



RBM15结合促进RNA内含子或外显子滞留*

王 茹^{1,2)} 柯 岩³⁾ 韦荣飞²⁾ 王新禹^{2)**} 李 栋^{2,4)**}⁽¹⁾ 中国科学技术大学生命科学与医学部生命科学学院, 合肥 230027;⁽²⁾ 中国科学院生物物理研究所, 中国科学院科教融合生物大分子卓越创新中心, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101;⁽³⁾ 北京大学人民医院骨关节科, 北京 100044; ⁽⁴⁾ 中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049)

摘要 RBM15是一种RNA结合蛋白,参与RNA的m⁶A修饰及可变剪接调控中.然而,RBM15在转录组水平如何调控可变剪接尚不清楚.本研究应用超分辨率荧光显微镜技术发现,RBM15在细胞核中形成斑点状结构,且与核斑有密切接触或完全定位于核斑中.核斑为细胞核中无膜细胞器,富含多种剪接因子,这提示RBM15可能参与可变剪接的调控过程中.为了确定RBM15能否及如何调控可变剪接,我们利用siRNA敲低RBM15,并对敲低RBM15和野生型细胞进行二代测序.结果显示,敲低RBM15能够引起1111个转录本中的1279个可变剪接事件的变化.与已发表的RBM15-CLIP数据进行比较分析,我们发现,这1111个转录本中,有191个能够与RBM15结合,提示这191个转录本可能为RBM15调控的直接靶标.进一步的分析表明,RBM15结合能够促进这191个转录本中的121个发生内含子或外显子的滞留.该研究揭示了RBM15在转录组水平调控可变剪接的规律.

关键词 RBM15,可变剪接,核斑**中图分类号** Q7, Q219**DOI:** 10.16476/j.pibb.2021.0028

RBM15 (RNA binding motif protein 15, RNA结合蛋白15)最早在一位含有t(1;22)(p13;q13)易位的婴儿急性巨核细胞白血病患者体内被鉴定,该易位导致*RBM15*与*MKL1* (megakaryoblastic leukemia 1,巨核细胞白血病1)的基因座位发生融合^[1-2].随后的多项研究均报道了含有*RBM15-MKL1*基因融合的婴儿急性巨核细胞白血病的病例^[3-11],这提示融合基因*RBM15-MKL1*可能是急性巨核细胞白血病发病的诱因.

*RBM15*的结构大体上可分为N端的RNA识别基序(RNA-recognition motif, RRM)结构和Spen蛋白旁系同源和直系同源C端(Spen paralog and ortholog C-terminal, SPOC)结构.*RBM15*通过RRM结构结合RNA分子并对其进行靶向调控.过往研究表明*RBM15*参与调控RNA的功能主要集中在以下3个方面:第一,*RBM15*作为甲基转移酶样蛋白3(methyltransferase-like protein 3, METTL3)的一个功能亚基,辅助METTL3对特定的RNA分子进行m⁶A修饰^[12-14];第二,特定

mRNA的可变剪接受*RBM15*调控,进而影响髓系造血细胞的分化^[15-17];第三,*RBM15*可以促进mRNA的出核运输^[18].为进一步研究*RBM15*的生理功能,研究人员对小鼠骨髓细胞中的*RBM15*进行条件性敲除后,与野生型小鼠相比发现,正常条件下,小鼠的造血功能不受影响,然而,在复制压力的条件下,*RBM15*缺失的造血干细胞不能进行有效的自我更新^[19].在斑马鱼中,*RBM15*突变导致肝脏无法发育成熟^[20].以上研究结果提示,*RBM15*在调控RNA方面具有重要的生物学功能.然而,*RBM15*如何在转录组水平调控mRNA可变剪接,目前尚不清楚.

本研究发现,*RBM15*在细胞核中形成斑点状结构,且大多与核斑有接触,或位于核斑中.核斑

* 国家自然科学基金(31771440, 31770930)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-64888513

李栋. E-mail: lidong@ibp.ac.cn

王新禹. E-mail: wangxinyu@ibp.ac.cn

收稿日期: 2021-03-24, 接受日期: 2021-05-06

是细胞核中的一种无膜细胞器, 富含多种剪接因子, 这提示RBM15可能参与到RNA的可变剪接过程中. 我们利用siRNA敲低RBM15的表达水平, 并进一步在转录组水平分析发生变化的可变剪接事件. 此外, 为了确定RBM15直接调控可变剪接的潜在靶基因, 我们将这些变化的可变剪接事件与RBM15在转录组的结合位点进行比较分析, 得到RBM15结合且可变剪接发生变化的转录本. 通过分析发现, RBM15结合在其调控可变剪接区域附近, 且RBM15的结合会导致内含子滞留, 同时RBM15直接调控的靶基因主要为核斑的成分蛋白.

1 材料与方法

1.1 细胞培养

KYSE150和KYSE30购自DMSZ (ACC 375和ACC 351). 将KYSE30细胞培养在45% RPMI1640 (Thermo Fisher Scientific, 61870036) +45% Ham's F12 (Thermo Fisher Scientific, 11765054) +10%胎牛血清 (Thermo Fisher Scientific, A3161002C) 中. U-2 OS细胞培养于90% McCoy's 5A改良培养基 (Thermo Fisher Scientific, 16600082) +10%的胎牛血清中. 所有细胞培养于37°C、5% CO₂培养箱.

1.2 间接免疫荧光染色

将1×10⁵细胞接种到预先涂有1 g/L胶原蛋白的35 mm盖玻片上. 在室温下, 将细胞置于PBS稀释终浓度为4%的甲醛中固定15 min, 1×PBS漂洗3次, 每次5 min. 将样品在封闭缓冲液 (PBS+3% 正常驴血清+0.1% Triton-X100) 中封闭60 min. 在封闭缓冲液中稀释RBM15 (Proteintech, Cat. 10578-1-AP) 和SC35 (Sigma, Cat. S4045) 一抗 (稀释比例分别为1:500、1:2000). 一抗4°C孵育过夜. 1×PBS漂洗3次, 每次5 min. Alexa488偶联 (驴抗小鼠) 和Alexa560偶联 (驴抗兔) 二抗室温避光孵育1 h. 1×PBS漂洗3次, 每次5 min, 上机成像.

1.3 siRNA转染

转染前12 h, 将2×10⁵个细胞接种到6 cm培养皿中. 使用LipofectamineRNAiMax (Invitrogen, 13778150) 将10 nmol/L siRNA双链体转染细胞. RBM15的siRNA双链体详见前期报道^[12], 由Ribobio (中国广州) 合成. 转染后72 h, 利用RT-qPCR检测RBM15敲低效率.

1.4 cDNA文库构建

根据VAHTS mRNA-seqV3 Library Prep Kit for Illumina®试剂盒 (Vazyme, 目录号NR611) 说明书构建cDNA文库. 使用Oligo-dT磁珠从4 μg总RNA中富集poly (A)+RNA. 清除rRNA后, 使用二价阳离子在94°C下孵育8 min将poly (A)+RNA进一步片段化为150~200 bp长度的短片段. 使用随机引物将切割的RNA片段反转录为第一链cDNA. 用RNase H消化杂交双链DNA-RNA双链体以消除RNA链, 并进行第二链cDNA合成. 将得到的cDNA片段进行末端修复, A尾修饰并与接头引物进行连接. 携带150~200 bp插入片段的cDNA片段通过VAHTSTM DNA Clean Beads富集. 通过PCR扩增cDNA最终得到cDNA文库, 并通过Agilent 2200进行定量. 将标记的cDNA文库以相等的比例合并, 在Illumina HiSeqXten的单泳道中用于150 bp的配对末端测序. 测序工作由上海烈冰生物科技有限公司完成.

1.5 可变剪接分析

根据已知文献报道^[21], 对可变剪接分析参数进行优化. 在映射前, 从原始读数中剪掉接头序列. 进一步过滤得到干净的reads, 含>5%歧义碱基 (称为N) 或含>50%碱基质量得分<20的读数. 应用Bowtie程序将干净的reads回帖到人类参考基因组 (版本: Hg38). 根据前期优化实验, 使用以下参数来获取有关AS的大多数信息 (-read-edit-dist 4 -read-mismatches 2 -read-realign-edit-dist 0-mate-inner-dist 25 -min-anchor 6-coverage-search-microexon-search-solexa1.3-quals -b2-very-sensitive). 由此操作生成一个bam文件, 其中包含有关所有连接读取基因组位置的信息. 所有连接读取均满足两个条件: (i) 至少5 nt的读取必须与潜在连接位点的两个侧翼区域中的每个区域完全匹配, 并且(ii) 在两个连接点中均具有>2的非冗余reads的连接位点必须经过过滤. 进一步使用名为ASD (可变剪接检测器) 的Java程序软件, 完成以下任务: (i) 基于上述重新注释的人类转录组重建外显子簇, 以识别5种常见的AS模式 (ii) 计算分别与WT和RBM15-KD样本中包含或排除同型对齐的reads, 并使用Fisher精确检验计算P值, (iii) 分别计算WT和RBM15-KD样本中替代外显子及其对应基因的读数覆盖率, 并基于Fisher精确检验和外显子reads覆盖率计算第二个P值, (iv) 使用加权算术方程组合两个P值以获得调整后的P值,

以评估两个样本之间可变剪接统计差异. 源代码请访问<https://sourceforge.net/p/cash-program>.

1.6 基因分型分析

通过基因分型联盟网络工具 (<http://geneontology.org/>) (包括分子功能、生物学功能和细胞成分) 鉴定基因分型 (GO) [22].

1.7 蛋白质-蛋白质相互作用图

蛋白质-蛋白质相互作用图谱可从在线 String 数据库 [23] 和 PINA v2 数据库 [24] 获得.

2 结 果

2.1 RBM15的敲低效率检测

关于RBM15的精细定位, 目前尚无研究报道. 为明确RBM15的亚细胞定位, 我们对KYSE150细胞进行间接免疫荧光染色, 利用实验室自行搭建的结构光照明超分辨率显微镜 [25], 检测了核斑 (SC35 标记) 和内源性RBM15的亚细胞

定位, 结果表明, 在U-2OS细胞中内源性RBM15能够形成直径约0.2 μm的斑块, 这些斑块与核斑存在密切互动, RBM15形成的斑块能够嵌合在核斑中 (图1a), 这与我们先前报道的结果一致 [26]. 前人对核斑进行的蛋白质组学研究表明, 核斑中富含多种可变剪接因子, 且参与RNA的代谢信号通路 [27]. 结合RBM15的定位, 我们推测RBM15形成的小斑块通过与核斑的密切接触来行使其功能, 例如: 调控RNA的可变剪接. 为了研究RBM15的生物学功能, 利用两条不同的siRNA (RBM15-KD-1和RBM15-KD-2) 敲低RBM15的表达. 定量荧光PCR的结果表明, 相比于对照组 (WT), RBM15敲低组中RBM15的mRNA表达水平显著降低 (图1b); 敲低RBM15组的二代测序结果显示, *RBM15*基因座位的reads数量明显减少, 与定量荧光PCR的结果一致 (图1c). 以上结果表明, siRNA能够有效敲低RBM15的表达水平, 这为进一步研究RBM15的功能提供了有力的工具.

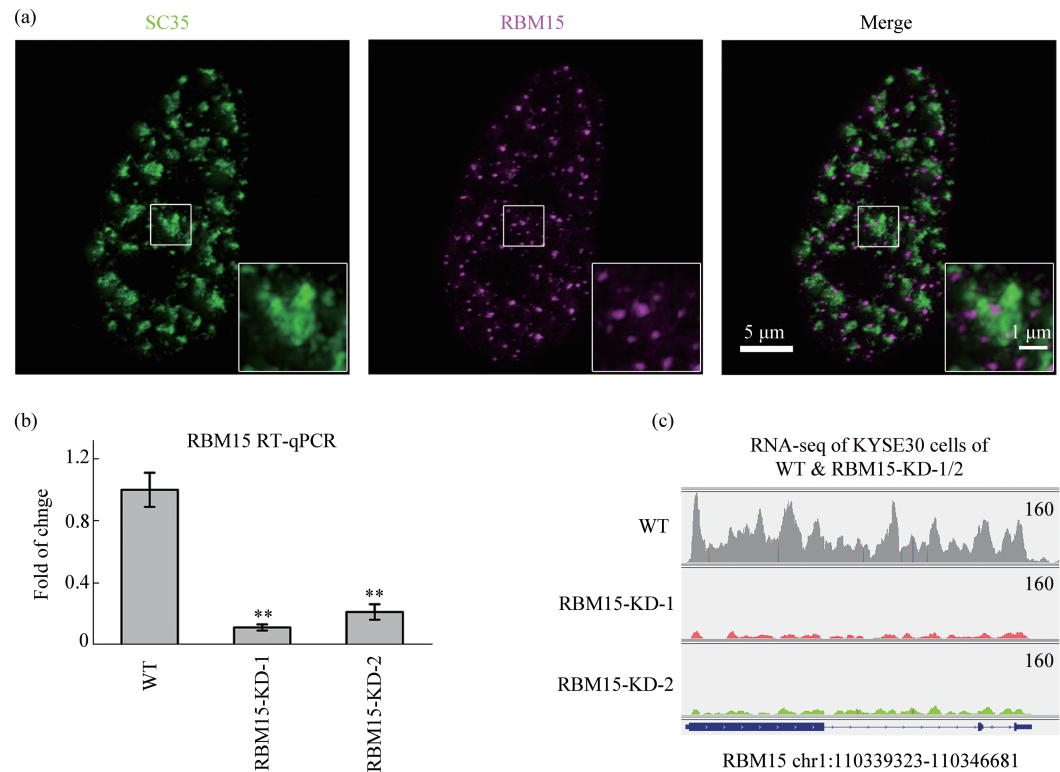


Fig. 1 RBM15 embeds in nuclear speckles and silencing efficacies of RBM15 with siRNA duplexes
(a) 3D-SIM images of RBM15 (purple) and SC35 (nuclear speckles, green) in U2OS cells. (b) KYSE30 cells were transfected with 10 nmol/L siRNAs targeting RBM15(RBM15-KD-1/2). RT-qPCR detects the abundance of RBM15 mRNA. GAPDH is used as an internal reference. WT: wildtype control group. ** $P<0.01$. Data are presented as ($\bar{x} \pm s$) of 3 independent experiments. (c) Next-generation sequencing result of the sample in (b).

2.2 RBM15敲低引发的可变剪接事件的数量和种类

为了进一步研究 RBM15 如何影响可变剪接, 我们使用 siRNA 敲低 KYSE30 细胞中的 RBM15 并利用 RNA-seq 技术分析其对可变剪接调控的影响. 当 WT 细胞和 RBM15-KD 细胞在标准培养基中培养至 90% 融合时, 提取总 RNA, 并通过包括 poly(A) 富集、RNA 片段化、随机六聚体引物 cDNA 合成、接头连接、大小选择和 PCR 扩增等系列流程构建 cDNA 文库, 然后使用 Illumina XTEN 仪器进行测序. 经过质控过滤后, 共产生 50 452 082 条和 40 396 838 条 reads 用来做进一步分析 (图 2a). 随后使用 Bowtie (v1.3.0) 软件将这些 reads 与人基因组序列 (hg38) 及其相应的注释基因 (hg38.gff3) 对齐. 配对末端的 reads 插入大小约为 (192 ± 16) bp, 这与在 cDNA 文库制备过程中分选的片段大小一致. 鉴于跨剪接点的 reads 准确读取是识别可变剪接事件的关键组成部分, 我们对一些参数列进行了优化以确保跨剪接点的 reads 数目 (详见“材料与方法”部分). 经优化后, WT 和 RBM15-KD 各生成 46 152 593 (91%) 和 45 354 730 (90%) 条可映射的 reads, 且 WT 和

RBM15-KD 中约 99% 的 reads 均能特异性回帖到参考基因组, 仅有约 1% 的 reads 作为多重映射而被过滤 (图 2a). 在后生动物中主要有 5 种可变剪接事件模式, 包括盒式外显子 (cassette exons)、5' 替代剪接 (alternative 5' splicing)、3' 替代剪接位点 (alternative 3' splicing sites)、互斥外显子 (mutually exclusive exons) 和滞留内含子 (retained introns) (图 2b). CASH 软件可以从所有带注释的转录本基因组坐标中搜索并找到发生可变剪接的外显子及其连接点的位置^[28]. 为了确定因 RBM15 缺失引起的这 5 种可变剪接事件的变化, 我们利用 CASH 算法对敲低 RBM15 后的转录本进行分析. 我们分别对 WT 和 RBM15-KD 样品中能够回帖到外显子和可变剪接结合处的所有 reads 进行计数, 通过比较 WT 和 RBM15-KD 样本之间连接处的 reads 数目, 确定由 RBM15-KD 引发的剪接模式的变化, 这种剪接模式的变化可以通过比较 WT 和 RBM15-KD 细胞之间的外显子 reads 覆盖率来进一步调整 (详见“材料与方法”部分). 在 RBM15-KD 样本中, 23 832 个剪接事件在调整后的 P 值截止值小于 0.01 的情况下, 在 1 111 个转录本中鉴定出 1 279 个可变剪接事件发生显著变化 (图 2c). 1 279

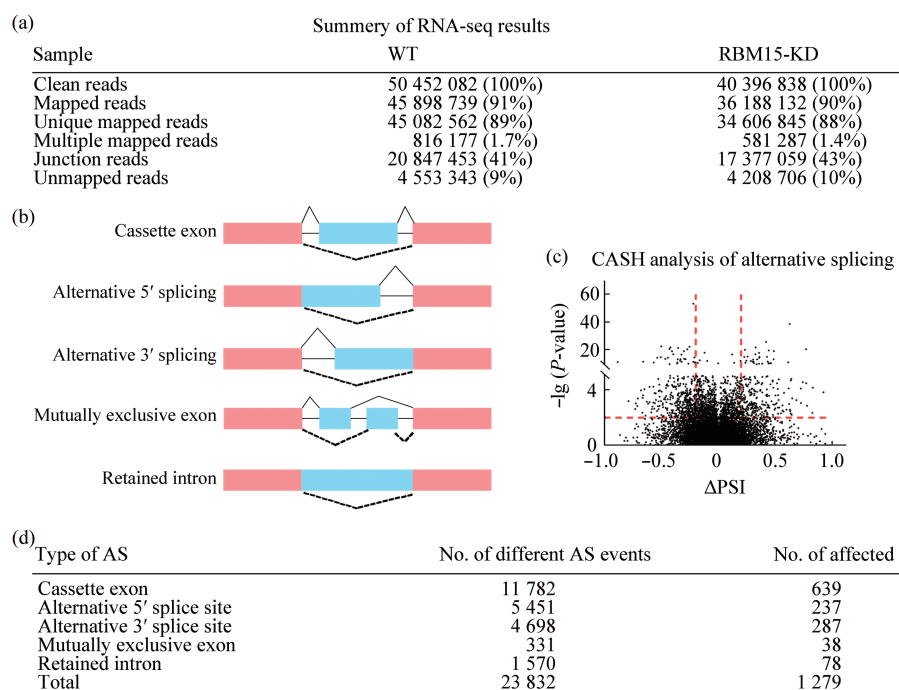


Fig. 2 Statistical analysis of alternative splicing changes caused by RBM15 knockdown

(a) Reads statistics of RNA-seq. (b) Diagrams of the exclusion and inclusion isoforms for the five modes of AS events that were examined. Red boxes: flanking constitutive exons; blue boxes: alternative spliced exons/regions; solid lines and dotted lines indicate two different AS isoforms. (c) Volcano plot of AS events. The y-ordinate represents the $-\lg$ of the adjusted P values. The percent spliced in index (PSI) indicates the efficiency of splicing a specific exon into the transcript population of a gene. Δ PSI represents the PSI difference between the RBM15-KD group and the WT control group. All data are analyzed using CASH software. (d) Statistical table of different AS events.

个发生显著变化的可变剪接事件中包含有639个盒式外显子事件、237个5'替代剪接事件、287个3'替代剪接事件、38个互斥外显子事件和78个滞留内含子事件(图2d)。总之,RBM15的敲低引起了所有常见可变剪接事件的改变。

2.3 确定RBM15直接调控的靶基因

RBM15是RNA结合蛋白,能够在转录组中结合不同类型的RNA分子^[12, 16]。为了明确1111个转

录本中因RBM15的敲低而直接导致可变剪接发生显著变化的转录本,将这1111个转录本与已知的RBM15转录组结合位点进行比较分析^[12, 16]。我们发现,这1111个转录本中,有191个是能与RBM15结合且由于RBM15敲低而直接发生可变剪接显著变化的转录本(图3a),因此,推测RBM15直接调控这191个基因的可变剪接。对191个转录本进行基因功能聚类分析,发现其中有26个转录

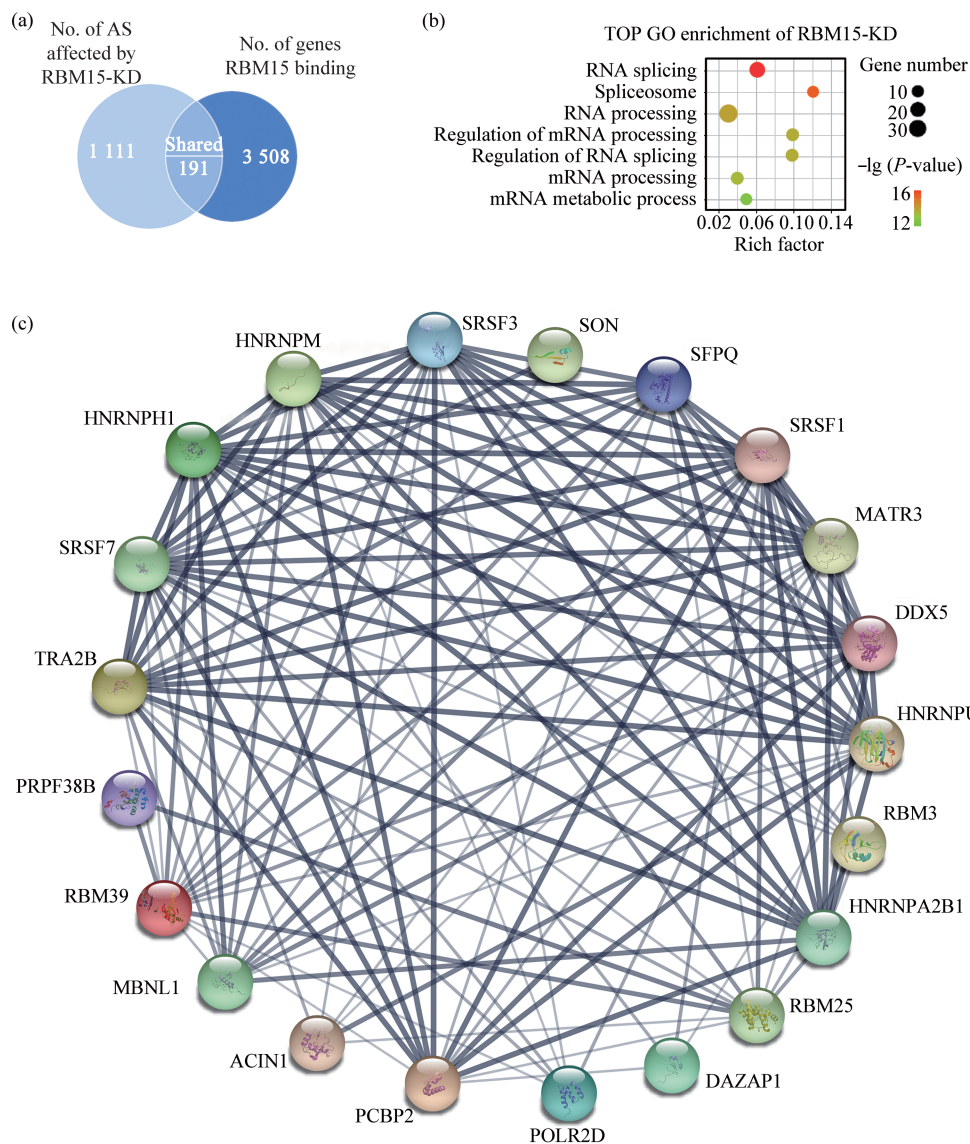


Fig. 3 RBM15 binds to the transcripts of nuclear speckle components and directly regulates their AS
(a) Venn diagram shows the intersection between the transcripts with changes in AS caused by RBM15-KD and the transcripts bound by RBM15. The intersection area represents that the AS of transcripts changes under RBM15-KD condition and can be bound by RBM15 simultaneously. (b) GO analysis on the intersection area in (a). (c) Protein-protein interaction network diagram for genes enriched in RNA splicing from (b). Each node represents a protein, and the thickness of the line represents the strength of the interaction. The protein interaction data were retrieved from the String database (<https://string-db.org/>).

本的编码蛋白参与到RNA可变剪接的调控过程中(图3b). 利用String数据库对这些基因进行蛋白质相互作用网络分析, 发现这些蛋白质形成功能高度相关的调控网络(图3c). 这些结果提示, RBM15结合编码核斑组分转录本, 进而调控其可变剪接. 前期报道揭示剪接因子的可变剪接在脊椎动物中高度保守且在精细调控可变剪接功能方面有着重要的作用^[29-32]. 这些由RBM15-KD引发的核斑转录本可变剪接变化可能会产生级联效应, 对更多转录本的可变剪接产生影响.

2.4 RBM15与转录本的结合抑制该转录本的相邻序列的剪接

为了进一步确定RBM15调控可变剪接是否有

规律可寻, 我们对图3a中的可与RBM15结合且发生可变剪接的191个转录本逐一进行分析. 如图4中举例所示, 与野生型转录本相比, RBM15-KD导致其中121个转录本在RBM15结合位置的临近区域的reads数目降低(图中黄色背景区域), reads密度降低的区域可能出现在转录本的3'末端(图4a, POLR2D; 图4e, RTL10; 图4f, BUB3), 转录本的5'末端(图4d, RBM39)或转录本中央区域(图4b, PRPF38B; 图4c, DDX5), 且这些区域通常位于RBM15结合位点的近端. 这些结果提示RBM15的结合能够阻碍结合位点临近序列的有效剪接.

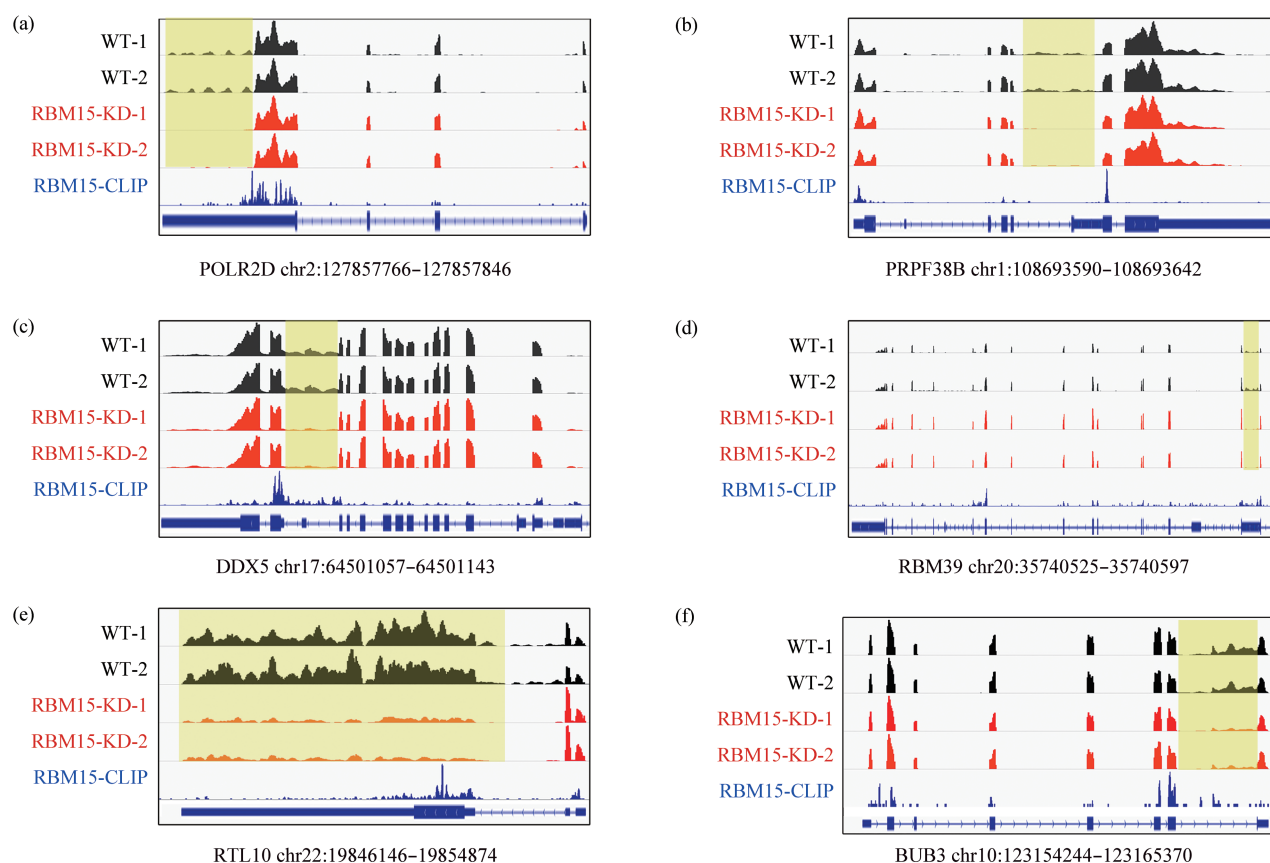


Fig. 4 RBM15 inhibits splicing of region adjacent to its binding sites

Representative the IGV snapshots of POLR2D (a), PRPF38B (b), DDX5 (c), RBM39 (d), RTL10 (e) and BUB3 (f). WT-1/-2 and RBM15-KD-1/-2 panels represent the distribution of reads in wild-type KYSE30 cells (black) and knockdown of RBM15 (red), respectively. RBM15-CLIP (blue) is the binding sites of RBM15. RBM15-CLIP data are from GEO public database GSM2064710. The differential AS events are highlighted by yellow background.

3 讨论

本研究分析了RBM15在转录组水平直接调控

的可变剪接事件. 我们发现RBM15调控所有常见类型的可变剪接, 转录本与RBM15的结合可以防止与RBM15结合位点相邻序列的剪接.

- [6] Torres L, Lisboa S, Vieira J, *et al.* Acute megakaryoblastic leukemia with a four-way variant translocation originating the RBM15-MKL1 fusion gene. *Pediatric Blood & Cancer*, 2011, **56**(5): 846-849
- [7] Hsiao H H, Yang M Y, Liu Y C, *et al.* RBM15-MKL1 (OTT-MAL) fusion transcript in an adult acute myeloid leukemia patient. *American Journal of Hematology*, 2005, **79**(1): 43-45
- [8] Mercher T, Busson-Le Coniat M, Nguyen Khac F, *et al.* Recurrence of OTT-MAL fusion in t(1; 22) of infant AML-M7. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 2002, **33**(1): 22-28
- [9] De Rooij J D E, Branstetter C, Ma J, *et al.* Pediatric non-Down syndrome acute megakaryoblastic leukemia is characterized by distinct genomic subsets with varying outcomes. *Nature Genetics*, 2017, **49**(3): 451-456
- [10] Hara Y, Shiba N, Ohki K, *et al.* Prognostic impact of specific molecular profiles in pediatric acute megakaryoblastic leukemia in non-Down syndrome. *Gene Chromosome Canc*, 2017, **56**(5): 394-404
- [11] De Rooij J D E, Masetti R, Van Den Heuvel-Eibrink M M, *et al.* Recurrent abnormalities can be used for risk group stratification in pediatric AMKL: a retrospective intergroup study. *Blood*, 2016, **127**(26): 3424-3430
- [12] Patil D P, Chen C K, Pickering B F, *et al.* m(6)A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature*, 2016, **537**(7620): 369-373
- [13] Knuckles P, Lence T, Haussmann I U, *et al.* Zc3h13/Flacc is required for adenosine methylation by bridging the mRNA-binding factor Rbm15/Spenito to the m(6)A machinery component Wtap/Fl(2)d. *Gene Dev*, 2018, **32**(5): 415-429
- [14] Xie Y B, Castro-Hernandez R, Sokpor G, *et al.* RBM15 modulates the function of chromatin remodeling factor BAF155 through RNA methylation in developing cortex. *Mol Neurobiol*, 2019, **56**(11): 7305-7320
- [15] Xiao N, Laha S, Das S P, *et al.* Ott1 (Rbm15) regulates thrombopoietin response in hematopoietic stem cells through alternative splicing of c-Mpl. *Blood*, 2015, **125**(6): 941-948
- [16] Zhang L, Tran N T, Su H R, *et al.* Cross-talk between PRMT1-mediated methylation and ubiquitylation on RBM15 controls RNA splicing. *Elife*, 2015, **4**(17): e07938
- [17] Niu C, Zhang J, Breslin P, *et al.* c-Myc is a target of RNA-binding motif protein 15 in the regulation of adult hematopoietic stem cell and megakaryocyte development. *Blood*, 2009, **114**(10): 2087-2096
- [18] Zolotukhin A S, Uranishi H, Lindtner S, *et al.* Nuclear export factor RBM15 facilitates the access of DBP5 to mRNA. *Nucleic Acids Res*, 2009, **37**(21): 7151-7162
- [19] Xiao N, Jani K, Morgan K, *et al.* Hematopoietic stem cells lacking Ott1 display aspects associated with aging and are unable to maintain quiescence during proliferative stress. *Blood*, 2012, **119**(21): 4898-4907
- [20] Hu L, Li H, Chi Z, *et al.* Loss of the RNA-binding protein Rbm15 disrupts liver maturation in zebrafish. *The Journal of Biological Chemistry*, 2020, **295**(33): 11466-11472
- [21] Zhou X, Wu W, Li H, *et al.* Transcriptome analysis of alternative splicing events regulated by SRSF10 reveals position-dependent splicing modulation. *Nucleic Acids Res*, 2014, **42**(6): 4019-4030
- [22] Mi H, Muruganujan A, Ebert D, *et al.* PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 2019, **47**(D1): D419-D426
- [23] Szklarczyk D, Gable A L, Lyon D, *et al.* STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res*, 2019, **47**(D1): D607-D613
- [24] Cowley M J, Pinese M, Kassahn K S, *et al.* PINA v2.0: mining interactome modules. *Nucleic Acids Res*, 2012, **40**(D1): D862-D865
- [25] Guo Y T, Li D, Zhang S W, *et al.* Visualizing intracellular organelle and cytoskeletal interactions at nanoscale resolution on millisecond timescales. *Cell*, 2018, **175**(5): 1430-1442
- [26] Wang X, Liu C, Zhang S, *et al.* N(6) -methyladenosine modification of MALAT1 promotes metastasis via reshaping nuclear speckles. *Developmental Cell*, 2021, **56**(5): 702-715
- [27] Saitoh N, Spahr C S, Patterson S D, *et al.* Proteomic analysis of interchromatin granule clusters. *Molecular Biology of The Cell*, 2004, **15**(8): 3876-3890
- [28] Wu W W, Zong J, Wei N, *et al.* CASH: a constructing comprehensive splice site method for detecting alternative splicing events. *Brief Bioinform*, 2018, **19**(5): 905-917
- [29] Lareau L F, Inada M, Green R E, *et al.* Unproductive splicing of SR genes associated with highly conserved and ultraconserved DNA elements. *Nature*, 2007, **446**(7138): 926-929
- [30] Lareau L F, Brenner S E. Regulation of splicing factors by alternative splicing and NMD is conserved between kingdoms yet evolutionarily flexible. *Mol Biol Evol*, 2015, **32**(4): 1072-1079
- [31] Ni J Z, Grate L, Donohue J P, *et al.* Ultraconserved elements are associated with homeostatic control of splicing regulators by alternative splicing and nonsense-mediated decay. *Gene Dev*, 2007, **21**(6): 708-718
- [32] Sureau A, Gattoni R, Dooghe Y, *et al.* SC35 autoregulates its expression by promoting splicing events that destabilize its mRNAs. *Embo J*, 2001, **20**(7): 1785-1796
- [33] Roundtree I A, Luo G Z, Zhang Z, *et al.* YTHDC1 mediates nuclear export of N(6)-methyladenosine methylated mRNAs. *eLife*, 2017, **6**(10): e31311
- [34] Lin S, Choe J, Du P, *et al.* The m(6)A methyltransferase METTL3 promotes translation in human cancer cells. *Molecular cell*, 2016, **62**(3): 335-345
- [35] Xiao W, Adhikari S, Dahal U, *et al.* Nuclear m(6)A reader YTHDC1 regulates mRNA splicing. *Molecular Cell*, 2016, **61**(4): 507-519
- [36] Bondy-Chorney E, Parks T E C, Ravel-Chapuis A, *et al.* Staufen1 regulates multiple alternative splicing events either positively or negatively in DM1 indicating its role as a disease modifier. *Plos*

Genet, 2016, **12**(1): e100582

[37] Mortera-Blanco T, Dimitriou M, Woll P S, *et al.* SF3B1-initiating mutations in MDS-RSs target lymphomyeloid hematopoietic stem cells. *Blood*, 2017, **130**(7): 881-890

[38] Wang L, Brooks A N, Fan J, *et al.* Transcriptomic characterization of SF3B1 mutation reveals its pleiotropic effects in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*, 2016, **30**(5): 750-763

[39] Furney S J, Pedersen M, Gentien D, *et al.* SF3B1 mutations are associated with alternative splicing in uveal melanoma. *Cancer Discovery*, 2013, **3**(10): 1122-1129

[40] Garcia-Dios D A, Levi D, Shah V, *et al.* MED12, TERT promoter and RBM15 mutations in primary and recurrent phyllodes tumours. *Brit J Cancer*, 2018, **118**(2): 277-284

RBM15 Promotes Intron or Exon Retention*

WANG Ru^{1,2)}, KE Yan³⁾, WEI Rong-Fei²⁾, WANG Xin-Yu^{2)**}, LI Dong^{2,4)**}

⁽¹⁾Division of Life Sciences and Medicine, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China;

²⁾National Laboratory of Biomacromolecules, CAS Center for Excellence in Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

³⁾Arthritis Clinic and Research Center, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China;

⁴⁾College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract RBM15 is an RNA binding protein that is known of involving in the m⁶A modification and the regulation of alternative splicing (AS). However, how RBM15 regulates AS is currently unclear. Here, using super-resolution microscopy, we found that RBM15 forms puncta structures that closely contact with or even embedded in the nuclear speckles. Nuclear speckles are enriched in splicing factors, which implies that RBM15 might be involved in RNA AS. To determine whether and how RBM15 regulates AS, we knocked down RBM15 (RBM15-KD) using siRNA and performed RNA-seq for wildtype(WT) cells and RBM15-KD cells. We analyzed the RNA-seq of WT and RBM15-KD cells. We show that RBM15-KD cause 1 279 differential AS events in 1 111 transcripts. After comparing to public RBM15-CLIP data, we identify that 191 out of 1 111 transcripts are directly bound by RBM15, indicating that these 191 transcripts are probably direct targets of RBM15. Moreover, RBM15 promotes the retention of the adjacent regions proximal to its binding sites in 121 out of the 191 transcripts. This study reveals that how RBM15 regulates AS on a transcriptomic level.

Key words RBM15, alternative splicing, nuclear speckles

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0028

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31771440, 31770930).

** Corresponding author.

Tel: 86-10-64888513

LI Dong. E-mail: lidong@ibp.ac.cn

WANG Xin-Yu. E-mail: wangxinyu@ibp.ac.cn

Received: March 24, 2021 Accepted: May 6, 2021