

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2022-050

## RNA 转录后代谢时空精密控制技术

刘韧玫<sup>1,2,3</sup>, 李乐诗<sup>1,2</sup>, 杨小燕<sup>1,2</sup>, 陈显军<sup>1,2</sup>, 杨弋<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> 华东理工大学光遗传学与合成生物学交叉学科研究中心, 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237; <sup>2</sup> 华东理工大学药学院, 上海市细胞代谢光遗传学技术前沿科学研究基地, 上海 200237; <sup>3</sup> 华东理工大学生物工程学院, 上海 200237)

**摘要:** RNA种类繁多且功能多样, 是细胞活动的核心分子之一。RNA代谢调控对于基因和RNA功能研究、细胞生命活动解析以及疾病治疗手段的开发都是至关重要的。为了深入研究RNA时间、空间分布以及功能机制, 科学家们一直在追求可以在活细胞内对RNA分子活动进行精密控制的技术, 这也是近些年生命科学领域的研究热点之一。目前基于基因编辑、转录调控等可以控制RNA转录生成的技术已较为成熟, 但对于RNA转录后代谢的控制技术尚在发展与突破阶段。此前, RNA转录后代谢调控工具是通过调节RNA或基于RNA结合蛋白的RNA效应因子来实现的, 但它们的时空分辨率较低, 很难对RNA转录后代谢进行定时、定量和定位精密调控。光遗传学凭借其独特的高时空分辨率、非侵入性等优势已经被逐步用于发展活细胞RNA代谢时空精确控制技术。目前, 基于核苷酸光化学修饰、遗传编码光响应因子的光遗传学工具已经可实现在转录或转录后水平对RNA多种代谢活动的时空精密控制, 包括生成、运输、翻译、降解等。本文将介绍RNA代谢调控系统的研究进展, 并聚焦于RNA转录后代谢的光遗传学调控技术, 同时对其未来发展前景进行了展望。

**关键词:** 光遗传学; RNA代谢; RNA功能; 时空精密控制; 光控RNA结合蛋白

**中图分类号:** Q816 **文献标志码:** A

## Technologies for precise spatiotemporal control of post-transcriptional RNA metabolism

LIU Renmei<sup>1,2,3</sup>, LI Leshi<sup>1,2</sup>, YANG Xiaoyan<sup>1,2</sup>, CHEN Xianjun<sup>1,2</sup>, YANG Yi<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Optogenetics & Synthetic Biology Interdisciplinary Research Center, State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; <sup>2</sup>Shanghai Frontiers Science Center of Optogenetic Techniques for Cell Metabolism, School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; <sup>3</sup>School of Bioengineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** RNA exhibits complex dynamics and functions at specific times and locations inside cells, which include

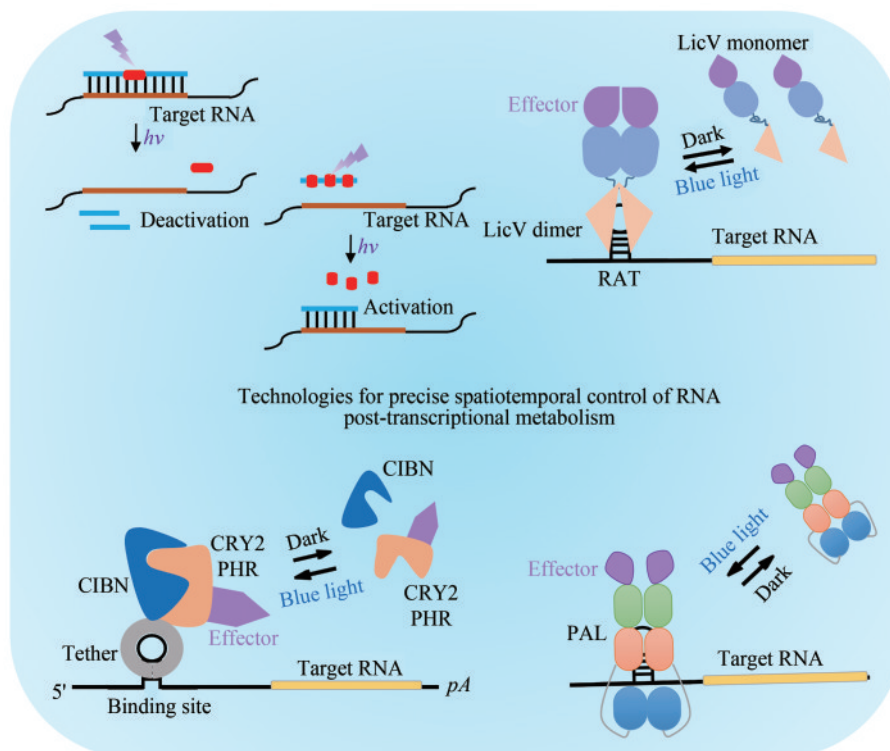
收稿日期: 2022-09-13 修回日期: 2022-11-18

基金项目: 国家重点研发计划 (2022YFC3400100, 2019YFA0904800, 2021ZD0202200); 国家自然科学基金 (32121005, 21937004, 32150028, 91857202, 32001026)

引用本文: 刘韧玫, 李乐诗, 杨小燕, 陈显军, 杨弋. RNA转录后代谢时空精密控制技术[J]. 合成生物学, 2023, 4(1): 141-164

Citation: LIU Renmei, LI Leshi, YANG Xiaoyan, CHEN Xianjun, YANG Yi. Technologies for precise spatiotemporal control of post-transcriptional RNA metabolism[J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(1): 141-164

changes in their expression, degradation, translocation, splicing and other chemical modifications. The precise regulation of RNA metabolism is crucial for the studies of gene and RNA functions, the analysis of cellular activities, as well as the development of treatments for diseases. In order to deeply understand the temporal and spatial distribution and functional mechanism of RNA, scientists are always pursuing technologies that can precisely control the activity of RNA molecules in live cells. There are several gene editing- or transcriptional regulation-based methodologies that can regulate RNA synthesis in live cells. However, technologies for controlling the post-transcriptional metabolic behaviors of RNA are highly desirable, but they are less attained. Traditional methodologies for regulating RNA metabolism, *e.g.*, regulatory RNA or RNA-binding proteins-based synthetic RNA effectors, suffer from low spatiotemporal resolution, making them difficult to dynamically regulate the post-transcriptional RNA metabolism in real time. Optogenetics has been used for precise spatiotemporal control of RNA metabolism in live cells due to its unique advantages of high spatiotemporal resolution and non-invasiveness. At present, photochemical modifications of nucleotides and genetically encoded photosensitive factors-based optogenetic tools have been applied for spatiotemporal control of various RNA metabolism at transcriptional or post-transcriptional levels, including transcription, translocation, translation and degradation. This article introduces recent progress in regulation of RNA metabolism, in particular the optogenetic control of post-transcriptional RNA metabolism, including technologies based on photochemical modified nucleotides, light-induced protein heterodimerization combined with RNA tethering, light-induced interactions between RNA-binding proteins and their cognate RNA motifs. Finally, we highlight prospects on technologies for precise spatiotemporal control of post-transcriptional RNA metabolism.



**Keywords:** optogenetics; RNA metabolism; RNA function; precise spatiotemporal control; light-switchable RNA-binding proteins

RNA作为DNA与蛋白质之间遗传信息传递的中间载体为人们所熟知。随着基因组学和生物信息学的发展,特别是高通量测序技术的大量应用,科学家发现细胞中还存在种类繁多且数量庞大的非编码RNA(non-coding RNA, ncRNAs)<sup>[1-2]</sup>。尽管这些ncRNAs不编码蛋白质,但它们在许多重要的细胞生命过程中都扮演至关重要的角色<sup>[2-4]</sup>,如在哺乳动物早期发育过程中调节多种基因的正确表达、参与炎症反应等。近年来RNA生物学研究进展迅速,不同种类的RNA及其修饰形式的鉴定、起源、功能与调控已经成为了国际研究前沿,而小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)、RNA适配体以及基于RNA的基因操作与分子识别技术也是国际生物技术应用的重要热点之一。这些研究不仅革新了人们对许多生物学基本概念和基本问题的认知,而且在生命科学、生物工程和医学中具有广阔的应用前景。

细胞内的RNA具有特定的时间、空间分布及不同的转录后修饰状态,可以像蛋白质一样形成复杂的高级结构进而与其他分子产生相互作用<sup>[5-7]</sup>。但与蛋白质研究相比,科学家对细胞内RNA的时间空间分布及其功能研究目前仍然相对滞后很多,其中一个重要原因是过去很长时间里缺乏可以在活细胞内对RNA分子活动进行精密控制的技术,使得深入研究RNA功能与调控机制面临重要技术挑战。

迄今为止, RNA调控技术的研究主要集中在RNA生成的控制,包括在基因和转录两个层面。在基因层面上,科学家可以利用基因编辑技术,如锌指核酸酶(ZF)、转录激活因子样效应物(TAL或TALE)以及成簇的规则间隔的短回文重复序列与其相关蛋白(CRISPR/Cas),通过对特定DNA序列的敲入、敲除、替换或突变等遗传操作,进而实现对RNA序列和功能的改变<sup>[8-9]</sup>。在转录水平上,各种基于Gal4、LexA等DNA结合结构域、TALE或CRISPR/dCas(核酸酶缺陷型Cas蛋白)的转录调控系统<sup>[10-13]</sup>与表观遗传修饰系统<sup>[13-15]</sup>也陆续被开发出来,可以实现对活细胞和活体内源与外源RNA生成的时空精确控制。

然而,除了RNA的生成, RNA还存在很多的转录后代谢活动。例如,转录生成后的RNA要经

历剪接、加帽、聚腺苷酸化等关键过程才能形成成熟的信使RNA(mRNA)<sup>[16]</sup>,成熟的mRNA有时还需要进行不同的化学修饰,如m<sup>6</sup>A、m<sup>6</sup>Am、m<sup>5</sup>C、m<sup>1</sup>A、假尿苷、A-to-I<sup>[17]</sup>,随后才被转运到细胞质中进行蛋白质翻译。除了mRNA以外,转录后非编码RNA也需要被正确折叠、运输到特定的细胞区室以发挥其正常生物学功能,包括参与染色质修饰、转座子沉默、pre-mRNA的剪接、基因沉默与逆转录等过程<sup>[18-21]</sup>。因此,这些RNA的转录后代谢活动可以用于调节基因表达产物的丰度、时空分布以及功能,在多种生理和病理过程中均发挥至关重要的作用<sup>[22-23]</sup>。综上所述,发展RNA转录后代谢的精密调控技术将极大促进人们从整合生物学的角度全面认识RNA的时空动态变化调控规律。

本综述将聚焦于RNA转录后代谢调控技术的研究进展,总结和讨论该领域的前沿技术方法以及展望其未来的发展方向和前景。

## 1 传统非光控RNA转录后代谢调控系统

此前,科学家可以通过反式调节因子在转录后水平对RNA代谢进行控制<sup>[18, 24]</sup>,如调节RNA(regulatory RNA)和RNA结合蛋白。一方面,随着越来越多类型调节RNA的作用机制被解析,科学家基于调节RNA发展了系列人工合成的RNA效应因子,它们一般包含两种作用方式:①通过招募内源功能蛋白质或通过与内源RNA结合机制竞争(占位作用)来调节目标RNA的代谢;②因本身就携带RNA修饰或其他的RNA调控功能结构域而直接作用于目的RNA。另一方面,科学家们在过去的20多年时间内也确定了大量的RNA结合蛋白(RNA binding proteins, RBPs)以及它们特异性的识别结合序列,并尝试通过将RNA结合蛋白或其RNA结合结构域与不同的功能结构域融合,开发了系列人工合成的RNA效应因子,试图通过操控这些人工合成RNA效应因子的活性或功能来达到调控RNA代谢的目的(表1)。

表1 RNA转录后代谢调控系统

项目	基于调节RNA的RNA效应因子	基于RNA结合蛋白的RNA效应因子	基于光化学修饰的核苷酸	基于光笼蛋白质或其配体	基于光诱导蛋白异二聚化和RNA结合蛋白	基于光控RNA结合蛋白PAL的RNA效应因子	基于光控RNA结合蛋白LicV的RNA效应因子
工作原理	自带或招募内源功能蛋白或空间位阻效应	RNA结合蛋白与不同功能结构域融合获得系列人工合成RNA效应因子	DNA/RNA中引入光化学修饰的寡核苷酸,光照调控DNA/RNA活性	利用光可移除的囚笼基团对RNA结合蛋白或其配体活性进行调控	光诱导蛋白异二聚化来调控RNA结合蛋白的活性	光诱导的PAL蛋白与RNA适配体的结合	光诱导的LicV与RAT RNA的结合
诱导条件	无	无	多数为UV光,少量为可见光	UV光	蓝光	蓝光	蓝光
细胞毒性	低	低	高	高	低	低	低
制备方法	遗传编码或体外合成	遗传编码	体外合成	体外合成	遗传编码	遗传编码	遗传编码
可调性	难	难	适中	适中	容易	容易	容易
时间分辨率	低	低	适中	适中	高	高	高
空间分辨率	低	低	高	高	高	高	高
普适性	高	高	低	低	未知	未知	高

### 1.1 基于调节RNA的RNA代谢调控技术

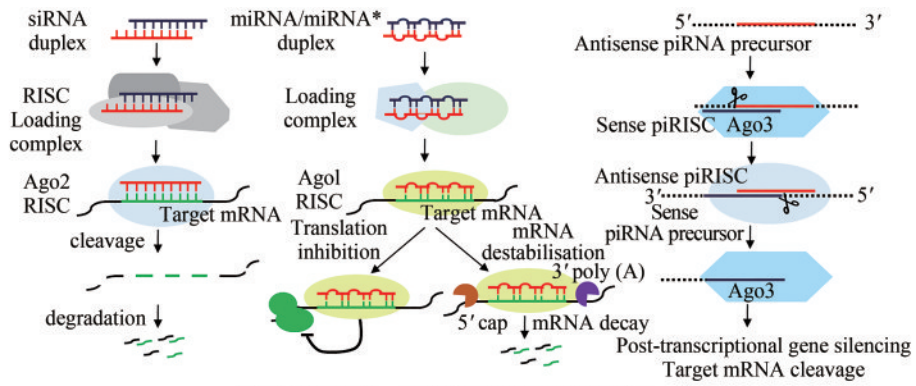
在很长一段时间里,调控RNA代谢的方法主要是利用RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术,它是一种进化上保守的序列特异性调控机制,可在转录水平或转录后水平由双链RNA诱发基因沉默。RNAi最早在1995年被Guo等<sup>[25]</sup>在秀丽新小杆线虫(*C.elegans*)中首次发现,随后陆续在动物、植物和真菌在内的真核生物中发现<sup>[26]</sup>,并被发展成为一种能在单细胞或活体内对特定基因功能进行调控与分析的有用工具。

在哺乳动物细胞中,人们可以通过体外化学合成、体外转录或体内直接表达微小RNA(microRNA, miRNA)、小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)以及与Piwi相互作用RNA(Piwi-interacting RNA, piRNA)等小RNA(small RNAs, sRNAs)[图1(a)]。sRNAs被装载Ago蛋白后其正义链会被降解,剩下的反义链可介导RNA诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complexes, RISC)靶向到与sRNA序列互补的mRNA或DNA分子,通过降解mRNA分子或抑制mRNA翻译,或者抑制DNA甲基化和染色质修饰来达到沉默特定基因的目的<sup>[27-30]</sup>。

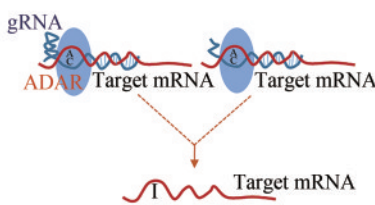
与RNAi技术的原理类似,反义寡核苷酸(antisense oligonucleotides, ASO)或长互补gRNA也可被设计为具有特定RNA调控功能的人工合成

RNA效应因子,它们通过与目的RNA的结合来招募细胞内源功能蛋白质或通过位阻效应来调控目的RNA的代谢<sup>[31]</sup>。例如,通过化学修饰的ASO或gRNA将内源ADAR酶(adenosine deaminase acting on RNA)招募到特定双链RNA(dsRNA),促使ADAR酶与该RNA结合,通过脱氨基作用将腺苷转化为肌苷使得RNA变得不稳定,从而实现RNA A-to-I编辑<sup>[32-33]</sup>[图1(b)]。此外,人们可以设计治疗性的ASO,它们可以按照碱基互补的方式来识别目的mRNA或pre-mRNA,通过招募RNase H进行RNA降解和翻译的调控,或者通过位阻效应阻断剪接信号来调控RNA的剪接[图1(c)]<sup>[34-35]</sup>。其中,RNase H是一种内源性的核糖核酸内切酶,它能够水解与DNA结合的RNA链上的磷酸二酯键,而不能水解单链或双链DNA或单独RNA链中的磷酸二酯键,因此能够特异性降解RNA/DNA异源双链体中的RNA分子。此外,RNase H还可以通过空间位阻效应阻止核糖体与RNA的结合而抑制蛋白质翻译。

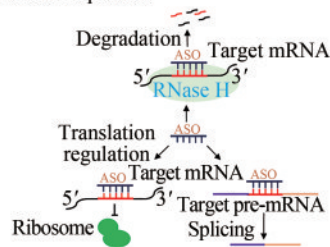
值得一提的是,此前还存在一种通过RNase H非依赖性反义寡核苷酸调控RNA代谢的方法。比较经典的例子是通过磷酸二氨基酯吗啉代低聚物调控3'非翻译区被插入了高效锤头状核酶(highly efficient hammerhead ribozymes, HHR)的目的mRNA的降解<sup>[36]</sup>[图1(d)]。锤头状核酶是一类具



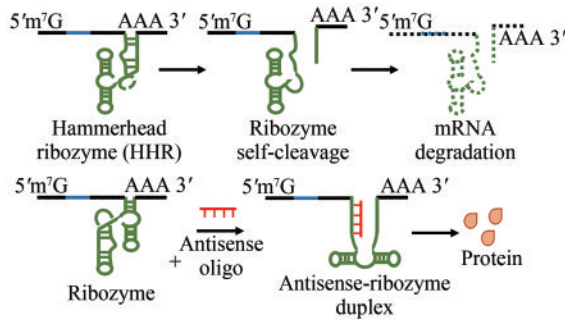
(a) 基于miRNA、siRNA和piRNA的RNA干扰  
(a) RNA interference based on miRNA, siRNA and piRNA



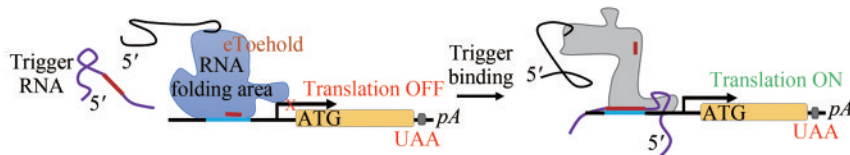
(b) 基于ASO或长互补gRNA的RNA A-to-I编辑  
(b) RNA A-to-I editing based on ASO or long complementary gRNA



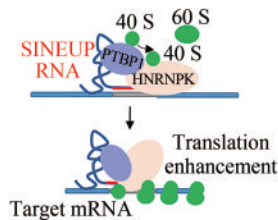
(c) 基于ASO的RNA降解、翻译和剪接  
(c) RNA degradation, translation, and splicing based on ASO



(d) 反义寡核苷酸使核酶失活从而恢复被HHR抑制的基因表达  
(d) Deactivation of the ribozyme by antisense oligonucleotide to rescue expression of gene deactivated by HHR



(e) eToeholds RNA分子开关(eToehold处于锁定状态时IRES活性被抑制。trRNA通过链侵入激活IRES活性，从而允许核糖体结合和翻译起始)  
(e) RNA-sensing riboswitch eToehold. eToehold modules are in locked states in which IRES activities are inhibited. trRNA activates IRES activities through strand invasion to release the IRES into an activated state, allowing for ribosome binding and protein production



(f) SINEUPs介导的翻译上调  
(f) SINEUPs mediated upregulating of translation



(g) 基于甲基转移酶核酶(MTR1)的RNA修饰  
(g) Methyltransferase ribozyme (MTR1) based RNA modification

图 1 基于调节RNA的人工合成RNA效应因子

Fig. 1 Engineered RNA effectors based on regulatory RNAs

有快速切割动力学的小型自切割核酶，是广泛使用的一类RNA型效应因子的RNA开关。其中，Ⅲ型锤头状核酶通过酶活性的提高被成功改造成为可以顺式切割哺乳动物mRNA的HHR，其活性可以被磷酸二氨基酯吗啉代低聚物严格调控。

类似地，trigger RNAs (trRNAs) 也可以被用来调控包含有eToeholds (eukaryotic toehold switches) RNA分子开关的目的mRNA的翻译<sup>[37]</sup> [图1(e)]。内部核糖体进入位点 (internal ribosome entry sites, IRES) 是在几种病毒和真核细胞内源转录产物中发现的RNA元件，其结构已经进化为可独立于mRNA 5'加帽和多聚腺苷酸化来启动蛋白质的翻译。真核细胞eToehold开关包含经过修饰的IRES，它能够通过特定trRNAs的存在来调节顺式报告基因的翻译。此外，这些eToeholds RNA分子开关也可被设计成为活性被抑制的IRES环状结构，它能够阻止IRES下游目的基因的翻译，但在与特定trRNA的正义-反义相互作用后，形成的新环路会破坏抑制性环路，进而重新激活IRES活性和下游目的基因的翻译。

还有一种策略是将调节RNA设计为自带RNA修饰或切割活性的人工合成RNA效应因子，进而直接对RNA代谢进行调控。例如，通过将反义的短散布核元件B2 (short interspersed nuclear element B2, SINEB2) 效应结构域嵌入天然长链非编码RNA (称为SINEUPs)，同时设计一段与mRNA部分重叠的反义序列 (称为结合域, BD)，可以实现正义链mRNA翻译的特异性上调<sup>[38-39]</sup> [图1(f)]。SINEUPs 先是与细胞质中的目的mRNA共定位，然后通过SINEUP相互作用的RNA结合蛋白 (如聚嘧啶束结合蛋白-1, PTBP1和异质核糖核蛋白K, HNRNPK) 相互作用来影响RNA的分布，再通过参与翻译起始复合物的组装来增加目的mRNA向多聚体的转移<sup>[40]</sup>。因此，整个SINEUP介导的翻译调控包含SINEUP RNA、目的mRNA和RNA结合蛋白在内的RNA-RNA-蛋白质复合物，它不仅有助于SINEUP RNA从细胞核穿梭到细胞质 (SINEUP RNA在没有目的mRNA的情况下保留在细胞核中)，还通过参与翻译起始复合物的组装来招募核糖体亚基，从而上调目的mRNA的翻译水平<sup>[40]</sup>。另一个经典的例子是通过设计具有特

定酶活性以及互补“结合臂”的核酶和脱氧核酶来实现靶标RNA修饰和切割的调控 [图1(g)]<sup>[41]</sup>。MTR1甲基转移酶核酶被第一个用于腺苷位点的特异性甲基化，它通过RNA-蛋白质复合物模拟RNA引导的RNA甲基化，使用一个简单的甲基化核碱基m<sup>6</sup>G作为甲基供体，在靶标RNA的特定位点合成唯一产物m<sup>1</sup>A。在这类人工合成RNA效应因子中，核酶或脱氧核酶因具有与靶标RNA互补“结合臂”而兼具核酶和靶向双重功能。

上述基于调节RNA的人工合成RNA效应因子凭借其可特异性调控内源和外源基因的表达而具有广阔的应用前景。目前它们已被应用于基因功能探究与基因治疗等领域<sup>[42-47]</sup>，如最近成功应用于新型冠状病毒感染 (COVID-19) 疫苗与RNAi药物的研发<sup>[43-45]</sup>、由G-to-A替代引起的疾病治疗<sup>[46]</sup>、ASO疗法的开发<sup>[47]</sup>等。然而，这些RNA效应因子一旦导入细胞内或在细胞内表达就会持续发挥功能，直至被降解，因此它们的可逆性和时空分辨率均不足，很难时空精确调控靶标RNA的代谢。

## 1.2 基于RNA结合蛋白的RNA代谢调控技术

在真核细胞中，许多蛋白质被认为具有结合RNA的功能，它们几乎控制RNA代谢的每一个过程，包括转录、加工、翻译、运输和定位等<sup>[48-49]</sup>。因此，人们设想能否利用RNA结合蛋白来调控RNA的代谢。此前比较常见的策略是直接利用天然的RNA结合蛋白与它们特异性识别的RNA序列，将天然RNA结合蛋白作为一个RNA结合支架来设计不同的RNA效应因子 (图2)。例如，科学家们将MS2衣壳蛋白 (MCP) 与不同的RNA功能结构域融合 [图2(a)]，发展了系列人工合成RNA效应因子，如将MCP与荧光蛋白、ADAR1结构域或转录激活因子融合，实现对靶标RNA的示踪<sup>[50-53]</sup>、A-to-I编辑<sup>[54, 55]</sup>或转录<sup>[56, 57]</sup>的调控。此外，科学家们在靶标RNA上融合多个MS2序列，通过招募多个效应因子到靶标RNA上来实现调控信号的放大 [图2(a)]。这一策略对于MCP-MS2在mRNA单分子成像的应用上特别重要，因为当靶标mRNA只包含单个MS2序列时，游离的MCP-FP融合蛋白会造成较高的本底荧光，使得只结合

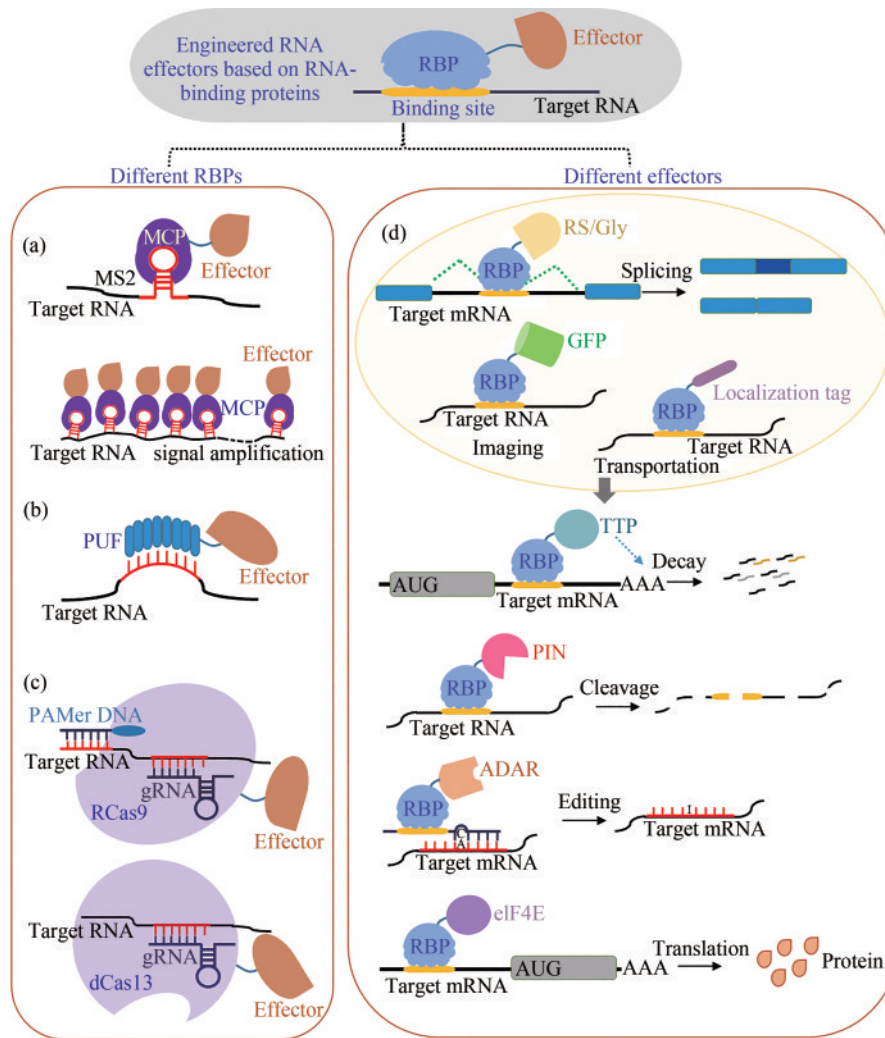


图2 基于RNA结合蛋白的人工合成RNA效应因子

Fig. 2 Engineered RNA effectors based on RNA-binding proteins

一个融合蛋白分子的靶标 mRNA 荧光信号很难与本底荧光信号区分开来<sup>[51, 58]</sup>。基于类似的策略, 科学家们将多个拷贝的 MS2 序列插入到 sgRNA 序列中, 可以实现对基因组中低重复区域或非重复区域的示踪与调控<sup>[53]</sup>。与 MCP-MS2 系统类似, PP7 衣壳蛋白 (PCP)<sup>[59]</sup> 可以结合特定的茎环 PBS 序列 (PCP-binding site), 它同样可被用于与不同的功能结构域融合来发展系列 RNA 效应因子<sup>[57]</sup>。由于 PBS 和 MS2 的序列不同, PCP 识别 PBS 和 MCP 识别 MS2 是生物正交的。因此, 融合了不同功能结构域的 MCP 和 PCP 可同时识别并结合含有 MS2 和 PBS 的目标 mRNA, 可实现目的 RNA 的多重控制或多色成像<sup>[60-61]</sup>。

与 MCP 或 PCP 不同的是, L7Ae RNA 结合蛋

白结合特定 RNA 序列后会导致结合序列结构改变<sup>[62]</sup>。L7Ae 是一种古菌蛋白, 当与金属离子一起结合 k-turn 序列后, 会稳定 k-turn 的动态结构<sup>[63]</sup>。基于这个特殊的性质, L7Ae 可被用于设计 RNA 开关。靶标 mRNA 的 5' 非编码区域的 L7Ae-k-turn 相互作用会阻止核糖体功能, 从而抑制 mRNA 翻译<sup>[64]</sup>。k-turn 还可被掺入反义 RNA 中, 此时的 L7Ae 可以作为信号输入, 通过折叠反义 RNA 使其不能与其互补链结合来激活翻译<sup>[65]</sup>。此外, 人们还通过改造与 L7Ae 结合的 k-turn 序列来开发一个翻译反馈系统, 并用于严格调控 mRNA 的翻译<sup>[66]</sup>。

与上述结合特定 RNA 序列的 RNA 结合蛋白不同, Pumilio/fem-3 结合因子 (PUF) 重复结构域<sup>[67]</sup> 及其衍生物, 可以被重新编程而与任意 RNA

序列结合用于RNA代谢调节 [图2(b)]。PUF结构域的一个显著特征是它们对短RNA序列的高亲和力,它包含8个重复片段,可以分别识别8个连续的RNA碱基。PUF可以作为一个RNA结合支架来设计不同的RNA效应器,用于RNA定位示踪<sup>[68-70]</sup>、mRNA翻译起始<sup>[71-72]</sup>、稳定性<sup>[73-74]</sup>以及剪接<sup>[75]</sup>的调控。

不同于PUF、MCP等只能靶向嵌入其特异性识别序列的靶标RNA分子,有些Cas蛋白可通过gRNA介导“自定义”靶向任意RNA序列。因此,基于它们开发的RNA效应因子可对任意RNA分子的代谢进行操控 [图2(c)],这对于RNA功能研究与应用具有重要意义。其中,RCas9或dCas13蛋白已经被用于与荧光蛋白、RNA内切酶、转录调节因子、m6阅读器蛋白、脱氨酶结构域等融合,实现对细胞内源mRNA的示踪<sup>[76]</sup>以及RNA特异性降解<sup>[77]</sup>、转录激活/抑制<sup>[78]</sup>、mRNA的降解或翻译控制<sup>[79]</sup>、RNA编辑<sup>[80]</sup>等RNA代谢活动的调控。

目前,基于RNA结合蛋白的人工RNA效应因子已经实现了对RNA多种代谢活动的调控 [图2(d)]。然而,这类RNA效应因子的活性和功能很难被限制或调控,一经表达就持续发挥功能,不仅增加脱靶效应,还很难实现对RNA代谢的实时动态调控。虽然有研究者试图利用化学诱导的方式调控这些RNA效应因子的活性,例如通过四环素类似物调控Tet阻遏蛋白(TetR)与靶标RNA结合,实现对真核细胞内mRNA翻译的诱导调控<sup>[81]</sup>;通过雷帕霉素诱导FKBP-FRB结合来调控基于dCas13的剪接因子的活性,实现对mRNA剪接的诱导调控<sup>[82]</sup>等。然而,化学诱导剂往往存在生理毒性、多效性、非特异性和易扩散不易清除等问题,还很难做到在时间和空间上精确控制RNA的代谢。

## 2 光控RNA转录后代谢调控系统

传统的非光控遗传操纵工具如调节RNA或基于RNA结合蛋白的RNA效应因子,它们的活性都很难被控制,很难实时动态调控RNA的水平与状态。因此,RNA研究仍迫切需要理想的调控技术,可以允许人们在时间和空间上精确控制RNA的代谢与功能。

光由于具有低毒性、易获取、易操控以及高时空分辨率等优点,是用于时空精确调控RNA代谢的理想诱导剂<sup>[83-87]</sup>。近年来,科学家们在利用光和光敏蛋白精密调控细胞行为这一光遗传学技术领域取得了一系列重大突破<sup>[84]</sup>。光遗传学技术是近20年来发展起来的技术革新之一,它最早在神经科学中被用来调控神经细胞的活性,目前已经被用于调控细胞膜定位、信号通路、基因表达、蛋白质功能以及复杂的生理活动等众多生命科学领域<sup>[88-91]</sup>。相比于传统的细胞调控技术,光遗传学技术的时间精度可达毫秒级,且空间精度可以精确到特定单一细胞甚至亚细胞器,并具有非侵入性和可逆性,这使得生物闭环研究进入微扰时代与单细胞水平<sup>[83-84]</sup>。因此,利用光遗传学发展活细胞RNA代谢精密控制技术将具有非常大的优势及前景。

### 2.1 基于光化学转换基团的光控RNA代谢调控技术

#### 2.1.1 基于核苷酸光化学修饰的调控技术

此前,科学家们通过在DNA/RNA杂交链中引入光化学修饰的寡核苷酸,可以使用光来调控经化学修饰的DNA/RNA活性,进而调控RNA的多种功能与代谢(图3)<sup>[92]</sup>。目前,有多种寡核苷酸光反应基团被应用于调节DNA/RNA结构和功能<sup>[92]</sup>,这些光反应基团具有不同的光反应类型,包括不可逆的光裂解反应(如邻硝基苄基、对羟基苯甲酰基、苯酚取代硫醚烯醇磷酸酯、芳基硫醚、硝基吡啶、二苯甲酮、苯乙酮、香豆素)、可逆的通过[2+2]环加成的分子间光交联反应(如香豆素、吡啶、乙烯基衍生物)、可逆的顺式-反式光异构化反应(如乙烯基衍生物、偶氮苯)、可逆的分子内光环化反应(如螺吡喃、二芳基乙烯)等。其中,研究和应用最为广泛的光反应基团是邻硝基苄基(oNB),通过对DNA/RNA中的碱基、骨架或核糖进行邻硝基苄基或其衍生物修饰,利用光裂解反应可实现对多种生物系统的调控。到目前为止,寡核苷酸功能的光调节方法一般有两种 [图3(a)]: ①作为光可切割的oNB或其衍生物接头被引入DNA/RNA主链,从而响应光刺激以触发链断裂<sup>[93-94]</sup>; ②通过核碱基封闭方法制造笼状核

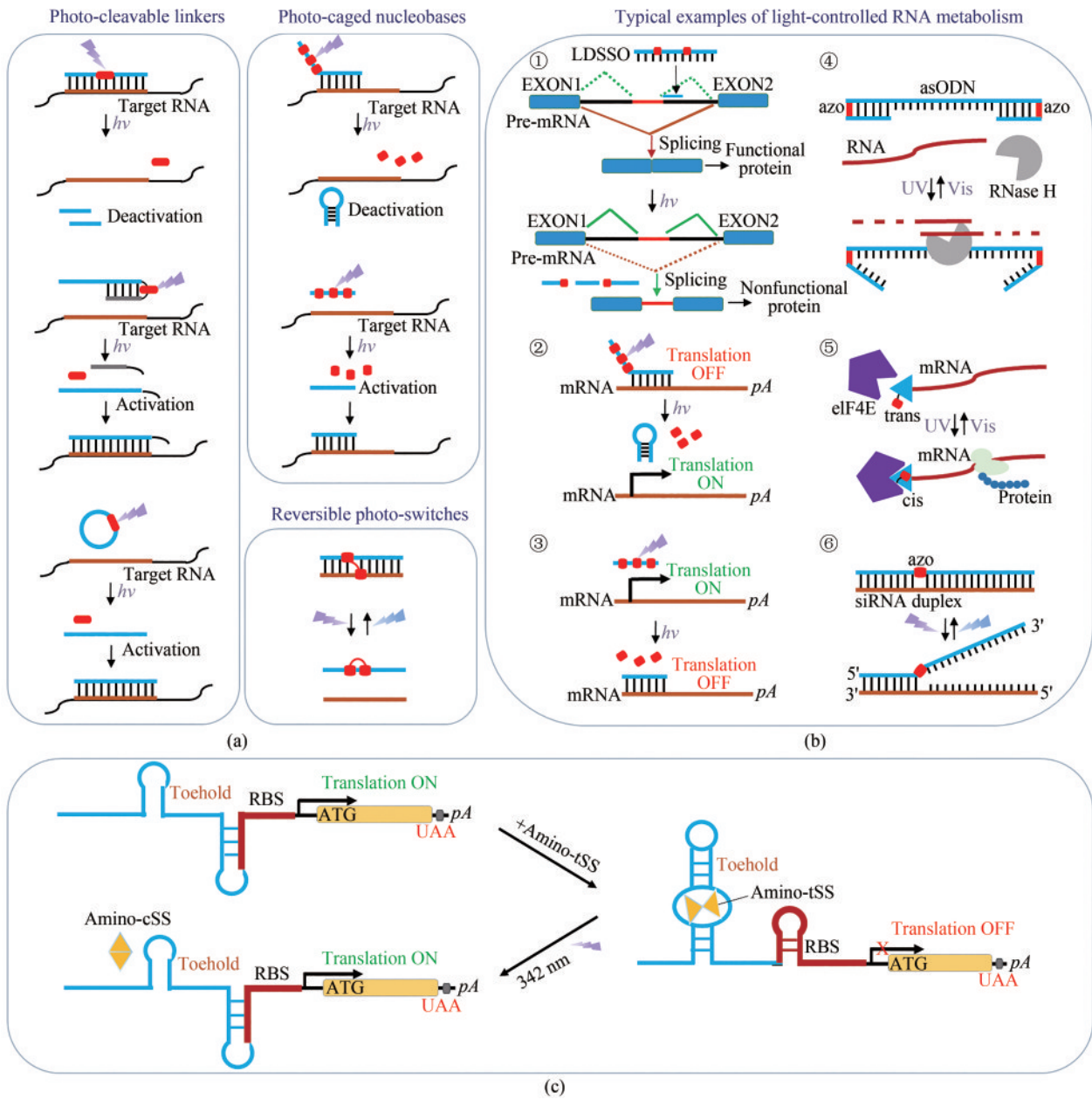


图3 基于核苷酸光化学修饰的调控技术

(a) 几种不同的寡核苷酸功能光调节方法。(b) 利用光可转换基团邻硝基苄基 (*o*NB) 或偶氮苯 (AzoB) 对 RNA 代谢的调控: ① *o*NB 修饰的 LDSO 对 RNA 剪接的调控; ② 通过核碱基笼状反义剂对基因沉默的光激活; ③ 通过光诱导形成发夹, 从而对反义剂进行光化学失活; ④ 使用偶氮苯修饰的哑铃反义寡脱氧核苷酸进行 RNA 降解的光响应调节; ⑤ PC-cap 对翻译的可逆光调节; ⑥ siRNAzOs 的光诱导失活和再激活。(c) Were-1 核糖开关的翻译调节。在没有配体的情况下, 核糖体结合位点 (RBS) 暴露并翻译荧光素酶, 而在存在 amino-tSS 的情况下, RBS 被隔离, 从而 Fluc 不表达。342 nm 光照射下, Amino-tSS 切换为 Amino-cSS 构象, 使得 Were-1 构象发生变化, 进而重新激活 RBS 活性

Fig. 3 Regulation technology based on photochemical modifications of nucleotides

(a) Different approaches for regulating oligonucleotide functions by light. (b) Regulation of RNA metabolism by photoswitchable *o*-nitrobenzyl (*o*NB) or azobenzene (AzoB). ① Regulation of RNA splicing by *o*NB-modified LDSOs; ② Light-activation of gene silencing through nucleobase-caged antisense agents; ③ Optochemical deactivation of an antisense agent through light-induced hairpin formation; ④ Photoregulating RNA digestion using azobenzene linked dumbbell antisense oligodeoxynucleotides; ⑤ Light-mediated reversible activation of translation via PC-cap; ⑥ Photoinduced inactivation and reactivation of siRNAzOs. (c) Translation regulation by the Were-1 riboswitch. In absence of the ligand, the ribosomal binding site (RBS) is exposed, and luciferase is translated, whereas in presence of amino-tSS, the RBS is sequestered, repressing the expression of Fluc. With light (342 nm) irradiation, amino-tSS is switched to amino-cSS conformation, causing the conformation change of Were-1 to activate RBS activities.

酸碱基<sup>[93]</sup>，形成笼锁 (caged) RNA 以响应光刺激。科学家们利用该方法已经实现了对环状反义寡核苷酸<sup>[95-96]</sup>、脱氧核酶<sup>[97-98]</sup>、限制核酸内切酶<sup>[99]</sup>或带负电荷的肽核酸<sup>[100]</sup>、RNA 干扰前体的单链环状 RNA<sup>[101-102]</sup>、siRNA 双链体<sup>[103-104]</sup>、基于 CRISPR-Cas9 的基因编辑的单导向 RNA (sgRNA)<sup>[105-107]</sup> 和剪接切换寡核苷酸<sup>[108-109]</sup> 等 RNA 的功能调控 [图 3(b)]。例如，Hemphill 等设计了一种光可裂解寡核苷酸 (light-deactivated SSO, LDSSO)，其中包含光可切割的 *o*NB 接头，它可以与 RNA 上特定位点结合，通过位阻效应阻断原剪接信号而调控 RNA 剪接。当 LDSSO 暴露在紫外光照射时，*o*NB 会响应光刺激而触发 LDSSO 链断裂，使其失去剪接调控功能 [图 3(b)①]<sup>[108]</sup>。类似地，*o*NB 或其衍生物可以被应用于 DNA/RNA 反义寡核苷酸形成笼状酸碱基，该囚笼结构可以响应光刺激而被去除，从而恢复反义寡核苷酸的调控功能 [图 3(b)②]<sup>[110]</sup>。*o*NB 或其衍生物还可以被插入 DNA/RNA 反义寡核苷酸的自互补链中形成笼状酸碱基，该囚笼结构也可以响应光刺激而被去除，从而促使反义寡核苷酸形成发夹结构而失去调控功能 [图 3(b)③]<sup>[110]</sup>。

还有一类光可转换基团是偶氮苯 (AzoB)，它在寡核苷酸调控中的应用最为广泛，它是一种可逆光开关 [图 3(a)]，并具有高量子产率、切换快速、低光漂白率、易于合成、高抗疲劳性和良好的热稳定性等优点<sup>[111]</sup>。通过在寡核苷酸片段中引入经偶氮苯或其衍生物修饰的 G 或 A 碱基、核苷、骨架或接头，科学家们可以利用顺式-反式光异构化反应来实现对 RNA 发夹结构的稳定性<sup>[112]</sup>、mRNA 的翻译<sup>[113]</sup>、基于 siRNA 的基因沉默<sup>[114]</sup> 等多种 RNA 代谢的光诱导调控 [图 3(b)]。例如，利用偶氮苯修饰的哑铃反义寡脱氧核苷酸 (azobenzene linked dumbbell antisense oligodeoxynucleotides, asODN) 可以通过紫外光或可见光照射可逆地控制整个发夹结构的稳定性。该结构包含两个末端发夹，由 asODN 和短抑制链组成，其中偶氮苯部分的高效反式到顺式光异构化会产生较大的热稳定性差异。修饰 asODN 的偶氮苯在可见光下处于反式结构，使得 asODN 被短抑制链紧密结合而只能结合很少比例的靶标 RNA；但在 UV 光照射下，偶氮苯会发生反式到顺式的光异构化，恢复 asODN 与靶标

RNA 结合，使得 asODN 通过招募 RNase H 和空间阻滞机制实现对靶标 RNA 的降解和翻译抑制 [图 3(b)④]<sup>[112]</sup>。类似地，将偶氮苯基团引入鸟苷的 C8 位置可诱导热不稳定的顺式 (*cis*) 异构体。Ogasawara 等对位于 C8 位置相对的 C2 胺进行不同的修饰，通过改变空间位阻的差异来调节其对 eIF4E 的亲和力。这类结构被称为光可控的帽子结构，它可以通过 370 nm 和 430 nm 光照射产生的顺反光异构来调控 mRNA 的翻译。在 370 nm 光照射下，PC-cap 的反式 (*trans*) 到顺式 (*cis*) 光异构化会激活 mRNA 的翻译。相反，通过 430 nm 光照射后产生的顺式到反式光异构化会关闭 mRNA 的翻译 [图 3(b)⑤]<sup>[113]</sup>。siRNA 的 RNA 调控功能也可以通过偶氮苯修饰进行光诱导调控。在 siRNA 双链有义链的内部插入偶氮苯修饰可合成被称为 siRNAzos 的 siRNA。这些 siRNAzos 中的偶氮苯在可见光下呈现顺式结构，可以将 siRNAzos 螺旋化而失去功能；在紫外光照射下，偶氮苯从顺式异构变为反式结构，促使 siRNAzos 发生解螺旋而恢复调控功能 [图 3(b)⑥]<sup>[114]</sup>。

其他的光可转换基团也可以在一些生物学应用中被用于调控 RNA 的代谢。例如：①通过对 RNA 上 U、T 碱基的芳基硫醚修饰，利用光裂解反应实现对 RNA 核糖开关折叠的控制<sup>[115]</sup>；②通过对 RNA 上 G、C 碱基的二苯甲酮或苯乙酮修饰，利用光裂解反应实现 mRNA 翻译<sup>[116]</sup> 或蛋白质-RNA 交联<sup>[117]</sup> 的控制；③通过对 DNA/RNA 上 G、T 碱基、磷酸基团、主链接头的香豆素修饰，利用分子间光交联反应实现对笼锁 mRNA 的激活控制<sup>[118]</sup>；④通过核苷的咪唑修饰，利用分子间光交联反应实现对瞬时基因沉默<sup>[119]</sup>、内源小 RNA<sup>[120]</sup> 或脱氧核酶活性<sup>[121]</sup> 的光诱导调控；⑤通过对核苷或 G 碱基的乙烯基衍生物修饰，利用分子间光交联或顺式-反式光异构化反应来实现 mRNA 翻译<sup>[122-123]</sup>、RNA 核糖开关的结构与功能的调控等。其中，通过光可转换基团硬-苯乙烯的顺式-反式光异构化反应调控 RNA 核糖开关的活性也是一个比较经典的例子 [图 3(c)]。硬-苯乙烯是一种快速且可逆的光致异构化小分子，可以在被称为 Amino-*t*SS 反式异构体和 Amino-*c*SS 顺式光异构体之间进行光诱导切换<sup>[124]</sup>。类似于真核细胞中 toehold 开关对于 IRES

的活性调控,原核细菌中 *toehold* 开关同样可以对核糖体结合位点 (ribosomal binding site, RBS) 的结构和功能进行控制,形成 RNA 核糖开关。在没有 Amino-*t*SS 结合时,体外筛选获得的 Werewolf-1 (Were-1) 核糖开关处于激活状态,下游开放阅读框的翻译正常进行。当该开关在与 Amino-*t*SS 结合时其结构会发生变化而转为锁定状态,使得 RBS 的活性被抑制,关闭下游开放阅读框的翻译。342 nm 的光可将 Amino-*t*SS 切换为 Amino-*c*SS 构象,由于 RNA 结合 Amino-*c*SS 的能力比 Amino-*t*SS 弱,这使得 Were-1 构象发生变化,进而重新激活 RBS 活性。

基于光可转换基团构建光反应寡核苷酸可以为操控 RNA 活性提供一种简便的方法,它利用光作为反应诱导剂,以空间和时间可控的方式改变分子结构来调控 RNA 的代谢。然而,该方法也有一定的局限性<sup>[92, 125-126]</sup>。例如,这些光可转换基团的反应波长往往处于紫外光或紫光范围,而通过工程改造而获得的反应波长红移的衍生物只是极少数<sup>[127]</sup>,这会导致细胞的不可逆损伤;大部分光反应基团的光转化产率(反应完全性)相对中等或偏低;包括笼锁 RNA 在内的多种化学修饰方式在 RNA 制备上具有较高的技术难度。因此,未来科学家们可以进一步改进光转换基团来使其获得更高的光反应效率、更长的反应波长等特性。另一方面,科学家们也通过具有更强光稳定性、生物相容性和可调性的光转换基团来扩展可用的光反应修饰阵列,从而拓宽它们在生物学研究中的适用性。

### 2.1.2 基于光笼(photocaged)蛋白质配体的调控技术

光反应基团还可以通过控制蛋白质或其配体的活性来以间接的方式调控 RNA 代谢。例如,人们将光可移除的囚笼基团与氨基酸残基或有机效应小分子配体进行连接,利用光照来时空精确控制特定蛋白的功能<sup>[128-132]</sup>。在非诱导条件下,光可移除的囚笼基团共价结合到有机效应小分子或特定氨基酸残基上以抑制其天然活性;在光照诱导条件下(最常用的是用 UV 光),囚笼基团会发生光解切割,并暴露出先前被囚笼的效应小分子或天然形式的氨基酸,从而失活或激活蛋白质的功

能,这个过程被称为去囚笼,如图 4 所示<sup>[133]</sup>。图 4(a)中,被囚笼的效应小分子不能行使其对蛋白质功能的调控,但紫外光的照射会使囚笼基团被去除,进而恢复其对蛋白质功能的调控;图 4(b)中,蛋白质的特定氨基酸被囚笼后活性被抑制,但紫外光的照射会使囚笼基团被去除,蛋白质的活性得以恢复。此前最常用的囚笼结构是建立在邻硝基苄基基础上的<sup>[134]</sup>,目前也开发出了具有不同光化学性质的囚笼结构<sup>[135-138]</sup>。

利用光可移除的囚笼基团可以对 RNA 结合蛋白或其配体活性进行光诱导控制,进而可实现 RNA 结合蛋白与靶标 modRNA (modified RNA) 间相互作用的光遗传学调控 [图 4(c)、(d)]。其中,基于 CaVT 和光笼配体的光控翻译激活系统是一个比较典型的例子<sup>[139]</sup>。CaVT 是由噬菌体衣壳蛋白 MCP 的 dIFG 突变体和被称为 VPg(FCV)的猫杯状病毒 VPg 蛋白融合而成。由于 MCP 可以结合靶标 modRNA 上的特异性 RNA 序列,以及 VPg(FCV)可以作为 5'帽的替代品,CaVT 被成功用于激活不含典型 5'帽的 modRNA 的翻译。

科学家们开发了两种基于 CaVT 和光笼配体的光控翻译激活系统,实现了对靶标 modRNA 的翻译激活调控<sup>[139]</sup>。一种是光响应分裂的 CaVT [图 4(c)],另一种是去稳定性结构域融合的 CaVT (DD-CaVT) [图 4(d)]。在光响应分裂的 CaVT 中,CaVT 被分裂为单独的 RNA 结合域和翻译激活结构域,并且这两个结构域的相互作用可以被光解囚笼配体诱导。其中,大肠杆菌二氢叶酸还原酶 (eDHFR) 和 HaloTag 分别融合 MCP 和 VPg(FCV),eDHFR 的配体甲氧苄啶 (TMP) 和 HaloTag 的配体 (HL) 被融合在一起形成融合配体 TMP-HL。当 TMP-HL 融合配体受到光可移除的囚笼基团的“囚笼”时,MCP 和 VPg(FCV)处于分裂状态,MCP-eDHFR 可以直接结合靶标 modRNA,但不能激活翻译。在紫外光照射下,“囚笼”TMP-HL 被去囚笼化,未囚笼化的 TMP-HL 便可同时结合 MCP-eDHFR 和 HaloTag-VPg(FCV),并诱导 VPg(FCV)介导的 modRNA 的翻译激活。在 DD-CaVT 系统中,DD-CaVT 在没有配体的情况下会被迅速降解,而在配体的光介导解笼下被稳定,因此能够对靶标 modRNA 的翻译进行调控。其中,eDHFR 衍生

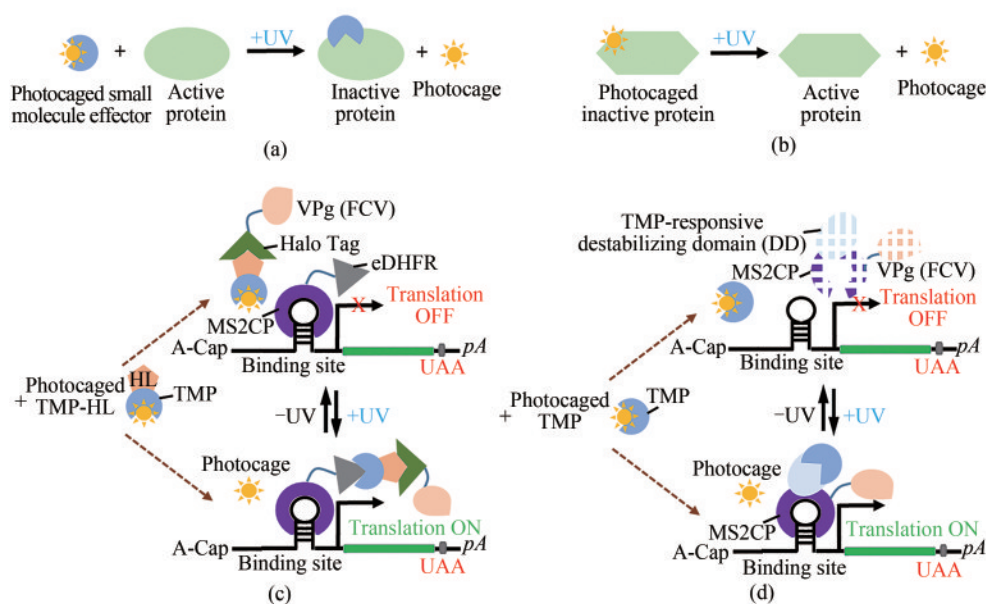


图4 基于光笼蛋白质配体的调控技术

(a) “光笼”效应小分子。(b) “光笼”氨基酸。(c) 基于分裂CaVT系统和光笼甲氧苄啶-HaloTag配体的光诱导翻译激活。光诱导TMP-HL去除光笼,使得TMP-HL介导MS2CP-eDHFR和HaloTag-VPg(FCV)发生相互作用。由此产生的MS2CP-eDHFR-HaloTag-VPg(FCV)复合物可激活含有1xMS2(U) site1-hmAG1基序的靶modRNA的翻译。(d) 基于光笼TMP与融合有响应TMP的去稳定域的CaVT(DD-CaVT)的光诱导翻译激活。光诱导TMP去除光笼,使得TMP与DD-CaVT发生相互作用,从而防止DD-CaVT的快速降解。稳定的DD-CaVT与含有弱结合基序1xMS2(U) site2-hmAG1的靶modRNA结合并激活其翻译

Fig. 4 Regulatory technology based on photocage protein ligands

(a) Photocaged small effector molecules. (b) Photocaged amino acids. (c) Light-inducible translational activation by split CaVT systems and photocaged trimethoprim-HaloTag ligand through light-mediated removal of the photocage from TMP-HL to enable the TMP-HL-mediated interactions between MS2CP-eDHFR and HaloTag-VPg(FCV), resulting MS2CP-eDHFR-HaloTag-VPg(FCV) complex to activate the translation of target modRNA containing a motif (1xMS2(U)site1-hmAG1). (d) Light-inducible translational activation by photocaged TMP and TMP-responsive destabilizing domain-fused CaVT (DD-CaVT) through light-mediated removal of the photocage from TMP to enable the interaction between TMP and DD-CaVT, preventing the rapid degradation of DD-CaVT for binding to a target modRNA with a weak binding motif (1xMS2(U) site2-hmAG1) and activate its translation.

的R12Y/Y100I不稳定结构域(DD)与CaVT融合,它的快速降解可以被TMP配体的结合而阻止。当TMP配体受到光可移除的囚笼基团的“囚笼”时,DD-CaVT被快速降解。在紫外光照射下,“囚笼”TMP被去囚笼化,未笼化的TMP便可结合DD-CaVT,阻止DD-CaVT被降解,DD-CaVT的MCP结构域便可结合modRNA,促使靶标modRNA的翻译激活。

## 2.2 基于遗传编码光响应因子的光控RNA转录后代谢调控系统

### 2.2.1 基于光敏蛋白组合CRY2/CIB1异源二聚的光控RNA转录后代谢调控系统

近十年来,随着光遗传学技术在利用光敏蛋

白控制蛋白质功能和基因表达方面越来越成熟,科学家们借鉴前人思路创新性地将光敏蛋白应用于人工合成RNA效应因子,试图通过合成光控RNA效应因子实现对RNA代谢的时空精密调控。其中,CRY2/CIB1光敏蛋白组合的光诱导相互作用,被最先用于发展基于RNA结合蛋白的光控RNA效应因子。来自拟南芥的隐花色素2(CRY2)和其伴侣蛋白CIB1[图5(a)],是蓝光诱导的异源二聚化蛋白,不需要外源引入发色团,有着较快的光响应动力学(对蓝光的响应处于亚秒级时间尺度)和良好的可逆性(撤除光照后几分钟即可解离)<sup>[140]</sup>。

2013年,Cao等<sup>[141]</sup>利用RNA系链系统的RNA结合结构域,同时结合CRY2/CIB1的相互作用,开发了光可控mRNA翻译因子,实现了哺乳动物细胞

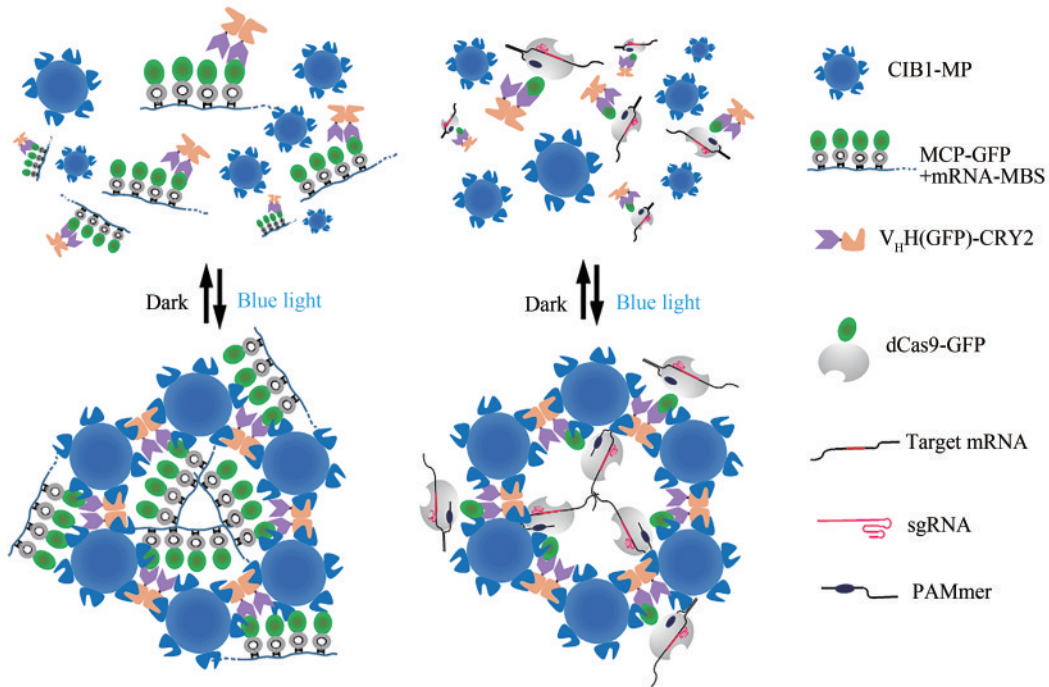
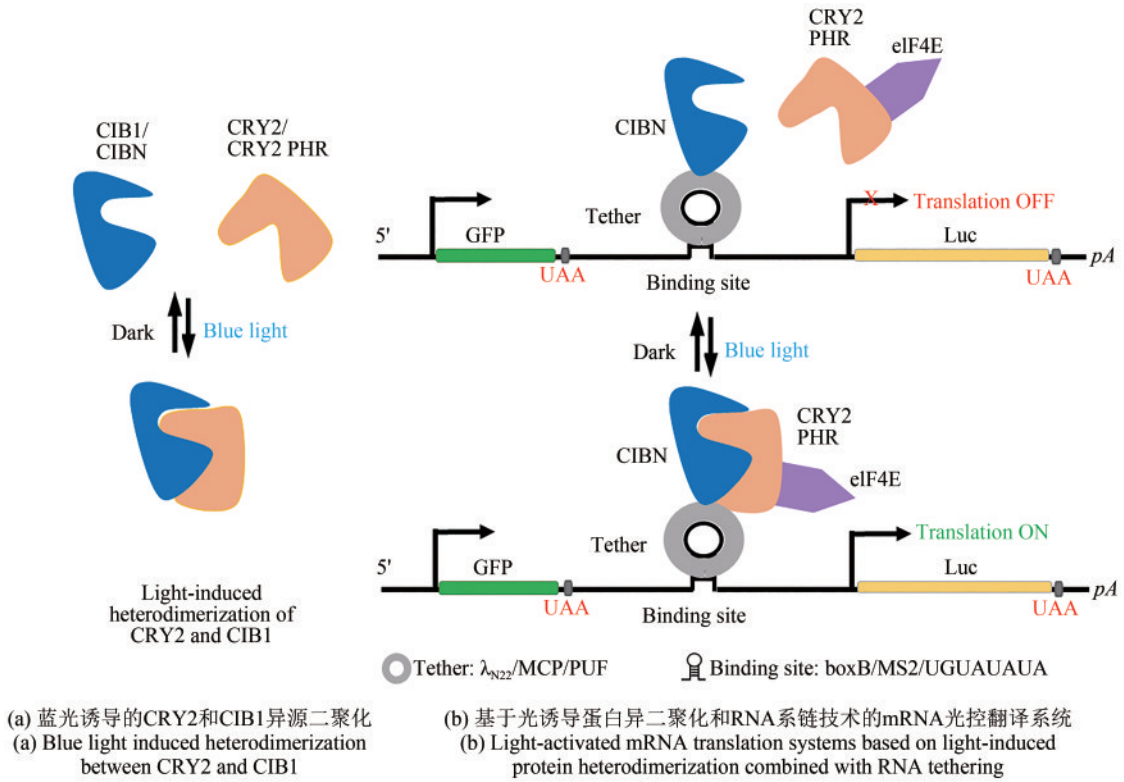


图5 基于CRY2/CIB1同源二聚化的mRNA定位和翻译的光遗传学控制技术

Fig. 5 Optogenetic control of mRNA localization and translation based on CRY2/CIB1 heterodimerization

中靶标 mRNA 翻译的光遗传学控制 [图 5(b)]。在该系统中, CIB1 截短体 (CIBN, 1~170 位氨基酸) 与  $\lambda$  噬菌体抗终止蛋白 N 端的 22 个氨基酸或 MS2 衣壳蛋白 (MCP) 融合得到  $\lambda$ -CIBN 或 CIBN-MCP 系链融合蛋白, CRY2 截短体 (PHR 结构域, 1~498 位氨基酸) 和 eIF4E 激活结构域融合得到 CRY2PHR-eIF4E 人工翻译起始因子。在蓝光照射下, 系链融合蛋白会与人工翻译起始因子形成异源二聚体, 通过 eIF4E 激活结构域招募其他翻译组分启动靶标 mRNA 的翻译。该光诱导翻译激活系统巧妙地利用 RNA 结合域和翻译起始域的光诱导重组, 是第一个应用于调控 mRNA 翻译的光遗传学系统。除了控制 mRNA 翻译外, 类似的系统还可被用于控制 mRNA 的剪接、稳定性和转运等代谢活动。因此, 光诱导蛋白异源二聚化和 RNA 系链技术的结合极大地扩展 RNA 代谢的光遗传学控制技术应用范围。基于类似的原理, Cao 等<sup>[142]</sup>于 2014 年将 RNA 结合结构域换成 PUF, 同样通过蓝光诱导人工翻译起始因子 CRY2PHR-eIF4E 和 CIBN-PUF 的异源二聚化, 通过 eIF4E 激活结构域招募其他翻译组分启动靶标 mRNA 的翻译, 该系统能够将荧光素酶报告基因的表达提高 17 倍以上。

2020 年, Heo 课题组<sup>[143]</sup>提出了一种可对特定 mRNA 定位和翻译进行光遗传学控制的 mRNA-LARIAT 技术。mRNA-LARIAT 系统也是基于 MS2 系链系统和 CRY2/CIB1 的光诱导相互作用设计的 [图 5(c)]。在该系统中, CRY2 与抗绿色荧光蛋白纳米体  $V_{H}$ (GFP) 融合, CIB1 与多聚体蛋白 MP 融合, 融合有 GFP 荧光蛋白的 MCP 可以结合含有 MS2 结合位点的 mRNA (mRNA-MBS)。CIB1-MP 与  $V_{H}$ (GFP)-CRY2 在蓝光诱导下可以形成异源二聚体, 而  $V_{H}$ (GFP)-CRY2 因含有抗绿色荧光蛋白的抗体可以结合 MCP-GFP, 因此蓝光可触发蛋白质之间的多聚相互作用而产生蛋白质“团簇”, 进而通过 MCP 与 MBS 相互作用捕获 mRNA-MBS 靶标 RNA。因此, 蓝光可诱导 mRNA-MBS 靶标 RNA 被固定隔离在蛋白质“团簇”中, 抑制了核糖体在靶标 RNA 上的动态结合与翻译过程。

随后, 他们将 mRNA-LARIAT 引入靶向 RNA 的 RCas9 系统中, 成功实现对内源 mRNA 翻译的光遗传学控制。与靶向外源 RNA 系统不同的是,

与 GFP 荧光蛋白融合的是 RCas9 蛋白, 通过蛋白质“团簇”中 RCas9 与 sgRNA、PAM 序列相互作用而靶向内源 RNA, 实现内源 mRNA 的成像。他们还利用 mRNA-LARIAT 系统实现了对细胞中新合成  $\beta$ -actin 蛋白质的区分。

上述这类基于光诱导蛋白异二聚化和 RNA 结合蛋白的光遗传学工具大大拓展了在转录后水平对 RNA 代谢的时空精确控制范畴, 从而有助于推动对于 RNA 和细胞功能以及它们与疾病之间因果关系的研究。然而, 这类方法中的 RNA 结合蛋白一旦表达就会一直结合靶标 RNA, 这很有可能会扰乱 RNA 的正常代谢与功能。相比之下, 利用如 PAL、Vivid 这类单一光敏蛋白的光诱导同源二聚化特性来开发光可控 RNA 结合蛋白, 进而发展只含有单一组分光可控 RNA 效应因子的系统, 可以避免上述问题。在这样的系统中, 人们可以利用光直接调控基于 RNA 结合蛋白的效应因子与 RNA 的结合活性, 从而达到对活细胞 RNA 多种代谢时空精确控制的目的。

## 2.2.2 基于光控 RNA 结合蛋白 PAL 同源二聚的光控 RNA 代谢调控系统

在活细胞中, RNA 结合蛋白被认为几乎参与了所有的 RNA 代谢过程<sup>[48-49]</sup>, 然而现有的 RNA 结合蛋白的活性很难被调控, 在对 RNA 代谢的实时动态调控上存在限制。2019 年, Weber 等<sup>[144]</sup>利用受蓝光调控的天然 RNA 结合蛋白 PAL, 筛选获得了能与其特异性结合的 RNA 适配体 [图 6(a)], 并利用蓝光调控 PAL 与 RNA 适配体的结合进而控制细菌和哺乳动物细胞内 mRNA 的翻译 [图 6(b)]。

PAL 是 Weber 等在革兰氏阳性放线菌中鉴定出的一种新 LOV 受体, 其 N 端到 C 端依次包括了 Per-ARNT-Sim (PAS)、ANTAR 和 LOV 结构域, 它在光照或黑暗下均呈现同源二聚体状态。通过指数富集的配体系统进化技术 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX), Weber 等筛选和鉴定出了两个性质优良的 PAL 亲和适配体——04.17 和 53.19, 它们与 PAL 具有良好的光依赖性相互作用以及低背景结合。PAL 可序列特异性地结合这两个短 RNA 茎环, 在蓝光下具有约 20 nmol/L 的亲和力, 在黑暗条件下则弱于 1  $\mu$ mol/L。

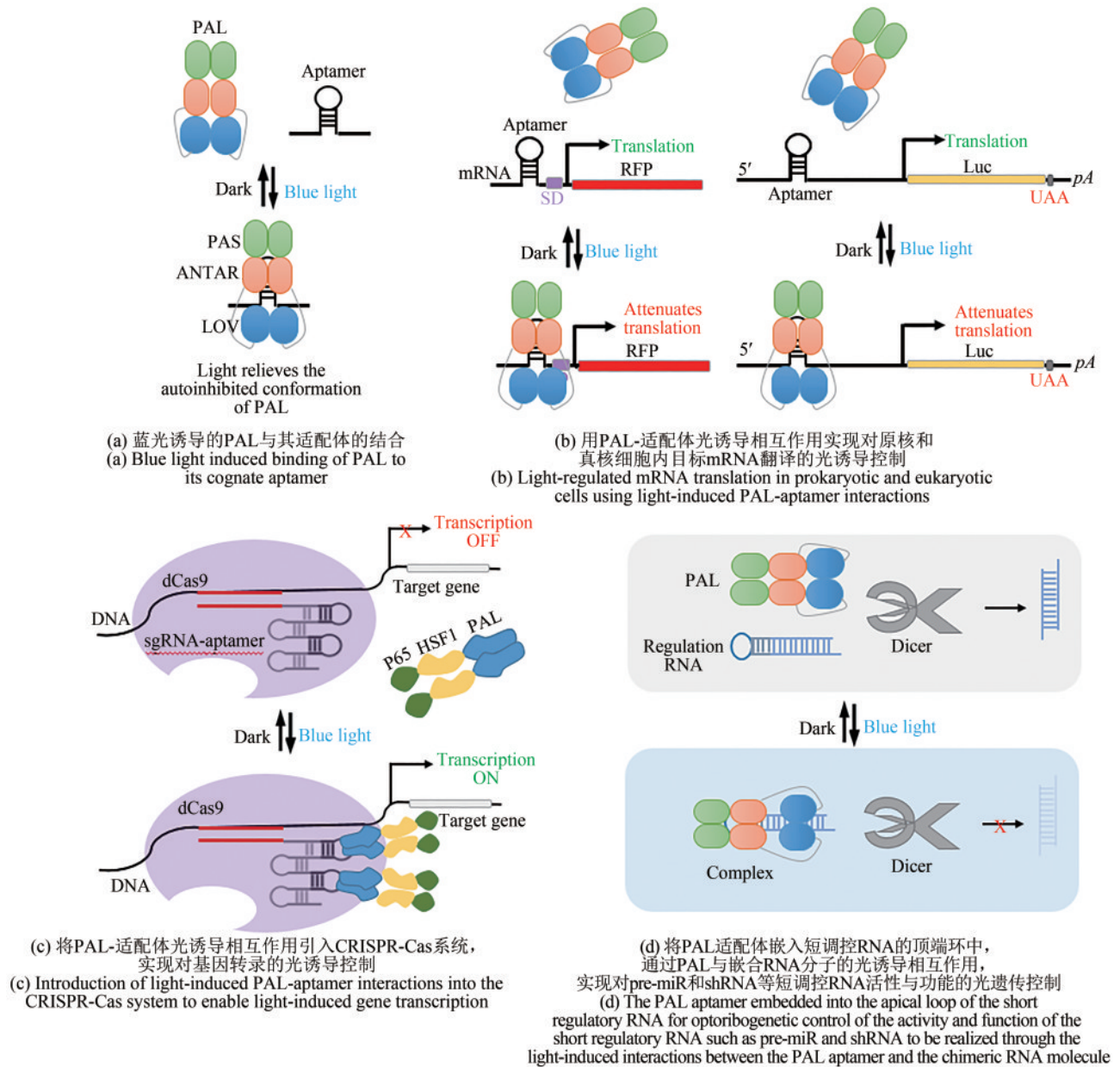


图6 基于PAL同源二聚化的RNA转录和转录后的光遗传学控制

Fig. 6 Optoribogenetic control of RNA transcription and post-transcription based on PAL homodimerization

在PAL结构中，LOV光电传感器由富含脯氨酸的连接肽与二聚体、全螺旋ANTAR效应器连接，并通过C末端的J $\alpha$ 螺旋指向ANTAR并与连接肽螺旋、源自连接肽的额外螺旋形成接触。在黑暗下，错综复杂的结构域相互作用使PAL处于RNA结合的自动抑制构象，可能是由于LOV模块阻碍了RNA与ANTAR结构域的接触。在蓝光诱导条件下，J $\alpha$ 螺旋与连接肽将光信号从LOV中转导到ANTAR模块中，引入的自由能扰动可减轻ANTAR

对于RNA结合的自动抑制作用。

基于PAL与适配体的相互作用，Weber等将适配体04.17嵌入荧光蛋白报告基因的Shine-Dalgarno (SD) 序列附近，利用蓝光诱导PAL与适配体结合，从而实现对大肠杆菌外源mRNA翻译的光遗传学控制。紧接着，他们又将适配体53.19嵌入到荧光素酶报告基因的5'-非翻译区，PAL可响应蓝光与嵌入mRNA 5'-非翻译区不同位置的53.19适配体结合，从而不同程度上降低mRNA报告基因的

翻译水平, 实现在哺乳动物细胞外源 mRNA 翻译的光遗传学控制。

2020年, Weber等<sup>[145]</sup>将PAL与RNA适配体53的光诱导相互作用引入sgRNA/dCas9系统, 实现了对mRNA转录生成的光遗传学精密调控[图6(c)]。具体来说, 他们将适体53嵌入sgRNA的四环(TL)和茎环2(SL2)中, 将PAL融合到激活域p65和HSF1(p65-HSF1-PAL, 称为PHP), 通过蓝光诱导PHP募集到sgRNA靶向的基因启动子附近, 激活目的基因的转录与表达。该系统需要两个适体结构域介导基因表达的激活, 具有良好光依赖性和可逆性, 并成功应用于对细胞内源基因转录的调节。

同一年, Weber等将PAL适配体53嵌入成熟的内源性微小RNA(microRNA, miRNA/miR)和合成短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)序列的顶端环中, 通过PAL与嵌合RNA分子的光依赖的可逆相互作用, 实现对哺乳动物细胞中pre-miR和shRNA等短调控RNA活性与功能的时空控制[图6(d)]<sup>[146]</sup>。其中, miR或shRNA等短调控RNA可以与mRNA的非编码或编码区中特定的互补位点相互作用, 进而抑制这些位点的翻译水平或促使靶标mRNA被水解。连接pre-miR/siRNA和适体结构域铰链区的单核苷酸突变会影响调节RNA功能并允许其微调, 其中光诱导的蛋白质表达变化最高达到15倍。该系统可通过改变mRNA中pre-miR或shRNA序列以针对不同的靶标RNA, 在时空调节细胞内源蛋白质和细胞行为上具有较好的适用性, 他们也利用该系统实现对细胞周期蛋白B1和CDK1蛋白的表达调控。

### 2.2.3 基于光控RNA结合蛋白LicV同源二聚的光控RNA代谢调控系统

光可控RNA结合蛋白也可以由天然RNA结合结构域和光感受器人工设计与合成。近期, Yang课题组通过独特的设计思路发展了首个人工合成的光控RNA结合蛋白LicV, 并基于它发展了系列光控RNA效应因子, 实现了活细胞RNA生成、剪接、运输、翻译和降解的时空精密控制(图7)<sup>[147]</sup>。

LicV是由来自枯草芽孢杆菌的转录抗终止蛋白LicT<sup>[148-149]</sup>的RNA结合域CAT(LicT<sup>CAT</sup>)与光敏蛋白Vivid(VVD)(一种含有LOV结构域的小

蛋白, 在蓝光激活后形成二聚体<sup>[150]</sup>)融合, 并利用基于流式细胞术的高通量筛选策略对融合蛋白LicT<sup>CAT</sup>-VVD的连接肽进行优化而获得。LicV蛋白具有光依赖的二聚化特性, 在蓝光照射下可以形成同源二聚体, 进而特异性结合抗终止子(ribonucleotidic antiterminator, RAT)RNA序列[图7(a)],  $K_D$ 为 $92.3 \text{ nmol/L} \pm 4.1 \text{ nmol/L}$ 。在黑暗条件下LicV主要呈现单体状态, 与RAT的结合力比, 在光照条件下仅为其1/40,  $K_D$ 为 $3793 \text{ nmol/L} \pm 428 \text{ nmol/L}$ 。LicV具有良好的可逆性, 与靶标RNA RAT的结合速率常数为 $2.8 \times 10^4 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ , 解离速率常数为 $1.8 \times 10^{-3} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ 。

LicV可在真核细胞中作为可编程的RNA结合支架, 被用于设计不同的人工合成效应因子来操纵靶标RNA的代谢与功能(图7)<sup>[147]</sup>, 包括:

(1) RNA定位的调控 将LicV与细胞膜定位信号肽CAAX基序、核定位信号肽NLS、外线粒体膜定位的TOMM20、出核信号肽NES等融合获得不同的光控RNA定位因子[图7(b)], 实现了将含有RAT茎环序列的靶标RNA转运到细胞膜、细胞核、线粒体外膜或细胞质的光遗传学控制, 该过程可逆且具有很高的时空分辨率。该课题组在LicV的VVD结构域中引入I85V突变, 获得的LicV<sub>I</sub>突变体具有更快的光恢复动力学, 可操控靶标RNA在光照1h内从细胞质迅速募集到质膜, 并在黑暗1h内从质膜逐渐解离到细胞质, 该过程还可以在单细胞的细胞膜局部区域进行精确控制。

(2) RNA剪接的调控 将LicV与SRSF7的RS结构域或hnRNP A1的Gly结构域融合, 获得了可用于选择性剪接光遗传学控制的光可控剪接因子, 利用光促进或阻碍含有RAT的靶RNA的盒式外显子增加[图7(c)]。

(3) 翻译的调控 将LicV与翻译起始因子eIF4E融合获得光控翻译起始因子LicV-eIF4E, 蓝光可诱导光控翻译起始因子结合靶标mRNA, 通过eIF4E结构域招募其他翻译组分启动目的mRNA的翻译[图7(d)]。LicV-eIF4E具有良好的光强依赖性, 可以通过改变光照强度在细胞中诱导不同程度的翻译水平。

(4) RNA降解的调控: 将LicV与RNA切割结构域结合, 获得的光可控RNA核酸内切酶LicV-

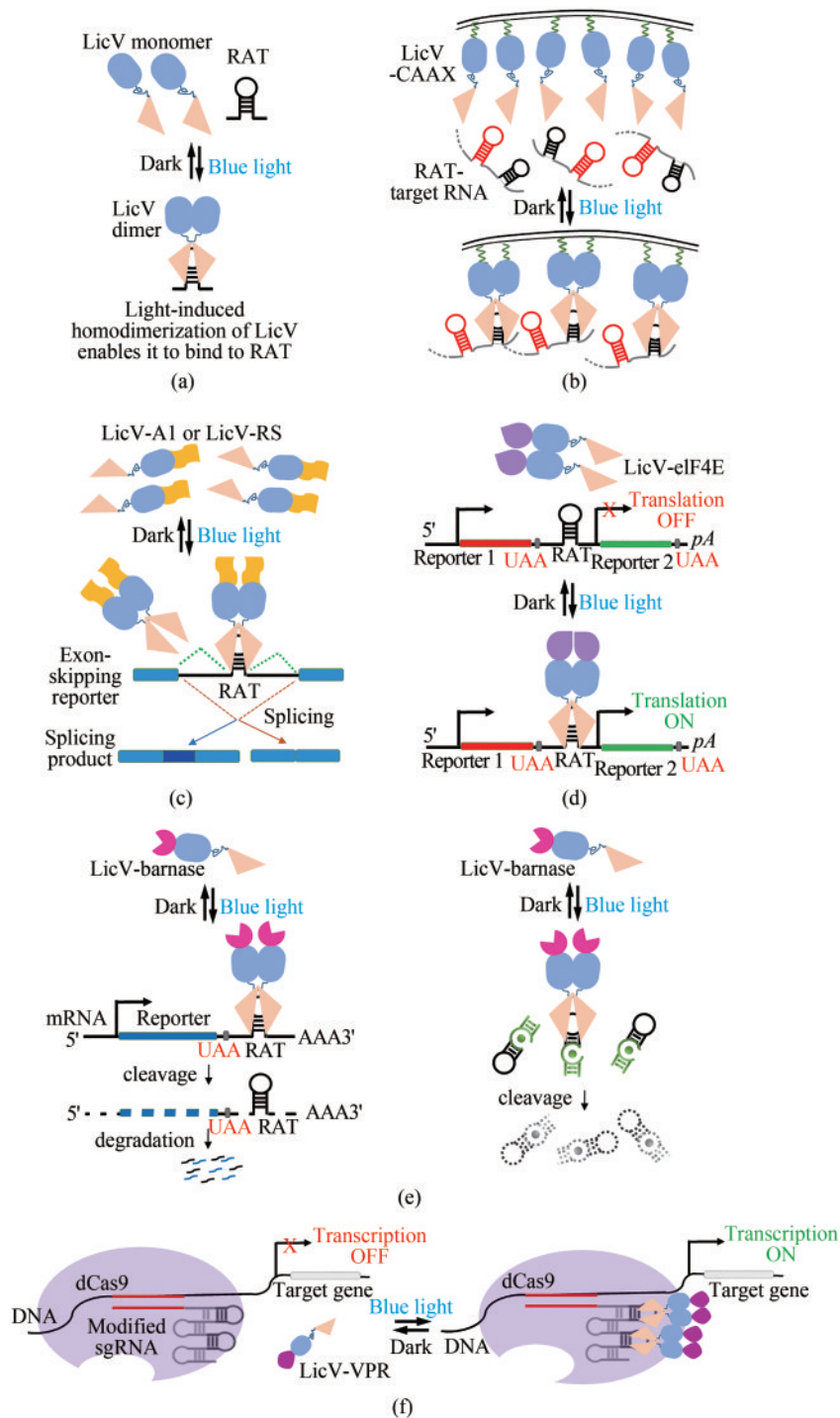


图7 基于LicV光诱导同源二聚化的RNA功能与代谢的光遗传学控制

(a) 蓝光可诱导 LicV 同源二聚化，使其与 RAT 短发夹 RNA 结合；(b)~(e) 利用 LicV-RAT 光诱导相互作用实现 RNA 定位 (b)、剪接 (c)、翻译 (d) 和降解 (e) 的光遗传学控制；(f) LA-CRISPR 系统原理：将 LicV-RAT 光诱导相互作用引入 CRISPR-Cas 系统，可实现对基因转录的光遗传学控制

Fig. 7 Optogenetic control of RNA function and metabolism based on light-induced homodimerization of LicV

Blue light induced homodimerization of LicV for its binding to RAT short hairpin RNA (a). Optogenetic control of RNA through light-induced LicV-RAT interaction for localization (b), splicing (c), translation (d), and degradation (e). The LA-CRISPR system based on the introduction of the light-induced LicV-RAT interaction into the CRISPR-Cas system to enable optogenetic control of gene transcription (f).

barnase<sub>M4</sub>/PIN可响应蓝光特异性结合并切割含有RAT的靶标mRNA或非编码RNA [图7(c)]。

LicV也可以与CRISPR-Cas系统结合起来发展新型光遗传学技术。Yang课题组基于LicV建立的LA-CRISPR系统可响应蓝光照射, 高效且灵活地调控内源和外源RNA的转录激活 [图7(f)]。在该转录激活系统中, 不同拷贝数的RAT序列以不同方式嵌入sgRNA四环、茎环2或3'末端, LicV以不同的连接肽与VPR转录激活域融合。sgRNA突变体和LicV-VPR突变体的不同组合具有不同的光诱导转录激活效率, 因此该系统具有良好的可调节性。LA-CRISPR系统还允许利用同一种Cas蛋白实现对不同基因的同时且差异调控, 以及通过简单地将RAT序列插入其相应的sgRNA或crRNA中来转化为对其他CRISPR-Cas系统的光遗传学控制。因此, 基于LicV的效应器对不同CRISPR-Cas系统具有广泛的适应性。他们简单地将VPR换为荧光蛋白报告基因以及将包含RAT的sgRNA改为靶向着丝粒, LA-CRISPR系统还可以成功应用于基因位点的可逆标记。

综上, 基于RNA结合蛋白和光敏蛋白同源二聚原理开发的光控RNA结合蛋白具有良好的光诱导性, 且设计简单、通用性强, 可用于开发更多样的光控RNA效应因子, 实现对RNA多种代谢活动的多元化时空精密控制。这种调控与分析手段将为全面深入解析活细胞RNA的时空动态变化和调控规律提供新技术与新方法, 同时还将极大推动病理解析、疾病诊断干预等领域的发展。

### 3 总结与展望

#### 3.1 总结

本文重点介绍了光控RNA转录后代谢调控系统的研究进展, 并详细描述如何利用光遗传学原理并结合合成生物学设计理念来发展新型光遗传学工具, 实现对RNA转录后代谢的时间和空间精密调控 (表1)。其中, 基于光可转换基团构建的光反应性寡核苷酸可以在RNA转录与转录后水平改变RNA分子结构, 进而实现对RNA活性和代谢的控制; 基于光诱导CRY2/CIB1异源二聚和RNA

结合蛋白的光遗传学工具实现了在转录或转录后水平对RNA多种代谢的调控, 包括RNA的生成、定位和翻译等; 利用蓝光响应的天然RNA结合蛋白PAL与其特异性结合的RNA适配体的相互作用, 实现了对活细胞mRNA生成与翻译以及短调控RNA活性与功能的光遗传学控制; 利用RNA结合结构域LicT<sup>CAT</sup>和光敏蛋白VVD设计与合成了光可控RNA结合蛋白LicV, 并基于它发展了系列光控RNA效应因子, 实现了对活细胞RNA生成、运输、剪接、翻译和降解等代谢的时空精密控制。综上所述, 本文介绍的光控RNA转录后代谢调控系统, 可以允许人们在时间和空间上精密控制活细胞RNA的各种转录后代谢活动, 将为RNA功能及其时空动态调控规律研究提供极具价值的实用工具。

#### 3.2 展望

细胞内的RNA具有特定的时间、空间分布以及不同的转录后修饰状态来执行正确的生物学功能。为了揭示RNA的作用机制, 有必要对细胞内RNA分子水平、分布和状态进行精密控制。此前发展的光遗传学工具可以允许人们在时间和空间上精确调控RNA的生成、剪接、运输、翻译和降解。然而, 活细胞RNA还存在共价修饰和编辑等转录后代谢行为。其中, RNA共价修饰包括如m<sup>6</sup>A (腺嘌呤上6号位N的甲基化)、tRNA上各种复杂的共价修饰, 或者mRNA上加帽序列m<sup>7</sup>G (鸟嘌呤上7号位N的甲基化), 它们可以改变RNA稳定性, 调控mRNA翻译。此外, 由ADAR蛋白介导的腺嘌呤到次黄嘌呤 (A-to-I) 的RNA编辑是后生动物中广泛存在的转录后修饰。由于I会被识别为G, 因此A-to-I RNA编辑在不改变基因组序列的情况下, 时空特异性地增加了转录组和蛋白组的多样性。因此, 发展光可控的RNA共价修饰与编辑系统对于RNA的功能发挥同样十分重要。与此同时, 许多细胞生命过程需要多种RNA分子的同时参与<sup>[151]</sup>, 如剪接体的装配与解离过程中牵涉多种snRNA<sup>[152]</sup>、核糖体形成也需要多种rRNA的参与等<sup>[153]</sup>。此外, RNA分子还存在剪接、修饰、运输、定位、翻译、降解等多种转录后代谢行为<sup>[154]</sup>, 它们在不同的层面以不同的尺度参与

RNA的功能发挥。因此,发展具有生物正交的光遗传学技术可以允许人们同时时空精确调控RNA多种代谢行为,实现RNA代谢与功能多维度、系统化的分析与解读。

此外,此前的光控RNA转录后代谢调控系统都是利用紫外光或者蓝光来调控光响应元件的活性。然而,紫外光会对细胞产生不可逆损伤,且制备并向活细胞中导入囚笼基团存在困难;蓝光虽然比紫外光有着更低的光毒性,但蓝光在含血红素的动物组织中渗透力不足,更高强度的蓝光可以诱导细胞内氧化应激导致皮肤过早光化<sup>[155]</sup>,这大大限制了系统在深层组织中应用,更加制约其向临床转化的应用。为了解决这一难题,Nguyen等<sup>[156]</sup>将响应蓝光的光遗传学系统与上转换纳米板(UCNP)相结合,这些纳米板具有增强的近红外(NIR)至蓝色上转换发光。UCNPs作为微型光传感器,在深组织可穿透近红外光的刺激下,使活体动物的LiCART细胞能够被诱导激活。这种NIR光可调纳米光遗传学平台能够时空控制CART细胞介导的针对血液系统恶性肿瘤和实体瘤的细胞毒性,并具有良好的剂量和时间可控性,从而大大减轻与当前免疫疗法相关的副作用。另一方面,Li等<sup>[157]</sup>将响应蓝光的光遗传学系统与荧光素酶发光系统结合起来,发展了一种基于生物发光能量共振转移的LuminON哺乳动物细胞基因表达调控系统。在该系统中,光敏元件中的荧光素酶催化底物furimazine发出460 nm波长的蓝光,通过分子内的能量转移激活光敏元件,进而启动目的基因的转录与表达。LuminON系统可以同时响应生物发光和外置蓝光,避免蓝光组织穿透力弱的不足,为系统在活体深层组织的应用提供很好的解决方案。除此之外,近红外光具有较低的细胞毒性以及较高的组织渗透性<sup>[158-159]</sup>,发展响应近红外光的光控RNA转录后代谢调控系统可以允许人们直接利用近红外光调控活体RNA的转录后代谢活动,这将使系统具有更高的效率和更好的可调性。

最后,将光控RNA代谢调控系统用于代谢工程具有很广泛的应用前景。在细胞的复杂代谢途径中,少数关键酶的表达量会对最终的代谢产物积累有巨大的影响。此前的光遗传学技术可以通过调控关键酶基因的转录和表达来控制关键酶在

细胞中的表达水平,进而调控细胞代谢流。然而,诱导状态下mRNA的转录生成与积累以及非诱导状态下mRNA的降解均需要时间,使得整个调控过程有着一定的延迟,这进而影响代谢流的方向与代谢产物的积累。相比之下,光控RNA转录后代谢调控系统可以直接调控关键酶mRNA的翻译和降解过程,一定程度上节省mRNA转录生成和降解所需要的时间,使得调控更加快速和及时,增加目的代谢产物的积累。

综上,如何进一步丰富活细胞RNA研究的“工具箱”,并将其应用于RNA功能研究与疾病治疗等领域,仍是未来研究中需要努力发展的方向。相信在不久的将来,科学家们会发展出功能多样化的RNA代谢调控工具,实现RNA代谢与功能系统化的分析与解读,为生物医学基础研究提供新工具,也为重大疾病的治疗提供新思路。

## 参 考 文 献

- [1] CECH T R, STEITZ J A. The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones[J]. *Cell*, 2014, 157(1): 77-94.
- [2] BHATTI G K, KHULLAR N, SIDHU I S, et al. Emerging role of non-coding RNA in health and disease[J]. *Metabolic Brain Disease*, 2021, 36(6): 1119-1134.
- [3] ESTELLER M. Non-coding RNAs in human disease[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2011, 12(12): 861-874.
- [4] MONTES M, SANFORD B L, COMISKEY D F, et al. RNA splicing and disease: animal models to therapies[J]. *Trends in Genetics: TIG*, 2019, 35(1): 68-87.
- [5] BATTICH N, STOEGER T, PELKMANS L. Image-based transcriptomics in thousands of single human cells at single-molecule resolution[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(11): 1127-1133.
- [6] WANG K C, CHANG H Y. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs[J]. *Molecular Cell*, 2011, 43(6): 904-914.
- [7] BUXBAUM A R, HAIMOVICH G, SINGER R H. In the right place at the right time: visualizing and understanding mRNA localization[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2015, 16(2): 95-109.
- [8] Method of the year 2011[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(1): 1.
- [9] KHAN S H. Genome-editing technologies: concept, pros, and cons of various genome-editing techniques and bioethical concerns for clinical application[J]. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2019, 16: 326-334.
- [10] DE MENA L, RIZK P, RINCON-LIMAS D E. Bringing light to transcription: the optogenetics repertoire[J]. *Frontiers in Genetics*, 2018, 9: 518.
- [11] TAN P, HE L, HUANG Y, et al. Optophysiology: illuminating

- cell physiology with optogenetics[J]. *Physiological Reviews*, 2022, 102(3): 1263-1325.
- [12] XU X S, QI L S. A CRISPR-dCas toolbox for genetic engineering and synthetic biology[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2019, 431(1): 34-47.
- [13] KONERMANN S, BRIGHAM M D, TREVINO A, et al. Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states[J]. *Nature*, 2013, 500(7463): 472-476.
- [14] WARYAH C B, MOSES C, AROOJ M, et al. Zinc fingers, TALEs, and CRISPR systems: a comparison of tools for epigenome editing[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2018, 1767: 19-63.
- [15] LO C L, CHOUDHURY S R, IRUDAYARAJ J, et al. Epigenetic editing of *Ascl1* gene in neural stem cells by optogenetics[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 42047.
- [16] CORBETT A H. Post-transcriptional regulation of gene expression and human disease[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2018, 52: 96-104.
- [17] ZACCARA S, RIES R J, JAFFREY S R. Reading, writing and erasing mRNA methylation[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2019, 20(10): 608-624.
- [18] GERSTBERGER S, HAFNER M, TUSCHL T. A census of human RNA-binding proteins[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2014, 15(12): 829-845.
- [19] MORRIS K V, MATTICK J S. The rise of regulatory RNA[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2014, 15(6): 423-437.
- [20] IWASAKI Y W, SIOMI M C, SIOMI H. PIWI-interacting RNA: its biogenesis and functions[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2015, 84: 405-433.
- [21] PANNI S, LOVERING R C, PORRAS P, et al. Non-coding RNA regulatory networks[J]. *Biochimica et Biophysica Acta Gene Regulatory Mechanisms*, 2020, 1863(6): 194417.
- [22] GOODALL G J, WICKRAMASINGHE V O. RNA in cancer[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2021, 21(1): 22-36.
- [23] JONKHOUT N, TRAN J, SMITH M A, et al. The RNA modification landscape in human disease[J]. *RNA*, 2017, 23(12): 1754-1769.
- [24] HUANG Y, ZHANG J L, YU X L, et al. Molecular functions of small regulatory noncoding RNA[J]. *Biochemistry Biokhimiia*, 2013, 78(3): 221-230.
- [25] GUO S, KEMPHUES K J. Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed[J]. *Cell*, 1995, 81(4): 611-620.
- [26] ZHAO J H, GUO H S. RNA silencing: from discovery and elucidation to application and perspectives[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2022, 64(2): 476-498.
- [27] GHILDIYAL M, ZAMORE P D. Small silencing RNAs: an expanding universe[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2009, 10(2): 94-108.
- [28] DANG Y K, YANG Q Y, XUE Z H, et al. RNA interference in fungi: Pathways, functions, and applications[J]. *Eukaryotic Cell*, 2011, 10(9): 1148-1155.
- [29] MORAN Y H, AGRON M, PRAHER D, et al. The evolutionary origin of plant and animal microRNAs[J]. *Nature Ecology & Evolution*, 2017, 1: 27.
- [30] OPHINNI Y, PALATINI U, HAYASHI Y, et al. piRNA-guided CRISPR-like immunity in eukaryotes[J]. *Trends in Immunology*, 2019, 40(11): 998-1010.
- [31] LIU H C, RAUCH S, DICKINSON B C. Programmable technologies to manipulate gene expression at the RNA level[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2021, 64: 27-37.
- [32] MERKLE T, MERZ S, REAUTSCHNIG P, et al. Precise RNA editing by recruiting endogenous ADARs with antisense oligonucleotides[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(2): 133-138.
- [33] QU L, YI Z Y, ZHU S Y, et al. Programmable RNA editing by recruiting endogenous ADAR using engineered RNAs[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(9): 1059-1069.
- [34] CROOKE S T, WITZTUM J L, BENNETT C F, et al. RNA-targeted therapeutics[J]. *Cell Metabolism*, 2018, 27(4): 714-739.
- [35] KOLE R, KRIEG A M. Exon skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2015, 87(4): 104-107.
- [36] ZHONG G C, WANG H M, HE W H, et al. A reversible RNA on-switch that controls gene expression of AAV-delivered therapeutics *in vivo*[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(2): 169-175.
- [37] ZHAO E M, MAO A S, DE PUIG H, et al. RNA-responsive elements for eukaryotic translational control[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(4): 539-545.
- [38] HOSEINPOOR R, KAZEMI B, RAJABIBAZL M, et al. Improving the expression of anti-IL-2R $\alpha$  monoclonal antibody in the CHO cells through optimization of the expression vector and translation efficiency[J]. *Journal of Biotechnology*, 2020, 324: 112-120.
- [39] BON C, LUFFARELLI R, RUSSO R, et al. SINEUP non-coding RNAs rescue defective frataxin expression and activity in a cellular model of Friedreich's Ataxia[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(20): 10728-10743.
- [40] TOKI N, TAKAHASHI H, SHARMA H, et al. SINEUP long non-coding RNA acts via PTB1 and HNRNPK to promote translational initiation assemblies[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(20): 11626-11644.
- [41] SCHEITL C P M, GHAEM MAGHAMI M, LENZ A K, et al. Site-specific RNA methylation by a methyltransferase ribozyme[J]. *Nature*, 2020, 587(7835): 663-667.
- [42] AGRAWAL N, DASARADHI P V N, MOHMMED A, et al. RNA interference: biology, mechanism, and applications[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2003, 67(4): 657-685.
- [43] KELLEHER A D, CORTEZ-JUGO C, CAVALIERI F, et al. RNAi therapeutics: an antiviral strategy for human infections[J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2020, 54: 121-129.

- [44] CORBETT K S, EDWARDS D K, LEIST S R, et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness[J]. *Nature*, 2020, 586(7830): 567-571.
- [45] MULLIGAN M J, LYKE K E, KITCHIN N, et al. Publisher Correction: Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults[J]. *Nature*, 2021, 590(7844): E26.
- [46] REES H A, LIU D R. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2018, 19(12): 770-788.
- [47] ROBERTS T C, LANGER R, WOOD M J A. Advances in oligonucleotide drug delivery[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2020, 19(10): 673-694.
- [48] PICHON X, WILSON L A, STONELEY M, et al. RNA binding protein/RNA element interactions and the control of translation[J]. *Current Protein & Peptide Science*, 2012, 13(4): 294-304.
- [49] ABIL Z, DENARD C A, ZHAO H M. Modular assembly of designer PUF proteins for specific post-transcriptional regulation of endogenous RNA[J]. *Journal of Biological Engineering*, 2014, 8(1): 7.
- [50] QUERIDO E, CHARTRAND P. Using fluorescent proteins to study mRNA trafficking in living cells[J]. *Methods in Cell Biology*, 2008, 85: 273-292.
- [51] BERTRAND E, CHARTRAND P, SCHAEFER M, et al. Localization of *ASH1* mRNA particles in living yeast[J]. *Molecular Cell*, 1998, 2(4): 437-445.
- [52] MA H H, TU L C, NASERI A, et al. CRISPR-Sirius: RNA scaffolds for signal amplification in genome imaging[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(11): 928-931.
- [53] QIN P W, PARLAK M, KUSCU C, et al. Live cell imaging of low- and non-repetitive chromosome loci using CRISPR-Cas9[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14725.
- [54] FUJII S, SMALL I. The evolution of RNA editing and pentatricopeptide repeat genes[J]. *New Phytologist*, 2011, 191(1): 37-47.
- [55] AZAD M T A, BHAKTA S, TSUKAHARA T. Site-directed RNA editing by adenosine deaminase acting on RNA for correction of the genetic code in gene therapy[J]. *Gene Therapy*, 2017, 24(12): 779-786.
- [56] SHAO J W, WANG M Y, YU G L, et al. Synthetic far-red light-mediated CRISPR-dCas9 device for inducing functional neuronal differentiation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(29): E6722-E6730.
- [57] ZALATAN J G, LEE M E, ALMEIDA R, et al. Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds[J]. *Cell*, 2015, 160(1/2): 339-350.
- [58] CZAPLINSKI K. Techniques for single-molecule mRNA imaging in living cells[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2017, 978: 425-441.
- [59] CHAO J A, PATSKOVSKY Y, ALMO S C, et al. Structural basis for the coevolution of a viral RNA-protein complex[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2008, 15(1): 103-105.
- [60] MA H H, TU L C, NASERI A, et al. Multiplexed labeling of genomic loci with dCas9 and engineered sgRNAs using CRISPRainbow[J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(5): 528-530.
- [61] SHAO S P, ZHANG W W, HU H, et al. Long-term dual-color tracking of genomic loci by modified sgRNAs of the CRISPR/Cas9 system[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(9): e86.
- [62] KARAGIANNIS P, FUJITA Y, SAITO H. RNA-based gene circuits for cell regulation[J]. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and Biological Sciences*, 2016, 92(9): 412-422.
- [63] KOPNICZKY M B, MOORE S J, FREEMONT P S. Multilevel regulation and translational switches in synthetic biology[J]. *IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems*, 2015, 9(4): 485-496.
- [64] LILLEY D M J. The K-turn motif in riboswitches and other RNA species[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 2014, 1839(10): 995-1004.
- [65] SAITO H, KOBAYASHI T, HARA T, et al. Synthetic translational regulation by an L7Ae-kink-turn RNP switch[J]. *Nature Chemical Biology*, 2010, 6(1): 71-78.
- [66] STAPLETON J A, ENDO K, FUJITA Y, et al. Feedback control of protein expression in mammalian cells by tunable synthetic translational inhibition[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2012, 1(3): 83-88.
- [67] ZHAO Y Y, MAO M W, ZHANG W J, et al. Expanding RNA binding specificity and affinity of engineered PUF domains[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(9): 4771-4782.
- [68] JAMIESON A C, MILLER J C, PABO C O. Drug discovery with engineered zinc-finger proteins[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2003, 2(5): 361-368.
- [69] MACKAY J P, FONT J, SEGAL D J. The prospects for designer single-stranded RNA-binding proteins[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2011, 18(3): 256-261.
- [70] FERRÉ-D'AMARÉ A R, DOUDNA J A. Crystallization and structure determination of a hepatitis delta virus ribozyme: use of the RNA-binding protein U1A as a crystallization module [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 295(3): 541-556.
- [71] SHAV-TAL Y, DARZACQ X, SHENOY S M, et al. Dynamics of single mRNPs in nuclei of living cells[J]. *Science*, 2004, 304(5678): 1797-1800.
- [72] FERRÉ-D'AMARÉ A R. Use of the spliceosomal protein U1A to facilitate crystallization and structure determination of complex RNAs[J]. *Methods*, 2010, 52(2): 159-167.
- [73] GOLDING I, PAULSSON J, ZAWILSKI S M, et al. Real-time kinetics of gene activity in individual bacteria[J]. *Cell*, 2005, 123(6): 1025-1036.
- [74] VASUDEVAN S, STEITZ J A. AU-rich-element-mediated up-regulation of translation by FXR1 and argonaute 2[J]. *Cell*, 2007, 128(6): 1105-1118.

- [75] WANG Y, CHEONG C G, TANAKA HALL T M, et al. Engineering splicing factors with designed specificities[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(11): 825-830.
- [76] NELLES D A, FANG M Y, O'CONNELL M R, et al. Programmable RNA tracking in live cells with CRISPR/Cas9[J]. *Cell*, 2016, 165(2): 488-496.
- [77] BATRA R, NELLES D A, PIRIE E, et al. Elimination of toxic microsatellite repeat expansion RNA by RNA-targeting Cas9[J]. *Cell*, 2017, 170(5): 899-912.e10.
- [78] KERYER-BIBENS C, BARREAU C, OSBORNE H B. Tethering of proteins to RNAs by bacteriophage proteins[J]. *Biology of the Cell*, 2008, 100(2): 125-138.
- [79] RAUCH S, HE C, DICKINSON B C. Targeted m<sup>6</sup>A reader proteins to study epitranscriptomic regulation of single RNAs[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(38): 11974-11981.
- [80] COX D B T, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, et al. RNA editing with CRISPR-cas13[J]. *Science*, 2017, 358(6366): 1019-1027.
- [81] GOLDFLESS S J, BELMONT B J, DE PAZ A M, et al. Direct and specific chemical control of eukaryotic translation with a synthetic RNA-protein interaction[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(9): e64.
- [82] DU M, JILLETTE N, ZHU J J, et al. CRISPR artificial splicing factors[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 2973.
- [83] PASTRANA E. Optogenetics: controlling cell function with light[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(1): 24-25.
- [84] DEISSEROTH K. Optogenetics[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(1): 26-29.
- [85] LIU X, TONEGAWA S. Optogenetics 3.0[J]. *Cell*, 2010, 141(1): 22-24.
- [86] NOWAK V A, PEREIRA E A C, GREEN A L, et al. Optogenetics—shining light on neurosurgical conditions[J]. *British Journal of Neurosurgery*, 2010, 24(6): 618-624.
- [87] TISCHER D, WEINER O D. Illuminating cell signalling with optogenetic tools[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014, 15(8): 551-558.
- [88] REPINA N A, ROSENBLOOM A, MUKHERJEE A, et al. At light speed: Advances in optogenetic systems for regulating cell signaling and behavior[J]. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2017, 8: 13-39.
- [89] SOMUNCU Ö S, BERNS H M, SANCHEZ J G. New pioneers of optogenetics in neuroscience[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2020, 1288: 47-60.
- [90] REDCHUK T A, KARASEV M M, VERKHUSHA P V, et al. Optogenetic regulation of endogenous proteins[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 605.
- [91] GOGLIA A G, TOETTCHER J E. A bright future: optogenetics to dissect the spatiotemporal control of cell behavior[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2019, 48: 106-113.
- [92] TAVAKOLI A, MIN J H. Photochemical modifications for DNA/RNA oligonucleotides[J]. *RSC Advances*, 2022, 12(11): 6484-6507.
- [93] LIU Q Y, DEITERS A. Optochemical control of deoxyoligonucleotide function *via* a nucleobase-caging approach[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2014, 47(1): 45-55.
- [94] DUSSY A, MEYER C, QUENNET E, et al. New light-sensitive nucleosides for caged DNA strand breaks[J]. *ChemBioChem*, 2002, 3(1): 54-60.
- [95] TANG X J, SU M, YU L L, et al. Photomodulating RNA cleavage using photolabile circular antisense oligodeoxynucleotides[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(11): 3848-3855.
- [96] GOVAN J M, UPRETY R, THOMAS M, et al. Cellular delivery and photochemical activation of antisense agents through a nucleobase caging strategy[J]. *ACS Chemical Biology*, 2013, 8(10): 2272-2282.
- [97] MCCONNELL E M, COZMA I, MOU Q B, et al. Biosensing with DNazymes[J]. *Chemical Society Reviews*, 2021, 50(16): 8954-8994.
- [98] HWANG K, WU P W, KIM T, et al. Photocaged DNazymes as a general method for sensing metal ions in living cells[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(50): 13798-13802.
- [99] YOUNG D D, GOVAN J M, LIVELY M O, et al. Photochemical regulation of restriction endonuclease activity[J]. *ChemBioChem*, 2009, 10(10): 1612-1616.
- [100] TANG X J, MAEGAWA S, WEINBERG E S, et al. Regulating gene expression in zebrafish embryos using light-activated, negatively charged peptide nucleic acids[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129(36): 11000-11001.
- [101] KIMURA Y, SHU Z M, ITO M, et al. Intracellular build-up RNAi with single-strand circular RNAs as siRNA precursors[J]. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 2020, 56(3): 466-469.
- [102] WU L, PEI F, ZHANG J H, et al. Synthesis of site-specifically phosphate-caged siRNAs and evaluation of their RNAi activity and stability[J]. *Chemistry*, 2014, 20(38): 12114-12122.
- [103] GOVAN J M, YOUNG D D, LUSIC H, et al. Optochemical control of RNA interference in mammalian cells[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(22): 10518-10528.
- [104] KALA A, JAIN P K, KARUNAKARAN D, et al. The synthesis of tetra-modified RNA for the multidimensional control of gene expression via light-activated RNA interference[J]. *Nature Protocols*, 2014, 9(1): 11-20.
- [105] CARLSON-STEVERMER J, KELSO R, KADINA A, et al. CRISPRoff enables spatio-temporal control of CRISPR editing[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 5041.
- [106] ZOU R S, LIU Y, WU B, et al. Cas9 deactivation with photocleavable guide RNAs[J]. *Molecular Cell*, 2021, 81(7): 1553-1565.e8.
- [107] LIU Y, ZOU R S, HE S X, et al. Very fast CRISPR on demand[J]. *Science*, 2020, 368(6496): 1265-1269.
- [108] HEMPHILL J, LIU Q Y, UPRETY R, et al. Conditional control

- of alternative splicing through light-triggered splice-switching oligonucleotides[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(10): 3656-3662.
- [109] GOVAN J M, YOUNG D D, LIVELY M O, et al. Optically triggered immune response through photocaged oligonucleotides[J]. *Tetrahedron Letters*, 2015, 56(23): 3639-3642.
- [110] YOUNG D D, LIVELY M O, DEITERS A. Activation and deactivation of DNAzyme and antisense function with light for the photochemical regulation of gene expression in mammalian cells[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(17): 6183-6193.
- [111] LUBBE A S, SZYMANSKI W, FERLINGA B L. Recent developments in reversible photoregulation of oligonucleotide structure and function[J]. *Chemical Society Reviews*, 2017, 46(4): 1052-1079.
- [112] WU L, HE Y, TANG X J, et al. Photoregulating RNA digestion using azobenzene linked dumbbell antisense oligodeoxynucleotides[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2015, 26(6): 1070-1079.
- [113] OGASAWARA S. Duration control of protein expression *in vivo* by light-mediated reversible activation of translation[J]. *ACS Chemical Biology*, 2017, 12(2): 351-356.
- [114] HAMMILL M L, ISLAM G, DESAULNIERS J P. Controlling gene-silencing with azobenzene-containing siRNAs (siRNAzos) [J]. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, 2020, 83(1): e119.
- [115] RESENDIZ M J E, SCHÖN A, FREIRE E, et al. Photochemical control of RNA structure by disrupting  $\pi$ -stacking[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(30): 12478-12481.
- [116] ANHÄUSER L, KLÖCKER N, MUTTACH F, et al. A benzophenone-based photocaging strategy for the N7 position of guanosine[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(8): 3161-3165.
- [117] JAKUBOVSKA J, TAURAITĖ D, MEŠKYS R. A versatile method for the UVA-induced cross-linking of acetophenone- or benzophenone-functionalized DNA[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 16484.
- [118] ANDO H, FURUTA T, TSIEN R Y, et al. Photo-mediated gene activation using caged RNA/DNA in zebrafish embryos[J]. *Nature Genetics*, 2001, 28(4): 317-325.
- [119] SAKAMOTO T, SHIGENO A, OHTAKI Y, et al. Photo-regulation of constitutive gene expression in living cells by using ultrafast photo-cross-linking oligonucleotides[J]. *Biomaterials Science*, 2014, 2(9): 1154-1157.
- [120] CHOUDHARY A, VANICHKINA D P, ENDER C, et al. Identification of miR-29b targets using 3-cyanovinylcarbazole containing mimics[J]. *RNA*, 2018, 24(4): 597-608.
- [121] WATANABE Y, FUJIMOTO K. Complete photochemical regulation of 8-17 DNAzyme activity by using reversible DNA photo-crosslinking[J]. *ChemBioChem*, 2020, 21(22): 3244-3248.
- [122] OGASAWARA S, MAEDA M. Photoresponsive 5'-cap for the reversible photoregulation of gene expression[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2011, 21(18): 5457-5459.
- [123] OGASAWARA S. Control of cellular function by reversible photoregulation of translation[J]. *ChemBioChem*, 2014, 15(18): 2652-2655.
- [124] ROTSTAN K A, ABDELSAYED M M, PASSALACQUA L F, et al. Regulation of mRNA translation by a photoriboswitch[J]. *eLife*, 2020, 9: e51737.
- [125] GONZAGA E R. Role of UV light in photodamage, skin aging, and skin cancer: importance of photoprotection[J]. *American Journal of Clinical Dermatology*, 2009, 10(S1): 19-24.
- [126] YOU M X, JAFFREY S R. Designing optogenetically controlled RNA for regulating biological systems[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2015, 1352(1): 13-19.
- [127] HAMMILL M L, ISLAM G, DESAULNIERS J P. Synthesis, derivatization and photochemical control of ortho-functionalized tetrachlorinated azobenzene-modified siRNAs[J]. *ChemBioChem*, 2020, 21(16): 2367-2372.
- [128] YOUNG D D, DEITERS A. Photochemical control of biological processes[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2007, 5(7): 999-1005.
- [129] MAYER G, HECKEL A. Biologically active molecules with a "light switch" [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2006, 45(30): 4900-4921.
- [130] LEE H M, LARSON D R, LAWRENCE D S. Illuminating the chemistry of life: Design, synthesis, and applications of "caged" and related photoresponsive compounds[J]. *ACS Chemical Biology*, 2009, 4(6): 409-427.
- [131] DEITERS A. Principles and applications of the photochemical control of cellular processes[J]. *ChemBioChem*, 2010, 11(1): 47-53.
- [132] DEITERS A. Light activation as a method of regulating and studying gene expression[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2009, 13(5/6): 678-686.
- [133] RIGGSBEE C W, DEITERS A. Recent advances in the photochemical control of protein function[J]. *Trends in Biotechnology*, 2010, 28(9): 468-475.
- [134] ADAMS S R, TSIEN R Y. Controlling cell chemistry with caged compounds[J]. *Annual Review of Physiology*, 1993, 55: 755-784.
- [135] ZHU Y, PAVLOS C M, TOSCANO J P, et al. 8-Bromo-7-hydroxyquinoline as a photoremovable protecting group for physiological use: mechanism and scope[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(13): 4267-4276.
- [136] MOMOTAKE A, LINDEGGER N, NIGGLI E, et al. The nitrobenzofuran chromophore: a new caging group for ultra-efficient photolysis in living cells[J]. *Nature Methods*, 2006, 3(1): 35-40.
- [137] FURUTA T, WANG S S, DANTZKER J L, et al. Brominated 7-hydroxycoumarin-4-ylmethyls: photolabile protecting groups with biologically useful cross-sections for two photon photoly-

- sis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(4): 1193-1200.
- [138] FURUTA T, TAKEUCHI H, ISOZAKI M, et al. Bhc-cNMPs as either water-soluble or membrane-permeant photoreleasable cyclic nucleotides for both one- and two-photon excitation[J]. ChemBioChem, 2004, 5(8): 1119-1128.
- [139] NAKANISHI H, YOSHII T, KAWASAKI S, et al. Light-controllable RNA-protein devices for translational regulation of synthetic mRNAs in mammalian cells[J]. Cell Chemical Biology, 2021, 28(5): 662-674.e5.
- [140] LIU H T, YU X H, LI K W, et al. Photoexcited CRY2 interacts with CIB1 to regulate transcription and floral initiation in *Arabidopsis*[J]. Science, 2008, 322(5907): 1535-1539.
- [141] CAO J C, ARHA M, SUDRIK C, et al. Light-inducible activation of target mRNA translation in mammalian cells[J]. Chemical Communications (Cambridge, England), 2013, 49(75): 8338-8340.
- [142] CAO J C, ARHA M, SUDRIK C, et al. Bidirectional regulation of mRNA translation in mammalian cells by using PUF domains[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2014, 53(19): 4900-4904.
- [143] KIM N Y, LEE S, YU J, et al. Optogenetic control of mRNA localization and translation in live cells[J]. Nature Cell Biology, 2020, 22(3): 341-352.
- [144] WEBER A M, KAISER J, ZIEGLER T, et al. A blue light receptor that mediates RNA binding and translational regulation[J]. Nature Chemical Biology, 2019, 15(11): 1085-1092.
- [145] RENZL C, KAKOTI A, MAYER G. Aptamer-mediated reversible transactivation of gene expression by light[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2020, 59(50): 22414-22418.
- [146] PILSL S, MORGAN C, CHOUKEIFE M, et al. Optoribogenetic control of regulatory RNA molecules[J]. Nature Communications, 2020, 11: 4825.
- [147] LIU R M, YANG J, YAO J, et al. Optogenetic control of RNA function and metabolism using engineered light-switchable RNA-binding proteins[J]. Nature Biotechnology, 2022, 40(5): 779-786.
- [148] HÜBNER S, DECLERCK N, DIETHMAIER C, et al. Prevention of cross-talk in conserved regulatory systems: Identification of specificity determinants in RNA-binding anti-termination proteins of the BglG family[J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39(10): 4360-4372.
- [149] DECLERCK N, VINCENT F, HOH F, et al. RNA recognition by transcriptional antiterminators of the BglG/SacY family: Functional and structural comparison of the CAT domain from SacY and LicT[J]. Journal of Molecular Biology, 1999, 294(2): 389-402.
- [150] ZOLTOWSKI B D, SCHWERDTFEGGER C, WIDOM J, et al. Conformational switching in the fungal light sensor Vivid[J]. Science, 2007, 316(5827): 1054-1057.
- [151] SHARMA E, STERNE-WEILER T, O'HANLON D, et al. Global mapping of human RNA-RNA interactions[J]. Molecular Cell, 2016, 62(4): 618-626.
- [152] WAN R X, BAI R, SHI Y G. Molecular choreography of pre-mRNA splicing by the spliceosome[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2019, 59: 124-133.
- [153] DOUDNA J A, RATH V L. Structure and function of the eukaryotic ribosome: The next frontier[J]. Cell, 2002, 109(2): 153-156.
- [154] HENTZE M W, CASTELLO A, SCHWARZL T, et al. A brave new world of RNA-binding proteins[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2018, 19(5): 327-341.
- [155] OPLÄNDER C, HIDDING S, WERNERS F B, et al. Effects of blue light irradiation on human dermal fibroblasts[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2011, 103(2): 118-125.
- [156] NGUYEN N T, HUANG K, ZENG H X, et al. Nano-optogenetic engineering of CAR T cells for precision immunotherapy with enhanced safety[J]. Nature Nanotechnology, 2021, 16(12): 1424-1434.
- [157] LI T, CHEN X J, QIAN Y J, et al. A synthetic BRET-based optogenetic device for pulsatile transgene expression enabling glucose homeostasis in mice[J]. Nature Communications, 2021, 12: 615.
- [158] MÜLLER K, ENGESSER R, METZGER S, et al. A red/far-red light-responsive bi-stable toggle switch to control gene expression in mammalian cells[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(7): e77.
- [159] ASH C, DUBEC M, DONNE K, et al. Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods[J]. Lasers in Medical Science, 2017, 32(8): 1909-1918.



**通讯作者:** 杨弋(1973—),男,教授,博士生导师。研究方向为控制与监测细胞内分子过程的合成生物技术与光遗传学前沿技术、癌症及代谢类疾病药理及药物筛选技术、蛋白质特异性标记与翻译后修饰的鉴定、细胞内原位成像、蛋白质药物生产技术等。  
E-mail: yiyang@ecust.edu.cn



**第一作者:** 刘韧玟(1989—),女,博士,讲师。研究方向为光遗传学与合成生物学(细胞代谢监测与控制技术)。  
E-mail: renmei2018@ecust.edu.cn