

接头蛋白 CIN85 的结构与功能

黄芳* 卞敏娟

(复旦大学上海医学院医学神经生物学国家重点实验室, 上海 200032)

摘要 CIN85 与 CD2AP 构成了一个接头蛋白家族, 在个体发育中担当重要角色并和多种疾病的病理机制相关。它们在功能结构域的序列上有很高的相似性, 并具有细胞骨架蛋白的特点。近来研究表明 CIN85 在受体酪氨酸激酶 (RTK) 的内吞与降解、细胞凋亡、细胞局部黏附等许多生物学过程中发挥重要作用。

关键词 CIN85; SH3 结构域; 脯氨酸富集区; 结合蛋白

信号接头蛋白(adaptor protein)是指具有蛋白质与蛋白质或者蛋白质与脂类相互作用的结构域, 但不具备酶活性的一类蛋白质, 它们或表达在细胞膜上或存在于细胞内, 在决定细胞信号转导通路的激活与关闭、信号通路的时空整合等生物学过程中起重要的作用。CIN85(Cbl-interacting protein of 85kDa)与 CD2AP(CD2 associated protein)构成了一个接头蛋白家族(adaptor protein family), 它们共同的结构包括 3 个 SH3(Src homology 3)结构域, 1 个脯氨酸富集区(proline rich domain)和 1 个 coiled-coil 结构域, 可以和多种内吞相关蛋白、细胞骨架组分及其他接头蛋白相互作用, 在细胞生长、分化、凋亡等涉及的多个信号通路中发挥重要的作用^[1,2]。

1 CIN85 基因

1996 年, Akopian 等^[3]在研究大鼠的小脑发育时利用基因差异表达的方法克隆到一个新的基因——3E7。2000 年, Bogler 等^[4]也是利用基因差异表达克隆了 SETA(SH3 domain-containing gene expressed in tumorigenic astrocytes); 利用酵母双杂交法, Take 等^[5]克隆了 CIN85; Gout 等^[6]在新基因 3E7 的基础上克隆了 RUK(regulator of ubiquitous kinase), 但 SETA、CIN85、RUK 事实上是同一种蛋白质, 除此之外, 还有其他名称: SH3KBP1(SH3-domain kinase binding protein 1)和 CD2BP3(CD2 binding protein 3)^[7,8]。

人和小鼠的 CIN85 基因分别定位于人染色体 Xp22.1 → p21.3 和小鼠 X 染色体的远端^[7,9]。小鼠的 CIN85 基因有 24 个外显子组成, 长度超过 320 kb。

对这个基因的研究表明, 在外显子 1、3、10、18 和 19 的上游分别具有 5 个潜在的启动子。这些启动子中, 有的是组织特异的, 有的则在多种细胞中发挥作用^[10,11]。由于启动子使用和 RNA 剪接的多样性, CIN85 有 8 种以上的形式, 不同形式之间在功能上是有区别的, CIN85 通常是指长度为 665 个氨基酸残基的形式。

2 与 CIN85 相互作用的蛋白质及 CIN85 的功能

CIN85 中有多个结构域, 与它相互作用的蛋白质有许多, 如: CIN85 的 SH3 结构域可同十几种蛋白质的 PXXXPR 序列或者 PX(P/A)XXR 序列或者 PXXP 序列相互作用, 这些蛋白质中有 Cbl (Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene, E3 泛素连接酶家族)、凋亡调节蛋白 AIP1/Alix (ALG2-interacting protein 1 or ALG2-interacting protein X, ALG2-apoptosis-linked gene 2, 凋亡相关蛋白)、Dab2 (disabled-2, 内吞相关接头蛋白); CIN85 的脯氨酸富集区可以结合 PI-3 激酶的 p85 调节亚单位、接头蛋白(如 Grb2、Crk 和 p130Cas)以及内吞相关蛋白 Endophilin A1~Endophilin A3; 其 coiled-coil 结构域负责蛋白质的二聚化。另有研究发现 CIN85 可以结合黏着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK)。随着研究的深入, 新的相互作用蛋白质也在不断地被发现。存在这么多与 CIN85 相互作用的蛋白质也提示了该接头蛋白功

收稿日期: 2005-05-23 接受日期: 2005-08-04

* 通讯作者。Tel: 021-54237296, Fax: 021-64174579, E-mail: huangf@shmu.edu.cn

表1 与 CIN85 相互作用的蛋白质及功能。

蛋白质名称	CIN85 中的结合区域	功能	参考文献
Cbl 家族(Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene), 包括 c-Cbl, Cbl-b	SH3 结构域	RTK 下调	[5,12,13]
B 细胞连接蛋白 (B-cell linker protein, BLNK)	SH3 结构域	调节 B 细胞受体信号转导	[14]
SB1(SETA binding protein 1)	SH3 结构域	功能不详	[12]
CD2	SH3 结构域	T 细胞受体的簇集	[12]
Dab2 (disabled-2)	SH3 结构域	调节 Clathrin 介导的受体内存	[15]
Rho GTP 酶激活蛋白 1 (CIN85 associated multi-domain containing RhoGAP1, CAMGAP1)	SH3 结构域	调节 Clathrin 介导的内存	[16]
磷脂酰肌醇磷酸酶 SHIP-1	SH3 结构域	可能是调节 RTK 内存与再循环	[17]
磷脂酰肌醇磷酸酶 Synaptojanin 2B1	SH3 结构域	可能是调节 RTK 内存与再循环	[17]
Arf GTP 酶激活蛋白 ASAP1	SH3 结构域	可能是调节 RTK 内存与再循环	[17]
Rho/Arf GTP 酶 ARAP3	SH3 结构域	可能是调节 RTK 内存与再循环	[17]
Clathrin 骨架蛋白 Hip1R	SH3 结构域	可能是调节 RTK 内存与再循环	[17]
接头蛋白 STAP1	SH3 结构域	可能是调节 RTK 内存与再循环	[17]
鸟核苷交换因子 P115Rho GEF	SH3 结构域	可能是调节 RTK 内存与再循环	[17]
Sprouty 1/2	SH3 结构域	抑制 RTK 下调	[18]
黏着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK)	可能是 SH3 结构域	调节细胞骨架与细胞黏附	[19]
PYK-2 (proline rich tyrosine kinase 2)	可能是 SH3 结构域	调节细胞骨架与细胞黏附	[19]
鸟核苷交换因子 Sos 1 (Son of sevenless)	可能是 SH3 结构域	调节 RTK 信号转导	[14]
AIPI/Alix(ALG-2 interacting protein 1 or ALG-2 interacting protein X)	SH3 结构域	胶质细胞凋亡, RTK 下调, 细胞黏附	[20]
单纯疱疹病毒(infected cell protein 0, ICP0)	SH3 结构域	配体非依赖的 RTK 降解	[21]
PI-3 激酶 p85 调节亚单位	脯氨酸富集区	负调控 PI-3 激酶, 促神经细胞凋亡	[6,8]
Grb2(growth factor receptor binding protein 2)	脯氨酸富集区	调节 RTK 信号转导	[12,14]
p130Cas	脯氨酸富集区	调节肌动蛋白细胞骨架	[14]
Src 激酶家族(Fyn, Src, Yes, Lck, Fgr, Hck, Lyn)	脯氨酸富集区	调节 Src 激酶家族的活性	[22]
Endophilins A1,A2,A3	脯氨酸富集区	调节 RTK 内存	[13]
接头蛋白 Crk	脯氨酸富集区	调节 RTK 信号转导	[14]
Cortactin	脯氨酸富集区	细胞骨架重排	[23]
AP2(clathrin-associated protein complex 2)的 α -ear	FxDxF 区	调节 Clathrin 介导的内存	[24]
Actin 加帽蛋白 CAPZ	C 末端	调节肌动蛋白细胞骨架	[25]
CIN85	coiled-coil 结构域	蛋白质的二聚化	[12,14]

能的多样性。表1总结了目前基本确定的与 CIN85 相互作用的蛋白质及功能^[5-25]。

根据已有的研究, CIN85 的功能可以归纳为促受体酪氨酸激酶 (RTK) 的内存与降解、促细胞凋亡、影响局部黏附(focal adhesion)三个方面, 下面做进一步的说明。

2.1 促受体酪氨酸激酶 (RTK) 的内存与降解

现已知道细胞因子与细胞膜受体的结合激活了细胞内的信号通路, 最终决定细胞的增殖、分化或者死亡。受体激活的同时也启动一系列的细胞负调控机制来降低信号的幅度, 调节细胞的反应。负调控机制是通过泛素连接酶、接头蛋白、抑制分子、激酶/磷酸酶、磷酸肌醇代谢物等协同作用来完成的, 在细胞的正常生理功能中极为重要。受 CIN85 调控的受体酪氨酸激酶包括: 表皮生长因子受体

(EGFR)、血小板源生长因子受体(PDGFR)、肝细胞生长因子受体(c-Met)和干细胞因子受体(c-Kit), 其中以参与 EGFR 的下调和降解研究得最为透彻, 这里介绍一下其生物学过程: EGFR 被 EGF 激活后, 受体发生磷酸化, Cbl 通过其磷酸酪氨酸结合域与 EGFR 结合并作为一种 E3 泛素连接酶进一步泛素化 EGFR, 同时 Cbl 自身在受体复合物中被磷酸化。磷酸化的 Cbl 通过其 C 末端同 CIN85 的 SH3 结构域结合, 由于 Endophilin 的 SH3 结构域同 CIN85 的脯氨酸富集区组成型地结合在一起, 这样就将 CIN85/Endophilins 复合物招募(recruit)过来, Endophilins 是成笼蛋白有被小泡(clathrin-coated vesicles)的调节成分, 在 RTK 内存的早期通过诱导质膜的弯曲和内陷来发挥作用。通过 Endophilins, EGFR 复合物被结合到成笼蛋白有被小泡中。CIN85

的角色不仅仅是下调 RTK, 它还参与了受体内吞后的进一步加工, 内吞小泡的运输需要小泡的极性和肌动蛋白的动态重组, 由于 CIN85 能同时结合受体复合物及肌动蛋白骨架, 因此在其中起协调作用。CIN85 N 末端有 3 个 SH3 结构域, 可以同时结合几个 Cbl 分子, 将 Cbl-RTK 复合物簇集在小泡的一侧, 在细胞内提供了分选信号。EGFR 激活之后, 在 EGFR/Cbl/CIN85 复合体中, CIN85 C 末端的赖氨酸残基也被 Cbl 泛素化, 提供了一种溶酶体分选信号, 使得内吞的 EGFR 进入溶酶体降解, 最终终止受体的信号转导^[13,17,26,27]。随着研究的深入, 这一生物学模式变得更加丰富, 有更多的细胞蛋白质组分参与进来。

CIN85 中的 Fx₂DxF 特征序列可以同 AP2 (clathrin-associated protein complex 2) 的 α -ear 相互作用, 而 AP2 复合物可以结合 RTK 的内吞特征序列或成笼蛋白和附加内吞蛋白, 这样通过 AP2 复合体的双重结合作用, 更利于已激活的 RTK 定位到成笼蛋白有被小泡中^[24]。另外受生长因子激活调控, CIN85 可以结合 Dab2, 之后 Dab2 及成笼蛋白与 CIN85 分开, CIN85 得以同其他分子如 Cbl 结合, 这种 CIN85 与其效应分子间的动态作用控制了 RTK 的内吞^[15]。此外, Liang 等^[21]发现单纯疱疹病毒的 ICP0 (infected cell protein 0) 可与 CIN85、Cbl 形成复合体, 以一种配体非依赖的形式促进受体酪氨酸激酶的降解。

EGFR 内吞降解过程是一个被精密调控的生物学过程, 细胞内还存在拮抗这一过程的分子机制。比如, 接头蛋白 AIP1 可以抑制 EGFR 的内吞^[28], 它是通过减弱 Cbl 同 CIN85 的结合及 Cbl 介导的 EGFR 泛素化来实现的。但是 AIP1 319 位的酪氨酸残基可以结合酪氨酸激酶 Src 的 SH2 结构域, Src 磷酸化 AIP1 C 末端的酪氨酸, 这一过程受 CIN85 调控, 磷酸化的 AIP1 离开细胞膜和细胞骨架进入胞质内, 与 CIN85、EGFR 及 PYK2 的结合减弱, 这样 AIP1 对 EGFR 内吞的负调控作用又被 Src 激酶所拮抗^[29]。再比如, Sprouty2 蛋白可以结合 Cbl 的环指结构域 (ring finger domain) 而影响 EGFR 的泛素化和内吞, 还可与 CIN85 的 2 个 SH3 结构域组成型地结合在一起, 阻碍 CIN85 对 Cbl 的簇集作用, 降低了 Cbl-EGFR 结合的稳定性以及受体的泛素化和下调^[18]; Sts-1/2 蛋白 (suppressors of T-cell receptor signaling) 通过其 SH3 结构域与 Cbl 作用, 竞争内吞相关蛋白同 Cbl-EGFR 复合物的结合, 增加受体的稳定性, 也抑制了受体的内吞^[30]。另有研究表明 EGF 受体的信号强度决定

了细胞内蛋白质之间的相互作用、泛素化和内吞。当细胞膜上 EGF 受体的信号被抑制, 或表达一种突变的转化型 EGFR (缺少外显子 2~7), 结果显示受体泛素化和内吞消失^[31]。

尽管 CIN85 被发现和 EGFR 的负调控密切相关, 但是最近也有研究揭示 CIN85 不是 EGFR 内吞和再循环所必需的: Eps15 是一种与成笼蛋白有被小泡装配相关的接头蛋白, 在一些细胞中, Eps15 分子内的 UIM (ubiquitin interacting motif) 为 Cbl 介导的 EGFR 内吞所必需。c-Cbl 介导 EGFR 进入 Eps15 内吞途径有两种机制: (1) c-Cbl 通过其磷酸酪氨酸结合域直接结合 EGFR 上磷酸化的酪氨酸残基; (2) 通过环指结构域 C 端的脯氨酸富集区结合 Grb2, 并通过 Grb2 使得 c-Cbl 非直接地结合到受体的另一位点上。c-Cbl 的环指结构域与泛素结合酶 (ubiquitin-conjugating enzyme, E2) 结合将泛素转移到 EGFR 或受体复合物的另一组分上, 随后 Eps15 通过分子内的 UIM 与泛素化组分作用, 因 Eps15 与 AP2 及成笼蛋白结合, 可将受体复合物送至成笼蛋白有被小泡中, 在这种情况下, 只需要受体复合物中有被泛素化的组分存在即可, 而泛素化的 EGFR 或者 CIN85 都不是 Eps15 UIM 锚定到受体复合物上所必需的^[32]。又有研究表明 Grb2 (growth factor receptor binding protein 2) 和 EGFR 一同被内吞, 并且 Grb2 介导 EGFR 对 Cbl 环指结构域的招募是 RTK 内吞的必要和充分条件, 而与 CIN85 结合的 Cbl C 末端在 RTK 的内吞中作用不大^[33]。这一观点部分支持了上述研究的结果, 但是在内容上并不完全吻合, 这种在研究 EGFR 内吞过程中所呈现的复杂性可能是由于研究的系统和手段不完全一致所造成的, 也反映了这种调节过程本身内在的多样性。

目前受体的泛素化是不是内吞的前提仍存在争论, 只有当受体的泛素化位点图谱解析之后, 通过突变的手段方可得出定论。概括地说, 受体的内吞与降解是一个多途径的生物学过程, 从而保证信号被适时、适量地转导。其中 CIN85、Cbl、Grb2 很有可能分别在不同的场合和步骤中起关键作用。

2.2 促细胞凋亡

细胞内 CIN85 还参与了凋亡的调节。CIN85 与细胞凋亡相关的研究有: (1) 体外实验证明 CIN85 的脯氨酸富集区可以结合 PI-3 激酶的 p85 调节亚单位, 从而抑制 PI-3 激酶的活性。大量研究表明体内 PI-3 激酶-蛋白激酶 B (PI3K-PKB) 通路是包括神经细胞在内的许多种细胞的存活信号通路。在培养

的原代外周神经细胞中高表达 CIN85, 可以抑制 PI3K-PKB 信号通路, 引起神经细胞的凋亡^[6,8]; (2) 在体外培养的胶质细胞中发现 CIN85 与凋亡相关蛋白 2 (ALG2) 及凋亡调节蛋白 (AIP1/Alix) 存在于一个复合体中, 调节胶质细胞的凋亡^[20]; (3) 在培养的人细胞株 CEMA301 和 U937 中高表达 CIN85, TNF α 刺激后细胞的凋亡明显增加。研究发现对于不具有酪氨酸激酶特性的肿瘤坏死因子受体 (TNFR), CIN85 通过酪氨酸激酶 Src 结合 TNFR 的细胞内部分也可以调控 TNF α 诱导的细胞凋亡^[22]。由此可见, CIN85 是一个重要的细胞凋亡的调节蛋白。

2.3 影响局部黏附

CIN85 调节细胞黏附性的论断是基于在细胞内 CIN85 与微丝中的肌动蛋白、微管及局部黏附部位共处。CIN85 可以直接结合与局部黏附相关的激酶, 如 FAK 和 PYK-2, 还可通过其结合蛋白 AIP1 同细胞骨架蛋白、局部黏附激酶相作用, CIN85 的细胞骨架蛋白的特点参与调节细胞的黏附性^[19]。

3 小结

CIN85 在多种组织中表达, 在脑内以黑质和海马区域表达较高。它作为一个信号通路的调控蛋白在脑内的功能如何? 它的促细胞凋亡特性与神经退行性病变有没有相关性已经成为一个非常值得研究的问题。

参考文献 (References)

- [1] Dikic I. *FEBS Lett*, 2002, **529**: 110
- [2] Dikic I et al. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, **15**: 128
- [3] Akopian AN et al. *Genetika*, 1996, **32**: 886
- [4] Bogler O et al. *Neuro-oncol*, 2000, **2**: 6
- [5] Take H et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **268**: 321
- [6] Gout I et al. *EMBO J*, 2000, **19**: 4015
- [7] Narita T et al. *Cytogenet Cell Genet*, 2001, **93**: 133
- [8] Borthwick EB et al. *J Mol Biol*, 2004, **343**: 1135
- [9] Hyatt MA et al. *Cytogenet Cell Genet*, 2000, **89**: 278
- [10] Buchman VL et al. *Gene*, 2002, **295**: 13
- [11] Finnis S et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **325**: 174
- [12] Borinstein SC et al. *Cell Signal*, 2000, **12**: 769
- [13] Soubeyran P et al. *Nature*, 2002, **416**: 183
- [14] Watanabe S et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **278**: 167
- [15] Kowanetz K et al. *FEBS Lett*, 2003, **554**: 81
- [16] Sakakibara T et al. *FEBS Lett*, 2004, **566**: 294
- [17] Kowanetz K et al. *Mol Biol Cell*, 2004, **15**: 3155
- [18] Haglund K et al. *EMBO Rep*, 2005, **6**: 635
- [19] Schmidt MH et al. *J Cell Sci*, 2003, **116**: 2845
- [20] Chen B et al. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 19275
- [21] Liang Y et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**: 5838
- [22] Narita T et al. *Exp Cell Res*, 2005, **304**: 256
- [23] Lynch DK et al. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 21805
- [24] Brett TJ et al. *Structure(Camb)*, 2002, **10**: 797
- [25] Hutchings NJ et al. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 22396
- [26] Szymkiewicz I et al. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 39666
- [27] Haglund K et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 12191
- [28] Schmidt MH et al. *Mol Cell Biol*, 2004, **24**: 8981
- [29] Schmidt MH et al. *J Biol Chem*, 2004, **280**: 3414
- [30] Kowanetz K et al. *J Biol Chem*, 2004, **279**: 32786
- [31] Schmidt MH et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 6505
- [32] de Melker AA et al. *J Biol Chem*, 2004, **279**: 55465
- [33] Huang F et al. *Mol Biol Cell*, 2005, **16**: 1268

Structure and Functions of CIN85

Fang Huang *, Min-Juan Bian

(State Key Laboratory of Medical Neurobiology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract CIN85 and CD2AP comprise a new family of adaptor proteins that plays important roles in animal development and diseases. They share a high sequence similarity in several functional domains that exhibit unique scaffolding function. Recent data suggest that the scaffolding function of CIN85 may control multiple cellular functions, such as down-regulation of receptor tyrosine kinases (RTK), regulation of apoptosis, and modulation of cell adhesion.

Key words CIN85; SH3 domain; proline-rich region; associated proteins

Received: May 23, 2005 Accepted: August 4, 2005

*Corresponding author. Tel: 86-21-54237296, Fax: 86-21-64174579, E-mail: huangf@shmu.edu.cn