

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2018.20180215

Myc/his-TDP-43 融合蛋白对 tau 外显子 10 可变剪接的影响

缪世琛, 屈舒婷, 陆 颖, 唐 啸, 任梁梁, 顾建兰*

南通大学医学院, 南通 226001

[摘要] **目的:**构建带 myc/his 标签的 pcDNA3.1/TDP-43 及其截断体质粒,探讨 myc/his-TDP-43 融合蛋白对 tau 外显子 10 可变剪接的影响。**方法:**采用 PCR 法扩增 TDP-43 基因及其各截断体,将扩增产物和载体 pcDNA3.1 双酶切后回收,连接载体和目的片段,获得重组质粒。在 HEK-293FT 细胞中转染 pcDNA3.1/TDP-43·myc·his 及其截断体质粒,Western 印迹法检测相关蛋白的表达。TDP-43 或 siTDP-43 和 tau 迷你基因 SI9/SI10 共转,RT-PCR 检测 TDP-43 对 tau 外显子 10 可变剪接的影响。**结果:**成功构建了 pcDNA3.1/TDP-43·myc·his 全长及各截断体质粒,并在 HEK-293FT 细胞中检测到其蛋白表达。Myc/his-TDP-43 融合蛋白可呈剂量依赖性促进 4R-tau 的表达($P<0.05$ 或 0.01)。**结论:**Myc/his-TDP-43 融合蛋白可促进 4R-tau 的表达,携带 myc/his 标签不影响 TDP-43 对 tau 外显子 10 可变剪接的促进作用,为后续研究奠定了基础。

[关键词] 反式激活反应 DNA 结合蛋白;tau 蛋白;可变剪接;阿尔茨海默病

[中图分类号] Q 786 **[文献标志码]** A

Effect of myc/his-TDP-43 fusion protein on alternative splicing of tau exon 10

MIAO Shi-chen, QU Shu-ting, LU Ying, TANG Xiao, REN Liang-liang, GU Jian-lan*

School of Medicine, Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu, China

[Abstract] **Objective:** To construct plasmids of TDP-43 and its truncations to pcDNA3.1 vector with myc/his tag and explore the effect of myc/his-TDP-43 fusion protein on the alternative splicing of tau exon 10. **Methods:** The cDNA of TDP-43 and its truncations were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and inserted into pcDNA3.1 after endonuclease cleavage. The recombinant plasmids were transfected into HEK-293FT cells and the expression of TDP-43 were detected by Western blots. TDP-43 or siTDP-43 was co-transfected with tau mini gene, SI9/SI10, and the alternative splicing products of tau exon 10 was detected by RT-PCR. **Results:** pcDNA3.1/TDP-43·myc·his and the truncation plasmids were constructed successfully. Myc/his-TDP-43 and truncation fusion proteins were expressed in HEK-293FT cells. Myc/his-TDP-43 fusion protein induced the expression of 4R-tau. **Conclusions:** Myc/his-TDP-43 fusion protein promoted 4R-tau expression. The truncation plasmids of TDP-43 might be helpful for the future study of different domains of TDP-43 in tau pathology and alternative splicing of tau exon 10 in neurodegenerative diseases.

[Key Words] TDP-43; tau protein; alternative splicing; Alzheimer disease

反式激活反应 DNA 结合蛋白(trans-activating response DNA-binding protein of 43 kDa, TDP-43)包含 414 个氨基酸,存在于各种神经退行性疾病中,包括路易体病、皮质基底节变性和阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)等^[1-2]。TDP-43 含有 2 个高度保守的 RNA 识别基序(RNA recognition motif, RRM)和 1 个富含甘氨酸的尾巴^[3]。其中,RRM 的主要功能是介导 TDP-43 与双/单链 DNA、RNA 结合,

是 TDP-43 发挥可变剪接调节作用所必需的。

Tau 蛋白过度磷酸化是 AD 的致病机制之一。为了探讨 TDP-43 对 tau 基因剪接以及表达的调节,本课题组构建了 pCI/TDP-43·HA,发现其在细胞中过表达后可促进 4R-tau 的表达^[4]。TDP-43 是高度磷酸化的磷蛋白,其功能受磷酸化调控。本课题组后续须研究哪些蛋白激酶可以磷酸化 TDP-43 和可能的磷酸化位点,及磷酸化后对 TDP-43 调

[收稿日期] 2018-03-08 **[接受日期]** 2018-03-27

[基金项目] 大学生创新创业计划国家级项目(201710304031Z),江苏省高校自然科学基金面上项目(16KJB310013),南通市市级科技计划项目(MS12015058),南通大学博士科研启动基金(15B30)。Supported by National Projects of University Students' Innovation and Entrepreneurship Program(201710304031Z),Natural Science Foundation of Universities of Jiangsu(16KJB310013),Nantong Municipal Science and Technology Project(MS12015058),and Doctoral Research Fund of Nantong University(15B30)。

[作者简介] 缪世琛,南通大学医学院 2015 级临床医学专业本科生。E-mail: 940193076@qq.com

*通信作者(Corresponding author)。Tel: 0513-85051813; E-mail: ntgilan@163.com

节 tau 功能的影响。本课题组现有的蛋白激酶,如酪蛋白激酶^[5]、蛋白激酶 A^[6]等表达质粒都构建在与 TDP-43 相同的载体 pCI-Neo 质粒上,且携带相同的 HA 标签。这为利用表达标签的优势研究蛋白激酶和 TDP-43 的相互作用带来了困难。因此,本研究将 TDP-43 构建到带 myc、his 标签的 pcDNA3.1 载体上,将 pcDNA3.1/TDP-43·myc·his 和 tau 迷你基因共转染,探讨 myc/his 标签肽对 TDP-43 蛋白在 tau 外显子 10 可变剪接中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂 细菌、细胞和质粒:大肠杆菌 DH5 α 购自天根生化科技(北京)有限公司;pCAG/TDP-43 质粒购自 Origene 公司;HEK-293FT 细胞(人胚肾细胞)和 N2a 细胞(小鼠神经瘤母细胞)购自中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所。抗体和其他试剂:myc 抗体(9E10)购自 Millipore 公司;tubulin 抗体购自 Sigma 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠、羊抗兔 IgG 抗体购自 Jackson Immuno Research Laboratories 公司;抗 GAPDH 抗体购自 Santa Cruz 公司。*Bam*H I、*Not* I 购自 NEB 公司;DNA marker、T₄ DNA 连接酶购自 Promega 公司;PrimeSTARTM HS DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司;质粒小量抽提试剂盒、凝胶回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;预染蛋白 Marker 购自 Bio-Rad 公司;RT 试剂盒、DMEM 培养基、胎牛血清购自 Invitrogen 公司;蛋白定量试剂盒和 ECL 化学发光试剂盒购自 Pierce 公司;Fugene HD 购自 Roche 公司。引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。培养板及相关细胞实验耗材购自 Corning 公司。

1.2 真核表达质粒 pcDNA3.1/TDP-43·myc·his 的构建 根据 GenBank 报道的 TDP-43 编码序列(coding sequence),设计并合成了相应的上下游引物,以 pCAG/TDP-43 为模板,扩增目的基因,反应总体积 100 μ L,含 5 $\times$ 反应缓冲液 20 μ L,模板 pCAG/TDP-43 共 20 ng,上、下游引物各 2 μ L(10 μ mol/L),PrimeSTARTM HS DNA 聚合酶 1 μ L(2.5 U/ μ L),dNTP mix 8 μ L(10 mmol/L);扩增条件为 98 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,98 $^{\circ}$ C 30 s、68 $^{\circ}$ C 90 s 重复 35 个循环,总延伸为 68 $^{\circ}$ C 10 min。

琼脂糖凝胶电泳鉴定并用 DNA 回收试剂盒回收 PCR 产物。纯化的 PCR 产物和 pcDNA3.1 的空载质粒分别用限制性核酸内切酶 *Bam*H I 和 *Not* I 进

行双酶切,37 $^{\circ}$ C 过夜。酶切后电泳鉴定并用凝胶回收试剂盒回收酶切产物。将酶切回收后的 pcDNA3.1 空载和 TDP-43 目的片段按 1:8 的比例,用 T₄ DNA 连接酶(10 μ L 体系)4 $^{\circ}$ C 连接过夜。

全部连接产物转化到 DH5 α 感受态细胞,涂布于含 100 μ g/mL 的氨苄青霉素(ampicillin, Amp)的琼脂糖平板上,37 $^{\circ}$ C 孵箱内倒置培养过夜。挑取 3~4 个单菌落,接种于含 Amp 的 5 mL LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。离心后回收菌体,用质粒小量抽提试剂盒抽提质粒。质粒用 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切 3 h 后电泳,选取在 1 200 bp 处有目的条带的克隆进行测序鉴定。将经 PubMed 比对正确的质粒用于后续实验。

1.3 细胞培养和转染 HEK-293FT 细胞用含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM)培养基,N2a 细胞用含 10% 血清的 DMEM/F12 培养基于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养,倒置相差显微镜下观察细胞。转染前 1 d,细胞用 0.25% 的胰蛋白酶消化,用不含抗生素的 DMEM/FBS 培养基终止反应,细胞以 50% 的融合度接种于 24 孔细胞培养板中,每组 3 个复孔。第 2 天,细胞覆盖达 90% 左右,按照 Fugene HD 操作说明进行转染,48 h 后处理细胞。

1.4 Western 印迹法测定蛋白表达 细胞转染 48 h 后,每孔细胞用 100 μ L 1 $\times$ Loading buffer 于 100 $^{\circ}$ C 沸水中裂解 5 min。提取的蛋白用 Pierce OD₆₆₀ 蛋白定量试剂盒测定浓度后,调整蛋白浓度一致,10% 或 12% SDS-PAGE 电泳分离后,电转至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭 1 h,anti-myc 单克隆抗体(1:1 000)或 anti-tubulin(1:5 000)、anti-GAPDH 抗体(1:1 000)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,用含 0.1% Tween 20 的 TBS(TBST)洗涤后,与辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)标记的二抗室温孵育 2 h,TBST 洗涤 3 次后显影。

1.5 反转录聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) Tau 迷你基因和不同量的 TDP-43 或 siTDP-43 转染至 HEK-293FT 细胞,48 h 后用 RNA 抽提试剂盒(OMEGA)提取总 RNA,取总 RNA 1 μ g,加入 5 mmol/L dNTP mix 2 μ L、10 μ mol/L Oligo dT₁₈ 1 μ L、补适量 DEPC 水至总体积 10 μ L,65 $^{\circ}$ C 5 min;加入 10 $\times$ 反转录 buffer 2 μ L、MgCl₂ 4 μ L、DTT 2 μ L、40 U/ μ L RNase OUTTM 1 μ L、200 U/ μ L

SuperScrip III 1 μ L, 50 $^{\circ}$ C 50 min, 85 $^{\circ}$ C 5 min; 加入 RNase H 1 μ L (2 U), 37 $^{\circ}$ C 20 min。以 cDNA 为模板, 用 PrimeSTARTM HS DNA Polymerase (TaKaRa) 进行 PCR 反应检测 tau 外显子 10 的可变剪接, 引物序列为: 5'-GGT GTC CAC TCC CAG TTC AA-3' (上游), 5'-CCC TGG TTT ATG ATG GAT GTT GCC TAA TGA G-3' (下游)。鼠 GAPDH 引物序列: 5'-TGC TGA GTA TGT CGT GGA GTC TA-3' (上游), 5'-AGT GGG AGT TGC TGT TGA AGT CG-3' (下游)。扩增条件为 98 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 98 $^{\circ}$ C 10 s, 68 $^{\circ}$ C 40 s 共 30 个循环, 总延伸为 68 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶 (含 0.5 μ g/mL 溴化乙锭) 电泳后, 分析条带。

1.6 TDP-43 各截断体的构建 根据 TDP-43 蛋白的结构设计并合成各截断体的引物, 以构建成功的 pcDNA3.1/TDP-43 $\cdot$ myc $\cdot$ his 为模板扩增目的基因。纯化的 PCR 产物和 pcDNA3.1 空载体分别用 BamH I 和 Not I 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 回收酶切产物。将酶切后的 pcDNA3.1 和 TDP-43 各截断体的片段在 4 $^{\circ}$ C 连接、转化, 通过 Amp 选择培养后, 挑斑摇菌, 提取质粒, 酶切鉴定后测序。

1.7 统计学处理 采用 STATA 10.0 软件对样本数据进行单因素方差分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 pcDNA3.1/TDP-43 $\cdot$ myc $\cdot$ his 全长质粒的构建 结果 (图 1) 显示: 电泳图 1.2 kb 处有目的片段, 测序结果也显示 pcDNA3.1/TDP-43 $\cdot$ myc $\cdot$ his 质粒构建成功。

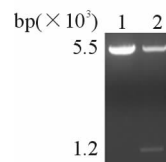


图 1 pcDNA3.1/TDP-43 $\cdot$ myc $\cdot$ his 全长质粒的酶切鉴定

1: pcDNA3.1; 2: TDP-43

2.2 过表达或下调 TDP-43 对 tau 迷你基因可变剪接的影响 为验证 pcDNA3.1/TDP-43 对 tau 外显子 10 可变剪接的影响, 在 HEK-293FT 细胞中过表达不同量的 pcDNA3.1/TDP-43 $\cdot$ myc $\cdot$ his, 同时共转 tau 迷你基因 SI9/SI10。48 h 后, RT-PCR 检测 tau 外显子 10 的可变剪接产物; Western 印迹法检测 TDP-43 (anti-myc) 的表达。结果显示: TDP-43 促进 tau 外显子 10 的编码, 促进作用呈剂量依赖性 (图 2A)。进一步的验证实验结果显示: TDP-43 促进 tau 外显子 10 的表达, siTDP-43 下调 TDP-43 表达后则作用相反 ($P < 0.05$ 或 0.01, 图 2B)。

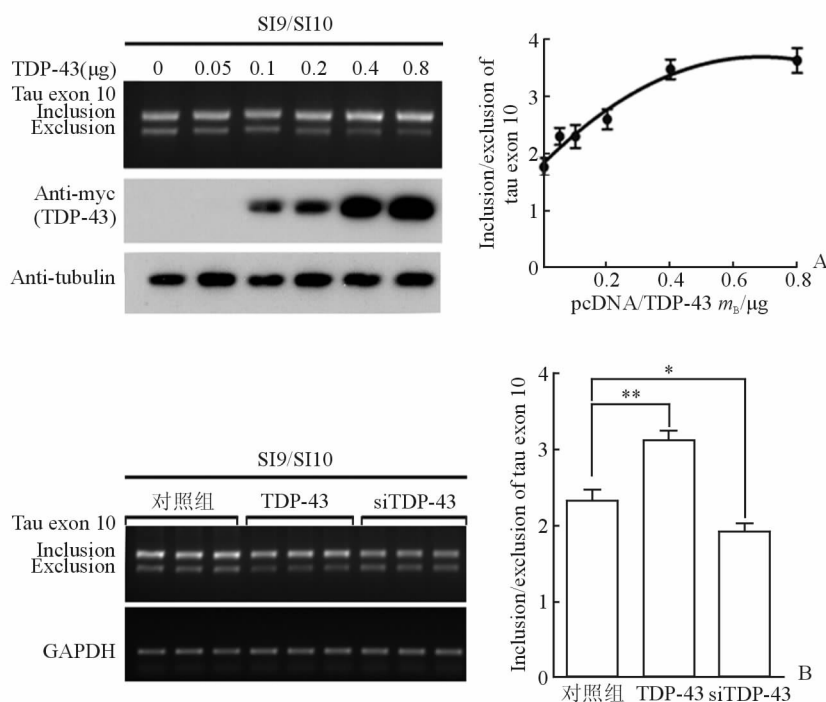


图 2 过表达或下调 TDP-43 对 tau 迷你基因 SI9/SI10 可变剪接的影响

A: 不同剂量 pcDNA3.1/TDP-43 $\cdot$ myc $\cdot$ his 和 SI9/SI10 共转染至 HEK-293FT 细胞 48 h 后 RT-PCR、Western 印迹结果及定量分析; B: TDP-43 或 siTDP-43 转染至 N2a 细胞 48 h 后 RT-PCR 结果及定量分析。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.3 TDP-43 及其各截断体质粒的构建和表达 pcDNA3.1/TDP-43·myc·his 全长质粒为模板,PCR 扩增获取目的片段,双酶切(图 3A)鉴定及公司测序鉴定结果显示,TDP-43 系列截断体构建成功。将 pcDNA3.1/TDP-43·myc·his 及各截断体质粒转染至 HEK-293FT 细胞,48 h 后 Western 印迹结果(图 3B)显示,除缺失核定位信号的 4 个质粒(pcDNA/TDP-43-188-414、237-414、255-414、273-414)外,其余质粒均在相应的相对分子质量附近有蛋白表达。

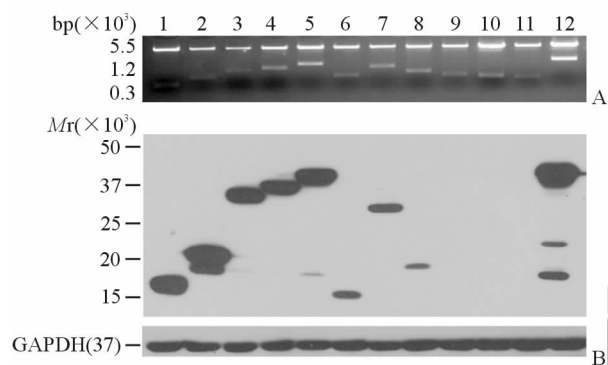


图 3 pcDNA/TDP-43 各截断体的酶切鉴定和表达

A: TDP-43 各截断体用 *Bam*H I 和 *Not* I 于 37℃ 酶切 3 h 后电泳结果; B: HEK-293FT 细胞中转染 TDP-43 及各截断体质粒 48 h 后 Western 印迹结果。1: TDP-43₁₋₁₀₄; 2: TDP-43₁₋₁₇₉; 3: TDP-43₁₋₂₇₅; 4: TDP-43₁₋₃₀₆; 5: TDP-43₁₋₃₈₃; 6: TDP-43₁₀₀₋₂₇₅; 7: TDP-43₁₀₀₋₄₁₄; 8: TDP-43₁₈₈₋₄₁₄; 9: TDP-43₂₃₇₋₄₁₄; 10: TDP-43₂₅₅₋₄₁₄; 11: TDP-43₂₇₃₋₄₁₄; 12: TDP-43

3 讨论

AD 是老年人常见的神经变性疾病。AD 的病因及发病机制尚未明确,特征性病理改变为 β -淀粉样蛋白沉积形成的细胞外老年斑和异常过度磷酸化的 tau 蛋白聚集形成的神经细胞内神经元纤维缠结^[7]。Josephs 等^[8]研究发现,57% AD 患者的神经元内含有 TDP-43,提出 TDP-43 可能是与 AD 发病相关的第 3 种蛋白质。

TDP-43 是一种 DNA 和 RNA 结合蛋白,参与 mRNA 的稳定、RNA 转录、剪接、RNA 加工、microRNA 的生物合成、细胞凋亡、细胞分裂、神经元完整性和可塑性等的调节^[3]。TDP-43 异常聚集与肌肉萎缩性侧索硬化症(渐冻症)有关,并在 AD 的进展中扮演着重要角色^[5]。TDP-43 在 AD 病理进程中的作用机制目前尚不清楚。高度保守的 SR 核蛋白家族参与体外前体 mRNA 剪接位点的选择,其中 SC35、9G8、ASF/SF2 等参与 tau 外显子 10 可

变剪接的调节^[9-11]。本课题组最近研究^[4]结果发现,pCI/TDP-43·HA 可以促进 4R-tau 的表达。本研究成功构建了 pcDNA3.1/TDP-43·myc·his 质粒,与 tau 迷你基因 SI9/SI10 共转后,发现 TDP-43 呈剂量依赖性地促进 4R-tau 的表达,下调 TDP-43 则抑制 4R-tau 的表达。该结果证明,携带不同的标签肽不影响 TDP-43 对 tau 外显子 10 可变剪接的促进作用。

TDP-43 蛋白全长分子中含有多个丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸位点,其中有多数潜在的磷酸化位点(NetPhos 2.0 软件分析结果)。文献^[12-13]报道,酪蛋白激酶可磷酸化 TDP-43,促进 TDP-43 在细胞内的聚集。为进一步研究蛋白激酶对 TDP-43 的磷酸化及磷酸化对 TDP-43 功能的影响,后续实验将把构建在 pcDNA3.1 载体上、带 myc/his 标签的 TDP-43 全长或各截断体质粒和构建在 pCI-Neo 载体上、带 HA 标签的酪蛋白激酶、蛋白激酶 A 等蛋白激酶质粒共转入细胞表达,观察哪些蛋白激酶可以磷酸化 TDP-43 及各结构域在 AD 等神经退行性疾病中作用的分子机制,以期对神经退行性疾病的防治提供分子生物学依据。

参考文献

- [1] HIGASHI S, ISEKI E, YAMAMOTO R, et al. Concurrence of TDP-43, tau and alpha-synuclein pathology in brains of Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies[J]. Brain Res, 2007, 1184: 284-294.
- [2] URYU K, NAKASHIMA-YASUDA H, FORMAN M S, et al. Concomitant TAR-DNA-binding protein 43 pathology is present in Alzheimer disease and corticobasal degeneration but not in other tauopathies[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2008, 67(6): 555-564.
- [3] BURATTI E, BARALLE F E. Multiple roles of TDP-43 in gene expression, splicing regulation, and human disease[J]. Front Biosci, 2008, 13: 867-878.
- [4] GU J, CHEN F, IQBAL K, et al. Transactive response DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates alternative splicing of tau exon 10: Implications for the pathogenesis of tauopathies[J]. J Biol Chem, 2017, 292(25): 10600-10612.
- [5] CHEN C, GU J, BASURTO-ISLAS G, et al. Up-regulation of casein kinase 1 ϵ is involved in tau pathogenesis in Alzheimer's disease[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 13478.
- [6] GU J, SHI J, WU S, et al. Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates 9G8-mediated alternative splicing of tau exon 10[J]. FEBS Lett, 2012, 586(16): 2239-2244.
- [7] HARDY J. A hundred years of Alzheimer's disease research[J]. Neuron, 2006, 52(1): 3-13.

- [8] JOSEPHS K A, WHITWELL J L, WEIGAND S D, et al. TDP-43 is a key player in the clinical features associated with Alzheimer's disease[J]. *Acta Neuropathol*, 2014, 127(6): 811-824.
- [9] SHI J, ZHANG T, ZHOU C, et al. Increased dosage of Dyrk1A alters alternative splicing factor (ASF)-regulated alternative splicing of tau in Down syndrome[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(42): 28660-28669.
- [10] QIAN W, LIANG H, SHI J, et al. Regulation of the alternative splicing of tau exon 10 by SC35 and Dyrk1A[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(14): 6161-6171.
- [11] YIN X, JIN N, GU J, et al. Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (Dyrk1A) modulates serine/arginine-rich protein 55 (SRp55)-promoted Tau exon 10 inclusion[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(36): 30497-30506.
- [12] KAMETANI F, NONAKA T, SUZUKI T, et al. Identification of casein kinase-1 phosphorylation sites on TDP-43[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 382(2): 405-409.
- [13] NONAKA T, SUZUKI G, TANAKA Y, et al. Phosphorylation of TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43) by truncated casein kinase 1delta triggers mislocalization and accumulation of TDP-43[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(11): 5473-5483.

[本文编辑] 姬静芳

