

蛋白磷酸酶 PP2A 的结构及其肿瘤抑制因子功能

李天祝 向本琼*

(北京师范大学生命科学学院, 北京 100088)

摘要 蛋白磷酸酶在细胞的生命活动中起着十分重要的作用, 蛋白磷酸酶 2A (protein phosphatase 2A, PP2A) 作为蛋白磷酸酶家族中十分重要的一员, 它几乎与所有真核细胞的生命活动都有密不可分的关系. 2006 年, PP2A 核心酶和全酶晶体结构的陆续破解对于深入了解 PP2A 自身的结构和亚基之间的相互作用, 以及其与结合蛋白作用的机制都有重大的影响. 随着 PP2A 与肿瘤相关性的一系列新研究成果的不断涌现, PP2A 在肿瘤发生和细胞迁移中也彰显出十分关键的作用. 重点介绍 PP2A 的组成与结构、催化亚基的特殊修饰、亚基之间的相互作用关系以及 PP2A 作为一种新的肿瘤抑制因子的生物学功能.

关键词 蛋白磷酸酶, PP2A, 结构与功能, 肿瘤抑制因子
学科分类号 Q71

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00420

蛋白质的磷酸化与去磷酸化调节着几乎每一个真核生物体生命活动中的所有过程, 包括细胞的增殖、发育和分化、新陈代谢等. 这种蛋白质的磷酸化与去磷酸化作用受到蛋白激酶 (protein kinases, PK) 和蛋白磷酸酶 (protein phosphatases, PP) 的共同调控.

蛋白磷酸酶 2A (protein phosphatase 2A, PP2A) 作为磷酸化丝氨酸 / 苏氨酸残基蛋白磷酸酶 (phosphoserine and phosphothreonine residues phosphatase, PPP) 家族中地位显赫的一员, 参与了细胞代谢、DNA 复制、基因表达、信号转导、细胞周期、细胞分化及凋亡等细胞活动过程, 尤为重要. 近年来许多实验都说明了 PP2A 在抑制肿瘤方面也起到了十分重要的作用^[1,2]. 因此, 最近科学家们投入了更大的精力去梳理和解析 PP2A 上下游极其纷繁复杂的细胞信号通路、PP2A 的结构及其行使磷酸酶功能的方式, 并取得了一些极为重要的进展.

1 PP2A 的组成与结构

1.1 PP2A 的组成

PP2A 是由催化亚基——C 亚基 (catalytic subunit C, PP2A_C) 和结构亚基——A 亚基 (scaffolding subunit A, PR65) 先形成核心酶 (PP2A core enzyme, PP2A_D), 然后再和各种可变的调节亚基——B 亚基 (regulatory subunit B) 组成异三聚体复合物——

PP2A 全酶 (PP2A heterotrimeric holoenzyme, PP2A_T) (图 1). 在生物体内有三分之一的 PP2A 以 PP2A_D 形式存在, 其余的以 PP2A_T 形式存在. 但在细胞内, PP2A 到底是先直接形成核心酶, 还是先形成一定数量的 C 亚基, 然后再结合 A 亚基形成核心酶, 之后再同 B 亚基结合, 抑或是这两种方式都可能存在, 这个问题仍有争议^[2].



Fig. 1 PP2A heterotrimeric holoenzyme complex^[1,2]

图 1 PP2A 异三聚体全酶的组成示意图^[1,2]

PP2A 三聚体蛋白包括催化亚基、结构亚基和调节亚基三部分, 其中每一个亚基又含有不同的亚型.

催化亚基 PP2A_C 是一个含 Zn²⁺ 和 Fe²⁺ 的金属酶, 由 309 个氨基酸残基组成, 分子质量约为 36 ku. 序列分析表明, PP2A_C 有 α 和 β 两种异构体, 由两个不同的基因编码, 同源性高达 97%. PP2A_C 在物种之间具有很强的保守性, 在酿酒酵

* 通讯联系人.

Tel: 010-58807721, E-mail: xiangbq@bnu.edu.cn

收稿日期: 2008-05-30, 接受日期: 2008-09-07

母、拟南芥、植物甘蓝型油菜、爪蟾、果蝇等不同真核生物内 PP2A_C 的序列具有让人惊讶的相似性和保守性, 是一个进化相当保守的蛋白质^[2]. 同时, PP2A_C 与该家族中的其他成员诸如 PP1、PP2B、PP4、PP5、PP6 以及 PP7 的催化结构域也具有非常高的同源性. PP2A_C 在细胞内的翻译水平受到细胞自身的严密调控, 使 PP2A 表达水平相对恒定^[2].

在细胞内, PP2A_C 一方面受到 Thr304 和 Tyr307 两个位点的磷酸化修饰, 其中 Thr304 的磷酸化受一种自磷酸化激活的蛋白激酶 (autophosphorylate-activated protein kinase) 的调控^[3], 而 Tyr307 是 p60v-src, p56lck, 表皮生长因子以及胰岛素受体的磷酸化靶位点^[4]; 另一方面 PP2A 还受羧基最末端 Leu309 的可逆甲基化修饰, 由亮氨酸甲基转移酶 (leucine carboxyl methyltransferase, LCMT) 和羧基端甲基酯酶 (carboxy methyltransferase, PME-1) 来实现这种可逆甲基化作用, 该羧基端的甲基化在 PPP 家族中是普遍存在且高度保守, 它很可能参与了非常重要的生物学事件^[5,6].

A 亚基作为结构亚基与 PP2A_C 紧密结合, 并起到支架蛋白的作用连接 B、C 两个亚基, 分子质量为 65 ku. 在哺乳动物中 A 亚基有 α 和 β 两种异构体, 由两个不同的基因编码, 具有 86% 的同源性. 虽然两种异构体具有很高的同源性, 但小鼠 A α 基因被敲除的实验却证明 A β 并不能替换前者的生物学功能^[2].

调节亚基 B 是 PP2A_C 的靶蛋白, 具有结构多样性和缺乏序列同源性的特点. 可分为 B/PR55、B'/PR61、B''/PR72 和 B'''/PR93 四个蛋白质家族, 有的学者也把 B'' 和 B''' 都归为 B'' 家族. B 亚基家族之间的同源性非常低, 但 B 亚基家族中不同的成员具有高度的组织特异性和不同的亚细胞结构定位, 这决定了 PP2A_T 的底物特异性以及特定发育阶段的不同存在形式, 进而介导 PP2A 在不同信号转导中的特定作用^[2].

B/PR55 家族蛋白的分子质量为 55 ku, 有 α 、 β 、 γ 和 δ 四个异构体, α 和 δ 分布广泛, 而 β 和 γ 则主要分布于脑组织中. α 、 β 、 γ 异构体随发育的情况而被调控, 出生后随 β 异构体的降低, γ 异构体急剧上升. B'(PR56/PR61) 家族有 α 、 β 、 γ 、 δ 和 ϵ 五个异构体, 而 β 又具有 $\beta 1$ 和 $\beta 2$ 两个亚型, γ 具有 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ 和 $\gamma 5$ 五个亚型, β 和 δ 主要存在于脑组织中, α 、 β 和 ϵ 主要存在于胞浆中,

$\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 和 $\gamma 3$ 主要存在于细胞核中. 除 $\gamma 1$ 外, 其他均为磷蛋白, 这能促进其与 PP2A 核心酶的结合从而调节 PP2A 的磷酸酶活性. 它们均具有高度保守的中心区域, 仅 N、C 端多变, 这些保守区介导了它们与 A 结构亚基和催化亚基 C 的相互作用, 而可变的 N、C 端决定了 PP2A 的底物特异性和亚细胞定位等. B'' (PR72) 家族有 PR72、PR130、PR59 和 PR48 四类蛋白. PR72 和 PR130 是同一基因的不同剪接产物, 具有不同的 N 端, PR130 分布广泛, 而 PR72 主要分布于心脏和骨骼肌中. PR59 与 PR72 具有 56% 的同源性和 65% 的相似性, 除肌肉组织外, 均有分布. PR59 和 PR48 之间具有 68% 的同源性, 仅分布于细胞核中. B''' (PR93/PR110) 家族的 Striatin (PR110) 和 SG2NA (S/G2 nuclear autoantigen, PR93) 是两种钙调素结合蛋白, 能与 PP2A_D 形成稳定的复合物, 它们和一些其他的蛋白质一起介导 PP2A 参与 Ca²⁺ 调节的信号途径^[7].

上述不同的调节亚基和 PP2A_D 形成至少 75 种以上不同的 PP2A 同工酶, 这些 PP2A 同工酶具有不同的组织和亚细胞定位、不同底物的特异性以及不同的生物学调节方式. 除前面提到的传统意义上的 B 亚基外, 在细胞内还有相当数量的其他蛋白质与 PP2A_D 结合, 在一定程度上它们也起到调节亚基的功能, 但在细胞层面上专家们宁愿把这些蛋白质看成 PP2A 的下游蛋白, 它们与 PP2A 结合之后改变 PP2A 的活性, 然后使其在细胞通路中的作用被启动或是关闭. SV40 病毒的小 T 抗原 (SV40 small T antigen, SVST) 便是其中之一, 它与 PP2A_D 结合, 降低 PP2A 的活性, 使 PP2A 下游的包括 MAPK, ERK, PI-3 kinase 等在内的重要通路被切断, 而 SV40 大 T 抗原主要与 P53, RB 等和细胞周期相关的蛋白质结合, 阻断其下游通路, 导致细胞的转移和癌变. 与 SV40 小 T 抗原类似, 多瘤病毒的中型 T 抗原和小 T 抗原也同样与 PP2A 的核心酶结合, 使 PP2A 失活, 导致细胞调控的混乱从而引起癌变^[8].

1.2 PP2A 的结构

PP2A 作为蛋白磷酸酶 PPP 家族中十分重要的一员, 其催化亚基的催化结构域与该家族其他成员的催化结构域具有非常高的同源性, 但 PP2A 却对于抑制剂冈田酸 (okadaic acid, OA) 和 MCLR (microcystin-LR) 的敏感度更高, 那么这些抑制剂到底是如何起到其特异的抑制作用以及它们与 PP2A

的特异结合位点何在, 这一直是该领域的热点问题之一。

2006年, Washington大学和Princeton大学的研究小组相继破解了PP2A_D和PP2A_T与其抑制剂结合的复合物的晶体结构。PP2A_D晶体长130Å、宽60Å、高80Å^[9](图2a), PP2A_T晶体长90Å、宽90Å、高70Å^[10,11](图2b)。C亚基与这两种抑制剂的复合物的晶体结构显示, OA和MCLR与C亚基结合从而抑制催化活性的结构和结合方式是几乎一致的(图2c), 抑制剂结合在活性位点的氨基酸包括PP2A_C活性中心一端的Gln122, Ile123, His191和Trp200以及另一端包括Leu243, Tyr265, Cys266, Arg268和Cys269在内的氨基酸, 其中Tyr265, Cys266, Arg268和Cys269都是处在β12和β13之间的环(loop)上, 而这一段区域也是PPP家族中高度保守的活性区域^[9]。

1.2.1 催化亚基.

目前还没有PP2A_C单独的晶体结构被解析出, 只知道C亚基由不同长度的α螺旋和β片层相间组成, 对它的具体多级结构仍没有详细的报道。

PP2A_D结构显示, 催化亚基C的活性中心含有两个Mn²⁺的活性位点(图2c), 在PP2A_C的结构中还包括一段游离的羧基尾巴(295~309位氨基酸), 它有何作用呢?

PP2A_C这段尾巴的结构与功能以及Leu309的甲基化作用一直都是许多专家的研究热点, 虽然目前的研究对于这些结构和修饰的功能并没有得出一个完全确定的结论, 但是仍然有许多有意义的成果不断被发掘和肯定。无论是从晶体结构的分析还是是一些突变试验中, 我们都可以确信PP2A_C的这段尾巴在结合调节亚基B中起到了关键的作用^[12]。删除Trp304和Tyr307位点后直接导致C亚基和B亚基的解聚, 羧基端的甲基化直接关系到C亚基同B亚基的结合, 去甲基化的C亚基和B亚基的结合将大大减弱。同样在一些检测甲基化程度的实验中, PP2A_D中检测到的甲基化水平要远远低于PP2A_T的甲基化水平。但同样值得注意的是, 最近的晶体结构分析指出, Leu309位点却并不是C亚基与B亚基结合所必需的位点^[13]。

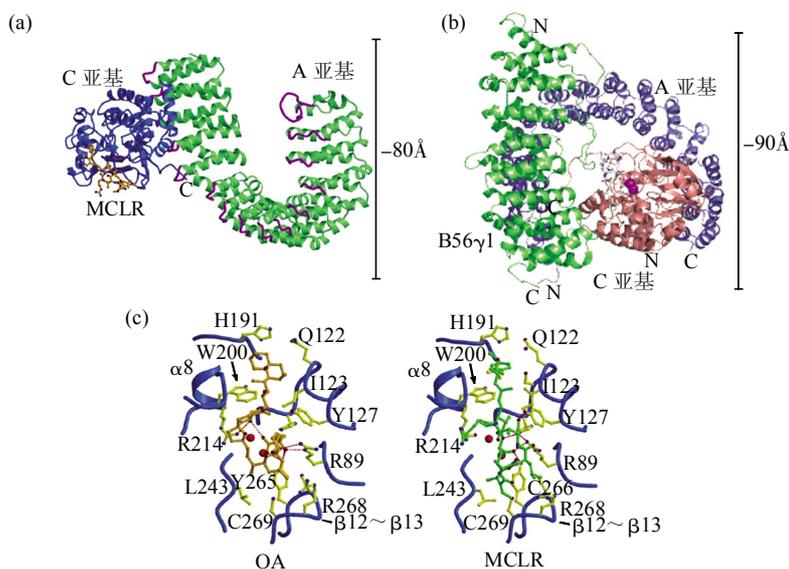


Fig. 2 The crystal structure of PP2A core-enzyme and holoenzyme^[9,11]

图2 PP2A_D和PP2A_T的晶体结构^[9,11]

(a)PP2A_D与抑制剂MCLR复合物的晶体结构, PP2A_D由催化亚基C和结构亚基A构成。(b)PP2A_T与抑制剂OA复合物的晶体结构, PP2A_T包括催化亚基C、结构亚基A和调节亚基B。(c)C亚基同抑制剂OA以及MCLR的结合位点示意图, C亚基与两种抑制剂几乎以完全相同的方式结合(红色圆点为Mn²⁺)。

近年来, 专家们越来越多地把Leu309的甲基化作用与PP2A_C的活性关联起来。很多文章报道甲基化后PP2A_C的活性得到提高, 而具有去甲基化功能的PME-1则能使PP2A失活, 最新解析出的PME-1与PP2A_D复合物的晶体结构更进一步地

明确了Leu309甲基化作用的功能。该晶体结构显示^[13], PME-1仅是与PP2A_D的催化亚基直接结合, 而并不与PP2A的结构亚基作用(图3a)。PME-1把PP2A_C羧基端的304~309位氨基酸残基包覆在自己的催化中心, 形成一个催化口袋(图3b), 而

PP2A_C 催化活性中心的一些主要位点也都参与了与 PME-1 的结合, 在两个蛋白质之间形成一个 S 形的结合面(图 3c). 该研究同时发现单独存在的 PME-1 并不能行使其去甲基化的功能, 只有与 PP2A_D 结合的 PME-1 才能形成紧缩的催化口袋. 此研究结构表明, PP2A 与 PME-1 的结合导致两个主要的结果: 第一个是使 PME-1 构象改变而使其

自身具有了催化活性; 另一个更重要的作用就是使得 PP2A 失活, 其机制很可能是因为 PME-1 使得 PP2A 必需的金属离子 Mn²⁺ 不能进入到活性中心, 而 PME-1 与催化亚基形成的结合表面则可能遮挡住了磷酸酶的催化活性位点, 导致其催化活性下降^[13].

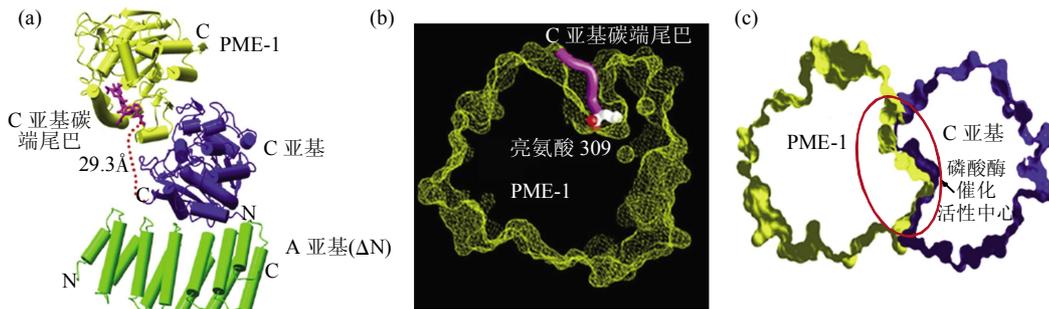


Fig. 3 Structure of PP2A_D core-enzyme and PME-1 complex^[13]

图 3 PME-1 与 PP2A_D 复合物的晶体结构^[13]

(a) PME-1 与 PP2A_D 复合物的晶体结构图, PME-1 直接与催化亚基 C 结合, 而不与结构亚基 A 结合. (b) PME-1 的催化口袋示意图, PME-1 的催化活性中心把 PP2A_C 羧基端的 304~309 位氨基酸残基包覆在其中形成一个催化口袋. (c) C 亚基催化活性中心与 PME-1 结合的结合表面示意图, C 亚基催化活性中心与 PME-1 结合形成一个 S 形的结合面.

1.2.2 结构亚基. A 亚基的结构对于其他亚基和全酶都有十分重要的意义, 单独的 A 亚基(A α 亚型)的晶体长 100Å, 宽 35Å, 高 20Å, 由 15 个串联的 HEAT(huntingtin-elongation-A subunit-TOR)重复子形成, 每个重复子由富含亮氨酸残基的大约 40 个氨基酸组成(序列不完全相同), 其二级结构相似, 由一个 loop 连接的反平行 α 螺旋组成(图 4a). 整个 A 亚基看上去像由食指和拇指组成的钩形体, 具有含保守残基的疏水内表面, 是 PP2A_C 和不同调节亚基的结合位点^[14]. 相对于单独游离的 A 亚基

的三维结构, 参与形成 PP2A_D 和 PP2A_T 的 A 亚基则形成弯曲度不同的马蹄形结构(图 4b). 导致这种空间构象改变的原因是由于 A 亚基与 C 亚基和 B 亚基的结合, 进而受到多种分子间作用力造成的, 其中第 11 和第 12 HEAT 重复子在构象上的改变是十分重要的因素. 而令人注意的是, 在 PP2A_D 中第 11 个 HEAT 重复子结构上疏水键的断裂对其构象变化做出了重要的贡献, 而与此同时在 PP2A_T 中却并没有出现这个位置上疏水键的破坏^[9~11].

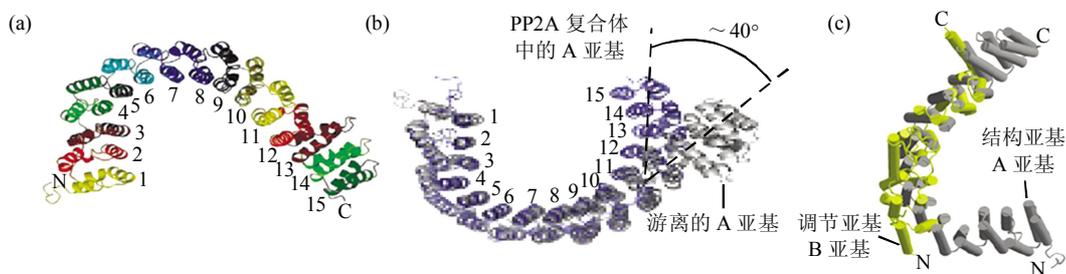


Fig. 4 Crystal structures of PP2A scaffolding subunit and regulatory subunit^[10, 11, 14]

图 4 PP2A 结构亚基 A 与调节亚基 B'γ 的晶体结构^[10, 11, 14]

(a) A 亚基晶体结构, 完整的 A 亚基由 15 个 HEAT 结构组成. (b) A 亚基的构象变化示意图, 与游离的 A 亚基相比, 参与形成 PP2A_D 和 PP2A_T 的 A 亚基的构象出现了巨大的变化, 结合形式的 A 亚基成“马蹄形”结构. (c) 调节亚基 B'γ 与结构亚基 A 的晶体结构比较图, 调节亚基(黄色)和 A 亚基(灰色)有类似的 HEAT 结构.

1.2.3 调节亚基. 最近, PP2A_T 的晶体结构显示: B'γ 亚基在形成全酶的构象中其 18 个 α 螺旋侧向堆叠形成了 8 个类似 HEAT 重复子的结构, 这与 A 亚基的结构惊人地类似(图 4c). 这一结构在空间上表现为一个延伸的超螺旋构象, 在超螺旋弯曲的凹槽中间富含大量的带负电的氨基酸, 而在超螺旋突出的部分则存在许多保守的疏水残基, 正是这样的构象对 B'γ 与 A 亚基的结合做出了重要的贡献. 但是与 A 亚基不同的是, 虽然这些类似的 HEAT 结构在氨基酸序列上的相似性很低, 但它们却可以非常有序地排列成一个规则的 HEAT 串联子^[13]. 而 B/PR55 家族在结构上都有 5 个退化了的 WD 重复子(WD-repeat), WD 重复子通常是由以 Arg-Trp 结尾的 40 个左右的氨基酸构成, 与 HEAT 结构不同, WD 结构主要是由一些 β 结构在空间上组合而成的, 在功能上 WD 重复可介导蛋白质与蛋白质之间的相互作用^[13], 这也构成了 B 亚基作为调节亚基定位 PP2A_D 在细胞内分布的分子基础. 而 PR110 也被报道含有这种重复的 WD 结构. 当然我们并不能就此断言所有 PP2A 的调节亚基均具有类似 HEAT 或 WD 的重复子结构, PP2A 上下游巨大的信号网络决定了起细胞定位作用的 B 亚基的多样性.

2 PP2A 亚基之间的相互作用

随着 PP2A_D 和 PP2A_T 的晶体结构被相继解析出来, PPP 家族中最后一个成员的晶体结构终于宣告浮出水面, 这一里程碑式的发现对于我们更加深入解析 PP2A 亚基之间的相互作用奠定了坚实的基础.

2.1 催化亚基与结构亚基之间的相互作用

PP2A_D 的晶体结构显示, 在 A 亚基的 15 个 HEAT 结构中, 11~15 个 HEAT 结构主要参与和 C 亚基的结合, C 亚基中的 α2 螺旋和羧基端的一些位点参与了与 A 亚基的结合, 这种亚基间的相互作用促使 A 亚基的构象从一个相对平展的结构变为一个类似马蹄形的形态(图 4b). 在 AC 亚基结合表面上, 范德华力起到了重要的作用, Aα 中位于 HEAT11 上的 Trp417 和位于 HEAT12 上的 Leu455 与位于 Cα 亚基 α2 螺旋上的 Arg70 和 Ile71 间有范德华力作用, 在此结合域外围 Aα 的 Arg418 和 Cα 的 Glu67 之间形成 4 个氢键加强结合作用. 疏水基团之间的作用在亚基结合中似乎更为广泛, Cα 亚基上的 Asp280 与 A 亚基 HEAT13~14 上的

493、495、498 位氨基酸都有氢键作用, 而 A 亚基上的 Asn535 则与 Cα 的 76、77 和 79 位氨基酸发生疏水作用, 此外, 结构亚基的 Val533 与催化亚基的 Pro51 也有相互作用(图 5a). 与 PP1、PP2B、PP4、PP5、PP7 等同家族酶催化结构域相比, C 亚基催化结构域中的 Glu67、Arg70、Arg110、Asp280 等氨基酸位点被认为在 PP2A_C 特异识别其结构亚基中起到重要的作用^[9,11].

2.2 调节亚基与核心酶之间的相互作用

B 亚基与 C 亚基的结合区域: 它们的结合主要包括三个区域. 第一个区域是 B'γ(PR61γ)亚基的 6~8 HEAT 结构与 C 亚基的 α5 螺旋, 其中 C 亚基的 Gln125 与 B'γ 亚基不仅有一对氢键的作用, 还与调节亚基的 His339, Phe340 和 Trp382 有范德华力作用, 此外, C 亚基上 Asp131 与调节亚基上 Ser298 的相互作用也对这一区域的结合作用起到支持(图 5b 左). 第二个区域则包括 C 亚基中 β12、β13 和活性中心位点与 B'γ 亚基 HEAT2~3 之间的 loop 结构, 其中 C 亚基 Arg268 与 B'γ 亚基中的 112、122、123 位点有疏水键的作用(图 5b 右). 最后一个特别值得一提的是区域三, 包括 C 亚基的羧基端尾巴与 B 亚基的 4~6 HEAT 结构. 其中 C 亚基中的 Pro305、Tyr307 和 Phe308 与 B 亚基中 Lys256、Lys 258、Tyr292 和 Lys295 在空间上相互接近, 并有范德华力的作用^[11], 同时这个区域也是 ABC 三个亚基共同结合的重点区域(图 5d). 从整体上看, B 亚基的 HEAT 结构形成的凹槽与 C 亚基的活性位点十分靠近, 而这一凹槽结构也提供了 PP2A 的可能底物结合位点, 这样的结构直接把 C 亚基的活性中心与底物拉近, 从而在分子水平上为 PP2A 完成其功能定下了基调^[9~11].

B 亚基和 A 亚基的结合区域: 由 B'γ 和 Aα、Cα 亚基形成的 PP2A_T 晶体结构显示, 在 B'家族中, 所有参与 AC 亚基结合的氨基酸位点几乎都是高度保守的. B 亚基与 C 亚基一样都结合在 A 亚基 HEAT 结构的同一侧, 其中 A 亚基的 2~7 HEAT 主要参与同 B 亚基的结合, 而与之对应的 A 亚基的 11~15 HEAT 则参与同 C 亚基的结合. Aα 亚基 Trp140、Phe141 在多重范德华力的作用下与 B'γ 的疏水氨基酸结合, 提供两个亚基间最主要的结合力, Aα 的 Arg183 提供一对氢键与 B'γ 中 Glu214 相互结合, B'γ 中 Lys256 与 Aα 的 Asp63、Glu100、Glu101 形成盐桥, Aα 的 Trp257 与 B'γ 中 109 位氨基酸以氢键结合(图 5c). 总的来说,

A 亚基与 B 亚基的结合是一种比较松散的形式, 虽然 A 亚基与 B 亚基上的结合覆盖了很大的范围, 但是其结合位点都是相对分散的, 而且分子间作用力也并不是很强烈, 这也不难解释为什么两个亚基之间不能形成稳定的复合体^[10, 11].

2.3 PP2A_T 三亚基之间的共同结合区域

C α 的疏水羧基端位于 A α 与 B' γ 结合面之间

的凹槽中. C α 中的 Pro305、Tyr307 和 Phe308 被围绕在 B' γ 的 Lys256、Lys258、Tyr292 和 Lys295 与 A α 的 Asp63、Glu64、Glu101 在空间上形成的口袋里(图 5d). 互相之间的范德华力被另外的 6 个氢键加强, 其中一个氢键是 A α 的 Glu63 和 C α 中的 309 位氨基酸之间形成的氢键. 当 A α 的 Glu63 发生突变时, A、B 亚基的结合力减弱^[10, 11].

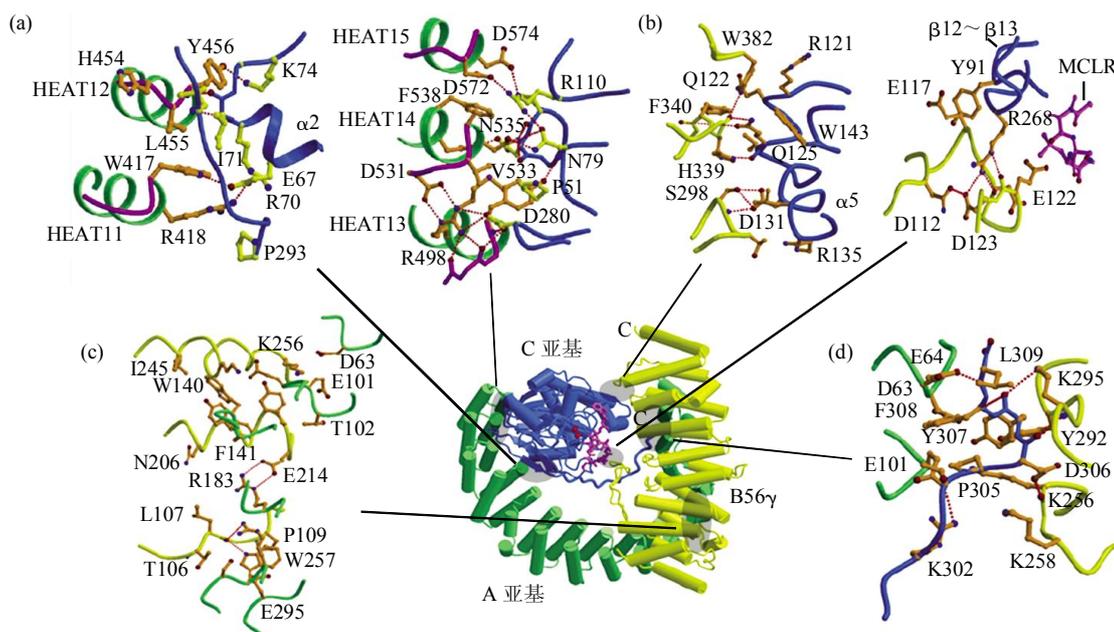


Fig. 5 The interactions between three subunits of PP2A^[10]

图 5 PP2A 亚基之间的相互作用^[10]

(a)A(绿)亚基与 C(蓝)亚基间的结合表面, 分别包括 A 亚基 HEAT11~12 以及 HEAT13~15 与 C 亚基的作用位点. (b)B(黄)亚基与 C 亚基间的第一和第二结合区域. (c)A 亚基与 B 亚基间的结合表面. (d)A、B、C 三个亚基间的共同结合表面, 该区域也是 B 与 C 亚基的第三结合区域.

3 PP2A 的功能: 作为可能的肿瘤抑制因子

正是因为 PP2A 复杂的空间结构以及其底物特异性和组织特异性, 其在信号转导中的地位也是极其重要和错综复杂的, 于是有学者将 PP2A 在信号通路中的作用形象地比喻为特洛伊木马^[1]. PP2A 在细胞中与许多非常重要事件的发生都有着密切的关系: PP2A 能够通过去磷酸化多种激酶使得细胞中期促进因子处在一种激活的状态, 而使细胞处在 G2/M 期之间; PP2A 与细胞骨架的形成有着密切的关系, 在酵母中, PP2A 失调的菌株表现出肌动蛋白和微管结合蛋白组装的缺陷; 同时 PP2A 还能调节波形蛋白和神经纤维的组装; PP2A 在 DNA 复制中还扮演了重要的角色, 许多病毒会利用 PP2A 在宿主体内复制自己的遗传信息; PP2A 同样被认为与细胞的凋亡有着密切的关系, 不同的研

究认为 PP2A 分别与 caspase-3, Bcl2 等与凋亡有关的蛋白质结合并调控这些蛋白质的开关. 除了上述的细胞生物学事件外, PP2A 还直接参与多种信号通路的调控, 已证明其与 TOR 通路、ERK 和 MEK 通路以及 Wnt 信号通路均有关^[2]. 除了前面提到的这些功能以外, PP2A 还具有很多其他十分重要的作用, 其中最引人关注的则是 PP2A 在各个方面所表现出来的可能与肿瘤抑制的关系.

目前我们很难完全把 PP2A 定义为一种传统意义上的肿瘤抑制因子, 但让人振奋的是不断有研究把 PP2A 与抑制肿瘤的发生联系在一起. 综合目前的研究进展, PP2A 可能通过以下的方式和作用机制来起到其肿瘤抑制作用(图 6).

在老鼠为模型的实验中, PP2A 强有力的抑制剂 OA 可激活 PP2A 下游的 MAPK 通路和 ERK 通路而有效地促进肿瘤的发生^[16]. 可引起多种肿瘤相

关疾病的 SV40 病毒的小 T 抗原, 被发现能够取代调节亚基结合到 A 亚基上, 从而抑制 PP2A 的磷酸酶活性, 导致与细胞生长有关的磷酸化加剧, 最终致使细胞调控的紊乱和细胞向恶性转化^[8,16,17]. 在 Hahn 等^[16]的工作中, 他的工作团队以 HEK TER 细胞(一种永生化的但没有癌变的细胞株系)为研究对象, 结果表明, SV40 小 T 抗原可以使得 PP2A 被抑制, 而不同的 PP2A_T 在这个过程中起着不同的作用, 只有特定的 PP2A 聚合体才能参与特定的生物学事件, 比如 SV40 小 T 抗原仅使特定的 A α CB56 α 和 A α CB56 γ 失活. 已证明 SV40 小 T 抗原可激活与 PP2A 下游的 MAPK 通路和 AKT 通路, 进而导致细胞一些癌变的特征出现, 此外, SV40 小 T 抗原还能诱导在细胞转化中有重要地位的转录因子 c-Myc 由不稳定的状态变为稳态, 从

而引起细胞的转化^[18].

近两年一些重要的发现则进一步揭示了 PP2A 抑制肿瘤发生的新机理. 2007 年, Junttila 等^[19]通过蛋白质组学研究发现一种 90 ku 的未知功能蛋白有过量的表达, 之后这种蛋白质被命名为 CIP2A (cancerous inhibitor of PP2A). 在 HeLa 细胞中降低 CIP2A 的表达量后, 细胞的增殖减弱, 细胞在软琼脂形成集落的能力下降, 并且在无胸腺的老鼠中发生肿瘤的概率也降低. 该研究还进一步指出, CIP2A 同样可以和通过抑制 PP2A 与转录因子 c-Myc 相互作用, 并通过抑制 PP2A 对 c-Myc 基因第 62 位丝氨酸去磷酸化的作用, 因而抑制了 c-Myc 蛋白的水解, 增加其稳定性. 此外, CIP2A 还可以促进停泊不依赖性细胞生长(anchorage-independent growth)和体内的细胞转化.

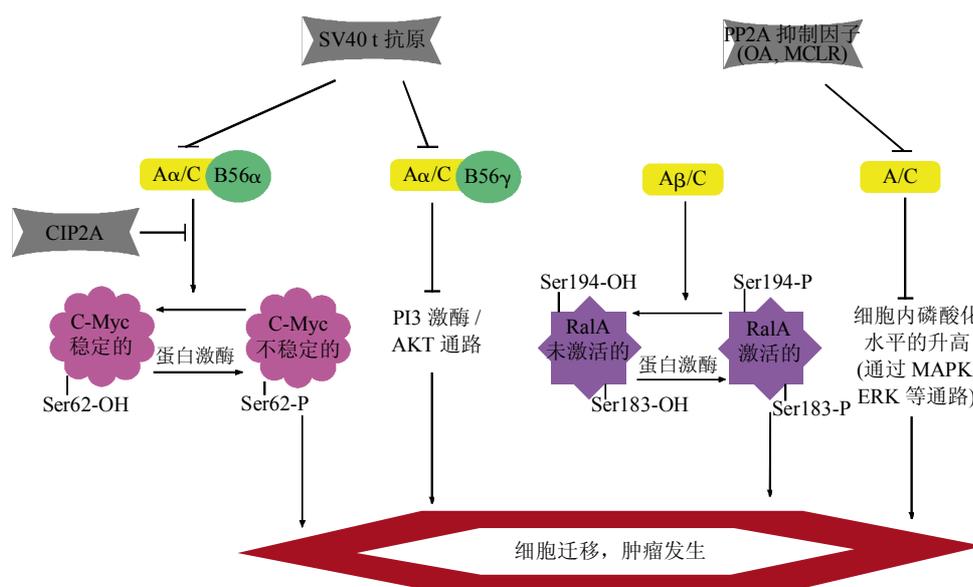


Fig. 6 Current mechanism of PP2A in inhibition of tumorigenesis^[17-21]

图 6 PP2A 抑制细胞迁移和肿瘤发生的新机制^[17-21]

在 PP2A 与肿瘤发生相互关系的最新研究中, 除了经典的 MAPK、ERK、PI3 激酶 / AKT 通路外, PP2A 还受到 CIP2A 的抑制而通过下游的 C-myc 导致细胞的迁移. 此外, PP2A 还可以直接去磷酸化 RalA 而导致细胞迁移.

同年, Seblina 等^[20]的研究发现了包含结构亚基 A β 的 PP2A 与肿瘤的发生有密切关系, 他们通过用 shRNA 敲除了 A β 的 HEK TER 细胞, 发现处理之后细胞的增殖率提高, 表现出停泊不依赖性细胞生长. 而用同样的技术敲除掉 A α 亚基却表现出细胞增殖的下降. 该实验进一步确认了一种 GTPase-RalA, 其与 A β 可以形成复合体, RalA 则可以在 HEK TER 细胞中取代 Ras 蛋白的作用导致

细胞的转化. 在敲除了 RalA 的 HEK TER 细胞中, A β 的表达受到了抑制, 并且使得细胞不能在软琼脂中形成集落. 同样在敲除了 A β 的细胞中, RalA 的活性则大幅提高, 与之相反, 在 A β 过量表达的细胞中, RalA 的活性下降. 一系列的证据无疑把 PP2A 的 A β 亚基和 RalA 以及肿瘤发生的种种表征联系起来, 最后试验还指出 A β 与 RalA 这样的一种调控可能是基于对 RalA 上第 183 位丝氨酸和

第 194 位丝氨酸的去磷酸化引起的。

我们已经勾画出了 PP2A 在信号通路中庞大版图的轮廓, 其在肿瘤抑制中的作用也正逐渐浮出水面, 虽然仍有学者对 PP2A 作为肿瘤抑制因子持非常谨慎的态度, 但其与多种与肿瘤发生有关因子的直接调控关系无疑让更多人站在了支持的立场上。可我们需要始终注意的是参与到不同生物学事件的 PP2A 也许本身就具有不同的特性, 在 PP2A 复杂的亚基结构和庞大的亚基家族背景下, 只有某一些特定的亚基组合才会参与到特定的生物学事件上, 就比如, 只有 A β 亚基参与到同 RalA 作用诱导的细胞转化中, 而 A α 亚基, 虽然在序列上和前者有 86% 的同源性, 但是在功能上却大相径庭。从这个角度来讲, PP2A 亚基间的组装和不同亚基间的组合对于我们更深入地了解 PP2A 在整个信号通路的地位, 尤其是与肿瘤发生相关的机制有着更为深刻的意义。

4 小结与展望

PP2A 在生命体中的重要地位已经毋庸置疑, 太多的生物学事件都和 PP2A 关联在一起。不过我们同时也应该认识到, 正是 PP2A 的两个基本特性决定了其如此广谱的功能: 首先, PP2A 广泛参与到各种需要通过磷酸化与去磷酸化来开启或关闭的信号通路和生物事件中; 另一个重要的原因就是 PP2A 具有多种不同形式。因为 PP2A 是一个异三聚体复合物, 而每一个亚基又有不同的亚型, 尤其是调节亚基 B 亚基的家族成员已知的就有 20 多种, 这样不同的亚型之间就可能形成不同的 PP2A $_T$, 而这些全酶在细胞中参与到不同生物学事件当中。

而上述的第二点也可以理解为, 只有特定组合的 PP2A 才能在特定的生物学事件中起到去磷酸化作用, 而并不是所有的 PP2A 组合都起到前文所述的各种功能。只有与调节亚基 PR70 结合的 PP2A 核心酶才能对于肿瘤抑制因子 RB 进行去磷酸化; 与 B56 δ 结合的 PP2A $_T$ 对 DARPP-32(dopamine and cAMP regulated phosphoprotein of molecular weight 32000) 有去磷酸化活性; 与 B56 α 和 B56 γ 结合的 PP2A $_T$ 则分别参与 c-Myc 和 AKT 信号通路的去磷酸化。除了不同的 B 亚基会引导 AC 核心酶参与到不同的生物学事件之中以外, A 亚基的两个亚型 α 与 β 也行使不同的功能, 如前所述, β 亚型对于肿瘤的抑制能力就明显强于 α 亚型。这一系列的事

实也告诉我们, 无论是从结构还是功能, 还是细化到抑制肿瘤的作用, 我们都更应该狭义地去理解 PP2A 的概念。

我们知道, 具有马蹄型结构的结构亚基 C 端 11~15 个 HEAT 结构主要与催化亚基的 N 端发生紧密的结合, 而结构亚基的 N 端主要参与同调节亚基的结合, 同时调节亚基也同催化亚基包括活性中心附近的一些位点在内的结构结合, 但 B 亚基与 AC 的结合则是一种相对松散的状态, 远不如 AC 亚基的结合紧密。但是目前的晶体结构仅仅展示的是 A α CB56 γ 的聚合体, 我们同样不能排除其他一些 PP2A 的结合蛋白会以不同的方式结合到 AC 亚基上。因此, 即使 PP2A $_T$ 的晶体结构已经破解, 也并不意味着我们就有理由停止对于 PP2A 结构和功能的研究, 比如说 PP2A 与其许多重要的结合蛋白的作用方式仍然还有待探究。而最近 PME-1 与 PP2A 聚合体晶体结构的解出就是一个很好的实例, 这对于我们进一步了解 PP2A 催化亚基 309 位 Leu 的甲基化机理和 PME-1 抑制 PP2A 活性都有着十分现实的意义。与此同时, 另外一些 PP2A 的结合蛋白与 PP2A 的作用方式还不为人知, 例如 PP2A 的特异性激活剂 PTPA 是如何作用到 PP2A 上并且提高其活性的还没有直接的晶体生物学证据, 而 SV40 小抗原在结构上和 B56 家族的蛋白质差异很大, 但它又是怎么样结合到 AC 亚基上, 使 PP2A 的催化活性降低的, 也还需要更多的结构学方面的实验来证明。

对于 PP2A 的肿瘤抑制功能, 我们同样也应该明确一点, 并非所有的 PP2A 都参与到这个机制之中, 只有一些少数的亚基与肿瘤的抑制有关。在 RASV12/hTERT/SV40 LT 发生迁移的人类细胞中, PR61 γ 可以加强细胞的迁移。一些研究表明, PR61 γ 可以直接作用到 ERK 上, 使其去磷酸化, 从而阻断 ERK 通路; 有意思的是, PR65 β 导致细胞的迁移则是通过介导与 PR61 γ 完全不同的信号通路来完成细胞迁移; 与之同样重要的是, PP2A 在 MAPK-ERK-RAF 通路上, 不仅仅作为一种上游蛋白抑制 MAPK, 其实在通路的各个阶段, 不同形式的 PP2A 都能起到去磷酸化作用, 无论是对于上游的蛋白质还是直接作用到 ERK 上, 甚至有报道指出 PP2A 可以直接去磷酸化 RAF 和 RAS^[21]。总而言之, 在 PP2A 纷繁的信号通路网中, 要整理出一张与抑制肿瘤相关的地图仍然有许多工作要做, 在继续探究 PP2A 是否还有更多的与细胞迁移

相关的作用途径的同时, 我们更应该关注是哪些特定的 PP2A 组合行使了怎样特定的功能.

毫无疑问, 随着我们对 PP2A 结构学上不断深入的了解, 随着我们对由不同家族和种类亚基组成的各种各样 PP2A 复合体功能的更明确认识, 我们一定会更清楚地了解 PP2A 是如何分门别类地在细胞中充当着“万金油”角色, 也会让我们逐渐揭开“肿瘤抑制因子”这个蒙在 PP2A 上的神秘面纱.

参 考 文 献

- Sontag E. Protein phosphatase 2A: the trojan horse of cellular signaling. *Cellular Signalling*, 2001, **13**(1): 7~16
- Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochemical J*, 2001, **353**(3): 417~439
- Guo H, Reddy S A, Damuni Z. Purification and characterization of an autophosphorylation activated protein serine threonine kinase that phosphorylates and inactivates protein phosphatase 2A. *J Biological Chemistry*, 1993, **268**(15): 11193~11198
- Brautigam D L. Flicking the switches: phosphorylation of serine/threonine protein phosphatases. *Seminars in Cancer Biology*, 1995, **6**(4): 211~217
- Mumby M. The 3D structure of protein phosphatase 2A: new insights into a ubiquitous regulator of cell signaling. *ACS Chemical Biology*, 2007, **2**(2): 99~103
- Favre B, Zolnierowicz S, Turowski P, *et al.* The catalytic subunit of protein phosphatase 2A is carboxyl-methylated *in vivo*. *J Biol Chem*, 1994, **269**(23): 16311~16317
- Moreno C S, Park S, Nelson K, *et al.* WD40 repeat proteins striatin and S/G2 nuclear autoantigen are members of a novel family of calmodulin-binding proteins that associate with protein phosphatase 2A. *J Biol Chem*, 2000, **275**(8): 5257~5263
- Rodriguez-Viciano P, Collins C, Fried M. Polyoma and SV40 proteins differentially regulate PP2A to activate distinct cellular signaling pathways involved in growth control. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(51): 19290~19295
- Xing Y, Xu Y, Chen Y, *et al.* Structure of protein phosphatase 2A core enzyme bound to tumor-inducing toxins. *Cell*, 2006, **127**(2): 341~353
- Xu Y, Xing Y, Chen Y, *et al.* Structure of the protein phosphatase 2A holoenzyme. *Cell*, 2006, **127**(6): 1239~1251
- Cho U S, Xu W. Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme. *Nature*, 2007, **445**(7123): 53~57
- Bryant J C, Westphal R S, Wadzinski B E. Methylated C-terminal leucine residue of PP2A catalytic subunit is important for binding of regulatory B α subunit. *Biochemical J*, 1999, **339**(2): 241~246
- Xing Y, Li Z, Chen Y, *et al.* Structural mechanism of demethylation and inactivation of protein phosphatase 2A. *Cell*, 2008, **133**(1): 154~163
- Groves M R, Hanlon N, Turowski P, *et al.* The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs. *Cell*, 1999, **96**(1): 99~110
- Neer E J, Schmidt C J, Nambudripad R, *et al.* The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature*, 1994, **371**(6495): 297~300
- Arroyo J D, Hahn W C. Involvement of PP2A in viral and cellular transformation. *Oncogene*, 2005, **24**(52): 7746~7755
- Yu J, Boyapati A, Rundell K. Critical role for SV40 small-t antigen in human cell transformation. *Virology*, 2001, **290**(2): 192~198
- Yeh E, Cunningham M, Arnold H, *et al.* A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nature Cell Biology*, 2004, **6**(4): 308~318
- Junttila M R, Puustinen P, Niemelä M, *et al.* CIP2A inhibits PP2A in human malignancies. *Cell*, 2007, **130**(1): 51~62
- Sablina A A, Chen W, Arroyo J D, *et al.* The tumor suppressor PP2A β regulates the RalA GTPase. *Cell*, 2007, **129**(5): 969~982
- Eichhorn P J, Creighton M P, Bernards R. Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2009, **1795**(1): 1~15

The Structure of Protein Phosphatase 2A and Its Inhibition of Tumorigenesis

LI Tian-Zhu, XIANG Ben-Qiong*

(College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100088, China)

Abstract Protein phosphatases are crucial for cell living. Protein phosphatase 2A (PP2A) is an important member of serine/threonine protein phosphatase family, which is involved in almost all biological processes in eukaryotic cell. The 3D structure of PP2A core enzyme and holoenzyme was solved in 2006. These results are significant instructions for us to further understand PP2A structure, interactions between PP2A subunits, and also interactions between PP2A and its binding proteins. In a series of studies, PP2A has been considered as a possible tumor inhibitor, which plays an essential role in tumorigenesis and cell transformation. Subunits composition and crystal structure of PP2A, specific carboxyl-terminal modification of PP2A catalytic subunit, interactions between the three subunits of PP2A, and its biological function as a new tumor inhibitor were summarized.

Key words protein phosphatase, PP2A, structure and function, tumor inhibitor

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00420

*Corresponding author.

Tel: 86-10-58807721, E-mail: xiangbq@bnu.edu.cn

Received: May 30, 2008 Accepted: September 7, 2008