

钙调磷酸酶 B 亚基钙结合位点的突变对 B 亚基结构和功能的影响*

尹燕霞¹⁾ 佟丽¹⁾ 黄建华²⁾ 姜国华^{1,2)†}

(1)北京师范大学生命科学学院,北京市基因工程药物及生物技术重点实验室,100875,北京;

2)北京师范大学分析测试中心,100875,北京)

摘要 应用远紫外 CD 光谱、紫外差光谱、内源荧光光谱以及 ANS 荧光光谱,探究了钙调磷酸酶 B 亚基钙结合位点的突变对 B 亚基结构和功能的影响.结果显示:钙结合位点突变体 Y105W 激活 CNA 的能力强于 CNB;而 E110Q 活化 CNA 的能力弱于 CNB;Y105W 和 E110Q 与 Ca²⁺亲和性低于 CNB;CNB 和它的突变体二级结构趋于一致,但三级结构存在明显差异,这种差异可能是它们功能差异的结构基础.

关键词 钙调磷酸酶;Ca²⁺;磷酸酶活性;三级结构;钙结合位点

中图分类号 Q556

DOI: 10.12202/j.0476-0301.2020199

钙调磷酸酶(calcineurin, CN)是目前所知的唯一一种活性受 Ca²⁺/CaM 调节的 Ser/Thr 蛋白磷酸酶^[1].它在 T 细胞活化、细胞凋亡、学习记忆、Ca²⁺依赖的信号转导等过程中起着重要的作用^[2-5].CN 是由 CNA 和 CNB 亚基按 1:1 的比例组成的异二聚体.CNA 是催化亚基,相对分子质量为 (6.0~6.1)×10⁴,包含催化结构域、CNB 结合区、CaM 结合区以及自抑制区 4 个结构域^[6-8].B 亚基为调节亚基,相对分子质量为 1.92×10⁴,由 2 个球状结构域 N 端结构域和 C 端结构域组成,每个结构域上有 2 个 Ca²⁺结合位点,这 2 个结构域呈线状排列,并和双亲性的 C 端 β-strand 形成一个 3.3 nm 的疏水沟与 CNA 相互作用^[9-10].

CNB 有 4 个 EF-hand Ca²⁺结合位点,它们在维持全酶的完整性、磷酸酶活性及免疫抑制剂复合物识别 CN 等方面起着重要的作用.Ca²⁺在 CNA 和 CNB 相互作用中起着重要作用,在 Ca²⁺存在的条件下,CNA 和 CNB 才能形成异二聚体^[11].在没有 CNB 的条件下,即使有 CaM,CNA 也只有很弱的磷酸酶活性^[12].免疫抑制剂复合物与 CN 的结合依赖于 CNB,Ca²⁺与 CNB 结合是免疫抑制剂复合物结合到 CN 的必要条件^[13].CNA 的磷酸酶活性被 2 个 Ca²⁺结合蛋白 CaM 和 CNB 所调节.结合 Ca²⁺是 CNB 发挥其功能的必要条件,CNB 的每个 Ca²⁺结合位点都有 5 个氨基酸与 Ca²⁺配位,结合 Ca²⁺后 CNB 形成一个疏水沟槽与 CNA

结合^[9-10].

CNB 发挥对 CNA 的激活作用依赖其钙结合位点与 Ca²⁺的结合,而 B 亚基钙结合位点的改变会使 CNB 结构发生哪些变化,以及这些变化如何影响其功能的发挥,一直未见详细的文献报道.本研究对 Ca²⁺结合位点的 Tyr105 和 Glu110 进行定点突变,表达和纯化这些突变体,研究这些突变体对 CNA 的激活作用,应用 CD 光谱、紫外差光谱、内源荧光光谱和疏水荧光探针等方法,研究这些突变对 CNB 结构和功能的影响.这些结果将有利于进一步深化对 CNB 结构和功能的认识.

1 实验材料

Ampicillin、IPTG、PMSF、DTT、PNPP、ANS 为 Sigma 公司产品. Phenyl-Sepharose、DEAE-FF、Sephadex G75 为 Pharmacia 公司产品. CaM、CNA 和 CNB 参照魏群教授等的方法制备^[14-15].其他试剂均采用分析纯.

2 实验方法

2.1 质粒构建 利用 PCR 重复延伸法进行定点突变,制备 Y105W、E110Q 突变体基因.PCR 扩增条件:先 94 °C 预变性 10 min;94 °C 变性 1 min、42 °C 退火 2 min、72 °C 延伸 2 min,循环 25 次;然后 72 °C 延

* 国家自然科学基金资助项目(30770478)

† 通信作者:姜国华(1962—),男,博士,教授.研究方向:蛋白质结构和功能. E-mail: jgh982@bnu.edu.cn

收稿日期:2020-05-18

伸 10 min. 载体和目的 DNA 酶切连接到载体 pET21a 上, 筛选得到阳性重组子, 转化受体细胞 BL21plysS(DE₃), 测序得到含有目的 DNA 的菌落.

2.2 突变体表达与纯化 CNB 及其突变体表达与纯化参见文献 [16–17]. 按细菌培养液的 1/10 体积向菌体沉淀中加入 Buffer A (20 mmol · L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.4)、1.0 mmol · L⁻¹ EDTA、1.0 mmol · L⁻¹ β-巯基乙醇、0.2 mmol · L⁻¹ PMSF), 重悬菌体, 超声破碎, 4 °C 15 000 r · min⁻¹ 离心 30 min, 取上清液经 20 mmol · L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.4) 缓冲液平衡好的 DEAE-FF 离子交换层析柱, 用 10 倍柱体积洗涤杂蛋白, 用含有 0.2 mol · L⁻¹ NaCl 的 20.0 mmol · L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.4) 洗出目的蛋白溶液. 向目的蛋白溶液中加入 NaCl 和 CaCl₂ 使其终浓度分别为 0.5 mol · L⁻¹ 和 1.0 mmol · L⁻¹, 将此蛋白质溶液经 Buffer B (20.0 mmol · L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.4)、0.5 mmol · L⁻¹ CaCl₂、1.0 mmol · L⁻¹ β-巯基乙醇) 平衡的 Phenyl-Sepharose CL-4B 疏水层析柱, 用含有 0.5 mol · L⁻¹ NaCl Buffer B 和无 NaCl Buffer B 洗去杂蛋白. 用 Buffer C (20.0 mmol · L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.4)、1.0 mmol · L⁻¹ EGTA、0.5 mmol · L⁻¹ DTT) 洗出所需蛋白. 经 Sephadex G75 凝胶过滤, 纯化得到高纯度蛋白.

2.3 CN 活性测定 测活方法参见文献 [17–18]. 以 20.0 mmol · L⁻¹ PNPP 为底物, 测活缓冲液是 50.0 mmol · L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.4)、0.5 mmol · L⁻¹ MnCl₂、3.0 mmol · L⁻¹ CaCl₂、0.5 mmol · L⁻¹ DTT、0.2 mg · mL⁻¹ BSA. 测活溶液中 CNB 及突变体和 CaM 与 CNA 摩尔比均为 1 : 1. 30 °C 反应 20 min (体积 0.2 mL), 加入 1.8 mL 终止液 (0.5 mmol · L⁻¹ Na₂CO₃、20.0 mmol · L⁻¹ EDTA) 终止反应, 测定 410 nm 的吸光值. 活性为水解 PNPP 的物质的量除以时间 (nmol · min⁻¹).

2.4 CD 谱和二级结构的测定 CD 谱在 Jasco 700 型自动分光偏振光仪上测定, 测定温度为 25 °C. 蛋白质量浓度 1.0 mg · mL⁻¹、Ca²⁺ 浓度 3.0 mmol · L⁻¹、样品池光径 1.0 cm. 依据 Jasco 公司的 Chen 和 Yang 方法计算 α-螺旋、β-转角和无规卷曲的所占比例.

2.5 紫外差光谱测定 紫外差光谱在 Shinadzu UV365 型可见-紫外光谱仪上测定, 测定温度 25 °C. 蛋白质量浓度 0.5 mg · mL⁻¹、Ca²⁺ 浓度 3.0 mmol · L⁻¹、样品池光径 1.0 cm, 测定样品在 240~320 nm 的紫外吸收.

2.6 内源荧光光谱测定 内源荧光光谱在 FLUOR MAX-2 型荧光光谱仪上测定, 测定温度 25 °C. 蛋白质量浓度 0.2 mg · mL⁻¹、Ca²⁺ 浓度 3.0 mmol · L⁻¹、样品池光径 1.0 cm、激发波长 285.0 nm、狭缝宽度 2.5 nm, 记录发射谱.

2.7 ANS 荧光光谱测定 ANS 荧光光谱在 FLUOR

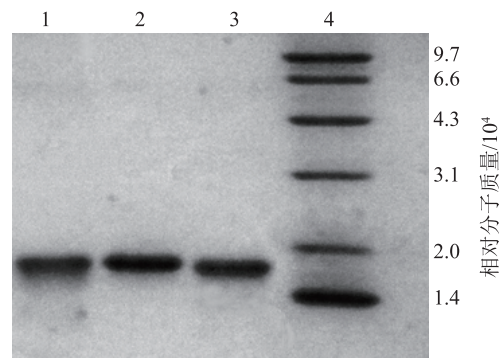
MAX-2 型荧光光谱仪上测定, 测定温度为 25 °C. 样品蛋白质量浓度为 0.1 mg · mL⁻¹、ANS 浓度为 50.0 μmol · L⁻¹、激发波长为 345 nm、狭缝宽度为 5 nm.

2.8 CNB 及其突变体与 Ca²⁺ 亲和性测定 内源荧光法测定 CNB、Y105W 和 E110Q 与 Ca²⁺ 亲和性参照 Grabarek^[19] 方法. CNB、Y105W 和 E110Q 的蛋白浓度均为 10.0 μmol · L⁻¹, Ca²⁺ 浓度分别为 0.06、0.13、0.5、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、3.0、4.0、6.0 mmol · L⁻¹. 于 FLUOR MAX-2 型荧光光谱仪上测定样品的内源荧光发射光谱. 测定 CNB 和 E110Q 时激发波长为 280.0 nm, 狭缝宽度 2.5 nm; 测定 Y105W 时激发波长为 280.0 nm, 狭缝宽度 1.5 nm.

3 结果

3.1 CNB 突变体 Y105W、E110Q 构建、表达、纯化

通过 PCR 重复延伸法、双酶切电泳分析、测序得到了目的突变体 Y105W 和 E110Q. 表达纯化后得到了电泳纯的 CNB、Y105W 和 E110Q 蛋白, 三者有着相同的电泳迁移率, 相对分子质量大小约为 1.9 × 10⁴ (图 1).



1. E110Q; 2. Y105W; 3. CNB; 4. protein marker.

图 1 CNB 及其突变体蛋白的 SDS-PAGE 分析

3.2 CNB 及其突变体对 CNA 磷酸酶活性的影响 CNB 本身并不具有磷酸酶功能, 但它可激活 CNA 的磷酸酶活性. 从图 2 可以看出, CNB 及其突变体对 CNA 磷酸酶比活性有着不同的影响, 不论 CaM 存在与否, CNB 及其突变体均可提高 CNA 的磷酸酶比活性, 但是激活程度存在着明显的差异. Y105W 激活程度高于 CNB, 而 E110Q 激活程度却低于 CNB. 表明 CNB 钙结合位点的这些氨基酸对其功能有着重要的影响.

3.3 Ca²⁺ 对 CNB 及其突变体二级结构的影响 利用远紫外 CD 谱研究了 CNB 及其突变体的二级结构特点及 Ca²⁺ 对其二级结构的影响. 分别计算了结合 Ca²⁺ 前后, CNB 及其突变体二级结构 α-螺旋、β-折叠、β-转角和无规卷曲的比例, 结果见表 1.

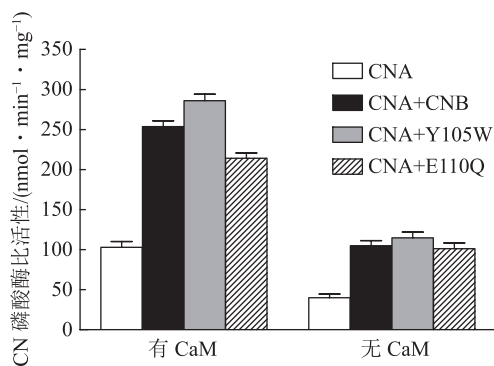


图2 CNB及其突变体蛋白对CNA磷酸酶比活性的影响

表1 CNB及其突变体的二级结构组成 %

项目	二级结构	CNB	Y105W	E110Q
无Ca ²⁺	α-螺旋	19.9	16.4	21.2
	β-折叠	42.2	37.9	37.4
	转角	3.3	10.8	6.5
	无规卷曲	34.6	34.8	34.9
有Ca ²⁺	α-螺旋	28.3	29.8	28.3
	β-折叠	39.2	32.9	36.9
	转角	2.7	7.2	1.2
	无规卷曲	29.9	30.1	33.0

由表1可知,与Ca²⁺结合后,CNB的α-螺旋比例由19.9%增至28.3%,无规卷曲由34.6%降至29.9%;Y105W的α-螺旋比例由16.4%增至29.8%,无规卷曲则由34.8%降至30.1%;E110Q的α-螺旋由21.2%增至28.3%,无规卷曲由34.9%降至33.0%。表明Ca²⁺能够诱导CNB及其突变体的α-螺旋比例上升,无规卷曲比例降低,分子有序性增强。

3.4 Ca²⁺对CNB及其突变体三级结构的影响 紫外吸收光谱的变化反映了生色团所在的微环境的变化,即分子的三级结构变化。从图3-a、b可以看出,无论Ca²⁺是否存在,CNB及其突变体Y105W和E110Q的紫外吸收光谱均存在着明显的差异。这表明CNB和其突变体在三级结构上存在着明显的差异。CNB的定点突变改变了其三级结构。

Ca²⁺能够诱导CNB及其突变体产生负的紫外差谱,结合Ca²⁺后CNB和它的突变体的紫外吸收峰强度都低于未结合Ca²⁺的紫外吸收强度(图3-c~e,这表明CNB及其突变体与Ca²⁺结合后,其分子构象发生了变化,使原本位于分子内部疏水环境的生色团暴露于极性高的溶剂环境中,导致负差谱的产生。

内源荧光光谱的变化显示了荧光生色团所处微环境的变化,即分子三级结构的变化^[17]。CN和突变体E110Q分子中没有Trp残基,只有3个Tyr(Tyr6、

Tyr98、Tyr105)残基,因此它们表现出Tyr荧光光谱特征,发射峰位于306 nm附近(图4-a);而Y105W由于将Tyr105突变成Trp,因此它的荧光光谱表现为Trp荧光光谱的特征,发射峰位于335 nm处(图4-d)。无论Ca²⁺是否存在,突变体E110Q的荧光强度均明显低于CNB的强度(图4-a、b),表明E110Q的分子构象与CNB有较大的差异。CNB及其突变体与Ca²⁺结合后,其荧光光谱均发生显著变化(图4-c~e),与Ca²⁺结合CNB的荧光强度增加了30%,E110Q增加了15%;而含有Trp的Y105W的荧光强度下降了64%,因此Ca²⁺与CNB及其突变体结合后能够导致其分子构象发生改变。

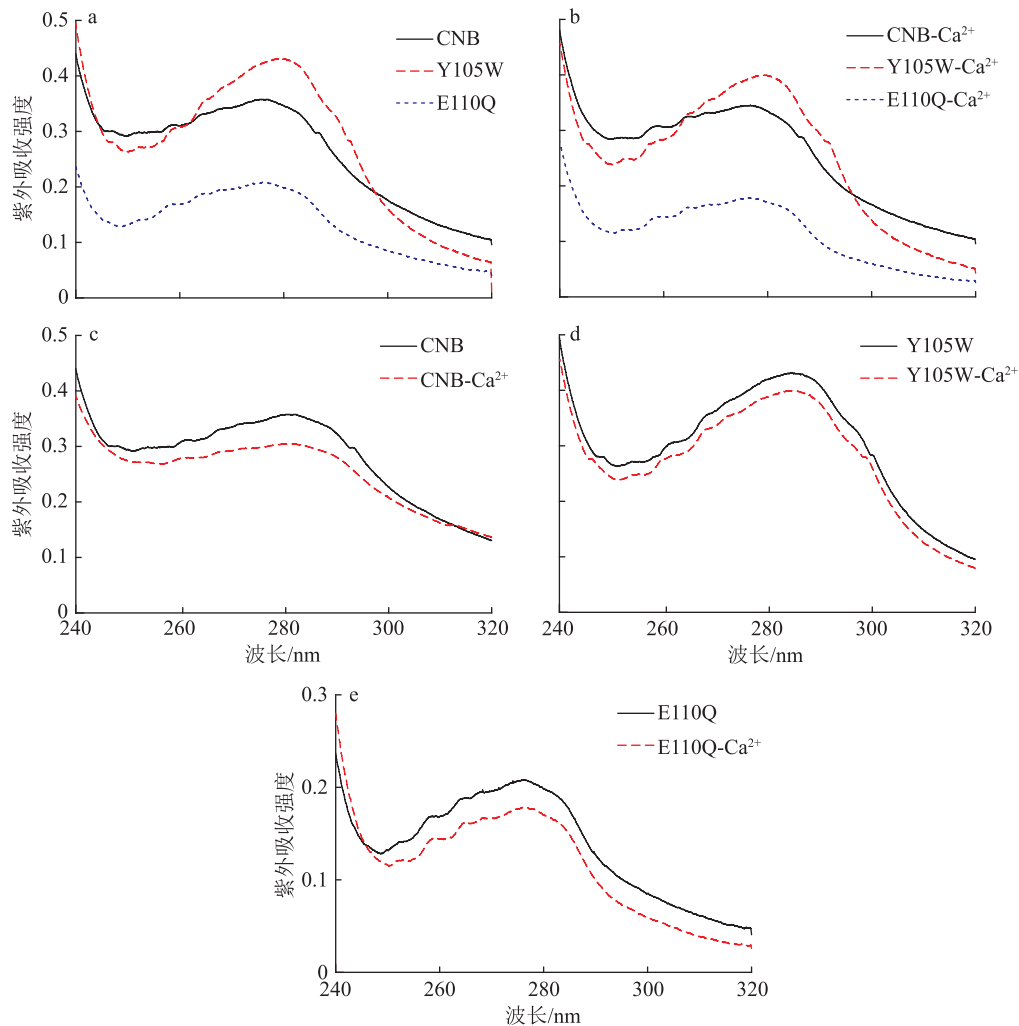
3.5 Ca²⁺对CNB及其突变体表面疏水性的影响

ANS是一种疏水荧光探针,它与蛋白质结合不影响蛋白质的结构,并且它只结合在蛋白质表面的疏水区域,而不与单个疏水氨基酸残基相作用。CNB主要依靠疏水作用与CNA相互作用。本文利用ANS作为探针研究Ca²⁺对CNB及其突变体表面疏水性质的影响。图5-a~c显示CNB及其突变体结合Ca²⁺后,三者的ANS荧光光谱均出现明显变化,结合在CNB上的ANS荧光强度由 $2.25 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ 增至 $8.73 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$,最大发射波长由503 nm蓝移至469 nm;结合在Y105W上的ANS荧光强度由 $2.84 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ 增至 $9.14 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$,最大发射波长由503 nm蓝移至469 nm;结合在E110Q上的ANS荧光强度由 $2.31 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ 增加至 $6.75 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$,最大发射波长由499 nm蓝移至470 nm。结合Ca²⁺后,结合在Y105W上的ANS荧光强度高于CNB的,而结合在E110Q的ANS荧光强度低于CNB的(图5-d)。由此可见,CNB及其突变体结合Ca²⁺后,结合在其上的ANS荧光强度大幅度增加,最大发射峰蓝移。表明Ca²⁺与CNB及其突变体结合导致其表面疏水性增强。

3.6 CNB、E110Q和Y105W的Ca²⁺亲和性 利用蛋白质内源荧光测定CNB及其钙结合位点突变体与Ca²⁺亲和性的变化(图6)。CNB的 $1/2 \Delta F_{\max}$ 对应Ca²⁺浓度为 $0.82 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$;Y105W的Ca²⁺浓度为 $1.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$;而E110Q的Ca²⁺浓度则为 $1.55 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,与Ca²⁺的亲和性由大到小排序为CNB、Y105W、E110Q。表明钙结合位点突变后,突变体的Ca²⁺亲和性降低。

4 讨论

CNB是CN的重要调节亚基,CNA自身只有很弱的磷酸酶比活性,CNB与CNA结合能够降低CN的 K_m 值,提高其催化效率^[13]。Perrino等^[20]认为,CNB结合Ca²⁺诱导CNA催化口袋构象改变,降低了

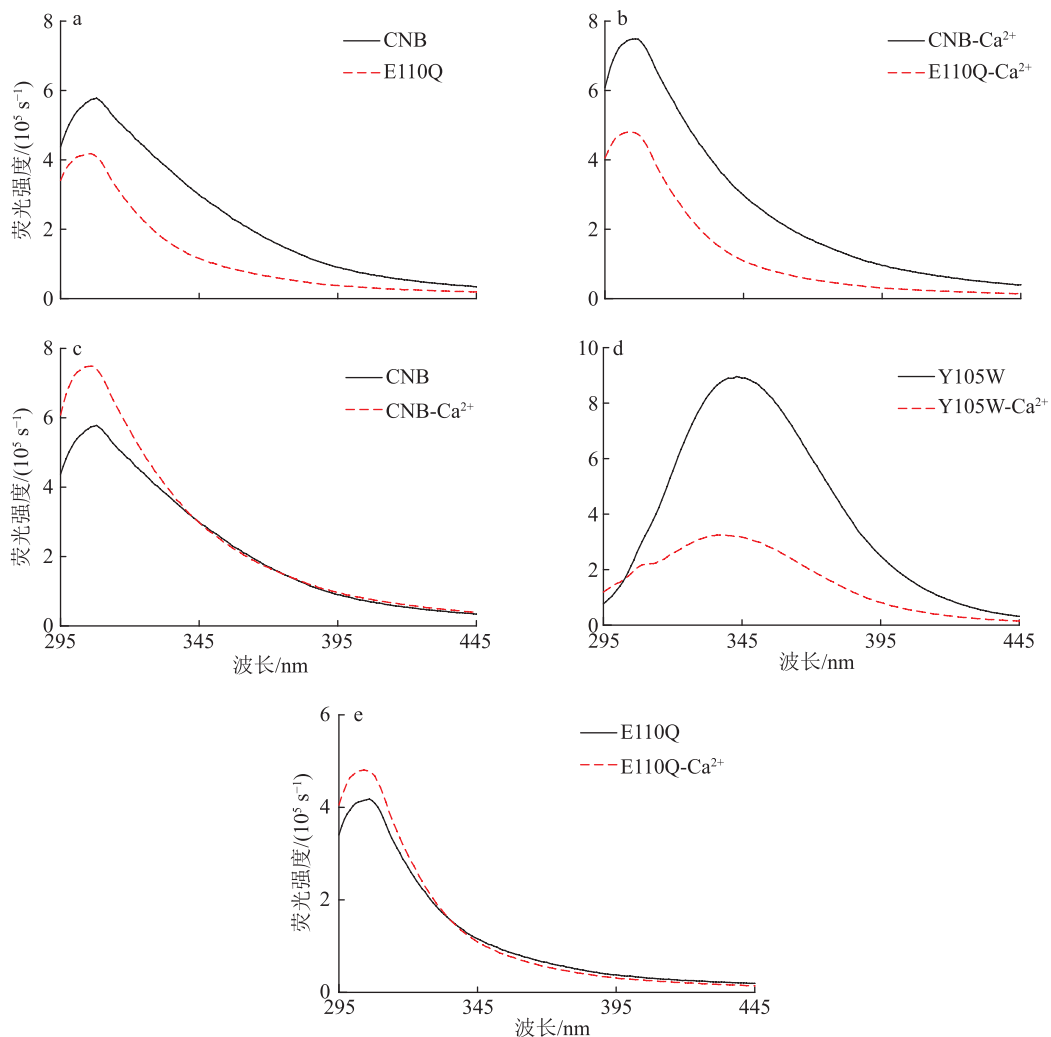


a. CNB 及其突变体的紫外吸收光谱; b. 存在 Ca^{2+} 时, CNB 及其突变体的紫外吸收光谱; c~e. Ca^{2+} 对 CNB 及其突变体紫外吸收光谱的影响. 各图的 $P < 0.001$, 均有显著的统计学差异.

图 3 Ca^{2+} 对 CNB 及其突变体紫外吸收光谱的影响

底物的 K_m . Watanabe 等^[21]将 CNA 的疏水氨基酸 (Val349、Phe350、Phe356 和 Val357) 突变成亲水的 Glu 或 Gln, 结果这种突变阻止了其野生型 CNB 的结合及野生型 CNB 对其的活化, 后来他们又将 CNB 的 Val115/Leu116 突变成 Glu, 结果显示, 这一突变体结合 CNA 和活化 CNA 的能力均大幅度降低. 他们认为疏水作用是 CNB 与 CNA 结合的重要维系力. 结合 4 个 Ca^{2+} 后, CNB 的 2 个结构域和 C-端 β -Strand 共同形成一个 3.3 nm 的疏水沟槽, 与 CNA 的 BBH 疏水上端通过疏水作用结合. 这种结构是 CNB 被 Ca^{2+} 饱和所形成的, 但是 CNB 是如何由无 Ca^{2+} 的非活性构象转变成被 Ca^{2+} 饱和的活性构象, 以及这一过程中表面疏水性变化情况, 是一个值得深入研究的问题. 本文利用远紫外 CD 谱、内源荧光光谱、紫外吸收光谱等方法, 研究了 Ca^{2+} 对 CNB 及其突变体二级、三级结构的影响. 利用疏水荧光探针 ANS 研究了 Ca^{2+} 对

CNB 及其突变体表面疏水性质的影响. 远紫外 CD 谱显示结合 Ca^{2+} 后, CNB 及其突变体出现 α -螺旋比例上升、无规卷曲比例下降、分子有序性升高等现象, 且结合 Ca^{2+} 后 CNB 及其突变体在二级结构上趋于一致, 这一结果提示 Ca^{2+} 可能是通过与主链羰基配位确定蛋白分子的二级结构. 紫外吸收光谱显示结合 Ca^{2+} 后, CNB 及其突变体均出现负的紫外差光谱. 陈旭等^[22]在研究 Ca^{2+} 与 CaM 相互作用时, 也发现 CaM 结合 Ca^{2+} 后出现负的紫外差光谱, 他们认为结合 Ca^{2+} 使 CaM 中的 α -螺旋比例上升, 疏水区域暴露, 结果导致负的紫外差光谱的出现, 这与本文的实验结果相似, 但 CNB 与其突变体紫外吸收光谱却有明显的差异. 内源荧光光谱显示 Ca^{2+} 与 CNB、E110Q 结合后, 其内源荧光强度有不同程度的升高, 而 Y105W 内源荧光强度出现下降. 出现这一现象是因为 CNB、E110Q 分子内无 Trp, 主要生色团是 Tyr, 结

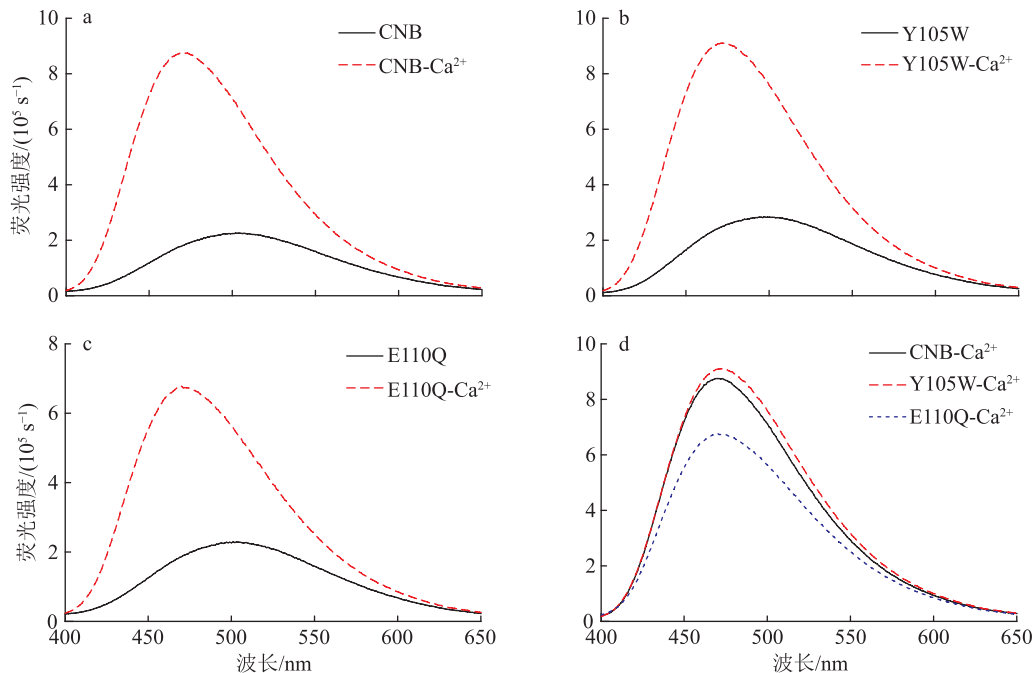


a. CNB 及其突变体 E110Q 的内源荧光光谱; b. 存在 Ca^{2+} 时, CNB 及 E110Q 内源荧光光谱; c~e. Ca^{2+} 对 CNB 及其突变体 Y105W、E110Q 的内源荧光光谱影响. 各图的 $P < 0.001$, 均有显著的统计学差异.

图 4 Ca^{2+} 对 CNB 及其突变体内源荧光光谱的影响

合 Ca^{2+} 后荧光强度上升的原因是分子结构变得更为紧凑^[23]. Y105W 由于分子内有 Trp 残基, 结合 Ca^{2+} 后荧光强度剧烈下降, 表明结合 Ca^{2+} 以前 Trp105 埋于分子内部的疏水区域内, 结合 Ca^{2+} 后, 分子的三级结构发生变化, 疏水区域暴露, 使得 Trp 暴露于分子表面, 其环境极性增强, 造成荧光猝灭. CNB 表面疏水性是其活化 CNA 磷酸酶比活性的重要结构基础, Ca^{2+} 通过改变 CNB 表面疏水性达到调节 CN 磷酸酶的比活性^[21], ANS 荧光光谱能够显示蛋白质表面的疏水强度. ANS 荧光光谱显示结合 Ca^{2+} 后, CNB 及其突变体的 ANS 荧光强度大幅上升, 发射峰蓝移. 这表明其表面疏水性增强. 综上所述, Ca^{2+} 与 CNB 及其突变体结合后引起其二、三级结构的变化导致其表面疏水性增强, 有利于其与 CNA 的结合; 结合 Ca^{2+} 后 CNB 和其突变体二级结构差异不大, 而三级结构却存在有明显的差异.

CNA 和 CNB 的重组需要 Ca^{2+} 的参加, CNB 分子上有 4 个 EF-hand 钙结合位点, 每个 Ca^{2+} 被 5 个配基所包绕, Ca^{2+} 与配基形成五角双锥全氧螯合的几何结构^[9, 13]. EF-hand 3 是 Ca^{2+} 的高亲和位点, Asp99、Asp101、Asp103、G110 和 Tyr105 是与 Ca^{2+} 配位的 5 个氨基酸. 我们发现将 Tyr105 突变成 Trp105 的突变体 Y105W 后, 激活 CNA 酶活性的能力比 CNB 提高了 13%; 而将 Glu110 突变成 Gln110 的突变体 E110Q 后, 激活 CNA 酶活性的能力下降了 15%. 荧光滴定实验显示, 突变体 Y105W 和 E110Q 的 Ca^{2+} 的结合能力均有不同程度的降低. 这些特性与 Tyr105 和 Glu110 的钙配位特性密切相关. X-射线衍射晶体结构显示 Tyr105 的主链羰基参与 Ca^{2+} 配位, 侧链基团没有参与 Ca^{2+} 配位. Tyr105 与 Ca^{2+} 形成的配位键键长最短, 键能最大. 在无 Ca^{2+} 条件下, Y105W 的二级结构不同于 CNB, 其 α -螺旋比例明显低于 CNB. 而与 Ca^{2+}



Ca²⁺对 CNB (a)、Y105W(b)、E110Q(c)ANS 荧光光谱的影响; 存在 Ca²⁺时的 CNB 及其突变体的 ANS 荧光光谱 (d). 各图的 $P < 0.001$, 均有显著的统计学差异.

图 5 ANS 与 CNB 及其突变体的相互作用

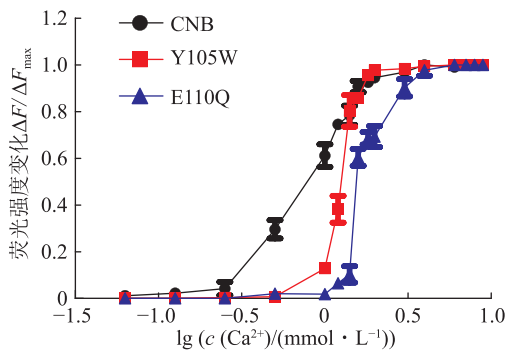


图 6 CNB 及其突变体的 Ca²⁺滴定

结合后, Y105W 与 CNB 在二级结构上趋于一致, 并且二者的 α -螺旋比例均上升. 与 CNB 有很高同源性的钙结合蛋白 CaM 也有类似现象^[22]. Meyer 等^[24]认为 Ca²⁺与配基相结合所释放的自由能驱动 CaM 分子由无活性的关闭状态, 转变成有活性开放状态. Ca²⁺与 CNB 及其突变体结合后, 其分子也由无活性状态变为有活性状态, 在二级结构方面表现为 α -螺旋比例上升, 这种变化的动力很可能来自 Ca²⁺与配基结合所释放的能量. Y105W 在无 Ca²⁺时 α -螺旋比例比 CNB 低, 与 Ca²⁺结合后形成与 CNB α -螺旋比例相似的活性状态, 这一过程可能需要较 CNB 更多的能量, 这可能是 Ca²⁺亲和性降低的原因之一. 另一种可能是将 Tyr 替换成 Trp 后, Trp 的配位能力可能低于 Tyr, 它的配位键键能较小, 与 Ca²⁺配位后释放的能量也较少, 难于形成有利于 Ca²⁺继续配位的

空间结构, 导致 Ca²⁺亲和性降低. 但是由于 Trp 的侧链基团比 Tyr 的大, 因此其空间位阻也大, 这可能有利于稳定 CNB 活性状态的构象. ANS 荧光光谱显示结合 Ca²⁺后, Y105W 表面疏水性强于 CNB 的疏水性(图 5-d), 这可能导致了其对 CNA 激活作用也强于 CNB(图 2). E110 与 Ca²⁺配位不同于 Tyr 与 Ca²⁺配位, E110 除主链羰基与 Ca²⁺配位外, 其侧链羰基氧也与 Ca²⁺配位, 因此 Ca²⁺除了束缚主链羰基外, 对侧链也有束缚作用, 这种作用可能对分子的空间构象产生较大的影响. Gln 与 Glu 分子大小性质非常相似, 但是 Gln 失去了侧链 Ca²⁺配位基团. 因此 E110Q 与 Ca²⁺结合少了一个配位键. 无论是否与 Ca²⁺结合, E110Q 的二级结构与 CNB 相差不大, 可见用 Gln 代替 Glu 对整个分子主链构象影响不大, 但是由于 Gln 侧链没有能配位的羰基, 因此 Glu110 侧链失去了束缚, 使其空间结构发生改变, 导致其 Ca²⁺亲和性降低, 并且 ANS 荧光光谱显示结合 Ca²⁺后, E110Q 表面疏水性明显弱于 CNB 的疏水性(图 5-d), 这也使其对 CNA 激活作用弱于 CNB(图 2). 尽管在无 Ca²⁺条件下, Y105W 与 E110Q 二级结构差异较大, 但与 Ca²⁺结合后二级结构趋于一致, 这表明 Ca²⁺与主链羰基配位对主链的构象影响相似, 侧链基团的差异可能更大程度地影响分子的空间结构. 总之, Y105W 和 E110Q 所表现出与 CNB 不同的特性, 与它们和 Ca²⁺配位的特点密切相关.

5 参考文献

- [1] RUSNAK F, MERTZ P. Calcineurin: form and function[J]. *Physiological Reviews*, 2000, 80(4): 1483
- [2] LIU J, FARMER J D Jr, LANE W S Jr, et al. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes[J]. *Cell*, 1991, 66(4): 807
- [3] SHIBASAKI F, KONDO E, AKAGI T, et al. Suppression of signalling through transcription factor NF-AT by interactions between calcineurin and Bcl-2[J]. *Nature*, 1997, 386(6626): 728
- [4] CZIRJÁK G, ENYEDI P. Targeting of calcineurin to an NFAT-like docking site is required for the calcium-dependent activation of the background K⁺ channel, TRESK[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(21): 14677
- [5] PARRA V, ROTHERMEL B A. Calcineurin signaling in the heart: the importance of time and place[J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2017, 103: 121
- [6] HUBBARD M J, KLEE C B. Functional domain structure of calcineurin A: mapping by limited proteolysis[J]. *Biochemistry*, 1989, 28(4): 1868
- [7] SONG R W, LI J, ZHANG J, et al. Peptides derived from transcription factor EB bind to calcineurin at a similar region as the NFAT-type motif[J]. *Biochimie*, 2017, 142: 158
- [8] MA Y P, JIANG G H, WANG Q R, et al. Enzymatic and thermodynamic analysis of calcineurin inhibition by RCAN1 [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 72: 254
- [9] GRIFFITH J P, KIM J L, KIM E E, et al. X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex[J]. *Cell*, 1995, 82(3): 507
- [10] KISSINGER C R, PARGE H E, KNIGHTON D R, et al. Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex[J]. *Nature*, 1995, 378(6557): 641
- [11] MILAN D, GRIFFITH J, SU M, et al. The latch region of calcineurin B is involved in both immunosuppressant-immunophilin complex docking and phosphatase activation[J]. *Cell*, 1994, 79(3): 437
- [12] PERRINO B A, FONG Y L, BRICKEY D A, et al. Characterization of the phosphatase activity of a baculovirus-expressed calcineurin A isoform[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(22): 15965
- [13] FENG B, STEMMER P M. Interactions of calcineurin A, calcineurin B, and Ca²⁺[J]. *Biochemistry*, 1999, 38(38): 12481
- [14] WEI Q, LEE E Y. Expression and reconstitution of calcineurin A and B subunits[J]. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1997, 41(1): 169
- [15] QIN Y L, YU D Y, WEI Q. Function and structure of recombinant single chain calcineurin[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 308(1): 87
- [16] LEI H, LUO J, TONG L, et al. Quercetin binds to calcineurin at a similar region to cyclosporin A and tacrolimus[J]. *Food Chemistry*, 2011, 127(3): 1169
- [17] 尹燕霞, 黄建华, 姜国华. 钙离子对钙调神经磷酸酶B亚基结构和功能的影响[J]. *北京师范大学学报(自然科学版)*, 2019, 55(2): 220
- [18] KAKALIS L T, KENNEDY M, SIKKINK R, et al. Characterization of the calcium-binding sites of calcineurin B[J]. *FEBS Letters*, 1995, 362(1): 55
- [19] GRABAREK Z, TAN R Y, WANG J, et al. Inhibition of mutant troponin C activity by an intra-domain disulphide bond[J]. *Nature*, 1990, 345(6271): 132
- [20] PERRINO B A, NG L Y, SODERLING T R. Calcium regulation of calcineurin phosphatase activity by its B subunit and calmodulin[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(1): 340
- [21] WATANABE Y, PERRINO B A, SODERLING T R. Activation of calcineurin A subunit phosphatase activity by its calcium-binding B subunit[J]. *Biochemistry*, 1996, 35(2): 562
- [22] 陈旭, 周玉祥, 徐育敏. 稀土离子和钙调蛋白重组的紫外差光谱及电泳研究[J]. *科学通报*, 1996, 41(21): 1982
- [23] YAO Y H, SCHOENEICH C, SQUIER T C. Resolution of structural changes associated with calcium activation of calmodulin using frequency domain fluorescence spectroscopy[J]. *Biochemistry*, 1994, 33(25): 7797
- [24] MEYER D F, MABUCHI Y, GRABAREK Z. The role of Phe-92 in the Ca²⁺-induced conformational transition in the C-terminal domain of calmodulin[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(19): 11284

Structure and function of calcineurin B subunit: mutation in the calcium binding site

YIN Yanxia¹⁾ TONG Li¹⁾ HUANG Jianhua²⁾ JIANG Guohua^{1,2)†}

(1) College of Life Sciences, Beijing Key Laboratory of Genetic Engineering Drugs and Biotechnology, Beijing Normal University, 100875, Beijing, China;

2) Analysis and Testing Center, Beijing Normal University, 100875, Beijing, China)

Abstract Effect of mutations in the calcium binding site on calcineurin B subunit structure and function was investigated, by far ultraviolet CD spectrum, ultraviolet difference spectrum, endogenous fluorescence spectrum and ANS fluorescence spectrum. It was found that calcium binding site mutant CNB-Y105W was stronger than wild type CNB to activate CNA, but CNB-E110Q was weaker. The affinity of CNB-Y105W and CNB-E110Q for Ca^{2+} was both found to be lower than CNB. The secondary structures were found to be similar among CNB and the 2 mutants, but their tertiary structures showed significant differences, consistent with their differences in protein activity.

Keywords calcineurin; Ca^{2+} ; phosphatase activity; tertiary structure; calcium binding site

【责任编辑: 武 佳】