



tau蛋白在PS19转基因小鼠中诱导异常的选择性剪切变化*

田学文¹, 陈 婵², 王 雄^{1△}

1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 检验科(武汉 430030); 2. 深圳市宝安区人民医院(深圳 518101)

【摘要】目的 通过大数据分析6月龄PS19小鼠体内异常选择性剪切(AS)事件是否在tau^{P301S}诱导的神经退行性表型之前出现。**方法** 采用axel从ENA数据库下载GSE182170数据集原始测序文件,通过STAR软件与ENSEMBL数据库参考基因组进行比对,rMATS和rmats2sashimplot R包进行常见AS事件分析和结果可视化展示。RSEM软件进行基因转录本定量,Deseq2、edgeR、limma R包进行差异分析,采用clusterProfiler R包对差异基因进行GO富集分析。String和Cytoscape软件用来进行蛋白质间相互作用分析。采用ggcorrplot R包进行基因表达相关性分析。PCR结合琼脂糖电泳验证AS事件。**结果** 通过rMATS鉴定出了8 079个AS事件,并最终筛选出117个显著AS事件($\Delta\text{PSI}>0.1$,测序覆盖度 >1)。外显子跳跃(SE)是最常见的AS事件(50.43%),其次是外显子3'端可变剪切(A3SS)和外显子互斥(MXE)。GO富集分析发现,突触组织基因发生异常SE事件,而剪切体基因主要发生异常A3SS事件。蛋白相互作用和相关性分析发现Snrpn剪切因子与最多数量的转录本表达显著相关。琼脂糖电泳证实PS19小鼠中Lrp8基因的异常AS事件。**结论** 异常的剪切因子可能参与了tau^{P301S}引起的异常AS改变。本研究扩展了tau蛋白病中tau蛋白循环和剪切因子的知识。

【关键词】 tau蛋白病 P301S 选择性剪切 外显子跳跃 突触

Tau Protein Induces Aberrant Alternative Splicing Changes in PS19 Transgenic Mice TIAN Xuwen¹, CHEN Chan², WANG Xiong^{1△}. 1. Department of Clinical Laboratory, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. Shenzhen Baoan District People's Hospital, Shenzhen 518101, China

△ Corresponding author, E-mail: wangxiong@tjh.tjmu.edu.cn

【Abstract】Objective To explore through big data analysis whether aberrant alternative splicing (AS) events precede tau^{P301S}-induced neurodegenerative phenotype in 6-month-old PS19 mice. **Methods** The original sequencing files of the GSE182170 dataset was downloaded from the European Nucleotide Archive (ENA) database with axel, aligned to the reference genome of the ENSEMBL database by using STAR software, and common AS event analysis and visualization were performed with rMATS and rmats2sashimplot R packages. RSEM software was utilized for gene transcript quantification, Deseq2, edgeR, and limma R packages were used for differential expression analysis, and clusterProfiler R package was applied for GO enrichment analysis. String and Cytoscape were used for protein-protein interaction (PPI) analysis. Gene expression correlation analysis was performed with ggcorrplot R package. AS events were validated using PCR followed by agarose electrophoresis. **Results** A total of 8 079 AS events were identified with rMATS and 117 significant AS events ($\Delta\text{PSI}>0.1$, sequencing coverage >1) were selected eventually. The most frequent type of AS event was skipped exon (SE) (50.43%), followed by alternative 3' splice site (A3SS) and mutually exclusive exons (MXE). GO enrichment analysis revealed that synapse organization genes were aberrantly spliced in SE events and spliceosome genes were spliced in A3SS events. PPI and correlation analyses showed that the splicing factor Snrpn was significantly associated with the largest number of transcripts. Agarose electrophoresis confirmed the aberrant AS event of the Lrp8 gene in PS19 mice. **Conclusion** Dysregulated splicing factors may contribute to tau^{P301S}-induced aberrant AS changes. The study also increases the understanding of the cycling of tau protein and splicing factors in tauopathies.

【Key words】 Tauopathy P301S Alternative splicing Exon skipping Synapse

选择性剪切(alternative splicing, AS)是一种常见的基因表达调控机制,允许一个基因在非翻译区或编码序列上产生不同的mRNA。这些差异可能会影响mRNA的定位、稳定性、翻译或不同功能蛋白的生成^[1]。AS有助于人类细胞的转录多样性,在细胞发育和组织定型的调节中发挥重要作用^[2]。AS包括外显子跳跃(skipped exon, SE)、5'端可变剪切(alternative 5' splice site, A5SS)、内含子保

留(retained intron, RI)、外显子互斥(mutually exclusive exon, MXE)和3'端可变剪切(alternative 3' splice site, A3SS)5种基本模式。AS的紊乱可能导致多种病变,包括自身免疫性疾病和神经系统疾病^[3]。已有研究显示,阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)发病与AS紊乱有关,如HAN等^[4]发现TRE2M基因的2种罕见变异导致外显子2跳跃,进而导致AD中免疫相关功能通路的激活。TYSOE等^[5]发现PSEN1基因4号内含子剪切供体位点G碱基的缺失导致4号外显子跳跃,导致PSEN1功能丧失,诱

* 国家自然科学基金(No. 81500925)资助

△ 通信作者, E-mail: wangxiong@tjh.tjmu.edu.cn

发早发型AD。

由微管相关蛋白MAPT编码的tau蛋白脑内聚集是AD等tau蛋白病的病理标志^[6]。剪切错误被认为是tau诱导产生神经毒性的原因^[3]。tau^{P301S}是tau蛋白病中一种常见的有害变异^[7]。由于PS19转基因小鼠表达tau^{P301S}突变体,该动物模型已被广泛应用于神经原纤维缠结、AD和神经退行性tau蛋白病的研究。YOSHIYAMA等^[8]发现,PS19小鼠在6月龄时出现丝状tau蛋白损伤,并在9~12月龄时进行性累积,与神经元丧失和内嗅皮质萎缩相关。在3月龄PS19小鼠中,突触丢失和突触功能障碍早于纤维tau蛋白缠结的出现。APICCO等^[9]报道了9月龄PS19转基因小鼠体内参与突触传递的基因剪切失调,细胞毒性颗粒相关RNA结合蛋白TIA1的减少可以减轻突触mRNA的剪切中断。本研究通过大数据分析研究了PS19小鼠在6月龄时前额叶皮质的AS变化,并鉴定了突触组织和剪切体基因中异常AS的变化,发现小核核糖核蛋白多肽N可能是tau^{P301S}诱导PS19大鼠脑内突触组织相关mRNA剪切失调的部分原因。

1 材料与方法

1.1 数据下载与处理

GSE182170数据来自WANG等^[10]对6月龄PS19和6月龄野生型(WT)小鼠的前额叶皮质进行的RNA测序结果(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE182170>)。其中原始测序文件采用axel(v2.17.5)从ENA数据库下载。从ENSEMBL数据库(ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-105/fasta/Mus_musculus/dna/)下载GRCm39_release105参考基因组。使用STAR(v2.7.10a)将数据与参考基因组进行差异表达比对。

1.2 差异表达转录分析

使用STAR生成的bam文件按照染色体坐标进行排序,使用RSEM(v1.3.2)计算转录本表达量。使用Deseq2、edgeR和limma R软件包分别对转录本表达矩阵进行差异表达分析,logFC和P的阈值分别为1.5和0.05。通过交叉所有三个软件包的失调转录本,获得显著失调的转录本。

1.3 AS事件分析

将STAR生成的排序bam文件使用rMATS(v4.1.2)用于AS事件识别,并使用rmats2sashimiplot(v2.0.4)进行绘图。PSI(Percent spliced in)分别表示SE、RI、A5SS/A3SS事件的可变外显子、保留内含子和最长外显子的包含程度。 Δ PSI为PS19小鼠与WT小鼠PSI的差值,如果 Δ PSI>0.1并且rMATS软件显示的平均覆盖度>1,则为显

著AS事件。

1.4 主成分分析

主成分分析(PCA)简化了高维数据的复杂性,同时保留了趋势和模式,它通过将数据转换为更少的维度来实现这一点。本研究中采用maser(v1.18.0) R包,基于PSI值进行主成分分析,判断PSI能否有效区分PS19和WT小鼠。

1.5 基因富集分析

使用clusterProfiler(v4.2.2)R包进行基因本体GO富集分析,使用GOplot(v1.0.2)R包对富集的GO项进行可视化。

1.6 蛋白质-蛋白质相互作用网络分析

通过String构建蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络。使用Cytoscape(v3.8.2)的MCODE应用程序筛选默认设置的主要集群。

1.7 剪切因子与转录本相关性分析

许多剪切因子(splicing factors, SFs)参与了AS事件的调控。本研究检测了先前报道的280个SFs的表达^[11]。使用ggcorrplot(v0.1.3)R包检测显著失调的SFs和显著AS事件中显著失调的转录本之间的相关性。只有P<0.05的相关结果被标记为红色(正相关)或蓝色(负相关)。

1.8 PCR

本研究分析的异常SE事件显示低密度脂蛋白受体相关蛋白8(Lrp8) SE PSI显著降低,提示在PS19小鼠体内,Lrp8倾向于含有较短的异构体。上述Lrp8 SE事件会导致其外显子19跳跃,完整的Lrp8对于维持突触连接有重要意义^[12]。TROTTER等^[12]报道,发生Lrp8外显子19跳跃的PCR产物(258 bp)比未发生外显子19跳跃的PCR产物(435 bp)小177 bp。因此本研究以PCR结合琼脂糖电泳进行AS事件验证。6月龄PS19小鼠由华中科技大学同济医学院附属协和医院李晓光博士馈赠。Lrp8外显子19跳跃引物如下: Forward: TGGTAATAGCCCTGCTATG, Reverse: TGCATAGGACTGAACTCC。PCR产物经1%琼脂糖电泳观察条带。

2 结果

2.1 可变剪切事件汇总

在GSE182170数据集中共识别出8 079个AS事件(图1A),并筛选出117个显著AS事件(图1B,表1)。基于PSI值的PCA可以清楚地区分PS19组和WT组(图1C)。与WT组相比,PS19组A3SS的PSI增加,而RI、A5SS、MXE和SE事件的PSI降低(图1D~1E)。表2为 Δ PSI前10位的AS事件。

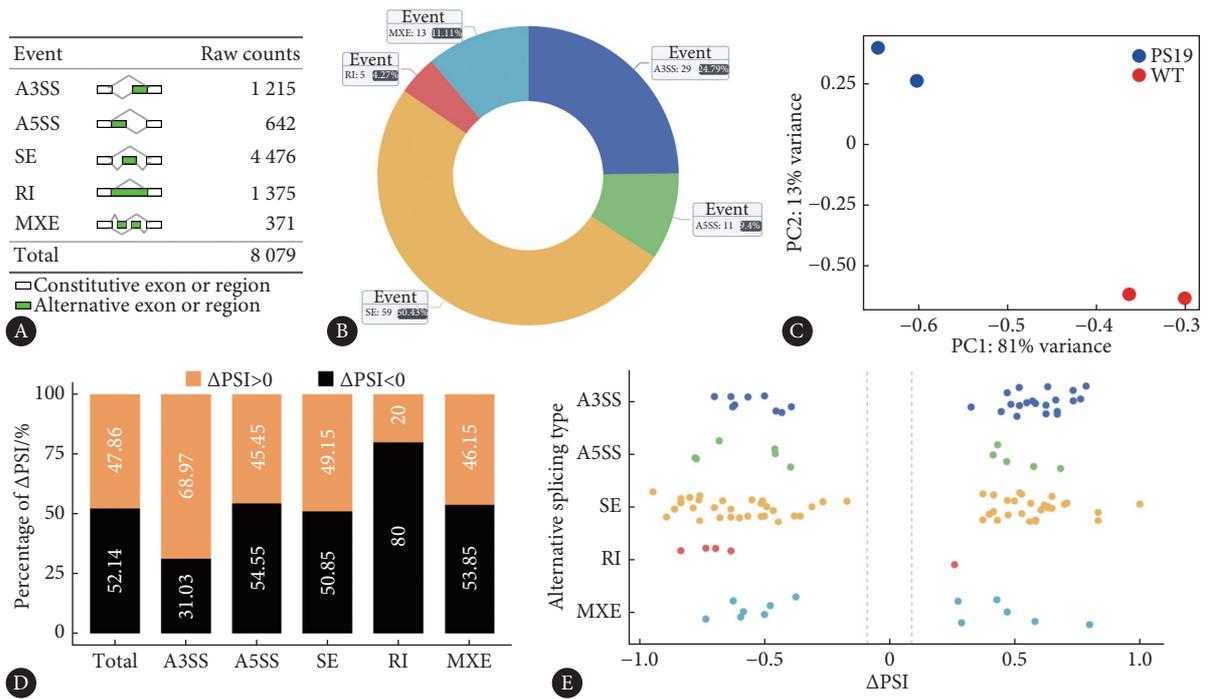


图 1 AS事件汇总

Fig 1 AS event summary

A3SS: alternative 3' splice site; A5SS: alternative 5' splice site; SE: skipped exon; RI: intron retention; MXE: mutually exclusive exons. A, Raw counts in each type of AS event. B, Number and proportion of each type of significant AS event. C, PCA analysis based on PSI values. PS19 and wild type groups were clearly distinguished. Each dot represents one sample. D, The percent of ΔPSI all significant AS events. E, Distribution of ΔPSI in all significant AS events. Each dot represents one AS event. ΔPSI=PS19—WT.

表 1 AS事件汇总

Table 1 Summary of AS events

Event type	Total events junction counts	Average coverage >1	FDR < 0.05, ΔPSI > 0.1	Ratio in WT	Ratio in PS19
A3SS	1 215	629	29	16.1%	32.8%
A5SS	642	300	11	10.7%	8.2%
SE	4 476	2 853	59	53.6%	47.5%
RI	1 375	325	5	7.1%	1.6%
MXE	371	237	13	12.5%	9.8%
Total	8 079	4 344	117	100%	100%

表 2 前10个显著AS事件

Table 2 The top 10 significant AS events

ID	P	FDR	ΔPSI	Gene	Type
7954	4.17E-11	1.87E-07	-0.945	<i>Rims1</i>	SE
10181	1.13E-10	2.53E-07	-0.891	<i>Fermt2</i>	SE
5088	3.83E-10	5.71E-07	1	<i>Ep400</i>	SE
1464	1.54E-09	2.11E-06	-0.834	<i>Ankrd16</i>	RI
4546	1.98E-08	3.86E-06	0.786	<i>Smarca4</i>	A3SS
4694	5.62E-09	5.03E-06	-0.762	<i>Ube2j1</i>	SE
6202	4.57E-08	2.05E-05	-0.758	<i>Pex2</i>	SE
19029	1.31E-07	5.35E-05	0.585	<i>Qrich1</i>	SE
564	3.22E-07	0.000 109	-0.678	<i>Spire1</i>	SE
7952	3.18E-07	0.000 109	-0.798	<i>Rims1</i>	SE

2.2 突触组织基因的异常SE事件

本研究分析出的显著AS事件中大部分为SE事件,高达50.43%(图1B)。GO富集分析显示,具有显著SE事件的基因富集在突触组织中(图2A~2B),包括Lrp8[也称为载脂蛋白E受体2(ApoER2)]和甲基化CpG结合蛋白2(Mecp2)。在PS19组中,Lrp8倾向于含有较短的异构体,而Mecp2倾向于含有较长的异构体(图2C~2D)。

2.3 剪切体基因的异常A3SS事件

共识别出29个显著的A3SS事件,占有AS事件的24.79%(图1B)。GO富集分析显示,剪切体基因富集于显著的A3SS事件中,包括Celf1(CUGBP、elav样家族成员1)

和Celf2(图3A~3B)。刺身图显示Celf1的PSI降低,异构体变短(图3C),而Celf2的PSI增加,异构体变长(图3D)。

2.4 差异表达的转录本

本研究使用RSEM计算了转录本的表达,并且每组内的样本均具有良好的相关性(图4A)。使用DeSeq2、edgeR和limma R软件包分析PS19组和WT组之间的差异表达转录本。3种工具均确定了483个上调和429个下调的转录本,并用于以下分析(图4B~4C)。生物过程的

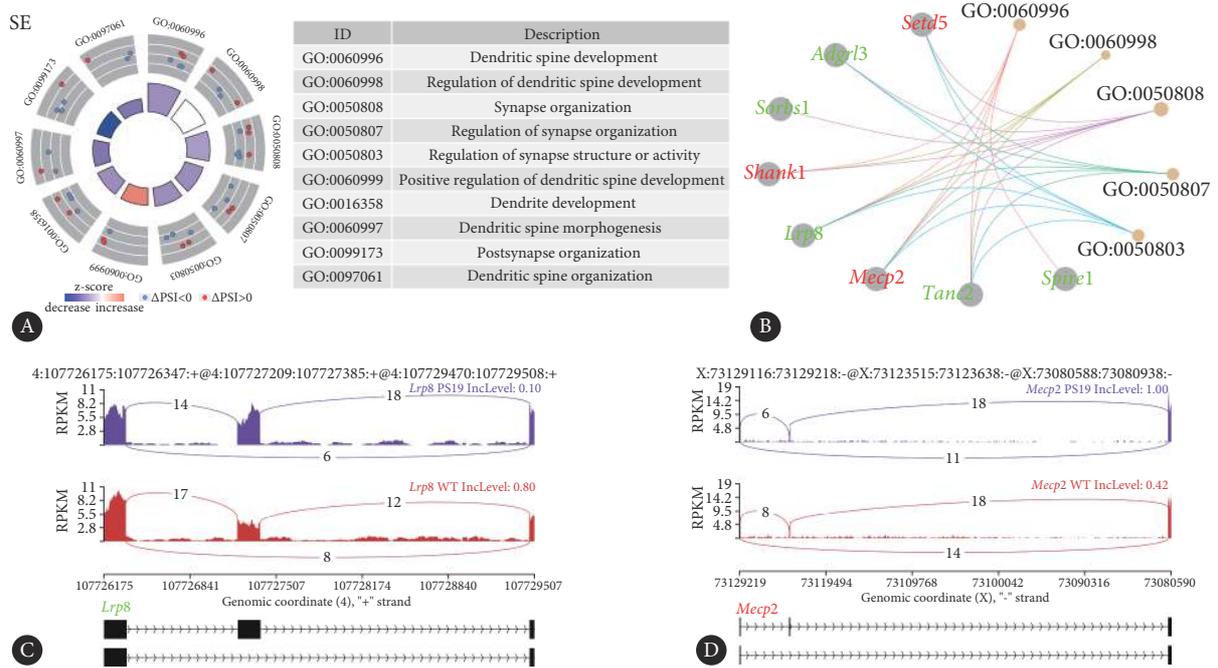


图 2 突触组织基因的异常SE事件

Fig 2 Aberrant SE events of synapse organization genes

A, GO enrichment analysis of genes harbouring significant SE events. Each dot represents one AS event. B, Cnetplot illustrates genes in the enriched GO terms. Genes coloured in green represent decreased PSI level, while genes coloured in red represent increased PSI level. The sashimi plots are for *Lrp8* (C) and *Mecp2* (D).

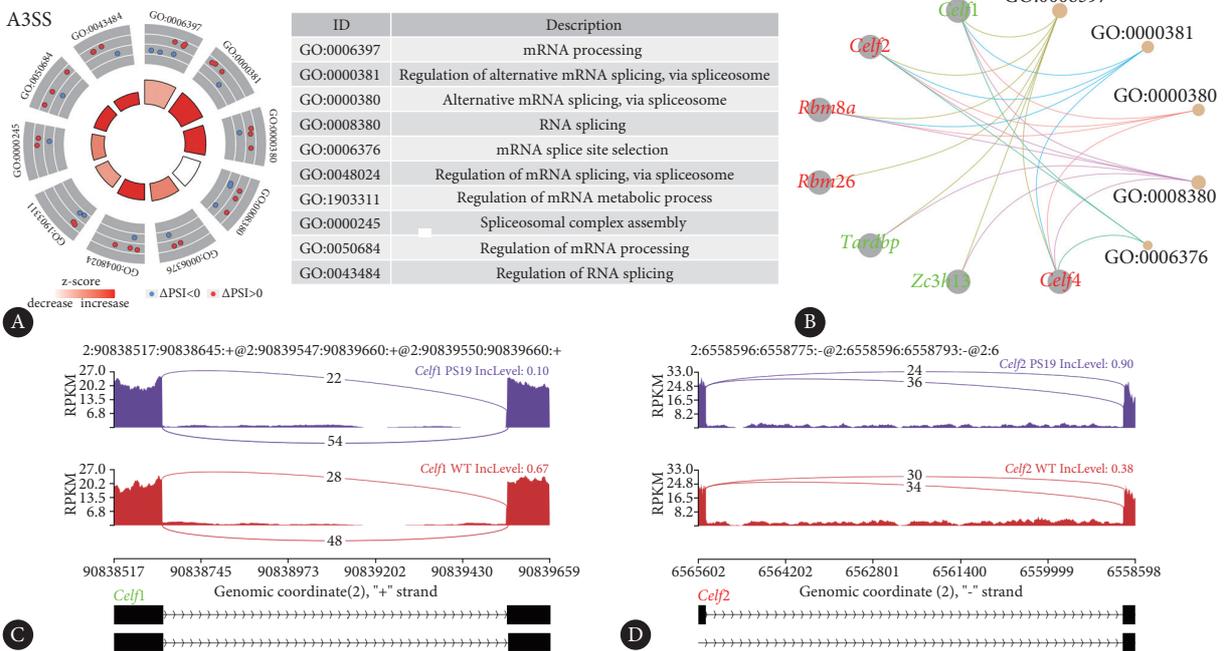


图 3 剪切体基因异常A3SS事件

Fig 3 Aberrant A3SS events of spliceosome genes

A, GO enrichment analysis of genes harbouring significant A3SS events. Each dot represents one AS event. B, Cnetplot illustrates genes in the enriched GO terms. Genes coloured in green indicate decreased PSI level, while genes coloured in red represent increased PSI level. The sashimi plots are for *Celf1* (C) and *Celf2* (D).

GO富集分析显示这些基因在突触组织中富集(图4D), 细胞成分分析显示在突触膜上富集(图4E)。

本研究进一步探索了AS事件和转录本表达之间的关

联。共鉴定出52个既差异表达, 又发生了显著AS事件的转录本(表3)。参与显著AS事件的几个基因以相反的趋势表达失调的转录本, 如*Celf1*和*Lrp8*(图5A)。在PS19小

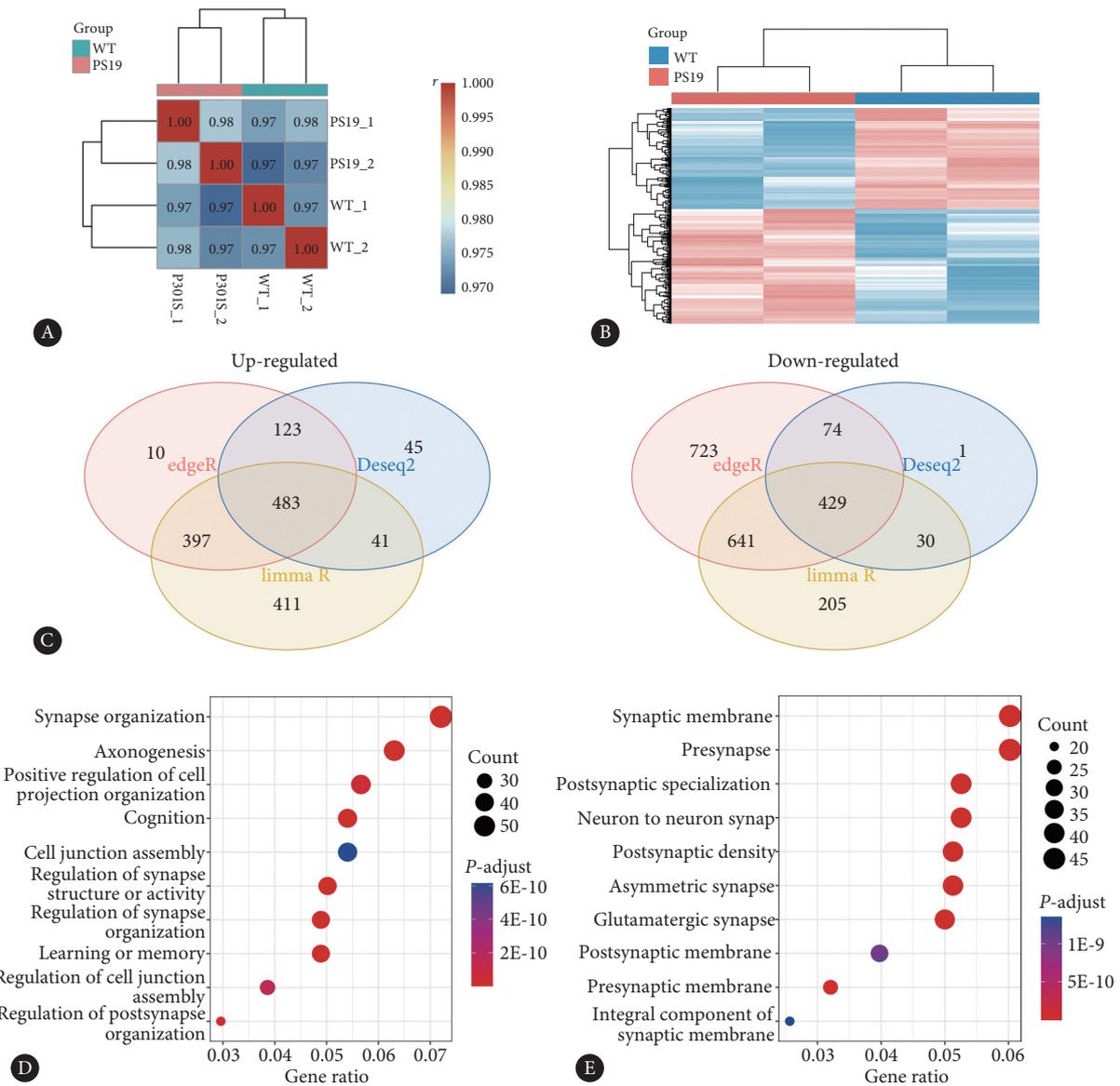


图 4 差异表达的转录本

Fig 4 Differentially expressed transcripts

A, Sample correlation analysis based on transcript expression. B, Heatmap of dysregulated transcripts between PS19 and wild type groups. C, Venn plot of dysregulated transcripts among Deseq2, edgeR, and limma R packages. The left panel showed up-regulated transcripts and the right panel showed down-regulated transcripts. D, GO enrichment analysis of biological processes using host genes of differentially expressed transcripts. The GO terms were mainly enriched in synapse organization. E, GO enrichment analysis of cellular components using host genes of differentially expressed transcripts. The GO terms were mainly enriched in synapse membrane.

鼠中, *Lrp8*在SE事件中的PSI水平降低, 并且倾向于携带更短的亚型。在发生A3SS事件的PS19小鼠中, 本研究发现PSI降低和*Celf1*的短亚型。例如, 考虑到锚蛋白重复域16(*Ankrd16*)基因的RI事件会产生较长的转录本(ENSMUST00000125024)和较短的转录本(ENSMUST0000056108)(图5B), 所以本研究分析了PS19小鼠中*Ankrd16*基因的RI事件。PS19小鼠RI事件PSI值低于WT小鼠(图5C), 提示PS19小鼠更倾向于生成较短的ENSMUST0000056108转录本。转录本表达量分析显

示, PS19组中PSI较低的长转录本ENSMUST00000125024的表达降低, 而短转录本ENSMUST0000056108的表达升高(图5D)。这些结果提示异常AS事件可能会导致同一基因不同转录本出现表达差异。

2.5 上游剪切因子分析

在PS19组和WT组之间, 共有15个SF转录本显著失调(表4, 图6A)。使用String构建了这些SF的PPI网络(图6B)。使用Cytoscape的MCODE模块筛选主要簇, 筛选出一个包含*Snrpn*、*LSM4*(*LSM4*同源物、U6核小

表 3 异常AS事件中涉及的异常表达转录本

Table 3 Dysregulated transcripts involved in aberrant AS events

Gene	Transcript	logFC	P	Change
<i>Czib</i>	ENSMUST00000030347	1.659 523	0.025 186	Up
<i>Ctdspl2</i>	ENSMUST00000036647	1.762 767	0.012 691	Up
<i>Ppp2r2d</i>	ENSMUST00000041097	0.999 524	0.028 762	UP
<i>Ep400</i>	ENSMUST00000041558	1.140 912	0.011 476	Up
<i>Setd5</i>	ENSMUST00000042889	-0.666 14	0.033 083	Down
<i>Armcx1</i>	ENSMUST00000051256	0.998 508	0.007 322	Up
<i>Ablim2</i>	ENSMUST00000054598	-1.369 66	0.008 548	Down
<i>Ankrd16</i>	ENSMUST00000056108	1.277 506	0.009 568	Up
<i>Celf1</i>	ENSMUST00000068747	0.603 695	0.012 954	Up
<i>St6galnac6</i>	ENSMUST00000072111	-0.773 98	0.003 676	Down
<i>Plec</i>	ENSMUST00000073418	-1.036 16	0.011 021	Down
<i>Fbxw11</i>	ENSMUST00000076383	0.861 714	0.015 902	Up
<i>St6galnac6</i>	ENSMUST00000095044	1.606 891	0.008 143	Up
<i>Rims1</i>	ENSMUST00000097808	-1.321 82	0.005 498	Down
<i>Celf2</i>	ENSMUST00000100429	0.734 255	0.029 349	Up
<i>Usp48</i>	ENSMUST00000105837	-0.786 14	0.032 728	Down
<i>Lrp8</i>	ENSMUST00000106733	-1.062 8	0.034 65	Down
<i>Shank1</i>	ENSMUST00000107935	-0.625 79	0.010 369	Down
<i>Zmiz2</i>	ENSMUST00000109787	1.700 795	0.015 008	Up
<i>Celf1</i>	ENSMUST00000111455	-2.209 73	0.044 164	Down
<i>Ep400</i>	ENSMUST00000112436	-1.529 65	0.000 674	Down
<i>Armcx</i>	ENSMUST00000113197	-2.134 4	0.033 295	Down
<i>St6galnac6</i>	ENSMUST00000113290	-1.692 28	0.023 443	Down
<i>Adgrl3</i>	ENSMUST00000117407	-0.720 72	0.047 625	Down
<i>Ankrd16</i>	ENSMUST00000125024	-2.862 3	0.013 749	Down
<i>Adgrl3</i>	ENSMUST00000132375	-1.679 91	0.023 895	Down
<i>Eef1d</i>	ENSMUST00000134222	-1.268 73	0.027 15	Down
<i>Tmem126a</i>	ENSMUST00000136652	1.757 229	0.002 23	Up
<i>Ncln</i>	ENSMUST00000136721	1.847 606	0.006 957	Up
<i>Ctdspl2</i>	ENSMUST00000138920	1.534 733	0.035 53	Up
<i>Afdn</i>	ENSMUST00000139666	-0.589 87	0.025 895	Down
<i>Nbr1</i>	ENSMUST00000146452	1.340 11	0.022 21	Up
<i>Nbr1</i>	ENSMUST00000148805	-1.513 25	0.034 956	Down
<i>Ecpas</i>	ENSMUST00000149301	0.653 901	0.035 459	Up
<i>Ecpas</i>	ENSMUST00000149513	-2.447 4	0.039 962	DOWN
<i>Zcchc17</i>	ENSMUST00000149755	0.928 164	0.033 15	Up
<i>Ankrd16</i>	ENSMUST00000150320	-0.834 81	0.035 656	Down
<i>Mib2</i>	ENSMUST00000151843	-0.616 62	0.036 781	Down
<i>Tbce</i>	ENSMUST00000159966	-1.610 2	0.005 239	Down
<i>Till11</i>	ENSMUST00000160906	1.295 583	0.006 904	Up
<i>Rbm26</i>	ENSMUST00000163499	-1.271 27	0.019 638	Down
<i>Rbm26</i>	ENSMUST00000163545	0.850 966	0.012 84	Up
<i>Nt5c2</i>	ENSMUST00000168536	2.836 236	0.018 041	Up
<i>Dnajc13</i>	ENSMUST00000185503	1.366 736	0.038 832	Up
<i>Pcdh9</i>	ENSMUST00000192221	0.823 86	0.012 156	Up
<i>Pcdh9</i>	ENSMUST00000195376	2.469 259	0.000 393	Up
<i>Fnbp1l</i>	ENSMUST00000197259	1.714 66	0.017 99	Up
<i>Mif2</i>	ENSMUST00000198662	-1.700 95	0.015 405	Down
<i>Immt</i>	ENSMUST00000206625	-1.130 42	0.045 971	Down
<i>Picalm</i>	ENSMUST00000207225	1.171 05	0.013 091	Up
<i>Btrc</i>	ENSMUST00000225662	-0.634 03	0.040 695	Down
<i>Lrp8</i>	ENSMUST00000238570	1.068 084	0.037 582	Up

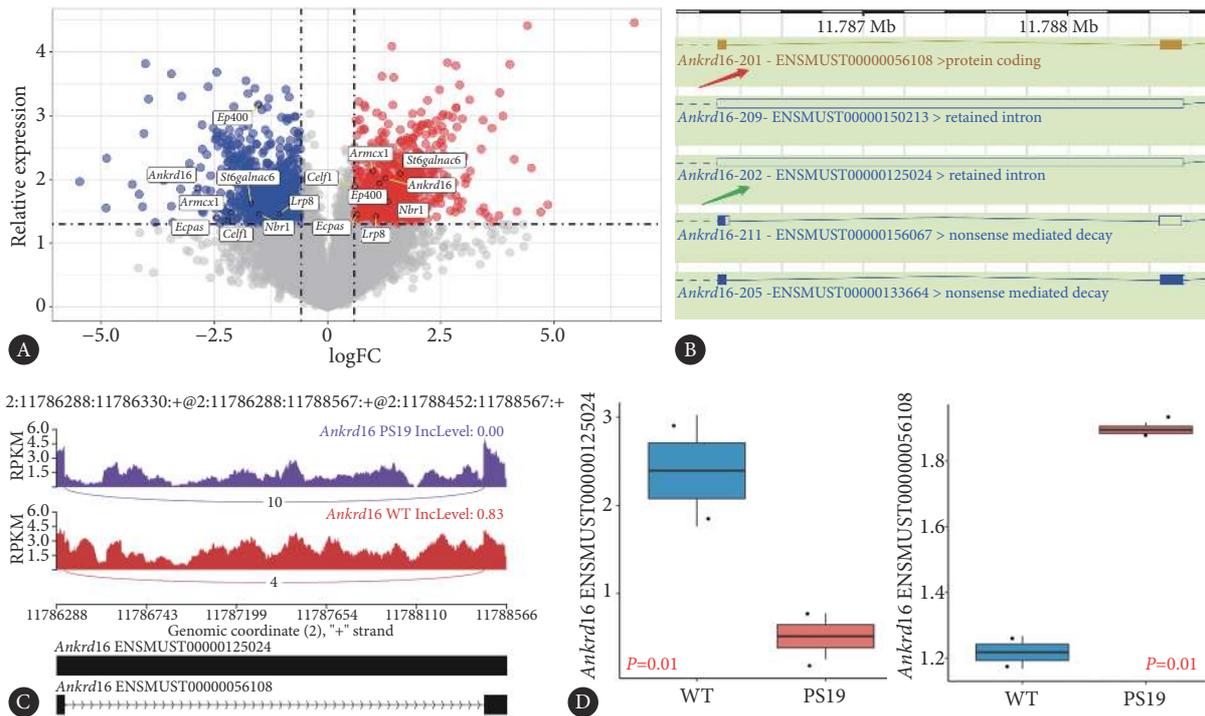


图 5 转录本表达与AS事件的相关性

Fig 5 Correlation between transcript expression and AS events

A, Volcano plot of dysregulated transcripts. Genes carried differentially expressed transcripts with opposite trends were labeled. B, Genomic information of *Ankrd16*. Red arrow indicates the protein coding transcript and the green arrow indicates the intron retained transcript. C, The sashimi plots for *Ankrd16* show a decreased inclusion level of intron retained transcript, ENSMUST00000125024, in the PS19 group. D, Relative expression of different transcripts. ENSMUST00000125024 represents the intron retained transcript and ENSMUST00000056108 represents the protein coding transcript.

表 4 失调的剪切因子

Table 4 Dysregulated splicing factors

Gene	Transcript	logFC	P	Change
<i>Prpf3</i>	ENSMUST00000015892	0.963 048	0.012 93	Up
<i>Hnrnpa1</i>	ENSMUST00000036004	1.301 391	0.008 566	Up
<i>Gemin8</i>	ENSMUST00000056410	2.915 23	0.000 33	Up
<i>Snrpn</i>	ENSMUST00000098402	1.474 11	0.017 551	Up
<i>Aqr</i>	ENSMUST00000102543	1.764 123	0.002 358	Up
<i>Pabpn1</i>	ENSMUST00000116476	-0.766 28	0.010 123	Down
<i>Son</i>	ENSMUST00000140312	0.783 944	0.038 661	Up
<i>Hnrnp3</i>	ENSMUST00000140743	1.921 598	0.017 536	Up
<i>U2af1</i>	ENSMUST00000166526	1.040 334	0.012 575	Up
<i>Tnpo3</i>	ENSMUST00000170350	0.964 117	0.003 083	Up
<i>Rbm4b</i>	ENSMUST00000183332	-1.018 92	0.015 464	Down
<i>Sf3b1</i>	ENSMUST00000188859	-1.562 49	0.010 113	Down
<i>Rps13</i>	ENSMUST00000205548	-2.442 38	0.001 799	Down
<i>Cd2bp2</i>	ENSMUST00000206026	-0.901 13	0.001 208	Down
<i>Lsm4</i>	ENSMUST00000210987	1.621 149	0.013 662	Up

RNA和mRNA降解相关)、Pre-mRNA加工因子3(*Prpf3*)和CD2细胞质尾部结合蛋白2(*Cd2bp2*)的簇(图6C)。本研究对失调的SFs和参与显著AS事件的转录本进行了相关性分析(图6D)。所有4个SF均与多个转录本相关。*Snrpn*与最多数量的转录本相关,其中9个转录本呈负相

关,7个转录本呈正相关。

2.6 UNC0642逆转PS19小鼠异常转录基因与AS事件关联分析

本研究将WANG等^[10]报道的PS19小鼠体内可被UNC0642逆转的98个下调基因和173个上调基因与本研

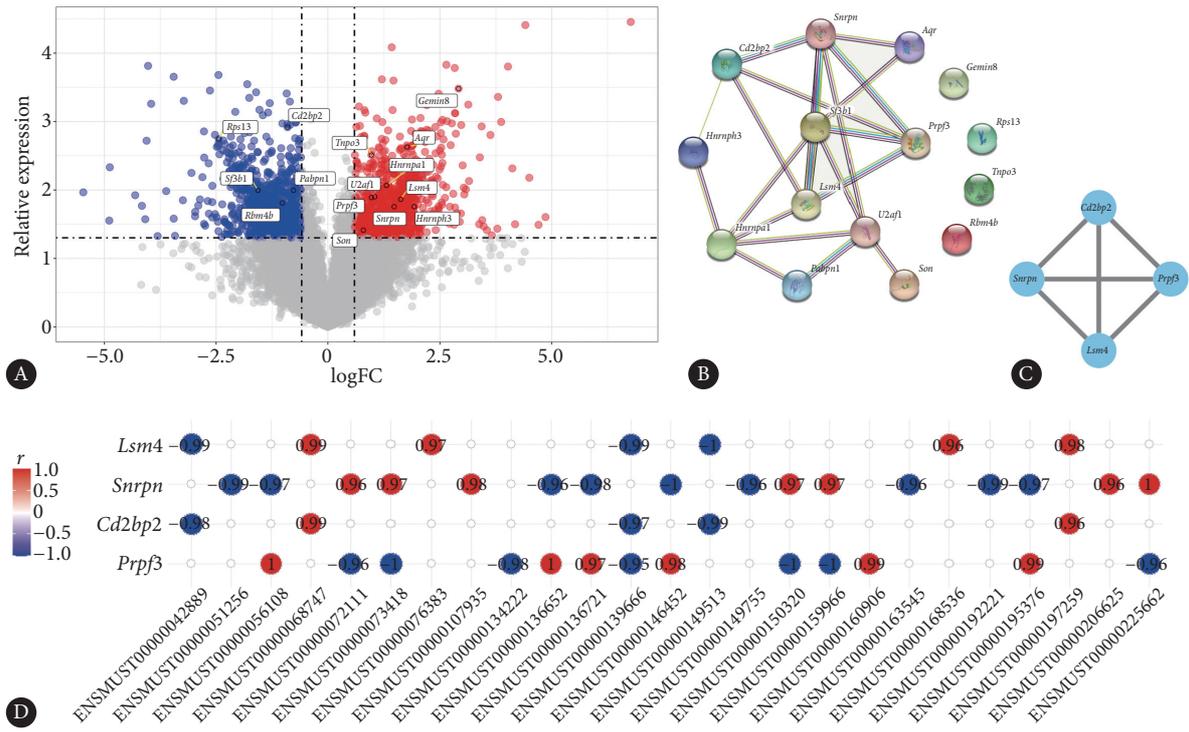


图 6 上游剪切因子分析

Fig 6 Analysis of upstream splicing factors

A, Volcano plot of dysregulated SFs. 10 SFs were upregulated and 5 SFs were downregulated. B, PPI networks of the 15 dysregulated SFs. C, The screened cluster of SFs using the MCODE application in Cytoscape. D, Correlation between the dysregulated SFs and transcripts involved in AS events.

究中发生异常AS事件的基因取交集发现,仅*Ksr1*基因发生了显著异常AS事件(SE),提示UNC0642逆转的基因表达可能与AS事件并不相关,见图7。

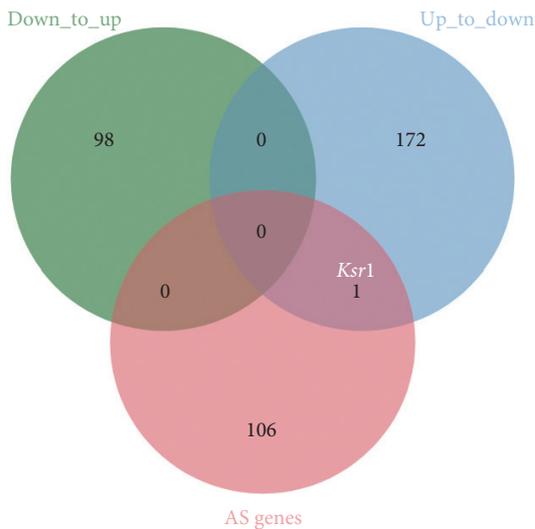


图 7 UNC0642逆转PS19小鼠异常转录基因与AS事件关联分析

Fig 7 Intersection between dysregulated PS19 mice genes reversed by UNC0642 and AS events

The expression of 98 downregulated and 173 upregulated genes in PS19 mice had been reversed by UNC0642 treatment. The list of these genes was intersected with genes in significant AS events and the result showed that only *Ksr1* was found in AS events.

2.7 PS19小鼠异常AS事件验证

实验结果(图8)表明6月龄PS19小鼠前额叶皮质中包含外显子19的*Lrp8*条带(435 bp)显著低于WT小鼠,提示PS19小鼠*Lrp8*外显子19跳跃异常增加与RNA测序结果一致。

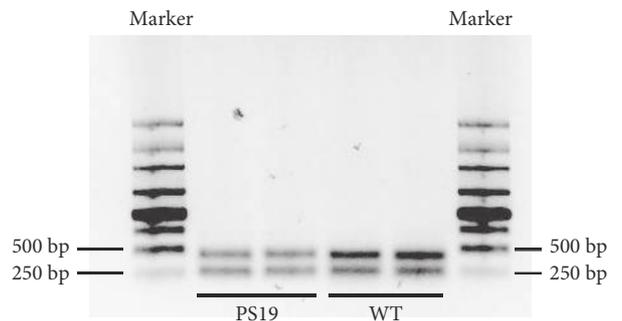


图 8 PS19小鼠异常AS事件验证

Fig 8 Validation of AS events of PS19 mice

RNA from the prefrontal cortex was extracted and *Lrp8* was amplified in the range of exon 18 to exon 20 to detect exon 19 skipping. The PCR products were observed by electrophoresis with 1% agarose.

3 讨论

APICCO等^[9]发现9月龄PS19小鼠大脑皮层中突触传

递相关基因出现AS异常。但本研究发现异常AS事件在早期(6月龄)PS19小鼠的前额叶皮层中就已经出现,突触组织基因在转录水平上失调,这些基因发生了异常SE事件,本研究提示AS的异常改变可能发生在神经退行性表型之前。此外,本研究发现异常的A3SS事件在剪切体基因中富集,*Snrpn*和*Lsm4*等多个SF可能参与了AS异常事件的调控。

本研究发现的PS19小鼠在不同时间点的AS变化与既往研究既相似又有所不同。本研究发现在6月龄时,SE(50.43%)、A3SS(24.79%)和MXE(11.11%)是排在前三位的AS事件,PS19小鼠的RI事件与WT小鼠相比显著下降($\Delta\text{PSI} > 0$ 和 $\Delta\text{PSI} < 0$ 分别为20%和80%)。这与APICCO等^[9]发现的在9月龄PS19小鼠体内排名前3位的AS事件一致,GO富集分析显示tau蛋白病中突触结构/功能相关基因的剪切失调。然而,6月龄和9月龄的PS19小鼠所涉及的基因不同。本研究发现与WT小鼠相比,6月龄PS19小鼠的*Setd5*、*Adgrl3*、*Sorbs1*、*Shank1*、*Lrp8*、*Mecp2*、*Tanc2*和*Spire1*存在异常剪切。APICCO等发现9月龄PS19小鼠的*Ndr4*、*Gria2*、*Camk2b*、*Snap25*、*Papss1*、*Snrnp70*和*Nrxn2*存在异常剪切。6月龄PS19小鼠早期出现异常SE事件。*Lrp8*是一种参与学习和记忆的ApoE受体。*Lrp8*编码区外显子19介导*Lrp8*与PSD95相互作用激活NMDA受体。缺乏外显子19的*Lrp8*亚型导致空间学习和长期记忆存储缺陷^[3]。本研究发现,与WT小鼠相比,6月龄PS19小鼠中*Lrp8*外显子19的包含水平显著降低(ΔPSI 分别为0.1和0.8),表明Tau^{P301S}突变可能导致*Lrp8*外显子19跳跃。DNA甲基化在AS外显子(ASEs)中富集,抑制DNA甲基化会导致ASEs的异常剪切。*Mecp2*是最丰富的DNA甲基化解码器,富集在ASEs中,抑制DNA甲基化会破坏*Mecp2*对ASEs的特异性靶向作用。*Mecp2*通过调节活动依赖的基因组程序促进记忆巩固,并在小鼠海马中控制空间学习诱导的AS事件,而*Mecp2*的破坏会改变这些AS事件。*Mecp2*通过调节tau的表达和磷酸化参与AD的tau蛋白病变^[14]。另一方面,tau过度表达导致miR-132的丢失,破坏miR-132/*Mecp2*通路,并损害神经元的内吞作用,提示tau和*Mecp2*的危险循环。在成年小鼠的大脑中,*Mecp2*的选择性剪切产生了两种亚型,MeCP2E1和MeCP2E2,这两种亚型具有脑区特异性的表达模式。在这项研究中,发现tau^{P301S}突变抑制*Mecp2*外显子跳跃,导致更长的亚型。这项工作扩展了对与tau和*Mecp2*循环相关危害的理解。

除了突触组织基因的SE事件,本研究也在PS19小鼠中观察到剪切体基因显著异常的A3SS事件,包括*Celf1*、

*Celf2*和*Celf4*。在1型强直性肌营养不良中,*Celf2*引起tau外显子10的错误剪切,并促进tau蛋白聚集^[5]。本研究在PS19小鼠中发现了一些失调的SFs转录本,笔者推测tau蛋白也可能调节SFs的剪切,并导致SFs的失调。

本研究差异表达转录本的结果与SE事件一致。参与SE事件和转录水平失调的基因均富集于突触结构和功能。例如,本研究探索了*Ankrd16*来研究转录本表达和AS事件之间的相关性。在PS19小鼠中,*Ankrd16*的长内含子保留亚型减少,与PSI水平降低相一致(PS19和WT分别为0.0和0.83)。

根据先前报道的SFs列表,本研究发现PS19小鼠中有15个SFs显著失调。利用Cytoscape的MCODE模块鉴定出4个SFs,包括*Snrpn*、*Lsm4*、*Prpf3*和*Cd2bp2*。这4个SFs与许多失调的转录本广泛相关。tau蛋白与果蝇和AD人脑中的许多小核核糖核蛋白颗粒(snRNP)核心成分相关,包括*Snrnp70*、*Snrpd2*、*Snrpd3*、*Snrpn*和*Snrpa*。Tau蛋白诱导剪切体破坏并引起果蝇神经退行性变。此外,tau蛋白和*Snrpn*的破坏导致果蝇大脑中类似的异常AS特征^[9]。*Snrpn*被确定为一个独立的AD风险基因组位点,并在果蝇中调节tau介导的神经毒性^[16]。本研究发现*Snrpn*与最多的转录本相关,表明其参与了tau^{P301S}诱导的突触基因的AS改变。

WANG等^[10]发现UNC0642可逆转PS19小鼠相关基因的表达^[10],本课题组将WANG等报道的基因与本研究中发生了异常AS事件的基因取交集,仅*Ksr1*基因发生了显著异常AS事件,提示UNC0642的逆转效果可能与AS事件并不相关。

最后,本研究采用PCR对本研究鉴定的AS事件进行了验证,结果发现6月龄PS19小鼠中包含外显子19的*Lrp8*长转录本条带显著低于WT小鼠,提示PS19小鼠*Lrp8*外显子19跳跃异常增加与本研究生信分析结果一致。

综上所述,本研究通过大数据分析发现,6月龄PS19小鼠脑内异常AS事件在tau^{P301S}诱导的神经退行性表型之前就已出现。异常的剪切因子可能参与了tau^{P301S}引起的异常AS事件。本研究扩展了tau蛋白病中tau蛋白循环和剪切因子的知识。

* * *

作者贡献声明 田学文负责正式分析、调查研究和研究方法,陈婵负责研究项目管理和软件,王雄负责论文构思、数据审编、可视化和审读与编辑写作,田学文、陈婵和王雄负责初稿写作。所有作者已经同意将文章提交给本刊,且对将要发表版本进行最终定稿,并同意对工作的所有方面负责。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] BARALLE F E, GIUDICE J. Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18: 437–451. doi: 10.1038/nrm.2017.27.
- [2] COOPER T A, WAN L, DREYFUSS G. RNA and disease. *Cell*, 2009, 136: 777–793. doi: 10.1016/j.cell.2009.02.011.
- [3] TOLLERVEY J R, WANG Z, HORTOBAGYI T, *et al.* Analysis of alternative splicing associated with aging and neurodegeneration in the human brain. *Genome Res*, 2011, 21: 1572–1582. doi: 10.1101/gr.122226.111.
- [4] HAN S, NA Y, KOH I, *et al.* Alternative splicing regulation of low-frequency genetic variants in exon 2 of TREM2 in Alzheimer's disease by splicing-based aggregation. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(18): 9865. doi: 10.3390/ijms22189865.
- [5] TYSOE C, WHITTAKER J, XUEREJ B, *et al.* A presenilin-1 truncating mutation is present in two cases with autopsy-confirmed early-onset Alzheimer disease. *Am J Hum Genet*, 1998, 62: 70–76. doi: 10.1086/301672.
- [6] WEGMANN S, BIERNAT J, MANDELKOW E. A current view on Tau protein phosphorylation in Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol*, 2021, 69: 131–138. doi: 10.1016/j.comb.2021.03.003.
- [7] STRANG K H, CROFT C L, SORRENTINO Z A, *et al.* Distinct differences in prion-like seeding and aggregation between Tau protein variants provide mechanistic insights into tauopathies. *J Biol Chem*, 2018, 293: 2408–2421. doi: 10.1074/jbc.M117.815357.
- [8] YOSHIYAMA Y, HIGUCHI M, ZHANG B, *et al.* Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron*, 2007, 53: 337–351. doi: 10.1016/j.neuron.2007.01.010.
- [9] APICCO D J, ZHANG C, MAZIUK B, *et al.* Dysregulation of RNA splicing in tauopathies. *Cell Rep*, 2019, 29(13): 4377–4388. doi: 10.1016/j.celrep.2019.11.093.
- [10] WANG W, CAO Q, TAN T, *et al.* Epigenetic treatment of behavioral and physiological deficits in a tauopathy mouse model. *Aging Cell*, 2021, 20(10): e13456. doi: 10.1111/acer.13456.
- [11] SVEEN A, AGESEN T H, NESBAKKEN A, *et al.* Transcriptome instability in colorectal cancer identified by exon microarray analyses: associations with splicing factor expression levels and patient survival. *Genome Med*, 2011, 3: 32. doi: 10.1186/gm248.
- [12] TROTTER J H, KLEIN M, JINWAI U K, *et al.* ApoE2 function in the establishment and maintenance of retinal synaptic connectivity. *J Neurosci*, 2011, 31(40): 14413–14423. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3135-11.2011.
- [13] WASSER C R, MASIULIS I, DURAKOGLUGIL M S, *et al.* Differential splicing and glycosylation of Apoer2 alters synaptic plasticity and fear learning. *Sci Signal*, 2014, 7(353): ra113. doi: 10.1126/scisignal.2005438.
- [14] MAPHIS N M, JIANG S, BINDER J, *et al.* Whole genome expression analysis in a mouse model of tauopathy identifies MECP2 as a possible regulator of tau pathology. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 69. doi: 10.3389/fnmol.2017.00069.
- [15] DHAENENS C M, TRAN H, FRANDEMICHE M L, *et al.* Mis-splicing of Tau exon 10 in myotonic dystrophy type 1 is reproduced by overexpression of CELF2 but not by MBNL1 silencing. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1812: 732–742. doi: 10.1016/j.bbdis.2011.03.010.
- [16] SHULMAN J M, IMBOYWA S, GIAGTZOGLU N, *et al.* Functional screening in *Drosophila* identifies Alzheimer's disease susceptibility genes and implicates Tau-mediated mechanisms. *Hum Mol Genet*, 2014, 23: 870–877. doi: 10.1093/hmg/ddt478.

(2023-06-05收稿, 2023-09-13修回)

编辑 汤洁



开放获取 本文遵循知识共享署名—非商业性使用

4.0国际许可协议(CC BY-NC 4.0), 允许第三方对本刊发表

的论文自由共享(即在任何媒介以任何形式复制、发行原文)、演绎(即修改、转换或以原文为基础进行创作), 必须给出适当的署名, 提供指向本文许可协议的链接, 同时标明是否对原文作了修改; 不得将本文用于商业目的。

CC BY-NC 4.0许可协议访问<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>。

© 2023 《四川大学学报(医学版)》编辑部 版权所有