

# 报告正文

参照以下提纲撰写，要求内容翔实、清晰，层次分明，标题突出。  
请勿删除或改动下述提纲标题及括号中的文字。

## (一) 立项依据与研究内容 (4000-8000 字):

1. 项目的立项依据 (研究意义、国内外研究现状及发展动态分析，需结合科学研究发展趋势来论述科学意义；或结合国民经济和社会发展中迫切需要解决的关键科技问题来论述其应用前景。附主要参考文献目录)；

B 淋巴细胞参与适应性体液免疫，是机体产生抗体，中和细菌、真菌和病毒等有害物质侵染的主要免疫细胞<sup>[1]</sup>。B 细胞的发育与分化是一个动态而复杂的过程，已知 B 细胞的发育和成熟经历抗原依赖和非依赖两个阶段<sup>[2]</sup>。骨髓是哺乳类动物 B 淋巴细胞早期发育的主要场所。在骨髓内的发育不依赖于抗原，可经过造血干细胞 (Hematopoietic Stem Cell, HSC)、淋巴多能祖细胞 (Lymphatic Pluripotent Progenitor, LMPPs)、淋巴系祖细胞 (CLPs)、祖 B 细胞 (Pro-B)、前 B 细胞 (Pre-B) 和幼 B 细胞 (immature B) 等主要阶段<sup>[3]</sup>。幼 B 细胞从骨髓中迁移至外周淋巴组织，如脾脏和淋巴结，在生发中心经抗原刺激后快速增殖并分化为可分泌抗体的浆细胞和记忆性 B 细胞，由此完成 B 细胞成熟的抗原依赖阶段<sup>[4]</sup>。B 细胞的发育异常与自身免疫性疾病、白血病、骨髓瘤和淋巴瘤等重大疾病的发生密切相关<sup>[5-7]</sup>。

B 淋巴细胞的发育和成熟受到转录因子、非编码 RNA 和 RNA 结合蛋白的共同调控。Ikaros 是淋巴细胞发育的关键转录因子，PU.1 与 Ikaros 协同表达可决定淋巴系祖细胞 (CLPs) 的分化方向<sup>[8]</sup>。此外，B 细胞的分化还依赖于 E2A、EBF、FOXO1、PAX5、BCL6 和 BLIMP1 等转录因子，它们与染色质调控因子 SWI/SNF、PRC2 和 Mi-2/NuRD 等相互协同在表观遗传层面决定 B 细胞的逐步发育和分化<sup>[9, 10]</sup>。比如

研究发现, Pax5 敲除小鼠的胎肝和骨髓中早期 B 细胞的 Pre-B 阶段分化受到阻碍, 既不能进行 V-D-J 重排, 又不表达 mb-1、CD19、LEF-1 和 N-myc, 当重新导入 Pax5 基因时, 以上缺陷均得到部分的恢复<sup>[11]</sup>。近年来的研究发现非编码 RNA 在 B 细胞的发育中也起着重要的调控作用。如 miR-181 在淋巴系祖细胞 (CLPs)、miR-150 和 miR-17-92 基因组在祖 B 细胞 (Pro-B)、miR-34a 在前 B 细胞 (Pre-B) 和 miR-185 在幼 B 细胞 (immature B) 阶段发挥作用<sup>[12-14]</sup>。除此之外, 有少量研究报道 RNA 结合蛋白在 B 细胞发育中也起着关键的调节作用。如 hnRNPLL<sup>[15]</sup>通过调控可变剪接和 mRNA 的稳定性而影响浆细胞的分化成熟。HuR 通过调节 100 多个基因的剪接而决定 B 细胞在生发中心的存活<sup>[16]</sup>。RNA 结合蛋白 ZFP36L1 和 ZFP36L2 在祖 B 细胞 (Pro-B) 中的敲除会破坏前 B 细胞 (Pre-B) 的发育。研究表明 ZFP36L1 和 ZFP36L2 结合在 Cyclin D3 和 Cyclin E2 等细胞周期相关基因的 3'UTR 而抑制其表达, 进而调节祖 B 细胞 (pro-B) 的静息状态<sup>[17,18]</sup>。目前 RNA 结合蛋白对 B 细胞发育的转录后调控研究已有了初步进展, 但 RNA 结合蛋白如何在转录水平调控 B 细胞命运还不清楚。

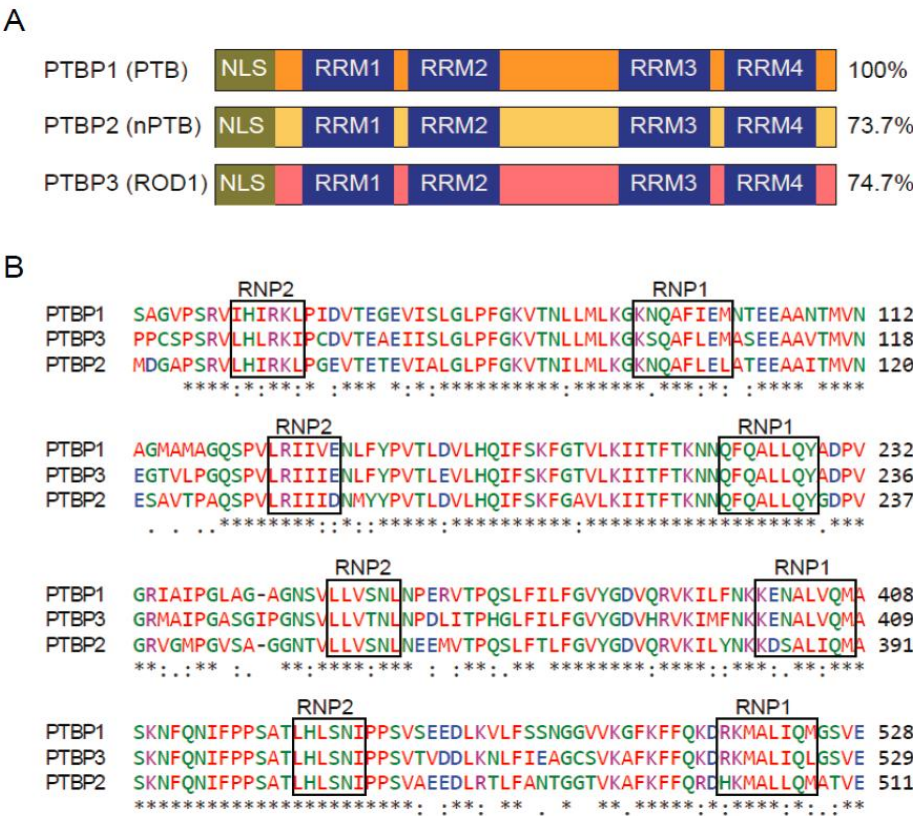
自 1984 年首次发现 RNA 结合蛋白结构域以来, 在过去的 30 年里整个领域对 RNA 结合蛋白的研究都集中在转录后调控, 比如研究其在 RNA 的剪接、转运、定位和翻译等方面的作用<sup>[19]</sup>。随着后基因组学时代的到来, 特别是高通量测序技术的发展, RNA 结合蛋白的转录调控以及非编码 RNA 的相关机制研究引起了人们越来越多的关注。近年的研究发现: 超过 90% 的人类基因组被转录, 产生了大量的非编码 RNA; 体外纯化的异染色质中 RNA 的含量是 DNA 的两倍, 反映了 RNA 在染色质结构和表观遗传建立中的关键作用<sup>[20]</sup>; 这两年的研究还发现大

量的 RNA 结合蛋白与染色质结合<sup>[21,22]</sup>。这些结果都提示 RNA 结合蛋白可能在转录和表观遗传调控中发挥重要作用，因此在 DNA 层面理解 RNA 结合蛋白如何调控转录和表观遗传已逐渐成为本领域的前沿课题。正是由于意识到了 RNA 结合蛋白的重要作用，美国 ENCODE 于 2014 年启动了 RNA 结合蛋白研究计划，目前我国在此方面的研究还没有系统的规划。

申请人所在实验室长期关注 RNA 结合蛋白在细胞命运决定中的作用，重点研究 RNA 结合蛋白 PTB 蛋白家族，该家族共有三个成员：PTBP1（也即 PTB）、PTBP2（也即 nPTB）和 PTBP3（也即 ROD1）。它们都有 4 个与 RNA 结合的 RRM 结构域，氨基酸序列有~74%的相似度（如下图一所示），但是功能却不相同，而且表达的组织特异性也不一样：PTBP1 在除神经元以外的其它细胞中表达；PTBP2 在刚分化的神经元中高表达，在成熟的神经元中低表达；PTBP3 已知在造血细胞中高表达，但是具体的功能机制不清<sup>[23]</sup>。我们在 RNA 结合蛋白 PTBP1 和 PTBP2 功能机制研究方面已取得了系列发现：（1）阐明了 PTBP1 调控可变剪接的规律，并发现 PTBP1 通过调节 PKM2 基因的可变剪接而将细胞的代谢途径从氧化磷酸化转变至糖酵解，因此回答了 PTBP1 过表达的致癌机理问题<sup>[24]</sup>。（2）发现 PTBP1 敲除可直接将鼠的成纤维细胞转分化至功能性的神经元，建立了细胞重编程的“减法策略”，并发现了 PTBP1 可增加或者抑制 miRNA 对靶位点识别的新功能<sup>[25]</sup>。（3）解析了 PTBP2 调节神经细胞成熟的信号通路，意外发现了 PTBP2 可通过结合在启动子区而抑制转录<sup>[26]</sup>。迄今为止，PTBP3 的功能与机制还不清楚。

1999 年 Okayama 研究组在裂殖酵母中筛选能够抑制 pat1-114 致

死型突变体的实验时意外的从大鼠和人的 cDNA 文库中鉴定到 PTBP3，当时命名为 ROD1 (Regulator of differentiation 1)。他们发现过表达 PTBP3 可抑制 K562 细胞的红系分化，但具体机理不明<sup>[27]</sup>。



图一：人类 PTB 蛋白家族的成员及其相似性。

PTB 蛋白家族有三个成员组成，它们都有四个 RRM 结构域和一个核定位信号。它们的氨基酸序列有~74%的相似度，其中方框标记的四个核心 RRM 结构域（由 RNP2 和 RNP1 组成）基本相同。

PTBP3 在裂殖酵母中的同源基因是 Nrd1，它在酵母中通过抑制 Set-11 调控的基因而影响有性生殖<sup>[28]</sup>。有意思的是 Nrd1 与 Nab3/Sen1 形成复合物可调控隐性不稳定转录本 (Cryptic unstable transcripts) 和反向 RNA 合成，此外 Nrd1 还可募集 RNA 外切体 (RNA exosome) 来降解其所结合的 RNA<sup>[29]</sup>。最新研究表明 Nrd1 可与 RNA 聚合酶 II 相互作用以调控酵母中绝大多数非编码 RNA 的转录终止<sup>[30]</sup>。作为 Nrd1 的同源基因，PTBP3 在 B 细胞发育分化过程中是否调控非编码 RNA 的生成、代谢和转录终止还不清楚，而且在造血系统中的组织特异性功

能也未知。

申请人前期的研究发现：(1) PTBP3 蛋白在小鼠骨髓、脾脏、淋巴结等免疫器官中富集，在 B 细胞中呈特异性高表达。大规模基因组测序显示 PTBP3 的点突变主要与炎症和免疫异常疾病相关。(2) 利用慢病毒 shRNA 体外敲降小鼠骨髓 B 淋巴细胞中 PTBP3 的表达，通过骨髓重建实验发现 PTBP3 敲降可导致骨髓 B 细胞总数量减少，其中 B 细胞发育停滞在 Pro/Pre-B 阶段。(3) 利用 CRISPR-Cas9 系统在小鼠中敲除 PTBP3 后，初步得到了骨髓 B 细胞总数量大幅减少的表型。(4) RNA-seq 数据初步分析发现，PTBP3 敲除后变化的基因绝大多数属于假基因和长非编码 RNA。基于以上研究结果，我们推测 **PTBP3 可能通过调节假基因和非编码 RNA 的转录或代谢而影响 B 细胞发育**。在此基础上，本项目旨在研究 PTBP3 在 B 细胞发育中的生理功能与作用机制，阐明 PTBP3 突变导致炎症和免疫异常的病理机制，为 B 细胞淋巴瘤及自身免疫性相关疾病的临床诊治提供理论基础和新的靶标。

### 主要参考文献：

1. Osmond DG. B cell development in the bone marrow. *Semin Immunol*. 1990; 2: 173-180.
2. Hardy RR, Carmack CE, Shinton SA. Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med*. 1991; 173(5):1213-1225.
3. Lu L, Smithson G, Kincade PW, Osmond DG. Two models of murine B lymphopoiesis: a correlation. *Eur J Immunol*. 1998; 28: 1755-1761.
4. Pearce EL, Poffenberger MC, Chang CH, Jones RG. Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science*. 2013; 342:1242-1245.
5. Ray A, Dittel BN. Mechanisms of Regulatory B cell Function in Autoimmune and Inflammatory Diseases beyond IL-10. *J Clin Med*. 2017;6(1). pii: E12.
6. Jones AP, Kermode AG, Lucas RM, Carroll WM, Nolan D, Hart PH. Circulating immune cells in multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol*. 2017; 187(2):193-203.
7. Martin P, Furman RR, Ruan J, Elstrom R, Barrientos J, Niesvizky R, Coleman M, Leonard JP. Novel and engineered anti-B-cell monoclonal antibodies for non-Hodgkin's lymphoma. *Semin Hematol*. 2008; 45 (2):126-132.
8. Macias-Garcia A, Heizmann B, Sellars M, Marchal P, Dali H, Pasquali JL, Muller S,

- Kastner P, Chan S. Ikaros Is a Negative Regulator of B1 Cell Development and Function. *J Biol Chem.* 2016; 291(17):9073-9086.
9. Mansson R, Welinder E, Åhsberg J, Lin YC, Benner C, Glass CK, Lucas JS, Sigvardsson M, Murre C. Positive intergenic feedback circuitry, involving EBF1 and FOXO1, orchestrates B-cell fate. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109(51):21028-21033.
  10. Wöhner M, Tagoh H, Bilic I, Jaritz M, Poliakova DK, Fischer M, Busslinger M. Molecular functions of the transcription factors E2A and E2-2 in controlling germinal center B cell and plasma cell development.
  11. Revilla-I-Domingo R, Bilic I, Vilagos B, Tagoh H, Ebert A, Tamir IM, Smeenk L, Trupke J, Sommer A, Jaritz M, Busslinger M. The B-cell identity factor Pax5 regulates distinct transcriptional programmes in early and late B lymphopoiesis. *EMBO J.* 2012; 31(14):3130-3146.
  12. Xiao C, Calado DP, Galler G, Thai TH, Patterson HC, Wang J, Rajewsky N, Bender TP, Rajewsky K. MiR-150 Controls B Cell Differentiation by Targeting the Transcription Factor c-Myb. *Cell.* 2016; 165 (4):1027.
  13. Mårtensson A, Argon Y, Melchers F, Dul JL, Mårtensson IL. Partial block in B lymphocyte development at the transition into the pre-B cell receptor stage in Vpre-B1-deficient mice. *Int Immunol.* 1999; 11(3):453-460.
  14. Belkaya S, Murray SE, Eitson JL, de la Morena MT, Forman JA, van Oers NS. Transgenic expression of microRNA-185 causes a developmental arrest of T cells by targeting multiple genes including Mzb1. *J Biol Chem.* 2013; 288(42):30752-30762.
  15. Chang X, Li B, Rao A. RNA-binding protein hnRNPLL regulates mRNA splicing and stability during B-cell to plasma-cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Apr 14;112(15):E1888-1897.
  16. Diaz-Muñoz MD, Bell SE, Fairfax K, Monzon-Casanova E, Cunningham AF, Gonzalez-Porta M, Andrews SR, Bunik VI, Zarnack K, Curk T, Heggermont WA, Heymans S, Gibson GE, Kontoyiannis DL, Ule J, Turner M. The RNA-binding protein HuR is essential for the B cell antibody response. *Nat Immunol.* 2015; 16(4):415-425.
  17. Galloway A, Saveliev A, Łukasiak S, Hodson DJ, Bolland D, Balmanno K, Ahlfors H, Monzón-Casanova E, Mannurita SC, Bell LS, Andrews S, Díaz-Muñoz MD, Cook SJ, Corcoran A, Turner M. RNA-binding proteins ZFP36L1 and ZFP36L2 promote cell quiescence. *Science.* 2016; 352(6284):453-459.
  18. Zekavati A, Nasir A, Alcaraz A, Aldrovandi M, Marsh P, Norton JD, Murphy JJ. Post-transcriptional regulation of BCL2 mRNA by the RNA-binding protein ZFP36L1 in malignant B cells. *PLoS One.* 2014; 9(7):e102625.
  19. Glisovic T, Bachorik JL, Yong J, Dreyfuss G. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett.* 2008; 582(14):1977-1986.
  20. Paul, J. and J.D. Duerksen. Chromatin-associated RNA content of heterochromatin and euchromatin. *Mol Cell Biochem.* 1975; 9(1): 9-16.
  21. Ji X, Dadon DB, Abraham BJ, Lee TI, Jaenisch R, Bradner JE, Young RA. Chromatin proteomic profiling reveals novel proteins associated with

- histone-marked genomic regions. *Proc Natl Acad Sci USA*.2015; 112(12): 3841-3846.
22. Vermeulen M, Eberl HC, Matarese F, Marks H, Denissov S, Butter F, Lee KK, Olsen JV, Hyman AA, Stunnenberg HG, Mann M. Quantitative interaction proteomics and genome-wide profiling of epigenetic histone marks and their readers. *Cell*.2010; 142(6):967-980.
  23. Keppetipola N, Sharma S, Li Q, Black DL. Neuronal regulation of pre-mRNA splicing by polypyrimidine tract binding proteins, PTBP1 and PTBP2. *Crit Rev Biochem Mol Biol*.2012; 47(4): 360-378.
  24. Xue Y, Zhou Y, Wu T, Zhu T, Ji X, Kwon YS, Zhang C, Yeo G, Black DL, Sun H, Fu XD, Zhang Y. Genome-wide analysis of PTB-RNA interactions reveals a strategy used by the general splicing repressor to modulate exon inclusion or skipping. *Mol Cell*. 2009; 36(6): 996-1006.
  25. Xue Y, Ouyang K, Huang J, Zhou Y, Ouyang H, Li H, Wang G, Wu Q, Wei C, Bi Y, Jiang L, Cai Z, Sun H, Zhang K, Zhang Y, Chen J, Fu XD. Direct conversion of fibroblasts to neurons by reprogramming PTB-regulated microRNA circuits. *Cell*.2013; 152(1-2): 82-96.
  26. Xue Y, Qian H, Hu J, Zhou B, Zhou Y, Hu X, Karakhanyan A, Pang Z, Fu XD. Sequential Regulatory Loops as Key Gatekeepers for Neuronal Reprogramming in Human Cell. *Nat Neurosci*. 2016; 19(6):807-815.
  27. Yamamoto H, Tsukahara K, Kanaoka Y, Jinno S, Okayama H. Isolation of a mammalian homologue of a fission yeast differentiation regulator. *Mol Cell Biol*, 1999; 19(5): 3829-3841.
  28. Tsukahara, K., H. Yamamoto, and H. Okayama, An RNA binding protein negatively controlling differentiation in fission yeast. *Mol Cell Biol*. 1998;18(8):4488-4498.
  29. Vasiljeva L, Buratowski S. Nrd1 interacts with the nuclear exosome for 3' processing of RNA polymerase II transcripts. *Mol Cell*. 2006; 21(2): 239-248.
  30. Schulz, D., et al., Transcriptome surveillance by selective termination of noncoding RNA synthesis. *Cell*, 2013. 155(5): 1075-1087.

## 2. 项目的研究内容、研究目标，以及拟解决的关键科学问题（此部分为重点阐述内容）；

### 研究内容：

PTBP3 自发现以来，其功能与机制的相关研究鲜有报道。申请人前期的研究发现 PTBP3 在 B 细胞中呈现特异性高表达，我们推测其可能在 B 细胞发育和谱系分化中发挥重要的调控作用。本项目将以 PTBP3 敲除小鼠为模型，细致分析 PTBP3 敲除对小鼠骨髓 B 细胞分化不同阶段的影响，鉴定 PTBP3 在骨髓 B 细胞分化过程中的直接作用



靶标，进一步通过 RNA-seq 挖掘与 PTBP3 敲除表型对应的分子事件，重点关注假基因和非编码 RNA，探讨 PTBP3 如何在转录水平调控非编码 RNA 和假基因而发挥正常的生理作用，以及 PTBP3 突变的病理机制。

具体研究内容分述如下：

### **(1) PTBP3 敲除后对骨髓 B 细胞发育分化的影响**

为了系统研究 PTBP3 对 B 细胞发育和分化的影响，申请人前期先利用慢病毒介导的 shRNA 敲降 PTBP3，意外发现敲降 PTBP3 导致骨髓 B 细胞总数量减少，且 B 细胞发育停滞在 Pro/Pre-B 阶段。近期，申请人利用 CRISPR-Cas9 技术得到了全身敲除小鼠，发现 PTBP3 敲除导致骨髓 B 细胞总的数量减少，对 B 细胞各发育阶段的细致分析将在本项目中进行。与此同时，我们也正在构建 PTBP3 (f/f) 转基因小鼠，下一步计划利用 Mb1-Cre 和 CD19-Cre 在 Pro-B 和 Pre-B 阶段特异敲除 PTBP3，进而确定 PTBP3 对 B 细胞发育和分化的影响。

### **(2) PTBP3 调控 B 细胞发育的生理机制研究**

申请人将从两个方面来探索 PTBP3 调控 B 细胞发育的生理机制。

首先，利用 PTBP3 特异性抗体在特定发育阶段的 B 细胞中进行免疫沉淀和质谱分析，从其相互作用蛋白方面尝试鉴定调控转录的新型蛋白质复合体机器，并回答相关作用机制。

其次，利用 PTBP3 特异性抗体进行 CLIP-seq 实验，鉴定 PTBP3 在特定 B 细胞内的直接结合靶标和作用位置。利用检测新生 RNA 的 GRO-seq 技术分析 PTBP3 对转录的影响。结合 RNA-seq 转录组测序，获得 PTBP3 的作用规律和图谱，深度解析 PTBP3 敲除导致 B 细胞发育停滞的可能分子事件，包括假基因和 lncRNA 在其中的功能机制，进而在体内利用骨髓重建实验加以验证。



### **(3) 阐释 PTBP3 突变的可能病理机制**

我们前期通过分析千人基因组测序数据发现 PTBP3 突变主要与炎症和免疫异常疾病相关。在本项目中将根据 PTBP3 突变的位置，从 PTBP3 的相互作用蛋白和体内作用靶标两个方面细致分析其致病机理。对于相互作用的蛋白来说，我们将分析突变如何影响它们与 PTBP3 的相互作用。对体内作用靶标方面，将分析突变对 PTBP3 与靶标 RNA 亲和力的影响。最后，我们将在白血病，淋巴瘤等患者样本中对 PTBP3 突变及其可能相互作用蛋白等作用机制进行功能验证。

#### **研究目标：**

**目标一：**通过构建 PTBP3 全身和骨髓 B 细胞阶段特异性敲除小鼠，阐明 PTBP3 在骨髓 B 细胞分化中的生理功能和相关机制。

**目标二：**全面解析 PTBP3 在骨髓 B 细胞命运决定以及谱系分化中调控的关键分子，探索其在假基因和非编码 RNA 转录和染色质修饰方面的潜在作用机制。

**目标三：**阐明 PTBP3 调控的关键分子事件，分析 PTBP3 突变的病理机制及其在淋巴细胞白血病、淋巴瘤和自身免疫病中的临床意义。

#### **拟解决的关键科学问题：**

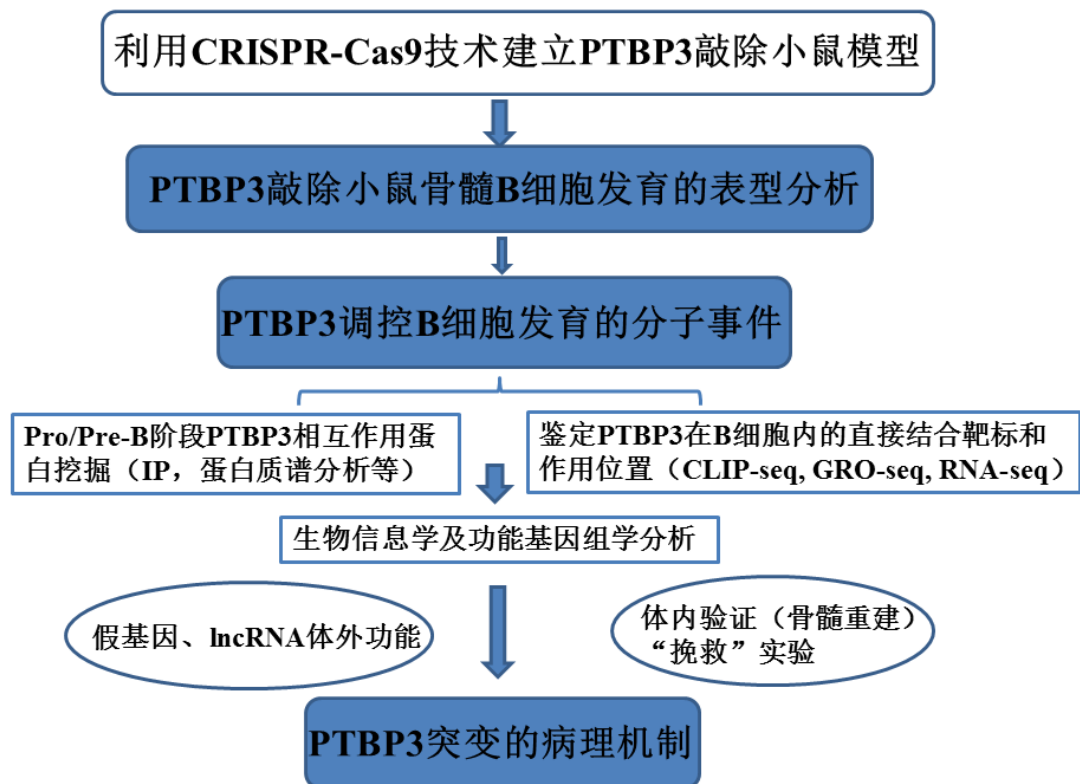
(1) 首要的关键问题是阐释 RNA 结合蛋白 PTBP3 在 B 细胞发育和谱系决定中的功能与机制。我们将利用 CRISPR-Cas9 敲除小鼠详细分析 PTBP3 在 B 细胞发育分化中的作用，在此基础上结合转录组测序及生物信息学分析等手段进行相关机制的研究。这将有助于我们对 RNA 结合蛋白 PTBP3 在 B 细胞谱系决定中作用的深度解析。

(2) 过去的研究主要侧重 RNA 结合蛋白的转录后调控，但是 RNA 结合蛋白如何在转录水平发挥作用而决定细胞分化依然是个空白。我们前期的研究发现 PTBP3 调节的基因主要是长非编码 RNA 和假基因。

我们将从转录的角度分析RNA结合蛋白如何调控长非编码RNA功能，并阐释假基因的作用和调控等未解之谜。

### 3. 拟采取的研究方案及可行性分析（包括研究方法、技术路线、实验手段、关键技术等说明）；

拟采取的研究方案见下图：



研究方法：

#### （一）研究 PTBP3 对骨髓 B 细胞发育分化的影响

##### 1. PTBP3 敲除小鼠的构建和表型分析

- （1）利用 CRISPR-Cas9 技术构建 PTBP3 全身敲除小鼠；
- （2）利用 Cre-LoxP 技术构建 PTBP3 条件性敲除小鼠，获得 PTBP3 (f/f) 转基因小鼠；
- （3）免疫磁珠法分离获得 PTBP3 敲除小鼠骨髓的不同发育阶段 B

细胞，利用流式细胞技术分析 PTBP3 敲除对 B 细胞发育和分化的影响，明确其不同分化阶段的比例和变化异常。

(4) 免疫印迹和流式细胞分选等方法分析 PTBP3 在 B 细胞发育不同阶段的表达。利用 DNA 测序确定 PTBP3 突变的位点和基因型。

## 2. PTBP3 对小鼠骨髓造血干细胞向 B 细胞分化的影响

(1) 体外分离小鼠骨髓造血干细胞，建立诱导分化 B 淋巴细胞体外培养体系；

(2) 利用慢病毒感染小鼠造血干细胞敲降 PTBP3 的表达，体外验证敲降效率；

(3) 选用细胞免疫荧光、实时定量 PCR 及流式细胞仪检测等方法分析骨髓造血干细胞向 B 淋巴细胞分化过程中，PTBP3 对不同发育阶段 B 细胞的影响。

## (二) 探讨 PTBP3 调控 B 细胞发育的可能分子事件

1. 利用 PTBP3 的 CRISPR-Cas9 敲除小鼠，分离纯合型、杂合型以及野生型的骨髓 B 淋巴细胞，通过转录组测序，结合生物信息学分析，鉴定 PTBP3 调控的差异表达基因，并详细 PTBP3 如何影响其中的非编码 RNA 和假基因表达，结合可检测新生 RNA 的 GRO-seq 和经典的 ChIP-seq 技术，分析 PTBP3 如何影响转录。

2. 利用流式细胞仪分选得到 Pre-B 和 Pro-B 等不同分化阶段 B 细胞，用特异性 PTBP3 抗体进行免疫共沉淀和质谱分析等实验，分析 PTBP3 的体内相互作用蛋白。

3. 利用 CLIP-seq 鉴定 RNA 结合蛋白 PTBP3 的体内作用靶标和结合位置。结合表达谱数据推导 PTBP3 在 B 细胞分化和谱系命运决定中的调控环路及可能作用机制。

4. 利用全身和 PTBP3 阶段特异性敲除小鼠模型与体外 B 淋巴细胞分化模型，结合 shRNA 敲降对非编码 RNA 和假基因进行体外和体内

两方面的功能验证及机制初探。

5. 利用 CRISPR-Cas9、CRISPRi 和 shRNA 等技术结合骨髓重建模型，将关键分子环路中的非编码 RNA 和假基因进行敲除/敲降，然后移植入骨髓，8-10 周后分析其对 B 细胞发育和分化的影响。

### **(三) 阐释 PTBP3 突变位点与免疫相关疾病的关联**

1. 结合实验室前期已经收集的免疫缺陷相关疾病患者的血液样本，进行外显子测序、SNP 检测等分析，进一步研究发现的 PTBP3 突变位点与疾病发生的关联性。

2. 对于相互作用蛋白来说，将纯化 PTBP3 的各种突变体蛋白，进行体外 pull-down 等实验，以确定突变体是否影响了 PTBP3 蛋白复合体的形成。

3. 在体内方面，尝试利用 CRISPR-Cas9 构建点突变敲入小鼠和细胞体系模型，结合免疫病理学方法对 PTBP3 敲入小鼠进行表型分析。并利用 CLIP-seq 和 RIP-qPCR 等方法验证突变对关键 RNA 分子亲和力的影响。此外，从临床样本中分析 PTBP3 突变与白血病和淋巴瘤发生等的关系。

### **主要实验手段和关键技术：**

#### **1. 利用 CRISPR-Cas9 和 Cre-LoxP 技术建立 PTBP3 敲除小鼠模型**

CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)，被称为规律成簇间隔短回文重复，是一种基因编辑器。该技术与以往的技术不同，是利用靶点特异性的 RNA 将 Cas9 核酸酶带到基因组上的具体靶点，从而对特定基因位点进行切割导致突变。该技术已经迅速被运用到基因敲除小鼠和大鼠等动物模型的构建之中。

申请人所在实验室前期已通过与中国科学院上海生化与细胞所的李劲

松研究员合作,利用 CRISPR-Cas9 技术设计 PTBP3 相关 gRNA,利用精原干细胞系分别构建了 PTBP3 敲除细胞系,通过假孕小鼠的胚胎移植,已经初步得到了 PTBP3 敲除小鼠的 F0 代,正在进行家系繁殖。同时,在 PTBP3 双端 flox 的基础上利用 Mb1-Cre 和 CD19-Cre 杂交分别构建 Pre-B 和 Pro-B 细胞阶段特异性敲除的转基因小鼠,分析 PTBP3 对 B 细胞发育的影响。

## **2. PTBP3 慢病毒干扰系统的构建与筛选**

为了系统研究 PTBP3 在 B 细胞发育与分化中的作用,我们构建了分别针对人和小鼠 PTBP3 的慢病毒 shRNA 干扰载体,并筛选到了可高效降低 PTBP3 表达水平的靶序列。这为下一步进行小鼠骨髓重建实验以验证 PTBP3 在 B 细胞发育和成熟过程中的作用打下了基础。

## **3. 免疫共沉淀、CLIP-seq、GRO-seq 和质谱分析等技术**

CLIP-seq、GRO-seq、ChIP-seq 和 RNA-seq 等高通量测序方法是申请人所在实验室常用的检测 RNA 结合蛋白作用靶标、分析转录及研究蛋白与 RNA 相互作用的常用手段。

## **4. 骨髓重建实验及免疫细胞与功能相关分析**

在慢病毒 shRNA 体外敲降 PTBP3 系统建立的基础上,我们已初步构建了小鼠骨髓重建模型。首先利用钴源  $\gamma$  射线破坏出生 4 周左右的小鼠骨髓系统,然后用慢病毒感染的不同品系来源的骨髓细胞按照 1:1 的比例移植进入照射后的小鼠,4 到 8 周后分析 B 细胞发育和分化的变化。同时,本项目中将用市售的免疫磁珠 B 淋巴细胞分离试剂盒获得 B 淋巴细胞;免疫细胞功能检测用到的流式细胞仪分析,细胞免疫荧光分析的激光共聚焦法等均是申请者所在实验室常用的实验技术手段。

### **可行性分析:**

(1) **扎实的理论和工作基础:** 本课题假设是依据文献的大量阅读和前期研究发现所提出的。申请人依托课题组及中科院生物物理研

究所感染与免疫国家重点实验室的雄厚基础,在 RNA 结合蛋白相关 B 细胞功能与研究方面已经取得了一定的进展。同时,所在研究组长期致力于 RNA 结合蛋白在细胞分化命运决定的相关研究,PTB 家族是重点关注的研究对象,课题组对此家族的研究工作近期分别发表在 *Cell* 和 *Nature Neuroscience* 杂志。本项目基于这些理论经验和研究成果,靶定 RNA 结合蛋白领域前沿和关键科学问题,有望在非编码 RNA 和转录调控方面取得创新性成果。

**(2) 优秀的科研平台:** 申请人所在研究组在功能基因组学研究方面有多达 10 年的科研积累,可熟练进行 RNA-seq、CLIP-seq、GRO-seq 和 ChIP-seq 等文库构建与测序,申请人所在课题组长是中科院生物物理研究所高通量测序平台负责人,同时在生物信息学相关分析方面具有丰富的经验。这些科研平台保证了本项目中相关高通量建库,测序及分析工作的顺利开展。

**(3) 全面的实验技术:** 项目依托的研究组在 CRISPR-Cas9 介导的基因编辑方面已经积累了丰富的经验,可熟练进行基因编辑。在转基因小鼠的构建方面,通过前期与合作单位的学习,独立建立了孤雄单倍体干细胞的培养与胚胎培养等操作体系,在此细胞已经上进行 CRISPR-Cas9 敲除和敲入操作,初步得到了 PTBP3 敲除小鼠 F0 代。这些本项目中模型构建的关键技术体系为整个项目实施和深入研究搭建了稳固平台。

**(4) 相关的研究背景:** 申请人曾长期进行干细胞与造血系统分化,胚胎发育表观遗传调控等方面的研究,在慢病毒介导的敲降及表达系统建立,转基因小鼠模型的构建,小鼠发育和病理表型分析,非编码 RNA (miRNA 等) 功能研究等相关技术和理论方面具有丰富的经验,发表了数篇研究论文。同时,申请人具有血液科临床医生的经历,在淋巴瘤、白血病等造血系统和免疫相关疾病方面具有一定的实践和理论基础,有助于深入挖掘 PTBP3 在相关淋巴瘤及免疫疾病的病理机制的挖掘。

以上各方面条件保障了本项目的开展和实施的可行性。

#### 4. 本项目的特色与创新之处

本项目重点关注组织特异性 RNA 结合蛋白在造血系统淋巴细胞命运决定中的作用，聚焦其调节的非编码 RNA 生成与代谢，分析假基因在 B 淋巴细胞增殖和谱系分化中的功能。我们以 **RNA 结合蛋白 PTBP3** 为切入点，重点解决 **PTBP3** 在转录调控中的组织特异性作用机制，将为造血与免疫细胞分化发育的相关研究提供新的证据。有望发现 PTBP3 新的组织特异性功能机制，挖掘出其相互作用蛋白和调控的非编码 RNA 等分子事件，为淋巴瘤及自身免疫疾病的病理研究提供新的理论依据和治疗靶标。

## 5. 年度研究计划及预期研究结果（包括拟组织的重要学术交流活动、国际合作与交流计划等）。

### 年度研究计划：

第一年度（2018.1-2018.12） 利用 CRISPR-Cas9 技术构建 PTBP3 阶段特异性敲除小鼠，确定 PTBP3 在骨髓 B 细胞发育和分化中的表型，完成 PTBP3 在特定阶段 B 细胞中的 RNA-seq、GRO-seq 和 CLIP-seq 文库构建及生物信息学分析。

第二年度（2018.1-2018.12） 免疫共沉淀和质谱方法鉴定 PTBP3 在 B 细胞中的相互作用蛋白质复合物，分析其在转录中的调控作用。在正常和敲除 PTBP3 的小鼠骨髓 B 细胞中利用 ChIP-seq 分析其结合靶标及定位情况，解析 RNA 结合蛋白 PTBP3 调控转录的分子机制，探究其在 B 细胞分化发育中的作用。

第三年度（2019.1-2019.12） 完成 PTBP3 关键分子事件的鉴定，靶定 PTBP3 的关键相互作用蛋白及非编码 RNA 分子，进一步阐明 PTBP3 在转录、非编码 RNA 代谢和假基因调控中的作用。整理数据，阐明 PTBP3 在 B 细胞发育中的生理功能及调控机制，撰写论文并投稿。

第四年度（2020.1-2021.12） 在前三年的基础上，利用体内模型和



骨髓重建实验等方法深度分析 PTBP3 如何通过调控假基因而在 B 细胞发育中发挥作用，结合基因组突变数据和临床材料，阐明 PTBP3 突变的致病机理。同时整理相关数据，撰写论文。

预期研究成果：

本研究成果将主要以研究论文的形式体现，预计在高水平 SCI 期刊上发表科研论文 2-3 篇，其中 IF>10 的论文 1 篇。培养博士研究生 2 名，硕士生 2 名。

## **(二) 研究基础与工作条件**

**1. 研究基础（与本项目相关的研究工作积累和已取得的研究工作成绩）：**

通过前期研究，我们已获得了部分结果：

### **(1) PTBP3 在 B 细胞中特异高表达与免疫异常疾病关联**

我们首先检测了 PTBP3 蛋白在 8 周成年雄鼠各组织器官中的表达。图 2A 所示为 Western blot 结果，PTBP3 蛋白在小鼠骨髓、脾脏、淋巴结等免疫器官中显著富集。进一步通过流式细胞分析发现：PTBP3 在 B 细胞中呈特异性高表达，表达水平明显高于树突状细胞（Dendritic cells, DC），中性粒细胞和自然杀伤细胞（Natural Killer, NK）以及 T 细胞等其它不同类型的免疫细胞。为了初步探讨 PTBP3 对 B 细胞发育的影响，我们又利用流式细胞仪鉴定了体外不同发育阶段的 B 细胞中 PTBP3 的表达，结果显示 PTBP3 在 Pre-B 和 Pro-B 阶段的表达水平最高（图 2 B, C）。另外，千人基因组测序发现了大量的 SNP 位点，与疾病相关性预测分析结果证实，PTBP3 点突变大多与炎症和免疫异常疾病相关联（图 2D）。

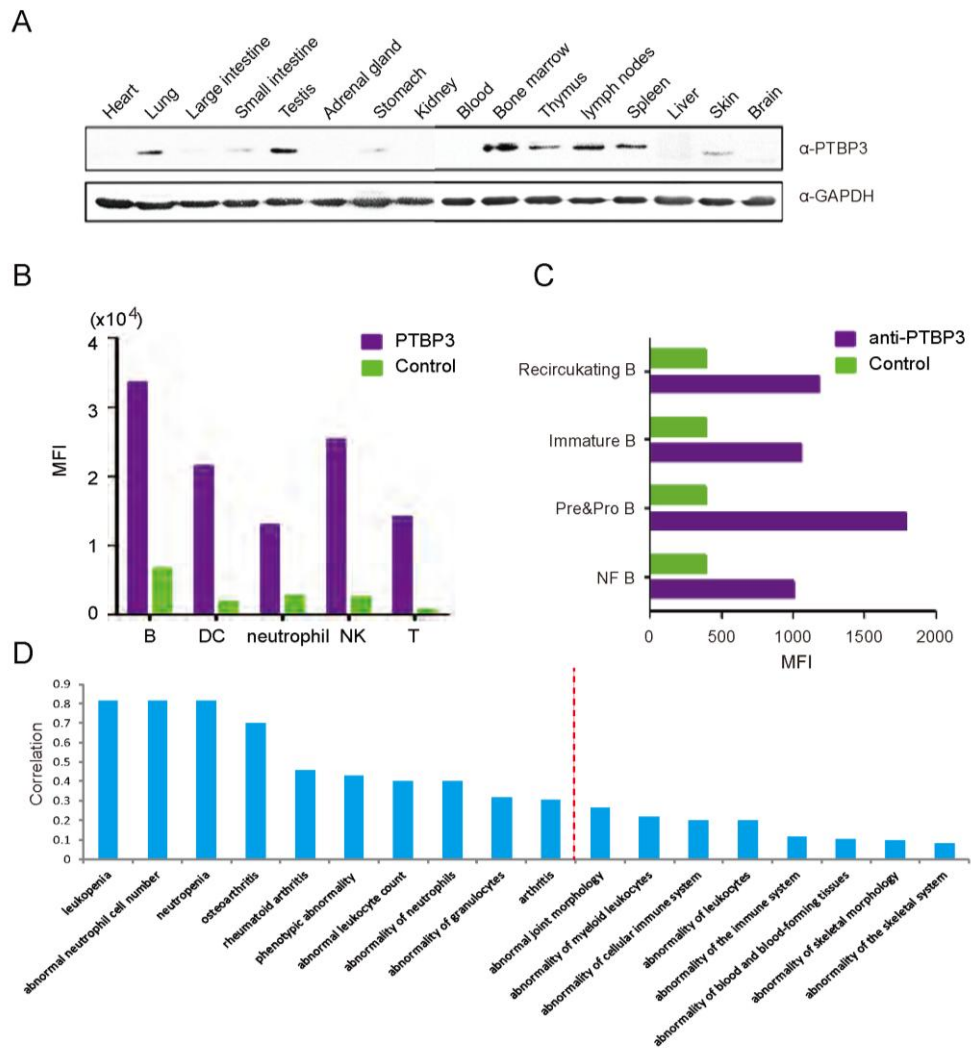
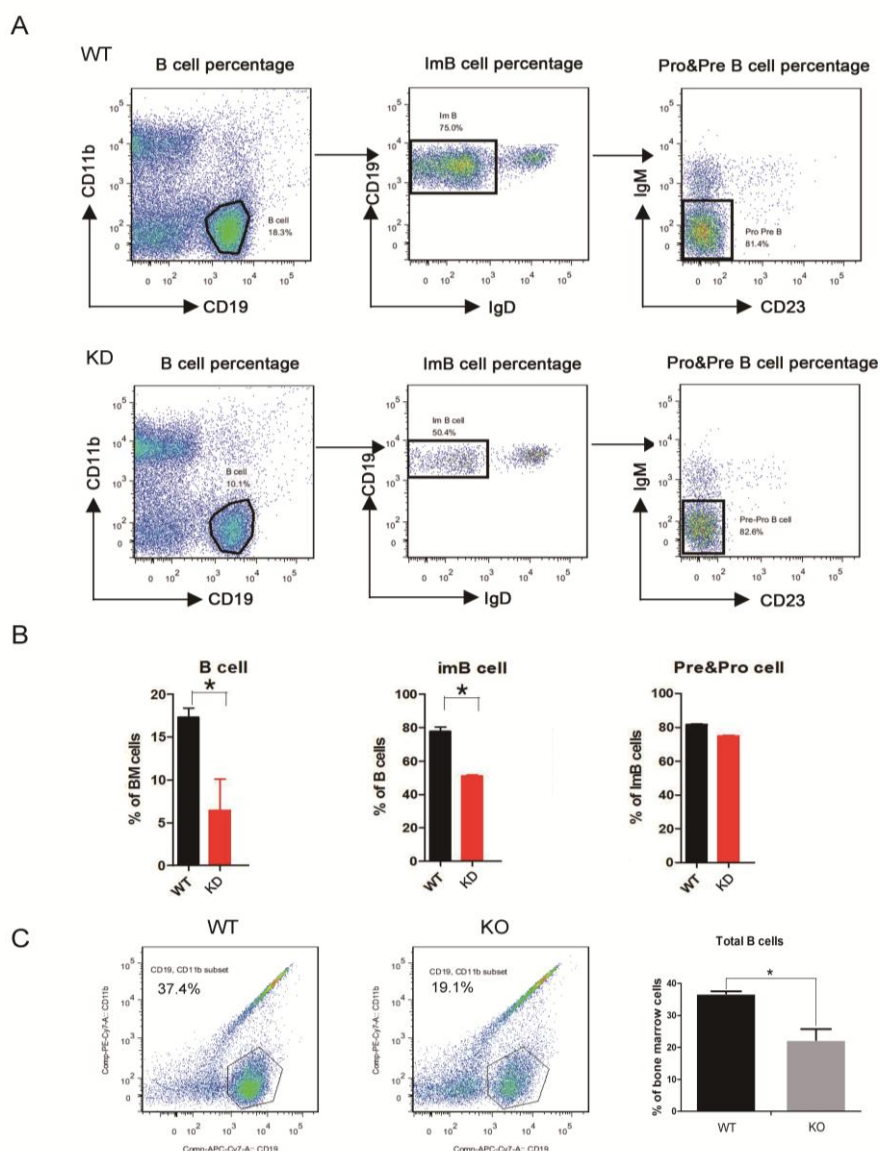


图 2. PTBP3 在小鼠不同组织器官中及 B 细胞中的表达及其与人类疾病相关性分析。(A) PTBP3 蛋白在小鼠不同组织中的 Western-blot 检测。(B) PTBP3 在不同类型免疫细胞中表达的流式分析。(C) PTBP3 在 B 细胞不同分化发育阶段的表达。(D) PTPB3 与免疫疾病的关联。

## (2) PTBP3 影响小鼠骨髓 B 细胞分化发育

为明确 PTBP3 在小鼠 B 细胞分化中的影响作用，我们通过 PTBP3 shRNA 慢病毒感染的方法体外敲降 PTBP3 表达，并初步构建了小鼠骨髓重建模型，流式分析结果显示（图 3A, B），敲降 PTBP3 后的骨髓 B 细胞总数明显减少，其中已成熟和未成熟 B 细胞数量明显减少，而

Pro/Pre-B 细胞与对照组相比无显著差异,提示 PTBP3 敲降后可能导致 B 细胞发育停滞在 Pro/Pre-B 阶段之前,从而影响 B 细胞发育成熟。



本项目下一步将在敲除小鼠中细致分析 PTBP3 对小鼠 B 细胞谱系分化的影响。

### **(3) PTBP3 条件性敲除小鼠模型的建立**

小鼠来源的 PTBP3 基因共有 15 个外显子，近期研究表明 PTBP3 有多达 11 个潜在的翻译起始位点，且实验证实只有 AUG1、AUG4 和 AUG11 可起始翻译产生蛋白质，但这三种不同长度的蛋白功能不详。因此我们设计了 4 条 guide RNA，分别靶定在外显子 3-6，这四种 gRNA 都可高效的切割基因组并引入缺失突变，导致 AUG1 和 AUG4 的移码突变（图 4A）。前期申请者所在研究组已经与中科院上海生化与细胞所合作，分别构建了 PTBP3 敲除细胞系（图 4B,C），通过单细胞注射及胚胎移植，获得了高效敲除的 F0 代小鼠。本项目基于此进行家系繁殖和表型鉴定。

同时，我们也在利用精原干细胞构建条件性敲除系统，计划在内含子 3 和 5 中分别插入 LoxP 位点，进而利用 Mb1-cre 和 CD19-cre 工具鼠(图 4C)得到了 B 细胞特异敲除的小鼠，用以研究 PTBP3 在 B 细胞中的功能。目前已完成在内含子 3 中的 LoxP 位点敲入(见图 4D)，下游的 LoxP 位点插入和筛选正在进行中。

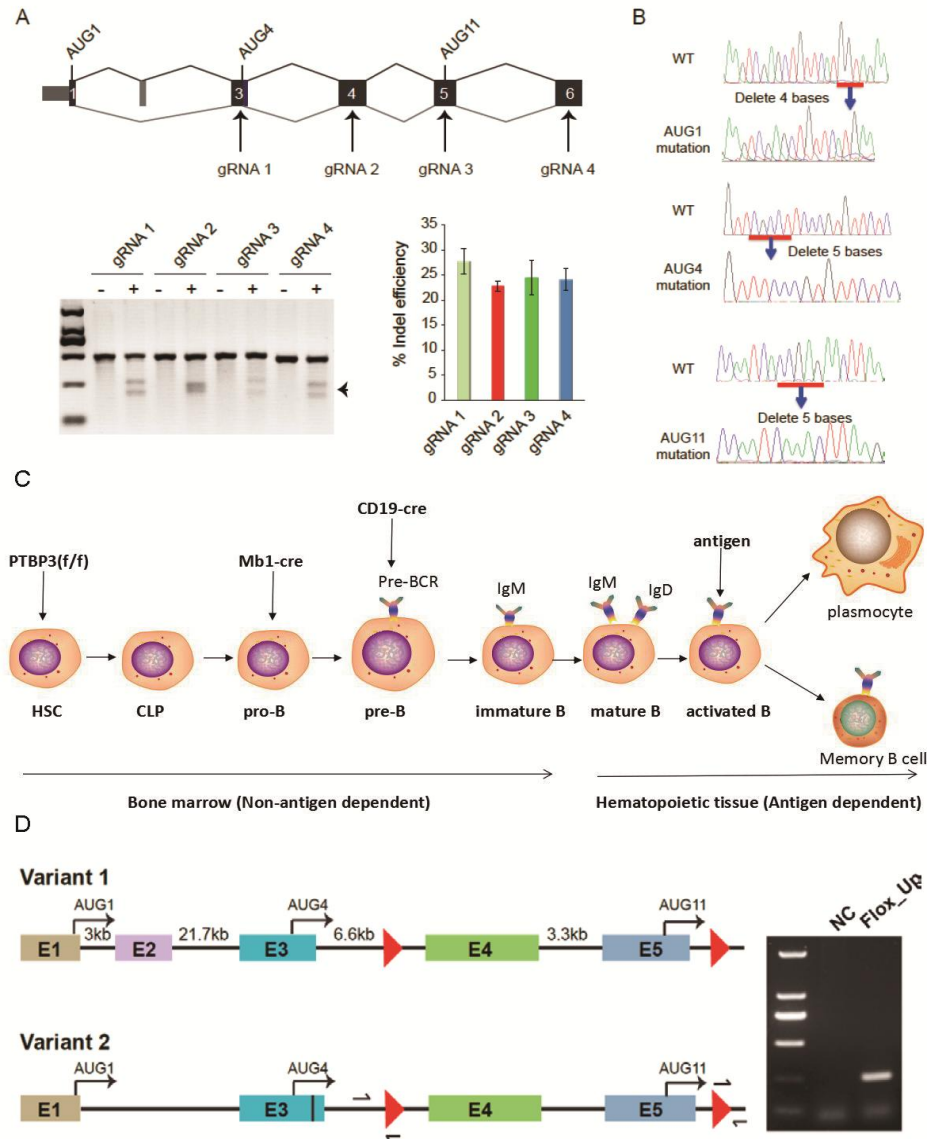


图 4. PTBP3 敲除小鼠模型的建立策略。A. PTBP3 的基因结构、gRNA 的筛选及精原干细胞系的构建。gRNA 分别靶定 PTBP3 的外显子 3、4、5、6，存活实验证实这四条 gRNA 都可有效的切割基因组，效率在 20% 左右。B. Sanger 测序证实了筛选的精原干细胞克隆发生了缺失突变。C. 利用 Cre 重组酶将 PTBP3 (f/f) 转基因小鼠在骨髓发育的早期阶段特异敲除 PTBP3 的技术路线。D. PTBP3 条件性敲除测验与初步结果。

#### (4) PTBP3 敲除小鼠骨髓 B 细胞转录组分析

我们前期利用 CRISPR/CAS9 方法初步建立了 PTBP3 Exon 3 的敲除小鼠模型，免疫磁珠法分离敲除小鼠和野生型小鼠骨髓 B 细胞，通

过 RNA-seq 技术建立 PTBP3 敲除相关转录组数据文库。对获得数据进行生物信息学初步分析发现：PTBP3 敲除后骨髓 B 细胞与野生型骨髓 B 细胞比较差异表达基因共 1928 个，其中上调的有 642 个，下调的基因有 1248 个（图 5A）。有趣的是，我们在对这些差异基因根据注释进行分类后发现，其中有大量的假基因（Pseudogene）和长非编码 RNA（lncRNA）（图 5B）。目前已报道的大多数有功能的假基因均是通过其转录物行使功能，还有假基因是否有功能不得而知。这些发现为本项目深入研究假基因及 lncRNA 与 PTBP3 间相互作用及其对 B 细胞发育分化的调控机制奠定了基础。

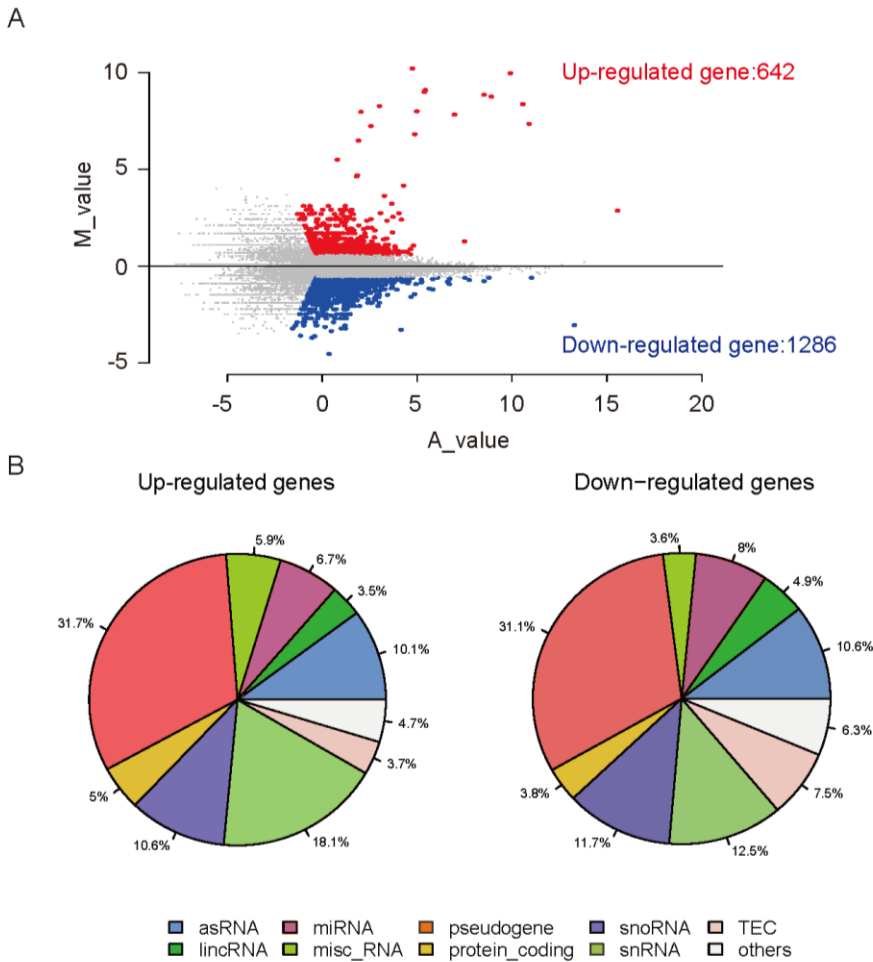


图 5. PTBP3 敲除的小鼠骨髓 B 细胞与野生型小鼠 RNA-seq 数据分析。(A) MA 散点图显示 PTBP3 敲除与野生型 B 细胞差异基因。(B) 差异基因分类饼图。



### (5) 小鼠骨髓重建模型的构建

在 PTBP3 高效 shRNA 慢病毒干扰系统的基础上,我们构建了小鼠骨髓重建模型。首先利用钴源  $\gamma$  射线破坏出生 4 周左右的小鼠骨髓系统,然后将用 control 和 PTBP3 shRNA 慢病毒感染的不同品系来源的骨髓细胞按照 1:1 的比例移植进入照射后的小鼠,4 到 8 周后分析 PTBP3 敲降后对 B 细胞发育和分化的影响(图 6A,B)。前期已经利用上述的骨髓重建策略,成功分析了 PTBP3 敲降后对 B 细胞不同分化阶段的影响。此方法将继续为本项目中体内验证研究作为实验技术基础。

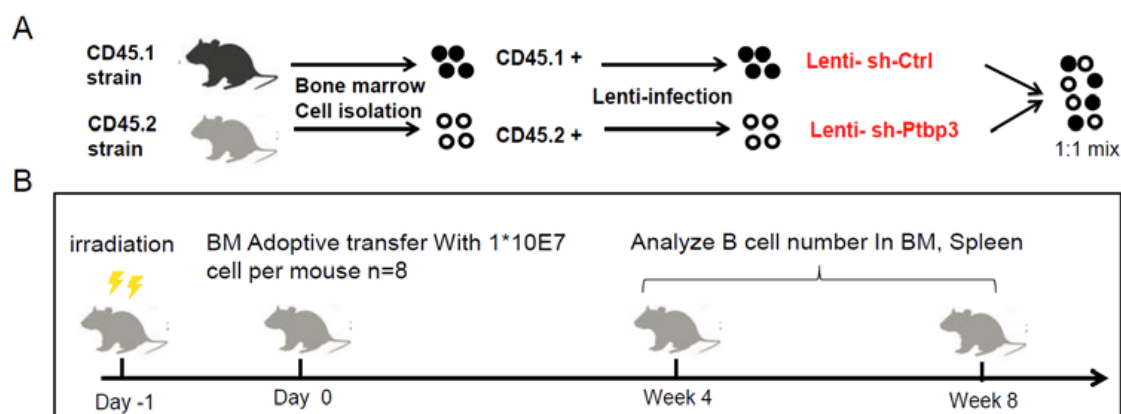


图 6. PTBP3 敲降后的骨髓重建实验流程及初步结果。CD45.1 和 CD45.2 品系的小鼠骨髓细胞被分离出来,并分别用 control 和 PTBP3 shRNA 处理,按照 1:1 比例混匀后进行移植(A,B)。

这些前期实验结果和工作基础,为进一步研究 PTBP3 在骨髓中调控 B 细胞发育的分子机制提供了良好的技术体系和研究模型,为本项目假设的提出和阐明奠定了坚实的基础。

申请者所在研究组长期从事 RNA 结合蛋白相关研究工作,在相关的知识结构和技術平台上有了很好的基础。研究组发展了一系列 RNA 结合蛋白相关研究的技術与细胞等模型,尤其在 PTBP 蛋白家族功能研究中取得了较大进展。这些相关的研究工作为本项目的开展和实施



提供了有力的科学理论依据，也是本研究假设的提出和验证的重要保障。

**2. 工作条件**（包括已具备的实验条件，尚缺少的实验条件和拟解决的途径，包括利用国家实验室、国家重点实验室和部门重点实验室等研究基地的计划与落实情况）；

依托生物物理研究所的中科院蛋白质科学研究平台，申请人所在实验室已经建立了结构与功能分析平台、蛋白质组学技术平台、生物成像中心和动物实验中心。其中包括超高速离心机、激光共聚焦显微镜、Orbitrap-XL、MALDI-TOF 和 Q-TOF 等质谱分析以及流式细胞分析仪等等。此外，依托生物物理研究所的感染与免疫国家重点实验室在小鼠模型，免疫细胞的活化、分化、迁移和功能研究方面具备丰富的资源,为本项目的实施提供了技术支持。

申请人所在实验室具有与本项目有关的设备：Bio-Rad T100 PCR 仪四台、Bio-Rad C1000 梯度 PCR 仪一台、Bio-Rad CFX96 荧光定量 PCR 仪一台、台式离心机 Microfuge20 四台、Eppendorf 5810R 和 5427R 冷冻离心机各一台、Forma 细胞培养箱四台、Odyssey CLx Infrared 成像系统、Syngene G:BOX Chemi XT4 凝胶成像系统、Bioruptor® Pico 超声破碎仪、Branson digital Sonifier® S-250D 超声破碎仪、CL-1000 和 CL-2000 紫外交联仪、Safe Imager™ 2.0 切胶仪、Eppendorf ThermoMixer C 热混仪、Beckman Allegra 64R 高速冷冻台式离心机、Turner Biosystems 96 孔自动光度计（Veritas Microplate Luminometer）、磁珠分离系统（DynaMag™-96 Side Magnet, -50Magnet, -15 Magnet）、Eppendorf 真空浓缩仪、Qubit 核酸定量仪、Nanodrop3000、EVOS® FL 细胞成像平台、蛋白和核酸电泳系统。这些条件均为申请人的科学研究提供了雄厚设备支撑。

**3. 正在承担的与本项目相关的科研项目情况**（申请人和项目组主

要参与者正在承担的与本项目相关的科研项目情况，包括国家自然科学基金的项目和国家其他科技计划项目，要注明项目的名称和编号、经费来源、起止年月、与本项目的关系及负责的内容等)；

无

4. 完成国家自然科学基金项目情况（对申请人负责的前一个已结题科学基金项目（项目名称及批准号）完成情况、后续研究进展及与本申请项目的关系加以详细说明。另附该已结题项目研究工作总结摘要（限 500 字）和相关成果的详细目录）。

国家自然科学基金青年科学基金项目（项目批准号：31200880）：  
印迹基因 H19 通过 miR-675 途径调节胎盘发育的作用机制研究  
（2013.01-2015.12），项目负责人：吉蕾

该项目已结题，与本项目的研究内容没有重复，部分关于小鼠动物模型和干细胞相关后续研究仍在进行中，在非编码 RNA 相关研究方法和动物技术平台可以作为本项目的支持。

项目研究工作总结摘要：

目前对 H19 基因功能的相关机制研究尚不清楚。近期研究表明 H19 是编码 miR-675 前体，H19 基因可能通过调控 miR675 的一种转录后调控作用机制参与发育过程。基于以上，本项目提出 H19-miR-675 途径可能是 H19 调节胎盘发育的重要作用途径。我们利用人滋养层细胞系和小鼠滋养层干细胞等体外模型研究了鼠早期胚胎及胎盘发育过程中 H19 和 miR-675 的定位与表达，发现 H19 和 miR-675 均在人孕早期绒毛中有较高的表达；原位杂交显示 H19 主要在绒毛细胞滋养层和滋养层柱中高表达，且 miR-675 与 H19 在人早孕绒毛中存在共定位。进一步发现 H19 可作为 miR-675 的前体，抑制细胞滋养层细胞增殖，可能是通过 miR-675 作用与靶基因 *NOMO1* 而激活 TGF- $\beta$  相关信号通路实现的。同时，H19 能促进小鼠滋养层干细胞增殖，而 miR-675 也参与其中，对其分化有一定的影响。为了深入阐明 H19-miR-675 作用途径

的作用机制，我们建立了慢病毒介导的胎盘特异性 H19 基因敲降小鼠模型，发现小鼠胎盘无明显的病理表型。因此，进一步鉴定了 miR-675 在子痫前期患者血浆中的表达，发现 miR-675 在 PE 患者血浆中表达显著升高，H19 及其预测的结合蛋白在 PE 胎盘中也呈高表达。我们首次发现 H19 结合蛋白 HuR 与 miR-675 可以抑制滋养层细胞的浸润功能。这有可能是 H19-miR-675 参与胎盘发育功能及 PE 病理相关机制的重要通路，对于阐明 H19-miR-675 发挥作用的机制有着重要的意义。

相关成果：

已发表会议摘要两篇，同时撰写两篇相关论文，分别投送 Hypertension 和 Sci Rep 杂志，一篇已接收，一篇正在审稿中。

### （三）其他需要说明的问题

1. 申请人同年申请不同类型的国家自然科学基金项目情况（列明同年申请的其他项目的项目类型、项目名称信息，并说明与本项目之间的区别与联系）。

无

2. 具有高级专业技术职务（职称）的申请人或者主要参与者是否存在同年申请或者参与申请国家自然科学基金项目的单位不一致的情况；如存在上述情况，列明所涉及人员的姓名，申请或参与申请的其他项目的项目类型、项目名称、单位名称、上述人员在该项目中是申请人还是参与者，并说明单位不一致原因。

无

3. 具有高级专业技术职务（职称）的申请人或者主要参与者是否存在与正在承担的国家自然科学基金项目的单位不一致的情况；如存在上述情况，列明所涉及人员的姓名，正在承担项目的批准号、项目类型、项目名称、单位名称、起止年月，并说明单位不一致原因。

无

4. 其他。

### 三、个人简历：

1. 申请人简历（由系统根据申请人在线填写的个人简介信息、承担项目情况和个人研究成果自动生成）

2. 主要参与者简历（在读研究生除外）（请下载参与者简历模板填写后上传；**除非特殊说明，请勿删除或改动简历模板中蓝色字体的标题及相应说明文字**）

### 四、附件

#### （一）附件目录

在附件目录中列出所有上传的电子附件材料清单。

#### （二）附件材料（逐项上传）

上传的电子附件材料应为项目申请人和主要参与者取得的代表性成果或者科技奖励。

1. 提供5篇以内申请人本人发表的与申请项目相关的代表性论文电子版文件；

2. 如上传专著，可以只提供著作封面、摘要、目录、版权页等；

3. 如上传所获科技奖励，应提供国家级科技奖励（国家自然科学奖、国家发明奖、国家科学技术进步奖）、省部级奖励（二等以上）奖励证书的电子版扫描文件；

4. 如上传专利或其他公认突出的创造性成果或成绩，应提供证明材料的电子版扫描文件；

5. 在国际学术会议上作大会报告、特邀报告，应提供邀请信或通知的电子版扫描文件；

6. 根据项目申请的需要，附件材料**还可能**包含以下电子版扫描文件：在职攻读研究生学位的申请人的导师同意函、在站博士后申请人的依托单位承诺函、不具有高级专业技术职务（职称）且不具有博士学位申请人的推荐信、无工作单位或所在单位不是依托单位的申请人与申请项目依托单位签订的书面合同、依托单位非全职聘用的境内外人员的聘任合同复印件和相关说明材料、伦理委员会证明、加盖依托

单位公章的国家社会科学基金结项证书复印件、依托单位生物安全保障承诺等。具体要求参见本年度《国家自然科学基金项目指南》“申请须知”部分和正文“面上项目”部分相关科学部要求。

特别提示：上述附件第 6 项还需提供纸质原件，随纸质《申请书》一同报送。