

交替剪接对干细胞多能性维持与谱系分化的调控

刘欢 李杰 周跃*

(第三军医大学附属新桥医院骨科, 重庆 400037)

摘要 交替剪接是转录后修饰的一个重要过程, 它很好的解释了基因数量有限性和蛋白质多样性之间巨大差异的问题。交替剪接能够调控细胞的多种生物学行为, 比如增殖、分化和发育等, 而且与许多疾病的发生相关, 包括癌症。干细胞多能性维持和分化的研究大多集中在转录因子、染色质重塑和非编码RNA上, 交替剪接概念的引入为干细胞研究提供了一个新的视角。该文综述了干细胞交替剪接调控的最新研究, 首先简述了不同类型的干细胞(全能干细胞、多能干细胞和专能干细胞)中存在的交替剪接事件; 其次, 从四个方面阐述了交替剪接对干细胞多能性的调控; 最后, 系统地总结了干细胞向神经组织、肌肉组织、造血系统、脂肪组织和骨组织分化过程中发生的交替剪接事件。这些研究充分说明了未来干细胞领域的研究中, 交替剪接是不可或缺的一部分。

关键词 交替剪接; 干细胞; 全能性; 谱系分化

Regulation of Stem Cell Pluripotency Maintenance and Cell Lineage Differentiation by Alternative Splicing

Liu Huan, Li Jie, Zhou Yue*

(Department of Orthopedics, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract Alternative splicing is an important process of post-transcriptional modification. It provides a good explanation for the significant difference between the limited number of genes and the protein diversity. Several biological behaviors are regulated by alternative splicing, such as proliferation, differentiation and development. As well as, the occurrence of many diseases are related with alternative splicing, including cancer. The studies of stem cell pluripotency maintenance and cell lineage differentiation mostly focus on transcription factors, chromatin remodeling, and non-coding RNA. Alternative splicing provides a new sight for stem cell study. The text summarized newest researches on regulation of stem cell by alternative splicing. First alternative splicing events were existed in different kinds of stem cells, including totipotent stem cells, pluripotent stem cells and progenitor cells. Next, the regulation of stem cell by alternative splicing was elaborated from four aspects. Finally, the splicing events during cell lineage differentiation of stem cells were summed up, including neural progenitor differentiation, cardiac precursor differentiation, myogenic differentiation, adipocyte differentiation and bone differentiation. All of these studies suggested that alternative splicing might play key roles in stem cell research in the future.

Key words alternative splicing; stem cell; pluripotency; lineage differentiation

收稿日期: 2012-10-22 接受日期: 2012-11-15

国家自然科学基金(批准号: 81071498、81271982)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68755608, E-mail: happyzhou@vip.163.com

Received: October 22, 2012 Accepted: November 15, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81071498, 81271982)

* Corresponding author. Tel: +86-23-68755608, E-mail: happyzhou@vip.163.com

1 引言

交替剪接, 也被称为选择性剪接(alternative splicing, AS), 是转录后修饰的一个重要过程。交替剪接允许通过不同的剪接方式由同一个前mRNA产生多个成熟mRNA产物, 翻译后产生具有不同功能的蛋白质^[1]。到目前为止, 这一过程仍是基因数量有限性与蛋白质多样性之间巨大差异的最好解释。随着研究的不断深入, 大量的研究表明, 交替剪接不仅在细胞增殖、分化和发育过程中起重要作用, 而且与人类的许多疾病(包括癌症^[2-6])密切相关。胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC或ES cell)最显著的特点就是能够自我更新和分化成任意细胞系^[7], 这种分化特性具有很高的治疗价值, 也正因为如此, 胚胎干细胞被视为组织工程理想的种子细胞。目前, 关于胚胎干细胞生物学的研究大多着眼于能够介导其自我更新和全能性维持的转录因子上, 事实上, 交替剪接在干细胞生理调控方面也有着关键的作用。交替剪接为研究者们提供了一个新的视角来思考干细胞的全能性及其分化。

2 干细胞生物学相关的交替剪接事件

随着高通量技术的发展, 外显子芯片技术以及高通量测序等方法为我们研究不同样本间的交替剪接差异提供了可能。Lemischka等^[8]运用计算和实验分析结合的方法研究证实了交替剪接能够增加干细胞转录组的复杂性, 而且交替剪接在组织特异性基因中发生的频率要高于遍在基因。根据分化能力的不同, 干细胞可以分为全能干细胞, 多能干细胞和专

能干细胞(也被称为祖细胞), 不同类型的干细胞中都存在大量的交替剪接事件(表1)。

胚胎干细胞是典型的全能干细胞, 许多研究都直接或间接证实了其分化过程中存在大量的交替剪接事件。纤维母细胞生长因子4(fibroblast growth factor 4, FGF4)是一种早期分化的核心因子, 受转录因子Sox2和Oct-4形成的异质二聚体调控^[9-10]。Mayshar等^[11]的研究发现, FGF4和它的一种交替剪接变异体FGFsi在未分化和早期分化的人胚胎干细胞中表达, 而且, 它们的作用相反, 即FGF4促进未分化的胚胎干细胞生长, 而FGFsi亚型高效抑制这一过程。HDAC7是其中一种组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs), HDACs能够调控基因表达。Margariti等^[12]研究证实, HDAC7的表达和交替剪接与胚胎干细胞向平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)的分化有关, 即HDAC7的剪接促进ESC向SMC分化。CoAA(coactivator activator, CoAA)是一种对转录偶联的剪接有调控作用的共激活剂, 是剪接因子hnRNP家族的成员, 含有两个N-末端RNA识别基序和一个C-末端转录激活区域^[13-15]。Yang等^[16]的研究表明, *CoAA*基因在胚胎干细胞中有表达, 而且在多种组织中发生交替剪接产生三种剪接变异体, 即CoAA、CoAM和CoAR。

造血干细胞是一种多能干细胞, 可以分化为白细胞、红细胞、血小板等约12种细胞, 一系列的转录因子都对造血干细胞有核心调控作用, 其中就包括白血病相关转录因子(acute myeloid leukemia 1, AML1)^[17]。AML1基因转录产生两种剪接变异体

表1 不同类型干细胞内的交替剪接事件

Table 1 Alternative splicing events in different kinds of stem cells

干细胞类型 Type of stem cell	交替剪接事件 Alternative splicing events	功能 Function	参考文献 References
Totipotent stem cell	FGFsi	Suppress growth of undifferentiated ESC	[11]
	HDAC7 splicing isoforms	Promote differentiation from ESC to smooth muscle cell	[12]
	CoAA, CoAM, CoAR	Regulate differentiation of ESC	[16]
Pluripotent stem cell	AML1b, AML1c	AML1b exists only in undifferentiated hematopoietic cell	[18]
	c-myb splicing isoforms	Regulate development of hematopoietic stem cell	[24]
Progenitor cell	Sam68splicing regulation	Affect differentiation of neural progenitor cell	[25]
	Tnc splicing isoforms	Nervous system development and repair	[26-27]
	Numb (L) and Numb (S)	Numb (L) promote proliferation and suppress differentiation during central neurogenesis, Numb (S) suppress proliferation and promote differentiation during central neurogenesis	[28]

AML1b和AML1c,这两种亚型虽然来自于同一种基因,但在早期造血系统发育过程中表达不同,作用也不相同^[18]。c-myc是一种对造血细胞分化、增殖和功能有重要调控作用的基因^[19-20],研究发现,在人、小鼠和鸡的造血细胞中c-myc基因都存在因交替剪接产生的剪接变异体^[21-23]。O'Rourke等^[24]研究显示,人c-myc基因在造血细胞分化过程中通过交替剪接产生多种不同的转录产物,这些产物翻译产生的蛋白质具有不同的转录性能。这说明c-myc基因能够通过交替剪接编码表达一个蛋白质家族,该家族的成员蛋白具有不同的转录活性。交替剪接调控可能是c-myc转化作用机制的很好解释。

专能干细胞源于多能干细胞,是指具有定向分化能力的干细胞,比如神经前体细胞。Sam68是一种核RNA结合蛋白,参与mRNA代谢的多个过程,其核定位与它调控剪接的功能相匹配。Chawla等^[25]在研究中发现了一系列的外显子,它们的剪接都依赖于Sam68。特别是,在神经干细胞分化过程中Sam68表达改变将影响许多特异性的剪接事件。这些研究表明, Sam68作为一种RNA结合蛋白能够通过调节剪接或其他mRNA代谢过程影响神经的分化状态。腱生蛋白C(tenascin C, Tnc)是神经系统发育和修复过程中重要的细胞外基质组分,神经干细胞中存在总数约为20种不同的Tnc剪接变异体^[26-27]。进一步的研究发现,过表达Pax6能够以不同方式调节Tnc亚型的表达,然而在这过程中总的Tnc mRNA水平不发生变化^[27]。Numb基因在调控神经发育特别是神经干细胞的维持上发挥多种功能,它有4种剪接变异亚型,根据各剪接变异体结构中是否含有脯氨酸富集区域(proline-rich region, PRR)可将它们分为两类。Toriya等^[28]研究了两类Numb剪接变异体在神经干细胞中的功能,研究发现这两种不同类型的剪接亚型在神经形成的不同阶段发挥功能。

3 交替剪接与干细胞多能性维持

干细胞自身的多能特性和自我更新特性有助于胚胎早期发育的研究;另外,干细胞在组织修复和药物筛选方面也蕴含着巨大的潜力,给一系列疾病治疗带来了希望,为治疗学的发展带来了新的方向。参与基因表达的转录因子对干细胞多能性的维持和调控有重要作用,核心转录因子包括: Nanog、Oct-4和Sox2^[29-32]。核心转录因子之间协同作用形成一个

调控网络,维持自我更新相关因子的稳定表达和抑制促分化基因的表达。反之,体细胞诱导多能干细胞时,除核心转录因子外还需要c-myc和Lin28等因子的协同作用^[33-34]。将交替剪接的概念引入干细胞研究也是最近几年才开始的,关于交替剪接对干细胞多能性和自我更新维持方面的调控作用的研究才刚刚起步。

交替剪接对干细胞多能性的调控主要体现在以下几个方面。首先,核心转录因子自身能够发生交替剪接,存在剪接变异体。Oct-4是一种转录调节基因,参与干细胞多能性的维持和抑制分化相关基因的表达。目前,文献报道的Oct-4至少存在3种转录亚型,即: Oct-4A、Oct-4B和Oct-4B1^[35-36]。3种亚型的功能各不相同, Oct-4A能够调节干细胞的多能性,而Oct-4B没有这种功能, Oct-4B1是一种潜在的干性标志性基因,但它的功能还有待于进一步的研究^[37]。Wnt通路转录因子Tcf3不仅能够调节下游多种目的基因的表达,而且能够维持多能性。Tcf3有两种剪接亚型,长亚型Tcf3(l)和短亚型Tcf3(s)。Tcf3(l)的在胚胎干细胞中高表达,随着分化的进行表达降低,而Tcf3(s)表达水平相当。基因敲除结果显示, Tcf3(l)亚型对Oct-4和Nanog的影响比Tcf3(s)显著。除此之外,两种亚型作用的目标基因类别也有差异, Tcf3(s)主要影响分化标志性基因和组织特异性基因,而Tcf3(l)不影响谱系标志性基因的表达,主要阻碍心肌和神经标志性基因的表达^[38]。Sall4也是一种转录因子,对干细胞多能性的维持有重要作用,通过交替剪接可以产生2种变异亚型, Sall4a和Sall4b。这两种亚型之间可以形成二聚体和异质二聚体,与Nanog发生相互作用^[39-40]。在Rao等^[41]的研究中, Sall4a和Sall4b在胚胎干细胞基因组中的结合位点有重叠,但又不完全相同,它们之间协同作用调节干细胞多能状态的维持。Sall4基因敲除研究发现, Sall4b而不是Sall4a对干细胞多能状态的恢复有作用。

其次,核心转录因子直接调控交替剪接。Tung等^[42]研究了Sox2对交替剪接的调控作用。结果显示,转录因子Sox2对交替剪接的调节主要是通过与前mRNA直接结合改变剪切位点的选择来实现的,在这过程中Sox2的作用与剪接因子类似。关于胚胎干细胞的一项最新的研究也证实了Sox2对交替剪接的调控作用^[43]。原肌球蛋白相关激酶

基因(tropomyosin-related kinase, TRK)在胚胎干细胞中存在3种剪接亚型, 即TRKA、TRKB和TRKC。研究发现, Sox2对TRKC的表达有重要的调控作用, 如果敲除Sox2基因, TRKC的表达显著降低。该研究揭示了Sox2调节干细胞多形性状态维持的一种可能机制, 即调节TRK基因剪接亚型TRKC的表达^[43]。

第三, 与核心转录因子协同作用调节干细胞多能性维持的基因对剪接因子的表达有调控作用。Rauch等^[44]研究发现, c-myc能够直接刺激剪接因子hnRNP H的表达; 进一步的研究证实, c-myc可以通过调节剪接因子hnRNP H的表达水平调控A-Raf基因的交替剪接模式, 产生功能相反的两种剪接变异体。除此之外, David等^[45]研究还发现, 剪接因子hnRNP家族的其他成员, 比如hnRNP A1、hnRNP A2和hnRNP I的表达也受c-myc的调控。

第四, 干细胞中某些其他调控多能性的重要因子也发生交替剪接, 产生的剪接变异体, 并在多能性调控中发挥不同的功能。FOX转录因子调节许多参与细胞增殖、分化和发育相关的基因表达^[46]。FOXP1是FOXP亚家族的成员, 能够发生交替剪接, 其中一种高度保守的交替剪接变异体特异性的在胚胎干细胞中被激活, 在细胞分化过程中逐渐沉默, 这一过程被称为ESC-特异性剪接, 产生的剪接转录产物被称为ESC-特异性FOXP1剪接亚型。ESC-特异性FOXP1剪接亚型能够刺激多能性必需的转录因子的表达, 包括: Oct-4、Nanog、NR5A2和GDF3, 同时抑制分化所需基因的表达^[47]。这个结果说明, 该特异性剪接亚型能够促进干细胞多能性的维持, 有助于体细胞重编程诱导全能干细胞。这项研究也充分证明了交替剪接事件在调控干细胞多能性上的核心作用。

4 交替剪接与干细胞谱系分化

干细胞的交替剪接调控还体现在交替剪接对干细胞谱系分化的调控上。目前, 这方面的研究才刚刚起步, 还处在现象描述的阶段, 关于机制的研究很少。干细胞谱系分化过程中的交替剪接事件的研究可以分为两种类型。一类是高通量的基因组水平的研究, 另一类是低通量的单个或多个基因水平的研究。基因组水平的交替剪接事件检测主要是应用了外显子芯片技术和高通量测序技术^[48-50]。研究者们应用这些技术分析识别干细胞和分化细胞系间的

交替剪接差异。低通量的交替剪接调控研究通常是围绕干细胞分化过程中起关键作用的核心基因来进行的, 研究这些基因的剪接变异亚型在干细胞分化中的功能。

4.1 神经分化

神经祖细胞(neural progenitor cells, NPs)来源于胚胎干细胞, 能够分化成多种神经亚型。在Yeo等^[51]的研究中, 应用Affymetrix外显子芯片分析了ESCs和NPs之间的交替剪接差异。结果显示, 在该分化过程中有1 737个外显子发生了交替剪接, 这些外显子多具有丝氨酸/苏氨酸激酶和解旋酶活性。人Numb基因的两两剪接变异体, 含有长PRR区域的称为hNumb-PRRL, 在神经形成的早期表达, 能够促进神经上皮细胞和成神经细胞的增殖, 不影响分化; 含有短PRR区域的称为hNumb-PRRS, 在整个神经形成过程中均有表达, 抑制干细胞的增殖, 促进神经分化^[28]。

4.2 肌原性分化

Bland等^[52]以C2C12细胞为研究对象, 应用剪接敏感芯片研究了肌肉生成过程中的交替剪接事件和交替剪接改变。结果显示, 在肌肉分化过程中发生改变的交替剪接事件数量为95, 剪接改变主要发生在以下几个方面, 如骨架、肌动蛋白结合、细胞连接和核苷酸激酶, 特别是整合素信号通路组件。Margariti等^[53]研究了组蛋白脱乙酰酶(histone deacetylases, HDACs)对ESCs向平滑肌细胞分化的影响。研究发现, HDAC7在ESCs分化过程中发生交替剪接, 而且HDAC7的剪接能够促进ESCs向平滑肌细胞的分化, 这种促进作用主要是通过调节SRF-心肌蛋白复合物来实现的。

4.3 造血系统分化

为评估红细胞分化晚期的交替剪接事件, Yamamoto等^[54]应用Affymetrix外显子芯片检测了红细胞分化过程中特殊外显子表达的改变。发现了10种不同的剪接模式, 6种新的交替剪接开关和3种新的选择性外显子。这些结果说明, 交替剪接程序对红细胞分化非常重要。对造血系统形成有决定作用的基因AML1被两个不同的启动子调控产生AML1b和AML1c两种剪接亚型, AML1b在未分化的ESCs中表达, 在早期分化阶段表达上调; 与之相反, AML1c在胚胎形成过程中表达稳定。因此, 可以推测AML1的两种剪接变异体在造血系统分化过程中功能可能

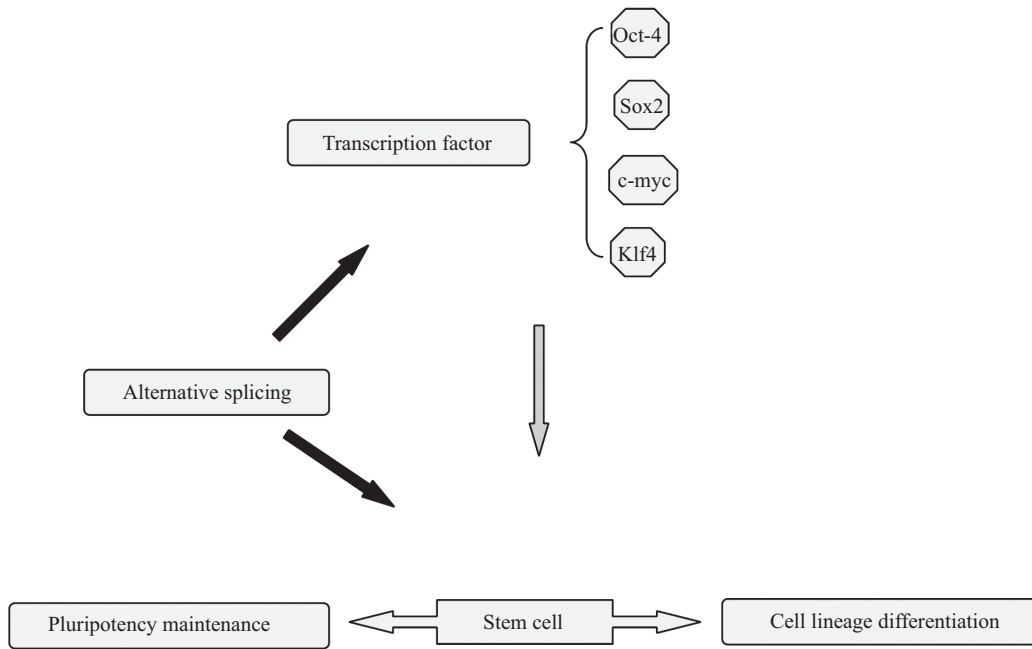


图1 交替剪接——干细胞多能性维持和谱系分化调控的新视角

Fig.1 Alternative splicing—a new sight of stem cell pluripotency maintenance and lineage differentiation

不同^[55]。

4.4 脂肪分化

在脂肪组织中许多基因都能够发生交替剪接, 比如PPAR γ 存在两种剪接变体, PPAR γ 1和PPAR γ 2, 它们包含有不同的N-末端氨基酸, 表达位置也不相同, PPAR γ 2只在脂肪组织中表达, 而PPAR γ 1在多种其他组织中也有表达。但是, 这两种剪接亚型都能够刺激脂肪的形成, 其中PPAR γ 2在低配合基浓度时作用效率更高^[56]。TIPs是典型的核受体共调节因子和染色质重塑激酶, 基因组比对结果显示, TIPs有3种剪接变体, TIP-1、TIP-2和TIP-3。功能分析显示, TIP-1促进肌肉生成, 而TIP-3刺激脂肪生成^[57]。

4.5 成骨分化

特异性转录因子Runx2参与成骨分化和骨的形成, 在人成骨细胞和人间充质干细胞中Runx2存在4种剪接变体。Makita等^[58]研究了向成骨分化过程中Runx2的四种剪接变异体的功能, 结果显示, 只有含有外显子5的剪接亚型才能够影响骨钙素的表达, 进而影响成骨分化。

5 展望

干细胞因其自身的卓越特性(多能性、自我更新及分化特性)成为再生医学和组织工程的宠儿, 深

入理解干细胞多能性维持和分化机制对以干细胞为基础的治疗学发展有重要意义。交替剪接的概念引入干细胞研究以后, 将干细胞的研究重点由核心转录因子、染色质重塑和非编码RNA对干细胞的调控特性研究引入到了交替剪接及其产生的剪接变体对干细胞的调控上, 使得干细胞的研究进入了一个全新的阶段——转录后修饰的水平(图1)。

图1简明扼要地描述了干细胞多能性维持和谱系分化研究的发展历程, 从最初的转录因子水平的研究逐步进入到了转录后修饰——交替剪接调控的层面。交替剪接对干细胞多能性维持和谱系分化的调控体现在两个方面, 一方面是通过调控核心转录因子来间接调控干细胞的多能性和分化; 另一方面, 交替剪接事件可以被视为调控干细胞多能性维持和谱系分化的开关, 直接调控干细胞的多能性和分化。交替剪接产生的不同类型的剪接变体可能具有不同的功能, 有的有助于多能性的维持, 有的有助于干细胞向不同方向分化。

前几年, 基因芯片技术在干细胞研究方向主要被用于比较分析干细胞和成体细胞间的基因表达差异, 忽略了干细胞分化的转录后调控, 外显子芯片技术的出现使得不同样本间的高通量的交替剪接转变研究成为可能。在未来干细胞研究的道路上, 干细胞的交替剪接调控及其机制研究将会称为一个热点。

参考文献 (References)

- 1 Blencowe BJ. Alternative Splicing: New insights from global analyses. *Cell* 2006; 126(1): 37-47.
- 2 Chen M, Zhang J, Manley JL. Turning on a fuel switch of cancer: hnRNP proteins regulate alternative splicing of pyruvate kinase mRNA. *Cancer Res* 2010; 70(22): 8977-80.
- 3 Suzuki H, Osaki K, Sano K, Alam AH, Nakamura Y, Ishiqaki Y, *et al.* Comprehensive analysis of alternative splicing and functionality in neuronal differentiation of P19 Cells. *PLoS One* 2011; 6(2): e16880.
- 4 Barberan-Soler S, Zahler AM. Alternative splicing regulation during *C. elegans* development: Splicing factors as regulated targets. *PLoS Genet* 2008; 4(2): e1000001.
- 5 David CJ, Manley JL. Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: Pathways and programs unhinged. *Genes Dev* 2010; 24(21): 2343-64.
- 6 Corrionero A, Minana B, Valcarcel J. Reduced fidelity of branch point recognition and alternative splicing induced by the anti-tumor drug spliceostatin A. *Genes Dev* 2011; 25(5): 445-59.
- 7 Evans MJ, Kaufman, MH. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292(5819): 154-6.
- 8 Lemischka IR, Pritsker M. Alternative splicing increases complexity of stem cell transcriptome. *Cell Cycle* 2006; 5(4): 347-51.
- 9 Yuan H, Corbi N, Basilico C, Dailey L. Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev* 1995; 9(21): 2635-45.
- 10 Ambrosetti DC, Basilico C, Dailey L. Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites. *Mol Cell Biol* 1997; 17(11): 6321-29.
- 11 Mayshar Y, Rom E, Chumakov I, Kronman A, Yayon A, Benvenisty N. Fibroblast growth factor 4 and its novel splice isoform have opposing effects on the maintenance of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells* 2008; 26(3): 767-74.
- 12 Margariti A, Xiao Q, Zampetaki A, Zhang Z, Li H, Martin D, *et al.* Splicing of HDAC7 modulates the SRF-myocardin complex during stem-cell differentiation towards smooth muscle cells. *J Cell Sci* 2009; 122(Pt 4): 460-70.
- 13 Fox AH, Lam YW, Leung AK, Lyon CE, Andersen J, Mann M, *et al.* Paraspeckles: A novel nuclear domain. *Curr Biol* 2002; 12(1): 13-25.
- 14 Andersen JS, Lyon CE, Fox AH, Leung AK, Lam YW, Steen H, *et al.* Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol* 2002; 12(1): 1-11.
- 15 Sui Y, Yang Z, Xiong S, Zhang L, Blanchard KL, Peiper SC, *et al.* Gene amplification and associated loss of 5' regulatory sequences of CoAA in human cancers. *Oncogene* 2007; 26(6): 822-35.
- 16 Yang Z, Sui Y, Xiong S, Liour SS, Phillips AC, Ko L. Switched alternative splicing of oncogene CoAA during embryonal carcinoma stem cell differentiation. *Nucleic Acids Res* 2007; 35(6): 1919-32.
- 17 Shivdasani RA, Orkin SH. The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood* 1996; 87(10): 4025-39.
- 18 Fujita Y, Nishimura M, Taniwaki M, Abe T, Okuda T. Identification of an alternatively spliced form of the mouse AML1/RUNX1 gene transcript AML1c and its expression in early hematopoietic development. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281(5): 1248-55.
- 19 Ness SA. The Myb oncoprotein: regulating a regulator. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1288(3): 123-39.
- 20 Ness SA. Myb binding proteins: regulators and cohorts in transformation. *Oncogene* 1999; 18(19): 3039-46.
- 21 Schuur ER, Rabinovich JM, Baluda MA. Distribution of alternatively spliced chicken c-myb exon 9A among hematopoietic tissues. *Oncogene* 1994; 9(11): 3363-65.
- 22 Shen-Ong GL, Skurla RM Jr, Owens JD, Mushinski JF. Alternative splicing of RNAs transcribed from the human c-myb gene. *Mol Cell Biol* 1990; 10(6): 2715-22.
- 23 Westin EH, Gorse KM, Clarke MF. Alternative splicing of the human c-myb gene. *Oncogene* 1990; 5(8): 1117-24.
- 24 O'Rourke JP, Ness SA. Alternative RNA splicing produces multiple forms of c-Myb with unique transcriptional activities. *Mol Cell Biol* 2008; 28(6): 2091-101.
- 25 Chawla G, Lin CH, Han A, Shiue L, Ares M Jr, Black DL. Sam68 regulates a set of alternatively spliced exons during neurogenesis. *Mol Cell Biol* 2009; 29(1): 201-13.
- 26 Joester A, Faissner A. The structure and function of tenascins in the nervous system. *Matrix Biol* 2001; 20(1): 13-22.
- 27 von Holst A, Eqbers U, Prochiantz A, Faissner A. Neural stem/progenitor cells express 20 tenascin C isoforms that are differentially regulated by Pax6. *J Biol Chem* 2007; 282(12): 9172-81.
- 28 Toriya M, Tokunaga A, Sawamoto K, Nakao K, Okano H. Distinct function of human numb isoforms revealed by misexpression in the neural stem cell lineage in the *Drosophila* larval brain. *Dev Neurosci* 2006; 28(1/2): 142-55.
- 29 van den Berg DL, Snoek T, Mullin NP, Yates A, Bezstarosti K, Demmers J, *et al.* An Oct4-centered protein interaction network in embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 6(4): 369-81.
- 30 Yang J, Gao C, Chai L, Ma Y. A novel SALL4/OCT4 transcriptional feedback network for pluripotency of embryonic stem cells. *PLoS One* 2010; 5(5): e10766.
- 31 Kidder BL, Yang J, Palmer S. Stat3 and c-Myc genome-wide promoter occupancy in embryonic stem cells. *PLoS One* 2008; 3(12): e3932.
- 32 Silva J, Nichols J, Theunissen T W, Guo G, van Oosten AL, Barrandon O, *et al.* Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* 2009; 138(4):722-37.
- 33 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663-76.
- 34 Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318(5858): 1917-20.
- 35 Takeda J, Seino S, Bell GI. Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues. *Nucleic Acids Res* 1992; 20(17): 4613-20.
- 36 Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA, Gokhale PJ, Andrews PW. OCT4

- spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells. *Stem Cells* 2008; 26(12): 3068-74.
- 37 Wang X, Dai J. Concise Review: Isoforms of OCT4 contribute to the confusing diversity in stem cell biology. *Stem cells* 2010; 28(5): 885-93.
- 38 Salomonis N, Schlieve CR, Pereira L, Wahlquist C, Colas A, Zamboni AC, *et al.* Alternative splicing regulates mouse embryonic stem cell pluripotency and differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(23): 10514-19.
- 39 Elling U, Klasen C, Eisenberger T, Anlag K, Treier M. Murine inner cell mass-derived lineages depend on Sall4 function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(44): 16319-24.
- 40 Zhang J, Tam WL, Tong GQ, Wu Q, Chan HY, Soh BS, *et al.* Sall4 modulates embryonic stem cell pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of Pou5f1. *Nat Cell Biol* 2006; 8(10): 1114-23.
- 41 Rao S, Zhen S, Roumiantsev S, McDonald LT, Yuan GC, Orkin SH. Differential role of Sall4 isoforms in embryonic stem cell pluripotency. *Mol Cell Biol* 2010; 30(22): 5364-80.
- 42 Tung CL, Hou PH, Kao YL, Huang YW, Shen CC, Cheng YH, *et al.* SOX2 modulates alternative splicing in transitional cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 393(3): 420-5.
- 43 Fong H, Wong RC, Donovan PJ. Transcriptional regulation of TRKC by SOX2 in human embryonic stem cells. *Stem Cell Res* 2012; 8(2): 206-14.
- 44 Rauch J, Moran-Jones K, Albrecht V, Schwarzl T, Hunter K, Gires O, *et al.* c-Myc regulates RNA splicing of the A-Raf kinase and its activation of the ERK pathway. *Cancer Res* 2011; 71(13): 4664-74.
- 45 David CJ, Chen M, Assanah M, Canoll P, Manley JL. HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature* 2009; 463(7279): 364-8.
- 46 Wijchers PJ, Burbach JP, Smidt MP. In control of biology: of mice, men and Foxes. *Biochem J* 2006; 397(2): 233-46.
- 47 Gabut M, Samavarchi-Tehrani P, Wang X, Slobodeniuc V, O'Hanlon D, Sung HK, *et al.* An alternative splicing switch regulates embryonic stem cell pluripotency and reprogramming. *Cell* 2011; 147(1): 132-46.
- 48 French PJ, Peeters J, Horsman S, Duijm E, Siccama I, van den Bent MJ, *et al.* Identification of differentially regulated splice variants and novel exons in glial brain tumors using exon expression arrays. *Cancer Res* 2007; 67(12): 5635-42.
- 49 Xing Y, Quyang Z, Kapur K, Scott MP, Wong WH. Assessing the conservation of mammalian gene expression using high-density exon arrays. *Mol Biol Evol* 2007; 24(6): 1283-5.
- 50 Kwan T, Benovoy D, Dias C, Gurd S, Provencher C, Beaulieu P, *et al.* Genome-wide analysis of transcript isoform variation in humans. *Nat Genet* 2008; 40(2): 225-31.
- 51 Yeo GW, Xu X, Liang TY, Muotri AR, Carson CT, Coufal NG, *et al.* Alternative splicing events identified in human embryonic stem cells and neural progenitors. *PLoS Comput Biol* 2007; 3(10): 1951-67.
- 52 Bland CS, Wang ET, Vu A, David MP, Castle JC, Johnson JM, *et al.* Global regulation of alternative splicing during myogenic differentiation. *Nucleic Acids Res* 2010; 38(21): 7651-64.
- 53 Margariti A, Xiao Q, Zampetaki A, Zhang Z, Li H, Martin D, *et al.* Splicing of HDAC7 modulates the SRF-myocardin complex during stem-cell differentiation towards smooth muscle cells. *J Cell Sci* 2009; 122(Pt 4): 460-70.
- 54 Yamamoto ML, Clark TA, Gee SL, Kang JA, Schweitaer AC, Wickrema A, *et al.* Alternative pre-mRNA splicing switches modulate gene expression in late erythropoiesis. *Blood* 2009; 113(14): 3363-70.
- 55 Fujita Y, Nishimura M, Taniwaki M, Abe T, Okuda T. Identification of an alternatively spliced form of the mouse AML1/RUNX1 gene transcript AML1c and its expression in early hematopoietic development. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281(5): 1248-55.
- 56 Huot MÉ, Vogel G, Zabaraukas A, Nqo CT, Coulombe-Huntington J, Majewski J, *et al.* The Sam68 STAR RNA-binding protein regulates mTOR alternative splicing during adipogenesis. *Mol Cell* 2012; 46(2): 187-99.
- 57 Jakkuraju S, Zhe X, Pan D, Choudhury R, Schuger L. TIPs are tension-responsive proteins involved in myogenic versus adipogenic differentiation. *Dev Cell* 2005; 9(1): 39-49.
- 58 Makita N, Suzuki M, Asami S, Takahata R, Kohzaki D, Kobayashi S, *et al.* Two of four alternatively spliced isoforms of RUNX2 control osteocalcin gene expression in human osteoblast cells. *Gene* 2008; 413(1-2): 8-17.