

Letters A, 1996, 210: 290~ 300

8 何光渝主编. FORTRAN 77 算法手册. 第12章. 北京: 科学出版社, 1993

9 Grssberger P, Procaccia I. Characterization of strange attractors. Phys Rev Let, 1983, 50(5): 346~ 349

10 Wolf A, Swift J B, Swinney H L, et al. Determining lyapunov exponents from a time series. Physica 16D, 1985: 285~ 317

(1997-06-02 收稿, 1998-01-13 收修改稿)

Ser³⁵⁴和 Ser³⁵⁷参与去甲肾上腺素转运蛋白的底物转运

黄芳 刘艳红 费俭* 郭礼和* Wolfgang Schwarz^④

(中国科学院上海细胞生物学研究所, 上海 200031; ④Max-Planck Institut fur Biophysik, Kennedy allee 70, 60596 Frankfurt/M, Germany. * 联系人)

摘要 对去甲肾上腺素转运蛋白(NET)第7跨膜区的 Ser³⁵⁴和 Ser³⁵⁷进行了突变研究. 结果表明, 上述2个位点双突变后, NET的底物转运活力下降到本底水平. 考虑到这2个氨基酸残基在同一转运蛋白家族中的保守性以及和β-肾上腺素受体中的相似性, 推测它们在NET中的作用与底物的识别与转运有关.

关键词 去甲肾上腺素转运蛋白 突变体

去甲肾上腺素(NE)是一种广泛存在的儿茶酚胺类的神经递质. 在NE神经信号传导中有2类蛋白极为重要, 1类是位于突触后膜上的去甲肾上腺素受体, 它负责将信号从突触前神经元向突触后神经元传递; 另1类是位于突触前膜或神经胶质细胞膜上的去甲肾上腺素转运蛋白(NET), 它调节信号传导的时程与强度, 并将NE摄取到突触前神经元内以便递质的再利用^[1]. 由于NET同许多神经性疾病和药物成瘾密切相关, 它越来越受到人们的关注. Giros等人^[2]和Buck等人^[3]曾用嵌合体的方式研究了NET的结构与功能的关系, 对其胞外大环上3个潜在的糖基化位点亦有研究^[4]. 本文在分析儿茶酚胺类递质转运蛋白和去甲肾上腺素受体结构的基础上, 对NET第7跨膜区中保守的2个丝氨酸位点 Ser³⁵⁴和 Ser³⁵⁷进行了定点突变, 并对突变体的功能进行了研究.

1 材料与方法

() 定点突变. 将NET cDNA(~ 2.0 kb, Prof. Susan G. Amara惠赠, The Vollum Institute, Oregon Health Sciences University, Portland, USA) 克隆到突变载体 pALTER-1 (Promega公司) 上, 突变引物为 5' AACTGTATCACC(G/A) GCTTCGTC(G/A) CTGGGTTCGCC 3', 按照Promega公司定点突变试剂盒使用说明进行突变反应, 突变子用DNA序列测定方法鉴定.

() 体外转录和蛙卵注射. 将野生型和突变的NET cDNA克隆到载体 pNWP的SP6启动子的下游, 该载体由Dr. Philip Wood和黄芳由pNKS2改建而来, 它给插入的cDNA的5'端提供了一个爪蟾卵母细胞中的Na⁺-K⁺ ATPase β亚基的核糖体结合位点(RBS)序列, 3'端

提供了 poly(A) 序列, 以便目的基因在蛙卵中高效表达. 克隆子 DNA 经 Not I 线性化后, 用 Ambion SP6 转录试剂盒进行体外转录. 每只蛙卵注射 10~20 ng 野生型或突变体的 NET cRNA, 注射后蛙卵在 Ringer 溶液中培养, 每天换液, 培养 3 d 后进行功能测定.

() 功能测定. 将每组 8 枚蛙卵放在含 2.5 $\mu\text{mol/L}$ NE(其中含 10 nmol/L ^3H -NE 和 17.8 $\mu\text{mol/L}$ ^{14}C -蔗糖) 的 Ringer 溶液中, 20 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 蛙卵用 Ringer 液清洗, 2% SDS 破碎, 加闪烁液进行液闪测定.

2 结果与讨论

用点突变的方式使位于第 7 跨膜区的 2 个丝氨酸进行突变, 构建了 2 个 NET 的突变体: () 将 357 位的丝氨酸改造成丙氨酸, 即突变体 S357A; () 将 354 位和 357 位的丝氨酸分别改造成甘氨酸和丙氨酸, 即突变体 S354G, S357A. 体外转录后注射蛙卵, 进行表达, 用 ^3H -NE 作为示踪剂进行转运功能检测, 并用 ^{14}C -蔗糖作参照, 结果见图 1. 突变体 S357A 保留 NET 野生型 64.5% 的转运活性, 而突变体 S354G, S357A 只有 NET 野生型 5% 的活性, 接近于对照水平.

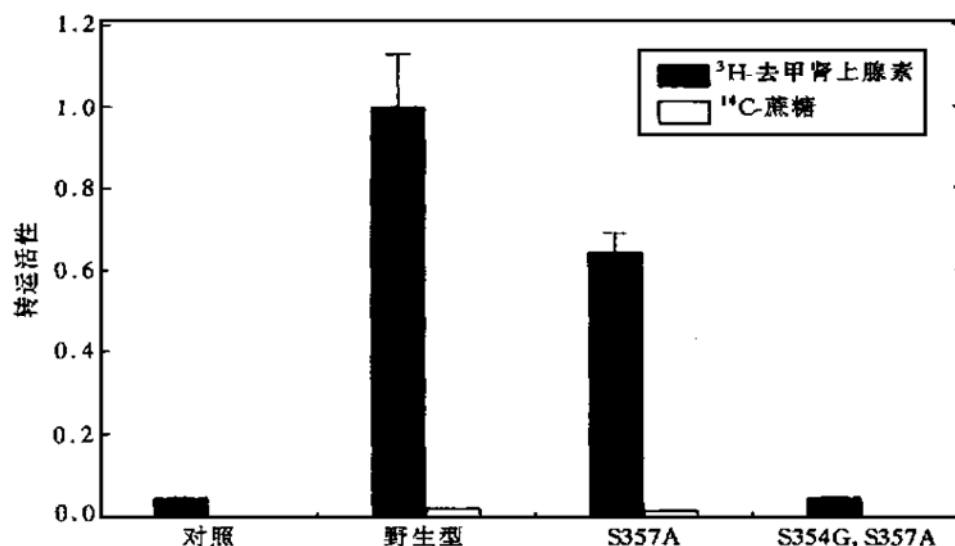


图1 野生型及突变体 hNET 对 ^3H -去甲肾上腺素的转运活性
所示的数据来自 2 批实验 16 个蛙卵. 以野生型转运活性为 1; S357A 及 S354G, S357A 的转运活性分别为 0.645 和 0.05

儿茶酚胺类转运蛋白包括去甲肾上腺素转运蛋白 (NET)、多巴胺转运蛋白 (DAT) 和 5-羟色胺转运蛋白 (SERT), 它们都属于 Na^+ 依赖的 12 次跨膜糖蛋白, 并且它们在蛋白的氨基酸组成上有很高的同源性^[1]. NET 第 7 跨膜区中的 Ser³⁵⁴ 和 Ser³⁵⁷ 在这 3 个儿茶酚胺类转运蛋白中非常保守 (图 2). Kitayama 等人^[5] 用点突变的方式研究 DAT 时发现相应的 Ser³⁵⁶ 和 Ser³⁵⁹ 突变后对多巴胺的转运下降, 类似的 Ser 位点亦存在于 α , β 肾上腺素受体中. Strader 等人^[6] 对 β 肾上腺素受体第 5 跨膜区中的 Ser²⁰⁴ 和 Ser²⁰⁷ 进行突变研究, 发现 Ser²⁰⁴ 侧链的羟基与儿茶酚胺上的间位羟基相互作用, 而 Ser²⁰⁷ 侧链羟基与儿茶酚胺中的对位羟基相互作用. Wang 等人^[7] 对 α_{2A} -肾上腺素受体的第 5 跨膜区中的 Ser²⁰⁴ 的突变研究也得到类似的结果. 依据这 2 个 Ser 位点在儿茶酚胺类受体和转运蛋白中的保守性及对儿茶酚胺识别的类似性, 我们推测 NET 跨膜区 7 中 Ser³⁵⁴ 和 Ser³⁵⁷ 可能参与了底物的识别和蛋白的转运功能.

★ ★

β_1	(198)	AYAIASSVVSFYVPLCIMA FVYL(220)	TM5
α_{2A}	(198)	WYILSSCIGSFFAPCLIMGLVYA(220)	TM5
α_{2B}	(198)	WYVISSCIGSFFAPCLIMILVYV(220)	TM5
NET	(343)	ALLTSSINCITSFVSGFAIFFSIL(366)	TM7
DAT	(345)	AIITTSINSLTSFSSGFVVFESFL(368)	TM7
SERT	(338)	ALVTSVNCMTSFVSGFVIFFTVL(361)	TM7

图2 人 β_1 -, α_{2A} -, α_{2B} -肾上腺素受体的第5跨膜区(TM5)及人 NET, DAT, SERT 第7跨膜区(TM7)的氨基酸序列

★指示保守的 Ser 残基

致谢 感谢 Max-Planck Institut fuer Biophysik 的 Dr. Philip Wood 和 Mrs Eva-Maria Gaertner 对实验的帮助. 本工作为中国科学院青年择优基金和上海市启明星计划资助项目.

参 考 文 献

- 1 黄芳, 费俭, 郭礼和. 神经递质转运蛋白. 生命科学, 1994, 6: 5~8
- 2 Giros B, Wang Y M, Suter S, et al. Delineation of discrete domains for substrate, cocaine and tricyclic antidepressant interactions using chimeric dopamine/norepinephrine transporters. J Biol Chem, 1994, 269(23): 15 985~ 15 988
- 3 Buck K J, Amara S G. Chimeric dopamine/norepinephrine transporters delineate structural domains influencing selectivity for catecholamines and 1-Methyl-4-Phenylpyridinium. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(26): 12 584~ 12 588
- 4 Melikian H E, Ramamoorthy S, Tate C G, et al. Inability to N-glycosylate the human norepinephrine transporter reduced protein stability, surface trafficking, and transport activity but not ligand recognition. Mol Pharmacol, 1996, 50(2): 266~ 276
- 5 Kitayama S, Shimada S, Xu H, et al. Dopamine transporter site-directed mutations differentially alter substrate transporter and cocaine binding. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(16): 7 782~ 7 785
- 6 Strader C D, Candelore M R, Hill W S, et al. Identification of two serine residues involved in agonist activation of the beta₂-adrenergic receptor. J Biol Chem, 1989, 264(23): 13 572~ 13 578
- 7 Wang C D, Buck M A, Fraser C M. Site-directed mutagenesis of alpha_{2A}-adrenergic receptors: identification of amino acids involved in ligand binding and receptor activation by agonists. Mol Pharmacol, 1991, 40(2): 168~ 179

(1997-11-28 收稿, 1998-03-02 收修改稿)

应激免疫抑制蛋白在血清中的作用时间

黄庆军 蒋 灿 范少光

(北京医科大学生理学系, 北京 100083)

摘要 在小鼠束缚应激 12 h 后的第 1, 12, 24 和 48 h 血清明显抑制淋巴细胞转化, 第 96 h 的血清已不再具有显著的抑制作用. 经计算, 应激免疫抑制蛋白在血清中生物作用的半寿期为 21.3 h.

关键词 应激免疫抑制蛋白 淋巴细胞转化 半寿期

在应激条件下, 大鼠和小鼠的脾脏和淋巴结可产生一种大分子蛋白质, 释放入血并具有明显抑制 T, B 淋巴细胞转化等免疫抑制作用^[1~5]. 本工作观察了应激免疫抑制蛋白在血清中