

亲和沉降及质谱法分离和鉴定与 EGFR 3'UTR 结合的蛋白质

王大巾,丁明,吴业卿

(浙江理工大学生命科学学院,杭州 310018)

摘要: 随着后基因组学研究的逐步深入,非编码 RNA 成为生物学研究的热点之一,其中对 mRNA 非翻译区的功能研究也逐渐广泛。mRNA 非翻译区(UTR)的调控序列与一些蛋白质特异结合,对其自身 mRNA 命运进行调控。表皮生长因子受体(EGFR)是细胞信号转导的关键因子,其特异酪氨酸残基发生磷酸化,可招募诸如 Shc、Grb2、磷脂酶 C γ 和 Src 等信号蛋白,进而激活下游信号通路,研究证实 EGFR 与一些癌症的发生相关,因此探讨 EGFR 非翻译区对其 mRNA 的调控机制就显得尤为重要。运用亲和沉降及质谱,从 HeLa 细胞中分离到 3 种蛋白质与 EGFR 3' UTR 相结合:Ilf3、hnRNP A1 和 hnRNP A2/B1。这些蛋白质均为 RNA 结合蛋白并参与 mRNA 代谢。这为研究 EGFR 3' UTR 的调控机制提供了依据。

关键词: 非翻译区;亲和沉降;ILF3;质谱分析

中图分类号: Q513

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851 (2017) 02-0277-05

0 引言

信号通路中信号分子的突变可能导致细胞恶性增殖、细胞停止分化、代谢紊乱等,进而引发癌变。表皮生长因子受体(EGFR)是细胞信号转导的关键因子,在细胞信号传导中起重要的作用,通过介导胞外信号向胞内传递,激活下游信号因子,调控与细胞增殖、粘附及迁移等众多生理活动,并调控多种癌症的发生发生与发展^[1]。

mRNA 的 UTR 含有很多调控序列,如茎环结构,调控蛋白元件,内部核糖体进入位点(IRES),microRNA 作用靶位及富 AU 元件(AREs)^[2]。其中 3'UTR 参与调节 mRNA 的稳定,定位和翻译,3'UTR 被认为是许多基因表达所必需的一个调节区。Rebecca 等^[3]的研究发现肺癌和乳腺癌细胞中 EGFR 3'UTR 含 3 个 microRNA 作用的靶位点,引起 EGFR mRNA 及蛋白的下调。许多 mRNA 的 3'UTR 都包含 AREs,AREs 是哺乳细胞中最常见的稳定 RNA 的重要元件之一^[4]。蛋白质或蛋白质

复合物可与 mRNA 的 UTR 的调控元件结合并执行一定的生理功能,这些蛋白称为 RNA 结合蛋白(RBP),RBP 通过其 RNA 结合结构域(RBD)与 RNA 结合^[5]。通常,一种 RBP 含有一种以上 RBD。RBP 通过其 RBD 与 RNA 结合,参与调控 mRNA 的成熟^[6],mRNA 从细胞核向胞质的转运及定位^[7],mRNA 的翻译和 mRNA 的更新^[8]等。

本研究运用亲和沉降和质谱方法,在子宫颈癌细胞 HeLa 细胞中分离纯化结合于 EGFR 3' UTR 的蛋白质因子,初探 EGFR 3' UTR 在其 mRNA 代谢(如转录、编辑、加工、运输、细胞内定位、稳定和降解等)方面的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

子宫颈癌细胞 HeLa 为本实验室保存;MBP-MS2 基因片段由丁明提供;MEM 培养液(Gibco 公司);胎牛血清(Gibco 公司);IPTG(Sigma 公司);HEPES (Amresco 公司);粉树脂(New

England BioLabs 公司); 镍柱填料 (GE Healthcare 公司); MEGAscript® T7 体外转录试剂盒 (Applied Biosystems 公司); LB 培养基、MOPS、DEPC、Tris-base、麦芽糖、咪唑和 PMSF (Sigma-Aldrich 公司); ab50832 兔抗人多克隆抗体 (Abcam 公司); ab6721 山羊抗兔 IgG (Abcam 公司)。

1.2 方法

1.2.1 载体构建及蛋白表达纯化

PCR 扩增获得 MBP-MS2 基因, 目的产物回收后, 经 Hind III 和 Nde I 双酶切克隆到载体 pET-28(a) 中, PCR 筛选鉴定阳性克隆。并将 pET-28(a)-MBP-MS2 质粒转化感受态细胞 BL21 中。挑取单克隆, 1:100 转接, 至菌液吸光度 OD_{600} 为 0.6~0.8, 加入终浓度 0.5 mmol/L IPTG 诱导 4 h; 离心, 收集菌体。直链淀粉树脂结合缓冲液重悬, 超声波破碎, 12000 r/min 离心 30 min, 重复一次, 上清备用。

镍柱纯化: 装柱和平衡, 将上述上清液加入镍柱, 经结合、洗涤、洗脱, 依次收集洗涤流出液、洗脱流出液。直链淀粉树脂亲和纯化: 装柱和平衡, 将镍柱洗脱蛋白上柱子, 经结合、洗涤、洗脱, 依次收集洗涤流出液、洗脱流出液, SDS-PAGE 检测纯化结果。

1.2.2 直链淀粉树脂-MBP-MS2-EGFR 3'UTR beads 的制备

Bradford 法测定 MBP-MS2 融合蛋白含量。按照 1 mL 直链淀粉树脂最多能承载 3 mg MBP-MS2 融合蛋白, 直链淀粉树脂装柱, 洗涤和平衡, 将镍柱洗脱蛋白与直链淀粉树脂柱再结合, HEPES 缓冲液 (DEPC 处理) 洗涤柱子, 保存备用。

EGFR 3'UTR 体外转录: 使用 T7 体外转录试剂盒, 总体系 20 μ L, 无 RNA 酶的水 7 μ L, A/U/G/CTP 各 2 μ L, 10 \times 反应缓冲液 2 μ L, T7-EGFR 3'UTR 2 μ L, RNA 聚合酶 1 μ L, 37 $^{\circ}$ C, 反应 3 h, 甲醛变性凝胶电泳检测纯度。

直链淀粉树脂-MBP-MS2-EGFR 3'UTR beads 的制备: 将一个反应 (20 μ L) 的体外转录物 (EGFR 3'UTR) 与 200 μ L 直链淀粉树脂-MBP-MS2 beads 于 4 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 甲醛变性凝胶电泳检测 EGFR 3'UTR 与直链淀粉树脂-MBP-MS2 beads 的结合效率。

1.2.3 与 EGFR 3'UTR 特异结合的蛋白质的分离与鉴定

HeLa 细胞裂解液制备: 细胞长满 80%, 离心去除倒掉上清液, 磷酸盐缓冲液 (DEPC 处理) 洗涤 3 次, 刮下细胞, 超声波破碎, 12000 r/min 离心 30 min, 重复一次, 上清备用。

亲和沉降: 以未加任何转录物的 200 μ L 直链淀粉树脂-MBP-MS2 beads 为对照组, 以直链淀粉树脂-MBP-MS2-EGFR 3'UTR beads 为实验组, 取 10 mL HeLa 细胞裂解液上清与两组 beads 于 4 $^{\circ}$ C 孵育 2 h; 用 10 mL HEPES 缓冲液 (DEPC 处理) 洗涤; 加入 100 μ L HEPES 缓冲液 (DEPC 处理) 和 0.1 μ L RNase A 进行孵育, 离心, 转移上清于离心管。将该上清制样, 进行 SDS-PAGE, 银染。扫描并取胶点保存。

酶解及质谱鉴定: 使用宜于 MALDI-TOF/TOF 质谱仪检测的方法进行胶内酶解^[9], 取样品与基质各 0.3 μ L 点靶, load 进入 MALDI-TOF/TOF 质谱仪进行鉴定。反射模式下, 六个外标进行校准, 5 ppm 质量精确度内, 0.05 Da 质量偏差内, m/z 范围为 800~4000 Da。经 Swiss-Prot 数据库搜索, Mascot 搜索结果 $p < 0.05$ 确认。

Western blot 验证: 上样, 进行 SDS-PAGE, 于 4 $^{\circ}$ C, 电压 100 V, 电流 400 mA, 转膜 2 h。5% 脱脂奶粉封闭, 室温 1 h。弃去封闭液, 用 ddH₂O 洗涤 3 次。加入一抗, 4 $^{\circ}$ C, 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次, 加入二抗, 室温 2 h。TBST 洗涤 3 次。ECL 底物均匀覆盖膜表面。暗室内显影。实验在相同条件下重复 3 次。

2 实验结果

2.1 MBP-MS2 的制备

融合蛋白 MBP-MS2 带有 6His 能结合于 Ni-NTA。MBP (麦芽糖结合蛋白) 可用直链淀粉树脂进行纯化^[10]。BL21-pET-28(a)-MBP-MS2 细胞裂解液经镍柱和直链淀粉树脂纯化, 获得分子量约为 50 kDa 的 MBP-MS2 融合蛋白 (图 1)。

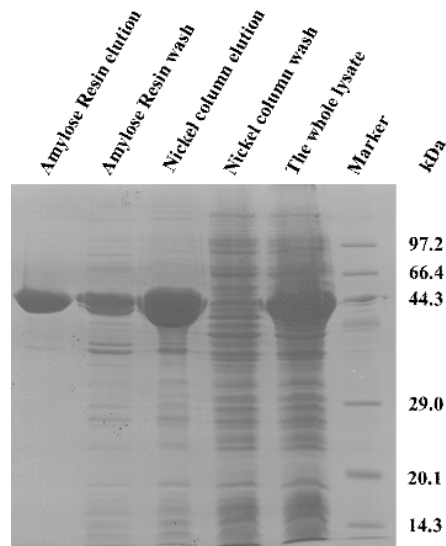


图1 融合蛋白 MBP-MS2 纯化结果

2.2 直链淀粉树脂-MBP-MS2 beads 的制备

MS2 为噬菌体外壳蛋白,可与 RNA 的发夹结构结合。EGFR 3'UTR 含有发夹结构(图 2(a)),因此可与 MS2 结合,进而形成直链淀粉树脂-MBP-MS2-EGFR 3'UTR 克隆。为检测 EGFR 3'UTR 与直链淀粉树脂-MBP-MS2 的结合效率,体外转录获得 EGFR 3'UTR 的 RNA 与对 MS2 孵育后产物,进行甲醛变性凝胶电泳如(图 2(b)),结果显示孵育后与孵育前相比,在相应位置没有条带,表明 EGFR 3'UTR 已结合于直链淀粉树脂-MBP-MS2 柱上。

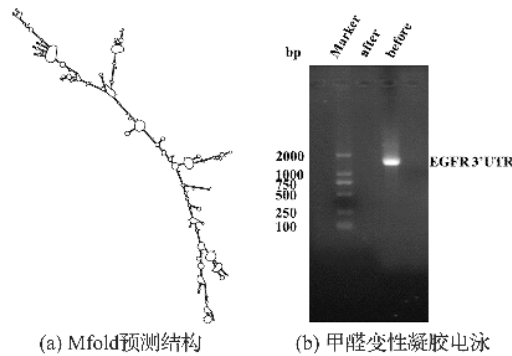


图 2 EGFR 3'UTR 二级结构预测及其与 Amylose Resin-MBP-MS2 结合

2.3 与 EGFR 3'UTR 特异结合的蛋白质的筛选与鉴定
为筛选与 EGFR 3'UTR 结合的蛋白质,采用亲和沉降法,将 EGFR 3'UTR 通过 MS2 固定于直链

淀粉树脂上,通过与 HeLa 细胞裂解液孵育,洗涤未结合,RNase A 消化 EGFR 3' UTR,进而分离得到与其结合的蛋白质(图 3(a))。通过 SDS-PAGE,银染,比较对照组和实验组,差异条带由质谱鉴定,共鉴定出 3 种蛋白(表 1)。免疫印迹实验进一步验证(图 3(b)) Ilf3 与 EGFR 3'UTR 的结合。

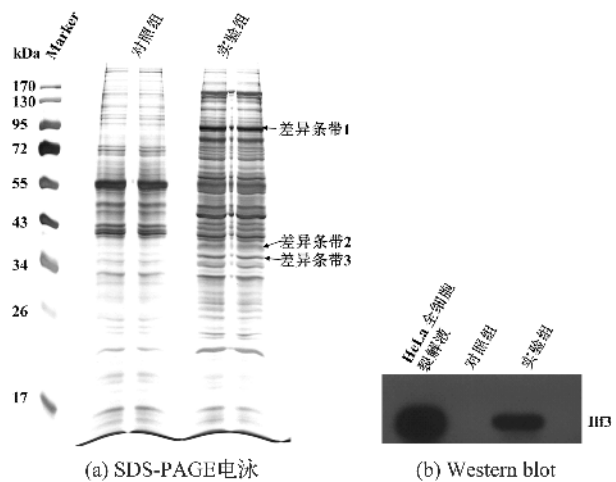


图 3 亲和纯化及免疫印迹实验结果

注:对照组:无 EGFR 3'UTR 的 Amylose resin-MBP-MS2 beads,实验组:EGFR 3'UTR 与 Amylose resin-MBP-MS2 beads;一抗:Anti-Ilf3 抗体,稀释比例 1/2500;二抗:Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP),稀释比例 1/5000。

表 1 质谱鉴定结果

名称 ^①	蛋白名称	Accession No.	理论 Mr/pI	Mascot 得分 ^②
差异条带 1	白细胞介素增强结合因子 3(Ilf3)	gi 62512150	95279.1/8.86	64
差异条带 2	不均一核糖核蛋白 A1(hnRNP A1)	gi 133254	38822.1/9.26	93
差异条带 3	不均一核糖核蛋白 A2/B1(hnRNP A2/B1)	gi 133257	37406.7/8.97	55

注:①图 6 A 中差异条带编号,②Mascot 得分由 GPS Explorer™ software (Version 3.5) 获得,Mascot 得分 > 53 被认为可信($p < 0.05$)^[9]。

3 讨 论

运用亲和沉降和 MALDI-TOF/TOF,鉴定出 3 种与 EGFR 3'UTR 结合的蛋白质,分别为 Ilf3、hnRNP A1 和 hnRNP A2/B1。人 Ilf3 经选择性剪接和翻译后修饰产生多种 Ilf3 亚型,多种亚型赋予其多种功能。Ilf3 作为 RNA 结合蛋白^[11],可与蛋白质、dsRNA、小非编码 RNA 或 mRNA 形成复合物,调控基因表达或维持 mRNA 稳定^[12]。Ilf3/NF90 可与 mRNA 3'UTR 的 AREs 结合,进而引起依赖于 AREs 结合蛋白的 mRNA 降解或保持稳定^[13]。Ilf3/NF90 还可与 HuR、hnRNP L 等 RBPs 协同,与人血管表皮生长因子 3'UTR mRNA 稳定

元件(富 AU 颈环结构)结合,对低氧依赖的 mRNA 稳定性发挥作用^[14]。

HnRNP A1 和 hnRNP A2/B1 均为 hnRNP 家族成员,为 RNA 结合蛋白。在细胞质内,hnRNPs 可以调控 mRNA 定位,翻译和稳定^[15]。另外,hnRNPs 蛋白含有至少一种 RBD,可与 mRNA 3'UTR 区域的 AREs 结合,参与介导细胞因子及原癌基因 mRNA 的降解^[16]。另外,部分 hnRNPs 可与 c-Myc 的 IRES 序列结合,参与癌基因 mRNA 的稳定及剪接,调控与癌症相关的增殖^[17]。HnRNP A1 是 hnRNP 蛋白复合物的核心蛋白,其 M9 结构域作为核定位序列和核输出信号,可与其他 hnRNP

蛋白协作,参与 mRNA 出核;hnRNP A1 还参与前体 mRNA 包装及亚细胞定位。Monette 等^[18]的研究表明 hnRNP A1 可促进 IRES 介导的 HIV-1 型病毒 RNA 翻译。Clower 等^[19]的研究证实 hnRNP A1 抑制丙酮酸激酶 M1 和 M2 的剪接。还有研究指出 hnRNP A1 能够解开 RNA 的发夹结构,与 RNA 竞争结合。HnRNP A1 与富 Ser/Arg 蛋白质通过竞争而抑制 3' 剪接位点剪接^[20]。HnRNP A2/B1 是第三种 hnRNP A/B 型蛋白质,是形成 hnRNP 颗粒的主要成分。另有研究证实 hnRNP A2/B1 与 RNA 的 UUAGGG 序列有很高的亲和力。细胞质中 hnRNP A2/B1 表达量增加,可作为评估患肝细胞癌(HCC)风险的诊断标记,hnRNP A2/B1 参与调节剪接活性,mRNA 稳定和翻译^[21-22]。

已有研究表明,Ilf3、hnRNP A1 和 hnRNP A2/B1 均为 RNA 结合蛋白,通过与 RNA 结合,发挥一定的生物学功能。Alexandre 等运用蛋白质组学方法研究 Ilf3 功能时,鉴定出五种 hnRNP 家族蛋白和一个剪切因子,其中包括 hnRNP A2/B1,暗示 Ilf3 在 RNA 代谢中的作用^[12]。因此,通过亲和沉降和质谱筛选和鉴定出的蛋白质,其结合形式是值得进一步研究的。近年来的研究表明,hnRNPs 在癌症发生发展中的重要作用,如 hnRNP A1 等参与的 mRNA 剪接失误将导致多种癌症^[23],鉴于 hnRNPs 通过调控 mRNA 代谢,进而在抑制细胞凋亡,血管生成,细胞分裂和上皮-间质转化等方面发挥重要作用。因此,在肿瘤治疗和预后方面,hnRNP 可能作为一个新的、有潜质的治疗靶点和标志物^[24]。EGFR 3'UTR 的调控序列可招募 RBPs (Ilf3、hnRNP A1 和 hnRNP A2/B1 等),可能参与调控 EGFR mRNA 或其蛋白质的生物学功能。

参考文献:

- [1] YARDEN Y. The EGFR family and its ligands in human cancer signaling mechanisms and therapeutic opportunities [J]. *European Journal of Cancer*, 2001, 37 (9): 3-8.
- [2] WILKIE G S, DICKSON K S. Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR binding factors [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2003, 28(4): 182-188.
- [3] WEBSTER R J, GILES K M, PRICE K J, et al. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling in human cancer cells by MicroRNA-7 [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 284(9): 5731-5741.
- [4] CHEN C Y, SHYU A B. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation [J]. *Trends in Biochemical Science*, 1995, 20(11): 465-470.
- [5] VIVEK A, KOONIN EV, ARAVIND L. Comparative genomics and evolution of proteins involved in RNA metabolism [J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(7): 1427-1464.
- [6] MARTINEZ N M, WANG G S, COOPER T A. Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation [J]. *Molecular Cell*, 2007, 28(1): 68-78.
- [7] GONSALVEZ GB, URBINATI CR, LONG RM. RNA localization in yeast: moving towards a mechanism [J]. *Biology Cell*, 2005, 97(1): 75-86.
- [8] BRENNAN C M, STEITZ J A. HuR and mRNA stability [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2001, 58(2): 266-277.
- [9] LIN J G, TIAN H, GAO X. A proteomic method for core needle biopsy sample characterization [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 24 (3): 221-230.
- [10] BATEY R T, KIEFT J S. Improved native affinity purification of RNA [J]. *RNA*, 2007, 13 (8): 1384-1389.
- [11] LARCHER J C, GASMI L, VIRANAICKEN W, et al. Ilf3 and NF90 associate with the axonal targeting element of Tau mRNA [J]. *FASEB Journal*, 2004, 18 (14): 1761-1763.
- [12] CHAUMET A, CASTELLA S, GASMI L, et al. Proteomic analysis of interleukin enhancer binding factor 3 (Ilf3) and nuclear factor 90 (NF90) interactome [J]. *Biochimie*, 2013, 95(6): 1146-1157.
- [13] CASTELLA S, BERNARD R, CORNO M, et al. Ilf3 and NF90 functions in RNA biology [J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2014, 6(2): 243-256.
- [14] VUMBACA F, PHOENIX K N, RODRIGUEZ-PINTO D, et al. Double-stranded RNA-binding protein regulates vascular endothelial growth factor mRNA stability, translation, and breast cancer angiogenesis [J]. *Molecular Cell Biology*, 2008, 28(2): 772-783.
- [15] SHYU A B, WILKINSON M F. The double lives of shuttling mRNA binding proteins [J]. *Cell*, 2000, 102 (2): 135-138.
- [16] CARPENTER B, MACKAY C, ALNABULSI A, et al. The roles of heterogeneous nuclear

- ribonucleoproteins in tumour development and progression [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, 1765(2):85-100.
- [17] DAVID C J, CHEN M, ASSANAH M, et al. HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer [J]. *Nature*, 2010, 463(7279):364-368.
- [18] MONETTE A, AJAMIAN L, LÓPEZ-LASTRA M, et al. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) induces the cytoplasmic retention of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 by disrupting nuclear import: implications for HIV-1 gene expression [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(45):31350-31362.
- [19] CLOWER CV, CHATTERJEE D, WANG Z. The alternative splicing repressors hnRNP A1/A2 and PTB influence pyruvate kinase isoform expression and cell metabolism [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(5):1894-1899.
- [20] OKUNOLA H L, KRAINER A R. Cooperative-binding and splicing-repressive properties of hnRNP A1 [J]. *Molecular & Cellular Biology*, 2009, 29(20):5620-5631.
- [21] MCKAY S J, COOKE H. HnRNP A2/B1 binds specifically to single stranded vertebrate telomeric repeat TTAGGGn [J]. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20(24):6461-6464.
- [22] WHITE R, GONSIOR C, KR? MER-ALBERS E M, et al. Activation of oligodendroglial Fyn kinase enhances translation of mRNAs transported in hnRNP A2-dependent RNA granules [J]. *Journal of Cell Biology*, 2008, 181(4):579-586.
- [23] BUSCH A, HERTEL K J. Evolution of SR protein and hnRNP splicing regulatory factors [J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews-RNA*, 2012, 3(1):1-12.
- [24] HAN N, LI W, ZHANG M. The function of the RNA-binding protein hnRNP in cancer metastasis [J]. *Journal of Cancer Research Therapeutics*, 2013, 9(7):129-134.

Isolation and Identification of Proteins Bonded to EGFR 3'UTR by Affinity Pull-down and Mass Spectrometry

WANG Dajin, Ding Ming, WU Yeqing

(College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: With the development of post-genomics, non-coding RNA has become one of the biological research hotspots. Researches about the function of mRNA untranslated region (UTR) are increasingly widespread. The regulatory sequence of mRNA UTR is bonded to some proteins to regulate mRNA fate. Epidermal growth factor receptor (EGFR) is the key factor in cell signal transduction. Phosphorylation of EGFR specific tyrosine residues can recruit specific signal proteins, such as Shc, Grb2, Phospholipase C gamma and Src, and then activate the downstream signal channel. The previous research confirmed that EGFR is associated with the occurrence of some cancers, so it is very important to investigate the regulatory mechanism of EGFR UTR on its mRNA regulation. Affinity pull-down and mass spectrometry technology were used to isolate and identify three kinds of proteins from HeLa cell lysate to interact with EGFR 3'UTR: Ilf3, hnRNP A1 and hnRNP A2/B1. These are all RNA binding proteins and participate in the metabolism of mRNA. The findings in our study may provide references to further investigate the regulatory mechanism of EGFR 3'UTR.

Key words: Untranslated region; affinity pull-down; ILF3; mass spectrometry

(责任编辑: 许惠儿)