

肿瘤抑制因子 Hamartin 和 Tuberin 信号调控机制

赵蕴玉 楼丽广*

(中国科学院上海生命科学研究院, 上海药物研究所, 上海 201203)

摘要 结节硬化复合症由 *tsc1*、*tsc2* 基因突变引起, 这 2 个基因分别编码 hamartin 和 tuberin, 它们均为肿瘤抑制因子, 在细胞生长和增殖过程中起关键性的调节作用。生长因子刺激的 PI3K/Akt 信号通路通过磷酸化 tuberin, 调控下游效应因子功能, 最终影响细胞的生长和增殖。现对 hamartin 和 tuberin 信号调控机制的最新进展进行综述, 并展望其发展趋势。

关键词 hamartin; tuberin; 肿瘤抑制因子

结节硬化复合症是由肿瘤抑制基因 *tsc1* 或 *tsc2* 突变造成的一种常见的遗传疾病。临床常表现为脑、肾、心脏、眼睛、肺以及皮肤出现良性错构瘤 (benign hamartomatous tumors)^[1]。Tsc1 基因编码大约 130 kDa 的蛋白质 hamartin, 该蛋白质包括一个卷曲螺旋 (coiled-coil) 区域, 但是没有明显的催化区域; Tsc2 基因编码 200 kDa 的蛋白质 tuberin, 该蛋白质包括一个卷曲螺旋区域和一个与 Rap GTPase 活化蛋白 (Rap-GAP) 同源的羧基末端区域^[2]。Hamartin 和 tuberin 作为肿瘤抑制因子, 作用机制虽仍不是很清楚, 但最近几年进展很快。本文就 hamartin 和 tuberin 信号通路中相关机制作一综述。

1 Tuberin 和 hamartin 是 S6K1 的负调控因子

在果蝇中, *tsc1* 或者 *tsc2* 基因功能缺失导致特异性细胞增殖和细胞体积增大^[3], 而 dPI3K、dAkt、dS6K1 过量表达或者肿瘤抑制因子 dPTEN 失活时, 同样可以观察到这些表型的改变^[4], 说明 tuberin 和 hamartin 调节细胞生长的作用与 PI3K/S6K1 信号通路平行或与之相互关联^[5,6]。过量表达 *tsc1*、*tsc2* 基因所引起的生长抑制能被 dS6K 的过量表达逆转^[6], 用 RNAi 方法下调果蝇中 tuberin 和 hamartin 表达导致 dS6K 磷酸化, 更进一步说明 hamartin 和 tuberin 特异性调节 S6K1 活性^[7]。

S6K1 (核糖体 S6 蛋白激酶 1) 能磷酸化核糖体蛋白 S6, 对细胞的翻译元件尤其是核糖体的生物合成非常重要。在 hamartin 缺失的小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 中, 发现 hamartin 与 S6K1 和核糖体蛋白 S6 的活化有关^[8]。在 *tsc2* 基因缺失的 MEF 和大鼠细胞

中, tuberin 功能失活导致 S6K1 持续性激活从而引起了核糖体蛋白 S6 的过量磷酸化^[9,10]。在 LAM (lymphangiomyomatosis) 或者 *tsc* 基因突变的肿瘤细胞中也存在类似现象^[9]。另一方面, tuberin 或者 hamartin/tuberin 同时过量表达都能抑制 S6K1 上 Thr389 位点的磷酸化, 但对 Thr421/Ser424 位点没有影响^[9~11]。这些数据说明 tuberin、hamartin 负调控 S6K1 和核糖体蛋白 S6。

2 Akt/PKB 是 tuberin 的上游调节因子

在果蝇中 hamartin 和 tuberin 通过阻断 PI3K/Akt 信号通路来发挥生长抑制作用^[3,6]。最近有证据表明 tuberin 是 Akt 下游的效应蛋白: 在生长因子刺激下, Akt 与 tuberin 结合, 磷酸化 tuberin^[12~14]。Tuberin 上被 Akt 磷酸化的位点在人类是 Ser939 和 Thr1462, 而在果蝇则是 Ser924 和 Thr1518^[12,14,15]。Tuberin 磷酸化对 PI3K 的抑制剂 wortmannin 和 Ly294002 敏感, 但对 mTOR 抑制剂 rapamycin 不敏感^[12,13,15], 并且持续激活的 PI3K 或 Akt 都能引起 tuberin 磷酸化^[13,16], 说明 tuberin 位于 PI3K 下游, 而在 mTOR 上游或与之平行。

依赖于 Akt 的 tuberin 磷酸化对调节细胞功能是很重要的。Tuberin 上这些磷酸化位点的突变能抑制 S6K1 的活化^[12], 这就证明了 tuberin 位于 S6K1 上游并且 tuberin 磷酸化是抑制 S6K1 活化必需的。在果蝇中过量表达 *tsc1* 和 *tsc2*, 或者 Akt 磷酸化位点发生突变的 tuberin 均能抑制由 Akt 过量表达而刺激的

收稿日期: 2004-11-01 接受日期: 2005-04-15

* 通讯作者。Tel: 021-50806056, Fax: 021-50807088, E-mail:

lglou@mail.shncn.ac.cn

细胞生长^[14]。

另外,在哺乳动物和果蝇中,Akt依赖的tuberin磷酸化对hamartin/tuberin复合物本身的稳定性有不同的影响。在果蝇中,Akt磷酸化tuberin导致hamartin/tuberin复合物的降解;同时Akt过量表达能抑制hamartin/tuberin复合物形成并阻断了hamartin和tuberin在细胞内的定位^[14]。相反,在哺乳动物细胞中,tuberin的磷酸化不影响tuberin和hamartin复合物形成,如在3T3成纤维细胞中,PDGF刺激的tuberin磷酸化长达10h,但不影响hamartin和tuberin的蛋白质表达水平,也不影响复合物形成的稳定性^[14]。

3 磷酸化的tuberin与14-3-3蛋白结合

Tuberin上存在很多丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸磷酸化位点^[8],提示tuberin的功能能被不同的信号分子调节。14-3-3蛋白是在不同细胞中均普遍表达的28~33kDa蛋白质家族,有7种异构体,能与各种包含磷酸丝氨酸序列的配体结合从而发挥广泛的生物学作用。已经证明7种14-3-3蛋白的7种异构体均能与磷酸化tuberin特异性结合^[15]。Tuberin的Ser939、Ser981和Ser1341氨基酸残基作为Akt的磷酸化位点已经被证明是与14-3-3蛋白结合的位点^[15]。14-3-3蛋白是与磷酸化的tuberin结合而不是和hamartin结合^[16~18]。

Tuberin也包含了与14-3-3蛋白结合的非Akt依赖性的位点。其中Ser1210的磷酸化对14-3-3蛋白与tuberin的结合很关键^[17]。由于抑制PI3K、Akt、PKA、ERK和PKC δ 对tuberin和14-3-3蛋白的结合没有什么影响,所以Ser1210位点的磷酸化不依赖于Akt,磷酸化该位点的蛋白激酶有待于进一步研究。在无血清条件下,tuberin和14-3-3蛋白的结合能力减弱,提示了14-3-3蛋白和tuberin形成复合物有可能被丝裂原调节^[17]。

4 Hamartin和tuberin是mTOR的调控因子

mTOR是rapamycin的直接作用靶点。营养物质,ATP和丝裂原等多种刺激都能引起mTOR活化从而阻断S6K1的功能^[19~22]。在tsc1或tsc2基因缺失的果蝇、哺乳动物细胞以及LAM细胞中,rapamycin都能抑制S6K1的磷酸化及其活性;而hamartin缺失促进另一个mTOR下游因子:真核细胞转录起始因子4E结合蛋白(4EBP1)的磷酸化^[7,10],表明mTOR

与hamartin/tuberin信号通路有联系。

Hamartin和tuberin可能作用于mTOR上游并且调控由营养物质诱导的mTOR活化。已经证明hamartin和tuberin对氨基酸诱导的mTOR信号通路起到负调控作用^[4]。在果蝇S2细胞中,抑制hamartin和tuberin表达能使细胞耐受氨基酸饥饿,而保持S6K1功能不变;与此类似,TSC1^{-/-},TSC2^{-/-}哺乳动物细胞MEF同样耐受氨基酸饥饿,提示在氨基酸诱导的mTOR信号通路中,hamartin和tuberin是必需的负调控因子^[7]。另外一些研究发现过量表达hamartin和tuberin能减弱由营养成分所诱导的S6K1的磷酸化以及4E-BP1的磷酸化^[11,12],提示mTOR是hamartin和tuberin信号通路中下游的效应因子。

虽然已证明hamartin和tuberin在氨基酸活化的mTOR信号通路中的作用,但是这两个蛋白质是否直接作用于mTOR而发挥对S6K1的负调控机制还不清楚。在果蝇S2细胞中,tuberin和mTOR能产生较强的特异性结合;但hamartin和mTOR的结合力很弱,只有两种蛋白质都过量表达时才能结合^[7]。

mTOR是否依赖于tuberin和hamartin调节S6K1活性还有一些争论。Inoki等^[12]和Tee等^[11]证明在HEK293细胞中过量表达hamartin和tuberin对胰岛素诱导的rapamycin耐受型S6K1无影响;Jaeschke等^[10]则提出在COS细胞中rapamycin耐受型S6K1的Thr308位点磷酸化可以被过量表达的hamartin和tuberin抑制。出现这些不一致的结果可能是hamartin和tuberin对S6K1的负调控存在两条通路:mTOR依赖型和非依赖型。另一个可能性就是:mTOR和S6K1,tuberin和hamartin之间的相互作用与其他信号分子相关,如raptor或者PP2A^[18,21,23,24],这些蛋白质的存在影响了最后的结果。

5 Tuberin发挥GAP功能抑制Rheb从而调控TOR

在tuberin上发现存在GAP的同源区域,这就提出了这样一个重要的问题:是否存在一个与这个过程有关的Ras/Rap相关的GTPase。Wienecke等^[25]发现在K565细胞中用免疫共沉淀方法拉下来的内源tuberin能诱导与Rap1A结合的GTP的水解。另外还有证据表明tuberin对Rab5也有GAP活性^[26]。

在患结节硬化复合症的病人中,tuberin GAP区域常有一定程度的突变^[26];而当Eker小鼠肿瘤细胞转染并表达C末端包含GAP区域的tuberin后,能

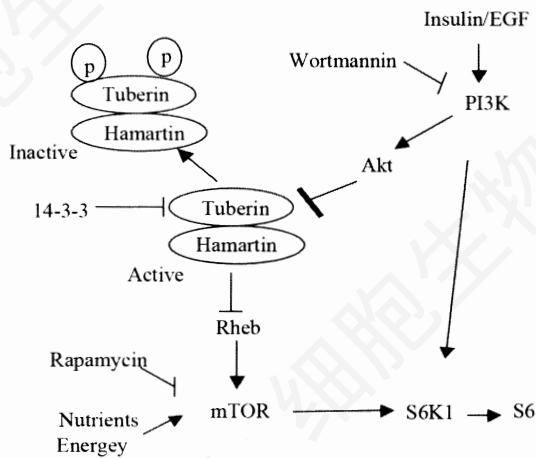


Fig.1 Model of tuberin and hamartin signaling pathway^[32,35]

降低细胞体内致瘤性^[27], 这些结果说明 GAP 区域在 tuberin 肿瘤抑制功能上非常重要。最近有报道 mTOR 的活化需要 Rheb(在大脑中大量存在的一种 Ras 同源物)的介导。在果蝇, 与 tsc 基因的功能相反^[28,29], Rheb 突变或过量表达能促进细胞增长^[27,30], 进一步研究则发现 dRheb, dPI3K, dAkt, dTSC1/dTSC2, dTOR 和 dS6K 存在相互关系^[30,31], 并且证明 TSC 负调控 Rheb, 而 Rheb 是 TOR 的正调控因子。这一点已在哺乳动物中得到了证明, 在生长因子和氨基酸缺失的情况下, Rheb 过量表达仍能激活 mTOR 下游因子如 S6K1 和 4EBP1^[32-35]。体外试验发现 Rheb 是 tuberin 的 GAP 催化区域的直接靶点^[32,33,36]。因此, 目前普遍认为 Rheb 是连接 tuberin 和 mTOR 的桥梁。

6 小结

在细胞中 hamartin 或者 tuberin 的突变能影响细胞内的信号传递, 造成细胞功能失常。Tuberin 和 hamartin 的信号调控是一个很复杂的有序过程(图 1), 目前还有很多问题没有解决, 例如: tuberin 所具有的 GAP 活性是否和它肿瘤抑制因子的功能有关; 具体有什么样的关系以及调节方式; tuberin 发

挥 GAP 催化功能调控 Rheb 的过程中是否也有 hamartin 的参与; 在 tuberin 和 Rheb 之间是否存在鸟嘌呤核苷酸交换因子(GEF); Tuberin 是否在 ERK/MAPK 通路中有同样重要的作用等。对这些问题的研究, 将更清楚地了解 tuberin 和 hamartin 的功能, 为抗肿瘤治疗提供新的策略。

参考文献(Reference)

- [1] Cheadle JP *et al. Hum Genet*, 2000, **107**: 97
- [2] The European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium. *Cell*, 1993, **75**: 1305
- [3] Tapon N *et al. Cell*, 2001, **105**: 345
- [4] Li Y *et al. Mol Cell Biol*, 2004, **24**: 7965
- [5] Gao X *et al. Genes Dev*, 2001, **15**: 1383
- [6] Potter CJ *et al. Cell*, 2001, **105**: 357
- [7] Wienecke R *et al. J Biol Chem*, 1995, **270**: 16409
- [8] Gao X *et al. Nat Cell Biol*, 2002, **4**: 699
- [9] Goncharova EA *et al. J Biol Chem*, 2002, **277**: 30958
- [10] Jaeschke A *et al. J Cell Biol*, 2002, **159**: 217
- [11] Tee AR *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 13571
- [12] Inoki K *et al. Nat Cell Biol*, 2002, **4**: 648
- [13] Manning BD *et al. Mol Cell*, 2002, **10**: 151
- [14] Dan HC *et al. J Biol Chem*, 2002, **277**: 35364
- [15] Potter CJ *et al. Nat Cell Biol*, 2002, **4**: 658
- [16] Liu MY *et al. Cancer Res*, 2002, **62**: 6475
- [17] Li Y *et al. J Biol Chem*, 2002, **277**: 44593
- [18] Schmelzle T *et al. Cell*, 2000, **103**: 253
- [19] Nellist M *et al. J Biol Chem*, 2002, **277**: 39417
- [20] Maeshima Y *et al. Science*, 2002, **295**: 140
- [21] Kim DH *et al. Cell*, 2002, **110**: 163
- [22] Kwiatkowski DJ *et al. Hum Mol Genet*, 2002, **11**: 525
- [23] Peterson RT *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 4438
- [24] Westphal RS *et al. J Biol Chem*, 1999, **274**: 687
- [25] Wienecke R *et al. J Biol Chem*, 1995, **270**: 16409
- [26] Xiao GH *et al. J Biol Chem*, 1997, **272**: 6097
- [27] Jin F *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 9154
- [28] Tapon N. *et al. Cell*, 2001, **105**: 345
- [29] Potter CJ *et al. Cell*, 2001, **105**: 357
- [30] Stocker H *et al. Nat Cell Biol*, 2003, **5**: 559
- [31] Saucedo LJ *et al. Nat Cell Biol*, 2003, **5**: 566
- [32] Tee AR *et al. Curr Biol*, 2003, **13**: 1259
- [33] Inoki K *et al. Genes Dev*, 2003, **17**: 1829
- [34] Garami A *et al. Mol Cell*, 2003, **11**: 1457
- [35] Castro AF *et al. J Biol Chem*, 2003, **278**: 32493
- [36] Zhang Y *et al. Nat Cell Biol*, 2003, **5**: 578

Regulation of Tumor Suppressors Hamartin and Tuberin Signaling

Yun-Yu Zhao, Li-Guang Lou*

(Shanghai Institute of Materia Medica, Shanghai Institute for Biological Sciences,
Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Tuberous sclerosis is an autosomal dominant disorder caused by mutations in *tsc1* and *tsc2* genes. Hamartin and tuberin, encoded by *tsc1* and *tsc2* genes, respectively, are tumor suppressors and play critical roles in cell growth and proliferation. Growth factor-stimulated PI3K/Akt signaling leads to tuberin phosphorylation, then regulates downstream effector function and affects cell growth and proliferation. This review summarizes the latest progresses in hamartin-and tuberin-mediated signaling transduction. We hope this review will give some insights into the understanding of the roles of hamartin and tuberin in cellular signaling and the challenge behind them.

Key words hamartin; tuberin; tumor suppressor

Received: November 1, 2004 Accepted: April 15, 2005

*Corresponding author. Tel: 86-21-50506056, Fax: 86-21-50807088, E-mail: lglou@mail.shcnc.ac.cn