

肌足蛋白的研究进展

邱凯[#] 应喜娟[#] 梁洁 彭梓 柯桂芬 陶涛^{*}

(厦门大学生命科学学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005)

摘要 肌足蛋白(myopodin)是新近发现的突足蛋白(synaptopodin)家族的第二个成员。除了突足蛋白外,它和其他已知的蛋白质没有明显的同源关系。肌足蛋白可以直接与肌动蛋白相互作用,因此它也是一种结构蛋白。研究发现,肌足蛋白在细胞中的分布受到细胞分化及胁迫的调控,并且它在细胞核中的定位对抑制膀胱癌有一定的作用;同时发现肌足蛋白基因在细胞中的部分或全部缺失与前列腺癌的发生有关,因此它也有可能作为前列腺癌的临床检测标记。

关键词 肌足蛋白; 出核; 入核; 膀胱癌; 前列腺癌

肌足蛋白(myopodin)是突足蛋白(synaptopodin)家族的第二个成员。突足蛋白是一个富含脯氨酸与肌动蛋白微丝偶联的蛋白质,在机体内只表达于肾小球的足细胞和后脑的突触内^[1],它在足突活动中发挥重要作用。通过序列对比发现,肌足蛋白与突足蛋白约有47.7%的相似性,特别在C端,同源性更高^[2];它们功能也有一些相似性,都可以与肌动蛋白直接结合。并且研究发现肌足蛋白不仅具有肌动蛋白结合蛋白的功能,它可能还具有信号调控作用,能促进肌动蛋白束的形成;它在细胞中的核质分布情况受到细胞分化情况及胁迫的影响^[3];同时它的表达与核质分布情况影响到膀胱癌及前列腺癌的恶化情况^[4,5]。

1 肌足蛋白的结构

与突足蛋白相似,肌足蛋白可以直接与肌动蛋白相互作用,它有一个肌动蛋白结合位点,位于氨基酸序列的410~563位之间;而且肌足蛋白也富含脯氨酸(≈13%),不能形成球形蛋白,而是以线性分子的形式存在。通过序列分析发现,肌足蛋白在氨基酸序列的N端及C端分别具有一个经典的入核信号(nuclear localization signal, NLS),分别是NLS1: 58KKRR61, NLS2: 616KKGK619^[6]。如果缺失NLS1或NLS2或是同时缺失NLS1和NLS2,肌足蛋白的入核转运都会受到影响。除入核信号外,肌足蛋白上还有两个磷酸化位点,分别是S225和T272,这两个位点的磷酸化直接影响到肌足蛋白与另一个蛋白质14-3-3(一个在所有真核细胞中都有表达且保守性强的调节蛋白^[7])的结合,从而影响到它

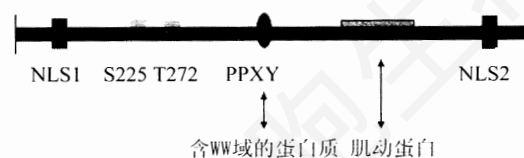


图1 肌足蛋白结构示意图^[8]

WW域: 包含35~45个氨基酸长的高度紧密的WW域,以出现成对的保守色氨酸(即W)为特征,识别含脯氨酸的序列。**PPXY域:** 富含脯氨酸的蛋白质与蛋白质相互作用模体,它存在于多种蛋白质中,与含有WW结构域的蛋白质相互作用。肌足蛋白包含有2个入核信号NLS1和NLS2、两个磷酸化位点S225和T272、一个肌动蛋白结合位点和一个PPXY域。

的入核转运。同时,在肌足蛋白中还发现有一个能与许多含有WW域、在信号转导中有重要作用的蛋白质相互作用的PPXY域^[8]。肌足蛋白的结构见图1。

2 肌足蛋白的生物学功能

肌足蛋白可与肌动蛋白结合,能促进肌动蛋白束的形成。但是,随着研究的深入,发现肌足蛋白还可以结合到其他的蛋白质分子上,包括14-3-3蛋白、核输入受体(importin)等,说明其功能不仅仅是结构蛋白,而且有可能参与信号转导过程。

2.1 肌足蛋白的分布

在体内,肌足蛋白具有两种形式:在小鼠骨骼肌细胞中分子量为80 kDa的形式,而在心肌细胞中是95 kDa的形式^[3]。肌足蛋白在骨骼肌中分布最

收稿日期: 2006-03-28 接受日期: 2006-07-24

教育部留学回国科研启动经费(No.2005-383)和福建省自然科学基金(No.C0510003)资助项目

[#]同为第一作者

^{*}通讯作者。Tel: 0592-2182880, E-mail: taotao@xmu.edu.cn

多,在舌、膀胱中也有分布,但在其他器官中则比较少(图2)^[9]。肌足蛋白在平滑肌细胞及骨骼肌细胞中有集中的、大量的表达,在一些器官的上皮细胞中表达量也比较多,比如膀胱上皮细胞等。同时,它在细胞的细胞质和细胞核之间可以穿梭。Weins等^[9]在有胁迫条件下(如热激)对哺乳动物细胞C2C12进行培养,发现分布在细胞质中的肌足蛋白又重新转运至细胞核内;当在细胞中过量表达肌足蛋白时,发现过量表达的肌足蛋白分布在细胞核内,并且促使肌动蛋白丝成环。这些现象表明肌足蛋白可能与机体发育相关,并且其在细胞核中的分布对机体抵抗不良环境起积极作用。

2.2 参与细胞的结构

肌动蛋白是细胞中一种重要的蛋白质,是细胞骨架的主要成分之一,它与其他蛋白质一起在维持细胞形态特征,使细胞能够在运动和收缩方面发挥着重要的作用。研究发现,肌足蛋白可以与肌动蛋白相互作用,通过一个肌动蛋白结合位点和它直

接结合。在未分化的小鼠肌肉细胞C2C12中,肌足蛋白分布在细胞核内;但在诱导分化6h后,肌足蛋白就逐渐往细胞质迁移,而且在细胞质中沿着肌动蛋白微丝(actin filament)分布^[2];在肌管分化过程中,肌足蛋白与紧张纤维(stress fibre)结合,整合到Z盘(Z-disc)中。这些都说明肌足蛋白参与了细胞结构的形成,它也是一种结构蛋白。

2.3 出入核机制的研究

一般来说,蛋白质的入核转运与出核转运都需要有入核信号(NLS)或是出核信号(nuclear export signal, NES)的介导^[10, 11]。经典的入核信号是富含碱性氨基酸残基的序列,如SV40大T抗原的入核信号KK/RXK/R,这类入核信号可以被核输入受体接头蛋白importin- α 蛋白家族成员识别然后结合核输入受体importin- β 蛋白家族成员从而进行入核转运。经典的出核转运信号是富含亮氨酸的氨基酸残基序列,如Rev NES序列LPPLERLTL。核输出受体(exportin)识别这些出核信号介导出核转运。但是,

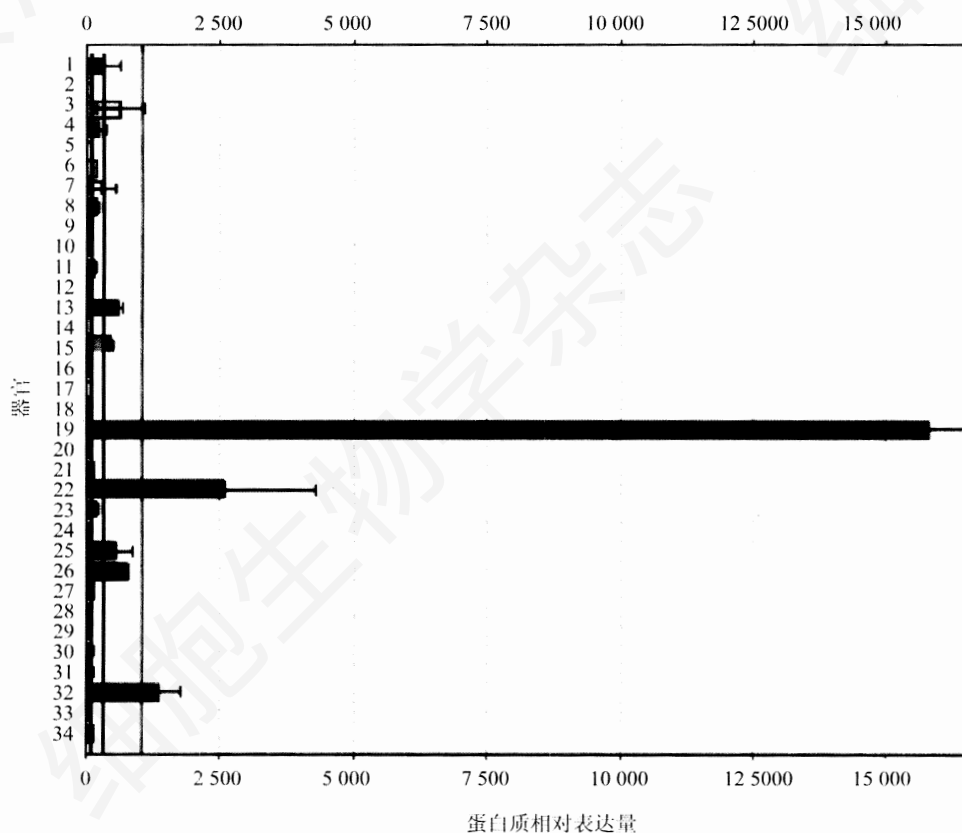


图2 肌足蛋白在不同器官中的分布^[9]

1: 棕脂肪; 2: 脂肪; 3: 骨; 4: 骨髓; 5: 扁桃腺; 6: 脊髓下部; 7: 脊髓上部; 8: 乳腺; 9: 卵巢; 10: 胎盘; 11: 前列腺; 12: 睾丸; 13: 脐带; 14: 子宫; 15: 心脏; 16: 肝脏; 17: 肺; 18: 淋巴; 19: 骨骼肌; 20: 犁鼻器; 21: 唾液腺; 22: 舌; 23: 胰腺; 24: 垂体; 25: 表皮; 26: 口腔上皮; 27: 脾; 28: 胃; 29: 胸腺; 30: 甲状腺; 31: 气管; 32: 膀胱; 33: 肾; 34: 视网膜。

没有经典入核信号的蛋白质或没有经典出核信号的蛋白质也可以分别进行核质转运。目前,发现越来越多样的入核信号,使人们对蛋白质核质转运的分子机制有了更深入的了解^[12]。

2.3.1 肌足蛋白入核机制 肌足蛋白在氨基酸序列的N端及C端分别具有一个经典的入核信号,分别是NLS1: ⁵⁸KKRR⁶¹, NLS2: ⁶¹⁶KKGK⁶¹⁹。研究发现,在C2C12细胞中,无论是把入核信号NLS1或NLS2,还是把两个入核信号同时进行缺失突变,都不能完全阻止肌足蛋白入核($\approx 14\%$ 的肌足蛋白仍在细胞核中)^[6]。虽然它们都对其入核起作用,但这些研究说明肌足蛋白的入核可能还有其他的途径。

除了入核信号外,肌足蛋白的入核转运机制还跟蛋白质的磷酸化有关。肌足蛋白上有两个磷酸化位点,分别是S225和T272,这两个位点是否磷酸化直接影响到肌足蛋白的入核转运。进一步的研究发现^[8],肌足蛋白的这两个位点磷酸化后可以与14-3-3蛋白相互作用,并且可与核输入受体接头蛋白importin- α 相结合。14-3-3蛋白与核输入受体接头蛋白importin- α 一起介导肌足蛋白入核(图3)。肌足

蛋白有两个14-3-3蛋白结合位点,将这两个位点缺失突变后,肌足蛋白不能结合14-3-3蛋白,与核输入受体接头蛋白importin- α 的相互作用也被解除,入核转运受到抑制。同样,若是将肌足蛋白进行去磷酸化处理,它也不可以结合14-3-3蛋白,入核转运同样受到抑制。综上所述,肌足蛋白入核需要入核信号、蛋白质磷酸化以及14-3-3蛋白的介导;并且,其他未知的入核机制还有待发现。

2.3.2 肌足蛋白出核机制 研究发现,肌足蛋白的出核转运受到细胞核输出抑制剂——柔红霉素B(leptomycin-B, LMB)的抑制,说明肌足蛋白的出核转运可能受Crm1途径调节^[2]。通过对几个肌动蛋白结合蛋白的序列对比,发现它们在N端都有一段富含亮氨酸的序列,并且发现FrgP(一种肌动蛋白结合蛋白)的氨基酸序列Gly¹⁸-Leu²⁷就是该蛋白质的出核信号,由此对肌足蛋白氨基酸序列Leu¹⁴-Leu²⁴进行了研究^[13]。将肌足蛋白氨基酸序列Leu¹⁴-Leu²⁴连接到GFP-CapG蛋白^[14]上构建成复合蛋白质,发现这段序列虽然具有出核信号的作用,但是信号作用较弱,不能像FrgP上的Gly¹⁸-Leu²⁷序列那样完全介导底物出核。目前研究还没有发现肌足蛋白上其他

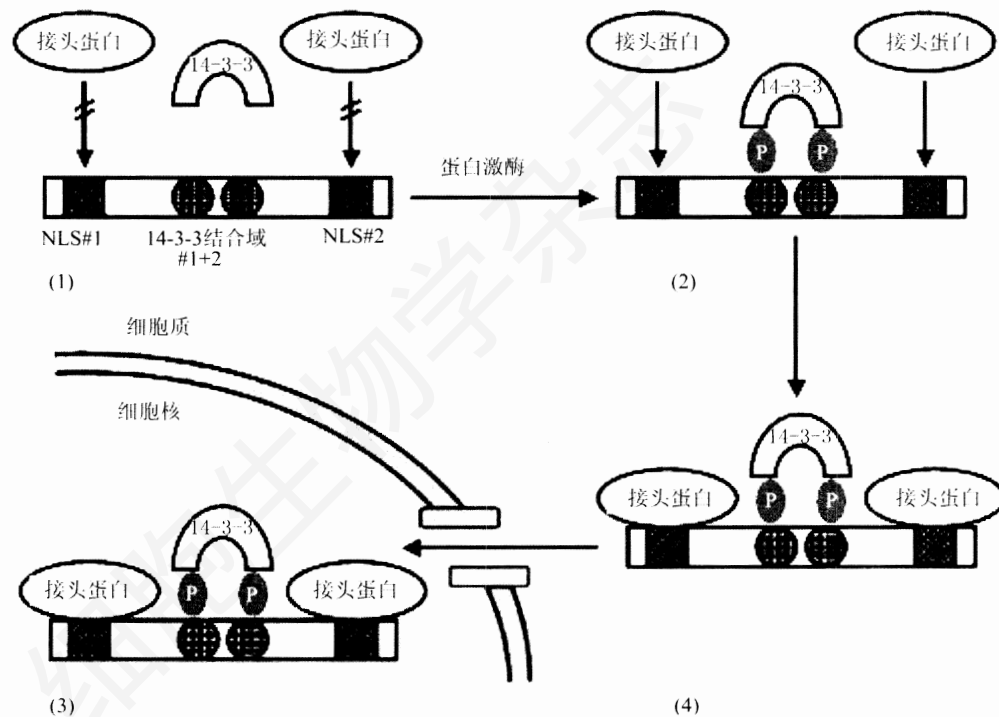


图3 核输入受体接头蛋白importin- α 与14-3-3蛋白一起介导磷酸化了的肌足蛋白入核^[8]

(1)当位于14-3-3蛋白结合域#1和#2中的两个磷酸化位点没有被磷酸化的时候,肌足蛋白就不能与核输入受体接头蛋白importin- α 结合,同时核输入受体接头蛋白importin- α 也不能与入核信号NLS1和NLS2结合,因此,肌足蛋白就进入不到细胞核内。(2)经过蛋白激酶的磷酸化后,肌足蛋白与14-3-3蛋白结合,同时使核输入受体接头蛋白importin- α 比较容易与NLSs结合。(3)核输入受体接头蛋白importin- α 结合到两个入核信号NLS1和NLS2上。(4)核输入受体接头蛋白importin- α 与14-3-3蛋白一起介导肌足蛋白进入细胞核内。

有效的出核信号及负责其他出核的受体。因此,肌足蛋白出核机制还不是很清楚。

3 肌足蛋白在肿瘤研究中的意义

前列腺癌和膀胱癌是两类常见的肿瘤,并且有较高的恶化率^[4,5]。但是,长期以来,这两类肿瘤在临床上缺乏有效的生物学标记来确定它们的发生和发展。目前的研究发现,肌足蛋白基因和肌足蛋白有可能与这两类肿瘤的发生和发展有关。这为今后在临床上诊断和治疗这两类肿瘤,提供了极具潜力的遗传学、分子生物学和细胞生物学手段。

3.1 肌足蛋白与前列腺癌

前列腺癌已成为导致男性死亡率比较高的癌症之一^[15]。通过流行病学和病理学的研究发现,遗传因素在前列腺癌的发病机制方面扮演着很重要的角色^[16,17]。和其他的恶性肿瘤的发生一样,前列腺癌的发生通常也是由于遗传物质发生改变而导致的。经过统计,有超过18%的前列腺癌在常染色体4q上出现突变或者缺失^[18,19]。在对前列腺癌的研究中发现,随着癌症的恶化程度的加深,有超过80%的前列腺癌侵入癌阶段的病例缺失部分或全部的肌足蛋白基因序列;而那些表达正常肌足蛋白的病例的存活时间要比缺失的病例长。因此肌足蛋白具有抑制前列腺癌恶化的作用,并可以提高病人的存活率^[4]。Jing等^[15]通过在前列腺癌细胞系PC-3和LNCaP中过表达肌足蛋白,发现这些细胞增殖一代所需的时间增加了一倍;同时PC-3的细胞数和LNCaP细胞数与对照的正常前列腺细胞的数目相比,则分别减少了2.5倍和3.2倍。这些结果说明了肌足蛋白对前列腺癌细胞的抑制作用以及对肿瘤体积增大的抑制作用。更为有意义的是,目前在临床上还缺乏有效的生物学标记来诊断前列腺癌及确定癌症的病理阶段,对肌足蛋白基因和蛋白质的研究为今后在临床上诊断和治疗前列腺癌提供了极其重要的线索。

3.2 肌足蛋白与膀胱癌

膀胱癌在中国居泌尿系统肿瘤之首,多见于男性。目前,组织病理学检测和肿瘤分期分级为膀胱癌主要的预后指标,尽管可提供某种程度的预后信息,对复发和生存率有一定意义,但仍有许多不足。因此发现和研究膀胱癌新的分子标志物有可能为膀胱癌的诊断和治疗提供全新的途径。肌足蛋白作为一个新发现的并与膀胱癌的发生和发展相关的蛋白质,有可能可以作为一种有效的生物学分子标

记来诊断膀胱癌的发生和发展。阿尔伯特爱因斯坦医学院的Peter Mundel小组发现,肌足蛋白对膀胱癌的恶化有抑制作用,这种抑制作用与肌足蛋白的核质分布情况有关,而且核中分布水平的提高可以提高病人的存活率^[3],在膀胱癌表皮细胞中,肌足蛋白在细胞核中水平的高低,与膀胱癌的发生和发展有紧密的关系:细胞核中肌足蛋白的水平在恶性膀胱癌组织中,明显低于良性病灶膀胱癌组织中的水平;细胞核中肌足蛋白的水平降低,与膀胱癌组织的发生时期、恶化程度以及病人的存活有着正相关性。更为重要的是,在膀胱癌细胞中,细胞核中肌足蛋白水平是随细胞周期的变化而变化的,在良性移行上皮膀胱肿瘤和分化较好的移行上皮膀胱癌细胞中,肌足蛋白主要分布在G₁/S细胞的细胞核中;但在浸润性膀胱癌细胞中,肌足蛋白在细胞核中就没有表达了。同时,在存活时间长的病人中,其膀胱癌组织的细胞核内肌足蛋白表达水平较高。因此,根据肌足蛋白在细胞核中的分布情况,有可能在临床上用来诊断膀胱癌发生和发展;同时,肌足蛋白可能具有抑制膀胱癌发生和发展的作用,这也为膀胱癌的治疗提供了一种潜在的有效手段。

4 展望

肌足蛋白的核质分布情况对机体发育、抗逆性及抑癌作用都有重要的作用,尤其是肌足蛋白的表达及核质分布对抑制前列腺癌和膀胱癌恶化可能具有重要的作用。但是,细胞如何调控肌足蛋白的表达及其在核质中分布的分子机制还不清楚,对肌足蛋白在前列腺癌和膀胱癌的发生和发展的生物学功能的研究还是空白,并且肌足蛋白与其他肿瘤的发生和发展之间是否也有联系,这些都应是人们今后研究的方向。通过这些研究,有可能会使人们在预防和治疗肿瘤的发生和发展方面找到新的线索和手段。

参考文献 (References)

- [1] Mundel P et al. *J Cell Chem*, 1997, **139**: 193
- [2] Deller T et al. *Hippocampus*, 2000, **10**: 569
- [3] Weins A et al. *J Cell Biol*, 2001, **155**: 393
- [4] Lin F et al. *Am J Pathol*, 2001, **159**: 1603
- [5] Sanchez-Carbayo M et al. *Oncogene*, 2003, **22**: 5298
- [6] De Ganck A et al. *FEBS Lett*, 2005, **579**: 6673
- [7] Brunet A et al. *J Cell Biol*, 2002, **156**: 817
- [8] Faul C et al. *J Cell Biol*, 2005, **169**: 415
- [9] Su AI et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 4465

- [10] Kutay U *et al. Trends Cell Biol*, 2005, **15**: 121
[11] Pemberton LF *et al. Traffic*, 2005, **6**: 187
[12] Weis K. *Cell*, 2003, **112**: 441
[13] Van Impe K *et al. J Biol Chem*, 2003, **278**: 17945
[14] Onoda K *et al. Cell Motil Cytoskeleton*, 1993, **26**: 227
[15] Jing L *et al. Am J Pathol*, 2004, **164**: 1799
[16] Smith JR *et al. Science*, 1996, **274**: 1371
[17] Lalani EN *et al. Semin Cancer Biol*, 1997, **8**: 53
[18] Suarez BK *et al. Am J Hum Genet*, 2000, **66**: 933
[19] Alers JC *et al. Lab Invest*, 2000, **80**: 931

Progress in Myopodin

Kai Qiu[#], Xi-Juan Ying[#], Jie Liang, Zi Peng, Gui-Fen Ke, Tao Tao*

(School of Life Sciences and Key Laboratory for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, the Ministry of Education of China, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract Myopodin is the second member of synaptopodin protein family. It shows no significant homology to any known protein except synaptopodin. Myopodin has two putative classic nuclear localization signals (NLSs). An actin-binding site (aa 410–563) has been found in myopodin. Recent researches show that nuclear import of myopodin is probably related to the progression of the bladder cancer. Patients with preserved nuclear myopodin expression showed a longer survival. Partial or complete deletion of MYOPODIN gene is closely correlated with the prostate cancer. Therefore, myopodin could be used as a potential diagnostic marker for both bladder and prostate cancers in the future.

Key words myopodin; nuclear export; nuclear import; bladder cancer; prostate cancer

Received: March 28, 2006 Accepted: July 24, 2006

This work was supported by the Ministry of Education of China (No.2005-383) and the Natural Science Foundation of Fujian Province (No.C0510003)

[#]These authors contributed equally

*Corresponding author. Tel: 86-592-2182880, E-mail: taotao@xmu.edu.cn