



## 拟南芥CaM5的不同剪接产物对其蛋白质结合活性的影响

李树强, 余洁雨, 王韞慧, 吕天晓, 范甜, 周玉萍, 田长恩

引用本文:

李树强,余洁雨,王韞慧,吕天晓,范甜,周玉萍,田长恩. 拟南芥CaM5的不同剪接产物对其蛋白质结合活性的影响[J]. 热带亚热带植物学报, 2024, 32(4): 458-464.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.4789>

### 您可能感兴趣的其他文章

#### Articles you may be interested in

#### 蔓花生PEPC基因家族的生物信息学分析

Bioinformatics Analysis of PEPC Gene Family in *Arachis duranensis*

热带亚热带植物学报. 2018, 26(2): 107-115 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3804>

#### 墨兰'达摩'原叶绿素酸酯氧化还原酶基因CsPORB功能的初步研究

Preliminary Study on the Function of NADPH: Protochlorophyllide Oxidoreductase (CsPORB) Gene in *Cymbidium sinense* 'Dharma'

热带亚热带植物学报. 2019, 27(3): 285-293 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3957>

#### 巨桉SuSy基因家族的生物信息学分析

Bioinformatics Analysis of SuSy Gene Family in *Eucalyptus grandis*

热带亚热带植物学报. 2018, 26(6): 580-588 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3929>

#### 毛竹油菜素内酯受体激酶基因的分子特征及表达模式分析

Molecular Characteristics and Expression Analysis of Brassinolide Receptor Kinase Genes in *Phyllostachys edulis*

热带亚热带植物学报. 2018, 26(3): 215-223 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3818>

#### 三角梅cDOPA 5GT基因的克隆和光照对其表达的影响

Cloning of Cyclo-DOPA-5-glucosyltransferase Gene from *Bougainvillea glabra* and Effect of Illumination on Its Expression

热带亚热带植物学报. 2021, 29(1): 75-81 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4233>

向下翻页, 浏览PDF全文

# 拟南芥 CaM5 的不同剪接产物对其蛋白质结合活性的影响

李树强, 余洁雨, 王韞慧, 吕天晓, 范甜, 周玉萍, 田长恩\*

(广州大学生命科学学院, 广东省植物适应性与分子设计重点实验室, 广州 510006)

**摘要:** 钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )/钙调素(calmodulin, CaM)信号参与植物生长发育和对外界刺激响应的调节。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) CaM 家族共有 7 个基因, 编码的蛋白质氨基酸序列具有高度保守性。该研究通过酵母双杂交及生物信息学分析等方法, 对 CaM5 的 2 个剪接体 CaM5.1 和 CaM5.3 进行蛋白结合活性分析。结果表明, 拟南芥钙调素结合蛋白(calmodulin-binding protein, CaMBP) IQM3 (IQ motif-containing protein 3)能在酵母中与除 CaM5.3 外的 CaM 家族的成员结合。生物信息学分析表明, CaM5.3 比 CaM5.1 和其他 CaM 亚型成员多出 1 个由 35 个氨基酸残基组成的 C-末端序列(C-terminal domain, CTD), 可能影响 CaM5.3 与 IQM3 结合。在 CaM5.1 的 C-末端添加 CML10 的 CTD, 将重组蛋白与 IQM3 进行结合, 证实 CaM5.3 的 CTD 是影响其与 IQM3 结合的关键序列。因此, 拟南芥 CaM5 的不同剪接方式影响其蛋白结合活性, 为研究钙调素及钙调素结合蛋白的结合活性提供参考。

**关键词:** 钙调素; 剪接方式; IQM3; 蛋白质结合活性

doi: 10.11926/jtsb.4789

## Effects of Different Alternative Splicing of *Arabidopsis* CaM5 on Its Protein-binding Activity

LI Shuqiang, YU Jieyu, WANG Yunhui, LÜ Tianxiao, FAN Tian, ZHOU Yuping, TIAN Chang'en\*

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Plant Adaptation and Molecular Design, School of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )/calmodulin (Cam) signals are involved in the regulation of plant growth and development and response to external stimuli. The *Arabidopsis thaliana* contains seven genes in CaM family, which encoding proteins with highly conserved amino acid sequence. The protein binding activities of CaM5 splicosomes CaM5.1 and CaM 5.3 were analyzed by yeast two-hybrid and bioinformatics analysis. The results showed that the *Arabidopsis* calmodulin-binding protein (CaMBP) IQM3 (IQ motif-containing protein 3) could bind to members of CaM family except CaM5.3 in yeast. The bioinformatic analysis revealed that CaM5.3 had one more C-terminal domain (CTD) consisting of 35 amino acid residues than CaM5.1 and other CaM subtypes, which might affect the binding of CaM5.3 to IQM3. CTD of CML10 was added to the C-terminal of CaM5.1, the recombinant protein was binded to IQM3, confirming that CTD of CaM5.3 was the key sequence affecting its binding to IQM3. Therefore, different splicing modes of CaM5 in *A. thaliana* affect its protein-binding activity, which providing reference for studying the binding activities of calmodulin and calmodulin-binding proteins.

**Key words:** CaM; Alternative splicing; IQM3; Protein-binding activity

收稿日期: 2023-04-01 接受日期: 2023-05-08

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2020A1515011423)资助

This work was supported by the Project for Natural Science in Guangdong (Grant No. 2020A1515011423).

作者简介: 李树强(1996年生), 男, 硕士, 主要从事植物分子遗传学研究。E-mail: 867409771@qq.com

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: biocetian@gzhu.edu.cn

钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )作为植物体内的一种第二信使,在时空上的浓度变化形成钙信号。钙信号在振幅、频率和定位上具有特异性,是连接体内外刺激与细胞响应及基因表达的关键信号之一<sup>[1]</sup>。

作为一类最重要的  $\text{Ca}^{2+}$  感受器,钙调素(calmodulin, CaM)是真核生物特有、高度保守且广泛存在的  $\text{Ca}^{2+}$  结合蛋白,具有4个能与  $\text{Ca}^{2+}$  结合的 EF-hand<sup>[2-3]</sup>。当  $\text{Ca}^{2+}$  与 CaM 结合时, CaM 分子发生构象变化,继而与靶标结合而传递钙信号<sup>[1]</sup>。能与 CaM 结合的靶标称为钙调素结合蛋白(CaM-binding protein, CaMBP),根据与 CaM 结合时是否需要  $\text{Ca}^{2+}$ ,可以将其分为  $\text{Ca}^{2+}$  依赖型和  $\text{Ca}^{2+}$  不依赖型<sup>[5]</sup>。据 Poovaiah 等<sup>[6]</sup>估计,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中至少有500个 CaMBP。

在植物中, CaM 也是一类极为重要的第二信使,参与生长发育和对外界刺激响应的调节<sup>[6]</sup>。拟南芥中共有7个 *CaM* 基因,编码4种经典 CaM 亚型(CaM1/4、CaM2/3/5、CaM6 和 CaM7)<sup>[7]</sup>;不同蛋白间只有少数几个氨基酸残基不同<sup>[8]</sup>。CaM 处于高度选择压力下来保持高水平的保守型,可能是植物体需要同时转录多个基因来保持高的基因表达水平,或者是 CaM 家族具有各自不同的特定功能<sup>[9]</sup>。因此,确定不同 *CaM* 基因的结构及功能的异同,对于阐明 CaM 家族的进化意义和同种型基因之间功能关系有重要意义<sup>[8]</sup>。

植物细胞中存在大量由不同数目内含子间隔而形成的断裂基因,一个基因在不同时空或在不同内外刺激时产生不同 mRNA,进而产生不同蛋白的方式称为选择性剪接(alternative splicing, AS),可导致基因功能的多样性<sup>[10]</sup>。拟南芥中的 AS 类型有内含子保留(约40%)、选择性5'或3'剪接位点(约23%)、外显子跳过(约8%)及少量其他类型<sup>[11-12]</sup>。AS 的功能大致分为:(1) 增加蛋白的多样性;(2) 改变蛋白的修饰位点;(3) 干扰性小肽的负调节效应;(4) 调节转录因子的活性<sup>[13]</sup>。由拟南芥数据库(<https://www.arabidopsis.org/>)可知, *AtCaM5* 的核苷酸序列存在2个内含子,有2种不同的剪接方式,第2个内含子中含有终止密码子。如果第2个内含子保留,则会使翻译提前终止,产生149个氨基酸残基的 CaM5.1;如果第2个内含子被剪切,则产生含有181个氨基酸残基的 CaM5.3。

IQM 家族是一个含有 IQ 基序的 CaMBP 家族<sup>[14]</sup>。我们前期研究表明,拟南芥钙调素结合蛋白

IQM3 (IQ-motif containing protein 3)可以在酵母细胞中与包括 CaM5.1 在内的 CaM 亚型成员结合,但是不能与 CaM5.3 结合。CaM5 的选择性剪接产生2种类型的蛋白,推测他们具有不同的功能,因此,进一步分析 CaM5.3 的结构和蛋白质结合活性的关系十分必要。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

本研究所用 CDS 由拟南芥野生型 Col 的 RNA 反转录 cDNA 扩增得到, pGBKT7 质粒、pGADT7 质粒、大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、酵母菌 AH109 均为实验室保存;逆转录酶、高保真 *Taq* 酶、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒均购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)公司,同源重组酶购自南京诺唯赞公司,引物合成和测序服务由上海生工生物公司完成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 载体构建

首先,在拟南芥数据库中,根据基因编号查询 CDS,设计相关引物(表1)。其次,以拟南芥 cDNA 为模版,先用高保真 *Taq* 酶进行扩增,再用同源重组酶将扩增产物与经 *EcoR* I 线性化载体进行同源重组,分别得到 pGBKT7-IQM3 和 pGADT7-CaM1-7。最后,将重组质粒转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,挑取阳性克隆,送生工生物公司完成测序,提取质粒备用。

*CaM5.1-CTD<sub>CML10</sub>* 载体的构建:先用引物9和10扩增 *CaM5.1* 的 CDS,再用引物17和18扩增 *CML10* 的 CTD,然后用引物9和10,对上述扩增产物的混合物进行重叠延伸 PCR 扩增,最后用同源重组将产物克隆到 pGADT7 载体。

#### 1.2.2 IQM3 蛋白毒性和转录自激活活性分析

利用醋酸锂(LiAc)法制备酵母 AH109 感受态细胞备用。将 pGBKT7-IQM3 单独转化酵母感受态细胞,涂布于 SD/-Trp 培养基上以分析 IQM3 的毒性;将 pGBKT7-IQM3 和 pGADT7 同时转化酵母感受态细胞,涂布于 SD/-Leu/-Trp 培养基上,随后挑单菌落涂布于 SD/-His/-Leu/Trp/-Ade 营养缺陷培养基以分析 IQM3 的转录自激活活性分析。

#### 1.2.3 酵母双杂交试验

将 pGBKT7-IQM3 分别与 pGADT7-CaM1.1/2.1/3.1/4.1/5.1/5.3/6.1/7.1/CaM5.1-CTD<sub>CML10</sub> 同时转化酵母感受态细胞,涂布于 SD/-Leu/-Trp 营养缺陷培养

表 1 本研究所用克隆引物序列

Table 1 Cloning primer sequences used in this research

基因 Gene	编号 Code	引物 Primer	序号 No.	序列 Sequence (5'~3') *
<i>CaM1</i>	At5G37780.1	ADCaM1-F	1	gccatggaggccagtgaattcATGGCGGATCAACTCACTGACG
		ADCaM1-R	2	atgccaccgggtggaattcTCACTTAGCCATCATAATCTTGACAA
<i>CaM2.1</i>	At2G41110.1	ADCaM2-F	3	gccatggaggccagtgaattcATGGCGGATCAGCTCACAGA
		ADCaM2-R	4	atgccaccgggtggaattcTCACTTAGCCATCATAACCTTACACA
<i>CaM3.1</i>	At3G56800.1	ADCaM2-F	5	gccatggaggccagtgaattcATGGCGGATCAGCTCACCG
		ADCaM2-R	6	atgccaccgggtggaattcTCACTTAGCCATCATGACCTTAACA
<i>CaM4.1</i>	At1G66410.1	ADCaM4-F	7	gccatggaggccagtgaattcATGGCGGATCAGCTAACTGATG
		ADCaM4-R	8	atgccaccgggtggaattcTCACTTAGCCATCATAATCTTGACAA
<i>CaM5.1</i>	At2G27030.1	ADCaM5.1-F	9	gccatggaggccagtgaattcATGGCAGATCAGCTCACCGATG
		ADCaM5.1-R	10	atgccaccgggtggaattcTCACTTTGCCATCATAACTTTGA
<i>CaM5.3</i>	At2G27030.3	ADCaM5.3-F	11	gccatggaggccagtgaattcATGGCAGATCAGCTCACCGATG
		ADCaM5.3-R	12	atgccaccgggtggaattcTCAAGAGAATACGGCAGTGAC
<i>CaM6.1</i>	At5G21274.1	ADCaM6-F	13	gccatggaggccagtgaattcATGGCGGATCAGCTCACCG
		ADCaM6-R	14	atgccaccgggtggaattcTCACTTAGCCATCATGACTTTGACG
<i>CaM7.1</i>	At3G43810.1	ADCaM7-F	15	gccatggaggccagtgaattcATGGCGGATCAGCTAAACCG
		ADCaM7-R	16	atgccaccgggtggaattcTCACTTTGCCATCATGACTTTGA
<i>CML10</i>	At2G41090	CML10-F	17	AATCAAGGTCATGATACTAA
		CML10-R	18	atgccaccgggtggaattc TCAAGAAAACAACGCTTCGA
<i>IQM3</i>	At3G52870	BDIQM3-F	19	atggccatggaggccgaattcATGCAGGTAGTCTCGAGCT
		BDIQM3-R	20	tcgacggatccccgggaattcTTAGACATCAAGCTTCCC

\*: 小写字母为载体片段, 大写字母为基因片段。

\*: Small letters are vector fragment, capital letters are gene fragments.

基, 随后挑单菌落涂布于 SD/-His/-Leu/Trp/-Ade/+X- $\alpha$ -gal 营养缺陷培养基, 30 °C 倒置培养 4~5 d。实验重复 3 次。

#### 1.2.4 生物信息学分析

利用 Snapgene (4.2.4) 软件中的“Align protein sequence”-Clustal Omega 方法对 *CaM1.1/2.1/3.1/4.1/5.1/5.3/6.1/7.1* 的氨基酸序列进行比对, 序列按照 CaM 家族进化树亲缘关系排序(1/4、6、7、2/3/5)。

因为在已发表的蛋白数据库 PDB (protein data bank) (<https://www.rcsb.org/>) 中未找到 *CaM5.3* 的空间结构, 所以在预测的蛋白数据库 Alpha Fold Protein

Structure Database (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) 查找, 结果表明, *CaM5.1* 和 *CaM5.3* 的 Uniprot ID 分别为 Q682T9 和 F4IVN6。

## 2 结果和分析

### 2.1 IQM3 蛋白毒性和转录自激活活性分析

要利用某蛋白进行酵母双杂交实验, 首先必须确定其是否具有毒性和转录自激活活性。因此, 构建 pGBKT7-*IQM3* 载体, 进行 *IQM3* 蛋白毒性及自激活活性分析。图 1: A 可见, pGBKT7-*IQM3* 的转

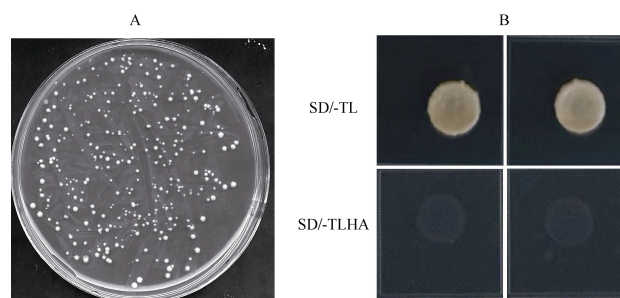


图 1 *IQM3* 毒性(A)和自激活分析(B)。SD/-Trp: 缺 Trp 的培养基; SD/-TLHA: 缺 Trp、Leu、His 和 Ade 的培养基。下同

Fig. 1 Toxicity detection (A) and self-activation (B) of *IQM3* protein. SD/-Trp: -Trp medium; SD/-TLHA: -Trp-Leu-His-Ade medium. The same below

基因酵母能在 SD/-His 中生长, 说明 IQM3 蛋白没有毒性。图 1: B 可见, 空载体 pGADT7 和 pGBKT7-IQM3 的转基因酵母不能在 SD/-His/-Leu/Trp/-Ade/上生长, 提示 IQM3 没有自激活活性。因此, pGBKT7-IQM3 可用于酵母双杂交分析。

### 2.2 IQM3 与 CaM 家族的酵母双杂交分析

拟南芥 IQM 家族的 6 个成员都含有 1 个 IQ 基序<sup>[15]</sup>, 在酵母和植物细胞中 IQM1 通过 IQ 基序与 CaM5.1 结合<sup>[16]</sup>。为了确定该家族的另一成员 IQM3 是否也具有 CaM 结合活性, 进行 IQM3 与 CaM 家族不同成员的酵母双杂交试验。结果表明, 在 SD/-Leu/-Trp 培养基中, 所有的组合均能形成菌落(图 2), 说明共转化成功; 在 SD/-His/-Leu/Trp/-Ade/+X-

$\alpha$ -gal 培养基中, 除 pGBKT7 分别与 pGADT7-CaM1.1/2.1/3.1/4.1/5.3/6.1/7.1/CaM5.3 的组合(未展示)和 pGBKT7-IQM3/pGADT7-CaM5.3 组合没有形成菌落外, 其他组合形成了菌落且变蓝色, 说明 IQM3 能在酵母中与 CaM1.1/2.1/3.1/4.1/6.1/7.1/结合。

### 2.3 CaM5.3 的特异 CTD

为了探究 CaM5.3 不能和 IQM3 结合的原因, 进行了相关生物信息学分析。在拟南芥数据库中获取 CaM5 的 2 个剪接体所编码的氨基酸序列: CaM5.1 和 CaM5.3 (未发现命名为 CaM5.2 的剪接体), 与从该数据库获取 CaM 家族其他成员的氨基酸序列进行比对(图 3)。结果表明, CaM5.3 在第 4 个 EF-hand 末端还有 1 个由 32 个氨基酸残基组成的 C-末端序

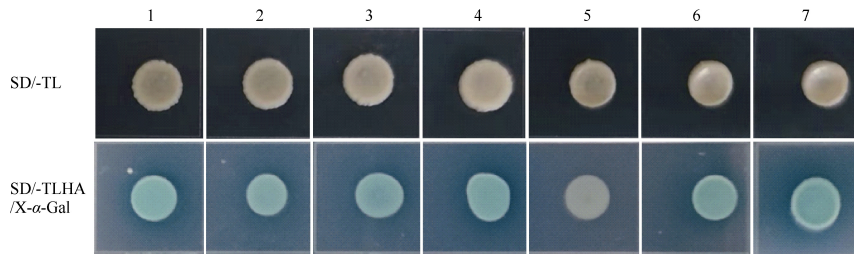


图 2 IQM3 与 CaM 家族成员的酵母双杂交分析。SD/-TL: 缺 Trp 和 Leu 的培养基; SD/-TLHA/+X- $\alpha$ -Gal: 缺 Trp、Leu、His 和 Ade, 含 X- $\alpha$ -Gal 的培养基。1-7 分别为 pGBKT7-IQM3 与 PGADT7-CaM1、CaM2、CaM3、CaM4、CaM5.3、CaM6、CaM7。下同

Fig. 2 Yeast two-hybrid analysis of IQM3 and CaM family members. SD/-TL: -Trp-Leu medium; SD/-TLHA/X- $\alpha$ -Gal: -Trp-Leu-His-Ade /+X- $\alpha$ -Gal medium. 1-7 are pGBKT7-IQM3 combined with PGADT7-CaM1, CaM2, CaM3, CaM4, CaM5.3, CaM6, CaM7, respectively. The same below

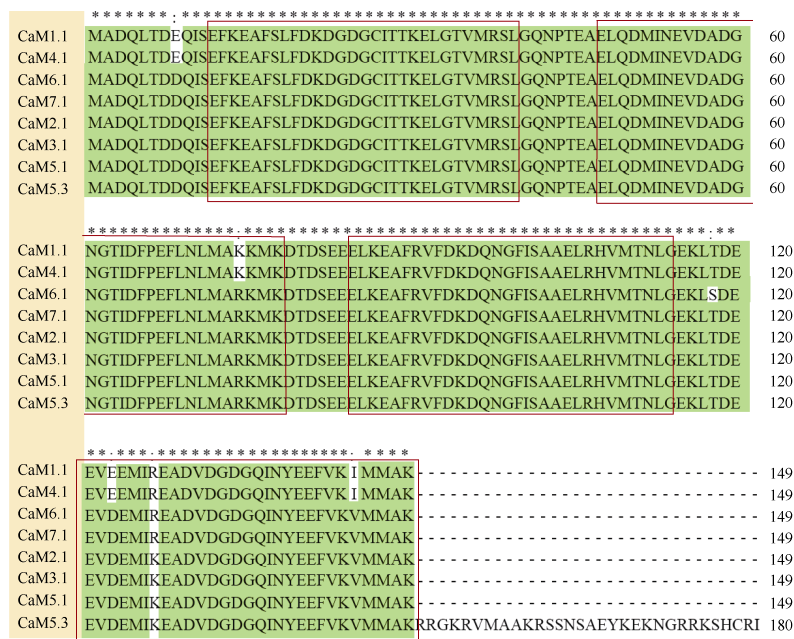


图 3 拟南芥 CaM 家族氨基酸序列的同源性比对。红框: EF-hand 保守区; \*: 高度保守区; :: 相似序列。

Fig. 3 Homology alignment of amino acid sequences of CaM family in *Arabidopsis thaliana*. Red box: EF-hand conserved region; \*: Highly conserved sequences; :: Similar sequences.

列(C-terminal domain, CTD), 其余序列与 CaM2.1、CaM3.1 和 CaM5.1 完全相同。因此, CaM5.3 的 CTD 可能是阻碍 CaM5.3 与 IQM3 结合的原因。

## 2.4 CaM5.3 的特异结构

为了进一步分析 CaM5.3 的特异性, 有必要了解其空间结构, 但在最主要收集已发表的蛋白质结构数据库 PDB (<https://www.rcsb.org/>)中未找到该蛋白的空间结构。因此, 利用 Alpha Fold Protein Structure

Database (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>)进行预测。从图 4 可见, 预测的 CaM5.1 的构象与 PDB 中报道的该蛋白的构象相似, 整个蛋白呈哑铃型, 其 N-端及相邻的 2 个 EF-hand、C-端及相邻的 2 个 EF-hand 分别位于哑铃的两“铃”, 中央的  $\alpha$ -螺旋形成两铃的“柄”; CaM5.3 与 CaM5.1 相比, C-端多出了 CTD。推测这个 CTD 的存在可能影响该蛋白的构象, 进而影响与 IQM3 的结合。

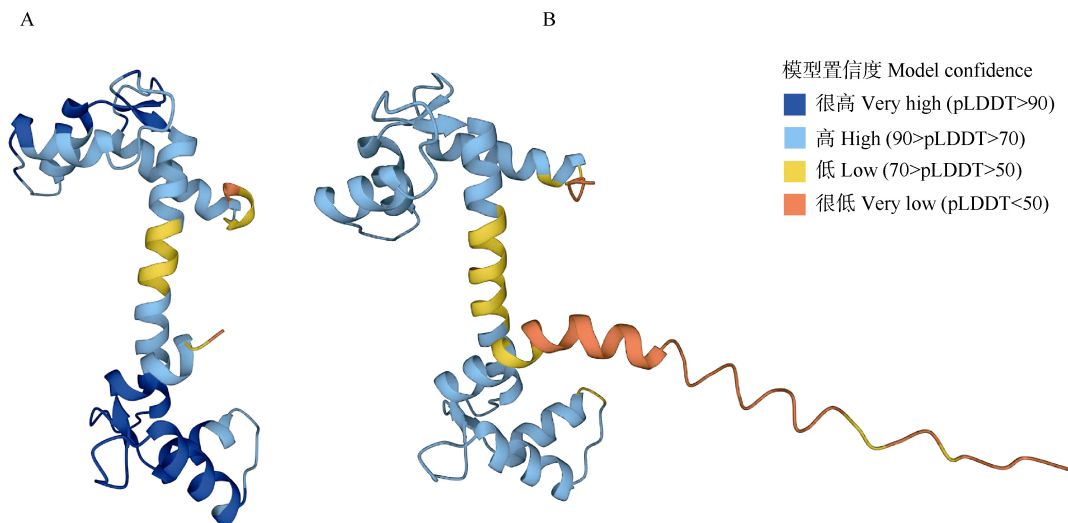


图 4 CaM5.1 (A)与 CaM5.3 (B)的三维结构预测图。pLDDT: 预测的 IDDT-C $\alpha$  值, 每个残基的局部置信度, pLDDT 越高, 置信度越高, pLDDT 低表示该区域可能是独立的非结构域。

Fig. 4 Predicted 3D structures of CaM5.1 (A) and CaM5.3 (B). pLDDT: Predicted value of IDDT-C $\alpha$ , local confidence for each residue, the higher pLDDT the higher confidence, and low pLDDT indicates that the region may be an independent non-domain.

## 2.5 CaM5.3 的 CTD 替换对其与 IQM3 结合的影响

CML10 是一个与 CaM 家族同源性较高的 CML 家族成员, 其结构与 CaM5.3 相似, 除具有 4 个 EF-hand 外, 其 C-末端也有 1 个 CTD, 由 45 个氨基酸残基组成(图 5), 该序列影响 CML10 与磷酸甘露糖变位酶(Phosphomannomutase, PMM)的结合<sup>[17]</sup>。

CML10 的 CTD 与 CaM5.3 的 CTD 同源性较低, 其可以用于替换 CaM5.3 的 CTD, 验证 CaM5.3 的 CTD 是阻碍 CaM5.3 与 IQM3 在酵母中结合的原因。因此, 将 CML10 的 CTD 连接到 CaM5.1 的 CDS 的 C-末端(图 5), 构建 pGADT7-CaM5.1-CTD<sub>CML10</sub> 载体, 与 IQM3 进行酵母双杂交分析(图 6)。

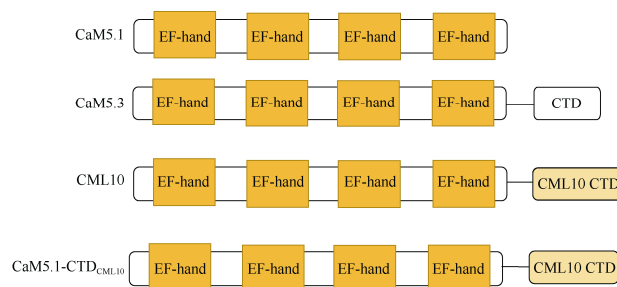


图 5 CaM5.1、CaM5.3、CML10、CaM5.1-CTD<sub>CML10</sub> 蛋白的基序组成

Fig. 5 Motif composition of CaM5.1, CaM5.3, CML10 and CaM5.1-CTD<sub>CML10</sub>

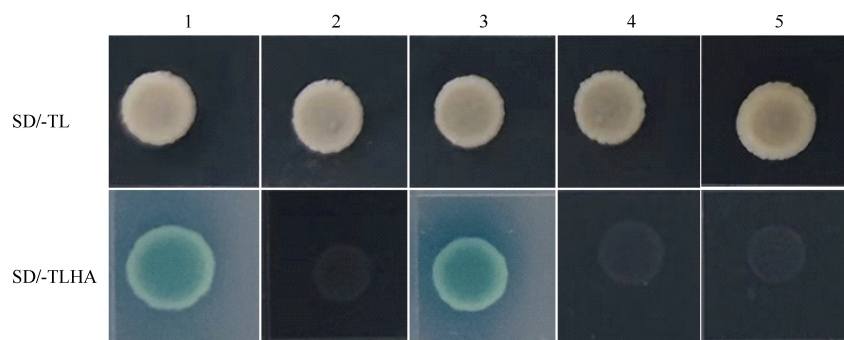


图6 CaM5.1、CaM5.3和CaM5.1-CTD<sub>CML10</sub>分别与IQM3的酵母双杂交。1: pGBKT7-53/pGADT7-T, 阳性对照; 2: pGBKT7/pGADT7, 阴性对照; 3: pGBKT7-IQM3/pGADT-CaM5.1; 4: pGBKT7-IQM3/pGADT-CaM5.3; 5: pGBKT7-IQM3/pGADT-CaM5.1-CTD<sub>CML10</sub>。

Fig. 6 Yeast two-hybrid of IQM3 with CaM5.1, CaM5.3 and CaM5.1-CTD<sub>CML10</sub>. 1: pGBKT7-53/pGADT7-T, positive control; 2: pGBKT7/pGADT7, negative control; 3: pGBKT7-IQM3/pGADT-CaM5.1; 4: pGBKT7-IQM3/pGADT-CaM5.3; 5: pGBKT7-IQM3/pGADT-CaM5.1-CTD<sub>CML10</sub>.

在 SD/-TLHA/X- $\alpha$ -Gal 培养基中, 阳性对照能正常生长且变蓝色(图 6: 1), 阴性对照 pGBKT7 分别与 pGADT7-CaM5.1/5.3/5.1-CTD<sub>CML10</sub> 的组合均不能形成菌落(未展示); IQM3 仅能在酵母中与 CaM5.1 发生相互作用(图 6: 3), 不能与 CaM5.3 (图 6: 4)和 CaM5.1-CTD<sub>CML10</sub> 发生相互作用(图 6: 5)。这表明在 CaM5.1 的 C-端增加 CML10 的 CTD 会阻碍所得重组蛋白与 IQM3 在酵母中的结合, 提示 CaM5.3 不能与 IQM3 结合的原因与 CaM5 的 CTD 有关。

### 3 讨论和结论

本研究表明, 拟南芥 CaM5 的 2 个不同剪接体 CaM5.1 和 CaM5.3 具有不同的生化功能, 在酵母中, CaM5.1 能与 IQM3 结合, 而 CaM5.3 不能与 IQM3 结合。生物信息学分析表明, CaM5.3 比 CaM5.1 多出 1 个由 35 个氨基酸残基组成的 CTD, 可能阻碍 CaM5.3 与 IQM3 的结合。在 CaM5.1 的 C-末端接上 CML10 的 CTD 干扰了所得重组蛋白与 IQM3 的结合, 证实 CaM5.3 的 CTD 阻碍了其 IQM3 的结合。可见, 拟南芥 CaM5 的可变剪接方式影响其蛋白质结合活性。

当 CaM 与 Ca<sup>2+</sup>结合, 会使 CaM 中 EF-hand 的 2 个  $\alpha$  螺旋角度变为垂直, 进而引起 CaM 分子表面特性发生改变, 形成易于 CaMBP 结合的疏水表面和疏水穴<sup>[18]</sup>。当 EF-hand 没有与 Ca<sup>2+</sup>结合时, CaM 的 N-端会维持关闭状态, 不能与 CaMBP 结合; 而 C-端会在半开和关闭的状态间变化, 从而还能与 CaMBP 结合<sup>[19-20]</sup>。左娜等<sup>[21]</sup>归纳总结 CaM 与 CaMBP 的相互作用主要是依靠疏水作用力, 而非静电作用

力。因此, CaM5.3 不能与 IQM3 发生蛋白质间相互作用的主要原因可能是 CaM5.3 末端 CTD 在空间结构上阻挡了 CaM5.3C-末端结构域的疏水表面或疏水作用力。而 IQM3 是一个钙不依赖的 CaMBP<sup>[15]</sup>, 因此推测, 在没有 Ca<sup>2+</sup>的情况下, CaM5.3 的 N-末端结构域维持关闭状态, C-末端的 CTD 阻挡了 IQM3 与 CaM5.3 的结合。CaM5.3 的 CTD 改变了 CaM5.3 的靶蛋白的种类, 使 CaM5.3 具有不同于常规 CaM 的生物功能。

尽管本研究从生化水平上揭示了 CaM5.1 和 CaM5.3 这 2 种剪接体具有不同的蛋白结合活性, 但是 CaM5 基因的可变剪接的生物学功能未知, 进一步研究可聚焦于 CaM5.1 和 CaM5.3 在植物体内的时空表达、细胞定位以及与 CaM5.1 和 CaM5.3 特异结合蛋白及其信号通路的分析。

### 参考文献

- [1] MEDVEDEV S S. Principles of calcium signal generation and transduction in plant cells [J]. Russ J Plant Physiol, 2018, 65(6): 771-783. doi: 10.1134/S1021443718060109.
- [2] YUN C H, BAI J, SUN D Y, et al. Structure of potato calmodulin PCM6: The first report of the three-dimensional structure of a plant calmodulin [J]. Acta Crystallogr D Biol Cryst, 2004, 60(7): 1214-1219. doi: 10.1107/S0907444904009771.
- [3] ISHIDA H, RAINALDI M, VOGEL H J. Structural studies of soybean calmodulin isoform 4 bound to the calmodulin-binding domain of tobacco mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 provide insights into a sequential target binding mode [J]. J Biol Chem, 2009, 284(41): 28292-28305. doi: 10.1074/jbc.M109.025080.
- [4] ANDREWS C, XU Y T, KIRBERGER M, et al. Structural aspects and

- prediction of calmodulin-binding proteins [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 22(1): 308. doi: 10.3390/ijms22010308.
- [5] O'DAY D H. CaMBOT: Profiling and characterizing calmodulin-binding proteins [J]. *Cell Signal*, 2003, 15(4): 347–354. doi: 10.1016/S0898-6568(02)00116-X.
- [6] POOVAIAH B W, DU L Q, WANG H Z, et al. Recent advances in calcium/calmodulin-mediated signaling with an emphasis on plant-microbe interactions [J]. *Plant Physiol*, 2013, 163(2): 531–542. doi: 10.1104/pp.113.220780.
- [7] MCCORMACK E, BRAAM J. Calmodulins and related potential calcium sensors of *Arabidopsis* [J]. *New Phytol*, 2003, 159(3): 585–598. doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00845.x.
- [8] LANDONI M, DE FRANCESCO A, GALBIATI M, et al. A loss-of-function mutation in *Calmodulin 2* gene affects pollen germination in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Mol Biol*, 2010, 74(3): 235–247. doi: 10.1007/s11103-010-9669-5.
- [9] MCCORMACK E, TSAI Y C, BRAAM J. Handling calcium signaling: *Arabidopsis* CaMs and CMLs [J]. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(8): 383–389. doi: 10.1016/j.tplants.2005.07.001.
- [10] ZOU Z M, ZOU H X, ZHANG H, et al. Studies on alternative splicing variants of rice *OsHDT703* gene [J]. *Acta Agric Boreali-Sin*, 2019, 34(4): 9–15. [邹志明, 邹海霞, 张焕, 等. 水稻 *OsHDT703* 基因的可变剪接体分析 [J]. 华北农学报, 2019, 34(4): 9–15. doi: 10.7668/hbnxb.201751587.]
- [11] ECKARDT N A. The plant cell reviews alternative splicing [J]. *Plant Cell*, 2013, 25(10): 3639. doi: 10.1105/tpc.113.251013.
- [12] REDDY A S N, MARQUEZ Y, KALYNA M, et al. Complexity of the alternative splicing landscape in plants [J]. *Plant Cell*, 2013, 25(10): 3657–3683. doi: 10.1105/tpc.113.117523.
- [13] HAO X F, WU Z J, MA T, et al. Alternative splicing of plant genes: Full of change, sail with wind [J]. *Chin Bull Bot*, 2022, 57(5): 661–672. [郝雪峰, 毋张晶, 马甜, 等. 植物基因选择性剪接: 断舍离合, 达权知变 [J]. 植物学报, 2022, 57(5): 661–672. doi: 10.11983/CBB22041.]
- [14] TIAN C E, ZHOU Y P. Research progress in plant IQ motif-containing calmodulin-binding proteins [J]. *Chin Bull Bot*, 2013, 48(4): 447–460. [田长恩, 周玉萍. 植物具 IQ 基序的钙调素结合蛋白的研究进展 [J]. 植物学报, 2013, 48(4): 447–460. doi: 10.3724/SP.J.1259.2013.00447.]
- [15] ZHOU Y P, CHEN Y Z, YAMAMOTO K T, et al. Sequence and expression analysis of the *Arabidopsis* IQM family [J]. *Acta Physiol Plant*, 2010, 32(1): 191–198. doi: 10.1007/s11738-009-0398-9.
- [16] ZHOU Y P, DUAN J, FUJIBE T, et al. AtIQM1, a novel calmodulin-binding protein, is involved in stomatal movement in *Arabidopsis* [J]. *Plant Mol Biol*, 2012, 79(4): 333–346. doi: 10.1007/s11103-012-9915-0.
- [17] CHO K M, NGUYEN H T K, KIM S Y, et al. CML 10, a variant of calmodulin, modulates ascorbic acid synthesis [J]. *New Phytol*, 2016, 209(2): 664–678. doi: 10.1111/nph.13612.
- [18] ZHANG M J, TANAKA T, IKURA M. Calcium-induced conformational transition revealed by the solution structure of apo calmodulin [J]. *Nat Struct Biol*, 1995, 2(9): 758–767. doi: 10.1038/nsb0995-758.
- [19] FENG Y D, WEI Q. Diversity of the modes for calmodulin binding to its targets [J]. *Prog Chem*, 2012, 24(10): 2028–2039. [冯业丹, 魏群. 钙调素与靶蛋白结合模式的多样性 [J]. 化学进展, 2012, 24(10): 2028–2039.]
- [20] WU C T, FAN T, LÜ T X, et al. Recent advances in calmodulin binding protein involved in plant responses to adversity stresses [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2022, 30(6): 823–834. [吴春婷, 范甜, 吕天晓, 等. 钙调素结合蛋白参与调控植物逆境胁迫的研究进展 [J]. 热带亚热带植物学报, 2022, 30(6): 823–834. doi: 10.11926/jtsb.4711.]
- [21] ZUO N, CHEN J, LÜ Y G. Advance progress in plant calmodulin and calmodulin-binding proteins structure biology [J]. *Cereals Oils*, 2016, 29(9): 1–5. [左娜, 陈洁, 吕莹果. 植物钙调素及其结合蛋白的结构生物学进展 [J]. 粮食与油脂, 2016, 29(9): 1–5. doi: 10.3969/j.issn.1008-9578.2016.09.001.]