

骨架蛋白 ENH 在心血管系统中作用的研究进展

朱政怡 戚彤云 张 雪 柯越海 程洪强

【摘要】 ENH 是一个含有 PDZ 和 LIM 结构域的骨架蛋白,存在多种 mRNA 剪接体,不同的剪接体具有不同的组织表达方式和功能。ENH 在心血管系统中发挥骨架蛋白的结构功能,在心脏发育和维持心脏 Z 线结构稳定中有重要作用。ENH 还能与不同的蛋白激酶结合,作为信号分子的锚定蛋白,调控信号转导,调节心肌细胞的生长、血管平滑肌细胞的增殖与迁移。

【关键词】 心血管系统;ENH;骨架蛋白;锚定蛋白
doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2016.06.009

心肌细胞与骨骼肌细胞是具有收缩功能的高度分化的肌细胞。肌小节是肌细胞结构与功能的最小单元。连接两个相邻肌小节的重要结构是 Z 线,由辅肌动蛋白 α -Actinin-2 以及与之结合的蛋白组成的蛋白复合体或蛋白质机器构成,在电镜下为特征性的暗线。编码 Z 线蛋白的基因突变是肥厚型和扩张型心肌病的主要遗传因素。研究发现,Z 线不仅维持肌小节结构稳定,还是肌细胞感受力和传递信号的关键节点^[1]。骨架蛋白 ENH(Enigma homolog)与辅肌动蛋白结合,在肌细胞中主要位于肌小节的 Z 线^[2],与其他 Z 线蛋白相互作用维持 Z 线的稳定,同时参与胞内信号的传递,是典型的 Z 线蛋白,在心血管系统中发挥重要作用。

1 ENH 概述

ENH 又名 PDLIM5,属于 PDLIM 蛋白家族^[3-5]。PDLIM 蛋白家族以含有 PDZ 和 LIM 结构域为特征,在哺乳动物中有 10 个编码基因,根据蛋白结构特征可分成 4 个亚族。其中 Enigma 亚族包括 Enigma、ENH 和 Cypher 3 个基因,编码的蛋白含有 N 端的 PDZ 结构域和 C 端的 3 个 LIM 结构域^[5]。PDZ 和 LIM 结构域的主要功能是参与蛋白间相互作用。PDZ 结构域由 80~100 个氨基酸残基组成,主要结合蛋白的疏水 C 末端。LIM 是由大约 55 个氨基酸残基组成的小结构域,含有半胱氨酸

丰富的保守序列 CX₂CX₁₆₋₂₃HX₂CX₂CX₁₆₋₂₁CX₂(Cys/His/Asp),与锌离子(Zn²⁺)结合形成特殊双锌指结构,不与核酸分子结合,介导蛋白间相互作用^[5]。ENH 通过 PDZ 和 LIM 结构域与众多蛋白相互作用,形成蛋白复合体,分别发挥细胞骨架和信号转导作用。见表 1。

表 1 与 ENH 相互作用的蛋白列表

蛋白	结构域	功能
辅肌动蛋白(α -Actinin-2)	PDZ	肌小节 Z 线蛋白
Calsarcin-1	PDZ	肌小节 Z 线蛋白
Myotilin	PDZ	肌小节 Z 线蛋白
L 型钙离子通道 (L-type calcium channel)	PDZ	肌细胞钙离子通道
蛋白激酶 C(PKC)	LIM	蛋白激酶
蛋白激酶 D1(PKD1)	LIM	蛋白激酶
环磷腺苷效应元件结合 蛋白(CREB)	LIM	cAMP 相关转录因子
蛋白激酶 A(PKA)	N/A	蛋白激酶
AMP 活化蛋白激酶 (AMPK)	N/A	蛋白激酶
信号传导与转录激活 因子 3(STAT3)	N/A	转录因子

注:ENH 选择性与 PKC β 1、 γ 和 ϵ 结合,不与 PKC α 、 δ 和 ξ 结合;N/A 为相互作用的结构域未进一步分析

2 ENH mRNA 剪接

在哺乳动物中,大于 95% 的 mRNA 存在选择性剪接,基因通过剪接可以产生多种蛋白^[6]。ENH

基金项目:国家自然科学基金(81170117,31471258)
作者单位:310058 杭州,浙江大学基础医学院病理与病理生理学系
通信作者:程洪强,Email:hqcheng11@zju.edu.cn

mRNA 存在复杂的剪接,产生的蛋白可以分成两组,含有 3 个 LIM 结构域的长剪接体和不含 LIM 结构域的短剪接体,长短剪接体又各自包含 4~5 种剪接体^[7-8]。小鼠的 ENH 基因包含 20 个外显子,外显子 1~3 编码 N 端 PDZ 结构域,外显子 17~20 编码 C 端的 3 个 LIM 结构域。外显子 5 存在长(5')和短(5'')两种形式,产生 ENH1a(5')和 ENH1b(5'')两种产物,还可以与外显子 12~14 组合产生 3 种不同剪接产物(ENH1c~ENH1e)。同样,外显子 5 和 5''与外显子 6~8 组合可产生 4 种 ENH 短剪接产物(ENH2、ENH3a、ENH3b 和 ENH4)。

ENH mRNA 剪接有组织特异性,长剪接体在多种组织中表达,包括心脏、大脑、脾脏、肝脏和肾脏,而短剪接体只在心肌和骨骼肌中高表达^[4, 9]。ENH mRNA 剪接还与发育过程有关,在心脏和骨骼肌中,长剪接体是胚胎型,在胚胎中表达高,出生后逐渐降低;短剪接体是成体型,在胚胎中表达低,出生后逐渐升高^[8, 10]。在骨骼肌细胞 C2C12 体外分化过程中,不同的 ENH 剪接体具有类似的表达模式^[8, 11]。这种与发育相关的剪接模式在 Enigma 亚族的 Cypher mRNA 上也存在^[12]。此外,ENH mRNA 剪接还与疾病相关,在心肌肥厚小鼠心脏中,ENH mRNA 剪接转变成胚胎型,即长剪接体表达升高,短剪接体表达降低^[10]。因此 ENH 剪接方式的变化可能参与心肌病的病理发生过程^[13-14]。

3 ENH 在心脏发育中的作用

心脏是胚胎早期发育并发挥功能的器官。ENH 在小鼠胚胎发育早期的心脏区高表达^[15],可能是心脏发育早期重要转录因子 Mesp1 和 Mef2A 作用的结果^[16-17],表明 ENH 可能在心脏发育过程中发挥作用。然而 ENH 基因敲除小鼠胚胎没有明显的心脏发育缺陷,推测是由于 ENH 同亚族的 Cypher 或 Enigma 发挥了替代作用^[7]。与 ENH 相似,Cypher 在小鼠心脏发育早期高表达,Cypher 敲除小鼠也没有明显的发育缺陷^[18]。而 ENH/Cypher 双敲除小鼠在胚胎发育早期死亡,有明显的心脏发育缺陷,包括心管扩张、心包积液、心室壁变薄以及心脏发育迟缓^[15],提示 Enigma 亚族的 ENH 与 Cypher 在心脏发育中确实存在功能上的冗余。在一项对室间隔缺损胎儿全基因组 DNA 甲基化修饰的分析中发现,室间隔缺损的胎儿 ENH 启动子甲基化水平低,室间隔缺损与 ENH 的高表达有关^[19]。

ENH 的不同剪接体对心肌发育有不同的作用。体外研究发现 ENH 长剪接体(ENH1a)能增加肌细胞分化转录因子 MyoD 和 Myogenin 的表达,促进心肌细胞肥大,而短剪接体(ENH4)具有相反的作用,可抑制苯肾上腺素诱导的心肌细胞肥大^[11]。

4 ENH 在维持心血管系统结构中的作用

免疫荧光染色显示 ENH 主要分布在心肌细胞肌小节的 Z 线上,因此 ENH 可能与肌细胞的收缩相关。ENH 敲除小鼠可出现扩张型心肌病,表现为左心室壁变薄、左心室腔增大、心脏收缩和射血功能减弱^[7]。ENH 敲除还会使小鼠心肌细胞的基因表达向胚胎型偏转(如心房利钠肽、B 型利钠肽、 β 肌球蛋白重链、骨骼肌肌动蛋白等表达升高)。ENH 的缺失导致与其相互作用的 Z 线蛋白 Calsarcin-1 和 Cypher 短剪接体 Cypher2c 显著减少。超显微结构分析显示 ENH 敲除小鼠肌小节 Z 线增宽,结构混乱。这些结果说明 ENH 参与维持心肌肌小节 Z 线结构的稳定。

在压力和损伤作用下,心脏会发生重构,表现为心肌纤维化和心肌细胞病理性生长,导致心力衰竭发生。心脏重构时,心脏成纤维细胞通过外泌体包裹的微小 RNA-21(miR-21)作用于心肌细胞,降低 miR-21 靶标基因 ENH 的表达,诱导心肌病理性肥厚,提示 ENH 在维持心肌稳态中发挥重要作用^[20]。人类 ENH 的编码基因是否存在与心肌病相关的突变及 ENH 在人类心血管结构中的作用尚不清楚。

5 ENH 在心血管系统中的信号转导作用

ENH 在心血管系统中还发挥信号转导作用。ENH 是在寻找与蛋白激酶 C(PKC) β 1 相互作用的新蛋白时被发现的,ENH 的 LIM 结构域与 PKC β 1 的 N 端 V1 区结合,可被 PKC 磷酸化^[4]。敲除 ENH 不影响心脏中 PKC 的表达^[7]。在 PKC 的不同亚型中,ENH 与 PKC β 1、 γ 和 ϵ 结合,而不与 PKC α 、 δ 和 ξ 结合^[4]。Enigma 亚族的 Cypher 能与上述 6 种 PKC 亚型结合^[21],而 Enigma 只与 PKC α 、 β 1 和 ξ 结合,说明 Enigma 亚族蛋白的 LIM 结构域都能与 PKC 结合,但通过结合不同的 PKC 亚型表现功能上的特异性。ENH 可招募 PKC β 1 到细胞膜并增强其激酶活性,而不需要 PKC 的活化分子如二酰基甘油或者磷脂酰丝氨酸的参与^[22]。Enigma 亚族中 Cypher 和 Enigma 也具有相同的功能,但 PDLIM 蛋白家族中其他成员仅能与 PKC 结合,不具有活化 PKC 的功能。活化的 PKC 能够直

接磷酸化环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB),或者通过活化蛋白激酶 D1(PKD1),后者再磷酸化 CREB^[23],磷酸化的 CREB 进入心肌细胞核发挥转录因子的功能,促进心肌细胞生长。这一过程是通过 ENH 的 LIM 结构域实现的,因此不含 LIM 结构域的 ENH 短剪接体不具有该功能,相反,ENH 短剪接体可抑制 PKC 活化、CREB 磷酸化以及心肌的病理性肥厚。

ENH 还可与蛋白激酶 A(PKA)和 PKD 相互作用^[24-25]。ENH 通过 PDZ 结构域结合心肌细胞 L-型钙离子通道(L-type calcium channel, LTCC),协助 PKD1 或 PKA 磷酸化 LTCC 胞内段(如 1928 位点的丝氨酸残基 Ser1928),调节细胞钙流,参与肾上腺素能受体介导的增强心肌收缩的信号转导。ENH 在这方面的作用可能与 Cypher 存在重叠^[24]。在对急性心肌梗死动物心脏的磷酸化蛋白质谱分析中发现,ENH 和肌钙蛋白 I(cTnI)磷酸化水平显著下降,其中,ENH 的 Ser118 和 cTnI 的 Ser22/23 位点是 PKA 的作用位点^[26]。ENH 等肌纤维蛋白的磷酸化形式可能在维持心脏结构与信号转导方面都发挥了重要作用。

除了心肌,ENH 还在血管平滑肌中发挥重要的作用。AMP 活化蛋白激酶(AMPK)是细胞内的能量传感器,通过调控微管和微丝的动态组装过程调节细胞的极性形成和运动。在血管平滑肌细胞中,AMPK 通过磷酸化 ENH(Ser177)抑制 Rac1 的活性,下游分子 Arp2/3 蛋白随之离开细胞片状伪足前沿,破坏了应力纤维的组装,抑制了伪足形成和细胞迁移^[27]。ENH 在肺动脉高压患者和小鼠模型的肺动脉平滑肌中表达升高,降低 ENH 的表达会活化转化生长因子 β (TGF β)的信号通路,促进肺动脉高压的发生^[28]。ENH 可能成为肺动脉高压治疗的新靶点^[29]。

6 结语

骨架蛋白 ENH 通过 PDZ 和 LIM 结构域与其它蛋白结合维持心肌细胞结构,尤其是心肌细胞在收缩过程中肌小节的结构。ENH 还具有信号转导方面的功能,可与蛋白激酶(PKA、PKC、PKD1 和 AMPK)及其底物直接作用,发挥锚定蛋白的功能,参与心肌细胞和血管平滑肌细胞的生长、增殖、分化和迁移。深入研究 ENH 在心血管系统中的作用,有助于设计与开发以骨架蛋白为靶点的新型心血管药物。

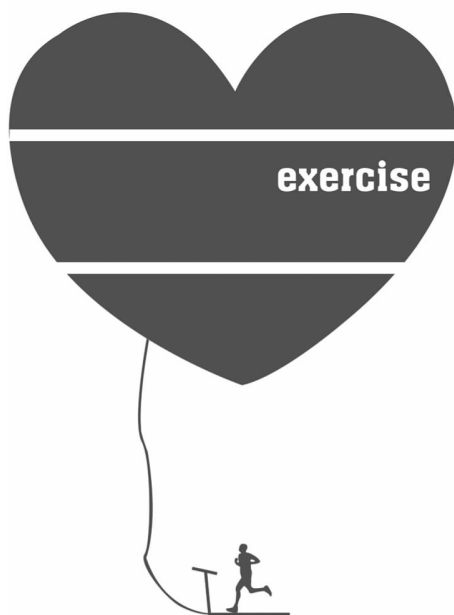
参 考 文 献

- [1] Frank D, Frey N. Cardiac Z-disc signaling network[J]. J Biol Chem, 2011,286(12):9897-9904.
- [2] Nakagawa N, Hoshijima M, Oyasu M, et al. ENH, containing PDZ and LIM domains, heart/skeletal muscle-specific protein, associates with cytoskeletal proteins through the PDZ domain[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 272(2):505-512.
- [3] te Velthuis AJ, Bagowski CP. PDZ and LIM domain-encoding genes: molecular interactions and their role in development[J]. Scientific World Journal, 2007,7:1470-1492.
- [4] Kuroda S, Tokunaga C, Kiyohara Y, et al. Protein-protein interaction of zinc finger LIM domains with protein kinase C [J]. J Biol Chem, 1996, 271(49):31029-31032.
- [5] Zheng M, Cheng H, Banerjee I, et al. ALP/Enigma PDZ-LIM domain proteins in the heart[J]. J Mol Cell Biol, 2010, 2(2):96-102.
- [6] van den Hoogenhof MM, Pinto YM, Creemers EE. RNA splicing: regulation and dysregulation in the heart[J]. Circ Res, 2016,118(3):454-468.
- [7] Cheng H, Kimura K, Peter AK, et al. Loss of enigma homolog protein results in dilated cardiomyopathy[J]. Circ Res, 2010,107(3):348-356.
- [8] Ito J, Hashimoto T, Nakamura S, et al. Splicing transitions of the anchoring protein ENH during striated muscle development[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012,421(2):232-238.
- [9] Niederlander N, Fayein NA, Auffray C, et al. Characterization of a new human isoform of the enigma homolog family specifically expressed in skeletal muscle[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004,325(4):1304-1311.
- [10] Yamazaki T, Walchli S, Fujita T, et al. Splice variants of enigma homolog, differentially expressed during heart development, promote or prevent hypertrophy [J]. Cardiovasc Res, 2010, 86(3):374-382.
- [11] Ito J, Takita M, Takimoto K, et al. Enigma homolog 1 promotes myogenic gene expression and differentiation of C2C12 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013,435(3):483-487.
- [12] Huang C, Zhou Q, Liang P, et al. Characterization and in vivo functional analysis of splice variants of cypher[J]. J Biol Chem, 2003,278(9):7360-7365.
- [13] Dixon DM, Choi J, El-Ghazali A, et al. Loss of muscleblind-like 1 results in cardiac pathology and persistence of embryonic splice isoforms[J]. Sci Rep, 2015,5:9042. .
- [14] Batra R, Charizanis K, Manchanda M, et al. Loss of MBNL leads to disruption of developmentally regulated alternative polyadenylation in RNA-mediated disease [J]. Mol Cell, 2014,56(2):311-322.
- [15] Mu Y, Jing R, Peter AK, et al. Cypher and Enigma homolog protein are essential for cardiac development and embryonic survival[J]. J Am Heart Assoc, 2015,4(5):e001950.

- [16] Bondue A, Lapouge G, Paulissen C, et al. Mesp1 acts as a master regulator of multipotent cardiovascular progenitor specification[J]. Cell Stem Cell, 2008,3(1):69-84.
- [17] Ewen EP, Snyder CM, Wilson M, et al. The Mef2A transcription factor coordinately regulates a costamere gene program in cardiac muscle[J]. J Biol Chem, 2011,286(34):29644-29653.
- [18] Zhou Q, Chu PH, Huang C, et al. Ablation of Cypher, a PDZ-LIM domain Z-line protein, causes a severe form of congenital myopathy[J]. J Cell Biol, 2001,155(4):605-612.
- [19] Zhu C, Yu ZB, Chen XH, et al. Screening for differential methylation status in fetal myocardial tissue samples with ventricular septal defects by promoter methylation microarrays[J]. Mol Med Rep, 2011,4(1):137-143.
- [20] Bang C, Batkai S, Dangwal S, et al. Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy[J]. J Clin Invest, 2014,124(5):2136-2146.
- [21] Zhou Q, Ruiz-Lozano P, Martone ME, et al. Cypher, a striated muscle-restricted PDZ and LIM domain-containing protein, binds to alpha-actinin-2 and protein kinase C[J]. J Biol Chem, 1999,274(28):19807-19813.
- [22] Maturana AD, Nakagawa N, Yoshimoto N, et al. LIM domains regulate protein kinase C activity: a novel molecular function[J]. Cell Signal, 2011,23(5):928-934.
- [23] Ito J, Iijima M, Yoshimoto N, et al. Scaffold protein enigma homolog activates CREB whereas a short splice variant prevents CREB activation in cardiomyocytes[J]. Cell Signal, 2015,27(12):2425-2433.
- [24] Lin C, Guo X, Lange S, et al. Cypher/ZASP is a novel A-kinase anchoring protein[J]. J Biol Chem, 2013,288(41):29403-29413.
- [25] Maturana AD, Walchli S, Iwata M, et al. Enigma homolog 1 scaffolds protein kinase D1 to regulate the activity of the cardiac L-type voltage-gated calcium channel[J]. Cardiovasc Res, 2008,78(3):458-465.
- [26] Peng Y, Gregorich ZR, Valeja SG, et al. Top-down proteomics reveals concerted reductions in myofilament and Z-disc protein phosphorylation after acute myocardial infarction[J]. Mol Cell Proteomics, 2014,13(10):2752-2764.
- [27] Yan Y, Tsukamoto O, Nakano A, et al. Augmented AMPK activity inhibits cell migration by phosphorylating the novel substrate Pdlim5[J]. Nat Commun, 2015,6:6137.
- [28] Chen T, Zhou G, Zhou Q, et al. Loss of microRNA-17 approximately 92 in smooth muscle cells attenuates experimental pulmonary hypertension via induction of PDZ and LIM domain 5[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2015,191(6):678-692.
- [29] Cheng H, Chen T, Tor M, et al. A High-throughput screening platform targeting PDLIM5 for pulmonary hypertension[J]. J Biomol Screen, 2016, 21(4):333-341.

(收稿:2016-06-01 修回:2016-08-11)

(本文编辑:胡晓静)



运动演绎精彩

健康成就未来