

# 2021.8.27 与导师talk

---

## 研究背景与意义

---

### 【等位基因特异性表达】 Allele-specific expression (ASE)

等位基因特异性表达是指由于亲本基因组的调控序列的变化，在杂种中优先表达亲本等位基因的特性。由ASE引起的表达差异可能导致表型的变化，这取决于基因的功能。在哺乳动物中，ASE常常与X染色体和基因组印记以及非印记常染色体基因的表现遗传失活有关。

一些研究表明，ASE在异质性中起作用，因为遗传变异经常导致基因表达的差异，这可能导致表型的变化。RNA-sequencing (RNA-seq) 技术的发展使整个转录组的无偏见和高度可重复的深度测序成为可能。这使得单核苷酸多态性 (SNPs) 的检测成为可能，它可以用来区分父母的等位基因，并确定杂合子中显示ASE的基因。

Gaur U, Li K, Mei S, Liu G (2013) Research progress in allele-specific expression and its regulatory mechanisms. *J Appl Genet* 54:271–283.

Knight JC (2004) Allele-specific gene expression uncovered. *Trends Genet* 20:113–116.

Shao, Lin, et al. "Patterns of genome-wide allele-specific expression in hybrid rice and the implications on the genetic basis of heterosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116.12 (2019): 5653-5658.

## 研究背景与意义

---

### 【人类HLA基因座上的ASE动态调控效应】

研究者们用高深度 RNA-seq 研究了健康个体在记忆 CD4 + t 细胞激活过程中8个时间点的遗传调控效动力学，发现了广泛的、动态的等位基因在整个基因组中的特定表达，其中等位基因的平衡随着时间的推移而改变，而这些基因在自身免疫基因座中富集了四倍。此外，研究者在六个 HLA 基因中发现了普遍的动态调控效应。这项研究表明，顺式调节元件中的遗传变异影响基因表达的方式依赖于淋巴细胞活化状态，这会促进个体免疫反应的复杂性。

Gutierrez-Arcelus, Maria, et al. "Allele-specific expression changes dynamically during T cell activation in HLA and other autoimmune loci." *Nature genetics* 52.3 (2020): 247-253.

## 研究背景与意义

---

### 【肿瘤环境下免疫细胞与肿瘤细胞内的ASE动态调控效应】

人类白细胞抗原I类（HLA-I）基因对异常肽片段的有效呈现是免疫检测和杀死癌细胞的必要条件。已知患者的HLA-I基因型会影响癌症免疫疗法的疗效，HLA-I杂合度的体细胞丢失已被确定为免疫逃避的一个因素。

研究者们使用一种新方法从输入的RNA和全外显子组测序数据中量化了11种TCGA肿瘤类型的HLA-I等位基因特异性表达（ASE）。发现三个HLA-I基因中至少有一个基因的等位基因特异性丢失（ASE丢失）是普遍存在的，并与各肿瘤类型的总生存率降低有关，包括胰腺癌、前列腺癌和胶质母细胞瘤等等。此外，这项研究的分析表明，检测与受ASE损失的特定HLA-I基因有结合亲和力的新抗原是总生存率的首要预后指标。同时，研究者也发现，ASE缺失阻碍了免疫治疗。这些结果强调了HLA-I ASE在癌症中缺失的普遍性，并提供了其在癌症预后和免疫治疗中的临床应用意义的参考。

Filip, Ioan, et al. "HLA allele-specific expression loss in tumors can shorten survival and hinder immunotherapy." *medRxiv* (2020).

## 技术路线

### 预实验

使用当前已发表的杂交系小鼠亲本及子代转录组测序数据，利用生物信息学工具进行等位基因特异性表达分析，探索不同组织及器官中来源不同亲本的等位基因是否存在表达差异；通过VCF工具构建亲本基因组，探索特异性表达的等位基因是否具有亲本偏好；通过基因功能富集分析，查看基因富集的功能与基因座。

### 参考数据集

#### 【小鼠】

[GSE44555](#) [SRP056236](#) [GSE33722](#)

Crowley, J., Zhabotynsky, V., Sun, W. *et al.* Analyses of allele-specific gene expression in highly divergent mouse crosses identifies pervasive allelic imbalance. *Nat Genet* **47**, 353–360 (2015). <https://doi.org/10.1038/ng.3222>

[GSE109071](#) [aRME](#)

Naik, Hemant C., et al. "Semi-coordinated allelic-bursting shape dynamic random monoallelic expression in pregastrulation embryos." *bioRxiv* (2021): 2020-09.

#### 【人类】

[GSE140244](#) [dynamicAS](#)

Gutierrez-Arcelus, M., Baglaenko, Y., Arora, J. *et al.* Allele-specific expression changes dynamically during T cell activation in HLA and other autoimmune loci. *Nat Genet* **52**, 247–253 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41588-020-0579-4>

## 技术路线

## 未来实验计划

1. 获得转基因工程小鼠肿瘤模型，保种繁殖；并与其他非同品系的近交系小鼠交配，获得杂交系小鼠
2. 对亲本进行转录组深度测序，利用 VCF 工具将两近交系亲本特异的 SNPs 整合到 GRCm38(mm10) 参考基因组中，构建亲本基因组
3. 分别对子代肿瘤、DC细胞、T细胞及正常组织进行单细胞测序，同时追踪子代肿瘤进程获得动态sc-RNA数据集
4. 使用Seurat (version 3.1.5)进行 (t-SNE)分析和谱系特异性标记基因表达分析，对细胞进行分群
5. 以亲本基因组作为参考，对细胞分群后的scRNA-seq数据集进行等位基因特异性表达分析

使用公式= (母本/父本读数) ÷ (母本读数+父本读数) 单独计算每个基因的等位基因表达。

如果至少95%的等位基因读数只来自一个等位基因，则认为该基因为单等位基因。

6. 利用SCALE (Single-Cell Allelic Expression)进行等位基因特异的爆发动力学分析
7. 对特异性表达的等位基因进行基因功能富集分析

## 目的及预期结果

已知人类白细胞抗原I类 (HLA-I) 基因对异常肽片段的有效呈现是免疫检测和杀死癌细胞的必要条件，而肿瘤患者的HLA-I基因型会影响癌症免疫疗法的疗效，体细胞的HLA-I杂合度丢失已被确定为免疫逃避的一个因素。虽然在不同的肿瘤类型中已经报道了HLA-I的全局性表达失调，但HLA-I等位基因的特异性表达缺失（即特定HLA-I等位基因的优先RNA表达缺失）在癌症中的作用还没有被充分描述。

因此，本实验预期在小鼠肿瘤环境下，追踪肿瘤发展进程，对免疫细胞（DC细胞及T细胞）与肿瘤细胞进行 ASE 量化，对存在 ASE 现象的基因进行功能富集分析，主要关注小鼠 H-2 复合体基因座，探究该基因座上的 ASE 丢失现象及其在肿瘤进展中发挥的作用，旨在阐明 ASE 的动态调控效应。