

从晶体结构

对PI3K（磷脂酰肌醇（-3）激酶）的 p110 α 催化亚基（catalytic subunit）和p85 α 调节亚基（regulatory subunit）所组成的复合体的晶体结构进行的研究，揭示了p110 α 原癌基因突变（oncogenic mutation）激活蛋白质的机制。



图片来源: *Image courtesy of Nicola McCarthy*

很 早以前，人们便已经发现PI3K信号通路的紊乱与癌症

的发生进展相关。但直到最近，才鉴定出癌症进展是源于通常发生在PIK3CA上的突变，PIK3CA是编码p110 α 催化亚基的基因。Bert Vogelstein、Sandra Gabelli、Mario Amzel及其同事已经鉴定出位于p110 α 及其调节亚基（p85 α ，由PIK3R1编码）之间的复合体的结构，为进一步了解PIK3CA的常见突变奠定了基础。

通过杆状病毒载体，Bert Vogelstein等研究人员可稳定表达p110 α 蛋白质，但它必须与p85 α 共表达。不过，值得注意的是，这样的方法会导致蛋白质凝聚。因此，研究者又提出了假设：究竟p85 α 不同的截短变异（truncated versions）是否可以提高p110 α 蛋白质的可溶性表达呢？经试验证实，p85 α 的 322–600残基可以获得最大量的p110 α 蛋白质可溶性表达。该残基结构中N端的SH2结构域（nSH2）可与p110 α 的SH2结构域（iSH2）相结合。该复合体也具有催化活性，所得p110 α -niSH2晶体可以进行分辨率为3.05埃水平的结构研究。

现已发现PIK3CA突变可发生在以下区域：N末端接头结合域（N-terminal adaptor binding domain, ABD），与膜结构相互作用的C2结构域，功能未知的螺旋状结构域及激酶结构域。研

看信号通路的传导

研究人员通过对晶体结构的研究，更深入地了解到在这些结构域上发生的突变是如何干扰p110 α 的功能的。比如，位于ABD的Arg38和Arg88较常见的是突变成为半胱氨酸、组氨酸或谷氨酰胺，而该结构域因基因突变而改变的结构表明，这些突变会改变ABD与激酶结构域之间的相互作用，从而改变酶活性。据推测，C2结构域的突变会改变p110 α 与细胞膜之间的相互作用。然而，对该结构域晶体结构方面的研究结果表明，位于C2结构域的Asn345的突变会破坏该结构域与p85 α 的iSH2结构域之间的相互作用，从而导致p110 α 的激活。此外，还有一种较少见的发生于p85 α 的突变，会导致蛋白质571位残基的截短。据推测，此类突变会抑制p85 α 抑制性结构域的功能。然而，针对该结构域进行的结构研究结果表明，该蛋白质的截短会降低iSH2卷曲螺旋

部分的稳定性，破坏其与p110 α 内Asn345之间的相互作用。

新的结构证实了此前一些生物化学方面的研究发现。p110 α 的螺旋结构域包含两个突变热点：Glu542和Glu545，以及另一个位于蛋白质表面的突变率稍低的突变位点Gln546。生化研究结果表明这些位点可以与p85 α 的N端SH2结构域相互作用，从而抑制p110 α 活性。由于p85 α 的这部分亚基的晶体结构还没有得到很好的研究，所以研究人员利用先前的晶体结构数据通过建模技术来预测了该蛋白的结构。他们的研究表明这些位点的突变确实会抑制p85 α N末端结构域的抑制作用。

研究人员希望这些采用新晶体结构所获得的研究发现可以应用于p110 α 特异性或突变特异性药物的研发。

蛋白截短试验 (protein truncation test, PTT) :

由于基因的表达产物是蛋白质，因此基因突变的结果往往会在蛋白质水平上有所反映。本方法就是从蛋白质水平的变化来检测基因突变，它主要检测导致开放阅读框改变的碱基缺失或插入突变等。检测时须提取细胞mRNA，将待测靶基因逆转录为cDNA，所用逆转录引物含一段T7启动子和真核细胞翻译起始序列，逆转录产物在无细胞提取液中翻译为相应的蛋白质。如果基因突变导致了开放阅读框的改变，那么合成的蛋白质经SDS-PAGE分离时会出现比正常蛋白质或长或短的蛋白产物。本方法的优点是突变检出率高，并可检测4~5 kb片段的突变；缺点是不能检测不影响开放阅读框的突变，且需要抽提组织mRNA。

参考文献

- [1]Huang, C.-H. et al. The structure of a human p110 /p85 complex elucidates the effects of oncogenic PI3K mutations. Science 318, 1744–1748 (2007)

原文检索: <http://www.signaling-gateway.org/update/updates/200802/nrc2315.html>

筱玥 编译