

復旦大學

本科畢業論文



論文題目：构建调控含过长 CAG 重复 RNA 相分离聚集的光控系统

姓 名：鲁盛谊 学 号：16307100084

院 系：生命科学学院

专 业：生物科学

指导教师：鲁伯坝 职 称：研究员

单 位：复旦大学生命科学学院

完成日期： 2021 年 5 月 26 日

构建调控含过长 CAG 重复 RNA 相分离聚集的光控系统

完成人

鲁盛谊

指导小组成员

鲁伯坝 研究员

目 录

摘要	I
Abstract	II
一、前言	1
1.1 相分离	1
1.2 RNA 相分离与亨廷顿病	1
1.3 液-液相分离的控制系统	3
二、材料与amp;方法	6
2.1 实验材料	6
2.1.1 细胞样品	6
2.1.2 质粒、引物、翻译寡核苷酸、肽段	6
2.2 实验试剂	6
2.2.1 分子克隆和质粒抽提	6
2.2.2 细胞系传代培养、脂质体转染等细胞实验	7
2.3 实验仪器及软件（部分）	8
2.4 实验方法	8
2.4.1 质粒构建	8
2.4.2 细胞培养、传代	8
2.4.3 RPhASe 光控实验	9
2.4.4 建模分析	10
2.4.5 FRAP 实验	10
2.4.6 反义寡核苷酸和短肽干扰实验	10

2.4.7 Caspase-3 活性检测细胞凋亡·····	11
三、研究结果 ·····	12
3.1 RPhASe 系统的构建与验证·····	12
3.1.1 RPhASe 系统的构建·····	12
3.1.1.1 RPhASe 系统构建的思路·····	12
3.1.1.2 RPhASe 系统的构建·····	13
3.1.2 RPhASe 系统能够光照诱导 eCAGr 形成相分离聚集·····	13
3.1.2.1 RPhASe 诱导外源 eCAGr 形成细胞核内相分离聚集·····	13
3.1.2.2 RPhASe 诱导外源 eCAGr 形成细胞核质内相分离聚集·····	14
3.1.2.3 建模分析预测 RPhASe 能够诱导 eCAGr 形成相分离聚集·····	17
3.1.3 RPhASe 光照诱导 eCAGr 聚集与疾病中聚集性质相似·····	20
3.1.3.1 RPhASe 诱导 eCAGr 聚集与疾病中聚集细胞定位相同·····	20
3.1.3.2 RPhASe 诱导 eCAGr 聚集具有胶体或固体性质·····	20
3.1.3.3 反义寡核苷酸和短肽干扰 RPhASe 诱导的 eCAGr 聚集·····	21
3.2 利用 RPhASe 系统探究 eCAGr 相分离聚集的功能·····	22
3.2.1 自噬阻断后 RPhASe 诱导 eCAGr 聚集增强细胞凋亡·····	23
四、讨论 ·····	25
参考文献 ·····	27
致谢 ·····	29

摘要

通过液-液相分离或相变生成的无膜细胞器/凝聚物具有很多生理和病理功能。传统观点认为蛋白质在这些凝聚物的聚集中起主导作用，而近期研究发现与重复扩增疾病有关的含有重复扩增的 RNA 能够独立形成凝聚物，并可能参与疾病进程。然而，研究 RNA 凝聚物的功能依然十分困难，因为缺乏在细胞中调控 RNA 相分离聚集的有力工具。本研究中我们构建了一个光遗传学系统 RPhASe，能够通过光照增强含重复扩增的 RNA 的细胞内相分离聚集。我们以亨廷顿病致病基因的转录产物——含过长 CAG 重复的 RNA (eCAGr) 作为模型，在细胞实验中证明了 RPhASe 系统的有效性和特异性。建模分析表明 RPhASe 能够有效光照诱导 eCAGr 发生相分离聚集，且光照在该过程中起到主导作用。利用 RPhASe 系统，我们发现自噬阻断后，细胞核和细胞质中 eCAGr 相分离聚集的同时增强导致细胞凋亡的上调。因此，RPhASe 能够被用于探究这些含重复扩增的 RNA 的相分离的功能，并且具有高特异性和高时空分辨率的特点。RPhASe 的设计思路也可拓展至调控其他能发生相分离的 RNA 的聚集，并研究 RNA 相分离/相变的功能。我们有关 eCAGr 细胞毒性的初步数据表明 eCAGr 可能独立于致病蛋白参与亨廷顿病的病程。

关键词： 相分离，重复扩增 RNA，光遗传学

Abstract

Membrane-less organelles or condensates arising from liquid-liquid phase separation/transitions play important roles in various physiological and pathological contexts. Unlike the traditional view conferring the protein a dominant role in condensate assembly, recent studies show that repeat-containing RNAs associated with repeat expansion disorders can form phase-separating condensates independently and may partially cause the diseases. However, it remains difficult to study the function of RNA condensates for a lack of potent tools to regulate their phase behavior in the cellular context. Here we develop an optogenetic platform, RNA photoactivated assembly system (RPhASe), to control the intracellular phase separation/transition of repeat-containing RNAs by light. Specifically, we use elongated CAG RNA (eCAGr), the transcript of the genetic cause of Huntington's disease, as a model. We elucidate the potency and specificity of RPhASe in cells. Computational simulation also confirms the efficacy and specificity of RPhASe theoretically and suggests light as a critical factor contributing to the assembly process. Utilizing this system, we discover that after autophagy inhibition, the enhanced cytosolic and nuclear eCAGr foci may cause higher level of apoptosis. Therefore, RPhASe can be used to investigate the functional implication of the phase behavior of these repeat-containing RNAs with high spatio-temporal resolution. The design principle of RPhASe can be further adapted to control the condensate assembly of other RNAs with a phase separation/transition potential. Our preliminary functional study of eCAGr phase separation implicates a probable role of RNA toxicity independent of the mutant protein in Huntington's disease.

Key words: phase separation, elongated CAG RNA, optogenetics

一、前言

1.1 相分离

相分离和相变现象在生物中广泛存在。其中，最常见的液-液相分离（liquid-liquid phase separation）现象是一种或几种特定分子会在溶液环境中形成液滴状聚集的现象，在这些具有液体性质的聚集中，特定蛋白质和 RNA 会被高度浓缩，但它们同时也与液滴外界保持着积极的物质交换^[1]。有时，这种液滴的液体状态并不稳定，在液滴中高度浓缩的物质由于其分子间排列越来越紧密，会发生溶质-凝胶转变（sol-gel transition），即液滴的性质由液态转变为与外界交换更差的胶体甚至固体^[2]。

生物相分离现象具有重要的生理病理功能。细胞中存在着多种依赖相分离形成的无膜细胞器（membrane-less organelles），包括核仁、异染色质、中心颗粒、中心体等等，相分离使它们能够不依赖细胞膜在细胞中高度动态地分隔出区室，组织生物大分子行使特定功能^[2]。因此，相分离具有重要的生理功能。另一方面，相分离也具有重要的病理功能。例如，许多与神经退行性疾病相关的关键蛋白都能够在体外实验和细胞实验中发生相分离，而它们在神经退行性疾病中则参与形成异常的具有固体性质的病理聚集，一些证据表明这些聚集具有细胞毒性，从而参与疾病发生^{[3][4]}。

综上，相分离和相变现象在生物中广泛存在，且具有重要的生理病理功能。

1.2 RNA 相分离与亨廷顿病

亨廷顿病（Huntington's disease, HD）是一种人类常染色体显性单基因遗传的神经退行性疾病，突变基因 *Huntingtin (Htt)* 存在超过 35 个的 CAG 核苷酸重复扩增时表现为疾病型^[5]。亨廷顿病通常在 40-50 岁发病，其中有大约 6% 的含有大于等于 75 个 CAG 核苷酸重复的病人会在青年发病。亨廷顿病的临床表现在不同病人中存在差异，但通常包括渐进式运动、认知、心理障碍^[5]。

许多突变基因的异常转录产物和翻译产物都会干扰正常细胞功能，参与疾病进程^[6]，亨廷顿病中的变异蛋白质和 RNA 亦是如此。传统观点认为突变型亨廷

顿病蛋白的功能获得型毒性在亨廷顿病的病程中起着主导作用^[7]，然而近年来许多研究表明突变 RNA 也存在毒性，可能参与疾病发生。亨廷顿病中，含过长 CAG 重复的 RNA (elongated CAG RNA, eCAGr) 会形成较大的斑点状聚集分布在核中^[6] (图 1)。证据表明在转基因小鼠、蠕虫、果蝇模型和成纤维细胞中，这些异常聚集具有细胞毒性，可能因此具有致病作用^[8]。最近研究表明 eCAGr 在核中的异常聚集会造成可变剪接调控分子 MBNL1 滞留其中，从而影响细胞的可变剪接^[9]。因此，RNA 毒性可能独立于蛋白质毒性，共同参与亨廷顿病的病理过程。

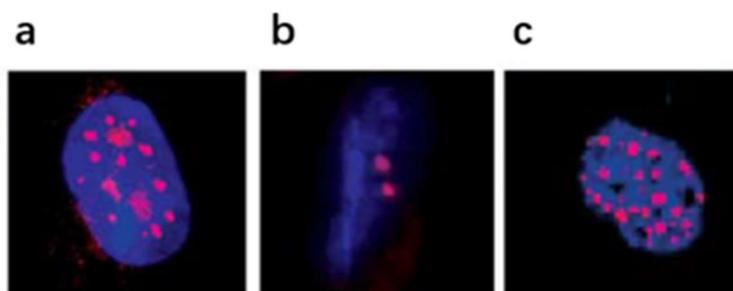


图 1^[6]: 包含长 CAG 重复的 RNA 形成的异常核斑

a: 人类 HD 成纤维细胞中的 CAG 核斑。b: CAG200 小鼠中分离所得肌肉的 CAG 核斑。c: COS7 细胞过表达 960 CAG 形成的核斑

目前包括亨廷顿病在内，已知至少九种 CAG 重复扩增导致的神经退行性疾病都有显著的阈值效应，只有 CAG 重复数达到一定阈值才发病^[10]。从蛋白毒性的角度来看，这种现象可能是由于 HTT 蛋白在 CAG 重复数达到一定阈值后发生构象改变，从而具有细胞毒性^[11]。那么，能否找到造成 RNA 毒性的阈值效应的可能分子机制？

Ankur Jain 和 Ronald D. Vale 在 2017 年发表的工作中对 *Htt RNA* 在超过特定重复数时才发生聚集的分子机制进行了探究，发现 eCAGr 的 CAG 重复会为多价碱基配对提供模板，使纯化的 RNA 在体外实验和细胞实验中能够在与疾病相近的重复数阈值以上通过液-液相分离形成聚集，并经历溶质-胶体转变^[12] (图 2)。这表明 RNA 相分离可能在由重复扩增导致疾病的病理进程中发挥作用，这种作用可能是独立于蛋白质毒性的。然而，这种 RNA 相分离聚集在 HD 病理过程中的作用机制和重要性仍属未知。

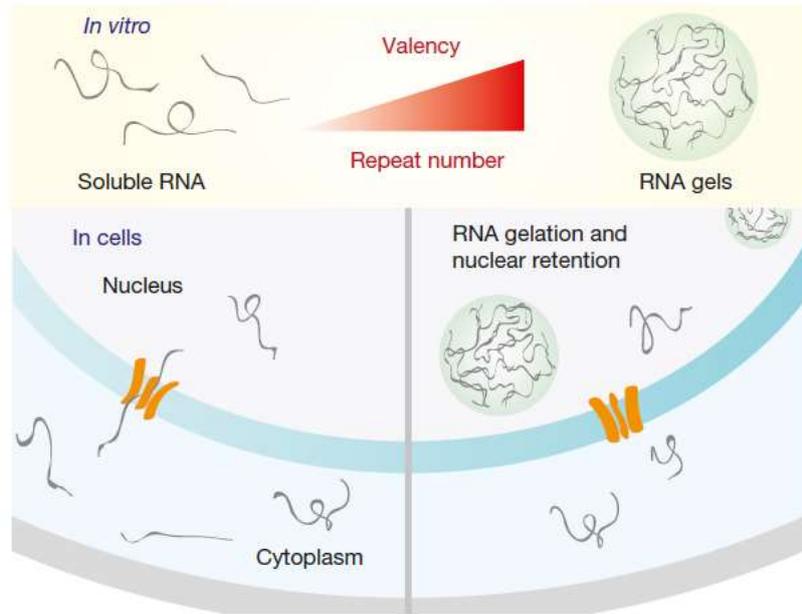


图 2^[12]: 重复扩增失调中 RNA 聚集的形成

具有重复扩增的序列形成能够发生多价碱基配对的模板，导致 RNA 异常聚集并滞留在细胞核中

综上，HD 中的 eCAGr 会通过相分离产生异常核内聚集，且这种聚集发生所需的 CAG 重复数阈值与临床上 HD 病人发病的阈值相近，表明 eCAGr 相分离可能独立于蛋白质参与疾病进程。

1.3 液-液相分离的控制系统

为了探究相分离与特定细胞功能的因果联系，我们需要有效的干扰或诱导相分离的手段，从而观察我们试图探究的功能或表型在相分离受干扰时会发生什么变化，建立两者之间的因果关系。然而，目前只有少数方法能够控制细胞内的相分离。其中，干扰细胞内相分离的主要手段包括能够干扰多价相互作用的化学药物与寡核苷酸^[12]，这两种方法只能负向调控细胞内相分离，且具有特异性差、时空分辨率低的缺点。

近年来，多项研究基于合成生物学的手段，试图构建高特异性、高时空分辨率、双向调控细胞内蛋白质相分离的工具。这些研究往往通过化学驱动或光驱动增强目标元件之间的多价作用（valence amplification），降低熵的相对重要性，从而诱导目标蛋白质发生可逆的相分离^[1]。这些系统使用的策略包括：在光驱动或化学驱动下，利用能够同源^[13]或异源^[14]寡聚化的蛋白质元件诱导与之串联的

目标蛋白质发生相分离，或利用核酸作为支架通过核酸结合蛋白诱导目标蛋白质聚集^[1]（图 3）。其中，光驱动利用已知的光照诱导的蛋白质同源或异源相互作用实现，而化学驱动则利用已知的化合物诱导的蛋白质间相互作用实现^[1]。表 1 总结了现有的细胞内相分离控制系统的原理及特点。

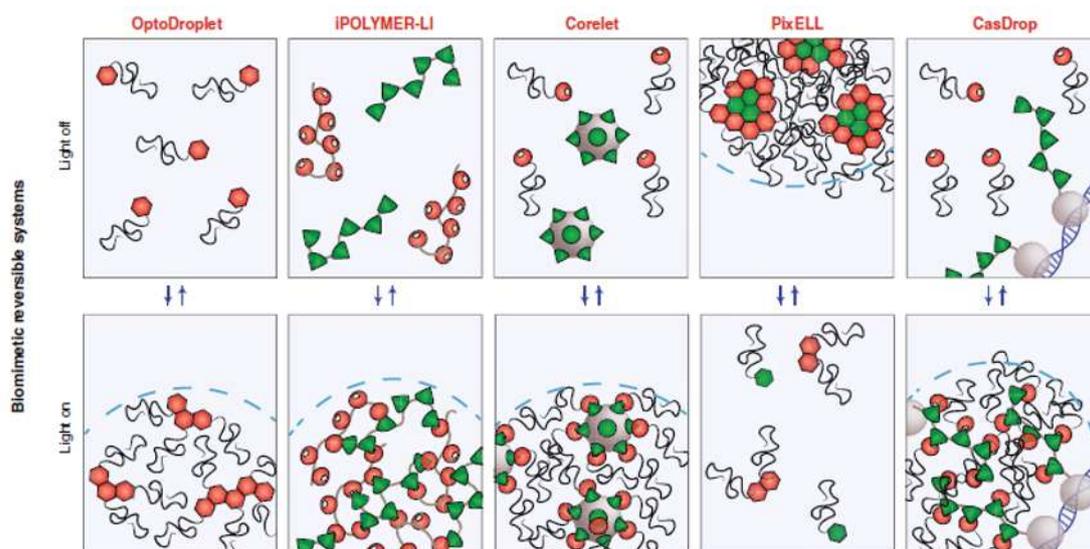


图 3^[1]: 目前通过光照调控多价作用实现细胞内相分离的系统。

表 1: 现有的细胞内相分离控制系统的原理、优点与缺点。

系统名称	原理	优点	缺点
OptoDroplet	光照诱导 CRY2 蛋白寡聚化，驱动与之融合的目标蛋白发生相分离 ^[13]	系统设计简单；光驱动具有高时空分辨率	寡聚化具有异质性；寡聚化原理不明确；不能控制驱动力强弱
iPOLYMER	FKBP 和 FRB 在雷帕霉素存在时互作 ^[15]	寡聚化原理清晰；可通过改变重复数控制驱动强度	化学驱动具有较低的时空分辨率
Corelet	以固定数量组装的 Core 与目标蛋白通过蓝光诱导 iLID 与 SspB 的互作结合 ^[14]	光驱动具有高时空分辨率；寡聚化原理明确，适合定量分析	系统设计较为复杂；不能控制驱动力强弱
PixELL	PixE/PixD 光敏蛋白	光驱动具有高时	系统设计较为复

	与目标蛋白融合，两者在黑暗中寡聚化，光照后解聚 ^[16]	空分辨率；寡聚化原理明确	杂；不能控制驱动力强弱
--	---	--------------	-------------

然而，上述诱导细胞内相分离发生的方法往往只能针对能够与控制元件相融合的目标蛋白质起作用，而目前依然没有有效的能够诱导 RNA 发生细胞内相分离的方法，这种工具的缺失使我们很难有效、特异地探究 RNA 相分离的功能。

因此，综上所述，本研究试图以合成生物学手段构建细胞内 RNA 相分离控制系统，以亨廷顿病中的 eCAGr 为模型，探究其可能的病理功能。

二、材料与amp;方法

2.1 实验材料

2.1.1 细胞样品

小鼠 STHdh^{Q7/Q7} 细胞系

2.1.2 质粒、引物、反义寡核苷酸、肽段

- 1) Cry2Olig 质粒: Cry2olig-mCherry (Addgene #60032)
- 2) CAG RNA 质粒(MS2 系统): pHR-Tre3G-47xCAG-12xMS2 (Addgene #99148), pHR-Tre3G-12xCAG-12xMS2, rtTA-N144 (Addgene #66810), pHR-tdMCP-YFP (Addgene #99151)
- 3) TAT-BIND-myc-F: 5'-
AGCTTATGTATGGCCGCAAAAAACGCCGCCAGCGCCGCCGCGCGGAAA
TTCGCCTGGTGAGCAAAGATGGCAAAGCAAAGGCATTGCGTATATTG
AATTTAAAGAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGTGAG-3'
- 4) TAT-BIND-myc-R: 5'-
GATCCTCACAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCCTTTAAATTCAAT
ATACGCAATGCCTTTGCTTTTGCCATCTTTGCTCACCAGGCGAATTTCC
GCGCGGCGGCGCTGGCGGCGTTTTTTGCGGCCATACATA-3'
- 5) BIND: AEIRLVSKDGKSKGIAYIEFK
- 6) BIND-S: GGEDIKSRVEAASILYFIKKK
- 7) 8×CTG: 5'-CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG-3'
- 8) Negative control (NC): 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'

2.2 实验试剂

2.2.1 分子克隆和质粒抽提

- 1) KOD FX, Toyobo
- 2) LB broth
- 3) LB broth agar, 夏夷

- 4) TAE 50X, 碧云天
- 5) 电泳用琼脂糖, BLOWEST
- 6) GeneGreen Nucleic Acid Dye
- 7) 1 KB DNA Ladder, 天根
- 8) DL2000 DNA Marker, 天根
- 9) 同源重组试剂盒, 天根
- 10) Top 10, 康为世纪
- 11) Stbl3, 全式金
- 12) 大提试剂盒, 天根
- 13) 小提中量试剂盒, 天根
- 14) 快速小提试剂盒, 天根
- 15) Ampicillin sodium, 生工
- 16) 引物合成与测序, 金唯智
- 17) 肽段合成, 科生景肽
- 18) 反义寡核苷酸合成, 金唯智
- 19) siRNA (Negative Control), 吉玛

2.2.2 细胞系传代培养、脂质体转染等细胞实验

- 1) DMEM, ThermoFisher
- 2) FBS, ThermoFisher
- 3) TrypLE, ThermoFisher
- 4) Opti-MEM, ThermoFisher
- 5) PBS, Hyclone
- 6) Lipofectamine 3000, ThermoFisher
- 7) Lipofectamine 2000, ThermoFisher
- 8) gelatin, Sigma
- 9) PFA, 生工
- 10) GlutaMAX, ThermoFisher
- 11) Doxycycline, Selleck

- 12) NH₄Cl, Sigma
- 13) caspase-3 染料, Biotium
- 14) Hoechst, ThermoFisher

2.3 实验仪器及软件（部分）

- 1) IncuCyte 3300 mini, CLiNX Science Instruments
- 2) 双转盘共聚焦 Dragonfly 200, Andor
- 3) 自制 LED 蓝光光源
- 4) Fiji
- 5) GraphPad Prism 8
- 6) MATLAB 2019a

2.4 实验方法

2.4.1 质粒构建

- 1) 用 TAT-BIND-myc-F 和 TAT-BIND-myc-R 引物和 KOD FX 酶，按照说明书中的三步法退火，PCR 得 TAT-BIND 片段
- 2) 用无缝克隆试剂盒将 TAT-BIND 片段克隆到 pHR-mCh-Cry2olig 质粒中，载体与插入片段的物质的量之比为 1:3
- 3) 将得到的 pHR-TAT-BIND-mCh-Cry2oligo 质粒送公司测序，确定序列正确

2.4.2 细胞培养、传代

- 1) STHdh 细胞培养条件：33 °C，5% CO₂
- 2) 细胞长满不超过 24 小时内传代，传代密度约 10%~20%，每 2~3 天传代
- 3) 倒掉 T25 培养瓶中原培养基，加入 2 ml TrypLE，放入培养箱静置 3 分钟
- 4) 加入 2 ml 培养液终止消化，吹打使细胞脱落，将溶液转移至 15 ml 离心管内，1300 rpm 离心 3 分钟
- 5) 吸除上清，加入 1 ml 培养基吹打混匀，取 200 ml 转移至新的 T25 培养瓶中
- 6) 向 T25 培养瓶中加入 5 ml 培养基，摇晃均匀，放入培养箱

2.4.3 RPhASe 光控实验

- 1) 四分皿用 2%明胶在室温或 33 °C 包被 2 小时，吸去明胶后晾干 1 小时
- 2) 对一个四分皿，以 2:2:1:5 质量比配制 pHR-tdMCP-YFP、pHR-Tre3G-12xCAG-12xMS2 或 pHR-Tre3G-47xCAG-12xMS2、rtTA 和 pHR-TAT-BIND-mCh-Cry2oligo 或 pHR-mCh-Cry2oligo，总质量 8 ug（为使表达水平相近，2/3 质量的 pHR-mCh-Cry2oligo 用 PC3.0 代替）
- 3) 加入 250 ul Opti-MEM（对于 lipofectamine 3000 转染，使用 100 ul Opti-MEM），混匀得到 mix A
- 4) 在 10 ul lipofectamine 2000（对于 lipofectamine 3000 转染，使用 6 ul lipofectamine 3000）中加入 240 ul（对于 lipofectamine 3000 转染，使用 100 ul）Opti-MEM，混匀得到 mix B
- 5) 将 mix B 加入 mix A 中，混匀，静置 20 分钟
- 6) 将 STHdh^{Q7/Q7} 细胞以约 50%密度铺在四分皿里
- 7) 加入转染试剂，摇晃均匀，放入培养箱
- 8) 转染约 6 小时后将培养基换成新鲜的培养基，并加入 1:100 GlutaMAX
- 9) 转染约 24 小时后，加入 1,000 ng/ml doxycycline（诱导 CAG RNA 表达）、10 mM NH₄Cl（对于需要阻断自噬的活细胞光控实验）和 1:100 GlutaMAX
- 10) 转染后约 48 小时：
 - 固定细胞光控实验：
 - a) 对于光照组，使用自制蓝光 LED 光源照射 2 小时；对于非光照组，按照 b)直接固定
 - b) 用 4% PFA 在室温固定细胞 15 分钟，用 PBS 洗三次
 - c) 用双转盘共聚焦显微镜 Dragonfly 200 的 z stack 功能拍摄细胞
 - d) 使用最大强度投射（max intensity projection, MIP）处理 z stack 图像
 - 活细胞光控实验：
 - a) 使细胞在拍摄前完全避光，用双转盘共聚焦显微镜 Dragonfly 200 的 z stack 功能拍摄细胞在光照前的成像，记录细胞位置
 - b) 用自制蓝光 LED 光源照射 2 小时，用 4% PFA 在室温固定细胞 15 分钟，用 PBS 洗三次

- c) 拍摄相同细胞在光照后的成像
- d) 使用最大强度投射 (max intensity projection, MIP) 处理 z stack 图像, 比较光照前后细胞

2.4.4 建模分析

如文中所示计算单个格栅混合的吉布斯自由能, 用 MATLAB 2019a 画图得到自由能曲面, 代码参考先前文献[17]。

2.4.5 FRAP 实验

- 1) 铺细胞、转染、加药与 RPhASe 光控实验部分相同
- 2) 对全部细胞使用自制蓝光 LED 光源照射 3 小时
- 3) 换成含 1:5000 Hoechst 的培养基
- 4) 对 RPhASe 光照诱导的 eCAGr 聚集, 用 405 nm 的激光光源漂白(功率 100%, 时间 10 秒)
- 5) 以 5 秒间隔拍摄十分钟, 记录 eCAGr 聚集荧光信号恢复
- 6) 在拍摄细胞的间隙找视野时, 用 50%功率的显微镜蓝光 LED 光源照射, 以保持 eCAGr 聚集状态
- 7) 用 Fiji 对荧光恢复定量, 并校正背景信号衰减造成的信号下降

2.4.6 反义寡核苷酸和短肽干扰实验

- 1) 对 STHdhQ7/Q7 细胞, 转染 phR-tdMCP-YFP、pHR-Tre3G-47xCAG-12xMS2、rtTA 和 pHR-TAT-BIND-mCh-Cry2oligo, 具体步骤同 RPhASe 光控实验, 除了细胞密度提高到 25 w/ml
- 2) 转染后约 6 小时, 将培养基换成新鲜的培养基, 并加入 1,000 ng/ml doxycycline、10 mM NH₄Cl 和 1:100 GlutaMAX
- 3) 反义寡核苷酸或 siRNA 转染 (8×CTG 或 NC) 同质粒, 除了将 8 ug 质粒替换为 20 nmol/ml 的反义寡核苷酸或 siRNA 5 ul, 且将细胞密度提高到 30 w/ml 铺到包被过的四分皿中, 且全程保持培养液中含 1,000 ng/ml doxycycline、10 mM NH₄Cl 和 1:100 GlutaMAX

- 4) 第二次转染后约 24 小时，用自制蓝光光源照射 3 小时
- 5) 用双转盘共聚焦显微镜 z stack 拍摄，使用 MIP 处理 z stack 图像，比较光照前后细胞

2.4.7 Caspase-3 活性检测细胞凋亡

- 1) 铺细胞、转染和加药与 RPhASe 光控实验相同（除了转染后约 6 小时换液时就加入 Doxycycline），其中 47×CAG+PC3.0 组以 2:2:1:5 质量比配制 pHR-tdMCP-YFP、pHR-Tre3G-47xCAG-12xMS2、rtTA 和 PC3.0
- 2) 转染约 24 小时后，将各组细胞以 25 w/ml 铺到 2 个 96 孔板上，每个 96 孔板每组设六个副孔，其中三个副孔加入 10 mM NH₄Cl，所有孔中都保持加入 1,000 ng/ml doxycycline
- 3) 静置 1.5 小时，将一个 96 孔板用自制 LED 蓝光光源照射 3 小时
- 4) 将培养基换成 Opti-MEM，其中加入 1:1500 caspase-3 染料
- 5) 放入 33 °C IncuCyte，拍摄明场和绿色荧光，3 小时间隔拍摄 72 小时，每个孔每次拍摄 4 张

三、研究结果

3.1 RPhASe 系统的构建与验证

3.1.1 RPhASe 系统的构建

该研究首先试图构建一个能够光控 RNA 发生相分离聚集的工具，称之为 RPhASe (RNA photoactivated assembly system)。我们将以亨廷顿病中变异的 eCAGr 为模型，高时空分辨率、特异性诱导 eCAGr 发生相分离，为后续探究 eCAGr 相分离的病理功能奠定基础。

3.1.1.1 RPhASe 系统构建的思路

RPhASe 系统试图以一个串联的融合蛋白实现对 RNA 聚集的操控，该融合蛋白由两个元件组成，分别是连接者 BIND 和聚集者 CRY2。

BIND 是能够特异性结合 eCAGr 的短肽，由 NCL 蛋白质的 RNA 识别基序 (RRM) 衍生得到。BIND 能够通过 CAG RNA 的依赖于重复数的直接相互作用抑制核内压力^[18]。BIND 与 SCA2_{CAG22}, SCA2_{CAG42}, SCA2_{CAG55}, SCA2_{CAG72} 的平均结合常数 (K_D) 分别为 17.28、5.60、4.83 和 0.66 μM ^[18]。

CRY2 是在拟南芥中发现的一种蛋白质，在蓝光照射下会发生寡聚化，在细胞中形成聚集^[19]。CRY2 形成的聚集具有异质性，单体数目不恒定，且聚集具体机制依然未知^[20]。CRY2 形成的聚集能在停止光照几分钟内完全解聚，因而具有较好的时间分辨率，且能够通过光照与黑暗的交替实现多循环的聚集^[13]。相比于 CRY2，其点突变体 CRY2_{olig} 具有更强的聚集能力，能够在更弱的光照下聚集，故在本研究中均使用 CRY2_{olig} (简称为 CRY2)^[21]。

我们预期两者的融合蛋白 BIND-CRY2 能够通过连接者 BIND 与 eCAGr 特异性结合，并通过聚集者 CRY2 在光照时诱导融合蛋白与 eCAGr 形成共同的聚集，从而促进 eCAGr 相分离的发生 (图 4)。

RNA Photoactivated Assembly System (RPhASe):

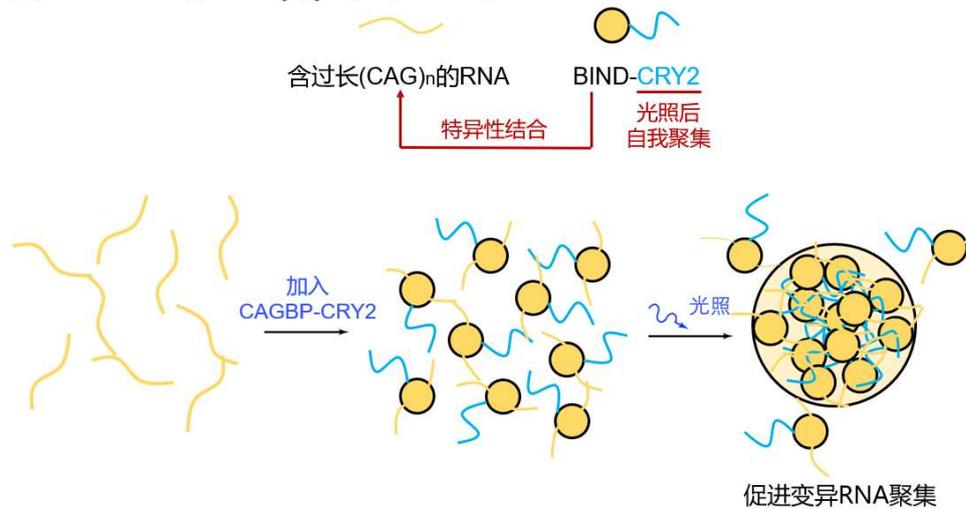


图 4: eCAGr 光控系统 RPhASe 的系统设计与预期模型

我们试图通过能够特异性结合 eCAGr 的短肽 BIND 和光照后自我聚集的 CRY2 组成的融合蛋白 BIND-CRY2 控制 eCAGr 发生相分离聚集。我们预期光照该系统时, CRY2 的聚集能够拉动与之结合的 eCAGr 形成共同聚集

3.1.1.2 RPhASe 系统的构建

基于以上思路, 以 BIND 短肽对应的 DNA 片段为模板, 使用同源重组将其克隆进入 CRY2olig-mCherry 质粒以在细胞中表达 BIND-CRY2olig-mCherry 融合蛋白 (以下简称为 BIND-CRY2)。

3.1.2 RPhASe 系统能够光照诱导 eCAGr 形成相分离聚集

为证明 RPhASe 系统光照诱导 eCAGr 形成相分离聚集的有效性, 一方面, 在细胞实验中通过成像检测 RPhASe 系统是否能够光照增强 eCAGr 聚集的形成; 另一方面, 通过建模模拟 RPhASe 系统光照后对体系相分离能力的影响(见下)。

3.1.2.1 RPhASe 诱导外源 eCAGr 形成细胞核内相分离聚集

为了验证 RPhASe 系统诱导 eCAGr 发生相分离聚集的有效性, 我在小鼠纹状体细胞永生化的细胞株 *STHdh^{Q7/Q7}* 中通过 MS2 系统过表达并可视化 CAG 重复数不同的 RNA, 同时过表达 BIND-CRY2 或 CRY2, 光照后固定或直接固定细胞, 发现只有同时过表达含 47 个 CAG 重复的变异 RNA 和 BIND-CRY2 时, 光照才能够诱导细胞核内出现更多 eCAGr 聚集 (图 5)。因此, RPhASe 系统能够

有效诱导外源 eCAGr 形成细胞核内聚集。

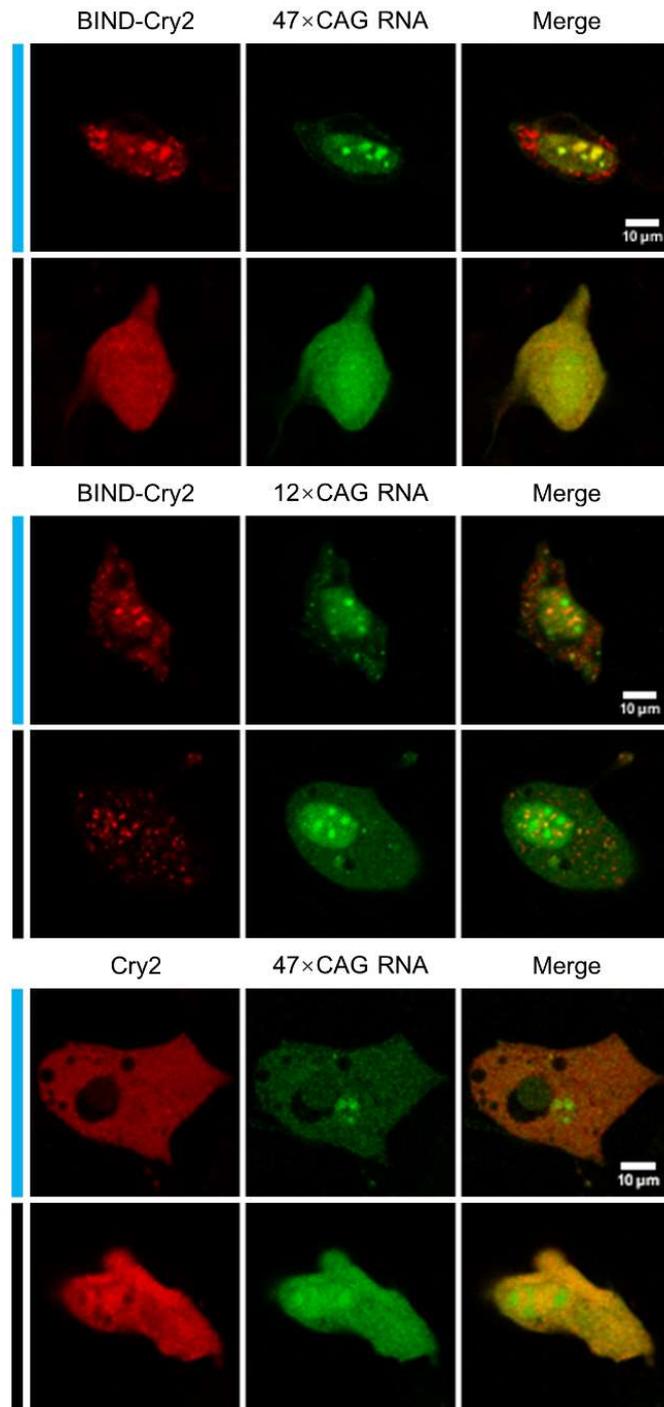


图 5: RPhAse 系统能够光照诱导外源 eCAGr 形成细胞核内相分离聚集
在细胞中通过 MS2 系统分别过表达含 12 个或 47 个 CAG 重复的 RNA，同时过表达 BIND-CRY2 或 CRY2，光照后固定或直接固定细胞。图片左侧蓝条代表光照，黑条代表不光照

3.1.2.2 RPhAse 诱导外源 eCAGr 形成细胞核质内相分离聚集

另一方面，我们发现使用 NH₄Cl 或 CQ 阻断自噬时内源或外源 eCAGr 也会

在细胞质内形成聚集(未发表数据),表明细胞质内并非没有 eCAGr 聚集的产生,而是会通过自噬途径降解。为了探究 RPhASe 系统是否也能有效增强自噬阻断后的胞质内 eCAGr 聚集,我在 STHdh^{Q7/Q7} 细胞中通过 MS2 系统过表达并可视化 CAG 重复数不同的 RNA,同时过表达 BIND-CRY2 或 CRY2,在光照前后对同一细胞进行成像,发现只有同时过表达含 47 个 CAG 重复的变异 RNA 和 BIND-CRY2 时,光照才能够诱导细胞核和质内出现更多 eCAGr 聚集(图 6)。因此,阻断自噬后,RPhASe 系统能够有效诱导外源 eCAGr 形成细胞核、质内聚集。

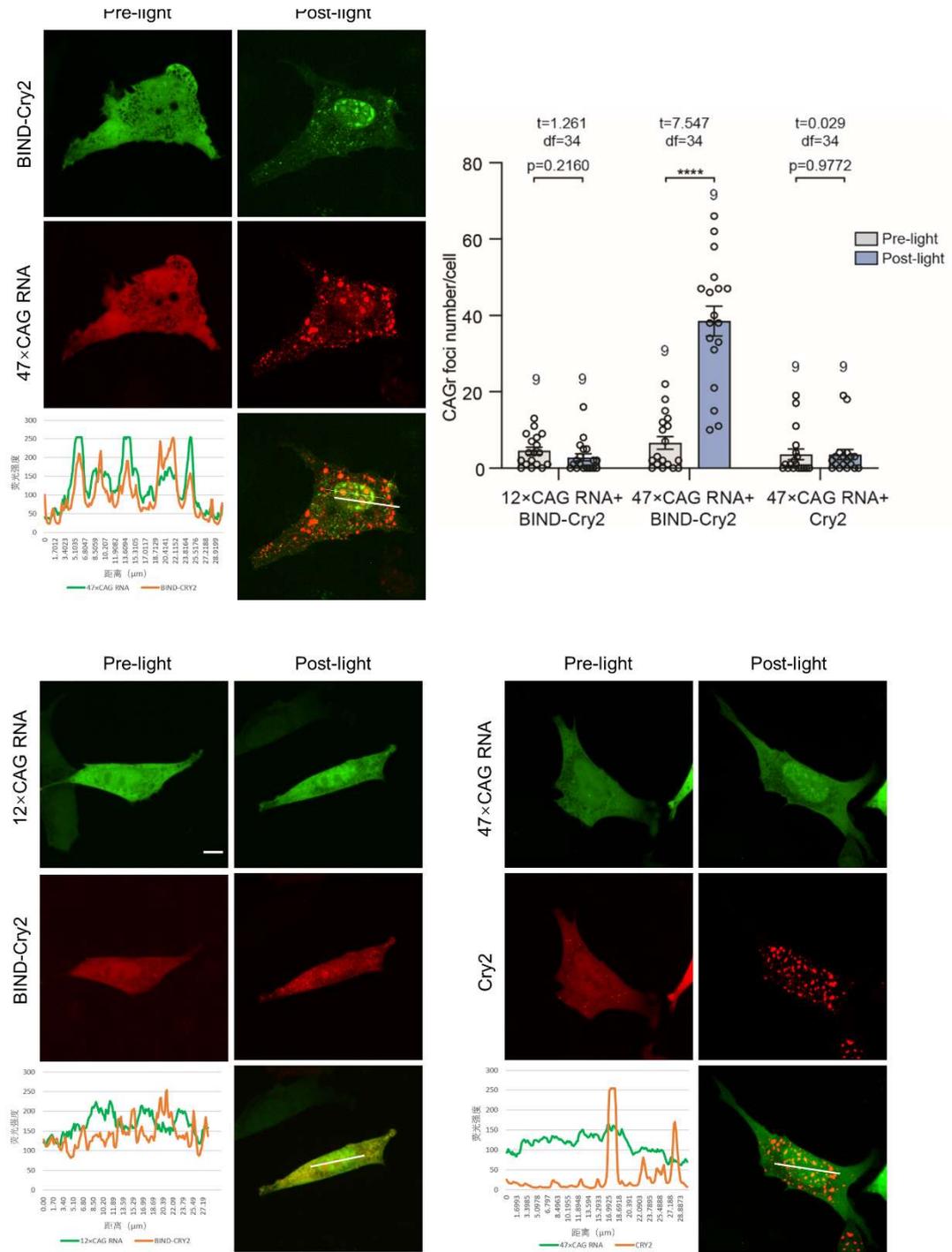


图 6: RPhASe 系统能够光照诱导外源 eCAGr 形成细胞核质内相分离聚集
 在细胞中通过 MS2 系统分别过表达含 12 个或 47 个 CAG 重复的 RNA，同时过表达 BIND-CRY2 或 CRY2，加入 NH4Cl 阻断自噬，在光照前后对细胞进行成像。比例尺：10 μ m

综上，细胞实验表明 RPhASe 系统能够有效光照诱导 eCAGr 形成细胞核内聚集，并在自噬阻断后诱导 eCAGr 同时形成细胞核、质内聚集，证明了 RPhASe

系统的有效性、特异性。

3.1.2.3 建模分析预测 RPhASe 能够诱导 eCAGr 形成相分离聚集

为了从生物热力学角度验证 RPhASe 系统光照诱导 eCAGr 形成相分离聚集在理论上的可行性，并探究该过程中的关键推动因素，我试图构建一个基于 Flory-Huggins 理论的简单模型，计算溶液体系在含不同长度 CAG 重复 RNA 和是否光照条件下的自由能曲面，从而考察该体系在不同条件下达到平衡时发生相分离的能力强弱。

由于 DNA、RNA 和蛋白质等生物大分子都由单体组成，因此它们可以被简化为多聚物。我假设一个简化的三元体系，包含：

A: 溶剂（单体）；

B: (CAG)_n RNA（多聚物）；

C: BIND-Cry2 蛋白（多聚物）。

接下来，我需要计算这三种成分从分离到混合时该体系的吉布斯自由能变化，因此需要分别计算该过程中的焓变和熵变：

对于焓变，基于柯西化学方法（quasi-chemical approach），这三种成分混合后发生的焓变是混合后相邻原子新生成的化学键与非混合状态下各成分化学键的键能总和之差。并且，基于均场近似（mean field approximation），可将任一分子受到其它分子的影响简化为一个单一的平均值。由此，可计算得到：

$$\Delta H_{mix} = k_B T [x_{AB} a \varphi (1 - \varphi) + x_{AC} (1 - a) \varphi (1 - \varphi) + x_{BC} a (1 - a) (1 - \varphi)^2]$$

其中， φ 是 B 和 C 两种多聚物在整个溶液中的物质的量占比， a 是 (CAG)_n RNA 在 B 和 C 两种多聚物中的物质的量占比； x_{AB} 是 A-B 键能与 A-A 和 B-B 键能平均值之差， x_{BC} 和 x_{AC} 同理。若 x 值为正，表明这两种物质倾向与相互排斥；若 x 值为负，则表明这两种物质倾向于相互吸引。

对于熵变，基于 Flory-Huggins 理论，单体占据二元栅格的一个格子，而多聚物则根据其所含单体数占据栅格连续的多个格子。由玻尔兹曼方程：

$$\Delta S_{mix} = k_B \ln \Omega_{polymer}$$

其中， $\Omega_{polymer}$ 是将两种多聚物和溶质单体填满二元栅格的所有可能方法的数量。

计算 $\Omega_{polymer}$ 并通过数学近似可得混合后每个栅格的熵的变化为：

$$\Delta S_{mix} = k_B \left[\log \varphi + \frac{a(1-\varphi) \log[a(1-\varphi)]}{N_B} + \frac{(1-a)(1-\varphi) \log[(1-a)(1-\varphi)]}{N_C} \right]$$

其中， N_B 、 N_C 分别是 B 和 C 所含单体的数量（或称 B 和 C 的长度）。

综上，结合焓变和熵变，这三种成分混合后吉布斯自由能发生的变化可以写作：

$$\begin{aligned} \Delta G_{mix} = k_B T & \left[\log \varphi + \frac{a(1-\varphi) \log[a(1-\varphi)]}{N_B} \right. \\ & \left. + \frac{(1-a)(1-\varphi) \log[(1-a)(1-\varphi)]}{N_C} + x_{AB} a \varphi (1-\varphi) \right. \\ & \left. + x_{AC} (1-a) \varphi (1-\varphi) + x_{BC} a(1-a)(1-\varphi)^2 \right] \end{aligned}$$

接下来，我通过改变 N_B ， x_{AB} ， x_{BC} 和 x_{AC} 的值模拟该体系在不同条件下的状态。当(CAG)_n RNA 的 CAG 重复数增加时， N_B 和 x_{AB} 的数值将增加，代表着 eCAGr 增大的长度和更强的自身相互作用。由于 CRY2 有着光照时自我聚集的特性，因此我将 x_{AC} 在光照和非光照条件下分别设为 8 和 0。由于 RNA 和蛋白质作为多聚物在溶液中有着排斥溶剂而自我聚集的倾向， x_{AB} 和 x_{AC} 被设为正值，而基于多聚物共分离（co-partition）的假设， x_{BC} 被设为负值。此外，由于 BIND 特异性结合含过长 CAG 重复的 RNA，它对应的 x_{BC} 的绝对值也相比短 CAG 重复 RNA 更大。

基于以上论述，我们可以以 φ 和 a 为自变量， ΔG_{mix} 为因变量，画出该体系在不同条件下的自由能曲面（图 7）。当自由能曲面的截面所得自由能曲线呈 W 形时，若溶质浓度在 W 形两个最低点之间，体系达到平衡时，为使自由能最低，并不会保持均一的一个相，而会分成组分浓度不同的两个相。由图 7 可见，只有在 eCAGr 和光照同时存在时，该体系的自由能曲面才呈现出更陡峭的 M 型，有着更大的发生相分离的浓度区间（平行于 φ 轴截面的 W 形的两个最低点之间范围更大），发生相分离后体系的自由能降低更多（W 形中间最高点和两个最低点之间差值更大），更容易发生相分离。

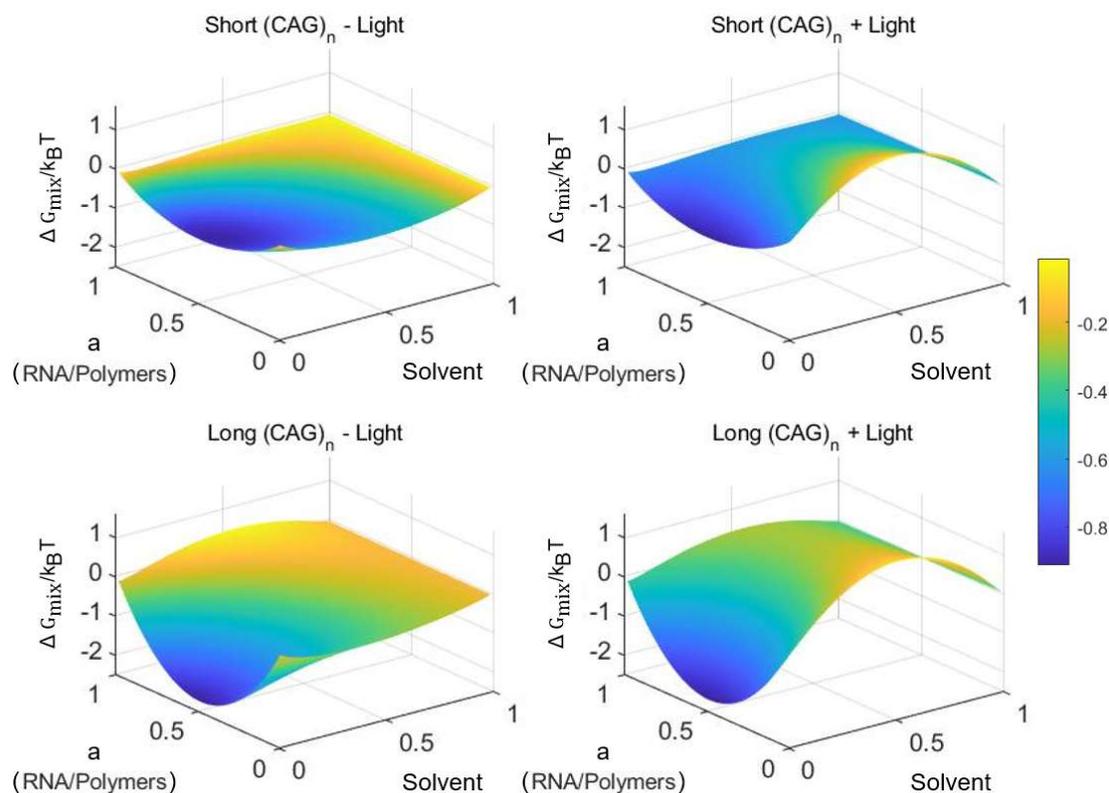


图 7: 建模分析预测 RPhASe 系统能够光照诱导 eCAGr 形成相分离聚集

基于 Flory-Huggins 理论考虑一个包含溶剂分子、(CAG)_n RNA 和 BIND-CRY2 蛋白的三元溶液体系，计算该体系在含不同长度 CAG 重复 RNA 和是否光照条件下的自由能曲面

当体系不受光照时，令人惊讶的是，当 a (RNA/多聚物) 的值较小时，平行于 ϕ 轴截面所得自由能曲线呈 U 形而非 W 形，表明该体系在整个多聚物总浓度区间内都不会发生相分离（图 7，左上和左下）。对比之下，体系受到光照后，在 a 的值较小时，相分离发生的窗口却很大，尽管光对相分离的这种促进作用在 a 接近 1 时不那么明显（图 7，右上和右下）。而体系都接受光照时，无论 a 的大小，含更长 CAG 重复的 RNA 总是能够使自由能曲线更为陡峭，从而使体系具有更强的相分离能力。

综上，建模分析预测 RPhASe 系统能够光照诱导 eCAGr 形成相分离聚集，而光照在该过程中相比 RNA 所含 CAG 重复数起到更决定性的作用。

综上所述，细胞实验和建模分析均表明 RPhASe 系统能够光照诱导 eCAGr 形成相分离聚集，证明了 RPhASe 系统的有效性与特异性。

3.1.3 RPhASe 光照诱导 eCAGr 聚集与疾病中聚集性质相似

接下来，我试图检测 RPhASe 光照诱导形成的 eCAGr 聚集与疾病中的聚集是否具有相似性质，包括 eCAGr 聚集的细胞定位和相（phase）的属性，以及短肽和寡核苷酸对 eCAGr 聚集的影响。若 RPhASe 光照诱导形成的 eCAGr 聚集与疾病中的聚集具有相似性质，则可进一步验证该系统的特异性，为后续利用 RPhASe 系统探究 eCAGr 聚集功能打下基础。

3.1.3.1 RPhASe 诱导 eCAGr 聚集与疾病中聚集细胞定位相同

在不加 NH₄Cl 时，RPhASe 光照诱导形成的 eCAGr 聚集定位于细胞核内（图 5），与疾病细胞中外源和内源的 eCAGr 聚集具有相同细胞定位^[12]；而加入 NH₄Cl 阻断自噬后，RPhASe 光照诱导形成的 eCAGr 聚集在细胞核和细胞质内均广泛存在（图 6），与疾病细胞中 NH₄Cl 或 CQ 阻断自噬后 eCAGr 聚集的定位相同（未发表数据）。因此，RPhASe 光照诱导 eCAGr 聚集与疾病中聚集具有相同细胞定位。

3.1.3.2 RPhASe 诱导 eCAGr 聚集具有胶体或固体性质

为探究 RPhASe 光照诱导形成的 eCAGr 聚集具有液体、胶体还是固体性质，可通过荧光漂白恢复（fluorescent recovery after photobleaching, FRAP）实验检测 eCAGr 聚集中 eCAGr 与外界环境中 eCAGr 交换的分子动力学性质。使用 NH₄Cl 阻断自噬后利用 RPhASe 光照诱导形成 eCAGr 聚集并进行 FRAP 实验，发现细胞核和细胞质里的 eCAGr 聚集都没有明显的恢复（图 8），表明聚集中的 eCAGr 与外界的 eCAGr 没有积极的分子交换，因此这些 eCAGr 聚集可能呈胶体或固体。而不引入 RPhASe 系统时，自噬阻断后的外源 eCAGr 聚集在细胞质内荧光恢复差，在细胞核内却有很好的恢复，具有液体性质（未发表数据），与 RPhASe 诱导形成的细胞核内 eCAGr 聚集性质不同。这可能是由于长时间光照使聚集中相互作用的 eCAGr 之间的结构排列得越来越紧密，使细胞核内本来呈液体的 eCAGr 相分离聚集发生了溶质-胶体转变，从液态逐渐转变为了胶体甚至固体，这在以前的研究中有类似报道^[13]。

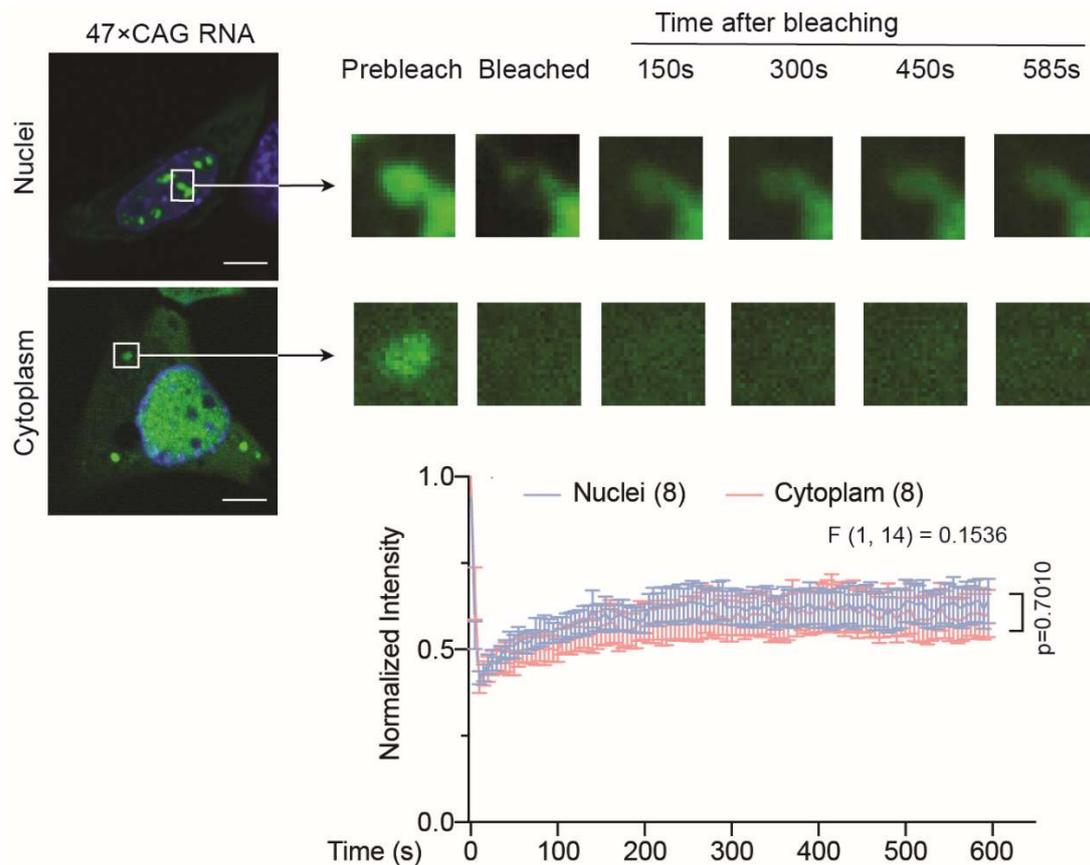


图 8: RPhASe 光照诱导 eCAGr 相分离聚集具有胶体或固体性质

使用 NH₄Cl 阻断自噬后利用 RPhASe 系统光照诱导细胞形成细胞核、质内 eCAGr 聚集，对 eCAGr 聚集光漂白后检测其荧光恢复。比例尺：10 μm

3.1.3.3 反义寡核苷酸和短肽干扰 RPhASe 诱导的 eCAGr 聚集

先前报道发现 8×CTG 反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotides, ASO) 会干扰细胞核内的 eCAGr 聚集，这可能是通过干扰了 eCAGr 分子间的碱基配对相互作用^[12]。为探究 8×CTG 是否也会干扰 RPhASe 光照诱导形成的 eCAGr 聚集，在转入 RPhASe 系统的细胞中转入 8×CTG 后光照细胞，发现转入 8×CTG 的细胞在细胞核和细胞质中不再有明显的 eCAGr 聚集，而转入对照寡核苷酸的细胞依然有 RPhASe 光照诱导形成的核质 eCAGr 聚集。

此外，我们猜测能够特异性结合 eCAGr 的短肽 BIND 也可能通过结合 eCAGr 干扰其分子间互作从而干扰 eCAGr 聚集。类似地，在转入 RPhASe 系统的细胞中转入 BIND 后光照细胞，发现转入 BIND 的细胞在细胞核和细胞质中不再有明显的 eCAGr 聚集，而转入不能结合 eCAGr 的对照短肽 BIND-S^[18]的细胞依然有 RPhASe 光照诱导形成的核质 eCAGr 聚集。

因此，能够干扰疾病中 eCAGr 聚集的反义寡核苷酸 8×CTG 和能够特异结合 eCAGr 的短肽 BIND 也能够干扰 RPhASe 光照诱导的 eCAGr 聚集。

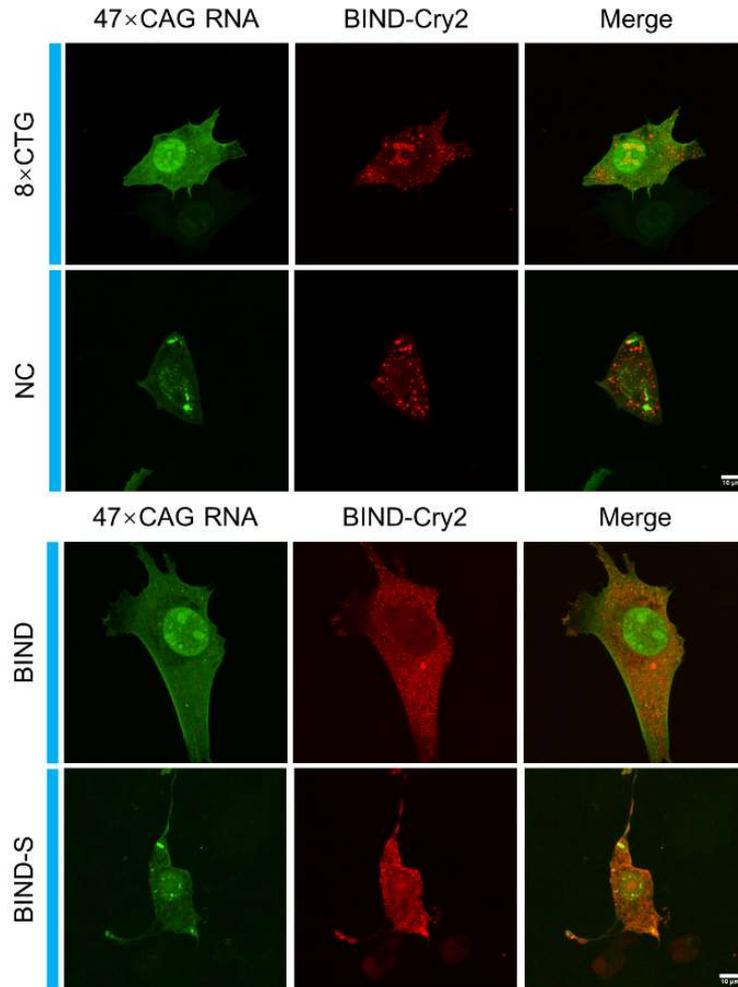


图 9：短肽和寡核苷酸干扰 RPhASe 光照诱导形成 eCAGr 聚集
在细胞中表达外源 eCAGr 和 BIND-CRY2 后转染图示反义寡核苷酸或短肽，光照并成像。
比例尺：10 μm

综上，RPhASe 光照诱导形成的 eCAGr 相分离聚集与疾病中的聚集具有相似性质，它们具有相同的细胞定位，且都受到短肽和反义寡核苷酸的干扰，这些结果进一步证明了 RPhASe 系统光照诱导形成 eCAGr 相分离聚集的特异性。

3.2 利用 RPhASe 系统探究 eCAGr 相分离聚集的功能

在证明了 RPhASe 系统的有效性和特异性后，我们希望利用 RPhASe 探究 eCAGr 相分离聚集的功能。如果用 RPhASe 光照增强了 eCAGr 的相分离聚集后，特定细胞功能或表型发生变化，就能够在 eCAGr 相分离聚集和该功能/表型之间

建立因果关系。

3.2.1 自噬阻断后 RPhASe 诱导 eCAGr 聚集增强细胞凋亡

我们猜测 eCAGr 相分离聚集可能具有细胞毒性，可能会引起细胞凋亡，因此检测了 RPhASe 光照诱导形成 eCAGr 相分离聚集的细胞及其对照的 Caspase-3 信号，以计算凋亡细胞占比。在不加入 NH₄Cl 阻断自噬时，转入 eCAGr 和 RPhASe 系统的细胞光照组与不光照组的凋亡信号没有明显差别（图 10，下），而加入 NH₄Cl 阻断自噬后，光照组的凋亡信号却在 3 天左右时明显大于不光照组（图 10，上）。以上结果表明不阻断自噬时，细胞核内 eCAGr 相分离聚集受 RPhASe 诱导增强可能并不会产生更明显的细胞毒性，而阻断自噬后，细胞核和细胞质内 eCAGr 相分离聚集受 RPhASe 诱导增强则会提高凋亡细胞占比。因此，细胞质内 eCAGr 相分离聚集可能具有更强的细胞毒性。

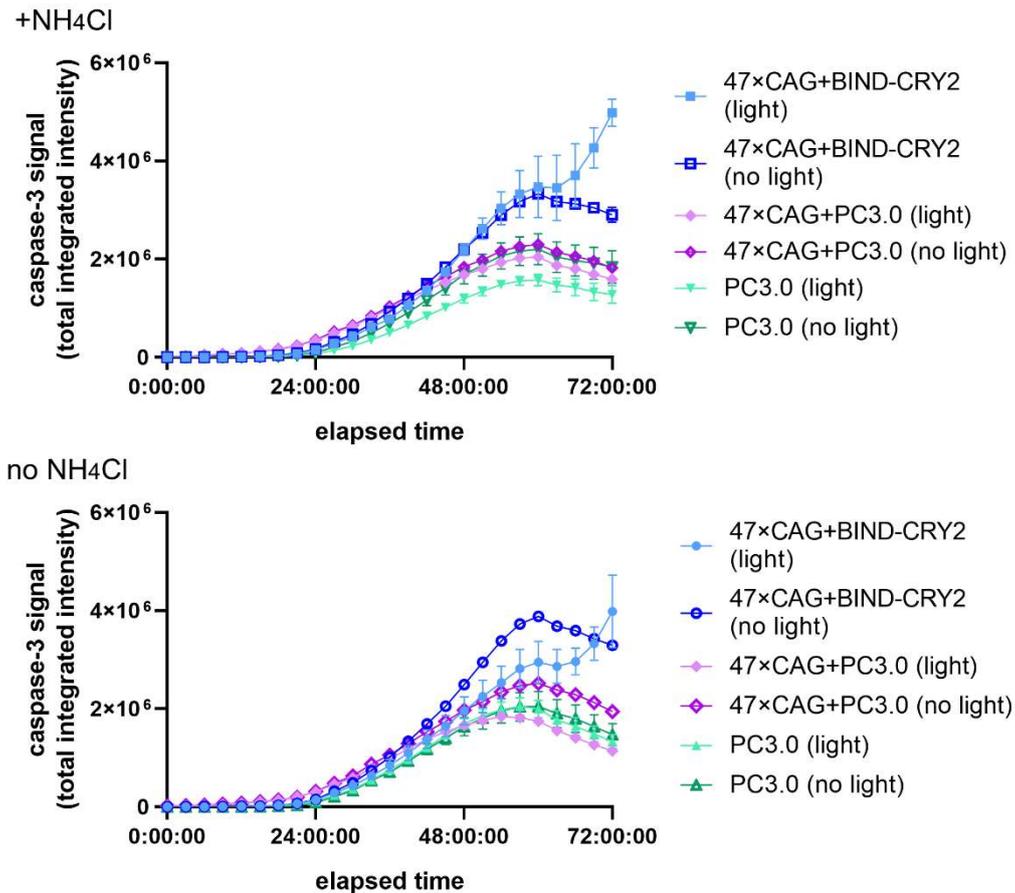


图 10: 自噬阻断后 RPhASe 光照诱导 eCAGr 聚集增强细胞凋亡
在细胞中表达外源 47×CAG RNA 和 BIND-CRY2，加或不加 NH₄Cl，检测表达 caspase-3 信号的凋亡细胞含量

综上，利用 RPhASe 系统在自噬阻断时光照诱导 eCAGr 形成更强的细胞核和细胞质相分离聚集会导致更多细胞发生凋亡。

四、讨论

本研究中，我们成功构建了一个光照诱导 eCAGr 发生相分离聚集的系统 RPhASe，并证明了该系统能够有效、特异地在细胞中增强 eCAGr 的相分离聚集。在阻断自噬后，细胞核和细胞质中增强的 eCAGr 相分离聚集都呈胶体或固体性质。建模分析从热力学角度证明了 RPhASe 光照诱导 eCAGr 聚集的理论可行性，并发现光照在该过程中起到主导作用。利用 RPhASe 系统探究 eCAGr 相分离聚集的功能，我们发现自噬阻断后细胞核和细胞质中 eCAGr 相分离聚集的增强会导致细胞凋亡增加。

该研究构建了全新的 RNA 相分离聚集正向控制系统，这在以前并未报道过。该系统具有高特异性和时空分辨率，且能够以类似思路构建其他能够发生相分离的 RNA 的工具，是研究 RNA 相分离功能的有力工具。例如，在肌萎缩侧索硬化（ALS）和额颞痴呆（FTD）中，C9ORF72 基因内含子中的 GGGGCC (G4C2) 重复扩增是最常见的遗传致病因素，而含 G4C2 的 RNA 能够在体外实验和细胞实验中形成相分离聚集^[12]。利用能够特异性结合含过长 G4C2 重复 RNA (elongated G4C2 RNA, eG4C2r) 的肽段，我们也可以构建光控 eG4C2r 的系统（未发表数据），并探究 eG4C2r 相分离聚集的病理功能。因此，该系统具有广泛应用价值。

该研究的初步结果发现 eCAGr 相分离聚集会在自噬阻断后引起细胞凋亡。传统观点认为含过长谷氨酰胺重复（polyQ）的 Huntingtin 蛋白的毒性是 HD 的主要致病因素，而该研究的结果初步表明 eCAGr 可能独立于过长 polyQ 蛋白参与疾病发生，提出了 HD 可能的新致病机制，为疾病治疗提供了新思路。

该研究存在的问题之一是细胞实验中只使用 RPhASe 诱导了外源表达的 eCAGr，因此表达量较高，且每个细胞表达水平均有差异。未来工作可构建稳转株表达接近生理水平的 eCAGr 或借助内源 RNA 活细胞成像工具，检测 RPhASe 能否有效诱导其相分离聚集，使对于 eCAGr 生理功能的研究更可信。如果能够在体外体系中证明纯化的 BIND-CRY2 能够光照诱导 eCAGr 相分离聚集，则能进一步证明 RPhASe 体系的特异性和充分性。

此外，该研究发现自噬阻断后细胞核和细胞质 eCAGr 相分离聚集的同时增

强才会导致细胞凋亡的上升，而不阻断自噬时细胞核 eCAGr 相分离聚集的增强却没有这种影响，说明细胞质 eCAGr 聚集可能具有更强毒性。这对于疾病的机制有着很多启示，因为 HD 作为一种神经退行性疾病，在发病后症状随着衰老越来越严重，而衰老这一过程伴随着自噬水平的降低。这在 HD 中是否可能导致细胞质中 eCAGr 聚集不能被有效降解而积累，其毒性进一步致病，从而可以解释疾病渐进式的加重呢？未来工作需要进一步研究 eCAGr 相分离聚集的病理功能，并区分细胞质和细胞核 eCAGr 聚集可能的不同作用。

除了能够应用与光控其他 RNA 的相分离聚集，该体系的应用还可拓展于在体系统。例如，可以在 HD 疾病型果蝇的眼睛中表达 RPhASe 并光照诱导 eCAGr 聚集，看是否会影响果蝇运动能力和生存能力。在在体系统中利用 RPhASe 这一工具研究 RNA 相分离功能将具有更大的生理病理意义和临床前景。

参考文献

- [1] D. Bracha, M. T. Walls, and C. P. Brangwynne, “Probing and engineering liquid-phase organelles,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 37, no. 12, pp. 1435–1445, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41587-019-0341-6.
- [2] Y. Shin and C. P. Brangwynne, “Liquid phase condensation in cell physiology and disease,” *Science*, vol. 357, no. 6357, p. eaaf4382, Sep. 2017, doi: 10.1126/science.aaf4382.
- [3] A. Zbinden, M. Pérez-Berlanga, P. De Rossi, and M. Polymenidou, “Phase Separation and Neurodegenerative Diseases: A Disturbance in the Force,” *Dev. Cell*, vol. 55, no. 1, pp. 45–68, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.devcel.2020.09.014.
- [4] Y.-B. Lee *et al.*, “Hexanucleotide Repeats in ALS/FTD Form Length-Dependent RNA Foci, Sequester RNA Binding Proteins, and Are Neurotoxic,” *Cell Rep.*, vol. 5, no. 5, pp. 1178–1186, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.celrep.2013.10.049.
- [5] C. A. Ross and S. J. Tabrizi, “Huntington’s disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment,” *Lancet Neurol.*, vol. 10, no. 1, pp. 83–98, Jan. 2011, doi: 10.1016/S1474-4422(10)70245-3.
- [6] M. Wojciechowska and W. J. Krzyzosiak, “Cellular toxicity of expanded RNA repeats: focus on RNA foci,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 20, no. 19, pp. 3811–3821, Oct. 2011, doi: 10.1093/hmg/ddr299.
- [7] F. Saudou and S. Humbert, “The Biology of Huntingtin,” *Neuron*, vol. 89, no. 5, pp. 910–926, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.neuron.2016.02.003.
- [8] W. J. Krzyzosiak, K. Sobczak, M. Wojciechowska, A. Fiszer, A. Mykowska, and P. Kozlowski, “Triplet repeat RNA structure and its role as pathogenic agent and therapeutic target,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. 1, pp. 11–26, Jan. 2012, doi: 10.1093/nar/gkr729.
- [9] M. O. Urbanek, M. Jazurek, P. M. Switonski, G. Figura, and W. J. Krzyzosiak, “Nuclear speckles are detention centers for transcripts containing expanded CAG repeats,” *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.*, vol. 1862, no. 9, pp. 1513–1520, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.bbadis.2016.05.015.
- [10] H. Y. Zoghbi and H. T. Orr, “Glutamine Repeats and Neurodegeneration,” *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 23, no. 1, pp. 217–247, Mar. 2000, doi: 10.1146/annurev.neuro.23.1.217.
- [11] X. Feng, S. Luo, and B. Lu, “Conformation Polymorphism of Polyglutamine Proteins,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 43, no. 6, pp. 424–435, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.tibs.2018.03.002.
- [12] A. Jain and R. D. Vale, “RNA phase transitions in repeat expansion disorders,” *Nature*, vol. 546, no. 7657, pp. 243–247, Jun. 2017, doi: 10.1038/nature22386.
- [13] Y. Shin, J. Berry, N. Pannucci, M. P. Haataja, J. E. Toettcher, and C. P. Brangwynne, “Spatiotemporal Control of Intracellular Phase Transitions Using Light-Activated optoDroplets,” *Cell*, vol. 168, no. 1–2, pp. 159–171.e14, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.cell.2016.11.054.
- [14] D. Bracha *et al.*, “Mapping Local and Global Liquid Phase Behavior in Living

- Cells Using Photo-Oligomerizable Seeds,” *Cell*, vol. 175, no. 6, pp. 1467-1480.e13, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.10.048.
- [15] H. Nakamura *et al.*, “Intracellular production of hydrogels and synthetic RNA granules by multivalent molecular interactions,” *Nat. Mater.*, vol. 17, no. 1, pp. 79–89, Jan. 2018, doi: 10.1038/nmat5006.
- [16] E. Dine, A. A. Gil, G. Uribe, C. P. Brangwynne, and J. E. Toettcher, “Protein Phase Separation Provides Long-Term Memory of Transient Spatial Stimuli,” *Cell Syst.*, vol. 6, no. 6, pp. 655-663.e5, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.cels.2018.05.002.
- [17] K. R. Shull, “MATLAB for the Materials Scientist/Engineer,” p. 14.
- [18] Q. Zhang *et al.*, “A peptidyl inhibitor for neutralizing expanded *CAG* RNA-induced nucleolar stress in polyglutamine diseases,” *RNA*, vol. 24, no. 4, pp. 486–498, Apr. 2018, doi: 10.1261/rna.062703.117.
- [19] L. J. Bugaj, A. T. Choksi, C. K. Mesuda, R. S. Kane, and D. V. Schaffer, “Optogenetic protein clustering and signaling activation in mammalian cells,” *Nat. Methods*, vol. 10, no. 3, pp. 249–252, Mar. 2013, doi: 10.1038/nmeth.2360.
- [20] L. Duan *et al.*, “Understanding CRY2 interactions for optical control of intracellular signaling,” *Nat. Commun.*, vol. 8, no. 1, p. 547, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41467-017-00648-8.
- [21] A. Taslimi *et al.*, “An optimized optogenetic clustering tool for probing protein interaction and function,” *Nat. Commun.*, vol. 5, no. 1, p. 4925, Dec. 2014, doi: 10.1038/ncomms5925.

致谢

我在 2018 年的暑假参加了生科院的 BIOS 课程，在鲁伯坝老师实验室进行了小鼠模块的学习，和搭档李晨自己设计并开展的小课题出乎意料地得到了鲁老师的高度认可，由此进入鲁伯坝老师实验室，并在此度过了三年的科研时光。在此期间，鲁老师给予了我无数指导与帮助。在每周的结果讨论中，鲁老师清晰的思路和严密的逻辑都在潜移默化地提升我的科研思维；当我参加项目需要鲁老师的推荐信时，鲁老师的大力推荐和高度赞扬使我感动之余又感到自己仍需更加努力；写 research highlight 的过程中，鲁老师教会了我如何使一篇文章的逻辑清晰明了，让我第一次体验到了投稿的整个过程。鲁老师是我的老师、朋友、也是偶像，我希望自己以后也能像鲁老师一样找到自己热爱的事业并为之奋斗。

我的师兄潘宇寅也在我的科研过程中给了我很多帮助，从初入实验室时手把手教我做实验，到与我不时讨论课题进展；从耐心解答我的任何问题，到帮我修改课题相关报告等等。在学习和生活上师兄也给予了我很多帮助和陪伴，我会记得我们一起吃饭、打球、打游戏的时光。希望他的文章能够早日发表，能够在学术道路上更进一步，实现当 PI 的理想。

我在进行该课题的过程中也得到了很多其他人的帮助，包括卢俊梅师姐、王坤工程师、李雄、胡婧怡等等，感谢你们的指导。在实验室期间，也感谢丁灏老师、孙晓俐老师、付玉华老师、文学师兄、赵佺师兄、王聪聪师姐、卢俊梅师姐、宋海坤师兄、李朝阳师兄、谭水霞师姐、潘宇寅师兄、王岑师姐、王紫英师姐、章晓丹师姐、安平师姐、王慧兰师姐、谭海亮师兄、梁辉师兄、赵子繁、陈子扬、李晨、林云致、李雄、胡健一等等或大或小的帮助。感谢实验室所有老师、师兄师姐和同学热情而友好地接纳我为 Lu Lab 的一分子，让我在这里感受到了集体归属感。

感谢父母养育我成人，特别感谢红丽女士为支持我的学习和爱好的经济和精力付出，感谢她对于我的人生选择的尊重。

感谢本科所有任课老师给予我学科基础知识、专业知识以及实验操作技巧等方面的知识。其中尤其感谢鲁伯坝老师和蔡亮老师在课程上的悉心指导。

感谢生科院的谈家桢班、拔尖计划平台，给本科生提供了一个良好的科研平台，使我感受到了科研的快乐。

感谢在生科院认识的许多志同道合的小伙伴，包括杜容榕、林云致、李晨、顾钰哲等等，我们一起玩乐也共同进步，祝我们都能在科研的道路上创造一片属于自己的天地。感谢容榕，你对科学纯粹的热爱感染着我，你对我的鼓励我铭记在心，祝你在 CalTech 继续做喜欢的科研，以后成为 leading scientist 和沙雕杜老师。感谢云致小天使般温暖的陪伴，祝你能够实现去国外读神经 PhD 的愿望。感谢李晨，作为我的第一个搭档，在学习和生活上给我的帮助和陪伴。感谢钰哲，你的真诚、大胆与自信使我也受益良多。

感谢室友王一凡、许海娇、吴佳芮、苗曦丹、许文艳，大学五年给予我良好的学习、生活环境，大家相互督促，共同进步。特别感谢吴佳芮在最后一年的陪伴，我们即使不在一个城市，依然可以每天交流科研与生活的种种，有机会就相约一起玩耍甚至旅游。祝你在 Hu Lab 的研究生之旅顺顺利利，未来能够过自己想要的生活。

最后，特别感谢陆译在大学以来的陪伴和支持，让我感受到我在这个世界上是有锚点与后盾的。希望未来我们可以继续一起成长。