

Calponin 蛋白家族在细胞骨架重构中的作用

董丽华 韩梅* 温进坤

(河北医科大学基础医学研究所, 河北省医学生物技术重点实验室, 石家庄 050017)

摘要 Calponin 蛋白家族包括 calponin (CaP) 和平滑肌(SM)22 α , 此家族的重要结构特征是由单一 CH 结构域和 CLR 结构域组成。CaP 和 SM22 α 属于肌动蛋白细胞骨架结合蛋白, 可通过与 F- 肌动蛋白相互作用来调节肌动蛋白细胞骨架重构, 影响细胞的生物学行为, 进而影响相关疾病的发生与发展。

关键词 calponin 蛋白家族; 细胞骨架; 肌动蛋白; calponin; 平滑肌 22 α

Calponin 蛋白家族包括 calponin(CaP)和平滑肌 22 α (smooth muscle 22 alpha, SM22 α), 分子结构主要由氨基末端的单一 CH 结构域(calponin homology domain)和羧基末端 calponin 样重复模体(calponin-like repeat, CLR)的单拷贝或多拷贝的串联重复序列组成^[1](图 1)。CaP 和 SM22 α 是分化标志蛋白, 在分化型平滑肌细胞中大量表达, 它们通过与细胞骨架蛋白肌动蛋白相结合, 参与肌动蛋白细胞骨架重构, 具有多种生物学功能, 其表达改变与许多疾病的发生发展密切相关。

1 Calponin 蛋白家族的分子结构和功能

1.1 CH 结构域

CH 结构域由 100 个氨基酸残基组成, 最初发现其存在于 CaP 的氨基末端。随后相继证实, 在多种肌动蛋白结合蛋白和信号分子的结构中也都具有该结构域, 但其功能尚不完全清楚。根据分子中含有的 CH 结构域数量的不同, 该类蛋白质可分为三类^[2]: (1)单一 CH 结构域蛋白质(1 \times CH 蛋白), 如 SM22 α 、CaP 以及信号分子 Vav、IQGAP 和 Cdc24; (2)含有由双 CH 结构域形成的 F- 肌动蛋白结合结构域(F-actin-binding domain, ABD)的蛋白质(2 \times CH 蛋白), 如 spectrins、dystrophin、filamins 和 plakins; (3)含有双 ABD 结构的蛋白质(4 \times CH 蛋白), 如 fimbrin/plastin 蛋白家族。此外, 依据 CH 结构域氨基酸序列的不同, 又可分为 CH1、CH2 和 CH3^[3]。其中, ABD 是由 CH1 和 CH2 构成, 单一 CH 结构域则由 CH3 形成, 而 fimbrins 的 CH 结构域是由 CH1.1、CH2.1、CH1.2 和 CH2.2 形成。

目前对 ABD 结构域的肌动蛋白结合功能研究的

较为清楚, 而且发现单一 CH 结构域(CH3)的功能与 2 \times CH 和 4 \times CH 蛋白中的 CH 结构域不同。许多研究者认为, 单一 CH 结构域可能不具备肌动蛋白结合功能。单一 CH 结构域缺失的 CaP 在体内、外都可以和 F- 肌动蛋白结合, 但是单独的 CH 结构域在细胞中不与 F- 肌动蛋白相互作用, 体外实验也发现其不与 F- 肌动蛋白共沉淀^[4,5], 说明单一 CH 结构域在 CaP 与肌动蛋白结合中不具有决定性作用。哺乳动物 SM22 α ^[6]和酵母 SM22 α 同源物 Scp1^[11]的单一 CH 结构域也不能在体外结合肌动蛋白纤维。那么, 单一 CH 结构域具有什么样的功能呢? 有研究表明^[2], CaP 可通过与 tubulin、desmin 等其他细胞骨架成分结合来稳定肌动蛋白纤维系统, 起到脚手架蛋白(scaffolding protein)的作用, CaP 与这些细胞骨架成分的结合位点就位于 CH 结构域。由于细胞骨架蛋白和信号分子中普遍存在 CH 结构域, 且单一 CH 结构域与其他肌动蛋白结合结构域往往共存在, 由此, Morgan 等^[7]认为, 单一 CH 结构域可能对信号分子定位于肌动蛋白细胞骨架起一定作用。还有研究发现^[8], CaP 的 CH 结构域和促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号途径中的细胞外信号调节激酶(extracellular regulated kinase, ERK)直接相互作用, 说明 CaP 是信号途径的调节蛋白。一些具有 CH3 的分子还出现在 Rho 信号途径中, 说明 CaP 是 Rho 相关激酶(Rho-associated kinase, ROCK)的直接靶分子, 参与平滑肌细胞肌动球蛋白(actomyosin)收缩的调节。

收稿日期: 2006-09-27 接受日期: 2007-01-12

国家自然科学基金(No.30570661)和科技部基础研究重大项目前期研究专项(No.2005CCA03100)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0311-86265563, E-mail: hanmei@hebmu.edu.cn

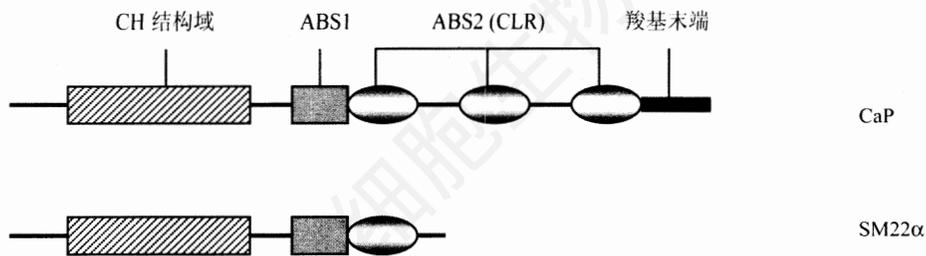


图1 Calponin 蛋白家族的分子结构^[1]

另外,对 SM22 α 同源物 Scp1 的研究发现^[1,9],CH 结构域不能介导 Scp1 与肌动蛋白纤维的结合,但 Scp1 却能与含有 ABD 结构域的肌动蛋白结合蛋白 Sac6 (fimbrin) 竞争结合肌动蛋白,这表明 CH 结构域可能扮演一个“定位”功能域(‘locator’ domain)的角色,有助于使 Scp1 分子上的肌动蛋白结合模体进行正确定位。

1.2 CLR 结构域

CLR 结构域是由 23~29 个氨基酸组成的一个独立单元,以单个或多个拷贝串联重复而形成的一种结构方式,该结构是 calponin 蛋白家族的一个重要特征。CaP 的羧基端有 3 个 CLR,形成一个独立的肌动蛋白结合结构域^[10];而 SM22 α 中只存在一个单一 CLR,研究表明该结构亦是其结合肌动蛋白纤维所必需的^[6],但是其与 F-肌动蛋白的亲合力远远小于 3 个 CLR,只具有弱的肌动蛋白结合活性。

利用体外共沉淀分析和体内细胞转染实验发现^[4,11],野生型 CaP 和缺失羧基末端的 CaP 都与 F-肌动蛋白相互作用,而缺失 2 个或 3 个 CLR 的 CaP 和野生型 SM22 α 不与 F-肌动蛋白相互作用,只含有 7 个 CLR 的 UNC-87 也可与 F-肌动蛋白相结合,这些研究提示,CLR 结构域是 calponin 蛋白家族与肌动蛋白相互作用所必需的。进一步的研究证实^[12],在体外 F-肌动蛋白直接与 CaP 的第一个 CLR(aa 172~187)结合,该区域中的 Ser175 的磷酸化可干扰 CaP 与肌动蛋白的结合活性。由此认为,CaP 与肌动蛋白的相互作用有赖于其分子中的第一个 CLR。这些结果表明,各个 CLR 可能具有不同的功能,但是还有待于提供更多的研究证据。

目前认为,CLR 具有稳固肌动蛋白细胞骨架的作用。Gimona 等^[10]研究发现,CLR 构成了 CaP 中一个独立的肌动蛋白结合位点(actin-binding site, ABS),称为 ABS2,该结合位点的特征是不与含 ABD 结构域的其他肌动蛋白结合蛋白竞争结合肌动蛋白。说明

ABS2 在肌动蛋白上的结合部位不同于 ABD。CLR 的非竞争性与肌动蛋白结合是其稳定肌动蛋白纤维的重要因素之一。

另外,有研究发现,CLR 还可以减少肿瘤细胞中的细胞活力和克隆的形成^[13]。在小鼠与人的转移性黑色素瘤和腺瘤细胞株中,CLR 是稳定肌动蛋白细胞骨架所必需的。CLR 稳固肌动蛋白纤维,干扰肌动蛋白纤维的更新转换,从而造成细胞活力的下降。这些结果说明了在细胞形成和迁移过程中,含有 CLR 结构域的蛋白质参与了细胞骨架的重构。

1.3 其他结构域

在 CaP CLR 结构域的氨基端还存在一个肌动蛋白结合位点,称为 ABS1,这个位点可以在体外与 F-肌动蛋白交联,发生共沉淀^[12]。但是,缺失 ABS1 的 CaP 仍然具有肌动蛋白结合活性^[10]。

另外,CaP 的羧基末端序列对 CaP 与肌动蛋白的结合具有负相调节作用,缺失羧基末端的 CaP,其与肌动蛋白的结合能力增强^[14]。这是由于羧基末端序列的存在,使 ABS2 的构象在抑制型和开放型之间不断变化,缺失羧基末端序列后,则 ABS2 处于开放型构象,有利于肌动蛋白的结合^[15]。

2 CaP 与细胞骨架重构

CaP 最初是从鸡沙囊平滑肌组织中分离提取出来的,作为一种肌动蛋白结合蛋白参与平滑肌的收缩。按其等电点(isoelectric point, pI)的大小可分为 3 种异构体^[15]:碱性 CaP(h1 CaP, pI 8~10),大多表达于终末分化和非增殖性的平滑肌细胞中,其在平滑肌组织中的含量与原肌球蛋白(tropomyosin)相似,为肌动蛋白的 1/7。但也有报道,h1 CaP 在早期胚胎心脏中有一过性短暂表达。中性 CaP(h2 CaP, pI 7~8),与 h1 CaP 有很高的同源序列,主要分布于心肌组织中,人的角化细胞中也有其存在^[16]。酸性 CaP(h3 CaP, pI 5~6),是一种无组织表达特异性的变体,其在脑

组织中含最丰富。这3种异构体的前273个氨基酸残基具有很高的同源性(>70%),都是由单一CH结构域和29个氨基酸残基组成的CLR三拷贝串联重复序列组成。但它们的羧基末端序列有较大的差异^[4]。结构分析表明(图1),CaP的CLR的氨基端存在一个肌动蛋白结合位点(aa142~163),称为ABS1,其在h1和h3CaP中是有活性的,但是在h2CaP中是无活性的^[4];位于CaP羧基端的3个CLR,形成一个独立的肌动蛋白结合结构域,称为ABS2。

Gimona等^[4]利用体外共沉淀分析发现,野生型h1、h2和h3CaP都与F-肌动蛋白相互作用,而且,NaCl浓度从50mmol/L增加到100mmol/L的离子强度缓冲体系都不会影响上述共沉淀结果。形态学研究表明,在分别转染了带有GFP标签的3种野生型CaP的成纤维细胞中,3种CaP都与应力纤维共定位,但是在膜周边的F-肌动蛋白处观察不到GFP h3CaP的聚集,而GFP h1CaP与GFP h2CaP则明显聚集在应力纤维末端和胞膜皱褶处^[15]。最近研究发现,CaP也与G-肌动蛋白结合,并且具有与F-肌动蛋白结合的相同的亲和力。CaP与G-肌动蛋白结合后影响其与F-肌动蛋白和其他蛋白质如gelsolin的结合^[17]。

有研究发现,在低离子强度的缓冲体系中,平滑肌CaP可以加速肌动蛋白的聚合,在活细胞中CaP具有稳定肌动蛋白纤维的能力,还可以减少肌动蛋白的重塑^[15]。用细胞松弛素B分别刺激转染了h1和h2CaP的细胞,发现在转染h1CaP的细胞中,肌动蛋白解聚被抑制,而h2CaP不具有抵抗肌动蛋白细胞骨架解聚的能力。这是由于h1CaP使F-肌动蛋白处于构象稳定状态,阻止如gelsolin、ADF/cofilin等解聚蛋白的结合,从而有效的稳定肌动蛋白纤维。但是CaP并不与gelsolin、ADF/cofilin竞争结合肌动蛋白,其稳定F-肌动蛋白的机制可能是通过CaP结合肌动蛋白纤维使其三维结构发生变化而引起的^[10,18]。确有研究证实,CaP与肌动蛋白纤维结合后改变了肌动蛋白纤维的结构^[19]。

此外,有研究认为,CaP蛋白与肌动蛋白的结合活性受PKC的磷酸化调节^[12,15]。PKC可在体内、外有效的磷酸化CaP(Ser175, Thr184),且Ser175磷酸化可抑制CaP与肌动蛋白的体内外的结合活性。另外,Tyr261磷酸化也抑制CaP与F-肌动蛋白的相互作用^[20]。

3 SM22 α 与细胞骨架重构

SM22 α 是从鸡胫的平滑肌中分离出来的,由一条含201个氨基酸残基的多肽链构成,其氨基末端含有单一CH结构域,羧基末端含有单一的由23个氨基酸残基组成的CLR结构域。目前认为,SM22 α 可以通过直接或间接方式与细胞骨架蛋白肌动蛋白结合而参与细胞骨架的重构。在SM22 α 结构中,CLR氨基端的154~161位氨基酸序列中存在一个肌动蛋白结合位点,即ABS1,而其单一CLR(aa175~195, ABS2)对SM22 α 的肌动蛋白结合活性亦非常重要(图1)。

形态学研究表明,血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)中SM22 α 与肌动蛋白纤维束和应力纤维共定位^[6]。这种形态学上的定位关系表明,SM22 α 可能通过与肌动蛋白纤维相互作用而参与肌动蛋白纤维的聚合与解聚过程。然而,对SM22 α 是否能与肌动蛋白直接结合尚存在争议。虽然单一的CLR是SM22 α 结合肌动蛋白所必需的,但是SM22 α 与F-肌动蛋白的亲合力远远低于CaP蛋白,只能在低离子强度条件下才能发生。Fu等^[6]亦在低离子强度的条件下检测到SM22 α 与肌动蛋白共沉淀。然而也有研究者不能用共沉淀分析检测到SM22 α 与肌动蛋白的结合,且在被转染的成纤维细胞中SM22 α 与肌动蛋白不发生共定位^[4]。研究发现,酵母中的SM22 α 同源物Scp1可与肌动蛋白纤维发生体外交联,且这种交联可在含100mmol/L KCl的高离子强度缓冲体系中发生^[9]。另外,裂殖酵母中SM22 α 同源物Stg1也具有肌动蛋白交联活性,但是在含100mmol/L KCl的高离子强度缓冲体系中不与肌动蛋白发生交联^[21],这些结果说明,SM22 α 是一种弱的肌动蛋白结合蛋白。

SM22 α 作为一种肌动蛋白结合蛋白,通过促进肌动蛋白纤维聚集成束,形成应力纤维而在VSMC收缩过程中起一定的调节作用^[7]。免疫共沉淀方法可检测到SM22 α 与SM α -肌动蛋白以互相缔合方式存在。我室利用血清饥饿法诱导合成型VSMC转化为收缩型模型,观察SM22 α 在表型转化过程中的表达变化,结果显示,合成型VSMC几乎检测不出SM22 α mRNA,血清饥饿后,SM22 α 转录活性迅速升高,与此伴随出现了VSMC内细胞骨架结构由稀疏的网格状向致密、均匀的束状重构,细胞也由铺展状转变为长梭状,随着SM22 α 的表达,VSMC又重新获得收缩功能^[22]。利用反义核酸技术封闭该基因的表达,可阻止F-肌动蛋白的交联,VSMC不能重新获得收缩能力^[23]。SM22 α 在VSMC的肌动蛋白细胞骨架中可

能起类似捆绑蛋白的作用,在该蛋白质的作用下,肌动蛋白纤维形成束状、平行的应力纤维结构。体外试验中发现,SM22 α 可以稳定松弛的肌动蛋白凝胶,促进肌动蛋白纤维凝胶化,提示SM22 α 可能还与细胞的变形能力有关。但是,SM22 α 不具有稳定肌动蛋白纤维的功能^[10]。总之,在肌动蛋白聚合及进一步组装成应力纤维的过程中,SM22 α 可能起一定的调节作用。但也有相反的报道认为,SM22 α 不是VSMC结构和功能所必需^[24]。可见,有关SM22 α 对肌动蛋白细胞骨架的调节作用还有待于进一步证明。此外,有研究认为,SM22 α 与肌动蛋白的结合活性受PKC的磷酸化调节^[6]。PKC可在体外有效的磷酸化SM22 α (Ser181),且该位点磷酸化可抑制SM22 α 与肌动蛋白的体外结合。

4 小结

Calponin 蛋白家族作为肌动蛋白细胞骨架结合蛋白,可通过与F-肌动蛋白相互作用来调节肌动蛋白细胞骨架重构,具有多种生物学功能。近年来对其家族成员CaP和SM22 α 在细胞骨架重构中的作用机制已有了许多了解,随着对这些机制的深入研究,将更有助于人们进一步认识CaP和SM22 α 在细胞骨架

重构中的关键作用和生物学意义。

参考文献(References)

- [1] Goodman A *et al.* *Mol Biol Cell*, 2003, **14**: 2617
- [2] Gimona M *et al.* *FEBS Lett*, 2002, **513**: 98
- [3] Korenbaum E *et al.* *J Cell Sci*, 2002, **115**: 3543
- [4] Gimona M *et al.* *J Cell Sci*, 1998, **111**: 1813
- [5] Galkin VE *et al.* *J Mol Biol*, 2006, **359**: 478
- [6] Fu Y *et al.* *J Appl Physiol*, 2000, **89**: 1985
- [7] Morgan KG *et al.* *J Appl Physiol*, 2001, **91**: 953
- [8] Leinweber BD *et al.* *Biochem J*, 1999, **344**: 117
- [9] Winder SJ *et al.* *Biochem J*, 2003, **375**: 287
- [10] Gimona M *et al.* *Mol Biol Cell*, 2003, **14**: 2482
- [11] Kranewitter WJ *et al.* *J Biol Chem*, 2001, **276**: 6306
- [12] Mino T *et al.* *Eur J Biochem*, 1998, **251**: 262
- [13] Lener T *et al.* *FEBS Lett*, 2004, **556**: 221
- [14] Burgstaller G *et al.* *J Cell Sci*, 2002, **115**: 2021
- [15] Danninger C *et al.* *J Cell Sci*, 2000, **113**: 3725
- [16] Hossain MM *et al.* *J Biol Chem*, 2005, **280**: 42442
- [17] Ferjani I *et al.* *FEBS Lett*, 2006, **580**: 4801
- [18] Leinweber B *et al.* *Biophys J*, 1999, **77**: 3208
- [19] Bartegi A *et al.* *Eur J Biochem*, 1999, **262**: 335
- [20] Abouzaglou J *et al.* *Eur J Biochem*, 2004, **271**: 2615
- [21] Nakano K *et al.* *FEBS Lett*, 2005, **579**: 6311
- [22] 程云会等. *细胞生物学杂志*, 2003, **25**: 384
- [23] 程云会等. *细胞生物学杂志*, 2006, **28**: 95
- [24] Zhang JC *et al.* *Mol Cell Biol*, 2001, **21**: 1336

Roles of Calponin Family in Cytoskeleton Remodelling

Li-Hua Dong, Mei Han*, Jin-Kun Wen

(Hebei Laboratory of Medical Biotechnology, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract Calponin family includes calponin (CaP) and smooth muscle 22 alpha (SM22 α), which is characterized by an calponin homology (CH) domain and one or more copies of calponin-like repeat (CLR). As actin-binding protein, CaP and SM22 α are associated with actin cytoskeleton remodelling via interacting with F-actin, and are involved in the regulation of cellular biological behaviour in physiological and pathological conditions.

Key words calponin family; cytoskeleton; actin; calponin; smooth muscle 22 alpha

Received: September 27, 2006 Accepted: January 12, 2007

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30570661) and the Special Found for Preliminary Research of Key Basic Research Project of Ministry of Science and Technology of China (No.2005CCA03100)

*Corresponding author. Tel: 86-311-86265563, E-mail: hanmei@hebmh.edu.cn