



阿尔茨海默病发生发展中关键 E3 泛素连接酶的筛选*

路亚岚 石桂英 王克维 白琳**

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,
北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心, 北京 100021)

摘要 **目的** 探索阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 发病中的关键 E3 泛素连接酶及其表达特征。**方法** 通过生物信息学方法分析筛选 AD 发生发展过程中的差异基因, 行基因本体 (GO) 分析, 并构建蛋白质互作网络 (PPI)。继而, 通过 The Human Protein Atlas 和 Alzdata 数据库, 分别查找泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 中的 E3 泛素连接酶的组织细胞学定位和 AD 患者/对照不同脑区中的表达值, 并通过 qPCR 方法在 AD 小鼠脑组织中验证。**结果** 我们发现 UPS 和泛素结合酶结构域 UBCc 分别在参与 AD 发生进程的生物学功能和结构域中位居前列; PPI 互作网络中多个 UPS 分子位居关键节点; 神经元中特异性高表达的 E3 泛素连接酶 (MKRN2、NEDD4L、LNX1、RNF41、TRIM36、RNF8 和 DTX4) 在 AD 患者和 AD 小鼠脑组织中表达量下调。**结论** 这 7 个 E3 泛素连接酶可能作为驱动因子参与 AD 进展, 这对进一步寻找诊断和治疗 AD 的新靶点以及深入的机制探索提供了重要线索。

关键词 阿尔茨海默病, 泛素化, 蛋白酶体, E3 泛素连接酶, 生物信息学

中图分类号 Q5, R74

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0136

泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 是存在于真核细胞内的一种高度选择性的蛋白质降解途径, 精确调控超过 80% 的错误折叠蛋白的降解^[1]。泛素化过程需要 3 种泛素酶的协同作用, 经过 E1 泛素活化酶和 E2 泛素结合酶激活泛素, 形成 E2-泛素复合物, 最后 E3 泛素连接酶识别特定靶蛋白, 并催化泛素分子转移到靶蛋白上^[2]。E3 泛素连接酶在特异性靶标识别以及泛素化系统活性调控中起着关键的作用^[3]。

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种起病缓慢隐匿、呈进行性进展的神经退行性疾病, 后期患者会陷入僵木并丧失独立生活能力^[4-5]。中国在快速进入老龄化社会, AD 的发病呈现爆发式增长, 给患者、家庭及社会带来沉重的负担和严峻的挑战^[6]。目前, AD 的发病机制尚不十分明确, 极大限制了有效治疗技术的开发。因此, 进一步探索 AD 的分子病理机制及其基础上的防治措施, 是亟需解决的重要科学问题。

AD 的发生与淀粉样蛋白的合成和清除障碍以

及 Tau 蛋白的过度磷酸化密切相关, 它们的异常沉积形成细胞外斑块和胞内的神经纤维缠结, 干扰神经元功能^[4]。早在 1987 年, Mori 等^[7] 和 Perry 等^[8] 发现在老年斑和神经纤维缠结上有泛素的存在。之后研究报道发现, UPS 功能下降可以抑制 A β 蛋白降解、增加前体蛋白水解、提高 β 位淀粉样前体蛋白裂解酶 1 (BACE1) 的表达量和增强 γ 分泌酶的活性, 进而导致淀粉样蛋白沉积^[9-10]。UPS 受损会导致 Tau 聚集, 引起过度磷酸化, 而过度磷酸化的 Tau 蛋白又可以抑制 UPS 功能^[10-11]。到目前为止, AD 的可用药物数量十分有限, 新近研究的直接靶向 A β 的药物临床实验相继宣告失败^[12]。因此, 寻找其他有效靶点是 AD 防治的瓶颈问题^[12]。UPS 的功能障碍与 β 淀粉样蛋白聚集、

* 北京市自然科学基金 (5171001) 和中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2019-12M-1-004) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-67770815, E-mail: bailin49@163.com

收稿日期: 2021-10-08, 接受日期: 2021-11-17

Tau蛋白过度磷酸化、突触功能抑制和载脂蛋白E功能异常密切关。靶向针对泛素蛋白酶体途径有望防止神经元异常聚集, 进而防止AD的发生发展^[13]。

本文通过生物信息学方法结合高通量基因芯片和统计学对生物数据进行系统处理和分析, 进而揭示其中关键的生物学过程和信号通路, 通过PPI蛋白互作筛选关键节点蛋白, 通过公用数据库查询其定位和表达信息, 进而通过AD小鼠模型验证, 为AD的深入机理的探索提供重要线索, 以期AD的预防和治疗提供方案依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 AD患者数据集

基因表达数据集从NCBI的GEO数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>)中检索获取。纳入数据集的标准如下: a. 样本来自确诊的AD患者和非痴呆对照组的脑组织; b. 数据集中病例和对照组的可用样本数 ≥ 50 个。最终选择分析表达数据集GSE15222(共363例样本, 其中对照186例, AD 176例)和GSE36980(共80例样本, 其中对照47例, AD 33例)。

1.1.2 实验动物

本研究使用的AD模型小鼠(APP/PS1和5 $\times$ FAD及其对照)为SPF级别, 饲养于中国医学科学院医学实验动物研究所的二层屏障环境动物房。饲养期间小鼠自由饮水取食, 环境温度24~26 $^{\circ}$ C, 光照12 h, 黑暗12 h常规饲养。选取8月龄APP/PS1和6月龄5 $\times$ FAD及其对照小鼠各3对, 取大脑组织进行后续检测。本实验中涉及的所有动物操作均得到中国医学科学院医学实验动物研究所动物使用与管理委员会的批准(IACUC编号: WKW19001), 并遵守3R原则人道主义地使用实验动物。

1.1.3 实验试剂

TRIzol试剂购买自美国ThermoFisher Scientific公司; PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) (RR036A) 和TB Green Premix Ex Taq TM II (TliRNaseH Plus) (RR82WR) 购买自日本TaKaRa公司。

1.1.4 实验仪器

-80 $^{\circ}$ C超低温冰箱购自中国海尔公司; Nanodrop 2000购买自美国ThermoFisher Scientific公司; StepOnePlusTM购买自美国Applied

Biosystems公司。

1.2 实验方法

1.2.1 DEGs的筛选和分析

采用GEO2R(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/GEO2R/>)在线工具筛选差异表达基因(DEGs), 筛选条件为 $p\text{adj} < 0.05$, $|\log_2 FC| > 1.0$ (FC即变化倍数fold change)。两组数据集(GSE15222和GSE36980)共同的DEGs行后续分析。

1.2.2 功能富集分析和蛋白质相互作用

获得差异表达基因后, 通过FunRich软件进行GO (gene ontology) 分析, 其用于描述及注释基因功能。GO将基因功能分为细胞组分 (cellular component)、生物学过程 (biological process)、分子功能 (molecular function) 和蛋白质结构域 (protein domain) 4部分, 用于发现在AD发生发展中的关键生物学过程。并对以上DEGs通过STRING数据库(<http://STRING-db.org/>)构建PPI网络 (protein-protein interaction network), 利用CytoHuba评估蛋白质网络及各节点的拓扑特性并筛选出关键节点蛋白分子。

1.2.3 关键基因的大数据库总结整理分析

通过The Human Protein Atlas数据库(<http://www.proteinatlas.org/>)总结整理E3泛素连接酶蛋白在脑组织中的细胞定位; 对特异性表达于神经元中的E3连接酶, 通过Pubmed数据库(<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>)查找目前在AD领域中的研究报道, 通过Alzdata数据库(<http://www.alzdata.org/>)查询E3连接酶在AD患者与对照在内嗅皮层、海马、颞叶皮层和额皮质中的表达量及其统计学差异。

1.2.4 总RNA提取和实时定量PCR (qPCR) 检测

按照TRIzol试剂说明书的操作流程提取3对APP/PS1和5 $\times$ FAD及对照小鼠整个大脑组织的总RNA, 溶解于DEPC水中。经过Nanodrop 2000测量样品总RNA浓度后, 将同批次样品调节至相同浓度。按照PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) cDNA逆转录试剂盒说明书流程将总RNA反转录成cDNA, 其反应体系包含2 μ l 5 $\times$ PrimeScript RT Master Mix, 500 ng Total RNA, 在37 $^{\circ}$ C反应15 min, 85 $^{\circ}$ C 5 s失活反转录酶后-20 $^{\circ}$ C保存备用。使用TB Green Premix Ex Taq TM II (TliRNaseH Plus) 试剂盒进行E3泛素连接酶(MKRN2、NEDD4L、LNX1、RNF41、TRIM36、RNF8、DTX4)和内参基因 β -actin的qPCR检测,

每个样本设置3个复孔。其反应体系包含20 ng cDNA, 正反向引物各400 nmol/L, 0.4 μ l ROX (50 $\times$) 和10 μ l SYBR Premix Ex Taq (2 $\times$), 共20 μ l。反应程序为95 $^{\circ}$ C 30 s, 随后95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C

30 s, 进行40次循环, 使用Step One Plus实时PCR系统完成实验后, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各个基因的相对表达量, 检测用引物见表1。

Table 1 The qPCR primers of mouse E3 ligases

Gene symbol	Forward primers	Reverse primers
MKRN2	GTCCTGCACCCAACCCTTC	CACCAGCGTCTTCTCTCCC
NEDD4L	CACGGGTGGTGAGGAATCC	GCCGAGTCCAAGTTGTGGT
LNX1	CAACCGGACCTTGACAGATGA	GGTGTGTCCACATGGAGTGT
RNF41	ATGGGGTATGATGTGACCCGT	GATGCAGGCGTTGCAGAAG
TRIM36	GGCTACATTATGGAATTGCTTGC	GGATCAGCGGGTGGGTAAAC
RNF8	GGACTTAGTGTCACATACCAGC	GGTCCACTGTCCCTCAGGATT
DTX4	TGTGCCTGTGAAAACTTGAATG	TGGGATGGACTTTATCTCACTCT
β -Actin	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT

1.3 统计学方法

实验数据用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 通过GraphPad Prism 8.0软件统计作图, 两组间数据比较采用 t -test检验, $P<0.05$ 认为差异存在统计学意义, 标识如下: ns , 无显著性差异。

2 结 果

2.1 AD患者中差异表达基因筛选

DEGs是在AD的发生发展过程中发生统计学改变的基因, 它们与AD的进程密切相关。因此, 首先将比较AD组与对照组数据, 分析DEGs, 结果如下: 在GSE15222数据集中筛选到8 093个DEGs, 在GSE36980数据集中筛选到3 671个DEGs, 其中共同DEGs 1 935个, 分别占两个数据集总DEGs的23.91%和52.71% (图1)。共同的差异基因代表在两个独立数据分析中这些基因均在

AD的进程中有显著改变, 将这些基因进行后续分析可以减少系统偏移误差, 提供更准确的分析结果。

2.2 差异表达基因GO功能富集

对1 935个共同DEGs进行GO分析, 结果发现: 上述共同差异基因的蛋白质产物主要位于细胞浆、线粒体、细胞液、溶酶体和外泌体等细胞组成部分, 细胞核与细胞膜定位蛋白并不多; 主要的生物学通路涉及能量代谢、神经递质通路和突触生成, 其中位于前3名的分别是糖代谢三羧酸循环、谷氨酰胺神经递质和5-羟色胺能神经递质的释放; 主要的分子功能涉及泛素化、能量代谢和离子通道等, 其中前3名分别为泛素-蛋白酶体系统、GTP酶活性和ATP活性; 在进一步结构域分析中发现UBCc、WD40、C2、UBQ等被富集到, 其中排名第1的UBCc具有统计学差异, 该结构域具有高度保守性, 在泛素化的生物学过程中具有关键作用。这些结果指向泛素化过程在AD病程的调控中具有重要功能, 可能参与调控能量代谢和神经递质合成 (图2)。

2.3 差异表达基因编码蛋白的PPI网络分析

为了进一步筛选AD发生发展中的关键调控分子, 进行DEGs基因的PPI蛋白互作网络分析, 结果发现大部分基因之间有紧密关联, 少数蛋白质只有2~3个相互作用蛋白, 位于核心网络之外 (图3)。排名前50的蛋白质分子如表2所示, 它们涉及信号通路转导、蛋白泛素化、能量代谢和离子通道等生物学过程。

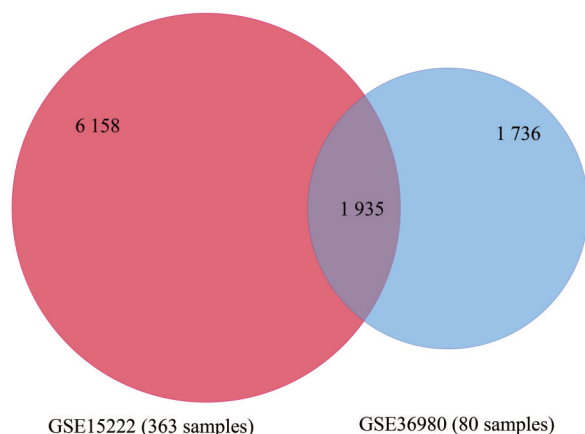


Fig. 1 The DEGs in GSE15222 and GSE36980 databases

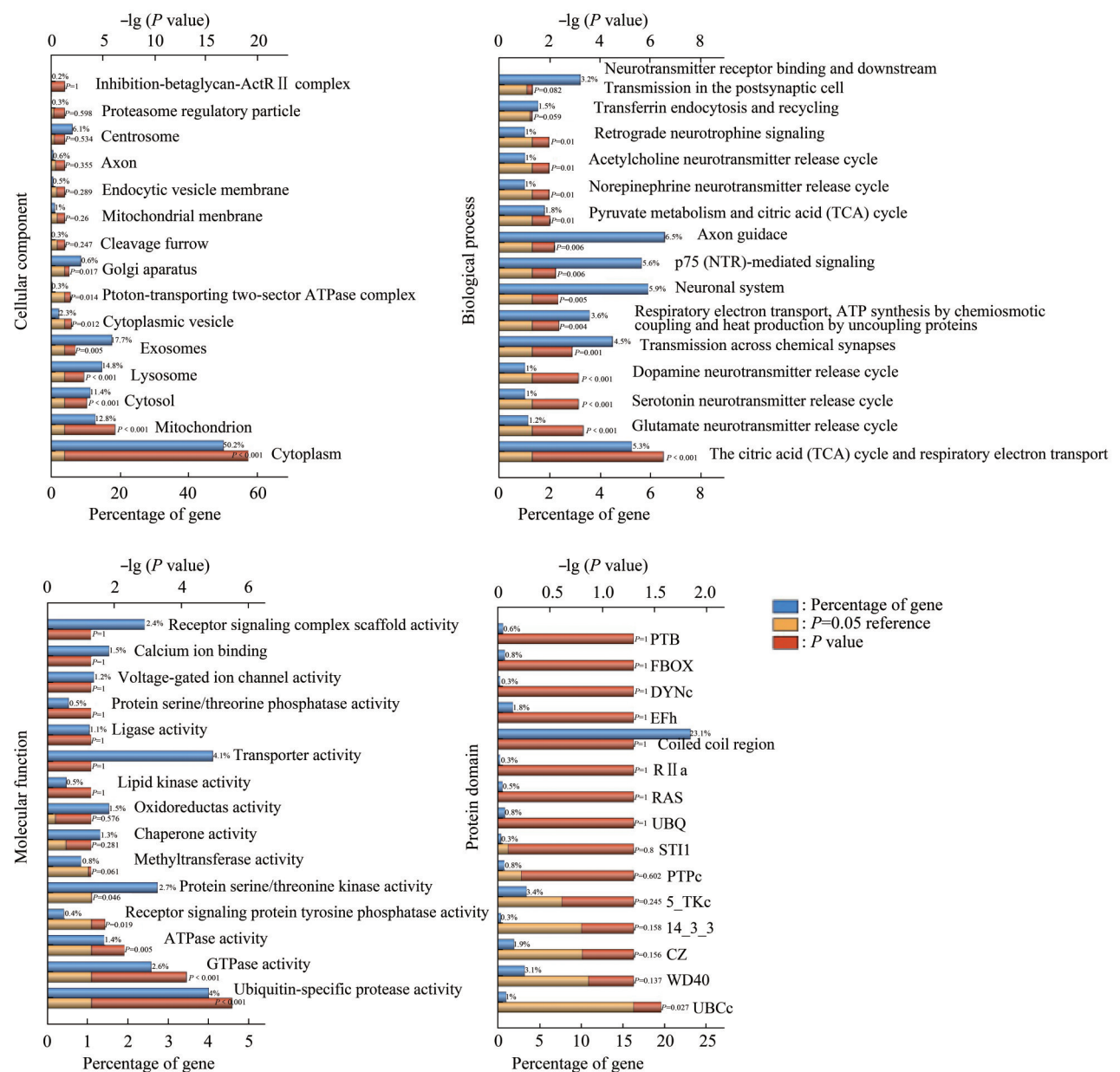


Fig. 2 GO analysis (cellular component, biological process, molecular function and protein domain) of DEGs

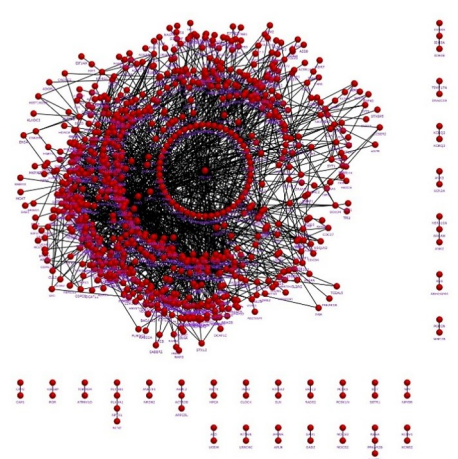


Fig. 3 PPI analysis of DEGs

2.4 E3泛素连接酶在脑组织中细胞定位

前期分析结果指向泛素化过程在AD的发生发展中的关键作用，E3泛素连接酶在底物识别和泛素化过程调控中具有关键作用。因此，通过The Human Protein Atlas 和 Pubmed 公用数据库，整理DEGs中的22个E3连接酶在脑组织中的细胞学定位（内皮细胞、胶质细胞和神经元）以及是否有与AD相关的文献报道（表3）。

Table 2 The top 50 proteins in PPI analysis

Rank	Protein	Score	Rank	Protein	Score	Rank	Protein	Score
1	MAPK1	44	18	GFAP	28	34	PPP3CB	25
2	PPP2R1A	42	18	RAB3A	28	34	PGK1	25
3	SYT1	41	18	PXN	28	34	BSN	25
4	VAMP2	40	18	ARF1	28	38	SV2A	24
5	ATP5B	37	18	GAP43	28	39	NDUFA9	23
5	SYN	37	23	POLR2F	27	39	POLR2K	23
7	BDNF	35	23	ATP5G1	27	39	GNG3	23
8	ATP5C1	34	23	MAP2K1	27	39	AP2M1	23
8	CDC5L	34	23	CREB1	27	43	UQCRCF1	22
10	NRXN1	31	23	NSF	27	43	WASL	22
11	STX1A	30	28	ATP5H	26	43	PRKACB	22
11	STXBP1	30	28	NPY	26	43	TOMM20	22
11	UBE2N	30	28	RAB3C	26	43	COPG1	22
14	VDAC1	29	28	SNCA	26	43	CLTA	22
14	RAB11A	29	28	MDH2	26	43	FBXL16	22
14	SDHB	29	28	GAD2	26	50	NDUFB5	21
14	SLC17A7	29	34	CPLX1	25			

Table 3 The cellular location of E3 ligases in human brain

Protein	Cellular location			Number of AD reports
	Endothelial cells	Gliocyte	Neuron	
MIB1	+++	+	++	3
HERC2	+	+	+++	1
TRIM37	-	-	-	-
RNF128	++	-	+	-
MKRN2	-	-	++	-
HECTD2	++	-	++	1
UBE3A	++	+++	+++	11
NEDD4L	-	-	++	7
SMURF1	++	++	-	2
RNF40	-	+	++	-
DZIP3	+	+	+	-
BAP1	-	+	+	1
PTA2	+	++	+++	1
RNF123	++	+	++	-
LNK1	-	-	++	-
TRIM56	++	+	++	-
RNF14	++	+	+++	1
RNF41	-	-	+++	-
TRIM36	-	-	+++	-
RNF8	-	-	++	-
DTX4	-	-	++	-
TRIM7	++	++	++	-

For the cellular location, +++: strong expression; ++: moderate expression; +: weak expression; -: negative expression. For the number of AD reports, - represents no report.

2.5 神经元特异表达E3泛素连接酶蛋白分子在Alzdata数据库中表达分析

AD患者神经元的水解功能异常，导致淀粉样蛋白和神经纤维缠结异常沉积，进而引起神经元功能障碍。因此，选取神经元特异高表达的E3泛素连接酶蛋白分子（包括MKRN2、NEDD4L、LNK1、RNF41、TRIM36、RNF8和DTX4）通过Alzdata数据库查找这些蛋白质分子在AD患者和对照人群不同脑区（包括内嗅皮层、海马、颞叶皮层和额叶皮层）中的表达量和统计学差异。经过整理具体结果如下：绝大部分蛋白质分子在AD患者中表达量下调，大部分具有统计学差异。例外包括：RNF8和DTX4在海马，NEDD4L在额皮质中略微上调，但均无统计学差异；DTX4在内嗅皮层和额叶皮层，以及LNK1在额皮质中缺失数据（图4）。它们的下调与促进泛素化降解功能的发挥，进而导致AD患者脑组织中异常蛋白堆积的现象一致，提示可能作为AD进展的驱动基因发挥作用。

2.6 神经元特异表达E3泛素连接酶蛋白分子在AD小鼠脑组织中表达验证

为了进一步验证从AD患者组织中筛选的E3泛素连接酶蛋白分子表达特征，选择具有明显AD病理学和行为学特征的8月龄APP/PS1和6月龄5×FAD的AD小鼠模型^[14-15]，将它们整个大脑组织匀浆后进行qPCR表达验证，结果发现这7个E3泛素连接酶在APP/PS1和5×FAD小鼠脑组织中表达量均有不同程度的下调趋势，其中NEDD4L、LNK1和TRIM36在两种AD小鼠模型中表达量有统计学意义的降低。在APP/PS1和对照小鼠脑组织中DTX4没有统计学差异，其他蛋白质均有统计学差异的下调；在5×FAD小鼠脑组织中，MKRN2、RNF41和RNF8尚无统计学差异，其他蛋白均有统计学差异的下调（图5）。该结果与AlzData数据库中AD患者的结果趋势是一致的，这提示在AD的不同物种间这些基因可能发挥相似的重要作用，也提示AD小鼠可作为重要的模型工具研究这些基因功能。

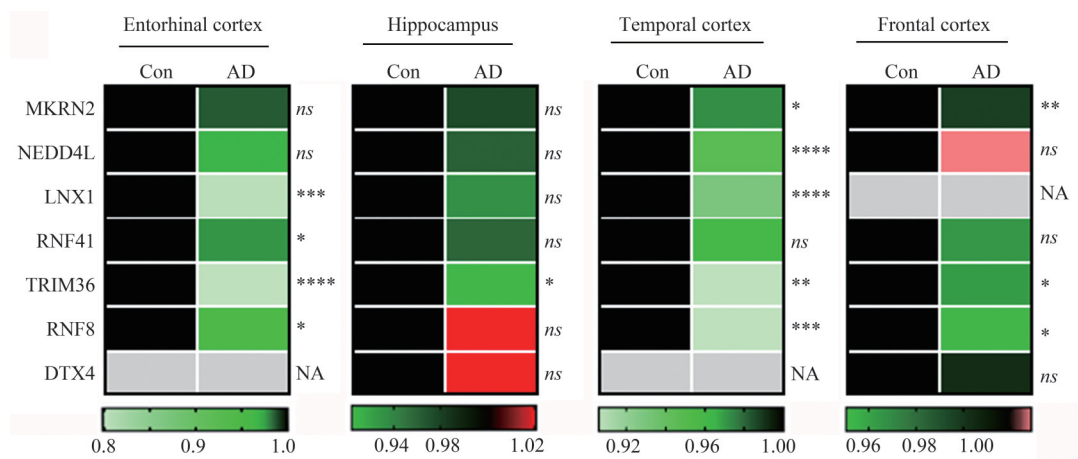


Fig. 4 Neuron-specific expression of E3 ligases in entorhinal cortex, hippocampus, temporal cortex and frontal cortex between control and AD patients
* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; **** $P<0.0001$.

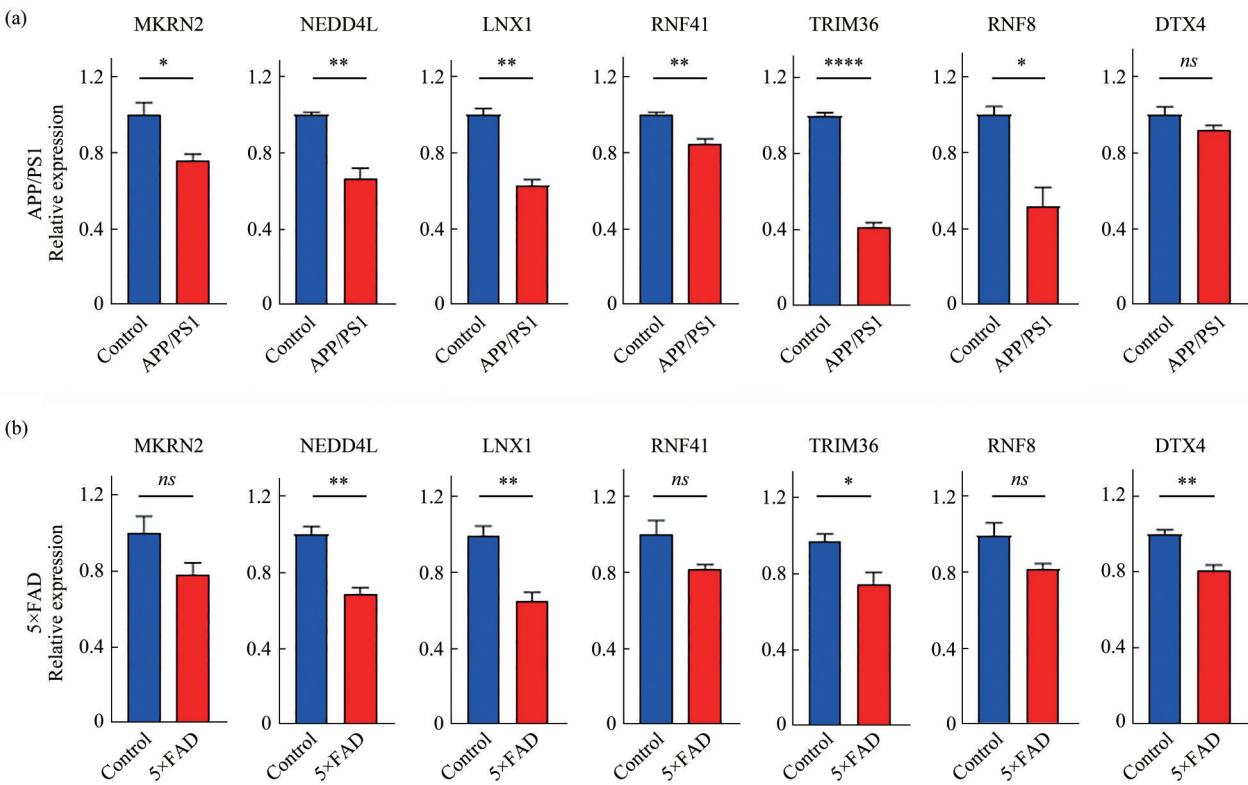


Fig. 5 Neuron-specific expression of E3 ligase in cerebrum tissues between control and AD mouse model
(a) qPCR analysis of E3 ligases in APP/PS1 and control mouse cerebrum tissues. (b) qPCR analysis of E3 ligases in 5x-FAD and control mouse cerebrum tissues. * $P<0.05$; ** $P<0.01$; **** $P<0.0001$.

3 讨 论

随着医疗卫生技术的发展和人们的寿命延长, AD 成为 21 世纪危害最大的神经退行性疾病之

一^[16]。AD 是一种原因不明的变性疾病, 目前分子机制尚不明朗, 需要进一步深入探索。高通量的数据 (测序、基因芯片等) 能同时对大量基因的表达水平进行检测和分析。为了减少误差, 选择了样本

量大于50的两组数据,两者均包括正常和AD组织的基因表达数据。从两组数据中选择共有基因进行功能富集分析,增加了分析数据的可靠性。

AD患者脑组织含有大量的异常表达基因,泛素-蛋白酶体过程和泛素结合酶结构域UBCc分别在参与AD发生进程的生物学功能和结构域中位居首列,这与差异蛋白主要定位于胞浆和溶酶体的分析结论一致。而糖脂代谢和多巴胺能神经递质代谢是最显著改变的生物学通路,由此推测,泛素蛋白酶体功能的异常可能通过能量代谢和神经递质代谢紊乱促进AD的发生和发展。在PPI蛋白相互作用网络中,节点得分越高代表与其他蛋白质相互关联越强,得分前50名蛋白质中包含大量与泛素化相关以及能量代谢相关的蛋白质分子,与GO分析结果一致。

E3泛素连接酶在蛋白质的识别标记中起着核心作用,在进一步分析中对富集到的22个E3泛素连接酶行组织细胞学定位和AD大数据细致分析以及文献整理。由于AD的典型病理特征是淀粉样蛋白的沉积和神经元纤维缠结,前者是在神经元中形成,后转运至细胞外沉积形成老年斑;后者主要在神经元胞内聚集沉降^[17]。因此,神经元内的泛素化过程异常是我们关注的重点之一^[18]。针对其中特异性高表达于神经元的7个E3泛素连接酶(MKRN2、NEDD4L、LNX1、RNF41、TRIM36、RNF8和DTX4)查阅Alzdata数据库,对其在4个不同脑区中的表达量和统计学差异进行整理。我们发现它们在AD组中表达量均低于对照组。它们的异常低表达会促进异常蛋白的累积,与AD发生发展呈正相关,推测它们可能是AD发生发展的驱动基因。这些E3泛素连接酶在不同脑区的统计学差异有些许不同,可能与大脑不同区域的特化功能相关,例如大脑不同分区负责运动、视觉、听觉等神经转导,而记忆功能主要在海马区。

通过qPCR方法验证AD小鼠中7个E3泛素连接酶的表达趋势与AD患者基本是一致的,表明这些基因在不同物种间的功能比较保守,也提示AD小鼠可作为重要的模型工具研究这些基因功能。同时,AD动物模型和AD患者样本结果也存在小量差异,例如:RNF8和DTX4在AD患者组在海马组织、NEDD4L在额叶皮层中是相对高表达的,尽管尚未有统计学差异。这其中可能原因为物种差异,本文检测的是AD小鼠组织,而且动物模型的模拟程度是有限的。目前除NEDD4L1在AD中有

少量报道,其他6个E3连接酶在AD中尚无报道。这些相关信息给AD机制研究提供了线索,可以考虑构建它们的基因编辑动物模型和细胞模型,深入探索这些基因与AD疾病的关系。此外,值得注意的是,TRIM36蛋白在AD患者、APP/PS1小鼠模型和5×FAD小鼠模型中表达量都是显著降低的,在以后的研究中可作为重点研究对象进行探索。

4 结 论

本研究通过生物信息学方法分析发现泛素蛋白酶体途径异常是AD患者最突出的生物学过程改变。神经元特异性表达的7个E3泛素连接酶(MKRN2、NEDD4L、LNX1、RNF41、TRIM36、RNF8和DTX4)在AD患者脑组织中显著低表达。这7个E3泛素连接酶在AD中的功能几乎无报道(NEDD4L有少量报告),在进一步探讨AD病因机制时可以考虑构建敲除/转基因动物和细胞模型,深入研究其内在的分子原因,为AD的诊疗提供新的靶标。

参 考 文 献

- [1] Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, *et al.* The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci*, 2006, **31**(1):137-155
- [2] 金雪佳. 泛素-蛋白酶体系统在神经退行性疾病中的研究. *药物生物技术*, 2015, **22**(4):366-368
Jin X J. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2015, **22**(4):366-368
- [3] Berndsen C E, Wolberger C. New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. *Nat Struct Mol Biol*, 2014, **21**(4):301-307
- [4] Lane C A, Hardy J, Schott J M, Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*, 2018, **25**(1): 59-70
- [5] Ballard C, Gauthier S, Corbett A, *et al.* Alzheimer's disease. *Lancet*, 2011, **377**(9770):1019-1031
- [6] 曾武,彭立辉. 骨髓间充质干细胞移植治疗阿尔茨海默病的研究进展. *湘南学院学报(医学版)*, 2017, **1**(19): 65-68
Zeng W, Peng L H. *Journal of Xiangnan University (Medical Sciences)*, 2017, **1**(19): 65-68
- [7] Mori H, Kondo J, Ihara Y. Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science*, 1987, **235**(4796):1641-1644
- [8] Perry G, Friedman R, Shaw G, *et al.* Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**(9): 3033-3036
- [9] Hong L, Huang H C, Jiang Z F. Relationship between amyloid-beta and the ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *Neurol Res*, 2014, **36**(3):276-282
- [10] Xin S H, Tan L, Cao X, *et al.* Clearance of amyloid beta and tau in Alzheimer's disease: from mechanisms to therapy. *Neurotox Res*, 2018, **34**(3):733-748

- [11] Myeku N, Clelland C L, Emrani S, *et al.* Tau-driven 26S proteasome impairment and cognitive dysfunction can be prevented early in disease by activating cAMP-PKA signaling. *Nat Med*, 2016, **22**(1):46-53
- [12] Congdon E E, Sigurdsson E M. Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2018, **14**(7): 399-415
- [13] 盛婵娟,王越,臧彩霞,等. 泛素-蛋白酶体系统与阿尔茨海默病. *中国新药杂志*, 2019, **28**(7): 798-803
Sheng C J, Wang Y, Zang C X, *et al.* *Chinese Journal of New Drugs*, 2019, **28**(7): 798-803
- [14] Drummond E, Wisniewski T. Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*, 2017, **2**(133): 155-175
- [15] Myers A, McGonigle P. Overview of transgenic mouse models for Alzheimer's disease. *Curr Protoc Neurosci*, 2019, **89**(1):e81
- [16] Bondi M W, Edmonds E C, Salmon D P. Alzheimer's disease: past, present, and future. *J Int Neuropsychol Soc*, 2017, **23**(9-10): 818-831
- [17] Serý O, Povová J, Míšek I, *et al.* Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review. *Folia Neuropathol*, 2013, **51**(1):1-9
- [18] Gadhav K, Bolshette N, Ahire A, *et al.* The ubiquitin proteasomal system: a potential target for the management of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med*, 2016, **20**(7):1392-1407

Screening of Key E3 Ubiquitin Ligase in The Development of Alzheimer's Disease*

LU Ya-Lan, SHI Gui-Ying, WANG Ke-Wei, BAI Lin**

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Science, Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College, NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Disease, Beijing 100021, China)

Abstract Objective To explore the key E3 ubiquitin ligases and their expression profile in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). **Methods** Bioinformatics method was used to screen the differential expression genes (DEGs) in the development of AD. The DEGs were analyzed by gene ontology (GO) and protein-protein interaction (PPI) network. Then, the E3 ubiquitin ligases were looked up through The Human Protein Atlas and Alzdata databases to find their histocytological localization in different brain regions. It was verified by qPCR in AD mice brain tissue. **Results** Ubiquitin-proteasome system (UPS) and ubiquitin conjugating enzyme from *Trypanosoma cruzi* (UBCc) domains of ubiquitin-conjugating enzyme were ranked top in the biological functions and domains involved in the process of AD; PPI network revealed multiple UPS molecules are the key node proteins; brain tissues specific and highly expressed E3 ubiquitin ligases (MKRN2, NEDD4L, LNX1, RNF41, TRIM36, RNF8 and DTX4) are reduced in AD patients and AD mice. **Conclusion** These 7 E3 ubiquitin ligases may function as driving factors to participate in the progress of AD, which provides important clues for further searching for new targets for the diagnosis, treatment and in-depth mechanism exploration in AD progression.

Key words Alzheimer's disease, ubiquitination, proteases, E3 ligase, bioinformatics

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0136

* This work was supported by grants from Natural Science Foundation of Beijing Municipality (5171001) and CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (2019-I2M-1-004).

** Corresponding author.

Tel: 86-10-67770815, E-mail: bailin49@163.com

Received: October 8, 2021 Accepted: November 17, 2021