

ITSN1 蛋白磷酸化的研究进展

张莹华 综述, 马勇杰 审校

(天津医科大学肿瘤医院细胞生物学实验室, 国家肿瘤临床医学研究中心, 天津市“肿瘤防治”重点实验室, 天津市恶性肿瘤临床医学研究中心, 天津 300060)

摘要 Intersectin(ITSN), 又称 EHS1、Dap60 和 ESE-1, 该基因位于人体第 21 号染色体上, 编码一种高度保守的多结构域细胞衔接蛋白, 主要调节胞吞和胞吐、肌动蛋白细胞骨架重排等生物学过程。磷酸化是蛋白质翻译后修饰的主要类型, 受到蛋白激酶和磷酸酶的共同调节而保持一种动态平衡, 在正常生命活动乃至肿瘤发生中发挥作用。本文总结了 ITSN1 磷酸化后参与的生物学过程及在一些疾病中的作用, 希望能进一步了解磷酸化是如何调节 ITSN1 蛋白的功能。

关键词 ITSN1; 磷酸化; 生物学; 疾病

中图分类号 Q51

文献标志码 A

1 ITSN1 蛋白的简介

Intersectin(ITSN)是一种多结构域的细胞衔接蛋白, 在进化过程中相当保守, 在线虫、节肢动物、鱼、非洲爪蟾和哺乳动物中都有表达。人类有 2 个 ITSN 基因, 分别是 ITSN1 和 ITSN2, 二者的氨基酸序列和结构域高度相似^[1]。

ITSN1 通过选择性剪切产生 2 种亚型: 短亚型(ITSN1-S)和长亚型(ITSN1-L), 短亚型在多种细胞和组织中广泛表达, 长亚型的表达具有神经元特异性^[2]。ITSN1-S 由 N 端的两个 Eps15 同源结构域(EH1/EH2)、中间的一个螺旋-螺旋区(CC)和 C 端 5 个串联的 Src 同源结构域 3(SH3A/SH3B/SH3C/SH3D/SH3E)构成; ITSN1-L 在 C 端延伸出了 3 个结构域: Dbp1 同源结构域(DH)、Pleckstrin 同源结构域(PH)和 C2 结构域^[2]。

ITSN1 参与内吞和胞吐、细胞信号传导、细胞存活和肌动蛋白细胞骨架重排等生物学过程, 与唐氏综合征(Down syndrome, DS)和阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)的进展相关, 还参与癌细胞的存活和迁移^[3]。

2 蛋白质磷酸化的功能

磷酸化主要发生在 Ser 和 Thr 残基上, Tyr 通常低于 1%, 主要是由于 P-Tyr 残基半衰期短, 几乎不作为结构蛋白执行功能^[4]。根据底物特异性对 Ser/Thr 蛋白激酶进行分类, 主要包括 Pro-directed、嗜碱性和嗜酸性^[5]。蛋白质的磷酸化不仅在生理条件下发挥许多生物学功能, 而且在疾病中也扮演着不可替代的角色。磷酸化可以快速改变蛋白质的性质

(酶活性), 改变蛋白质与其他蛋白质的相互作用, 改变蛋白质的细胞内定位, 使蛋白质的构象发生改变或使蛋白质靶向溶酶体降解^[4,6]。酪氨酸激酶可以使一种含锌指的 DNA 结合蛋白磷酸化, 增强其核定位及转录因子的功能^[7]。

各种激酶通过基因扩增等机制在癌症中的表达呈增加的趋势, 促进细胞的恶性转化^[8]。磷酸化的 HK(糖酵解途径中的限速酶己糖激酶)能够增强沃伯格效应, 促进肿瘤的发生和转移^[9]。进一步明确激酶与底物的关系有利于我们对疾病进行靶向治疗^[5]。

3 ITSN1 蛋白磷酸化参与的生物学过程

关于 ITSN1 磷酸化的证据大多来源于生物信息学数据, 多项研究在不同细胞系中利用质谱检测到 ITSN1 同种氨基酸不同位点以及不同类型氨基酸不同位点的磷酸化。

磷酸化数据库 Phospho.ELM 提示, ITSN 发生多种氨基酸位点的磷酸化修饰。其中丝氨酸磷酸化位点 34 个, 分别为 Ser122、Ser184、Ser188、Ser192、Ser203、Ser208、Ser220、Ser221、Ser313、Ser315、Ser318、Ser324、Ser559、Ser564、Ser624、Ser687、Ser735、Ser840、Ser897、Ser901、Ser902、Ser904、Ser970、Ser976、Ser978、Ser981、Ser983、Ser984、Ser986、Ser989、Ser995、Ser1137、Ser1645、Ser1670; 苏氨酸磷酸化位点 14 个, 分别为 Thr127、Thr477、Thr567、Thr832、Thr839、Thr861、Thr897、Thr899、Thr977、Thr1144、Thr1146、Thr1383、Thr1501、Thr1638; 酪氨酸磷酸化位点 4 个, 分别为 Tyr922、Tyr1208、Tyr1132、Tyr1334。ITSN1 发生磷酸化的比例为 65.4%(Ser)、26.9%(Thr)、7.7%(Tyr), 这与蛋白质磷酸化主要发生在 Ser 和 Thr 残基上的报道一致^[4]。

基金项目 国家自然科学基金面上项目(81572851)

作者简介 张莹华(1990-), 女, 硕士在读, 研究方向: 生物化学与分子生物学; 通信作者: 马勇杰, E-mail: yongjiemagu@aliyun.com。

3.1 ITSN1 磷酸化与早期胚胎发育 胚胎发育是孕育新生命的开始,胚胎干细胞可以分化为多种组织器官,因此在疾病治疗中具有很大的潜力。在胚胎干细胞中,参与细胞骨架重排、细胞粘附、有丝分裂细胞周期、抗细胞凋亡等过程的蛋白的磷酸化升高。Ilyas 等利用质谱在胚胎干细胞中检测到 ITSN1 发生磷酸化^[10],由于 ITSN1 参与细胞骨架重排,因此它可能通过磷酸化修饰而影响胚胎干细胞的运动。

多种与 RTK 信号通路相关的蛋白在胚胎干细胞中发生磷酸化,Laurence 等的质谱结果提示 ITSN1 在 hESC 中具有磷酸化修饰^[11]。ITSN1 与 E3 泛素化连接酶相互作用可以促进 EGFR 的降解,磷酸化的 ITSN1 可能以其他方式调节 RTK 信号通路,对细胞生长和细胞分化有影响。虽然目前还不清楚 ITSN1 是如何通过磷酸化而影响胚胎干细胞,但可以认为它在早期胚胎发育中一定扮演着重要的角色。

3.2 ITSN1 磷酸化与 MAPK 信号通路 MAPK 在细胞信号通路中占有重要地位,受到蛋白磷酸化和脱磷酸化的共同调节。

前列腺素 E₂ 可以增加细胞内 cAMP 的水平,影响 PI3K/AKT/MAPK 信号通路,与细胞骨架调控、细胞周期相关。质谱显示 ITSN1 在前列腺素 E₂ 刺激的 T 细胞中发生磷酸化^[12]。与此结论一致,Piero 等在前列腺素 E₂ 刺激的 T 细胞中发现 ITSN1 Ser 磷酸化^[13]。在异丙肾上腺素刺激的 HEK 细胞中发现大部分磷酸化蛋白与 MAPK 信号传导相关,质谱检测到 ITSN1 的磷酸化^[14]。Justin 等在前列腺癌中发现 AKT/mTOR/MAPK 信号传导中的蛋白质发生磷酸化,同时利用质谱检测到 ITSN1 的磷酸化^[15]。EGF 刺激可以活化 EGFR 的磷酸化和 MAPK 信号通路,Honggang 等在 EGF 刺激的细胞中发现 ITSN1 发生磷酸化修饰^[16]。

ITSN1 与细胞骨架调控密切相关,可调节 MAPK 信号通路,ITSN1 有可能通过磷酸化与 MAPK 信号通路的某些组分相互作用而影响细胞存活。

3.3 ITSN1 磷酸化与 DNA 损伤应答 紫外线、电离辐射、烷化剂、碱基类似物等多种理化因素可以使细胞发生 DNA 损伤,若没有及时对这种损伤做出应答将会影响细胞生长。为此,细胞在进化过程中形成了各种应对 DNA 损伤的机制。

溶血磷脂酸可以诱导肾癌细胞发生 DNA 损伤,Thiemo 等通过质谱检测到 ITSN1 在溶血磷脂酸处理的肾癌细胞中磷酸化升高^[17]。Cockayne 综合征 B 蛋白参与 DNA 损伤反应,可被泛素化及磷酸化,说明翻译后修饰在 DNA 损伤反应中发挥关键作用。

Stefan 等在紫外线照射的细胞中利用质谱发现多种磷酸化蛋白,包括 ITSN1^[18]。因此,ITSN1 磷酸化后可能参与 DNA 损伤反应。

3.4 ITSN1 蛋白磷酸化与细胞核定位 蛋白质可通过磷酸化、核定位信号、蛋白相互作用 3 种不同的方式穿梭到细胞核。

Gualtiero 等发现 ITSN1 能以染色体区域维持 1 依赖性的方式从细胞质穿梭到细胞核,在 SH3 结构域内找到入核信号序^[3]。Mathias 等的质谱结果显示 ITSN1 在核孔复合物中具有磷酸化修饰^[19]。有研究利用质谱分析 HeLa 细胞核,发现大多数磷酸化蛋白位于线粒体和内质网等细胞核相关的细胞器,同时检测到 ITSN1 的磷酸化^[5]。有研究者在分析比较 Hela 细胞有丝分裂前期(G1 期)和有丝分裂期(M 期)蛋白质发生磷酸化的情况时,发现 ITSN1 在 M 期发生磷酸化,而 G1 期则没有此现象^[6]。可能磷酸化和核定位信号这两者共同协调 ITSN1 入核。

4 ITSN1 磷酸化与疾病

多项研究发现蛋白磷酸化参与疾病的发展,尾侧同源盒转录因子 1 使 p38MAPK 磷酸化增加,STAT3 磷酸化降低,抑制结直肠癌细胞增殖^[20]。骨桥蛋白使 Akt 磷酸化增加,促进胶质瘤的恶性进展^[21]。ERK 在卵巢癌细胞中的磷酸化显著升高,这可能是卵巢癌细胞对顺铂治疗耐药的原因之一^[22]。

4.1 ITSN1 磷酸化与病毒感染 ITSN1-s 在胰腺癌、肺癌、脂肪肉瘤和威尔姆氏肿瘤中高表达。虽然 ITSN1 在内吞和胞吐过程中发挥关键作用,但它主要通过信号转导参与肿瘤的发生^[3]。质谱提示 ITSN1 在流感病毒感染的巨噬细胞中发生磷酸化,它可能通过磷酸化参与病毒对宿主细胞的感染过程^[23]。Oleksandr 等在过表达潜伏膜蛋白 2A 的 HEK293 细胞中利用免疫共沉淀发现蛋白激酶 SYK 使 ITSN1 发生酪氨酸磷酸化,脾酪氨酸激酶磷酸化 ITSN1 需要依赖潜伏膜蛋白 2A^[24]。因此 ITSN1 的磷酸化与病毒感染细胞的过程相关。

4.2 ITSN1 磷酸化与结直肠癌 肿瘤微环境中的外泌体可以转运核酸和蛋白质,磷酸化酪氨酸(pTyr)的水平高于细胞外泌体,肿瘤细胞的外泌体有丰富的受体酪氨酸激酶,如 EGFR 和 HER2。

结直肠癌中的大部分磷酸化蛋白与 ephrin 信号传导途径(细胞骨架重塑)相关,Eph 蛋白是酪氨酸激酶受体超家族成员之一,通过 AKT 和 PI3K 磷酸化依赖性信号传导与结直肠癌进展相关。ITSN1 与 ephrin 信号传导和 RTK 信号通路相关,质谱显示 ITSN1 在结直肠癌中被磷酸化^[25]。Tkashi 等^[26]的质谱

显示 ITSN1 在结直肠癌中磷酸化, 其他高度磷酸化的蛋白参与细胞周期和 DNA 复制。

4.3 ITSN1 磷酸化与肺癌 在对吉西他滨耐药的肺癌细胞中发现几种蛋白的磷酸化显著升高, 而 EGFR 的磷酸化水平却降低。该研究通过质谱发现 ITSN1 发生磷酸化, 该磷酸化可能参与肺癌细胞的耐药性过程^[27]。在对达沙替尼敏感的肺癌细胞中发现参与细胞骨架调节的蛋白其磷酸化较高。ITSN1 广泛参与细胞骨架调节, 并且与 EGFR 信号通路相关, Martin 等利用质谱在肺癌中发现 ITSN1 发生磷酸化修饰^[28]。

RTK 信号通路中的 EGFR 和 HER2 在非小细胞肺癌中表达上调, 促进细胞增殖、肿瘤侵袭和转移。在肺癌中观察到多种磷酸化蛋白与 ErbB、Raf/MEK/ERK 信号通路相关。Devin 等利用质谱在非小细胞肺癌中发现 ITSN1 发生磷酸化修饰^[29]。ephrin 和 Eph 信号传导在多种癌症中失调, 在过表达 ephrin B3 的非小细胞肺癌中发现多种磷酸化蛋白质, 包括 ITSN1^[30]。

4.4 ITSN1 磷酸化与神经系统疾病 额颞叶变性是一种神经退行性疾病, 主要特点是细胞中有大量的泛素化/磷酸化的 TAR DNA 结合蛋白-43。在额颞叶变性中发现几种异常磷酸化的蛋白, 因此磷酸化失调有助于该疾病的发展。Jeremy 等使用质谱在额颞叶变性中发现了磷酸化的 ITSN1^[31]。

AD 是最常见的痴呆形式, 患者脑中磷酸化的 tau 蛋白升高, 这有助于形成神经结节, 使神经丝和微管相关蛋白 1B 的磷酸化增加。GSK-3 β 、CDK5、MAPK 和 PP2A 等多种激酶和磷酸酶参与这种异常修饰。Haiyan 等利用质谱在 AD 中发现 ITSN1 有磷酸化修饰^[32]。因此 ITSN1 磷酸化可能与神经系统疾病密切相关。

ITSN1 的磷酸化与早期胚胎发育、MAPK 信号通路、DNA 损伤、细胞核定位等过程相关。多项研究通过质谱在神经系统疾病、病毒感染、结直肠癌、肺癌、卵巢癌^[33]、乳腺癌^[34]等疾病中检测到 ITSN1 的磷酸化。ITSN1 如何通过磷酸化参与疾病的发生发展, 目前的研究还不是很明确。

参考文献:

- [1] Gubar O, Morderer D, Tsyba L, et al. Intersectin: the crossroad between vesicle exocytosis and endocytosis[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2013, 4(109):1
- [2] Gryaznova T, Gubar O, Burdyniuk M, et al. WIP/ITSN1 complex is involved in cellular vesicle trafficking and formation of filopodia-like protrusions[J]. Gene, 2018, 674(2):49
- [3] Alvisi G, Paolini L, Contarini A, et al. Intersectin goes nuclear: secret life of an endocytic protein[J]. Biochem J, 2018, 475(8):1455
- [4] Sharma K, Souza R C, Tyanova S, et al. Ultra-deep human phosphoproteome reveals a distinct regulatory nature of Tyr and Ser/Thr-Based signaling[J]. Cell Rep, 2014, 8(5):1583
- [5] Beausoleil S A, Jedrychowski M, Schwartz D, et al. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(33):12130
- [6] Dephoure N, Zhou C S, Villen J, et al. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(31):10762
- [7] Uckuna F M, Ma H, Z J, et al. Serine phosphorylation by SYK is critical for nuclear localization and transcription factor function of Ikaros[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(44):18072
- [8] Kettenbach A N, Schwappe D K, Faherty B K, et al. Quantitative phosphoproteomics identifies substrates and functional modules of aurora and Polo-Like kinase activities in mitotic cells[J]. Sci Signal, 2013, 4(179):1
- [9] 徐婷婷. c-Src 通过磷酸化激活 HK 促进肿瘤的发生和转移[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2017, 56(2):1
- [10] Singec I, Crain A M, Hou J J, et al. Quantitative analysis of human pluripotency and neural specification by in-depth (Phospho) proteomic profiling[J]. Stem Cell Reports, 2016, 7(3):527
- [11] Brill L M, Xiong W, Lee K B, et al. Phosphoproteomic analysis of human embryonic stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2009, 5(2): 204
- [12] Graaf E L, Giansanti P, Marrien Altelaar A F, et al. Single-step enrichment by Ti4-IMAC and label-free quantitation enables in-depth monitoring of phosphorylation dynamics with high reproducibility and temporal resolution[J]. Mol Cell Proteomics, 2014, 13(9): 2426
- [13] Giansanti P, Aye T T, Toorn H, et al. An augmented multiple-protease-based human phosphopeptide atlas[J]. Cell Rep, 2015, 11(11):1834
- [14] Ruse C I, McClatchy D B, Lu B, et al. Motif-specific sampling of phosphoproteomes[J]. J Proteome Res, 2008, 7(5):2140
- [15] Drake J M, Paull E O, Graham N A, et al. Phosphoproteome integration reveals patient-specific networks in prostate cancer[J]. Cell, 2016, 166(4):1041
- [16] Huang H, Petersen M H, Ibanez-Vea M, et al. Simultaneous enrichment of cysteine-containing peptides and phosphopeptides using a cysteine-specific phosphonate adaptable tag (CysPAT) in combination with titanium dioxide(TiO₂) chromatography[J]. Mol Cell Proteomics, 2016, 15(10):3282
- [17] Schreiber T B, Usbacher N M, Keri G, et al. An integrated phosphoproteomics work flow reveals extensive network regulation in early lysophosphatidic acid signaling[J]. Mol Cell Proteomics, 2010, 9(6): 1047
- [18] Boeing S, Williamson L, Encheva V, et al. Multiomic analysis of the UV Induced DNA damage response[J]. Cell Rep, 2016, 15(7):1597
- [19] Wilhelm M, Schleg J, Hahne H, et al. Mass-spectrometry-based draft of the human proteome[J]. Nature, 2014, 509(7502):582
- [20] 张东升, 周方正, 王小聪, 等. CDX1 对结直肠癌细胞增殖凋亡及 p38MAPK 磷酸化水平的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(17):2665
- [21] 胡军, 程妮, 钟占强, 等. CD44v6 通过 Akt 信号通路调节胶质瘤细胞生长[J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(19):3022
- [22] 黄平, 李彦英, 李玲玲, 等. ATIP3a-HMGA2-ERK 信号通路对卵

- 巢上皮细胞癌顺铂耐药性的影响[J].河北医科大学学报,2018,39(10):1179
- [23] Soderholm S, Kainov D E, Hman T O, et al. Phosphoproteomics to characterize host response during influenza A virus infection of human macrophages[J]. Mol Cell Proteomics, 2016,15(10):3203
- [24] Dergai O, Dergai M, Skrypkina I, et al. The LMP2A protein of Epstein-Barr virus regulates phosphorylation of ITSN1 and Shb adaptors by tyrosine kinases [J]. Cell Signalling, 2013,25(1):33
- [25] Guo J H, Cui Y Z, Yan Z Q, et al. Phosphoproteome characterization of human colorectal cancer SW620 cell-derived exosomes and new phosphosite discovery for C-HPP[J]. J Proteome Res, 2016,15(11):4060
- [26] Shiromizu T, Adachi J, Watanabe S, et al. Identification of missing proteins in the neXtProt database and unregistered phosphopeptides in the phospho site plus database as part of the chromosome-centric human proteome project [J]. J Proteome Res, 2013,12(6):2414
- [27] Tsai C F, Wang Y T, Yen H Y, et al. Large-scale determination of absolute phosphorylation stoichiometries in human cells by motif-targeting quantitative proteomics[J]. Nat Commun, 2015,6:1
- [28] Klammer M, Kaminski M, Zedler A, et al. Phosphosignature predicts dasatinib response in non-small cell lung cancer[J]. Mol Cell Proteomics, 2012,11(9):651
- [29] Schweppe D K, Rigas J R, Gerber S A. Quantitative phosphoproteomic profiling of human non-small cell lung cancer tumors[J]. J Proteomics, 2013,91:286
- [30] Stahl S, Branca R M, Efazat G, et al. Phosphoproteomic profiling of NSCLC cells reveals that ephrin B3 regulates pro-survival signaling through Akt1-mediated phosphorylation of the EphA2 receptor [J]. J Proteome Res, 2011, 10(5):2566
- [31] Herskowitz J H, Seyfried N T, Duong D M, et al. Phosphoproteomic analysis reveals site-specific changes in GFAP and NDRG2 phosphorylation in frontotemporal lobar degeneration[J]. J Proteome Res, 2010, 9(12):6368
- [32] Tan H Y, Wu Z P, Wang H, et al. Refined phosphopeptide enrichment by phosphate additive and the analysis of human brain phosphoproteome [J]. Proteomics, 2015,15(2-3):500
- [33] Mertins P, Yang F, Liu T, et al. Ischemia in tumors induces early and sustained phosphorylation changes in stress kinase pathways but does not affect global protein levels[J]. Mol Cell Proteomics, 2014,13(7):1690
- [34] Mertins P, Mani D R, Ruggles K V, et al. Proteogenomics connects somatic mutations to signaling in breast cancer [J]. Nature, 2016, 534(7605):55

(2018-11-24 收稿)

欢迎投稿 欢迎订阅