

DOI:10.3969/j.issn.1672-5565.201706004

核糖体蛋白 S6 激酶 $\beta 1$ 的分子结构和理化性质分析

刘 畅^{1,2}, 刘 安³

(1.山西医科大学 基础医学院生物化学与分子生物学教研室,太原 030001;

2.长治医学院中心实验室,山西 长治 046000;

3.长治医学院附属和济医院 医务科,山西 长治 046000)

摘要:核糖体蛋白 S6 激酶 $\beta 1$ (Ribosomal protein S6 kinase $\beta 1$, RPS6KB1) 是一个有价值的肝癌诊断和预后标志物,也是一个潜在的基因治疗分子靶点,但其致癌机制和预后价值仍未完全阐明。为了全面认识 RPS6KB1,本文使用生物信息学手段,对 RPS6KB1 蛋白的序列同源性、组织表达、亚细胞定位、理化性质、空间结构及蛋白质相互作用网络进行分析。结果表明人 RPS6KB1 基因编码 525 个氨基酸组成的多肽,在进化过程中高度保守,属于 PKc_like 超家族,是酸性不稳定的亲水蛋白,无信号肽和跨膜区域。该蛋白定位于细胞核的可能性最大,主要二级结构为随机卷曲,存在磷酸化、乙酰化和泛素化位点。与 RPS6KB1 相互作用的蛋白主要是 mTOR 信号途径相关蛋白、PI3K 信号途径相关蛋白、蛋白质合成相关蛋白以及调控胰岛素水平相关蛋白。本文结果为进一步研究 RPS6KB1 的功能及致癌机制提供一定的参考。

关键词:核糖体蛋白 S6 激酶 $\beta 1$; 肝癌; 相互作用蛋白; 预后标志物; 功能

中图分类号: Q71 文献标志码: A 文章编号: 1672-5565(2018)01-015-07

Analysis of the molecular structure and physicochemical property of ribosomal protein S6 kinase $\beta 1$

LIU Chang^{1,2}, LIU An³

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;

2. Central Laboratory of Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China;

3. Medical Department, Heji Hospital Affiliated to Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China)

Abstract: Ribosomal protein S6 kinase $\beta 1$ (RPS6KB1) is a valuable diagnosis and prognostic marker for hepatocellular carcinoma and a potential target for gene therapy, but its carcinogenic mechanism and prognostic value have not been fully elucidated. To gain insightful information of RPS6KB1 protein, bioinformatics methods are applied to analyze the hereditary conservation, tissue expression, subcellular localization, chemical properties, space structure and protein interaction networks of RPS6KB1 protein. The RPS6KB1 protein is highly conserved and comprised of 525 amino acid residues and belongs to the PKc_like super family. It is a hydrophilic unstable protein without signal peptide and trans-membrane region. It is mainly located in the nucleus and the main secondary structure elements are random coil. It contains several phosphorylation, acetylation and ubiquitination sites. Interactive proteins with RPS6KB1 are mainly proteins associated with mTOR signal pathway, PI3K signal pathway, protein synthesis and insulin regulation. Our results provide some reference for further study on the function and carcinogenic mechanism of the protein.

Keywords: RPS6KB1; Hepatocellular carcinoma; Interactive proteins; Prognostic marker; Function

近年来,肝癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)的致死率逐渐攀升,已成为中国第二大致死癌症^[1]。由于目前缺乏特异且敏感的分子标志物,临

床上治疗肝癌通常使用手术切除、化疗和放疗等手段,这些手段的复发或转移几率高,肝癌患者预后不佳,总体生存率低至 25%~39%^[2]。因此,寻找有

效的诊断及预后标志物有助于改善肝癌患者生存状况。临床病理学分析显示,RPS6KB1 的表达水平与肝癌患者的肿瘤体积、组织病理学分类和血清 AFP 水平密切相关^[3]。

核糖体蛋白 S6 激酶 $\beta 1$ (Ribosomal protein S6 kinase $\beta 1$, RPS6KB1),亦被称为 PS6K 或 S6K。近期研究发现,RPS6KB1 在卵巢癌、乳腺癌、非小细胞肺癌、前列腺癌和结直肠癌等固体肿瘤中常常过量表达,且与癌症患者预后差、生存状况不佳呈正相关^[4-6]。RAS/MAPK 和 PI3K/AKT 信号途径作为 mTOR 的主要上游调控网络,能够激活 mTOR-RPS6KB1 途径。p38MAPK 能够通过 mTOR-RPS6KB1-MDM2 途径调控 p53 稳定性,推测 RPS6KB1 为致癌基因^[7-8]。但 RPS6KB1 的致癌机制和诊断预后的价值尚未完全阐明,针对该分子的基因治疗手段也尚未见报道。

越来越多证据表明,在多种实体瘤中,RPS6KB1 是一个有价值的诊断和预后标志物,也是一个潜在的基因治疗分子靶点。研究人员对 30 对肝癌组织和癌旁正常组织中 RPS6KB1 的表达情况进行分析,发现肝癌组织中该蛋白表达水平显著升高。在低分化和中分化组织中 RPS6KB1 过量表达,在高分化组织中其表达水平较低^[3]。因此,RPS6KB1 作为肝癌的一个潜在分子标志物和基因治疗靶点,它的生理功能及其参与的信号通路值得深入研究。本文使用生物信息学分析方法,研究 RPS6KB1 蛋白的理化性质和结构功能,可为进一步研究 RPS6KB1 的作用机制及其作为肝癌治疗潜在靶点提供思路。

1 材料与方法

1.1 RPS6KB1 蛋白序列的获得

使用美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information,NCBI)的蛋白质数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),以“RPS6KB1 + 物种名”为关键词,搜索得到人 RPS6KB1 蛋白的氨基酸序列信息。在哺乳动物中,核糖体蛋白 S6 激酶家族(ribosomal protein S6K,S6 kinase)包括 S6K1 和 S6K2,其中 S6K1 由 RPS6KB1 基因编码,S6K1 又被称为 S6K α ;S6K2 由 RPS6KB2 基因编码,S6K2 又被称为 S6K β ^[9]。本文的分析对象是 RPS6KB1 异构体 α (Accession number: NP_003152)。

1.2 系统进化树构建

在 NCBI 中,进行 BLASTp 同源搜索,得到 RPS6KB1 在不同物种中的同源蛋白质序列。使用

Clustal2.1 软件进行同源蛋白间的多重序列比对。使用 MEGA6 软件,Neighbor-joining 方法,设置 Boot-strap 分析重复数为 1 000,构建系统进化树^[10],并计算进化距离。

1.3 组织表达特异性和亚细胞定位预测

使用 NCBI 的 UniGene 数据库中 EST 结果对 RPS6KB1 在正常组织和癌变组织中的表达情况进行分析。使用 PSORTII (<https://psort.hgc.jp/>)进行 RPS6KB1 的亚细胞定位预测。

1.4 理化性质分析

将 RPS6KB1 蛋白序列输入到 ExPASy 数据分析系统中,使用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)工具,对 RPS6KB1 的分子式、分子量、等电点、酸碱性和稳定性等理化性质进行分析。使用 ProtScale 工具 (<http://web.expasy.org/protscale/>)对 RPS6KB1 的亲疏水性进行分析。使用 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析 RPS6KB1 有无切割位点和信号肽,TMHMM 2.0 工具 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)分析 RPS6KB1 有无跨膜区域。

1.5 二级结构和高级结构分析

使用 SOPMA 工具 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl)预测 RPS6KB1 的二级结构及各成分所占比例。使用 NCBI 的 Conserved Domain 数据库分析结构域。使用 SWISS-MODEL 建模服务器 (<https://swissmodel.expasy.org/>)预测三维结构。

1.6 磷酸化位点分析

使用 PhosphoSitePlus 工具 (<http://www.phosphosite.org/homeAction.action>)对 RPS6KB1 的磷酸化位点进行分析。

1.7 相互作用蛋白预测

使用 STRING 数据库 (<http://string-db.org/>),设置为高置信度 0.7,数量限制在 10 个以内,构建与 RPS6KB1 相互作用的蛋白网络。

2 结果与分析

2.1 RPS6KB1 蛋白多序列比对和进化关系分析

在 NCBI 数据库中搜索到人 RPS6KB1 蛋白在哺乳动物、两栖类和鱼类中的同源序列。人 RPS6KB1 蛋白的氨基酸序列与猕猴、黑猩猩、野猪、猫、大鼠、小鼠、鸡、非洲爪蟾和斑马鱼的相似性分别为 98.68%、96.00%、99.62%、95.43%、99.43%、99.43%、92.95%、87.05%和 80.72%。图 1 中系统进化树分支上的数字代表进化距离。结果表明,

序列相似度为 61 % ,覆盖率为 65 % ,该模型结构合理。

使用 PhosphoSitePlus 分析 RPS6KB1 翻译后修饰情况,发现赖氨酸会发生乙酰化和泛素化修饰,精氨酸会发生甲基化修饰,丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸会发生磷酸化修饰。有文献报道,RPS6KB1 的 C 末端 Lys516 能够发生乙酰化,且乙酰化修饰有利于增强蛋白稳定性。RPS6KB1 至少有八个磷酸化位点,包

括催化结构域中的 Thr229,连接区域的 Ser371, Thr389 和 Ser404,以及自抑制结构域中的 Ser411, Ser418, Thr421 和 Ser424^[12]。目前认为 RPS6KB1 的激活首先由 mTORC1 磷酸化 Thr421/Ser424 位点和 T389 位点,接着 PDK1 使 Thr229 位点磷酸化^[12]。进一步研究磷酸化程度及动态变化情况,有利于加深对 RPS6KB1 蛋白功能的理解。

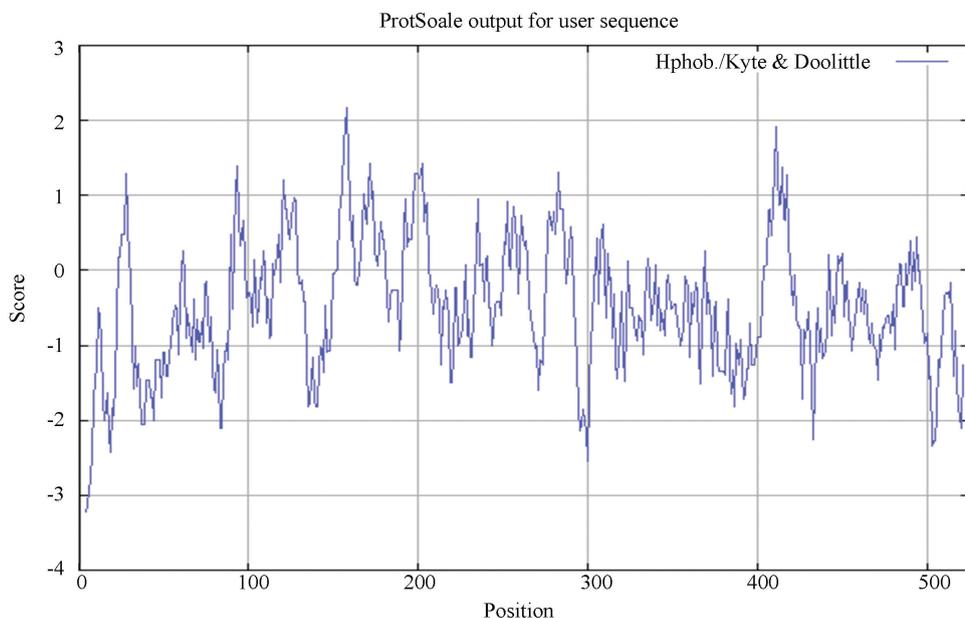


图2 ProtScale 分析 RPS6KB1 蛋白的亲疏水性

Fig.2 Hydrophobicity profile of the RPS6KB1 protein analyzed by ProtScale

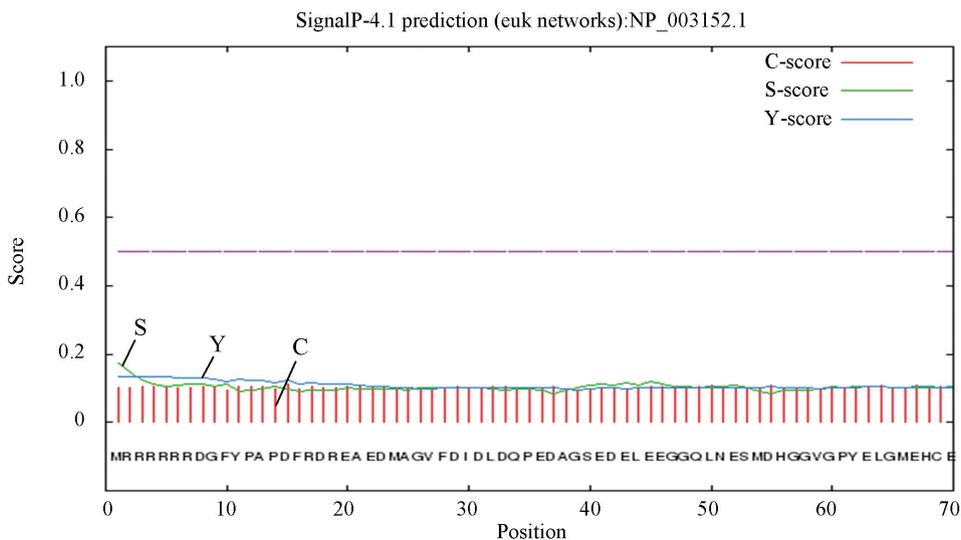


图3 RPS6KB1 蛋白的信号肽分析结果

Fig.3 The analysis result of RPS6KB1 signal peptide

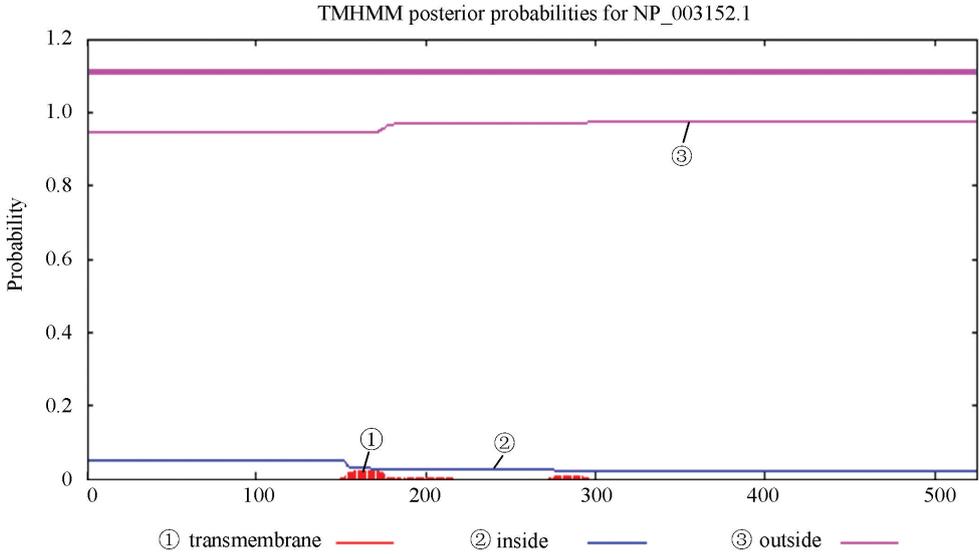


图 4 RPS6KB1 蛋白跨膜结构分析

Fig.4 Trans-membrane domain analysis of RPS6KB1

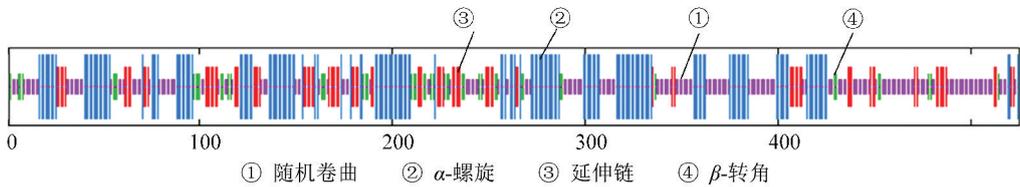


图 5 SOPMA 预测 RPS6KB1 蛋白二级结构

Fig.5 Predicted secondary structure of RPS6KB1 protein by SOPMA

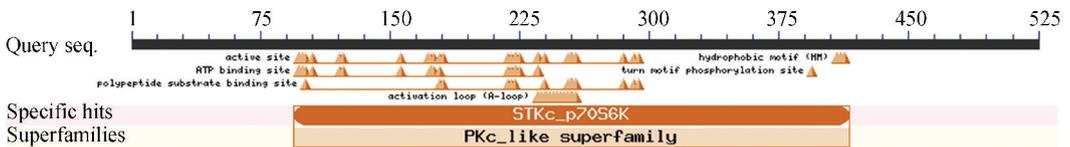


图 6 RPS6KB1 蛋白保守结构域

Fig.6 Conserved domain of RPS6KB1 protein

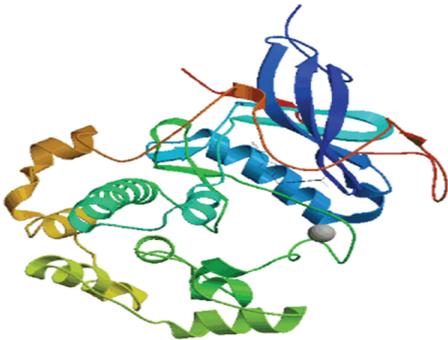


图 7 RPS6KB1 三维结构预测

Fig.7 Three dimensional structure prediction of RPS6KB1

2.5 RPS6KB1 蛋白质相互作用分析

使用 STRING 数据库搜索与 RPS6KB1 相互作用的蛋白质信息,构建 RPS6KB1 蛋白相互作用网络

(见图 8)。与 RPS6KB1 相互作用的蛋白质主要包括 mTOR(mechanistic target of rapamycin)信号途径相关蛋白:mTOR、RPTOR(Regulatory associated protein of mTOR, complex 1)、RICTOR(RPTOR independent companion of mTOR, complex 2)、RHEB(Ras homolog enriched in brain);PI3K 信号途径相关蛋白:PIK3CA(Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha);蛋白质合成相关蛋白:RPS6(Ribosomal protein S6)、EIF4E(Eukaryotic translation initiation factor 4E)、EIF4B(Eukaryotic translation initiation factor 4B)以及调控胰岛素水平相关蛋白:INS(Insulin)、IRS1(Insulin receptor substrate 1)。值得关注的是,RPS6KB1 与 mTOR 信号途径多种蛋白存在相互作用。

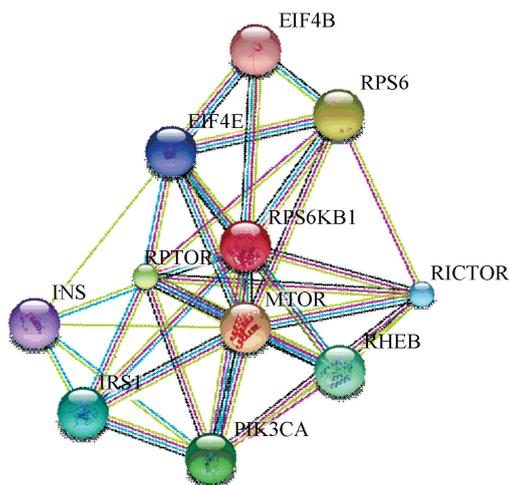


图8 STRING 预测 RPS6KB1 蛋白相互作用网络

Fig.8 Protein-protein interaction network for RPS6KB1 predicted by STRING

3 讨论

根据 STRING 预测结果,推测 RPS6KB1 是 mTOR 信号途径的关键效应物,也是 mTOR 的主要底物。在许多癌细胞中,PI3K/AKT/mTOR 信号途径紊乱,促进细胞生长、增殖和存活。mTOR 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,能够磷酸化 RPS6KB1 将其激活,活化的 RPS6KB1 进一步磷酸化 RPS6、EIF4E 和 EIF4B,调控翻译起始复合体活化及转录翻译过程^[13]。mTOR 作为一种保守的蛋白激酶,是调控细胞生长和增殖的关键分子,能够直接或间接调控细胞周期相关蛋白和代谢相关蛋白磷酸化,也能够通过磷酸化转录因子(如:RPS6KB1)调控癌变过程中相关基因的表达^[9]。因此,评估 mTOR 下游效应物及其在肝癌发生发展中的作用,探索 mTOR 信号途径中基因突变的临床相关性,开发针对 mTOR 的抑制剂值得进一步关注。研究发现,干扰 RPS6KB1 表达并不影响小鼠的存活和繁殖,但对小鼠生长,尤其在胚胎发育阶段有显著影响。在胚胎发育阶段,敲除 RPS6KB1 发现小鼠体内单个细胞体积变小,其整体的身体尺寸也变小^[14]。然而,用 Rapamycin (mTOR 抑制剂)处理小鼠却能够延长其寿命,表明 mTOR-RPS6KB1 在促进衰老方面也发挥作用^[15]。因此,mTOR-RPS6KB1 途径如何调控两个看似相反的生命过程(增殖和衰老),值得进一步探索。

根据 STRING 预测结果,RPS6KB1 与调控胰岛素水平相关蛋白也存在相互作用。RPS6KB1 能够磷酸化 IRS-1,使其失活或降解,从而扰乱 RPS6KB1 缺陷小鼠体内的糖代谢过程^[16]。通过调控癌细胞

粘附、存活和侵袭转移关键蛋白(如:细胞周期蛋白 D1、PDCD4、FAK、E-钙粘蛋白、 β -连环蛋白和组织转谷氨酰胺酶 2),RPS6KB1 在癌细胞转移过程中发挥作用^[17]。通过调控缺氧诱导因子 1α 和血管内皮生长因子的表达,RPS6KB1 在肿瘤生长和血管新生过程中发挥作用^[18]。由此可知,RPS6KB1 通过调控胰岛素敏感性、代谢、细胞周期和蛋白质合成,在细胞生长和增殖方面扮演重要角色。此外,RPS6KB1 表达异常会增加罹患癌症、II 型糖尿病、超重和衰老的可能性^[19]。

RPS6KB1 作为肝癌潜在的分子标志物和治疗靶点,本文通过生物信息学方法,构建 RPS6KB1 的系统进化树,分析 RPS6KB1 蛋白的组织特异性、亚细胞定位、理化性质、高级结构及相互作用蛋白质,为全面认识 RPS6KB1,研究其功能及 mTOR 信号途径在肝癌发生发展中的作用提供一定的基础,为进一步开发针对 RPS6KB1 的靶向药物和基因治疗方法提供思路。

4 结论

1)RPS6KB1 的理论分子量为 59 139.55 Da,理论等电点为 6.21,分类为酸性蛋白质。不稳定系数为 51.00,总平均亲水性为 -0.491,预测为亲水蛋白质;

2)RPS6KB1 的二级结构主要为随机卷曲,属于 PKc_like 超家族,含有一个 STKc 结构域。无信号肽和跨膜区域。存在磷酸化、乙酰化和泛素化位点;

3)RPS6KB1 表达的组织特异性不强,定位于细胞核的可能性最大;

4)系统进化树显示,人 RPS6KB1 蛋白与哺乳动物氨基酸序列相似性较大,组成一支,而与两栖类和鱼类的序列相似性较小。推测该蛋白在进化过程中高度保守;

5)与 RPS6KB1 相互作用的蛋白主要是 mTOR 信号途径相关蛋白,PI3K 信号途径相关蛋白,蛋白质合成相关蛋白以及调控胰岛素水平相关蛋白。

参考文献(References)

- [1]TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. Ca A Cancer Journal for Clinicians, 2015, 65(2): 87-108. DOI: 10.3322/caac.21262.
- [2]KISHI Y, HASEGAWA K, SUGAWARA Y, et al. Hepatocellular carcinoma: current management and future development-improved outcomes with surgical resection [J]. International Journal of Hepatol, 2011, 2011: 728103. DOI:

- 10.4061/2011/728103.
- [3] LI P D, ZHANG W J, ZHANG M Y, et al. Overexpression of RPS6KB1 predicts worse prognosis in primary HCC patients [J]. *Medical Oncology*, 2012, 29 (5): 3070–3076. DOI: 10.1007/s12032-012-0268-y.
- [4] ZHANG Y, NI H J, CHENG D Y. Prognostic value of phosphorylated mTOR/RPS6KB1 in non-small cell lung cancer [J]. *Asian Pacific Journal Cancer Prevention*, 2013, 14(6): 3725–3728.
- [5] SLATTERY M L, LUNDGREEN A, HERRICK J S, et al. Genetic variation in RPS6KA1, RPS6KA2, RPS6KB1, RPS6KB2, and PDK1 and risk of colon or rectal cancer [J]. *Mutation Research*, 2011, 706(1–2): 13–20. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2010.10.005.
- [6] YAMNIK R L, DIGILOVA A, DAVIS D C, et al. S6 kinase 1 regulates estrogen receptor alpha in control of breast cancer cell proliferation [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(10): 6361–6369. DOI: 10.1074/jbc.M807532200.
- [7] SHAW R J, CANTLEY L C. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth [J]. *Nature*, 2006, 441(7092): 424–430. DOI: 10.1038/nature04869.
- [8] ZONCU R, EFEYAN A, SABATINI D M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2011, 12(1): 21–35. DOI: 10.1038/nrm3025.
- [9] MAGNUSON B, EKIM B, FINGAR D C. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signaling networks [J]. *Biochemical Journal*, 2012, 441(1): 1–21. DOI: 10.1042/BJ20110892.
- [10] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596–1599. DOI: 10.1093/molbev/msm092.
- [11] LAI K P, LEONG W F, CHAU J F, et al. S6K1 is a multifaceted regulator of Mdm2 that connects nutrient status and DNA damage response [J]. *EMBO Journal*, 2010, 29(17): 2994–3006. DOI: 10.1038/emboj.2010.166.
- [12] BAHRAMI-B F, ATAIE-KACHOIE P, POURGHOLAMI M H, et al. p70 Ribosomal protein S6 kinase (Rps6kb1): an update [J]. *Journal of Clinical Pathology*, 2014, 67(12): 1019–1025. DOI: 10.1136/jclinpath-2014-202560.
- [13] LAPLANTE M, SABATINI D M. mTOR signaling in growth control and disease [J]. *Cell*, 2012, 149(2): 274–293. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.017.
- [14] SHIMA H, PENDE M, CHEN Y, et al. Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase [J]. *EMBO Journal*, 1998, 17(22): 6649–6659. DOI: 10.1093/emboj/17.22.6649.
- [15] SELMAN C, TULLET J M, WIESER D, et al. Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span [J]. *Science*, 2009, 326(5949): 140–144. DOI: 10.1126/science.1177221.
- [16] AGUILAR V, ALLIOUACHENE S, SOTIROPOULOS A, et al. S6 kinase deletion suppresses muscle growth adaptations to nutrient availability by activating AMP kinase [J]. *Cell Metabolism*, 2007, 5(6): 476–487. DOI: 10.1016/j.cmet.2007.05.006.
- [17] AKAR U, OZPOLAT B, MEHTA K, et al. Targeting p70S6K prevented lung metastasis in a breast cancer xenograft model [J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2010, 9(5): 1180–1187. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-09-1025.
- [18] BIAN C X, SHI Z, MENG Q, et al. P70S6K 1 regulation of angiogenesis through VEGF and HIF-1 α expression [J]. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 2010, 398(3): 395–399. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.06.080.
- [19] ESPELLAC C, MITCHELL C, CELTON-MORIZUR S, et al. S6 kinase 1 is required for rapamycin-sensitive liver proliferation after mouse hepatectomy [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2011, 121(7): 2821–2832. DOI: 10.1172/JCI44203.