

doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2016.04.04

心脏肌球蛋白结合蛋白 C 的生物信息学分析

任晨霞,麻丽霞

(山西省高等学校血脂代谢与血液病重点实验室(长治医学院),山西 长治 046000)

摘要: *MYBPC3* 基因突变是家族性肥厚型心肌病的原因之一。本文对心脏肌球蛋白结合蛋白 C 基因 (cardiac myosin binding protein C, *MYBPC3*) 及其编码蛋白 (cMyBP-C) 进行生物信息学分析。运用生物信息学相关数据库和在线生物学软件分析 *MYBPC3* 基因的结构与突变位点,对 cMyBP-C 蛋白分子物种间的序列同源性、蛋白质空间结构、理化性质、组织特异性、蛋白质翻译后修饰、蛋白质相互作用网络进行分析。结果表明人 *MYBPC3* 基因 mRNA 全长为 4 217 bp, 编码区为 3 825 bp, *MYBPC3* 基因编码 1 274 个氨基酸组成的多肽,与物种进化程度一致,属于免疫球蛋白超家族,是酸性亲水蛋白,稳定性不高,其主要二级结构元件为随机卷曲。与 cMyBP-C 存在相互作用的基因和蛋白主要是磷酸激酶与肌小节组成成分。本文对 *MYBPC3* 基因进行生物信息学分析,为深入研究 *MYBPC3* 基因的分子功能以及靶向治疗遗传性心肌病提供一定的依据。

关键词: 肌球蛋白结合蛋白 C; *MYBPC3* 基因; 生物信息学

中图分类号: Q71 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-5565(2016)04-219-07

Bioinformatics analysis of the *MYBPC3* gene and protein

REN Chenxia, MA Lixia

(Key Laboratory of Blood Lipid Metabolism & Hematology in Colleges and Universities of Shanxi Province
(Changzhi Medical College), Changzhi Shanxi 046000, China)

Abstract: The *MYBPC3* gene mutations can cause hypertrophic cardiomyopathy (HCM). To analyze the biological information of *MYBPC3* gene and its coding protein. Bioinformatics approaches are applied to analyze mutant sites, hereditary conservation, chemical properties, space structure, and protein interaction networks of cMyBP-C protein. The cMyBP-C protein is comprised of 1 274 amino acid residues which belong to the immunoglobulin super family. It is a hydrophilic unstable protein without transmembrane region. The main secondary structure elements are random coil, and it contained eight immunoglobulin domains and three fibronectin type 3 domains. Interactive proteins with cMyBP-C are mainly its phosphokinase and sarcomere components. We analyze the insightful information of *MYBPC3* gene and its protein providing certain theoretical basis for the research of gene function of *MYBPC3* and its role in the formation and development of HCM.

Keywords: cMyBP-C; *MYBPC3*; Bioinformatics

家族性肥厚型心肌病(Hypertrophic cardiomyopathy, HCM)是一种主要因编码心肌肌节蛋白基因突变导致原发性心肌病,患者主要表现为左室室壁非对称性增厚引起舒张功能障碍。致 HCM 的突变基因主要包含有 *MYBPC3*、 β -肌球蛋白重链 (Beta-myosin heavy chain, MYH7)、肌钙蛋白 T (Cardiac troponin-T, TNNT2)、肌球蛋白重链 3 (Myosin light chain 3, MYL3X)、心脏肌钙蛋白 I (Cardiac troponin-1, TNNI3)、

α -肌动蛋白 (Alpha-cardiac actin, ACTC1) 和 α -原肌球蛋白 (Alpha-tropomyosin, TPM1) 等。值得关注的是, *MYBPC3* 突变导致 HCM 的概率占到了 42%^[1], 表明 *MYBPC3* 基因在心脏正常发育和功能维持方面起着及其重要的作用,然而,其分子机制仍未完全阐明,针对该分子的基因治疗手段也尚未见报道。

MYBPC3 编码的肌球蛋白结合蛋白 C (cMyBP-C) 是一个横纹肌的粗肌丝相关蛋白,位于粗肌丝两

收稿日期:2016-06-30;修回日期:2016-08-16.

基金项目:长治医学院创新团队项目 (No.CX2015-07)。

作者简介:任晨霞,女,讲师,研究方向:心血管疾病的自噬分子机制研究;E-mail:rcx2010@126.com.

端肌球蛋白头部的横桥处, cMyBP-C 是其心肌组织的特异表达形式, 可与肌动蛋白或者肌球蛋白相互作用^[2-3]。早期研究认为, cMyBP-C 主要在肌节装配和结构稳定中发挥作用, 然而, *MYBPC3* 基因敲除小鼠没有引起肌节的装配异常, 却表现出室间隔肥厚, 心室扩张, 左心室压力上升速度加快等与 HCM 一致的症状, 生化提取肌原纤维的 cMyBP-C 对肌节的稳定性也没有影响^[4]。Hartzell 等在两栖动物心脏中注射乙酰胆碱, 发现 cMyBP-C 磷酸化水平发生变化开启了对该蛋白质的结构、生化性质和分子功能等一系列研究^[5-6]。此外, 小鼠 *MYBPC3* 基因突变会引起心肌氧化应激水平升高, 加剧糖尿病性心肌病小鼠的心力衰竭^[7]。

因此, 严格意义上来讲, cMyBP-C 不只是一种结构蛋白, 越来越多证据表明 cMyBP-C 是一个调节心脏收缩的速度和幅度的关键因子。 *MYBPC3* 突变作为 HCM 发生发展的主要因素, 应是治疗心肌病较好的干预靶点, cMyBP-C 蛋白的功能及其参与的信号转导通路值得我们深入探究。本文运用生物信息学手段分析 cMyBP-C 蛋白的结构与功能特性, 可为进一步研究 cMyBP-C 的生理功能及其作为心脏病治疗靶点提供基本依据。

1 材料和方法

1.1 材料

从美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 的 GenBank 数据库, 获取人 *MYBPC3* 基因转录本序列与 cMyBP-C 蛋白的氨基酸序列信息, *MYBPC3* 基因突变位点信息来自 Uniprot 网站。

1.2 方法

采用 Clustal 2.1 软件比对氨基酸序列, Mega6

绘制序列系统进化树。采用 SPORT II 软件和 SobLoc 网站预测 cMyBP-C 的亚细胞定位, NCBI 的 UniGene 数据库分析其组织表达特异性。采用专业蛋白质分析系统 ExPasy (Expert Protein Analysis System) 的 ProtParam 工具, 分析 cMyBP-C 蛋白的理化性质, 采用 SignalP 4.0 预测信号肽, TMHMM 2.0 软件预测跨膜区域。SOPMA 工具预测二级结构, 并通过 NCBI 的 Conserved Domain 数据库与 Smart 在线预测 cMyBP-C 的结构域。采用 STRING 数据库, 构建 cMyBP-C 与其他蛋白之间的相互作用网络。

2 结果与分析

2.1 cMyBP-C 蛋白多序列比对分析

通过 NCBI 的 BLAST 数据库比对得到其它几种哺乳动物、鸟类、两栖类和鱼类中存在人 cMyBP-C 的同源蛋白, 人 cMyBP-C 蛋白的氨基酸序列与黑猩猩、猕猴、牛、小鼠、大鼠、鸡、非洲爪蟾、斑马鱼的同源蛋白相似性分别为 98.5%、97.7%、92%、92%、91.9%、72.6%、69.1%、66.8%。采用 Clustal 2.1 软件进行 cMyBP-C 同源蛋白间的多重序列比对后, 通过 Mega6 的邻接法 (Neighbor-joining, NJ) 绘制序列系统进化树 (见图 1), NJ 法是基于序列同源性的一种算法, 分支中数字表示进化距离。结果表明, 人 cMyBP-C 蛋白和其它几种哺乳动物组成一支, 与黑猩猩的同源性最高进化距离为 0.02, 与鸡的 cMyBP-C 同源蛋白进化距离为 0.14, 进化距离最远的是非洲爪蟾和斑马鱼分别为 0.19 和 0.23。cMyBP-C 蛋白的同源性与其物种间的亲缘关系成正相关关系, 该分子在物种的进化与演变中发挥一定的作用。

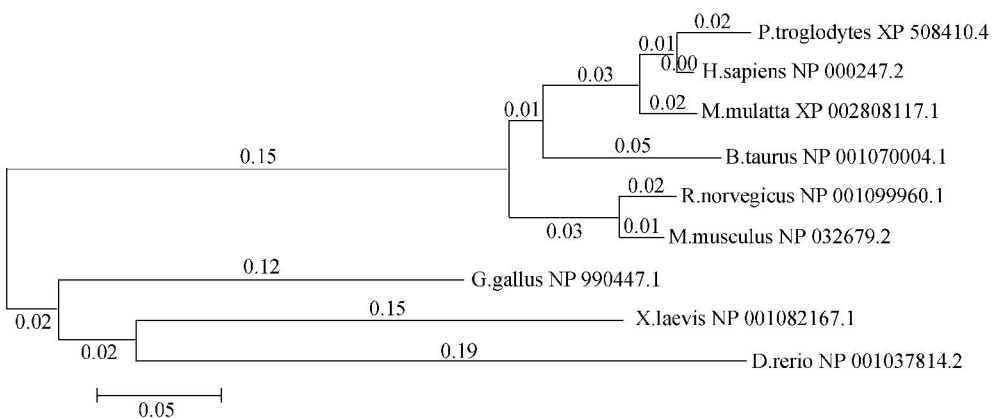


图 1 人 cMyBP-C 蛋白与其同源序列比对的分子进化树

Fig. 1 The sequence alignment of human cMyBP-C protein and its homologous sequences

2.2 cMyBP-C 的组织表达特异性与亚细胞定位分析

NCBI 的 UniGene 数据库 EST 结果显示, *MYBPC3* 在以下组织中均有表达,拷贝数分别是:心脏 592,肝 24,肌肉 18,肺 14,淋巴结 11,胎盘 7,结蹄组织 6,睾丸 6,胚胎组织 4,心脏中的表达量最高。通过 SPORT II 亚细胞定位分析,cMyBP-C 蛋白定位于细胞质的可能性较大(52.2%),其次分别为细胞核(30.4%),线粒体(13.0%)和分泌系统囊泡上(4.0%)。SobLoc 网站分析 cMyBP-C 定位于细胞质,cMyBP-C 是心肌细胞肌小节的组成成分,确实属于胞浆成分,而软件预测其细胞核的定位可能性也比较大,结合其在肝等其他组织中也有表达,预示 cMyBP-C 的未知功能值得进一步探究。

2.3 cMyBP-C 蛋白质的理化性质

人 *MYBPC3* 基因位于 11 号染色体(11p11.2)上,有 3 种 mRNA 可变剪切产物,分别是 NM_000256.3、XM_011520118.1 和 XM_011520117.1,蛋白质产物分别是 NP_000247.2,XP_011518420.1 和 XP_011518419.1。其中,NM_000256.3 共有 35 个外显子,mRNA 全长为 3 825 nt,编码全长为 1 274 个氨基酸组成的 NP_000247.2 产物是 *MYBPC3* 的蛋白共识编码序列,其 ID 为 CCDS53621.1。cMyBP-C 蛋白质分子式为 $C_{6254}H_{9898}N_{1732}O_{1877}S_{43}$,分子量为 14 0762.4 Da,理论等电点预测为 6.24,属酸性蛋白,

cMyBP-C 在哺乳动物网织红细胞内半衰期为 30 h,不稳定系数为 42.08,属不稳定蛋白质。ProtScale 预测 cMyBP-C 亲水性最强的位点是第 831 位的赖氨酸,分值为-3.356,疏水性最强的位点是1 128 位的谷氨酸,分值为 2.022,cMyBP-C 的整个氨基酸序列中亲水区域多于疏水区域(见图 2),Protparam 预测 cMyBP-C 脂肪系数是 79.73,总的平均亲水性为-0.392,所以其属于亲水蛋白。SignalP4.0 预测 cMyBP-C 蛋白序列不含切割位点,无信号肽序列(见图 3)。TMHMM2.0 在线分析 cMyBP-C 无跨膜结构域(见图 4)。采用 PhosphoSitePlus 分析 cMyBP-C 蛋白质翻译后修饰,发现 K418 会被乙酰化修饰,被磷酸化修饰位点有:S18、T59、S78、Y79、S86、S133、S212、Y213、T274、S275、S284、S286、T290、S304、T307、S311、Y340、Y373、S424、S427、Y548、S550、S588、T602、T607、S708、S830、Y1043、Y1119、Y1135、Y1136、Y1167、Y1172。cMyBP-C 的磷酸化程度是决定心脏收缩的速度和力量的关键因素之一,探索其磷酸化动态变化会加深对心脏病理状态改变的理解。分析结果显示小鼠的 cMyBP-C 同源蛋白泛素化位点有 K87、K102、K183、K308、K376、K391、K102、K394、K414、K446、K484、K539,针对人 cMyBP-C 蛋白是否会泛素化及其如何降解的问题,值得进一步探究。

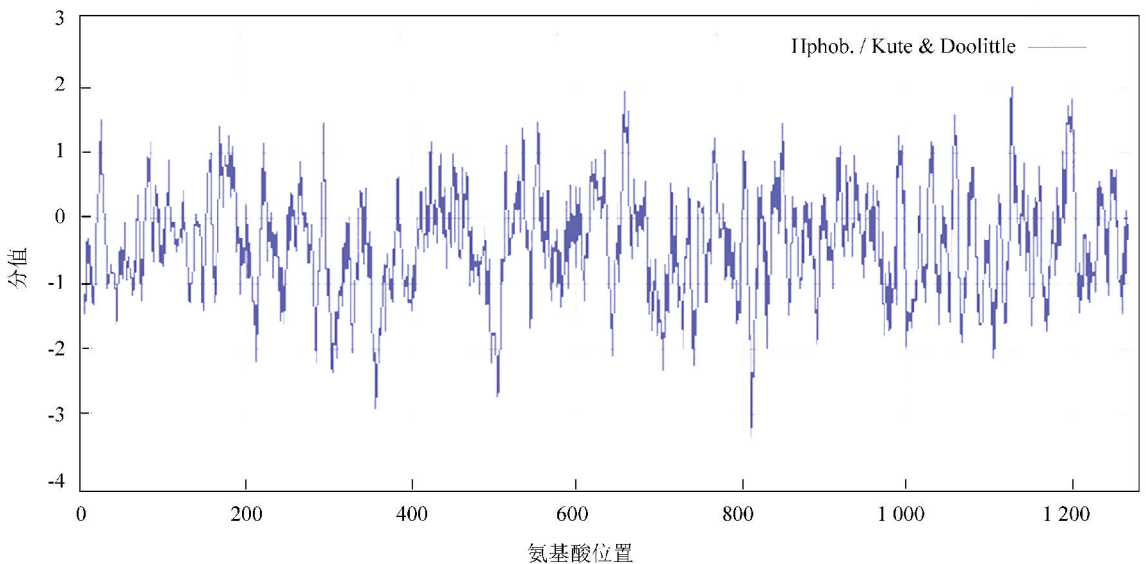


图 2 程序分析 cMyBP-C 蛋白的疏水性

Fig. 2 Hydrophobicity profile of the cMyBP-C protein

图中的细实线、点状虚线和线性虚线分别表示膜外部分、跨膜区域和膜内部分,图中 cMyBP-C 蛋白位于膜外的概率几乎为 100%,跨膜区域和位于膜内的区域的概率极低几乎为 0,虚线与纵坐标为 0

的基线重叠。粗线是用来标识多肽链中跨膜区域所在位置的,因本文的 cMyBP-C 蛋白没有跨膜区域,所以在粗线上没有任何标记。

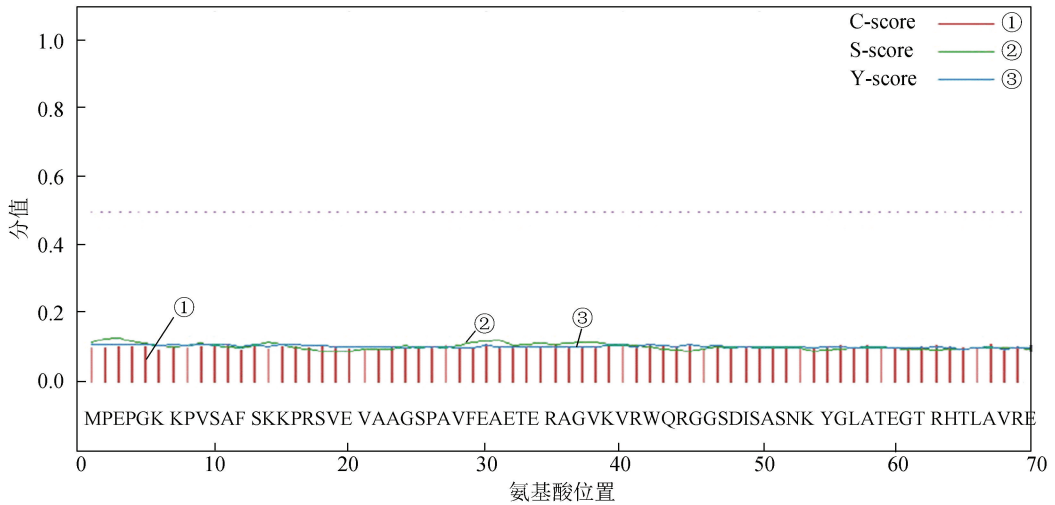


图3 cMyBP-C 蛋白的信号肽分析结果

Fig. 3 The result of cMyBP-C signal peptide analysis

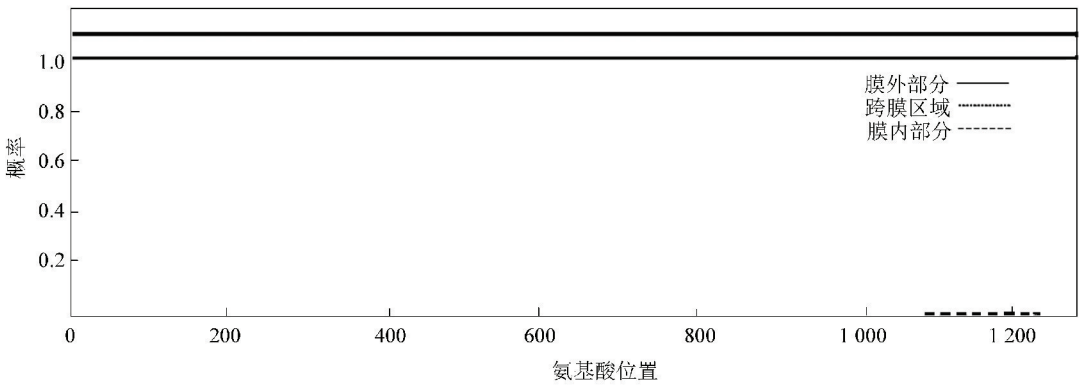


图4 cMyBP-C 蛋白的跨膜结构分析

Fig. 4 Transmembrane domain of cMyBP-C predicted by TMHMM

2.4 cMyBP-C 蛋白质结构分析

cMyBP-C 蛋白的二级结构中,随机卷曲占 51.73%, α -螺旋占 28.18%,延伸链占 20.09% (见图 5)。结构域分析表明,含有 3 个细胞因子受体超二级结构和 3 个结构域间相互作用模体,cMyBP-C 属于 III 型纤连蛋白超家族和免疫球蛋白超家族,含有 3 个 III 型纤连蛋白结构域 (Fibronectin type 3, FN3) 和 8 个免疫球蛋白样结构域 (Immunoglobulin, Ig)。FN3 是两片反向平行的 β -链形成的层状结构,一层含有 3 个 β 折叠链,另一层含 4 个,含 FN3 的多为受体蛋白。Ig 由约 70-110 氨基酸组成,由两层反向平行的 β -折叠

链形成的层状结构,含 9 个 β 折叠链的称为 IgV (Immunoglobulin variable),含 7 个 β 折叠链称 IgC1 (Immunoglobulin constant),如 IgC 尺寸和 IgV 一样则称为 IgC2,其他类似结构域归为 IgI (Immunoglobulin intermediate)。NCBI 保守结构数据库将 cMyBP-C 的 8 个 Ig 结构域分为 6 个 IgI 型结构域和 2 个类 Ig 结构域,与 Smart 数据库预测结果基本一致,后者将 C 端的 Ig 结构域归类为 Ig C2 型 (见图 6)。总之,cMyBP-C 属于 FN3 蛋白超家族和 Ig 蛋白超家族,两者都是广泛存在于动物蛋白中的进化保守的蛋白结构域,多介导蛋白质-配体间的相互作用。

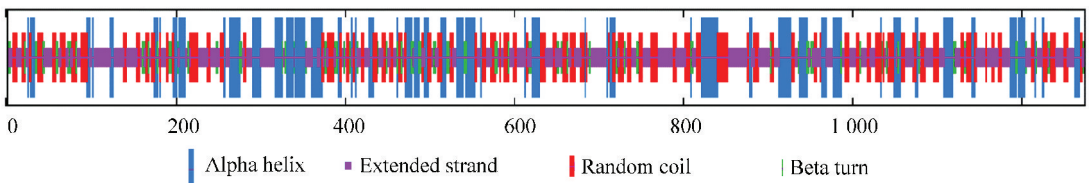
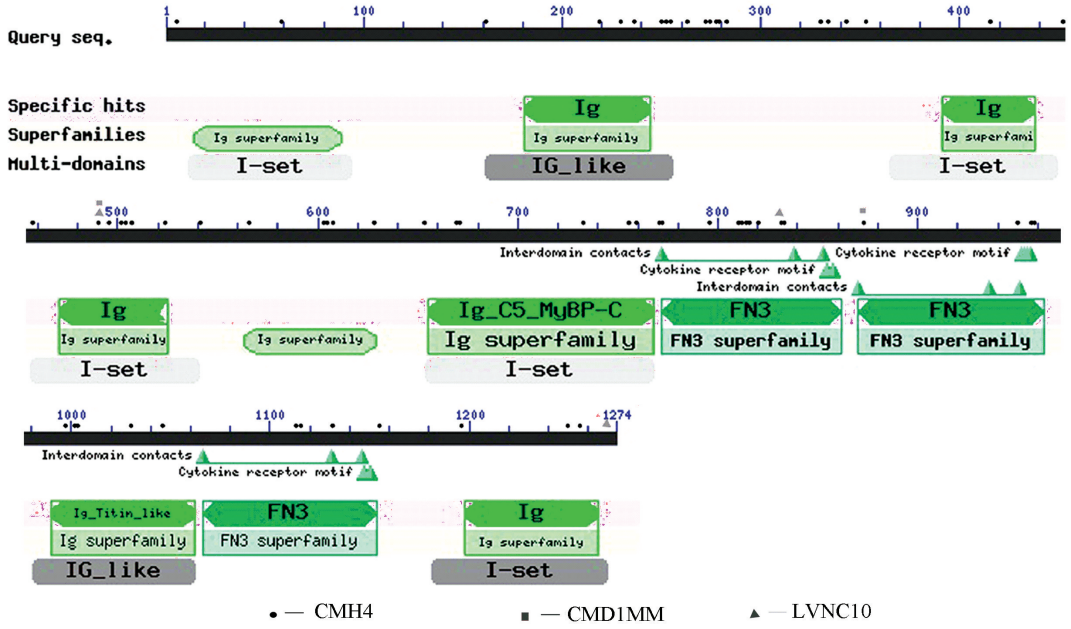


图5 SOPMA 预测 cMyBP-C 蛋白二级结构*

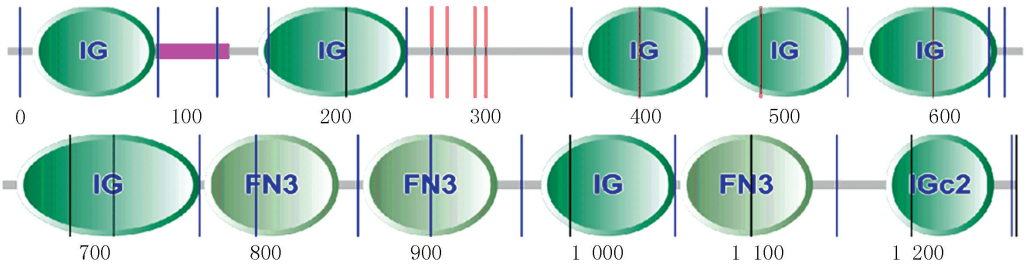
Fig. 5 Predicted secondary structure of cMyBP-C protein by SOPMA

图 6(a)表示 NCBI 的 Conserved Domain 数据库分析结果,黑色圆点指示突变后表现为 CMH4 (Cardiomyopathy, familial hypertrophic 4) 症状的位点,灰色方框表示突变后表现为 CMD1MM

(Cardiomyopathy, dilated 1MM) 症状的位点,灰色三角表示突变后表现为 LVNC10 (Left ventricular noncompaction 10) 症状的位点;图 6(b)表示 Smart 数据库分析结果。



(a) NCBI的Conserved Domain数据库分析cMyBP-C蛋白保守结构域



(b) Smart数据库分析cMyBP-C蛋白保守结构域

图 6 cMyBP-C 蛋白保守结构域

Fig. 6 Conserved domain of cMyBP-C protein

2.5 蛋白间相互作用分析

利用 STRING 交互式数据库搜索蛋白质相互作用信息,置信度设置为 0.700,数量限制为 10 个以内,构建 cMyBP-C 蛋白相互作用网络(见图 7)。cMyBP-C 相互作用主要有肌球蛋白重链和轻链成分:MYH6 (Myosin heavy chain 6)、MYH7、MYH14 和 MYL3 (Myosin light chain 3),肌钙蛋白 TNNT2 (Troponin T2) 和 TNNI3,肌联蛋白 TTN (Titin),原肌球蛋白 TPM1 (Tropomyosin 1),这些蛋白均属于肌纤维的组成成分,与 cMyBP-C 相互协调完成肌丝滑动的动态过程。值得关注的是,相互作用网络中还包括蛋白激酶 PRKAG2 (Protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit gamma 2) 以及依赖维生素 K 的丝氨酸蛋白酶 PROC (Protein C)。

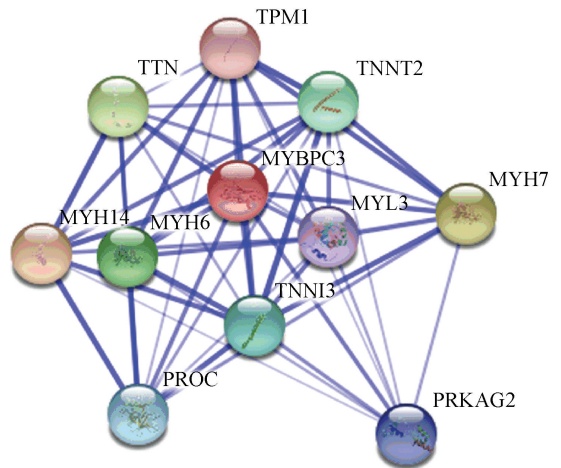


图 7 STRING 预测 cMyBP-C 蛋白相互作用网络
Fig. 7 Protein-protein interaction network for cMyBP-C predicted by STRING

3 讨论

转录后修饰是调节蛋白质活性的重要机制。本文通过 PhosphoSitePlus 在线分析得出 cMyBP-C 含有 33 个磷酸化位点,这与文献报道 cMyBP-C 是高度磷酸化蛋白质是一致的。cMyBP-C 磷酸化水平随着细胞状态不同而变化,心力衰竭终末期和肥厚型心肌病的特征之一是 cMyBP-C 磷酸化水平的降低^[7]。去磷酸化的 cMyBP-C 和肌球蛋白结合,被依赖 cAMP 的蛋白激酶 A (cAMP-dependent protein kinase, PKA) 或 CaMK2 δ 等其他激酶磷酸化后与肌动蛋白结合。在受到 β -肾上腺素刺激时,磷酸化 cMyBP-C 加速横桥与肌动蛋白结合,从而加快横桥对细肌丝的招募,导致心脏抽搐程度增加^[8],表明磷酸化的 cMyBP-C 是心脏收缩力度和幅度的一个关键调控因子。此外,多聚泛素化蛋白的积累是心脏疾病的一个共同特征^[9],蛋白酶抑制剂治疗可以逆转 *MYBPC3* 突变体小鼠的 HCM 疾病表型,抑制蛋白酶体可以起到改善心脏功能和抗心肌肥厚的作用^[10],本文预测到小鼠 cMyBP-C 蛋白存在多个泛素化修饰位点,而人 cMyBP-C 泛素化修饰及其降解方式与心肌病的关系有待于我们进一步探究。

MYBPC3 基因突变引起扩张型心肌病,据文献报道,突变位点的不同可引起不同的症状,大致可以分为以下三类:CMH4 型的特点是心室不对称肥厚,常累及室间隔,症状包括呼吸困难、晕厥、心悸、胸痛,很容易地由于运动引发^[11];CMD1MM 型的特点是心室扩张和收缩功能受损,导致充血性心力衰竭和心律失常^[12];LVNC10 型的特点是由于心肌形态发育受阻致左室心肌致密化不全、左心室肥厚、收缩功能差、小梁增深^[13]。突变位点大致位置与所致表型见图 6。最近研究表明,对小鼠 *MYBPC3* 的基因治疗,可以恢复心肌 cMyBP-C 的水平,并能长期预防心肌病的发生发展^[14]。目前 CRISPR/Cas9 系统已被应用于哺乳动物基因单一或群集突变的校正^[15],这种方法有望很快用于纠正 *MYBPC3* 的突变,更有效地改善 HCM 症状。

PRKAG2 基因编码单磷酸腺苷激活蛋白激酶 γ 2 亚基,文献报道 PRKAG2 突变可引起心脏综合症,出现胞内糖原沉积、心室预激、传导系统疾病和左心室肥厚等各种表型^[16],占肥厚性心肌病 (HCM) 患者比例约为 0.23%~1.00%^[17]。cMyBP-C 和 PRKAG2 均为 HCM 的重要致病基因,尚未见报道两者间的关系研究,本文分析得出两者存在蛋白间相互作用关系,有望成为深入解析 HCM 疾病信

号通路新的突破口。PROC 是一种多功能的丝氨酸蛋白酶,已知功能主要是参与凝血系统的调节,可降解凝血因子 V 和 VIII,具有抗细胞凋亡和抗炎的作用^[18],最新研究阐明 PROC 可抵抗心肌缺血/再灌注引起的急性炎症反应^[19]。本文通过 STRING 在线预测软件分析到 cMyBP-C 与 PROC 的相互作用,两者的关系及参与的具体生理过程值得我们进一步实验研究。

目前,基因治疗是国际上的研究热点,特别是 CRISPR/Cas9 系统应用的深入发掘,家族性肥厚型心肌病中有 40% 的原因是 *MYBPC3* 基因的突变,本文对这一最重要的家族性肥厚型心肌病的易感基因的结构与功能进行生物信息学分析,为下一步开发针对该分子的基因治疗方式奠定基础。本文通过生物信息学方法分析了 *MYBPC3* 基因的保守性、cMyBP-C 蛋白的亚细胞定位、组织特异性、蛋白质高级结构信息、及其相互作用蛋白,揭示了 cMyBP-C 是一种肌节特有的多功能蛋白分子,为完善 *MYBPC3* 基因的分子功能以及研究其在调节心肌舒缩过程中参与的具体信号通路提供一定的依据。

参考文献 (References)

- [1] BEHRENSG V, MEARINI G, GEDICKE H C, et al. *MYBPC3* in hypertrophic cardiomyopathy: from mutation identification to RNA-based correction [J]. *Pflugers Arch*, 2014 (466): 215-223. DOI: 10.1007/s00424-013-1409-7.
- [2] CARRIER L, MEARINI G, STATHOPOULOU K, et al. Cardiac myosin-binding protein C (*MYBPC3*) in cardiac pathophysiology [J]. *Gene*, 2015, 573(2): 188-197. DOI: 10.1016/j.gene.2015.09.008.
- [3] MOSS R L, FITZSIMONS D P, RALPHE J C. Cardiac MyBP-C regulates the rate and force of contraction in mammalian myocardium [J]. *Circulation Research*, 2015, 116(1): 183-192. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.300561.
- [4] HARRIS S P, BARTLEY C R, HACKER T A, et al. Hypertrophic cardiomyopathy in cardiac myosin binding protein-C knockout mice [J]. *Circulation Research*, 2002, 90(5): 594-601. DOI: 10.1161/01.RES.0000012222.70819.64.
- [5] KENNETH S G, RANGANATH M, JULIAN E S. The contribution of cardiac myosin binding protein-c Ser282 phosphorylation to the rate of force generation and in vivo cardiac contractility [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2014, 592 (Pt 17): 3747-3765. DOI: 10.1113/jphysiol.2014.276022.
- [6] JACQUES A M, COPELAND O, MESSER A E, et al. Myosin binding protein C phosphorylation in normal, hypertrophic and failing human heart muscle [J]. *Journal of Mo-*

- lecular and Cellular Cardiology, 2008, 45(2):209-216. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2008.05.020.
- [7] LYNCH T L, SIVAGURU M, VELAYUTHAM M, et al. Oxidative stress in dilated cardiomyopathy caused by *MYBPC3* mutation cMyBP-C[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2015(2015):424751. DOI: 10.1155/2015/424751.
- [8] COPELAND O, SADAYAPPAN S, MESSER A E, et al. Analysis of cardiac myosin binding protein-C phosphorylation in human heart muscle[J]. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2010, 49(6):1003-1011. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2010.09.007.
- [9] WEEKES J, MORRISON K, MULLEN A, et al. Hyperubiquitination of proteins in dilated cardiomyopathy[J]. Journal of Proteomics, 2003, 3(2):208-216. DOI: 10.1002/pmic.200390029.
- [10] SASKIA S, SONIA R S, BIRGIT G, et al. Proteasome inhibition slightly improves cardiac function in mice with hypertrophic cardiomyopathy [J]. Frontiers in Physiology, 2014, 16(5):484. DOI: 10.3389/fphys.2014.00484.
- [11] MORITA H, REHM H L, MENESSES A, et al. Shared genetic causes of cardiac hypertrophy in children and adults [J]. The New England Journal of Medicine, 2008, 358(18):1899-1908. DOI: 10.1056/NEJMoa075463.
- [12] HERSHBERGER R E, NORTON N, MORALES A, et al. Coding sequence rare variants identified in *MYBPC3*, *MYH6*, *TPM1*, *TNNC1*, and *TNNI3* from 312 patients with familial or idiopathic dilated cardiomyopathy[J]. Circulation Cardiovascular Genetics, 2010, 3(2):155-161. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.109.912345.
- [13] PROBST S, OECHSLIN E, SCHULER P, et al. Sarcomere gene mutations in isolated left ventricular noncompaction cardiomyopathy do not predict clinical phenotype [J]. Circulation Cardiovascular Genetics, 2011, 4(4):367-374. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.110.959270.
- [14] BEHRENS G V, MEARINI G, GEDICKE H C, et al. *MYBPC3* in hypertrophic cardiomyopathy: from mutation identification to RNA-based correction[J]. Pflügers Arch, 2014, 466(2):215-223. DOI: 10.1007/s00424-013-1409-7.
- [15] HSU P D, LANDER E S, ZHANG F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering[J]. Cell, 2014, 157(6):1262-1278. DOI: 10.1016/j.cell.2014.05.010.
- [16] PÖYHÖNEN P, HIIPPALA A, OLLILA L, et al. Cardiovascular magnetic resonance findings in patients with *PRKAG2* gene mutations[J]. Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance, 2015(17):89. DOI: 10.1186/s12968-015-0192-3.
- [17] GRUNER C, CARE M, SIMINOVITCHK, et al. Sarcomere protein gene mutations in patients with apical hypertrophic cardiomyopathy [J]. Circulation Cardiovascular Genetics, 2011, 4(3):288-295. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.110.958835.
- [18] GRIFFIN J H, ZLOKOVIC B V, MOSNIER L O. Protein C anticoagulant and cytoprotective pathways [J]. International Journal of Hematology, 2012, 95(4):333-345. DOI:10.1007/s12185-012-1059-0.
- [19] WILDHAGEN K C, SCHRIJVER R, BECKERS L, et al. Effects of exogenous recombinant APC in mouse models of ischemia reperfusion injury and of atherosclerosis [J]. PLoS One, 2014, 9(7):e101446. DOI: 10.1371/journal.pone.0101446.