



网格蛋白斑块的调控机制和功能多样性*

赵以歌¹⁾ 蒋昭泓¹⁾ 周倩仪¹⁾ 陈志明^{1,2,3)**}

(¹⁾ 南华大学基础医学院细胞生物学与遗传学教研室, 衡阳 421000; (²⁾ 国家卫健委出生缺陷研究与预防重点实验室, 长沙 410008;

(³⁾ 南华大学附属第一医院检验医学中心, 衡阳 421000)

摘要 网格蛋白介导型胞吞作用 (clathrin-mediated endocytosis, CME) 是细胞胞吞大分子物质的主要途径, 同时也是细胞囊泡运输 (vesicle trafficking) 的起始环节。网格蛋白斑块 (clathrin plaques) 是细胞质膜上大而扁平的网格蛋白包被结构 (clathrin-coated structures, CCSs), 有时也称为扁平的网格蛋白晶格 (flat clathrin lattices)。与典型的网格蛋白包被小窝 (clathrin-coated pits, CCPs) 相比, 网格蛋白斑块具有更平坦的形态、更大的面积和更长的寿命。现有的研究证据表明, 网格蛋白斑块不仅可以通过 CME 参与大分子货物的选择性胞吞, 还是一种特殊的细胞黏附结构, 并作为信号转导平台参与细胞信号通路的调节。斑块在不同类型细胞的细胞黏附、机械感应、细胞迁移、病原体入侵等过程中扮演重要角色, 但截至目前, 国内外研究对网格蛋白斑块的功能多样性及其形成和调控机制仍未完全探明。本文回顾网格蛋白斑块的研究历程, 综述网格蛋白斑块的结构特征和功能, 讨论调节网格蛋白斑块动态的机制及其在 CME 中的最新发现。

关键词 网格蛋白斑块, 胞吞作用, 细胞黏附, 信号转导, 显微镜成像

中图分类号 Q2, Q4, Q6

DOI: 10.16476/j.pibb.2025.0065

CSTR: 32369.14.pibb.20250065

网格蛋白 (clathrin) 是一种进化上高度保守的蛋白, 在如跨膜受体及其结合配体的大分子货物胞吞及囊泡运输过程中发挥关键作用。网格蛋白通过与多种衔接蛋白 (adaptor proteins) 和辅助因子相互作用, 在细胞表面组装形成网格蛋白包被小窝以及斑块状网格蛋白结构^[1-2]。网格蛋白斑块作为网格蛋白包被结构的一种非典型形式, 在胞吞作用、细胞黏附和信号转导等关键生理过程中发挥着重要作用^[3]。近年来, 随着关联超分辨率显微成像技术和冷冻电子断层扫描等技术的快速发展, 研究人员对网格蛋白斑块的结构、动态调控机制及其功能有了更深入的认识^[4-5]。然而, 网格蛋白斑块的动态可塑性及其在不同细胞类型中的功能异质性仍存在许多未解之谜。本文综述了网格蛋白斑块的显微成像技术、结构与定位、动态调控因素及其在胞吞作用、细胞黏附和信号转导中的功能, 并探讨了其未来的研究方向。

1 显微镜成像技术与网格蛋白斑块研究

随着显微成像技术的发展, 人们对网格蛋白斑

块进行了逐步深入地结构解析和动态追踪 (表 1)。1960 年代, 透射电子显微镜首次在薄层切片中观察到细胞质膜上的高曲率小凹陷结构 (半径 50~100 nm)^[6], 通过生化鉴定, 这些结构被证实由网格蛋白构成^[7]。1970~1980 年代, 铂复制透射电镜与冷冻电镜的引入使人们更清晰地观察到细胞质膜上还存在大而扁平的网格蛋白包被结构 (clathrin-coated structures, CCSs) 即网格蛋白斑块 (clathrin plaques), 揭示了其由六边形主导的网格蛋白几何排列^[8]。1990 年代, 显微动态成像兴起, 荧光蛋白标记技术首次实现活细胞中网格蛋白的动态追踪, 发现质膜上网格蛋白包被小窝 (clathrin-coated pits, CCPs) 的寿命存在异质性^[9]。研究人员推测, 网格蛋白斑块可能是 CCPs 形成过程的一个阶段, 并提出了 CCSs 产生曲率的模型^[10]。

* 国家自然科学基金 (32200564), 湖南省自然科学基金 (2025JJ60612, 2024JJ2045, 2022JJ40357) 和湖南省教改项目 (HNJG-20230607) 资助。

** 通讯联系人。

Tel: 0734-8281979, E-mail: zhiming.chen@usc.edu.cn

收稿日期: 2025-02-11, 接受日期: 2025-05-06

2000~2010年代,全内反射荧光显微镜和实现全细胞光学切片的旋转轮盘共聚焦显微技术发现网格蛋白斑块在非基底膜区域的分布及其与细胞黏附的关联^[11]。全内反射荧光显微镜和超分辨率成像技术的发展使得人们可以实时追踪细胞膜上的网格蛋白斑块,观察CCSs动力学^[12-16]。荧光显微镜和电子断层扫描技术结合揭示网格蛋白斑块从平坦向弯曲结构的连续重塑^[17],这类关联光镜与电子显微技术(correlative light and electron microscopy, CLEM)结合荧光显微镜与电镜成像,实现细胞同一区域多尺度成像,能够将网格蛋白介导型胞吞作用(clathrin-mediated endocytosis, CME)动态招募事件与CCSs纳米级结构变化直接关联^[18-19]。超分辨率显微技术突破分辨率极限(分辨率达20~50 nm),对网格蛋白斑块结构和动态变化的详细观察揭示了其与细胞黏附和信号转导更为紧密的联系^[20-21]。高速原子力显微镜(high-speed atomic force microscopy, HS-AFM)在毫秒级分辨率下实时观察网格蛋白斑块的曲率变化与膜动力学,用于研究网格蛋白斑块自发性弯曲的力学机制^[14, 22]。

2020年代,铂复制电镜对CCSs及细胞骨架进行高分辨率成像,提出分支肌动蛋白聚合通过推动网格蛋白斑块边缘来促进产生CCPs^[23]。活细胞的超分辨成像追踪了网格蛋白斑块中受体与信号分子的动态共聚集,揭示了在网格蛋白斑块处生长因子信号的共激活^[24]。新的关联冷冻电子断层扫描技术(cryo-electron tomography technology, Cryo-ET)使用电镜可见标签结合冷冻固定与断层重建,对分离的细胞基底和顶端质膜大面积超薄区域进行成像,测定网格蛋白晶格的Å级构象变化^[4, 25]。

超分辨率成像技术的开发实现了对斑块纳米级曲率变化和蛋白质招募的实时追踪,更精细地观测了复杂条件下网格蛋白斑块的表型,阐明斑块在胞吞、黏附和信号枢纽的多功能角色;从透射电镜(transmission electron microscope, TEM)对CCSs结构的静态观察到Cryo-ET的动态三维重建,人们逐步揭示了网格蛋白斑块结构的可塑性;CLEM系统将分子机制与细胞功能跨尺度整合,如整合素的招募与细胞3D迁移的直接关联,推动对网格蛋白斑块从结构到生理功能的系统理解。显微技术的创新极大地促进了我们对网格蛋白斑块结构和功能的了解,但仍存在局限性,如何将实时监测网格蛋白斑块动态变化成像与深入研究分子-细胞-组织多尺度动态调控机制相结合,仍是未来需要解决的关键

问题。CME一直是理解复杂的分子组装结构如何动态重排以执行物质内化的一个关键系统,在原子尺度上深入研究CME有助于我们理解不同系统中复杂蛋白复合物的工作原理。荧光显微镜和电镜技术的进步结合单细胞基因工程的发展,将有助于破解常规和非常规网格蛋白结构的作用,探索它们响应遗传调控和环境变化的机制。

2 网格蛋白斑块的结构与细胞定位

在细胞质膜内侧,研究人员通过电镜观察到六边形的蜂窝状结构形成大面积的平坦斑块,并有CCPs围绕在斑块边缘^[8, 26-27]。网格蛋白斑块结构在细胞膜上形成稳定的平台,通常与肌动蛋白网络相关联,斑块的边缘部分可以弯曲产生介导胞吞作用的囊泡。在不同细胞中,斑块的结构动态响应不同细胞功能。网格蛋白斑块和经典的CCPs一样,都是由网格蛋白这一进化上高度保守的蛋白质为主体组成的CCSs。经典的CCPs寿命通常在30~90 s,而斑块的寿命可以延长至数分钟甚至数小时。网格蛋白斑块是细胞膜结构的胞质侧由三腿蛋白(triskelion)组成的蜂窝状晶格结构。网格蛋白重链的近端腿上结合网格蛋白轻链,3个这样的重链蛋白和轻链蛋白二聚体构成斑块的基本结构单位三腿蛋白,多个三腿蛋白相互作用共同组装为晶格结构,形成网格蛋白斑块的主体(图1)。网格蛋白重链的三聚结构域交叉为三脚架顶点,由3个相邻顶点三腿蛋白的膝部结构域包围,其下由两个顶点外的三腿蛋白踝部结构域组成支撑^[28],N末端结构域上4个特定的保守基序能够与衔接蛋白复合体2(adaptor protein complex 2, AP-2)和胞吞辅助蛋白(endocytic accessory proteins, EAPs)等相互作用。网格蛋白斑块的几何形状和曲率由其晶格的多边形组合决定,而这些组合能够快速适应膜曲率的变化。在体外,斑块会自发弯曲,这可以通过低亲和力的单个相互作用在弯曲状态下相互作用更强来解释^[29-31]。在细胞内,研究人员通过阻断整合素连接和去除胆固醇等方法解除将斑块拉平的平坦力(flattening force)的约束后,发现网格蛋白斑块可以自发地弯曲成囊泡,这表明它们储存了可以驱动这种构象转变能量。在进行货物胞吞的网格蛋白斑块位点,部分六边形网格可以重排为五边形来组成弯曲的晶格,但斑块实际上并非完整稳定的六边形阵列,它包含许多无序和松散连接,如预先已存在的五边形空隙,以更迅速地适应膜曲率变化而无需

表1 显微镜技术与网格蛋白斑块研究
Table 1 Microscopy techniques and research on clathrin plaques

显微成像技术	观测方式及特点	应用
透射电子显微镜 [6, 23]	使用电子束扫描样本超薄切片, 通过重金属染色增强对比度。分辨率约1~2 nm。但仅适用于固定样本, 样品制备复杂	揭示网格蛋白斑块的超微结构, 确认其扁平晶格形态及与细胞膜的结合方式
冷冻电子断层扫描显微镜 [4, 8, 25]	结合冷冻固定与断层重建。快速冷冻样本保持天然状态, 直接观察未染色的生物大分子结构。低温电子断层扫描具有近原子级分辨率 (约3~4 Å), 无需化学固定或染色, 样品制备难度高	解析网格蛋白的功能性单元——三腿蛋白 (clathrin triskelion) 在斑块中的组装模式, 揭示其与衔接蛋白的结合机制
全内反射荧光显微镜 [12, 15, 20]	通过全反射光仅激发细胞膜附近~100 nm深度的荧光分子, 减少背景信号, 产生高分辨率荧光图像	实时追踪网格蛋白斑块在细胞膜上的动态变化, 或研究其与黏附受体的相互作用。能够对单个微粒向CME位点的招募进行成像, 跟踪指示活细胞网格蛋白相对量以及其向细胞内的移动距离, 允许实时可视化单个CME位点的膜曲率
激光共聚焦显微镜 [11]	使用荧光标记的网格蛋白抗体或荧光标签融合蛋白逐层扫描细胞样本的三维结构。分辨率约200~300 nm。可观察活细胞或固定样本的动态过程, 适合长时间成像	观察网格蛋白的整体分布及其与细胞骨架的共定位, 分析其在细胞迁移中的动态行为等
超分辨显微镜 [20-21, 24]	超分辨率显微技术通过物理或算法突破光学衍射极限, 分辨率约20~50 nm, 成像特定分子	清楚解析网格蛋白斑块与相关蛋白的共定位, 研究其作为黏附和信号枢纽的功能等
原子力显微镜 [14, 22]	通过微悬臂探针扫描样本表面, 测量力学性质, 如弹性、黏附力, 可同时获取形貌和力学数据。分辨率约1 nm, 样品需固定或活细胞在特定条件下成像	可用于研究网格蛋白斑块形成时的膜张力变化, 分析基质刚度对斑块结构稳定性的影响
光学和电子显微镜关联技术 [17-19]	用不同荧光显微镜结合使用电镜成像, 将图像叠加分析。荧光寿命成像可以反映分子间相互作用或微环境	荧光显微成像提供特定蛋白质信息, 电镜提供网格蛋白位点及周围的纳米级结构。验证网格蛋白斑块与细胞骨架的物理连接, 研究机械力如何通过斑块传递信号。解析晶格纳米级组装细节, 观察斑块核心与边缘的分子组成差异

进行大规模的网格重组 [32]。这样五边形、六边形以及少量其他多边形和不规则形状的三腿蛋白晶格组合在质膜上形成曲率, 网格蛋白本身也作为一种裂变蛋白在囊泡萌芽和融合中起作用 [33], 在衔接蛋白和众多胞吞辅助蛋白的协助下, 最终足球状、网球状或篮状的网格蛋白囊泡携货物内陷入胞 [34]。

网格蛋白斑块的形态、分布和寿命在不同的细胞类型中有所差别, 斑块周围的肌动蛋白丝和CCPs密度也存在差距。在细胞迁移过程中, 斑块通常出现在细胞与胞外基质接触的区域, 机械感应胞外环境。在极化的上皮细胞中, 斑块在细胞顶端 (背侧) 和基底面 (黏连腹侧) 的分布可能不同, 且其寿命与膜张力相关。动态的斑块存在于许多细胞类型 (HEK293、SKMEL2、BSC1 和 HeLa) 的背侧 [14, 17-18, 35-36]; U373、Swiss 3T3、HeLa细胞在

基底面具有更多长寿命网格蛋白斑块 (>2 min) 而在细胞背侧较少; BSC1、HEK293、SKMEL2细胞不容易出现长寿命网格蛋白斑块 [35, 37]; 人源骨肉瘤 U2OS 细胞、PtK2 上皮肾细胞中存在各种类型的CCSs [23]。除了参与细胞最基础的胞吞作用, 网格蛋白斑块在骨骼肌肌管和成骨细胞中大量存在, 它们参与细胞骨架的连接和细胞黏附: 斑块连接细胞骨架包括肌动蛋白和中间丝, 位于斑块上的整合素与胞外基质结合 [19, 38-39]。

网格蛋白斑块不仅存在于细胞膜上, 还在细胞器如内体细胞质侧形成, 同样用于集中特定受体, 作为传递化学和物理信号的转导平台, 以及作为黏附平台为细胞骨架提供锚定点 [3]。在迁移细胞中, 网格蛋白和衔接蛋白 AP-2 可以在胶原纤维-质膜接触位点形成管状组件, 称为管状网格蛋白/AP-2 晶

格 (tubular clathrin/AP-2 lattices, TCALs), TCALs通过局部力传递控制细胞沿 CCSs 货物配体

修饰的胶原蛋白纤维定向迁移^[40]。

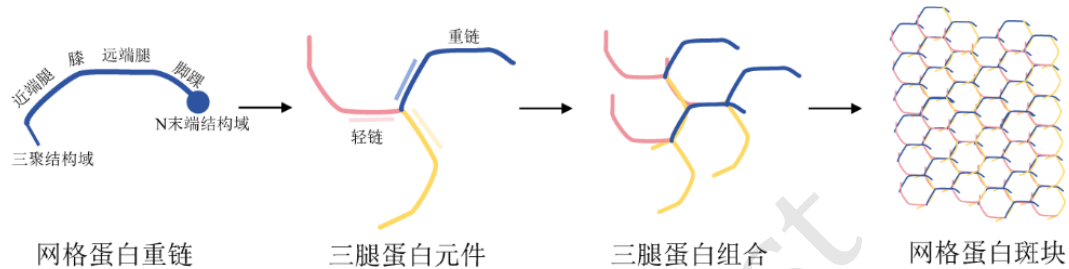


Fig. 1 The structure of clathrin plaques

图1 网格蛋白斑块结构

网格蛋白重链蛋白结构由三聚结构域、近端腿、膝、远端腿、脚踝、N末端结构域组成, 3条网格蛋白重链和3条轻链组成斑块的功能性元件——三腿蛋白, 以三腿蛋白为骨架组装成网格蛋白斑块的蜂窝状晶格结构。在细胞中网格蛋白斑块的形态并非六边形晶格的紧密阵列, 还包含许多无序和松散连接。

3 调控网格蛋白斑块动态的因素

3.1 膜特性对网格蛋白斑块的影响

膜张力是影响细胞膜上网格蛋白斑块产生的因素之一。酵母细胞内具有高膨胀压力, 网格蛋白在这种环境下必须先组装为平坦的斑块再由肌动蛋白、交联蛋白等参与形态的弯曲来实现 CME^[41]。在哺乳动物细胞中, 膜张力的增加会影响已存在的网格蛋白结构成熟的能力, 如延长网格蛋白斑块寿命、抑制斑块的弯曲^[4]以及改变网格包被结构的大小^[42]。胆固醇与多不饱和脂肪酸在膜脂质微域中的动态分布对网格蛋白斑块具有调控作用。胆固醇的缺乏会增加膜张力、降低蛋白流动性, 胆固醇含量的降低会导致长寿命网格蛋白斑块的堆积, 斑块趋于稳定但功能受限, 而多不饱和脂类的富集则增强膜的流动性, 提高 CME 效率^[43]。

不同细胞中网格蛋白斑块的形态和寿命存在异质性, 网格蛋白斑块动态变化适应不同细胞及其所处环境的特性。斑块动力学受到局部生理环境的调节, 当给培养的内皮细胞施加生理水平的流体剪切应力, 斑块和囊泡的形成都增加, 但曲率起始延迟, 对应网格蛋白斑块从平坦到弯曲的转变^[44]。也有一些研究者认为, 网格蛋白斑块是为增加底物硬度的功能而组装, 细胞黏附到刚硬的基质上会促进网格蛋白斑块的形成, 基质越硬, 细胞膜贴壁面聚集的斑块就越多^[19]。网格蛋白斑块有时与细胞黏附结构重叠, 重叠区的网格蛋白斑块寿命往往更长^[37], 使黏附蛋白区域的网格蛋白斑块产生曲率

可能需要额外的辅助因素。

细胞膜上 G 蛋白偶联受体 GPCRs 招募的增加被证明能够延长网格蛋白斑块的寿命^[20, 45], 而低密度脂蛋白受体 LDLR 通过其特异性衔接蛋白 Dab2 和 ARH 与网格蛋白斑块相互作用, 对网格蛋白斑块的大小和寿命产生影响^[46]。

3.2 整合素对网格蛋白斑块的影响

整合素通过其胞外结构域结合细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 配体, 并通过胞内尾部与多种支架蛋白相互作用, 将基于整合素的黏附结构锚定至细胞骨架, 同时将黏附结构转化为重要的信号传导平台 (图 2, 左图)。尽管整合素调控网格蛋白斑块形成的分子机制尚未完全阐明, 但其在斑块生长和动态转化中的核心作用已得到明确验证。整合素 $\alpha\beta5$ 被证实是斑块形成的关键驱动因子, 纤维连接蛋白 (fibronectin, FN) 及其受体整合素 $\alpha\beta1$ 通过拮抗 $\alpha\beta5$ 抑制斑块的生成^[47]。整合素 $\alpha\beta5$ 定位于典型整合素黏附结构: 黏着斑 (focal adhesions, FAs) 和非典型的黏附结构: 网状黏附 (reticular adhesions, RAs) 以及网格蛋白斑块等结构中。FAs 富含 paxillin 等黏着斑标志蛋白, RAs 含有 stonin1 标志性蛋白且局部与网格蛋白斑块组分重叠^[48]。网格蛋白斑块可能是 RA 组装的前体结构: RA 的初始稳定依赖于斑块的存在, 随后 RA 再生长扩展至无网格蛋白覆盖的区域^[49]。网格蛋白斑块在低 FN 分泌细胞 (如 U2OS、HeLa、MCF7 细胞) 的 RAs 黏附结构中呈现动态更替, 高 FN 分泌细胞 (如 HDF、Caco-2 细胞) 仅在小范围

低 FN 区域出现点状斑块和 RAs 的复合结构。在 $\alpha\text{v}\beta 5$ 整合素这一黏附结构中稳定存在的支架上, 典型与非典型黏附结构的动态转化可通过选择性交换组分实现: 在有丝分裂过程中, paxillin 逐渐从整合素支架上解离, 同时 stonin1 和 clathrin 被募集, 形成 RAs 和斑块; 在有丝分裂后子细胞的黏附重建过程中, RAs 和斑块的整合素支架可重新招募 paxillin, 转化为新生 FAs^[50-51]。

整合素 $\alpha\text{v}\beta 5$ 通过招募不同效应蛋白, 如胞吞或黏附相关因子, 协调网格蛋白斑块的分布, 实现细胞黏附状态的精准调控, 灵活适应细胞迁移、分裂等生理需求。

3.3 肌动蛋白丝网络对网格蛋白斑块的影响

肌动蛋白丝网络可以通过推动网格蛋白斑块边缘使其内陷 (图 2, 右图), 这种装配过程优先发生在停滞的 CME 位点。与质膜上从头生成的 CCP 不同, 网格蛋白斑块处的 CCP 成熟需要神经 Wiskott-Aldrich 综合征蛋白 (neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein, N-WASP) 和肌动蛋白相关蛋白 2/3 (actin related protein 2/3, Arp2/3) 复合体介导的分支肌动蛋白聚合。在网格蛋白斑块中, 动力蛋白 2 (dynamins-related protein 2, DNM2) 招募 N-WASP^[52], 后者激活 Arp2/3 复合体启动新的肌动蛋白丝生长, 以驱动膜重塑, 并协助 Epsin 蛋白的定位^[23]。这些因子被招募到网格蛋白斑块 CME 位点的一侧, 刺激肌动蛋白在小窝生成处不对称地聚合, 协助将囊泡拉入细胞^[53]。

在肌节连接点中, 网格蛋白斑块与肌动蛋白及中间丝共同构成力学传导微域, 连接肌纤维膜与肌节。分支肌动蛋白网络在网格蛋白斑块周围聚集形成巢状结构, 增强斑块的稳定性。机械拉伸实验显示, 当外力增加时, 斑块面积扩大并且与肌动蛋白的结合增强^[21]。在稳定黏附状态下, 斑块周围的肌动蛋白网络通过亨廷顿蛋白相互作用蛋白 1 相关蛋白 (Huntingtin-interacting protein 1-related protein, Hip1R) 与网格蛋白轻链结合, 抑制 CCPs 的形成, 优先维持斑块在肌节连接点中的力学锚定功能, Hip1R 的敲低会导致肌动蛋白在斑块上过度积累, 胞吞活性异常升高^[54]。肌动蛋白稳定性受损会导致斑块解体, 肌节连接点功能丧失。

肌动蛋白丝网络通过物理锚定、动态重塑和力学信号转导, 多维调控网格蛋白斑块的组装和稳定性。尽管网格蛋白-肌动蛋白协同过程中的受力和调控机制尚不完全清楚, 但这一相互作用无疑对网

格蛋白斑块的动态进展与功能起着关键作用^[54-55]。

4 网格蛋白斑块功能多样性

4.1 网格蛋白斑块参与胞吞作用

CME 是细胞从质膜上摄取大分子物质的主要途径, 参与突触小泡循环、发育信号接收和免疫反应等基本生理过程^[56-57], 控制着细胞的营养、黏附、迁移和信号转导等重要功能。CME 进程大致可分为启动、稳定、成熟、脱离质膜和解除包被 5 个阶段, 由衔接蛋白和众多胞吞辅助蛋白协助参与完成^[58]。

CCSs 如何在质膜上产生膜曲率是一个关键的研究问题。由网格蛋白斑块生成 CCPs 的现象, 为理解膜曲率的生成机制以及网格蛋白组装如何适应膜曲率变化提供了重要线索。研究人员提出了两种主要的 CME 模型: 恒定面积模型和恒定曲率模型。恒定面积模型认为, 网格蛋白首先在细胞膜上组装成平坦的网格蛋白斑块, 然后逐渐弯曲成囊泡形状, 直到完成胞吞作用。然而, 这一过程需要大量能量, 并涉及蛋白质相互作用位点的破坏和重建。恒定曲率模型则认为, 网格蛋白从一开始就以囊泡形状组装, 并在此基础上不断生长, 直到完成胞吞作用。这两种模型在实验数据中都有支持, 它们可能分别代表了囊泡形成的两种极端路径^[59]。研究还表明, 不同寿命的 CCSs 可能遵循不同的机制: 短寿命的 CCSs 更倾向于恒定曲率模型, 而长寿命的 CCSs 更倾向于恒定面积模型。此外, 不同细胞类型可能偏好不同的机制, 囊泡的形成可能包含恒定面积和恒定曲率的动态平衡。Nawara 等^[1]通过实时成像技术进一步揭示了曲率形成的多样性, 支持囊泡可以通过多种路径形成, 包括网格蛋白斑块从平坦到弯曲的转变。另有研究人员认为, 网格蛋白斑块是 CME 过程的一种能量储存中间态, 通过释放平坦力驱动囊泡曲率形成^[4]。

网格蛋白斑块的形成不仅依赖网格蛋白的自组装, 肌动蛋白和微管也在这一过程中发挥着重要作用。我们可以将网格蛋白斑块看作具有胞吞活性的动态肌动蛋白丝位点^[21], 在“边缘推动”模型中, 研究人员提出分支肌动蛋白聚合通过推动网格蛋白斑块边界来促使斑块内陷。在某些情况下, 这些分支肌动蛋白网络起源于微管尖端, 向球形和平坦的各种形态 CCSs 延伸^[23, 60]。

脱壳伴侣蛋白依赖性的蛋白交换被认为有助于从纯六边形网格蛋白晶格到五边形的过渡, 如曲率

相关的胞吞辅助蛋白 HSC70/GAK/auxilin^[61]。当体内细胞 ATP 耗尽时,三腿蛋白的动态交换受到抑制。其他胞吞辅助蛋白如 Epsin、CALM 和 AP180 的无序 C 末端结构域^[62-63]可以使膜弯曲,尤其是集中在网格蛋白斑块上的 Epsin^[18]。CALM 簇会局部增加网格蛋白斑块的应力变化,最终导致斑块边缘的破裂,进而促进网格蛋白斑块上 CCPs 的组装^[64]。包括 AP-2 和 Epsin 等胞吞蛋白随 CME 进程在网格蛋白斑块不同区域的再分配,暗示网格蛋白斑块上或许存在衔接蛋白和关键 EAPs 的 CME 检验点^[65-66]。

表达外显子 31 的网格蛋白重链组成的三腿蛋白倾向平面聚合,有助于低曲率斑块的形成,由重链三聚结构域组成的三腿蛋白顶端角的改变可以驱动网格蛋白斑块从平坦到弯曲的转变^[67],而重链 N 末端等结构域与衔接蛋白和 EAPs 协同作用,共同产生膜的曲率^[67-69]。网格蛋白轻链在质膜上组装网格蛋白斑块,有研究人员提出其特定构象转换也可调节斑块曲率。随着网格蛋白斑块弯曲为囊泡,轻链 N 端会重新定位,远离三腿蛋白的顶点和质膜,向细胞质深处移动,使用化学手段阻止这种构象转换会增加斑块尺寸并抑制胞吞作用^[70]。另外,网格蛋白斑块的动态可能受到 HIP、HIP1R 等胞吞辅助蛋白的结合和磷酸化^[71]、泛素化修饰的影响,如非泛素化的 μ -阿片神经肽受体抑制斑块向 CCP 的转化^[72],大型货物和形状不规则的货物内化导致大面积、长寿命的斑块结构^[1, 65]。

Mund 等^[5]使用超分辨率显微镜进一步可视化了 CCSs 的形态并进行定量分析,发现网格蛋白斑块的表面积和曲率随着胞吞的进行协同增加,且曲率增加的速度逐渐减慢,提出了整合曲率与面积动态平衡的合作曲率模型 (cooperative curvature model, CoopCM)。CoopCM 假设斑块的净面积增长通过三腿蛋白加入斑块边缘的可用结合位点实现,曲率增加的速度与曲率本身呈非线性关系表明三腿蛋白之间的相互作用是斑块曲率生成的关键。但网格蛋白斑块的发展在胞吞过程中并不是单向的,简化的模型忽略了其他可能对网格蛋白斑块产生影响的 EAPs 如屏障相关蛋白 (Bin-Amphiphysin-Rvs, BAR),并忽略了可能由衔接蛋白的解离和去包装因子如 Auxilin 介导的网格蛋白解聚^[73]。总的来说,现有研究表明网格蛋白斑块在胞吞过程中的动态并非遵循单一发展模式,其动态组装和曲率形成具有多样性和异质性,网格蛋白

斑块在 CME 中的调控机制仍需进一步探明。

许多病毒 (如冠状病毒、流感病毒) 都利用 CME 途径进入宿主细胞,网格蛋白斑块可能作为病毒入侵宿主细胞的“热点”部位。三角冠状病毒 HKU11、HKU13 等通过 CME 依赖的 Rab5/Rab7 通路进入禽类细胞^[74]。犬细小病毒衣壳与细胞表面的转铁蛋白受体结合通过 CME 入胞。丙型肝炎病毒进入肝细胞和从感染细胞中排出都需要网格蛋白参与。对牛呼吸道合胞病毒的研究发现热休克蛋白家族 A 成员 4 (heat shock protein family A (Hsp70) member 4, HSPA4) 可以通过激活 PI3K-Akt 信号通路促进网格蛋白重链蛋白表达,并能增加热休克同源蛋白 70 (heat shock cognate protein 70, HSC70) 的 ATP 酶活性来提高 CME 的效率促进病毒入胞^[75]。猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 的宿主细胞结合伴侣蛋白核糖核酸酶 K (ribonuclease K, RNASEK) 通过增加 PEDV 病毒粒子、网格蛋白和表皮生长因子受体通路底物 15 蛋白 (epidermal growth factor receptor pathway substrate 15, EPS15) 之间的相互作用来促进病毒入胞^[76]。CME 也是神经元内淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 的处理和病理性 tau 蛋白临近细胞间传播的关键步骤。CME 相关蛋白 (如 PICALM、BIN1) 的基因突变与阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的风险显著相关,网格蛋白斑块异常导致的 CME 紊乱可能促使 APP 的异常切割和 β 样淀粉蛋白的累积^[77]。研究靶向网格蛋白斑块及其他 CME 关键分子的药物为抗病毒感染和 AD 等疾病治疗提供了新的策略,但如何选择性地调节 CME 以平衡正常生理功能仍然具挑战性。

4.2 网格蛋白斑块在细胞黏附中的作用

细胞黏附复合物通过质膜双向传递信号,调节细胞的迁移、分化和生长。网格蛋白斑块在细胞黏附过程中发挥重要作用,能够调节细胞黏附和质膜上的持续信号^[78]。

网格蛋白斑块在骨骼肌肌管和成骨细胞中大量存在,被认为有助于细胞与细胞外基质的黏附。在吞噬细胞和肌肉细胞肌节部位有观察到类似的整合素-网格蛋白结构并作为黏附机制的一部分^[54, 79]。在破骨细胞中,网格蛋白斑块分布在足突带和封闭区周围,与其协同作用,参与细胞黏附和机械感应^[80]。在肌管中,网格蛋白斑块与其周围的分支肌动蛋白密切相互作用并锚定中间丝 (图 2, 下

图), 斑块作为肌节连接点的组成部分, 连接肌纤维膜和肌节, 将收缩力通过整合素传递到细胞外基质^[54-55]。

整合素 $\alpha V\beta 5$ 在网格蛋白斑块中的存在对于细胞黏附、玻连蛋白的黏附以及细胞扩散和增殖至关重要^[81]。研究表明, $\alpha V\beta 5$ 的敲低会导致网格蛋白斑块的丢失, 而其过度表达则有助于 CCSs 的稳定性^[19]。 $\alpha V\beta 5$ 与其配体玻连蛋白的相互作用及其随后的聚集是通过衔接蛋白介导的, 这对大多数 CCSs 的组装必不可少^[48], 玻连蛋白合成的增加和 $\beta 5$ 整合素水平的升高与多种癌症的进展相关, 包括结肠直肠癌、脑癌、乳腺癌和非小细胞肺癌。已有研究发现, 结直肠癌的转移潜力与异常的网格蛋白斑块分布有关, 转移性细胞中网格蛋白斑块的比例显著高于低转移能力的细胞, 暗示网格蛋白斑块在癌症转移中可能发挥重要作用^[82]。

一些细菌如李斯特菌、耶尔森菌和金黄色葡萄球菌, 通过结合细胞膜表面特定受体, 激活肌动蛋白的聚集, 导致膜延伸形成包裹病原体的囊泡来入侵宿主细胞, 这种“拉链式”病原体入侵依赖宿主细胞网格蛋白斑块的协助。斑块还聚集在像肠致病性大肠杆菌这种黏附型细菌的基座尖端, 斑块蛋白的缺失会影响病原体的致病能力, 尽管细菌募集网格蛋白及相关辅助因子的确切机制以及这些网格蛋白斑块在基座中的功能尚不完全清楚, 但网格蛋白斑块和与其关联的肌动蛋白丝可以促进这些胞外细菌在细胞表面的黏附^[83-84]。

4.3 网格蛋白斑块在信号转导中的功能

网格蛋白斑块不仅是胞吞作用的参与者, 也作为信号转导的核心平台, 调节细胞的生长、迁移等重要生理过程。网格蛋白斑块作为参与细胞增殖、迁移、分化、凋亡等多种生物学过程的溶血磷脂酸受体 1 (lysophosphatidic acid receptor, LPA1) 的信号转导中枢, 通过控制受体胞吞调节信号强度和信号持续时间, 参与 LPA 依赖的癌细胞趋化性, 从而影响癌症的转移和扩散^[21]。

网格蛋白斑块是上皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 的信号平台^[78]。最近, 研究人员还发现 EGF 刺激会使 EGFR、成纤维细胞生长因子受体 (fibroblast growth factor receptor, FGFR) 和低密度脂蛋白受体 (low density lipoprotein receptor, LDLR), 以及 Casitas B 细胞淋巴瘤蛋白 (Casitas B-lineage lymphoma, Cbl)、生长因子受体结合蛋白 2

(growth factor receptor-bound protein 2, Grb2) 和 DNM2 等蛋白在网格蛋白斑块处共聚集, 激活下游信号通路实现信号转导 (图 2, 上图)^[24]。网格蛋白斑块对受体蛋白的共聚集可以导致细胞骨架的重塑, 如肌动蛋白纤维的形成和细胞黏附作用的改变, 从而影响细胞形态和细胞迁移。DNM2 将肌动蛋白丝束聚集并稳定, 能够促进侵袭性突起的形成^[52]。在痘苗病毒出胞过程中, Grb2 能够通过与交叉蛋白和其他肌动蛋白结合蛋白互作, 参与网格蛋白的募集和肌动蛋白的聚合, 从而促进细胞运动和病毒传播^[85]。网格蛋白还在 EGFR-VAV2-Rac1 介导的细胞运动信号通路中起着重要作用, EGFR 依赖性细胞迁移和 VAV2 依赖性 Rac1 持续激活都需要网格蛋白, 这一内吞体信号通路可能主要起到延长和维持信号转导的作用^[86]。另外, 过度活跃的受体酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinase, RTK) 信号和高底物硬度会诱导健康细胞向肿瘤起始细胞的转化, 这提高了异常网格蛋白斑块成为肿瘤发生的重要因素的可能^[87-88]。

YES 相关蛋白 (Yes-associated protein, YAP) 和具有 PDZ 结合基序的转录共激活因子 (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif, TAZ) 是 Hippo 信号通路的核心转录因子, 调控细胞增殖、存活和机械转导, 它们在多种癌症中被激活, 与肿瘤发生和侵袭密切相关。当 Hippo 通路失活时, YAP/TAZ 进入细胞核, 与转录增强结构域 (transcriptional enhanced associate domain, TEAD) 蛋白结合并激活下游基因表达, 促进细胞增殖和存活^[89]。网格蛋白斑块感知 ECM 刚度, 传递机械信号。在机械刺激下, YAP/TAZ 被招募至斑块周围的肌动蛋白丝附近, 并与 DNM2 直接相互作用, 斑块中的整合素激活类固醇受体辅激活因子 (Steroid receptor coactivator, SRC) 和 Ras 同源基因家族蛋白 A (Ras homolog family member A, RhoA) 信号, 抑制 Hippo 通路核心激酶大肿瘤抑制因子 1/2 (large tumor suppressor 1/2, LATS1/2) 的磷酸化活性, 解除对 YAP/TAZ 的抑制, 促进其核定位及转录活性^[55]。在癌症中, 网格蛋白斑块功能异常可能导致 YAP/TAZ 持续激活, 促进肿瘤细胞增殖和侵袭。此外, YAP/TAZ 通过 TEAD 途径可能上调整合素 $\alpha v\beta 5$ 和网格蛋白斑块相关蛋白的表达, 进一步增强细胞黏附和机械转导能力, 加剧肿瘤进展。

网格蛋白斑块通过胞吞作用、机械传感和信号

转导等多种机制,调控肿瘤相关信号分子活性、细胞外基质动态以及肿瘤微环境的变化,是肿瘤发生发展中的重要调控因子,未来研究有待进一步揭示网格蛋白斑块在癌症治疗中的潜在应用价值。

4.4 网格蛋白斑块与细胞骨架的协同作用

网格蛋白斑块与细胞骨架密切相关,在肌肉的结构维持和力学传导中发挥关键功能。在骨骼肌中,斑块主要分布于肌纤维膜的肌节连接点区域(图2,下图)。肌节连接点是骨骼肌细胞中特化的亚膜结构,位于肌纤维膜的下方横向环绕肌纤维,是骨骼肌力学传导的核心枢纽,其结构完整性依赖网格蛋白斑块与细胞骨架的协同作用。在肌节连接点中,网格蛋白斑块与肌动蛋白及中间丝共同构成力学传导微域,连接肌纤维膜与肌节。

由 Arp2/3 复合体介导的分支肌动蛋白网络和纵向排列的肌动蛋白应力纤维通过 α -辅肌动蛋白与斑块交联,将肌节收缩产生的力传递至斑块,进而通过斑块上的整合素将收缩力传递至细胞外基质。斑块功能缺陷会导致 α -辅肌动蛋白聚集成团,分支肌动蛋白形态和应力纤维排列紊乱,中间丝在胞质内的异常聚集缠结,即破坏了肌节连接点的结构完整性,导致肌节-肌纤维膜连接失效和收缩力传导障碍。肌节连接点通过 α -辅肌动蛋白和中间丝连接肌节和膜下肌动蛋白网络,维持肌纤维的横向稳定性。

网格蛋白斑块-肌动蛋白形成的三维网络直接锚定中间丝,中间丝从斑块延伸至肌节 Z 带,形成跨膜力学传导路径。在中间丝敲除小鼠的肌管中,网格蛋白斑块的尺寸减小而 CCPs 增多,表明中间丝对斑块的稳定性具有调节作用。中心核肌病 (centronuclear myopathy, CNM) 患者肌肉组织的 Z 带扩张、中间丝缠结,肌纤维膜与肌节的力学连接失效,导致患者肌无力、肌萎缩。DNM2 是网格蛋白斑块的关键组分,通过调控分支肌动蛋白的聚合重塑来维持斑块的结构完整性,在 DNM2 功能缺陷小鼠的肌肉中,网格蛋白斑块和周围肌动蛋白网络的连接断裂,中间丝网络在肌纤维膜表面呈放射状紊乱,与 CNM 患者的肌肉组织病理特征一致。

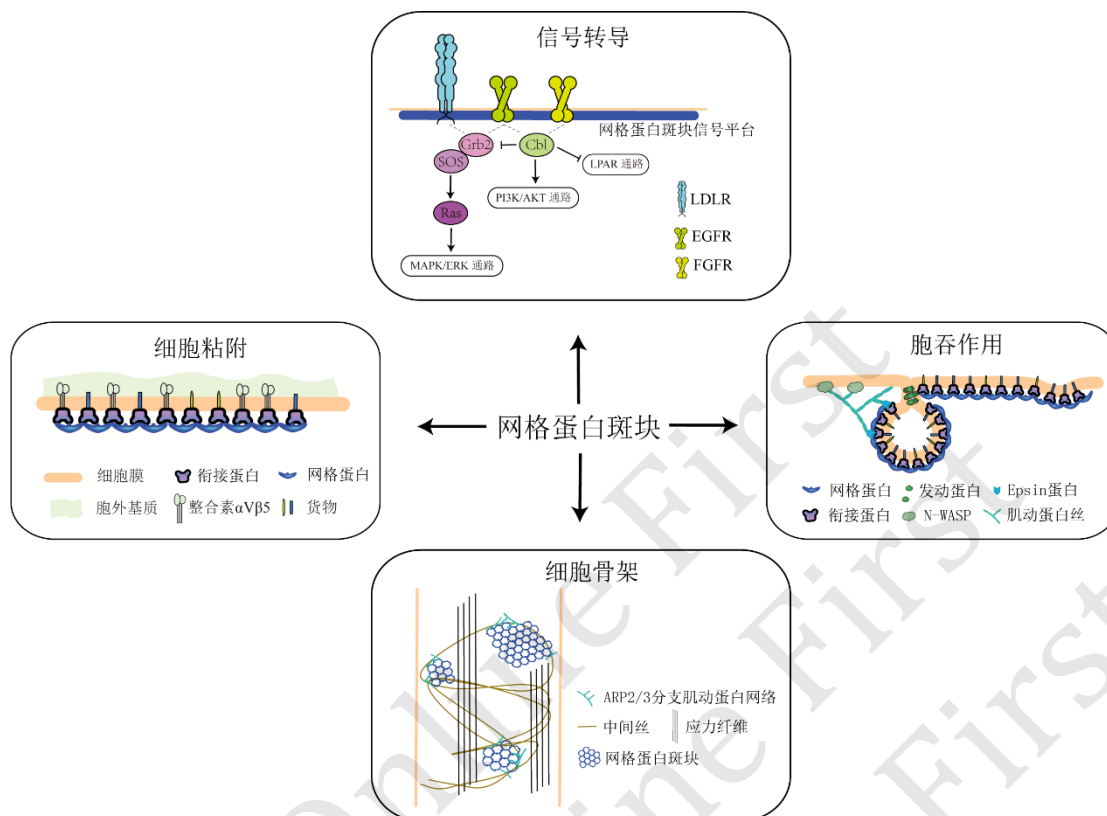
解析斑块与细胞骨架对肌肉结构维持和力学传导的协同功能,对研究 CNM 等神经肌肉疾病的治疗策略具有重要意义,未来研究可进一步探索斑块与细胞骨架的交互作用,探究其在力学稳态、肌肉生长和修复中的潜在调控功能。

5 总结与展望

网格蛋白斑块作为重要的动态 CCSs 结构,其生长和转化受到多种因素的调控,在细胞胞吞、细胞黏附和信号转导等关键生理过程中发挥着重要作用。不同细胞类型对网格蛋白斑块的需求不同,斑块功能的异质性源于细胞类型特异性的机械环境、胞吞辅助蛋白的差异表达和信号通路的特异性激活等。人类胚胎干细胞和神经细胞中网格蛋白寿命较短,倾向于形成小而弯曲的结构,以满足细胞频繁的胞吞货物运输;成纤维细胞则更多形成大而扁平的斑块,作为细胞黏附和信号平台;在癌细胞中,斑块参与肿瘤相关信号通路的调控,并通过局部力传递促使细胞迁移;在有丝分裂细胞中,斑块作为非典型黏附结构维持细胞锚定;在骨骼肌中,斑块则主要负责锚定肌动蛋白和中间丝,维持肌纤维收缩力。AP-2 的高表达与成纤维细胞中更长的网格蛋白寿命和更大的囊泡相关,不同细胞类型中特定衔接蛋白(如 AP2、FCHO1/2、Epsin 等)和辅助蛋白(如 CALM、Hip1R)表达水平的不同,通过调控网格蛋白的组装、膜曲率生成和货物分选等因素影响斑块动态进展。

目前针对网格蛋白斑块的特异性调控策略包括通过调节细胞机械环境、整合素活性和细胞骨架等来影响斑块的功能。低渗溶液或增加膜张力可延长斑块寿命;软基质抑制斑块形成,而硬基质则促进其组装;抑制 $\alpha v \beta 5$ 整合素的抗体或小分子阻断剂可抑制斑块形成;肌动蛋白聚合抑制剂如细胞松弛素 D 通过破坏斑块相关肌动网络抑制斑块功能。未来针对网格蛋白斑块的研究可以通过精准靶向斑组分进行特异性调控,例如靶向网格蛋白重链的可变剪接来调控斑块的组装,开发新型材料实时调节局部膜张力或基质硬度以定向调控斑块的功能。

多项研究已经证实,网格蛋白斑块可以平坦生长或在质膜处弯曲,显示了网格蛋白斑块结构的可塑性,但其形态变化的调控机制尚不完全明了。细胞骨架的募集、网格蛋白构象变化和蛋白质重排可能是这一过程的关键因素。货物、膜张力、膜曲率、脂质成分、胞外基质和细胞类型特异性表达,使得斑块的调控机制呈现出灵活性和复杂性。网格蛋白斑块作为非典型 CCSs 的功能多样性远超传统认知,其作为信号整合枢纽的角色在近年研究中尤为突出。尽管目前已经揭示了网格蛋白斑块的结构和功能多样性,但导致这种动态可塑性的遗传因素

**Fig. 2 The functional diversity of clathrin plaques****图2 网格蛋白斑块功能多样性**

网格蛋白斑块功能的多样性包括其在胞吞作用、信号转导、细胞黏附和构成细胞骨架中扮演重要角色。右图: 在细胞膜的货物胞吞位点上, 网格蛋白斑块从其边缘出芽, 在胞吞衔接蛋白和辅助蛋白的协助下形成网格蛋白包被囊泡, 分支肌动蛋白直接嵌入斑块边缘, 推动局部膜内陷。上图: 网格蛋白斑块能够通过聚集受体和信号分子促进或抑制受体信号通路的激活, 在EGF刺激下, 网格蛋白斑块作为信号传导平台促使EGFR、FGFR和LDLR共聚集, 这些受体与Cbl、Grb2等蛋白结合; Grb2结合SOS蛋白进而激活Ras蛋白, 促使MAPK/ERK通路的激活; Cbl可以与多种RTKs和细胞因子受体结合, 介导其信号通路的负调控, 还能够促进PI3K1的募集和下游PI3K/Akt信号的转导, 参与细胞增殖和迁移。左图: 作为细胞黏附机制的一部分, 整合素 $\alpha\text{v}\beta 5$ 定位的网格蛋白斑块连接胞外基质和细胞骨架。下图: 在骨骼肌中, 网格蛋白斑块是肌节的连接组分, 作为肌动蛋白支点将中间丝锚定在细胞膜上。

尚未完全明确, 细胞如何组织调控网格蛋白斑块参与这些或与胞吞作用串联的细胞生物过程仍不清楚。未来研究应重点关注网格蛋白斑块功能异质性及其动态变化机制, 聚焦病理模型中的斑块特异性调控及潜在治疗靶点。进一步研究网格蛋白斑块的调控机制将有助于揭示细胞胞吞、黏附、迁移、信号转导等生物功能的基本规律, 并为神经肌肉疾病、癌症和病原体感染等疾病治疗策略及新型生物材料的开发提供新的思路。

参考文献

- [1] Nawara T J, Williams Y D, Rao T C, *et al.* Imaging vesicle formation dynamics supports the flexible model of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Commun*, 2022, **13**: 1732
- [2] Jin M, Iwamoto Y, Shirazinejad C, *et al.* Intersectin1 promotes

clathrin-mediated endocytosis by organizing and stabilizing endocytic protein interaction networks. *bioRxiv*, 2024: 2024.04.22.590579

- [3] Vassilopoulos S, Montagnac G. Clathrin assemblies at a glance. *J Cell Sci*, 2024, **137**(8): jcs261674
- [4] Sochacki K A, Heine B L, Haber G J, *et al.* The structure and spontaneous curvature of clathrin lattices at the plasma membrane. *Dev Cell*, 2021, **56**(8): 1131-1146.e3
- [5] Mund M, Tschanz A, Wu Y L, *et al.* Clathrin coats partially preassemble and subsequently bend during endocytosis. *J Cell Biol*, 2023, **222**(3): e202206038
- [6] Todaro G J, Green H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol*, 1963, **17**(2): 299-313
- [7] Pearse B M. Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, **73**(4): 1255-1259

- [8] Heuser J. Three-dimensional visualization of coated vesicle formation in fibroblasts. *J Cell Biol*, 1980, **84**(3): 560-583
- [9] Gaidarov I, Santini F, Warren R A, *et al.* Spatial control of coated-pit dynamics in living cells. *Nat Cell Biol*, 1999, **1**(1): 1-7
- [10] Jin A J, Nossal R. Topological mechanisms involved in the formation of clathrin-coated vesicles. *Biophys J*, 1993, **65**(4): 1523-1537
- [11] Saffarian S, Cocucci E, Kirchhausen T. Distinct dynamics of endocytic clathrin-coated pits and coated plaques. *PLoS Biol*, 2009, **7**(9): e1000191
- [12] Taylor M J, Perrais D, Merrifield C J. A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biol*, 2011, **9**(3): e1000604
- [13] Cocucci E, Aguet F, Boulant S, *et al.* The first five seconds in the life of a clathrin-coated pit. *Cell*, 2012, **150**(3): 495-507
- [14] Scott B L, Sochacki K A, Low-Nam S T, *et al.* Membrane bending occurs at all stages of clathrin-coat assembly and defines endocytic dynamics. *Nat Commun*, 2018, **9**(1): 419
- [15] Picco A, Kaksonen M. Quantitative imaging of clathrin-mediated endocytosis. *Curr Opin Cell Biol*, 2018, **53**: 105-110
- [16] Aguet F, Cocucci E. Measuring clathrin-coated vesicle formation with single-molecule resolution. *Methods Mol Biol*, 2018, **1847**: 197-216
- [17] Avinoam O, Schorb M, Beese C J, *et al.* Endocytic sites mature by continuous bending and remodeling of the clathrin coat. *Science*, 2015, **348**(6241): 1369-1372
- [18] Sochacki K A, Dickey A M, Strub M P, *et al.* Endocytic proteins are partitioned at the edge of the clathrin lattice in mammalian cells. *Nat Cell Biol*, 2017, **19**(4): 352-361
- [19] Baschieri F, Dayot S, Elkhatib N, *et al.* Frustrated endocytosis controls contractility-independent mechanotransduction at clathrin-coated structures. *Nat Commun*, 2018, **9**(1): 3825
- [20] Lampe M, Pierre F, Al-Sabah S, *et al.* Dual single-scission event analysis of constitutive transferrin receptor (TfR) endocytosis and ligand-triggered β 2-adrenergic receptor (β 2AR) or Mu-opioid receptor (MOR) endocytosis. *Mol Biol Cell*, 2014, **25**(19): 3070-3080
- [21] Leyton-Puig D, Isogai T, Argenzio E, *et al.* Flat clathrin lattices are dynamic actin-controlled hubs for clathrin-mediated endocytosis and signalling of specific receptors. *Nat Commun*, 2017, **8**: 16068
- [22] Yu Y, Yoshimura S H. Investigating the morphological dynamics of the plasma membrane by high-speed atomic force microscopy. *J Cell Sci*, 2021, **134**(17): jcs243584
- [23] Yang C, Colosi P, Hugelier S, *et al.* Actin polymerization promotes invagination of flat clathrin-coated lattices in mammalian cells by pushing at lattice edges. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 6127
- [24] Alfonso-Méndez M A, Strub M P, Taraska J W. Crosstalk of growth factor receptors at plasma membrane clathrin-coated sites. *bioRxiv*, 2024: 2024.05.16.594559
- [25] Sun W W, Michalak D J, Sochacki K A, *et al.* Cryo-electron tomography pipeline for plasma membranes. *Nat Commun*, 2025, **16**: 855
- [26] Fujimoto L M, Roth R, Heuser J E, *et al.* Actin assembly plays a variable, but not obligatory role in receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *Traffic*, 2000, **1**(2): 161-171
- [27] Heuser J. Effects of cytoplasmic acidification on clathrin lattice morphology. *J Cell Biol*, 1989, **108**(2): 401-411
- [28] Sochacki K A, Taraska J W. From flat to curved clathrin: controlling a plastic ratchet. *Trends Cell Biol*, 2019, **29**(3): 241-256
- [29] Dannhauser P N, Platen M, Böning H, *et al.* Effect of clathrin light chains on the stiffness of clathrin lattices and membrane budding. *Traffic*, 2015, **16**(5): 519-533
- [30] Wakeham D E, Chen C Y, Greene B, *et al.* Clathrin self-assembly involves coordinated weak interactions favorable for cellular regulation. *EMBO J*, 2003, **22**(19): 4980-4990
- [31] Hinrichsen L, Meyerholz A, Groos S, *et al.* Bending a membrane: how clathrin affects budding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(23): 8715-8720
- [32] Smith S M, Smith C J. Capturing the mechanics of clathrin-mediated endocytosis. *Curr Opin Struct Biol*, 2022, **75**: 102427
- [33] Wei L, Guo X, Haimov E, *et al.* Clathrin mediates membrane fission and budding by constricting membrane pores. *Cell Discov*, 2024, **10**(1): 62
- [34] Halebian M, Morris K, Smith C. Structure and assembly of clathrin cages. *Subcell Biochem*, 2017, **83**: 551-567
- [35] Grove J, Metcalf D J, Knight A E, *et al.* Flat clathrin lattices: stable features of the plasma membrane. *Mol Biol Cell*, 2014, **25**(22): 3581-3594
- [36] Bucher D, Frey F, Sochacki K A, *et al.* Clathrin-adaptor ratio and membrane tension regulate the flat-to-curved transition of the clathrin coat during endocytosis. *Nat Commun*, 2018, **9**: 1109
- [37] Loerke D, Mettlen M, Yasar D, *et al.* Cargo and dynamin regulate clathrin-coated pit maturation. *PLoS Biol*, 2009, **7**(3): e57
- [38] Batchelder E M, Yasar D. Differential requirements for clathrin-dependent endocytosis at sites of cell-substrate adhesion. *Mol Biol Cell*, 2010, **21**(17): 3070-3079
- [39] Elkhatib N, Breteau E, Baschieri F, *et al.* Tubular clathrin/AP-2 lattices pinch collagen fibers to support 3D cell migration. *Science*, 2017, **356**(6343): eaal4713
- [40] Baschieri F, Illand A, Barbazan J, *et al.* Fibroblasts generate topographical cues that steer cancer cell migration. *Sci Adv*, 2023, **9**(33): eade2120
- [41] Hill J M, Cai S, Carver M D, *et al.* A role for cross-linking proteins in actin filament network organization and force generation. *bioRxiv*, 2024: 2024.04.19.590161
- [42] Akatay A A, Wu T, Djakbarova U, *et al.* Endocytosis at extremes: Formation and internalization of giant clathrin-coated pits under elevated membrane tension. *Front Mol Biosci*, 2022, **9**: 959737
- [43] Handlin L J, Dai G. Direct regulation of the voltage sensor of HCN channels by membrane lipid compartmentalization. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 6595
- [44] Nawara T J, Sztul E, Mattheyses A L. Fluidic shear stress alters clathrin dynamics and vesicle formation in endothelial cells. *bioRxiv*, 2024: 2024.01.02.572628

- [45] Puthenveedu M A, von Zastrow M. Cargo regulates clathrin-coated pit dynamics. *Cell*, 2006, **127**(1): 113-124
- [46] Mettlen M, Loerke D, Yasar D, *et al.* Cargo- and adaptor-specific mechanisms regulate clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol*, 2010, **188**(6): 919-933
- [47] Hakanpää L, Abouelezz A, Lenaerts A S, *et al.* Reticular adhesions are assembled at flat clathrin lattices and opposed by active integrin $\alpha 5 \beta 1$. *J Cell Biol*, 2023, **222**(8): e202303107
- [48] Zuidema A, Wang W, Kreft M, *et al.* Mechanisms of integrin $\alpha V \beta 5$ clustering in flat clathrin lattices. *J Cell Sci*, 2018, **131**(21): jcs221317
- [49] Lukas F, Duchmann M, Maritzen T. Focal adhesions, reticular adhesions, flat clathrin lattices: what divides them, what unites them. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2025, **328**(1): C288-C302
- [50] Lock J G, Jones M C, Askari J A, *et al.* Reticular adhesions are a distinct class of cell-matrix adhesions that mediate attachment during mitosis. *Nat Cell Biol*, 2018, **20**(11): 1290-1302
- [51] Lukas F, Matthaeus C, López-Hernández T, *et al.* Canonical and non-canonical integrin-based adhesions dynamically interconvert. *Nat Commun*, 2024, **15**(1): 2093
- [52] Lu Y, Walji T, Ravau B, *et al.* Spatiotemporal coordination of actin regulators generates invasive protrusions in cell-cell fusion. *Nat Cell Biol*, 2024, **26**(11): 1860-1877
- [53] Jin M, Shirazinejad C, Wang B, *et al.* Branched actin networks are organized for asymmetric force production during clathrin-mediated endocytosis in mammalian cells. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 3578
- [54] Vassilopoulos S, Gentil C, Lainé J, *et al.* Actin scaffolding by clathrin heavy chain is required for skeletal muscle sarcomere organization. *J Cell Biol*, 2014, **205**(3): 377-393
- [55] Franck A, Lainé J, Moulay G, *et al.* Clathrin plaques and associated actin anchor intermediate filaments in skeletal muscle. *Mol Biol Cell*, 2019, **30**(5): 579-590
- [56] Sorkina T, Bagalkot T, Cheng M H, *et al.* Monoamine transporter ubiquitination and inward-open conformation synergistically maximize transporter endocytosis. *Sci Adv*, 2024, **10**(47): eadq9793
- [57] Kvalvaag A, Valvo S, Céspedes P F, *et al.* Clathrin mediates both internalization and vesicular release of triggered T cell receptor at the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, **120**(6): e2211368120
- [58] Bhavé M, Mino R E, Wang X, *et al.* Functional characterization of 67 endocytic accessory proteins using multiparametric quantitative analysis of CCP dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, **117**(50): 31591-31602
- [59] Wang X, Berro J, Ma R. Vesiculation pathways in clathrin-mediated endocytosis. *bioRxiv*, 2024: 2024.08.13.607731
- [60] Ezratty E J, Bertaux C, Marcantonio E E, *et al.* Clathrin mediates integrin endocytosis for focal adhesion disassembly in migrating cells. *J Cell Biol*, 2009, **187**(5): 733-747
- [61] Wu X, Zhao X, Baylor L, *et al.* Clathrin exchange during clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol*, 2001, **155**(2): 291-300
- [62] Rosenthal J A, Chen H, Slepnev V I, *et al.* The epsins define a family of proteins that interact with components of the clathrin coat and contain a new protein module. *J Biol Chem*, 1999, **274**(48): 33959-33965
- [63] Busch D J, Houser J R, Hayden C C, *et al.* Intrinsically disordered proteins drive membrane curvature. *Nat Commun*, 2015, **6**: 7875
- [64] Willy N M, Ferguson J P, Akatay A, *et al.* *De novo* endocytic clathrin coats develop curvature at early stages of their formation. *Dev Cell*, 2021, **56**(22): 3146-3159.e5
- [65] Dambournet D, Sochacki K A, Cheng A T, *et al.* Genome-edited human stem cells expressing fluorescently labeled endocytic markers allow quantitative analysis of clathrin-mediated endocytosis during differentiation. *J Cell Biol*, 2018, **217**(9): 3301-3311
- [66] Mettlen M, Stoeber M, Loerke D, *et al.* Endocytic accessory proteins are functionally distinguished by their differential effects on the maturation of clathrin-coated pits. *Mol Biol Cell*, 2009, **20**(14): 3251-3260
- [67] Moulay G, Lainé J, Lemaître M, *et al.* Alternative splicing of clathrin heavy chain contributes to the switch from coated pits to plaques. *J Cell Biol*, 2020, **219**(9): e201912061
- [68] den Otter W K, Briels W J. The generation of curved clathrin coats from flat plaques. *Traffic*, 2011, **12**(10): 1407-1416
- [69] Giani M, den Otter W K, Briels W J. Early stages of clathrin aggregation at a membrane in coarse-grained simulations. *J Chem Phys*, 2017, **146**(15): 155102
- [70] Obashi K, Sochacki K A, Strub M P, *et al.* A conformational switch in clathrin light chain regulates lattice structure and endocytosis at the plasma membrane of mammalian cells. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 732
- [71] Bonazzi M, Vasudevan L, Mallet A, *et al.* Clathrin phosphorylation is required for actin recruitment at sites of bacterial adhesion and internalization. *J Cell Biol*, 2011, **195**(3): 525-536
- [72] Henry A G, Hislop J N, Grove J, *et al.* Regulation of endocytic clathrin dynamics by cargo ubiquitination. *Dev Cell*, 2012, **23**(3): 519-532
- [73] Frey F, Schwarz U S. Coat stiffening can explain invagination of clathrin-coated membranes. *Phys Rev E*, 2024, **110**(): 064403
- [74] Liang Q Z, Ji C M, Wang B, *et al.* Deltacoronavirus HKU11, HKU13, PDCoV (HKU15) and HKU17 spike pseudoviruses enter avian DF-1 cells via clathrin-mediated endocytosis in a Rab5-, Rab7- and pH-dependent manner. *Vet Res*, 2025, **56**(1): 15
- [75] Liu Y, Li Q, Shao S, *et al.* HSPA4 enhances BRSV entry via clathrin-mediated endocytosis through regulating the PI3K-Akt signaling pathway and ATPase activity of HSC70. *Viruses*, 2024, **16**(11): 1784
- [76] Qin W, Kong N, Xie S, *et al.* RNASEK interacting with PEDV structural proteins facilitates virus entry via clathrin-mediated endocytosis. *J Virol*, 2025, **99**(2): e0176024
- [77] Jaye S, Sandau U S, Saugstad J A. Clathrin mediated endocytosis in Alzheimer's disease: cell type specific involvement in amyloid

- beta pathology. *Front Aging Neurosci*, 2024, **16**: 1378576
- [78] Alfonzo-Méndez M A, Sochacki K A, Strub M P, *et al*. Dual clathrin and integrin signaling systems regulate growth factor receptor activation. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 905
- [79] Aggeler J, Werb Z. Initial events during phagocytosis by macrophages viewed from outside and inside the cell: membrane-particle interactions and clathrin. *J Cell Biol*, 1982, **94**(3): 613-623
- [80] Akisaka T, Yoshida A. Surface distribution of heterogenous clathrin assemblies in resorbing osteoclasts. *Exp Cell Res*, 2021, **399**(1): 112433
- [81] Zuidema A, Wang W, Kreft M, *et al*. Molecular determinants of $\alpha V\beta 5$ localization in flat clathrin lattices - role of $\alpha V\beta 5$ in cell adhesion and proliferation. *J Cell Sci*, 2022, **135**(11): jcs259465
- [82] Cresens C, Solís-Fernández G, Tiwari A, *et al*. Flat clathrin lattices are linked to metastatic potential in colorectal cancer. *iScience*, 2023, **26**(8): 107327
- [83] Kassa E G, Zlotkin-Rivkin E, Friedman G, *et al*. Enteropathogenic *Escherichia coli* remodels host endosomes to promote endocytic turnover and breakdown of surface polarity. *PLoS Pathog*, 2019, **15**(6): e1007851
- [84] Tapia R, Kralicek S E, Hecht G A. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) recruitment of PAR polarity protein atypical PKC ζ to pedestals and cell-cell contacts precedes disruption of tight junctions in intestinal epithelial cells. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(2): 527
- [85] Basant A, Way M. The relative binding position of Nck and Grb2 adaptors impacts actin-based motility of *Vaccinia* virus. *eLife*, 2022, **11**: e74655
- [86] Pinilla-Macua I, Surve S, Sorkin A. Cell migration signaling through the EGFR-VAV2-Rac1 pathway is sustained in endosomes. *J Cell Sci*, 2025, **138**(2): jcs263541
- [87] Panciera T, Citron A, Di Biagio D, *et al*. Reprogramming normal cells into tumour precursors requires ECM stiffness and oncogene-mediated changes of cell mechanical properties. *Nat Mater*, 2020, **19**(7): 797-806
- [88] Xu L, Guo J, Xie X, *et al*. GTPase GPN3 facilitates cell proliferation and migration in non-small cell lung cancer by impeding clathrin-mediated endocytosis of EGFR. *Cell Death Discov*, 2025, **11**(1): 38
- [89] Rausch V, Hansen C G. The hippo pathway, YAP/TAZ, and the plasma membrane. *Trends Cell Biol*, 2020, **30**(1): 32-48

The Functional Diversity and Regulatory Mechanism of Clathrin Plaques*

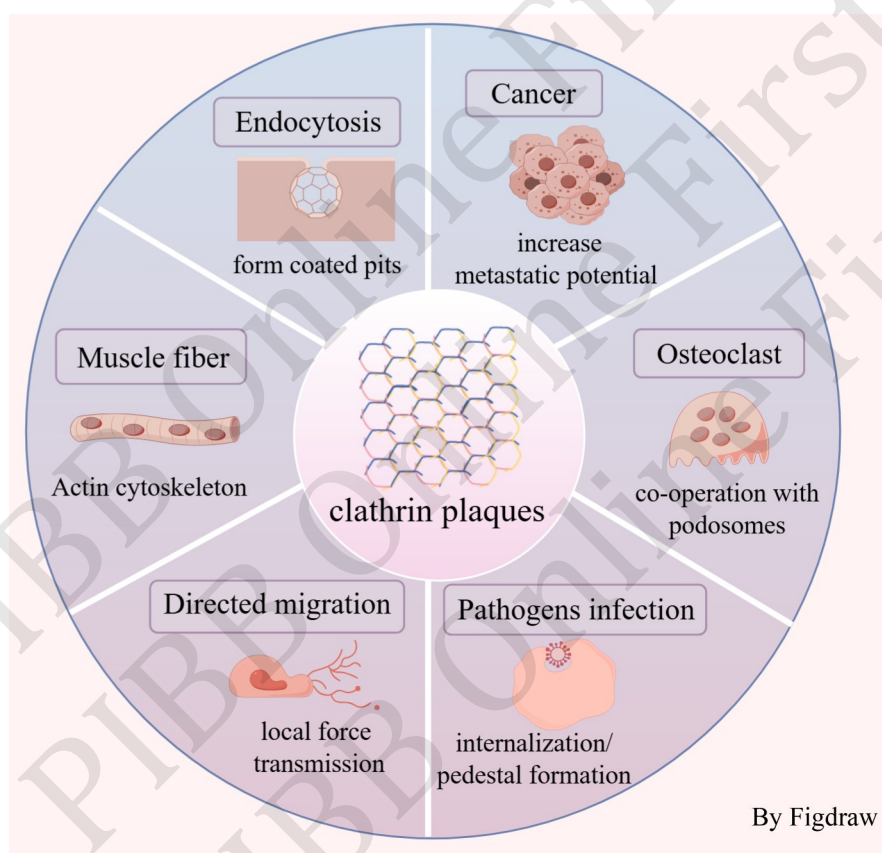
ZHAO Yi-Ge¹⁾, JIANG Zhao-Hong¹⁾, ZHOU Qian-Yi¹⁾, CHEN Zhi-Ming^{1,2,3)**}

¹⁾Institute of Cytology and Genetics, School of Basic Medical Sciences, University of South China, Hengyang 421000, China;

²⁾NHC Key Laboratory of Birth Defect for Research and Prevention, Changsha 410008, China;

³⁾Center for Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421000, China)

Graphical abstract



Abstract Clathrin-mediated endocytosis (CME) is a critical process by which cells internalize macromolecular substances and initiate vesicle trafficking, serving as the foundation for many cellular activities. Central to this process are clathrin-coated structures (CCSs), which consist of clathrin-coated pits (CCPs) and clathrin plaques. While clathrin-coated pits are well-established in the study of endocytosis, clathrin plaques represent a more recently discovered but equally important component of this system. These plaques are large, flat, and extended clathrin-coated assemblies found on the cytoplasmic membrane. They are distinct from the more typical clathrin-coated pits in terms of their morphology, larger surface area, and longer lifespan. Recent research has revealed that clathrin plaques play roles that go far beyond endocytosis, contributing to diverse cellular processes such as cellular adhesion, mechanosensing, migration, and pathogen invasion. Unlike traditional clathrin-coated pits, which are transient and dynamic structures involved primarily in the internalization of molecules, clathrin plaques are more stable and extensive, often persisting for extended periods. Their extended lifespan suggests that they

serve functions beyond the typical endocytic role, making them integral to various cellular processes. For instance, clathrin plaques are involved in the regulation of intercellular adhesion, allowing cells to better adhere to one another or to the extracellular matrix, which is crucial for tissue formation and maintenance. Furthermore, clathrin plaques act as mechanosensitive hubs, enabling the cell to sense and respond to mechanical stress, a feature that is essential for processes like migration, tissue remodeling, and even cancer progression. Recent discoveries have also highlighted the role of clathrin plaques in cellular signaling. These plaques can serve as scaffolds for signaling molecules, orchestrating the activation of various pathways that govern cellular behavior. For example, the recruitment of actin-binding proteins such as F-actin and vinculin to clathrin plaques can influence cytoskeletal dynamics, helping cells adapt to mechanical changes in their environment. This recruitment also plays a pivotal role in regulating cellular migration, which is crucial for developmental processes. Additionally, clathrin plaques influence receptor-mediated signal transduction by acting as platforms for the assembly of signaling complexes, thereby affecting processes such as growth factor signaling and cellular responses to extracellular stimuli. Despite the growing body of evidence that supports the involvement of clathrin plaques in a wide array of cellular functions, much remains unknown about the precise molecular mechanisms that govern their formation, maintenance, and turnover. For example, the factors that regulate the recruitment of clathrin and other coat proteins to form plaques, as well as the signaling molecules that coordinate plaque dynamics, remain areas of active research. Furthermore, the complex interplay between clathrin plaques and other cellular systems, such as the actin cytoskeleton and integrin-based adhesion complexes, needs further exploration. Studies have shown that clathrin plaques can respond to mechanical forces, with recent findings indicating that they act as mechanosensitive structures that help the cell adapt to changing mechanical environments. This ability underscores the multifunctional nature of clathrin plaques, which, in addition to their role in endocytosis, are involved in cellular processes such as mechanotransduction and adhesion signaling. In summary, clathrin plaques represent a dynamic and versatile component of clathrin-mediated endocytosis. They play an integral role not only in the internalization of macromolecular cargo but also in regulating cellular adhesion, migration, and signal transduction. While much has been learned about their structural and functional properties, significant questions remain regarding the molecular mechanisms that regulate their formation and their broader role in cellular physiology. This review highlights the evolving understanding of clathrin plaques, emphasizing their importance in both endocytosis and a wide range of other cellular functions. Future research is needed to fully elucidate the mechanisms by which clathrin plaques contribute to cellular processes and to better understand their implications for diseases, including cancer and tissue remodeling. Ultimately, clathrin plaques are emerging as crucial hubs that integrate mechanical, biochemical, and signaling inputs, providing new insights into cellular function and the regulation of complex cellular behaviors.

Key words clathrin plaque, endocytosis, cell adhesion, cell signaling, microscopy

DOI: 10.16476/j.pibb.2025.0065

CSTR: 32369.14.pibb.20250065

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (32200564), The Natural Science Foundation of Hunan Province (2025JJ60612, 2024JJ2045, 2022JJ40357), and Teaching Reform Research Project of Hunan Provincial (HNJG-20230607).

** Corresponding author.

Tel: 86-734-8281979, E-mail: zhiming.chen@usc.edu.cn

Received: February 11, 2025 Accepted: May 6, 2025