

•综述•

DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2017.09.03

远端上游元件结合蛋白 1 的生物学功能

刘祥莉¹⁾, 张福成²⁾, 王要军^{1)*}

(¹⁾ 济南军区总医院消化内科 济南 250300; ²⁾ 山东大学附属省立医院消化内科 济南 250300)

摘要 远端上游元件结合蛋白 1(far upstream element binding protein 1, FUBP1) 通过特异性结合远端上游元件(upstream element, FUSE) 调控原癌基因 *c-Myc* 的转录。FUBP 家族包括 FUBP1、FUBP2、FUBP3 及 FUBP4, 其序列具有高度同源性, 但功能各不相同。FUBP1 蛋白由 3 个结构域构成, 具有两亲性螺旋结构的 N 端、富含酪氨酸的 C 端以及 1 个 DNA 结合区域。生理状态下, FUBP1 蛋白定位于细胞核。除了调控 *c-Myc* 转录外, FUBP1 还可结合 RNA, 参与调控 mRNA 稳定性、病毒复制及 RNA 的剪接。

关键词 远端上游元件结合蛋白 1; *c-Myc*; 转录; 生物学功能

中图分类号 R34

The Biological Function of Far Upstream Element Binding Protein 1

LIU Xiang-Li¹⁾, ZHANG Fu-Cheng²⁾, WANG Yao-Jun^{1)*}

(¹⁾ Department of Gastroenterology, General Hospital of Jinan Military Command, Jinan 250300, China;

²⁾ Department of Gastroenterology, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250300, China)

Abstract The far upstream binding protein 1 (FUBP1) can bind to the far upstream element (FUSE), and then regulates *c-Myc* gene transcription. *c-Myc* gene is an oncogene and a large number of studies demonstrated that FUBP1 was overexpressed in multiple types of cancers, such as non-small cell lung cancer, breast cancer, clear cell renal cancer, liver cancer, bladder cancer and prostate cancer. FUBP1 may be a new oncogene. FUBP family consists of four members, FUBP1, FUBP2, FUBP3 and FUBP4. These four genes share a high degree of sequence homology but show different functions. FUBP1 protein has three well-defined domains, an amphipathic helix N-terminal domain, a tyrosine-rich C-terminal domain and a DNA-binding central domain. The N-terminal domain can repress the activity of the C-terminal domain. The DNA-binding central domain is important for FUSE binding. Under normal physiological conditions, FUBP1 is located in the nucleus. Under stress such as heat shock, viral infection and oxidative stress, FUBP1 can translocate from the nuclei to the cytoplasm. In addition to the transcription regulation of *c-Myc*, FUBP1 can also interact with RNA and regulate the stability of mRNA, replication of virus and RNA splicing.

Key words far upstream element binding protein 1 (FUBP1); *c-Myc*; transcription; biological function

远端上游元件结合蛋白 1(far upstream element binding protein 1, FUBP1) 最初视为 DNA 结合蛋白质, 调控 *c-Myc* 的转录。随着众多相关研究的开展, 发现 FUBP1 还可与 RNA 结合, 参与 mRNA 稳定性、翻译、病毒复制和 RNA 剪接等多个过程。关于 FUBP1 的研究仍在不断深入, 现结合文献就 FUBP1 的生物学功能进行综述。

1 远端上游元件结合蛋白 1 概况

1.1 FUBP1 的发现

FUBP1 作为 DNA 结合蛋白质, 特异性地结合

远端上游元件(upstream element, FUSE), 参与调控原癌基因 *c-Myc* 的转录过程。1994 年, FUBP1 首次被报道^[1]。研究者发现, 在人类白血病细胞系 HL60 和人类组织细胞淋巴瘤细胞系 U937 的诱导分化过程中, 原癌基因 *c-Myc* 表达下调, *c-Myc* 基因下调与 FUBP1 密切相关。FUSE 是 *c-Myc* 基因表达

收稿日期: 2017-01-20; 修回日期: 2017-03-02; 接受日期: 2017-03-24

* 通讯作者 Tel: 15069052910, E-mail: 931778403@qq.com;

Received: January 20, 2017; Revised: March 2, 2017; Accepted: March 24, 2017

* Corresponding author Tel: 15069052910, E-mail: 931778403@qq.com

最大化的必需元件,在未分化细胞中,FUSE 特异性结合某种未知蛋白质,而在分化细胞中则不存在这种蛋白质^[1],推测该蛋白质与抑制细胞分化有关,后证实是 FUBP1。

1.2 FUBP 家族

FUBP 家族目前包括 4 个成员: FUBP1、FUBP2、FUBP3 及 FUBP4^[2]。FUBP 家族成员拥有同源序列、共同的结构特点以及组织分布的相似性,决定了该家族成员既具有部分生物学功能的重叠,每个成员又各具特殊性。

其中,研究最多的是 FUBP1,FUBP1 蛋白包含 644 个氨基酸残基,唯一具有解旋酶活性,可与单链 DNA 结合,进而调控 *c-Myc* 基因的表达^[3]。FUBP2 主要与 RNA 结合,维持 mRNA 的稳定性^[4]。另外,敲除 *FUBP2* 基因可以提高 FUBP1 的 mRNA 及蛋白质水平,说明 FUBP2 具有抑制 FUBP1 表达的作用^[5]。FUBP3 的相关研究较少,

FUBP3 可以协助 FUBP2 结合 RNA^[6]。而 FUBP4 在新杆状线虫中被发现,因为与 FUBP1 具有同源性,故将其列为 FUBP 家族成员,但其生物学功能不详^[1]。

1.3 FUBP1 的分子结构特点

FUBP1 蛋白主要由 3 个结构域构成,具有两亲性螺旋结构的 N 端、富含酪氨酸的 C 端以及一个 DNA 结合区域^[7] (Fig. 1)。其中,N 端可抑制 C 端的活性,说明当 FUBP1 分子处于封闭状态时是无活性的,而分子结构处于开放状态才具有活性。DNA 结合区域是 FUBP1 分子的核心,包括 4 个 KH 域,其中,KH3 和 KH4 参与 FUBP1 与 FUSE 的结合^[8,9]。C 端包含 3 个富含酪氨酸的模体,与 FUBP1 和转录因子 II-H (transcription factor II-H, TF II H) 的结合密切相关^[10],TFI II H 是 RNA 聚合酶 II 的转录因子,具有 DNA 解旋酶活性,解开 DNA 双螺旋,进而使 FUBP1 与 DNA 结合^[11]。

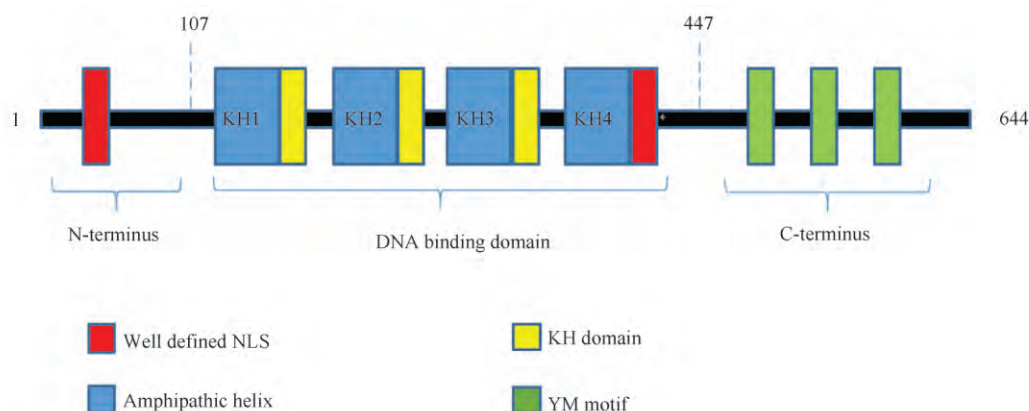


Fig. 1 Schematic structure of FUBP1 protein
NLS: Nuclear localization sequence; KH domain: the K homology domain;
YM motif: Tyrosine-rich motifs

1.4 FUBP1 的细胞定位

作为转录因子,FUBP1 定位于细胞核,但是,其部分生物学功能的发挥需位于细胞质,例如维持 RNA 的稳定性^[12,13]。正常生理状态下,FUBP1 定位细胞核需依赖于其 3 个核定位信号,分别位于 FUBP1 分子的 3 个结构域^[14]。当遇到热应激、氧化应激及病毒感染时,胞浆内的应激颗粒可招募 FUBP1 移向胞浆,进而在细胞质内进行翻译^[15]。

另外,凋亡细胞中也存在 FUBP1 定位于细胞质的现象^[13]。已知 TNF- α 和环己酰亚胺可诱导细胞凋亡,研究者使用 TNF- α 和环己酰亚胺处理细胞,结果 30% 的凋亡细胞中可见 FUBP1 的胞浆定位现象,究其原因是半胱天冬酶(也称细胞凋亡蛋白酶)切断 FUBP1 蛋白分子 N 端的核定位信号所致。病

毒感染时也存在 FUBP1 定位胞浆现象,乙脑病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 感染的细胞可见 FUBP1 定位在胞浆^[16]。FUBP1 定位于胞浆可致细胞凋亡,而 JEV 感染细胞也存在其胞浆定位现象,因此推测病毒感染时 FUBP1 的胞浆定位为一种自我保护机制,FUBP1 移向胞浆可诱导细胞凋亡从而抑制 JEV 病毒的复制。

2 FUBP1 的生物学功能

2.1 FUBP1 调节 *c-Myc* 基因的转录

FUSE 位于 *c-Myc* 基因启动子上游 1.5 kb 处,富含腺嘌呤 (A) 和胸腺嘧啶 (T)^[17]。FUSE 不与 FUBP1 结合时,*c-Myc* 基因无法开始转录。但 FUSE 仅仅与 FUBP1 结合亦不能诱导转录开始,只有在其

他相关转录因子的共同作用下, FUSE 和 FUBP1 的结合才可诱导转录^[18]。说明 FUBP1 与 FUSE 的结合是 *c-Myc* 基因转录的必要条件, 而非充分条件。研究证明, FUBP1 在与 FUSE 结合的同时可与 TFIH 相互作用。三者转录起始点形成启动环结构, 该结构使得 FUBP1、TFIIH 和 RNA 聚合酶 II 复合体紧密结合, 激活 TFIH 的解旋酶活性, 进而增强 *c-Myc* 基因转录。

生理状态下, TFIH 和 FUBP1 的核心区域与一种蛋白质相结合, 这种蛋白质被命名为 FUBP1 抑制蛋白 (FUBP1 interacting repressor, FIR)。FIR 包含 542 个氨基酸残基, 其核心区域含有 2 个 RNA 识别模体^[19]。FIR 可与 FUBP1 相互作用而结合到 FUSE 上, 然后, FIR 与 TFIH 相接触并抑制 TFIH 的解旋

酶活性。因此, 当 FIR 被招募到启动环结构附近时, 可以抑制 TFIH 的解旋酶活性, 从而阻碍 *c-Myc* 基因的转录^[20]。

研究证明 *c-Myc* 基因的基态转录往往受阻于启动子附近区域, FUBP1 可以帮助消除这种阻碍, 从而使 *c-Myc* 转录最优化。其发挥作用需依赖 FUBP1-FUSE-FIR 轴^[21]。具体过程为^[22]: 第 1 阶段, 传统转录因子通过 RNA 聚合酶 II 促进 *c-Myc* 基因的基态转录, 但在转录起始附近区域受阻, 此时, 染色质结构重塑, FUSE 区域暴露; 第 2 阶段, FUBP1 结合到 FUSE 上, 并与 TFIH 相作用, 刺激其解旋酶活性, 三者相互作用, 促使 *c-Myc* 转录恢复; 第 3 阶段, FIR 替代 FUBP1 结合到 FUSE 上, FIR 抑制 TFIH 解旋酶活性, 进而抑制 *c-Myc* 基因的最大化转录 (Fig. 2)。

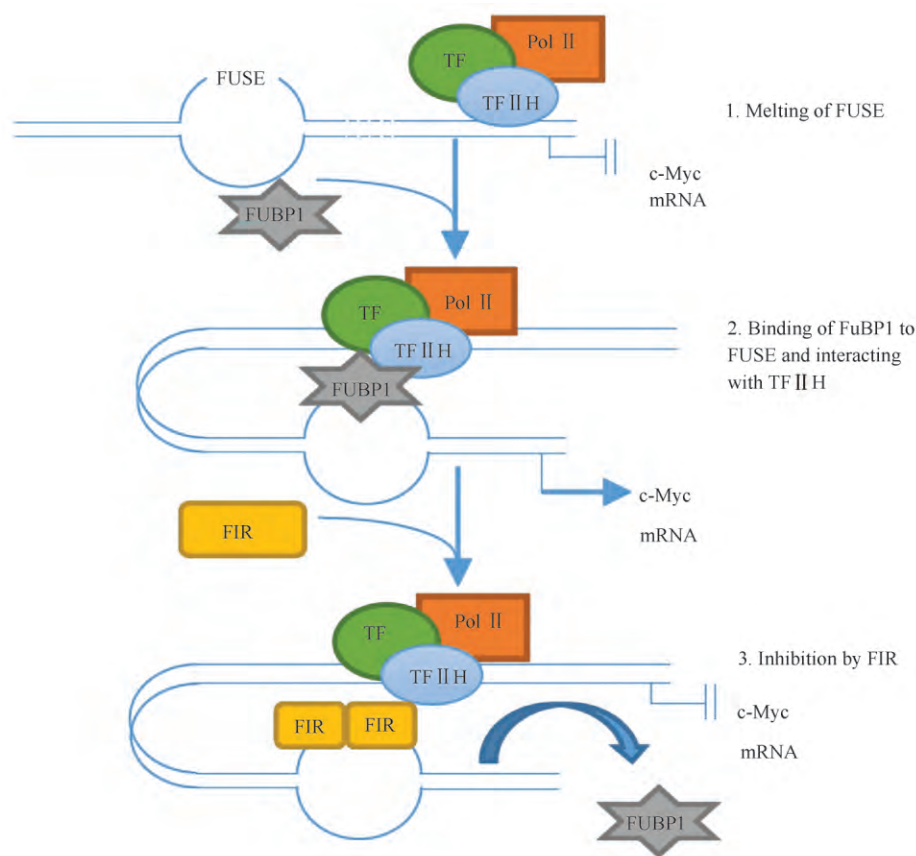


Fig. 2 Schematic diagram for the transcriptional regulation of *c-Myc* by FUBP1^[1]

2.2 FUBP1 与 mRNA 稳定性

在不同细胞、不同基因中, FUBP1 对 mRNA 的稳定性影响有所不同。而相同点是, FUBP1 往往是通过结合 RNA 特定区域的方式来发挥作用。

生长相关蛋白 43 (growth-associated protein 43, GAP43) 是一种膜相关磷脂蛋白, 与神经系统中轴突

的生长和再生密切相关^[23]。FUBP1 通过对 GAP43 转录后调节而影响神经系统的发育。研究表明, GAP43 的 3' 端非翻译区 (3'-untranslated region, 3'-UTR) 能够破坏相关基因的 mRNA 的稳定性, 而 FUBP1 可结合到该区域, 这种结合导致 GAP43 的 mRNA 降解, 阻断 GAP43 的翻译^[24]。所以, FUBP1

通过对 *GAP43* 的转录后调节,抑制 *GAP43* 翻译,进而保持相关基因 mRNA 稳定性。

众所周知,*P21* 基因是抑癌基因,其 mRNA 的 3'-UTR 包含 3 个富含腺嘌呤(A)、尿嘧啶(U)的元件(AU-rich elements, AREs)。FUBP1 可通过结合 AREs 调节 *P21* 的 mRNA 稳定性^[25]。有研究发现,在人类肝癌细胞 Hep3B 细胞中,*FUBP1* 基因被敲除后,*P21* mRNA 水平远远高于其正常水平。进一步研究证明,*FUBP1* 可结合到 *P21* 的 AREs,破坏 *P21* 的 mRNA 稳定性^[5]。

2.3 FUBP1 对翻译的影响

P27 与 *P21* 类似,也是公认的抑癌基因。近年有研究发现^[26],*FUBP1* 可促进 *P27* 的翻译过程。*P27* mRNA 的 5'-UTR 存在 1 个内部核糖体进入位点(internal ribosomal entry site, IRES),*FUBP1* 特异性地结合至 IRES,促进核糖体聚集,进而促进 *P27* mRNA 的翻译。更进一步的研究证实,*FUBP1* 对 IRES 的结合主要依赖 *FUBP1* 的 N 端和核心区域,因为删除二者中任何一个区域都会引起 *P27* 蛋白水平的下降。

核仁磷蛋白(nucleophosmin, NPM)是细胞增殖和染色质稳定性的调节因子。根据细胞种类和 *NPM* 表达水平的不同,*NPM* 可以抑制或促进肿瘤发生、发展^[27,28]。研究证明,*FUBP1* 对 *NPM* 的翻译起负性调节的作用^[29]。*FUBP1* 可以结合到 *NPM* 的 5'-UTR,干扰翻译起始,抑制 *NPM* 的翻译过程。敲除 *FUBP1* 基因,*NPM* mRNA 水平升高,*NPM* 蛋白表达增加;*FUBP1* 过表达则会导致 *NPM* 蛋白表达下降。

2.4 FUBP1 调控 RNA 病毒复制

FUBP1 可通过与 RNA 结合,调节某些逆转录病毒在宿主细胞中的复制。但是,*FUBP1* 对 RNA 病毒的复制既能是促进性的,也可以是抑制性的。

研究证明,人类丙肝病毒(human hepatitis C virus, HCV)在宿主细胞中的复制需要 *FUBP1* 的参与^[30]。*FUBP1* 结合到 HCV RNA 的 3'-UTR 的多聚尿嘧啶(U)区域,促进 HCV 复制。实验证实,敲除 *FUBP1* 基因可显著降低 HCV 的复制。相反,*FUBP1* 的过表达则会使 HCV 复制加速。而 *FUBP1* 对乙脑病毒(JEV)的复制则起抑制作用,*FUBP1* 可结合于 JEV RNA 的 3'-UTR 从而抑制其复制^[16]。研究证实,敲除 *FUBP1* 可导致 JEV 复制加速。

近年的研究指出,*FUBP1* 与肠病毒 71 (enterovirus 71, EV71)的复制密切相关。EV71 感

染可导致手足口病,而 *FUBP1* 可促进 EV71 的复制。研究发现, EV71 RNA 的 5'-UTR 的 IRES 可促进 EV71 在宿主细胞中的翻译过程^[31]。*FUBP1* 的 KH3 和 KH4 可以结合到该 IRES 上,通过竞争 IRES 的抑制因子促进 EV71 的翻译^[32]。同时还证实,敲除 *FUBP1* 可降低 EV71 的 5'-UTR 的活性,进而抑制 EV71 的复制。

2.5 FUBP1 调节 RNA 剪接

众所周知,*FUBP2* 是剪接调节因子,*FUBP1* 与 *FUBP2* 高度同源。近年,多项研究表明,*FUBP1* 在剪接中也发挥重要作用。*FUBP1* 可通过结合富含 AU 的外显子剪接沉默元件抑制 RNA 剪接^[33]。但另有研究认为,*FUBP1* 也可促进 RNA 剪接。鼠双微体 2(murine double minute 2, MDM2)是原癌基因,通过抑制抑癌基因 *P53* 而发挥致癌作用。在 *MDM2* 的剪接过程中,*FUBP1* 可结合其内含子剪接增强元件,促进 *MDM2* RNA 的剪接^[34]。进行性假肥大性肌营养不良基因(duchenne muscular dystrophy, DMD)的剪接过程也存在 *FUBP1* 的参与,*FUBP1* 可结合到 *DMD* RNA 外显子 39 上游的富含尿嘧啶(U)、鸟嘌呤(G)的剪接增强子上,促进 *DMD* 的剪接^[35]。

3 问题与展望

自 *FUBP1* 发现至今已有 20 多年。最初的研究发现,它可调节 *c-Myc* 基因转录。由于 *c-Myc* 基因是广为人知的原癌基因,所以学者们首先考虑 *FUBP1* 在肿瘤发生发展中的重要作用。因此,关于 *FUBP1* 与肿瘤方面的研究一度成为热点。此后,对于 *FUBP1* 的研究却停滞不前,大家对 *FUBP1* 的了解仅仅停留在促进肿瘤发生发展的水平。直到近年,部分研究者受到 *FUBP1* 家族其他成员生物学功能的启发,认为它们具有相似的分子结构,或许 *FUBP1* 同样具备其他家族成员的某些功能。所以,近年来 *FUBP1* 作为 RNA 结合蛋白的各种作用才被逐渐发现。关于 *FUBP1* 研究的发展历程告诫人们,做研究不但要有钻研深度,还应有开阔的思路,这样才能打破陈旧,获得新的发现。*FUBP1* 仍有许多不为所知的方面,只要善于联想,敢于假设,严谨求证,相信对它的了解将会更多。

参考文献(References)

- [1] Zhang J, Chen QM. Far upstream element binding protein 1: a commander of transcription, translation and beyond [J]. *Oncogene*, 2013, 32(24): 2907-2916

- [2] Gau BH, Chen TM, Shih YH, *et al.* FUBP3 interacts with FGF9 3' microsatellite and positively regulates FGF9 translation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, **39**(9): 3582-3593
- [3] Vindigni A, Ochem A, Triolo G, *et al.* Identification of human DNA helicase V with the far upstream element-binding protein [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, **29**(5): 1061-1067
- [4] Gherzi R, Chen CY, Trabucchi M, *et al.* The role of KSRP in mRNA decay and microRNA precursor maturation [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2010, **1**(2): 230-239
- [5] Malz M, Weber A, Singer S, *et al.* Overexpression of far upstream element binding proteins: a mechanism regulating proliferation and migration in liver cancer cells [J]. *Hepatology*, 2009, **50**(4): 1130-1139
- [6] Danckwardt S, Gantzer AS, Macher-Goeppinger S, *et al.* p38 MAPK controls prothrombin expression by regulated RNA 3' end processing [J]. *Mol Cell*, 2011, **41**(3): 298-310
- [7] Duncan R, Collins I, Tomonaga T, *et al.* A unique transactivation sequence motif is found in the carboxyl-terminal domain of the single-strand-binding protein FBP [J]. *Mol Cell Biol*, 1996, **16**(5): 2274-2282
- [8] Valverde R, Edwards L, Regan L. Structure and function of KH domains [J]. *FEBS J*, 2008, **275**(11): 2712-2726
- [9] Braddock DT, Baber JL, Levens D, *et al.* Molecular basis of sequence-specific single-stranded DNA recognition by KH domains: solution structure of a complex between hnRNP K KH3 and single-stranded DNA [J]. *EMBO J*, 2002, **21**(13): 3476-3485
- [10] Liu J, Akoulitchev S, Weber A, *et al.* Defective interplay of activators and repressors with TFIH in xeroderma pigmentosum [J]. *Cell*, 2001, **104**(3): 353-363
- [11] Giglia-Mari G, Coin F, Ranish JA, *et al.* A new, tenth subunit of TFIH is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A [J]. *Nat Genet*, 2004, **36**(7): 714-719
- [12] Liu J, Chung HJ, Vogt M, *et al.* JTV1 co-activates FBP to induce USP29 transcription and stabilize p53 in response to oxidative stress [J]. *EMBO J*, 2011, **30**(5): 846-858
- [13] Jang M, Park BC, Kang S, *et al.* Far upstream element-binding protein-1, a novel caspase substrate, acts as a cross-talk between apoptosis and the c-myc oncogene [J]. *Oncogene*, 2009, **28**(12): 1529-1536
- [14] He L, Weber A, Levens D. Nuclear targeting determinants of the far upstream element binding protein, a c-myc transcription factor [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28**(22): 4558-4565
- [15] Buchan JR, Parker R. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation [J]. *Mol Cell*, 2009, **36**(6): 932-941
- [16] Chien HL, Liao CL, Lin YL. FUSE binding protein 1 interacts with untranslated regions of Japanese encephalitis virus RNA and negatively regulates viral replication [J]. *J Virol*, 2011, **85**(10): 4698-4706
- [17] Avigan MI, Strober B, Levens D. A far upstream element stimulates c-myc expression in undifferentiated leukemia cells [J]. *J Biol Chem*, 1990, **265**(30): 18538-18545
- [18] Liu J, He L, Collins I, *et al.* The FBP interacting repressor targets TFIH to inhibit activated transcription [J]. *Mol Cell*, 2000, **5**(2): 331-341
- [19] Chung HJ, Liu J, Dundr M, *et al.* FBPs are calibrated molecular tools to adjust gene expression [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, **26**(17): 6584-6597
- [20] Liu J, Kouzine F, Nie Z. The FUSE/FBP/FIR/TFIIH system is a molecular machine programming a pulse of c-myc expression [J]. *EMBO J*, 2006, **25**(10): 2119-2130
- [21] Hsiao HH, Nath A, Lin CY, *et al.* Quantitative characterization of the interactions among c-myc transcriptional regulators FUSE, FBP, and FIR [J]. *Biochemistry*, 2010, **49**(22): 4620-4634
- [22] Levens D. How the c-myc promoter works and why it sometimes does not [J]. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2008, **39**(1): 41-43
- [23] Kusik BW, Hammond DR, Udvadia AJ. Transcriptional regulatory regions of gap43 needed in developing and regenerating retinal ganglion cells [J]. *Dev Dyn*, 2010, **239**(2): 482-495
- [24] Irwin N, Baekelandt V, Goritchenko L, *et al.* Identification of two proteins that bind to a pyrimidine-rich sequence in the 3'-untranslated region of GAP-43 mRNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**(6): 1281-1288
- [25] Wang W, Furneaux H, Cheng H, *et al.* HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, **20**(3): 760-769
- [26] Zheng Y, Miskimins WK. Far upstream element binding protein 1 activates translation of p27Kip1 mRNA through its internal ribosomal entry site [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, **43**(11): 1641-1648
- [27] Colombo E, Alcalay M, Pelicci PG. Nucleophosmin and its complex network: a possible therapeutic target in hematological diseases [J]. *Oncogene*, 2011, **30**(23): 2595-2609
- [28] Sportoletti P, Grisendi S, Majid SM, *et al.* Npm1 is a haploinsufficient suppressor of myeloid and lymphoid malignancies in the mouse [J]. *Blood*, 2008, **111**(7): 3859-3862
- [29] Olanich ME, Moss BL, Piwnicka-Worms D, *et al.* Identification of FUSE-binding protein 1 as a regulatory mRNA-binding protein that represses nucleophosmin translation [J]. *Oncogene*, 2011, **30**(1): 77-86
- [30] Zhang Z, Harris D, Pandey VN. The FUSE binding protein is a cellular factor required for efficient replication of hepatitis C virus [J]. *J Virol*, 2008, **82**(12): 5761-5773
- [31] Balvay L, Soto Rifo R, Ricci EP, *et al.* Structural and functional diversity of viral IRESes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, **1789**(9-10): 542-557
- [32] Huang PN, Lin JY, Locker N, *et al.* Far upstream element binding protein 1 binds the internal ribosomal entry site of enterovirus 71 and enhances viral translation and viral growth [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, **39**(22): 9633-9648
- [33] Li H, Wang Z, Zhou X, *et al.* Far upstream element-binding protein 1 and RNA secondary structure both mediate second-step splicing repression [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, **110**(29): E2687-2695
- [34] Jacob AG, Singh RK, Mohammad F, *et al.* The splicing factor FUBP1 is required for the efficient splicing of oncogene MDM2 pre-mRNA [J]. *J Biol Chem*, 2014, **289**(25): 17350-17364
- [35] Miro J, Laaref AM, Rofidal V, *et al.* FUBP1: a new protagonist in splicing regulation of the DMD gene [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, **43**(4): 2378-2389