

人钙激活中性蛋白酶-1 及-2 催化亚基的生物信息学分析*

徐国强^{1**}, 胡晓霞¹, 潘 娅¹, 董宇华¹, 张金娟², 张 敏¹, 张祥令³, 臧贵勇⁴, 熊 英², 王旭东¹, 陈腾祥¹

(1. 贵阳医学院 生理学教研室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵阳医学院 机能实验室, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵阳医学院 组织胚胎学教研室, 贵州 贵阳 550004; 4. 贵阳医学院 解剖学教研室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 对人钙激活中性蛋白酶(calpain)的2个亚家族成员 calpain-1 和 calpain-2 进行功能的比较分析。方法: 以美国生物技术国家中心(NCBI)的蛋白质数据库获取人 calpain-1 和 calpain-2 的参考序列号(RefSeq)和氨基酸序列,通过 UniProt 数据库检索2个蛋白的一般蛋白质功能注释,获取相关结构域信息;利用 DNAMAN 软件对结构域进行序列比对,用蛋白质结构数据(PBD)和蛋白修饰数据库(PhosphoSit Plus)进行修饰位点空间分布的分析及用 String9.0 软件进行蛋白质-蛋白质相互作用分析。结果: 结构域比对分析显示,人 calpain-1 和 calpain-2 的钙蛋白酶催化结构域保守性程度高,而 EF-hand 结构域的差异比较大;翻译修饰分析发现,2个蛋白的修饰有明显的不同,人 calpain-1 的修饰比较单一,仅发现在赖氨酸(K84)有乙酰化修饰,而 calpain-2 的修饰形式和位点相对多样,分布在分子表面、间隙内及分子内部。相互作用分析发现,与人 calpain-1 和 calpain-2 相互作用的蛋白质有少部分是相同的,而多数是不同的,分别与不同细胞活动有关。结论: 人 calpain-1 和 calpain-2 的钙蛋白酶催化结构域是高度保守的,二者功能上差异主要是由于调控位点(EH-hand 和翻译后修饰位点)的差异引起。

[关键词] 钙激活中性蛋白酶; 催化亚基; 生物信息学; 结构域; 翻译后修饰

[中图分类号] Q811.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2011)04-0335-05

Bioinformatic Analysis on Catalytic Subunits of Calcium-activated Neutral Protease-1 and-2

XU Guoqiang¹, HU Xiaoxia¹, PAN Ya¹, DONG Yuhua¹, ZHANG Jinjuan², ZHANG Min¹, ZHANG Xiangling³, ZANG Guiyong⁴, XIONG Ying², WANG Xudong¹, CHEN Tengxiang¹

(1. Department of Physiology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Laboratory of Functional Experiments, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Department of Histology and Embryology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China; 4. Department of Anatomy, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the function of human calpain-1 and calpain-2, two classic sub-family proteins of calcium-activated neutral protease. **Methods:** The RefSeq and amino acid sequences of human calpain-1 and -2 were acquired from the protein database of American national center for biotechnology (NCBI). The general protein annotation and domain information of calpain-1 and -2 were obtained from UniProt database. DNAMAN software was used to compare the primary structure of domains of the two calpains, and the distribution of modified sites were detected with protein data bank (PBD) and protein modification database(PhosphoSit Plus) jointly. String 9.0 was used in the analysis of protein-protein interaction. **Results:** As analysis of domain showing, calpain catalytic domain of the two calpains were highly conserved, while the variation in EF-hand domain was relatively large. The

*[基金项目] 国家自然科学基金资助项目: NO. 81060176, 贵州省科技厅自然基金项目: 黔科合 J 字[2008]2280

** 通讯作者 E-mail: gqxu@gmc.edu.cn

post-translational modification (PTM) in calpain-1 was only on lys(K)84, while in calpain-2 was more complex which could be found on the surface, in the cleft and inside the molecular in different forms. The protein-protein interaction analysis indicated that there were only few proteins commonly in both interaction maps, while most proteins were specific in individual maps of the two calpains, which associated with different cell activities. **Conclusion:** The catalytic domains of human calpain-1 and calpain-2 are highly conserved. The functional differences between them are mainly caused by the alteration of regulating sites (EF-hand domain and PTM sites).

[**Key words**] calcium-activated neutral protease; catalytic subunit; bioinformatics; domain; post-translational modification

钙激活中性蛋白酶 (calcium-activated neutral protease, CANP; calpain) 是一类可以由钙离子调节激活的半胱氨酸蛋白酶, 主要包括 calpain-1 和 calpain-2 2 个亚家族成员, 它们均是异源二聚体, 由大亚基和小亚基组成, 小亚基 (28 kDa) 为活性调节亚单位 (regulated subunit), 在 calpain-1 和 calpain-2 中是完全相同的; 大亚基为催化功能亚单位 (catalytic subunit), 2 个亚家族成员的大亚基 (80 kDa) 有 65% 同源性^[1]。研究发现, calpain-1 和 calpain-2 功能有较高的相似性, 但是在不同的细胞行为过程中, calpain-1 和 calpain-2 的表现也有差异。研究显示, 对 calpain-1 和 calpain-2 的功能存在争议, 其原因是实验的条件有差异或研究的方法有在体和离体之差别, 亦有研究认为 calpain-1 的功能在 calpain-2 也有表现^[1]。由于 calpain-1 和 calpain-2 的结构存在差异, 为了对 2 个亚家族成员的功能有相对清晰的认识, 因而从生物信息学 (bioinformatics) 的角度进行分析。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及设备

计算机 (lenovo ThinkPad SL410k), 处理器 (Intel Pentium Dual-Core CPU), 内存 (2.0 GB)。Window 7 操作系统 (Microsoft 公司); DNAMAN7.0 (Lynnon 公司); Java (Sun Microsystems 公司); String 9.0 在线软件 (<http://string-db.org/>)。

1.2 数据库

美国生物技术国家中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); UniProt (<http://www.uniprot.org/>); 翻译后修饰数据库 PhosphoSit Plus (<http://www.phosphosite.org/>); 蛋白质结构数据库 (Protein Data Bank, PDB: <http://www.rcsb.org/pdb/>)。

1.3 生物信息学处理方法

1.3.1 蛋白质参考序列号 (RefSeq) 的检索 在 NCBI 的蛋白质数据库中检索 RefSeq (人 calpain-1: NP_001185797.1; 人 calpain-2 转录本 1: NP_001739.2; 人 calpain-2 转录本 2: NP_001139540.1), 选取 NP_001185797.1 和 NP_001739.2 进行后续的分析 (calpain-2 转录本 2 的蛋白质序列只是在 N-末端比转录本 1 少 67 个氨基酸残基, 其余序列相同, 所以选转录本 1 的序列进行比较)。

1.3.2 Uniprot 数据库检索分析 将 NP_001185797.1 和 NP_001739.2 作为检索词在 Uniprot 数据库中进行检索, 获取人 calpain-1 和 calpain-2 的一般生物信息学注释; 分别从 Uniprot 中获取蛋白质结构域信息及结构域氨基酸序列做比对分析; 通过 Uniprot 链接到 PDB 数据库, 获取蛋白质的晶体结构信息; 通过 Uniprot 链接到 PhosphoSit Plus 获取翻译后修饰信息。

1.3.3 结构域比对分析 将 Uniprot 数据库中获取的结构域氨基酸序列拷贝到 DNAMAN7.0 中, 建立 “*.seq” 格式的氨基酸序列文件, 将建立的文件输入 “multiple alignment” 分析工具对话框中, 设置参数: full alignment、run in background、gap penalty (3)、K-tuple (1)、protein weight (BLOSUM)、hydrophilic Residues (GPSNDQEKR)、Use Residue-specific Penal, 进行 2 个蛋白质间各结构域的比对分析, 将比对结果生成 EMF 图形文件。

1.3.4 蛋白质修饰位点和空间结构分析 获取 PDB 蛋白质结构文件后, 利用 PhosphoSit Plus 进行空间结构和修饰位点的综合分析, 参数设置: 选取 Atoms, Solvent, surface, site (lysine, Serine, Tyrosine, Threonine) 等显示参数, 在 Java 软件的支持下, 进行可视化的动态观察, 可对结构图进行放大和缩小, 以利于修饰位点的观察, 以截图方式获取图形文件。

1.3.5 蛋白质-蛋白质相互作用分析 将 NP_001185797.1 和 NP_001739.2 的氨基酸序列输入 String9.0 在线软件。

2 结果

2.1 一般生物信息学分析

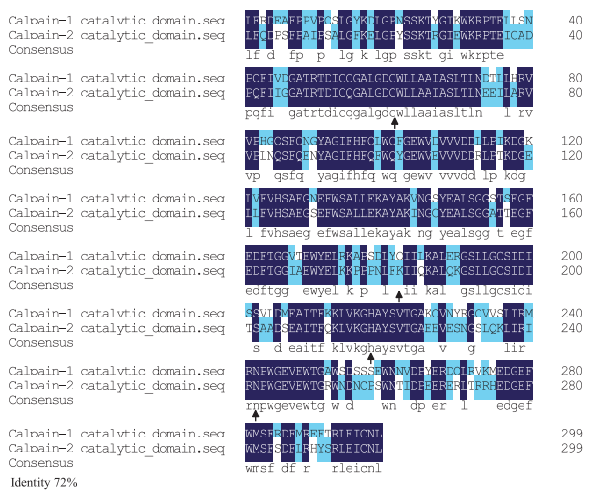
表 1 UniProt 数据库中对人 calpain-1 和 calpain-2 的功能注解
Tab. 1 Annotation of human calpain-1 and calpain-2 function in UniProt

比较内容	人 calpain-1	人 calpain-2
细胞遗传学定位	chr11 : q13.1 - q13.1	chr1 : q41 - q41
蛋白质的细胞定位	细胞质 细胞质膜	细胞质 细胞质膜
分子功能	钙依赖型半胱氨酸肽链内切酶的活性 正调控细胞增殖	
生物学过程	水解蛋白质 选择性地、非共价地与钙离子结合	水解蛋白质

2.2 结构域比对分析

人 calpain-1 和 calpain-2 的催化亚基具有相似的结构域(钙蛋白酶催化结构域、EF-hand 结构域、结构域Ⅲ),这些结构的相似性程度可以提示催化亚基间功能的相似性或差异。

2.2.1 钙蛋白酶催化结构域的比对分析 如图 1 所示,人 calpain-1 和 calpain-2 的钙蛋白酶催化结构域相似程度达到了 72%,表明它们之间有较高的保守性,箭头所指为结构域中的活性位点,比对



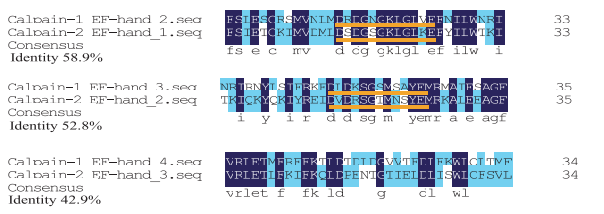
注:涂蓝部分示相同氨基酸序列,序列一致性为 72%;
箭头所指氨基酸为催化活性位点

图 1 人 calpain-1 和 calpain-2 催化结构域的蛋白质序列比对结果
Fig. 1 Comparison picture of amino acid sequence of human calpain-1 and calpain-2 catalytic domains

表 1 所示,人 calpain-1 和 calpain-2 的催化亚基的基因定位并不是在同一个染色体上,蛋白质的细胞定位却是相同的。在分子功能和生物学过程上,人 calpain-1 的功能注解比人 calpain-2 的注解要多,表明人 calpain-1 在钙依赖型半胱氨酸肽链内切酶的活性、正调控细胞增殖、选择性非共价地与钙离子结合等功能上还缺乏足够的分析。

结果提示 3 个活性位点完全相同,而且位点上下游的氨基酸也高度保守。结果提示,人 calpain-1 和 calpain-2 的酶解底物差异性不大,酶解能力差别也不会很大。

2.2.2 EF-hand 结构域的分析和比对结果 人 calpain-1 有 4 个 EF-hand 结构域:EF-hand 1 (氨基酸位点: Glu541-Lys576); EF-hand 2 (Phe585-Arg618); EF-hand 3 (Asn615-Lys650); EF-hand 4 (Val680-Ala714)。人 calpain-2 有 3 个 EF-hand 结构域: EF-hand 1 (Phe572-Gln618); EF-hand 2 (Thr602-Lys637); EF-hand 3 (Val541-Leu576)。分别对上述的 EF-hand 结构域进行两两两两比对分析,结构有 3 对 EF-hand 结构域的同源性较高(图 2 所示)。结果提示,人 calpain-1 的 EF-hand 1 与 calpain-2 的 EF-hand 结构域同源性很低,而且其所在



注:涂蓝部分示相同氨基酸序列,下划线为
“EF-hand”结构域中的钙离子结合位点

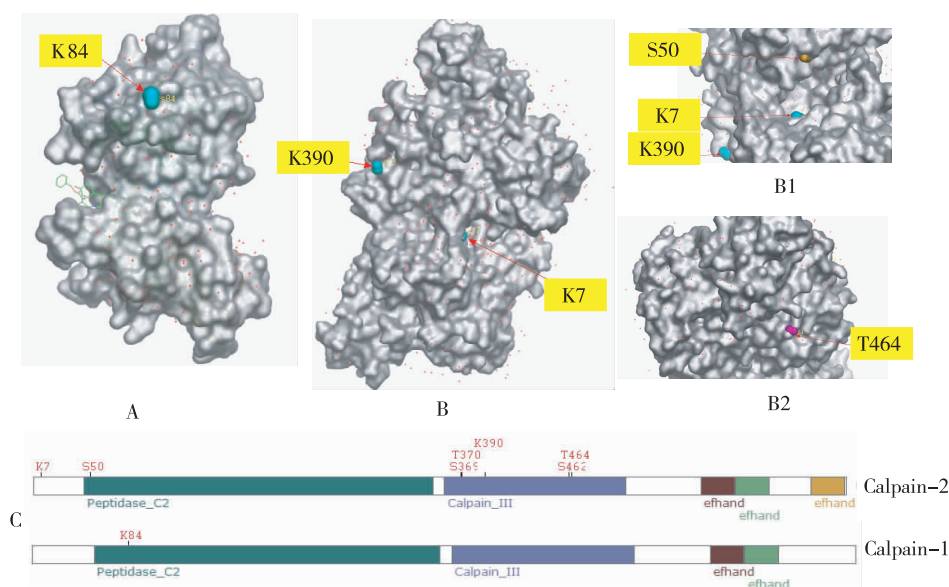
图 2 人 calpain-1 和 calpain-2 “EF-hand”结构域的蛋白质序列比对结果
Fig. 2 Comparison picture of amino acid sequence of human calpain-1 and calpain-2 EF-hand domains

位置更接近于蛋白质的氨基酸链中段。在 EF-hand 结构域中,钙离子结合位点(图 2 中下划线所示)的保守性比非结合位点的保守性要高。calpain-1 的 EF-hand 4 和 calpain-2 的 EF-hand 3 接近 C-末端,尚未鉴定出钙离子结合位点。

2.3 翻译后修饰分析

根据 UniProt 数据库注释,人 calpain-1 只有 1 个翻译后修饰情况:在赖氨酸(Lys,K)84 位点上的 N6-乙酰化修饰,如图 3 所示,K84 位点在钙蛋白酶催化结构域中,在空间结构上位于分子结构的表

面。人 calpain-2 有 7 个翻译后修饰情况,磷酸化修饰位点:丝氨酸(Ser,S)50、S369、苏氨酸(Thr,T)370、S462、T464;N6-乙酰化修饰:K7;小泛素修饰(Small ubiquitin-modified, SUMO):K390,其中,K7 位于 calpain-2 的 N-末端与小亚基锚钉的区域内,S50 在钙蛋白酶催化结构域中,S369、T370、K390、S462、T464 在 calpain III 结构域中;在空间结构上,有些修饰位点位于分子表面(K390、T464),有些位于分子间隙内表面(S50、K7),有些则隐藏在分子内部,不与溶液直接接触(S369、T370、S462)。



注:A:calpain-1 3D 模型结构;B:calpain-2 3D 模型结构;B1 和 B2:B 的局部放大。箭头所指为分子表面氨基酸残基修饰位点,红色“+”示分子表面正电荷分布情况;C:人 calpain-1 和 calpain-2 氨基酸序列中的修饰情况

图 3 人 calpain-1 和 calpain-2 三维结构模型及其表面修饰位点

Fig.3 The diagram of 3D models and modified amino acid sites on surface of human calpain-1 and calpain-2

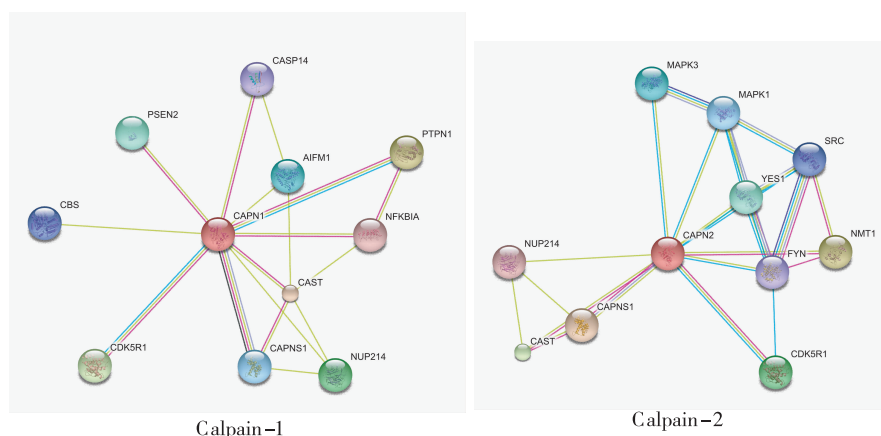
2.4 人 calpain-1、calpain-2 蛋白质间相互作用分析

通过 String 在线软件搜索计算与 calpain-1 和 calpain-2 发生直接相互作用的蛋白质,结果发现,除了 calpain 小亚基(CANPS1)、钙蛋白酶抑制蛋白(calpastatin,CAST)、人核孔蛋白 214(nuclear pore complex protein,Nup214)和细胞周期蛋白依赖性激酶 5-调节亚基 1(cyclin-dependent kinase 5-regulatory subunit 1,CDK5R1),与 calpain-1 和 calpain-2 发生相互作用的蛋白有很大的差异。与 calpain-1 发生相互作用的蛋白质还有:酪氨酸蛋白磷酸酶非受体型 1(tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1,PTPN1)、早老素-2(presenilin-2,PSEN2)、线粒体相关型凋亡诱导因子-1(Apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated-1,AIFM1)、胱硫醚

β 合酶(cystathionine beta synthase,CBS)、半胱天冬酶 14(caspase 14,CASP14)、NFKBIA(又称 I κ B α)等。与 calpain-2 相互作用的蛋白质还有:N-肉豆蔻酰转移酶 1(N-myristoyltransferase 1,NMT1)、Fyn、Src、有丝分裂原激活蛋白激酶 1(mitogen-activated protein kinase 1,MAPK1)、有丝分裂原激活蛋白激酶 3(MAPK3)、Yes1,见图 4。

3 讨论

人 calpain-1 和 calpain-2 的结构功能有相似性,也有差异,一直以来缺乏结构上的对比分析,也缺乏对它们功能差异性的清晰认识。因此,UniProt 数据库中的本体论(ontology)注解并不全面。通过



注:分子间连线越多,表明作图的依据越多

图4 人 calpain-1 和 calpain-2 的蛋白质-蛋白质相互作用情况

Fig. 4 Protein-protein interaction map of human calpain-1 and calpain-2

结构域分析发现,2 个蛋白有相似的结构域,包括钙蛋白酶催化结构域、EF-hand 结构域、结构域Ⅲ等。其中,钙蛋白酶催化结构域保守型很高,而且催化活性位点完全相同。这表明,calpain-1 和 calpain-2 对底物氨基酸序列的识别是没有差异的,因此从理论上说,二者对底物应该没有选择性,功能就没有差异。事实并非如此,蛋白质-蛋白质相互作用分析发现,除了催化亚单位(CANPS1)、共同的内源性抑制物(CAST)、在核-质间移位时结合的蛋白(Nup214)和细胞周期调控蛋白 CDK5R1,其它相互作用的蛋白是有差异的。原因何在? 问题出在其它结构差异上。

首先,二者的 EF-hand 结构域有差异。人 calpain-1 有 4 个 EF-hand 结构域,而人 calpain-2 只有 3 个,分别对这些结构域进行两两比对分析,发现人 calpain-1 和 calpain-2 只有 2 个 EF-hand 结构域间有相对较高的同源性,这表明他们与钙离子的结合能力是有差异的,由于人 calpain-1 的 EF-hand 结构域相对较多,calpain-1 与钙离子的结合机会要多,因此只需要微摩尔级的钙离子就能激活 calpain-1 (因此有称为 μ -calpain),而 calpain-2 (又称为 m-calpain)则需要毫摩尔级的钙离子才激活^[2]。细胞质内钙离子浓度在不同的细胞活动中是不一样的,因此意味着不同的细胞行为,激活的 calpain 不同。

其次,二者的翻译后修饰差异很大。人 calpain-1 目前只发现有 K84 的乙酰化修饰,而人 calpain-2 的修饰就复杂得多,有些位点在分子表面,很容易发生修饰,有些则埋在分子内部,成为潜在的修饰位点,只有在特定细胞活动才通过打开分子

得以修饰。不同的修饰情况是在不同的细胞活动才发生,因此,人 calpain-1 和 calpain-2 的激活条件不一样。

在细胞的分子社会中,在不同的细胞活动过程中,会出现不同的蛋白质组群,也激活不同的蛋白质^[3]。因此,calpain-1 和 calpain-2 虽然有高度的催化活性的保守型。但是,它们的激活有不同的前提条件,因此底物也不尽相同。从蛋白质-蛋白质相互作用结果发现,人 calpain-1 更多地与胰岛素信号通路的蛋白质(PTPN1)、老年性痴呆相关蛋白质(PSEN2)、细胞凋亡信号通路相关蛋白(AIFM1、CASP14)、卵母细胞发育相关蛋白(CBS)结合或酶解它们,提示人 calpain-1 与上述生命过程的细胞活动有关^[4~6];而人 calpain-2 则与 Fyn、Src、Yes1 原癌基因或促癌基因蛋白相互作用,而且与促分裂增殖的 MAPK1、MAPK3 酪氨酸激酶相互作用,表明人 calpain-2 与癌症的异常细胞活动有关^[2,7]。在癌细胞中,由于细胞信号通路调控失去平衡,各种翻译后修饰异常活跃,使 calpain-2 有机会打开分子内部,实现一些潜在的氨基酸残基修饰,使 calpain-2 的功能异常活跃。课题组在前期工作中发现,该高转移肝癌细胞 MHCC97-H 中,calpain-2 被高度剪切成不同长度的分子片段,从而暴露不同的潜在修饰位点,而在低转移的细胞株中,calpain-2 被剪切的程度较低^[8]。

通过生物信息学分析发现,人 calpain-1 和 calpain-2 的钙蛋白酶催化结构域是高度保守的,二者功能上差异主要是由于调控位点(EH-hand 和翻译后修饰位点)的差异引起。

(下转第 343 页)

ERK MAPK 信号转导通路与 $\alpha 7$ 尼古丁受体之间的关系,用 ERK 信号通路特异性抑制剂 U0126 阻断该通路信号传递观察 $\alpha 7$ 尼古丁受体表达水平。U0126 是一种高选择性和高效的 MAPKs 阻滞剂,通过直接抑制 ERK 1/2 的上游激活物 MEK 的活性而阻滞 ERK 1/2 的磷酸化,从而阻断刺激信号向核内传递^[10]。检测发现,细胞经 U0126 处理后 p-MEK 和 p-ERK 1/2 的水平明显降低,提示 MEK 和 ERK 1/2 的磷酸化被阻断,即 MAPKs 信号转导通路受到抑制。U0126 处理组 $\alpha 7$ 尼古丁受体蛋白的表达量降低,进一步说明 ERK MAPK 信号转导通路的活化可能与神经细胞 $\alpha 7$ 尼古丁受体的正常分泌及胆碱能信号传递密切相关,这是否与 AD 病人记忆受损有关还需进一步研究。

4 参考文献

- [1] Boonyaratankornkit V, Bi Y. The role and mechanism of progesterone receptor activation of extra-nuclear signaling pathways in regulating gene transcription and cell cycle progression[J]. Steroids, 2008(9-10):922-928.
- [2] Samuels IS, Karlo JC, Faruzzi AN, et al. Deletion of ERK2 mitogen-activated protein kinase identifies its key roles in cortical neurogenesis and cognitive function[J]. J Neurosci, 2008(27):6983-6995.
- [3] 官志忠, 齐晓岚. 阿尔茨海默病的分子发病机制及其治疗研究进展[J]. 中华病理学杂志, 2008(1):11-15.
- [4] Young KF, Pasternak SH, Rylett RJ. Oligomeric aggregates of amyloid beta peptide 1-42 activate ERK/MAPK in SH-SY5Y cells via the $\alpha 7$ nicotinic receptor[J]. Neurochem Int, 2009(8):796-801.
- [5] Nordberg A, Winblad B. Reduced number of [3H]-nicotine and [3H]-acetylcholine binding sites in the frontal cortex of Alzheimer's brains[J]. Neurosci Lett, 1986(1):115-119.
- [6] Guan ZZ, Miao H, Tian JY, et al. Suppressed expression of nicotinic acetylcholine receptors by nanomolar beta-amyloid peptides in PC12 cells[J]. J Neural Transm, 2001(12):1417-1433.
- [7] Hebert AE, Dash PK. Nonredundant roles for hippocampal and entorhinal cortical plasticity in spatial memory storage[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2004(79):143-153.
- [8] Park EM, Cho S. Enhanced ERK dependent CREB activation reduces apoptosis in staurosporine-treated human neuroblastoma SK-N-BE(2) C cells[J]. Neurosci Lett, 2006(1-2):190-4.
- [9] Blum S, Moore AN, Adams F, et al. A mitogen-activated protein kinase cascade in the CA1/CA2 subfield of the dorsal hippocampus is essential for long-term spatial memory[J]. J Neurosci, 1999(19):3535-3544.
- [10] Agthong S, Koonam J, Kaewsema A, et al. Inhibition of MAPK ERK impairs axonal regeneration without an effect on neuronal loss after nerve injury[J]. Neurol Res, 2009(10):1068-1074.

(2011-01-13 收稿, 2011-04-02 修回)

(上接第 339 页)

4 参考文献

- [1] Goll DE, Thompson VF, Li H, et al. The calpain system[J]. Physiol Rev, 2003(3):731-801.
- [2] Storr SJ, Carragher NO, Frame MC, et al. The calpain system and cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2011(5):364-374.
- [3] Vidal M, Cusick ME, Barabasi AL. Interactome networks and human disease[J]. Cell, 2011(6):986-998.
- [4] Bowden DW. Association of the PTPN1 gene with type 2 diabetes and insulin resistance[J]. Discov Med, 2004(24):427-432.
- [5] Soler-Lopez M, Zanzoni A, Lluís R, et al. Interactome mapping suggests new mechanistic details underlying Alzheimer's disease[J]. Genome Res, 2011(3):364-376.
- [6] Wang Y, Kim NS, Li X, et al. Calpain activation is not required for AIF translocation in PARP-1-dependent cell death (parthanatos) [J]. J Neurochem, 2009(2):687-696.
- [7] Kristinsson SY, Tureson I. The association of cancer and venous thrombosis: yes, Trousseau is right again [J]. Leuk Lymphoma, 2011(5):734-735.
- [8] 唐佳艳, 洪阳, 向敏, 等. 钙激活中性蛋白酶在肝癌细胞迁移能力中的作用的研究[J]. 贵阳医学院学报, 2011(3):235-237.

(2011-07-11 收稿, 2011-07-15 修回)