长非编码 RNA-*Tug1* 在大脑皮层发育过程中的初步研究

牟丽丽, 雷灿, 钟小灵, 周严*

武汉大学生命科学学院, 细胞生物学系, 武汉 430072

* 联系人, E-mail: yan.zhou@whu.edu.cn

收稿日期: 2014-09-03; 接受日期: 2014-09-18; 网络版发表日期: 2015-02-03

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2011CBA01102)和国家自然科学基金(批准号: 31171314, 31471361)资助项目
doi: 10.1360/N052014-00301

摘要 哺乳动物大脑皮层发育过程中, 神经前体细胞精密有序地产生不同类型的子代细胞, 如神经元和胶质细胞. 特异转录因子精确激活或抑制性状决定基因在该过程中发挥决定性作用. 最近的研究发现, 长非编码 RNA(lncRNA)在器官发育和疾病发生过程中发挥重要的基因调控功能, 但 lncRNA 在大脑皮层发育过程中发挥的作用尚不清楚. 本研究发现, 在小鼠大脑皮层发育过程中, lncRNA-*Tug1* 的表达量随着神经元的产生而显著上调. 组织原位杂交显示, 在皮层发育的几个关键时期, *Tug1* 广泛分布于背侧前脑神经前体细胞及其子代细胞中. 应用小鼠子宫内电穿孔技术敲低 *Tug1*, 发现 *Tug1* 对神经前体细胞的增殖或分化没有显著性影响. 本研究构建了特异针对 *Tug1* 转录起始位点上游的 TALEN 表达载体, 在培养的小鼠细胞里发现它们具有显著的切割效率. 下一步将在 *Tug1* 转录起始位点 5'端敲入多聚腺苷酸尾(PolyA)信号片段, 以构建 *Tug1* 失活小鼠模型, 研究 *Tug1* 在皮层发育过程中的作用, 并探索高效建立 lncRNA 失活小鼠模型的途径.

关键词

lncRNA

Tug1

神经前体细胞

TALEN 基因敲入

哺乳动物的大脑皮层是一个高度复杂、精密有序的结构, 负责执行重要的认知、感知等高级功能, 也是意识的基础^[1]. 大脑皮层由大量不同类型的神经元和胶质细胞形成一个 6 层结构^[2]. 大脑皮层发育过程中, 神经前体细胞先产生神经元后产生胶质细胞, 其中投射神经元的产生和迁移遵循由内到外模式: 除第一层外, 早产生的神经元定位在深部皮层, 晚产生的神经元沿着神经前体细胞的辐射状突起迁移到浅部皮层^[3]. 这些不同类型神经元的有序产生和迁移过程是多种组合转录因子精确激活或抑制性状决定基

因的结果^[4,5].

最近研究表明, 长非编码 RNA(long noncoding RNA, lncRNA)在基因表达调控中发挥重要作用. lncRNA 是一类长度大于 200 nt 的 RNA, 没有完整的可读框(open reading frame, ORF), 不编码蛋白质, 以 RNA 的形式发挥功能^[6,7]. 前期研究发现, lncRNA 可在不同水平调控基因的表达, 例如, 参与染色质的修饰和重塑^[8,9], 调控转录起始^[10]、mRNA 剪接、翻译^[11,12]及 mRNA 的稳定性^[13-16]等. 与编码基因相比, lncRNA 通常具有更为特异的时空表达谱^[17], 目前已

引用格式: 牟丽丽, 雷灿, 钟小灵, 等. 长非编码 RNA-*Tug1* 在大脑皮层发育过程中的初步研究. 中国科学: 生命科学, 2015, 45: 156-164

Mu L L, Lei C, Zhong X L, et al. Long non-coding RNA *Tug1* in cortical development of cerebrum. SCIENTIA SINICA Vitae, 2015, 45: 156-164, doi: 10.1360/N052014-00301

发现一些 lncRNA 在干细胞干性维持和分化、器官发育等过程中发挥重要功能, 如 *RMST* (rhabdomyosarcoma 2-associated transcript) 和 *TINCR* (terminal differentiation-induced ncRNA) 能够分别调控神经前体细胞和表皮前体细胞的分化, *Braveheart* 在中胚层向心脏方向分化的命运决定中起重要作用^[16,18,19]. 但目前尚不清楚 lncRNA 是否在大脑皮层发育过程中影响神经前体细胞的命运决定或神经元的分化和迁移过程.

长非编码 RNA-*Tug1* (taurine upregulated gene 1) 最早在体外培养的新生小鼠 (*Mus musculus*) 视网膜细胞中被发现, 是一个能够被剪接的, 具有多聚腺苷酸尾 (polyA) 的 lncRNA, 因其随着牛磺酸的加入而上调, 因此被称作 *Tug1*^[20]. 小鼠的 *Tug1* 有 3 个转录产物: *Tug1a*, *Tug1b* 和 *Tug1c*, 长度分别为 4726, 3233 和 6720 bp. 其中, *Tug1c* 是大多数组织中表达量最高的转录产物. *Tug1* 在视网膜和新生小鼠大脑皮层中均有表达. 在新生小鼠视网膜中敲低 *Tug1* 会导致感受器细胞外端发育畸形并使终末分化的视杆细胞减少, 视锥细胞增多, 同时会引起部分细胞的凋亡, 提示 *Tug1* 是视网膜前体细胞分化过程中所必需的^[21]. 另有研究表明, *Tug1* 可以和另外一个 lncRNA-*Neat2* 协同发挥作用, 调控生长控制基因的表达^[22]. 而在肿瘤细胞中, 过量表达 *Tug1* 能促进肿瘤细胞的增殖^[23,24]. 本研究通过组织原位杂交和 RT-qPCR 鉴定了 *Tug1* 在大脑皮层发育过程中的精细表达谱及表达量的变化; 应用小鼠子宫内电穿孔敲低 *Tug1*, 发现对神经前体细胞及其子代细胞的分布和构成无显著影响. 构建了针对特异识别 *Tug1* 基因转录起始位点 5' 邻近区域的 TALEN (transcription activator-like effector nuclease) 表达载体, 在 NIE-115 细胞中验证了该载体具有显著的切割活性. 后续实验计划应用 TALEN 介导的同源重组技术, 把 *LacZ* 和 polyA 信号片段转入 *Tug1* 基因转录起始位点 5' 邻近区域, 以构建 *Tug1* 失活小鼠, 研究其在大脑皮层发育过程中的作用, 并探索快速建立 lncRNA 敲除小鼠模型的途径.

1 材料与方法

1.1 RNA 提取和 RT-qPCR

TRIzol (Invitrogen, 美国) 提取总 RNA, 使用 FastQuant RT Kit (TIANGEN, 北京) 去除基因组 DNA,

并反转录 cDNA. 采用 Bio-Rad CFX connect™ 荧光定量 PCR 检测系统 (Bio-Rad, 美国) 和 iTaq™ Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, 美国) 进行实时定量分析.

1.2 地高辛标记的 RNA 探针制备

将 5 μg 质粒进行酶切, 待酶切完全后, 等体积酚氯仿进行抽提, 加入 1/10 体积 3 mol L⁻¹ NaAc (pH 5.2) 和 2.5 倍体积的无水乙醇, -20℃ 沉淀 1 h 以上. 18000×g 离心 10 min, 0.5 mL 70% 乙醇洗涤 DNA, 溶于 10 μL 焦碳酸二己酯 (diethyl pyrocarbonate, DEPC) 水. 取 1 μg DNA 进行体外转录. 转录试剂包括: 地高辛 (digoxin, DIG)-NTP (Roche, 瑞士), Ribonuclease Inhibitor (TaKaRa, 日本), SP6 转录酶 (Thermo, 美国).

1.3 组织原位杂交

第 1 天: 冰冻切片室温晾干后, 4% 多聚甲醛 (paraformaldehyde) 后固定 20 min, 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤 2 次, 使用 2 μg μL⁻¹ 蛋白酶 K (proteinase K, PK) 及 0.1 mol L⁻¹ 三乙醇胺 (triethanolamine, TEA) 各处理 10 min. PBS 洗涤 2 遍, 室温预杂交 3 h, 加入 RNA 探针 65℃ 孵育过夜. 第 2 天: 使用 0.2× 柠檬酸钠缓冲液 (saline sodium citrate, SSC) 65℃ 洗涤 4 次, 每次 20 min, 然后转移至室温洗涤 5 min, 随后加入 1 μg mL⁻¹ RNaseA (TaKaRa, 日本), 37℃ 消化 15 min. 经 10% 绵羊血清封闭 1 h 后, 加入抗地高辛抗体 (Roche, 瑞士) 4℃ 孵育过夜. 第 3 天: B1 洗涤 3 次, 每次 20 min, B3 平衡 10 min, 最后加入四唑硝基蓝 (tetranitroblue tetrazolium chloride, NBT/BCIP) 显色底物 (Roche, 瑞士) 显色 48~72 h.

1.4 TALEN 质粒构建

TALEN 质粒构建使用斯丹赛 FastTALE™ (上海) 试剂完成. 具体步骤按照试剂盒说明书进行. 选取正确的模块组合与 TALEN 骨架载体进行连接、转化, 挑取单克隆, 酶切正确后测序鉴定. 本研究选用小鼠打靶专用载体, 针对 *Tug1* 转录起始位点上序列, 构建左臂 3 个、右臂 2 个, 以保证获得高活性的 TALEN 质粒组合. 本研究所用引物及其序列见附表 1.

1.5 TALEN 质粒各组合的活性验证

根据脂质体 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, 美国)

说明书转染小鼠神经母细胞瘤细胞株 NIE-115, 24 h 后加入 $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ 嘌呤霉素进行筛选, 每隔 24 h 换液 1 次. 连续加药 3 天后, 收集存活细胞, 提取基因组并进行 PCR, 最后将 PCR 产物测序, 观察有无套峰, 套峰的高低显示 TALEN 质粒切割活性的强弱.

1.6 小鼠子宫内电穿孔

使用孕 13.5 天的 ICR 小鼠, 按小鼠体重 $14 \mu\text{L g}^{-1}$ 注射 0.7% 戊巴比妥钠进行麻醉. 剃除腹侧体毛并用 75% 酒精消毒. 打开腹腔暴露子宫, 吸取 1~2 μL 质粒混合液, 注射到胚鼠一侧脑室并进行电穿孔. 电穿孔条件为: 电压 33 V, 脉搏每循环 50 ms, 循环 5 次. 间隔注射以减少刺激, 电转完成后将子宫送回小鼠腹腔内并进行缝合. 3 天后取胚固定并进行切片染色.

1.7 免疫荧光染色

冰冻切片室温晾干, 刮掉组织外多余包埋剂, 使用橡胶水泥围住玻片周围. PBS 洗涤 3 次, 每次 7 min, 加入 3% 正常山羊血清 (Jackson, 多哥) 室温封闭 1 h 以上. 一抗 4°C 孵育过夜. Sox2 抗体 (Millipore, 美国) 按 1:1000 使用, Tuj1 抗体 (Sigma, 美国) 按 1:200 使用. 一抗孵育完成后 PBS 洗涤 3 次, 每次 10 min. 按 1:1000 加入二抗, 室温孵育 1 h. PBS 洗涤 3 次, 每次 10 min, 最后加入封片剂封片. 拍照在激光共聚焦显微镜 (FV1000, Olympus, 日本) 下进行, 以 10 倍物镜收集大小为 $1024 \text{ px} \times 1024 \text{ px}$, 分辨率为每英寸 72 px 的图像.

1.8 统计分析

切片染色后, 在荧光位置处将图片裁剪成宽 425 px、高 708 px 大小, 以 Tuj1 边界进行分区, 由脑室向外侧依次分为皮层板 (cortical plate, CP), 中间区 (intermediate zone, IZ), 脑室区和脑室上区 (ventricular zone/subventricular zone, VZ/SVZ). 数据以 $\bar{x} \pm \text{SD}$ 表示. 利用单尾不配对的学生 *t* 检验进行统计分析确定样品间的统计显著性. $P < 0.05$ 标记为*, $P < 0.01$ 标记为**, $P < 0.001$ 标记为***.

1.9 样品取材及 RNA-Seq 数据分析

解剖显微镜下切取胚胎期 10.5 和 12.5 天背侧前脑皮层, TRIzol 提取 RNA 并用 DNase I 进行消化, RNA 的完整性使用 Agilent Bioanalyzer 2100 (美国) 进

行分析, 最后 RNA-Seq 由 Illumina HiSeq 2000 (美国) 完成. 最终每个时期得到约 4 亿个 Reads. 测序得到的 Reads 使用 TopHat 比对到小鼠基因组 (mm9) 上, 参数为 “-p 6-phred 64-quals-segment-length 30-segment-mismatches 2-r 20-library-type fr-firststrand”. Reads 的组装由 Cufflinks 完成, 参数为 “-F 0.3-j 1-A 0-p 6”.

2 结果

2.1 长非编码 RNA-*Tug1* 的表达随着神经元的产生而显著上调

Tug1 有 3 个转录产物: *Tug1a*, *Tug1b* 和 *Tug1c*. 其中, *Tug1c* 是大多数组织中表达量最高的转录产物. 应用 phastCons 和 phyloP 方法发现 *Tug1* 序列在哺乳动物中具有较高的保守性 (图 1A). 综合分析本实验室和公共数据库中小鼠胚胎皮层的 RNA-seq 数据 (胚胎期 10.5, 12.5, 14.5, 17 天及成年皮层) 发现, *Tug1* 在大脑皮层发育过程中表达水平很高, 并且随着神经元的产生而显著上调 (图 1B), 而其在成年皮层中表达量很低, 提示 *Tug1* 很可能在皮层的神经元发生过程中发挥作用^[17,25,26]. 随后应用 RT-qPCR 验证 *Tug1* 在 4 个发育时期的相对表达量发现, 其表达模式与 RNA-seq 数据基本一致 (图 1C), 进一步证明 *Tug1* 在皮层发育过程中高量表达且随着神经元的产生而显著上调.

2.2 *Tug1* 在背侧前脑高表达

本研究随后通过组织原位杂交检测 *Tug1* 在各时期的表达模式. 首先, 与已报道结果一致, *Tug1* 在发育的视网膜中高表达 (图 2A). 同时在胚胎发育的几个关键时期, *Tug1* 在背侧前脑呈广泛均一分布, 其中在胚胎期 10.5 和 12.5 天, *Tug1* 在神经前体细胞中高表达; 胚胎期 14.5 及 16.5 天, *Tug1* 在神经前体细胞和神经元中均有表达, 其不仅定位于细胞核中, 细胞质中也有明显分布 (与最近报道的亚细胞组分 RNA 测序结果一致)^[27]. 这表明 *Tug1* 不仅能在细胞核内调控基因的表达^[22], 还可能参与调节 mRNA 翻译及其稳定性的过程.

2.3 敲低 *Tug1* 对大脑皮层发育无显著影响

研究发现, 在视网膜发育过程中敲低 *Tug1* 会导

图1 *Tug1* 在小鼠基因组的位置及其在皮层发育各时期表达量的变化

A: *Tug1* 在小鼠基因组 NCBI37/mm9 的位置及其转录本, 峰的高低表示保守性的强弱; B: RNA-seq 显示 *Tug1* 在小鼠皮层发育各时期的表达量及其变化; FPKM: fragments per kilobase of exon per million aligned fragments; C: RT-qPCR 检测 *Tug1* 在小鼠皮层发育各时期表达量的变化

图2 *Tug1* 在小鼠皮层发育中的表达谱

组织原位杂交显示 *Tug1* 在胚胎期 10.5, 12.5, 14.5, 16.5 天的表达模式

致光感受器细胞的外段发育畸形, 同时前体细胞的分化发生异常^[21]. 此研究是在发育的大脑皮层中敲低 *Tug1* 以探究其在神经前体细胞中是否发挥类似功能. 进行小鼠子宫内电穿孔实验前, 首先检测了 shRNA 的敲低效率. 将表达针对 *Tug1* 的 2 条 shRNA 质粒分别转染 NIE-115 细胞, 48 h 后 RT-qPCR 检测 *Tug1* 的相对表达量. 其中, shRNA1 能显著敲低 *Tug1* 的表达, 使其表达量下调为对照组的 30% 左右, 而 shRNA2 的敲低效率并不显著(图 3B), 故后续实验选用 shRNA1. 小鼠子宫内电穿孔实验使用孕 13.5 天的 ICR 小鼠, 经子宫向胚鼠脑室注射 pCI-mcherry 对照质粒或 *Tug1* shRNA1 和 pCI-mcherry 混合质粒后进行电穿孔, 3 天后取胚固定并进行切片染色(图 3A).

VZ/SVZ 区为神经前体细胞分布区域, IZ 区是神经元迁移所经区域, CP 区是神经元最终定位区域. 经计数和统计分析发现, *Tug1* 敲低胚胎的新生神经元在 VZ/SVZ, IZ, CP 区的分布与对照组相比没有显著性差异(图 4C), 提示敲低 *Tug1* 对神经前体细胞的分化或新生神经元的迁移无明显影响.

2.4 TALEN 质粒构建及活性验证

尽管通过小鼠子宫内电穿孔敲低 *Tug1* 对大脑皮层细胞的分布和构成无显著影响, 但这可能是由于敲低时间过短或者残存的 RNA 还能发挥功能造成的, 不能排除 *Tug1* 在皮层发育中发挥重要功能的可能性. 因此本研究试图通过敲除小鼠 *Tug1* 基因来回答这个

图3 敲低 *Tug1* 对小鼠大脑皮层发育的影响

A: 应用小鼠子宫内电穿孔敲低 *Tug1* 对大脑皮层发育的影响; B: RT-qPCR 检测 2 条 shRNA 的敲低效率, shRNA1 使 *Tug1* 的表达水平下调约 70%; C: 统计结果显示, 敲低 *Tug1* 对小鼠神经前体细胞的增殖或分化无显著影响. Sox2: 神经前体细胞标记物; Tuj1: 神经元标记物

问题. 本研究采用高效便捷的 TALEN 技术, 针对 *Tug1* 转录起始位点上游序列, 设计 TALEN 左臂 3 个, 右臂 2 个(图 4A). 首先, 在 NIE-115 细胞株中检测 TALEN 各组合的切割活性. 将 5 种组合的 TALEN 质粒分别和 pLKO.1-puro 质粒共转, 经 $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ 嘌呤霉素筛选 3 天后, 提取基因组并进行 PCR, 将 PCR 产物进行测序. 如图 4B 显示, 左臂 1 右臂 1(L1R1) 组合测序有套峰, 且套峰开始出现的位置在左臂和右臂之间, 证明该组合能准确有效地进行切割, 另一组合左臂 3 右臂 1(L3R1) 测序套峰更高, 显示出更高的切割效率(图 4C). 为了验证 TALEN 组合切割的效率, 将 L3R1 组合 PCR 产物连入 pGEM-Teasy 载体, 随机挑取 30 个单克隆进行测序. 经序列比对发现, 该组合能有效地对 DNA 双链进行切割, 造成一个或几个碱基的插入或缺失突变(图 4D), 切割效率为 17.8%(28 个 *Tug1* 基因组克隆中发现 5 个有突变).

2.5 TALEN 介导的 polyA 信号片段敲入

有研究显示, 如果在 *Malat1* 基因转录起始位点上游敲入 1~2 个 polyA 信号片段, 几乎能完全终止 *Malat1* 在培养细胞中的转录, 并使微量转录的

mRNA 快速降解, *Malat1* 的最终表达量下调为本底水平的 1% 或更低^[28]. 本研究在 *Tug1* 转录起始位点上游 52 bp 处设计 TALEN 识别位点(图 4A), 同时构建带有 *LacZ* 和 polyA 信号及 2 段同源臂的打靶载体, 以期通过这种 TALEN 介导的基因敲入, 既能终止 *Tug1* 表达, 又能通过 β -半乳糖苷酶组织化学染色观察 *Tug1* 在发育中小鼠的表达情况. 为鉴定 polyA 信号片段是否准确插入靶位点, 在 *Tug1* 左同源臂外侧设计探针, 用于后续 Southern blot 验证(图 5).

3 讨论

Tug1 在视网膜和新生小鼠大脑皮层中均有表达, 而且 *Tug1* 在小鼠视网膜前体细胞分化中是必需的, 敲低 *Tug1* 会使终末分化的视锥和视杆细胞比例发生明显变化, 并且能够和另一个 lncRNA-*Neat2* 协同调控生长控制基因的表达, 这均说明 *Tug1* 起重要的基因调控作用^[21,22]. 本研究进一步阐明 *Tug1* 在小鼠胚胎期大脑皮层中高量表达且广泛分布, 其表达量随着神经元的产生而显著上调. 然而在大脑皮层中应用小鼠子宫内电穿孔技术敲低 *Tug1* 后, 神经前体细

图 4 TALEN 质粒活性验证

A: *LacZ* 及 polyA 信号片段敲入到基因组位置, 红色碱基代表 TALEN 识别序列; B: TALEN 质粒 L1R1 PCR 测序套峰, 显示该组合具有一定的切割效率, 红线表示 TALEN 质粒 L1 的识别位置; C: TALEN 质粒 L3R1 PCR 测序套峰, 显示具有较高的切割效率, 红线表示 TALEN 质粒 L3 的识别位置; D: 测序比对显示 TALEN 质粒切割后会导致切割位点处发生一个或几个碱基的插入或缺失

图5 制作 polyA 信号片段敲入小鼠模式图

胞的增殖、分化以及新生神经元的迁移过程并无显著改变. 主要原因可能存在以下 3 种情况: (i) 瞬时敲低 *Tug1* 会引起某些代偿机制发挥作用; (ii) 由于敲低时间太短不足以观察到神经前体细胞增殖或分化的改变; (iii) *Tug1* 发挥功能并不需要很高的表达量, shRNA 敲低后残余的 *Tug1* 足以使皮层发育正常进行.

在近期一项研究中, 通过将 *Tug1* 部分基因组置换为 *LacZ* 以达到 *Tug1* 基因敲除目的, 该小鼠的生存率和生长发育过程不受影响, 也没有出现明显的神经系统结构缺陷, 但该研究并未进行脑切片染色、记忆和行为学等系统鉴定, 故不能排除 *Tug1* 在神经系统发育和功能中可能发挥一定的作用^[29]. 传统同源重组介导的敲除方法周期长, 费用高, 打靶效率低,

且 lncRNA 不能通过移码的方式使其失去活性. 所以本研究采用 TALEN 介导的基因敲入技术来实现失活 *Tug1* 的目的. 有报道在 A549 细胞系中, 在 *Malat1* 基因转录起始位点前敲入 1 或 2 段 polyA 信号片段可以基本终止其表达(*Malat1* 表达量下降为本底水平的 1% 以下), 实现细胞水平的敲除^[28]. 目前还没有应用该策略成功构建 lncRNA 基因敲除小鼠模型的报道, 但预测该方法能在小鼠水平达到同样的敲除效果. 本研究已成功构建特异针对 *Tug1* 的 TALEN 质粒及同源重组所需的打靶载体, 并已经验证了 TALEN 各组合的切割效率, 其中 L3R1 组合切割效率较高, 且切割位点与设计位点一致. 如果应用该方法能够成功建立 lncRNA 突变小鼠模型, 将会为 lncRNA 的研究提供新的理论和方法依据.

参考文献

- 1 Zhou Y. Cortical development and asymmetric cell divisions. *Front Biol*, 2012, 7: 297–306
- 2 Ramon Y, Cajal S. *Histology of the Nervous System of Man and Vertebrates*. New York: Oxford University Press, 1995
- 3 Belgard T G, Marques A C, Oliver P L, et al. A transcriptomic atlas of mouse neocortical layers. *Neuron*, 2011, 71: 605–616
- 4 Götz M, Huttner W B. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6: 777–788
- 5 Wang X, Tsai J W, Lamonica B, et al. A new subtype of progenitor cell in the mouse embryonic neocortex. *Nat Neurosci*, 2011, 14: 555–561
- 6 Batista P J, Chang H Y. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease. *Cell*, 2013, 152: 1298–1307
- 7 Bernstein E, Allis C D. RNA meets chromatin. *Genes Dev*, 2005, 19: 1635–1655
- 8 Li L, Liu B, Wapinski O L, et al. Targeted disruption of *Hotair* leads to homeotic transformation and gene derepression. *Cell Rep*, 2013, 5: 3–12
- 9 Sun S, Del Rosario B C, Szanto A, et al. Jpx RNA activates *Xist* by evicting CTCF. *Cell*, 2013, 153: 1537–1551
- 10 Latos P A, Pauler F M, Koerner M V, et al. *Airn* transcriptional overlap, but not its lncRNA products, induces imprinted *Igf2r* silencing. *Science*, 2012, 338: 1469–1472
- 11 Carrieri C, Cimatti L, Biagioli M, et al. Long non-coding antisense RNA controls *Uchl1* translation through an embedded SINEB2 repeat. *Nature*, 2012, 491: 454–457
- 12 Yoon J H, Abdelmohsen K, Srikantan S, et al. LincRNA-p21 suppresses target mRNA translation. *Mol Cell*, 2012, 47: 648–655

- 13 Kallen A N, Zhou X B, Xu J, et al. The imprinted H19 lncRNA antagonizes let-7 microRNAs. *Mol Cell*, 2013, 52: 101–112
- 14 Cesana M, Cacchiarelli D, Legnini I, et al. A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Cell*, 2011, 147: 358–369
- 15 Gong C, Maquat L E. lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3'UTRs via Alu elements. *Nature*, 2011, 470: 284–288
- 16 Kretz M, Siprashvili Z, Chu C, et al. Control of somatic tissue differentiation by the long non-coding RNA TINCR. *Nature*, 2013, 493: 231–235
- 17 Ramos A D, Diaz A, Nellore A, et al. Integration of genome-wide approaches identifies lncRNAs of adult neural stem cells and their progeny *in vivo*. *Cell Stem Cell*, 2013, 12: 616–628
- 18 Klattenhoff C A, Scheuermann J C, Surface L E, et al. Braveheart, a long noncoding RNA required for cardiovascular lineage commitment. *Cell*, 2013, 152: 570–583
- 19 Ng S Y, Bogu G K, Soh B S, et al. The long noncoding RNA *RMST* interacts with SOX2 to regulate neurogenesis. *Mol Cell*, 2013, 51: 349–359
- 20 Young T L, Cepko C L. A role for ligand-gated ion channels in rod photoreceptor development. *Neuron*, 2004, 41: 867–879
- 21 Young T L, Matsuda T, Cepko C L. The noncoding RNA *taurine upregulated gene 1* is required for differentiation of the murine retina. *Curr Biol*, 2005, 15: 501–512
- 22 Yang L, Lin C, Liu W, et al. ncRNA- and Pc2 methylation-dependent gene relocation between nuclear structures mediates gene activation programs. *Cell*, 2011, 147: 773–788
- 23 Zhang Q, Geng P L, Yin P, et al. Down-regulation of long non-coding RNA TUG1 inhibits osteosarcoma cell proliferation and promotes apoptosis. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14: 2311–2315
- 24 Han Y, Liu Y, Gui Y, et al. Long intergenic non-coding RNA TUG1 is overexpressed in urothelial carcinoma of the bladder. *J Surg Oncol*, 2013, 107: 555–559
- 25 Ayoub A E, Oh S, Xie Y, et al. Transcriptional programs in transient embryonic zones of the cerebral cortex defined by high-resolution mRNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 14950–14955
- 26 Dillman A A, Hauser D N, Gibbs J R, et al. mRNA expression, splicing and editing in the embryonic and adult mouse cerebral cortex. *Nat Neurosci*, 2013, 16: 499–506
- 27 Van Heesch S, Van Itersen M, Jacobi J, et al. Extensive localization of long noncoding RNAs to the cytosol and mono-and polyribosomal complexes. *Genome Biol*, 2014, 15: R6
- 28 Gutschner T, Baas M, Diederichs S. Noncoding RNA gene silencing through genomic integration of RNA destabilizing elements using zinc finger nucleases. *Genome Res*, 2011, 21: 1944–1954
- 29 Sauvageau M, Goff L A, Lodato S, et al. Multiple knockout mouse models reveal lincRNAs are required for life and brain development. *Elife*, 2013, 2: e01749

Long Non-Coding RNA *Tug1* in Cortical Development of Cerebrum

MU LiLi, LEI Can, ZHONG XiaoLing & ZHOU Yan

Department of Cellular Biology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China

The sophisticated circuitry of cerebral cortex (neocortex) is assembled from a diverse repertoire of neuronal subtypes and glia generated by neural progenitors. The fate specification of neocortical projection neurons are likely due to changes of sets of transcription factors in neural progenitor cells (NPCs). Recently, long non-coding RNAs (lncRNAs) are found to be crucial in many biological and pathological processes. However, little is known about how lncRNAs are involved in neocortical development. Here, we found lncRNA *Tug1* is expressed both in cortical neural progenitors and neurons using *in situ* hybridization and its expression level significantly increases as neurogenesis progresses. Knockdown of *Tug1* using *in utero* electroporation has no significant effect on NPC proliferation and neuronal differentiation. To elucidate detailed roles of *Tug1* in neocortical development, we constructed the transcription activator-like effector nuclease (TALEN) vectors that specifically target 5' to the transcription start site of *Tug1* and found they can efficiently generate indels in cultured mouse cells. We are currently making *Tug1* loss-of-function mouse model by inserting polyadenylation signals using TALEN-mediated homologous recombination, which may be an ideal strategy to inactivate lncRNA transcription in cellular and animal models.

lncRNA, *Tug1*, neural progenitor cell, TALEN knockin

doi: 10.1360/N052014-00301