

使用基于SPR的动力学分析阐明RNA结合蛋白的功能机制

- 蛋白-RNA相互作用的新视角
- 利用速率常数研究动态生物分子相互作用
- U1A与RNA结合的两步推想

摘要

多数RNA分子在功能上依赖于它们和一系列有着不同RNA结合位点的蛋白的相互作用。这些相互作用在本质上是高度动态化的，其结合和解离的动态平衡对于相关RNA结合蛋白的功能起着关键作用。Biacore所利用的表面等离子共振技术(SPR)非常适用于进行生物大分子之间相互作用的复杂动力学分析，因此被用于深入研究关键RNA结合蛋白的功能机制。在本实验中，研究者用基于SPR的动力学分析方法研究了神经元特异性的RNA结合蛋白HuD、剪接体蛋白U1A和它们的靶RNA的相互作用。从个体速度常数上看，本研究为RNA/蛋白的相互作用提供了全新的重要发现。除了极大程度上方便了这两个重要RNA结合蛋白其功能机制的理解外，该研究也清晰地论证了对于这类复杂的生物大分子的相互作用来说，仅仅进行基于稳态作用的简单亲和力分析是不够的。

引言

新生RNA链在转录过程中生成的同时，RNA分子和特异性结合蛋白的相互作用也迅速开始。在此过程中，一系列不同的蛋白与RNA结合和解离，这些蛋白和RNA的协同转录及转录滞后有关，比如被运输到细胞质以维持RNA稳定翻译的拼接过程[1]。这些相互作用高度动态化，并且在RNA的处理过程中，对各个步骤的调节起着指导性的作用。

基于以上考虑，显而易见任何对这些复杂作用的了解都需要先对这些个性化的蛋白-RNA相互作用的动力学结合特性进行了解。然而时至今日，多数对于RNA结合蛋白的研究都仅仅停留在测定稳态水平的技术层面上(如电泳泳动性和过滤结合实验)。尽管在许多场合，基于亲和力的研究数据是有价值的，但这些数据未曾涉及到RNA-蛋白相互作用的真正核心问题即动力学。所以，我们需要进行深入的动力学分析以获得个体化的结合速率常数(k_a)和解离速率常数(k_d)。

以下研究来自Dr. Ite Laird-Offringa和他的工作小组[2-5]，介绍了Biacore的SPR技术如何用于提供详细的关于RNA结合蛋白和它们的特定靶RNA相互作用

的动力学数据，以及这些数据能够怎样地对其功能提供重要的依据。研究表明：神经元蛋白HuD和RNA的结合需要三个不同的RNA结合区域的活化[2]；剪接体蛋白U1A和其靶RNA的结合作用是通过一个两步的反应机制[3]；除了发现这些重要的研究成果，研究者还使用Biacore对RNA-蛋白的结合条件作了优化选择，并提供了相应的技术信息。

方法

读者可以在参考文献2和3中找到关于HuD和U1A的详细实验步骤和数据分析方法。下面将列出使用Biacore对RNA结合蛋白进行研究的实验设计方面的一些要点。如果希望得到更深入的细节，请读者参阅参考文献4，这是一篇在较宽泛的范围内对这一领域进行探讨的文章。

偶联分子的选择

在RNA-蛋白的结合研究中，常把核酸分子偶联至芯片上。理由之一是RNA能够方便地被化学合成，并在末端进行生物学标记，这样就能和一种商品化的传感芯片SA进行偶联，见图1A。

另一种在传感芯片表面捕获RNA分子的策略是：将RNA退火使之和一段已通过生物素基团和芯片偶联的单链DNA形成双链结构。该方法通过从质粒中得到克隆位点序列，并延伸RNA，在一端连上了一段核苷酸，这段核苷酸的序列和已偶联至传感芯片上的DNA分子序列互补。关于该偶联RNA的方法见图1B。

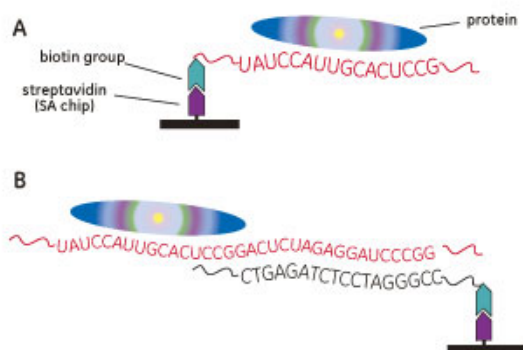


图1: 在传感芯片表面捕获RNA分子的策略

A RNA通过5'端的生物素标记，以直接偶联的方式与SA芯片表面连接。

B 先偶联一段生物素标记的单链DNA至SA芯片上，一段和其互补的核苷酸序列结合于目标RNA的3'端，进行退火反应即可将两者形成局部的双链结构，并为接下来的相互作用留出蛋白的结合区域，RNA序列以红色显示，DNA序列以黑色显示。

DNA的偶联

正如所有的Biacore实验一样，最优化的偶联水平由分析物的大小和所需实验数据的种类共同决定。

一般来说，结合力较强的蛋白结合物和较弱的蛋白结合物其对应的RNA偶联密度分别为25-30 RU (最大结合信号) 和 100-125 RU[2, 3]

将生物素标记的RNA分子以 $1\mu\text{M}$ 的浓度溶于实验缓冲液中(10 mM Tris- HCl, pH 8, 150 mM NaCl)，然后通过一系列10-20 μl 进样体积的样品注射进行偶联，直到达到预期的偶联水平。

如果使用了未被生物素标记的RNA，一条被生物素标记的、约含20个核苷酸的单链互补DNA被事先结合于芯片表面，结合水平约为60 RU。然后以一个低流速(2 $\mu\text{l}/\text{min}$)注射RNA样品(0.5 μM 溶于1M NaCl)。进行退火反应使RNA和DNA的序列互补区域生成双链结构。

结果

三色揭示了在HuD和富含AU的RNA的结合过程中的多重RNA识别作用。

在已知的4种Hu蛋白中，有3种能在神经细胞中特异性表达，并且被认为参与了神经细胞特异性的转录后基因调控。这些功能可能包括了Hu蛋白对于mRNA稳定性的影响。而与这些蛋白结合的富含AU的序列常常在不稳定的mRNA的3' 端未翻译区域被发现，就像在生长因子基因中发现的那样。

HuD 包括了3个保守的RNA识别基序(RRMs)。用部分纯化的靶RNA进行稳态分析表明，只有其中的2个RRMs是结合必须的。然而，通过使用短链富含AU的靶RNA寡核苷酸序列进行SPR研究，却得出了一个完全不同的结果[2]。

这些RNA通过退火，部分地与偶联在传感芯片上的生物素标记DNA形成双链结构。使用Biacore X对除去了每个RRM的HuD分别进行分析。实验结果表明，所有3个RNA结合区域对形成一个稳定的RNA/蛋白质复合物都非常重要。(图2)





Mutations of HuD	Affinity	Association	Dissociation
	wt	wt	wt
	↓ 2000 X	↓ 20 X	↑ 100 X
	↓ 13.5 X	↑ 2.5 X	↑ 35 X
	↓ 3.5 X	↑ 4 X	↑ 14 X

图2: 不同RRM位点的去除对HuD/RNA结合的亲和力和动力学特性的影响

野生型中的3个RNA识别基序分别以数字表示，每步去除的基序以X表示。在表格中列出了亲和力和结合/解离速率常数的大致改变。“wt”表示使用野生型得到的对照数值)

之前的亲和力分析数据显示: RRM1是RNA结合的主要区域，RRM2作用较小，而去除RRM3对于亲和力分析几乎没什么影响。这些稳态的分析掩盖了RNA结合位点真正主要的动力学作用。特别地，如果除去RRM2或RRM3中的任一者，其解离速率常数(kd)都会有很大程度的增加(即导致蛋白-RNA复合物的不稳定性增加)。然而由于它们的缺失同样会导致结合速率常数(ka)的增加，因此这些动力学的影响在亲和力的分析中就被掩盖了起来(图2)。而对于RRM1来说，由于其缺失同时导致了结合速率常数的下降和解离速率常数的上升，则在亲和力分析中得到了一个非常清晰的作用，即RRM1能阻碍蛋白-RNA复合物的生成。

以上结果表明: RRM2和RRM3，特别是RRM3，虽然对整体反应的亲和力分析没有太大的影响，但对动力学分析却有着非常重要的影响。它们是RNA结合蛋白在体内执行功能的重要组成部分。功能学研究同样表明缺失了RRM2或3的Hu蛋白将缺失生物学功能。

动力学分析揭示了U1A和其靶RNA的结合是通过2个步骤的机制

U1A是一种剪接体蛋白质，能特异性地和小型核蛋白RNA(U1hplII)的茎环结构发生结合。尽管U1A包含了2个RRM的区域，先前的研究表明只有N端的RRM参与了它和U1hplII的结合过程。虽然目前已获得了一些结构学和生化上的数据，但该系统的动力学(即反应机制)研究仍处于空白状态。

在U1A/U1hplII的晶体结构上设计了U1A和其靶RNA的突变型后，Katsamba等[3]使用基于SPR的动力学分析技术提出了一个全新的，分两个阶段结合的反应机制。利用Biacore2000和Biacore3000，将生物素标记的野生型和点突变的U1hplII RNA偶联于传感芯片上，通过和一系列浓度U1A的结合，包括目标氨基的替代作用进行动力学分析。

野生型的U1A和U1hplII的结合亲和力在pM水平(与先前的研究一致)，动力学分析表明这种相互作用来源于较快的结合速度($k_a = 1.1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)和较

表1.在U1A和U1AhpII结合中，赖氨酸-丙氨酸替代产生的动力学和亲和力影响

protein	affinity	association rate	dissociation rate
wt I1A	$K_D=32\text{pM}$	$K_a=1.1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$K_d=3.6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
Lys20,22Ala	↓39 X	↓9.8 X	↑1.5 X
Lys50Ala	↓16 X	↓10 X	↑3.9 X

野生型U1A和U1AhpII的平衡解离和结合/解离速率常数，相关突变型U1A和U1AhpII的亲和力、结合和解离变化

带正电荷的赖氨酸位点在U1A和靶RNA结合的过程中所起的作用表明在此过程中有静电作用参与，因此可以猜测离子微环境对结合有着重要影响。如表2所列，提高结合缓冲液中的NaCl浓度，由150mM上升至500mM，对应的U1A/U1hplII相互作用的亲和力将会减少超过100倍。对个体速率常数的检测表明，这种影响主要由于赖氨酸突变的U1A的结合速率降低而导致。尽管和猜测的一样，离子浓度的慢的解离速度($k_d = 3.6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$)。由于结合速度预示了U1A和其带负电荷的靶RNA间的静电作用，因此对靠近RNA结合区域的基本氨基酸的作用进行了研究。U1A/U1hplII的晶体结构被用来选择适于定

位的带正电荷的位点，但这些基团和氢键结合的相互作用无关。3个保守的赖氨酸位点(20, 22 & 50)因此被定位用于发生丙氨酸取代，生成Lys20,22Ala(双位点突变)和Lys50Ala(单位点突变)的U1A蛋白。动力学分析表明，和野生型相比，这两种突变型都体现了明显的亲和力缺失，这主要是因为结合速率的降低(表1)。研究数据还表明对于Lys20,22Ala U1A来说，其解离速率有一定程度的上升，而相对来说，Lys50突变体的解离速率的上升程度较少。综合以上分析可以得出：尽管Lys20/Lys22对维持复合物的稳定性也起着一定作用，但无疑这3个赖氨酸位点对于促进RNA和蛋白结合起着更为重要的作用。

增强同样降低了结合速率(每个对象包括了完整的保守氨基酸位点)，但值得注意的是，相比野生型蛋白，这种下降程度更小。因此，突变型和离子浓度的动力学分析数据确认了如下事实：即U1A/U1hplII复合物中，靠近RNA结合位点的3个赖氨酸位点对最初的结合起着重要作用，这种作用主要由于静电相互作用的参与。

表2. 盐离子浓度的增长对于野生型和突变型U1A的动力学和亲和力的影响

protein	affinity (500 mM NaCl)	association rate (500 mM NaCl)	dissociation rate (500 mM NaCl)
wt I1A	↓132 X	↓59 X	↑2.2 X
Lys20,22Ala	↓108 X	↓14 X	↑7.6 X
Lys50Ala	↓136 X	↓19 X	↑7.3 X

500 mM NaCl的浓度相对于标准结合缓冲液的150 mM NaCl浓度，在结合蛋白量相同时，动力学和亲和力的变化比较

在研究过程中，研究者还对用来研究U1A/U1hplII复合物稳定性的U1A蛋白和RNA突变体的本身进行了动力学分析。结构分析发现了RNA环上底部的一个特殊位置(A6)，该位置上堆叠了U1A的第56个氨基酸Phe。这使蛋白结构进行了重新组合，以通过诱导适应稳定RNA和蛋白的结合。将该Phe突变后，生成的U1A Phe56Ala突变子的亲和力相比野生型会有6600倍的下降(表3)。当对个体速率常数进行分析的时候，其显著的亲和力变化完全由于解离速率的增长(1400倍，相比而言结合速率只下降了不到5倍)。如果在U1hplII的RNA环上的第4位G突变为C(在RNA/蛋白的接触面生成氢键)，相比和野生型的

U1A的结合，其亲和力和动力学效应是非常相似的（解离速率增长2500倍，结合速率下降3.5倍）。以上数据确认了芳香族堆叠作用和氢键对RNA/蛋白复合物的稳定性起着重要作用，并且包括了RNA/蛋白表面的氨基酸和核苷酸位点。基于自由U1A和蛋白/RNA复合体的结构比较，通过诱导适应的作用，这些相近范围的相互作用将会发生。

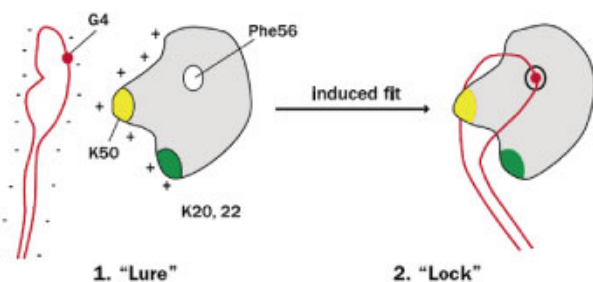
表3. U1A/U1hplII复合体的蛋白/RNA连接处突变型的动力学和亲和力分析

mutation	affinity	association rate	dissociation rate
Phe56Ala	↓6600 X	↓4.7 X	↑1400 X
U1hplII G4C	↓8700 X	↓3.5 X	↑2500 X

Phe56Ala 和 U1hplII G4C 分别是文中提到的 U1A 和 RNA 的突变型。通过SPR检测获得的亲和力和动力学的数据表明了它们相对于全野生型U1A/U1hplII结合的变化趋势

上述SPR的动力学分析第一次显示了U1A和U1hplII的结合是一个分两步的作用。而且，高分辨率的数据说明了蛋白和RNA相关的特异性位点参与了最初的结合阶段和接下来的诱导适应稳定性阶段。这使得作者能够提出一个“诱导和封闭”的结合机制，该机制包括了两个不同的步骤。这两个步骤分别由静电相互作用和芳香族堆叠/氢键结合力所控制(图3)。

图3.对于U1A和U1hplII RNA结合的两步骤“诱导和封闭”模型



在第一个步骤中，通过静电相互作用，在带负电的RNA磷酸盐骨架和带正电的氨基酸位点间产生快速的结合作用，使RNA和蛋白结合。赖氨酸位点在此步骤中起主要作用(K20, 22 和 K50)。在该模型的第二个步骤中，在RNA和蛋白相互诱导适应过程中生成的相近范围的堆叠和氢键结合封闭其结合位置使之成为一个稳定的复合物。U1hplII上的第4位核苷酸G和U1A上的第56个氨基酸Phe在此过程中起重要作用。

结论

以上对于RNA结合蛋白机制的研究，包括HuD和U1A，为研究生物分子的动态相互作用提供了重要且细致的动力学分析方法。

在关于HuD的分析例子中，先前基于稳态分析模型研究中被“隐藏”的个体化RRM的作用完全被展示了出来。实验表明它们在整体的结合作用中有着重要的动力学分析意义。由于很多RNA结合蛋白都包含了多重的RRM区域，因此关于HuD的研究可能对如何研究这类蛋白的作用方式提出了一个通用的模型。

对于U1A和其靶RNA的结合分析揭示了一个之前未知的两步结合机制。相关的分析数据还被用来鉴定了两个步骤中的关键性氨基酸和核苷酸，并为其中的结合力提供了证据。这个模型也可能被广泛应用，因为对于许多其他的RNA结合蛋白，在它们的结合位点附近同样分布着一些保守的氨基酸位点。在这篇文章所提到的两个研究例子中，都获得了一些全新且重要的蛋白-RNA的作用机制。这些研究结果主要依赖于Biacore的SPR技术提供了高质量的动力学分析数据。作者认为Biacore特别适用于将来在相关领域的研究[4]。除了得到更多蛋白和RNA的重要生物学作用信息外，动力学分析方法同样能被用于相关治疗领域小分子抑制剂的设计。

参考文献

- Burd, G.C. and Dreyfuss, G. Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* 265: 615-21 (1994)
- Park, S., Myszka, D.G., Yu, M., Littler, S.J. and Laird-Offringa, I.A. HuD RNA recognition motifs play distinctive roles in the formation of a stable complex with AU-rich RNA. *Mol Cell Biol* 20: 4765-72 (2000)
- Katsamba, P.S., Myszka, D.G. and Laird-Offringa, I.A. Two functionally distinct steps mediate high affinity binding of U1A protein to U1 hairpin II RNA. *Biol Chem* 276: 21476-81 (2001)
- Katsamba, P.S., Park, S. and Laird-Offringa, I.A. Kinetic studies of RNA-protein interactions using surface plasmon resonance. *Methods* 26: 95-104 (2002)
- Katsamba, P.S., Bayramyan, M., Haworth, I.S., Myszka, D.G. and Laird-Offringa, I.A. Complex role of the b2-b3 loop in the interaction of U1A with U1 hairpin II RNA. *J Biol Chem* 277: 33267-74 (2002)