

DOI: 10.13376/j.cbbs/2014037

文章编号: 1004-0374(2014)03-0239-09



伊成器 教授

伊成器实验室主要通过化学生物学、结构生物学、高通量测序等手段,对核酸修饰的生物功能及其生理调控机制进行研究。一方面,核酸的化学修饰对许多重要生命过程(比如5-甲基胞嘧啶及其氧化产物对基因表达及细胞发育过程、RNA编辑对选择性剪接及蛋白质翻译过程等等)都有着广泛而深远的影响;另一方面,异常的核酸修饰(比如DNA及RNA损伤)则会导致细胞衰老、死亡及致癌性变异等严重后果。因此,我们将通过灵敏、高效的检测手段的建立,对许多核酸修饰的产生及调控过程进行研究,并对其生物功能进行阐述。具体的研究内容包括:(1)新颖RNA修饰对小分子RNA(microRNA)及长链非编码RNA(lincRNA)功能的影响及机理;(2)碱基切除及核苷酸切除DNA修复通路在防止细胞衰老及癌变过程中的分子机制;(3)以核酸修饰为机理的表观遗传学。

RNA中的假尿苷修饰: 形成、功能及鉴定

李笑雨^{1#}, 孙芳芳^{2#}, 伊成器^{1,3*}

(1 北京大学生命科学学院, 蛋白质与植物基因研究国家重点实验室, 北京100871;

2 清华大学生命科学学院, 北京100084;

3 北京大学合成与功能生物分子中心, 北京大学-清华大学生命科学联合中心, 北京100871)

摘 要: 假尿苷修饰是目前已知丰度最高的RNA修饰, 广泛存在于多个物种的多类RNA中。作为尿苷的5位异构体, 假尿苷在真核生物中的形成机制主要有两种: 依赖于假尿苷合酶或是依赖于H/ACA核糖核蛋白复合体。假尿苷修饰在多个生物学过程中发挥作用, 同时不同位点的假尿苷修饰具有不同的功能。而人为地在mRNA终止密码子中引入假尿苷修饰则可以使其具有编码能力, 这改变了传统的中心法则。目前对于RNA中假尿苷的研究主要是通过2D-TLC及液质联用对其进行定量分析, 使用CMCT标记假尿苷及RNase H和SCARLET的方法对其进行定位。

关键词: 假尿苷; 形成; 功能; 定位

中图分类号: Q525; Q528^{+.2}; Q752 **文献标志码:** A

Pseudouridines in RNA: formation, function and characterization

LI Xiao-Yu^{1#}, SUN Fang-Fang^{2#}, YI Cheng-Qi^{1,3*}

(1 State Key Laboratory of Protein and Plant Gene Research, School of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China; 2 School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 3 Peking-Tsinghua Joint Center for Life Science, Synthetic and Functional Biomolecules Center, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: Pseudouridine is the most abundant RNA modification and it is widely spread in various RNAs of many organisms. As a rotation isomer of uridine, it is formed mainly through two mechanisms: stand-alone pseudouridine synthases and Box H/ACA Ribonucleoprotein. Pseudouridylation affects many cellular processes, with distinct

收稿日期: 2013-11-21

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31270838)

*通信作者: E-mail: chengqi.yi@pku.edu.cn

#共同第一作者

functions at different sites in RNA. When incorporated into mRNA artificially, nonsense codons-containing pseudouridine can be converted into sense codons. To characterize pseudouridine in RNA, 2D-TLC and LC-MS have been used for quantification purposes, while CMCT-based labeling method, RNase H-based digestion method and most recently “SCARLET” method can all be applied for mapping the pseudouridine sites in RNA.

Key words: pseudouridine; formation; function; characterization

自然界中的RNA很多都发生了转录后修饰。这些转录后修饰在RNA的结构、功能及代谢等方面都有重要的作用。目前已经发现107种RNA修饰(<http://mods.rna.albany.edu/>), 其中假尿苷修饰是最早发现并且丰度最高的一种RNA修饰^[1-2], 因此它也被称为“第五个碱基”。假尿苷是尿苷的5位核糖异构体(图1), 广泛存在于多种RNA中(tRNA、rRNA、snRNA与snoRNA等)。与尿苷相比, 假尿苷的碱基与核糖之间不是通过N-C键而是C-C键相连。假尿苷的异构化并没有影响经典的碱基互补配对, 但使N1位变为了一个质子的供体, 这可能是假尿苷具有与其他碱基不同的特性并能够使得很多RNA结构具有稳定性的重要原因。

1 假尿苷的形成

RNA中假尿苷的形成主要有两种机制^[1-2], 一种是只依赖于蛋白质即假尿苷合酶的机制, 在这种机制中一个蛋白质同时发挥识别与催化的作用; 另外一种则是依赖于一类H/ACA box小核仁RNA(snRNA)与相应的蛋白质形成的复合物, 在这种机制中RNA起到识别作用, 与其结合的蛋白质发挥催化作用。在原核生物中只存在第一种机制, 在真

核生物中这两种机制同时存在。下面将对这两种机制进行详细介绍。

1.1 只依赖于假尿苷合酶的机制

对于假尿苷合酶, 目前主要分为五个家族: RluA、RsuA、TruA、TruB和TruD^[3-4]。虽然不同家族的假尿苷合酶序列有所差异, 但是它们都有一个保守的核心折叠区域与活性位点。除了这个保守区域外, 不同家族的假尿苷合酶结构会有所差异, 并且对于这些酶, 不同的酶有其相应的底物的专一性。例如, TruA家族的蛋白催化tRNA反密码子环上38~40位的尿苷变为假尿苷, TruB家族蛋白负责催化产生tRNA的TΨC环上55位的假尿苷修饰, TruD家族蛋白对tRNA中D茎环中15位尿苷发挥作用(图2)。RsuA家族蛋白主要对原核生物中rRNA上的位点具有高度位点特异的催化活性。RluA家族也主要催化原核生物中rRNA上假尿苷修饰的产生; 但是与RsuA家族蛋白相比, RluA家族蛋白不仅催化的位点有所差异, 并且具有更广泛的催化位点区域^[4-5]。

1.2 依赖于H/ACA核酸蛋白复合物的催化机制

H/ACA核酸蛋白复合物的催化机制多存在于真核生物中, 主要催化rRNA和snRNA的假尿苷

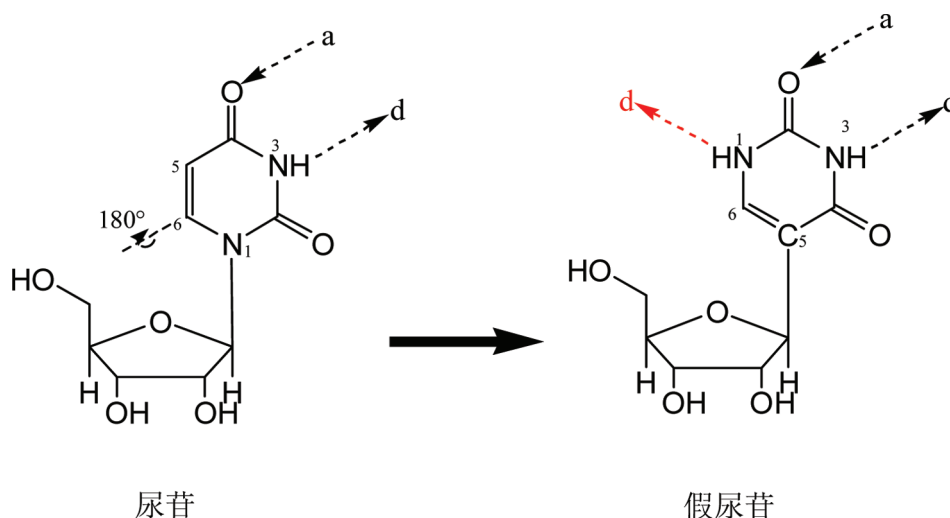
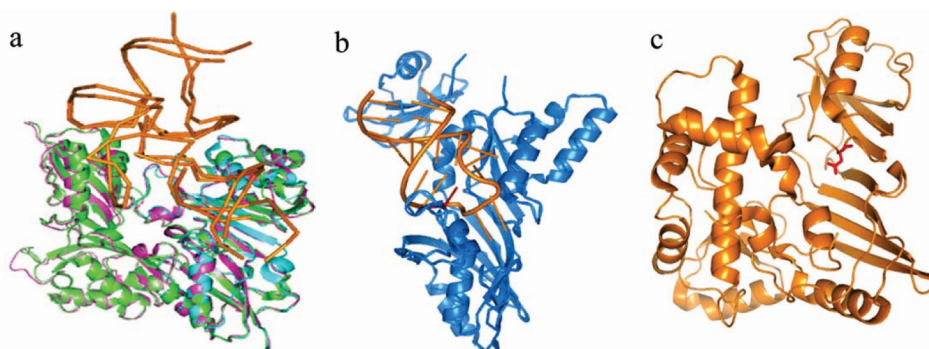


图1 尿苷和假尿苷(d为氢键供体、a为受体)



a: TruA-tRNA复合物由三个蛋白tRNA复合物的C α 骨架组合而成; b: TruB(蓝色)与tRNA的TSL(T Stem-Loop)(黄色)复合物, 红色表示U55即假尿嘧啶化位点; c: TruD结构, 红色表示Asp80催化位点。TruA、TruB、TruD蛋白质数据库(protein data bank, PDB)登记号分别为2NQP、1K8W、1SI7。

图2 TruA^[6]、TruB^[7]、TruD^[8]结构

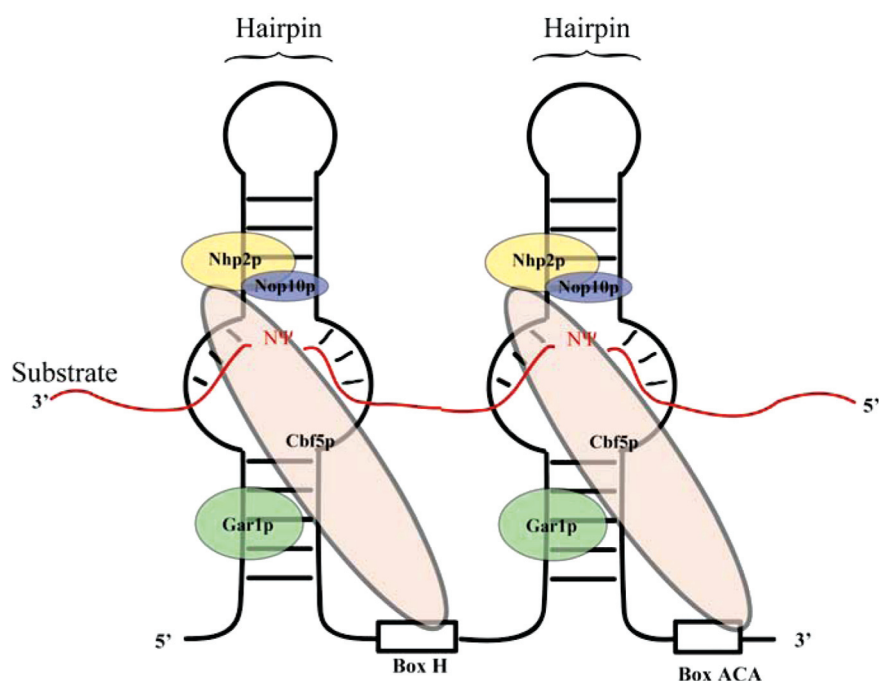
修饰(图3)。H/ACA核糖核蛋白复合物是由H/ACA snRNA与四个核心蛋白:Nhp2、Gar1、Nop10和Cbf5(酵母, 人类同源蛋白为Dyskerin)组成^[9-11]。H/ACA snRNA包括两个茎环结构, 在两个茎环结构之间存在一段ANANNA保守序列, 称为“H box”, 而在第二个茎环结构之后会紧接着三个“ACA”序列, 该序列被称为“ACA box”^[12-13]。每个茎环结构的中部会有一个由未配对单链RNA形成的环, 这个环也被称为“pseudouridine pocket”,

通过这个环与底物RNA互补配对, 进而决定了假尿苷修饰位点的特异性。因此, H/ACA snRNA在催化过程中主要起到识别与向导的作用。

2 假尿苷修饰的功能

2.1 rRNA中的假尿苷修饰

rRNA中的假尿苷修饰普遍存在于rRNA的大小亚基中, 并且主要聚集分布在功能重要区域, 例如肽基转移酶中心(PTC)、解码中心和A-site finger



在Nhp2、Gar1、Nop10和Cbf5四种蛋白中, Cbf5蛋白负责催化尿苷变为假尿苷。Cbf5蛋白含有一个与TruB家族蛋白类似的催化结构域, 但是与其他假尿苷合酶不同的是, 它并不具有与RNA结合的结构域^[14-15]。

图3 真核生物box H/ACA核糖核蛋白^[16]

区域 (ASF)^[2,17], 它的分布暗示着假尿苷修饰可以影响 rRNA 的功能。这些区域的假尿苷修饰可能会影响 rRNA 的折叠、核糖体的组装以及维持相应的高级结构^[1,14]。

当敲除酵母细胞中与 PTC 区域假尿苷相关的 snoRNA 使该区域的假尿苷修饰缺失时, 虽然发现单一的 snoRNA 缺失对生长的影响较小, 但是当所有的 snoRNA 都缺失时会对生长速度产生较大的影响^[18]。解码中心的假尿苷缺失则会引起生长速度变慢, 小亚基 RNA 有明显的缺陷, 氨基酸掺入速率变慢^[19]。

2.2 snRNA中的假尿苷修饰

在 pre-mRNA 剪切过程中, snRNA(U1、U2、U3、U4、U5、U6) 和一系列蛋白质形成的剪切体对于内含子的剪切发挥重要作用^[13]。在所有的 snRNA 中基本上都发生了假尿苷修饰, 并且这些修饰在不同的物种之间有很高的保守性^[13,20]。例如, 在脊椎动物 U5 snRNA 中保守环上的 $\Psi 43$, 也存在酵母的 U5 snRNA 中的类似位点。与 rRNA 中的假尿苷分布类似, snRNA 中的假尿苷也主要聚集分布在功能重要的区域。例如, U1 snRNA 中的假尿苷修饰分布在 5' 末端区域, 这个区域在早期剪切过程中对识别 5' 剪切位点具有重要作用。snRNA 中的假尿苷修饰的分布也说明了它对剪切 RNA 具有重要功能^[21], 并且目前的研究表明, snRNA 上的假尿苷修饰主要是通过 RNA 与 RNA 之间的相互作用在剪切过程中发挥作用。研究 snRNA 中的假尿苷修饰的作用可以通过三种体系: 一种是体外系统, 一种是非洲爪蟾卵微注射系统, 一种是酵母系统^[13-14,20-21]。

在这六种主要的 snRNA 中, U2 上含有最多的假尿苷修饰位点, 并且被研究的最多^[21]。在体外系统中, 将合成的 snRNA 与 HeLa 细胞提取物共孵育, 使其发生假尿苷修饰。5- 氟尿苷是假尿苷形成的抑制剂, 当 5- 氟尿苷替代 RNA 中的尿苷时, 该位点不能发生假尿苷修饰。当体外合成的 snRNA 掺入了 5- 氟尿苷后, 由于不能发生正常的假尿苷修饰, 不含有假尿苷修饰的 snRNA 将不能形成正常的 snRNP^[22]。利用非洲爪蟾微注射系统, 将体外合成的不含有假尿苷修饰的 U2 snRNA 注射到缺失 U2 的非非洲爪蟾卵中, 发现这会影响 pre-mRNA 剪切。因此, U2 snRNA 中的假尿苷修饰在 snRNP 的形成、剪切体的组装和 pre-mRNA 的剪切中有重要作用^[23]。

2.3 mRNA上的假尿苷修饰

假尿苷修饰被发现广泛存在于 tRNA、rRNA

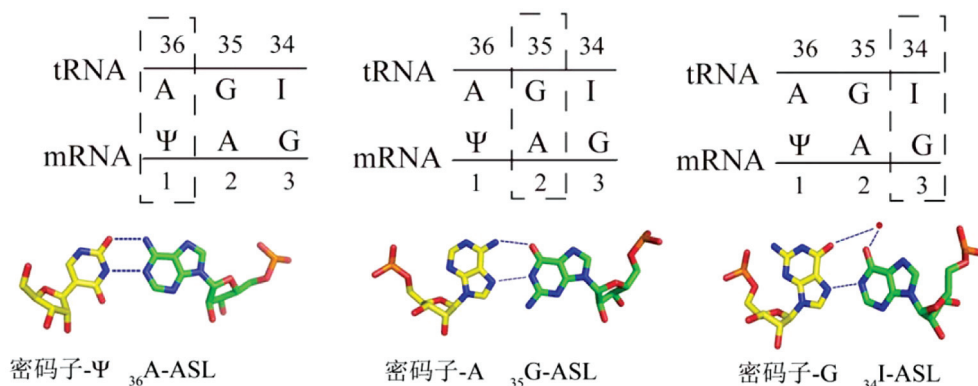
以及 snRNA 上, 但是目前并没有关于体内 mRNA 上存在假尿苷修饰的报道。2011 年, Rochester 大学 Yi-Tao Yu 的实验室发现, 在终止密码子中引入假尿苷修饰, 可以将终止密码子变成有义密码子^[24]。他们首先在体外合成了一段中间带有终止密码子 UAA 的 mRNA 序列, 终止密码子前为标签蛋白 His 序列, 之后为标签蛋白 flag 序列。当 Ψ 替换终止密码子的 U 时, 发现原来并未表达的 flag 蛋白被表达, 这说明了终止密码子中的假尿苷修饰会改变其编码能力。同时, 他们发现将编码序列前含有一个终止密码子的报告基因序列和人为设计的能够定位于该终止密码子的 H/ACA box snoRNA 在酵母中共表达时, 这个报告基因的 mRNA 的终止密码子可以被假尿苷修饰, 同时报告基因被表达。这说明在体内人为引入识别特定序列介导的 H/ACA 核糖核蛋白复合体可以使得特定位点发生假尿苷修饰, 并且体内的终止密码子序列中的 U 发生假尿苷修饰后也会改变其编码能力。除此之外, 他们还发现当终止密码子的尿苷发生修饰以后, 它将能够编码特定的氨基酸, 例如当 UAA 变为 Ψ AA 时, 它可以编码丝氨酸或者是苏氨酸; UAG 变为 Ψ AG 时, 可以编码丝氨酸或者苏氨酸; UGA 变为 Ψ GA 后, 它将编码酪氨酸或者苯丙氨酸 (图 4)^[24]。

为了解释终止密码子中发生假尿苷修饰后将能够使其具有编码能力的现象, 研究人员获得了 30S 小亚基或细菌 70S 核糖体与 tRNA^{ser}(反密码子序列为 IGA) 及 Ψ AG 终止密码子的复合物结构。通过对该结构的分析, 研究人员发现 Ψ 可以与 A36 形成经典的碱基互补配对, 而密码子 2 位与 3 位的碱基都形成非经典的嘌呤与嘌呤配对, 这个结构说明了核糖体的解码中心对于非经典的碱基互补配对有很高的耐受性 (图 5)^[25]。

同时, 其他研究人员还发现, 当将体外转录出的含有假尿苷修饰的 mRNA 注射入体内后, 与不含有假尿苷修饰的 mRNA 相比, 含有修饰的 RNA 翻译速率及稳定性都会增加^[26-28]。



图4 终止密码子中假尿苷的插入^[24]

图5 含假尿苷密码子的配对模式^[25]

3 RNA上的假尿苷修饰的研究方法

RNA 上的假尿苷修饰分布很广, 并且具有重要的生物学意义, 同时不同 RNA 上不同位点的假尿苷修饰具有不同的作用。因此, 当研究某一种 RNA 上的假尿苷修饰时, 对其含量的测定及定位显得尤为重要。下文将对 RNA 上假尿苷修饰的定量及定位方法进行详细说明。

3.1 假尿苷修饰的定量方法

3.1.1 二维纤维素薄层析(2D-TLC)

2D-TLC 系统含有两种不同的层析系统: 第一维可以使用异丁酸-氨水-水的混合物, 第二维可以使用异丙醇-盐酸-水混合物或者磷酸钠-硫酸铵-异丙醇混合物^[29]。使用 RNaseA 或者 RNaseT1 及 RNaseT2 将 RNA 切成寡聚核苷酸, 并对其 5' 端进行 ³²P 标记, 最后使用 nuclease P1 获得 5'-³²P-NMP。由于不同的碱基具有不同的极性, ³²P 具有高度的灵敏性, 利用这些特点可以在 2D-TLC 上将其分离并且对其进行定位。由于不同的碱基在 2D-TLC 上会有不同的位置, 因此可以通过分析 2D-TLC 图谱中假尿苷位置处是否存在相应的点来确定 RNA 中是否含有假尿苷。同时, 可以通过检测假尿苷位置处曝光强度与其他常见碱基 (如 A、G、C、U) 曝光强度的比值来确定其相对含量^[30-33]。

3.1.2 高分辨率质谱

对于 RNA 上的假尿苷修饰, 也可以通过高效液相色谱与高分辨质谱联用 (LC-MS/MS) 对其定量^[34]。将 RNA 进行酶切成单个的核苷, 由于不同的碱基的极性有所差异, 因此在高效液相色谱上不同的碱基具有不同的保留时间; 同时在电离时每个

碱基会产生其特异的离子对, 因此通过 LC-MS/MS 即可将不同碱基进行分离, 同时可以通过检测离子强度对其进行定量。通过该方法, 研究人员可以对酵母 tRNA 中的 25 种修饰中的 23 种修饰进行定量^[35]。

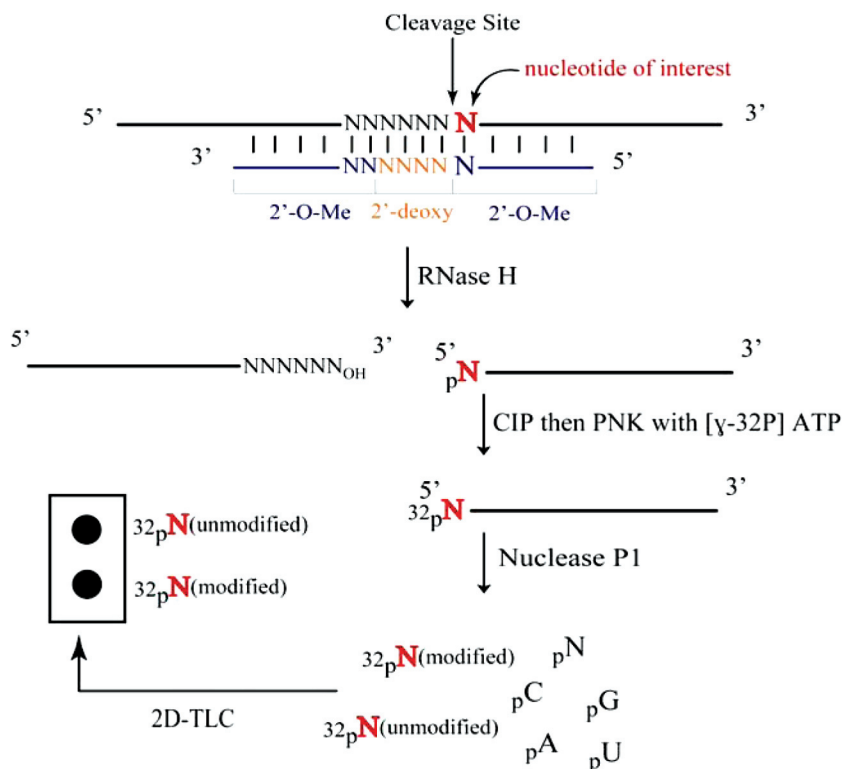
3.2 RNA上假尿苷修饰的定位方法

3.2.1 利用RNase H切割特定位点对假尿苷进行定位

RNase H 能够特异切割 DNA 与 RNA 形成的杂合体, 并且如果当糖环上的 2'-OH 被修饰后, 切割将受到阻碍。利用这一特点, 设计一段特殊的 DNA 序列, 这个 DNA 序列由三部分组成, 其中与含有假尿苷的区域互补的序列为 DNA 序列, 在 DNA 序列的两端都为 2'-O-甲基化修饰 RNA, 同时与假尿苷互补的碱基位于 DNA 序列之后的第一个被 2'-O-甲基化修饰的核苷, 这样的设计保证了 RNase H 的切割位点恰好位于假尿苷前方 (图 6)。此时 RNA 可以被切割成 5' 与 3' 两部分, 假尿苷修饰恰好位于 3' 部分的 5' 端, 由于 3' 部分与 5' 部分有大小差异, 可以通过跑胶对 3' 部分进行纯化。然后对 3' 部分进行去磷酸化进而使用 [γ -³²P]ATP 对其 5' 端进行标记。进一步使用 nuclease P1 将 5' 标记的 RNA 切成单个的核苷, 使用 2D-TLC 进行分离, 由于只有 5' 端被标记即只有被修饰的假尿苷和未被修饰的尿苷被 ³²P 标记, 因此通过这种方法不仅能够确定该位点是否含有假尿苷修饰, 并且能够确定该位点发生假尿苷修饰的比例^[36]。

3.2.2 利用CMCT对假尿苷进行定位

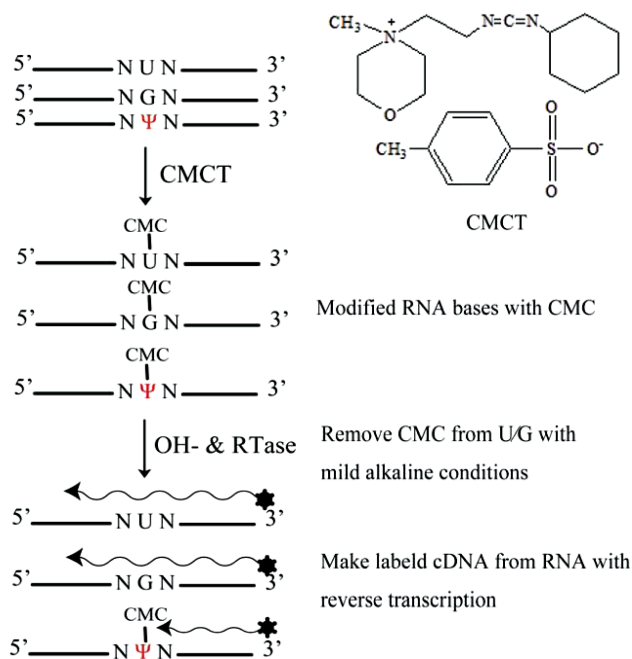
CMCT 是 N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl) carbodiimide metho-p-toluenesulfonate 的简称。CMCT 可以与尿苷的 3 位 NH、假尿苷的 1 位与 3 位的 NH 以及鸟嘌呤 3 位的 NH 发生反应。但是在弱碱的条

图6 RNase H方法^[36]

件下, 尿苷和鸟嘌呤上的加合物会脱去, 假尿苷上只有 3 位的加合物会保留。因此, 通过这两步反应可以在假尿苷上特异地发生 CMCT 的加合。由于 CMCT 与假尿苷的 N3 位发生反应, 这一位点位于假尿苷的 Watson-Crick 一侧, 因此会影响碱基互补配对, 在反转录过程中阻止其正常进行 (图 7)。因此, 根据这一原理, 利用引物延伸的方法可以对某个已知区域内的假尿苷进行定位。在反转录过程中, 当带有 ^{32}P 标记的引物遇到与 CMCT 反应后的假尿苷时, 反转录过程会发生终止。将反转录产物通过丙烯酰胺凝胶电泳进行区分, 由于反转录反应停在了假尿苷的位置, 因此当对应于某一个碱基的位置有很浓的条带时, 可以说明该位置发生了假尿苷修饰^[37-38]。

3.2.3 利用 SCARLET 的方法对 mRNA 或者 lncRNA 上的假尿苷修饰进行定位

利用 RNase H 特异剪切的特性可以对 RNA 上的修饰进行定位, 但是由于这种方法需要首先将要研究的某一种 RNA 进行分离, 因此对于丰度很低的 mRNA 或者 lncRNA 上的修饰的研究并不适用。最近, 芝加哥大学的 Tao Pan 研究组发展了一种新的方法, 将传统的 RNase H 特异性识别剪切与夹板

图7 CMCT对假尿苷进行定位^[37-38]

连接法相结合 (site-specific cleavage and radioactive-labeling followed by ligation-assisted Extraction and TLC, SCARLET)^[39]。这种新方法的特点是, 它利用

了夹板连接法来实现对所需要研究的 RNA 的分离, 因此, 利用该方法不需要最初纯化某一种特定的 RNA。使用 RNase H 在修饰位点的 5' 端进行切割并进行 ^{32}P 标记后, 利用夹板连接法使其与一个 116 nt 的单链 DNA 进行连接, 虽然其他序列的 5' 端也可以被 ^{32}P 标记, 但是在夹板 DNA 存在的情况下, 只有目的 RNA 才可以与 DNA 发生连接。使用 RNase A/T1 将与 DNA 连接的 RNA 链进行切割, 此时 ^{32}P 标记的修饰位点将和 DNA 链形成 DNA- ^{32}P -Xp 或 DNA- ^{32}P -XCp 的结构。之后, 再通过跑胶将该条带进行分离纯化, 然后使用 nuclease P1 将其切成单个的核苷酸, 使用 2D-TLC 对其分离, 即可确定该位点是否含有修饰并且能够确定该位点发生修饰的比例 (图 8)。

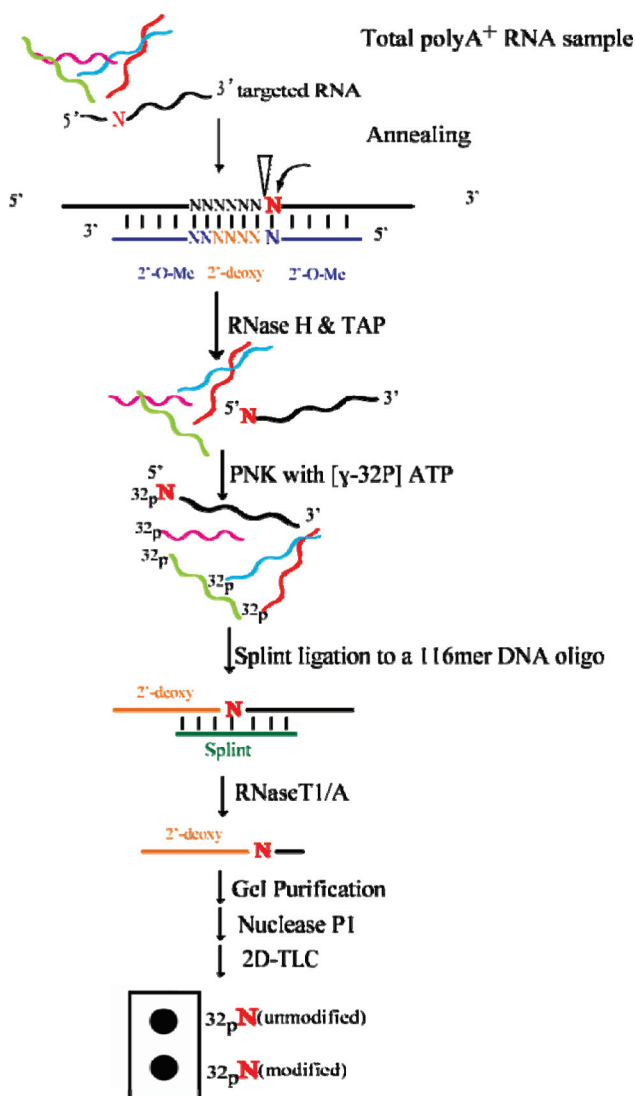


图8 SCARLET流程图^[39]

4 总结

目前已经发现假尿苷修饰存在于 tRNA、rRNA 和 snRNA 上, 并对其形成机制和功能有了一定的研究。但是对于 mRNA 上是否存在假尿苷修饰, 以及其潜在的功能及形成机制的研究仍然没有定论。而人为地在终止密码子中引入假尿苷修饰可以使得其变成有义密码子的发现, 进一步凸显出 mRNA 中假尿苷发现与功能研究的迫切性。因此, 未来进一步发展更高通量、更高灵敏度的检测手段, 将开启假尿苷研究的新领域。

[参 考 文 献]

- [1] Ofengand J. Ribosomal RNA pseudouridines and pseudouridine synthases. *FEBS Lett*, 2002, 514(1): 17-25
- [2] Charette M, Gray MW. Pseudouridine in RNA: what, where, how, and why. *IUBMB Life*, 2000, 49(5): 341-51
- [3] Hamma T, Ferre-D'Amare AR. Pseudouridine synthases. *Chem Biol*, 2006, 13(11): 1125-35
- [4] Ferre-D'Amare AR. RNA-modifying enzymes. *Curr Opin Struc Biol*, 2003, 13(1): 49-55
- [5] Hur S, Stroud RM, Finer-Moore J. Substrate recognition by RNA 5-methyluridine methyltransferases and pseudouridine synthases: a structural perspective. *J Biol Chem*, 2006, 281(51): 38969-73
- [6] Hur S, Stroud RM. How U38, 39, and 40 of many tRNAs become the targets for pseudouridylation by TruA. *Mol Cell*, 2007, 26(2): 189-203
- [7] Hoang C, Ferre-D'Amare AR. Cocystal structure of a tRNA Psi55 pseudouridine synthase: nucleotide flipping by an RNA-modifying enzyme. *Cell*, 2001, 107(7): 929-39
- [8] Kaya Y, Del Campo M, Ofengand J, et al. Crystal structure of TruD, a novel pseudouridine synthase with a new protein fold. *J Biol Chem*, 2004, 279(18): 18107-10
- [9] Kiss T, Fayet E, Jady BE, et al. Biogenesis and intranuclear trafficking of human box C/D and H/ACA RNPs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2006, 71: 407-17
- [10] Ye K. H/ACA guide RNAs, proteins and complexes. *Curr Opin Struc Biol*, 2007, 17(3): 287-92
- [11] Reichow SL, Hamma T, Ferre-D'Amare AR, et al. The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(5): 1452-64
- [12] Henras AK, Dez C, Henry Y. RNA structure and function in C/D and H/ACA s(no)RNPs. *Curr Opin Struc Biol*, 2004, 14(3): 335-43
- [13] Wu G, Yu AT, Kantartzis A, et al. Functions and mechanisms of spliceosomal small nuclear RNA pseudouridylation. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2011, 2(4): 571-81
- [14] Kiss T, Fayet-Lebaron E, Jady BE. Box H/ACA small ribonucleoproteins. *Mol Cell*, 2010, 37(5): 597-606
- [15] Meier UT. How a single protein complex accommodates many different H/ACA RNAs. *Trends Biochem Sci*, 2006,

- 31(6): 311-5
- [16] Ge J, Yu YT. RNA pseudouridylation: new insights into an old modification. *Trends Biochem Sci*, 2013, 38(4): 210-8
- [17] Jack K, Bellodi C, Landry DM, et al. rRNA pseudouridylation defects affect ribosomal ligand binding and translational fidelity from yeast to human cells. *Mol Cell*, 2011, 44(4): 660-6
- [18] King TH, Liu B, McCully RR, et al. Ribosome structure and activity are altered in cells lacking snoRNPs that form pseudouridines in the peptidyl transferase center. *Mol Cell*, 2003, 11(2): 425-35
- [19] Liang XH, Liu Q, Fournier MJ. Loss of rRNA modifications in the decoding center of the ribosome impairs translation and strongly delays pre-rRNA processing. *RNA*, 2009, 15(9): 1716-28
- [20] Yu AT, Ge J, Yu YT. Pseudouridines in spliceosomal snRNAs. *Protein Cell*, 2011, 2(9): 712-25
- [21] Karijolich J, Yu YT. Spliceosomal snRNA modifications and their function. *RNA Biol*, 2010, 7(2): 192-204
- [22] Yu YT, Shu MD, Steitz JA. Modifications of U2 snRNA are required for snRNP assembly and pre-mRNA splicing. *EMBO J*, 1998, 17(19): 5783-95
- [23] Zhao X, Yu YT. Pseudouridines in and near the branch site recognition region of U2 snRNA are required for snRNP biogenesis and pre-mRNA splicing in *Xenopus* oocytes. *RNA*, 2004, 10(4): 681-90
- [24] Karijolich J, Yu YT. Converting nonsense codons into sense codons by targeted pseudouridylation. *Nature*, 2011, 474(7351): 395-8
- [25] Fernandez IS, Ng CL, Kelley AC, et al. Unusual base pairing during the decoding of a stop codon by the ribosome. *Nature*, 2013, 500(7460): 107-10
- [26] Anderson BR, Muramatsu H, Nallagatla SR, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA enhances translation by diminishing PKR activation. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(17): 5884-92
- [27] Kariko K, Muramatsu H, Welsh FA, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol Ther*, 2008, 16(11): 1833-40
- [28] Kariko K, Muramatsu H, Keller JM, et al. Increased erythropoiesis in mice injected with submicrogram quantities of pseudouridine-containing mRNA encoding erythropoietin. *Mol Ther*, 2012, 20(5): 948-53
- [29] Keith G. Mobilities of modified ribonucleotides on two-dimensional cellulose thin-layer chromatography. *Biochimie*, 1995, 77(1-2): 142-4
- [30] Behm-Ansmant I, Massenet S, Immel F, et al. A previously unidentified activity of yeast and mouse RNA: pseudouridine synthases 1 (Pus1p) on tRNAs. *RNA*, 2006, 12(8): 1583-93
- [31] Charpentier B, Muller S, Branlant C. Reconstitution of archaeal H/ACA small ribonucleoprotein complexes active in pseudouridylation. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(10): 3133-44
- [32] Roovers M, Hale C, Tricot C, et al. Formation of the conserved pseudouridine at position 55 in archaeal tRNA. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(15): 4293-301
- [33] Zebajarian Y, King T, Fournier MJ, et al. Point mutations in yeast CBF5 can abolish in vivo pseudouridylation of rRNA. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(11): 7461-72
- [34] Gradeen CY, Billay DM, Chan SC. Analysis of bumetanide in human urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and gas chromatography/mass spectrometry. *J Anal Toxicol*, 1990, 14(2): 123-6
- [35] Chan CT, Dyavaiah M, DeMott MS, et al. A quantitative systems approach reveals dynamic control of tRNA modifications during cellular stress. *PLoS Genet*, 2010, 6(12): e1001247
- [36] Zhao X, Yu YT. Detection and quantitation of RNA base modifications. *RNA*, 2004, 10(6): 996-1002
- [37] Ofengand J, Bakin A. Mapping to nucleotide resolution of pseudouridine residues in large subunit ribosomal RNAs from representative eukaryotes, prokaryotes, archaeobacteria, mitochondria and chloroplasts. *J Mol Biol*, 1997, 266(2): 246-68
- [38] Ofengand J, Del Campo M, Kaya Y. Mapping pseudouridines in RNA molecules. *Methods*, 2001, 25(3): 365-73
- [39] Liu N, Parisien M, Dai Q, et al. Probing N6-methyladenosine RNA modification status at single nucleotide resolution in mRNA and long noncoding RNA. *RNA*, 2013, 19(12): 1848-56

伊成器报告讨论

王江云(中国科学院生物物理研究所)

Q: 你刚才提到当 U 型终止子变成 ψ 型终止子时, 它除了能编码丝氨酸和苏氨酸以外, 还能编码哪些氨基酸呢?

A: U 型终止子变成 ψ 型终止子时, 它到底能编码哪几种氨基酸, 我们实验室目前还没研究过。2011 年, 我和做这方面的实验室进行了沟通, 他们的实验表明 ψ 型终止子 ψ AG 和 ψ AA 主要编码丝氨酸和苏氨酸, 而 ψ GA 主要编码酪氨酸和苯丙氨酸, 当然这也不是绝对的, 比如说 ψ AA 可能 50% 左右编码丝氨酸, 50% 左右编码苏氨酸, 但是还是有可能编码其他一些氨基酸。有义密码子如果有修饰, 也许会改变 mRNA 的编码能力。这应该更有趣。

Q: 化合物 CMCT 是否能与 ψ 上的两个 N 均能发生化学反应? 有何专一性? CMCT 与 ψ 上的两个 N 反应之间的 pKa 有无差别?

A: 我们是根据一篇 1963 年有关 CMCT 的文献报道, 作者测试过 ψ 上两个 N 与 CMCT 反应时 pKa 的差别, 他们的数据表明 ψ 上 3 位 N 的反应活性更高, 大概是 1 位 N 的 20 倍左右, 他们再通过后续一个反应就能保证得到比较单一的化合物。