

长QT综合征相关钙调蛋白突变体E141G的C末端片段载体构建和蛋白制备

邵冬雪,张晨阳,叶苗苗,陈帆,郝丽英
(中国医科大学药学院药物毒理学教研室,沈阳 110122)

摘要 目的 构建长QT综合征(LQTS)相关钙调蛋白(CaM)突变体E141G的C末端片段(C-lobe_{E141G})原核表达载体并进行蛋白表达、纯化及活性鉴定。方法 将C-lobe_{E141G} cDNA片段插入PGEX-6p-3质粒载体后转化大肠杆菌BL21感受态细胞,异丙基硫代-β-D半乳糖苷(IPTG)诱导谷胱甘肽-S-转移酶(GST)融合蛋白表达。利用Glutathione-Sepharose 4B beads对融合蛋白进行分离纯化,经蛋白酶切除GST标签后,分别采用SDS-PAGE及BCA方法检测纯化后的目的蛋白纯度及浓度,GST pull-down方法和膜片钳技术检测纯化后蛋白活性。结果 GST-C-lobe_{E141G}融合蛋白高表达,纯化后获得高纯度、高浓度C-lobe_{E141G}蛋白。纯化后C-lobe_{E141G}蛋白具有能与CaV1.2型钙通道结合并维持大鼠心肌细胞通道开放的活性。结论 成功构建可以表达生物活性蛋白的C-lobe_{E141G}原核表达载体,可为CaM的C-lobe位点突变介导的LQTS机制研究提供材料基础。

关键词 钙调蛋白; C末端片段; 突变体; 融合蛋白

中图分类号 R96 文献标志码 B 文章编号 0258-4646(2024)11-0967-05

网络出版地址 <https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20241120.1430.032>

DOI:10.12007/j.issn.0258-4646.2024.11.002

Vector construction and protein preparation of long QT syndrome-related C-terminal lobe of calmodulin mutant E141G

SHAO Dongxue, ZHANG Chenyang, YE Miaomiao, CHEN Fan, HAO Liying

(Department of Pharmaceutical Toxicology, Pharmacy College of China Medical University, Shenyang 110122, China)

Abstract **Objective** To construct a prokaryotic expression vector of the long QT syndrome (LQTS) associated C-terminal lobe of calmodulin (CaM) mutant E141G (C-lobe_{E141G}) and to identify the expression, purification, and activity of C-lobe_{E141G}. **Methods** A cDNA fragment was inserted into a PGEX-6p-3 plasmid vector and transferred into *Escherichia coli* BL21 receptor cells, and glutathione-S-transferase (GST) fusion protein was induced by isopropyl thio-β-D galactoside (IPTG). Glutathione-Sepharose 4B beads were used to separate and purify GST-C-lobe_{E141G}. After removing the GST label with protease, the purity and concentration of purified C-lobe_{E141G} were detected using SDS-PAGE and BCA, respectively. The activity of purified C-lobe_{E141G} was detected using the GST pull-down method and patch clamp technique. **Results** GST-C-lobe_{E141G} fusion protein was highly expressed, and C-lobe_{E141G} with high purity and concentration was obtained. The purified C-lobe_{E141G} protein not only bound to CaV1.2 calcium channels, but also rescued the channel activity from run-down in the ventricular myocytes of rat hearts. **Conclusion** This study successfully constructed a prokaryotic expression vector of C-lobe_{E141G}, which provides a material basis for the study of the mechanism of LQTS mediated by C-lobe mutations in CaM.

Keywords calmodulin; C-terminal lobe; mutant; fusion protein

电压门控钙通道(voltage gated calcium channel, VGCC)是细胞内Ca²⁺内流的最主要途径,介导细胞内多种Ca²⁺依赖性调控过程的发生,如兴奋产生、肌肉收缩、激素和神经递质的分泌及基因表达等^[1-3]。

VGCC受2种钙调蛋白(calmodulin, CaM)介导的Ca²⁺依赖性的反馈机制调节,即Ca²⁺依赖性易化(Ca²⁺-dependent facilitation, CDF)和Ca²⁺依赖性失活(Ca²⁺-dependent inactivation, CDI)过程,从而维持细胞内钙稳态^[4-10]。对于心肌CaV1.2钙通道,CaM的结合位点包括位于通道C末端的IQ和preIQ基序, I - II环以及通道N末端^[9-11]。近期研究^[12-16]表明一系列CaM关键结构域内位点突变引发可伴随心源性猝死的长QT综合征(long QT syndrome, LQTS),有研究^[12-17]表明这可能与CaM突变后改变与CaV钙通道作用引发

基金项目:辽宁省科学技术计划(2022JH2/20200069);西南医科大学心血管医学研究所医学电生理教育部重点实验室开放基金(KeyME-2018-02)

作者简介:邵冬雪(1987-),女,讲师,博士。

通信作者:郝丽英, E-mail: lyhao@cmu.edu.cn

收稿日期:2024-01-19

网络出版时间:2024-11-21 11:14:35

CDI异常有关。

CaM是主要的Ca²⁺传感器之一,为哑铃形构象,有2个球形末端[N末端片段(N-terminal lobe, N-lobe; a.a. 3-81)和C末端片段(C-terminal lobe, C-lobe; a.a. 77-149)],两端结构域有48%相同序列和75%同源序列^[18]。N-lobe和C-lobe虽然结构相似,但两端的不同序列也决定了它们对Ca²⁺的亲合力不同,与CaV钙通道上不同结合位点的亲合力也不同,两者对CaV钙通道起到特异性调节作用^[19-21]。有趣的是,全外显子组测序相继发现的与LQTS相关的多种CaM致病突变体均位于CaM的C-lobe上,这可能与N-lobe和C-lobe对CaVs钙通道调节的特异性有关,但具体机制尚不明确。

本研究首次构建LQTS相关CaM突变体E141G的C-lobe(C-lobe of CaM mutant E141G, C-lobe_{E141G}),以排除CaM的N-lobe对通道的调节,可清晰观察突变对CaM的C-lobe作用的影响,旨在阐明突变对CaM的C-lobe特异性调节CaV钙通道的影响,进而为CaM的C-lobe突变引发的LQTS的发生机制的研究提供材料基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料和动物

pGEX-6p-3/C-lobe质粒由日本鹿儿岛大学KAMEYAMA教授惠赠,pGEX-6p-3/C-lobe_{E141G}由江苏溥博生物科技有限公司以C-lobe为模版采用点突变试剂盒制备。6~8周龄、体重220~320 g的SD大鼠由中国医科大学实验动物部提供。动物饲养和实验原则遵照《中国医科大学实验动物福利与伦理审查委员会规定》进行。

1.2 方法

1.2.1 质粒的转化及鉴定:取大肠杆菌BL21感受态细胞100 μL,加入pGEX-6p-3/C-lobe_{E141G}质粒10 ng,冰中放置30 min后于42 °C水浴中精确热击60 s,然后快速转移至冰中冷却2 min,加入预热好的37 °C SOC培养基1 mL,37 °C摇震荡培养1 h,4 000 r/min离心2 min后吸除部分上清培养液,剩余约200 μL培养液重悬菌体,均匀涂布在含氨苄青霉素(0.1 mg/mL)的琼脂平板培养基37 °C过夜筛选。挑取单克隆菌种接种于装有LB培养液(含氨苄青霉素0.05 mg/mL)的试管中震荡培养12~16 h,采用碱裂解法提取质

粒。质粒经BamH I 和Not I 双酶切后进行琼脂糖凝胶电泳,并进行DNA测序,鉴定质粒。

1.2.2 融合蛋白的表达及纯化:取适量pGEX-6p-3/C-lobe_{E141G}重组质粒转化BL21菌种,加入装有400 mL LB培养液(含AMP 50 μg/mL)的锥形瓶中,在37 °C水浴锅中以120 r/min速度震荡培养12~16 h。当波长595时的吸光度(A595)值达到0.6~1.0时,加入异丙基硫代-β-D半乳糖苷(isopropyl thiobeta-D galactoside, IPTG)使其终浓度为1 mmol/L,37 °C、120 r/min条件下诱导谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-transferase, GST)-C-lobe_{E141G}融合蛋白表达4 h。菌液以5 000 r/min、4 °C离心10 min后弃上清,用20 mL PBS重悬沉淀菌体,加入溶菌酶至终浓度为0.1 mg/mL,冰浴处理30 min。在冰浴中以200 W、超声3 s间隔7 s的条件共超声20 min,打破菌体后4 °C、16 000 r/min离心10 min。收集上清与两管300 μL GS-4B beads混合后置10 r/min的旋转培养器4 °C旋转过夜。PBS清洗3次后每管加入495 μL PBS和5 μL 蛋白酶切酶,混匀后室温剧烈震荡酶切GST标签5 h。600 r/min,离心3 min,收集上清即获得目的蛋白C-lobe_{E141G},并于-20 °C冻存。

preIQ重组质粒经LB培养基培养后,IPTG诱导GST融合蛋白表达,采用GS-4B beads进行分离纯化后得到GST-preIQ融合蛋白^[20]。

1.2.3 蛋白的纯度鉴定及浓度测定:常规15% SDS-PAGE电泳检测纯化后的C-lobe_{E141G}蛋白纯度及相对分子量。参照BCA蛋白浓度测定试剂盒方法测定纯化后的C-lobe_{E141G}蛋白浓度。

1.2.4 GST pull-down实验:取连接于GS-4B beads上的GST-preIQ融合蛋白40 μL于2 mL EP管中,加入C-lobe_{E141G}使其终浓度分别为0.1、0.35、0.7、1.4、2.1、3.5 μmol/L,加入[Ca²⁺]为2 mmol/L的Tris缓冲液至总体积为300 μL。4 °C低转速旋转孵育4 h。800 r/min 4 °C离心3 min。弃掉上清后取Tris缓冲液300 μL,800 r/min 4 °C轻柔清洗2次,每管加入15 μL 1×SDS样品缓冲液洗脱。取上清,采用常规15% SDS-PAGE电泳检测纯化蛋白。

1.2.5 单个大鼠心室肌细胞的制备:SD大鼠经苯巴比妥腹腔注射麻醉后,在人工呼吸机支持下进行主动脉插管,分离心脏。然后利用Langendorff灌注装置,采用胶原酶消化大鼠心室肌细胞来获得单个心

肌细胞。

1.2.6 单通道钙电流的检测:应用膜片钳单通道记录模式监测钙通道活性。首先形成细胞贴附模式,然后将膜片自细胞游离建立膜内面向外模式,再将膜片小心移动入浴槽旁边充满测试溶液的凹槽中。用pClamp10.2软件记录和分析数据,由于 $I = N \times P_o \times i$,测定实验脉冲开始后5~105 ms期间的平均电流(I),并除以单通道电流幅值(i)可获得通道开放频率(NPo),其中N为膜片中的通道数目,Po为通道的平均时间开放概率。

2 结果

2.1 重组质粒的鉴定

重组质粒pGEX-6p-3/C-lobe_{E141G}经BamH I 和Not I 双酶切后的琼脂糖凝胶电泳图见图1。目的片段C-lobe_{E141G}约为240 bp,与图1显示明显亮带位置相符,说明C-lobe_{E141G}目的片段扩增成功。DNA测序

结果于NCBI数据库中进行Blast比对,结果显示,与Homo sapiens calmodulin 2 (CALM2) 相比,141位谷氨酸(E)对应的GAG碱基突变为甘氨酸(G)对应的GGG碱基(图2),其他碱基比对结果一致。证明质粒构建成功。

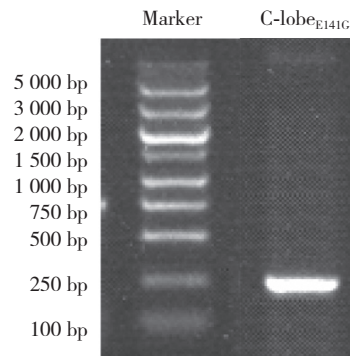


图1 重组质粒的酶切鉴定琼脂糖电泳图

Fig.1 Agarose electrophoresis of recombination plasmids digested by restriction endonuclease

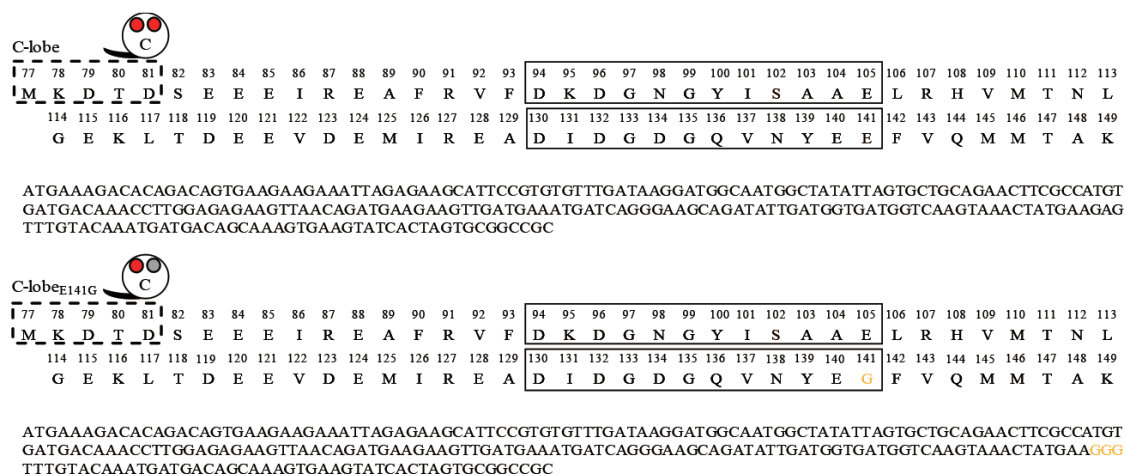


图2 C-lobe和C-lobe_{E141G}氨基酸序列及其各自对应的碱基序列图

Fig.2 Amino acid sequences and the corresponding base sequences of C-lobe and C-lobe_{E141G}

2.2 C-lobe_{E141G}蛋白纯度和浓度的测定

结果如图3所示,通过15% SDS-PAGE凝胶电泳检测纯化后的C-lobe_{E141G}蛋白,条带位置与预期结果大概一致,且杂带较少即纯度较高。采用BCA试剂盒测定蛋白浓度为0.98 g/L。

以上结果表明重组质粒能够高表达GST-C-lobe_{E141G}融合蛋白,纯化后获得高纯度、高浓度C-lobe_{E141G}蛋白。

2.3 C-lobe_{E141G}蛋白与CaV1.2钙通道preIQ片段的结合

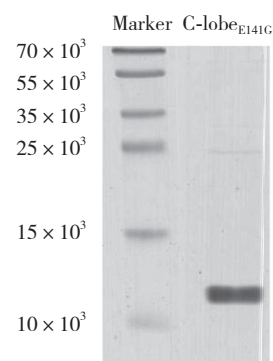


图3 纯化后的C-lobe_{E141G}蛋白SDS-PAGE图

Fig.3 SDS-PAGE of the purified C-lobe_{E141G}

GST pull-down结果显示,纯化后的C-lobe_{E141G}在2 mmol/L [Ca²⁺]条件下可与CaV1.2钙通道的preIQ片段浓度依赖性结合,表明本实验纯化的蛋白具有与CaV1.2钙通道结合的生物活性。见图4。

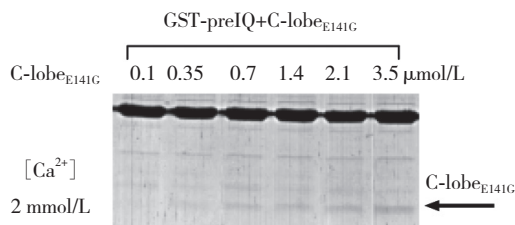


图4 C-lobe_{E141G}与GST-preIQ结合的SDS-PAGE图
Fig.4 SDS-PAGE of C-lobe_{E141G} binding to GST-preIQ

2.4 C-lobe_{E141G}蛋白对心肌钙通道的作用

膜片钳单通道膜内向外 (inside-out) 模式下记录通道电流时,由于人为改变细胞内环境,通道活性会随着记录时间下降,即“run-down”现象。CaM及ATP是恢复钙通道“run-down”的必要因子^[22]。结果显示,纯化后C-lobe_{E141G}蛋白可恢复已“run-down”的心肌钙通道活性至169%,表明本研究纯化的蛋白具有维持钙通道开放的电生理活性。见图5。

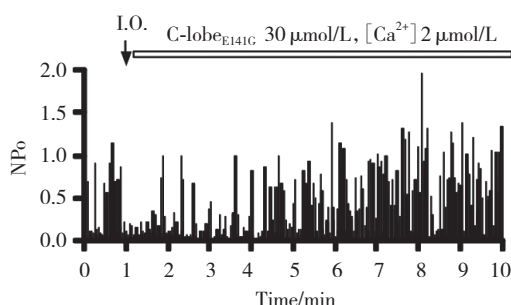


图5 C-lobe_{E141G}对CaV1.2的电生理作用
Fig.5 Electrophysiological effects of C-lobe_{E141G} on CaV1.2

3 讨论

研究^[13]表明,编码相同CaM的3个基因(CALM1、CALM2和CALM3)中的任一个基因突变都会导致罕见的危及生命的心律失常综合征,统称为CaM病,包括LQTS、儿茶酚胺诱发的心动过速(catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, CPVT),特发性心室颤动(idiopathic ventricular fibrillation, IVF)及重叠特征表型等。2016年BOCZEK等^[23]首次报道CaM突变体E141G(CaM_{E141G})导致C-lobe结构域的Ca²⁺亲和力降低,N-lobe的Ca²⁺亲和力没有显著变化;这不

仅扰乱了CaV1.2通道的CDI作用,也可以使NaV 1.5后期电流增强,是第1个显示出会影响成年心脏钠通道亚型的CaM突变体。当共表达野生型CaM与突变体CaM_{E141G}时,NaV1.5晚钠电流被修复,然而,3倍过量的野生型CaM却无法修复突变体CaM_{E141G}导致的CaV1.2通道CDI异常^[23]。SU等^[17]进一步研究发现,和CaM相比,CaM_{E141G}与CaV1.2通道的结合减少;但是在低钙状态下CaM_{E141G}与CaM相比变化并不明显。

2013年以来,通过全外显子组测序相继发现了与LQTS相关的多种CaM致病突变体^[12-16]。有趣的是,已知的这些突变位点均位于CaM的C-lobe上,除F142为紧邻EF-hand4钙结合环的第1个氨基酸,其余均是EF-hand钙结合环内与钙共价结合的位点。JENSEN等^[24]利用Gnom AD数据库对138 632例基因筛查发现的28个CaM突变位点散在分布于整个CaM上,并且只有1个位点位于C-lobe的钙结合位点上,这些突变体未有LQTS表型。说明并不是CaM的所有突变都会导致LQTS,只有突变发生在C-lobe上,并且影响C-lobe结合钙的能力,才可能导致LQTS,而此现象背后的机制尚未阐明。

本课题组前期研究^[20]显示,CaM的N-lobe和C-lobe均可钙依赖性与CaV1.2通道结合而调节通道功能;当以CaM全长为研究对象研究CaM突变体E141G对CaV1.2功能的影响时,N-lobe仍保持一定的生理活性,尤其干扰在低钙条件下观察C-lobe突变对通道结合的影响。采用CaM截短蛋白C-lobe_{E141G},可排除CaM的N-lobe对通道的调节,直接观察突变对CaM的C-lobe作用的影响。

综上所述,本研究成功构建LQTS相关C-lobe_{E141G}载体,并制备高浓度高纯度C-lobe_{E141G}蛋白,可作为研究LQTS相关的CaM突变位点集中于C-lobe结构域这一现象,以及CaM突变体通过其C环干扰CaV1.2通道CDI作用机制的基础。CaM突变引发的严重LQTS,临床上治疗的传统药物或方法(β受体阻断剂、苯妥英、螺内酯、钾以及单腔起搏器等)效果并不理想,因此寻找新的治疗靶点具有重要的临床意义。本研究为探究CaM突变引发的LQTS的发生机制及寻找新的治疗靶点提供了材料基础。

参考文献:

[1] PALLIEN T, KLUSSMANN E. New aspects in cardiac L-type Ca²⁺

- channel regulation [J]. *Biochem Soc Trans*, 2020, 48 (1) : 39-49. DOI: 10.1042/BST20190229.
- [2] PITT GS, MATSUI M, CAO CK. Voltage-gated calcium channels in nonexcitable tissues [J]. *Annu Rev Physiol*, 2021, 83: 183-203. DOI: 10.1146/annurev-physiol-031620-091043.
- [3] VERGNOL A, TRAORÉ M, PIETRI-ROUXEL F, et al. New insights in CaV β subunits: role in the regulation of gene expression and cellular homeostasis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 880441. DOI: 10.3389/fcell.2022.880441.
- [4] BEN-JOHN M, YUE DT. Calmodulin regulation (calmodulation) of voltage-gated calcium channels [J]. *J Gen Physiol*, 2014, 143 (6) : 679-692. DOI: 10.1085/jgp.201311153.
- [5] CATTERALL WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca $^{2+}$ channels [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000, 16: 521-555. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.16.1.521.
- [6] HOFMANN F, FLOCKERZI V, KAHL S, et al. L-type CaV1.2 calcium channels: from in vitro findings to in vivo function [J]. *Physiol Rev*, 2014, 94 (1) : 303-326. DOI: 10.1152/physrev.00016.2013.
- [7] BENMOCHA GUGGENHEIMER A, ALMAGOR L, TSEMAKHOVICH V, et al. Interactions between N and C termini of α 1C subunit regulate inactivation of CaV1.2 L-type Ca (2+) channel [J]. *Channels*, 2016, 10 (1) : 55-68. DOI: 10.1080/19336950.2015.1108499.
- [8] HAN DY, MINOBE E, WANG WY, et al. Calmodulin- and Ca $^{2+}$ -dependent facilitation and inactivation of the Cav1.2 Ca $^{2+}$ channels in guinea-pig ventricular myocytes [J]. *J Pharmacol Sci*, 2010, 112 (3) : 310-319. DOI: 10.1254/jphs.09282fp.
- [9] AMES JB. L-type Ca $^{2+}$ channel regulation by calmodulin and CaBP1 [J]. *Biomolecules*, 2021, 11 (12) : 1811. DOI: 10.3390/biom11121811.
- [10] GAUBERG J, ELKHATIB W, SMITH CL, et al. Divergent Ca $^{2+}$ /calmodulin feedback regulation of CaV1 and CaV2 voltage-gated calcium channels evolved in the common ancestor of Placozoa and Bilateria [J]. *J Biol Chem*, 2022, 298 (4) : 101741. DOI: 10.1016/j.jbc.2022.101741.
- [11] PATE P, MOCHCA-MORALES J, WU Y, et al. Determinants for calmodulin binding on voltage-dependent Ca $^{2+}$ channels [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275 (50) : 39786-39792. DOI: 10.1074/jbc.M007158200.
- [12] URRUTIA J, AGUADO A, MUGURUZA-MONTERO A, et al. The crossroad of ion channels and calmodulin in disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (2) : 400. DOI: 10.3390/ijms20020400.
- [13] CROTTI L, SPAZZOLINI C, TESTER DJ, et al. Calmodulin mutations and life-threatening cardiac arrhythmias: insights from the International Calmodulinopathy Registry [J]. *Eur Heart J*, 2019, 40 (35) : 2964-2975. DOI: 10.1093/eurheartj/ehz311.
- [14] ADLER A, NOVELLI V, AMIN AS, et al. An international, multicenter, evidence-based reappraisal of genes reported to cause congenital long QT syndrome [J]. *Circulation*, 2020, 141 (6) : 418-428. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.043132.
- [15] HUSSEY JW, LIMPITIKUL WB, DICK IE. Calmodulin mutations in human disease [J]. *Channels*, 2023, 17 (1) : 2165278. DOI: 10.1080/19336950.2023.2165278.
- [16] WANG KQ, BROHUS M, HOLT C, et al. Arrhythmia mutations in calmodulin can disrupt cooperativity of Ca $^{2+}$ binding and cause misfolding [J]. *J Physiol*, 2020, 598 (6) : 1169-1186. DOI: 10.1113/JP279307.
- [17] SU JY, GAO QH, YU LF, et al. The LQT-associated calmodulin mutant E141G induces disturbed Ca $^{2+}$ -dependent binding and a flickering gating mode of the CaV1.2 channel [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020, 318 (5) : C991-C1004. DOI: 10.1152/ajpcell.00019.2020.
- [18] CHIN D, MEANS AR. Calmodulin: a prototypical calcium sensor [J]. *Trends Cell Biol*, 2000, 10 (8) : 322-328. DOI: 10.1016/s0962-8924(00)01800-6.
- [19] LIANG HY, DEMARIA CD, ERICKSON MG, et al. Unified mechanisms of Ca $^{2+}$ regulation across the Ca $^{2+}$ channel family [J]. *Neuron*, 2003, 39 (6) : 951-960. DOI: 10.1016/s0896-6273(03)00560-9.
- [20] SHAO DX, ZHAO MM, XU JJ, et al. The individual N- and C-lobes of calmodulin tether to the Cav1.2 channel and rescue the channel activity from Run-down in ventricular myocytes of guinea-pig heart [J]. *FEBS Lett*, 2014, 588 (21) : 3855-3861. DOI: 10.1016/j.febslet.2014.09.029.
- [21] BANERJEE R, YODER JB, YUE DT, et al. Bilobal architecture is a requirement for calmodulin signaling to CaV1.3 channels [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115 (13) : E3026-E3035. DOI: 10.1073/pnas.1716381115.
- [22] KAMEYAMA M, MINOBE E, SHAO DX, et al. Regulation of cardiac Cav1.2 channels by calmodulin [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (7) : 6409. DOI: 10.3390/ijms24076409.
- [23] BOCZEK NJ, GOMEZ-HURTADO N, YE D, et al. Spectrum and prevalence of CALM1-, CALM2-, and CALM3-encoded calmodulin variants in long QT syndrome and functional characterization of a novel long QT syndrome-associated calmodulin missense variant, E141G [J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2016, 9 (2) : 136-146. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.115.001323.
- [24] JENSEN HH, BROHUS M, NYEGAARD M, et al. Human calmodulin mutations [J]. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11: 396. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00396.

(编辑 武玉欣)