

RNA 结合蛋白的组学解析与功能探索*

曾如馨 陈鹏*

(北京大学化学与分子工程学院化学生物学系 北京大学合成与功能生物分子中心 北京 100871)

摘要 转录后调控在生理过程中占据十分重要的地位,其分子机制包含大量的核糖核酸(RNA)与蛋白质之间的相互作用。在 RNA 的整个生命周期中, RNA 结合蛋白(RBPs)是相当关键的参与者和执行者,影响了细胞生理过程的运行及机体稳态的维持。研究 RNA 结合蛋白质组,可以为发掘生物标志物、寻找疾病治疗的靶标提供重要信息。近年来,捕捉 RBPs 的手段推陈出新,从只能富集特定 RNA 的结合蛋白发展至可以实现全局性的 RBPs 鉴定,并对 RBP 的性质如空间分布、翻译后修饰所产生的影响进行了探索。聚焦于 RBPs 的组学解析手段以及功能蛋白质组探索,介绍现有的技术,总结技术特点并分析其所存在的问题,最后展望 RBP 组学研究技术改进的方向和应用前景。

关键词 核糖核酸(RNA)结合蛋白; RNA 结合蛋白质组; 相分离; 空间分布; 翻译后修饰

RNA-Binding Proteome Analysis and Functional Explorations*

Zeng, Ruxin Chen, Peng R.*

(Department of Chemical Biology, College of Chemistry and Molecular Engineering, Synthetic and Functional Biomolecules Center, Peking University, Beijing 100871)

Abstract Post-transcriptional regulations play a critical role in diverse biological processes, and a series of RNA-protein interactions are involved in their underlying mechanism. RNA-binding proteins (RBPs) are key participants and executors in entire life cycle of RNA, affecting the operation of biological processes and the maintenance of cellular homeostasis. The RNA-binding proteome profiling therefore provides crucial information for discovering biological markers and targets of diseases. An array of RBPs capturing methods have been developed in recent years, ranging from profiling binding proteins of specific RNA to unbiased global RBPs identification, and even to exploring the functional aspects of RBPs such as spatial distribution and/or post-translational modifications. This review will focus on tool development for RBP proteomics and functional proteome characterization, and finally discusses bottlenecks and future prospects of this exciting direction of RBP proteomics.

Keywords RNA-binding proteins; RNA binding proteome; phase separation; spatial distribution; post-translational modifications

1 引言

核糖核酸(RNA)作为一种重要的遗传信息载体,在生长发育、衰老及疾病等生理、病理过程中都具有重要的作用。随着转录后调控在细胞生命过程中的重要性被逐渐发掘,围绕 RNA 的分子机制研究,尤其是针对 RNA-蛋白质之间相互作用的探索,对于解析细胞复杂的动态变化越来越关键^[1]。RNA 结合蛋白(RNA-binding proteins, RBPs)是细胞中一类能够结合 RNA 的特定蛋白质,其完整地参与了 RNA 的生命周期,对细胞生理过程的运行及机体稳态的维持具有关键性的作用^[2]。RBP 通过与 RNA 的动态相互作用,控制其生物发生和周转从而影响 RNA 的多种功能,包括 RNA 剪接^[3]、多腺苷酸化^[4-5]、mRNA 的稳定化^[6]、RNA 转运和定位^[7]、

RNA 编辑以及化学修饰^[8]等转录后调控的相关过程(图 1),一些 RBPs 还会兼具多种功能^[9],如 RBFOX1 既影响稳定化也影响翻译。除此之外, RBP 还会影响共翻译蛋白的折叠和定位以及蛋白复合物的组装^[10-11]。

RBP 与 RNA 的相互作用涉及氢键、范德华力以及两者的三级结构等多种因素。为了能够特异地结合 RNA, RBP 通常含有一个或多个结合区域,即 RNA 结合域(RNA-binding domain, RBD),一些 RBPs 中不同的结合域还会协同工作^[12]。常见的 RBDs 有 RNA 识别基序(RRM), KH 结合域^[13]和锌指结合域^[14]等。大多数 RBPs 还包含内在无序区域(intrinsically disordered regions, IDRs),其中部分 IDRs 也会参与结合 RNA,但目前对 IDRs 与 RNA 相互作用的研究尚不充分^[15]。也有一些 RBPs 缺乏已知的 RNA 结合域,使得难以通过结合域的

* Dedicated to the 90th anniversary of *Acta Chimica Sinica*.

* E-mail: pengchen@pku.edu.cn

Received July 2, 2023; published August 14, 2023.

Project supported by the National Key Research and Development Programmes of the Ministry of Science and Technology of China (No. 2021YFA1302603).

* 庆祝《化学学报》创刊 90 周年。

项目受科技部国家重点研发计划(No. 2021YFA1302603)资助。

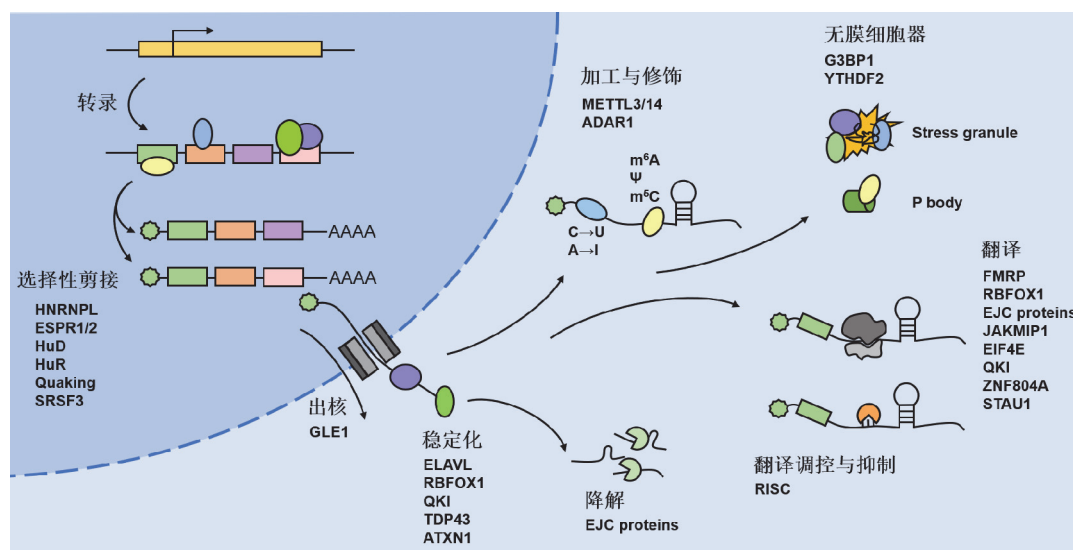


图 1 RNA 结合蛋白的主要功能. RNA 结合蛋白参与 RNA 的整个生命周期, 包括选择性剪接、转运、稳定化、加工、翻译及降解等过程, 并参与无膜细胞器的形成^[3-9]. 图示包括相关过程涉及的部分 RBPs 基因名

Figure 1 Function of RNA-binding proteins. RNA-binding proteins are involved in the entire life of RNA, including selective splicing, transport, stabilization, processing, translation and degradation, as well as the formation of membrane-less organelles^[3-9]. The Figure includes the gene names of some RBPs involved in the relevant process

特点对这类蛋白进行归类. 结合域对 RBP 在生理过程中的调控起到了极为关键的作用, 其“打开”和“封闭”往往意味着 RBP 对于 RNA 底物的特定识别能力的有无. 因此, 从结合域层面研究 RNA 和 RBP 的作用模式非常重要.

RBP 往往会受到其它蛋白或者小分子的协作调控, 才能正常行使其功能^[15], 例如 m^6A 的 writer 蛋白 METTL3 通常需要有 METTL14 作为 RNA 底物识别元件共同协作, 以及其它一些辅助蛋白共同组成复合物, 才能正常行使其修饰功能^[16]. 另外由于 RNA 和蛋白质性质的显著不同(例如电性、溶解度等), 特定条件下 RNA-RBP 复合物及相关的分子可能会形成一些独立存在的细胞内颗粒, 如 Stress Granule(应激颗粒)、P body (P 小体)等^[17-19]. 在神经系统中, 一些 RBPs 或其目标 mRNA 发生突变会损害 RNA 转运和翻译过程, 从而形成难以被高效清除的 RNA 或蛋白相关颗粒, 这也被认为是一系列神经退行性疾病的诱因^[20]. TDP43, FUS, hnRNP A2/B1, hnRNP A1 等 RBPs 的突变会导致肌萎缩侧索硬化(ALS)的发生^[21-23]. 另外, ATXN1/2 的 poly Q 区域异常增加会导致脊髓小脑性共济失调^[24-25]. 除了 mRNA 的结合蛋白之外, tRNA 的结合蛋白 SMN1 的失调也会直接影响到剪接体的功能, 进而导致脊髓性肌萎缩的发生^[26].

RBP 所涉及的功能表型往往与组织特异性有关, 其对于基因表达的调控作用, 在免疫过程中具有重要功能^[27]. 2021 年, 李华兵课题组^[28]利用 CRISPR-Cas9 基因筛查系统排查了巨噬细胞中的 800 多个 RBPs, 发现 m^6A 甲基化酶 METTL3 在巨噬细胞抗感染的过程中起

到了关键作用. 他们通过进一步测序找到了其靶向的 mRNA, 最终揭示了 METTL3 加速靶向的 mRNA 降解, 促进巨噬细胞活化的新机制. 2022 年, Turner 课题组^[29]发现 RNA 结合蛋白 ZFP36 和 ZFP36L1 限制了活化的初始 $CD8^+T$ 细胞的分化速率以及由此产生的细胞毒性淋巴细胞的效力. RBP 直接与 NF- κ B, Irf8 和 Notch1 转录因子和细胞因子(包括 IL-2)的 mRNA 相结合, 进而通过 CD28 共刺激以实现完整的 T 细胞激活和分化过程. FMRP (Familial mental retardation protein)是一个发现于神经细胞中的 RBP, 2022 年 Hanahan 课题组^[30]的研究表明该蛋白在多种癌症肿瘤组织中的天然高表达, 与癌症细胞的抗杀伤和扩散能力相关. 因此, FMRP 可以作为重要的可调控因子, 用于协调多方面的抗肿瘤免疫反应屏障.

RBPs 是一类重要的生物标志物, 自 20 世纪 70 年代起, 就有学者针对 RNA 与其的相互作用发展相应的研究工具^[31-33], 以期揭示其结构与功能的特性. 该研究领域覆盖面逐渐从 mRNA 的结合蛋白, 延伸至非编码 RNA, 如 rRNA、tRNA 的结合蛋白. 交联方式也从单纯的紫外光交联发展至与荧光、点击化学、化学交联和邻近标记等多方式联用的标记富集方法. 本综述将聚焦于 RBP 组学研究技术手段, 介绍捕捉 RBPs 的工具特点, 分析其优势及局限性, 并拓展至 RBP 的性质如亚细胞分布以及翻译后修饰的系统研究. 最后对 RNA 结合蛋白质组的研究进行总结和展望.

2 RNA 结合蛋白的组学研究方法

为了能够系统性鉴定 RBPs, 研究者们发展了一系

列技术手段. 捕捉 RBP 有两个技术关键, 一是需要固定 RNA-蛋白质的相互作用, 由于其大多为弱的非共价结合, 为了避免在后续富集时丧失特异性, 常用紫外光照或化学交联的方式在 RNA 与 RBP 之间构建共价键^[32-34]. 二是富集 RBP 的方法, 常用的方法可分为靶向和无偏两类, 前者是针对具有某种性质的 RNA 设计富集方法提取复合物从而获得对应的 RBP, 后者则是根据 RNA-RBP 复合物本身的物理化学特性进行分离^[35-37]. 其中, 研究者们还结合邻近标记、化学反应或者引入非天然的核苷酸进行代谢标记来完成富集^[38-39]. 本节将主要以不同富集方式的角度来介绍 RBP 的组学研究方法.

2.1 依赖特定 RNA 序列捕捉 RNA 结合蛋白

根据 RNA 序列的独特性, 可以利用寡聚核苷酸互补配对的方式将复合物富集下来, 这种策略被称为 RNA “相互作用组” 的捕捉. 在 2012 年, Hentze^[40]和 Landthaler^[41]两个课题组分别独立开发这一方法, 最早实现了 RBP 的高通量质谱鉴定. 他们在完成 RNA 与 RBP 的紫外交联后, 加入带有寡聚胸腺嘧啶的磁珠 (Oligo-dT 珠), 从而富集得到带有 poly-A 尾巴的 RNA-RBP 复合物. 经过 RNA 酶解及蛋白酶切后, 采用基于质谱的方式鉴定其中结合蛋白的信息 (图 2a 上). 利用该策略, 他们在 HeLa 及 HEK 293T 细胞系中鉴定到 800 多个 RBP, 其中不乏一些新的 RBP. 由于交联后的复合物能够耐受高盐和活性剂, 该富集可以在严格的

变性条件下进行, 从而去除样品中游离的蛋白. 该策略已经被广泛地应用于研究 mRNA 的结合蛋白, 对于转录调控的研究具有重要的作用^[42-43].

相似的富集策略也被用于 Xist 结合蛋白的鉴定中. Xist 是一种长的非编码 RNA (lncRNA), 在 X 染色体失活中具有关键作用, 然而它结合一系列蛋白导致基因沉默的机制一直难以捉摸. 2015 年, Chang 等^[44]利用一组生物素标记的寡聚核苷酸链 (Oligo-Xist) 与目标 Xist 杂交, 并用链霉亲和素富集 RNA-RBP 复合物, 发展了 ChIRP-MS 的流程 (图 2a 下). 在最终鉴定到的 81 个 lncRNA Xist 结合蛋白中包含 SPEN 这一关键蛋白, 为后续研究 X 染色体沉默提供了非常关键的生物标志物.

这一类针对特定 RNA 设计寡聚核苷酸链的富集策略, 能够有效地富集某种特定 RNA 的结合蛋白, 主要对于转录后调控进行研究. 但这种策略难以实现全局性的 RBP 鉴定, 对于诸如 rRNA 或者 tRNA 等一类 RNA 的结合蛋白研究存在局限性.

2.2 邻近标记方法实现 RNA 结合蛋白提取

随着邻近标记技术的发展, 一些生物素连接酶在标记时间较短的同时也能够实现混杂标记, 被广泛地用于蛋白质组学研究中^[45]. 由于 RBP 与相互作用的 RNA 在空间上处在邻近的位置, 研究者们产生了利用这一空间特性研究 RNA 结合蛋白质组的想法.

2018 年, Khavari 发展了 RaPID 策略, 他们发展了来源于枯草芽孢杆菌的生物素连接酶 BASU (BirA*)

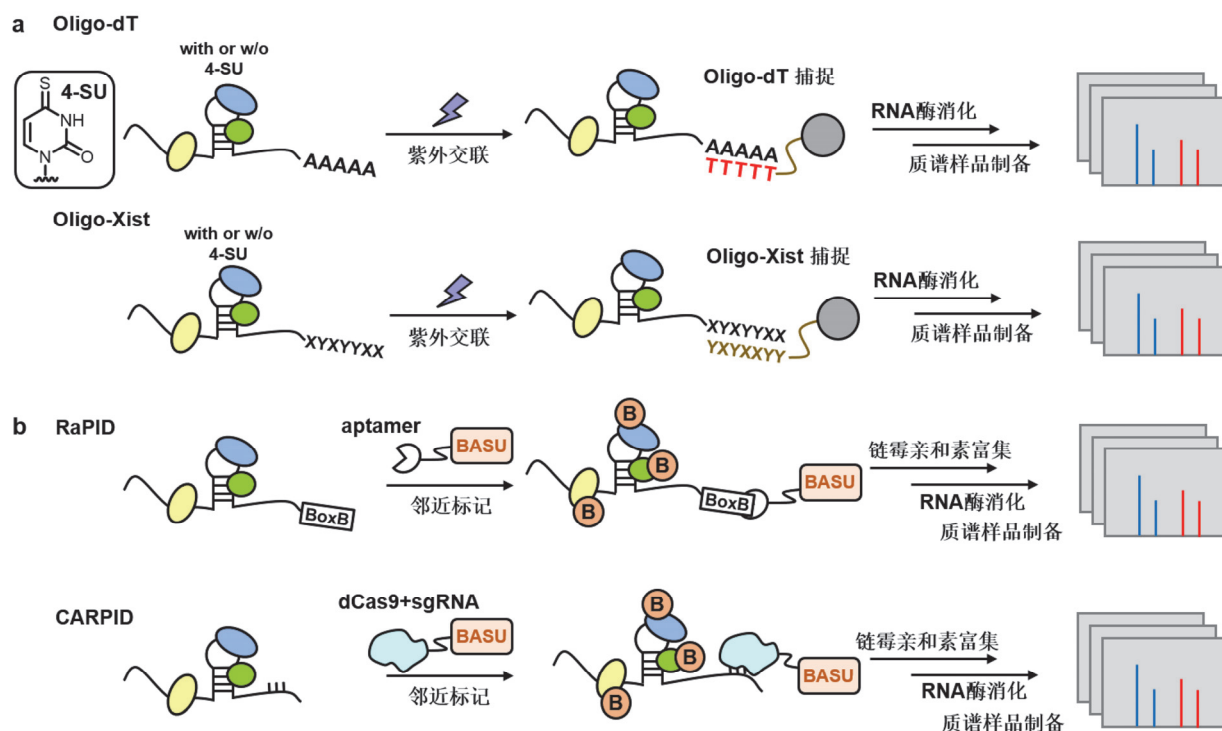


图 2 研究特定 RNA 的结合蛋白质组. (a) 利用寡聚核苷酸捕捉 RNA-蛋白复合物^[38-39,42]. (b) 利用邻近标记酶标记特定 RNA 的相互作用蛋白^[43-44]
Figure 2 Profiling RNA binding proteome of specific RNAs. (a) RNA-protein complexes captured by oligonucleotides^[38-39,42]. (b) Proteins interacted with specific RNA labeled by proximity labeling enzyme^[43-44]

mutant engineered from *Bacillus subtilis*), 并融合在适配体 λ -N 上, 同时将目标 RNA 与 BoxB 融合^[46](图 2b 上). 由于 λ -N 和 BoxB 可以特异性结合, BASU 就能够标记目标 RNA 邻近的 RBPs, 从而利用链霉亲和素富集该 RNA 的结合蛋白质组. 2020 年, Yan 课题组^[47]也采用了 BASU 这一邻近标记酶发展了 CARPID (CRISPR-assisted RNA-protein interaction detection method). 该策略将 dCasRx 的靶向元件与 BASU 融合表达, 利用 sgRNA 锚定目标 RNA, 实现了精准的靶向, 稀释掉了非特异性相互作用带来的噪声干扰(图 2b 下). 最终他们鉴定到了 73 个 Xist 的 RBPs, 其中包括 TAF15 等新发现的相互作用蛋白.

除了生物素连接酶之外, 过氧化物酶 APEX2 (ascorbate peroxidases, APEX) 也被用于特定 RNA 结合蛋白质组的鉴定中. Ting 课题组^[48]分别采用可与 RNA 茎环结构紧密结合的 MS2 标签和无催化活性的 dCas13 蛋白作为靶向人端粒酶 RNA (human telomerase RNA, hTR) 的元件, 与 APEX2 融合表达, 实现了 hTR 邻近 RNA 相互作用蛋白的标记和富集.

邻近标记技术能够针对性地研究目标 RNA 的结合蛋白质组, 可以避免交联效率低带来的问题, 富集操作较为简单. 但不可否认的是, 该方法需要对细胞进行基因改造, 难以在难转染细胞系和原代细胞这类复杂的样本中进行操作. 此外邻近标记酶的标记半径较广, 在拥挤的细胞环境中, 非直接与 RNA 相互作用的蛋白也有可能被标记, 给最终的实验结果带来了干扰.

2.3 代谢非天然核苷酸标记 RNA-RBP 复合物

为了摆脱寡聚核苷酸链富集的限制性, 实现细胞内

无偏向性的 RBPs 捕捉, 研究者们利用非天然核苷酸代谢实现了全局性的 RBPs 鉴定.

2016 年, Bonasio 课题组^[49]利用了非天然核苷酸 4-SU (4-硫尿苷) 发展了 RBR-ID 方法. 4-SU 可以在 365 nm 的紫外光照下与蛋白发生交联, RBP 中的交联肽段在酶切后无法被收集, 导致在质谱上表现出信号减弱或缺失, 因此可以通过实验组与没有代谢 4-SU 的对照组进行信号强度比对来鉴定 RBPs(图 3a). 在胚胎干细胞核内, 他们从肽段层面鉴定到了约 800 个 RBPs, 并且发现了一些尚未被研究的结合位点. 该方法不仅实现了无偏差的 RNA 结合蛋白质组整体鉴定, 还能够提供 RBP 与 RNA 结合的位点信息. 但是该方法所制备的样品中存在很多非 RBPs 的肽段, 对于一些本身丰度较低的蛋白来说, 其交联肽段的信号很容易被淹没, 导致整体蛋白质组的覆盖度降低.

另一种用于 RBP 组学研究的非天然核苷酸为带有炔基的非天然核苷酸 5-EU (5-乙炔基尿苷). 2018 年, Esteban 课题组^[50]及陈兴课题组^[51]分别开发了 RICK (RNA interactome using click chemistry) 和 CARIC (Click Chemistry-assisted RNA-interactome capture) 方法. 他们在细胞中代谢了 5-EU, 在紫外交联 RNA 和相应结合蛋白后, 利用叠氮与炔基之间的生物正交反应使复合物带上生物素标签, 从而能够富集 RNA-RBP 复合物并完成后续质谱鉴定(图 3b). 在 HeLa 细胞中, CARIC 鉴定得到了已知的 mRNA 和非编码 RNA 的结合蛋白, 还发现了 130 个未知的 RBPs. 相比 RBR-ID, 该方法能够将 RBPs 提取出来, 在实现无偏鉴定的同时避免了其他信号的干扰.

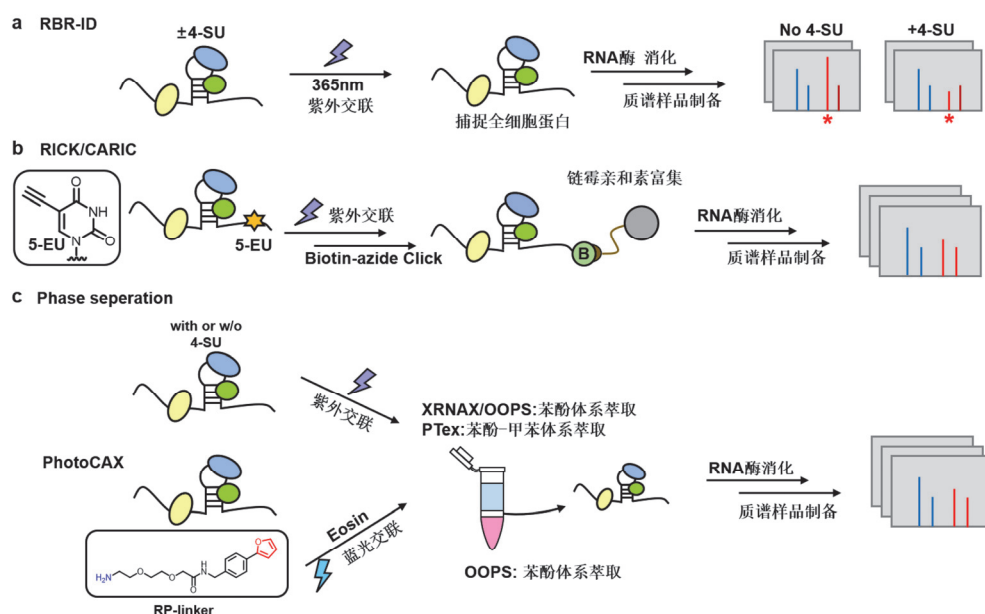


图 3 全局性的 RNA 结合蛋白研究手段. (a) 利用 4-SU 发展的 RBR-ID 方法^[46]. (b) 利用 5-EU 结合点击反应发展的 RICK/CARIC 方法^[47-48]. (c) 利用相分离实现 RBPs 的提取^[50-53]

Figure 3 Unbiased methods for profiling RNA binding proteome. (a) RBR-ID developed by 4-SU^[46]. (b) RICK/CARIC method developed by 5-EU combined with click reaction^[47-48]. (c) RBPs extraction by phase separation^[50-53]

非天然核苷酸代谢为 RNA 安装了一个特殊的标记,使得我们可以采用更灵活的方式研究 RBPs. 但是相较于天然核苷酸其无法实现 100% 的插入,使得一些 RNA 的信息被遗漏,并且非天然核苷酸相关的代谢产物也容易引起假阳性,降低了所获 RNA 结合蛋白质组的准确性和重复性.

2.4 利用物化性质分离 RNA-RBP 复合物

实际上, RNA 和蛋白质都具有其独特的物理化学性质,细胞样品中常用于提取 RNA 的方法就是利用 Trizol(酸性硫氰酸胍/苯酚/氯仿)将 RNA 与 DNA 和蛋白质分离开^[52],可见 RNA-RBP 这一共价复合物肯定拥有与游离的 RNA 与蛋白质不同的性质.

2019 年,三种基于相分离的 RNA-蛋白质相互作用捕捉技术同期发表. 它们是 XRNAX (protein-crosslinked RNA extraction), OOPS (orthogonal organic phase separation) 技术及 PTex (Phenol Toluol extraction) 技术. XRNAX 及 OOPS 技术采用较为标准的 Trizol 配方,对细胞样品进行交联处理后提取间相层,进行纯化和 RNA 酶切后获得全细胞的 RBPs(图 3c). 应用 XRNAX 策略, Krijgsveld 课题组^[53]在 MCF7, HeLa 和 HEK293 三种细胞中一共鉴定到 1753 个 RBPs,并捕捉了亚硝酸盐应激过程中动态的 RNA 结合蛋白质组. 而 Lilley 课题组^[54]则利用 OOPS 策略对 U2OS, HEK293 和 MCF10A 三种细胞系进行了定量蛋白质组学分析,总共鉴定到了 1838 种 RBPs. Beckmann 课题组^[55]发展的 PTex 技术采用了苯酚-甲苯的初始溶剂配方和酸性苯酚,在不同 pH 下进行顺序富集最后提取得到 RNA-RBP 复合物,他们除了哺乳动物细胞外,还完成了沙门氏菌的 RNA 结合蛋白质组鉴定. 基于相变分离的研究策略能够兼容不同类型的 RNA,可以应用于细菌、细胞甚至组织样品的 RBPs 提取,为 RNA-蛋白质相互作用的研究提供了更强有力的工具.

上述的 RBPs 富集策略主要都采用的是紫外交联的方式,也有一部分研究者会选择甲醛或者戊二醛构建 RNA-RBP 之间的共价键. 然而这两种策略都存在交联效率较低的问题,并且会带来额外的蛋白-蛋白交联产物,使得非直接相互作用的蛋白也会被提取出来,降低了特异性. 2022 年,我们课题组^[56]发展了新的 RBP 组学研究手段——PhotoCAX(图 3c). 针对核苷酸和氨基酸的化学性质,我们开发了新的交联探针 RP-linker. 该策略利用了 Eosin 光催化产生单线态氧的性质,细胞经过蓝光照射后被氧化的酪氨酸残基可以与 RP-linker 上的氨基反应产生交联产物,同时 RP-linker 上的呋喃也会被氧化生成 α,β -不饱和醛与胞嘧啶交联^[57-58]. 形成的 RNA-RBP 复合物后续利用 OOPS 中的相分离方法进行提取. 相比于 OOPS 技术,该策略在 HEK 293T 细胞系中鉴定得到了 2044 个 RBPs,其中有 974 个与前者有交集,提高了交联效率. 利用蓝光 LED 进行交联,提高了

实验的可操作性,并且该技术采用的光敏剂和交联分子都是小分子,能够在后续进行修饰改造,提供了深入研究具有特定亚细胞定位的 RBPs 的可能性.

上述基于物化性质进行相分离提取的策略,无需进行基因改造就能够富集不同种类 RNA 的结合蛋白. 不仅可以对多种类型的样品进行研究,还可以分析处于不同时间点或者状态的样品. 这一类全局性的 RBPs 提取手段,为 RBP 组学研究拓宽了道路,目前已经被广泛地用于各类 RNA 相关的研究当中.

2.5 计算模拟分析 RNA 结合蛋白

除了通过实验获取 RBPs 的信息外,利用计算机模拟以及分析也逐渐成为 RBPs 的研究手段^[59]. 最常见的分析方式就是根据已知 RNA 结合结构域,通过数据库比对寻找规律,分析蛋白的结构从而推算其与 RNA 结合的可能性^[60-61]. 这种分析方式成功地发现了一些实验中没有检测到的 RBPs. 然而具有 RBD 相似结构域的蛋白并不一定与 RNA 有直接相互作用,并且一些蛋白是通过 IDR 与 RNA 结合,很容易在模拟时被忽略^[15]. 另一种 RBPs 的预测方法是基于蛋白-蛋白相互作用网络完成的,2017 年 Yeo 课题组^[62]报道了新的 RBPs 预测方法 SONAR (support vector machine obtained from neighborhood associated RBPs). 他们认为,当一个蛋白能够与越多 RBPs 发生相互作用,它就越可能是 RBP. 因此基于目前已知的所有 RBPs 和目标物种的蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络进行推演,SONAR 鉴定到了人、果蝇和酵母中新发现的 RBPs,并且经 CLIP-seq 分析证实. SONAR 是完全基于已知的数据库,容易受到数据质量和完整性的影响,并且其底层设想存在一定的瑕疵,容易引起假阳性. 因此在已知 RBPs 较少或相互作用网络不完整的体系中,SONAR 的应用受限. 因此想要在理论计算层面对 RBPs 进行更深入地发掘,我们仍需要更好地理解 RNA-蛋白质相互作用的方式,丰富 RBPs 的数据库.

3 空间分辨的 RNA 结合蛋白质组

上述 RNA 结合蛋白质组的研究,为我们提供了大量的信息,但是其中许多蛋白与 RNA 结合所发挥的功能,又或是结合 RNA 对其性质的影响等都还尚未可知. 因此,研究者们开始针对 RBP 的一些性质进行功能性的探索,例如空间分布^[63]. 上文中我们介绍到, RBP 能够介导 RNA 的出核和转运,并且参与 mRNA 在内质网膜上的共翻译过程. 除此之外,利用 APEX-seq 研究空间转录组时, Ting 课题组^[64]发现线粒体外膜上存在相当数量的 RNA. 因此 RBP 的空间分布,对其具体功能的探索具有相当重要的意义.

此前曾有研究者利用核质分离的方式研究细胞核内的 RBPs^[65],但这种方式所获的各组分之间的污染比较严重,且无法精确地研究一些特定的亚细胞结构,尤其容易丧失细胞器膜上的蛋白信息. 因此在 2021 年,

Ting 课题组^[66]利用 APEX2 的空间组学研究优势, 结合 OOPS 的 RBPs 提取技术, 发展了 APEX-PS 策略(图 4 上). 利用该策略, 他们得到了细胞核、核仁以及线粒体外膜的 RNA 结合蛋白质组信息.

他们在无膜的核仁中鉴定得到大量经典的核仁内 RBPs, 比如核糖体蛋白和 snoRNP 组成蛋白等等. 另外还发现了九个未知的核仁 RBPs, 其中他们验证了 MIS18A 和 ATAD5, 发现它们的确具有 RNA 结合能力以及核仁定位. 在嘌呤霉素的处理下, APEX-PS 鉴定得到 15 个不依赖于核糖体而结合 RNA 的线粒体外膜 RBPs. 其中对 SYNJ2BP 进一步的功能探索中, 他们发现这一蛋白能够影响 5 个 mRNA 对线粒体外膜的靶向, 其中 3 个对应的蛋白是氧化磷酸化复合物的重要成分. 在细胞压力下, 敲除 SYNJ2BP 会显著延缓这五个 mRNA 靶标的蛋白合成速度, 说明 SYNJ2BP 其可以通过调控线粒体外膜上特定 mRNA 的翻译从而参与到细胞压力反馈过程中.

这一研究充分说明, RBP 空间组的研究能够为我们解析细胞生理过程的分子机制提供相当重要的信息. 随着空间蛋白质组学技术的发展, 其可以很好地与 RBPs 提取技术结合起来, 完成这些问题的探索^[45]. 例如在应激过程产生的一些无膜细胞器, 如应激颗粒, P body 还有炎症小体中, 都存在着 RNA 和蛋白质之间的相互作用^[67]. 目前研究无膜细胞器蛋白质组的主要方法是邻近标记技术, 如果能够将近标记酶与无膜细胞器中已知的标志蛋白融合表达(图 4 中), 利用组学手段解析该类空间限域中的 RBPs, 对于理解无膜细胞器的形成和变化有所助益, 特别是神经退行性疾病这类有丰富相变

的体系. 另外, 还可以将分析得到的 RBP 作为靶标, 调控生理过程, 助力药物研发.

4 RNA 结合蛋白的翻译后修饰组

蛋白质的另一重要性质就是翻译后修饰, 其极大地提高了蛋白的异质性, 使得蛋白具有更为多样的功能. 对于 RBPs 来说, 翻译后修饰可能会影响它与 RNA 的相互作用, 来调控其在生理过程中的功能. 以神经退行性疾病为例, RBP 上翻译后修饰的发生或变化是其病理性变化的关键^[68]. 肌萎缩侧索硬化症(ALS)和额颞叶痴呆(FTD)中有两个极为关键的 RBPs——FUS^[69-70]和 TDP-43^[71]. FUS 上具有丰富的修饰位点, 其 N 端低复杂度区域的丝氨酸/苏氨酸磷酸化在体外实验中能够降低相分离的程度^[72], 而 RRM 区域上的乙酰化能够调控与 RNA 的相互作用^[73]. 对于 TDP-43 来说, 糖基化修饰抑制了其自身的过度磷酸化, 使得其在培养细胞中的溶解度增加, 并提高它对 mRNA 的剪接活性^[74]. 另外 TDP-43 的多聚 ADP 核糖基化修饰(Poly(ADP-ribosyl)-ation, PARylation)是其形成应激颗粒的决定因素之一, 对于神经系统中异常蛋白聚集具有重要调控功能^[75].

在植物细胞上的研究也同样说明了翻译后修饰对于 RNA-RBP 相互作用的影响. 免疫调节 RNA 结合蛋白 IRR 在上游植物诱导肽受体(Plant Elicitor Peptides Receptors, PEPRs)激活后能够瞬时去磷酸化, 减少与 CPK28 的结合, 抑制正常的选择性剪接. CPK28 的功能受损导致免疫信号转导和防御能力的增强, 同时反馈调节 PEPR 的信号转导能力. 因此针对 RBPs 的功能探索

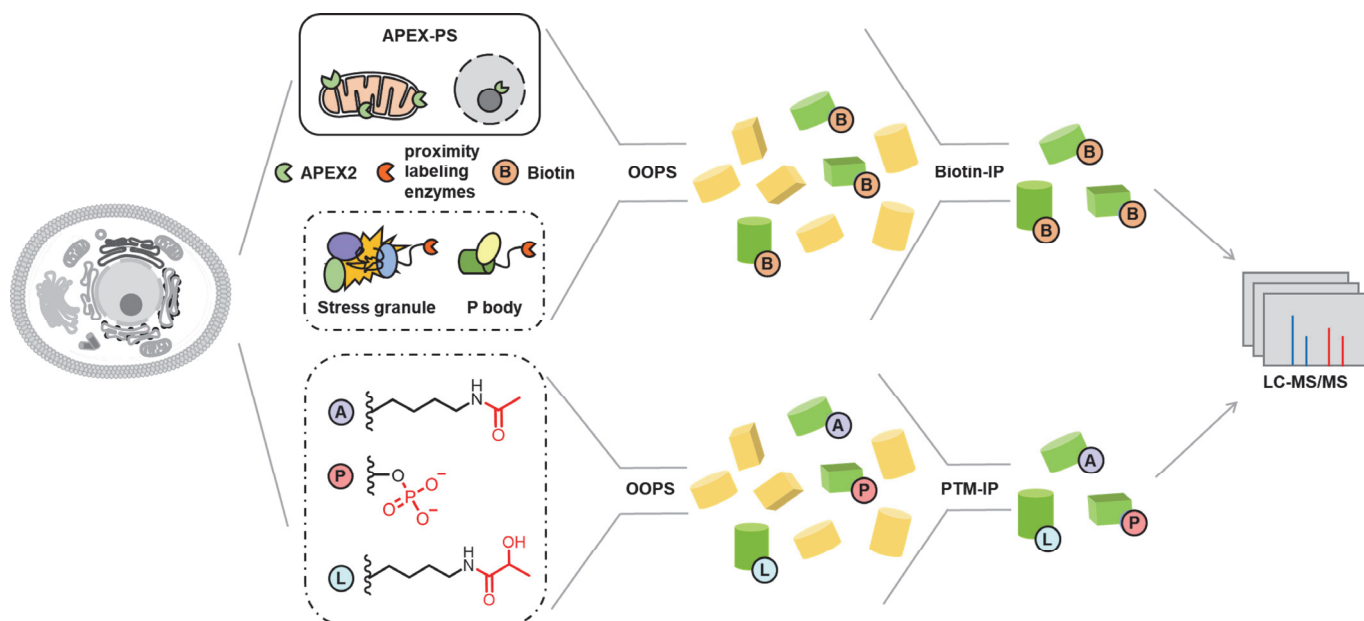


图 4 功能性 RNA 结合蛋白质组的研究手段及展望. 结合邻近标记技术研究亚细胞空间的 RBPs 及结合翻译后修饰富集手段研究 RBP 的翻译后修饰组

Figure 4 Tool and prospect of functional RNA binding proteomics. Profiling subcellular RNA-binding proteomes with proximity labeling techniques and profiling post-translational modification proteome of RBP with corresponding enrichment methods

中, 翻译后修饰是非常值得关注的性质^[76].

在已有的 RNA 结合蛋白质组学研究基础上, Flynn 和 Spitale 团队^[77]将 RBPs 与蛋白质翻译后修饰数据库进行交叉比对, 发现翻译后修饰广泛存在于 RBPs 中, 其中最为丰富的是磷酸化. 不仅如此, 与 74.5% 的蛋白质的随机翻译后修饰位点相比, RBPs 的翻译后修饰位点具有明显的保守性, 说明这些位点对于进化过程具有重要作用. 在分析疾病相关的数据时, 他们发现大量 RBPs 上的翻译后修饰位点与癌症相关. 例如 SF3B1 的 K700E 就是一个突变十分频繁的位点, 谷氨酸突变能够破坏该位点的泛素化从而影响了其与 pre-mRNA 的相互作用以及对分支点序列的识别, 增加了隐藏位点的剪切^[78]. 另外 TP53 上 230 位的甲基化对蛋白功能的影响也十分突出.

针对单个 RBP 的翻译后修饰分析以及全局性的交叉比对都揭示了翻译后修饰对 RBP 功能及其在细胞动态过程的扮演的角色所具有的巨大影响. 然而对于 RBP 翻译后修饰组, 目前尚未有较好的研究工具或者富集流程. 在第二节中, 我们介绍了全局性的 RBPs 分离手段 OOPS, 它能够用于复杂的细胞或者组织样本, 如果将其和翻译后修饰的富集手段结合起来(图 4 下), 有望实现 RBP 翻译后修饰组的鉴定, 并针对某一细胞状态或者特定疾病模型中分析其修饰水平的动态变化. 在所获得的蛋白质组及修饰信息中, 探索 RBP 参与生理过程的分子机制.

5 总结与展望

从 2012 年利用 Oligo-dT 磁珠捕捉带有 poly-A 尾巴的 RNA-RBP 复合物开始, 研究者们已经开发出多种高通量的 RBPs 鉴定手段, 绘制细胞层面 RNA-蛋白质的相互作用图谱, 为深入了解转录后调控的分子机制提供了强有力的工具. 这些 RBP 组学研究工具, 利用不同的交联方式以固定 RNA-RBP 间的非共价作用, 并采取不同的富集方式获取 RNA-RBP 复合物. 不论是特定的 RNA 还是无偏的全局 RNA, 都有相应捕捉其结合蛋白质的手段. 在现有基础上, RBPs 的组学解析还需要从以下几个方面发展以达成对生理过程的进一步理解.

在鉴定工具方面, 目前的交联方法还有很大的进步空间, 即使一定程度上规避了甲醛交联引起的假阳性和 UV 交联的低效, 利用光催化实现共价交联的方式效率仍有待提升. 从操作层面上看, 多次孵育光敏剂和交联分子可能对细胞的实时状态仍有影响. 因此发展更高效安全的交联手段如设计新的交联分子, 对提高 RBPs 的鉴定效率来说是较为可行的. 在 RNA-RBP 复合物富集方法上, 可以尝试萃取效率更高的溶剂成分和配比, 缩短实验流程从而尽可能地降低系统误差. 改进 RBPs 获取方式, 能够使得最终的数据准确性和可重复性有所提升.

另外, 随着转录组和蛋白质组学数据量的爆炸式增长, 如何发掘组学数据获得有效的信息并针对性地进行研究十分必要. 因此, 围绕 RBPs 的某种关键性质发展功能蛋白质组学研究方法也提上了日程. 目前 RBP 的空间分布与其相互作用 RNA 之间的关系仍是迷雾重重, 潜在的分子机制有待发掘. 在 APEX-PS 之外, 需要有更多的空间蛋白质组学技术应用到该领域. 不仅如此, RNA 转录后修饰和 RBP 翻译后修饰在 RNA-RBP 相互作用和细胞过程的所发挥的功能也是值得探索的宝藏. 目前我们缺乏检测和研究复杂样品中 RBP 翻译后修饰组的方法. 将转录后调控和翻译后事件联系起来, 能够帮助我们解析动态过程中 RNA 直接相关的分子机理.

最后, 验证和分析数据组中的候选蛋白的功能是不可或缺的. 在上述的 RBPs 鉴定手段中, 有一些不仅能够获得蛋白质组的信息, 还能获得相应的 RNA 信息. 解析候选蛋白相互作用的 RNA, 或许能够更好地理解该 RBP 的功能^[10]. 目前已有一系列带有光交联基团的赖氨酸, 它们可以通过代谢插入或者位点特异地引入活细胞的蛋白质中, 研究特定蛋白相互作用组学信息. 其中 Diazirine 基团在 365 nm 的紫外光照下不仅能够交联相互作用的蛋白质, 还能够交联相互作用的 RNA^[79-80]. 这种交联方式分子间距离短, 能够固定直接的相互作用. 采用这种针对性的交联方式并结合 OOPS 流程能够提取相互作用 RNA, 经过测序后绘制该 RBP 的对应的 RNA 图谱. 这样不仅能对所获的 RNA 结合蛋白质组信息进行验证, 还使得复杂的蛋白质组信息能够落到 RNA 层面, 更好地解析 RNA-蛋白质相互作用在生理过程中发挥的功能.

RNA 结合蛋白的组学解析具有很大的应用潜力, 其既可以作为 RBP 功能探索的有用工具, 也可以作为未来药物开发的先导. 但如何能够开发得心应手的工具, 又如何用好这个工具, 还需要研究者共同努力深耕.

作者简介



曾如馨, 2023 年博士毕业于北京大学化学与分子工程学院, 就读期间曾获北京大学博士研究生校长奖学金. 2018 年加入陈鹏教授课题组, 主要研究方向为时空分辨的蛋白质和蛋白质翻译后修饰、蛋白质互作组学.



陈鹏, 北京大学化学与分子工程学院教授、化学生物系主任, 新基石研究员。长期致力于化学与生命科学前沿交叉研究, 系统地发展了适用于活细胞的化学反应, 为生命问题的探索提供了创新的工具和研究方式。尤其是提出并发展了“生物正交剪切反应”, 突破了在活细胞内研究蛋白质功能的技术瓶颈, 并应用于蛋白质药物开发和蛋白质组学研究, 开拓了生物正交化学新方向, 受到国内外同行的高度重视和应用。现任中国化学会化学生物学专业委员会主任、美国化学会 ACS Chemical Biology 执行主编等。

References

- Licatalosi, D. D.; Darnell, R. B. *Nat. Rev. Genet.* **2010**, *11*, 75.
- Lukong, K. E.; Chang, K.-W.; Khandjian, E. W.; Richard, S. *Trends Genet.* **2008**, *24*, 416.
- Chen, M.; Manley, J. L. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 741.
- Gruber, A. J.; Zavolan, M. *Nat. Rev. Genet.* **2019**, *20*, 599.
- Erson-Bensan, A. E. *J. Mol. Endocrinol.* **2016**, *57*, F29.
- Kurosaki, T.; Popp, M. W.; Maquat, L. E. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20*, 406.
- Das, S.; Vera, M.; Gandin, V.; Singer, R. H.; Tutucci, E. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2021**, *22*, 483.
- Calo, E.; Flynn, R. A.; Martin, L.; Spitale, R. C.; Chang, H. Y.; Wysocka, J. *Nature* **2015**, *518*, 249.
- Chen, X.; Huang, C. *Trends Cell Biol.* **2023**, *33*, 625.
- Van Nostrand, E. L.; Freese, P.; Pratt, G. A.; Wang, X.; Wei, X.; Xiao, R.; Blue, S. M.; Chen, J.-Y.; Cody, N. A. L.; Dominguez, D.; Olson, S.; Sundararaman, B.; Zhan, L.; Bazile, C.; Bouvrette, L. P. B.; Bergalet, J.; Duff, M. O.; Garcia, K. E.; Gelboin-Burkhart, C.; Hochman, M.; Lambert, N. J.; Li, H.; McGurk, M. P.; Nguyen, T. B.; Palden, T.; Rabano, I.; Sathe, S.; Stanton, R.; Su, A.; Wang, R.; Yee, B. A.; Zhou, B.; Louie, A. L.; Aigner, S.; Fu, X.-D.; Lécuyer, E.; Burge, C. B.; Graveley, B. R.; Yeo, G. W. *Nature* **2020**, *583*, 711.
- He, S.; Valkov, E.; Cheloufi, S.; Murn, J. *Nat. Rev. Genet.* **2023**, *24*, 276.
- Jankowsky, E.; Harris, M. E. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2015**, *16*, 533.
- Valverde, R.; Edwards, L.; Regan, L. *FEBS J.* **2008**, *275*, 2712.
- Font, J.; Mackay, J. P. In *Engineered Zinc Finger Proteins: Methods and Protocols*, Eds.: Mackay, J. P.; Segal, D. J., Humana Press, Totowa, NJ, **2010**; pp. 479~491.
- Corley, M.; Burns, M. C.; Yeo, G. W. *Mol. Cell* **2020**, *78*, 9.
- Wang, X.; Feng, J.; Xue, Y.; Guan, Z.; Zhang, D.; Liu, Z.; Gong, Z.; Wang, Q.; Huang, J.; Tang, C.; Zou, T.; Yin, P. *Nature* **2016**, *534*, 575.
- Wiedner, H. J.; Giudice, J. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2021**, *28*, 465.
- Buchan, J. R.; Parker, R. *Mol. Cell* **2009**, *36*, 932.
- Parker, R.; Sheth, U. *Mol. Cell* **2007**, *25*, 635.
- Gebauer, F.; Schwarzl, T.; Valcárcel, J.; Hentze, M. W. *Nat. Rev. Genet.* **2021**, *22*, 185.
- Kim, H. J.; Kim, N. C.; Wang, Y.-D.; Scarborough, E. A.; Moore, J.; Diaz, Z.; MacLea, K. S.; Freibaum, B.; Li, S.; Molliex, A.; Kanagaraj, A. P.; Carter, R.; Boylan, K. B.; Wojtas, A. M.; Rademakers, R.; Pinkus, J. L.; Greenberg, S. A.; Trojanowski, J. Q.; Traynor, B. J.; Smith, B. N.; Topp, S.; Gkazi, A.-S.; Miller, J.; Shaw, C. E.; Kottlors, M.; Kirschner, J.; Pestronk, A.; Li, Y. R.; Ford, A. F.; Gitler, A. D.; Benatar, M.; King, O. D.; Kimonis, V. E.; Ross, E. D.; Weihl, C. C.; Shorter, J.; Taylor, J. P. *Nature* **2013**, *495*, 467.
- Martinez, F. J.; Pratt, G. A.; Van Nostrand, E. L.; Batra, R.; Huelga, S. C.; Kapeli, K.; Freese, P.; Chun, S. J.; Ling, K.; Gelboin-Burkhart, C.; Fijany, L.; Wang, H. C.; Nussbacher, J. K.; Broski, S. M.; Kim, H. J.; Lardelli, R.; Sundararaman, B.; Donohue, J. P.; Javaherian, A.; Lykke-Andersen, J.; Finkbeiner, S.; Bennett, C. F.; Ares, M.; Burge, C. B.; Taylor, J. P.; Rigo, F.; Yeo, G. W. *Neuron* **2016**, *92*, 780.
- Lagier-Tourenne, C.; Polymenidou, M.; Cleveland, D. W. *Hum. Mol. Genet.* **2010**, *19*, R46.
- Orr, H. T.; Chung, M.-Y.; Banfi, S.; Kwiatkowski, T. J.; Servadio, A.; Beaudet, A. L.; McCall, A. E.; Duvick, L. A.; Ranum, L. P. W.; Zoghbi, H. Y. *Nat. Genet.* **1993**, *4*, 221.
- Banfi, S.; Servadio, A.; Chung, M.-Y.; Kwiatkowski, T. J.; McCall, A. E.; Duvick, L. A.; Shen, Y.; Roth, E. J.; Orr, H. T.; Zoghbi, H. Y. *Nat. Genet.* **1994**, *7*, 513.
- Burghes, A. H. M.; Beattie, C. E. *Nat. Rev. Neurosci.* **2009**, *10*, 597.
- Zhu, H.; Liu, J.; Cao, X.-T. *Chin. J. Cancer Biother.* **2023**, *30*, 1 (in Chinese). (朱哈, 刘娟, 曹雪涛, 中国肿瘤生物治疗杂志, **2023**, *30*, 1.)
- Tong, J.; Wang, X.; Liu, Y.; Ren, X.; Wang, A.; Chen, Z.; Yao, J.; Mao, K.; Liu, T.; Meng, F.-L.; Pan, W.; Zou, Q.; Liu, J.; Zhou, Y.; Xia, Q.; Flavell, R. A.; Zhu, S.; Li, H.-B. *Sci. Adv.* **2021**, *7*, eabd4742.
- Petkau, G.; Mitchell, T. J.; Chakraborty, K.; Bell, S. E.; D'Angeli, V.; Matheson, L.; Turner, D. J.; Saveliev, A.; Gizlenci, O.; Salerno, F.; Katsikis, P. D.; Turner, M. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 2274.
- Zeng, Q.; Saghaifnia, S.; Chryplewicz, A.; Fournier, N.; Christe, L.; Xie, Y.-Q.; Guillot, J.; Yucel, S.; Li, P.; Galván, J. A.; Karamitopoulou, E.; Zlobec, I.; Ataca, D.; Gallea, F.; Zhang, P.; Rodriguez-Calero, J. A.; Rubin, M.; Tichet, M.; Homicsko, K.; Hanahan, D. *Science* **2022**, *378*, eabl7207.
- Wetzel, R.; Soëll, D. *Nucleic Acids Res.* **1977**, *4*, 1681-1694.
- Greenberg, J. R. *Nucleic Acids Res.* **1979**, *6*, 715.
- Brimacombe, R.; Stiege, W.; Kyriatsoulis, A.; Maly, P. In *Methods Enzymol.* Academic Press, Cambridge, MA, **1988**, Vol. 164, pp. 287~309.
- Meisenheimer, K. M.; Koch, T. H. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1997**, *32*, 101.
- Nechay, M.; Kleiner, R. E. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2020**, *54*, 37.
- Julio, A. R.; Backus, K. M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2021**, *62*, 13.
- Sun, R.-H.; Chen, R.-B. *Chin. J. Biotechnol.* **2023**, *43*, 77 (in Chinese). (孙若航, 陈瑞冰, 中国生物工程杂志, **2023**, *43*, 77.)
- Ramanathan, M.; Porter, D. F.; Khavari, P. A. *Nat. Methods* **2019**, *16*, 225.
- Zhang, Z.; Liu, T.; Dong, H.; Li, J.; Sun, H.; Qian, X.; Qin, W. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, e65.
- Castello, A.; Fischer, B.; Eichelbaum, K.; Horos, R.; Beckmann, B. M.; Strein, C.; Davey, N. E.; Humphreys, D. T.; Preiss, T.; Steinmetz, L. M.; Krijgsveld, J.; Hentze, M. W. *Cell* **2012**, *149*, 1393.
- Baltz, A. G.; Munschauer, M.; Schwanhäusser, B.; Vasile, A.; Murakawa, Y.; Schueler, M.; Youngs, N.; Penfold-Brown, D.; Drew, K.; Milek, M.; Wyler, E.; Bonneau, R.; Selbach, M.; Dieterich, C.; Landthaler, M. *Mol. Cell* **2012**, *46*, 674.
- Perez-Perri, J. I.; Rogell, B.; Schwarzl, T.; Stein, F.; Zhou, Y.; Rettel, M.; Brosig, A.; Hentze, M. W. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4408.
- Conrad, T.; Albrecht, A.-S.; de Melo Costa, V. R.; Sauer, S.; Meierhofer, D.; Ørom, U. A. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11212.
- Chu, C.; Zhang, Q. C.; da Rocha, S. T.; Flynn, R. A.; Bharadwaj, M.; Calabrese, J. M.; Magnuson, T.; Heard, E.; Chang, H. Y. *Cell* **2015**, *161*, 404.
- Liu, Y.; Ge, Y.; Zeng, R.; Ngai, W. S.; Fan, X.; Chen, P. R. *CCS Chem.* **2023**, *5*, 802.
- Ramanathan, M.; Majzoub, K.; Rao, D. S.; Neela, P. H.; Zarnegar, B. J.; Mondal, S.; Roth, J. G.; Gai, H.; Kovalski, J. R.; Siprashvili, Z.; Palmer, T. D.; Carette, J. E.; Khavari, P. A. *Nat. Methods* **2018**, *15*, 207.
- Yi, W.; Li, J.; Zhu, X.; Wang, X.; Fan, L.; Sun, W.; Liao, L.; Zhang, J.; Li, X.; Ye, J.; Chen, F.; Taipale, J.; Chan, K. M.; Zhang, L.; Yan, J. *Nat. Methods* **2020**, *17*, 685.
- Han, S.; Zhao, B. S.; Myers, S. A.; Carr, S. A.; He, C.; Ting, A. Y. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2020**, *117*, 22068.
- He, C.; Sidoli, S.; Warneford-Thomson, R.; Tatomer, D. C.; Wilusz, J. E.; Garcia, B. A.; Bonasio, R. *Mol. Cell* **2016**, *64*, 416.
- Ban, X.; Guo, X.; Yin, M.; Tariq, M.; Lai, Y.; Kanwal, S.; Zhou, J.; Li, N.; Lv, Y.; Pulido-Quetglas, C.; Wang, X.; Ji, L.; Khan, M. J.; Zhu, X.; Luo, Z.; Shao, C.; Lim, D.-H.; Liu, X.; Li, N.; Wang, W.; He, M.; Liu, Y.-L.; Ward, C.; Wang, T.; Zhang, G.; Wang, D.; Yang,

- J.; Chen, Y.; Zhang, C.; Jauch, R.; Yang, Y.-G.; Wang, Y.; Qin, B.; Anko, M.-L.; Hutchins, A. P.; Sun, H.; Wang, H.; Fu, X.-D.; Zhang, B.; Esteban, M. A. *Nat. Methods* **2018**, *15*, 213.
- [51] Huang, R.; Han, M.; Meng, L.; Chen, X. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2018**, *115*, E3879.
- [52] Rio, D. C.; Ares, M. Jr.; Hannon, G. J.; Nilsen, T. W. *Cold Spring Harb Protoc.* **2010**, *2010*, pdb.prot5439.
- [53] Trendel, J.; Schwarzl, T.; Horos, R.; Prakash, A.; Bateman, A.; Hentze, M. W.; Krijgsveld, J. *Cell* **2019**, *176*, 391.
- [54] Queiroz, R. M. L.; Smith, T.; Villanueva, E.; Marti-Solano, M.; Monti, M.; Pizzinga, M.; Mirea, D.-M.; Ramakrishna, M.; Harvey, R. F.; Dezi, V.; Thomas, G. H.; Willis, A. E.; Lilley, K. S. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 169.
- [55] Urdaneta, E. C.; Vieira-Vieira, C. H.; Hick, T.; Wessels, H.-H.; Figini, D.; Moschall, R.; Medenbach, J.; Ohler, U.; Granneman, S.; Selbach, M.; Beckmann, B. M. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 990.
- [56] Luo, H.; Tang, W.; Liu, H.; Zeng, X.; Ngai, W. S. C.; Gao, R.; Li, H.; Li, R.; Zheng, H.; Guo, J.; Qin, F.; Wang, G.; Li, K.; Fan, X.; Zou, P.; Chen, P. R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2022**, *61*, e202202008.
- [57] Di Mascio, P.; Martinez, G. R.; Miyamoto, S.; Ronsein, G. E.; Medeiros, M. H. G.; Cadet, J. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 2043.
- [58] Op de Beeck, M.; Madder, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 796.
- [59] Hentze, M. W.; Castello, A.; Schwarzl, T.; Preiss, T. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 327.
- [60] Bono, F.; Ebert, J.; Lorentzen, E.; Conti, E. *Cell* **2006**, *126*, 713.
- [61] Gerstberger, S.; Hafner, M.; Tuschl, T. *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15*, 829.
- [62] Brannan, K. W.; Jin, W.; Huelga, S. C.; Banks, C. A. S.; Gilmore, J. M.; Florens, L.; Washburn, M. P.; Van Nostrand, E. L.; Pratt, G. A.; Schwinn, M. K.; Daniels, D. L.; Yeo, G. W. *Mol. Cell* **2016**, *64*, 282.
- [63] Benoit Bouvrette, L. P.; Wang, X.; Boulais, J.; Kong, J.; Syed, E. U.; Blue, S. M.; Zhan, L.; Olson, S.; Stanton, R.; Wei, X.; Yee, B.; Van Nostrand, E. L.; Fu, X.-D.; Burge, C. B.; Graveley, B. R.; Yeo, G. W.; Lécuyer, E. *Nucleic Acids Res.* **2023**, *51*, D1549.
- [64] Fazal, F. M.; Han, S.; Parker, K. R.; Kaewsapsak, P.; Xu, J.; Boettiger, A. N.; Chang, H. Y.; Ting, A. Y. *Cell* **2019**, *178*, 473.
- [65] Backlund, M.; Kulozik, A. E. In *The Integrated Stress Response: Methods and Protocols*, Eds.: Matějů, D.; Chao, J. A., Springer US, New York, NY, **2022**, pp. 291~304.
- [66] Qin, W.; Myers, S. A.; Carey, D. K.; Carr, S. A.; Ting, A. Y. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 4980.
- [67] Ivanov, P.; Kedersha, N.; Anderson, P. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2019**, *11*, a032813.
- [68] Sternburg, E. L.; Gruijs da Silva, L. A.; Dormann, D. *Trends Biochem. Sci.* **2022**, *47*, 6.
- [69] Vance, C.; Rogelj, B.; Hortobágyi, T.; De Vos, K. J.; Nishimura, A. L.; Sreedharan, J.; Hu, X.; Smith, B.; Ruddy, D.; Wright, P.; Ganesalingam, J.; Williams, K. L.; Tripathi, V.; Al-Saraj, S.; Al-Chalabi, A.; Leigh, P. N.; Blair, I. P.; Nicholson, G.; de Belleroche, J.; Gallo, J.-M.; Miller, C. C.; Shaw, C. E. *Science* **2009**, *323*, 1208.
- [70] Neumann, M.; Rademakers, R.; Roeber, S.; Baker, M.; Kretzschmar, H. A.; Mackenzie, I. R. A. *Brain* **2009**, *132*, 2922.
- [71] Neumann, M.; Sampathu, D. M.; Kwong, L. K.; Truax, A. C.; Micsenyi, M. C.; Chou, T. T.; Bruce, J.; Schuck, T.; Grossman, M.; Clark, C. M.; McCluskey, L. F.; Miller, B. L.; Masliah, E.; Mackenzie, I. R.; Feldman, H.; Feiden, W.; Kretzschmar, H. A.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. Y. *Science* **2006**, *314*, 130.
- [72] Monahan, Z.; Ryan, V. H.; Janke, A. M.; Burke, K. A.; Rhoads, S. N.; Zerze, G. H.; O'Meally, R.; Dignon, G. L.; Conicella, A. E.; Zheng, W.; Best, R. B.; Cole, R. N.; Mittal, J.; Shewmaker, F.; Fawzi, N. L. *EMBO J.* **2017**, *36*, 2951.
- [73] Arenas, A.; Chen, J.; Kuang, L.; Barnett, K. R.; Kasarskis, E. J.; Gal, J.; Zhu, H. *Hum. Mol. Genet.* **2020**, *29*, 2684.
- [74] Zhao, M.-J.; Yao, X.; Wei, P.; Zhao, C.; Cheng, M.; Zhang, D.; Xue, W.; He, W.-T.; Xue, W.; Zuo, X.; Jiang, L.-L.; Luo, Z.; Song, J.; Shu, W.-J.; Yuan, H.-Y.; Liang, Y.; Sun, H.; Zhou, Y.; Zhou, Y.; Zheng, L.; Hu, H.-Y.; Wang, J.; Du, H.-N. *EMBO Rep.* **2021**, *22*, e51649.
- [75] Duan, Y.; Du, A.; Gu, J.; Duan, G.; Wang, C.; Gui, X.; Ma, Z.; Qian, B.; Deng, X.; Zhang, K.; Sun, L.; Tian, K.; Zhang, Y.; Jiang, H.; Liu, C.; Fang, Y. *Cell Res.* **2019**, *29*, 233.
- [76] Dressano, K.; Weckwerth, P. R.; Poretsky, E.; Takahashi, Y.; Villarreal, C.; Shen, Z.; Schroeder, J. I.; Briggs, S. P.; Huffaker, A. *Nat. Plants* **2020**, *6*, 1008.
- [77] England, W. E.; Wang, J.; Chen, S.; Baldi, P.; Flynn, R. A.; Spitale, R. C. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, 4329.
- [78] Bellare, P.; Small, E. C.; Huang, X.; Wohlschlegel, J. A.; Staley, J. P.; Sontheimer, E. J. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 444.
- [79] Dziuba, D.; Hoffmann, J.-E.; Hentze, M. W.; Schultz, C. *ChemBioChem* **2020**, *21*, 88.
- [80] Weidmann, C. A.; Mustoe, A. M.; Jariwala, P. B.; Calabrese, J. M.; Weeks, K. M. *Nat. Biotechnol.* **2021**, *39*, 347.

(Lu, Y.)