

PH 结构域与细胞方向感觉

李世迎* 李晓辉

(第三军医大学药理教研室, 重庆 400038)

摘要 PH (pleckstrin homology) 结构域与细胞方向感觉关系密切, 目前已发现, PH 结构域存在于 60 多种蛋白质中, 这些蛋白质能与趋化细胞胞膜表面的相关结合位点结合, 进而激发信号转导的下游事件. 这种结合有以下特点: a. 迅速而短暂; b. 只与外界环境中两点间浓度梯度差相关, 据此提出了“空间模式”; c. 改变趋化剂的位置时, 结合位点在胞膜上的分布也随之改变, 由此提出了“时间模式”. 深入而全面地探讨各种 PH 结构域及其结合位点在细胞方向感觉中的作用, 对于细胞方向感觉的研究具有巨大的推动作用和深远的理论意义.

关键词 PH 结构域, 细胞方向感觉, 胞浆腺苷酸环化酶调节因子

学科分类号 Q5

为了探讨多细胞生物中细胞是如何寻找并保持它们自己所适合的位置, 近年来对于细胞的定向移动和趋化作了大量的研究, 对于细菌趋化的研究已相对明了, 真核细胞方向感觉的研究也取得了新的进展.

1 PH 结构域及含 PH 结构域的蛋白

目前发现, 约含有 100 个氨基酸的 PH (pleckstrin homology) 结构域存在于 60 多种蛋白质中, 其中大部分该类蛋白质与细胞膜表面受体的信号转导下游分子事件有关. 已有大量实验证实: PH 结构域能与 $G_{\beta\gamma}$ 亚单位或磷酸肌醇结合, 或者与二者同时结合^[1-3]. 在化学趋化剂的诱导下, 在面向刺激源一侧的细胞膜内表面短暂地出现了一些有活性的结合位点, 这些结合位点能结合含有 PH 结构域的蛋白.

2 趋化细胞的行为特性

近来的研究表明, 趋化细胞的方向感觉行为具有以下特性: 第一, 趋化细胞是非常敏感的. 趋化的精确性是依赖于趋化剂浓度梯度的相对变化幅度而不是趋化剂的平均浓度, 例如当细胞前后端浓度差异只有 2% 时, 仍可指导细胞运动. 第二, 细胞可以调节极性. 虽然这些细胞在其周边各点上都表现出敏感性, 但是当阿米巴朝向趋化剂数分钟后, 它们的后部会变得逐渐不敏感. 第三, 移动似乎不是方向感觉必需的. van Duijn 等的研究结果显示: 通过电穿孔固定了的阿米巴在细胞受刺激的一侧产

生了伪足. 在那些加入了抑制肌动蛋白聚集的 latrunculin 或细胞松弛素的细胞中, 细胞不能运动, 但是极化的应答并未减弱^[4]. 这表明, 细胞运动或肌动蛋白等细胞骨架均不是方向感觉所必需的. 第四, 化学趋化剂受体和 G 蛋白 $\beta\gamma$ 亚单位可能都是均匀分布在细胞周边的. 真核细胞的方向感觉是由 G 蛋白 (guanine nucleotide-binding protein) 偶联的信号通路所介导的. 既往研究发现, 趋化细胞面向趋化剂的一侧 (leading edge) 胞膜内表面上聚集有肌动蛋白、冠状蛋白 (coronin)、cofilin 以及 CAP (cyclase-associate protein), 因而有人推测它们的重分布是由于 G 蛋白或化学趋化剂受体在细胞膜上的不对称分布^[5]. 最近, 通过利用绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 融合蛋白技术, 发现在阿米巴 *D. Discoideum* 及哺乳动物白细胞中, 化学趋化剂受体和 G 蛋白 $\beta\gamma$ 亚单位都是均匀分布在细胞周边的^[6,7], 只是其活化是局部发生于趋化细胞面向趋化剂的一侧, 从而深化了该方面的认识.

3 含 PH 结构域蛋白的作用

Parent 等在 *D. Discoideum* 中采用了一种新近发现的蛋白质——胞浆腺苷酸环化酶调节因子 (cytosolic regulator of adenylyl cyclase protein, CRAC). CRAC 的 N 端含有 PH 结构域, 能与胞

* 通讯联系人.

Tel: 023-68752266, E-mail: xhl@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2000-03-27, 接受日期: 2000-04-26

膜上 CRAC 结合位点结合, 进而通过 CRAC 的 C 端与 AC 的结合来激活腺苷酸环化酶 (adenylyl cyclase, AC), 生成 cAMP (adenosine 3' 5'-cyclic phosphate). 故 CRAC-GFP 可作为 G 蛋白偶联信号转导通路上的一个标记物, 用于标记 G 蛋白活化的亚细胞位点. 研究者观察到: 当趋化细胞受到趋化剂的刺激时, CRAC-GFP 迅速从胞浆移到了面向趋化剂的一侧胞膜上. 定量研究表明: CRAC-GFP 在胞膜上聚集的同时, 胞浆中 CRAC-GFP 的数量也下降了. 当改变趋化剂微吸管的位置时, 趋化细胞中 CRAC-GFP 也随之重新聚集在面向新的趋化剂位置的一侧胞膜内表面上. 在趋化细胞中, 蛋白激酶 D (PKD)^[8]、蛋白激酶 B (PKB)、Rho 交换因子 Vav 均含有 PH 结构域, 都能与 CRAC 结合位点结合. 可见, 与含 PH 结构域蛋白相结合的结合位点, 是短暂地出现在面向趋化剂的一侧胞膜内表面上. 这表明, 这些受体和 G 蛋白 $\beta\gamma$ 亚单位的活化是局部发生于趋化细胞面向趋化剂的一侧 (leading edge). 有学者认为, CRAC 结合位点本身可能就是 $G_{\beta\gamma}$, 或者该位点的生成需要 $G_{\beta\gamma}$ 的参与. 不过这一学说尚有争议. 因为有实验发现, 在野生型和无 G_{β} 的细胞中, CRAC-GFP 能与大胞饮泡边缘相结合. 这提示, 虽然受体介导的这些 CRAC 结合位点的产生需要 $G_{\beta\gamma}$, 但这些结合位点在没有 $G_{\beta\gamma}$ 时也可以产生, 而且 $G_{\beta\gamma}$ 本身并不是这种结合位点^[4].

另外, 在酵母细胞中, Farlp 将 Rho 交换因子 Cdc24 及 Cdc42 与 $G_{\beta\gamma}$ 相连接. 虽然目前还不知道这种复合体是否是局部分布的, 但在阿米巴以及更高等的真核细胞中, 对连接异三聚体与小分子 G 蛋白的中间步骤的相关蛋白质研究发现, 这些蛋白质可能含有 G 蛋白信号转导调节因子 (regulators of G protein signaling, RGS) 和 Rho 交换因子结构域, 而这两种交换因子都含有 PH 结构域. Cdc42 和 Rac 在吞噬体中是局部聚集的, 其方式和冠状蛋白 (coronin) 与大胞饮泡结合方式相似, 而且 Cdc42 和 Rac 随后都可能转移到细胞面向趋化剂一侧的胞膜上^[9, 10].

4 CRAC 结合位点的结合特征

进一步的研究表明, 这些含有 PH 结构域的蛋白与 CRAC 结合位点的结合具有以下特点:

a. 迅速而短暂. 实验结果显示: 当趋化细胞受到 $1 \mu\text{mol/L}$ 的 cAMP 刺激时, CRAC-GFP 在 5

~ 10 s 内迅速从胞浆移到了面向趋化剂的一侧胞膜上, 此时 CRAC-GFP 的移动速度达到顶峰. 30~40 s 后, CRAC-GFP 在胞浆中又恢复为均匀分布的状态. 将 cAMP 的浓度减为 1 nmol/L 时, 仍能观察到同样的现象^[4].

b. 研究中发现: 每隔 5 s 增加一次趋化剂的浓度, 造成其浓度梯度. 然后改变趋化剂微吸管的位置, 在与原来微吸管位置完全相对的地方重新放置微吸管, 发现 CRAC-GFP 在胞膜上的分布发生了改变, CRAC-GFP 移到了面向新的趋化剂位置的一侧胞膜上^[4]. 由此支持了真核细胞方向感觉的一种模式——“时间模式”, 该模式认为: 最初细胞可以在其胞膜周边各个点对外界刺激发生应答, 产生合成 CRAC 结合位点的酶, 随即又产生了一种降解 CRAC 结合位点的酶. 在面向趋化剂的一侧, 合成酶的产生多于降解酶, 从而使这一侧成了细胞进行方向感觉的前端, 表现为兴奋, 启动了一系列信号转导事件. 而在背向趋化剂的一侧, 降解酶多于合成酶, 表现为抑制. 方向感觉是由两个相反活动 (兴奋与抑制) 之间的差异决定的, 所以是相当敏感的, 并且细胞后端总是抑制大于兴奋. 实验结果也表明: 趋化剂造成的细胞周边各点的普遍应答会迅速地消失, 但细胞面向趋化剂一侧的应答却持久地存在^[11].

c. 有实验显示, 无论是距离趋化剂微吸管最近的还是最远的趋化细胞, 其胞膜上 CRAC-GFP 的分布都是相同的. 进一步的研究表明: 细胞中 CRAC 等含 PH 结构域的蛋白与 CRAC 结合位点的结合只与外界环境中两点间浓度梯度差相关, 与平均浓度、细胞与趋化剂距离远近均无关. 有学者据此提出了真核细胞方向感觉的另一种模式——“空间模式”, 认为细胞能够比较其两端受体同时接受的趋化剂浓度刺激的差异, 即使这些受体在接受刺激时并没有时间上的差异^[4, 11].

综上所述, 虽然 PH 结构域结合位点 (如 CRAC 结合位点) 的化学特性还有待进一步阐明, 但是这些研究已经提示: CRAC、PKB、PKD、Vav 等含 PH 结构域的蛋白, 通过使用在胞膜面向趋化剂一侧的相同的 CRAC 结合位点, 可以启动多信号级联反应 (如 cAMP 的生成, 肌动蛋白的极性聚集等等), 从而使细胞完成复杂的方向感觉及其对于外界环境的动态应答行为 (如免疫, 血管生成, 创伤修复, 胚胎发育等), 这为深入阐明细胞方向感觉的分子机理奠定了新的基础.

参 考 文 献

- 1 Lemmon M A, Ferguson K M, Schlessinger J. PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface. *Cell*, 1996, **85** (5): 621~ 624
- 2 Barak L S, Ferguson S S, Zhang J, *et al.* A beta-arrestin/green fluorescent protein biosensor for detecting G protein-coupled receptor activation. *J Biol Chem*, 1997, **272** (44): 27497~ 27500
- 3 Sawai T, Hirakawa T, Yamada K, *et al.* Interaction between pleckstrin homology domains and G protein beta-gamma subunits: analyses of kinetic parameters by a biosensor-based method. *Biol Pharm Bull*, 1999, **22** (3): 229~ 233
- 4 Parent C A, Blacklock B J, Froehlich W M, *et al.* G protein signaling events are activated at the leading edge of chemotactic cells. *Cell*, 1998, **95** (1): 81~ 91
- 5 Westphal M, Jungbluth A, Heidecker M, *et al.* Microfilament dynamics during cell movement and chemotaxis monitored using a GFP-actin fusion protein. *Curr Biol*, 1997, **7** (3): 176~ 183
- 6 Servant G, Weiner O D, Nepture E R, *et al.* Dynamics of a chemoattractant receptor in living neutrophils during chemotaxis. *Mol Biol Cell*, 1999, **10** (4): 1163~ 1178
- 7 Xiao Z, Zhang N, Muirphy D B, *et al.* Dynamics distribution of chemoattractant receptors in living cells during chemotaxis and persistent stimulation. *J Cell Biol*, 1997, **139** (2): 365~ 374
- 8 Jamora C, Yamanouye N, Van L J, *et al.* Gbetagamma-mediated regulation of Golgi organization is through the direct activation of protein kinase D. *Cell*, 1999, **98** (1): 59~ 68
- 9 Butty A C, Pryciak P M, Huang L S, *et al.* The role of Far1p in linking the heterotrimeric G protein to polarity establishment proteins during yeast mating. *Science*, 1998, **282** (5393): 1511 ~ 1516
- 10 Caron E, Hall A. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science*, 1998, **282** (5394): 1717~ 1721
- 11 Parent C A, Devreotes P N. A cell's sense of direction. *Science*, 1999, **284** (5415): 765~ 770

PH Domain and Cell's Sense of Direction

LI Shi-Ying*, LI Xiao-Hui

(Department of pharmacology, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract The cell's sense direction is closely related with the proteins that contain PH (pleckstrin homology) domain. PH domain has been found in about 60 proteins, many of which could activate the sequent events of signal transduction via combining with the related binding sites on the surface of chemotactic cells. The characteristics of this combining are: a. rapid and transient; b. It is only related to the concentration gradient of surroundings outside cells, which is the base of spatial model; c. The distribution of the binding sites on the cell membrane changes when the researchers altered the position of the chemoattractant. This is the base of temporal model. To deeply investigate the effects of all kinds of proteins which contain PH domain on cell's sense of direction will greatly promote the research of this field, and hence, has great theoretical significance.

Key words PH domain, cell's sense direction, cytosolic regulator of adenylyl cyclase protein (CRAC)

* Corresponding author. Tel: 86-23-68752266, E-mail: xhl@mail.tmmu.com.cn

Received: March 27, 2000 Accepted: April 26, 2000