

# 5S rRNA 互作蛋白组研究揭示 5S rRNA 参与 mRNA 剪接调控\*

周祥明<sup>1</sup>, 杨兵<sup>2</sup>, 赖巧<sup>2</sup>, 李乐<sup>1</sup>, 董军<sup>1</sup>, 廖建友<sup>2</sup>, 朱爽<sup>1</sup>

(1. 广东药科大学生命科学与生物制药学院, 广东 广州 511400;

2. 中山大学孙逸仙纪念医院, 广东 广州 510030)

**摘要:** 为系统揭示 5S rRNA 调控细胞进程的新功能和分子机制, 合成了生物素标记探针, 利用分子杂交技术特异捕获 5S rRBP, 并结合高灵敏度质谱技术和生物信息学分析共鉴定出 162 个 5S rRNA 互作蛋白。基于 ConsensusPathDB 和 STRING 数据库获取蛋白复合体富集信息和构建蛋白与蛋白互作网络, 利用 GO 数据库获取互作蛋白的功能注释, 利用 KEGG 数据库进行通路富集分析。分析结果显示 5S rRNA 除了与翻译相关蛋白发生互作外, 还与大量来自 microRNA 加工通路、mRNA 剪接通路和细胞信号调控通路蛋白有互作。这说明 5S rRNA 除了具有蛋白质翻译调控功能外, 还参与 mRNA 剪接等过程的调控, 为 5S rRNA 功能和调控机制研究指明了一个新的方向。

**关键词:** 5S rRNA; ChIRP-MS; 互作蛋白组; mRNA 剪接

**中图分类号:** Q71 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2019) 03-0054-09

## 5S rRNA interactome reveals that 5S rRNA is involved in mRNA splicing regulation

ZHOU Xiangming<sup>1</sup>, YANG Bing<sup>2</sup>, LAI Qiao<sup>2</sup>, LI Le<sup>1</sup>, DONG Jun<sup>1</sup>, LIAO Jianyou<sup>2</sup>, ZHU Shuang<sup>1</sup>

(1. School of Life Sciences and Biopharmaceutics,

Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 511400, China;

2. Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510030, China)

**Abstract:** This study aims to systematically reveal the new function and molecular mechanism of 5S rRNA regulating cell process. The biotin-labeled probe was synthesized, and the 5S rRBP was obtained by molecular hybridization. 162 5S rRNA interacting proteins was identified by high sensitivity mass spectrometry and bioinformatics analysis. Protein complex-based gene sets analysis was based on ConsensusPathDB. Protein-protein interaction network was constructed basing on STRING database. The GO database was used for acquiring functional annotations of interactive proteins. KEGG database was used for pathway enrichment analysis. The analysis showed that in addition to interacting with translation-related proteins, 5S rRNA also interacts with a large number of proteins from microRNA processing pathways, mRNA splicing pathways and signal pathway regulation pathways, etc. The result indicates that 5S rRNA not only have the function of protein translation regulation, but also participate in the regulation of mRNA

\* 收稿日期: 2018-11-09

**基金项目:** 广东省恶性肿瘤表观遗传与基因调控重点实验室基金 (2017B030314026); 广东省科技计划项目 (2017A030313066); 广东省自然科学基金 (2016A020221037); 国家自然科学基金 (41271263)

**作者简介:** 周祥明 (1994 年生), 男; **研究方向:** 生物化学与分子生物学; E-mail: 786943236@qq.com

**通信作者:** 朱爽 (1977 年生), 男; **研究方向:** 生物化学与分子生物学; E-mail: 15683727@qq.com

splicing and other processes. This study points out a new direction for the study of 5S rRNA function and regulatory mechanism.

**Key words:** 5S rRNA; ChIRP-MS; interactome; mRNA splicing

非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA) 是指不编码蛋白质的 RNA, 包括长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA)、核糖体 RNA (ribosomal RNA, rRNA)、核小 RNA (small nuclear RNA, snRNA) 和 microRNA 等等<sup>[1-4]</sup>。它们参与调控了几乎所有的细胞生命活动过程。ncRNA 主要通过与其结合蛋白的互作来发挥调控功能。例如, 各种 lncRNA 都是通过与常规的和非常规的 RNA 结合蛋白 (RNA binding protein, RBP) 的互作来调控各种生命活动过程<sup>[5]</sup>, rRNA 通过与蛋白质翻译机器蛋白的互作来行使翻译功能, 而 microRNA 则通过与 AGO 蛋白的结合来抑制 mRNA 翻译或者促进 mRNA 降解来调控基因表达<sup>[6]</sup>。因此确定 ncRNA 的 RBP 对理解 ncRNA 功能至关重要。由于每个 ncRNA 都不止与一种蛋白发生互作, 极大地增加了 ncRNA 功能和调控机制的研究难度。例如, 近期研究显示 U1 snRNA 在体内与超过 400 种 RNA 结合蛋白互作<sup>[7]</sup>。而目前绝大多数 ncRNA 的互作蛋白都是未知的, 严重阻碍了我们对 ncRNA 在细胞生命活动中所扮演角色的理解, 因此亟需系统地去鉴定各种 ncRNA 的互作蛋白组。

5S rRNA 是一个长度为 120 nt 的小 RNA, 在原

核生物和真核生物中都具有高保守性的二级和三级结构。在 1960 年, 5S rRNA 在核糖体中首次被发现<sup>[8]</sup>。在 1971 年, 首次报道了大肠杆菌在缺失 5S rRNA 的情况下不能合成多肽从而导致翻译终止, 证明 5S rRNA 是核糖体的重要组成部分。在真核生物细胞中, 5S rRNA 与 eL5/L18 家族蛋白, 23S rRNA 结合构成了核糖体的主要成分<sup>[9]</sup>。进一步研究表明, 5S rRNA 除了参与蛋白质翻译调控外, 还可能具有其它的调控功能。例如, Andria Pelava 等<sup>[10]</sup>发现 5S rRNA 可以通过结合肿瘤抑制因子 p53 来参与肿瘤发生发展的调控。然而目前还缺乏对 5S rRNA 相互蛋白的系统研究工作, 不清楚 5S rRNA 的互作蛋白组全貌是怎样的, 所以对 5S rRNA 的互作蛋白组系统解析将可以帮助我们更全面地认识 5S rRNA 这种细胞生命活动过程中最重要调控因子之一的功能和调控机制。

本研究将利用国际上最先进的 ncRNA 互作蛋白组研究技术 ChIRP-MS<sup>[7]</sup> (chromatin isolation by RNA purification-mass spectrometry, 图 1A) 首次鉴定出 5S rRNA 互作蛋白组, 并采用系统的生物信息学分析方法 (图 1B) 探究 5S rRNA 新的调控功能和分子机制。

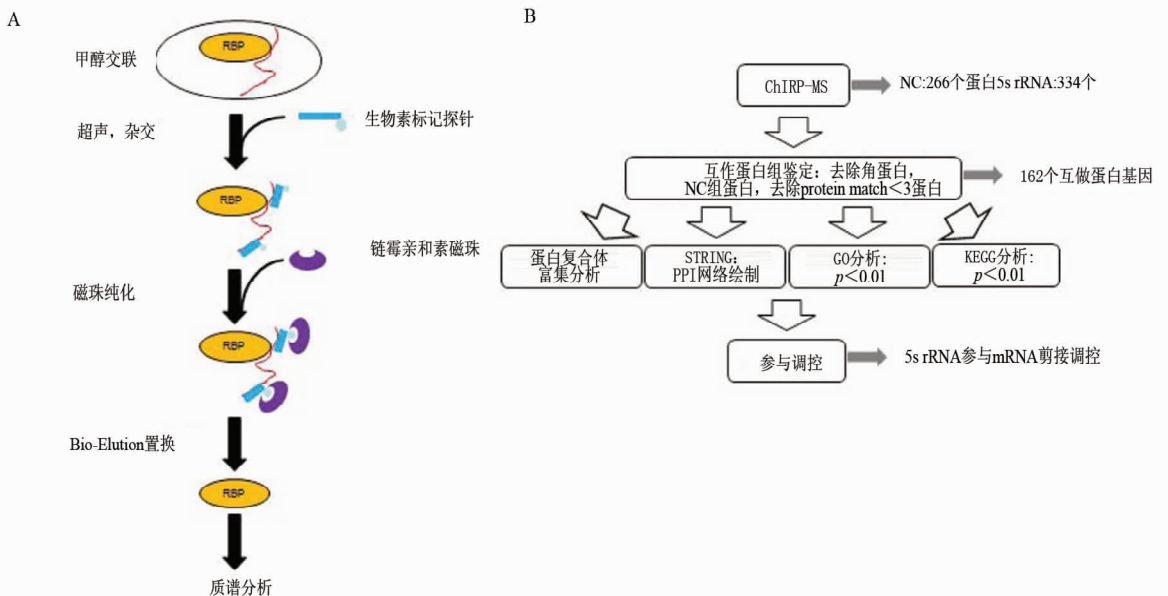


图 1 ChIRP-MS 流程及生物信息学分析流程

Fig. 1 Procedures of ChIRP-MS and Bioinformatics analysis

## 1 材料与方法

### 1.1 ChIRP-MS 实验

**1.1.1 探针设计** 在 UCSC 网站上查询目的基因序列。根据目的基因序列设计探针,并在上海生工合成生物素标记探针。

**1.1.2 收集细胞并交联** 收细胞后计数。加入  $\varphi = 3\%$  甲醛溶液 (用 PBS 按照  $10^7$  个细胞 10 mL 配置) 重悬细胞,颠倒混匀,在摇床上室温混匀 30 min。加入 1/10 体积的 1.25 mol/L 甘氨酸 (glycine),混匀后在摇床上室温摇 5 min。4 °C 离心弃上清。预冷 PBS 洗一次,4 °C 离心弃上清。按每  $2 \times 10^7$  个细胞的 1 mL PBS 的量加入预冷 PBS 并重悬。每个 1.5 mL 管加入 1 mL 细胞悬浮液分装,4 °C 离心弃上清。

**1.1.3 裂解细胞** 细胞称重,加入 Lysis Buffer 重悬细胞 (0.05 mol/L Tris-HCl pH7.0, 10 mmol/L EDTA,  $w = 1\%$  SDS。按照每 100 mg 细胞添加 1 mL Lysis Buffer。Lysis Buffer 中提前加入蛋白酶抑制剂、PMSF 和 RNasin)。

**1.1.4 超声打断 DNA 和 RNA** 4 °C 水浴中用最高能量以 30 s ON, 45 s OFF 条件超声细胞。取 5  $\mu$ L 检测超声效果,如果 DNA 大小在 100 ~ 500 bp,说明超声完成,如果不是,则继续超声。

**1.1.5 杂交** 将超声样品 4 °C 离心取上清,取细胞裂解液体积的 1/100 作为 Input 对照。取 10  $\mu$ L 链霉亲和素磁珠用 100  $\mu$ L Lysis Buffer 洗三次 (该磁珠用于去除非特异结合的蛋白)。将细胞裂解液转移到 15 mL 管中,加入 Hybridization Buffer (750 mmol/L NaCl,  $w = 1\%$  SDS, 50 mmol/L Tris-HCl pH7.0, 1 mmol/L EDTA pH 8.0,  $w = 15\%$  Formamide)。每 1 mL Lysis Buffer 添加 2 mL Hybridization Buffer,并提前加入蛋白酶抑制剂、PMSF 和 RNasin)。加入 10  $\mu$ L 洗过的磁珠,在杂交炉中 37 °C 洗 30 min 后弃磁珠。每  $2 \times 10^7$  个细胞加入 1  $\mu$ L 100  $\mu$ mol/L 探针,在杂交炉中 37 °C 孵育过夜。取 100  $\mu$ L 磁珠,用 Lysis Buffer 洗三次。用裂解细胞相同体积的 Lysis Buffer (加入蛋白酶抑制剂、PMSF 和 RNasin) 来将磁珠悬浮。在杂交结束后,将磁珠悬浮液加到每个管中,在杂交炉中 37 °C 旋转混匀 30 min。用 1 mL Wash Buffer ( $2 \times$  SSC,  $w = 0.5\%$  SDS) 洗 5 次磁珠。在最后一次洗脱完成后,先加入与磁珠等体积的 Wash Buffer,取 10  $\mu$ L 磁珠用于提 RNA,剩下所有磁珠用于提蛋白。

**1.1.6 qRT-PCR 检测 ncRNA 是否被探针捕获** 在

10  $\mu$ L RNA Input 中加入 85  $\mu$ L RNA PK Buffer pH7.0 (100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl pH. 7.0, 1 mmol/L EDTA pH8.0,  $w = 0.5\%$  SDS),加入 5  $\mu$ L Protease K。10  $\mu$ L 磁珠中加入 95  $\mu$ L 的 RNA PK Buffer pH7.0,加入 5  $\mu$ L Protease K。在杂交炉中 50 °C 孵育 45 min。加入 100  $\mu$ L DEPC 水,加入 200  $\mu$ L 酚氯仿 (苯酚:氯仿 = 1:1),剧烈涡旋 5 s。4 °C 离心取上清加入等体积氯仿,剧烈涡旋 5 s。4 °C 离心取上清,加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc, 0.5  $\mu$ L 糖元 (glycogen blue), 3 倍体积无水乙醇, -20 °C 沉淀过夜。4 °C 离心弃上清,真空抽干后用 10  $\mu$ L DEPC 处理水回溶。qRT-PCR 检测目标 ncRNA 和 GAPDH mRNA 的丰度。

**1.1.7 回收蛋白用于 MS** 弃上清留磁珠,加入与磁珠等体积的 Biotin elution Buffer (12.5 mmol/L D-biotin, 7.5 mmol/L HEPES pH7.5, 75 mmol/L NaCl, 1.5 mmol/L EDTA pH8.0,  $w = 0.15\%$  SDS,  $w = 0.075\%$  sarkosyl,  $w = 0.02\%$  Na-Deoxycholate,  $6.4 \times 10^{-3}$  mol/L NaOH),涡旋混匀后室温静置 20 min, 65 °C 干浴 10 min,收集上清。再次加入与磁珠等体积的 Biotin elution Buffer,室温静置 20 min, 65 °C 干浴 10 min,合并两次上清。加入 4 倍体积预冷丙酮, -20 °C 沉淀过夜。4 °C 离心弃上清,室温静置 1 min,立刻加入 30  $\mu$ L 1  $\times$  laemmli sample buffer (biorad)。95 °C 干浴 30 min,每 5 min 混匀一次,最终获得蛋白样品。蛋白样品跑  $w = 10\%$  SDS-PAGE 胶后银染并用于质谱检测。

### 1.2 蛋白序号转换基因名

Uniport (The Universal Protein Resource) 是一个蛋白序列和蛋白功能的综合性数据库<sup>[11]</sup>,并且是目前信息最丰富、资源最广的免费蛋白质数据库。本研究利用 uniprot 在线转换工具将蛋白序号 (protein accession) 转换成基因名 (gene symbol)。

### 1.3 蛋白复合体富集分析与 PPI 网络构建

了解细胞内的不同分子间的互作有助于健康和疾病的深入研究,所以急需一个可以将不同分子互作数据库整合起来的综合性数据库。Consensus-PathDB 就是这样的一个数据库,它整合了超过 30 个分子互作相关的人、鼠和酵母数据库,总共包括了 215 541 个分子互作 (蛋白与蛋白互作、生化反应、基因调控互作) 和 4 601 条通路信息,并可将这些信息可视化<sup>[12-13]</sup>。文章中利用 ConsensusPathDB 分析获得 5S rRNA 互作蛋白组的蛋白复合体富集信息。

STRING 数据库 (Search Tool for the Retrieval of

Interacting Genes/Proteins Database) 是一个搜寻蛋白质之间互作的数据库。它能够帮助用户轻松获取独特的、覆盖范围广的实验以及预测的互作关系信息, 既包括蛋白质之间的直接物理互作, 也包括蛋白质之间的间接功能相关性。它除了包含有实验数据、从 PubMed 摘要中挖掘的结果和综合其他数据库数据外, 还可利用生物信息学方法预测结果。Cytoscape 是一款图形化显示网络并进行分析和编辑的软件, 我们利用 Cytoscap 将 STRING 数据库查询的蛋白互作信息可视化并构建蛋白与蛋白互作 (protein-protein interaction network, PPI) 网络。

#### 1.4 GO 注释富集和 KEGG 信号通路富集

GO (Gene Ontology) 是一个提供基因及产物功能注释信息的数据库。KEGG (Kyoto Encyclopedia of Gene and Genome) 是一个包含基因、通路、疾病、药物的综合数据库<sup>[12]</sup>。利用 GO 和 KEGG 对目标基因进行分析, 从而预测该基因参与的生物过程 (biological process, BP)、细胞分布 (compo-

nents of cells, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 及参与通路 (pathway)。

## 2 结果与分析

### 2.1 内源 5S rRNA 互作蛋白的捕获和检测

ChIRP-MS 技术是近年发展起来的一种系统鉴定特定 RNA 内源互作蛋白组的技术。它首先利用甲醛交联细胞, 再用生物素修饰 DNA 探针捕获目标 RNA, 然后经过链霉亲和素磁珠吸附纯化和洗脱, 结合高效液相色谱-质谱联用 (HPLC-MS) 技术, 最终获得目标 RNA 内源互作蛋白组<sup>[14]</sup> (图 1A)。使用人模式细胞 HeLa 来研究 5S rRNA 的内源互作蛋白组, 细胞培养后利用  $\varphi = 3\%$  甲醛对细胞做了交联处理并进行超声。利用在线 ChIRP 探针设计软件 ChIRP-Designer, 设计了针对 5S rRNA 的特异探针 (表 1)。为了减少质谱结果的非特异性, 我们同时设计了一条靶向细菌 RNA 的 NC 对照组探针 (表 1)。在利用所设计的探针捕获 5S rRNA

表 1 本研究中的序列  
Table 1 The sequences in this study

名称	序列
5S rRNA	GTCTACGGCCATACCACCCTGAACGCGC- CCGATCTCGTCTGATCTCGGAAGCTAAG- CAGGGTCTGGCCTGGTTAGTACTTGGAT- GGGAGACCGCTGGGAATACCGGGTGCTGTAGGCTTT
5S rRNA qRT-PCR 引物	F: GCCATACCACCCTGAACG R: AGCCTACAGCACCCGGTATT
5S rRNA 探针	AGGGTGGTATGGCCGTAGAC
NC 对照组探针	CCAGTGAATCCGTAATCATG

互作蛋白后, 取一部分去提 RNA。通过实时定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测, 发现 5S rRNA 探针捕获到的 5S rRNA 占 input 5S rRNA 的  $(23 \pm 2.3)\%$  (图 2A), 而 5S rRNA 探针几乎没有捕获到 GAPDH mRNA。NC 对照组探针几乎没有捕获到 5S rRNA 和 GAPDH mRNA。该结果说明我们成功地利用所合成的 5S rRNA 探针特异地捕获到了 5S rRNA, 且 NC 对照组探针的特异性是非常高的。将探针捕获到的 5S rRNA 互作蛋白跑 SDS-PAGE 胶后银染。银染结果显示 5S rRNA 互作蛋白分布于整个泳道,

相比之下 NC 对照组探针泳道没有明显信号, 这说明 5S rRNA 在细胞内可能结合有大量的蛋白, 而这里的绝大部分蛋白可能都是未知的 (图 2B)。

虽然 qRT-PCR 结果显示此次实验所使用的 5S rRNA 探针捕获到的 5S rRNA 达到了 input 5S rRNA 的  $(23 \pm 2.3)\%$  (图 2A)。但是在以后的 ChIRP-MS 实验中, 需要进一步提高 5S rRNA 探针的捕获效率从而提高实验成功率。可考虑同时设计多条探针并比较他们捕获效率后, 再选取捕获效率最高的探针进行实验。

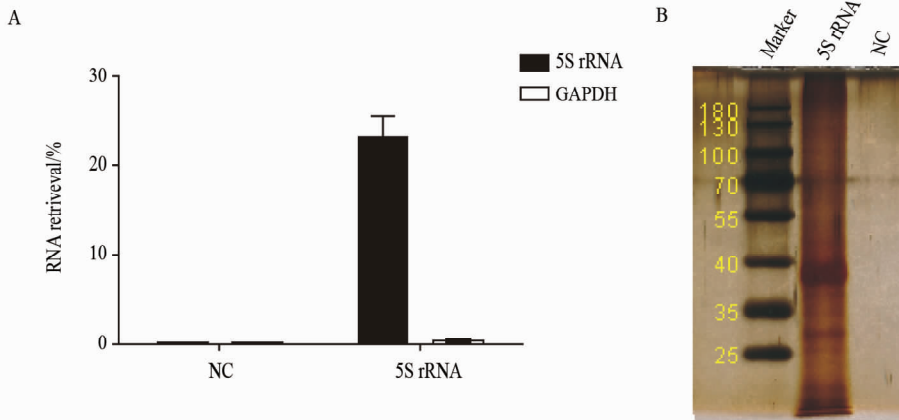


图 2 5S rRNA 捕获效率检测及银染

Fig. 2 5S rRNA captured efficiency detection and silver staining

## 2.2 HPLC-MS 鉴定 5S rRNA 互作蛋白组

随后用 HPLC-MS 系统鉴定了 NC 对照组探针和 5S rRNA 特异探针捕获到的蛋白。NC 对照组共检测出 266 个蛋白质，5S rRNA 组共检测出 334 个蛋白质。为了进一步减少质谱结果的非特异性，提高质谱结果可信度，首先去除两组蛋白中质谱信号低的蛋白，也即 protein match < 3 的蛋白；随后再

去除样品组和 NC 对照组中所有的角蛋白；最后在 5S rRNA 的蛋白列表中移除 NC 中同样存在的蛋白；最终获得了 162 个高可信度的 5S rRNA 内源互作蛋白，并用 uniprot 在线转换工具将 protein accession 转换为 gene symbol。表 2 展示了 5S rRNA 互作蛋白组中质谱信号排名前 20 的蛋白。

表 2 5S rRNA 互作蛋白组中质谱信号排名前 20 的蛋白

Table 2 The top 20 proteins of MS signal in the 5S rRNA interactome

Protein accession	Gene symbol	Protein match
MUC19_HUMAN	MUC19	84
SSF1_HUMAN	PPAN	73
RAB7B_HUMAN	RAB7B	62
MYH7_HUMAN	MYH7	43
DYHC1_HUMAN	DYNC1H1	35
CE290_HUMAN	CEP290	32
DYH10_HUMAN	DNAH10	30
DMD_HUMAN	DMD	29
MDN1_HUMAN	MDN1	28
SRSF7_HUMAN	SRSF7	26
SCNND_HUMAN	SCNN1D	26
RL5_HUMAN	RPL5	25
NUCL_HUMAN	NCL	24
ACTB_HUMAN	ACTB	23
RL13_HUMAN	RPL13	21
HNRPM_HUMAN	HNRNPM	21
MYOF_HUMAN	MYOF	21
CRYAA_HUMAN	CRYAA	21
SPAT1_HUMAN	SPATA1	21
HNRPC_HUMAN	HNRNPC	20

### 2.3 5S rRNA 互作蛋白组复合体富集分析和 PPI 网络构建

利用 ConsensusPathDB 数据库中的复合体富集分析 (protein complex-based gene sets analysis) 对 5S rRNA 的互作蛋白成分进行了系统分析 (图 3A)。分析结果显示 5S rRNA 的互作蛋白组显著富集了核糖体、蛋白质翻译相关的蛋白复合体。例如, Nop56p-associated pre-rRNA complex<sup>[15]</sup>、PGC-1-SRp40-SRp55-SRp75 complex<sup>[16]</sup>、Ribosome, cytoplasmic、60S ribosomal subunit, cytoplasmic、40S ribosomal subunit, cytoplasmic 等。这与人们熟知的 5S rRNA 蛋白翻译调控功能相一致。此外, 还可以看到 5S rRNA 互作蛋白组中还包含其它蛋白复合体, 包括: TRBP containing complex<sup>[17]</sup>、TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B signaling complex 6、Spliceosome、capped, methylated pre-mRNP; CBC complex<sup>[18]</sup>、DGCR8 multiprotein complex<sup>[19]</sup>、Large Droscha complex<sup>[20]</sup>、

TLE1 corepressor complex<sup>[21]</sup>、p54nrb/PSF/Matrin3/inosine RNA<sup>[22]</sup>、H2AX complex, isolated from cells without IR exposure<sup>[23]</sup>、Emerin complex 25<sup>[24]</sup>、SNW1 complex<sup>[25]</sup> 等等。以上结果说明 5S rRNA 可能不仅仅参与了蛋白质翻译调控, 可能还参与了 microRNA 加工成熟调控和 RNA 转录调控、mRNA 剪接调控、细胞信号通路调控、DNA 损伤修复等过程。进一步利用 STRING 数据库对 5S rRNA 互作蛋白组中质谱信号排名前 50 的蛋白绘制了 PPI 网络 (图 3B)。结果显示, 5S rRNA 互作蛋白组间也有复杂的互作模式, 并且其构成的 PPI 网络是由 HNRNP 家族<sup>[27]</sup>、SR 蛋白家族<sup>[27]</sup>、核糖体蛋白 RPL 家族与 DDX5 蛋白<sup>[28-29]</sup> 构成网络主体。这些蛋白都是我们所熟知的, 其在细胞中发挥着重要生物学功能。这些功能包括: 核糖体构成和 mRNA 剪接。这些互作网络在 5S rRNA 的参与下很有可能变的更复杂。

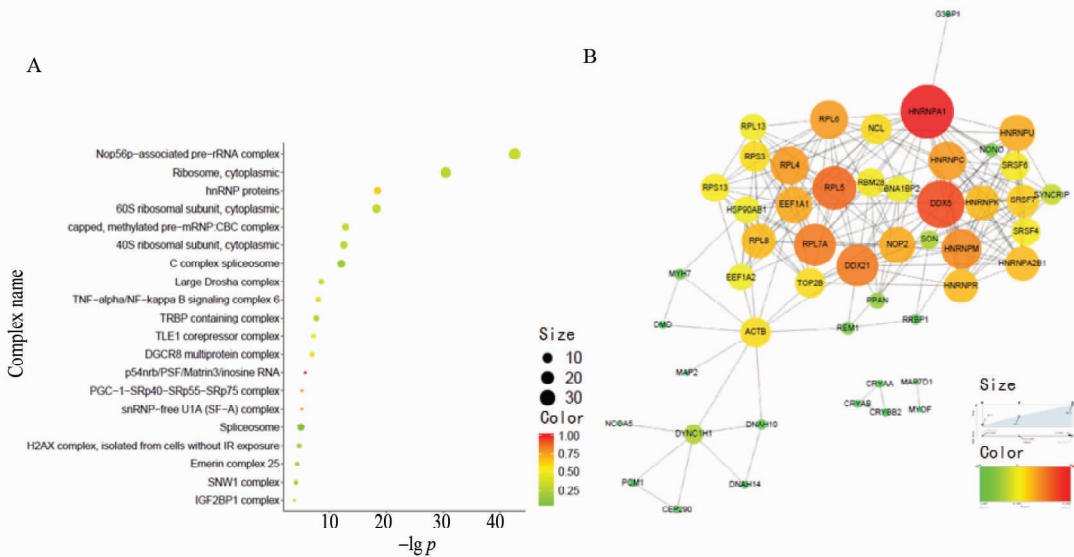


图3 5S rRNA 互作蛋白组复合体富集及其蛋白与蛋白互作网络

Fig. 3 Protein complex enrichment and PPI network of 5S rRNA interactome

### 2.4 GO 和 KEGG 通路富集显示 5S rRNA 参与 mRNA 剪接调控

将 5S rRNA 互作蛋白组在 ConsensusPathDB 数据库中进行 GO 分析, 设定  $p < 0.01$ , 并用 R 软件作图 (图 4)。GO 的 BP 分析结果显示: 5S rRNA 互作蛋白组显著富集于核糖体蛋白复合体起源、翻译启动 (图 4), 此外还富集多种复合物代谢调控过程和染色质调控过程。GO 细胞成分 (CC) 分析显示 5S rRNA 与大量细胞核蛋白 (nuclear part) 有互作。这些蛋白可能跟 5S rRNA 的加工成熟相关,

但也有可能意味着 5S rRNA 不仅在细胞质中参与蛋白质的翻译调控, 还可能进入细胞核中参与各种基因表达或者加工的调控。可以预计 5S rRNA 互作蛋白组中应该主要为核酸结合蛋白, 这点得到了 GO 分子功能 (MF) 分析结果的支持。MF 分析显示 5S rRNA 互作蛋白组主要富集了核酸结合蛋白, 这说明我们的数据可信度较高。MF 分析也显示 5S rRNA 也结合了其它功能的蛋白, 这些功能蛋白有可能是非典型的 RNA 结合蛋白 (图 4)。对 5S rRNA 互作蛋白组进行 KEGG 通路富集分析 (表

3), 并根据  $p$  值排序 ( $p$  值越小, 富集该通路的可信度越高), 5S rRNA 相互作用蛋白组富集到的通路可信度最高的是核糖体通路, 与蛋白复合体富集分析结果一致。值得注意的是 mRNA 剪接通路富集可信度排名第二, 仅次于核糖体通路。5S rRNA 与包括各类 SRSF 系列蛋白在内的 14 个 mRNA 剪接相关蛋白有互作, 表明 mRNA 剪接调控功能可能是 5S rRNA 翻译调控功能之外的又一重要功能。除了核糖体通路和 mRNA 剪接通路外, 5S rRNA 相

互作用蛋白组还富集了单纯疱疹病毒感染和内质网蛋白加工通路。随着  $p$  值的增大, 5S rRNA 互作蛋白组富集到单纯疱疹病毒感染和内质网蛋白加工通路可信度变低, 富集到这两个通路中的蛋白也随之变少。

综上所述, 结合蛋白复合体富集分析、PPI 网络构建、GO 分析、KEGG 通路富集分析, 我们得出 5S rRNA 参与 mRNA 剪接调控的结论。

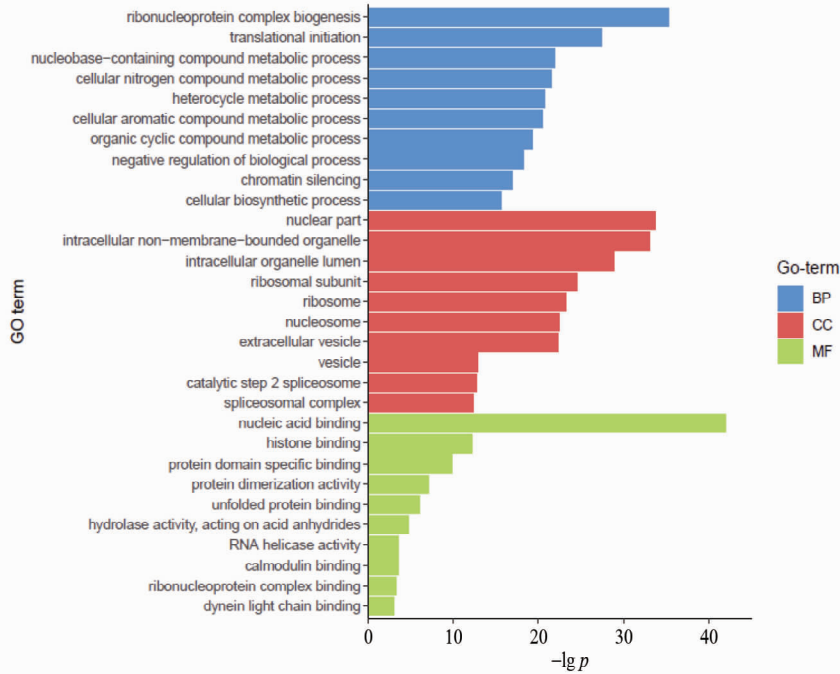


图 4 5S rRNA 互作蛋白组的 GO 分析

Fig. 4 Genetic ontology analysis of 5S rRNA interactome

表 3 5S rRNA 互作蛋白组 KEGG 通路富集分析

Table 3 KEGG pathway enrichment analysis of 5S rRNA interactome

$p^{1)}$	$q^{2)}$	Term	Genes
1. 04E-24	4. 46E-23	hsa03010: Ribosome-Homo sapiens (human)	RPS13; RPL37A; RPL8; RPS14; RPL6; RPL7; RPL4; RPS18; RPS15A; RPS3; RPS8; RPL7A; RPL29; RPL23A; RPL24; RPL5; RPL14; RPL17; RPL11; RPL13; RPS4X; RPL18; RPL19; RPL26L1; RPS3A; RPL10L
3. 13E-14	3. 37E-13	hsa03040: Spliceosome-Homo sapiens (human)	SRSF5; SRSF4; SRSF7; SRSF6; SRSF1; HNRNPA3; HNRNPA1; HNRNPU; SRSF8; RBMXL1; DDX5; RBMXL3; HNRNPK; HNRNPM; RBMX; HNRNPC; TRA2B
0. 003 075 65	0. 022 042	hsa05168: Herpes simplex infection-Homo sapiens (human)	SRSF5; SRSF4; SRSF7; SRSF6; SRSF1; SRSF8; HNRNPK
0. 007 294 18	0. 039 206	hsa04141: Protein processing in endoplasmic reticulum-Homo sapiens (human)	SYVN1; CRYAB; CRYAA; HSP90AB1; HSP90AA1; RRNP1

1), 2) E-n;  $\times 10^{-n}$

### 3 讨 论

RNA 互作蛋白组研究是 RNA 研究的前沿领域之一, 迅速确定 RNA 内源互作蛋白组图谱可以帮助我们全面理解 RNA 的功能和调控机制。采用传统体外的标记 RNA Pull-Down 方法对 RNA 互作蛋白进行研究具有通量低、实验繁琐耗时和效率低等缺点, 并且一次只能鉴定一到几种 RNA 结合蛋白。利用传统的 RNA 结合蛋白鉴定方法是很难对 RNA 的结合蛋白谱有全面的了解。例如, 从 mRNA 发现后的几十年间, 人们总共才鉴定出了 500 多种 mRNA 结合蛋白。而在 2012 年, Castello 等<sup>[26]</sup>利用和我们使用的类似策略系统分离了 mRBP, 并利用 HPLC-MS 做鉴定, 将 mRNA 结合蛋白成员迅速增加到了接近 900 种, 极大地提高了 RNA 结合蛋白的鉴定效率。再比如调控 X 染色体失活的 lncRNA Xist, 通过 ChIRP-MS 技术将其互作蛋白从不到 10 种一下增加到了 81 种<sup>[7]</sup>, 使得 Xist 的功能和调控机制得以重新认识。

在本研究中, 利用 ChIRP-MS 这种 RNA 互作蛋白组高通量鉴定技术系统地鉴定了 5S rRNA 的互作蛋白组图谱。共鉴定出 162 个 5S rRNA 互作蛋白, 极大地拓展了对 5S rRNA 互作蛋白的认识。结果显示 ChIRP-MS 不仅鉴定到了大量已知的 5S rRNA 互作蛋白 (表 2, 图 2, 3), 还鉴定出了大量新的 5S rRNA 互作蛋白。这些新的 5S rRNA 互作蛋白来自各种细胞功能蛋白复合物, 包括 mRNA 剪接复合物、TNF- $\alpha$  信号通路调控复合物、microRNA 加工成熟相关的 DGCR8 复合物等等 (图 3A)。5S rRNA 的这些相互作用蛋白暗示 5S rRNA 可能参与了 mRNA 剪接调控、TNF- $\alpha$  信号通路调控和 microRNA 加工成熟调控等正常生理调控过程。此外还发现 5S rRNA 可能参与了一些病理过

程的调控, 比如病毒感染 (表 3)。这些发现极大地扩展了 5S rRNA 的可能功能范围, 为未来 5S rRNA 的具体功能和调控机制研究指明了新的方向。

基于蛋白复合物富集分析、PPI 网络构建、GO 分析、KEGG 通路富集分析, 我们发现 5S rRNA 与 mRNA 剪接复合物有明显的互作, 暗示它可能参与了 mRNA 剪接调控。在 5S rRNA 互作蛋白组中大量存在 SR 蛋白家族、HNRNP 蛋白家族和 DDX5 等跟 mRNA 剪接密切相关的蛋白<sup>[27-29]</sup>, 结果暗示这些蛋白可能通过与 5S rRNA 的互作来发挥正常的功能。此外, SR 蛋白家族、HNRNP 蛋白家族除了与 mRNA 剪接相关外, 还参与调控 RNA 稳定性、翻译和蛋白降解等等<sup>[27]</sup>, 这也暗示了 5S rRNA 可能也具有同样的功能。综上所述, 我们的 5S rRNA 互作蛋白组研究表明 5S rRNA 的功能可能远不局限于蛋白质翻译调控, 可能还参与了 mRNA 剪接、信号通路调控等过程。研究也说明互作蛋白组研究是 ncRNA 功能和调控机制研究的有力工具, 能帮助揭示 ncRNA 在生命活动过程中所扮演角色的全貌。基于本文的内容, 我们计划更深层次研究 5S rRNA 如何参与 mRNA 剪接调控, 并将在相关已知发生 mRNA 剪接生物学表型的病理细胞或组织样品进行一系列工作。这样会使我们的工作更有临床价值和生物学意义。接下来的工作可以包括: 对可信度较高的蛋白进行细胞内 RNA 免疫沉淀 (RNA immunoprecipitation, RIP) 与免疫共沉淀 (protein complex immunoprecipitation, Co-IP) 实验以证明该组合的有效性, 截断实验确定 5S rRNA 与其互作蛋白的结合位点, RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 实验研究 5S rRNA 调控其互作蛋白发挥功能的模式。

### 参考文献:

- [1] LAURENT G S, WAHLESTEDT C, KAPRANOV P. The landscape of long noncoding RNA classification [J]. Trends in Genetics, 2015, 31(5):239-251.
- [2] JANDURA A, KRAUSE H M. The new RNA world: Growing evidence for long noncoding RNA functionality [J]. Trends in Genetics, 2017, 33(10):665-676.
- [3] ENGREITZ J M, OLLIKAINEN N, GUTTMAN M. Long non-coding RNAs: spatial amplifiers that control nuclear structure and gene expression [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2016, 17(12):756-770.
- [4] SCHMITT A M, CHANG H Y. Long noncoding RNAs in cancer pathways [J]. Cancer Cell, 2016, 29(4):452-463.
- [5] DOMINGUEZ D, FREESE P, ALEXIS M S, et al. Sequence, structure, and context preferences of human RNA binding proteins [J]. Molecular Cell, 2018, 70(5):854-867.
- [6] BUSHATI N, COHEN S M. microRNA functions [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007, 23(23):175-205.
- [7] CHU C, ZHANG Q C, DA ROCHA S T, et al. Systemat-

- ic discovery of xist RNA binding proteins [J]. *Cell*, 2015, 161(2):404–416.
- [8] GONGADZE G M. 5S rRNA and ribosome[J]. *Biochemistry Biokhimiia*, 2011, 76(13):1450–1464.
- [9] SMIRNOV A V, ENTELIS N S, KRASHENINNIKOV I A, et al. Specific features of 5S rRNA structure-its interactions with macromolecules and possible functions [J]. *Biochemistry Biokhimiia*, 2008, 73(13):1418–1437.
- [10] PELAVA A, SCHNEIDER C, WATKINS N J. The importance of ribosome production, and the 5S RNP – MDM2 pathway, in health and disease[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2016, 44(4):1086–1090.
- [11] PICHLER K, WARNER K, MAGRANE M, et al. SPIN: Submitting sequences determined at protein level to uniProt [J]. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2018, 62(1):e52.
- [12] KAMBUROV A, STELZL U, LEHRACH H, et al. The consensusPathDB interaction database: 2013 update[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(D1):D793–D800.
- [13] HERWIG R, HARDT C, LIENHARD M, et al. Analyzing and interpreting genome data at the network level with ConsensusPathDB[J]. *Nature Protocols*, 2016, 11(10):1889–1907.
- [14] CHU C, QU K, ZHONG F, et al. Genomic maps of lincRNA occupancy reveal principles of RNA-chromatin interactions[J]. *Molecular Cell*, 2011, 44(4):667–678.
- [15] HAYANO T, YANAGIDA M, YAMAUCHI Y, et al. Proteomic analysis of human Nop56p-associated pre-ribosomal ribonucleoprotein complexes: Possible link between Nop56p and the nucleolar protein treacle responsible for treacher collins syndrome[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(36):34309–34319.
- [16] SWANSON C M, SHERER N M, MALIM M H. SRp40 and SRp55 promote the translation of unspliced human immunodeficiency virus type 1 RNA[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(13):6748–6759.
- [17] BENOIT M, IMBERT L, PALENCIA A, et al. The RNA-binding region of human TRBP interacts with microRNA precursors through two independent domains [J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(7):4241–4252.
- [18] GIACOMETTI S, BENBAHOUCHE N E H, DOMANSKI M, et al. Mutually exclusive CBC-containing complexes contribute to RNA fate[J]. *Cell Reports*, 2017, 18(11):2635–2650.
- [19] MACIAS S, PLASS M, STAJUDA A, et al. DGCR8 HITS-CLIP reveals novel functions for the microprocessor [J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2012, 19(8):760–766.
- [20] MECHTLER P, JOHNSON S, SLABODKIN H, et al. The evidence for a microRNA product of human DROSHA gene[J]. *RNA Biology*, 2017, 14(11):1508–1513
- [21] KALTENBRUN E, GRECO T M, SLAGLE C E, et al. A Gro/TLE-NuRD corepressor complex facilitates Tbx20-dependent transcriptional repression[J]. *Journal of Proteome Research*, 2013, 12(12):5395–5409.
- [22] ZHANG X, WU C, XIONG W, et al. Knockdown of p54nrb inhibits migration, invasion and TNF- $\alpha$  release of human acute monocytic leukemia THP1 cells[J]. *Oncology Reports*, 2016, 35(6):3742–3748.
- [23] LI X, NAN A, XIAO Y, et al. PP2A – B56e complex is involved in dephosphorylation of  $\gamma$ -H2AX in the repair process of CPT-induced DNA double-strand breaks[J]. *Toxicology*, 2015, 331:57–65.
- [24] HOLASKA J M, WILSON K L. An emerin “proteome”: Purification of distinct emerin-containing complexes from HeLa cells suggests molecular basis for diverse roles including generegulation, mRNA splicing, signaling, mechanosensing, and nuclear architecture[J]. *Biochemistry*, 2007, 46(30):8897–8908.
- [25] SATO N, MAEDA M, SUGIYAMA M, et al. Inhibition of SNW1 association with spliceosomal proteins promotes apoptosis in breast cancer cells[J]. *Cancer Medicine*, 2015, 4(2):268–277.
- [26] CASTELLO A, FISCHER B, EICHELBAUM K, et al. Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins[J]. *Cell*, 2012, 149(6):1393–1406.
- [27] KEDZIERSKA H, WITKOWSKA A P. Splicing factors of SR and hnRNP families as regulators of apoptosis in cancer[J]. *Cancer Letters*, 2017, 396:53–65.
- [28] KAR A, FUSHIMI K, ZHOU X, et al. RNA helicase p68 (DDX5) regulates tau exon 10 splicing by modulating a stem-loop structure at the 5′ splice site[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2011, 31(9):1812–1821.
- [29] LIU Z. p68 RNA helicase is an essential human splicing factor that acts at the U1 snRNA-5′ splice site duplex [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2002, 22(15):5443–5450.