

DDEF1的结构和功能研究进展

刘秋艳¹ 许瑞安¹ 杨云青²

(1. 华侨大学分子药理学研究所分子药物教育部工程研究中心 福建泉州 362021;

2. 厦门大学生命科学学院生物医学科学 应激细胞生物学国家重点实验室 福建厦门 361005)

【摘要】DDEF1又称为ASAP3(ACAP4或UPLC1,属于小G蛋白家族中Arfs家族的一种Arf GAP。人的肝和肺是DDEF1表达水平较高的两个组织^[1]。了解DDEF1的结构及功能,可以为肝癌或其它癌症患者提供一种新的基因治疗方案。

【关键词】DDEF1 酶学特异性 细胞迁移 膜泡运输

【中图分类号】TB34

【文献标识码】A

【文章编号】1672-5654(2012)03(a)-0170-02

1 DDEF1的结构

人DDEF1基因位于染色体1p36.13,由903个氨基酸组成^[1],包含2个位于氨基端的coiled-coils结构、一个pleckstrin homology结构、一个Arf GAP结构和2个ankyrin重复序列^[1-2]。在结构上,它可能属于Arfs的GTP酶激活蛋白AZAP家族;在序列上,DDEF1与DDEF1/ASAPI和APG3/DDEFZ有相对较高的一致性,但DDEF1比它们的序列要分别短100~250个氨基酸,而且DDEF1分子中没有特征性SH3结构;在结构域的分布上,DDEF1与ACAPI/2更相似,但它比ACAPI/2要多出100多个氨基酸。由此,方志友实验组将其命名为ACAP4^[3]。

2 DDEF1的功能研究进展

2.1 DDEF1的酶学特异性研究

Fang等^[2]利用免疫共沉淀法,分别选择Arf1、Arf5及Arf6作为三类Arfs代表,结果DDEF1不能被Arf1及Arf5免疫共沉淀,只能被Arf6免疫共沉淀。Ismail等^[4]以Arf1、Arf4和Arf6作为三类Arfs代表研究DDEF1对Arfs-GTP的水解作用,发现DDEF1对Arf6-GTP的水解速率比Arf1-GTP和Arf4-GTP的水解速率高。这表明,DDEF1的特异性底物更倾向于Arf6。

然而,Ha VL等^[5]体外实验说明,全长DDEF1的GTP水解活性ARF5>ARF1>ARF6。Ha VL等指出,Fang实验中使用GST-ARF融合蛋白作底物,而GST的分子量比ARF大,GST很可能影响ARF蛋白的空间结构,导致结果不同^[1]。

2.2 DDEF1对底物Arf-GTP水解的作用机制研究

Fang等^[2]利用薄层层析法证明,磷脂调节DDEF1的GAP活性,在体系中加入PIP₂和PA后,DDEF1的GAP活性大大提高;并且加入PIP₂和PA后,PH结构缺失与未缺失的DDEF1的GAP活性差不多。Ha VL等^[5]也证实,在体系中添加PIP、PIP₂或PIP₃能激活DDEF1的GAP活性。Fang等认为,PH结构可能妨碍Arf-GTP与GAP结构之间相互作用,当反应体系中加入磷脂后,磷脂与PH结构结合,DDEF1空间结构改变,暴露出GAP结构,使Arf-GTP与GAP之间易于结合。这些研究初步揭示了DDEF1靶向Arf6-GTP并使其水解的机制。

2.3 DDEF1在调节细胞迁移中的作用研究

Fang等^[2]抑制MDA-MB-231细胞中DDEF1的表达,发现与对照组相比抑制创伤复原的速度。在细胞中分别转染野生型DDEF1及GAP结构突变型DDEF1,发现GAP结构突变的DDEF1能够抑制创伤复原速度,这进一步说明,DDEF1对细胞迁移的调节作用是通过其GAP结构使Arf6-GTP转变成失活型Arf6-GDP来实现的。Ha VL等^[5]的划痕损伤实验表明,MDA-MB-231细胞中抑制DDEF1表达后,与对照组相比,细胞迁移速度减慢。

综上所述,DDEF1能够促进肿瘤细胞迁移,但其是作为Arf6的GAP或通过其他机制调控肿瘤细胞迁移还有待进一步研究。

2.4 DDEF1在调节膜泡运输中的作用研究

王峰松等^[6]阐述了DDEF1在胃

壁细胞酸分泌过程中的重要作用。该小组认为,当壁细胞接受到泌酸信号后,DDEF1以其N端1-400AA片段与磷酸化的Ezrin结合的方式被募集到顶膜,Arf6、DDEF1及Ezrin三者形成顶膜信号复合物,共同介导H/K-ATPase质子泵向顶膜转运。Arf6的GTP/GDP循环对活化泌酸通路是必须的。

Xue Yu等^[7]的实验揭示了与DDEF1有关的细胞迁移过程中的膜泡运输。该小组认为,EGF刺激诱导DDEF1第733位酪氨酸磷酸化,继而DDEF1与Grb2结合,这抑制了EGF刺激后内吞入胞内的Integrin β 1重新返回到细胞膜上,因为Integrin β 1不断地内吞入胞内,再重新回到细胞膜上,Integrin β 1的循环对细胞运动非常关键^[8],所以DDEF1-Grb2间的作用抑制Integrin β 1调节的细胞迁移。

综上所述,DDEF1无论参与胃酸分泌过程或参与细胞迁移过程中的膜泡运输,都需要通过其GAP调节Arf6实现。在体内,DDEF1可以通过1-300AA的片段形成同源或异源二聚体,参与膜泡运输,而这种作用不依赖GAP活性。

3 结语

DDEF1蛋白多结构域的特点决定了其功能多样性。对于DDEF1酶学特异性,更多实验^[6]支持Fang的观点,即DDEF1更易于与Arf6相互作用。DDEF1可通过GAP调节细胞内膜泡运输,也可不依赖GAP。DDEF1调节的细胞迁移和膜泡运输相联系,DDEF1可

(下转172页)

2.6 分享双阳夫妻案例增强单阳家庭责任感意识

感染HIV严重影响了感染者的正常生活,加上目前人们对HIV感染者和艾滋病患者带有偏见和歧视,他们承受的心理压力要比常人严重得多^[2]。现实生活中,8个双阳家庭夫妻发病时出现各种机会性感染的痛苦,不停就医、买药时经济上的拮据,病毒扩散导致的体力不支,情感问题纠结时的挣扎等等案例深深触动随访管理的医务人员。与单阳家庭夫妻分享上述案例故事后,他们会意识到自己是不幸中的万幸,会更加珍惜对方没有被感染的夫妻生活,同时增强了家庭责任感意识。

2.7 安全套的推广和使用确保了性生活的安全

医务人员在对艾滋病单阳家庭进行性伴告知时了解到,29对艾滋病单阳家庭夫妻性生活中安全套使用率几乎为零。安全套除了避孕功能外,还可预防性病和艾滋病的传播,是阻断经性接触传播艾滋病的重要手段^[3],安全套的推广和使用确保了艾滋病单阳家庭性生活的安全。

3 结果

5年间,先后接受艾滋病综合关怀29个艾滋病单阳家庭夫妻阴性者一方每年进行HIV抗体检测1次(快速法和酶联法),新增HIV抗体阳性1例(女性),其余28

例为阴性。新增HIV抗体阳性者被感染原因主要是受传宗接代观念影响,在隐瞒医务人员情况下盲目放弃使用安全套,结果阳性丈夫导致阴性配偶感染。

4 讨论

性,是夫妻生活中一部分,是维系夫妻感情和家庭生活必不可少的情感纽带。对29个艾滋病单阳家庭实施综合关怀中,促使他们性行为发生安全性转变必不可少连锁性环节有5个。(1)在感染者配偶的告知技巧上采用了本人告知和医务人员告知相结合的方式,这样不仅弥补因感染者本人对配偶告知的技巧、方法和防艾知识面不足等因素引起的夫妻双方压力过大,医务人员又可占在一个中立位置为他们分析将来生活中可能出现的种种压力和问题,让他们更加清楚自己的责任和义务;(2)在家庭随访上采用先电话联系后在自愿的原则下进行面对面交流,坦诚相待的工作方式能让他们真正体会到被尊重的感觉,容易获取他们生活中的真实信息;(3)讲诚信的做人原则和实实在在的关怀救助可以拉近医患间距离,构建和谐医患关系,更能赢得他们对防艾工作者信任;(4)增强阴性一方自我保护意识,让他们明白HIV抗体检测只是证实是否感染的一种手段而并非是预防艾滋病的方法,从而让每年一次HIV抗体检测从被动接受变为主动要求;(5)夫妻双方安全性教

育是家庭随访必不可少的内容。

综合关怀是对HIV感染者/艾滋病患者开展行为干预工作最好的措施和方法,也是铺垫、搭建、构建和稳固医患关系必不可少的工作手段,它在艾滋病单阳家庭夫妻性行为发生安全性转变过程中起到积极促进作用。阴性配偶一方自我保护意识增强,夫妻双方家庭与社会责任感的建立,会促使阳性一方为对方着想的做人原则在性生活中自觉使用安全套,性安全才是控制艾滋病婚内传播的关键。

参考文献

- [1] 袁建华,刘康迈,徐熙阳,等.艾滋病对我国社会经济的影响[J].科学决策,2009(3):1~18.
- [2] 吴卫群,黄丽欢,马丽萍.HIV感染者和患者心理状况的调查分析[J].中国中医药现代远程教育,2011(8):109~112.
- [3] 孔亮,田庆丰,陈冰,等.河南省HIV/AIDS患者避孕套使用情况调查[J].中国公共卫生,2008,24(12):1413~1414.

【收稿日期】2012-01-29

(上接170页)

以通过调节膜泡运输来调控细胞迁移。DDEFL1的作用机理还需要更多的实验来揭示,以便于为肝癌患者提供一种更好的治疗方案。

参考文献

- [1] 孔芳.腺病毒DDEFL1 shRNA干涉载体的构建以及DDEFL1生物学功能的初步探讨[D].厦门大学硕士学位论文,2009.
- [2] Fang ZY, Miao Y, Ding X, et al. Proteomic identification and functional characterization of a novel ARF6 GTPase-activating protein, ACAP4[J]. Mol. Cell Proteomics, 2006, 5(8):1437.

[3] 方志友.一个新的Arf6特异性GTP酶激活蛋白ACAP4的发现与功能研究[D].中国科学技术大学博士学位论文,2006.

[4] Ismail SA, Vetter IR, Sot B et al. The Structure of an Arf-ArfGAP Complex Reveals a Ca²⁺ Regulatory Mechanism[J]. Cell, 2010, 141:812.

[5] Ha VL, Bharti S, Inoue H, et al. ASAP3 is a focal adhesion-associated Arf GAP that functions in cell migration and invasion [J]. J. Biol. Chem, 2008, 283(22):14~15.

[6] 王峰松. Ezrin-ACAP4蛋白复合物在胞吐动力学调控中的功能研究[D].中国科学技术大学博士学位论文,2008.

[7] Yu X, Wang FS, Liu HS, et al. ACAP4

Protein Cooperates with Grb2 Protein to Orchestrate Epidermal Growth Factor-stimulated Integrinβ1 Recycling in Cell Migration[J]. J. Biol. Chem, 2011, 286(51): 43735.

[8] Caswell PT, Norman, J.C. Traffic, 2006, 7:14.

【收稿日期】2012-01-28