论文

整合分析脆性 X 染色体综合征患者来源的诱导多能干细胞在神经元分化中的转录组变化

陆平^{①†}, 陈啸龙^{②†}, 冯云^{①†}, 曾桥^①, 江赐忠^②, 祝献民^{②*}, 范国平^{②③*}, 薛志刚^{①④⑤*}

① 同济大学医学院同济干细胞研究中心, 上海 200092;

② 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092;

③ Department of Human Genetics, David Geffen School of Medicine, University of California Los Angeles, 695 Charles Young Drive South, Los Angeles, CA 90095, USA;

④ 同济医院干细胞转化医学中心, 同济大学附属医院再生医学, 上海 200065;

⑤ 同济大学苏州研究院, 苏州 215101

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: xuezg@tongji.edu.cn; gfan@mednet.ucla.edu; xianminzhu@hotmail.com

收稿日期: 2016-06-30; 接受日期: 2016-09-05; 网络版发表日期: 2016-12-12

科技部国家重大科学研究计划(批准号: 2015CB964601, 2015CB964702)、国家自然科学基金海外及港澳学者合作研究基金项目(批准号: 31428016)、国家自然科学基金重点项目(批准号: 81430026)、教育部“留学回国人员科研启动基金”(祝献民)、上海市卫计委(批准号: XBR2013094)、江苏省科技计划(批准号: BM2014052)资助。

摘要 脆性 X 染色体综合征(fragile X syndrome, FXS)患者在 *FMRI* 基因的启动子区具有超过 200 个以上 CGG 三核苷酸重复片段, 导致其编码的脆性 X 智力低下蛋白(fragile X mental retardation protein, FMRP)的表达减少或缺失。然而目前尚未在单核苷酸分辨率(即 RNA-seq)水平上鉴定 FMRP 缺失所引起的转录组变化。本文对 FXS 患者成纤维细胞来源的诱导多能干细胞(human induced pluripotent stem cell, iPS 细胞)(FXS-iPSC)进行了体外神经元分化。然后采用 RNA-seq 技术检测了 FXS-iPSC 在体外神经元分化各阶段的转录调控变化情况。通过详尽的分析这些转录组数据并整合其他研究平台的成果, 发现在 FXS-iPSC 分化得到的神经元中许多与神经元分化相关的转录因子(*WNT1*, *BMP4*, *POU3F4*, *TFAP2C* 和 *PAX3*)表达上调, 钾离子通道基因(*KCNA1*, *KCNC3*, *KCNG2*, *KCNIP4*, *KCNJ3*, *KCNK9* 和 *KCNT1*)表达下调, 而 *SHANK1* 和 *NNAT* 转录调控的时序发生改变, 这表明 FXS 患者神经元的分化和功能受损。综上所述, 本研究证明 FXS 患者中 FMRP 的缺失显著影响了神经发育过程的基因表达模式, 并将有助于发现临床治疗 FXS 的潜在靶点。

关键词 脆性 X 染色体综合征, 智力发育迟滞, 人类诱导多能干细胞, 神经元分化

引用格式: 陆平, 陈啸龙, 冯云, 等. 整合分析脆性 X 染色体综合征患者来源的诱导多能干细胞在神经元分化中的转录组变化. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 1400–1412, doi: 10.1360/N052016-00329

英文版见: Lu P, Chen X L, Feng Y, et al. Integrated transcriptome analysis of human iPS cells derived from a fragile X syndrome patient during neuronal differentiation. Sci China Life Sci, 2016, 59: 1093–1105, doi: 10.1007/s11427-016-0194-6

脆性 X 染色体综合征(fragile X syndrome, FXS)是一种常见的遗传性疾病,与智力低下和情绪障碍有关,也被认为是最常见的单基因引起的自闭症。FXS 患者中, *FMR1* 基因的 5'端非翻译区(5'-untranslated region, 5'-UTR)CGG 三核苷酸重复序列与健康人相比明显增加(>200)。高度重复的 CGG 三核苷酸序列引起包括 DNA 甲基化和组蛋白修饰在内的诸多表观遗传改变,最终导致 *FMR1* 基因表达沉默^[1]。由 *FMR1* 基因编码的脆性 X 智力低下蛋白(fragile X mental retardation protein, FMRP)在许多组织中广泛表达,尤其是脑和睾丸表达丰富^[2]。在神经系统中, FMRP 缺失导致大脑中蛋白质合成增加^[3,4],突触强度削弱,并且影响树突棘^[5-7],因此许多重要的信号通路受到影响,例如代谢型谷氨酸受体(metabotropic glutamate receptor, mGluR)介导的信号受损^[8], γ -氨基丁酸能的传递减少^[9], mTOR 信号增强^[10]。在细胞质中 FMRP 的主要功能是选择性的结合 mRNA 翻译进行中的多聚核糖体,并且负调控编码突触前后蛋白质的目标 mRNA 的翻译,有趣的是,其中也包括许多转录因子^[7,11-17]。此外 FMRP 还包含细胞核输出信号(nuclear export signal, NES)和细胞核定位信号(nuclear localization signal, NLS)结构域,表明该蛋白穿梭于细胞核和细胞质之间^[18-20]。进一步研究证实 DNA 损伤时 FMRP 具有染色质结合蛋白的功能^[21],表明 FMRP 很可能直接调控细胞核中的转录。目前研究局限于 *Fmr1* 缺陷型小鼠(*Mus musculus*)^[22], FXS 患者类淋巴细胞^[23]和 FXS 患者诱导的 iPSC^[24]的低通量的微阵列(Microarray)基因表达谱数据分析,仍然迫切的需要通量和分辨率更高的 RNA-seq 来深入剖析 FMRP 缺失诱发的转录紊乱。

目前对 FXS 的研究建立在一些动物模型上。其中 *Fmr1* 缺陷型小鼠是最成功的哺乳动物模型之一,它囊括了人类 FXS 患者的一些表型,如在突触发生、突触结构和功能异常^[25]。由于特殊需要,研究人员还建立了携带 FXS 患者特定突变的小鼠模型,例如 I340N^[26]。通过靶向不同通路的关键靶分子,如 mGluR^[27-29]、淀粉样 β -protein 前体(amyloid β -protein precursor, A β PP)^[30], mTOR^[15], p21 激活激酶(p21-activated kinase, PAK)^[31]和蛋白质酪氨酸磷酸酶(protein tyrosine phosphatase, STEP)^[32],已在小鼠模型中获得了有效的遗传挽救功效。然而小鼠模型有

明显的局限性。例如,转基因小鼠没有 CGG 三核苷酸重复序列。年龄和遗传背景等不可控变量也影响了不同实验结果的分析。FXS 人类胚胎干细胞(human embryonic stem cells, ES)和 iPSC 细胞的应用克服了小鼠模型的缺点,提供了很好的工具来解析 FMRP 缺失的致病机制^[33-37]。

如上所述,FXS 患者的异常发育表型可能部分由于 FMRP 缺失引起的全基因组水平的转录调控紊乱,但目前尚无定论。为了验证这个假设,本研究首先取得并检验了从 FXS 患者(具有 *FMR1* 启动子 CGG 高度重复)成纤维细胞诱导得到的 FXS-iPSC 细胞系(由 Philip H. Schwartz 教授惠赠)^[38]。然后将 FXS-iPSC 和正常对照 iPS 细胞系 HDF2-iPSC 分别体外分化为神经元,并收集不同阶段的样品,即 iPSC 聚集体(iPSC aggregates, IA)、神经上皮(neuroepithelia, NE)和神经上皮聚集体(neuroepithelia aggregates, NA)。通过分析了从每个细胞系 4 个不同阶段的总共 2 亿个比对读长的 RNA-seq 数据,发现在神经元分化过程中 FXS-iPSC 和 HDF2-iPSC 之间共有 1559 个差异表达(differentially expressed, DE)基因。在神经元阶段,早期神经分化相关的基因(如 *WNT1*, *BMP4* 和 *POU3F4*)表达上调,而神经功能必不可少的许多基因,如钾离子通道(*KCNA1*, *KCNC3*, *KCNG2*, *KCNIP4*, *KCNJ3*, *KCNK9* 和 *KCNT1*)表达下调,这暗示 FXS-iPSC 分化得到的神经元是不成熟的并且功能受损。此外,本研究发现了 *SHANK1* 和 *NNAT* 等重要因子的时序调控被扰乱。首次通过高通量 RNA-seq 揭示了病人来源的 FXS-iPSC 在不同的发育阶段的转录组变化,有助于识别 FMRP 直接/间接的转录调控功能。这些关键的基因对神经元分化和发育十分重要,有助于对未来 FXS 新疗法的探索。

1 材料与方法

1.1 动物

CF1 孕鼠购自上海斯莱克动物实验室并饲养在同济大学动物房。所有动物实验饲养及使用均经过同济大学伦理委员会批准(#TJMED-013-063)。实验小鼠均饲养于静置鼠笼中,食物和水充足,供其自由摄取,最大限度降低实验鼠的痛苦。快速脱颈椎处死孕鼠,并对胚胎成纤维细胞进行分离培养。

1.2 细胞培养

HDF2-iPS 细胞来自加州大学洛杉矶分校干细胞中心^[39], FXS-iPS 细胞(命名编号为 SC128)由 Philip H. Schwartz 教授惠赠^[38]. 细胞培养在 37°C, 5% CO₂ 的恒温培养箱内, 每 3 天进行传代培养一次. 小鼠滋养层细胞取自于孕鼠的胚胎成纤维细胞, 取出 13.5 天孕鼠的子宫, 剥离得到幼胚, 去除头部及内脏组织, 躯干部位用 PBS 清洗后转移至 0.1 mmol/L 胰酶、1 mmol/L EDTA 溶液孵育消化 20 min, 加入滋养层细胞培养基(含 15% FBS 的 DMEM 培养基)上下吹打释放细胞, 经过 1~3 代培养的成纤维细胞用作滋养层细胞.

iPS 细胞培养采取与滋养层细胞共培养的方法. 其培养基是在 DMEM/F12 培养基中添加 2 mmol/L L-glutamine(Invitrogen), 1 mmol/L β -mercaptoethanol, 1 $\times$ non-essential amino acids(NEAA, Invitrogen), 20% knock-out serum replacement (KSR, Invitrogen), 100 U/mL penicillin 和 100 μ g/mL streptomycin (Invitrogen). 在细胞挑选和传代时, 细胞经 0.1% 胶原酶 IV(Stem Cell Tech)消化 10 min, 机械吹打使克隆分散后转移至新的滋养层上按照 3~4 倍稀释比例扩大培养.

1.3 体外神经分化

本研究采用已报道的方法诱导 iPS 细胞定向分化为神经元^[40], 流程概要如下: iPS 细胞克隆经胶原酶消化吹打制备成细胞团悬液, 置于含有 20% KSR (Invitrogen), 1% Glutamax(Invitrogen), 1% NEAA (Invitrogen)的 DMEM/F12 培养基(Invitrogen)培养 4 天, 然后换成神经诱导培养基(含 1% N2, 1% Glutamax, 1% NEAA 和 1 mg/mL heparin 的 DMEM/F12 培养基)继续培养 2 天; 随后 iPS 细胞经消化后用神经诱导培养基重悬制备成细胞团悬液并接种于经 20 μ g/mL 层粘连蛋白包被的 6 孔板内, 继续培养 11 天直至形成神经管花环样的 NE, 随后 NE 细胞经温和吹打转移至含 1% B27 的神经诱导培养基中使其形成 NA, 继续培养 8 天. 在第 25 天, NA 细胞经 accutase/trypsin(1:1)消化后转移至经多聚鸟氨酸/层粘连蛋白包被的玻璃盖玻片上, 置于含 1% N2, 1% B27, 1% Glutamax, 1% NEAA, 10 ng/mL BDNF, GDNF 和 IGF-1 的神经分化培养基(neural differentiation medium, NDM)中继续培养, 10 天之内

形成有丝分裂后期的神经元细胞, 分化完全成熟的神经元细胞在铺板 25 天后形成.

1.4 RNA 提取和实时 RT-PCR

收集 HDF2-iPSC 和 SC128 诱导分化的 iPSC(0 天)、IA (6 天)、NA(18 天)和成熟神经元(50 天) 四个不同阶段的细胞样品, 用 TRIzol 试剂(Ambion)抽提总 RNA, 取 200 ng 反转录合成 cDNA 第一链, SYBR Green 荧光法(TIAGEN)检测目的基因表达量, GAPDH 用作内参基因, 所有引物列表见网络版附表 S2.

1.5 免疫组织化学

细胞爬片上的细胞经 4%多聚赖氨酸固定后按照免疫荧光染色标准流程进行分析. 固定细胞经 0.3%的 Triton X-100 通透 1 h 后用 5%山羊血清溶液封闭, 然后一抗结合在 4°C 冰箱过夜, 其中各抗体稀释浓度如下: SOX2(1:100, mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology), NANOG(1:1000, goat polyclonal R&D Systems), SOX1(1:100, goat polyclonal, R&D Systems), FMRP(1:1000, rabbit polyclonal, Abcam), NESTIN(1:250, mouse monoclonal, BD bioscience), PAX6 (1:200, mouse monoclonal, DSHB), GFAP(1:500, mouse monoclonal, Novus Biologicals), MAP2(1:1000, rabbit polyclonal, Chemicon) 和 TUJ1(1:1000, mouse monoclonal, Covance). 第二天将细胞转移至 PBS 溶液中清洗 3 次, 选择合适荧光标记的二抗(Cy2-conjugated 1:300 或 Cy3-conjugated 1:500; Jackson ImmunoResearch)于室温下结合 2 h, PBS 清洗 3 次后用含有 DAPI 染液的封片剂封片固定, 最后于荧光显微镜下(Nikon eclipse Ti-S and Leica TCS SPS)观察成像.

1.6 文库构建和 RNA-seq

本研究用来自分化不同阶段细胞各 400 ng 总 RNA, 利用 Illumina TruSeq™ RNA-seq 文库试剂盒进行 mRNA 捕获、片段化、反转录和第二链合成, 经末端修复、接头连接后, 用 PCR 扩增 15 个循环进行扩增. 将所得到的文库用 Qubit 荧光定量(Invitrogen), 取每个样品 10 nmol 混合后用 Illumina HiSeq 2000 平台进行测序分析. 测序读长匹配至 hg19 基因组(Bowtie2)进行分拣及后续生物信息学分析.

1.7 生物信息学分析

原始测序数据经过去除接头序列、重复即低质量 ($Q<20$) 读长序列获得过滤后数据, 所得到的数据利用 TopHat v2.0.13 与参照基因组 hg19 进行比对^[41], 默认序列错配不超过 2 个碱基, 这部分数据小结见网络版附表 S3. 以每个转录本的 RPKM 值做为其表达水平的计算标准, 差异基因利用 Cuffdiff v1.3.0 进行分析^[42], 其中 $P<0.05$ 、表达量大于 2 倍则认为其表达水平有显著性差异. 应用聚类 (k -means, $k=7$) 计算 SC128 比 HDF 的 log2 变化倍数. 差异基因的富集分析利用 DAVID 在线工具 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) 进行分析^[43], 选择其中 $P<0.01$ 的基因进行展示. 利用 GeneMANIA 工具筛选出神经元阶段的上调和下调基因并进行相应的生物学功能调控网络分析^[44]. 用作比较分析的芯片检测数据从在线数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO) 中下载 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), 数据编号分别为 GSE25542^[45] 和 GSE62721^[24]. 来自不同样品和数据集的基因表达水平利用 Bioconductor SVA 包进行批间差异去除进行归一化处理, 选择 $P<0.01$ 、表达量差异大于 2 倍的基因作为 DE 基因.

2 结果

2.1 脆性 X 染色体综合征诱导多能干细胞(FXS-iPSC)体外定向分化神经元细胞

FXS-iPSC 由 Philip H. Schwartz 教授实验室惠赠^[38]. 该细胞从建系至该研究使用已经历 28 代培养, 细胞观察显示其状态良好并保持均一的 ES 细胞样形态特征 (数据未显示). 利用 Asuragen Amplide X FMR1 PCR 试剂盒检测, 发现在 FXS-iPSC 细胞中 *FMR1* 基因的 5'-UTR 区域含有 236 个 CGG 重复, 而来自正常供体对照细胞 HDF2-iPSC 仅有 36 个 CGG 重复 (网络版附图 S1A~B). 与正常对照相比, FXS-iPSC 未检测到 *FMR1* 基因的表达 (图 1B, 网络版附图 S1C).

将 FXS-和 HDF2-iPSC 在体外定向诱导分化为神经元细胞 (图 1A). 在体外分化的不同阶段, 免疫荧光和定量 PCR 均不能检测到 *FMR1* 基因在 FXS-iPSC 中表达 (网络版附图 S1C); 而 FXS-iPSC 仍然可以像

正常细胞 HDF2-iPSC 一样表达阶段特异性的标志基因 (图 1B~D). FXS-iPSC 分化的神经元得率远低于正常对照组 ($73.2\% \pm 0.8\%$ vs. $83.7\% \pm 3.9\%$, $P=0.0019$), 与 FXS 患者的临床表现相一致^[33].

2.2 FMRP 缺失导致神经发育进程中基因表达改变

分别收集分化第 0 天 (iPS 期)、6 天 (IA 期)、18 天 (NA 期) 和 50 天 (神经元期) 的细胞并进行转录组分析. 通过 Illumina Hi-seq 平台对 8 个样品进行测序并得到 200 M 的匹配读长. 通过主成分分析, 发现 FXS-iPSC 和 HDF2-iPSC 体外分化在相同阶段时的基因表达模式非常相似 (图 2A~B). 为了评估体外分化方法的可靠性, 通过与 Pasca 等人^[45]的单细胞测序结果进行比较, 发现 FXS-iPSC 和 HDF2-iPSC 在第 0 和第 6 天的基因表达模式与 Pasca 等的 iPSC 阶段细胞最为接近, 而第 18 和第 50 天的基因表达模式分别与 Pasca 等的神经球 (neurosphere) 和神经元 (neuron) 阶段相对应 (图 2C), 这表明 FXS-iPSC 和 HDF2-iPSC 均已成功分化为神经元. 因此, FMRP 缺失在转录水平上仅引起基因表达的细微变化, 而且 FXS-iPSC 在体外分化的神经元在形态上与 HDF2-iPSC 分化的神经元类似.

以 $P<0.05$ and $\log_2$ (fold change) >1 设限, 在 FXS-iPSC 和 HDF2-iPSC 的神经元分化过程中共找到 1559 个 DE 基因 (图 2D, 网络版附表 S1). 大部分差异基因出现在 iPSC 阶段, 第 6 和第 18 天的 DE 基因与其他阶段有较高的重叠 (网络版附表 S2). 功能分析显示, 这些上调或下调的 DE 基因均与胚胎发育、神经分化和功能密切相关. 这些结果提示 FXS-iPSC 在分化为神经元的过程中转录调控受到严重影响, 以下将详细阐述.

2.3 基因表达模式与报道的 FXS-iPSC 分化差异基因相一致

由于 FXS 患者的遗传背景和实验条件各不相同, 来自单一患者的转录组数据是否有助于解析 FXS 所共有的转录变化规律仍有疑问. 为此, 本研究找到另一组已公开发表的 FXS 患者来源的 iPSC 向神经元分化的转录组数据^[24]. 虽然这些数据来自低通量的微阵列 (microarray), 而且仅包含 iPSC 和神经元两个阶段的结果, 但是通过整合分析, 发现这些结果与本研

图 1 FXS-iPSC 的体外神经元分化

A: 体外神经元分化示意图; B~D: 体外分化各阶段细胞的免疫荧光染色, 使用抗-FMRP 抗体、干性标志物 NANOG 和 SOX2(B)、神经上皮标志物 NESTIN, SOX1 和 PAX6(C)、神经元标志物 MAP2 和 TUJ1. (iPSC: 诱导多能干细胞; NE: 神经上皮; NU: 神经)

究高通量测序数据基本保持一致. 如图 3A~B 所示, 第 0 和第 50 天的数据与 Halevy 等的 iPSC 和神经元阶段的数据分别聚类在一起, 说明本研究的体外分化体系和 RNA-seq 的质量很高. Halevy 等的数据缺少中间阶段, 但本研究第 0, 6 和 18 天的数据都和 Halevy 等的 iPSC 阶段聚类在一起了. 同时, 本研究的数据互相聚类在一起, 而 Halevy 等的数据之间的差异相对较大. 但无论如何, 本研究和 Halevy 等的两组数据都比较一致的在神经元阶段检测到上调和下调基因(图 3C). 综上所述, 本研究的数据对研究

FXS 患者的神经发育具有代表性, 可以与其他不同平台来源的数据进行整合分析.

2.4 神经元阶段的基因表达差异决定了 FXS-iPSC 和 HDF2-iPSC 神经分化的表型差异

本研究进一步着重分析了 FXS-iPSC 在神经元阶段的 DE 基因. 热图显示在 FXS 分化的神经元中上调和下调的基因可以明显的聚类为两个群(图 4A~D), 其中群 1 和群 2 分别代表上调的和下调的 DE 基因. 这些 DE 基因与胚胎发育和突触传递有关, 因而它们

图 2 FXS-iPSC 向神经元分化过程的基因表达模式

A: 神经分化各阶段的基因表达的无监督分级聚类; B: HDF 和 SC128 向神经分化四个阶段的主成分分析; C: 聚类分析表明神经分化得到的各个阶段细胞的基因表达与 Pasca 等在 2011 年的报道类似; D: 火山图显示 HDF 和 SC128 样品的基因表达的整体比较. $\log_2FC$: SC128 和 HDF 基因表达差异倍数的对数

反映了转录组变化, 并最终导致神经功能异常. 如表 1 所示, 群 1 中上调基因主要包括 *WNT1*, *BMP4*,

POU3F4, *TFAP2C* 和 *PAX3* 等神经发生相关的基因, 表明 FXS-iPSC 分化得到的神经元细胞相对不成熟.

图3 整合分析本文的 RNA-seq 数据与其他实验室 FXS-iPSC 体外神经元分化的数据

A: 热图显示本文 RNA-seq 数据与 Halevy 等 2015 年报道的微阵列数据的基因表达聚类分析的结果。本文数据命名为 HDF 和 SC128, 而 Halevy 等的的数据命名为 WT 和 FXS; B: 对本文 RNA-seq 数据与 Halevy 等 2015 年报道的微阵列数据的 iPSC 和神经元两个阶段的基因表达分别进行主成分分析; C: 在神经元阶段, 本文和 Halevy 等找到的 DE 基因数目对比。Up: 在 FXS 来源的样品中上调表达的基因; Down: 在 FXS 来源的样品中下调表达的基因

值得一提的是, 群 2 中的下调基因包括钾离子通道相关蛋白的编码基因, 如 *KCNA1*, *KCNC3*, *KCNG2*, *KCNIP4*, *KCNJ3*, *KCNK9* 和 *KCNT1* 等, 暗示这些下调基因与 FXS 患者智力障碍发生密切相关。通过实时荧光定量 PCR 对上述测序结果进行了验证(图 4A)。同时, 进一步与 Halevy 等^[24]的数据一起进行整合分析, 同样检测出这些 DE 基因。例如, 功能注释中的“embryonic morphogenesis”(GO:0048598)显著上调

(图 4B~C), 而钾离子通路相关基因则显著下调(图 4D~E)。

与群 1 和群 2 不同, 一些基因在 FXS-iPSC 体外分化的整个过程中都下调或上调, 而这些 DE 基因在神经系统发育过程中具有重要功能(图 4A)。通过实时荧光定量 PCR 检测(图 4A)和比较人类大脑转录组 (human brain transcriptome, HBT), 发现其中 *SHANK1*(群 3)和的 *NNAT*(群 4)的时序性表达模式在

图 4 FXS-iPSC 来源的神经元中特异上调或下调的四类基因

A: $\log_2$ FC(SC128 / HDF)的热图显示 SC128 与 HDF 在神经元阶段(D50)的 DE 基因可分为 4 个群。GO 分析显示每群基因的生物学功能, 实时荧光定量 PCR 验证每个群里代表基因的 mRNA 水平; B: 箱线图显示本文数据中胚胎发育功能分类(GO:0048598)上调的基因; C: B 中功能分类(GO:0048598)上调的基因在 Haldane 等的微阵列数据同样表现为上调; D: 箱线图表示本文数据中 79 个下调的钾离子通道相关基因(来源于 HGNC); E: D 中下调的钾离子通道相关基因同样在 Haldane 等的微阵列数据中下调。Log₂: 基因表达差异; P 值通过配对 *t*-检验计算

FXS 患者来源的细胞中发生显著改变, 表明它们与 FXS 智力缺陷的形成密切相关。最后, 生物网络分析进一步显示所有这些 DE 基因具有重要功能, 它们的联合调控是成熟神经元所必需的(图 5A)。

3 讨论

尽管翻译失调导致 FXS 的分子致病机制已经被广泛接受^[46], 但研究者依然试图探究其转录机制是否发生并如何发生了改变^[22~24]。转录发生改变有以下几个原因: 首先, FMRP 能够结合大约 6000 种不同的 mRNA 并抑制它们的翻译^[14], 而其中包括 932 个

已知功能的转录因子^[47]。这些转录因子的表达失调会间接导致转录改变。其次, 5%的 FMRP 位于细胞核内, 因此有可能参与转录、mRNA 剪接和 DNA 损伤修复等。然而, 除了 DNA 损伤修复^[21], 我们对核内 FMRP 的功能知之甚少。最后, *FMR1* 启动子区的表观遗传变化可以延伸至 X 染色体的临近区域, 对基因表达产生直接或间接的影响。与以往来自 *FMR1* 缺陷鼠^[22]和 FXS 患者来源的淋巴细胞^[23]的低通量芯片检测不同, 本研究利用 FXS 患者来源的 iPSC 细胞进行定向诱导分化形成神经元, 系统全面地分析了每个阶段的基因表达谱, 共发现 1559 个 DE 基因。根据表达模式将这些基因聚类到不同的群(表 1), 发现其中

图 5 神经发育过程中 FMRP 在细胞核内调控特定基因的转录

A: 利用 GeneMANIA 绘制的生物学功能网络表明, 本文发现的这些 DE 基因对于调控神经发育和功能必不可少. 大圆圈表示神经元阶段 (D50) 的 DE 基因, 其中红色代表上调基因, 蓝色代表下调基因. 中间的黄色钻石样图形代表主要的生物学功能, 例如神经发育、钾离子通道和谷氨酸能突触. 彩色线将各个 DE 基因和其对应的生物学功能连接起来; B: 在神经分化过程中 FMRP 可能直接或通过调控其他转录因子间接调控下游不同基因的转录. “+”: 正调控; “-”: 负调控; “?”: 小部分 FMRP(5%) 如何定位于核中, 以及如何与其他未知转录因子相互作用, 直接或间接调控靶基因转录的机制仍需进一步研究

很多基因协同作用, 具有神经发育、钾离子通道和谷氨酸能突触等重要神经功能(图 5A), 因此这些基因的失调很有可能引起 FXS 的病理特征. 通过将本研究的数据与其他实验结果进行整合分析, 发现 FMRP 在神经分化发育过程中调控了一系列关键基因(图 5B), 然而详细机制仍待进一步验证.

神经元阶段的 DE 基因(群 1 和群 2) 主要与神经发生、突触可塑性和回路兴奋性有关, 提示其转录水

平的失调能够导致 FXS 患者的智力发育障碍. 在 FXS-iPSC 分化得到的神经元中 *WNT1*, *BMP4*, *POU3F4* 和 *TFAP2C* 等重要的转录因子表达上调. 众所周知, *WNT1* 和 *BMP4* 在干性维持中发挥重要作用, 抑制 *BMP4* 信号通路是神经分化的关键. 在小鼠中, 通过 *Pax6*-BAF 复合物激活后, *Pou3F4* 参与了早期神经发生的调控网络^[48]. 在斑马鱼中, *Tfap2c* 和 *Tfap2a* 的时空表达是神经脊发育所必需^[49]. 因此, 这类转录

表 1 在 FXS-iPSC 体外分化过程中表达失调的基因

Symbol	Description	Location	Cluster	Function
<i>WNT1</i>	wingless-type MMTV integration site family member 1	12q13	3	GO:0007399~nervous system development
<i>BMP4</i>	bone morphogenetic protein 4	14q22-q23	3	GO:0030154~cell differentiation
<i>POU3F4</i>	POU class 3 homeobox 4	Xq21.1	3	GO:0006357~regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
<i>TFAP2C</i>	transcription factor AP-2 gamma (activating enhancer binding protein 2 gamma)	20q13.2	3	GO:0006357~regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
<i>KCNA1</i>	potassium channel, voltage gated shaker related subfamily A, member 1	12p13.32	4	GO:0006812~cation transport
<i>KCNC3</i>	potassium channel, voltage gated Shaw related subfamily C, member 3	19q13.33	4	GO:0006812cation transport
<i>KCNG2</i>	potassium channel, voltage gated modifier subfamily G, member 2	18q23	4	GO:0006812~cation transport
<i>KCNIP4</i>	Kv channel interacting protein 4	4p15.32	4	GO:0007600~sensory perception
<i>KCNJ3</i>	potassium channel, inwardly rectifying subfamily J, member 3	2q24.1	4	GO:0006812~cation transport
<i>KCNK9</i>	potassium channel, two pore domain subfamily K, member 9	8q24.3	4	GO:0006812~cation transport
<i>KCNT1</i>	potassium channel, sodium activated subfamily T, member 1	9q34.3	4	GO:0008324~cation transmembrane transporter activity
<i>SHANK1</i>	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 1	19q13.3	5	GO:2000463~positive regulation of excitatory postsynaptic potential
<i>NNAT</i>	neuronatin	20q11.2-q12	6	GO:0007399~nervous system development

因子的表达上调是神经未成熟的标志之一, FXS-iPSC 中的转录失调抑制或延缓了神经元分化的过程. 此外, 群 1 中的关键转录因子 PAX3 异常高表达, 已知 PAX3 参与调控神经嵴诱导、特化和分化^[50], 因异常高表达的 PAX3 将破坏神经元分化过程的平衡, 增加或减少神经元亚型的数量, 并最终导致 FXS 患者的智力发育障碍. 群 2 中的 *KCNA1*, *KCNC3*, *KCNG2*, *KCNIP4*, *KCNJ3*, *KCNK9* 和 *KCNT1* 等钾离子通道蛋白编码基因的表达在 FXS-iPSC 分化的神经元中均发生下调. 钾离子通道在维持神经元膜电位方面发挥重要功能, 该类蛋白的下调与 FXS 患者的神经系统疾病有关^[51]. 目前已知, FMRP 通过翻译水平或蛋白-蛋白相互作用来调节 *KCNT1*^[52], *KCNC1*^[53], *KCND2*^[54]和 *KCNMA1*^[55]编码的 4 种钾离子通道蛋白. 与之呼应, 本研究发现了钾离子通道蛋白下调, 为 FMRP 可能通过转录调控进而引起膜电位变化提供了新的证据. 此外, 本研究在 DE 基因中还发现了与 mGluR 通路调控相关的基因的表达变化, 例如 *PRKCG*, *GRIN3A* 的上调和 *GRIN1*, *GRIA4*, *GRIN2B*, *GRM5* 和 *GRM7* 的下调, 推测 mGluR5 自身下调表达是 FMRP 缺失导致的翻译失调所引发的负反馈调控.

神经发育受到严密的时空转录调节, 这已得到 HBT 数据库的支持^[56~58]. 本研究通过分析 FXS-iPSC 分化所有阶段的上调或下调的 DE 基因(图 4A), 发现它们与 HBT 数据库相应的表达模式截然相反. 推测

SHANK1 和 *NNAT* 两个基因的转录失调可能与 FXS 相关. 在 HBT 中, *SHANK1* 表达逐步升高, 在新生婴儿脑中达到稳定的最高点; 而 *SHANK1* 在 FXS-iPSC 体外分化过程中表达量维持在低水平, 在第 50 天更加迅速降低. *SHANK1* 编码神经骨架蛋白, 它的突变与人类^[59,60]和动物模型^[61]的自闭症有很高的相关性. 尽管在 *FMRI* 缺陷鼠中并未发现 *SHANK1* mRNA 水平发生变化^[62], 推测很可能是种间差异和样品制备的问题. 因为其 FXS 表型与自闭症有很多重叠之处^[63], 提示 *SHANK1* 在 FXS 病理过程中的作用需要更多的验证. 在 HBT 数据库中, *NNAT* 的表达在神经发育中呈现持续下降趋势, 到新生婴儿阶段达到最低点; 而在 FXS-iPSC 体外分化过程中, *NNAT* 表达偏高, 在第 18 和第 50 天出现高表达跃升. *NNAT* 是父源表达的印记基因, 在 PC12 细胞向神经细胞分化过程中呈下降趋势^[64,65]. 在 Lafora 症^[66,67]和苯丙酮尿症^[68]中都有 *NNAT* 蛋白聚集. 因此, *NNAT* 高表达可能阻碍了 FXS 患者的神经发育.

本研究的结果与此前的研究一致, 即 FXS 是由 *FMRI* 单基因突变所引起的^[1,69]. 否则, 如果 *FMRI* 基因 5'-UTR 的 DNA 甲基化或其他表观遗传改变扩展至临近区域并引起相应基因的表达变化, 理论上应该观察到这些临近脆性 X 染色体位点的基因在整个神经分化中均保持沉默. 本研究确实发现, 在整个

神经元分化进程中存在持续表达上调或下调的基因(图 4A, 网络版附图 S2A~B)。然而 GO 分析发现这些基因在生物学功能上呈现低水平的富集(图 4A)。在整个神经分化进程中持续表达下调的基因仅有 9 个, 且没有一个位于 X 染色体上(附图 S2C), 其中大部分位于 19 号染色体的端粒区附近, 包括 *ZFN558* 和 *ZFN199* 等特异性锌指蛋白类基因^[70]。雄性 19 号染色体的端粒区附近存在高频染色体互换^[70,71], 因此这些基因表达下调有可能是随机重组交换的后果。总

之, *FMR1* 突变不会直接引起其邻近 X 染色体区域的转录抑制。

综上所述, 本研究通过 iPS 细胞模型和高通量 RNA-seq 技术, 全面深入的分析了 FXS-iPSC 体外分化为神经元过程中的转录变化, 发现很多与 FXS 患者智力缺陷相关的候选基因。由于大多数基因在 FXS 患者和动物模型中均未见报道, 本研究将为 FXS 分子病因的基础研究和药物筛选等领域提供丰富的资源。

致谢 感谢 Children's Hospital of Orange County 的 Philip H. Schwartz 教授惠赠 SC128 细胞系。

参考文献

- 1 Bagni C, Tassone F, Neri G, et al. Fragile X syndrome: causes, diagnosis, mechanisms, and therapeutics. *J Clin Invest*, 2012, 122: 4314–4322
- 2 Devys D, Lutz Y, Rouyer N, et al. The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nat Genet*, 1993, 4: 335–340
- 3 Qin M, Kang J, Burlin T V, et al. Postadolescent changes in regional cerebral protein synthesis: an *in vivo* study in the FMR1 null mouse. *J Neurosci*, 2005, 25: 5087–5095
- 4 Lagerbauer B, Ostareck D, Keide E M, et al. Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Hum Mol Genet*, 2001, 10: 329–338
- 5 Cruz-Martin A, Crespo M, Portera-Cailliau C. Delayed stabilization of dendritic spines in fragile X mice. *J Neurosci*, 2010, 30: 7793–7803
- 6 Pan F, Aldridge G M, Greenough W T, et al. Dendritic spine instability and insensitivity to modulation by sensory experience in a mouse model of fragile X syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 17768–17773
- 7 Pfeiffer B E, Huber K M. Fragile X mental retardation protein induces synapse loss through acute postsynaptic translational regulation. *J Neurosci*, 2007, 27: 3120–3130
- 8 Bear M F, Huber K M, Warren S T. The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends Neurosci*, 2004, 27: 370–377
- 9 D'Hulst C, Kooy R F. The GABAA receptor: a novel target for treatment of fragile X? *Trends Neurosci*, 2007, 30: 425–431
- 10 Sharma A, Hoeffler C A, Takayasu Y, et al. Dysregulation of mTOR signaling in fragile X syndrome. *J Neurosci*, 2010, 30: 694–702
- 11 Muddashetty R S, Kelić S, Gross C, et al., Dysregulated metabotropic glutamate receptor-dependent translation of AMPA receptor and postsynaptic density-95 mRNAs at synapses in a mouse model of fragile X syndrome. *J Neurosci*, 2007, 27: 5338–5348
- 12 Lu R, Wang H, Liang Z, et al. The fragile X protein controls microtubule-associated protein 1B translation and microtubule stability in brain neuron development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 15201–15206
- 13 Osterweil E K, Krueger D D, Reinhold K, et al. Hypersensitivity to mGluR5 and ERK1/2 leads to excessive protein synthesis in the hippocampus of a mouse model of fragile X syndrome. *J Neurosci*, 2010, 30: 15616–15627
- 14 Ascano M Jr, Mukherjee N, Bandaru P, et al. FMRP targets distinct mRNA sequence elements to regulate protein expression. *Nature*, 2012, 492: 382–386
- 15 Auerbach B D, Osterweil E K, Bear M F. Mutations causing syndromic autism define an axis of synaptic pathophysiology. *Nature*, 2011, 480: 63–68
- 16 Kao D I, Aldridge G M, Weiler I J, et al. Altered mRNA transport, docking, and protein translation in neurons lacking fragile X mental retardation protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 15601–15606
- 17 Darnell J C, Van Driesche S J, Zhang C, et al. FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell*, 2011, 146: 247–261
- 18 Eberhart D E, Malter H E, Feng Y, et al. The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear

- localization and nuclear export signals. *Hum Mol Genet*, 1996, 5: 1083–1091
- 19 Sittler A, Devys D, Weber C, et al. Alternative splicing of exon 14 determines nuclear or cytoplasmic localisation of *fmr1* protein isoforms. *Hum Mol Genet*, 1996, 5: 95–102
 - 20 Feng Y, Gutekunst C A, Eberhart D E, et al. Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes. *J Neurosci*, 1997, 17: 1539–1547
 - 21 Alpatov R, Lesch B J, Nakamoto-Kinoshita M, et al. A chromatin-dependent role of the fragile X mental retardation protein FMRP in the DNA damage response. *Cell*, 2014, 157: 869–881
 - 22 D'Agata V, Warren S T, Zhao W, et al. Gene expression profiles in a transgenic animal model of fragile X syndrome. *Neurobiol Dis*, 2002, 10: 211–218
 - 23 Bittel D C, Kibiryeva N, Butler M G. Whole genome microarray analysis of gene expression in subjects with fragile X syndrome. *Genet Med*, 2007, 9: 464–472
 - 24 Halevy T, Czech C, Benvenisty N. Molecular mechanisms regulating the defects in fragile X syndrome neurons derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*, 2015, 4: 37–46
 - 25 Bakker E C, Verheij C, Willemsen R, et al. *Fmr1* knockout mice: A model to study fragile X mental retardation. *Cell*, 1994, 78: 23–33
 - 26 Zang J B, Nosyreva E D, Spencer C M, et al. A mouse model of the human Fragile X syndrome I304N mutation. *PLoS Genet*, 2009, 5: e1000758
 - 27 Dölen G, Osterweil E, Rao B S, et al. Correction of fragile X syndrome in mice. *Neuron*, 2007, 56: 955–962
 - 28 Lindemann L, Jaeschke G, Michalon A, et al. CTEP: a novel, potent, long-acting, and orally bioavailable metabotropic glutamate receptor 5 inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011, 339: 474–486
 - 29 Michalon A, Sidorov M, Ballard T M, et al. Chronic pharmacological mGlu5 inhibition corrects fragile X in adult mice. *Neuron*, 2012, 74: 49–56
 - 30 Westmark C J, Westmark P R, O'Riordan K J, et al. Reversal of fragile X phenotypes by manipulation of AbetaPP/Abeta levels in *Fmr1*^{KO} mice. *PLoS One*, 2011, 6: e26549
 - 31 Hayashi M L, Rao B S, Seo J S, et al. Inhibition of p21-activated kinase rescues symptoms of fragile X syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104: 11489–11494
 - 32 Goebel-Goody S M, Wilson-Wallis E D, Royston S, et al. Genetic manipulation of STEP reverses behavioral abnormalities in a fragile X syndrome mouse model. *Genes Brain Behav*, 2012, 11: 586–600
 - 33 Telias M, Segal M, Ben-Yosef D. Neural differentiation of Fragile X human Embryonic Stem Cells reveals abnormal patterns of development despite successful neurogenesis. *Dev Biol*, 2013, 374: 32–45
 - 34 Sheridan S D, Theriault K M, Reis S A, et al. Epigenetic characterization of the *FMRI* gene and aberrant neurodevelopment in human induced pluripotent stem cell models of fragile X syndrome. *PLoS One*, 2011, 6: e26203
 - 35 Eiges R, Urbach A, Malcov M, et al. Developmental study of fragile X syndrome using human embryonic stem cells derived from preimplantation genetically diagnosed embryos. *Cell Stem Cell*, 2007, 1: 568–577
 - 36 Wu H, Xu J, Pang Z P, et al. Integrative genomic and functional analyses reveal neuronal subtype differentiation bias in human embryonic stem cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 13821–13826
 - 37 Huang S, Fu X B. Stem cell therapies and regenerative medicine in China. *Sci China Life Sci*, 2014, 57: 157–161
 - 38 Brick D J, Nethercott H E, Montesano S, et al. The Autism Spectrum Disorders Stem Cell Resource at Children's Hospital of Orange County: Implications for Disease Modeling and Drug Discovery. *Stem Cells Transl Med*, 2014, 3: 1275–1286
 - 39 Liao J L, Yu J, Huang K, et al. Molecular signature of primary retinal pigment epithelium and stem-cell-derived RPE cells. *Hum Mol Genet*, 2010, 19: 4229–4238
 - 40 Zhang X Q, Zhang S C. Differentiation of neural precursors and dopaminergic neurons from human embryonic stem cells. *Methods Mol Biol*, 2010, 584: 355–366
 - 41 Kim D, Pertea G, Trapnell C, et al. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol*, 2013, 14: R36
 - 42 Trapnell C, Roberts A, Goff L, et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc*, 2012, 7: 562–578
 - 43 Huang da W, Sherman B T, Lempicki R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*, 2009, 4: 44–57
 - 44 Warde-Farley D, Donaldson S L, Comes O, et al. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38: W214–20

- 45 Paşca S P, Portmann T, Voineagu I, et al. Using iPSC-derived neurons to uncover cellular phenotypes associated with Timothy syndrome. *Nat Med*, 2011, 17: 1657–1662
- 46 Darnell J C, Klann E. The translation of translational control by FMRP: therapeutic targets for FXS. *Nat Neurosci*, 2013, 16: 1530–1536
- 47 Vaquerizas J M, Kummerfeld S K, Teichmann S A, et al. A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nat Rev Genet*, 2009, 10: 252–263
- 48 Ninkovic J, Steiner-Mezzadri A, Jawerka M, et al. The BAF complex interacts with Pax6 in adult neural progenitors to establish a neurogenic cross-regulatory transcriptional network. *Cell Stem Cell*, 2013, 13: 403–418
- 49 Li W, Cornell R A. Redundant activities of Tfp2a and Tfp2c are required for neural crest induction and development of other non-neural ectoderm derivatives in zebrafish embryos. *Dev Biol*, 2007, 304: 338–354
- 50 Monsoro-Burq, A H. PAX transcription factors in neural crest development. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 44: 87–96
- 51 Lee H Y, Jan L Y. Fragile X syndrome: mechanistic insights and therapeutic avenues regarding the role of potassium channels. *Curr Opin Neurobiol*, 2012, 22: 887–894
- 52 Brown M R, Kronengold J, Gazula V R, et al. Fragile X mental retardation protein controls gating of the sodium-activated potassium channel Slack. *Nat Neurosci*, 2010, 13: 819–821
- 53 Strumbos J G, Brown M R, Kronengold J, et al. Fragile X mental retardation protein is required for rapid experience-dependent regulation of the potassium channel Kv3.1b. *J Neurosci*, 2010, 30: 10263–10271
- 54 Lee H Y, Ge W P, Huang W, et al. Bidirectional regulation of dendritic voltage-gated potassium channels by the fragile X mental retardation protein. *Neuron*, 2011, 72: 630–642
- 55 Deng P Y, Rotman Z, Blundon J A, et al. FMRP regulates neurotransmitter release and synaptic information transmission by modulating action potential duration via BK channels. *Neuron*, 2013, 77: 696–711
- 56 Johnson M B, Kawasawa Y I, Mason C E, et al. Functional and evolutionary insights into human brain development through global transcriptome analysis. *Neuron*, 2009, 62: 494–509
- 57 Kang H J, Kawasawa Y I, Cheng F, et al. Spatio-temporal transcriptome of the human brain. *Nature*, 2011, 478: 483–489
- 58 Pletikos M, Sousa A M, Sedmak G, et al. Temporal specification and bilaterality of human neocortical topographic gene expression. *Neuron*, 2014, 81: 321–32
- 59 Sato D, Lionel A C, Leblond C S, et al. SHANK1 Deletions in Males with Autism Spectrum Disorder. *Am J Hum Genet*, 2012, 90: 879–887
- 60 Leblond C S, Nava C, Polge A, et al. Meta-analysis of SHANK Mutations in Autism Spectrum Disorders: a gradient of severity in cognitive impairments. *PLoS Genet*, 2014, 10: e1004580
- 61 Hung A Y, Futai K, Sala C, et al. Smaller dendritic spines, weaker synaptic transmission, but enhanced spatial learning in mice lacking Shank1. *J Neurosci*, 2008, 28: 1697–1708
- 62 Schütt J, Falley K, Richter D, et al. Fragile X mental retardation protein regulates the levels of scaffold proteins and glutamate receptors in postsynaptic densities. *J Biol Chem*, 2009, 284: 25479–25487
- 63 Devitt, N M, Gallagher L, Reilly R B. Autism Spectrum Disorder (ASD) and Fragile X Syndrome (FXS): Two Overlapping Disorders Reviewed through Electroencephalography-What Can be Interpreted from the Available Information? *Brain Sci*, 2015, 5: 92–117
- 64 Joseph R, Tsang W, Dou D, et al. Neuronatin mRNA in PC12 cells: downregulation by nerve growth factor. *Brain Res*, 1996, 738: 32–38
- 65 Zheng S, Chou A H, Jimenez A L, et al., The fetal and neonatal brain protein neuronatin protects PC12 cells against certain types of toxic insult. *Brain Res Dev Brain Res*, 2002, 136: 101–110
- 66 Sharma J, Mukherjee D, Rao S N, et al. Neuronatin-mediated aberrant calcium signaling and endoplasmic reticulum stress underlie neuropathology in Lafora disease. *J Biol Chem*, 2013, 288: 9482–9490
- 67 Sharma J, Rao S N, Shankar S K, et al. Lafora disease ubiquitin ligase malin promotes proteasomal degradation of neuronatin and regulates glycogen synthesis. *Neurobiol Dis*, 2011, 44: 133–141
- 68 Surendran S, Tying S K, Matalon R. Expression of calpastatin, minopontin, NIPSNAP1, rabaptin-5 and neuronatin in the phenylketonuria (PKU) mouse brain: possible role on cognitive defect seen in PKU. *Neurochem Int*, 2005, 46: 595–599
- 69 Nelson D L, Orr H T, Warren S T. The unstable repeats--three evolving faces of neurological disease. *Neuron*, 2013, 77: 825–843
- 70 Mohrenweiser H W, Tsujimoto S, Gordon L, et al. Regions of sex-specific hypo- and hyper-recombination identified through integration of 180 genetic markers into the metric physical map of human chromosome 19. *Genomics*, 1998, 47: 153–162
- 71 Tapper W, Collins A, Gibson J, et al. A map of the human genome in linkage disequilibrium units. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005. 102: 11835–11839