

蛋白激酶 KSR 的研究进展

杨吉安 陈谦学

摘 要 Ras 激酶抑制因子 KSR 在 MAPK 信号通路中发挥关键作用,在细胞膜上与 RAF、MEK 和 ERK 形成复合体,正性调节 MAPK 信号通路。KSR 作为 MAPK 信号通路的支架蛋白正性调节 Ras/MAPK 信号通路促进肿瘤形成和肿瘤细胞增殖,促进 T 细胞的分化,调节细胞的能量代谢并在炎症中起到保护作用。随着研究的不断深入,人们发现 KSR 能够自磷酸化并直接活化 MEK 并进一步调节细胞的生物学过程,表现出催化活性。KSR 显示出支架蛋白和活性激酶的双重作用,然而其在肿瘤形成等过程中确切的作用还有待于进一步研究。

关键词 Ras 激酶抑制因子 蛋白激酶 支架蛋白 MAPK 信号通路

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.03.003

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路参与调节多种生物学过程,包括细胞增殖、分化、迁移、生存与细胞代谢等。MAPK 信号通路主要由 RAF(MAPKKK)、MEK(MAPKK)和 ERK(MAPK)组成,受到细胞外因子如细胞因子刺激后,磷酸化诸多下游底物参与多种信号转导。有一类被称为支架蛋白或者受体蛋白的蛋白激酶能够结合 Ras/MAPK 信号通路中的多个组分,调节 MAPK 信号通路。Ras 激酶抑制因子(kinase suppressor of Ras, KSR)是最为经典的 MAPK 信号通路调节蛋白,能够正性调节 Ras/MAPK 信号通路。KSR 首先在秀丽隐杆线虫和黑腹果蝇中发现,随后众多研究认为 KSR 不具有催化活性,将其归类为假性激酶,发挥着支架蛋白的作用^[1]。随着人们对 KSR 的研究和认识不断深入,越来越多的证据显示 KSR 在 Ras/Raf/MAPK 信号通路中表现出支架蛋白和活性激酶的双重功能,因而我们需要重新认识 KSR 这一蛋白激酶。

一、KSR 的结构与分布

KSR 家族成员包括 KSR1 和 KSR2,在无脊椎动物和哺乳动物细胞内均有表达。KSR 蛋白结构与 Raf 家族成员蛋白高度相似,主要由 5 个保守区域构成,被称为 CA1-CA5 结构域。位于 N 端的 CA1 结构域由 40 个氨基酸组成,能够与 Raf 蛋白结合。CA1 结构域为 KSR1 蛋白所特有,KSR2 蛋白缺失。CA2

结构域富含脯氨酸,其功能尚不清楚。CA3 结构域是一个富含半胱氨酸的锌指结构,通过与细胞膜的脂质体结合,锚定 KSR 于细胞膜并活化 Ras,因而 CA3 结构域可调节 KSR 蛋白的细胞定位。CA4 结构域是一个富含丝氨酸/苏氨酸的保守序列,包含一个能与 ERK 结合的 FXFP 模体。CA5 结构域位于 KSR 蛋白的 C 端,是一个与 Raf 蛋白激酶结构域类似的激酶样结构域,能够与 MEK 结合^[1]。除以上 5 个结构域外,近来的研究发现 KSR1 还含有 1 个 CC-SAM 结构域,该结构域由 1 个卷曲螺旋和 1 个 SAM 结构组成,KSR1 可通过该结构域结合到细胞质膜的特定位置^[2]。KSR 和 Raf 家族成员不仅在结构上表现出高度相似性,两者的表达模式也近乎相同。哺乳动物体内几乎所有的组织和器官均有表达 KSR 蛋白,其中在脑组织中表达水平最高,子宫、膀胱、肺、肾脏和睾丸等组织中中度表达,心脏、脾脏和肝脏组织中低表达或者不表达^[3]。

二、KSR 的支架蛋白作用

KSR1 作为 Ras/Raf/MAPK 信号通路中的支架蛋白,在细胞膜上与 MAPK 信号通路中的 3 种激酶 Raf/MEK/ERK 形成复合体。在非刺激状态下,Cdc25C 相关激酶 1(C-TAK1)使 KSR1 的 Ser297 和 Ser392 磷酸化,形成结合位点使之与 14-3-3 蛋白结合。此时,KSR1 位于细胞质内,并与 MEK 和 ERK 形成复合体。一旦受到 EGF 等生长因子的刺激后,活化的 Ras 触发蛋白磷酸酶 2A(PP2A),使 KSR1 的 Ser392 去磷酸化,导致 14-3-3 蛋白从结合位点释放。KSR1 与 14-3-3 蛋白解聚这一过程使 KSR1 移位并锚定到细胞膜上,与 Raf、MEK 和 ERK 形成复

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81372683)

作者单位:430060 武汉大学人民医院神经外科

通讯作者:陈谦学,电子信箱:chenqx666@sohu.com

合体。KSR1 增加 Raf、MEK 和 ERK 的磷酸化,促进上游信号转导和下游位于细胞质和细胞核内的多种底物磷酸化,并通过这种方式调节细胞增殖、细胞周期和凋亡等生物学过程^[1]。

通过质谱分析和免疫沉淀等方法对 KSR2 的形成的复合物进行检测后发现,KSR2 与 KSR1 一样,能够作为支架蛋白与 MAPK 信号通路中的 B-Raf、MEK 和 ERK 结合并与之形成复合体,参与活化酪氨酸介导的 MAPK 信号通路的调节。此外,研究证实参与 KSR1 分布和功能调节的 C-TAK1、14-3-3 和 PP2A 等蛋白也参与对 KSR2 的调节^[4]。

近年对 KSR1 结构的进一步研究发现 KSR1 涉及多种支架复合体的形成。生长因子刺激后,KSR1 的功能结构域 CA1 区与 B-Raf 和 MEK 结合形成三聚体,进一步活化 MEK 和 ERK。ERK 反过来磷酸化 KSR1 和 B-Raf 的若干反馈丝氨酸/苏氨酸磷酸化位点,导致 KSR1 从细胞膜上解离。在 Raf 抑制剂作用下,KSR1 可与 C-Raf 竞争性地结合 B-Raf,进而调节下游的 ERK 信号^[5]。当 KSR1 与 Raf 形成边对边 KSR1-Raf 二聚体后,KSR1 能够直接调节 Raf 活化,然而 KSR1 的这一功能与其催化活性无关^[6]。KSR1 的 CA1 结构域与酪蛋白激酶 2 (CK2) 结合后形成 KSR1 支架复合体参与调节 Raf 激酶活性,促进 ERK 信号活化。阻断 CK2 与 KSR1 之间的结合或抑制 CK2 活性后生长因子介导的 C-Raf 和 B-Raf 磷酸化程度明显减低。与 CK2 正性调节 MAPK 信号通路相反的是,有丝分裂信号传播阻滞剂 (IMP) 结合 KSR1,阻碍 Raf-MEK 复合体的形成^[1]。最新的研究显示 GEF-H1 也是 KSR1 复合体中的一部分,与 PP2A 的 B 亚基结合后介导 KSR1 的 Ser392 去磷酸化^[7]。

三、KSR 的活性酶作用

尽管 KSR1 无完整的催化结构域,但是越来越多的证据支持 KSR1 是一个活性酶。早期的体外激酶活性实验显示不同浓度的神经酰胺能够介导 KSR1 的自身磷酸化,并进一步磷酸化 Raf-1 的 Thr269 使之活化。随后的两级激酶试验研究表明 EGF 能够刺激 KSR1 激酶活性的增加。此外,只有全长的 KSR1 才具有 C-Raf-1 信号依赖性的激酶活性,C 端和 N 端缺失突变时丧失其激酶活性^[8]。在肠上皮细胞中,KSR1 对 Raf-1 的直接磷酸化作用对于 TNF- α 介导的 ERK1/2 活化起到了至关重要的作用。这一结果显示 KSR1 的调节性激酶活性在炎症反应过程

中起保护作用^[9]。

蛋白纯化和分子重构等新型生物化学技术的出现,为 KSR 功能特别是催化功能的进一步研究提供了新的思路。在 TNF- α 刺激下,重组的野生型 KSR1 能够自身磷酸化其丝氨酸残基,通过磷酸化作用直接活化 MEK1 进一步调节细胞生存,而突变型无酶活性的 KSR1 对 TNF- α 刺激则不能产生相应的效应^[10]。为了进一步区别 KSR1 的支架作用和激酶作用,Hu 等^[11]通过在 KSR1 的 ATP 结合区域添加一个苯丙氨酸残基构建了丧失 ATP 结合能力 KSR1 突变体 (A587F),这个 KSR1 突变体仍然可作为一个支架蛋白与 MEK 相结合,却不能直接磷酸化 MEK,证实野生型 KSR1 在 C-Raf 诱导时磷酸化 MEK 需要其激酶活性。对 KSR2 激酶结构域的晶体结构研究显示 KSR2 与 MEK1 通过它们各自的活化片段和 C 端半段 α G 螺旋体形成边对边结合。离体激酶试验和化学基因学研究显示,当 ATP 结合其催化位点时,KSR2 便能够磷酸化 MEK1^[12]。

四、KSR 的生物学功能

1. KSR 与肿瘤: Ras/Raf/MAPK 信号通路是一个经典的肿瘤相关的信号通路,而 KSR 在这条信号通路中发挥关键性的作用,因而有许多研究开始探索 KSR 在不同肿瘤中的生物学特征。KSR1 在人类子宫内膜癌组织中高表达,敲除 KSR1 后肿瘤细胞的生长受到抑制^[13]。在 K-Ras 依赖的人类 PANC-1 胰腺癌细胞和 A549 非小细胞肺癌构建的裸鼠异种移植模型中连续注入硫代磷酸反义寡脱氧核苷酸 (ODN) 能够减缓肿瘤的生长,这表明 KSR1 是 Ras 依赖的恶性肿瘤的潜在治疗靶点^[14]。此外,KSR1 与细胞对顺铂的化疗敏感度相关。相对于野生型鼠胚胎成纤维细胞 (MEF),KSR1 缺失的 MEF 细胞中由顺铂介导的 ERK 活化程度减低,顺铂诱导的细胞凋亡增加。KSR1 导入 KSR-/- MEF 细胞和 MCF 细胞后,细胞中 ERK 活化增加,对顺铂的敏感度增加,这说明 KSR1 在细胞对抗肿瘤药物的敏感度中起到重要作用^[15]。此外对人类急性髓系白血病细胞的一项研究显示,1,25-二羟维生素 D₃ 诱发癌蛋白 Cot1 下调 KSR1 蛋白表达,这表明 KSR1 与非固态肿瘤相关^[16]。

KSR2 可通过调节腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 依赖的方式调控肿瘤代谢和细胞增殖。在 KSR 缺失的 MEF 细胞中恢复 KSR2 的表达能够促进细胞增殖并介导非锚定依赖的细胞生长。在 KSR2 缺失的情

况下导入 AMPK 能够恢复细胞转化后的表现型和肿瘤代谢活性^[17]。蛋白激酶组分析显示 KSR1 具有促进 ER α 依赖乳腺癌发展的潜在作用^[18]。然而最近一项研究提示高表达 KSR1 的乳腺癌患者具有较好的预后,这与 KSR1 调节 BRCA1 蛋白降解从而抑制乳腺癌细胞生长相关。在多种人类恶性肿瘤细胞系中,高表达 GEF-H1 介导 KSR1 的 Ser392 去磷酸化,促进肿瘤细胞的生长^[7]。尽管这些研究之间存在差异,但都表明 KSR 在肿瘤中起到重要作用并可能成为 Ras 相关肿瘤的潜在治疗靶点。

2. KSR 与免疫调节:KSR 是一个重要的免疫功能调节因子。NK 细胞中 KSR1 缺失导致 NK 细胞的细胞溶解能力下降。当 T 细胞活化时,KSR1 介导 ERK 在 NK 细胞溶解突触的定位及活化^[19]。在肠道炎症状态下,KSR1 对 TNF- α 等细胞因子所介导的细胞凋亡起到保护作用^[9]。此外,KSR1 也被证实 在细菌性感染中起到重要作用。相对于野生型小鼠,KSR 缺陷型小鼠非常容易被肺铜绿假单胞菌感染,这与 KSR1 募集诱生型一氧化氮合酶(iNOS)和热休克蛋白 90(Hsp90),导致 iNOS 活性增加和 NO 释放消除细菌相关^[20]。然而也有研究显示 KSR 缺失对 T 细胞分化没有明显影响。miR-31 在 T 细胞分化过程中表达上调,miR-31 表达上调时促进 IL-2 的产生并直接作用于 KSR2 的 3'非编码区进而抑制 KSR2 的表达^[21]。

3. KSR 的其他生物学功能:当 KSR1 或 KSR2 缺失时小鼠会出现代谢异常,这提示 KSR 家族成员 KSR1 和 KSR2 均与维持细胞代谢有关。KSR 的两种亚型在能量代谢过程中均能够与关键的能量传感器 AMPK 直接结合,阻断它们之间的直接结合会阻滞 AMPK 的活化和磷酸化进而影响到脂肪酸氧化和糖摄取。除了 KSR2 在维持胰岛素稳态中发挥作用外,KSR1 通过与微管结合调节激酶 2(MARK2)相互作用参与调节糖耐量和胰岛素敏感度。在这个过程中,MARK2 直接磷酸化 KSR1 的 Ser392 发挥其对胰岛素敏感度的负性调节作用。KSR1/2 不仅在调节细胞代谢和能量平衡中的重要作用,还可能成为肥胖等代谢异常的潜在治疗靶点。有研究证实 KSR1 在小鼠脑部高表达,KSR1 缺失时影响小鼠脑部形态的发育。KSR1 通过活化 ERK 及下游的信号通路调节 ERK 依赖性突触的可塑性,进一步影响海马区域的学习和记忆功能。越来越多的研究表明 KSR 参与排卵、造血、胚胎发育和神经分化等诸多生命过程的调节。

近年来对 KSR 结构和功能的研究使我们对 KSR 有了新的认识,KSR 不仅是一个支架蛋白,其还可作为活性激酶磷酸化多种下游底物参与细胞信号转导。然而 KSR 复杂的生物学功能还有待于进一步研究。KSR 作为支架蛋白在不同细胞状态下的结合模式以及可能会产生的多种生物学效应有待于进一步明确。研究提示 KSR 可以作为活性激酶调节 MAPK 信号通路,但是其生理底物、不同环境中催化活性的调节以及其发挥特定生物学功能的亚细胞定位尚不明确。尽管有研究报道 KSR 与肿瘤的关系密切,KSR1 作为恶性肿瘤潜在的治疗靶点的研究还局限于 Ras 依赖性肿瘤。KSR 在脑组织中高表达,而 KSR 特别是 KSR2 是否作用于肿瘤特别是神经系统肿瘤的研究尚不多。KSR 是否与其他肿瘤存在密切的关系,能否成为确切的治疗靶点还需要进一步澄清和验证。另外,KSR 在免疫调节等多种生物学过程中的作用还存在争议。

参考文献

- Meister M, Tomasovic A, Banning A, *et al.* Mitogen-activated protein (MAP) kinase scaffolding proteins: a recount[J]. *Int J Mol Sci*,2013,14(3): 4854-4884
- Koveal D, Schuh-Nuhfer N, Ritt D, *et al.* A CC-SAM, for coiled coil-sterile alpha motif, domain targets the scaffold KSR-1 to specific sites in the plasma membrane[J]. *Sci Signal*,2012,5(255): a94
- Giblett SM, Lloyd DJ, Light Y, *et al.* Expression of kinase suppressor of Ras in the normal adult and embryonic mouse[J]. *Cell Growth Differ*,2002,13(7): 307-313
- Dougherty MK, Ritt DA, Zhou M, *et al.* KSR2 is a calcineurin substrate that promotes ERK cascade activation in response to calcium signals[J]. *Mol Cell*,2009,34(6): 652-662
- McKay MM, Ritt DA, *et al.* RAF inhibitor-induced KSR1/B-RAF binding and its effects on ERK cascade signaling[J]. *Curr Biol*, 2011,21(7): 563-568
- Rajakulendran T, Sahmi M, Lefrancois M, *et al.* A dimerization-dependent mechanism drives RAF catalytic activation[J]. *Nature*, 2009,461(7263): 542-545
- Cullis J, Meiri D, Sandi MJ, *et al.* The RhoGEF GEF-H1 is required for oncogenic RAS signaling via KSR-1[J]. *Cancer Cell*, 2014,25(2): 181-195
- Xing HR, Lozano J, Kolesnick R. Epidermal growth factor treatment enhances the kinase activity of kinase suppressor of Ras[J]. *J Biol Chem*,2000,275(23): 17276-17280
- Yan F, John SK, Wilson G, *et al.* Kinase suppressor of Ras-1 protects intestinal epithelium from cytokine-mediated apoptosis during inflammation[J]. *J Clin Invest*,2004,114(9): 1272-1280
- Goettel JA, Liang D, Hilliard VC, *et al.* KSR1 is a functional protein kinase capable of serine autophosphorylation and direct phosphoryla-

- tion of MEK1[J]. *Exp Cell Res*, 2011, 317(4): 452-463
- 11 Hu J, Yu H, Kornev AP, *et al.* Mutation that blocks ATP binding creates a pseudokinase stabilizing the scaffolding function of kinase suppressor of Ras, CRAF and BRAF[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(15): 6067-6072
 - 12 Brennan DF, Dar AC, Hertz NT, *et al.* A Raf-induced allosteric transition of KSR stimulates phosphorylation of MEK[J]. *Nature*, 2011, 472(7343): 366-369
 - 13 Llobet D, Eritja N, Domingo M, *et al.* KSR1 is overexpressed in endometrial carcinoma and regulates proliferation and TRAIL-induced apoptosis by modulating FLIP levels[J]. *Am J Pathol*, 2011, 178(4): 1529-1543
 - 14 Xing HR, Cordon-Cardo C, Deng X, *et al.* Pharmacologic inactivation of kinase suppressor of ras-1 abrogates Ras-mediated pancreatic cancer[J]. *Nat Med*, 2003, 9(10): 1266-1268
 - 15 Kortum RL, Lewis RE. The molecular scaffold KSR1 regulates the proliferative and oncogenic potential of cells[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(10): 4407-4416
 - 16 Wang X, Studzinski GP. Oncoprotein Cot1 represses kinase suppressors of Ras1/2 and 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced differentiation of human acute myeloid leukemia cells[J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(5): 1232-1240
 - 17 Fernandez MR, Henry MD, Lewis RE. Kinase suppressor of Ras 2 (KSR2) regulates tumor cell transformation via AMPK[J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(18): 3718-3731
 - 18 Giamas G, Filipovic A, Jacob J, *et al.* Kinome screening for regulators of the estrogen receptor identifies LMTK3 as a new therapeutic target in breast cancer[J]. *Nat Med*, 2011, 17(6): 715-719
 - 19 Giurisato E, Lin J, Harding A, *et al.* The mitogen-activated protein kinase scaffold KSR1 is required for recruitment of extracellular signal-regulated kinase to the immunological synapse[J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(6): 1554-1564
 - 20 Zhang Y, Li X, Carpinteiro A, *et al.* Kinase suppressor of Ras-1 protects against pulmonary pseudomonas aeruginosa infections[J]. *Nat Med*, 2011, 17(3): 341-346
 - 21 Xue F, Li H, Zhang J, *et al.* miR-31 regulates interleukin 2 and kinase suppressor of ras 2 during T cell activation[J]. *Genes Immun*, 2013, 14(2): 127-131

(收稿日期:2014-08-31)

(修回日期:2014-09-24)

树突状细胞疫苗抗肿瘤免疫研究进展

段丽芳 张晓芹

摘 要 树突状细胞(dendritic cell, DC)生物学功能的进一步研究显示了其在免疫系统中的关键作用,也为以DC为基础的肿瘤免疫疗法提供了理论依据。但DC疫苗还处于初级阶段,近年来,已经发现了许多扩增DC及其负载抗原的方法,使DC疫苗在肿瘤患者身上开始临床研究成为可能。本文就DC疫苗的临床应用及进展做一综述。

关键词 树突状细胞疫苗 肿瘤免疫疗法 临床研究

中图分类号 R730.51

文献标识码 A

DOI 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.03.004

随着肿瘤免疫疗法的深入研究,已经证实树突状细胞(dendritic cell, DC)在起始免疫应答、诱导免疫记忆以及破坏免疫耐受方面发挥重要的作用,成为肿瘤免疫研究中重要的细胞工具,因此DC疫苗成为近年来的研究热点。随着对DC的扩增及抗原负载方法的深入研究,使得DC疫苗在肿瘤患者身上开始临床研究成为可能。

一、DC的生物学特性

DC的生命周期可以分为两个阶段:不成熟阶段和成熟阶段。在不成熟阶段,DC通过各种机制识别抗原后,不成熟(iDC)递呈抗原给T细胞同时转变为

成熟的DC(mDC)。iDC表面特征性的低表达MHC分子、共刺激分子、黏附分子和DC的标志,同时高表达炎性趋化因子受体,以使它们到达炎症组织。mDC高表达MHC分子、黏附分子、共刺激分子(CD40、CD54、CD58、CD80、CD83和CD86)和DC的标志DC-LAMP,但部分也在iDC表面也低水平的表达,CD83在iDC表面不表达可以用来区分iDC和mDC^[1]。

DC分为CD11c⁺CD123lo髓系DC(mDC)和CD11c-CD123hi浆细胞DC(pDC),pDC是固有免疫的重要介质,也是体内产生INF-γ的重要细胞,pDC定居在血液和淋巴器官中。mDC既停留在血液和淋巴器官也存在于皮肤的真皮和大多数器官的组织间隙中,朗格汉斯细胞作为一种特殊亚型的mDC,存在