8 个锌指结构域(RZFD，REST Zinc Figure domain)。RZFD-V2 和 RZFD-V3 两种设计中，我们将 RZFD 分别融合了两种不同激活因子，分别命名为 RZFD-V2 和 RZFD-V3。RZFD-V2 由 RZFD 的 C-末端与 VP64 融合得到，RZFD-V3 由 RZFD 的 C-末端融合了一个 P65 和一个 HSF1 的转录激活结构域所组成。RZFDmax 是对 RZFD 进行了密码子优化，增加其在哺乳动物中的表达量，并同时在 RZFD 两端加上了 BPNLS 序列，增强其入核发挥功能的效率。(B)在胶质细胞中，REST 与 RE1 相结合，REST 的 C-端和 N-端分别招募一些转录抑制因子，使得 RE1 所调控的神经元相关基因不能表达。(C)我们设想在胶质细胞中表达 RZFD-V1 后，RZFD 与 RE1 竞争性结合，阻止了 REST 与 RE1 的结合，从而不能形成 REST 沉默复合体，不能抑制 RE1 所调控的基因，其中包括神经元相关基因表达。(D)RZFD-V2 通过 RZFD 结构域与 RE1 竞争性结合，阻止了 REST/NRSF 与 RE1 的结合，同时其 VP64 结构域能招募转录激活因子，增强 RE1 所调控的神经元相关基因的表达。(E)在胶质细胞向神经元转分化过程中，RZFD-V3 的 RZFD 结构域结合与 RE1 结合，阻止 REST 与 RE1 的结合，解除 REST 对 RE1 调控的基因的抑制，同时 P65-HSF1 激活结构域招募一些转录激活因子，进一步促进 RE1 所调控的神经元相关基因的表达。(F)利用 REST 的 N-端和 C-端开发抑制系统设计示意图，用 dCas9 分别与 REST 的 N-端和 C-端进行连接，dCas9-Krab 为阳性对照系统。(G 和 H)dCas9-Krab 或 dCas9-3xKrab 在 gRNA 的作用下，抑制靶基因表达示意图。(I-K)N-dCas9 或 3xN-dCas9 或 3xN-dCas9-3xC 在 gRNA 的引导下抑制靶基因表达示意图，其中 N 代表 REST 的 N-端抑制结构域，C 代表 REST 的 C-端抑制结构域。(L)用各抑制系统转染 HEK293T 细胞抑制 Ptbp1 基因表达效率，dCas9-Krab、N-dCas9 和 3xN-dCas9 抑制效率都比较低，dCas9-3xKrab 和 3xN-dCas9-3xC 抑制效率比较高。

[47] 图 2. RZFD 介导的胶质细胞向神经元转分化。(A)AAV 载体设计示意图，载体 1 为 GFAP 驱动 mCherry 表达的载体示意图，GFAP 是一种胶质细胞中特异性表达的启动子，mCherry 是一种红色荧光蛋白，应用于标记胶质细胞。载体 2 是人源 RZFD 表达载体示意图，由星形胶质细

胞特异性启动子 GFAP 来驱动 RZFD 的表达。(B)注射和取材分析示意图，将注射 AAV 当天记为第 0 天，在注射后 2 周取材分析胶质细胞转分化为神经元的结果，在注射后 1.5 个月时，分析胶质细胞转分化为神经元和多巴胺神经元的结果。(C)AAV 病毒注射和转分化示意图，在小鼠的纹状体或黑质单独注射 GFAP-mCherry，或注射 GFAP-mCherry 和 GFAP-RZFD 的混合 AAV，GFAP-mCherry 会将胶质细胞标记为红色，而 GFAP-RZFD 会将胶质细胞转分化为神经元神经元。(D)在野生型的 C57 小鼠纹状体中单独注射 GFAP-mCherry 后，将星形胶质细胞标记为红色，mCherry 通道表示 GFAP-mCherry 标记上的星形胶质细胞，DAPI 为细胞核染色，NeuN 为神经元特异性标志物，叠合图显示 GFAP-mCherry 特异性标记星形胶质细胞而不标记神经元。(E)在小鼠纹状体中注射 GFAP-mCherry 和 GFAP-RZFD 的混合 AAV 后 2 周取材分析，大部分胶质细胞已经开始变形，而且有少量 mCherry 阳性细胞已经开始表达 NeuN，但没有细胞表达 TH，其中 NeuN 为神经元特异性标志物，TH 为多巴胺神经元特异性标志物。(F)在小鼠纹状体中注射 GFAP-mCherry 和 GFAP-RZFD 的混合 AAV 后 1.5 个月后取材分析，大部分 mCherry 阳性细胞都表达神经元特异性标志物，而且有一部分细胞有多巴胺特异性标志物 TH 的表达。箭头指示的为同时表达 mCherry 和 TH 的神经元。(G)在小鼠纹状体中注射 GFAP-mCherry 和 GFAP-RZFDmax 的混合 AAV 后约 1.5 个月后取材分析，GFAP-mCherry + GFAP-RZFDmax 促进小鼠纹状体星形胶质细胞转分化为多巴胺神经元，TH 为多巴胺特异性标志物。标尺为 50 微米。(H)RZFD 与 RZFDmax 转分化产生多巴胺神经元数量统计，在对照组中没有 TH 阳性细胞，RZFDmax 转分化产生多巴胺神经元数量明显(P=0.0212)比 RZFD 组更多。

[48] 图 3. RZFD 在 6-OHDA 造模的 DAT-Cre:Ai9 小鼠中将星形胶质细胞转分化为多巴胺神经元。(A)AAV 注射示意图，GFAP-EGFP 为标记 AAV，在 GFAP 启动子启动下，特异性标记星形胶质细胞。GFAP-EGFP 与 GFAP-RZFD 混合注射到小鼠纹状体或黑质中，诱导星形胶质细胞转分化为多巴胺神经元。(B)对照组 AAV 注射后分析，绿色荧光信号为 GFAP-EGFP 特异性标记的星形胶质细胞，依然呈现典型的星形胶质细胞形态，无特异性标记多巴胺神经元的 tdTomato 信号，而且无 TH 阳性细胞，黄色箭头指向 EGFP 阳性的星形胶质细胞。(C)GFAP-EGFP 和 GFAP-RZFD 混合注射组，几乎所有绿色荧光标记细胞都已经具有神经元形态，而且在纹状体中出现 tdTomato 信号，并且 tdTomato 信号与 TH 信号共标，白色箭头指向 TH 阳性的 tdTomato 红色细胞。标尺为 50 微米。(D)对注射 GFAP-EGFP 的对照组和注射了 GFAP-EGFP + GFAP-RZFD 治疗组的小鼠进行转棒实验测试，每组大于 8 只小鼠。(E)圆桶实验测试，统计身体同侧前爪触壁次数，每组大于 8 只小鼠。(F 和 G)药物诱导的旋转行为测试，统计每分钟转圈次数，并统计同侧转圈比例，每组大于 8 只小鼠。

[49] 图 4. RZFD-VP64 或 RZFD-P65-HSF1 介导的胶质细胞向神经元转分化。(A)GFAP-RZFD-V2 和 GFAP-RZFD-V3 表达载体设计示意图。RZFD-V2 是 RZFD 与 VP64 的融合蛋白，由胶质细胞特异性启动子 GFAP 驱动表达，RZFD-V3 由 RZFD 和 P65-HSF1 激活结构域所组成。(B)GFAP-RZFD-V2 与 GFAP-mCherry 混合 AAV 注射小鼠纹状体或黑质示意图，注射后 1.5 个月取材分析。(C)GFAP-RZFD-V2 在纹状体中将胶质细胞转分化为神经元或多巴胺神经元代表图，mCherry 为 GFAP-mCherry 所标记上的细胞，TH 是多巴胺神经元特异性标志物，NeuN 是神经元特异性标志物。箭头指示的为同时表达 mCherry 和 TH 的神经元。(D) 在 DAT-Cre：Ai9 小鼠中注射 GFAP-RZFD-V3 示意图，GFAP-RZFD-V3 注射到 DAT-Cre：Ai9 小鼠的纹状体或黑质，1.5 个月后取材分析， Dat-Cre 是在 Dat 内源性启动子后面插入了 Cre，Ai9 是

Rosa26-CAG-LSL-tdTomato-WPRE 小鼠，DAT-Cre：Ai9 小鼠大脑中只有成熟多巴胺神经元才能被 tdTomato 红色荧光信号标记上。(E)在在纹状体中注射 GFAP-RZFD-V3 后 1.5 个月取材分析结果代表图，红色荧光信号(tdTomato)代表转化而来的成熟多巴胺神经元，绿色信号为多巴胺神经元特异性标志物 TH 染色，白色信号为神经元特异性标志物 NeuN 染色，Merge 图显示 tdTomato 红色信号与 TH 染色绿色信号重合，箭头指示的为同时表达 tdTomato 和 TH 的神经元。标尺为 50 微米。

[50] 图 5. **在视网膜中过表达 GFAP-RZFD 将穆勒胶质细胞转分化为感光细胞或视网膜神经节细胞。**(A)过表达 GFAP-RZFD 将穆勒胶质细胞转分化为感光细胞或视网膜神经节细胞实验流程示意图，其中载体 1 为 GFAP-EGFP-2A-Cre，注射到 Ai9 小鼠视网膜中，可用于特异性标记小鼠的穆勒胶质细胞，标记的细胞会被 tdTomato 标记。(B)对照组病毒 GFAP-EGFP-2A-Cre 注射后 Ai9 小鼠视网膜后，红色荧光信号特异性表达于穆勒胶质细胞。(C)在注射了 GFAP-RZFD + GFAP-EGFP-2A-Cre 组，白色箭头指向转分化的感光细胞。标尺为 50 微米。(D)注射了 GFAP-EGFP-2A-Cre 对照组病毒小鼠的视神经，在视神经中未观察到 tdTomato 标记的轴突。(E)在注射了 GFAP-RZFD + GFAP-EGFP-2A-Cre 组的小鼠的视神经，在视神经中观测到大量的 tdTomato 标记的轴突。(F)在 NMDA 造模的 Ai9 小鼠视网膜下注射对照组病毒 GFAP-EGFP-2A-Cre 注射后红色荧光信号特异性表达于穆勒胶质细，不与 RGC 特异性蛋白标志物 Rbpms 共标，黄色箭头指向 Rbpms 阳性的 RGC。(G)在注射 GFAP-RZFD 组 AAV 的视网膜中，发现部分 tdTomato 阳性细胞位于视网膜神经节细胞层，并且与 RGC 特异性蛋白标志物 Rbpms 共标，白色箭头指向 tdTomato 和 Rbpms 双阳的细胞。(H)感光细胞特异性蛋白标志物 Rhodopsin 染色，在注射 GFAP-RZFD 组视网膜外颗粒层发现部分 tdTomato 阳性细胞与 Rhodopsin 共标，白色箭头指向共标的细胞。(I)视锥细胞特异性蛋白标志物 Cone Arrestin(mCAR)染色，注射 GFAP-RZFD 组视网膜外颗粒层有少量 tdTomato 阳性细胞与 mCAR 共标，白色箭头指向共标的细胞。标尺为 50 微米。(J)对照组和测试组 tdTomato 阳性的感光细胞数量统计，对照组几乎没有 tdTomato 标记的感光细胞，GFAP-RZFD 过表达组则观测到有转分化而来的 tdTomato 阳性感光细胞，每组大于 3 只小鼠。(K)注射 GFAP-EGFP-2A-Cre 对照组 AAV 和 GFAP-RZFD + GFAP-EGFP-2A-Cre 组 AAV 的小鼠视神经中 tdTomato 阳性轴突数量，每组大于 3 只小鼠。

[51] **图 6.过表达 miRNA 可以将小鼠星形胶质细胞转分化为神经元但不能产生多巴胺神经元。**(A)通过过表达 miRNA 实现星形胶质细胞到神经元转换的示意图。载体 1 为 AAV-GFAP-mCherry，载体 2(AAV-GFAP-miRNA)由 GFAP 驱动 miRNA 过表达。载体 1 单独注射为对照组，载体 1+2 混合注射为实验组。(B)对应图 A 的载体 2。由 GFAP 启动子分别驱动表达 miR-124(包含 miR-124-5p 和 miR-124-3p)，miR-9(包含 miR-9-5p 和 miR-9-3p)或 miR-9-miR-124 的 AAV 表达载体示意图。(C)在小鼠纹状体中注射 GFAP-mCherry，mCherry 特异性表达于胶质细胞，并且在纹状体中无 TH 阳性细胞。(D)在小鼠纹状体中注射实验组 AAV 病毒(GFAP-mCherry + GFAP-miR-124)，白色箭头指向被标记的细胞，叠合图显示红色荧光与 NeuN 不重叠，标尺为 50 微米。(E)在小鼠纹状体中注射 GFAP-mCherry + GFAP-miR-9+miR-124，白色箭头指向被标记的细胞，叠合图显示红色荧光与 NeuN 重叠，标尺为 50 微米。(F)在小鼠纹状体中注射 GFAP-mCherry + GFAP-miR-9+miR-124，TH 为多巴胺神经元特异性标志物，白色箭头指向被标记的细胞，叠合图显示红色荧光与 TH 信号不重叠，标尺为 50 微米。

[52] **图 7.CasRx 可以在体外敲低 Ctdsp1 的 mRNA 表达。**体外人 293T 和小鼠 N2A 细胞系中表达 CasRx 和一个靶向 Ctdsp1 mRNA 的 gRNA 可以实现 Ctdsp1 的 mRNA 敲低。Ctdsp1 全称为 Carboxy-terminal domain RNA polymerase II polypeptide A small phosphatase 1(Ctdsp1)。

[53] **图 8.敲低 Ctdsp1 可以将小鼠星形胶质细胞转分化为神经元但不能产生多巴胺神经元。**(A)通过基因敲低实现星形胶质细胞到神经元转换的示意图。载体 1(AAV-GFAP-mCherry)由星形胶质细胞特异性启动子 GFAP 驱动荧光蛋白 mCherry 表达，载体 2(AAV-GFAP-CasRx)由 GFAP 驱动 RNA 编辑蛋白 CasRx 表达。载体 3(AAV-GFAP-CasRx-Ctdsp1)编码 CasRx 和一个靶向 Ctdsp1 的 gRNA。向 C57BL/6 小鼠纹状体或者黑质中注射 AAV-GFAP-CasRx-Ctdsp1 或不含 gRNA 的对照载体 AAV-GFAP-CasRx 以及 AAV-GFAP-mCherry。AAV-GFAP-mCherry 共注射用来特异性的标记星形胶质细胞或者由星形胶质细胞转化来的神经元。注射后 1～2 个月后检查转化的发生。载体 1+2 为对照组，载体 1+3 为测试组。(B)在小鼠纹状体中注射对照组 AAV(GFAP-mCherry + GFAP-CasRx)，橙色箭头指向被标记的星形胶质细胞，NeuN 为神经元特异性标志物，叠合图显示红色荧光与 NeuN 不重叠，标尺为 50 微米。(C)在小鼠纹状体中注射实验组 AAV 病毒(GFAP-mCherry + GFAP-CasRx-Ctdsp1)后胶质细胞向神经元转分化结果，白色箭头指向红色荧光信号与 NeuN 共标的细胞，标尺为 50 微米。

[54] **图 9.敲低 Ctdsp1 或过表达 miRNA 不能产生视网膜神经节细胞、感光细胞或耳蜗螺旋神经节细胞。**(A)载体设计示意图，载体 1(GFAP-EGFP-2A-Cre)由星形胶质细胞特异性启动子 GFAP 驱动 Cre 特异性表达于穆勒胶质细胞，载体 2(GFAP-CasRx)由 GFAP 驱动 RNA 编辑蛋白 CasRx 表达。载体 3(GFAP-CasRx-Ctdsp1)编码 CasRx 和一个靶向 Ctdsp1 的 gRNA。(B)向小鼠视网膜中注射 GFAP-CasRx-Ctdsp1+ GFAP-EGFP-2A-Cre 或对照病毒 GFAP-CasRx + GFAP-EGFP-2A-Cre。GFAP-EGFP-2A-Cre 共注射用来特异性穆勒胶质细胞。载体 1+2 为对照组，载体 1+3 为测试组。(C)在视网膜中过表达 miRNA 示意图。载体 1 为 GFAP-EGFP-2A-Cre，载体 2(GFAP-miRNA)由 GFAP 驱动 miRNA 过表达。载体 1 单独注射为对照组，载体 1+2 混合注射为实验组。(D) 对应图 C 的载体 2。由 GFAP 启动子分别驱动表达 miR-124，miR-9 或 miR-9-miR-124 的 AAV 表达载体示意图。

具体实施方式

[55] 本申请提供了与 RE1/NRSE 调控相关的组合物、基于内源的 RE1/NRSE 结合蛋白 REST 的不同结构域进行改造的生物活性分子及其应用。特别地，本申请涉及对内源的 RE1 结合蛋白 REST 进行改造，以利用 REST 蛋白中的不同区域对基因表达调控的功能。

[56] 抑制元件 1/神经元限制性沉默元件(repressor element 1/neuron-restrictive silencer element，RE1/NRSE)是一段特定的 DNA 序列，长度约为 21bp(20-23bp 不等)，存在于许多神经相关基因的启动子区域。在本申请中，RE1/NRSE 与 RE1 可互换使用。RE1 是神经元成熟相关的负向调节元件，最开始被发现于 NaV1.2 和 SCG10 的启动子 5'端，调控这些基因的表达。在非神经元细胞中，RE1 位点被组蛋白去乙酰化酶和甲基化酶等组成的沉默复合体结合，抑制神经元相关基因的表达。在小鼠和人类中大约有 1800 多个 RE1 元件。

[57] RE1 主要与 REST(RE1 沉默转录因子(RE1-silencing transcription factor))结合，调控神经元发育和成熟相关的基因表达。REST，也称为神经元限制性沉默因子(neuron-restrictive silencer factor，NRSF)，是一种内源性结合 RE1 的蛋白。人源的 REST 蛋白全长序列请参见 SEQ ID NO：

20 所示。

[58] 通过结构域预测和蛋白结构建模，本申请的发明人发现，人源 REST 蛋白第 159-412 中包含 8 个锌指蛋白结构域(Zinc Finger Domain，ZFD)(图 1A)，在其 N-端 1-83 位为其 N-端抑制区域，主要与 Sin3a 和 Sin3b 等蛋白结合，第 1008-1097 位为其 C-端的抑制结构域和一个锌指结构域，主要 RCOR1 等蛋白结合。中间的 84-158 位和 413-1007 位没有明显的蛋白结构域，其功能尚不明确，可能参与调节 REST 与 RE1 的结合。REST 蛋白中的锌指结构域可能与其结合于 RE1 相关，进而允许 REST 蛋白中的转录抑制结构域(被认为存在于 REST 蛋白的 N 端或 C 端)对 RE1 进行转录调控，由此抑制 RE1 靶基因的表达。之前的研究表明，删除 REST 蛋白的 1-83 和 1008-1097 位不影响 REST 与 RE1 的结合，但不能发挥正常功能。

[59] 一方面，本申请提供了通过调控 RE1 以在个体体内将非神经元细胞转分化为功能性神经元细胞的方法。在某些实施方式中，通过在体内感兴趣的部位(例如受疾病影响的部位)阻断 REST 与 RE1/NRSE 元件的结合，可以在感兴趣的部位实现非神经元细胞转分化为功能性神经元。

[60] 虽然之前的研究表明 RE1 存在于许多神经相关基因的启动子区域，但是否可以通过调节 RE1 来实现胶质细胞向神经元转分化仍然未知。在本研究中，通过对内源性 RE1 结合蛋白进行基因工程改造，利用能与 RE1 结合的内源性蛋白 REST 的锌指结构域(Zinc Finger Domain，ZFD)来调控 RE1，实现对其相关基因的表达调控。在之前的研究中，在体外培养的细胞中通过过表达 REST 的锌指结构域或敲低 REST 表达，将成纤维细胞转分化为 Tuj-1 和 Map2 阳性神经元，但并不是成熟的神经元。而且这些研究是在体外培养的细胞中开展的，体外研究体系实现的功能大部分很难在更为复杂的体内实现。而且，之前的研究中只是转分化获得普通神经元，而不能获得特殊类型的神经元，如多巴胺神经元，5-羟色胺神经元，视网膜神经节细胞和感光细胞等。因此，在体内探索调控 RE1 是否能将胶质细胞转分化为特殊类神经元具有十分重要的科学意义。

[61] 另一方面，本申请的发明人发现，REST 蛋白的 N-端和 C-端能够招募多种表观遗传调控元件，进而负向调控其作用的基因。当将 DNA 结合蛋白与 REST 蛋白的 N-端和/或 C-端组合或融合时，可以实现在 DNA 结合蛋白所结合的目标基因区域进行负向调控。

[62] 转分化的方法

[63] 在一方面，本申请提供了一种在个体体内将非神经元细胞转分化为功能性神经元的方法。

[64] 在另一方面，本申请提供了一种在有需要的个体体内预防和/或治疗与神经元功能缺失或死亡相关疾病的方法，所述方法包括将受所述疾病影响部位的非神经元细胞转分化为功能性神经元。

[65] i) 功能性神经元

[66] 在本申请中，术语“功能性神经元”是指能够具有特定功能的的神经元细胞，例如多巴胺神经元、视网膜神经节细胞、感光细胞等具有特定功能的神经元。。在一些实施方式中，功能性神经元具有至少一种神经元的形态特征，例如具有突触，例如轴突。在一些实施方式中，功能性神经元表达至少一种成熟神经元的标志物，例如 NeuN 基因表达产物。在一些实施方式中，功能性神经元具有电生理特性。

[67] 功能性神经元可以有不同的功能。在一些实施方式中，所述功能性神经元包括多巴胺神经元、视网膜神经节细胞、感光细胞和耳蜗螺旋神经节细胞、GABA 神经元、5-HT 神经元、谷氨

酸能神经元、ChAT 神经元、NE 神经元、运动神经元、脊髓神经元、脊髓运动神经元、脊髓感觉神经元、双极细胞、水平细胞、无长突细胞、锥体神经元、中间神经元、中型多棘神经元(MSN)、浦肯野细胞、颗粒细胞、嗅感觉神经元、球周细胞或其任意组合。

[68] 在一些实施方式中，所述功能性神经元表达 NeuN 基因。NeuN 基因是一种已知的成熟神经元的特异性标记物。在非神经元细胞中检测到 NeuN 基因表达产物(例如 NeuN 蛋白)，则提示非神经元细胞转分化为功能性神经元。

[69] 在一些实施方式中，所述功能性神经元具有轴突。神经元的轴突可以通过显微镜进行观察。

[70] 在一些实施方式中，所述功能性神经元包括多巴胺神经元、视网膜神经节细胞、感光细胞或耳蜗螺旋神经节细胞。

[71] 在一些实施方式中，所述功能性神经元包括多巴胺神经元。在本申请中，多巴胺神经元与多巴胺能神经元可互换使用。多巴胺能神经元(dopaminergic neuron)是含有并释放多巴胺(dopamine，DA)作为神经递质的神经元。多巴胺能神经元是中枢神经系统中主要的多巴胺来源。多巴胺属于儿茶酚胺类神经递质，能够影响情绪和奖励等神经功能，在中枢神经系统中发挥重要的生物学作用。大脑内的多巴胺能神经元主要集中在中脑的黑质致密区(substantria nigra pars compacta, SNc)、腹侧被盖区(ventral tegmental area, VTA)、下丘脑和脑室周围。很多实验证实多巴胺能神经元与人体的多种疾病密切相关，最典型的就是帕金森病。多巴胺能神经元逐渐丧失会引发许多与帕金森症有关的运动症状。

[72] 在一些实施方式中，所述多巴胺神经元表达一种或多种选自下组的标志物：酪氨酸羟化酶(TH)、FoxA2、Nurr1、Pitx3、Vmat2 和 DAT。“标志物”在本申请中可以指基因的表达产物，例如 mRNA 或蛋白。在功能性神经元细胞中检测到一种或多种这些标志物的表达，则提示该功能性神经元细胞是多巴胺神经元。这些标志物的示例性的基因序列和蛋白序列都是本领域公知的，通过公共数据库可以查询(例如美国国立卫生院下的生物信息国家中心(NCBI)的基因数据库和蛋白数据库)，在本申请中列举在表 A 中。酪氨酸羟化酶(TH)是负责催化氨基酸 L-酪氨酸转变为二羟基苯丙氨酸(多巴)的酶，是多巴胺能神经元中参与多巴胺合成代谢的酶。多巴胺神经元的其他标志物还包括 FoxA2、Nurr1、Vmat2 和 DAT 等。在一些实施方式中，所述多巴胺神经元表达 NeuN，TH，和 DAT。

[73] 在一些实施方式中，所述功能性神经元包括视网膜神经节细胞。视网膜神经节细胞是一种位于视网膜内表面(神经节细胞层)附近的神经元，其通过两种中间神经元(双极细胞和无长突细胞)从光感受器接收视觉信息。它的树突主要与双极细胞建立突触连接，它的轴突延伸至视神经乳头处，形成视神经，延伸到大脑。

[74] 在一些实施方式中，所述视网膜神经节细胞(RGC)表达一种或多种选自下组的标志物：RBPMS、Pax6、Brn3a、Brn3b、Brn3c、和 Map2。RBPMS 是 RGC 的特异性标志物。在功能性神经元细胞中检测到 RBPMS 的表达，则提示该功能性神经元细胞是 RGC。RBPMS 的示例性的基因序列和蛋白序列是本领域公知的，通过公共数据库可以查询，在本申请中列举在表 A 中。在一些实施方式中，所述视网膜神经节细胞(RGC)表达 NeuN 和 RBPMS。

[75] 在一些实施方式中，所述功能性神经元包括感光细胞。感光细胞是一种在视网膜中发现的特殊的神经上皮细胞，具有感受光线且进行光转导功能的功能。其能经双极细胞和神经节细胞的处理，将光信号转换成电信号并传递给大脑。感光细胞包括视杆细胞和视锥细胞。

[76] 在一些实施方式中，所述感光细胞表达一种或多种选自下组的标志物：Rhodopsin、mCAR、

m-opsin 和 S-opsin。 Rhodopsin、mCAR、m-opsin 和 S-opsin 都是 RGC 的特异性标志物。在功能性神经元细胞中检测到 Rhodopsin、mCAR、m-opsi 和/或 S-opsin 的表达，则提示功能性该神经元细胞是感光细胞。Rhodopsin、mCAR、m-opsi 和 S-opsin 的示例性的基因序列和蛋白序列是本领域公知的，通过公共数据库可以查询，在本申请中列举在表 A 中。在一些实施方式中，所述感光细胞表达 NeuN、Rhodopsin 和/或 mCAR。

[77] 在一些实施方式中，所述功能性神经元包括耳蜗螺旋神经节细胞。耳蜗螺旋神经节细胞是一种双极神经节细胞，是听觉传导通路的第一级神经元，其周围突与毛细胞相连，中枢突参与组成听神经。螺旋神经节细胞在声音信号的传递与编码方面具有重要作用。

[78] 在一些实施方式中，所述耳蜗螺旋神经节细胞表达一种或多种选自下组的标志物 NeuN，Prox1，Tuj-1，和 Map2。在功能性神经元细胞中检测到 Prox1 和 Map2 的表达，则提示该功能性神经元细胞是耳蜗螺旋神经节细胞。Prox1、Tuj-1、Map2 的示例性的基因序列和蛋白序列是本领域公知的，通过公共数据库可以查询，在本申请中列举在表 A 中。在一些实施方式中，所述耳蜗螺旋神经节细胞表达 NeuN、Prox1，Tuj-1、和 Map2。

[79] 表 A 功能性神经元的标志物

	基因登录号 GeneID (鼠)	蛋白序列登录号 NCBI 参考号(鼠)	基因登录号 GeneID (人)	蛋白序列登录号 NCBI 参考号(人)
NeuN	52897	NP_001034256.1	146713	NP_001337382.1
TH	21823	NP_033403.1	7054	NP_954986.2
FOXA2	15376	NP_001277994.1	3170	NP_068556.2
NURR1	18227	NP_038641.1	4929	NP_006177.1
Pitx3	18742	NP_032878.1	5309	NP_005020.1
VMAT2	214084	NP_766111.1	6571	NP_003045.2
DAT	13162	NP_034150.1	6531	NP_001035.1
RBPMS	19663	NP_001036139.1	11030	NP_001008710.1
Pax6	18508	NP_001231127.1	5080	NP_000271.1
Brn3a	18996	NP_035273.3	5457	NP_006228.3
Brn3b	18997	NP_620394.2	5458	NP_004566.2
Brn3c	18998	NP_620395.2	5459	NP_002691.1
Rhodopsin	212541	NP_663358.1	6010	NP_000530.1
MCAR	170735	NP_573468.1	407	NP_004303.2
m-opsin	14539	NP_032132.1	2652	NP_000504.1
S-opsin	12057	NP_031564.1	611	NP_001372054.1
PROX1	19130	NP_032963.1	5629	NP_001257545.1
TUJ1	22152	NP_075768.1	10381	NP_006077.2
MAP2	17756	NP_001035023.1	4133	NP_001362434.1

[80] **ii) 非神经元细胞**

[81] 在一些实施方式中，所述非神经元细胞包括胶质细胞(例如神经胶质细胞)、成纤维细胞、干细胞、神经前体细胞、或神经干细胞。在一些实施方式中，所述非神经元细胞包括胶质细胞(例如神经胶质细胞)。

[82] 在一些实施方式中，所述胶质细胞选自星形胶质细胞、少突胶质细胞、室管膜细胞、施万细胞、NG2 细胞、卫星细胞、穆勒胶质细胞、内耳神经胶质细胞和其任意组合。穆勒胶质细胞(Müller glia，MG)是视网膜组织中的主要神经胶质细胞。

[83] 在一些实施方式中，所述胶质细胞位于脑、脊髓、眼或耳。在一些实施方式中，所述胶质

细胞位于脑的纹状体、黑质、中脑腹侧被盖区、延髓、下丘脑、背侧中脑或大脑皮层。

[84] 在一些实施方式中，所述活性物质被局部施用至所述个体体内的以下一个或多个部位的胶质细胞：1)纹状体中的胶质细胞；ii)大脑黑质中的胶质细胞；iii)视网膜中的胶质细胞；iv)内耳中的胶质细胞；v)脊髓中的胶质细胞；vi)前额皮质中的胶质细胞；vii)运动皮质中的胶质细胞；viii)下丘脑中的胶质细胞；以及 ix)腹侧被盖区(VTA)中的胶质细胞。

[85] 不希望受任何理论的束缚，但认为胶质细胞在体内所处的微环境有助于促进由本申请所述的活性物质诱导的转分化作用，促进所述胶质细胞在体内转分化为功能性神经元细胞。

[86] 在一些实施方式中，所述胶质细胞选自星形胶质细胞、穆勒胶质细胞和耳蜗神经胶质细胞。

[87] 在一些实施方式中，所述胶质细胞包括星形胶质细胞，且所述功能性神经元包括多巴胺神经元细胞。在一些实施方式中，本申请提供的方法涉及在个体体内将星形胶质细胞转分化为多巴胺神经元细胞的方法。在一些实施方式中，所述星形胶质细胞位于纹状体和/或黑质。在一些实施方式中，所述方法包括向所述个体的纹状体和/或黑质施用本申请提供的活性物质。

[88] 在一些实施方式中，所述胶质细胞包括穆勒胶质细胞，且所述功能性神经元细胞包括视网膜神经节细胞(RGC)和/或感光细胞。在一些实施方式中，本申请提供的方法涉及在个体体内将穆勒胶质细胞转分化为视网膜神经节细胞(RGC)和/或感光细胞的方法。在一些实施方式中，所述穆勒胶质细胞位于视网膜下或玻璃体腔。在一些实施方式中，所述方法包括向所述个体的视网膜下或玻璃体腔施用本申请提供的活性物质。

[89] 在一些实施方式中，所述胶质细胞包括耳蜗神经胶质细胞，且所述功能性神经元细胞包括耳蜗螺旋神经节细胞。在一些实施方式中，本申请提供的方法涉及在个体体内将耳蜗神经胶质细胞转分化为耳蜗螺旋神经节细胞的方法。在一些实施方式中，所述耳蜗神经胶质细胞位于内耳。在一些实施方式中，所述方法包括向所述个体的内耳施用本申请提供的活性物质。

[90] 在一些实施方式中，所述活性物质施用后达到的所述胶质细胞转分化为功能性神经元的转分化效率为至少 1%，或至少 10%、20%、30%、40%或 50%。转分化效率可以通过本领域人员公知的方法进行检测和计算。例如，利用荧光蛋白对转分化的起始细胞(如胶质细胞)进行标记，如 GFAP-mCherry、GFAP-tdTomato、GFAP-EGFP 等，也可以使用例如 Ai9 转基因小鼠，其中的胶质细胞具有荧光标记。由于转分化后的细胞也携带荧光，通过计算转分化获得的细胞数量占起始标记细胞数量的百分比，可以计算得到转分化效率。或者，也可以计算转分化产生的细胞数量占施用部位处此类型细胞数量的百分比，由此得到转分化效率，例如在黑质中，新产生的多巴胺神经元占黑质中多巴胺神经元的百分比。

[91] **iii)活性物质**

[92] 在一些实施方式中，本申请提供的在个体体内将非神经元细胞转分化为功能性神经元的方法，包括向所述个体施用能够降低 REST 与 RE1/NRSE 元件的结合、或者降低 REST 的量或活性的活性物质。

[93] 在另一些实施方式中，本申请提供的在有需要的个体体内预防和/或治疗与神经元功能缺失或死亡相关疾病的方法，包括向所述个体中受所述疾病影响的部位施用治疗有效剂量的能够降低 REST 与 RE1/NRSE 元件的结合、或者降低 REST 的量或活性的活性物质，以将受所述疾病影响部位的非神经元细胞转分化为功能性神经元。

[94] 在一些实施方式中，所述活性物质能够降低 REST 的量或活性。任何可以降低 REST 的量或活性的活性物质都可以使用。在一些实施方式中，通过例如基因编辑、小 RNA 干扰或蛋白质

加速降解的方法来降低 REST 的量。在一些实施方式中，通过例如基因编辑、反义寡核苷酸(Antisense Oligonucleotide，ASO)、小 RNA 干扰、miRNA 技术、小分子化合物、或蛋白质加速降解的方法来降低 REST 的量。在一些实施方式中，通过基因编辑去除 REST 的抑制活性区或通过 REST 活性抑制剂来降低 REST 的活性。

[95] 在一些实施方式中，所述活性物质能够降低 REST 与 RE1/NRSE 元件的结合。在一些实施方式中，通过 REST 结合剂与 REST 结合来阻断 REST 与 RE1/NRSE 元件的结合，所述 REST 结合剂例如 REST 抗体。

[96] 在一些实施方式中，所述活性物质包括 RE1/NRSE 元件阻断剂，其能够与 RE1/NRSE 元件结合来阻断 REST 与 RE1/NRSE 元件的结合。

[97] 在一些实施方式中，所述 RE1/NRSE 元件阻断剂包含与 REST 竞争结合 RE1 的小分子化合物、核酸、或核酸类似物。

[98] 在一些实施方式中，所述 RE1/NRSE 元件阻断剂包含与 REST 竞争结合 RE1 的蛋白或编码所述蛋白的核酸。

[99] 在一些实施方式中，所述与 REST 竞争结合 RE1 的蛋白包含 REST 变体。“变体”在本申请中是指，具有与亲本序列相比一个或多个氨基酸残基的取代(包含但不限于保守取代)、添加、缺失、插入或截短或其任何组合的衍生序列。在某些实施方式中，REST 变体可以包含 REST 蛋白的片段，或 REST 蛋白的片段与其他蛋白的融合蛋白。

[100] 在一些实施方式中，所述 REST 变体包含 REST 的 DNA 结合结构域，但缺失 REST 的 N 端和/或 C 端抑制结构域。天然的 REST 蛋白包含 N-端抑制结构域、中间负责与 DNA 结合的 DNA 结合结构域，以及 C-端的转录抑制结构域。人源 REST 蛋白中具有 8 个锌指结构域，负责与 DNA 结合，更具体地，与 RE1/NRSE 元件结合。REST 的 DNA 结合结构域可以是 REST 蛋白中的 8 个锌指结构域或其中的能够结合 DNA 的片段(例如其中的少于 8 个的锌指结构域)。

[101] 在一些实施方式中，所述 REST 变体包含 REST(特别是人源 REST)的第 155-420 位氨基酸，但缺失 REST 的 N 端和/或 C 端抑制结构域。在一些实施方式中，所述 REST 变体包含 REST(特别是人源 REST)的第 155-420 位氨基酸中的 RE1 结合片段，但缺失 REST 的 N 端和/或 C 端抑制结构域。“RE1 结合片段”在本申请中是指，能够结合 RE1 元件的蛋白片段。

[102] 在一些实施方式中，所述 REST 变体具有 SEQ ID NO: 1, 3, 5 或者 9 的氨基酸序列，或者与其具有至少 70%、60%、或者 50%同一性百分比的序列。

[103] 在一些实施方式中，所述 RE1/NRSE 元件阻断剂包含编码所述 REST 变体的核酸，所述编码所述 REST 变体的核酸具有 SEQ ID NO:2, 4, 6 或 10 的核苷酸序列，或者与其具有至少 70%、60%、或者 50%同一性百分比的序列。

[104] 关于氨基酸序列(或核酸序列)的术语“序列一致性百分比(%)”定义为在比对序列并在必要时引入空位以实现最大数目的相同氨基酸(或核酸)后，候选序列中与参考序列中的氨基酸(或核酸)残基相同的氨基酸(或核酸)残基的百分比。换句话说，氨基酸序列(或核酸序列)的序列一致性百分比(%)可以通过将相对于其比较的参考序列相同的氨基酸残基(或碱基)的数目除以候选序列或参考序列中氨基酸残基(或碱基)的总数(以较短者为准)来计算。氨基酸残基的保守取代可视为或可不视为相同残基。出于确定氨基酸(或核酸)序列一致性百分比的目的进行的比对可例如使用以下实现：可公开获得的工具，如 BLASTN、BLASTp(可见于美国国家生物技术信息中心(U.S. National Center for Biotechnology Information；NCBI)的网站，另外参见 Altschul S.F.

等人，《分子生物学杂志》, 215:403-410 (1990)；Stephen F.等人，《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》, 25:3389-3402 (1997))、ClustalW2(可见于欧洲生物信息研究所(European Bioinformatics Institute)网站，另外参见 Higgins D.G.等人，《酶学方法(Methods in Enzymology)》, 266:383-402 (1996)；Larkin M.A.等人，《生物信息学(Bioinformatics)》(英格兰牛津(Oxford, England)), 23(21): 2947-8 (2007))和 ALIGN 或 Megalign(DNASTAR)软件。所属领域的技术人员可使用所述工具所提供的默认参数，或可视需要例如通过选择适合算法来自定义比对的参数。

[105] 在一些实施方式中，所述编码所述 REST 变体的核酸是密码子优化的，可选地具有 SEQ ID NO: 15 的核苷酸序列，或者与其具有至少 70%、60%、或者 50%同一性百分比的序列。不受理论限制，但认为密码子优化后的 REST 变体的核酸序列能够在人体细胞中更高地表达。

[106] 在一些实施方式中，所述 REST 变体进一步包含与所述 REST 的 DNA 结合结构域融合的激活结构域。在本申请中，“激活结构域”是指能够与目标基因的调控序列相互作用并激活或增加目标基因表达的结构域。

[107] 在一些实施方式中，所述激活结构域包含表观遗传修饰蛋白或者基因激活调控元件，可选地，所述激活结构域包括 VP64、P65-HSF1、VP16、RTA、Suntag、P300、CBP 或其任意组合，可选地，所述激活结构域包括 VP64 或 P65-HSF1。

[108] 在一些实施方式中，所述 REST 变体与一个或多个核定位信号序列(即 NLS)融合。不希望受任何理论束缚，但认为核定位信号序列能够促使 REST 变体进入细胞核，进而更好地发挥基因表达调控以及细胞转分化作用。任何合适的核定位信号序列都可以使用。核定位信号序列的例子包括，但不限于，BPNLS(例如，如 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列)、SV40 病毒大 T 抗原的 NLS，具有氨基酸序列 PKKKRKV(SEQ ID NO: 41)；来自核质蛋白的 NLS(例如，具有序列 KRPAATKKAGQAKKKK 的核质蛋白二分 NLS)(SEQ ID NO:42)；c-myc NLS，具有氨基酸序列 PAAKRVKLD(SEQ ID NO:43)或 RQRRNELKRSP(SEQ ID NO: 44)；hRNPA1M9NLS，具有序列 NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY(SEQ ID NO:45)；来自输入蛋白-α 的 IBB 结构域的序列 RMRIZFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV(SEQ ID NO:46)；肌瘤 T 蛋白的序列 VSRKRPRP(SEQ ID NO:47)和 PPKKARED(SEQ ID NO:48)；人 p53 的序列 POPKKKPL(SEQ ID NO:49)；小鼠 c-abl IV 的序列 SALIKKKKKMAP(SEQ ID NO:50)；流感病毒 NS1 的序列 DRLRR(SEQ IDNO:51)和 PKQKKRK(SEQ ID NO:52)；肝炎病毒 δ 抗原的序列 RKLKKKIKKL(SEQ ID NO:53)；小鼠 Mx1 蛋白的序列 REKKKFLKRR(SEQ ID NO:54)；人聚(ADP-核糖)聚合酶的序列 KRKGDEVDGVDEVAKKKSKK(SEQ ID NO:55)；以及类固醇激素受体(人)糖皮质激素的序列 RKCLQAGMNLEARKTKK(SEQ ID NO:56)。NES 的非限制性实例包括 NES 序列 LYPERLRRILT(SEQ ID NO: 57)、PKKKRKV(SEQ ID NO: 58)。

[109] 在一些实施方式中，至少一个所述核定位信号序列与所述 REST 变体的 N 末端融合。

[110] 在一些实施方式中，至少一个所述核定位信号序列与所述 REST 变体的 C 末端融合。

[111] 在一些实施方式中，至少一个所述核定位信号序列分别与所述 REST 变体的 N 末端和 C 末端融合。

[112] 在一些实施方式中，所述核定位信号序列包含选自下组的氨基酸序列序列：SEQ ID NOs: 13,和 41-58。

[113] 在本申请的实施例中，发明人利用蛋白结构预测，结合基因工程改造技术，对 REST 的内源锌指结构域进行了一系列分析和改造。首先，通过截短实验，发明人发现过表达 REST 的第

155-420 位氨基酸(仅包含 8 个锌指结构域，称为 RZFD：REST Zinc Finger Domain)，可以阻断 REST 与 RE1 的结合。通过 AAV 介导的基因递送技术，在小鼠纹状体星形胶质细胞中过表达 RZFD 可以将胶质细胞转分化为功能性神经元。通过对 RZFD 进行进一步改造，在 RZFD 的 N-端或 C-端融合 VP64，形成 RZFD-VP64，并成功实现 AAV 介导的在体胶质细胞向神经元转分化。在 RZFD 上进一步融合 P65 和 HSF1 的转录激活结构域，形成 RZFD-P65-HSF1。应用 AAV 介导的在体转分化技术，发现 RZFD-P65-HSF1 也能在纹状体中将胶质细胞转分化为功能性神经元。

[114] 之前的研究表明抑制 REST 可以将胶质细胞转分化为神经元，而 REST 结合与基因组中一种被称为 RE1 的 DNA 序列。而 RE1 是一类序列，无法通过 CRISPR 技术进行靶向，而本研究中采用一种人类内源性锌指结构(REST 锌指结构域(RZFD))巧妙的靶向 RE1 序列，从而阻断 REST 沉默复合体与 RE1 的结合。在胶质细胞等非神经元细胞中，表达 RZFD(RZFD-V1)解除了 REST 沉默复合体对神经元相关基因表达的抑制。进一步通过在 RZFD 上融合 VP64 (RZFD-V2)或 P65-HSF1(RZFD-V3)等激活结构域，进一步促进了神经元相关基因的表达，促进胶质细胞向神经元转分化。在本申请的实施例中，通过免疫荧光染色和 DAT-Cre：Ai9 标记系统，还发现 RZFD-V1, RZFD-V2 和 RZFD-V3 都可以将胶质细胞转分化为多巴胺神经元。

[115] 在本申请的实施例中，通过在 Ai9 视网膜中下腔注射 AAV，发现 RZFD，RZFD-VP64 和 RZFD-P65-HSF1 可以将穆勒细胞转分化为视网膜神经节细胞，并且观察到部分感光细胞。视网膜神经节细胞是视觉通路中唯一将视觉信号传递到大脑的细胞，其缺失或死亡会导致永久性的失明。在非人灵长类动物中的研究与小鼠中的结果类似，发明人发现在大脑中 RZFD，RZFD-VP64 和 RZFD-P65-HSF1 可以将胶质细胞转分化为多巴胺神经元，在视网膜中 RZFD，RZFD-VP64 和 RZFD-P65-HSF1 可以将穆勒细胞转分化为视网膜神经节细胞和感光细胞。

[116] **iv)个体和疾病治疗**

[117] 在一些实施方式中，所述个体是人或动物。

[118] 在一些实施方式中，所述动物是非人灵长类动物(例如猴)、大鼠或小鼠。

[119] 在本申请内容中，与神经元功能缺失或死亡相关的疾病主要包括与多巴胺神经元功能缺失或死亡相关的疾病，以及与视神经节或感光细胞缺失或死亡相关的视力障碍。在一些实施方式中，所述与神经元功能缺失或死亡相关的疾病选自：帕金森病、阿尔茨海默病、脑卒中(中风)、精神分裂症、亨廷顿舞蹈症、抑郁症、运动神经元病、肌萎缩性侧索硬化、脊髓性肌萎缩症、Pick 病、睡眠失调、癫痫、共济失调、RGC 细胞死亡导致的视力损伤、青光眼、年龄相关的 RGC 病变、视神经损伤、视网膜缺血或出血、Leber 遗传性视神经病变、损伤或退行性病变导致的感光细胞变性或死亡、黄斑变性、视网膜色素变性、糖尿病有关的失明、夜盲症、色盲、遗传性失明、先天性黑蒙症、螺旋神经节细胞死亡导致的耳聋或听觉减退，和其任意组合。

[120] 在一些实施方式中，本申请提供在有需要的个体体内预防和/或治疗与神经元功能缺失或死亡相关疾病的方法，包括向所述个体的纹状体和/或黑质施用治疗有效剂量的本申请提供的活性物质，以将所述纹状体和/或黑质的星形胶质细胞转分化为多巴胺神经元细胞，其中所述与神经元功能缺失或死亡相关的疾病选自下组：帕金森病抑郁症和阿尔茨海默病。

[121] 在一些实施方式中，本申请提供在有需要的个体体内预防和/或治疗与神经元功能缺失或死亡相关疾病的方法，包括向所述个体的视网膜下或玻璃体腔施用治疗有效剂量的本申请提供的活性物质，以将所述视网膜下或玻璃体腔的穆勒胶质细胞转分化为视网膜神经节细胞(RGC)

和/或感光细胞，其中所述与神经元功能缺失或死亡相关的疾病选自下组：RGC 细胞死亡导致的视力损伤、青光眼、年龄相关的 RGC 病变、视神经损伤、视网膜缺血或出血、Leber 遗传性视神经病变、损伤或退行性病变导致的感光细胞变性或死亡、黄斑变性、视网膜色素变性、糖尿病有关的失明、夜盲症、色盲、遗传性失明、和先天性黑蒙症。

[122] 在一些实施方式中，本申请提供在有需要的个体体内预防和/或治疗与神经元功能缺失或死亡相关疾病的方法，包括向所述个体的内耳施用治疗有效剂量的本申请提供的活性物质，以将所述内耳的耳蜗神经胶质细胞转分化为耳蜗螺旋神经节细胞，其中所述与神经元功能缺失或死亡相关的疾病选自下组：螺旋神经节细胞死亡导致的耳聋或听觉减退。

[123] REST 变体

[124] 在另一方面，本申请提供了一种 REST 变体，其包含 REST 的 DNA 结合结构域，但缺失 REST 的 N 端和/或 C 端抑制结构域。REST 在本申请中是指天然的或内源的 REST 分子，包括任何物种的 REST。

[125] 在一些实施方式中，所述 REST 变体包含 REST 的第 155-420 位氨基酸，但缺失 REST 的 N 端和/或 C 端抑制结构域。在一些实施方式中，所述 REST 变体包含 REST(特别是人源 REST)的第 155-420 位氨基酸中的 RE1 结合片段，但缺失 REST 的 N 端和/或 C 端抑制结构域。

[126] 在一些实施方式中，所述 REST 变体具有 SEQ ID NO:1, 3, 5 或者 9 的氨基酸序列，或者与其具有至少 70%、60%、或者 50%同一性百分比的序列。

[127] 在一些实施方式中，所述 RE1/NRSE 元件阻断剂包含编码所述 REST 变体的核酸，所述编码所述 REST 变体的核酸具有 SEQ ID NO:2, 4, 6 或 10 的核苷酸序列，或者与其具有至少 70%、60%、或 50%同一性百分比的序列。

[128] 在一些实施方式中，所述 REST 变体进一步包含与所述 REST 的 DNA 结合结构域融合的激活结构域。

[129] 在一些实施方式中，所述激活结构域包含表观遗传修饰蛋白或者基因激活调控元件，可选地，所述激活结构域包括 VP64、P65-HSF1、VP16、RTA、Suntag、P300、CBP 或其任意组合，可选地，所述激活结构域包括 VP64 或 P65-HSF1。

[130] 在一些实施方式中，所述 REST 变体与一个或多个核定位信号序列融合。

[131] 在一些实施方式中，至少一个所述核定位信号序列与所述 REST 变体的 N 末端融合。

[132] 在一些实施方式中，至少一个所述核定位信号序列与所述 REST 变体的 C 末端融合。

[133] 在一些实施方式中，至少一个所述核定位信号序列分别与所述 REST 变体的 N 末端和 C 末端融合。

[134] 在一些实施方式中，所述核定位信号序列包含 SEQ ID NO：13 所示的氨基酸序列。

[135] 编码 REST 变体的多核苷酸

[136] 在另一方面，本申请提供了一种多核苷酸，包含编码如本申请所述的 REST 变体的核酸序列。

[137] 在另一方面，本申请提供了一种表达载体，其包含编码 REST 变体的多核苷酸，以及可选地进一步包含与所述多核苷酸可操作地连接的启动子。

[138] 在一些实施方式中，所述启动子是胶质细胞特异性启动子。在一些实施方式中，所述胶质细胞特异性启动子是星形胶质细胞特异性启动子或穆勒胶质细胞(MG)细胞特异性启动子。

[139] 在一些实施方式中，所述胶质细胞特异性启动子选自 GFAP 启动子、ALDH1L1 启动子、

EAAT1/GLAST 启动子、谷氨酰胺合成酶启动子、S100β 启动子 EAAT2/GLT-1 启动子和 Rlbp1 启动子，优选 GFAP 启动子。

[140] 在一些实施方式中，所述胶质细胞特异性启动子是耳蜗神经胶质细胞特异性启动子。

[141] 在一些实施方式中，所述耳蜗神经胶质细胞特异性启动子选自：GFAP 启动子(例如，见 SEQ ID NO: 39 或 40)、ALDH1L1 启动子、EAAT1/GLAST 启动子，和 Plp1 启动子。

[142] 药物组合物、药盒、试剂盒

[143] 在另一方面，本申请提供了一种药物组合物，其包含如本申请所述的 REST 变体、或编码所述 REST 变体的多核苷酸、或包含编码 REST 变体的多核苷酸的表达载体，和药学上可以接受的载体。

[144] 在一些实施方式中，所述药物组合物进一步包含用于递送所述多核苷酸的运载体，其中所述运载体包含病毒载体、脂质体、纳米颗粒、外泌体、或类病毒颗粒。

[145] 在一些实施方式中，所述病毒载体包括重组腺相关病毒载体(rAAV)、腺相关病毒(AAV)载体、腺病毒载体、慢病毒载体、逆转录病毒载体、痘病毒载体、疱疹病毒、SV40 病毒载体、或其任意组合，其中优选 AAV 或 rAAV。

[146] 在一些实施方式中，所述的药物组合物适用于局部施用至以下一个或多个部位的胶质细胞：i)纹状体中的胶质细胞；ii)大脑黑质中的胶质细胞；iii)视网膜中的胶质细胞；iv)内耳中的胶质细胞；v)脊髓中的胶质细胞；vi)前额皮质中的胶质细胞；vii)运动皮质中的胶质细胞；viii)下丘脑中的胶质细胞；以及 ix)腹侧被盖区(VTA)中的胶质细胞。

[147] 在一些实施方式中，所述药物组合物适用于颅内给药或眼内给药。

[148] 在一些实施方式中，所述的药物组合物还包含 i)一种或多种多巴胺神经元相关因子，或 ii)用于穆勒胶质细胞中表达一种或更多种视网膜神经节细胞相关因子，

1)其中所述一种或多种多巴胺神经元相关因子选自：FoxA2、Lmx1a、Lmx1b、Nurr1、Pbx1a、Pitx3、Gata2、Gata3、FGF8、BMP、En1、En2、PET1、Pax 家族蛋白(Pax3、Pax6 等)、SHH、Wnt 家族蛋白，TGF-β 家族蛋白，和其任意组合；

2)其中所述一种或多种视网膜神经节细胞相关因子包括选自：β-catenin、Oct4、Sox2、Klf4、Crx、aCamKII、Brn3a、Brn3b、Brn3C、Math5、Otx2、Ngn2、Ngn1、AscL1、miRNA9、miRNA-124、Nr2e3，Nrl，和其任意组合。

[149] 在另一方面，本申请提供了一种药盒或试剂盒，其包含本申请提供的药物组合物。

[150] 融合蛋白与蛋白复合物

[151] 在另一方面，本申请提供了一种融合蛋白，其包含 DNA 结合蛋白融合于一个或多个 REST 的抑制结构域。DNA 结合蛋白能够与待调控的目标 DNA 结合，并允许与之融合的 REST 抑制结构域对该待调控的目标 DNA 发挥负向调控的作用，以抑制待调控目标 DNA 的转录活性。

[152] 除了直接融合以外，DNA 结合蛋白与一个或多个 REST 的抑制结构域也可以通过非共价的方式结合或复合，以形成蛋白复合物。

[153] 因此，本申请还提供了一种组合物，其包含 a) DNA 结合蛋白和 b) 包含一个或多个 REST 的抑制结构域的蛋白，其中所述 a)和 b)能够结合形成蛋白复合物。在本申请中，“蛋白复合物”是指由两个蛋白分子通过非共价键结合形成的复合物。例如，在所述 DNA 结合蛋白中，可以额外具有一个结合部分(例如抗体或其中的抗原结合片段)，该结合部分能够结合所述包含一个或多个 REST 的抑制结构域的蛋白。在另一个例子中，包含一个或多个 REST 的抑制结构域的蛋

白中可以额外具有结合部分(例如抗体或其中的抗原结合片段)，该结合部分能够结合所述 DNA 结合蛋白。本领域技术人员能够理解，该结合部分可以不影响 DNA 结合蛋白与目标 DNA 的结合，也不影响所述包含一个或多个 REST 的抑制结构域的蛋白与 RE1 的结合。换言之，形成的蛋白复合物仍然具有至少部分的结合目标 DNA 的功能以及至少部分的结合 RE1 的功能。通过这样的方式，可以获得非共价结合的蛋白复合物，其中既包含所述 DNA 结合蛋白，其能够结合待调控的目标 DNA，也包含 REST 的抑制结构域，其能够抑制待调控的目标 DNA 的转录活性。

[154] 在某些实施方式中，在本申请提供的组合物中，所述 a)和 b) 分别与一对自组装配体连接，所述自组装配体可以相互结合。在本申请中，“自组装配体”是指能自发地相互结合的两个配体。由于两个配体能够自发地结合，因此也称为一对自组装配体。

[155] 在一些实施方式中，所述一对自组装配体可以选自下组：i) 相互结合的两个蛋白结构域；和 ii) RNA 剪切供体和剪切受体。任何可以相互结合的两个蛋白结构域都可以用作本申请所述的自组装配体，例如：抗原和抗体；抗原和抗体中的抗原结合片段；受体和配体；或者相互结合的两种蛋白。在一些实施方式中，所述一对自组装配体包括：KFBP 和 FRB；或 PYL 和 ABI。任何 RNA 剪切供体和剪切受体都可以用作本申请所述的自组装配体，例如，可以使用断裂蛋白质内含子(Split Intein)。

[156] 在一些实施方式中，所述一对自组装配体中的两个配体分别连接到：a) DNA 结合蛋白和 b) 包含一个或多个 REST 的抑制结构域的蛋白。例如，REST 的抑制结构域可以连接抗原，而 CRISPR-Cas 蛋白可以连接与之结合的抗体，由此通过抗原和抗体之间的相互作用，自组装成本申请所述的蛋白复合物。

[157] i) REST 的抑制结构域

[158] 在本申请提供的融合蛋白与组合物以及蛋白复合物中，都具有一个或多个 REST 的抑制结构域。“REST 的抑制结构域”在本申请中是指，在 REST 蛋白中具有抑制基因表达功能的结构域。不希望受任何理论束缚，但认为在 REST 蛋白中存在不同的 REST 的抑制结构域，包括但不限于，REST 蛋白的 N 末端区域和 REST 蛋白的 C 末端区域。在本申请中，所述“一个或多个 REST 的抑制结构域”可以指一个或多个相同的 REST 的抑制结构域，例如同一个抑制结构域的多个重复，也可以指一个或多个不同的 REST 的抑制结构域。

[159] 在一些实施方式中，所述一个或多个 REST 的抑制结构域包含 REST 的 N-末端抑制区域和/或 REST 的 C-末端抑制区域。

[160] 在一些实施方式中，所述一个或多个 REST 的抑制结构域来源于人 REST 蛋白或者动物 REST 蛋白。在一些实施方式中，所述动物 REST 蛋白可以包括非人灵长类动物的 REST 蛋白(例如猴)、啮齿类动物的 REST 蛋白(例如小鼠、大鼠)、家禽(例如鸡、鸭、鹅等)、农场动物(例如牛、羊、猪等)。

[161] 在一些实施方式中，所述 REST 的 N-末端抑制区域包含 REST 的第 1-83 位氨基酸或其中具有转录抑制活性的片段。在本申请中，“转录抑制活性”是指，当 REST 的抑制结构域与某个目标基因的转录调控序列相互作用时，所述 REST 的抑制结构域能够降低或减少所述目标基因的转录。在本申请中，“具有转录抑制活性的片段”是指，在 REST 的氨基酸序列中，能够提供至少部分转录抑制活性的片段。

[162] 在一些实施方式中，所述 REST 的 N-末端抑制区域包含如 SEQ ID NO: 16 所示的序列或其中具有转录抑制活性的片段。

[163] 在一些实施方式中，所述 REST 的 C-末端抑制区域包含 REST 的第 1008-1097 位氨基酸或其中具有转录抑制活性的片段。

[164] 在一些实施方式中，所述 REST 的 C-末端抑制区域包含如 SEQ ID NO: 18 所示的序列或其中具有转录抑制活性的片段。

[165] 在一些实施方式中，所述具有转录抑制活性的片段包含 REST 蛋白上的至少连续 20 个氨基酸、连续 30 个氨基酸、连续 40 个氨基酸、或者连续 50 个氨基酸的片段。

[166] **ii) DNA 结合蛋白**

[167] 在本申请提供的融合蛋白与组合物以及蛋白复合物中，都具有 DNA 结合蛋白。在一些实施方式中，所述 DNA 结合蛋白可以靶向结合特定的靶 DNA 序列。在一些实施方式中，所述 DNA 结合蛋白可以是转录激活因子样效应因子核酸酶(TALEN)，锌指核酶(ZFN)、序列引导的 DNA 结合蛋白例如 CRISPR –Cas 蛋白，或转录因子中的 DNA 结合部分。ZFN 和 TALEN 经由蛋白质-DNA 相互作用实现特异性 DNA 结合，CRISPR –Cas 蛋白(例如 Cas9、Cas12)通过与靶 DNA 碱基配对的短的向导 RNA 引导，与特异性 DNA 序列靶向结合。在一些实施方式中，所述转录因子中的 DNA 结合部分不是 REST 中天然存在的 DNA 结合结构域。

[168] 在一些实施方式中，所述 DNA 结合蛋白选自序列引导的 DNA 结合蛋白。“序列引导的 DNA 结合蛋白”是指能在靶向性部分的引导下，与特定核苷酸序列结合的 DNA 结合蛋白。序列引导的 DNA 结合蛋白包括但不限于，CRISPR -Cas 蛋白。

[169] 在一些实施方式中，所述序列引导的 DNA 结合蛋白是 CRISPR-Cas 蛋白或其变体。“CRISPR-Cas 蛋白“是指规律间隔成簇短回文重复序列相关蛋白，其是源自细菌或古生菌适应性免疫系统中的一类核酸酶，CRISPR-Cas 蛋白可以在靶向性的向导 RNA(gRNA)引导下靶向结合特定的核酸序列并对其进行切割。能结合 DNA 的 CRISPR-Cas 蛋白包括但不限于，Cas9 和 Cas12。

[170] 在一些实施方式中，所述 CRISPR-Cas 蛋白变体不具有核酸酶活性。

[171] 在一些实施方式中，所述序列引导的 DNA 结合蛋白是 Cas9 蛋白或不具有核酸酶活性的 Cas9 变体。不具有核酸酶活性的 Cas9 变体的例子包括，nCas9 或 dCas9。

[172] Cas9 蛋白可以来自多种细菌，包括但不限于，来自化脓性链球菌(Streptococcus pyogenes)的 Cas9(SpCas9)、来自金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)的 Cas9 (SaCas9)、来自嗜热链球菌(Streptococcus thermophilus)的 Cas9(StCas9)等。在一些实施方式中，Cas9 蛋白可以被改造以包含一个或多个能够降低或消除核酸酶活性的突变。Cas9 蛋白中的突变可以使其失去切割双链 DNA 的活性，或者仅具有切割一条单链 DNA 的活性。例如，以 SpCas9 为例，可以将第 10 位的 Asp 残基转变为 Ala 残基(即 D10A 突变体)，或者将第 840 位的 His 残基转变为 Ala 残基(H840A 突变体)，由此得到只能切割单链 DNA 的突变体，也称为 nCas9。再例如，以 SpCas9 为例，可以同时引入 D10A 和 H840A 双突变，使 Cas9 失去切割 DNA 双链的活性，这样的 Cas9 突变体也称为 dCas9。在一些实施方式中，所述 dCas9 具有如 SEQ ID NO: 21 或 22 所示的氨基酸序列。

[173] 在一些实施方式中，其中所述序列引导的 DNA 结合蛋白是 Cas12 蛋白或不具有核酸酶活性的 Cas12 变体。

[174] Cas12 蛋白，也称为 Cpf1，可以来自多种细菌，包括但不限于毛螺旋菌(Lachnospiraceae bacterium)的 Cpf1(LbCpf1)、氨基酸球菌(Acidaminococcussp) 的 Cpf1(AsCpf1)、弗朗西斯菌(Francisella novicida)的 Cpf1(FnCpf1)等。在一些实施方式中，Cas12 蛋白可以被改造以包含一个

或多个能够降低或消除核酸酶活性的突变。

[175] 在一些实施方式中，至少一个所述 REST 蛋白的 N-末端抑制区域连接于所述 DNA 结合蛋白的 N 末端或 C 末端。

[176] 在一些实施方式中，至少一个所述 REST 蛋白的 C-末端抑制区域连接于所述 DNA 结合蛋白的 N 末端或 C 末端。

[177] 在一些实施方式中，所述融合蛋白包含与所述 DNA 结合蛋白的 N 末端或 C 末端连接的至少一个串联的所述 REST 的 N-末端抑制区域。

[178] 在一些实施方式中，所述融合蛋白包含与所述 DNA 结合蛋白的 N 末端或 C 末端连接的至少一个串联的所述 REST 的 C-末端抑制区域。

[179] 在一些实施方式中，所述融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 25-27 所示的氨基酸序列。

[180] 多核苷酸

[181] 在另一方面，本申请提供了一种多核苷酸，其编码如本申请所述的融合蛋白或组合物或蛋白复合物。

[182] 一种多核苷酸，其编码如本申请所述的蛋白复合物。

[183] 在一些实施方式中，其中包含编码 DNA 结合蛋白的第一多核苷酸片段和编码包含一个或多个 REST 的抑制结构域的蛋白的第二多核苷酸片段。

[184] 在一些实施方式中，其中所述第一多核苷酸片段与第二多核苷酸片段通过一个可自剪切的第三核苷酸片段连接。

[185] 在另一方面，本申请提供了一种在细胞中抑制目标基因表达的方法，包括向所述细胞递送如本申请所述的融合蛋白或编码所述的融合蛋白的多核苷酸，其中所述 DNA 结合蛋白能够结合所述目标基因或其调控序列，并抑制所述目标基因的表达。

[186] 在另一方面，本申请提供了一种在个体中抑制目标基因表达的方法，包括向所述个体递送如本申请所述的融合蛋白或编码所述的融合蛋白的多核苷酸，其中所述 DNA 结合蛋白能够结合所述目标基因或其调控序列，并抑制所述目标基因的表达。

[187] 在一些实施方式中，所述 DNA 结合蛋白是 CRISPR-Cas 蛋白或其变体。

[188] 在一些实施方式中，所述 CRISPR-Cas 蛋白变体不具有核酸酶活性。

[189] 在一些实施方式中，所述序列引导的 DNA 结合蛋白是 Cas9 蛋白或不具有核酸酶活性的 Cas9 变体。

[190] 在一些实施方式中，所述方法进一步包括向所述细胞或所述个体递送向导 RNA，其包含与目标基因或其调控序列的靶区域互补的靶向序列，以及与所述 DNA 结合蛋白结合的序列。

[191] 实施例

通用方法

动物伦理：

[192] 本研究中动物的饲养和使用是在中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心生物医学研究伦理委员会的指导原则指导下完成。

质粒构建：

[193] 本研究中的质粒均为本实验室自己构建，AAV 骨架载体用限制性内切酶进行酶切，并进行琼脂糖凝胶电泳，回收骨架载体。插入 DNA 片段为以细胞 cDNA 为模板进行 PCR，琼脂糖

凝胶电泳后回收 PCR 片段。利用诺唯赞生物科技有限公司的 ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit(Vazyme, C113-02)进行骨架载体与片段连接。连接后转化到 DH5a 大肠杆菌中进行，并涂板。第二天挑取单克隆进行鉴定，阳性克隆进行测序，测序完全正确的克隆进行扩大培养和质粒抽提。

小鼠脑部 AAV 注射：

[194] 本研究中所使用的 AAV 血清型为 AAV8。利用瑞沃德立体定位注射系统进行立体定位注射 (C57BL / 6 或 Dat-Cre:Ai9 小鼠，年龄大于两个月)。AAV-GFAP-RZFD-V1, AAV-GFAP-RZFD-V2 和 AAV-GFAP-RZFD-V3 的滴度为大于 5×10^{12}vg/ml (每次注射 1-3μl)。将 AAV 注入纹状体(AP + 0.8mm，ML±1.6mm 和 DV-2.8mm)或黑质(AP – 3.0mm，ML±1.25mm 和 DV-4.5mm)。

小鼠组织免疫荧光染色：

[195] 注射后 2 周和注射后 1.5-2 个月取材、切片并进行免疫荧光染色。生理盐水和 4% PFA 灌注小鼠后取脑，并用 4%多聚甲醛(PFA)固定过夜，然后在 30%蔗糖中脱水至少 12 小时以上，待组织沉入溶液底部。用 OCT 进行包埋后进行冷冻切片，切片厚度为 30 μm 或 40 μm。免疫荧光染色之前，用 0.1M 磷酸盐缓冲液(PBS)清洗脑片三次，每次 5-10 分钟。一抗 4℃孵育过夜后，用 PBS 清洗 3-4 次，每次 10-15 分钟。然后再加入抗体稀释液稀释后的二抗进行孵育，室温孵育 2-3 个小时，孵育结束后再用 PBS 洗 3-4 次，每次 10-15 分钟。最后用抗荧光淬灭封片剂(Life Technology)进行封片保存。

抗体：

[196] 本研究中所用一抗包括：荷兰猪抗 NeuN (1:500, ABN90, Millipore)，兔抗 TH (1:500, AB152, Millipore)，大鼠抗 DAT (1:100, MAB369, Millipore)，兔抗 RBPMS (Proteintech, Cat# 15187-1-AP)和鼠抗 Flag (1:2000, F3165, Sigma),。该研究中使用的二抗为: Cy5-AffiniPure Donkey Anti-Guinea Pig IgG (H+L) (1:500, 706-175-148, Jackson ImmunoResearch)，Alexa Fluora-488 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) (1:500, 711-545-152, Jackson ImmunoResearch)，Alexa Fluora-488 AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L) (1:500, 715-545-150, Jackson ImmunoResearch)和 Cy5 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) (1:500, 711-175-152, Jackson ImmunoResearch)。

6-OHDA PD 小鼠模型

[197] 本实验所使用的的小鼠为成年 C57BL / 6 小鼠(7-10 周)小鼠。在麻醉前半小时腹腔注射 25mg / kg 盐酸地昔帕明(D3900，Sigma-Aldrich)。麻醉后，向小鼠右侧内侧前脑束注射 3μg 6-OHDA(H116，Sigma-Aldrich)或生理盐水：前后位(A / P)= -1.2 mm，内外侧(M / L)= -1.1 mm，背腹(D / V)= -5 mm。手术后 1 小时，给小鼠皮下注射 1ml 4%的葡萄糖-盐水溶液。

阿扑吗啡诱导的旋转试验

[198] 在测试前 10 分钟给小鼠腹腔注射 0.5mg / kg 阿扑吗啡(A4393，Sigma-Aldrich)。测试时，将小鼠各自放置在不透明的圆柱体(直径 30cm)中，由摄像机在其上方记录 20 分钟的行为。旋转的定义为全身转向，其中一个后爪作为中心并且没有头部朝向的改变。统计注射一侧和注射的对侧旋转数，并将数据量化为 20 分钟内的对侧逆转数。

圆筒试验

[199] 将小鼠轻轻放到玻璃烧杯(1000ml)中，在其前面用录相机记录 10 分钟的行为。分别计算

注射侧和注射对侧前肢触壁次数，并将数据量化为同侧触壁数与总触壁数的比率。

转杆试验

[200] 将小鼠先进行 2 天训练，在第 3 天进行行为测试。第 1 天，转杆以 4 圈/分钟的固定速度训练小鼠 4 次，每次 300 秒。第 2 天，以 4 至 40 圈/分钟的加速方式训练小鼠 4 次。第三天以 4-40 圈/分钟的方式进行行为测试，测试 4 次。将小鼠在脱落前在杆上停留的时间记录为停留期，并且使用 3 个最长停留期的平均值进行分析。

NMDA 造模：

[201] 为研究在受损视网膜中是否可以再生 RGC，用 PBS 中配制 200mM 的 NMDA 溶液，然后通过玻璃体内注射，将 1.5μl NMDA 溶液注到 4-8 周龄的 Ai9 小鼠或 5-6 周龄的 C57BL/6 小鼠的眼睛中(用于 VEP 和黑白场景偏好测试)。NMDA 注射 2-3 周后，GFAP-GFP-Cre 与 GFAP-CasRx-REST 或 GFAP-CasRx 一起通过视网膜下注射共同递送至视网膜。为了评估受损视网膜的功能营救(VEP 和明暗箱穿梭实验)，对 5 周到 12 个月年的小鼠(C57BL/6)注射 NMDA 诱导视网膜损伤，并在注射 2-3 周后在视网膜下注射 GFAP-mCherry (0.1 μl)与 PBS(0.9 ul)或 GFAP-RZFD-V1(0.9μl)/ GFAP-RZFD-V2(0.9μl)/ GFAP-RZFD-V3(0.9μl)混合物。

视网膜下 AAV 注射

[202] 在 Olympus 显微镜(Olympus，日本东京)下用 Hamilton 注射器(32G 针)向眼睛注射高滴度(> 1×10^{13} vg/ml) AAV。为确定完整视网膜中的重编程，通过视网膜下注射(Ai9 和 C57BL/6 小鼠，4 周到 12 个月年龄)将共计 1μl 的 GFAP-GFP-Cre(0.1ul)+pbs(0.9ul)，或 GFAP-GFP-Cre(0.1μl)和 GFAP-RZFD-V1(0.9μl)/ GFAP-RZFD-V2(0.9μl)/ GFAP-RZFD-V3(0.9μl)注射至视网膜下。

视网膜取材和切片：

[203] AAV 注射 1-3 个月后，取眼睛，视神经和脑组织，用 4%多聚甲醛(PFA)固定 2 小时(眼睛和视神经)或 24 小时(脑部)，然后在 30%蔗糖溶液中脱水 2h(眼睛)或 24(脑)小时，视神经直接用 PBS 清洗后封片观察。然后用 OCT 进行包埋，将眼睛和大脑进行切片，厚度为 30μm。

视网膜免疫荧光染色：

[204] 用于免疫荧光染色的一抗：兔抗 RBPMS(1：500,15187-1-AP，Proteintech)，小鼠抗 Brn3a(1：100，MAB1585，Millipore)，兔抗 Sox9(1：500，AB5535，Millipore)，兔抗 Prox1(1：500，AB5475，Millipore)，兔抗 Pax6(1：500,901301，Biolegent)。二抗为：Cy™5 AffiniPure Donkey 小鼠抗 IgG(H + L)(1：500,715-175-150，Jackson ImmunoResearch)和 Cy TM 5 AffiniPure Donkey 兔抗 IgG(H + L)(1：500,711-175-152，Jackson ImmunoResearch)。一抗 4℃孵育过夜，然后用 PBS 清洗 3 遍，每次 10 分钟。二抗室温孵育 2-3h，再用 PBS 清洗 3 遍，每次 10 分钟。最后用抗荧光淬灭剂封片(Life technology)，并使用 Olympus FV3000 显微镜进行成像。

统计分析：

[205] 由 s.e.m.设置误差线，以非成对双尾 t 检验或单因素方差分析计算统计学显着性($p < 0.05$)。所有实验均随机制定，未使用统计学方法预确定样本量。假设数据分布正常但未经正式检验。数据收集和分析并未在盲实验条件下进行。

实施例 1. 靶向 RE1 的工具构建

[206] 为了实现对 RE1 的调控，我们利用 REST 能结合于 RE1 的特点，挖掘其内源锌指蛋白(ZF)的 RE1 结合结构域来调控 RE1，称为 RZFD(REST Zinc Finger Domain)(SEQ ID NO: 1)。通过结

构域预测和蛋白结构建模，我们发现人源 REST 蛋白的第 159-412 位包含 8 个锌指蛋白结构域(图 1A)。为了进一步调控 RE1 控制的神经相关蛋白的表达，我们在 RZFD 的 C-末端融合了一个基因表达调控因子 VP64(SEQ ID NO: 7)或 P65-HSF1(SEQ ID NO: 11)，构建成 RZFD-VP64 和 RZFD-P65-HSF(图 1A)。VP64 和 P65-HSF 可以招募转录因子和组蛋白乙酰化等蛋白到 RE1 附近，调控 RE1 附近的染色体结构，让其控制的基因能够表达。为了进一步优化 RZFD 系统，我们将 RZFD 进行密码子优化(SEQ ID NO: 15)，提高 RZFD 在哺乳动物细胞中的表达量，与此同时，我们在 RZFD 的两端分别加上 bpNLS 序列，以增强其入核效率，将此版本命名为 RZFDmax(图 1A)。在非神经元(如：胶质细胞)中，REST 复合体结合于 RE1，在复合体中的组蛋白去乙酰化酶和甲基化酶作用下，RE1 附近的染色质转变为致密状态，神经元相关基因表达关闭(图 1B)。我们在非神经元细胞(如：胶质细胞)中表达 RZFD、RZFD-VP64 或 RZFD-P65-HSF1，RZFD、RZFD-VP64 或 RZFD-P65-HSF1 与 RE1 竞争性结合，阻止了 REST 沉默复合体与 RE1 的结合(图 1C，D 和 E)。RZFD 的机制是通过与 RE1 竞争性结合，而 RZFD-VP64 和 RZFD-P65-HSF1 不仅能竞争性结合于 RE1，还能进一步改变 RE1 附件的染色体状态，促进其调控的神经相关基因的表达。

实施例 2. 基因表达抑制系统构建

[207] REST 蛋白的 N-端(SEQ ID NO: 16)和 C-端(SEQ ID NO: 18)具有招募多种表观遗传调控元件的作用，从而实现对 REST 靶基因表达的调控。为了研究 N-端和 C-端抑制靶基因表达的能力，我们构建了多个不同的抑制系统并在 293T 细胞中测试靶向抑制 Ptbp1 的效率(图 1F-K)。同时，为了与已知的基因表达抑制结构域 Krab(SEQ ID NO: 28)的抑制效率进行对比，我们也构建了 dCas9-Krab(SEQ ID NO: 23)和 dCas9-3 x Krab(SEQ ID NO: 24)系统。dCas9-Krab 进入细胞后，在 sgRNA 引导下，与内源基因表达调控区域结合，从而达到抑制靶基因表达的目的。为了研究单个 N-端抑制效率，多个 N-端串联抑制效率的差异，以及同时引入 N-端和 C-端的抑制效率差异，我们构建了 N-dCas9 (SEQ ID NO: 25)，3 x N-dCas9(SEQ ID NO: 26)和 3 x N-dCas9-3xC(SEQ ID NO: 27) 这几种类型的抑制系统，在靶向 Ptbp1 的 sgRNA 引导下，抑制 Ptbp1 表达(图 1G-K)。为了对各个系统抑制效率进行测试，我们将不同的系统转染进 293T 细胞，并通过流式细胞术分选转染阳性的细胞，并对阳性细胞进行 RT-qPCR 以检测各系统对 Ptbp1 的抑制效果。N-dCas9 和 dCas9-Krab 对靶基因的抑制效率接近，但抑制效率都比较低。3 x N-dCas9 的抑制效率也不高。而 dCas9-3 x Krab 和 3 x N-dCas9-3xC 的抑制效率则比较高，尤其是 3 x N-dCas9-3xC 的抑制效率，比 dCas9-3 x Krab 的抑制效率更高(图 1L)。这些结果表明将 REST 的 N-端和 C-端构建为抑制系统，能有效抑制内源基因的表达，可以作为表观遗传调控工具或基因表达抑制工具。

实施例 3. RZFD 和 RZFDmax 将星形胶质细胞转分化为多巴胺神经元

[208] 为了在小鼠体内实现胶质细胞向神经元细胞的转分化，我们构建了 AAV 表达载体。为了特异性标记星形胶质细胞，在 AAV 表达载体中，我们利用星形胶质细胞特异性启动子 GFAP 驱动荧光蛋白 mCherry 表达(GFAP-mCherry)，人源 RZFD 也由 GFAP 启动子驱动(GFAP-RZFD，其中的 RZFD 的氨基酸序列为 SEQ ID NO :1，核酸序列为 SEQ ID NO :2)，特异性表达于星形胶质细胞中(图 2A)。为了检测注射后 2 周或 2 周以上的时间是否能诱导胶质细胞转分化为神经元或者多巴胺神经元，我们分别在注射 AAV 后 2 周或 1.5 个月进行取材，并进行神经元特异性

标志物 NeuN 和多巴胺神经元的特异性标志物酪氨酸羟化酶(Tyrosine hydroxylase，简称为 TH)染色(图 2B)。在 8 周龄的 C57 小鼠的纹状体或者黑质中注射表达 GFAP-mCherry + GFAP-RZFD 的 AAV 作为实验组，或单独注射表达 GFAP-mCherry 的 AAV 作为对照组(图 2C)。我们以前的研究表明，注射后 1 周到注射后 3 个月，在对照组中都不会有神经元的产生。与之前的研究结果一致，在注射对照组 AAV 两周后，我们没有观察到神经元的产生(图 2D)。而在实验组中，我们发现注射后 2 周，可以观察到部分细胞已经开始变形，并有少部分胶质细胞已经开始表达神经元特异性标志物 NeuN(图 2E)。这表明在星形胶质细胞中表达 RZFD 有将星形胶质细胞转分化为神经元的潜力。在注射表达 GFAP-mCherry + GFAP-RZFD 的混合 AAV 病毒 1.5 个月后进行分析，我们发现大量的 $mCherry^{+}NeuN^{+}$双阳性细胞，而在对照组则没有 $mCherry^{+}NeuN^{+}$双阳细胞出现，这表明 RZFD 可以高效将星形胶质细胞转分化为神经元。与此同时，利用检测多巴胺神经元的特异性标志物 TH，我们发现部分 mCherry 阳性细胞中 TH 的表达增强并形成神经元，这表明 RZFD 可以将星形胶质细胞转分化为多巴胺神经元(图 2F)。为了研究 RZFDmax 是否可以进一步增强将星形胶质细胞转分化为神经元和多巴胺神经元的效率，在小鼠纹状体中注射 GFAP-mCherry + GFAP-RZFDmax 的混合 AAV 病毒，并在对其转分化效率进行分析。在注射了 GFAP-mCherry + GFAP-RZFDmax 的小鼠纹状体中发现较多的 TH 阳性神经元数量(图 2G)。通过对 GFAP-RZFD 和组 GFAP-RZFDmax 组统计分析，发现 GFAP-RZFDmax 组产生的 TH 阳性神经元数量明显多于 GFAP-RZFD 组(图 2H)。这些结果表明 GFAP-RZFD 和 GFAP-RZFDmax 都能诱导星形胶质细胞转分化为神经元和多巴胺神经元，并且 GFAP-RZFDmax 诱导胶质细胞转分化多巴胺神经元的效率更高。

实施例 4. RZFD 将星形胶质细胞转分化为多巴胺神经元减轻帕金森小鼠模型疾病症状

[209] 为了进一步在帕金森小鼠疾病模型中探究 GFAP-RZFD 是否能缓解帕金森小鼠的疾病症状，我们首先在 Dat-Cre:Ai9 小鼠 MFB 注射 6-OHDA 进行造模。然后在造模后的小鼠纹状体(Striatum，简称 ST)或黑质(Nigra)中注射对照组和测试组 AAV，并在注射后 1.5-3 个月进行分析(图 3A)。Dat-Cre:Ai9 能特异性标记多巴胺神经元，只有多巴胺神经元会被标记为 tdTomato 阳性。一般情况下小鼠纹状体中无阳性细胞，如果有胶质细胞转分化为多巴胺神经元，则会被标记为红色。在对照组中，我们注射了表达 GFAP-EGFP 的 AAV，EGFP 绿色荧光信号特异性表达于星形胶质细胞中，这些细胞维持典型的星形胶质细胞形态，而且在红色荧光下没有发现红色信号，也没有发现 TH 阳性细胞，这表明 GFAP-EGFP 对照组没有转分化产生的多巴胺神经元(图 3B)。而在注射了 GFAP-EGFP + GFAP-RZFD 的实验组，观察到部分 EGFP 阳性细胞分化为神经元形态，而且出现部分大量 tdTomato 阳性细胞，TH 染色显示这些 tdTomato 阳性细胞与 TH 共定位(图 3C)。这表明，在 Dat-Cre:Ai9 小鼠中过表达 RZFD 能将胶质细胞转分化为多巴胺神经元。为了进一步测试这些转分化的神经元是否可以缓解帕金森小鼠模型的疾病症状，我们对小鼠进行转棒实验测试、圆筒实验测试和药物诱导的旋转行为测试(图 3D-G)。在转棒测试中，对照组小鼠大约能维持 120s 左右，而治疗小鼠则能到达 180s 左右(图 3D)。圆筒测试中，治疗组小鼠使用前爪的平衡性明显要优于对照组(图 3E)。在药物诱导的旋转行为测试中，相对于对照组而言，治疗组的转圈行为明显减少(图 3F 和 3G)。这些结果表明，转分化获得的多巴胺神经元能明显缓解帕金森小鼠模型的疾病症状。

实施例 5. RZFD-VP64 和 RZFD-P65-HSF1 将星形胶质细胞转分化为多巴胺神经元

[210] 为了进一步研究调控 RE1 神经元相关基因的表达，我们构建了 RZFD-VP64 (被标注为 GFAP-RZFD-V2，氨基酸序列 SEQ ID NO: 5，核酸序列 SEQ ID NO: 6)和 RZFD-P65-HSF1 (被标注为 GFAP-RZFD-V3，氨基酸序列 SEQ ID NO: 9，核酸序列 SEQ ID NO: 10)的 AAV 表达载体(图 4A)。在胶质细胞特异性启动子 GFAP 的驱动下，表达 RZFD-VP64 和 RZFD-P65-HSF1。我们在 C57 小鼠的纹状体或黑质中注射 GFAP-mCherry + GFAP-RZFD-VP64 的混合 AAV，并在注射后 1.5 个月取材分析(图 4B)。我们发现注射 GFAP-RZFD-VP64 组大部分红色荧光标记的细胞都表达神经元特异性标志物 NeuN，同时还有部分细胞表达多巴胺神经元特异性标志物 TH(图 4C)。我们在 DAT-Cre：Ai9 小鼠的纹状体或黑质中进行了类似的 AAV 注射，将 GFAP-RZFD-P65-HSF1 注射到小鼠的纹状体或黑质中，1.5 个月后取材分析(图 4D)。在 DAT-Cre：Ai9 小鼠中，只有成熟的多巴胺神经元能被标记上，而我们的研究发现在对照组小鼠的纹状体中是没有红色荧光标记的细胞。而注射了 GFAP-RZFD-P65-HSF1 的 DAT-Cre：Ai9 小鼠纹状体中有红色细胞产生，经过 NeuN 和 TH 染色，我们发现，这些有红色荧光信号的细胞表达神经元特异性标志物 NeuN，同时还表达多巴胺神经元特异性标志物 TH(图 4E)。这表明在胶质细胞中表达 RZFD-P65-HSF1 能将星形胶质细胞转分化为多巴胺神经元。

实施例 6. RZFD 将穆勒胶质细胞转分化为感光细胞和视网膜神经节细胞

[211] 为了研究 RZFD 在小鼠视网膜中的作用，我们将表达 NLS-RZFD-V1(SEQ ID NO: 3)的 AAV 注射到小鼠视网膜下，探索 RZFD 是否可以将视网膜中的穆勒胶质细胞转分化为其他类型的细胞。在 Ai9 小鼠中，通过视网膜下注射的方式，将表达 GFAP-EGFP-2A-Cre 的 AAV 递送至小鼠眼睛中。其中 GFAP-EGFP-2A-Cre 用于标记穆勒胶质细胞，在 GFAP 启动子作用下，Cre 特异性表达于穆勒胶质细胞中，解开 Ai9 小鼠的 LSL 序列，从而达到标记 Ai9 小鼠的穆勒胶质细胞的作用(图 5A)。首先，我们对 Ai9 小鼠进行 NMDA 造模，造模后进行 AAV 注射。在对照组中，注射 GFAP-EGFP-2A-Cre 后，标记穆勒胶质细胞没有明显的变形，也没有观察到穆勒胶质细胞以外的其他细胞被标记上(图 5B)。而在注射了表达 NLS-RZFD-V1 的 AAV 组(即：GFAP-RZFD)，在外颗粒细胞层观察到 tdTomato 阳性的感光细胞，而且观测到许多穆勒胶质细胞变形(图 5C)。利用感光细胞特异性蛋白标志物 Rhodopsin 和 Cone arrestin 进行染色，发现位于外颗粒层的 tdTomato 阳性细胞与 Rhodopsin 或 Cone arrestin(即 MCAR)共标(图 5H 和 5I)。这表明在穆勒胶质细胞中过表达 RZFD 能将其转分化为感光细胞。对感光细胞数量进行统计，发现在每个视野中感光细胞的平均数量大约为 8 个，而在对照组几乎没有观测到 tdTomato 阳性的感光细胞(图 5J)。为了检测过表达 RZFD 是否可以将穆勒胶质细胞转分化为视网膜神经节细胞，我们取注射后的小鼠视神经，并通过全组织封片扫描，发现在对照组中几乎没有 tdTomato 阳性的轴突，而在实验组中则有大量的 tdTomato 阳性轴突(图 5D 和 5E)。进一步对视网膜进行 Rbpms 染色，在对照组 tdTomato 阳性细胞全部位于内颗粒细胞层，在视网膜神经节细胞层无 tdTomato 阳性细胞，而在 RZFD 过表达组，则有部分 tdTomato 阳性细胞迁移到视网膜神经节细胞层，并且与视网膜神经节细胞特异性蛋白标志物 Rbpms 共标(图 5F 和 5G)。对视神经进行统计分析，发现每个视神经中有大于 50 条被 tdTomato 标记的轴突(图 5K)。这表明在穆勒胶质细胞中过表达 RZFD 也能将穆勒胶质细胞转分化为视网膜神经节细胞。综上，过表达 RZFD 不仅能将穆勒胶质细胞转分化为视网膜神经节细胞，而且还能转分化为感光细胞。

实施例 7. 过表达 miR-9 或 miR-124 不能将胶质细胞转分化为神经元

[212] 之前的研究表明敲低 Ptbp1 能将胶质细胞转分化为多巴胺神经元。敲低 Ptbp1 可以导致 miR-124 的表达量上调，而 miR-124 又被报道可以下调 REST 表达。为了研究 miR-124 是否可以有效降低 REST 的表达，我们在 293T 和 N2A 细胞中过表达 miR-124(核酸编码序列 SEQ ID NO: 31)，以验证 miR-124 过表达是否能有效降低 REST 蛋白的表达。

[213] 我们利用 AAV 载体，使用组织特异性启动子 GFAP 启动 miR-124 pri-miRNA (如 SEQ ID NO: 34 所示)的表达，pri-miRNA 表达后会在细胞内加工成 pre-miRNA(如 SEQ ID NO: 33 所示)，最后再加工成成熟的 miRNA(SEQ ID NO: 31 和 SEQ ID NO: 32)，从而实现组织特异性表达 miR-124。实验结果发现，过表达 miR-124 并不能高效降低 REST 的表达。

[214] 为了进一步研究，我们在胶质细胞中通过同样的方法，利用类似的 AAV 载体以组织特异性启动子 GFAP 启动 miR-124 的过表达，以验证其是否可以将胶质细胞转分化为神经元。对注射后的小鼠脑切片进行分析发现，过表达 miR-124 并不能将胶质细胞转分化为神经元(图 6A-D)。在对照组，红色荧光信号 mCherry 表达于胶质细胞中，并且不与神经元特异性标志物 NeuN 共标，在纹状体中也无 TH 阳性神经元(图 6C)。因此，仅通过上调 miR-124 不足以实现胶质细胞向多巴胺神经元的转分化。

[215] 之前的研究还表明 Ptbp2 能通过调节 miR-9 的表达，促进体外培养的成纤维细胞向神经元转分化。过表达 miR-9 能促进体外分化的神经元成熟。为了研究 miR-9 的过表达是否可以有效促进胶质细胞向多巴胺神经元的转分化。我们构建了 GFAP-miR-9 过表达的 AAV 载体，通过 AAV 将其递送到小鼠纹状体中，在 GFAP 启动子作用下， miR-9 pri-miRNA (如 SEQ ID NO: 38 所示)特异性表达于胶质细胞中，miR-9 pri-miRNA 表达后会在细胞内加工成 pre-miRNA(如 SEQ ID NO: 37 所示)，最后再加工成成熟的 miRNA(SEQ ID NO: 35 和 SEQ ID NO: 36)，从而实现组织特异性表达 miR-9。同时利用 GFAP-mCherry 来标记纹状体中的星形胶质细胞。

[216] 通过切片染色分析，发现过表达 miR-9 也不能促进胶质细胞向神经元转分化。与 miR-124 类似，虽然有胶质细胞发生了形态的改变，但过表达 miR-9 或 miR-124 都不能将星形胶质细胞转分化为神经元或多巴胺神经元。

实施例 8. miR-9 和 miR124 共同过表达能将胶质细胞转分化为神经元

[217] 之前在体外的研究表明，miR-124 与 miR-9 共同过表达，能促进干细胞向神经元分化，那么 miR-124 与 miR-9 共同过表达是否可以促进胶质细胞向神经元转分化，我们将 miR-9 和 miR124 用一个 GFAP 启动子进行驱动，并将其包装成 AAV，注射到小鼠纹状体中进行研究。我们惊奇地发现 miR-9 和 miR124 共同过表达能将胶质细胞转分化为神经元(图 7E)。进一步利用多巴胺特异性蛋白标志物 TH 进行染色，发现 miR-9 和 miR124 共同过表达虽然能将胶质细胞转分化为神经元，但不能将胶质细胞转分化为多巴胺神经元(图 7F)。

实施例 9. 使用 CasRx 在体外特异的敲低 Ctdsp1

[218] 之前的研究表明，敲低 Ctdsp1(氨基酸序列 SEQ ID NO:29，核酸序列 SEQ ID NO:30)的表达，能促进体外培养的成纤维细胞转分化为神经元。而之前的研究，采用的是 shRNA 敲低的方法。CasRx 介导的 RNA 编辑技术是新一代 RNA 敲低技术，其效率更高，而且特异性更强。为

了确定 CasRx 介导的 Ctdsp1 敲低效率，首先设计了靶向 **Ctdsp1** 的 gRNA，gRNA 靶向的区域为 Ctdsp1 基因 CDS 序列的第 318-347 位，并在在培养的人 293T 和小鼠 N2A 细胞中对它们的抑制效率进行了比较。对照组细胞转染的质粒为 CAG-CasRx-P2A-GFP 和 U6-nontarget-CMV-mCherry，实验组转染的质粒为 CAG-CasRx-P2A-GFP 和 U6-gRNA(Ctdsp1)-CMV-mCherry。转染后通过流式分选阳性细胞，并进行 QPCR 分析。结果表明，靶向 Ctdsp1 mRNA 的 gRNA 和 CasRx 共转染，可以在人 293T 和小鼠 N2A 细胞中高效敲低 Ctdsp1 的表达(图 8)。

实施例 10. 在星形胶质细胞中敲低 Ctdsp1 将胶质细胞转分化为神经元但不能产生多巴胺神经元

[219] 为了进一步在体内研究在星形胶质细胞中敲低 Ctdsp1 是否可以将胶质细胞转分化为神经元，我们构建了 GFAP-CasRx-gRNA(Ctdsp1)，同时以不含 gRNA 的 AAV 载体 GFAP-CasRx 为对照，并用 GFAP-mCherry 对胶质细胞进行标记(图 9A)。在注射 AAV 病毒后 1-2 个月切分分析，在对照组中，GFAP-mCherry 标记的星形胶质细胞依然保持着典型的胶质细胞形态，而且不与神经元特异性标志物 NeuN 共标(图 9B)。而在敲低 Ctdsp1 组，我们发现有一部分红色荧光信号表达的细胞表达 NeuN，这表明敲低 Ctdsp1 能将星形胶质细胞转分化为神经元(图 9C)。首次在体内环境中证明 Ctdsp1 可以作为在体星形胶质细胞向神经元转分化的靶点。进一步用多巴胺特异性蛋白标志物 TH 进行染色，发现敲低 Ctdsp1 并不能在体内将星形胶质细胞转分化为多巴胺神经元。

实施例 11. 在视网膜敲低 Ctdsp1 或过表达 miR-9 或 miR-124 不能将胶质细胞转分化为感光细胞或视网膜神经节细胞

[220] 为了在研究敲低 Ctdsp1 或过表达 miR-9 或 miR-124 是否可以将视网膜中的穆勒胶质细胞转分化为视网膜神经节细胞或感光细胞，我们将 GFAP-gRNA(Ctdsp1)或 miR-9 或 miR-124 或 miR-9 + miR-124 分别注射到 Ai9 小鼠视网膜中，并同时注射 GFAP-EGFP-2A-Cre 对穆勒胶质细胞进行标记，在注射后 1-2 个月进行分析，发现敲低 Ctdsp1 或过表达 miR-9 或 miR-124 或 miR-9 + miR-124 都不能将穆勒胶质细胞转分化为视网膜神经节细胞或感光细胞(图 10)。这些结果表明，单独过表达 miR-9 或 miR-124 不能将胶质细胞转分化为神经元，而敲低 Ctdsp1 或过表达 miR-9 + miR-124 能在大脑中将星形胶质细胞转分化为普通神经元，而不能产生特异类型的神经元，如多巴胺神经元、感光细胞和视网膜神经节细胞等。

[221] 序列信息

人 RZFD 氨基酸序列(SEQ ID NO: 1)

KTKPFRCKPCQYEAESEEQFVHHIRVHSAKKFFVEESAEKQAKARESGSSTAEEGDFSKGPIRCDRC
GYNTNRYDHYTAHLKHHTRAGDNERVYKCIICTYTTVSEYHWRKHLRNHFPRKVYTCGKCNYFSDRK
NNYVQHVRTHTGERPYKCELCPYSSSQKTHLTRHMRTHSGEKPFKCDQCSYVASNQHEVTRHARQVH
NGPKPLNCPHCDYKTADRSNFKKHVELHVNPRQFNCPVCDYAASKKCNLQYHFKSKHPTCPNKTM

人 RZFD 编码序列(SEQ ID NO: 2)

aagaccaaaccctttcgctgtaagccatgccaatatgaagcagaatctgaagaacagtttgtgcatcacatcagagttcacagtgctaagaaatttttttgtgg
aagagagtgcagagaagcaggcaaaagccagggaatctggctcttccactgcagaagagggagatttctccaagggccccattcgctgtgaccgctgcggct
acaatactaatcgatatgatcactatacagcacacctgaaacaccacaccagagctggggataatgagcgagtctacaagtgtatcatttgcacatacacaacagt

gagcgagtatcactggaggaaacatttaagaaaccattttccaaggaaagtatacacatgtggaaaatgcaactatttttcagacagaaaaaacaattatgttcagc
atgttagaactcatacaggagaacgcccatataaatgtgaactttgtccttactcaagttctcagaagactcatctaactagacatatgcgtactcattcaggtgaga
agccatttaaatgtgatcagtgcagttatgtggcctctaatcaacatgaagtaacccgccatgcaagacaggttcacaatgggcctaaacctcttaattgcccacac
tgtgattacaaaacagcagatagaagcaacttcaaaaaacatgtagagctacatgtgaacccacggcagttcaattgccctgtatgtgactatgcagcttccaaga
agtgtaatctacagtatcacttcaaatctaagcatcctacttgtcctaataaaacaatg

NLS-RZFD-V1 氨基酸序列(SEQ ID NO: 3)

MPKKKRKVGSGKTKPFRCKPCQYEAESEEQFVHHIRVHSAKKFFVEESAEKQAKARESGSSTAEEG
DFSKGPIRCDRCGYNTNRYDHYTAHLKHHTRAGDNERVYKCIICTYTTVSEYHWRKHLRNHFPRKVYT
CGKCNYFSDRKNNYVQHVRTHTGERPYKCELCPYSSSQKTHLTRHMRTHSGEKPFKCDQCSYVASNQH
EVTRHARQVHNGPKPLNCPHCDYKTADRSNFKKHVELHVNPRQFNCPVCDYAASKKCNLQYHFKSKH
PTCPNKTM

NLS-RZFD-V1 核苷酸酸序列(SEQ ID NO: 4)

atgCCTAAAAAGAAAAGAAAGGTGGGTTCTGGTaagaccaaaccctttcgctgtaagccatgccaatatgaagcagaatctga
agaacagtttgtgcatcacatcagagttcacagtgctaagaaatttttttgtggaagagagtgcagagaagcaggcaaaagccagggaatctggctcttccactgc
agaagagggagatttctccaagggccccattcgctgtgaccgctgcggctacaatactaatcgatatgatcactatacagcacacctgaaacaccacaccagag
ctggggataatgagcgagtctacaagtgtatcatttgcacatacacaacagtgagcgagtatcactggaggaaacatttaagaaaccattttccaaggaaagtata
cacatgtggaaaatgcaactatttttcagacagaaaaaacaattatgttcagcatgttagaactcatacaggagaacgcccatataaatgtgaactttgtccttactca
agttctcagaagactcatctaactagacatatgcgtactcattcaggtgagaagccatttaaatgtgatcagtgcagttatgtggcctctaatcaacatgaagtaacc
cgccatgcaagacaggttcacaatgggcctaaacctcttaattgcccacactgtgattacaaaacagcagatagaagcaacttcaaaaaacatgtagagctacat
gtgaacccacggcagttcaattgccctgtatgtgactatgcagcttccaagaagtgtaatctacagtatcacttcaaatctaagcatcctacttgtcctaataaaacaa
tg

NLS-RZFD-V2 的氨基酸序列(SEQ ID NO: 5)

MPKKKRKVGSGKTKPFRCKPCQYEAESEEQFVHHIRVHSAKKFFVEESAEKQAKARESGSSTAEEG
DFSKGPIRCDRCGYNTNRYDHYTAHLKHHTRAGDNERVYKCIICTYTTVSEYHWRKHLRNHFPRKVYT
CGKCNYFSDRKNNYVQHVRTHTGERPYKCELCPYSSSQKTHLTRHMRTHSGEKPFKCDQCSYVASNQH
EVTRHARQVHNGPKPLNCPHCDYKTADRSNFKKHVELHVNPRQFNCPVCDYAASKKCNLQYHFKSKH
PTCPNKTMGSGGGGSGGGGSRADALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDF
DLDMLYID

NLS-RZFD-V2 的核苷酸序列(SEQ ID NO: 6)

atgCCTAAAAAGAAAAGAAAGGTGGGTTCTGGTaagaccaaaccctttcgctgtaagccatgccaatatgaagcagaatctga
agaacagtttgtgcatcacatcagagttcacagtgctaagaaatttttttgtggaagagagtgcagagaagcaggcaaaagccagggaatctggctcttccactgc
agaagagggagatttctccaagggccccattcgctgtgaccgctgcggctacaatactaatcgatatgatcactatacagcacacctgaaacaccacaccagag
ctggggataatgagcgagtctacaagtgtatcatttgcacatacacaacagtgagcgagtatcactggaggaaacatttaagaaaccattttccaaggaaagtata
cacatgtggaaaatgcaactatttttcagacagaaaaaacaattatgttcagcatgttagaactcatacaggagaacgcccatataaatgtgaactttgtccttactca
agttctcagaagactcatctaactagacatatgcgtactcattcaggtgagaagccatttaaatgtgatcagtgcagttatgtggcctctaatcaacatgaagtaacc
cgccatgcaagacaggttcacaatgggcctaaacctcttaattgcccacactgtgattacaaaacagcagatagaagcaacttcaaaaaacatgtagagctacat
gtgaacccacggcagttcaattgccctgtatgtgactatgcagcttccaagaagtgtaatctacagtatcacttcaaatctaagcatcctacttgtcctaataaaacaa
tgGGTAGTGGCGGTGGTGGTTCAGGAGGCGGCGGAAGCCGCGCCGACGCGCTGGACGATTTCGATCT
CGACATGCTGGGTTCTGATGCCCTCGATGACTTTGACCTGGATATGTTGGGAAGCGACGCATTGGAT
GACTTTGATCTGGACATGCTCGGCTCCGATGCTCTGGACGATTTCGATCTCGATATGTTATATATCG
AT

VP64 氨基酸序列(SEQ ID NO: 7)

RADALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLYID

VP64 核苷酸序列(SEQ ID NO: 8)

CGCGCCGACGCGCTGGACGATTTCGATCTCGACATGCTGGGTTCTGATGCCCTCGATGACTTTG
ACCTGGATATGTTGGGAAGCGACGCATTGGATGACTTTGATCTGGACATGCTCGGCTCCGATGCTCT
GGACGATTTCGATCTCGATATGTTATATATCGAT

NLS-RZFD-V3 氨基酸序列(SEQ ID NO: 9)

MPKKKRKVGSGKTKPFRCKPCQYEAESEEQFVHHIRVHSAKKFFVEESAEKQAKARESGSSTAEEG
DFSKGPIRCDRCGYNTNRYDHYTAHLKHHTRAGDNERVYKCHCTYTTVSEYHWRKHLRNHFPRKVYT
CGKCNYFSDRKNNYVQHVRTHTGERPYKCELCPYSSSQKTHLTRHMRTHSGEKPFKCDQCSYVASNQH
EVTRHARQVHNGPKPLNCPHCDYKTADRSNFKKHVELHVNPRQFNCPVCDYAASKKCNLQYHFKSKH
PTCPNKTMGSGGGGSGGGGSRADALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDF
DLDMLYIDDYKLGSGGGGSGGGGSPSGQISNQALALAPSSAPVLAQTMVPSSAMVPLAQPPAPAPVLTP
GPPQSLSAPVPKSTQAGEGTLSEALLHLQFDADEDLGALLGNSTDPGVFTDLASVDNSEFQQLLNQGVS
MSHSTAEPMLMEYPEAITRLVTGSQRPPDPAPTPLGTSGLPNGLSGDEDFSSIADMDFSALLSQISSSGQG
GGGSGFSVDTSALLDLFSPSVTVPDMSLPDLDSSLASIQELLSPQEPPRPPEAENSSPDSGKQLVHYTAQP
LFLLDPGSVDTGSNDLPVLFELGEGSYFSEGDGFAEDPTISLLTGSEPPKAKDPTVSPKKKRKV

NLS-RZFD-V3 核苷酸序列(SEQ ID NO: 10)

atgCCTAAAAAGAAAAGAAAGGTGGGTTCTGGTaagaccaaaccctttcgctgtaagccatgccaatatgaagcagaatctga
agaacagtttgtgcatcacatcagagttcacagtgctaagaaatttttttgtggaagagagtgcagagaagcaggcaaaagccagggaatctggctcttccactgc
agaagagggagatttctccaagggccccattcgctgtgaccgctgcggctacaatactaatcgatatgatcactatacagcacacctgaaacaccacaccagag
ctggggataatgagcgagtctacaagtgtatcatttgcacatacacaacagtgagcgagtatcactggaggaaacatttaagaaaccattttccaaggaaagtata
cacatgtggaaaatgcaactatttttcagacagaaaaaacaattatgttcagcatgttagaactcatacaggagaacgcccatataaatgtgaacttgtccttactca
agttctcagaagactcatctaactagacatatgcgtactcattcaggtgagaagccatttaaatgtgatcagtgcagttatgtggcctctaatcaacatgaagtaacc
cgccatgcaagacaggttcacaatgggcctaaacctcttaattgcccacactgtgattacaaaacagcagatagaagcaacttcaaaaaacatgtagagctacat
gtgaacccacggcagttcaattgccctgtatgtgactatgcagcttccaagaagtgtaatctacagtatcacttcaaatctaagcatcctacttgtcctaataaaacaa
tgGGTAGTGGCGGTGGTGGTTCAGGAGGCGGCGGAAGCCGCGCCGACGCGCTGGACGATTTCGATCT
CGACATGCTGGGTTCTGATGCCCTCGATGACTTTGACCTGGATATGTTGGGAAGCGACGCATTGGAT
GACTTTGATCTGGACATGCTCGGCTCCGATGCTCTGGACGATTTCGATCTCGATATGTTATATATCG
ATGATTACAAGCTTGGTAGTGGCGGTGGTGGTTCAGGAGGCGGCGGAAGCCCTTCAGGGCAGATCA
GCAACCAGGCCCTGGCTCTGGCCCCTAGCTCCGCTCCAGTGCTGGCCCAGACTATGGTGCCCTCTAG
TGCTATGGTGCCTCTGGCCCAGCCACCTGCTCCAGCCCCTGTGCTGACCCCAGGACCACCCCAGTCA
CTGAGCGCTCCAGTGCCCAAGTCTACACAGGCCGGCGAGGGGACTCTGAGTGAAGCTCTGCTGCAC
CTGCAGTTCGACGCTGATGAGGACCTGGGAGCTCTGCTGGGGAACAGCACCGATCCCGGAGTGTTC
ACAGATCTGGCCTCCGTGGACAACTCTGAGTTTCAGCAGCTGCTGAATCAGGGCGTGTCCATGTCTC
ATAGTACAGCCGAACCAATGCTGATGGAGTACCCCGAAGCCATTACCCGGCTGGTGACCGGCAGCC
AGCGGCCCCCCGACCCCGCTCCAACTCCCCTGGGAACCAGCGGCCTGCCTAATGGGCTGTCCGGAG
ATGAAGACTTCTCAAGCATCGCTGATATGGACTTTAGTGCCCTGCTGTCACAGATTTCCTCTAGTGG
GCAGGGAGGAGGTGGAAGCGGCTTCAGCGTGGACACCAGTGCCCTGCTGGACCTGTTCAGCCCCTC
GGTGACCGTGCCCGACATGAGCCTGCCTGACCTTGACAGCAGCCTGGCCAGTATCCAAGAGCTCCT
GTCTCCCCAGGAGCCCCCCAGGCCTCCCGAGGCAGAGAACAGCAGCCCGGATTCAGGGAAGCAGCT
GGTGCACTACACAGCGCAGCCGCTGTTCCTGCTGGACCCCGGCTCCGTGGACACCGGGAGCAACGA
CCTGCCGGTGCTGTTTGAGCTGGGAGAGGGCTCCTACTTCTCCGAAGGGGACGGCTTCGCCGAGGA
CCCCACCATCTCCCTGCTGACAGGCTCGGAGCCTCCCAAAGCCAAGGACCCCACTGTCTCCCCCAAG
AAGAAGCGCAAGGTG

P65-HSF1 氨基酸序列(SEQ ID NO: 11)

PSGQISNQALALAPSSAPVLAQTMVPSSAMVPLAQPPAPAPVLTPGPPQSLSAPVPKSTQAGEGTLSE
ALLHLQFDADEDLGALLGNSTDPGVFTDLASVDNSEFQQLLNQGVSMSHSTAEPMLMEYPEAITRLVTG
SQRPPDPAPTPLGTSGLPNGLSGDEDFSSIADMDFSALLSQISSSGQGGGGSGFSVDTSALLDLFSPSVTVP
DMSLPDLDSSLASIQELLSPQEPPRPPEAENSSPDSGKQLVHYTAQPLFLLDPGSVDTGSNDLPVLFELGE
GSYFSEGDGFAEDPTISLLTGSEPPKAKDPTVS

P65-HSF1 核苷酸序列(SEQ ID NO: 12)

CCTTCAGGGCAGATCAGCAACCAGGCCCTGGCTCTGGCCCCTAGCTCCGCTCCAGTGCTGGCCC
AGACTATGGTGCCCTCTAGTGCTATGGTGCCTCTGGCCCAGCCACCTGCTCCAGCCCCTGTGCTGAC
CCCAGGACCACCCCAGTCACTGAGCGCTCCAGTGCCCAAGTCTACACAGGCCGGCGAGGGGACTCT
GAGTGAAGCTCTGCTGCACCTGCAGTTCGACGCTGATGAGGACCTGGGAGCTCTGCTGGGGAACAG
CACCGATCCCGGAGTGTTCACAGATCTGGCCTCCGTGGACAACTCTGAGTTTCAGCAGCTGCTGAAT
CAGGGCGTGTCCATGTCTCATAGTACAGCCGAACCAATGCTGATGGAGTACCCCGAAGCCATTACC
CGGCTGGTGACCGGCAGCCAGCGGCCCCCCGACCCCGCTCCAACTCCCCTGGGAACCAGCGGCCTG
CCTAATGGGCTGTCCGGAGATGAAGACTTCTCAAGCATCGCTGATATGGACTTTAGTGCCCTGCTGT
CACAGATTTCCTCTAGTGGGCAGGGAGGAGGTGGAAGCGGCTTCAGCGTGGACACCAGTGCCCTGC
TGGACCTGTTCAGCCCCTCGGTGACCGTGCCCGACATGAGCCTGCCTGACCTTGACAGCAGCCTGGC
CAGTATCCAAGAGCTCCTGTCTCCCCAGGAGCCCCCCAGGCCTCCCGAGGCAGAGAACAGCAGCCC

GGATTCAGGGAAGCAGCTGGTGCACTACACAGCGCAGCCGCTGTTCCTGCTGGACCCCGGCTCCGT
GGACACCGGGAGCAACGACCTGCCGGTGCTGTTTGAGCTGGGAGAGGGCTCCTACTTCTCCGAAGG
GGACGGCTTCGCCGAGGACCCCACCATCTCCCTGCTGACAGGCTCGGAGCCTCCCAAAGCCAAGGA
CCCCACTGTCTCC

BPNLS 氨基酸序列(SEQ ID NO: 13)

KRTADGSEFESPKKKRKV

BPNLS 核苷酸序列(SEQ ID NO: 14)

AAACGGACAGCCGATGGCAGCGAGTTCGAGAGCCCCAAGAAGAAGAGAAAGGTG

密码子优化 RZFD(SEQ ID NO: 15)

AAGACCAAGCCCTTCAGGTGTAAACCCTGCCAGTACGAGGCCGAGTCTGAGGAACAGTTTGTC
CACCACATCAGAGTGCACAGCGCTAAGAAATTCTTCGTTGAGGAATCTGCCGAGAAGCAGGCCAAG
GCCCGGGAAAGCGGCTCCAGTACAGCCGAAGAGGGCGACTTCAGCAAGGGCCCTATCCGGTGCGAC
AGATGTGGCTATAATACCAACAGATACGACCACTACACAGCGCACCTGAAGCACCACACCCGGGCC
GGCGACAACGAGAGAGTGTACAAGTGCATCATCTGCACCTACACCACAGTGTCCGAGTACCACTGG
CGGAAACATCTCAGAAACCACTTTCCAAGAAAGGTGTACACCTGCGGCAAGTGCAACTACTTCAGC
GACCGGAAGAACAACTACGTGCAGCACGTGCGGACACACACCGGCGAGAGACCTTATAAGTGTGA
ACTGTGCCCTTACAGCAGCAGCCAGAAAACTCACCTGACCCGCCACATGAGAACCCATAGCGGAGA
AAAGCCATTTAAGTGCGACCAGTGCAGCTACGTGGCCAGCAATCAACACGAGGTGACCAGACACGC
CAGACAGGTGCACAACGGCCCTAAGCCTCTGAACTGTCCCCACTGCGACTACAAAACCGCCGATCG
GAGCAACTTCAAGAAACACGTGGAACTGCACGTGAATCCTAGACAGTTCAACTGCCCCGTGTGCGA
TTACGCCGCCTCCAAGAAGTGTAACCTGCAATACCACTTCAAGAGCAAGCATCCTACATGCCCTAAC
AAGACCATG

人 REST N-端氨基酸序列(SEQ ID NO: 16)

MATQVMGQSSGGGGLFTSSGNIGMALPNDMYDLHDLSKAELAAPQLIMLANVALTGEVNGSCCD
YLVGEERQMAELMPVGDNNFSDSEEGEGLEESADIKGEPHGLENMELR

人 REST N-端核苷酸序列(SEQ ID NO: 17)

atggccacccaggtaatggggcagtcttctggaggaggagggctgtttaccagcagtggcaacattggaatggccctgcctaacgacatgtatgacttgc
atgacctttccaaagctgaactggccgcacctcagcttattatgctggcaaatgtggccttaactggggaagtaaatggcagctgctgtgattacctggtcggtgaa
gaaagacagatggcagaactgatgccggttggggataacaacttttcagatagtgaagaaggagaaggacttgaagagtctgctgatataaaaggtgaacctca
tggactggaaaacatggaactgaga

人 REST C-端氨基酸序列(SEQ ID NO: 18)

MDEGIHSHEGSDLSDNMSEGSDDSGLHGARPVPQESSRKNAKEALAVKAAKGDFVCIFCDRSFRKG
KDYSKHLNRHLVNVYYLEEAAQGQE

人 REST C-端核苷酸序列(SEQ ID NO: 19)

ATGgatgaaggcatccacagccatgaaggaagtgacctaagtgacaacatgtcagagggtagtgatgattctggattgcatggggctcggccagttcc
acaagaatctagcagaaaaaatgcaaaggaagccttggcagtcaaagcggctaagggagattttgtttgtatcttctgtgatcgttctttcagaaagggaaaagatt
acagcaaacacctcaatcgccatttggttaatgtgtactatcttgaagaagcagctcaagggcaggag

人 REST 全长氨基酸序列(SEQ ID NO: 20)

MATQVMGQSSGGGGLFTSSGNIGMALPNDMYDLHDLSKAELAAPQLIMLANVALTGEVNGSCCD
YLVGEERQMAELMPVGDNNFSDSEEGEGLEESADIKGEPHGLENMELRSLELSVVEPQPVFEASGAPDI
YSSNKDLPPETPGAEDKGKSSKTKPFRCKPCQYEAESEEQFVHHIRVHSAKKFFVEESAEKQAKARESGS
STAEEGDFSKGPIRCDRCGYNTNRYDHYTAHLKHHTRAGDNERVYKCIICTYTTVSEYHWRKHLRNHFP
RKVYTCGKCNYFSDRKNNYVQHVRTHTGERPYKCELCPYSSSQKTHLTRHMRTHSGEKPFKCDQCSYV
ASNQHEVTRHARQVHNGPKPLNCPHCDYKTADRSNFKKHVELHVNPRQFNCPVCDYAASKKCNLQYH
FKSKHPTCPNKTMDVSKVKLKKTKKREADLPDNITNEKTEIEQTKIKGDVAGKKNEKSVKAEKRDVSKE
KKPSNNVSVIQVTTRTRKSVTEVKEMDVHTGSNSEKFSKTKKSKRKLEVDSHSLHGPVNDEESSTKKKK
KVESKSKNNSQEVPKGDSKVEENKKQNTCMKKSTKKKTLKNKSSKKSSKPPQKEPVEKGSAQMDPPQ

MGPAPTEAVQKGPVQVEPPPPMEHAQMEGAQIRPAPDEPVQMEVVQEGPAQKELLPPVEPAQMVGAQI
VLAHMELPPPMETAQTEVAQMGPAPMEPAQMEVAQVESAPMQVVQKEPVQMELSPPMEVVQKEPVQI
ELSPPMEVVQKEPVKIELSPPIEVVQKEPVQMELSPPMGVVQKEPAQREPPPPREPPLHMEPISKKPPLRK
DKKEKSNMQSERARKEQVLIEVGLVPVKDSWLLKESVSTEDLSPPSPPLPKENLREEASGDQKLLNTGE
GNKEAPLQKVGAEEADESLPGLAANINESTHISSSGQNLNTPEGETLNGKHQTDSIVCEMKMDTDQNTR
ENLTGINSTVEEPVSPMLPPSAVEEREAVSKTALASPPATMAANESQEIDEDEGIHSHEGSDLSDNMSEGS
DDSGLHGARPVPQESSRKNAKEALAVKAAKGDFVCIFCDRSFRKGKDYSKHLNRHLVNVYYLEEAAQG
QE*

dCas9 氨基酸序列(SEQ ID NO: 21)

MAKRNYILGLAIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARRLKRRRRHRIQR
VKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTK
EQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLL
ETRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENE
KLEYYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIIENA
ELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSELTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIF
NRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSKDAQKMI
NEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIPRS
VSFDNSFNNKVLVKQEEASKKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDIN
RFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHH
AEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKY
SHRVDKKPNRKLINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLKKLINKSPEKLLMYHHDPQTYQK
LKLIMEQYGDEKNPLYKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKVVKL
SLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQAEFIASFYKNDLIKING
ELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENMNDKRPPHIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHP
QIIKKG

dspCas9 氨基酸序列(SEQ ID NO: 22)

MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRT
ARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYH
LRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVD
AKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDN
LLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKY
KEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGE
LHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASA
QSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNR
KVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFED
REMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLI
HDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARE
NQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSD
YDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKA
ERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFY
KVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNI
MNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPK
RNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLE
AKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDN
EQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAA
FKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD

dCas9-Krab 氨基酸序列(SEQ ID NO: 23)

MKRTADGSEFESPKKKRKVMDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNL
IGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPI
FGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQL
VQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLA
EDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHH
QDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLL
RKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSE
ETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAF
LSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDN

EENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTI
LDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVK
VMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQN
GRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQ
LLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVK
VITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI
AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQV
NIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVK
ELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKY
VNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPI
REQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDAKRTA
DGSEFESPKKKRKVAAADYKDDMGRVTFEDVTVNFTQGEWQRLNPEQRNLYRDVMLENYSNLVSVGQ
GETTKPDVILRLEQGKEPWLEEEEVLGSGRAEKNGDIGGQIWKPKDVKESLADYKDDDDK

dCas9-3xKrab 氨基酸序列(SEQ ID NO: 24)

MPKKKRKVGIHGVPAAKRNYILGLAIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRG
ARRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNV
NEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAY
HQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNA
LNDLNNLVITRDENEKLEYYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVY
HDIKDITARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSELTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLI
LDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIE
LAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLL
NNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEEASKKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRI
SKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRK
WKFKKERNKGYKHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETEQEYKEIFIT
PHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRKLINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLKKLINKSPE
KLLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDI
TDDYPNSRNKVVKLSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQAE
FIASFYKNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENMNDKRPPHIIKTIASKTQSIKKYSTDI
LGNLYEVKSKKHPQIIKKGKRPAATKKAGQAKKKKGSGSGGGGSGGGGSMGRVTFEDVTVNFTQGEW
QRLNPEQRNLYRDVMLENYSNLVSVGQGETTKPDVILRLEQGKEPWLEEEEVLGSGRAEKNGDIGGQI
WKPKDVKESLGGGGSMGRVTFEDVTVNFTQGEWQRLNPEQRNLYRDVMLENYSNLVSVGQGETTKPD
VILRLEQGKEPWLEEEEVLGSGRAEKNGDIGGQIWKPKDVKESLGGGGSMGRVTFEDVTVNFTQGEWQ
RLNPEQRNLYRDVMLENYSNLVSVGQGETTKPDVILRLEQGKEPWLEEEEVLGSGRAEKNGDIGGQIW
KPKDVKESLAAADYKDDDDK*

N-dCas9 氨基酸序列(SEQ ID NO: 25)

MPKKKRKVGIHGVPAAKRNYILGLAIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRG
ARRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNV
NEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAY
HQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNA
LNDLNNLVITRDENEKLEYYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVY
HDIKDITARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSELTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLI
LDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIE
LAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLL
NNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEEASKKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRI
SKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRK
WKFKKERNKGYKHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETEQEYKEIFIT
PHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRKLINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLKKLINKSPE
KLLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDI
TDDYPNSRNKVVKLSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQAE
FIASFYKNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENMNDKRPPHIIKTIASKTQSIKKYSTDI
LGNLYEVKSKKHPQIIKKGKRPAATKKAGQAKKKKGSMATQVMGQSSGGGGLFTSSGNIGMALPNDM
YDLHDLSKAELAAPQLIMLANVALTGEVNGSCCDYLVGEERQMAELMPVGDNNFSDSEEGEGLEESAD
IKGEPHGLENMELRGGGGSMATQVMGQSSGGGGLFTSSGNIGMALPNDMYDLHDLSKAELAAPQLIML
ANVALTGEVNGSCCDYLVGEERQMAELMPVGDNNFSDSEEGEGLEESADIKGEPHGLENMELRGGGGS
MATQVMGQSSGGGGLFTSSGNIGMALPNDMYDLHDLSKAELAAPQLIMLANVALTGEVNGSCCDYLV
GEERQMAELMPVGDNNFSDSEEGEGLEESADIKGEPHGLENMELRGSGGGGSGGGGSAAADYKDDDD
K*

3xN-dCas9 氨基酸序列(SEQ ID NO: 26)

MPKKKRKVGIHGVPAKKKKGSMATQVMGQSSGGGGLFTSSGNIGMALPNDMYDLHDLSKAELAA
PQLIMLANVALTGEVNGSCCDYLVGEERQMAELMPVGDNNFSDSEEGEGLEESADIKGEPHGLENMEL
RGGGGSMATQVMGQSSGGGGLFTSSGNIGMALPNDMYDLHDLSKAELAAPQLIMLANVALTGEVNGS
CCDYLVGEERQMAELMPVGDNNFSDSEEGEGLEESADIKGEPHGLENMELRGGGGSMATQVMGQSSG
GGGLFTSSGNIGMALPNDMYDLHDLSKAELAAPQLIMLANVALTGEVNGSCCDYLVGEERQMAELMP
VGDNNFSDSEEGEGLEESADIKGEPHGLENMELRGSGGGGSGGGGSAKRNYILGLAIGITSVGYGIIDYE
TRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARV
KGLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDG
EVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYE
MLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIA
KEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNS
ELTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFI
LSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAK
YLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEEASKKGNRTPF
QYLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLL
RSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVM
ENQMFEEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRKLINDTLYSTRKDDKGN
TLIVNNLNGLYDKDNDKLKKLINKSPEKLLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYKYYEETGNYLT
KYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKVVKLSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVI
KKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQAEFIASFYKNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYL
ENMNDKRPPHIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKGKRPAATKKAGQAKKKKGSAAAD
YKDDDDK*

3xN-dCas9-3xC 氨基酸序列(SEQ ID NO: 27)

MPKKKRKVGIHGVPAKKKKGSMATQVMGQSSGGGGLFTSSGNIGMALPNDMYDLHDLSKAELAA
PQLIMLANVALTGEVNGSCCDYLVGEERQMAELMPVGDNNFSDSEEGEGLEESADIKGEPHGLENMEL
RGGGGSMATQVMGQSSGGGGLFTSSGNIGMALPNDMYDLHDLSKAELAAPQLIMLANVALTGEVNGS
CCDYLVGEERQMAELMPVGDNNFSDSEEGEGLEESADIKGEPHGLENMELRGGGGSMATQVMGQSSG
GGGLFTSSGNIGMALPNDMYDLHDLSKAELAAPQLIMLANVALTGEVNGSCCDYLVGEERQMAELMP
VGDNNFSDSEEGEGLEESADIKGEPHGLENMELRGSGGGGSGGGGSAKRNYILGLAIGITSVGYGIIDYE
TRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARV
KGLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDG
EVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYE
MLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIA
KEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNS
ELTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFI
LSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAK
YLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEEASKKGNRTPF
QYLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLL
RSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVM
ENQMFEEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRKLINDTLYSTRKDDKGN
TLIVNNLNGLYDKDNDKLKKLINKSPEKLLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYKYYEETGNYLT
KYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKVVKLSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVI
KKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQAEFIASFYKNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYL
ENMNDKRPPHIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKGKRPAATKKAGQAKKKKGSAGSG
GGGSGGGGSMDEGIHSHEGSDLSDNMSEGSDDSGLHGARPVPQESSRKNAKEALAVKAAKGDFVCIFC
DRSFRKGKDYSKHLNRHLVNVYYLEEAAQGQEGGGGSMDEGIHSHEGSDLSDNMSEGSDDSGLHGAR
PVPQESSRKNAKEALAVKAAKGDFVCIFCDRSFRKGKDYSKHLNRHLVNVYYLEEAAQGQEGGGGSM
DEGIHSHEGSDLSDNMSEGSDDSGLHGARPVPQESSRKNAKEALAVKAAKGDFVCIFCDRSFRKGKDYS
KHLNRHLVNVYYLEEAAQGQEAAADYKDDDDK*

Krab 氨基酸序列(SEQ ID NO: 28)

MGRVTFEDVTVNFTQGEWQRLNPEQRNLYRDVMLENYSNLVSVGQGETTKPDVILRLEQGKEPWL
EEEEVLGSGRAEKNGDIGGQIWKPKDVKESL

Ctdsp1 的氨基酸序列(SEQ ID NO: 29)

MDSSAVITQISKEEARGPLRGKGDQKSAASQKPRSRGILHSLFCCVCRDDGEALPAHSGAPLLVEEN
GAIPKQTPVQYLLPEAKAQDSDKICVVIDLDETLVHSSFKPVNNADFIIPVEIDGVVHQVYVLKRPHVDEF
LQRMGELFECVLFTASLAKYADPVADLLDKWGAFRARLFRESCVFHRGNYVKDLSRLGRDLRRVLILD
NSPASYVFHPDNAVPVASWFDNMSDTELHDLLPFFEQLSRVDDVYSVLRQPRPGS*

Ctdsp1 的核酸序列(SEQ ID NO:30)

Atggacagctcggccgtcattactcagatcagcaaggaggaggctcggggcccgctgcggggcaaaggtgaccagaagtcagcagcttcccagaag
ccccgaagccggggcatcctccactcactcttctgctgtgtctgccgggatgatggggaggccctgcctgctcacagcggggcgcccctgcttgtggaggaga
atggcgccatccctaagcagaccccagtccaatacctgctccctgaggccaaggcccaggactcagacaagatctgcgtggtcatcgacctggacgagaccct
ggtgcacagctccttcaagccagtgaacaacgcggacttcatcatccctgtggagattgatgggtggtccaccaggtctacgtgttgaagcgtcctcacgtgga
tgagttcctgcagcgaatgggcgagctctttgaatgtgtgctgttcactgctagcctcgccaagtacgcagacccagtagctgacctgctggacaaatgggggc
cttccgggcccggctgtttcgagagtcctgcgtcttccaccgggggaactacgtgaaggacctgagccggttgggtcgagacctgcggcgggtgctcatcctg
gacaattcacctgcctcctatgtcttccatccagacaatgctgtaccggtggcctcgtggtttgacaacatgagtgacacagagctccacgacctcctccccttcttc
gagcaactcagccgtgtggacgacgtgtactcagtgctcaggcagccacggccagggagctag

人 miRNA-124 编码序列(SEQ ID NO:31)

5'-cgtgttcacagcggaccttgat-3'

人 miRNA-124* 编码序列(SEQ ID NO:32)

5'-taaggcacgcggtgaatgccaa-3'

人 miRNA-124 Pre-miRNA 全长(SEQ ID NO:33)

atcaagattagaggctctgctctccgtgttcacagcggaccttgatttaatgtcatacaattaaggcacgcggtgaatgccaagagcggagcctacggctg
cacttgaa

表达人 miRNA-124 Pri-miRNA 的序列(SEQ ID NO:34)

Gggtaattaacttggatccacgccgtcatttgaaaactagatttataggcttatgtatgttttttaggcgtgtgctgtaaatggcatggagatatatgcatatgtat
acgcaggcacacgcaccgtctacacttccacggaacagactaattaacagcggctctggcagatgtgtcagagatgagcagagacaggagctgggcttatgag
ttatgactctaggggtagagactcagagcggagagaggggatgggcagggagagaagagtggtaatcgcagtgggtcttatactttccggatcaagattaga
ggctctgctctccgtgttcacagcggaccttgatttaatgtcatacaattaaggcacgcggtgaatgccaagagcggagcctacggctgcacttgaaggacacca
aagcatctcagggtcagaaaggggaaaaagcaattgcagggaatttaggggtagtaaaaggaacccatctcttgccgcataaatgccccccaccccacccca
ggactgattctggaagcaacctagtgttcgaaagggaaaggctcctacttttccattacagccgcggaaatccgcaggcaaatctccgaggagaatttttagggaa
gcttcattgacagctgtctggagagcagtagttcccgcctgtgcaaatattccagagagttaaatcatttagaaagcactagtt

人 miRNA-9 编码序列

5'- tctttggttatctagctgtatga-3' (SEQ ID NO:35)

人 miRNA-9* 编码序列

5'- ataaagctagataaccgaaagt-3' (SEQ ID NO:36)

人 miRNA-9 Per-miRNA 全长 (SEQ ID NO:37)

Ggaggcccgtttctctctttggttatctagctgtatgagtgccacagagccgtcataaagctagataaccgaaagtagaaatgattctca

表达人 miRNA-9 Pri-miRNA 的序列为 (SEQ ID NO:38)

Agcgctccgcgcgggtgccctacgtgagccccgggacgccgtcgaggcaggccggcagcgccggtgccaggacgcacggaacggggagcaggg
gagaaatgcgccgggagggcgagggaggaagggaactgggcgggggctgcgggcctaggtggcgggagtcagcgtgtgcgtgtctgtccatccccctct
ggctctccgcgtgcgccccaggatccgggcacggcgtccgctcaggctcccgcgctcggcaggcagcagcacgtggagcccacggcgcggcagcggcac
tggctaagggaggcccgtttctctctttggttatctagctgtatgagtgccacagagccgtcataaagctagataaccgaaagtagaaatgattctcacaacttctgc
gtgcgagcgcccgccccaccgaccgccccggcccggcccgcaagagccagaggagccgagaggagcccagcgccggcccagcggactccagctcgac
ggagcggccgcgccccgaccaggtacctgacctcggctctctctctggggacacttgcagtgccagctttccccagtcctcctctttcctggtcccccaccct
atccccagcgccggagcaggaaccccaaagtggagcgggccggggagagggaggggttggggttgcagaggggtcgctggaagggg

长 GFAP 启动子(SEQ ID NO:39)

TAATCCCACCTCCCTCTCTGTGCTGGGACTCACAGAGGGAGACCTCAGGAGGCAGTCTGTCCAT
CACATGTCCAAATGCAGAGCATACCCTGGGCTGGGCGCAGTGGCGCACAACTGTAATTCCAGCACT
TTGGGAGGCTGATGTGGAAGGATCACTTGAGCCCAGAAGTTCTAGACCAGCCTGGGCAACATGGCA
AGACCCTATCTCTACAAAAAAAGTTAAAAAATCAGCCACGTGTGGTGACACACACCTGTAGTCCCA
GCTATTCAGGAGGCTGAGGTGAGGGGATCACTTAAGGCTGGGAGGTTGAGGCTGCAGTGAGTCGTG
GTTGCGCCACTGCACTCCAGCCTGGGCAACAGTGAGACCCTGTCTCAAAAGACAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAGAACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGCCTG
AGCTGGCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGCAAGCAGACCTGGCAGCA
TTGGGCTGGCCGCCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCCCAGTGAATGACTCACCTTGGCACAGACACA
ATGTTCGGGGTGGGCACAGTGCCTGCTTCCCGCCGCACCCCAGCCCCCCTCAAATGCCTTCCGAGAA
GCCCATTGAGCAGGGGGCTTGCATTGCACCCCAGCCTGACAGCCTGGCATCTTGGGATAAAAGCAG
CACAGCCCCCTAGGGGCTGCCCTTGCTGTGTGGCGCCACCGGCGGTGGAGAACAAGGCTCTATTCA
GCCTGTGCCCAGGAAAGGGGATCAGGGGATGCCCAGGCATGGACAGTGGGTGGCAGGGGGGGAGA
GGAGGGCTGTCTGCTTCCCAGAAGTCCAAGGACACAAATGGGTGAGGGGACTGGGCAGGGTTCTGA
CCCTGTGGGACCAGAGTGGAGGGCGTAGATGGACCTGAAGTCTCCAGGGACAACAGGGCCCAGGTC
TCAGGCTCCTAGTTGGGCCCAGTGGCTCCAGCGTTTCCAAACCCATCCATCCCCAGAGGTTCTTCCC
ATCTCTCCAGGCTGATGTGTGGGAACTCGAGGAAATAAATCTCCAGTGGGAGACGGAGGGGTGGCC
AGGGAAACGGGGCGCTGCAGGAATAAAGACGAGCCAGCACAGCCAGCTCATGTGTAACGGCTTTGT
GGAGCTGTCAAGGCCTGGTCTCTGGGAGAGAGGCACAGGGAGGCCAGACAAGGAAGGGGTGACCT
GGAGGGACAGATCCAGGGGCTAAAGTCCTGATAAGGCAAGAGAGTGCCGGCCCCCTCTTGCCCTAT
CAGGACCTCCACTGCCACATAGAGGCCATGATTGACCCTTAGACAAAGGGCTGGTGTCCAATCCCA
GCCCCCAGCCCCAGAACTCCAGGGAATGAATGGGCAGAGAGCAGGAATGTGGGACATCTGTGTTCA
AGGGAAGGACTCCAGGAGTCTGCTGGGAATGAGGCCTAGTAGGAAATGAGGTGGCCCTTGAGGGT
ACAGAACAGGTTCATTCTTCGCCAAATTCCCAGCACCTTGCAGGCACTTACAGCTGAGTGAGATAAT
GCCTGGGTTATGAAATCAAAAAGTTGGAAAGCAGGTCAGAGGTCATCTGGTACAGCCCTTCCTTCCC
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGAGACAAGGTCTCTCTCTGTTGCCCAGGCTGGAGTGGCGCAAACACAG
CTCACTGCAGCCTCAACCTACTGGGCTCAAGCAATCCTCCAGCCTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGAT
TACAAGCATGAGCCACCCCACTCAGCCCTTTCCTTCCTTTTTAATTGATGCATAATAATTGTAAGTAT
TCATCATGGTCCAACCAACCCTTTCTTGACCCACCTTCCTAGAGAGAGGGTCCTCTTGCTTCAGCGG
TCAGGGCCCCAGACCCATGGTCTGGCTCCAGGTACCACCTGCCTCATGCAGGAGTTGGCGTGCCCAG
GAAGCTCTGCCTCTGGGCACAGTGACCTCAGTGGGGTGAGGGGAGCTCTCCCCATAGCTGGGCTGC
GGCCCAACCCCACCCCCTCAGGCTATGCCAGGGGGTGTTGCCAGGGGCACCCGGGCATCGCCAGTC
TAGCCCACTCCTTCATAAAGCCCTCGCATCCCAGGAGCGAGCAGAGCCAGAGCAGGTTGGAGAGGA
GACGCATCACCTCCGCTGCTCGCGG

短 GFAP 启动子(SEQ ID NO: 40)

AACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGCCTGAGCTGGCTCTG
TGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGCAAGCAGACCTGGCAGCATTGGGCTGGCC
GCCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCCCAGTGAATGACTCACCTTGGCACAGACACAATGTTCGGGGT
GGGCACAGTGCCTGCTTCCCGCCGCACCCCAGCCCCCCTCAAATGCCTTCCGAGAAGCCCATTGAGC
AGGGGGCTTGCATTGCACCCCAGCCTGACAGCCTGGCATCTTGGGATAAAAGCAGCACAGCCCCCT
AGGGGCTGCCCTTGCTGTGTGGCGCCACCGGCGGTGGAGAACAAGGCTCTATTCAGCCTGTGCCCA
GGAAAGGGGATCAGGGGATGCCCAGGCATGGACAGTGGGTGGCAGGGGGGGAGAGGAGGGCTGTC
TGCTTCCCAGAAGTCCAAGGACACAAATGGGTGAGGGGAGAGCTCTCCCCATAGCTGGGCTGCGGC
CCAaccccacccccteaggctatgccaggggggtgttgccaggggcacccgggcatcgccagtctagcccactccttcataaagccctcgcatcccaggagc
gagcagagccagagcaggttggagaggagacgcatcacctccgctgctcgc

权 利 要 求

1 在个体体内将非神经元细胞转分化为功能性神经元的方法，其包括向所述个体施用能够降低 REST 与 RE1/NRSE 元件的结合、或者降低 REST 的量或活性的活性物质。

2 一种在有需要的个体体内预防和/或治疗与神经元功能缺失或死亡相关的疾病的方法，所述方法包括向所述个体中受所述疾病影响的部位施用治疗有效剂量的能够降低 REST 与 RE1/NRSE 元件的结合、或者降低 REST 的量或活性的活性物质，以将受所述疾病影响部位的非神经元细胞转分化为功能性神经元。

3 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其中所述功能性神经元包括多巴胺神经元、视网膜神经节细胞、感光细胞和耳蜗螺旋神经节细胞、GABA 神经元、5-HT 神经元、谷氨酸能神经元、ChAT 神经元、NE 神经元、运动神经元、脊髓神经元、脊髓运动神经元、脊髓感觉神经元、双极细胞、水平细胞、无长突细胞、锥体神经元、中间神经元、中型多棘神经元(MSN)、浦肯野细胞、颗粒细胞、嗅感觉神经元、球周细胞或其任意组合。

4 如前述任一权利要求所述的方法，所述功能性神经元表达 NeuN 基因。

5 如前述任一权利要求所述的方法，所述功能性神经元具有轴突。

6 如前述任一权利要求所述的方法，其中所述功能性神经元包括多巴胺神经元、视网膜神经节细胞、感光细胞或耳蜗螺旋神经节细胞。

7 如权利要求 6 所述的方法，所述多巴胺神经元表达一种或多种选自下组的标志物：酪氨酸羟化酶(TH)、FoxA2、Nurr1、Pitx3、Vmat2 和 DAT。

8 如权利要求 6 所述的方法，所述多巴胺神经元表达 NeuN，TH，和 DAT。

9 如权利要求 6 所述的方法，其中所述视网膜神经节细胞表达一种或多种选自下组的标志物：RBPMS、Pax6、Brn3a、Brn3b、Brn3c、和 Map2。

10 如权利要求 6 所述的方法，所述感光细胞表达一种或多种选自下组的标志物：Rhodopsin、mCAR、m-opsin 和 S-opsin。

11 如权利要求 6 所述的方法，所述耳蜗螺旋神经节细胞表达一种或多种选自下组的标志物 NeuN，Prox1，Tuj-1 和 Map2。

12 如前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述非神经元细胞包括胶质细胞、成纤维细胞、干细胞、神经前体细胞、或神经干细胞。

13 如权利要求 12 所述的方法，其中所述胶质细胞选自星形胶质细胞、少突胶质细胞、室管膜细胞、施万细胞、NG2 细胞、卫星细胞、穆勒胶质细胞、内耳神经胶质细胞和其任意组合。

14 如权利要求 13 所述的方法，其中所述胶质细胞选自星形胶质细胞、穆勒胶质细胞和耳蜗神经胶质细胞。

15 如权利要求 12-14 任一所述的方法，其中所述胶质细胞位于脑、脊髓、眼或耳。

16 如权利要求 15 所述的方法，其中所述胶质细胞位于脑的纹状体、黑质、中脑腹侧被盖区、延髓、下丘脑、背侧中脑或大脑皮层。

17 如前述任一权利要求所述的方法，其中所述活性物质被局部施用至所述个体体内的以下一个或多个部位的胶质细胞：i)纹状体中的胶质细胞；ii)大脑黑质中的胶质细胞；iii)视网膜中的胶质细胞；iv)内耳中的胶质细胞；v)脊髓中的胶质细胞；vi)前额皮质中的胶质细胞；vii)运动皮质中的胶质细胞；viii)下丘脑中的胶质细胞；以及 ix)腹侧被盖区(VTA)中的胶质细胞。

18 如前述任一权利要求所述的方法，其中所述胶质细胞包括星形胶质细胞，且所述功能性神经元

包括多巴胺神经元细胞。

19 如权利要求 18 所述的方法，其中所述星形胶质细胞位于纹状体和/或黑质。

20 如权利要求 1-17 任一所述的方法，其中所述胶质细胞包括穆勒胶质细胞，且所述功能性神经元细胞包括视网膜神经节细胞(RGC)和/或感光细胞。

21 如权利要求 20 所述的方法，其中所述穆勒胶质细胞位于视网膜下或玻璃体腔。

22 如权利要求 1-17 任一所述的方法，其中所述胶质细胞包括耳蜗神经胶质细胞，且所述功能性神经元细胞包括耳蜗螺旋神经节细胞。

23 如权利要求 22 所述的方法，其中所述耳蜗神经胶质细胞位于内耳。

24 如前述任一权利要求所述的方法，其中所述活性物质施用后达到的所述胶质细胞转分化为功能性神经元的转分化效率为至少 1%，或至少 10%、20%、30%、40%或 50%。

25 如前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述活性物质包括 RE1/NRSE 元件阻断剂，其能够与 RE1/NRSE 元件结合来阻断 REST 与 RE1/NRSE 元件的结合。

26 如权利要求 25 所述的方法，其中所述 RE1/NRSE 元件阻断剂包含与 REST 竞争结合 RE1 的小分子化合物、核酸、或核酸类似物。

27 如权利要求 25 所述的方法，其中所述 RE1/NRSE 元件阻断剂包含与 REST 竞争结合 RE1 的蛋白或编码所述蛋白的核酸。

28 如权利要求 27 所述的方法，其中所述与 REST 竞争结合 RE1 的蛋白包含 REST 变体。

29 如权利要求 28 所述的方法，其中所述 REST 变体包含 REST 的 DNA 结合结构域，但缺失 REST 的 N-末端和/或 C-末端抑制结构域。

30 如权利要求 28 或 29 所述的方法，其中所述 REST 变体包含 REST 的第 155-420 位氨基酸，但缺失 REST 的 N-末端和/或 C-末端抑制结构域。

31 如权利要求 28-30 任一所述的方法，其中所述 REST 变体具有 SEQ ID NO:1, 3, 5 或者 9 的氨基酸序列，或者与其具有至少 70%、60%、或者 50%同一性百分比的序列。

32 如权利要求 27 所述的方法，其中所述 RE1/NRSE 元件阻断剂包含编码如权利要求 28-31 任一所述的 REST 变体的核酸，所述编码所述 REST 变体的核酸具有 SEQ ID NO:2, 4, 6 或 10 的核苷酸序列，或者与其具有至少 70%、60%、或者 50%同一性百分比的序列。

33 如权利要求 32 所述的方法，其中所述编码所述 REST 变体的核酸是密码子优化的，可选地具有 SEQ ID NO: 15 的核苷酸序列，或者与其具有至少 70%、60%、或者 50%同一性百分比的序列。

34 如权利要求 28-31 所述的方法，其中所述 REST 变体进一步包含与所述 REST 的 DNA 结合结构域融合的激活结构域。

35 如权利要求 34 所述的方法，其中所述激活结构域包含表观遗传修饰蛋白或者基因激活调控元件，可选地，所述激活结构域包括 VP64、P65-HSF1、VP16、RTA、Suntag、P300、CBP 或其任意组合，可选地，所述激活结构域包括 VP64 或 P65-HSF1。

36 如权利要求 28- 35 任一所述的方法，其中所述 REST 变体与一个或多个核定位信号序列融合。

37 如权利要求 36 所述的方法，其中至少一个所述核定位信号序列与所述 REST 变体的 N-末端融合。

38 如权利要求 36 或 37 所述的方法，其中至少一个所述核定位信号序列与所述 REST 变体的 C-末端融合。

39 如权利要求 36-38 任一所述的方法，其中至少一个所述核定位信号序列分别与所述 REST 变体的 N-末端和 C-末端融合。

40 如权利要求 36-39 任一所述的方法，其中所述核定位信号序列包含选自下组的氨基酸序列序列：SEQ ID NOs: 13, 41-58。

41 如前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述个体是人或动物。

42 如权利要求 41 所述的方法，其中所述动物是非人灵长类动物、大鼠或小鼠。

43 如权利要求 2 所述的方法，其中所述与神经元功能缺失或死亡相关的疾病选自：帕金森病、阿尔茨海默病、脑卒中(中风)、精神分裂症、亨廷顿舞蹈症、抑郁症、运动神经元病、肌萎缩性侧索硬化、脊髓性肌萎缩症、Pick 病、睡眠失调、癫痫、共济失调、RGC 细胞死亡导致的视力损伤、青光眼、年龄相关的 RGC 病变、视神经损伤、视网膜缺血或出血、Leber 遗传性视神经病变、损伤或退行性病变导致的感光细胞变性或死亡、黄斑变性、视网膜色素变性、糖尿病有关的失明、夜盲症、色盲、遗传性失明、先天性黑蒙症、螺旋神经节细胞死亡导致的耳聋或听觉减退，和其任意组合。

44 一种 REST 变体，其包含 REST 的 DNA 结合结构域，但缺失 REST 的 N-末端和/或 C-末端抑制结构域。

45 如权利要求 44 所述的 REST 变体，其包含 REST 的第 155-420 位氨基酸，但缺失 REST 的 N-末端和/或 C-末端抑制结构域。

46 如权利要求 44 或 45 所述的 REST 变体，其具有 SEQ ID NO:1, 3, 5 或者 9 的氨基酸序列，或者与其具有至少 70%、60%、或者 50%同一性百分比的序列。

47 如权利要求 44-46 任一所述的 REST 变体，其由具有 SEQ ID NO:2, 4, 6 或 10 的核苷酸序列，或者与其具有至少 70%、60%、或 50%同一性百分比的序列编码得到。

48 如权利要求 44-47 任一所述的 REST 变体，其进一步包含与所述 REST 的 DNA 结合结构域融合的激活结构域。

49 如权利要求 48 所述的 REST 变体，其中所述激活结构域包含表观遗传修饰蛋白或者基因激活调控元件，可选地，所述激活结构域包括 VP64、P65-HSF1、VP16、RTA、Suntag、P300、CBP 或其任意组合，可选地，所述激活结构域包括 VP64 或 P65-HSF1。

50 如权利要求 44-49 任一所述的 REST 变体，其与一个或多个核定位信号序列融合。

51 如权利要求 50 所述的 REST 变体，其中至少一个所述核定位信号序列与所述 REST 变体的 N-末端融合。

52 如权利要求 50 或 51 所述的 REST 变体，其中至少一个所述核定位信号序列与所述 REST 变体的 C-末端融合。

53 如权利要求 50-52 任一所述的 REST 变体，其中至少一个所述核定位信号序列分别与所述 REST 变体的 N-末端和-C 末端融合。

54 如权利要求 50-53 任一所述的 REST 变体，其中所述核定位信号序列包含 SEQ ID NO：13 所示的氨基酸序列。

55 一种多核苷酸，包含编码如权利要求 44-54 任一所述的 REST 变体的核酸序列。

56 一种表达载体，其包含如权利要求 55 所述的多核苷酸，以及可选地进一步包含与所述多核苷酸可操作地连接的启动子。

57 如权利要求 56 所述的表达载体，其中所述启动子是胶质细胞特异性启动子。

58 如权利要求 57 所述的表达载体，所述胶质细胞特异性启动子是星形胶质细胞特异性启动子或穆勒胶质细胞(MG)细胞特异性启动子。

59 如权利要求 57 或 58 所述的表达载体，所述胶质细胞特异性启动子选自 GFAP 启动子、ALDH1L1 启动子、EAAT1/GLAST 启动子、谷氨酰胺合成酶启动子、S100β 启动子 EAAT2/GLT-1 启动子和 Rlbp1 启动子，优选 GFAP 启动子。

60 如权利要求 57-59 任一所述的表达载体，所述胶质细胞特异性启动子是耳蜗神经胶质细胞特异性启动子。

61 如权利要求 60 所述的表达载体，所述耳蜗神经胶质细胞特异性启动子选自下组：GFAP 启动子、ALDH1L1 启动子、EAAT1/GLAST 启动子和 Plp1 启动子。

62 一种药物组合物，其包含如权利要求 44-54 任一所述的 REST 变体或如权利要求 55 所述的多核苷酸或如权利要求 56-60 任一所述的表达载体，和药学上可以接受的载体。

63 如权利要求 62 所述的药物组合物，其进一步包含用于递送所述多核苷酸的运载体，其中所述运载体包含病毒载体、脂质体、纳米颗粒、外泌体、或类病毒颗粒。

64 如权利要求 63 所述的药物组合物，其中所述病毒载体包括重组腺相关病毒载体(rAAV)、腺相关病毒(AAV)载体、腺病毒载体、慢病毒载体、逆转录病毒载体、痘病毒载体、疱疹病毒、SV40 病毒载体、或其任意组合，其中优选 AAV 或 rAAV。

65 如权利要求 62-64 任一所述的药物组合物，其适用于局部施用至以下一个或多个部位的胶质细胞：i)纹状体中的胶质细胞；ii)大脑黑质中的胶质细胞；iii)视网膜中的胶质细胞；iv)内耳中的胶质细胞；v)脊髓中的胶质细胞；vi)前额皮质中的胶质细胞；vii)运动皮质中的胶质细胞；viii)下丘脑中的胶质细胞；以及 ix)腹侧被盖区(VTA)中的胶质细胞。

66 如权利要求 62-65 任一所述的药物组合物，其适用于颅内给药或眼内给药。

67 如权利要求 62-66 任一所述的药物组合物，其还包含 i)一种或多种多巴胺神经元相关因子，或 ii)用于穆勒胶质细胞中表达一种或更多种视网膜神经节细胞相关因子，

1)其中所述一种或多种多巴胺神经元相关因子选自：FoxA2、Lmx1a、Lmx1b、Nurr1、Pbx1a、Pitx3、Gata2、Gata3、FGF8、BMP、En1、En2、PET1、Pax 家族蛋白(Pax3、Pax6 等)、SHH、Wnt 家族蛋白，TGF-β 家族蛋白，和其任意组合；

2)其中所述一种或多种视网膜神经节细胞相关因子选自：β-catenin、Oct4、Sox2、Klf4、Crx、aCamKII、Brn3a、Brn3b、Brn3C、Math5、Otx2、Ngn2、Ngn1、AscL1、miRNA9、miRNA-124、Nr2e3，Nrl，和其任意组合。

68 一种药盒或试剂盒，其包含如权利要求 62-67 任一所述的药物组合物。

69 一种融合蛋白，其包含 DNA 结合蛋白融合于一个或多个 REST 的抑制结构域。

70 一种组合物，其包含 a) DNA 结合蛋白和 b) 包含一个或多个 REST 的抑制结构域的蛋白，其中所述 a)和 b)能够结合形成蛋白复合物。

71 如权利要求 70 所述的组合物，其中所述 a)和 b) 分别与一对自组装配体连接，所述自组装配体可以相互结合。

72 如权利要求 71 所述的组合物，其中所述一对自组装配体可以选自下组：i) 相互结合的两个蛋白结构域(例如，抗原和抗体；或者抗原和抗体中的抗原结合片段)；和 ii) RNA 剪切供体和剪切受体。

73 如权利要求 69 所述的融合蛋白或如权利要求 70 所述的组合物，其中所述一个或多个 REST 的抑制结构域包含 REST 的 N-末端抑制区域和/或 REST 的 C-末端抑制区域。

74 如权利要求 69 所述的融合蛋白或如权利要求 70 所述的组合物，其中所述一个或多个 REST 的

抑制结构域来源于人 REST 蛋白或者动物 REST 蛋白。

75 如权利要求 73 所述的融合蛋白或组合物，其中所述 REST 的 N-末端抑制区域包含 REST 的第 1-83 位氨基酸或其中具有转录抑制活性的片段。

76 如权利要求 73 或 75 所述的融合蛋白或组合物，其中所述 REST 的 N-末端抑制区域包含如 SEQ ID NO: 16 所示的序列或其中具有转录抑制活性的片段。

77 如权利要求 73 所述的融合蛋白或组合物，其中所述 REST 的 C-末端抑制区域包含 REST 的第 1008-1097 位氨基酸或其中具有转录抑制活性的片段。

78 如权利要求 73 或 77 所述的融合蛋白或组合物，其中所述 REST 的 C-末端抑制区域包含如 SEQ ID NO: 18 所示的序列或其中具有转录抑制活性的片段。

79 如权利要求 75-78 任一所述的融合蛋白或组合物，其中所述具有转录抑制活性的片段包含 REST 蛋白上的至少连续 20 个氨基酸、连续 30 个氨基酸、连续 40 个氨基酸、或者连续 50 个氨基酸的片段。

80 如权利要求 68-79 任一所述的融合蛋白或组合物，其中所述 DNA 结合蛋白选自序列引导的 DNA 结合蛋白、转录激活因子样效应因子核酸酶(TALEN)，锌指核酶(ZFN)、或转录因子中的 DNA 结合部分。

81 如权利要求 80 所述的融合蛋白或组合物，其中所述序列引导的 DNA 结合蛋白是 CRISPR-Cas 蛋白或其变体。

82 如权利要求 81 所述的融合蛋白或组合物，其中所述 CRISPR-Cas 蛋白变体不具有核酸酶活性。

83 如权利要求 80-82 任一所述的融合蛋白或组合物，其中所述序列引导的 DNA 结合蛋白是 Cas9 蛋白或不具有核酸酶活性的 Cas9 变体。

84 如权利要求 80-82 任一所述的融合蛋白或组合物，其中所述序列引导的 DNA 结合蛋白是 Cas12 蛋白或不具有核酸酶活性的 Cas12 变体。

85 如权利要求 73，75 或 76 任一所述的融合蛋白或组合物，其中至少一个所述 REST 的 N-末端抑制区域连接于所述 DNA 结合蛋白的 N-末端或 C-末端。

86 如权利要求 73，77 或 78 任一所述的融合蛋白或组合物，其中至少一个所述 REST 的 C-末端抑制区域连接于所述 DNA 结合蛋白的 N-末端或 C-末端。

87 如权利要求 73，75 或 76 任一所述的融合蛋白或组合物，其包含与所述 DNA 结合蛋白的 N-末端或 C-末端连接的至少一个串联的所述 REST 的 N-末端抑制区域。

88 如权利要求 73，77 或 78 任一所述的融合蛋白或组合物，其包含与所述 DNA 结合蛋白的 N-末端或 C-末端连接的至少一个串联的所述 REST 的 C-末端抑制区域。

89 如权利要求 69-88 任一所述的融合蛋白或组合物，其包含如 SEQ ID NO: 25-27 所示的氨基酸序列。

90 一种多核苷酸，其编码如权利要求 69-89 任一所述的融合蛋白或组合物。

91 如权利要求 90 所述的多核苷酸，其包含编码 DNA 结合蛋白的第一多核苷酸片段和编码包含一个或多个 REST 的抑制结构域的蛋白的第二多核苷酸片段。

92 如权利要求 91 所述的多核苷酸，其中所述第一多核苷酸片段与第二多核苷酸片段通过一个可自剪切的第三核苷酸片段连接。

93 一种在细胞中抑制目标基因表达的方法，包括向所述细胞递送如权利要求 69-89 任一所述的融合蛋白或组合物，或如权利要求 90-92 任一所述的多核苷酸，其中所述 DNA 结合蛋白能够结合所

述目标基因或其调控序列，并抑制所述目标基因的表达。

94 一种在个体中抑制目标基因表达的方法，包括向所述个体递送如权利要求 69-89 任一所述的融合蛋白或组合物，或如权利要求 90-92 任一所述的多核苷酸，其中所述 DNA 结合蛋白能够结合所述目标基因或其调控序列，并抑制所述目标基因的表达。

95 如权利要求 93 或 94 所述的方法，其中所述 DNA 结合蛋白选自序列引导的 DNA 结合蛋白、转录激活因子样效应因子核酸酶(TALEN)，锌指核酶(ZFN)、或转录因子中的 DNA 结合部分。

96 如权利要求 95 任一所述的方法，其中所述序列引导的 DNA 结合蛋白是 CRISPR-Cas 蛋白或其变体。

97 如权利要求 96 所述的方法，其中所述 CRISPR-Cas 蛋白变体不具有核酸酶活性。

98 如权利要求 95-97 任一所述的方法，其中所述序列引导的 DNA 结合蛋白是 Cas9 蛋白或不具有核酸酶活性的 Cas9 变体。

99 如权利要求 95-97 任一所述的方法，其中所述序列引导的 DNA 结合蛋白是 Cas12 蛋白或不具有核酸酶活性的 Cas12 变体。

100 如权利要求 93-99 任一所述的方法，其中所述方法进一步包括向所述细胞或所述个体递送向导 RNA，其包含与目标基因或其调控序列的靶区域互补的靶向序列，以及与所述 DNA 结合蛋白结合的序列。