



清华大学
Tsinghua University

Phase Transition in Postsynaptic Densities Underlies Formation of Synaptic Complexes and Synaptic Plasticity

Zeng et al., 2016, *Cell*

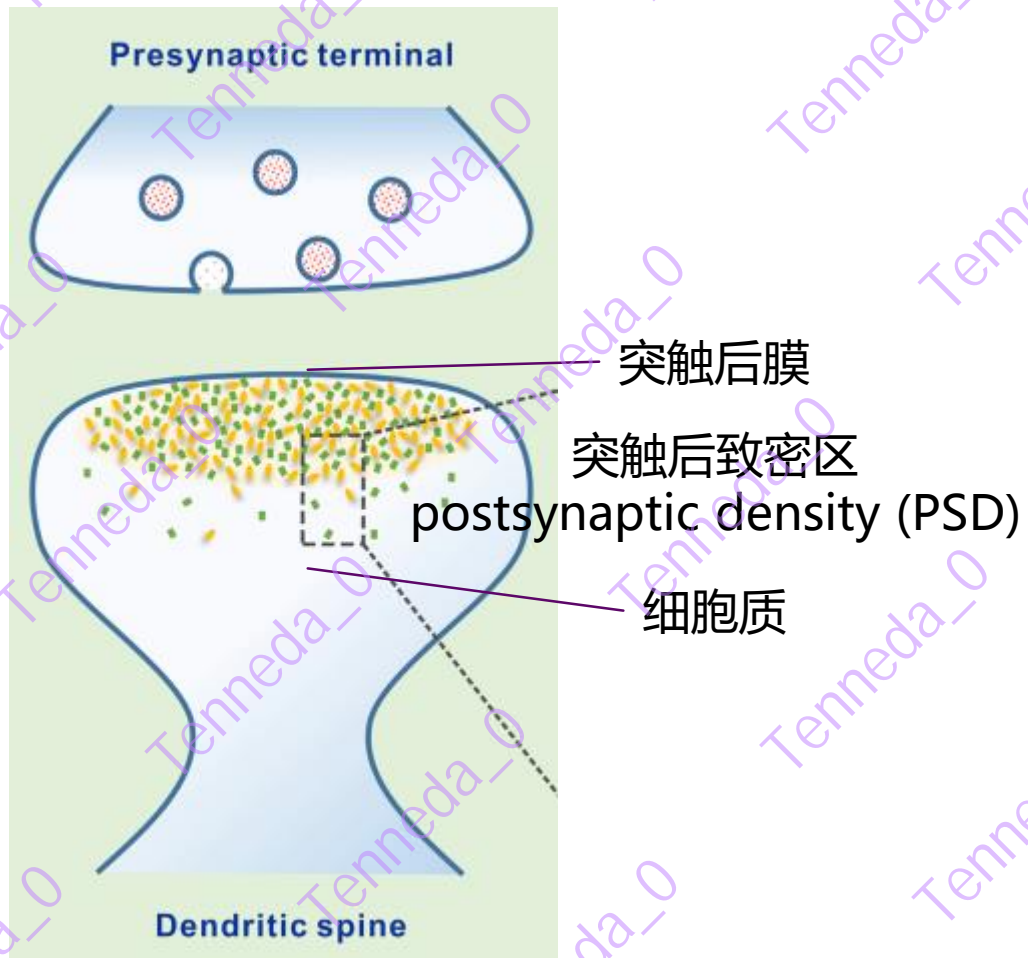
Tennedar_0

2024.11.29

目录

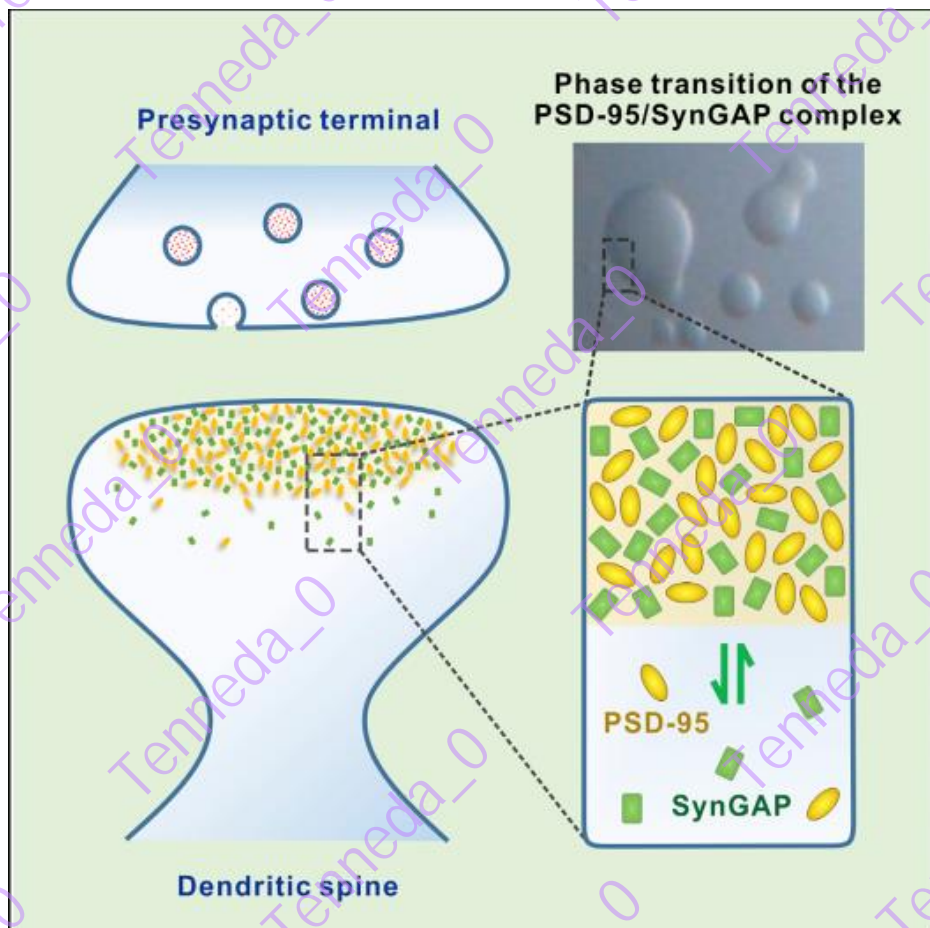
- Introduction
- Results (1)
- Results (2)
- Discussion
- Summary

突触



- 半封闭膜结构
- PSD: 由密集排列的蛋白质组成, 每个成分的组成和运动都具有高度动态性
- 突触: 长期增强/抑制过程 (LTP/LTD)

PSD蛋白



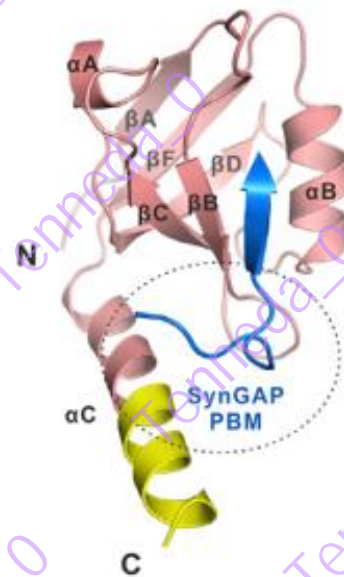
- 两种主要蛋白，化学计量比接近
- 已知SynGAP或PSD-95的任何一种突变都会导致人类精神疾病，如智力障碍、癫痫和自闭症
- PSD-95
 - 支架蛋白
 - 功能：支撑PSD结构、协调信号级联
- SynGAP
 - GAP
 - 通过与PSD-95特异性结合（多价相互作用）定位于PSD
 - 兴奋性突触强度的负调节因子
- 液-液相分离、交换

研究问题

- PSD如何在半开放的结构下自发形成?
- 如何维持PSD与细胞质间的蛋白质浓度差（保持相分离）？
- PSD组装的改变与神经元活动之间有何种联系？
- PSD组装的改变与精神疾病之间有何种联系？

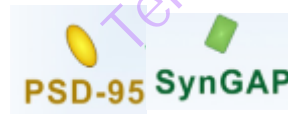
Results (1)

SynGAP/PSD-95 的多价相互作用



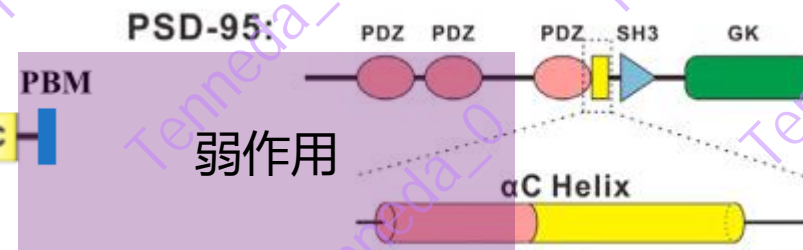
PSD-95
PDZ3-C/
SynGAP PBM
复合物结构

C-末端 α 螺旋延伸增强亲和力

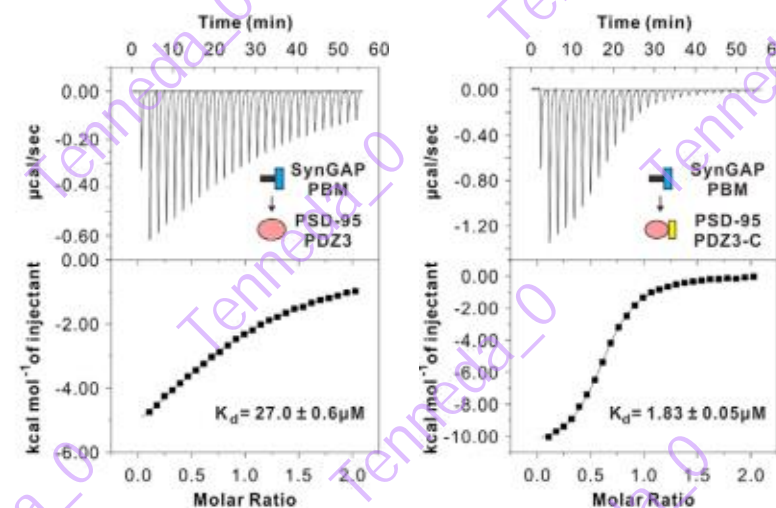


- 纯化蛋白
- 等温滴定量热法 (ITC)
- 氨基酸序列分析
- ITC

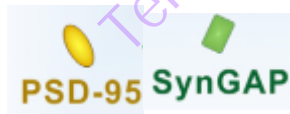
SynGAP Isoform $\alpha 1$:



PSD-95_human	P	E	E	Y	S	R	F	E	A	K	I	H	D	L	R	E	Q	L	M	N	S	S	L	G
PSD-95_rat	P	E	E	Y	S	R	F	E	A	K	I	H	D	L	R	E	Q	L	M	N	S	S	L	G
PSD-95_mouse	P	E	E	Y	S	R	F	E	A	K	I	H	D	L	R	E	Q	L	M	N	S	S	L	G
PSD-95_megaBat	P	E	E	Y	S	R	F	E	A	K	I	H	D	L	R	E	Q	L	M	N	S	S	L	G
PSD-95_xenopus	P	E	E	Y	S	R	F	E	A	K	I	H	D	L	R	E	Q	L	M	N	S	S	L	G
PSD-95_zebrafish	P	E	E	Y	S	R	F	E	A	K	I	H	D	L	R	E	Q	L	M	N	S	S	L	V
PSD-95_lancelet	P	E	D	Y	N	R	F	E	A	K	I	H	D	L	R	E	Q	L	M	N	S	S	V	S
DLG_drosophila	P	E	E	Y	N	R	F	E	A	R	I	Q	E	L	K	Q	Q	A	A	L	G	A	G	G
DLG_c.elegans	P	Q	D	Y	Q	I	F	E	S	K	I	E	K	L	R	N	D	V	I	A	Q	S	R	M

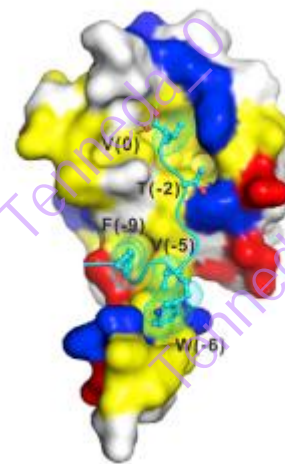


C-末端 α 螺旋延伸增强亲和力

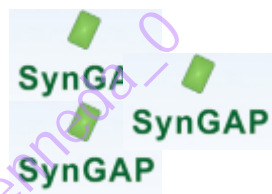


- X射线衍射
- 结构分析

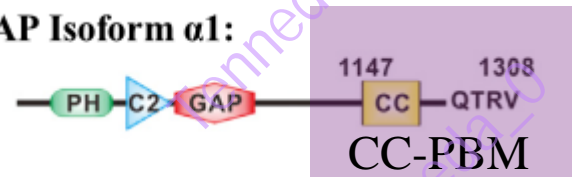
- 疏水相互作用: 将V或F用带电荷的Glu 替代, 或将W替换为更小的疏水Ala, 都会显著减弱结合



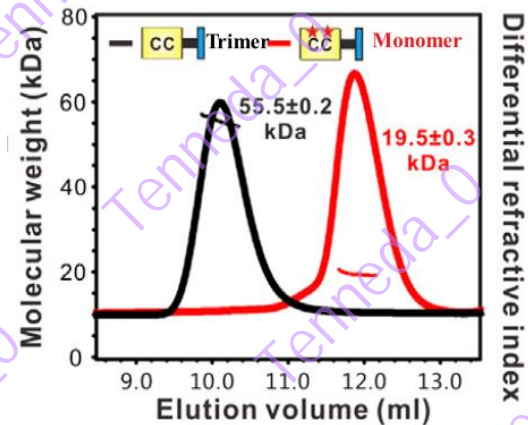
SynGAP形成三聚体



SynGAP Isoform $\alpha 1$:



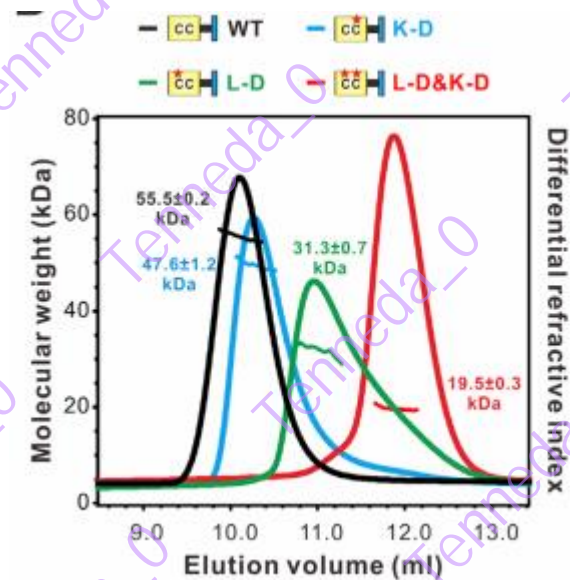
- 详细的序列分析表明, SynGAP的C端可能存在 coiled-coil domain
- 快速蛋白液相色谱(FPLC)结合静态光散射分析表明, SynGAP CC-PBM在溶液中的均匀分子质量约为 55.5kDa, 等于理论单体质量的三倍, 表明 SynGAP在溶液中形成稳定的三聚体
- 晶体结构解析同样证实这一结论
- 三聚体结构中有不对称分布的Tyr残基, 可用于磷酸化修饰



SynGAP单体设计



- 设计含最少氨基酸取代的单体 SynGAP 突变蛋白
- 双位点突变蛋白L-D&K-D



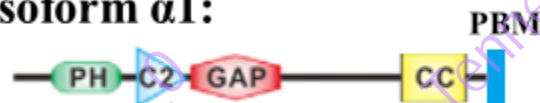
SynGAP/PSD-95 相互作用的高亲和力&特异性

- PDZ-SH3-GK串联形成PSG

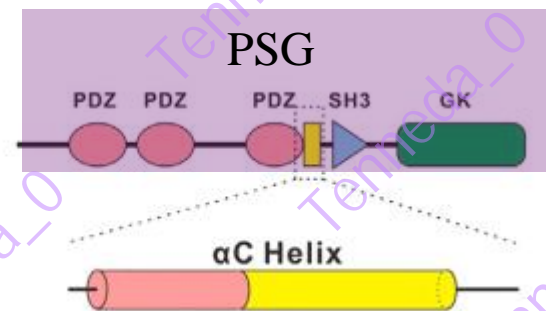
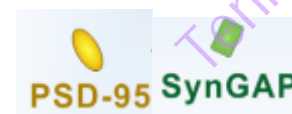
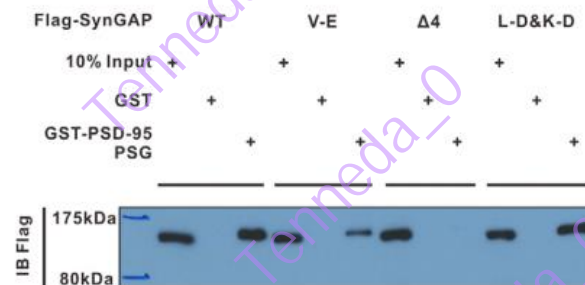
- ITC
- Pull-down

- ④三聚体的形成不影响结合

SynGAP Isoform $\alpha 1$:



	SynGAP CC-PBM	PSD-95 PSG	K_d (μ M)
B1	WT	WT	0.14 ± 0.03
	W-A		2.06 ± 0.35
	V-E		9.09 ± 0.99
B2	$\Delta 4$	WT	Undetectable
	L-D&K-D		0.25 ± 0.06
B3	WT	Δ EXT	1.70 ± 0.22

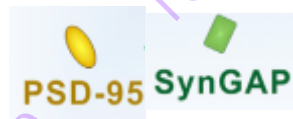


①疏水作用

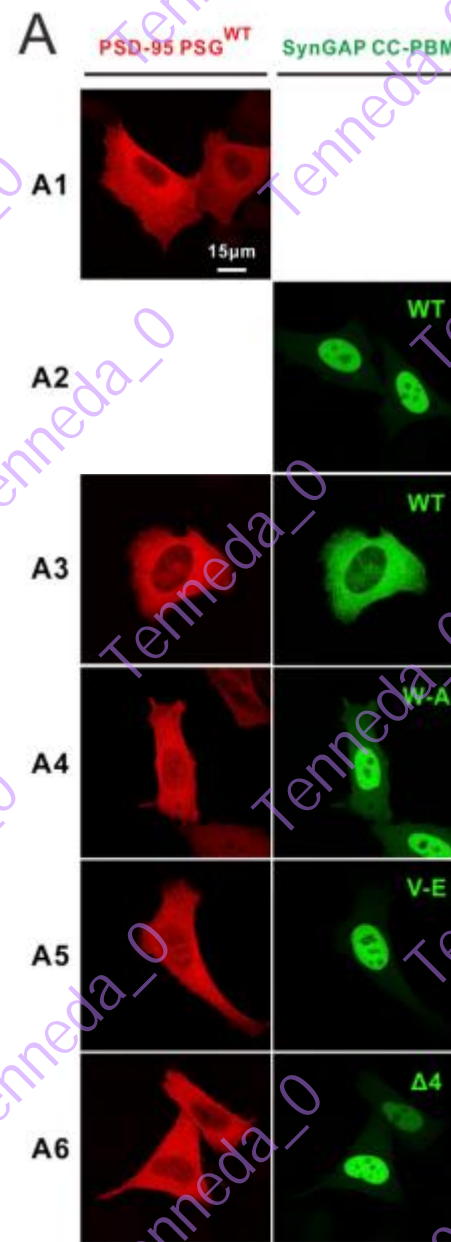
③最后四个残基

② α -C helix

SynGAP/PSD-95复合物定位



- 在HeLa细胞中过表达RFP-PSD-95 PSG和GFP-SynGAP CC-PBM
- 突变体：亲和力越弱，定位效果越不显著



SynGAP/PSD-95以3:2形成复合物

- 单独存在：SynGAP三聚体，PSD-95单体
- 1:1混合，形成分子量为154.8 kDa的复合峰和游离的PSD-95峰，可换算成3:2复合物 (D)
- 引入His tag：1:1混合，结果相同；3:2混合，游离峰消失 (A-B)
- 补充：
- 删除末端4个残基的SynGAP 突变体完全没有形成复合物 (C)
- L-D&K-D单体形成的复合物分子量较低且分布不均匀 (F)
- SynGAP三聚体对复合物组装至关重要

