

1991, 350 (6320): 718-720

A Target for Cancer Therapy: Strategies for Telomerase Inhibition. ZHENG Xiao-fei, WANG Sheng-qi, SUN Zhi-xian (*Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

Abstract Telomerase activity is associated with

cancer. Telomerase inhibition is a strategy for suppression of tumor growth. The progress in inhibition of telomerase activity by peptide nucleic acids, ribozyme, differentiating agents, reverse transcriptase inhibitors and G-quartet DNA structures are reviewed.

Key words telomerase, cancer, inhibitor

PH 结构域的结构和功能研究进展*

王吉村 药立波

(第四军医大学生物化学与分子生物学教研室, 西安 710032)

摘要 PH 结构域是一种存在于多种信号转导蛋白和细胞骨架蛋白中的大约由 120 个氨基酸组成的功能性区域。不同蛋白质中的 PH 结构域在一级结构上的同源性并不很高, 但其空间结构中肽链主链的折叠方式基本相同, 而主要差别存在于其中的三个可变环上, 含有这些环的侧面带有正电荷, 被认为是其配体的结合部位。目前已知的配体有 G 蛋白 $\beta\gamma$ 亚单位 (G $\beta\gamma$)、蛋白激酶 C (PKC) 和磷脂酰肌醇衍生物 (PIP₂ 或 IP₃), 所以 PH 结构域可能介导信号蛋白与这些分子间的相互作用, 参与细胞信号转导网络的构成。

关键词 PH 结构域, 信号转导, 蛋白激酶 C, G 蛋白, 磷脂酰肌醇衍生物

学科分类号 Q71

PH 结构域是一种存在于多种信号蛋白和细胞骨架相关蛋白中的大约由 120 个氨基酸组成的功能性区域。由于它们与血小板-白细胞 C 激酶底物 (pleckstrin) 中的一段重复序列具有同源性, 所以称为 pleckstrin homology (PH) 结构域。这一同源区的频繁出现是 Mayer 等^[1]和 Haslam 等^[2]分别于 1993 年在进行计算机基因库资料分析时发现的。目前已发现的含有 PH 结构域的蛋白质有 90 余种, 主要为一些参与信号传递的分子。PH 结构域在信号转导分子中的广泛分布提示, PH 结构域可能与 SH2 和 SH3 结构域的功能类似, 在细胞信号转导网络中介导信号分子间的相互作用。

不同蛋白质中的 PH 结构域在一级结构上的同源性并不很高, 但是对其空间结构的研究发现, 其肽链主链折叠方式基本相同, 这样就

在结构上证实了 PH 结构域是一真正的功能性单位。

1 PH 结构域的结构特点

PH 结构域基本上由两个反向平行的 β 片层结构和一个长的 C 端 α 螺旋构成。一组 β 片层结构由 β_1 、 β_2 、 β_3 和 β_4 四条链反向平行组成, 另一组 β 片层结构由 β_5 、 β_6 和 β_7 三条链反向平行组成。 β_1/β_2 、 β_3/β_4 和 β_6/β_7 间各有一个环结构 (图 1)。这两组 β 片层结构在空间上近似垂直, 曾有人把这一结构形容为“ β 桶”, 但 Ferguson 等^[3,4]认为, 这些靠氢键连接起来的结构不可能围成一个桶形, 而是相互包裹形成一个三明治样结构。将几种蛋白质的

* 国家自然科学基金资助课题 (39740020)。

收稿日期: 1997-04-09, 修回日期: 1997-07-18

结构进行比较,发现不同 PH 结构域 β 片层结构和 α 螺旋在不同 PH 结构域中基本相同,而 β 链间的三个环在序列和结构上变化较明显.将几种 PH 结构域的序列进行比较发现: β_1/β_2 、 β_3/β_4 和 β_6/β_7 连接环只在长度上稍稍保守,它们都位于分子的一个侧面,而分子的另一侧,围绕着 α 螺旋,则形成一个在结构上更为保守的侧面.这样,PH 结构域的一个表面特别可变的这个特点决定了每种 PH 结构域可能都有其配体结合特异性.这些可变成成分位于 β 片层结构的骨架上,提示它们可能成为免疫

球蛋白可变区结构域的抗原识别点^[3].

对发动蛋白 (dynammin)、磷脂酶 C- δ_1 (PLC- δ_1)、血影蛋白 (spectrin) 和血小板-白细胞 C 激酶底物 (pleckstrin) 等蛋白质中 PH 结构域的结构研究表明,PH 结构域具有表面极性:其较保守的一面,即包括 α 螺旋的一面,带有负电荷,而另一面,即包括可变环的一面,则带有正电荷,其他疏水残基位于分子内部.这种与可变环位置相联系的极性,也是 PH 结构域的一个保守特点,它提示,PH 结构域的配体可能带有负电荷^[3].

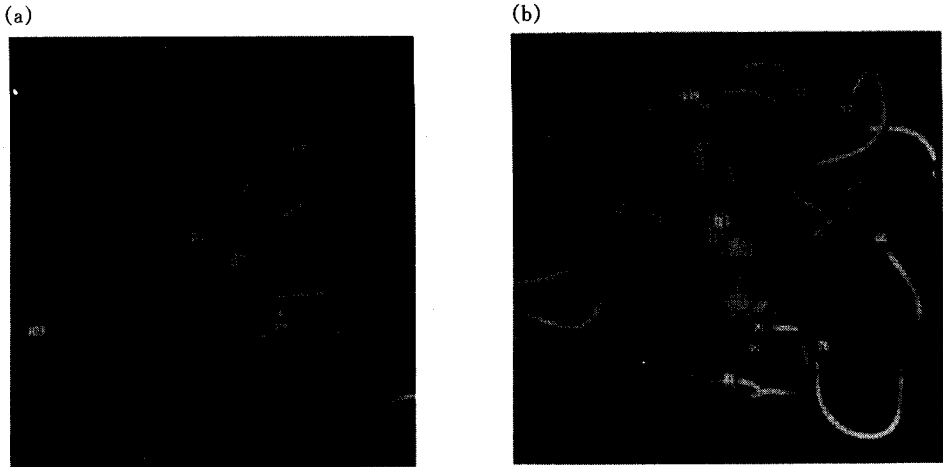


图1 发动蛋白 (dynammin) PH 结构域的空间结构 (X 射线晶体衍射图谱分析结果)^[3]

(a) 从垂直于两个 β 片层平面的角度看,两个 β 片层分别由 β_1 , β_2 , β_3 , β_4 四条链和 β_5 , β_6 , β_7 三条链构成, α 螺旋位于 C 端。(b) 沿着 β 片层平面,从两个 β 片层中间看,相当于分子沿着 (a) 图视角的垂直轴转了 90° .两个 β 片层将 α 螺旋夹在中间,形成一个三明治样结构。

已有研究表明,酪氨酸蛋白激酶 Btk (bruton tyrosine kinase Btk) PH 结构域中的 R28C 突变,即由半胱氨酸取代精氨酸,与 xid 小鼠的性染色体连锁性免疫缺陷症 (XID) 有关^[5]. R28 相应位于 β_2 链中部,在人 dynammin PH 结构域中,这一位置是酪氨酸 (Y33). Dynammin PH 结构域在溶液状态时,这一酪氨酸 (Y33) 暴露于带正电荷的分子表面,这一表面包括可变环^[3]. Btk R28C 的突变效应提示,PH 结构域的这一区域对于配体结合非常重要。

2 PH 结构域的功能

PH 结构域虽然已在很多蛋白质中被发现,但其功能尚不十分清楚.一般认为,PH 结构域可能与 SH2 和 SH3 功能类似,介导信号分子间相互作用.前已述及, Btk R28C 突变可引起小鼠的性染色体连锁性免疫缺陷症.在人类性染色体连锁性低 γ 球蛋白血症 (XLA) 病人中也检测到数种 Btk 点突变是发生在 PH 结构域中的^[6].虽然 XID 小鼠 B 细胞不能正常地被激活,但 Btk 酶本身活性不受

影响, 说明是 Btk 与信号转导途径中的其他分子的相互作用受到了影响^[6]. 因此, 寻找 PH 结构域的相应配体成为近三年来各组研究人员竞相研究的热点, 并取得了相当大的进展. 正如从有关结构中预测的那样, PH 结构域的配体确实具有一定的多样性, 目前已知的有, G 蛋白 $\beta\gamma$ 亚单位、蛋白激酶 C 和磷脂酰肌醇衍生物 (4, 5-二磷酸磷脂酰肌醇 (PIP₂) 或 1, 4, 5-三磷酸肌醇 (IP₃)) 等三种, 下面我们分别介绍.

2.1 PH 结构域与 G $\beta\gamma$ 的相互作用

G 蛋白是细胞信号转导途径中的一种具有重要调节功能的信号蛋白. G $\beta\gamma$ 和 G α 分别是 G 蛋白中的两个功能亚单位. 早期人们曾认为, G $\beta\gamma$ 亚基的作用仅仅是结合 G α 亚基, 后来有许多证据表明, G $\beta\gamma$ 亚单位亦可直接调节胞内的信号传递, 如, G $\beta\gamma$ 可激活 PLC- β . 1994 年, Touhara 等^[7]将含有 PH 结构域的九种蛋白质: β 肾上腺素能受体激酶 (β -ARK)、磷脂酶 C- γ (PLC- γ)、胰岛素受体底物-1 (IRS-1)、spectrin、Rac- β 、氧化甾类结合蛋白 (OSBP)、Ras-GTP 酶活化蛋白 (Ras-GAP)、Ras-鸟苷酸释放因子 (Ras-GRF) 和 γ 球蛋白缺乏症酪氨酸激酶 (Atk) 的 GST 融合蛋白分别与 G $\beta\gamma$ 作用, 发现它们与 G $\beta\gamma$ 均有不同程度的结合, 其中以 β -ARK 结合性最强. 但 G $\beta\gamma$ 只与 PH 结构域的 C 端结合. 同时, G $\beta\gamma$ 和 PH 结构域的结合与 G $\beta\gamma$ 和 G α 的结合相互排斥. 这提示, PH 结构域与 G α 在它们与 G $\beta\gamma$ 结合点上结构相似. 最近 Srinivason 等^[8]进一步研究发现: G α 转换 II 区与 PH 结构域的 C 端相似.

G $\beta\gamma$ 能与如此多的含 PH 结构域的信号分子作用提示, G $\beta\gamma$ 的胞内靶分子范围可能比原来想象的更宽, 作用更广泛. 例如, Tsukada 等^[9]研究发现, 在体内外 Btk 都与 G $\beta\gamma$ 结合, 提示胞浆酪氨酸蛋白激酶 (PTK) 与 G 蛋白在信号转导上有联系. Langhans 等应用共转染检测技术研究发现, Tsk 和 Btk (二者均为含有 PH 结构域的酪氨酸蛋白激酶) 可被 G $\beta\gamma$

激活; 并且在体外, Tsk 酶活性可因 G $\beta\gamma$ 与其他膜上分子的结合而增强^[10]. 这些发现提示, 酪氨酸蛋白激酶家族可能通过 PH 结构域成为 G 蛋白的效应分子.

2.2 PH 结构域与 PKC 的相互作用

PKC 参与细胞内多种信号转导途径, 与细胞的生长和分化密切相关^[11]. 1994 年, 药立波 (Yao)^[12]在美国拉霍亚免疫学和变态反应学研究所做客座研究时报告了 Btk 经由其 N 端的 PH 结构域与 PKC 的相互作用. 我们发现 Btk 在细胞内外均可与 PKC 相结合存在. 应用 GST-Btk (PH) 表达载体制备的 GST-Btk-PH 融合蛋白做亲和纯化分析表明, 这种结合是由 Btk 中的 PH 结构域介导的. 为了确定 Btk-PH 结构域中与 PKC 相结合的区域, 我们构建了多种缺失突变的 Btk-PH 结构域, 用这些缺失突变的 PH 结构域证实了负责与 PKC 结合的部位为 Btk-PH 结构域的 β_2 和 β_3 链, 这一部位与 PIP₂ 的结合区有重叠, 所以 PIP₂ 对 PKC 与 Btk 的结合可能有竞争作用^[13]. 对于 Btk 与 PKC 的结合的生理意义, 我们观察到, PKC 在体外对 Btk 的活性有抑制作用, 尤其当在细胞内使用 PKC 抑制剂时, 抑制剂可以明显促进 Btk 对外源刺激的活化反应. 但这种负调节现象在细胞内信息传递网络中究竟起着什么样的作用, 目前仍在探讨中.

2.3 PH 结构域与 PIP₂ 和 IP₃ 的相互作用

PH 结构域不仅介导蛋白质-蛋白质相互作用, 还可能通过与 PIP₂ 或 IP₃ 的作用介导蛋白质-脂质相互作用. 1993 年, Cifuentes 等^[14]发现 PLC- δ_1 的 N 端部分, 包括 PH 结构域, 可以形成一个与 PIP₂ 结合的部位. Harlan 等^[15]应用离心方法研究发现, 几种 PH 结构域 (Tsk、Ras-GAP 和 β -ARK) 都可特异地与含 PIP₂ 的脂膜结合, 这一结合涉及 PH 结构域带正电荷的一面, 结合于“ β 桶”的边上. 进一步的研究表明, PLC- δ_1 PH 结构域与 PIP₂ 和 IP₃ 都有高度亲和力, 与 PIP₂ 的亲和力最高. Ferguson 等^[16]研究发现, PLC- δ_1 PH 结构

域带正电荷一面上的 β_1/β_2 和 β_3/β_4 两个连接环主要与 IP_3 肌醇环上的第 4 和第 5 两个磷酸基团结合。但 Harlan 等^[15]发现, spectrin 只微弱地与 IP_3 结合, pleckstrin 中的 PH 结构域与脂膜中 PIP_2 亲和力也很低, 目前尚不清楚为什么不同的 PH 结构域有不同的脂质结合性。

有人认为, PH 结构域可能通过与磷脂结合而引导信号蛋白在膜上定位, 从而使信号蛋白传递膜上信号。Whitehead 等^[17]发现, PH 结构域引导 Ifc 蛋白质到膜上是细胞转化的必要步骤, 而 Ifc 是一种与鸟苷酸交换因子 (GEF) 和 PKC 调节区结构非常相似的原癌基因产物。

另外, 在对 PH 结构域与 $G\beta\gamma$ 、PKC 和磷脂酰肌醇衍生物的结合部位分析中我们发现, PH 结构域与后三者的结合均在 PH 结构域带正电荷的一面, 并与三个可变环相关。是否它们与 PH 结构域的结合位置相同? 还是有各自的特异结合点? 这些还需我们进一步研究确实。不过, 对于 SH2 结构域, 的确存在着 PIP_2 和磷酸酪氨酸蛋白的结合竞争现象。Pitcher 等^[18]曾研究发现, PH 结构域介导的 β -ARK 的膜结合和激活需要 PH 结构域- $G\beta\gamma$ 和 PH 结构域-脂质的共结合, 只有这样, 才能加速激动剂依赖的受体磷酸化, 这可能是一种新的蛋白质膜结合机制。

综上所述, PH 结构域在细胞信号传递网络中的作用研究已经取得了相当大的进展, 但是, 要最终明确各种 PH 结构域的功能、这些不同种类 PH 结构域在配体结合上有多大的选择性和差异性以及它们在各自的信号传递途径中有什么样的作用等还需做大量工作, 这些问题的明确将对细胞内信号转导途径的理解有更大的帮助。

参 考 文 献

- Mayer B J, Ren R, Clark K L *et al.* A putative modular domain present in diverse signaling molecules. *Cell*, 1993, **73** (4): 629~ 630
- Haslam R J, Koide H B, Hemmings B A. Pleckstrin homology domain. *Nature*, 1993, **363** (6477): 309~ 310
- Ferguson K M, Lemmon M A, Schlessinger J *et al.* Crystal structure at 2.2 Å resolution of the pleckstrin homology domain from human dynamin. *Cell*, 1994, **79** (21): 199~ 209
- Yoon H S, Hajduk P J, Patros A M *et al.* Solution structure of a pleckstrin homology domain. *Nature*, 1994, **369** (6482): 672~ 675
- Rawling D J, Saffran D C, Tsukada S *et al.* Mutation of unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. *Science*, 1993, **261** (3): 358~ 361
- Tsukada S, Saffran D C, Rawling D J *et al.* Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked Amammaglobulinemia. *Cell*, 1993, **72** (2): 279~ 290
- Touhara K, Inglese J, Pitcher J A *et al.* Binding of G protein $\beta\gamma$ -subunits to pleckstrin homology domains. *J Biol Chem*, 1994, **269** (14): 10217~ 10220
- Srinivason V, Waterfield M D, Blundell T L. Comparative analysis of the regions beta gamma-subunits in G alpha and PH domain. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **220** (3): 697~ 702
- Tsukada S, Simon M J, Witte O N *et al.* Binding of beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins to the PH domain of Bruton tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (23): 11256~ 11260
- Langhans Rajasekaran S A, Wan Y, Huang X Y. Activation of Tsk and Btk Tyrosine kinase by G protein beta gamma subunits. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (19): 8601~ 8605
- Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implication for cellular regulation. *Nature*, 1988, **334** (6184): 661~ 665
- Yao L, Kawakami Y, Kawakami T *et al.* The pleckstrin homology domain of Bruton tyrosine kinase interacts with protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (19): 9175~ 9179
- Yao L, Suzuki H, Ozawa K *et al.* Interactions between protein kinase C and PH domains: inhibition by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate and PMA. *J Biol Chem*, 1997, **272** (20): 13033~ 13039
- Cifuentes M E, Hankanen L, Rebecchi M J. Proteolytic fragments of phosphoinositide. *J Biol Chem*, 1993, **268** (16): 11586~ 11593
- Harlan J E, Hajduk P J, Yoon H S *et al.* Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *Nature*, 1994, **371** (8): 168~ 170
- Ferguson K M, Lemmon M A, Schlessinger J *et al.* Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domains. *Cell*, 1995, **83** (6): 1037~ 1046
- Whitehead I, Kirk H, Togron C *et al.* Expression cloning of Lfc, a novel oncogene with structure similarities to guanine nucleotide exchange factor and to the regulatory region of protein kinases C. *J Biol Chem*, 1995, **270** (31): 18388~ 18395
- Pitcher J A, Touhara K, Dayne E S *et al.* Pleckstrin

homology domain-mediated membrane association and activation of the beta-adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with G beta gamma subunits and lipid. *J Biol Chem*, 1995, **270** (20): 11707~ 11710

Structure and Function of PH Domain. WANG Jifun, YAO Libo (*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China*).

Abstract The PH domain is a protein module of approximately 120 amino acid residues founded in many proteins involved in signal transduction. The PH domains are similar to each other in their three-dimensional structures, and the major structure difference among them lies in the three variable loops in the structures. The PH

domain is electrostatically-polarized and the variable loops are on the positively-charged surface, which may serve as a ligand-binding surface. So far, it has been found that PH domains can interact with the $\beta\gamma$ -subunits of G protein ($G\beta\gamma$), protein kinase C (PKC) and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP₂ or inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP₃)). All these implied that PH domain might play an important role in the interaction between the signaling molecules and help to form the signal transduction network.

Key Words PH domain, signal transduction, protein kinase C, G protein, phosphatidylinositol derivatives

受体介导的基因转移技术

李崇辉

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要 通过受体对 DNA-配体复合物的特异识别和吞入, 可以将外源基因导入特定的细胞内进行表达, 称为受体介导的基因转移技术. 对该项技术的基本方法、体内外应用研究进展以及发展方向等进行了介绍和综述.

关键词 受体, 配体, 基因转移

学科分类号 Q78

基因转移技术是生物工程和基因治疗中的关键技术之一. 随着分子生物学的发展和人类基因组计划的进展, 越来越多的基因序列得以测定. 利用基因转移技术将这些基因转移到各种细胞中进行表达, 才能进一步对这些基因的蛋白质产物进行研究或用于基因治疗. 目前, 磷酸钙共沉淀、DEAE 葡聚糖、脂质体和病毒载体等介导的基因转移技术已得到了广泛应用, 但是其共同的不足是缺乏细胞或组织特异性. 而受体介导的基因转移技术则利用特异的受体配体反应, 将外源基因导入特定的细胞中

进行表达, 以加强基因产物对这些细胞的作用而又不致于对其他细胞产生毒副作用. 而且由于是利用细胞生理性的吞入作用吸收外源基因, 可以提高基因转移效率, 减少细胞毒性. 自从 1987 年 Wu 等^[1]首次利用受体配体反应来介导基因转移成功后, 受体介导的基因转移技术得到了广泛重视和深入研究. 本文旨在对受体介导的基因转移技术进行介绍, 并对其近年来的研究进展进行综述.

收稿日期: 1997-04-14, 修回日期: 1997-07-21