

吞蛋白 A2 在非网格蛋白内吞中的作用研究进展*

余春红 易宗春**

(北京航空航天大学生物与医学工程学院, 北京 100191)

摘要 内吞作用是细胞从细胞外空间和内化横跨膜的细胞表面蛋白转运物质到细胞内的过程。吞蛋白(endophilin)一直被认为参与了网格蛋白介导的细胞内吞作用, 2015年《自然》(*Nature*)发表的两篇研究论文报道了一种由 endophilin A 标记和控制的独立于网格蛋白的有被囊泡内吞作用。本文主要综述近年来 endophilin A2 的研究, 着重介绍 endophilin A2 在非网格蛋白介导的内吞作用中的功能和机制。

关键词 Endophilin A2, 非网格蛋白介导的内吞, FEME 途径, 膜剪切

学科分类号 Q71, Q291

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0203

内吞作用有多种, 其中网格蛋白介导的胞吞作用(clathrin-mediated endocytosis, CME)是最典型的, 它协调许多受体的内化, 包括大量生长因子受体和信号受体^[1]。CME 在突触功能和突触囊泡的循环运输中发挥着重要作用, 但其速度较慢。非网格蛋白介导的内吞作用(clathrin-independent endocytosis, CIE), 如大型胞饮作用和胞膜窖依赖的胞吞作用, 机制尚不清楚^[2]。这主要是由于缺乏对 CIE 特异性的内源性配体的了解, 或未找到特异性的调控 CIE 的细胞标记物, 使 CIE 的研究难以获得突破性进展。

吞蛋白(endophilin)一直被认为参与了网格蛋白介导的内吞作用, 2015年《自然》(*Nature*)上发表的

两篇研究论文报道了一种由 endophilin A 标记和控制的独立于网格蛋白的有被囊泡内吞作用。Boucrot 等^[3]命名这种内吞作用为 endophilin 介导的快速内吞作用(fast endophilin-mediated endocytosis, FEME), Renard 等^[4]研究表明 endophilin A2 与发动蛋白和肌动蛋白利用相同通道在细菌毒素进入细胞中发挥作用。这是国际上首次明确描述的一种非网格蛋白介导的内吞作用机制。FEME 的重要特征是它在静息细胞中不活跃, 只有在同源配体刺激性分泌受体($t_{1/2} \approx 7s$)后, 能快速形成内吞作用胞膜蛋白。Endophilin A2 在 FEME 途径和膜剪切中重要作用的阐明, 将推进 CIE 作用机制和细胞膜功能的研究。图 1 示 CME 和 FEME 的作用途径。

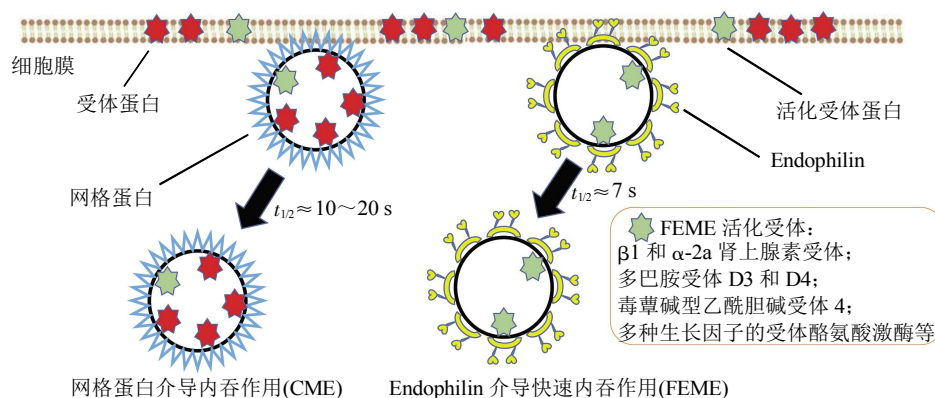


Fig. 1 The mechanisms of CME and FEME

图 1 CME 和 FEME 途径示意图

* 国家自然科学基金(81573192, 81072325)资助项目。

** 通讯联系人. Tel: 010-82339552, E-mail: yizc@buaa.edu.cn

收稿日期: 2016-10-25, 接受日期: 2016-11-14

1 吞蛋白家族

吞蛋白(endophilin)家族由 A 亚家族和 B 亚家族构成, 其中 A 亚家族有 3 个亚型, A1、A2 和 A3; B 亚家族有 2 个亚型, B1 和 B2. 在筛选小鼠胚胎细胞 cDNA 表达文库中, Chen 等^[5]发现富含吡咯氨酸的 SH3 结构域. 1997 年 Ringstad 等^[6]鉴定出 SH3p4、SH3p8 和 SH3p13, 由于 SH3p4 与吞蛋白的密切联系, 后来依次被命名为 endophilin A1、endophilin A2 和 endophilin A3, 尽管当时 endophilin A2 和 endophilin A3 在细胞内吞中的作用有待报道^[7]. 人类吞蛋白是从一名急性淋巴细胞性白血病儿童患者的标本中克隆得到的, 此病人具有 11 号和 19 号染色体易位, 使该基因与 MLL (mixed lineage leukemia gene) 发生融合形成融合基因, 因此, endophilin A 也叫作 EEN(extra eleven nineteen)^[8]. 2000 年 endophilins B 家族被发现, 使用促凋亡蛋白 Bax 诱导, 在酵母双杂交实验中, 两个课题组发现 endophilins B1, 命名为 SH3GLB1 或 Bif-1(bax-interacting factor-1). 使用 endophilins B1 诱导, 鉴定出 endophilins B2, 命名为 SH3GLB2^[9-10].

Endophilin A1 主要分布在脑部, endophilin A2 在各种组织广泛表达, 而 endophilin A3 在脑部和睾丸组织中高表达, 但不局限于这些组织. Endophilin B1 和 endophilin B2 则在大多数器官中都有分布, 包括大脑^[6, 11]. Ringstad 等^[6]对 endophilin A 在神经元中分布的研究显示, endophilin A 主要集中在突触部位, 其中 endophilin A1 主要分布在突触前膜, endophilin A2 在前后膜均丰富地表达, 而 endophilin A3 更多分布在突触后膜. 在造血干细胞、成纤维细胞及内皮细胞中, endophilin A2 主要分布在细胞核. 而在神经元及破骨细胞中, endophilin A2 主要分布在胞质. Endophilin 的亚细胞定位在不同的时期和位置会发生变化. 例如细胞周期中, endophilin A2 的亚定位发生动态变化: 分裂前中期位于染色体周边, 分裂中期后期与双级纺锤体共位, 分裂末期回到中央区和中间体^[12].

2 Endophilin A2 的结构特点

所有 endophilins 由 1 个 N 端 BAR 结构域, 1 个中间可变区域和 1 个 C 端 SH3 结构域组成. Endophilin A2 整个分子由 368 个氨基酸构成, 其 5~241 区域为 BAR 结构域, 311~362 为 SH3 结构域, 242~310 为中间可变区域, 可变区有 1 个

非典型的富含脯氨酸结构域^[13]. BAR 结构域(Bin/Amphiphysin/Rvs)是新月形的, 具有高度保守的二聚体结构, 具备感应、稳定和通过膜凹面诱导膜弯曲能力, 并且能特异性地结合到已经弯曲的膜上^[14-15]. 中间可变区域包含几个磷酸化残基, 参与 endophilin 翻译后加工过程, 同时在决定 endophilin 是否促进或抑制受体介导的内吞作用中发挥着重要作用^[16]. SH3 结构域能识别富含脯氨酸的其他吞蛋白, 如突触小泡磷酸酶和发动蛋白^[17-18]. 大鼠中 endophilin A2 的 SH3 结构域的晶体结构已通过多波长反常色散方法确定, 与人类的 endophilin A1 和 A3 相应的结构域高度地相似^[19]. 在电压依赖性钙通道中, endophilin 的 SH3 结构域通过识别内部上游脯氨酸序列, 来介导 endophilin A2 结合在钙离子通道电压门控的 C 端, 作用于神经末梢的囊泡运输^[13].

3 Endophilin A2 参与非网格蛋白介导的内吞作用

内吞作用是从细胞外空间和内化横跨膜的细胞表面蛋白转运物质到细胞内的过程^[20]. 所有真核细胞需要通过内吞作用与环境发生交换, 微量元素的内化和细胞表面成分的翻转. 内吞作用在细胞信号转导, 神经递质运输和调控细胞命运发生过程中起着关键作用^[20]. 内吞作用过程是通过质膜内陷形成小泡, 运输“货物”分子. 一旦质膜表面内陷, 内吞作用的囊泡将从质膜运输, 分选或者循环回到细胞表面, 维持细胞信号传导或者送往溶酶体降解, 然后处于特异性信号的长期的脱敏作用^[21]. 此外, 内吞作用也被许多病原体(如毒素、病毒、细菌)作为突破口. 因此, 研究和了解内吞作用对研究生物学多领域有着重要意义, 并引起很多学者研究治疗干预措施和大多数药物靶点的浓厚兴趣.

Endophilin 已经被认为是内吞作用的蛋白质, 它能募集动力蛋白和突触小泡磷酸酶, 它的裂解对小鼠、蠕虫和果蝇内的胞吞作用有深远的影响^[22-25]. 在哺乳动物细胞网格蛋白小窝上 endophilin 已经通过免疫电子显微镜和免疫荧光显微镜检测到^[26-27], 而关于 endophilin 在 CME 研究中表明, 只有 1/4 的网格蛋白小窝中检测到 endophilin^[28-29]. 不同细胞系研究表明, 通过 RNAi 技术三次基因敲除 endophilin A 蛋白(A1, A2, A3), 并不影响 CME 中物质转运^[30]. Tang 等^[31]研究表明, endophilin 直接结合在 $\beta 1$ 肾上腺素受体($\beta 1$ -AR), 而不是 $\beta 2$ 肾

上腺素受体的胞内第三环富含脯氨酸区域, 尽管它们都是 G 蛋白偶联受体超家族成员. $\beta 1$ -AR 的内化在 endophilin 三次基因敲除细胞中明显减少, 而未发生在网格蛋白或者 AP2 敲除细胞中, 这表明其内吞作用与 CME 不同^[3]. 在 BSC1 细胞中, 5 种 endophilin 家族成员中 endophilin A2 是最重要的, endophilin A1 发挥很少作用, 而 A3、B1 和 B2 不发挥作用. $\beta 1$ -AR 的内化需要完整的 endophilin A2, 而不仅是其 BAR 域或 SH3 域. Endophilin 和发动蛋白 (dynamin)、突触小泡磷酸酶 (synaptojanin)、lamellipodin 与 F 肌动蛋白等结合蛋白在细胞前缘共位. 而敲除 CIE 的内吞蛋白, 如陷窝蛋白 1 (caveolin-1)、筏蛋白 1/2 (flotillin1/2) 或者 GRAF1, 并不影响 endophilin 信号途径, 表明这是一种不同的非网格蛋白介导内吞作用^[3].

Boucrot 课题组^[3]命名并揭秘这种独立于网格蛋白的有被囊泡的内吞作用 (FEME). Endophilin 能迅速内化几个医学上重要的 G 蛋白耦合受体 (GPCRs)、生长因子和细胞因子受体. 到目前为止, 他们发现 FEME 能分别控制 $\beta 1$ 和 $\alpha 2a$ 肾上腺素受体、多巴胺受体 D3 和 D4、毒蕈碱型乙酰胆碱受体 4、以及表皮生长因子 (EGFR)、肝细胞生长因子 (HGFR)、成纤维细胞生长因子 (FGFR)、血管内皮生长因子 (VEGFR)、血小板源生长因子 (PDGFR) 和胰岛素样生长因子 1 (IGF1R) 的受体酪氨酸激酶的内化. 他们还发现, FEME 独立于 AP2 和网格蛋白, 但依赖动力蛋白和突触小泡磷酸酶功能. FEME 被肌动蛋白解聚药物或 Rac 抑制剂抑制, 而通过抑制 Cdc42 被激活^[3]. FEME 囊泡形成的细胞功能和机制还在研究中.

与此同时, Renard 等^[4]在人类和其他哺乳动物细胞系中发现, endophilin A2 与非网格蛋白介导的志贺细菌毒素和霍乱细菌毒素吞噬早期吸收结构特异性相关. Endophilin A2、发动蛋白和肌动蛋白参与志贺毒素诱导的微管剪切作用, 揭示了 endophilin A2 在 CIE 中的作用. 志贺毒素诱导 CIE 细胞质膜内陷是进入细胞的第一步. 在 endophilin A2 外源性表达的细胞中, 志贺毒素 B 亚单位 (STxB) 引导的微管更短, 表明 endophilin A2 与 STxB 的吸收过程有关. 在耗尽 ATP 的细胞中, 没有检测到 STxB 转运到高尔基体. 通过转染 GFP 标记 endophilin A2 发现, 短的微管很可能是由长微管剪切而成, 而不是通过抑制微管形成. 含有 endophilin A2 结构的生命周期中明显增加了 STxB

出现的频率, endophilin A2 是通过 STxB 募集到细胞质膜. 同样的现象也发生在霍乱毒素 B 亚单位 (CTxB) 内化中^[4].

在 endophilin A2 敲除的细胞中, 通过共聚焦光学显微镜可以观察到短而明显的管状 STxB 内陷, 并连接到细胞质膜上. Endophilin A2 敲除后, STxB 出现的频率不增加, 而平均长度明显增加. 进一步的研究表明 endophilin A2 的 SH3 结构域, 而不是氨基端, 与结合伴侣如动力蛋白相互作用参与 STxB 的运输. 敲除 endophilin A2 并不影响转铁蛋白内化或者循环, 网格蛋白介导的运输物质 TGN46 和非阳离子依赖型甘露糖 6 磷酸受体 (CI-MPR) 的稳定位置, 或者 E-cadherin 的顺向运输. 在 ATP 数量减少的细胞中, 敲除 endophilin A2, 由于存在 endophilin A2 耐受性 FKBP- 标记 endophilin A2 融合蛋白, STxB 包含的微管长度仅仅稍微增加. 加入雷帕霉素后, 融合蛋白从线粒体游离, STxB 包含的微管长度明显增加, 而洗去雷帕霉素, 微管长度会显著变短, 这表明 endophilin A2 参与 STxB 引起的细胞质膜内陷剪切作用. Vincent 等研究表明 ALG2 相互作用蛋白 X (ALG-2 interacting protein X, Alix) 协同 endophilin A2 介导 CTxB 的非网格蛋白内吞作用^[32]. Endophilin A2 在拉力驱动膜剪切中的作用, 将推动膜剪切中细胞骨架的分子马达和以 BAR 结构蛋白为依托的细胞膜功能与机制研究^[4].

4 展 望

FEME 途径可能通过调控膜蛋白内化, 参与微重力引起细胞骨架变化、环境化学物毒性作用等方面, 这将对揭示其生理和病理机制可能有突破性进展. 宇航员进入太空后免疫系统功能失调, 导致机体患感染性疾病和免疫疾病风险增加, 模拟微重力环境会减少原代人类 T 淋巴细胞、大鼠肺 T 淋巴细胞等中的 IL-2 生成^[33-34], 而 FEME 途径介导 IL-2 受体的内吞作用. 微重力公认可以引起细胞骨架变化, 这是否通过引起 FEME 介导的膜蛋白内化产生影响. Endophilin A2 是否调控微重力环境下 T 淋巴细胞的激活, 这对于宇宙飞行影响宇航员免疫系统的病理机制研究将有重要意义.

针对苯血液毒性的机制已有大量研究, 但机制仍不十分清楚. 苯的代谢物氢醌和 1, 2, 4- 苯三醇抑制细胞表面转铁蛋白受体 CD71 和血型糖蛋白 GPA 的表达, 血红素合成还需要细胞表面表达的

CD71 将铁运入细胞内^[35]。Endophilin 介导的膜蛋白内化过程是否发生改变而参与其中? 许多肿瘤中表皮生长因子受体表达增强, PDGFR 的激活与许多人类疾病有关, 如血管再狭窄、动脉粥样硬化。VEGFR 是血管生成的重要调节因子, FGFR 调节细胞生长、分化、迁移和生存, IGF1R 在血细胞肿瘤中常见, FEME 途径控制多种受体酪氨酸激酶的内化, 使其在人类机体组织器官中的生理功能和疾病联系研究具有重要意义^[36]。

FEME 途径在静息细胞中不活跃, 只有在同源配体刺激性分泌受体后, 能快速形成内吞作用胞膜蛋白, 这种特性使其有望成为未来应用治疗和靶向药物的最佳选择。FEME 途径为什么比 CME 速度更快? Endophilin A 既参与 CME 也参与 CIE, 是否存在某些标志性蛋白只参与 CIE 而不参与 CME? Endophilin A2 介导的 FEME 为非网格蛋白作用机制研究提供了新的思路, 其在多种生命活动如免疫应答、神经递质运输、细胞信号传导、组织代谢平衡中的分子机制和在人类机体组织器官中的应用有待进一步探讨和研究。

参 考 文 献

- [1] McMahon H T, Boucrot E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2011, **12**(8): 517-533
- [2] Sandvig K, Pust S, Skotland T, *et al.* Clathrin-independent endocytosis: mechanisms and function. *Current Opinion in Cell Biology*, 2011, **23**(4): 413-420
- [3] Boucrot E, Ferreira A P, Almeida-Souza L, *et al.* Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. *Nature*, 2015, **517**(7535): 460-465
- [4] Renard H F, Simunovic M, Lemièrre J, *et al.* Endophilin-A2 functions in membrane scission in clathrin-independent endocytosis. *Nature*, 2015, **517**(7535): 493-496
- [5] Chen H, Antonarakis S E. The SH3D1A gene maps to human chromosome 21q22.1-->q22.2. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 1997, **78**(3-4): 213-215
- [6] Ringstad N, Nemoto Y, De Camilli P. The SH3p4/Sh3p8/ SH3p13 protein family: binding partners for synaptojanin and dynamin *via* a Grb2-like Src homology 3 domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(16): 8569-8574
- [7] Micheva K D, Kay B K, McPherson P S. Synaptojanin forms two separate complexes in the nerve terminal. Interactions with endophilin and amphiphysin. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272**(43): 27239-27245
- [8] So C W, Caldas C, Liu M M, *et al.* EEN encodes for a member of a new family of proteins containing an Src homology 3 domain and is the third gene located on chromosome 19p13 that fuses to MLL in human leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(6): 2563-2568
- [9] Cuddeback S M, Yamaguchi H, Komatsu K, *et al.* Molecular cloning and characterization of Bif-1. A novel Src homology 3 domain-containing protein that associates with Bax. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**(23): 20559-20565
- [10] Pierrat B, Simonen M, Cueto M, *et al.* SH3GLB, a new endophilin-related protein family featuring an SH3 domain. *Genomics*, 2001, **71**(2): 222-234
- [11] Giachino C, Lantelme E, Lanzetti L, *et al.* A novel SH3-containing human gene family preferentially expressed in the central nervous system. *Genomics*, 1997, **41**(3): 427-434
- [12] Cheung N, So C W, Yam J W, *et al.* Subcellular localization of EEN/endophilin A2, a fusion partner gene in leukaemia. *Biochemical Journal*, 2004, **383**(Pt 1): 27-35
- [13] Chen Y, Deng L, Maeno H Y, *et al.* Formation of an endophilin-Ca²⁺ channel complex is critical for clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Cell*, 2003, **115**(1): 37-48
- [14] Peter B J, Kent H M, Mills I G, *et al.* BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science*, 2004, **303**(5657): 495-499
- [15] Boucrot E, Pick A, Çamdere G, *et al.* Membrane fission is promoted by insertion of amphipathic helices and is restricted by crescent BAR domains. *Cell*, 2012, **149**(1): 124-136
- [16] Sugiura H, Iwata K, Matsuoka M, *et al.* Inhibitory role of endophilin 3 in receptor-mediated endocytosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, **279**(1): 23343-23348
- [17] Slepnev V I, De Camilli P. Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nature Reviews Neuroscience*, 2000, **1**(3): 161-172
- [18] Song W, Zinsmaier K E. Endophilin and synaptojanin hook up to promote synaptic vesicle endocytosis. *Neuron*, 2003, **40** (4): 665-667
- [19] Gao Y G, Yan X Z, Song A X, *et al.* Structural insights into the specific binding of huntingtin proline-rich region with the SH3 and WW domains. *Structure*, 2006, **14**(12): 1755-1765
- [20] Doherty G J, McMahon H T. Mechanisms of endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, 2009, **78**(1): 857-902
- [21] Sigismund S, Confalonieri S, Ciliberto A, *et al.* Endocytosis and signaling: cell logistics shape the eukaryotic cell plan. *Physiological Reviews*, 2012, **92**(1): 273-366
- [22] Guichet A, Wucherpfennig T, Dudu V, *et al.* Essential role of endophilin A in synaptic vesicle budding at the *Drosophila* neuromuscular junction. *EMBO Journal*, 2002, **21**(7): 1661-1672
- [23] Verstreken P, Kjaerulff O, Lloyd T E, *et al.* Endophilin mutations block clathrin-mediated endocytosis but not neurotransmitter release. *Cell*, 2002, **109**(1): 101-112
- [24] Schuske K R, Richmond J E, Matthies D S, *et al.* Endophilin is required for synaptic vesicle endocytosis by localizing synaptojanin. *Neuron*, 2003, **40**(4): 749-762
- [25] Milosevic I, Giovedi S, Lou X, *et al.* Recruitment of endophilin to clathrin-coated pit necks is required for efficient vesicle uncoating

- after fission. *Neuron*, 2001, **72**(4): 587–601
- [26] Sundborger A, Soderblom C, Vorontsova O, *et al.* An endophilin-dynamin complex promotes budding of clathrin-coated vesicles during synaptic vesicle recycling. *Journal of Cell Science*, 2011, **124**(Pt 1): 133–143
- [27] Ferguson S M, Raimondi A, Paradise S, *et al.* Coordinated actions of actin and BAR proteins upstream of dynamin at endocytic clathrin-coated pits. *Developmental Cell*, 2009, **17**(6): 811–822
- [28] Perera R M, Zoncu R, Lucast L, *et al.* Two synaptojanin 1 isoforms are recruited to clathrin-coated pits at different stages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(51): 19332–19337
- [29] Taylor M J, Perrais D, Merrifield C J. A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biology*, 2011, **9**(3): e1000604
- [30] Meinecke M, Boucrot E, Camdere G, *et al.* Cooperative recruitment of dynamin and BIN/amphiphysin/Rvs (BAR) domain-containing proteins leads to GTP-dependent membrane scission. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, **288**(9): 6651–6661
- [31] Tang Y, Hu L A, Miller W E, *et al.* Identification of the endophilins (SH3p4/p8/p13) as novel binding partners for the beta1-adrenergic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, **96**(22): 12559–12564
- [32] Mercier V, Laporte M H, Destaing O, *et al.* ALG-2 interacting protein-X (Alix) is essential for lathrin-independent endocytosis and signaling. *Scientific Reports*, 2016 May 31, **6**: 26986
- [33] Tauber S, Hauschild S, Paulsen K, *et al.* Signal transduction in primary human T lymphocytes in altered gravity during parabolic flight and clinostat experiments. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2015, **35**: 1034–1051
- [34] Li X, Liu C T, Wang L X, *et al.* Investigation of the function change of T lymphocytes in lung under a simulated microgravity condition. *Immunological Journal*, 2007, **23**(5): 559–562
- [35] Wu X R, Xue M, Li X F, *et al.* Phenolic metabolites of benzene inhibited the erythroid differentiation of K562 cells. *Toxicology Letters*, 2011 Jun 24, **203**(3): 190–199
- [36] Mao Y J, Li H H, Li J F, *et al.* Signal transduction by protein tyrosine kinases and antitumor agents. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2008, **43**(4): 323–334

Advances in Roles of Endophilin A2 in Clathrin-independent Endocytosis*

YU Chun-Hong, YI Zong-Chun**

(School of Biological Science and Medical Engineering, Beihang University, Beijing 100191, China)

Abstract Endocytosis plays important roles in the internalization of micronutrients and turnover of membrane components. Endophilin has always been considered involving in clathrin-mediated endocytosis process. However, it was reported that endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway on *Nature* in 2015 by two research groups. This review introduces recent advances in endophilin A2 and highlights the functions and mechanisms of endophilin A2 in clathrin-independent endocytosis.

Key words endophilin A2, clathrin-independent endocytosis, FEME pathway, membrane scission

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0203

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (81573192, 81072325).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-82339552, E-mail: yizc@buaa.edu.cn

Received: October 25, 2016 Accepted: November 14, 2016