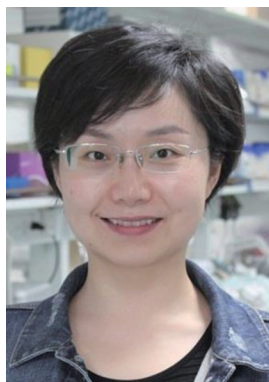


## 研究前沿



陈玲玲, 女, 博士, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心(生物化学与细胞生物学研究所)研究员, 博士生导师。主要从事长非编码RNA的发现、代谢和功能研究。2017年入选国家基金委杰出青年基金和HHMI国际研究员。任*Cell*、*Cell Chem Cell*、*Trends Cell Biol*、*Trends Genet*、*Genome Biol*、*RNA*等国际期刊编委, 美国冷泉港实验室非编码RNA大会主席, 冷泉港亚洲RNA生物学大会主席, 国际RNA协会年会大会主席等。

## 长非编码RNAs物种特异性的加工定位 决定其在干细胞中的差异功能

马旭凯<sup>1#</sup>, 郭纯洁<sup>2#</sup>, 杨力<sup>1,3</sup>, 陈玲玲<sup>2,3,4\*</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院上海营养与健康研究所, 中国科学院计算生物学重点实验室, 中国科学院-马普学会计算生物学伙伴研究所, 中国科学院大学, 上海200031; <sup>2</sup>中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 分子生物学国家重点实验室, 上海市分子男科学重点实验室, 中国科学院生物化学与细胞生物学研究所, 中国科学院大学, 上海200031; <sup>3</sup>上海科技大学生命科学与技术学院, 上海200031;

<sup>4</sup>国科大杭州高等研究院, 生命与健康科学学院, 杭州310024)

**摘要:** 长非编码RNAs(long noncoding RNAs, lncRNAs)在真核生物中广泛表达。不同于序列高度保守的信使RNAs(mRNAs), lncRNAs具有快速进化改变的特点。目前, 关于lncRNAs的加工和定位在物种进化过程中的变化及其对lncRNAs功能的影响仍有待深入研究。中国科学院分子细胞科学卓越创新中心(生物化学与细胞生物学研究所)陈玲玲研究组与马普学会计算生物学伙伴研究所杨力研究组的最新合作研究成果首次揭示了人、小鼠胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)中保守的lncRNAs的加工定位及功能作用存在显著差异。例如人胚胎干细胞中细胞质定位的lncRNAs—hFAST通过维持WNT信号通路的激活维持人胚胎干细胞多能性。小鼠胚胎干细胞中保守的mFast则滞留于细胞核, 且对小鼠胚胎干细胞多能性维持无显著影响。进一步筛选得到剪接因子PPIE调控lncRNAs加工和定位。该工作首次揭示lncRNAs的姿态万千可能是种属特异性调控和适应的重要机理之一, 丰富了对lncRNAs表达、定位和功能多样性的认识。

**关键词:** 长非编码RNAs; FAST; RNA加工; RNA定位; 胚胎干细胞; 多能性调控; WNT; RNA进化; PPIE

收稿日期: 2020-05-26

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项B类项目(XDB19020104); 国家科技部重点研发计划项目(2016YFA0100701); 国家自然科学基金项目(31725009、31730111、31830108、31821004、31861143025、31925011); 霍华德休斯医学研究所国际科学家支持计划项目(55008728)

<sup>#</sup>第一作者: 马旭凯, E-mail: maxukai@picb.ac.cn; 郭纯洁, E-mail: guochunjie2015@sibcb.ac.cn

\*通信作者: E-mail: linglingchen@sibcb.ac.cn

## Altered processing of lncRNAs in stem cells contributes to non-conserved functions

MA Xukai<sup>1#</sup>, GUO Chunjie<sup>2#</sup>, YANG Li<sup>1,3</sup>, CHEN Lingling<sup>2,3,4\*</sup>

(<sup>1</sup>CAS Key Laboratory of Computational Biology, CAS-MPG Partner Institute for Computational Biology, Shanghai Institute of Nutrition and Health, University of the Chinese Academy of Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; <sup>2</sup>State Key Laboratory of Molecular Biology, Shanghai Key Laboratory of Molecular Andrology, CAS Center for Excellence in Molecular Cell Science, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, University of the Chinese Academy of Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; <sup>3</sup>School of Life Science and Technology, ShanghaiTech University, Shanghai 200031, China; <sup>4</sup>School of Life Science, Hangzhou Institute for Advanced Study, University of Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310024, China)

**Abstract:** Long noncoding RNAs (lncRNAs) are pervasively expressed in the eukaryotic genome. Unlike high conservation of mRNAs, lncRNAs evolve more rapidly. The understanding of how processing and localization of conserved lncRNAs altered during evolution and their effects to the lncRNAs functions are limited. A recent study reported different subcellular localization of lncRNAs between human and mouse embryonic stem cells (ESCs). Several such distinctly cytoplasm-localized lncRNAs are related to hESCs pluripotency. For example, the positionally conserved lncRNAs *FAST* is not conserved in its processing and localization. In hESCs, cytoplasmic h*FAST* binds to the WD40 domain of the E3 ubiquitin ligase  $\beta$ -TrCP and blocks its interaction with phosphorylated  $\beta$ -catenin to prevent degradation, leading to activated WNT signaling, which is required for pluripotency. In contrast, m*Fast* is nuclear retained in mESCs, and its processing is suppressed by the splicing factor PPIE, which is highly expressed in mESCs but not hESCs. These findings highlight that lncRNAs processing and localization are previously under-appreciated contributors to the rapid evolution of function.

**Key Words:** long noncoding RNA (lncRNAs); *FAST*; RNA processing; RNA subcellular localization; embryonic stem cells (ESCs); regulation of pluripotency; WNT; RNA evolution; PPIE

### 1 长非编码RNAs研究现状

真核生物基因组可以被广泛转录, 其中超过98%的转录序列是非编码RNA序列<sup>[1]</sup>。非编码RNA包括转运RNA(tRNA)、核糖体RNA(rRNA)、多种小非编码RNA(snoRNA、microRNA等)和大量长度大于200 nt的lncRNAs。大部分lncRNAs同mRNA类似, 同样具有5'端帽子和3'端多聚腺苷酸尾巴结构<sup>[2-3]</sup>; 但是也存在多种具备特殊结构的lncRNAs: 由RNase P在3'末端剪切产生三螺旋结构的lncRNAs *MALAT1*<sup>[4-5]</sup>和*NEAT1*<sup>[6-7]</sup>; 单链共价闭环环状结构的环形RNA<sup>[8]</sup>; 两端由完整的snoRNA序列组成的

*sno-lncRNA*<sup>[9-10]</sup>, 或一端由snoRNA组成另一端由多聚腺苷酸尾巴结构组成的*SPA*等<sup>[11]</sup>。研究发现越来越多的lncRNAs在多种生命过程中发挥重要功能, 包括基因表达调控<sup>[12]</sup>、RNA的转录后调控<sup>[13]</sup>、蛋白翻译调控等, 然而大部分lncRNAs的功能作用仍有待探索。

与mRNA在物种进化过程中序列和功能高度保守<sup>[14]</sup>不同, lncRNAs在不同物种之间序列保守性相对较低<sup>[15-18]</sup>。但lncRNAs在多个层面体现出其保守性<sup>[18-20]</sup>: 如序列保守性、RNA结构保守性、基因组位置保守性和生物学功能保守性。其中, 根据

lncRNAs与mRNA的基因组相对位置来确定的lncRNAs基因组位置保守性,在许多研究中被证明可能指示lncRNAs的生物学功能<sup>[19-21]</sup>。

在细胞内lncRNAs的亚细胞定位与其功能发挥息息相关<sup>[22-23]</sup>: mRNA主要定位于细胞质中翻译蛋白质行使功能,而lncRNAs具有多样化的亚细胞定位,行使不同的生物学功能。例如:非编码RNA *Xist*在细胞核中覆盖待沉默X染色体,介导X染色体失活<sup>[24]</sup>; lncRNAs *SLERT*定位于细胞核亚结构核仁中并促进前体rRNA的转录和成熟rRNA的生成<sup>[10]</sup>; lncRNAs *GAS5*运输到细胞质中,能够抑制MYC翻译<sup>[25]</sup>。细胞中顺式作用元件、反式作用因子、RNA的特殊加工修饰及RNA的高级结构等多种因素共同相互作用调控lncRNAs的定位。此外,研究发现,大量lncRNAs参与干细胞多能性维持<sup>[26-28]</sup>。然而,lncRNAs物种特异性的加工、定位和对其功能特别是人、鼠胚胎干细胞差异性的调控仍有待进一步研究。

## 2 干细胞中长非编码RNAs物种特异性的加工定位决定其差异功能的研究

为解答这些问题,近期,陈玲玲研究员及合作者在国际著名学术期刊*Cell*上发表了关于lncRNAs的最新研究成果。该研究通过生物学实验与高通量测序计算分析相结合,解析了人、鼠胚胎干细胞中lncRNAs的加工和亚细胞定位存在显著差异,揭示基因组位置保守但加工定位差异的lncRNAs *FAST*在胚胎干细胞命运决定中的重要作用,并详细探究了lncRNAs在不同物种之间的加工定位差异的机制,发现剪接因子PPIE的重要调控功能<sup>[29]</sup>(图1)。该研究首次发现lncRNAs的种属特异性加工是其在进化过程中发生适应性功能变化的重要调控新机制,为深入理解lncRNAs的进化及功能提出了新思路。

### 2.1 人、鼠胚胎干细胞中保守长非编码RNAs的亚细胞定位存在显著差异

研究人员首先通过分离人、鼠胚胎干细胞H9

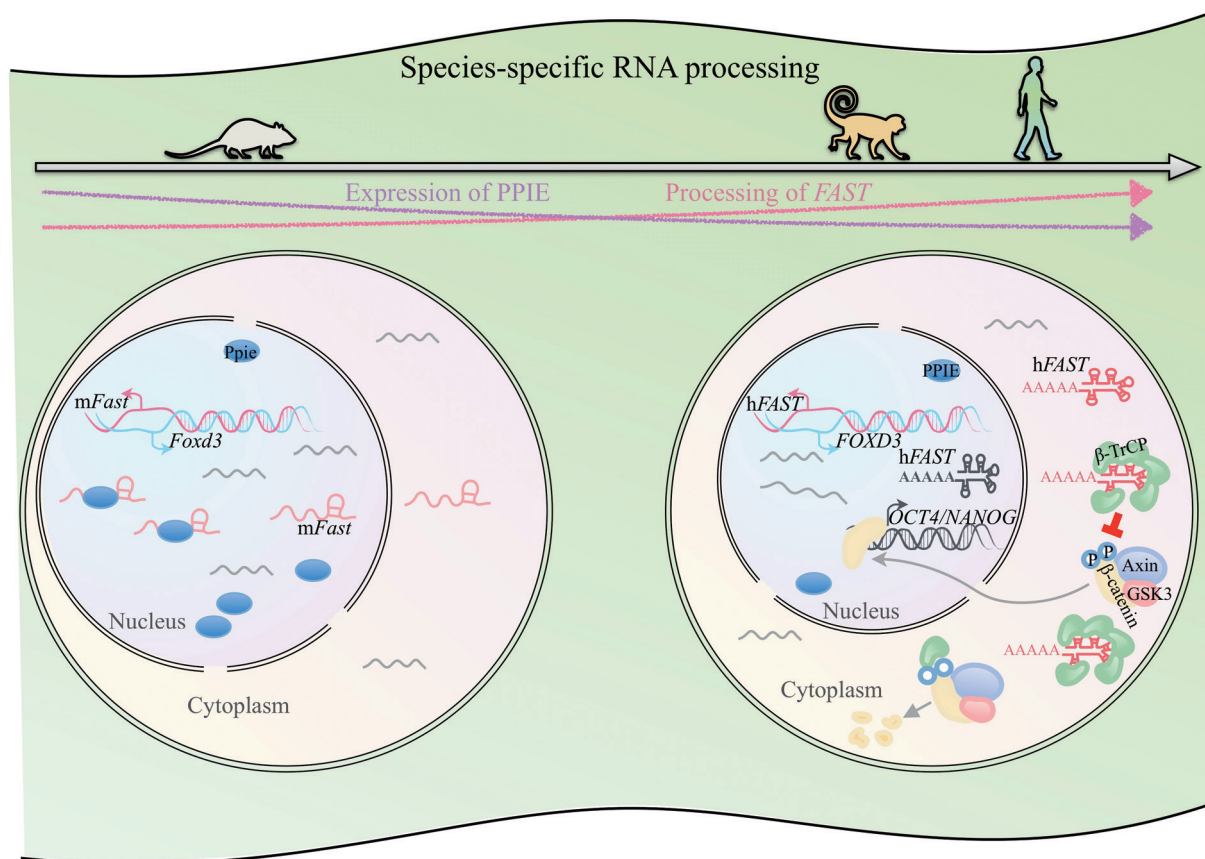


图1 长非编码RNAs种属特异性加工定位决定其功能发挥



和R1细胞系的细胞核、细胞质RNA进行高通量测序,然后进行了系统计算分析及qRT-PCR、RNA FISH等实验,结果发现人、鼠胚胎干细胞中序列保守或基因组位置保守的lncRNAs的亚细胞定位具有显著差异;而作为对照的mRNA的亚细胞定位在两个细胞系中则无明显差异。为探究这一现象的普遍性,研究人员进一步在其他亚型的人胚胎干细胞系H1、CT1,小鼠胚胎干细胞系E14以及在胚胎干细胞的不同状态(primed及naïve-like)和培养条件下证明了lncRNAs定位的差异是人、鼠物种间的差异,而非细胞系或者培养条件的差异所导致。lncRNAs的功能与亚细胞定位密切相关<sup>[22-23]</sup>。这种广泛存在的定位差异提示我们:保守lncRNAs在人、鼠胚胎干细胞中可能具有不同的功能。

## 2.2 长非编码RNAs FAST对人胚胎干细胞多能性维持具有重要作用

为了进一步探索lncRNAs在人、鼠胚胎干细胞中定位差异对生物学功能的影响,研究人员筛选了其中五个基因组位置保守,但在人、鼠胚胎干细胞中亚细胞定位存在最显著差异的lncRNAs,利用shRNA或sgRNA对其进行敲低实验,发现其中大多数人胚胎干细胞来源的细胞质定位的lncRNAs会影响胚胎干细胞中多能性维持关键基因OCT4和NANOG的表达,而鼠胚胎干细胞来源的细胞核定位的lncRNAs对胚胎干细胞多能性的影响不明显。研究详细解析了其中lncRNAs FAST维持人胚胎干细胞自我更新的作用机制。FAST由FOXD3蛋白编码基因的反义链转录,在人胚胎干细胞系H9中主要存在547 nt的加工完全的转录本,每个H9细胞中约有140个FAST转录本。小鼠中保守的mFast主要有两个转录本,1 377 nt的不完全加工转录本和701 nt加工后转录本。通过对hFAST和mFast在外显子结构、序列和基因组位置三个层次进行保守性分析发现<sup>[21]</sup>,FAST是具有相同转录方向和保守的上下游序列的基因组位置保守lncRNAs。hFAST在多种人胚胎干细胞系和诱导性多能干细胞系中显著特异高表达,且在分化过程中快速降低。上述发现也提示,hFAST可能在干细胞干性维持方面具有重要功能。

研究人员进一步通过设计shRNA及sgRNA敲低H9细胞中hFAST,结果显示,缺失hFAST的H9细胞克

隆形成能力显著下降,缺失hFAST的H9克隆呈现严重的分化。进一步的免疫荧光(immunofluorescence, IF)、免疫印迹(Western blot)和qRT-PCR分析均证明,hFAST敲低显著降低了OCT4和NANOG的表达。对hFAST敲低H9细胞的转录组测序发现,hFAST敲低会导致许多细胞干性维持相关基因的异常表达。更为重要的是,hFAST敲低H9细胞中过表达hFAST能够回补OCT4和NANOG的表达水平。而敲除mFast显示其不影响小鼠胚胎干细胞中Oct4和Nanog的蛋白表达。以上结果证明了不同亚细胞定位的hFAST和mFast在人、鼠胚胎干细胞中发挥不同的生物学功能。

## 2.3 hFAST通过多个茎环结构结合β-TrCP蛋白的WD40结构域

为探究hFAST调控胚胎干细胞多能性的具体机制,研究人员通过分析调控胚胎干细胞多能性的相关通路发现,hFAST主要通过调控WNT信号通路进而调控细胞多能性。RNA pull down及RNA蛋白免疫共沉淀(RNA immunoprecipitation, RIP)实验证明了hFAST与WNT信号通路的关键因子β-TrCP存在相互作用。为了探究hFAST如何与β-TrCP相互作用,研究人员将hFAST截断成一系列约100 nt的片段与β-TrCP蛋白体外结合实验发现,hFAST 5'和3'端的序列可与β-TrCP相互作用。依据细胞内SHAPE-MaP实验<sup>[30]</sup>得到的hFAST二级结构进一步构建hFAST截断片段的结果表明,hFAST至少存在五个独立的茎环结构结合β-TrCP。β-TrCP蛋白主要存在两个功能结构域:N端的F-box基序及C端的七个WD40重复序列<sup>[31]</sup>。研究人员通过截断β-TrCP不同区域片段,证明β-TrCP通过七个WD40重复片段结合hFAST。更重要的是,hFAST并不与其他包含WD40结构域的蛋白质(WDR26和STRAP)结合,表明了hFAST与β-TrCP相互作用的特异性。

## 2.4 hFAST通过维持WNT信号通路的持续激活而维持人胚胎干细胞的多能性

WNT信号通路在胚胎干细胞中的作用比较复杂。研究人员首先通过化合物(BIO和CHIR99021)或敲低WNT信号通路中的关键蛋白(Axin1、β-catenin)等多种方式激活或抑制WNT信号通路在胚胎干细胞中的活性,阐明了WNT信号通路的激活对维持人胚胎干细胞自我更新的重要作用。

$\beta$ -TrCP的WD40结构域既具备RNA结合能力<sup>[32]</sup>, 也能够识别磷酸化的 $\beta$ -catenin进而利用蛋白酶体降解 $\beta$ -catenin<sup>[33]</sup>。研究人员发现, 敲除hFAST导致 $\beta$ -catenin蛋白水平降低,  $\beta$ -catenin的泛素化水平上升, 破坏复合体和 $\beta$ -TrCP相互作用水平增强; 过表达hFAST则抑制了 $\beta$ -TrCP和磷酸化 $\beta$ -catenin的相互作用。以上研究结果揭示了hFAST通过竞争性结合 $\beta$ -TrCP、阻滞 $\beta$ -TrCP识别磷酸化 $\beta$ -catenin, 从而保护 $\beta$ -catenin不被蛋白酶体降解, 保持WNT信号通路激活, 进而维持胚胎干细胞的自我更新。

## 2.5 剪接因子PPIE调控FAST加工及定位

RNA剪接加工是影响RNA亚细胞定位的关键作用因素<sup>[34-35]</sup>。研究人员分析了人、鼠不同干细胞来源的保守RNA剪接加工情况, 发现人胚胎干细胞中保守的lncRNAs剪接水平较高, 而保守的mRNA加工却没有明显差别。特别值得一提的是, mFast由于非完全剪接加工而滞留于鼠胚胎干细胞细胞核内; hFAST则发生完全的剪接加工并运输到细胞质中。为了探索影响lncRNAs FAST定位的因素, 研究人员将外源hFAST或mFast通过不同方式导入了H9或R1中。有意思的是, 不论瞬时转染还是稳定过表达FAST, 多种实验证明, hFAST和mFast都定位于H9细胞的细胞质中, 在R1细胞中hFAST和mFast则滞留于细胞核内。这提示可能存在反式作用因子调控FAST在人、鼠胚胎干细胞中的差异定位。

因此研究人员通过ATtRACT数据库计算分析了hFAST和mFast的潜在结合蛋白。根据预测结合位点数及已报道的蛋白质功能, 进一步筛选了10个可能调控FAST加工定位且在H9和R1中差异表达的RNA结合蛋白。在过表达mFast的H9细胞系中敲低候选蛋白, 发现PPIE蛋白的敲低导致mFast大量出核, 说明PPIE是阻滞mFast出核的蛋白因子之一。PPIE属于肽脯氨酰顺反异构酶(peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, PPIase)家族, 多个肽脯氨酰顺反异构酶家族成员为剪接复合体组成部分并参与剪接<sup>[36-38]</sup>。PPIE在人鼠之间高度保守, 具有RNA识别基序(RNA recognition motif, RRM)和PPIase cyclophilin-type domain结构域。实验结果表明, 小鼠R1细胞中的Ppie表达水平远远高于人H9细胞中

的PPIE表达水平, 提示PPIE可能在小鼠胚胎干细胞系中抑制RNA的加工和运输。

研究人员分别在H9和R1细胞中敲低PPIE, 均发现缺失PPIE促进内源mFast或hFAST的出核。RIP实验进一步验证PPIE结合前体hFAST和mFast转录本。更有意思的是, FISH及qRT-PCR实验证明了Ppie的敲低可以促进前体mFast的加工剪接, 使得更多加工剪接成熟的mFast运输到细胞质中。在Ppie敲低的R1细胞中回补Ppie的表达能够恢复多个基因组位置保守的lncRNAs(包括mFast)的加工及亚细胞定位。同时, 高通量测序数据分析显示, 大量lncRNAs和部分mRNA的亚细胞定位受Ppie调控。上述结果揭示了差异表达的PPIE调控部分lncRNAs在人、鼠胚胎干细胞中的定位差异。

## 2.6 PPIE在物种进化过程中差异表达并调控长非编码RNAs的加工

研究人员进一步在人、猴、鼠三个物种间探究PPIE与lncRNAs加工的关系。FAST在人、猴之间具有高达94%的序列保守性, Northern印迹杂交实验发现食蟹猴胚胎干细胞M21中FAST(534 nt)高水平表达, 且主要定位于细胞质。食蟹猴FAST的敲除同样降低了M21细胞中NANOG和OCT4基因的表达水平。这些结果揭示了lncRNAs FAST在灵长类胚胎干细胞中保守的加工、定位和功能。与之对应的, 生物信息学及实验分析表明, PPIE在M21细胞系和恒河猴LYON-1细胞中的表达水平都稍高于人胚胎干细胞中的表达水平, 且远低于鼠胚胎干细胞中的表达水平。进一步分析H9、LYON-1和R1的高通量测序数据中保守的lncRNAs的加工水平, 结果发现随着物种的进化, PPIE表达逐渐降低, lncRNAs的加工水平渐渐上升。上述结果提示, 不同物种之间很可能通过不同表达水平的PPIE调控lncRNAs的加工水平。

## 3 结语与展望

lncRNAs进化过程中的快速变化<sup>[21,39]</sup>阻碍了研究人员对其功能机制的探索。该工作中, 陈玲玲研究组首次发现人、鼠胚胎干细胞中大部分保守的lncRNAs具有显著不同的亚细胞定位模式。更为重要的是, 保守lncRNAs的种属特异的加工定位决定了其非保守的生物学功能, 拓展了关于lncRNAs

快速进化和高度可塑性对其功能作用的新知识,为深入理解lncRNAs的进化及功能提出了新思路。

尽管PPIE能够调控许多lncRNAs的核滞留,却极有可能存在其他RNA结合蛋白和更复杂的复合体调控lncRNAs定位,同时顺式作用元件也可能在lncRNAs进化过程中调控其加工定位及功能。对lncRNAs进化过程中多层次调控网络的探索将为lncRNAs生成及功能的内在机理研究提供更加全面的认知。

### 参 考 文 献

- [1] Elgar G, Vavouri T. Tuning in to the signals: noncoding sequence conservation in vertebrate genomes. *Trends Genet*, 2008, 24(7): 344-352
- [2] Derrien T, Johnson R, Bussotti G, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res*, 2012, 22(9): 1775-1789
- [3] Mele M, Mattioli K, Mallard W, et al. Chromatin environment, transcriptional regulation, and splicing distinguish lincRNAs and mRNAs. *Genome Res*, 2017, 27(1): 27-37
- [4] Wilusz JE, Freier SM, Spector DL. 3' end processing of a long nuclear-retained noncoding RNA yields a tRNA-like cytoplasmic RNA. *Cell*, 2008, 135(5): 919-932
- [5] Brown JA, Valenstein ML, Yario TA, et al. Formation of triple-helical structures by the 3'-end sequences of MALAT1 and MENbeta noncoding RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(47): 19202-19207
- [6] Sunwoo H, Dinger ME, Wilusz JE, et al. MEN epsilon/beta nuclear-retained non-coding RNAs are up-regulated upon muscle differentiation and are essential components of paraspeckles. *Genome Res*, 2009, 19(3): 347-359
- [7] Wilusz JE, Whipple JM, Phizicky EM, et al. tRNAs marked with CCACCA are targeted for degradation. *Science*, 2011, 334(6057): 817-821
- [8] Chen LL. The expanding regulatory mechanisms and cellular functions of circular RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(8): 475-490
- [9] Yin QF, Yang L, Zhang Y, et al. Long noncoding RNAs with snoRNA ends. *Mol Cell*, 2012, 48(2): 219-230
- [10] Xing YH, Yao RW, Zhang Y, et al. SLERT regulates DDX21 rings associated with Pol I transcription. *Cell*, 2017, 169(4): 664-678, e616
- [11] Wu H, Yin QF, Luo Z, et al. Unusual processing generates SPA lncRNAs that sequester multiple RNA binding proteins. *Mol Cell*, 2016, 64(3): 534-548
- [12] Martianov I, Ramadass A, Serra Barros A, et al. Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript. *Nature*, 2007, 445(7128): 666-670
- [13] Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, et al. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell*, 2010, 39(6): 925-938
- [14] Makalowski W, Zhang J, Boguski MS. Comparative analysis of 1196 orthologous mouse and human full-length mRNA and protein sequences. *Genome Res*, 1996, 6(9): 846-857
- [15] Hezroni H, Koppstein D, Schwartz MG, et al. Principles of long noncoding RNA evolution derived from direct comparison of transcriptomes in 17 species. *Cell Rep*, 2015, 11(7): 1110-1122
- [16] Kutter C, Watt S, Stefflova K, et al. Rapid turnover of long noncoding RNAs and the evolution of gene expression. *PLoS Genet*, 2012, 8(7): e1002841
- [17] Necseulea A, Soumillon M, Warnefors M, et al. The evolution of lncRNA repertoires and expression patterns in tetrapods. *Nature*, 2014, 505(7485): 635-640
- [18] Ulitsky I, Shkumatava A, Jan CH, et al. Conserved function of lincRNAs in vertebrate embryonic development despite rapid sequence evolution. *Cell*, 2011, 147(7): 1537-1550
- [19] Diederichs S. The four dimensions of noncoding RNA conservation. *Trends Genet*, 2014, 30(4): 121-123
- [20] Johnsson P, Lipovich L, Grander D, et al. Evolutionary conservation of long non-coding RNAs; sequence, structure, function. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(3): 1063-1071
- [21] Ulitsky I. Evolution to the rescue: using comparative genomics to understand long non-coding RNAs. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(10): 601-614
- [22] Carlevaro-Fita J, Johnson R. Global positioning system: understanding long noncoding RNAs through subcellular localization. *Mol Cell*, 2019, 73(5): 869-883
- [23] Chen LL. Linking long noncoding RNA localization and function. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41(9): 761-772
- [24] Morey C, Navarro P, Debrand E, et al. The region 3' to Xist mediates X chromosome counting and H3 Lys-4 dimethylation within the Xist gene. *EMBO J*, 2004, 23(3): 594-604
- [25] Hu G, Lou Z, Gupta M. The long non-coding RNA GAS5 cooperates with the eukaryotic translation initiation factor 4E to regulate c-Myc translation. *PLoS One*, 2014, 9(9): e107016
- [26] Dinger ME, Amaral PP, Mercer TR, et al. Long noncoding RNAs in mouse embryonic stem cell pluripotency and differentiation. *Genome Res*, 2008,

- 18(9): 1433-1445
- [27] Ng SY, Stanton LW. Long non-coding RNAs in stem cell pluripotency. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2013, 4(1): 121-128
- [28] Ng SY, Johnson R, Stanton LW. Human long non-coding RNAs promote pluripotency and neuronal differentiation by association with chromatin modifiers and transcription factors. *EMBO J*, 2012, 31(3): 522-533
- [29] Guo CJ, Ma XK, Xing YH, et al. Distinct processing of lncRNAs contributes to non-conserved functions in stem cells. *Cell*, 2020, 181(3): 621-636, e622
- [30] Smola MJ, Rice GM, Busan S, et al. Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension and mutational profiling (SHAPE-MaP) for direct, versatile and accurate RNA structure analysis. *Nat Protoc*, 2015, 10(11): 1643-1669
- [31] Fuchs SY, Spiegelman VS, Kumar KG. The many faces of beta-TrCP E3 ubiquitin ligases: reflections in the magic mirror of cancer. *Oncogene*, 2004, 23(11): 2028-2036
- [32] Castello A, Fischer B, Eichelbaum K, et al. Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell*, 2012, 149(6): 1393-1406
- [33] Wu G, Xu G, Schulman BA, et al. Structure of a beta-TrCP1-Skp1-beta-catenin complex: destruction motif binding and lysine specificity of the SCF (beta-TrCP1) ubiquitin ligase. *Mol Cell*, 2003, 11(6): 1445-1456
- [34] Valencia P, Dias AP, Reed R. Splicing promotes rapid and efficient mRNA export in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(9): 3386-3391
- [35] Zuckerman B, Ulitsky I. Predictive models of subcellular localization of long RNAs. *RNA*, 2019, 25(5): 557-572
- [36] Bertram K, Agafonov DE, Liu WT, et al. Cryo-EM structure of a human spliceosome activated for step 2 of splicing. *Nature*, 2017, 542(7641): 318-323
- [37] Bessonov S, Anokhina M, Will CL, et al. Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core. *Nature*, 2008, 452(7189): 846-850
- [38] Schiene-Fischer C. Multidomain peptidyl prolyl cis/trans isomerases. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1850(10): 2005-2016
- [39] Nitsche A, Stadler PF. Evolutionary clues in lncRNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2017. doi: 10.1002/wrna.1376