

双分子荧光互补系统分析S-periaxin蛋白的聚合

任页玫 石亚伟*

(化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西大学生物技术研究所, 太原 030006)

摘要 S-periaxin蛋白是施旺氏细胞特异性表达的一种蛋白, 在维持髓鞘的稳定方面发挥重要作用, 该蛋白基因的突变引起腓骨肌萎缩症4F亚型的发生。Periaxin基因由于mRNA剪切方式的不同可以编码两种长短不同的含PDZ结构域的蛋白, 即L-periaxin和S-periaxin。两种蛋白在施旺氏细胞的定位存在明显的差异, 相对L-periaxin而言, S-periaxin无论是分子结构还是生物学功能均未见相关研究。该文从大鼠的施旺氏细胞系RSC96克隆了S-periaxin基因, 构建了原核表达载体pET-M-3C-S-periaxin, 在大肠杆菌中进行重组表达, 经Ni-NTA亲和柱和Sephacryl S-200凝胶层析柱获得电泳纯的目的蛋白。体外戊二醛交联分析蛋白的聚合状态表明, S-periaxin蛋白在体外易于形成不同聚合度的聚合物。免疫共沉淀也表明, S-periaxin蛋白存在同源蛋白间相互作用。另外, 构建了原、真核双分子荧光互补系统, 并利用该系统分析了细胞内S-periaxin蛋白间的相互作用。

关键词 periaxin; 施旺氏细胞; 戊二醛交联; 免疫共沉淀; 双分子荧光互补

Analysis of Protein Interaction Between S-periaxin by Bimolecular Fluorescence Complementation Assay

Ren Yemei, Shi Yawei*

(Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering, Ministry of Education, China;
Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract Periaxin is expressed by myelinating Schwann cells and plays an essential role in stabilizing the Schwann cell-axon unit in the myelinated fibers of the vertebra. Mutations in the *periaxin* gene are known to cause autosomal recessive demyelinating Charcot-Marie-Tooth (CMT4F). *Periaxin* gene encodes L-periaxin and a truncated isoform, S-periaxin, which have an N-terminal PDZ domain and are targeted differently in the Schwann cell. The molecular structure and biological function of S-periaxin are unknown to date. In this work, the DNA sequence encoding S-periaxin was cloned into the vector pET-M-3C to form a recombinant plasmid pET-M-3C-S-periaxin. The recombinant protein was overexpressed in *E.coli* BL21 and purified by Ni-NTA column and Sephacryl S-200 column. S-periaxin was easy to form the different degree of polymerization *in vitro* by glutaraldehyde crosslinking. S-periaxin could homodimerize with coimmunoprecipitation. In addition, bimolecular fluorescence complementation (BiFC) system was developed by splitting mCherry. BiFC demonstrated S-periaxin could also form homodimer in *E.coli* BL21 and RSC96 cell.

Key words periaxin; Schwann cells; glutaraldehyde crosslinking; coimmunoprecipitation; bimolecular fluorescence complementation (BiFC)

收稿日期: 2014-02-28 接受日期: 2014-05-12

国家自然科学基金(批准号: 31170748)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0351-7018268, E-mail: yaweishi@sxu.edu.cn

Received: February 28, 2014 Accepted: May 12, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31170748)

*Corresponding author. Tel: +86-351-7018268, E-mail: yaweishi@sxu.edu.cn

网络出版时间: 2014-07-25 17:03

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.08.0062.html>

髓鞘是包裹在轴突外面的一层膜,其作用是保护神经元并使神经冲动在神经元上得到快速传递。在周围神经系统中,成串排列的施旺细胞以1:1的关系呈螺旋状包裹轴突,形成类似同心圆板层“髓鞘”。成熟的髓鞘由蛋白质和脂类组成,目前已经鉴定了小鼠坐骨神经髓鞘的545种蛋白,其中P0、periaxin和髓鞘基底蛋白分别占到了髓鞘总蛋白的21%、16%和8%^[1]。Periaxin是外周神经系统髓鞘化的施旺氏细胞特异性表达蛋白^[2]。Periaxin基因的突变将导致神经元和施旺细胞间通讯发生紊乱,从而引发常染色体隐性遗传病腓骨肌萎缩症(Charcot-Marie-Tooth disease, CMT)4F亚型的发生^[3-4]。Periaxin蛋白也可成簇聚集于小鼠六角形晶状体纤维细胞的各连接点上,与ankyrin-B、spectrin、NrCAM、filensin、ezrin和desmoyokin等膜蛋白共同组成一个高分子复合物,该复合物的形成在晶纤维细胞的正确聚集、分布及形态的维持等方面均具有重要作用^[5]。Periaxin基因由于mRNA剪切方式的不同可以编码两种长短不同的含PDZ结构域的蛋白,即L-periaxin和S-periaxin。人源的L-periaxin由1461个氨基酸组成,含有PDZ、核输入信号区(nuclear localization signal, NLS)、重复序列区(repeat domain)和酸性结构域区(acidic domain)四个结构域。而小分子S-periaxin由147个氨基酸组成。除C末端20个氨基酸残基外,两个蛋白1~127序列中包括大约90个氨基酸残基的PDZ结构域是完全一致的^[6]。

L-periaxin蛋白可以由其上的NLS区域介导核输入^[7],又可通过NLS区域和肌营养不良蛋白2(dystroglycan-dystrophin-related protein 2, DRP2)结合参与肌营养不良蛋白聚糖复合物(dystrophin-glycoprotein complex)的形成,将施旺氏细胞膜骨架连接到基底膜上^[8]。对于L-periaxin及S-periaxin蛋白的PDZ结构域尚未发现相应的配体,特别是S-periaxin的功能仍不明确。

PDZ结构域一般是由80~100个氨基酸残基折叠组装成的紧密球状结构,该结构域作为一个蛋白-蛋白相互作用元件^[9],可以调节蛋白亚细胞定位,特别是膜蛋白的定位。此外,PDZ可以和蛋白质或多肽配体、脂质体相结合,也可以形成同源或异源二聚体,参与到蛋白质复合体的组装、细胞内运输、离子通道等信号通路。本文利用RT-PCR从施旺氏细胞系RSC96中扩增了S-periaxin的编码序列,并在原

核细胞实现大量的重组表达,对含PDZ结构域的S-periaxin蛋白的聚合状态进行了体内外分析。

1 材料与方法

1.1 生化试剂

TRNzol、反转录试剂盒、TransStart FastPfu DNA Polymerase、TransTaq HiFi DNA Polymerase、T4 DNA ligase均购自TransGen Biotech公司;EcoR I、Sal I、Hind III、BamH I、Not I、Nhe I、Xho I、Kpn I均为TaKaRa公司产品;Ni-Agarose亲和柱、Sephacryl S-200凝胶层析柱均购自GE公司;TurboFect *in vivo* Transfection Reagent转染试剂购自Fermentas公司;IP细胞裂解液、Protein A+G Agarose、anti-myc以及其他抗体均为碧云天生物技术研究产品;戊二醛、氯仿、异丙醇、无水乙醇等均为国产分析纯试剂。

1.2 菌种和细胞株

E. coli BL21(DE3): 基因型: F⁻ *ompT hsdS_B(f_B⁻m_B⁻)*, *gal dcm*(DE3)。

大鼠施旺氏细胞(RSC96)购于中国科学院细胞库。用含10%无支原体胎牛血清的DMEM(高糖,含丙酮酸钠)培养液在37 °C、5% CO₂及饱和湿度的培养箱中培养。

1.3 实验方法

1.3.1 pET-M-3C-S-periaxin重组载体的构建 利用Trizol法提取RSC96细胞总RNA,经反转录试剂盒(TransGen Biotech)将RNA反转录为cDNA。根据S-periaxin基因序列设计引物,上游引物为: 5'-GAG GAA TTC ATG GAG GCC AGG AGC CGG AGT GCC GAG GAG CTG AGG CGG GCG GAG-3'(EcoR I);下游引物为: 5'-CGA GTC GAC TCA CGG CGC AGA GAC CGG ATC GCT GGG GCA GTC CAG GGC-3'(Sal I)。以cDNA为模板,经PCR扩增,将S-periaxin基因通过EcoR I/Sal I双酶切后克隆到载体pET-M-3C上,获得重组质粒pET-M-3C-S-periaxin。

1.3.2 His-S-periaxin重组蛋白的表达与纯化 将重组质粒pET-M-3C-S-periaxin转化*E. coli* BL21,涂布于LB固体平板(含100 μg/mL氨苄青霉素),37 °C倒置培养约为12 h。挑取菌落于5 mL含氨苄青霉素(100 μg/mL)的LB液体培养基中,37 °C培养约7 h,以2%接种至1 L新鲜LB液体培养基(含100 μg/mL氨苄青霉素)中,37 °C培养,D₆₀₀达到0.6~0.8时,加入

IPTG使其终浓度为0.3 mmol/L, 16 °C过夜诱导培养, 8 000 r/min离心10 min后收集菌体。

将菌体悬浮于1×Binding Buffer(20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 5 mmol/L imidazole, pH7.9)中, 冰浴超声破碎菌体, 4 °C 12 000 r/min离心30 min, 收集上清。利用Ni-NTA亲和柱和Sephacryl S-200凝胶层析柱纯化His-S-periaxin蛋白(按说明书操作进行), 收集相应的目标蛋白洗脱峰, 获得His-S-periaxin蛋白, 蛋白浓缩后, 储存于4 °C。

1.3.3 戊二醛交联 将上述获得的重组蛋白His-S-periaxin经P10柱置换为磷酸缓冲液(含50 mmol/L Na₂-HPO₄-NaH₂PO₄, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L DTT和1 mmol/L EDTA), 取等量的重组蛋白, 加入0.01%的戊二醛, 分别交联反应的时间为0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10 min, 用50 mmol/L Tris(pH8.0)终止反应^[10], 然后进行SDS-PAGE分析。

1.3.4 免疫共沉淀 将RSC96细胞接种于6孔板, 当细胞密度达到80%, 按照TurboFect *in vivo* Transfection Reagent转染试剂说明, 将重组质粒pEGFP-C3/pCMV-Tag-3B-*S-periaxin*和pEGFP-C3-*S-periaxin*/pCMV-Tag-3B-*S-periaxin*分别共转染RSC96细胞, 使其在细胞内共表达蛋白GFP/Myc-*S-periaxin*和GFP-*S-periaxin*/Myc-*S-periaxin*。转染36 h后收集细胞, 用300 μL细胞裂解液[20 mmol/L Tris-HCl(pH7.5), 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF), sodium pyrophosphate, β-glycerophosphate, EDTA, Na₅VO₄, leupeptin]冰上裂解30 min, 4 °C、14 000 r/min离心20 min, 取上清。将上清与2 μg anti-myc抗体于4 °C过夜孵育, 然后加入20 μL充分重悬的Protein A+G Agarose, 4 °C孵育4 h, 2 500 r/min离心5 min, 小心吸除上清, 用漂洗缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 10% glycerol, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EGTA, pH7.5)洗涤沉淀3次, 加入40 μL 1×SDS-PAGE电泳上样缓冲液重悬沉淀, 100 °C处理5 min后进行SDS-PAGE和Western blot检测。

1.3.5 双分子荧光互补实验的基因克隆和载体构建 利用PCR将编码红色荧光蛋白(mCherry)的基因在编码159和160氨基酸的基因位置切开^[11], 获得的两个基因片段cherry1-159、cherry160-237分别克隆到pQE-30、pET-28a载体上, 构建含有红色荧光蛋白N-端1~159基因片段和C-端160~237基因片段的

原核双分子荧光互补分析载体pmCherry1-159-N1和pmCherry160-237-C1。

同理, 以pmCherry-C1为模板, PCR扩增mCherry1-159与mCherry160-237基因片段, 插入到载体pEGFP-N1、pEGFP-C1上, 构建真核双分子荧光互补分析载体pMN1-159、pMC160-237。

以pTO-T7-GFP为模板, 利用PCR扩增GFP基因, 克隆到载体pmCherry1-159-N1、pmCherry160-237-C1上, 构建pGFP-mCherry1-159和pmCherry160-237-GFP重组质粒, 用于验证双分子荧光互补(bimolecular fluorescence complementation, BiFC)系统。

将PCR扩增获得的*S-periaxin*基因分别利用BamH I/Kpn I和Sal I/Xho I双酶切后克隆到原核双分子荧光互补分析载体pmCherry1-159-N1、pmCherry160-237-C1上, 获得了重组载体pS-*periaxin*-Cherry(1-159)和pmCherry(160-237)-*S-periaxin*。另外, 将*S-periaxin*分别利用Xho I/Sal I、EcoR I/Sal I插入到真核双分子荧光互补分析载体pMN1-159、pMC160-237上, 构建pmyc-*S-periaxin*-MN1-159和pMC160-237-*S-periaxin*用于BiFC实验。

1.3.6 原核双分子荧光互补BiFC 将pmCherry1-159-N1/pmCherry160-237-C1、pGFP-mCherry1-159/pmCherry160-237-GFP或pS-*periaxin*-Cherry(1-159)/pmCherry(160-237)-*S-periaxin*分别转化或共同转化*E.coli* BL21, 涂布于含卡那霉素和氨苄青霉素的平板, 37 °C过夜倒置培养, 第2 d接种于5 mL LB培养基上, 37 °C培养3 h后, 加入0.3 mmol/L IPTG, 37 °C诱导3 h。菌体4 °C低温处理1 h后, 收集1 mL菌体, PBS Buffer洗涤菌体3次, 最后100 μL PBS Buffer悬起菌体^[12], 利用Delta Vision检测红色荧光。

1.3.7 Western blot分析 pS-*periaxin*-Cherry(1-159)/pmCherry(160-237)-*S-periaxin*共同转化*E.coli* BL21, 0.3 mmol/L IPTG诱导培养的菌体, 冰上超声破碎后于4 °C 13 000 r/min离心20 min, 取上清。将样品上样进行SDS-PAGE, 经半干法转印至PVDF膜上, 1×TBST洗涤3次(5 min/次), 5%脱脂奶粉室温封闭1 h, 1×TBST洗涤3次, 加入鼠源His标签抗体(1:500), 4 °C过夜, 1×TBST洗涤3次, 加入HRP标记的羊抗鼠IgG抗体(1:1 000), 室温孵育1 h, 1×TBST洗涤3次, 进行DAB显色。

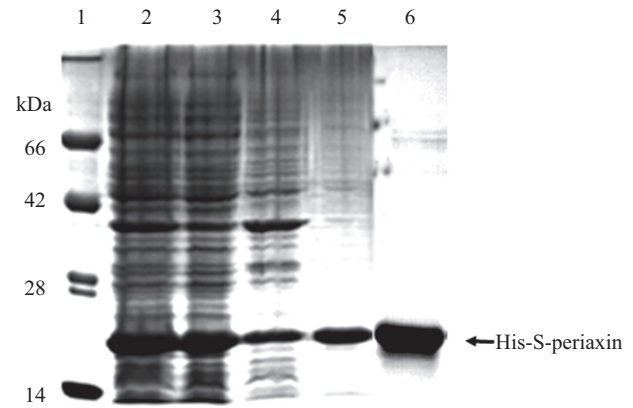
1.3.8 真核双分子荧光互补BiFC实验 将真核BiFC质粒pMN1-159/pMC160-237、pmyc-*S-periaxin*-

MN1-159/ pMC160-237-*S-periaxin*共转染RSC96细胞, 于37 °C的培养箱培养20 h后将细胞转到4 °C中放置1 h, 再将细胞恢复到37 °C培养15 min^[11]。用DAPI染色, 爬片利用*Delta Vision*进行观察。

2 结果

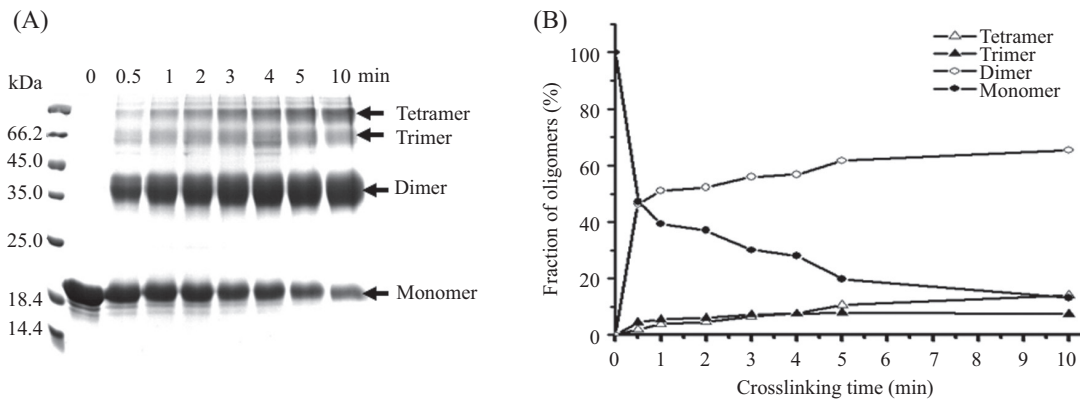
2.1 His-S-periaxin重组蛋白的表达与纯化

工程菌pET-M-3C-*S-periaxin*/*E.coli*经过0.3 mmol/L IPTG过夜诱导后, 收集菌体并超声破碎细胞, 取全菌、上清、沉淀的样品分别进行SDS-PAGE检测, 重组S-periaxin蛋白质在大肠杆菌中可溶性表达, 分子量大约为18 kDa, 与计算的分子量基本相符。经Ni-NTA亲和柱以及Sephacryl S-200凝胶层析纯化, 获得电泳纯的His-S-periaxin重组蛋白(图1)。



1: 蛋白质marker; 2: 全菌裂解液; 3: 上清; 4: 沉淀; 5: Ni-NTA亲和柱洗脱样品; 6: Sephacryl S-200凝胶层析柱洗脱样品。
1: protein marker; 2: whole cell lysis solution; 3: supernatant; 4: pre-precipitation; 5: elution fractions from Ni-NTA column; 6: elution fractions from Sephacryl S-200.

图1 12% SDS-PAGE分析His-S-periaxin重组蛋白的纯化过程
Fig.1 12% SDS-PAGE analysis of His-S-periaxin purification



A: 12% SDS-PAGE分析0.01%戊二醛交联His-S-periaxin不同时间后的分子聚合状态。B: 0.01%戊二醛交联反应不同时间后His-S-periaxin的各种聚合物的百分比。

A: 12% SDS-PAGE analysis of His-S-periaxin incubated with 0.01% glutaraldehyde for 0~10 min; B: quantification of the percentage of the molecular form of His-S-periaxin by 0.01% glutaraldehyde cross-linking.

图2 体外戊二醛交联分析重组His-S-periaxin聚合状态

Fig.2 Analysis of the molecular form by Cross-linking with glutaraldehyde

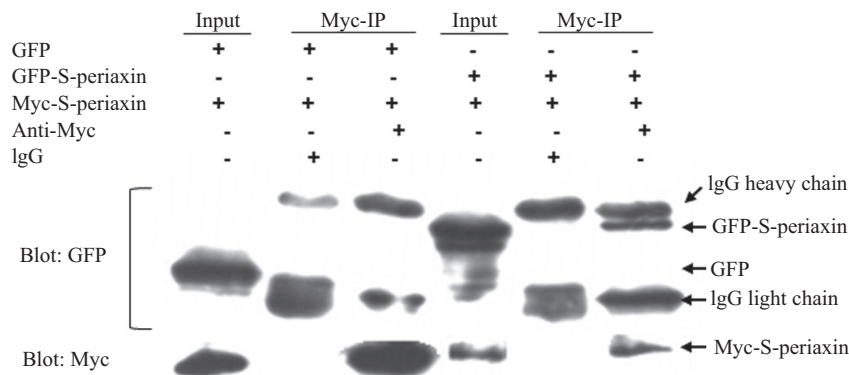


图3 免疫共沉淀分析S-periaxin蛋白相互作用

Fig.3 Analysis of the S-periaxin/S-periaxin interaction by co-immunoprecipitation

2.2 戊二醛交联

重组蛋白His-S-periaxin利用0.01%的戊二醛分别交联0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10 min, 经SDS-PAGE检测及Gel-Pro analyzer软件分析, 结果表明, 随着交联时间的延长, His-S-periaxin蛋白单体逐渐减少, 二聚体、三聚体和四聚体的含量逐渐增多, 且二聚体含量增加最为明显(图2)。

2.3 免疫共沉淀

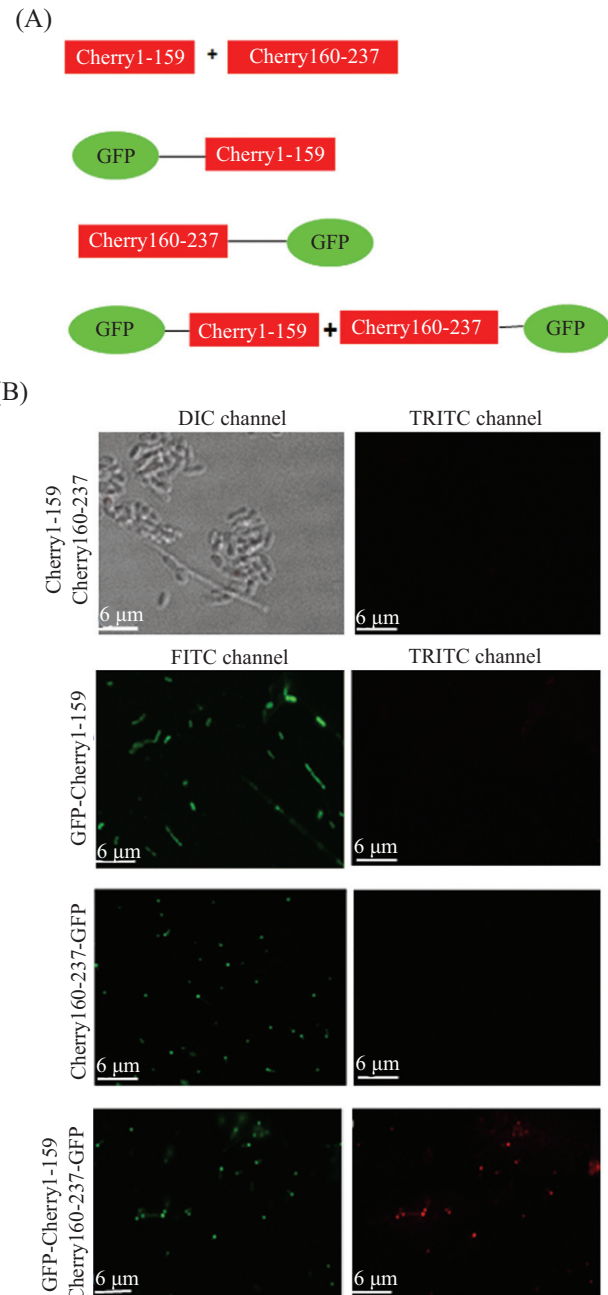
共表达GFP/Myc-S-periaxin或GFP-S-periaxin/Myc-S-periaxin蛋白的RSC96细胞, 裂解后收集细胞总蛋白, 以anti-Myc抗体沉淀免疫复合物, 沉淀经Western blot检测。结果如图3所示, 在共表达Myc-S-periaxin和GFP的免疫共沉淀复合物中只检测到Myc-S-periaxin蛋白, 而没有检测到GFP, 表明S-periaxin和GFP没有相互作用。在共表达Myc-S-periaxin和GFP-S-periaxin的免疫共沉淀复合物中检测到Myc-S-periaxin和GFP-S-periaxin蛋白, 而阴性对照组中均未检测到Myc-S-periaxin和GFP-S-periaxin, 表明S-periaxin蛋白间存在相互作用。

2.4 双分子荧光互补实验(BiFC)

GFP有较弱的相互作用以及二聚化的倾向^[13], GFP又可以作为荧光标签指示融合蛋白在细胞内的表达, 因此, 以GFP作为弱相互作用的一组蛋白来验证本文构建的双分子荧光互补原核系统具有可行性。将pmCherry1-159-N1和pmCherry160-237-C1共转*E. coli* BL-21, pGFP-mCherry1-159和pmCherry160-237-GFP分别单转或共转*E. coli* BL-21, 37 °C诱导目的蛋白表达, 菌体低温处理后, 利用Delta Vision进行绿色荧光及红色荧光的检测(图4A)。结果显示, 共表达的mCherry1-159和mCherry160-237两个多肽片段没有发出红色荧光, 单独表达的GFP-mCherry1-159或mCherry160-237-GFP只能检测到绿色荧光, 而看不到红色荧光的存在; 但如将GFP-mCherry1-159和mCherry160-237-GFP共表达在一个细胞内, 由于融合GFP蛋白间的相互作用, 将两个mCherry1-159和mCherry160-237距离拉近, 在激发光激发下发射红色荧光(图4B)。

2.5 S-periaxin蛋白相互作用

将pS-periaxin-Cherry(1-159)、pmCherry(160-237)-S-periaxin单转以及共转*E. coli* BL-21后, 于37 °C诱导目的蛋白表达。将菌液低温处理后, PBS洗菌液3次, 利用Delta Vision检测红色荧光。pS-periaxin-Cher-



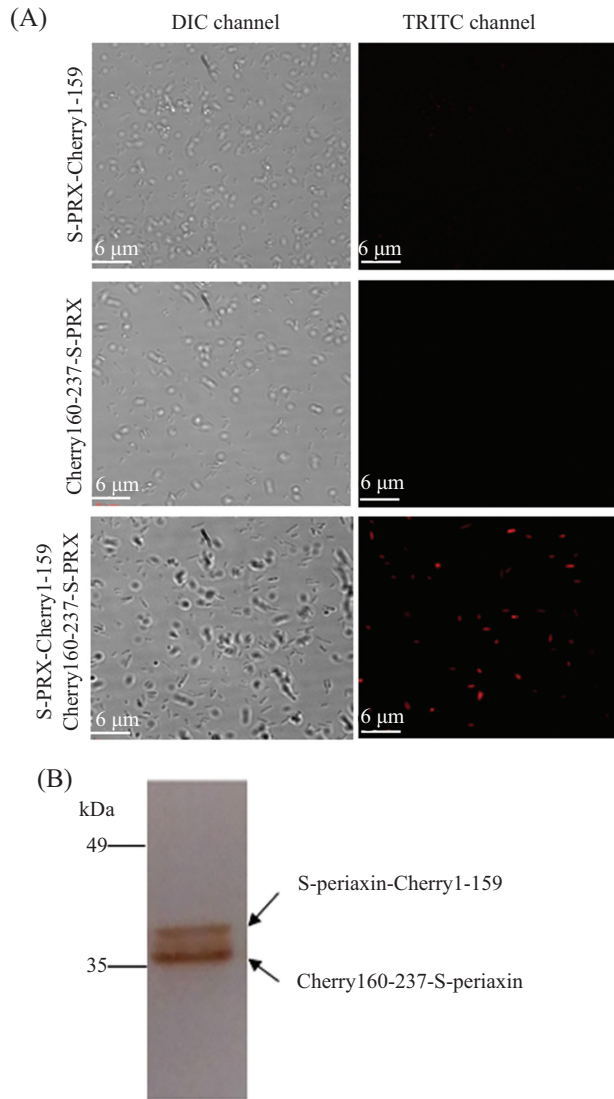
A: mCherry蛋白的原核BiFC载体与融合GFP载体的构建及共表达示意图; B: 基于mCherry的原核BiFC系统对GFP蛋白间较弱的相互作用验证。

A: schematic diagram of gene of splitted mCherry protein and fusing with GFP in prokaryotic BiFC system; B: BiFC assays to evaluate known GFP/GFP interaction.

图4 基于mCherry的双分子荧光互补原核系统的构建

Fig.4 Construction of the mCherry-based prokaryotic BiFC system

ry(1-159)和pmCherry(160-237)-S-periaxin单转后没有检测到红色荧光, 而pS-periaxin-Cherry(1-159)和pmCherry(160-237)-S-periaxin共转*E. coli* BL-21后检测到红色荧光(图5A)。结果表明, 在S-periaxin蛋白



A: 基于mCherry原核BiFC系统对S-periaxin相互作用分析; B: Western blot检测S-periaxin-Cherry1-159和Cherry160-237-S-periaxin重组蛋白在原核中的可溶性表达。

A: prokaryotic BiFC assays to evaluate S-periaxin/S-periaxin interaction; B: the soluble S-periaxin-Cherry1-159 and Cherry160-237-S-periaxin proteins were detected by anti-His antibody in Western blot.

图5 原核双分子荧光互补系统分析S-periaxin蛋白之间相互作用

Fig.5 Visualization of S-periaxin/S-periaxin interactions using prokaryotic BiFC system

的相互作用下, mCherry的两个片段重新组装, 恢复荧光功能。同时收集菌体, 经超声破碎、离心, 获得蛋白上清液, 经SDS-PAGE电泳、Western blot检测表明, S-periaxin-Cherry1-159和Cherry160-237-S-periaxin重组蛋白均可溶性表达, 排除表达蛋白沉淀假象(图5B)。

2.6 真核细胞内S-periaxin蛋白的相互作用

原核双分子荧光互补分析表明, S-periaxin蛋白

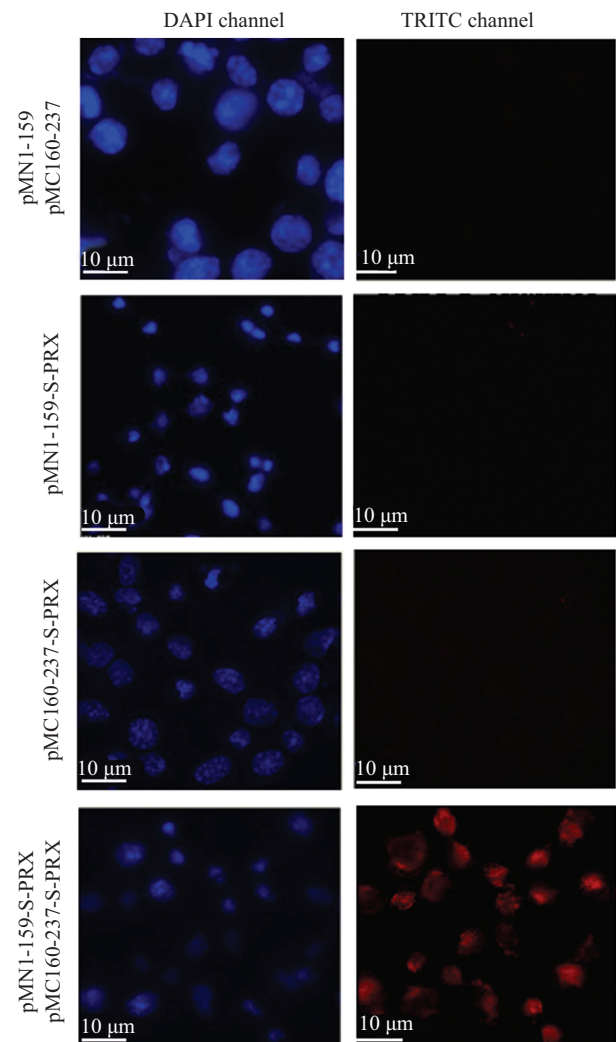


图6 利用真核双分子荧光互补系统在RSC96细胞内分析S-periaxin蛋白间的相互作用

Fig.6 Visualization of S-periaxin/S-periaxin interactions in RSC96 cells using eukaryotic BiFC system

之间存在相互作用。随后, 又利用真核双分子荧光互补分析S-periaxin在RSC96细胞内的相互作用。将真核BiFC质粒pMN1-159/pMC160-237共转RSC96细胞, 37 °C的培养箱培养20 h后, 4 °C处理1 h, 利用Delta Vision没有检测到红色荧光(图6)。同上将pmyc-S-periaxin-MN1-159和pMC160-237-S-periaxin单转RSC96细胞没有检测到红色荧光, 共转后检测到红色荧光(图6)。结果表明, 在RSC96细胞内, 通过S-periaxin蛋白之间的相互作用将Cherry的两片段重新组合, 因此检测到红色荧光, 同图5结果一致。

3 讨论

双分子荧光互补实验是近几年出现的一种新

技术, 该技术简单直观, 能够用于体内或体外蛋白质相互作用研究。此技术是将荧光蛋白切割成没有荧光的两段, 分别与诱饵蛋白和捕获蛋白融合, 只有在诱饵蛋白和捕获蛋白发生相互作用的情况下, 两段不完整的荧光蛋白多肽片段才会重新形成完整的分子结构, 发出荧光^[14]。为了了解细胞内S-periaxin的分子状态, 构建了基于mCherry的双分子荧光互补原核系统, 由于S-periaxin蛋白之间存在相互作用, 我们在真核系统以及原核系统均观察到在S-periaxin介导下将mCherry荧光蛋白的两个片段在空间上互相靠近互补, 重新组装形成荧光复合物, 发出红色荧光。对于双分子互补系统来讲, 原核系统相比真核系统有着更好的稳定性, 体现在原核的转染效率高, 又在双选择抗生素压力下进行, 体系的稳定性好, 保证进入视野的细胞两个重组子位于一个细胞内, 唯一的缺陷是要明确原核的重组蛋白是否以可溶性形式进行表达, 才可用于蛋白之间相互作用分析。真核系统优势恰是原核系统的短板, 可以很好地解决重组蛋白表达的问题, 但两个重组子的共转染率成为制约因素。原核系统显然在时间和经济上有着很好的优势。

除双分子荧光互补实验外, 本文还利用戊二醛交联、免疫共沉淀研究S-periaxin蛋白的聚合状态, 研究表明, S-periaxin蛋白存在相互作用, 有形成同源聚合物的能力, S-periaxin同源聚合物的形成是由PDZ结构域介导的。PDZ形成二聚体有以下几种方式: (1)通过N-端 β A链形成反向平行的 β 折叠片段, 如Shank1的PDZ^[15]; (2)通过大量对称 β 链的交换形成二聚体, 如ZO1-PDZ2^[16]; (3)通过半胱氨酸残基形成二硫键介导PDZ二聚体的形成, 如: PSD-95以头对头的方式形成二聚体, 在此过程中Cys3和Cys5起着重要的作用^[17]; PICK1蛋白通过Cys44形成分子间二硫键导致二聚化^[18]。那么, S-periaxin蛋白PDZ结构域是以何种方式形成二聚体的? 最近, Han等^[19]报道periaxin和AHNAK2两种蛋白的PDZ结构域序列相似度达到57%, 对L-periaxin、AHNAK2的PDZ进行晶体结构的分析, 表明它们均以交换缠绕的方式形成二聚体, 其为S-periaxin同源聚合物形成机制的研究提供了基础。

de Morree等^[20]的研究表明, AHNAK具有L-AHNAK和S-AHNAK两种亚型, S-AHNAK在细胞质中同L-AHNAK的N-端相互作用形成异源复合物,

其还可以在细胞核中形成同源二聚体与剪接体蛋白相互作用, 提高自身mRNA水平, 降低L-AHNAK的mRNA水平。Periaxin是目前报道的与AHNAK具有较高同源性的蛋白, 其基因同样由于mRNA剪切方式的不同, 编码了L-periaxin和S-periaxin两种亚型^[6], L-periaxin蛋白可通过其N-端的PDZ结构域形成同源二聚体^[8,21]。若将S-periaxin在U2OS细胞内表达, 其与S-AHNAK类似, 同样使S-AHNAK的mRNA水平升高, L-AHNAK的mRNA水平降低^[20]。S-periaxin能够调节AHNAK的mRNA水平, 其是单体的形式还是聚合物的形式进行调节? 是否通过同源分子及异源分子间的结合差异来从不同分子水平调节施旺氏细胞参与髓鞘化的功能? S-periaxin与L-periaxin间以及与S-AHNAK、L-AHNAK间的关系分析将是我们今后研究的一个方向。

参考文献 (References)

- 1 Patzig J, Jahn O, Tenzer S, Wichert SP, de Monasterio-Schrader P, Rosfa S, *et al.* Quantitative and integrative proteome analysis of peripheral nerve myelin identifies novel myelin proteins and candidate neuropathy loci. *J Neurosci* 2011; 31(45): 16369-86.
- 2 Scherer SS, Xu YT, Bannerman PG, Sherman DL, Brophy PJ. Periaxin expression in myelinating Schwann cells: Modulation by axon-glia interactions and polarized localization during development. *Development* 1995; 121(12): 4265-73.
- 3 Otagiri T, Sugai K, Kijima K, Arai H, Sawaishi Y, Shimohata M, *et al.* Periaxin mutation in Japanese patients with Charcot-Marie-Tooth disease. *J Hum Genet* 2006; 51(7): 625-8.
- 4 Kijima K, Numakura C, Shirahata E, Sawaishi Y, Shimohata M, Igarashi S, *et al.* Periaxin mutation causes early-onset but slow-progressive Charcot-Marie-Tooth disease. *J Hum Genet* 2004; 49(7): 376-9.
- 5 Maddala R, Skiba NP, Lalane R 3rd, Sherman DL, Brophy PJ, Rao PV. Periaxin is required for hexagonal geometry and membrane organization of mature lens fibers. *Dev Biol* 2011; 357(1): 179-90.
- 6 Dytrych L, Sherman DL, Gillespie CS, Brophy PJ. Two PDZ domain proteins encoded by the murine periaxin gene are the result of alternative intron retention and are differentially targeted in Schwann cells. *J Biol Chem* 1998; 273(10): 5794-800.
- 7 Sherman DL, Brophy PJ. A tripartite nuclear localization signal in the PDZ-domain protein L-periaxin. *J Biol Chem* 2000; 275(7): 4537-40.
- 8 Sherman DL, Fabrizi C, Gillespie CS, Brophy PJ. Specific disruption of a schwann cell dystrophin-related protein complex in a demyelinating neuropathy. *Neuron* 2001; 30(3): 677-87.
- 9 Ivarsson Y. Plasticity of PDZ domains in ligand recognition and signaling. *FEBS Lett* 2012; 586(17): 2638-47.
- 10 Sola M, Bavro VN, Timmins J, Franz T, Ricard-Blum S, Schoehn G, *et al.* Structural basis of dynamic glycine receptor clustering by gephyrin. *EMBO J* 2004; 23(13): 2510-9.

- 11 Fan JY, Cui ZQ, Wei HP, Zhang ZP, Zhou YF, Wang YP, *et al.* Split mCherry as a new red bimolecular fluorescence complementation system for visualizing protein-protein interactions in living cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 367(1): 47-53.
- 12 Tsuchisaka A, Theologis A. Heterodimeric interactions among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase polypeptides encoded by the Arabidopsis gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(8): 2275-80.
- 13 Phillips GN Jr. Structure and dynamics of green fluorescent protein. *Curr Opin Struct Biol* 1997; 7(6): 821-7.
- 14 Kerppola TK. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys* 2008; 37(1): 465-87.
- 15 Im YJ, Lee JH, Park SH, Park SJ, Rho SH, Kang GB, *et al.* Crystal structure of the Shank PDZ-ligand complex reveals a class I PDZ interaction and a novel PDZ-PDZ dimerization. *J Biol Chem* 2003; 278(48): 48099-104.
- 16 Chen J, Pan L, Wei Z, Zhao Y, Zhang M. Domain-swapped dimerization of ZO-1 PDZ2 generates specific and regulatory connexin43-binding sites. *EMBO J* 2008; 27(15): 2113-23.
- 17 Hsueh YP, Sheng M. Requirement of N-terminal cysteines of PSD-95 for PSD-95 multimerization and ternary complex formation, but not for binding to potassium channel Kv1.4. *J Biol Chem* 1999; 274(1): 532-6.
- 18 Shi Y, Yu J, Jia Y, Pan L, Shen C, Xia J, *et al.* Redox-regulated lipid membrane binding of the PICK1 PDZ domain. *Biochemistry* 2010; 49(21): 4432-9.
- 19 Han H, Kursula P. Periaxin and AHNAK nucleoprotein 2 form intertwined homodimers through domain swapping. *J Biol Chem* 2014; 289: 14121-31..
- 20 de Morree A, Droog M, Moursel LG, Bisschop IJ, Impagliazzo A, Frants RR, *et al.* Self-regulated alternative splicing at the AHNAK locus. *Faseb J* 2012; 26(1): 93-103.
- 21 Wu LM, Williams A, Delaney A, Sherman DL, Brophy PJ. Increasing internodal distance in myelinated nerves accelerates nerve conduction to a flat maximum. *Curr Biol* 2012; 22(20): 1957-61.