

SRp38 基因在小鼠视网膜细胞中的表达以及对 GluR-B 小基因可变剪接的调控*

彭正羽¹⁾ 李淑贞²⁾ 张 薇³⁾ 陈献华^{1)**}

(¹⁾复旦大学医学院医学神经生物学国家重点实验室, 上海 200032; ²⁾复旦大学脑科学研究院神经生物学研究所, 上海 200032;

³⁾浙江大学城市学院药理学系, 杭州 310015)

摘要 SR 蛋白在前体 mRNA 可变剪接调控中发挥重要作用. SRp38 作为一种新近发现的具有神经及生殖组织特异性的 SR 蛋白, 能够调控一些在神经组织中起重要作用的基因(如 GluR-B, Trk-C, NCAML1 等)的前体 mRNA 可变剪接. 同时还可以在有丝分裂 M 期及热休克时抑制前体 mRNA 剪接的发生. 利用 Western blot 以及免疫组织化学方法研究了 SRp38 蛋白在小鼠视网膜中的表达以及分布情况, 结果显示, SRp38 蛋白在视网膜中的表达具有区域特异性, 在外网层、内核层、内网层以及节细胞层中均有表达, 而在外核层无表达. 对分离培养的小鼠视网膜细胞进行免疫双标记分析的结果表明, SRp38 蛋白在视杆-双极细胞的胞体、轴突、树突中表达. 通过瞬时共转染以及 RT-PCR 分析, 发现在 R28 细胞中, SRp38 过表达可以促进 GluR-B 小基因 Flip 亚型的剪接. 结果提示 SRp38 蛋白可能通过调控小鼠视网膜内前体 mRNA 可变剪接、进而在小鼠视网膜功能中发挥重要作用.

关键词 SRp38, 前体 mRNA 可变剪接, 视网膜, 双极细胞, GluR-B 小基因

学科分类号 Q7, R77

随着基因组计划研究的深入, 目前已发现约 70% 的人类基因都存在前体 mRNA 可变剪接. 通过可变剪接过程可以将前体 mRNA 的外显子选择性地组合、连接在一起, 并最终表达出功能各异的、甚至完全相反的蛋白质亚型^[1,2]. 前体 mRNA 的剪接是在“剪接复合体”中进行的, 剪接复合体包含 snRNPs (small nuclear ribonucleoproteins)、hnRNPs (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins) 和 SR (serine/arginine-rich) 蛋白及其相关蛋白, 剪接复合体始终处于动态之中, 在不同的时期吸纳不同的组分进行 RNA-RNA、RNA-蛋白质、蛋白质-蛋白质之间的作用^[3~5]. 调控可变剪接的因素包括顺式元件和反式调节因子. 顺式元件指前体 mRNA 上特定的序列, 包括剪接增强子和抑制子. 反式调节因子主要包括 hnRNP 蛋白家族, SR 蛋白和 SR 相关蛋白家族, 它们可以通过同前体 mRNA 上的剪接增强子和抑制子结合并影响 snRNP 和其他剪接因子与 RNA 的相互作用, 从而促进或抑制剪接位点的利用, 最终产生不同的 mRNA 亚型以及蛋白质亚型^[6,7].

SR 蛋白是参与基因剪接调控的主要反式调节因子, 目前发现的 SR 蛋白已达 30 余种, 它们都有一些共同的特征, 即 N 端有 1~2 个 RBD (RNA binding domain) 结构域, C 端有数个包含 Ser~Arg 重复序列的 RS 结构域, RBD 结构域可以识别 mRNA 序列, 而 RS 结构域可以介导蛋白质-蛋白质相互作用^[8,9]. 在体外剪接 (*in vitro*) 系统中加入 SR 蛋白可以促进前体 mRNA 剪接的进行, 如 TRA2 (transformer 2), ASF / SF2 (alternative splicing factor/splicing factor 2) 蛋白等^[10].

SRp38 是一种新近发现的 SR 蛋白, 1998 年华盛顿大学的 Yang 等^[11]在对 TLS (translocated in liposarcoma) 蛋白的研究中, 通过酵母双杂实验率先发现了该蛋白质, 命名为 TLS 相关的 SR 蛋白 (TLS-associated SR protein, TASR). 1999 年 Komatsu

* 上海市卫生局科研基金(2006003)和国家自然科学基金(30470383)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 021-54237075, Email: xhchen@fudan.edu.cn

收稿日期: 2007-10-15, 接受日期: 2007-12-28

等^[12]用消减 PCR(degenerate PCR)的方法从分化的 P19 细胞也克隆得到了该基因, 命名为神经系统显著表达的 SR 蛋白(neural salient SR protein, NSSR)。2001 年, Cowper 等^[13]通过对 EST 数据库的 DNA 序列检索查找符合 SR 蛋白特点的基因时, 也发现了该基因, 根据其蛋白质产物分子质量的大小命名为 SRp40。而在 2002 年, Shin 等^[14]用 TRA2 蛋白做诱饵, 也分离得到了该基因, 命名为 SRp38。上述 4 种不同途径发现的 SR 蛋白通过基因序列的比较证实为是同一基因, 目前较一致的叫法为 SRp38 基因。SRp38 具有经典的 SR 蛋白结构特点, 即 N 端有 1 个 RBD 结构域, C 端有 3 个 RS 结构域。研究证实 SRp38 具有跟其他 SR 蛋白类似的作用, 可以调节基因的前体 mRNA 可变剪接。然而与其他 SR 蛋白不同的是, Shin 等^[14~16]发现在有丝分裂时以及热休克时, 去磷酸化的 SRp38 可以抑制前体 mRNA 可变剪接的发生, 从而在保证有丝分裂期的正常进行, 以及在热休克期间保护细胞免遭损伤等方面具有非常重要的生理意义。

以前的研究发现 SRp38 蛋白主要分布在小鼠及人体神经组织内(如大脑神经元, 小脑浦肯野氏细胞等)^[17], 同时在生殖系统(如睾丸)中也有表达^[18]。Fushimi 等^[19]的研究发现在小鼠视网膜以及晶状体上皮中有 SRp38 mRNA 的表达, 但关于 SRp38 蛋白在小鼠视网膜中表达的研究目前尚无报道。作为一类重要的中枢神经组织, 视网膜中的 SRp38 蛋白表达可能对其中前体 mRNA 可变剪接及视网膜的生理功能具有重要意义, 因此, 本研究对 SRp38 蛋白在小鼠视网膜中的表达以及分布情况进行了探索。

1 材料与方法

1.1 Western blot 分析

成年昆明种小鼠购自复旦大学上海医学院动物房, 经戊巴比妥钠麻醉后断颈处死, 迅速摘除小鼠眼球并沿冠状方向切开, 剥离出视网膜。小鼠的大脑组织经从枕骨大孔处剪开并分离获得。Western blot 的具体方法如前所述, 简介如下: 首先在组织样品中加入适量的裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 1% NP-40, 10% PMSF), 在冰浴上匀浆, 在冰上放置 20 min 以裂解细胞, 离心(13 000 r/min, 15 min), 取上清, 加入等体积 $2\times$ 上样缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8; 200 mmol/L DTT, 4 g/L SDS, 2 g/L

溴酚蓝, 20%甘油), 混匀, 100℃水浴煮沸 15 min, 冰上冷却后, 经 10% SDS-PAGE 分离蛋白质, 并转移到硝酸纤维素膜上, 以 5%脱脂奶粉/TBS 室温封闭 1 h, 以免抗 SRp38 抗体(1:500 稀释, 由本实验室自制^[17])为一抗, 4℃结合过夜, TBS 洗 3 次后, 加入碱性磷酸酶(AP)标记的羊抗兔 IgG(1:500, Sigma, St Louis, Missouri, USA)为二抗, 室温结合 1 h, TBS 洗 3 次后以 BCIP/NBT(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium, 上海鼎国生物公司)为底物显色。

1.2 免疫荧光组织化学分析

1.2.1 视网膜冰冻切片的制备以及视网膜细胞的分离。

如上述方法剥离的视网膜置于预冷的含 4%甲醛的磷酸盐缓冲液中固定 20 min, 然后将固定好的视网膜依次浸入预冷的含 10%、20% 和 30% 蔗糖的磷酸盐缓冲液中各 2 h 进行脱水处理。处理好的视网膜经包埋后, 用低温切片机沿垂直方向切片, 片厚 14 μm , 裱于预涂明胶的载玻片上, 反应前用预冷的含 4%甲醛的磷酸盐缓冲液固定 15 min。

视网膜细胞的分离采用木瓜蛋白酶酶解和机械分离相结合的方法, 摘取小鼠眼球, 于 70% 酒精中浸泡 30 s, 然后用预冷的生理盐水清洗, 切除眼球的上半部, 分离视网膜并放入酶消化液中, 37℃消化 40 min, 消化结束后用 Hank's 液清洗组织, 然后置于含 Ringer's 液的玻璃管中, 用滴管轻轻吹打至组织块消失, 静置 5 min 后取细胞悬浮液接种于预置盖玻片的培养皿中, 30 min 后, 吸掉上清, 加入 4%甲醛固定液固定细胞。

1.2.2 免疫荧光组织化学反应。将固定好的视网膜冰冻切片以及贴附在玻片上分离的视网膜细胞, 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次后, 滴加含 5%正常羊血清的磷酸盐缓冲液, 4℃封闭过夜。对于冰冻切片, 以免抗 SRp38 抗体(1:250)为一抗, 以经 SRp38 抗原预吸附的兔抗 SRp38 抗血清为阴性对照; 对于分离的视网膜细胞, 同时以免抗 SRp38 抗体(1:250)以及鼠抗 PKC(protein kinase C)单克隆抗体(1:5 000, Sigma, USA)作为一抗, 4℃结合过夜, PBS 洗 3 次。然后, 在二抗结合时, 对于视网膜冰冻切片, 用 texas red 偶联的驴抗兔 IgG 进行标记; 对于分离的视网膜细胞, 采用 texas red 偶联的驴抗兔 IgG 以及 FITC (Fluorescein Isothiocyanate)偶联的马抗羊 IgG 进行双重荧光标记(稀释度均为 1:200, Jackson ImmunoResearch

Laboratories, USA), 室温结合 1 h 后, PBS 洗 3 次, 用含 40% 甘油的 PBS 封片, 用激光共聚焦显微镜 (TCS-NT, Leica, Germany) 观察, 具体见文献[20].

1.3 细胞瞬时转染以及 RT-PCR 反应

1.3.1 细胞培养以及质粒的瞬时转染. R28 细胞来自 ATCC, 采用含 10% 新生牛血清的低糖 DMEM 培养基培养. 真核过表达 SRp38 的质粒 pcDNA3.1-his-myc-SRp38 以及 GluR-B 小基因的构建如前所述^[21], 细胞的瞬时转染采用 Lipfectamine 2000 (Invitrogen) 进行, 转染方法如下: 细胞以 3×10^4 的密度接种到 12 孔细胞培养板内, 24 h 后进行转染. 对于每孔细胞, 将 1.4 μg 相应质粒加入 100 μl DMEM 培养基, 混匀. 另各取 4 μl Lipfectamine 2000 与 100 μl DMEM 培养基吹打混匀, 室温静置 5 min 后, 将含质粒的培养基与含 Lipfectamine 2000 的培养基混合吹打均匀, 静置 20 min, 然后将混合液逐滴加入细胞培养皿的, 边加边轻晃以摇匀. 6 h 后, 换新鲜的培养液, 再过 9~15 h 后观察或收集细胞.

1.3.2 RT-PCR 分析. 用 Trizol 试剂按说明书要求从瞬时转染的 R28 细胞中抽提总 RNA, 然后, 以 Oligo-dT18 为引物, 用 M-MLV 逆转录酶按说明书要求进行逆转录反应, 将所得到的 cDNA 作为模板进行 PCR 分析. GluR-B 引物序列: 正向, T7 5' TAATACGACTCACTATAG 3', 反向, 5' CC-CCTA AATTTTAACACTCT 3'; 反应条件是: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 25~30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5min. PCR 产物用 1% 琼脂糖胶电泳分离, 凝胶成像系统拍照(上海复日公司), 然后用 Totallab 软件进行条带亮度分析并统计结果.

2 结 果

2.1 SRp38 蛋白在小鼠大脑以及视网膜中的表达

已有的研究发现 SRp38 的 mRNA 在鼠的视网膜中存在表达. Western blot 结果表明, 利用 SRp38 抗体, 无论是在鼠的大脑还是视网膜中均检测到分子质量为 38 ku 的 SRp38 蛋白条带(图 1a), 而抗体经抗原预吸附后, 该条带消失(图片未列出), 说明 SRp38 蛋白在鼠大脑和视网膜中均有表达.

2.2 SRp38 蛋白在小鼠视网膜中的表达分布

利用免疫荧光组织化学方法, 我们用抗 SRp38

蛋白的抗体对 SRp38 在鼠视网膜中的分布进行了分析, 图 1b 为鼠视网膜垂直切片免疫荧光的激光共聚焦扫描结果. 结果显示, SRp38 集中表达在鼠视网膜的外网层(outer plexiform layer, OPL)和内网层(inner plexiform, IPL)中, 同时在内核层(inner nuclear layer, INL)以及节细胞层(ganglion cell layer, GCL)中也有明显分布. 在用经过抗原预吸附后的 SRp38 蛋白抗体进行的检测(阴性对照)中没有观察到阳性信号(图 1c). 在图 1b 中, 还可以明显地观察到 SRp38 蛋白在双极细胞以及节细胞中的表达.

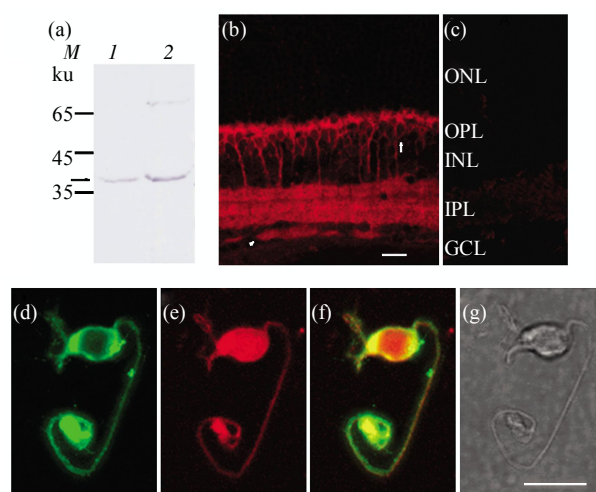


Fig. 1 The expression and distribution of SRp38 proteins in mouse retina

(a) Western blot images demonstrating the expression of SRp38 in mouse retina and cerebrum. M: Marker; 1: Retina; 2: Cerebrum. (b) Confocal laser scanning images showing the distribution of SRp38 in the OPL, IPL, INL and GCL. Bipolar cells (arrow) in the INL and ganglion cells (arrowhead) in the GCL were indicated. (c) Immunostaining with pre-absorbed SRp38 antiserum (Control). (d) and (e) Confocal laser scanning images showing the immunostainings of PKC (green) and SRp38 (red), respectively, in cultured retina cells. (f) The overlapped image of (d) and (e) showing the double-staining (yellowish). (g) The Nomarski image of the cells shown in (d), (e) and (f). Scale bars: 10 μm .

2.3 SRp38 蛋白在分离的视网膜双极细胞中的表达分布

为进一步确证 SRp38 蛋白在双极细胞中的表达, 在分离并将视网膜细胞固定在盖玻片上以后, 用特异标记视杆-双极细胞的鼠抗 PKC 单克隆抗体和兔抗 SRp38 进行了双标记的免疫荧光分析, 结果表明, 在分离的视杆-双极细胞中存在 PKC 和 SRp38 的共同表达, 其中 SRp38 的主要分布在胞体、树突以及轴突等部位, 如图 1d~e 所示.

2.4 SRp38 对 GluR-B 小基因的剪接调控

在体内正常的细胞中 GluR-B 基因通过可变剪

接可以产生两个亚型, 即 Flip 亚型(含 exon15)和 Flop 亚型(含 exon14), 在体外培养的细胞中, GluR-B 小基因则通过可变剪接产生 Flip 亚型以及 Truncate(截短型, 不含 exon14 以及 exon15)亚型(图 2^[12]), 通过在视网膜来源的 R28 细胞中瞬时共转染 SRp38 的真核表达质粒以及 GluR-B 小基因, 发现 SRp38 可以促进 GluR-B 小基因的 Flip 亚型的剪接, 而减少其 Truncate 亚型的产生(图3).

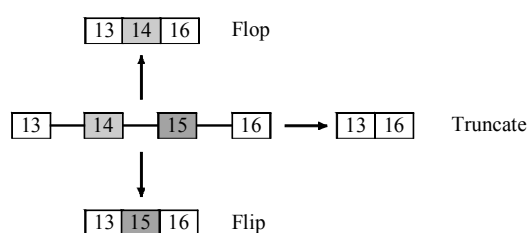


Fig. 2 Diagram of the alternative splicing of GluR-B minigene

In cultured cells, the production of alternative splicing was identified by enzymatic digestion and proved to be Flip and truncate as previously described^[12].

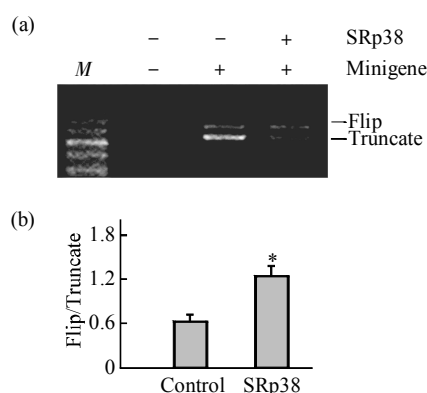


Fig. 3 Effect of SRp38 on alternative splicing of GluR-B minigene in R28 cells

(a) RT-PCR analysis showing the splicing of GluR-B minigene in R28 cells with over expressed SRp38 (pcDNA3.1-SRp38) or control plasmid (pcDNA3.1-his-myc(-)). (b) Statistical analysis of the ratio of Flip to truncate GluR-B represented by (a). Differences are considered to be statistically significant when $P < 0.01$ as indicated by stars (*), $n \geq 3$.

3 讨 论

研究证实包括视网膜在内的神经组织是前体 mRNA 可变剪接发生最为丰富的组织之一^[22], 在视网膜中已经发现很多存在着可变剪接的基因, 其中包括与突触传递相关的受体, 如谷氨酸受体^[23]、GABA (Gamma-aminobutyric acid) 受体^[24]等, 与感

光相关的重要功能基因如 Arrestin^[25], 与疾病相关的基因如大肿瘤抑制基因 (Lats1, large tumor suppressor gene)^[26]、APC 肿瘤抑制基因 (Adenomatous polyposis coli tumor suppressor)^[27]等, 这些基因的不同剪接亚型可能在视网膜的发育以及功能中发挥重要作用. 作为主要的前体 mRNA 可变剪接调控因子, SR 蛋白可能在视网膜中调控不同基因剪接亚型的产生, 因此, 研究 SR 蛋白在视网膜中的表达调控对于了解视网膜中复杂的光反应的分子机制, 以及神经信号的传导等有重要的作用.

目前有关 SR 蛋白在视网膜中表达调控的报道极少, 仅有 Gabut 等^[28]通过转基因动物模型发现在果蝇的视觉系统发育过程中, B52 和 dASF/SF2 (*Drosophila* alternative splicing factor/splicing factor 2) 可以引起果蝇小眼结构的异常, 同时, B52 可以引起光感受器的轴突投射损伤, 同时影响视神经节的发生. Snow 等^[29]发现 SFRS5/SRp40 的 1.8 kb 和 3.3 kb 两个 mRNA 亚型在人类的视网膜中存在表达, 其中 1.8 kb 的亚型表达最高. 但进一步他们发现其在视网膜各类细胞中分布的特异性不强, 基本上每种细胞都有. 与此相比, 本文的研究发现, SRp38 蛋白在鼠视网膜中的表达具有区域特异性, 即: 主要分布在外网层、内核层、内网层以及节细胞层中, 而在外核层中没有分布. 这一分布特征表明 SRp38 蛋白可能主要与视网膜中神经信号的传递有关, 而与感光功能联系不大, 因为外核层主要以视细胞即视杆细胞和视锥细胞为主, 对光线敏感并可以将光信号转变为电化学信号. 从视网膜组织切片的免疫标记结果可以看出, SRp38 标记阳性的主要细胞类型包括双极细胞和节细胞, 且标记在胞体、轴突和树突等部位. 在无长突细胞以及水平细胞中是否也存在 SRp38 表达尚有待进一步验证. 通过 PKC 以及 SRp38 抗体双标记分离培养的视网膜细胞, 结果证实, 在分离培养的视杆 - 双极细胞中 SRp38 的表达为阳性, 且其表达分布在胞体、轴突和树突, 与组织切片细胞中的表达一致. 双极细胞在是脊椎动物的中间神经元, 处于直接的视通路中, 它接受光感受器的信号输入, 并将其整合后传递至神经节细胞, 在视觉信号加工中占据重要地位, 因此, SRp38 在其中的表达可能具有重要的生理功能.

现有的研究证实 SRp38 可以调节很多基因的前体 mRNA 可变剪接, 如 E1A (adenoviral early region 1A)、 β -Globin、HIV-TAT、IgM 等^[11, 13], 更

重要的是, SRp38 能够调节许多在神经系统特异表达的基因的可变剪接, 例如 Komatsu 等^[12]发现 SRp38 可以对小鼠 GluR-B (glutamate receptor subunit B) 基因的可变剪接起调节作用. 我们通过对视网膜来源的 R28 细胞进行共转染, 也证实了在视网膜细胞中, SRp38 可以调节 GluR-B 小基因的可变剪接. GluR-B 是神经递质 AMPA (alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid) 受体的亚基, 目前已经发现其在视网膜水平细胞、双极细胞、节细胞、无长突细胞中均有分布, 与我们发现的 SRp38 在视网膜中的分布基本一致. 鉴于 AMPA 受体在中枢神经系统的信号传导、发育以及突触的可塑性等方面发挥的重要功能^[30], SRp38 有可能通过对 GluR-B 的可变剪接的调控从而调控视网膜的发育、信号传导以及突触的可塑性. 因为 AMPA 受体的另外 3 个亚基即 GluR-A、GluR-C、GluR-D 等也能够进行 Flip/Flop 的可变剪接, SRp38 是否对它们的可变剪接也具有调节作用还需要进一步的研究.

另外, 我们以前的研究也发现 SRp38 可以调控神经细胞内源性的 Trk-C (tropomyosin-related kinase C) 基因以及 NCAML1 (neural cell adhesion molecule L1)、CREB 等基因剪接^[18, 21]. NCAML1 基因具有促有丝分裂以及刺激神经细胞分化的作用, 在神经细胞分化过程中, 可以促进神经干细胞向神经元方向分化而减少其向星形细胞分化的可能, 其在视网膜无长突细胞中存在表达^[31]. 而 Trk-C 也是一类与神经元的存活及分化相关的受体基因, 在视网膜中分布于节细胞以及无长突细胞中^[32]. CREB 在双极细胞中也有分布. 在视网膜中 SRp38 是否可以调控 Trk-C、NCAML1 以及 CREB 等基因的前体 mRNA 可变剪接以及其剪接机制目前我们正在进一步的研究中.

综上所述, 我们的研究发现 SRp38 主要在小鼠视网膜的外网层、内核层、内网层以及节细胞层中表达, 表达的细胞类型主要包括双极细胞、节细胞等, 在双极细胞中 SRp38 在细胞的胞体、树突、轴突均有分布. 通过瞬时共转染, 我们还发现在视网膜来源的 R28 细胞中, SRp38 可以调节 GluR-B 小基因的可变剪接. 结果提示, SRp38 在小鼠视网膜中可能发挥重要的生理功能, 且其生理功能可能通过调控 GluR-B、NCAML1、CREB 以及 Trk-C 等基因的前体 mRNA 可变剪接来实现.

参 考 文 献

- 1 Graveley B R. Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA*, 2000, **6**(9): 1197~1211
- 2 Garcia-Blanco M A. Messenger RNA reprogramming by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *J Clin Invest*, 2003, **112**(4): 474~480
- 3 Yang Y, Walsh C E. Spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Mol Ther*, 2005, **12**(6): 1006~1012
- 4 Dredge B K, Polydorides A D, Darnell R B. The splice of life: alternative splicing and neurological disease. *Nat Rev Neurosci*, 2001, **2**(1): 43~50
- 5 Soller M. Pre-messenger RNA processing and its regulation: a genomic perspective. *Cell Mol Life Sci*, 2006, **63**(7-8): 796~819
- 6 Black D L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem*, 2003, **72**: 291~336
- 7 Jurica M S, Moore M J. Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol Cell*, 2003, **12**(1): 5~14
- 8 Hertel K J, Graveley B R. RS domains contact the pre-mRNA throughout spliceosome assembly. *Trends Biochem Sci*, 2005, **30**(3): 115~118
- 9 Ma X, He F. Advances in the study of SR protein family. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2003, **1**(1): 2~8
- 10 Kondo S, Yamamoto N, Murakami T, *et al.* Tra2 beta, SF2/ASF and SRp30c modulate the function of an exonic splicing enhancer in exon 10 of tau pre-mRNA. *Genes Cells*, 2004, **9**(2): 121~130
- 11 Yang L, Embree L J, Tsai S, *et al.* Oncoprotein TLS interacts with serine-arginine proteins involved in RNA splicing. *J Biol Chem*, 1998, **273**(43): 27761~27764
- 12 Komatsu M, Kominami E, Arahata K, *et al.* Cloning and characterization of two neural-salient serine/arginine-rich (NSSR) proteins involved in the regulation of alternative splicing in neurones. *Genes Cells*, 1999, **4**(10): 593~606
- 13 Cowper A E, Caceres J F, Mayeda A, *et al.* Serine-arginine (SR) protein-like factors that antagonize authentic SR proteins and regulate alternative splicing. *J Biol Chem*, 2001, **276**(52): 48908~48914
- 14 Shin C, Manley J L. The SR protein SRp38 represses splicing in M phase cells. *Cell*, 2002, **111**(3): 407~417
- 15 Shin C, Kleiman F E, Manley J L. Multiple properties of the splicing repressor SRp38 distinguish it from typical SR proteins. *Mol Cell Biol*, 2005, **25**(18): 8334~8343
- 16 Shin C, Feng Y, Manley J L. Dephosphorylated SRp38 acts as a splicing repressor in response to heat shock. *Nature*, 2004, **427**(6974): 553~558
- 17 Liu L, Lin J J, Chen X, *et al.* Neural expression and regulation of NSSR1 proteins. *Neuroreport*, 2003, **14**(14): 1847~1850
- 18 Xiao P J, Hu L, Li J, *et al.* NSSR1 is regulated in testes development and cryptorchidism and promotes the exon 5-included splicing of CREB transcripts. *Mol Reprod Dev*, 2007, **74**(11): 1363~1372
- 19 Fushimi K, Osumi N, Tsukahara T. NSSRs/TASRs/SRp38s function as splicing modulators via binding to pre-mRNAs. *Genes Cells*,

- 2005, **10**(6): 531~541
- 20 Peng Z Y, Lee S C, Chen X H. The expression and distribution of neural salient serine/arginine-rich protein 1 in rat retina. *Neuroreport*, 2007, **18**(16): 1641~1644
 - 21 Liu L, Chen X H, Huang J, *et al.* NSSR1 promotes neuronal differentiation of mouse embryonic carcinoma P19 cells. *Neuroreport*, 2004, **15**(5): 823~828
 - 22 Yeo G, Holste D, Kreiman G, *et al.* Variation in alternative splicing across human tissues. *Genome Biol*, 2004, **5**(10): R74
 - 23 Lopez T, Lopez-Colome A M, Ortega A. Changes in GluR4 expression induced by metabotropic receptor activation in radial glia cultures. *Brain Res Mol Brain Res*, 1998, **58**(1-2): 40~46
 - 24 Wang C T, Blankenship A G, Anishchenko A, *et al.* GABA (A) receptor-mediated signaling alters the structure of spontaneous activity in the developing retina. *J Neurosci*, 2007, **27**(34): 9130~9140
 - 25 Schroder K, Pulvermuller A, Hofmann K P. Arrestin and its splice variant Arr1-370A (p44). Mechanism and biological role of their interaction with rhodopsin. *J Biol Chem*, 2002, **277**(46): 43987~43996
 - 26 Akhmedov N B, Yamashita C K, Tran D, *et al.* Two forms of the large tumor suppressor gene (Lats1) protein expressed in the vertebrate retina. *Biochim Biophys Acta*, 2005, **1728**(1-2): 11~17
 - 27 Liou G I, Samuel S, Matragoon S, *et al.* Alternative splicing of the APC gene in the neural retina and retinal pigment epithelium. *Mol Vis*, 2004, **10**: 383~391
 - 28 Gabut M, Dejardin J, Tazi J, *et al.* The SR family proteins B52 and dASF/SF2 modulate development of the Drosophila visual system by regulating specific RNA targets. *Mol Cell Biol*, 2007, **27**(8): 3087~3097
 - 29 Snow B E, Heng H H, Shi X M, *et al.* Expression analysis and chromosomal assignment of the human SFRS5/SRp40 gene. *Genomics*, 1997, **43**(2): 165~170
 - 30 Wang J Q, Arora A, Yang L, *et al.* Phosphorylation of AMPA receptors: mechanisms and synaptic plasticity. *Mol Neurobiol*, 2005, **32**(3): 237~249
 - 31 Demyanenko G P, Maness P F. The L1 cell adhesion molecule is essential for topographic mapping of retinal axons. *J Neurosci*, 2003, **23**(2): 530~538
 - 32 Das I, Sparrow J R, Lin M I, *et al.* Trk C signaling is required for retinal progenitor cell proliferation. *J Neurosci*, 2000, **20**(8): 2887~2895

The Expression of SRp38 Gene in Mouse Retina and It's Regulation of Alternative Splicing of GluR-B Minigene*

PENG Zheng-Yu¹⁾, Lee Shu-Chen²⁾, ZHANG Wei³⁾, CHEN Xian-Hua^{1)**}

(¹⁾State Key Laboratory of Medical Neurobiology, Fudan University, Shanghai 200032, China; ²⁾Institute of Neurobiology and Institute of Brain Science, Fudan University, Shanghai 200032, China; ³⁾Department of Pharmaceutic, City College of Zhejiang University, Hangzhou 310015, China)

Abstract SR proteins play important roles in regulating alternative pre-mRNA splicing. As a newly discovered neural and reproductive tissue specific SR protein, SRp38 regulates the alternative splicing of several genes important for neural function, such as GluR-B, Trk-C and NCAML1. It also acts as a splicing inhibitor during mitosis or stress response in order to prevent wrong splicing. The expression of SRp38 in mouse retina was investigated by Western blot and immunohistochemistry (IHC) analyses. The result shows that the expression of SRp38 proteins in mouse retina is region-specific, with extensive distribution in the outer and inner plexiform layers, inner nuclear layer and ganglion cell layer, but no expression in outer nuclear layer. Double staining of isolated retina cells with anti-SRp38 and anti-Trk-C antibodies showed that SRp38 is localized in the dendrites, somata and axon terminals of rod-bipolar cells. By transient co-transmission of over-expressed SRp38 plasmid and RT-PCR analyses, the further results showed that overexpressed SRp38 could promote the splicing of the Flip isoform of GluR-B minigene in R28 cells. The result suggests that SRp38 may play important roles in the retinal function, possibly *via* regulating the neural-specific alternative splicing of genes as GluR-B.

Key words SRp38, alternative pre-mRNA splicing, retina, bipolar cell, GluR-B minigene

*This work was supported by grants from Shanghai Health Department (2006003) and The National Natural Science Foundation of China (30470383).

**Corresponding author.

Tel: 86-21-54237075, Email: xhchen@fudan.edu.cn

Received: October 15, 2007 Accepted: December 28, 2007