

鼠源 Filia N 端蛋白在 GSH 条件中的一种全新三维结构*

李新新¹⁾ 王巨克²⁾ 刘新奇^{1)**}

¹⁾南开大学生命科学学院, 药物化学生物学国家重点实验室, 天津 300071;

²⁾天津科技大学生物工程学院工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300457)

摘要 母性效应因子复合体 SCMC (subcortical maternal complex) 中的 Filia 蛋白, 其 N 端具有 I 型 KH 结构域的特征, 通过结合 RNA 参与卵子发生及胚胎发育过程中的 RNA 转录调控. 此外, Filia 蛋白对染色体整倍体化的维持起重要作用. 缺乏 Filia 的雌鼠体内早期胚胎发育进程延迟, 致使雌鼠生殖力降低, 但不会不育. 在卵母细胞成熟过程中, 还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 浓度发生变化以维持胞内的氧化还原环境. 本文成功解析了在含有 GSH 的条件中生长的 Filia (N1-124) 蛋白晶体结构. 与在不含 GSH 的条件中生长的 Filia (N1-124) 蛋白晶体相比, 在含有 GSH 的条件中, Filia (N1-124) 蛋白晶体的一个不对称单位中含有 5 对二聚体, Filia (N1-124) 单体分子在 $\alpha 3$ 螺旋区与邻近分子发生了结构域交换. Filia (N1-124) 晶体内凭借链间的离子键、氢键和疏水相互作用, 形成了独特的十聚体组装方式. 本文为进一步研究在不同生理条件下 Filia 的结构与功能的关系提供了结构依据.

关键词 Filia, SCMC, GSH, 晶体, 结构域交换

学科分类号 Q71

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00379

卵母细胞成熟过程中, 大量的母源 RNA 积累于卵母细胞内. 卵子受精后母源 RNA 逐渐被降解. 这些母源 RNA 为卵子受精、母源-合子转化、植入前胚胎发育等过程所必需^[1]. 胚胎发育起始于配子的识别, 受精过程如原核(pronuclear)的形成和融合等过程都极度依赖母性效应因子^[1-3]. 母源型向合子型转变过程极其需要母性效应因子来启动发育、消除多余的母源物质以及激活胚胎基因组^[4]. 胚胎基因组激活后, 发育能否顺利进行仍然需要储存的母性效应因子^[1].

在小鼠卵母细胞以及早期胚胎发育过程中, 存在一种母性效应因子复合体 SCMC (subcortical maternal complex), SCMC 复合体在卵子发生过程中完成组装, 对植入前的胚胎发育过程来说必不可少^[5]. SCMC 复合体由 FLOPED^[6]、MATER^[7]、TLE6^[8]、Filia^[5] 4 种蛋白组成, 也有研究报道认为 PADI6^[9]也参与了 SCMC 复合体的形成. 在 SCMC 复合体中, Filia 与 MATER 相互作用, 与 FLOPED

和 TLE6 没有直接的相互作用^[5]. 胚胎完成第一次细胞分裂后, SCMC 复合物中的组分分布于细胞-细胞接触区之外的区域^[5]. 该现象的发生是可逆的^[5-6, 10], 推测可能是由于位于细胞质中的预组装复合物(或复合物组分)和位于皮质下的复合物之间存在着动态平衡的缘故. 处于桑葚胚和囊胚期的 SCMC 复合物组分主要分布于胚胎发育的外层细胞中. 含有 SCMC 复合物的区域最后将发育成滋养外胚层, 而不含 SCMC 复合物的区域将发育成囊胚的内细胞团^[1, 5].

Filia 是 SCMC 复合体中的一员, 它由含有 3 个外显子的单拷贝基因编码, 定位于小鼠 9 号染色体长臂 D 区, 基因被选择性剪接成 1.2 kb 和 1.6 kb

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2010CB911800).

** 通讯联系人.

Tel: 022-23505130, E-mail: liu2008@nankai.edu.cn

收稿日期: 2013-08-14, 接受日期: 2013-10-16

两种 mRNA 转录产物, 在成熟的卵母细胞中特异表达^[9]. 与其他母性效应因子相似, 在卵母细胞减数分裂 / 成熟期和排卵期, Filia 转录本被逐渐降解, 而 Filia 蛋白在植入前胚胎发育过程中一直存在. 之前我们对 Filia 的序列比对和结构研究表明, Filia N 端含有一段延伸区域和一个非典型的 KH 结构域^[11]. Filia N 端第 40~124 位氨基酸残基形成了具有 $\beta 1-\alpha 1-\alpha 2-\beta 2-\beta 3-\alpha 3$ 拓扑结构的 KH 结构域^[12], 与其他 KH 结构域的整体结构相似. 不同的是, N 端 40 个残基的延伸区与典型的 KH 结构域形成了紧密的接触, 这种构象有利于结构的稳定, 并可能与卵子发生及胚胎发育过程中的转录调控有关^[11]. Filia C 端含有 10 个由 23 个氨基酸组成的随机重复序列^[9], 但目前结构信息一直未知.

在受精后的胚胎细胞增殖过程中, 母源 Filia 对染色体整倍体化的维持起重要作用. 缺失母源 Filia 会导致纺锤体形态发生以及纺锤体组装检控点受损, 影响胚胎发育, 表现出落后染色体 (lagging chromosomes)、微核以及高倍体等染色体非整倍体的特征. Filia 通过 RhoA 信号途径来调控并确保正常的纺锤体形态发生, 负责纺锤体组装过程中的关键调控子 (如 AURKA、PLK1 和 γ -tubulin) 在微管组织中心的合理分配^[13]. 此外, MAD2 是纺锤体组装检控点的必需组分, MAD2 通过定位到动粒来执行纺锤体组装检控点功能, 这一过程需要 Filia 的参与^[13]. 在体外实验与体内实验中均发现, 缺乏 Filia 的雌鼠体内的早期胚胎发育进程发生延迟, 但却不会完全阻滞早期胚胎发育. 表现为雌鼠受精后 2.5 天和 3.5 天, Filia 敲除的雌鼠的桑葚胚和囊胚数目显著降低. 缺乏 Filia 的胚胎在进行第一次和第二次有丝分裂时, 会发生 6~8 h 的延迟, 致使细胞周期较长时间地停留在 G2/M 期^[13].

卵母细胞成熟过程中, 多种基因转录和蛋白质合成发生改变. 卵母细胞内的还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 起到抗氧化、维持细胞内的氧化还原环境的作用. 此外, 在卵母细胞减数分裂中 GSH 具有维持纺锤体形态的作用. GSH 能够调节卵母细胞的受精及激活, 卵母细胞受精后, GSH 能够促进雄原核去浓缩化, 有助于植入前胚胎发育^[14]. 在卵母细胞成熟过程中, GSH 的含量是判断卵母细胞成熟程度的指标^[15]. GSH 随着卵母细胞的成熟而升高, M II 期达到高峰, 在受精卵和胚胎早期发育阶段, 浓度迅速下降. 我们在含有 GSH 和不含 GSH^[16]的缓冲液中分别得到了不同聚合状态的

Filia 蛋白晶体, 即不同的 GSH 含量条件下, Filia 蛋白具有明显不同的构象. 之前我们已经发表了 Filia 在没有 GSH 条件下的晶体结构, 本文着重阐述了在含有 GSH 条件下的 Filia 晶体结构, 这种结构展示了一种新的组装方式, 为揭示 Filia 在不同的生理环境下的功能及作用机制提供了结构基础.

1 材料与方法

1.1 表达载体构建及蛋白质表达纯化

按照 TEV-LIC 连接方法设计引物, 将鼠源 Filia N 端 1-124Aa 基因亚克隆到 pET30a-TEV/LIC 载体中, 载体具有 N 端的 6xHis 融合标签. DNA 测序鉴定结果显示, 序列 100%一致. 随后在大肠杆菌 BL21(DE3)表达系统中表达 Filia (N1-124Aa). 37°C 培养, 当 A_{600} 值达到 0.8 时降温至 16°C, 加入 IPTG 并使其终浓度为 0.3 mmol/L. 经 14 h 的诱导后, 收集菌体 (4 000 g 离心, 10 min). 菌体在裂解缓冲液 (50 mmol/L Tris pH 8.0, 500 mmol/L NaCl, 4 mmol/L imidazole) 中重悬, 4°C 超声破碎.

细胞裂解物于 18 000 r/min, 4°C, 40 min 条件下离心, 取上清液通过镍亲和柱 (Qiagen) 挂柱, 洗涤缓冲液 (50 mmol/L Tris pH 8.0, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L imidazole) 洗去非特异吸附蛋白后, 洗脱缓冲液 (50 mmol/L Tris pH 8.0, 500 mmol/L NaCl, 500 mmol/L imidazole) 进行洗脱. 目的蛋白用 Amicon Ultra filter (Millipore) 3kDa 浓缩管浓缩并替换为低盐缓冲液 (50 mmol/L Tris pH 8.0, 50 mmol/L NaCl), 加入 TEV 酶酶切过夜后, 利用阴离子交换柱 HiTrap Q HP 柱 (GE Healthcare) 进行分离纯化. 在 50 mmol/L Tris (pH 8.0) 缓冲液中经 0.05~0.8 mol/L NaCl 线性梯度洗脱得到目标蛋白. 洗脱峰浓缩后利用凝胶层析柱 HiLoad 16/60 Superdex-200 (GE Healthcare) 进行纯化, 缓冲液为 50 mmol/L Tris pH 8.0, 300 mmol/L NaCl.

纯化得到的蛋白质经 SDS-PAGE 鉴定, 纯度大于 95%. 纯化的蛋白质浓缩至 15 g/L, 分别保存在不含 GSH (50 mmol/L Tris pH 8.0, 300 mmol/L NaCl) 和含 GSH 的缓冲液 (50 mmol/L Tris pH 8.0, 300 mmol/L NaCl 和 10 mmol/L GSH) 中, -80°C 冻存, 以用于后续的结晶和生化实验.

1.2 结晶、优化和数据收集

利用 Hampton Research 公司的晶体生长试剂盒 Crystal Screen、Crystal Screen 2、Index、Index 2、PEG/Ion 和 SaltRx 对保存在含 10 mmol/L GSH 的

缓冲液(50 mmol/L Tris pH 8.0, 300 mmol/L NaCl 和 10 mmol/L GSH)中的 Filia (N1-124Aa)蛋白进行结晶条件筛选. 在 20°C 下, 以结晶条件为基础, 尝试对 pH 缓冲液、沉淀剂和盐的种类、浓度以及蛋白质浓度进行优化, 最终在以硫酸铵为沉淀剂的条件下(1.3 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L GSH, pH 7.0)获得了分辨率达 2.8Å 的 Filia (N1-124Aa)单晶. 衍射数据的收集在上海同步辐射光源进行. 在进行数据收集时, 先将晶体在含有 20%甘油的池液中保存 10 s 进行防冻处理, 再在 100K 温度条件下进行数据收集.

利用 HKL2000 对衍射数据进行指标化和积分. 以我们之前解析的不含 GSH 条件中生长的二聚体 Filia (N1-124)晶体为模型, 通过 CCP4 进行分子置换. 然后用 Phenix 修正初始模型, 在 COOT 中手动调整搭建剩余序列. 利用 Phenix 和 COOT 反复修正并最终解析得到含有 GSH 条件中生长的 Filia(N1-124)结构(表 1).

Table 1 Data collection and refinement statistics for Filia N1-124 (decamer)

| | | |
|---------------------------------------|-----------------------------|----------------------|
| Data collection | Space group | $P2_12_12_1$ |
| | a, b, c (Å) | 75.66, 89.06, 207.16 |
| | α, β, γ (°) | 90, 90, 90 |
| | Wavelength/Å | 0.9792 |
| | Resolution/Å | 2.80(2.88-2.80) |
| | Rmerge/%* | 0.18(0.54) |
| | $I / \sigma I$ | 5.1(1.6) |
| | Completeness/% | 98.64(95.45) |
| | Redundancy | 4.8(3.4) |
| | Refinement | Resolution/Å |
| No. reflections | | 42002 |
| $R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ (%) | | 22.70/28.94 |
| No. atoms | | |
| Protein | | 9362 |
| Water | | 203 |
| B -factors/Å ² | | |
| Protein | | 50.30 |
| Water | | 56.45 |
| R.m.s. deviations | | |
| Bond lengths/Å | 0.009 | |
| Bond angles/(°) | 1.245 | |

Values in parentheses are for highest-resolution shell.
* $R_{\text{merge}} = \sum |I_i - \langle I \rangle| / \sum I_i$, where I_i is the intensity of the i th observation and $\langle I \rangle$ is the mean intensity of reflections.

1.3 聚集实验

收集经过镍亲和柱、阴离子交换柱、凝胶层析柱纯化后得到的 Filia (N1-124)蛋白, 浓缩至蛋白质浓度为 1 g/L, 选用 GSH、 β -ME、DTT 3 种还原剂进行实验, 测试 Filia N1-124 蛋白的聚合程度以及稳定性. 还原剂在 50 mmol/L Tris pH 8.0, 300 mmol/L NaCl 缓冲液中进行溶解. 还原剂的浓度预先配置成效应浓度的 10 倍, 用于进行实验的还原剂的效应浓度分别为 0、0.10、0.20、0.50、1.0、2.5、5.0、10、20 和 30 mmol/L, 然后缓慢滴加至目的蛋白溶液中并充分混匀, 随后, 测定 600 nm 处的吸光度值(A_{600}).

2 结果

2.1 Filia 晶体结构

以不含 GSH 的条件中生长的 Filia 晶体结构 (PDB entry:3v69)为模板, 我们成功解析了在含有 GSH 条件下生长的 Filia 晶体的结构. 对二者的结构进行对比后发现, 在蛋白质纯化以及晶体生长过程中, 含有 GSH 的溶液中生长的 Filia 蛋白晶体的晶胞参数发生改变, 分子间堆积以及相互作用也发生了改变. 不含 GSH 的条件中生长的 Filia 晶体属于 $P2_12_12_1$ 空间群, 一个不对称单位含有 2 个 Filia N1-124 分子, Filia 分子按 $\beta 1-\alpha 1-\alpha 2-\beta 2-\beta 3-\alpha 3$ 拓扑结构排列, 具有 I 型 KH 结构域的特征, 二聚体相互作用界面富含大量的疏水氨基酸, 分子间主要靠 α 螺旋之间的疏水相互作用形成二聚体^[1].

含有 GSH 条件下生长的 Filia 晶体虽然也属于 $P2_12_12_1$ 空间群, 但一个不对称单位含有 10 个 Filia (N1-124)分子, 形成了由 5 对二聚体组成的四面体样结构(图 1). 其中的 3 对二聚体沿二聚体交界面附近以同向排列的方式形成“三角形”, 另外两对二聚体与“三角形”底边垂直, 以一正一反的反向排列方式卡在“三角形”底边中部, 也就是说, 其整体结构类似于两个共享顶点, 套在一起并互相垂直的“三角形”, 分子间的这种堆积方式使其内部形成了空腔.

有趣的是, 在两个不同条件下的晶体中, Filia 单体的结构差别较大(图 2a). 十聚体 Filia 分子中, 5 个二聚体单元全部在 $\alpha 3$ 螺旋区(98~116 位氨基酸)发生了结构域交换, 也就是说, A 链的 $\alpha 3$ 螺旋与 B 链的 $\alpha 3$ 螺旋沿分子内部对称轴发生了互换. 这样就产生了二聚体整体结构差别不大, 而单体间发生了显著的差异的现象.

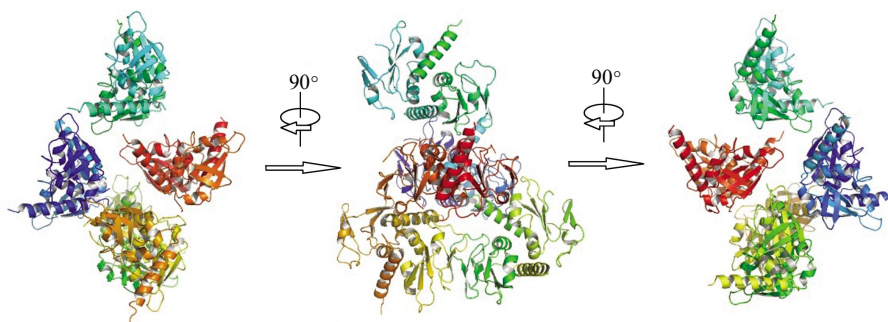


Fig. 1 The conformation of the Filia decamer

The ribbon model of the Filia decamer from the side view. Ten molecules of Filia (N1-124) in one asymmetric unit forming five pairs of dimer. Molecules of Filia (N1-124) are colored in rainbow style.

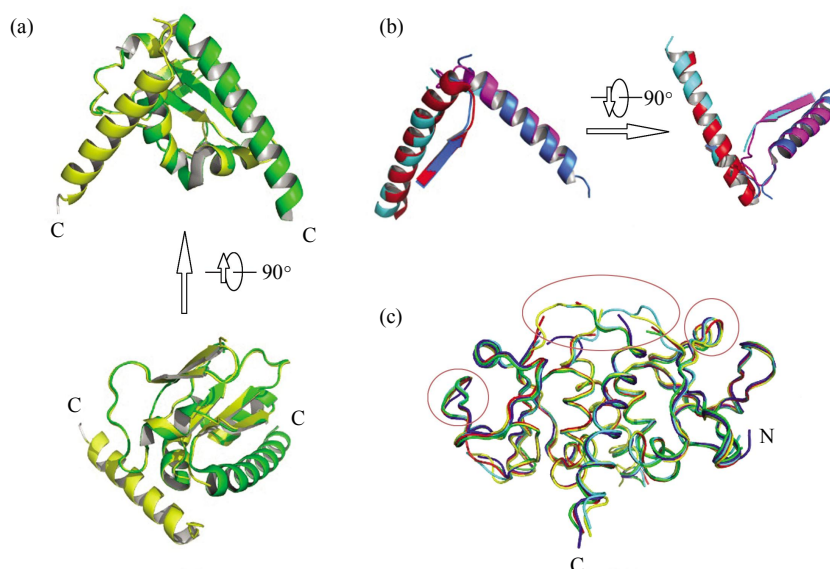


Fig. 2 Structural comparison of the Filia dimer with Filia decamer

(a) The structure of chain A of Filia decamer (colored yellow) superimposed with that of Filia dimer (colored green). Domain swapping occur at $\alpha 3$ -helix at C-terminus. (b) A portion of the structure of chain A (colored blue) and chain B (colored cyan) of Filia decamer superimposed with that of Filia dimer [chain A (colored red) and chain B (colored magenta)]. The whole structure seems to be unaltered. (c) The five dimers of Filia decamer in one asymmetric unit are superimposed. They are structurally identical, except slight difference of loops between $\beta 3$ -sheet and $\alpha 3$ -helix at C-terminus. The pink circle highlights where the structures exhibit variations.

连接 $\alpha 3$ 螺旋(98~116 位氨基酸)和 $\beta 3$ 折叠(84~89 位氨基酸)的是一段 Loop 区(90~97 位氨基酸), 5 个二聚体中有 4 个 loop 区的部分电子云不清晰, 可能是由于这段 Loop 区的柔性非常大, 使 Filia 分子在不同环境下的自由能发生改变, 分子内部形成了不同的堆积, 分子间发生了结构域交换。

将二聚体和十聚体中二聚体单元的三维结构进

行叠合。与不含 GSH 条件下的二聚体 Filia 分子相比, 十聚体 Filia 分子的 AB、CD、EF、GH、IJ 链原子叠合的 RMSD 值分别为 0.840、0.562、0.702、1.042 和 0.857Å。与不含 GSH 条件下的 Filia 二聚体分子相比, 含有 GSH 条件中的 Filia 二聚体单元的整体结构看上去也同样变化不大, 仅在 loop 环处有轻微的摆动(图 2b)。除了存在结构域交换外, 十聚体中二聚体单元与不含 GSH 条件下的二聚体

的折叠方式非常相似。

在十聚体 *Filia* 分子中, 对每个二聚体单元的三维结构进行叠合(图 2c), 结果表明, 每个二聚体之间的结构基本类似, 略有差别. 与 AB 链形成的二聚体相比, CD、EF、GH、IJ 链原子叠合的 RMSD 值分别为 0.489、0.444、0.459 和 0.358Å.

2.2 *Filia* 晶体结构界面及其相互作用

在含有 GSH 的条件下生长的 *Filia* 晶体中, 9 对疏水相互作用、4 对氢键和 2 对离子键共同维持了二聚体内部的稳定. 在十聚体分子中, 二聚体单

元 - 单元之间形成许多接触面相互作用, 在离子键、疏水相互作用、氢键等力的共同作用下保持二聚体单元 - 单元之间的相互作用, 稳定十聚体的整体结构.

有 19 对离子键介于十聚体的二聚体单元 - 单元界面. 其中, A、B、D、E、G 链的单体分子中 N 端的多个氨基酸以及 E 链单体分子中 C 端多个氨基酸参与到二聚体单元之间的相互作用中, 而 C、F、H、I、J 链的单体分子只有较少数的氨基酸在相互作用中发挥作用(图 3).

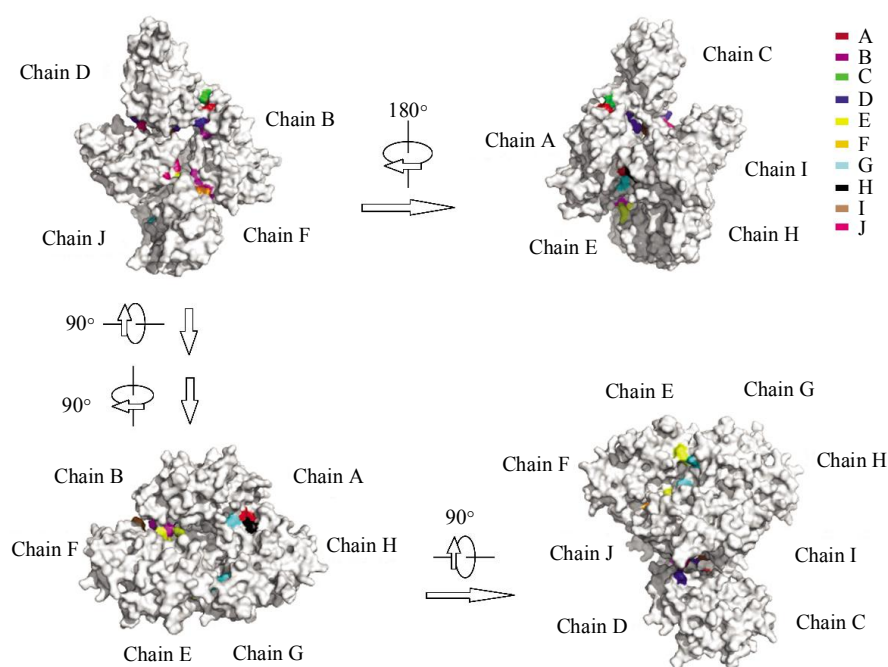


Fig. 3 Ionic Interactions between five dimers of decamer

The structure is shown in surface-filled model. The interaction sites from various chains are colored differentially.

有 23 对氨基酸依靠疏水相互作用来稳定二聚体界面. A-D、C-I、E-I、F-J 链间各存在 1 对疏水相互作用; A-G、A-H 链间各存在 2 对疏水相互作用; E-J 链间各存在 3 对疏水相互作用; G-I 链间存在 5 对疏水相互作用; E-G 链间存在 7 对疏水相互作用, 构成了十分稳定的疏水面(图 4a).

此外, 有 11 对链间氢键参与二聚体界面的相互作用. A-G 链间的 His34(A) : Glu117(G)和

Arg100(A) : Ala119(G)之间形成了 2 对氢键, A-H 链间的 Glu36(A) : Arg49(H)形成了一对氢键, E-G 链间形成了 4 对氢键, 分别为 Lys16(E) : Leu4(G)、Arg6(E) : Asp14(G)、Asp14(E) : Arg6(G)和 Lys5(E) : Glu22(G), E-I 链间的 Ala120(E) : Arg110(I)和 E-J 链间的 Ala119(E) : Arg83(J)各形成了一对氢键, G-I 链间的 Glu36(G) : Ala95(I)和 Ala95(G) : Glu36(I)之间形成了 2 对氢键(图 4b).

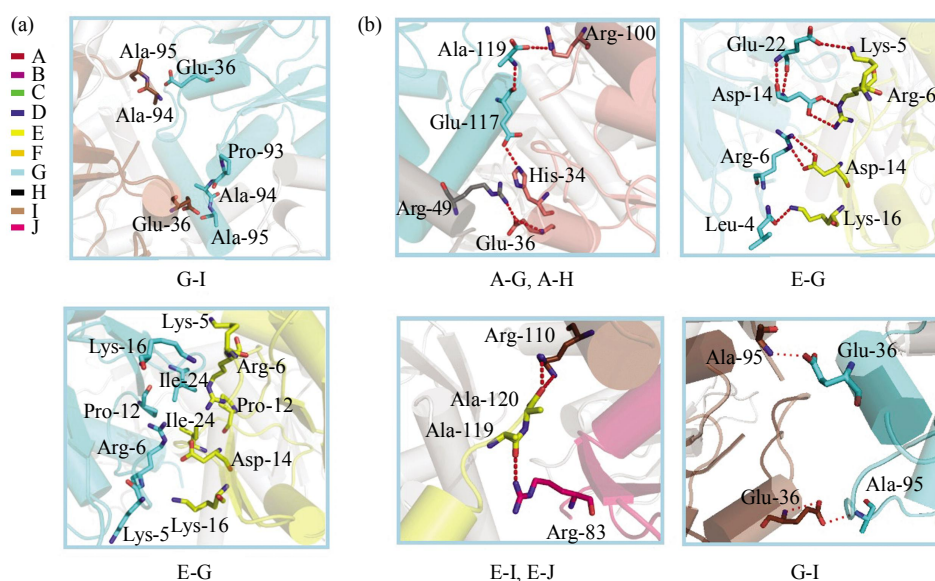


Fig. 4 Hydrophobic Interactions and H-bond between five dimers of decamer

The secondary structures are shown in cartoon model, and interaction residues are shown in stick. The interaction sites from various chains are colored differentially.

2.3 聚集实验

在含有 GSH 的条件下获得了十聚体形式存在的 Filia(N1-124), 我们推测, GSH 存在与否对 Filia(N1-124)的聚合状态有影响. 在纯化后的 Filia(N1-124)蛋白中添加 GSH、 β -ME、DTT 3 种还原剂进行聚集实验, 测定 A_{600} 后, 我们发现, β -ME、DTT 这两种还原剂无论在什么浓度下, 都不能使 A_{600} 值发生改变, 即没有发生聚合; 而溶解了不同浓度 GSH 的缓冲液滴加到 Filia(N1-124)蛋白中, 当浓度达到 7.5 mmol/L 时, A_{600} 值显著升高, 聚集程度发生明显变化; 当浓度达到 20 mmol/L 时, 吸光度值趋于稳定. 对溶解了不同浓度 GSH 的缓冲液进行 pH 值测定, 发现缓冲液的 pH 值随 GSH 浓度升高而降低. 效应浓度为 7.5 mmol/L 时, pH 值降至 4.55, 效应浓度达到 20 mmol/L 时, 吸光度值趋于稳定, 为 3.30.

将溶解了不同浓度 GSH 缓冲液的 pH 值全部调整为 7.5 后再进行实验, 则无论在什么浓度下, 都不能使 A_{600} 吸光度值发生改变. 此外, 在不含 GSH 的 Filia 蛋白溶液中, 改变 Filia 蛋白所在溶液的 pH 后, 发现 Filia 蛋白的聚集程度随着溶液 pH 的降低而增加. 因此, 我们推测, GSH 对 Filia(N1-124)蛋白聚合程度的影响可能是由于 GSH 的

添加改变了缓冲液的 pH 值, 使二聚体单元 - 单元之间表面电荷发生变化, 在交界面之间形成了许多对离子键和氢键等作用力, 促进了十聚体堆积结构的产生.

3 讨 论

还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)有许多重要的生理功能. 卵母细胞成熟过程中, 可以根据 GSH 的含量来判断卵母细胞成熟程度. GSH 随着卵母细胞的成熟而升高, M II 期达到高峰(最高可达 7 mmol/L), 在受精卵和胚胎早期发育阶段, 浓度迅速下降. GSH 水平的变化可能表明了胚胎在发育过程中对氧化水平是敏感的^[7]. 在本文中, 我们报道了在含有 GSH 的缓冲液中得到 Filia 蛋白晶体结构. 与之前报道的在不含 GSH 条件下得到的晶体结构相比, Filia 蛋白具有明显不同的构象. 在得到的晶体结构中, 一个不对称单位含有 5 对二体, 而不是像以前不含 GSH 时, 只以单纯二体的形式存在. 我们仔细地检查了晶体结构, 并没有发现相应于 GSH 的电子密度. 这一方面可能是由于我们的数据分辨率不够高(2.8Å), 另一方面, 也可能 GSH 与 Filia 蛋白的结合是非位点特异性的, 从而电子密度被平均掉了.

GSH 加入到含有 Filia 蛋白的缓冲液之后, 容易引起蛋白质的聚集, 形成沉淀, 从而使吸光度值升高. 我们将含有不同浓度 GSH 的缓冲液的 pH 均调整为 7.5, 发现调整 pH 值后 GSH 浓度的变化不会显著影响 Filia 蛋白在 600 nm 处的吸光度值. 对实验结果进行分析后, 我们认为, 在体外实验中, GSH 的添加会使缓冲液的 pH 值发生改变, Filia(N1-124)蛋白的聚合程度会随之变化. 在胚胎发育过程中, 细胞内的 pH 常常会发生较大的变化, 我们目前还不清楚这种变化与 GSH 浓度和 Filia 功能之间的关系, 还需要进一步的实验验证. Li 等^[9]在 2008 年的研究中报道, 经 HPLC 对卵细胞裂解物进行分离和免疫印迹检测后发现, 介于 158~2000 ku 之间的组分都能够检测到 Filia, 除了介于 669~2000 ku 之间的 FLOPED、MATER、TLE6 和 Filia 的复合物组分外, 158~440 ku 之间还存在 Filia 自身特有的分离峰, 表明在生理条件下, Filia 蛋白可能通过形成 SCMC 复合物, 或是通过自身寡聚或与其他蛋白质相互作用的方式执行生理功能.

结构域交换可以作为寡聚组装形成的一种方式. 在发生结构域交换时, 单体蛋白分子中的二级或三级结构元件被另一分子的相同元件所替换, 而单体分子内其他部分的结构未发生变化. 与未发生交换的蛋白相比, 结构域互换产生的寡聚体常常更有利于功能的发挥, 是一种进化上选择的结果. 在蛋白质二聚体中, 蛋白质的某一结构域在二体内的互换(domain swapping)经常作为一种维持蛋白二体稳定和行使功能的调节方式. 在本文中 GSH 存在条件下得到的 Filia 二体中, 我们也观察到了 $\alpha 3$ 螺旋的二体内互换, 但具体的作用目前还不清楚. 综上所述, 本文报道的 Filia 在 GSH 存在下的晶体结构阐述了 Filia 的一种新的堆积方式, 为 Filia 在胚胎发育过程中的作用提供了新的信息.

参 考 文 献

- [1] Li L, Lu X, Dean J. The maternal to zygotic transition in mammals. *Mol Aspects Med*, 2013, **34**(5): 919-938
- [2] Philipps D L, Wigglesworth K, Hartford S A, *et al.* The dual bromodomain and Wd repeat-containing mouse protein brwd1 is required for normal spermiogenesis and the oocyte-embryo transition. *Dev Biol*, 2008, **317**(1): 72-82
- [3] Wu X, Viveiros M M, Eppig J J, *et al.* Zygote arrest 1 (Zar1) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. *Nat Genet*, 2003, **33**(2): 187-191
- [4] Tadros W, Lipshitz H D. The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development*, 2009, **136**(18): 3033-3042
- [5] Li L, Baibakov B, Dean J. A subcortical maternal complex essential for preimplantation mouse embryogenesis. *Dev Cell*, 2008, **15**(3): 416-425
- [6] Herr J C, Chertihin O, Digilio L, *et al.* Distribution of Rna binding protein moep19 in the oocyte cortex and early embryo indicates pre-patterning related to blastomere polarity and trophectoderm specification. *Dev Biol*, 2008, **314**(2): 300-316
- [7] Tong Z B, Gold L, Pfeifer K E, *et al.* Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nat Genet*, 2000, **26**(3): 267-268
- [8] Bajoghli B. Evolution of the groucho/tle gene family: gene organization and duplication events. *Dev Genes Evol*, 2007, **217**(8): 613-618
- [9] Yurttas P, Vitale A M, Fitzhenry R J, *et al.* Role for Padi6 and the cytoplasmic lattices in ribosomal storage in oocytes and translational control in the early mouse embryo. *Development*, 2008, **135**(15): 2627-2636
- [10] Ohsugi M, Zheng P, Baibakov B, *et al.* Maternally derived filia-mater complex localizes asymmetrically in cleavage-stage mouse embryos. *Development*, 2008, **135**(2): 259-269
- [11] Wang J, Xu M, Zhu K, *et al.* The N-terminus of filia forms an atypical Kh domain with a unique extension involved in interaction with RNA. *PLoS One*, 2012, **7**(1): e32029
- [12] Valverde R, Edwards L, Regan L. Structure and function of Kh domains. *FEBS J*, 2008, **275**(11): 2712-2726
- [13] Zheng P, Dean J. Role of filia, a maternal effect gene, in maintaining euploidy during cleavage-stage mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(18): 7473-7478
- [14] Zuelke K A, Jeffay S C, Zucker R M, *et al.* Glutathione (Gsh) concentrations vary with the cell cycle in maturing hamster oocytes, zygotes, and pre-implantation stage embryos. *Mol Reprod Dev*, 2003, **64**(1): 106-112
- [15] de Matos D G, Furnus C C. The importance of having high glutathione (Gsh) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development effect of Beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology*, 2000, **53**(3): 761-771
- [16] Wang J, Zhang T C, Liu X. Preliminary crystallographic analysis of the N-terminal domain of filia, a protein essential for embryogenesis. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2010, **66**(Pt 9): 1111-1114
- [17] Gardiner C S, Reed D J. Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod*, 1994, **51**(6): 1307-1314

A Novel Structure of *Mus musculus* Filia N-terminal Protein Grown in Solution With GSH*

LI Xin-Xin¹⁾, WANG Ju-Ke²⁾, LIU Xin-Qi¹⁾**

¹⁾ College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China;

²⁾ College of Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract Filia is one of the components of maternal Subcortical Maternal Complex(SCMC). The N-terminal of Filia is similar to KH domain of type I family, which play roles in transcription regulation in oogenesis and embryo development by binding RNA. Additionally, maternal Filia plays essential role in maintaining euploidy. The absence of maternal Filia appears to delay embryonic progression, which can decrease the number of offspring rather than sterile. During oocyte maturation stage, the concentration of GSH varied to keep balance of oxidation-reduction. Our crystallographic studies successfully reveal the structure of Filia N-terminal protein grown in solution with GSH. In contrast with the structure of Filia N-terminal protein grown in condition free of GSH, protein grown in GSH have five pairs of dimer in an asymmetry unit. Domain swapping occurs in the α 3-helix of Filia (N1-124) molecules. A special decamer structure is formed by ionic interaction, H-bond and hydrophobic interaction. The Filia N-terminal structure provides a structural foundation for further researches on the structure and function of Filia in diversity physiological environment.

Key words Filia, SCMC, GSH, crystal, domain swapping

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00379

*This work was supported by a grant from National Basic Research Program of China (2010CB911800).

**Corresponding author.

Tel: 86-22-23505130, E-mail: liu2008@nankai.edu.cn

Received: August 14, 2013 Accepted: October 16, 2013