

# 磷酸酶 STEP 的 Q-loop 中 T541 参与催化反应的机制

谢迪东<sup>1,2\*</sup>, 龚正<sup>3\*</sup>, 李容<sup>2</sup>, 李慧<sup>2</sup>, 刘宏达<sup>2</sup>, 孙金鹏<sup>1,2</sup>, 庞琦<sup>1</sup>

(1. 山东大学附属省立医院神经外科, 济南 250021;

2. 山东大学医学院生物化学与分子生物学研究所, 济南 250012;

3. 山东大学威海分校, 山东 威海 264209)

**摘要:**目的 研究纹状体蛋白质酪氨酸磷酸酶(STEP) pY-loop 结构上第 330 位的苏氨酸(T330)和 Q-loop 结构上第 541 位的苏氨酸(T541)参与催化反应的作用机制。方法 构建 STEP 野生型(STEP-WT)及其突变体(STEP-T<sub>330</sub>D/T<sub>541</sub>A)的表达质粒;表达并纯化 STEP-WT 及其突变体蛋白,体外检测这些蛋白对小分子底物 4-硝基苯磷酸二钠(pNPP)的催化活力,分析 NaVO<sub>3</sub> 对 STEP-WT 及其突变体酶活性的抑制作用;检测 STEP-WT 及其突变体催化反应的 pH 依赖性和对解离基团 pK<sub>a</sub> 的依赖性。结果 体外催化 pNPP 水解的过程中,STEP-T<sub>330</sub>D 的催化性质较 STEP-WT 无明显变化,STEP-T<sub>541</sub>A 的 K<sub>m</sub> 略有增加,k<sub>cat</sub> 下降至 STEP-WT 的 1/3 以下。NaVO<sub>3</sub> 对于 STEP-WT 及其突变体的抑制常数 K<sub>i</sub> 无明显变化。在 STEP 的 pH 依赖性研究中,STEP-T<sub>541</sub>A 的 pK<sub>2</sub><sup>app</sup> 显著增加且它的 (k<sub>cat</sub>)<sup>lim</sup> 下降至野生型 1/10 以下。在 STEP 催化底物反应过程对底物解离基团 pK<sub>a</sub> 依赖性的研究中,STEP-T<sub>541</sub>A 的 β<sub>1g</sub>(k<sub>cat</sub>) 较 STEP-WT 明显增大。结论 T541 参与了 STEP 催化反应中从产物生成到磷酸根释放这一过程,靶向 STEP 治疗神经系统疾病的药物可以考虑通过与 T541 相互作用进行设计。

**关键词:**蛋白质酪氨酸磷酸酶;纹状体蛋白质酪氨酸磷酸酶;纹状体;中枢神经系统;蛋白磷酸化

中图分类号:R34

文献标志码:A

## T541 in Q-loop of STEP plays a key role in the catalytical activity

XIE Di-dong<sup>1,2\*</sup>, GONG Zheng<sup>3\*</sup>, LI Rong<sup>2</sup>, LI Hui<sup>2</sup>, LIU Hong-da<sup>2</sup>, SUN Jin-peng<sup>1,2</sup>, PANG Qi<sup>1</sup>

(1. Department of Neurosurgery, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, China;

2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China;

3. Weihai Campus, Shandong University, Weihai 264209, Shandong, China)

**Abstract: Objective** To explore the essential role of Threonine at position 541 and 330 (T541, T330) in the intrinsic phosphatase activity of striatal-enriched protein tyrosine phosphatase (STEP). **Methods** STEP wild type (STEP-WT) and its mutants STEP-T<sub>330</sub>D/T<sub>541</sub>A were sub-cloned into the PET15b vector. Expression and purification of STEP-WT and its mutants were performed by affinity column and liquid chromatography. The phosphatase activity was measured in vitro with 4-nitrophenyl phosphate (pNPP) as substrate. The inhibition by NaVO<sub>3</sub> was measured to monitor the effects of mutants on protein folding. The pH-dependence and leaving-group pK<sub>a</sub> dependence of STEP catalysis were carried out to dissect the underlying molecular mechanism. **Results** STEP-WT and STEP-T<sub>330</sub>D displayed similar catalytic ability toward pNPP at pH 7.0. The k<sub>cat</sub> of STEP-T<sub>541</sub>A decreased 3 folds compared to STEP-WT. STEP-WT and the two mutants had similar K<sub>i</sub> for NaVO<sub>3</sub>. Examination of the k<sub>cat</sub> versus pH curve revealed that pK<sub>2</sub><sup>app</sup> of STEP-T<sub>541</sub>A significantly increased and the (k<sub>cat</sub>)<sup>lim</sup> dropped by at least 10 folds. In consistent with these observations, β<sub>1g</sub>(k<sub>cat</sub>) of STEP-T<sub>541</sub>A increased significantly. **Conclusion** T541 plays an important role in STEP catalysis, by participating the

收稿日期:2013-03-11

基金项目:国家自然科学基金(81171062;31271505);国家自然科学基金青年项目(31100580);山东大学自主创新基金(2012TS114)。

通讯作者:孙金鹏, E-mail:sunjinpeng@sdu.edu.cn; 庞琦, E-mail:pangqi@sdu.edu.cn

\* 两位作者对本研究有同等贡献。

processes from product formation to phosphate release. Future drugs targeting to STEP for therapeutic usage could be developed through modulating T541 conformations.

**Key words:** Protein tyrosine phosphatase; Striatal-enriched protein tyrosine phosphatase; Striatal; Central nervous system; Protein phosphorylation

蛋白质的酪氨酸磷酸化修饰是多细胞生物中目前已知的最重要的转录后修饰之一,调节许多重要的生理过程,如细胞的新陈代谢、组织的分化和生长、基因的转录与调控、神经可塑性和免疫应答等<sup>[1-2]</sup>。在人体内,蛋白质酪氨酸激酶(protein tyrosine kinase, PTK)将磷酸基团共价转移到酪氨酸的苯环羟基上,蛋白质酪氨酸磷酸酶(protein tyrosine phosphatase, PTP)催化磷酸根的水解,二者共同调节酪氨酸上的磷酸化可逆修饰,精确地控制体内酪氨酸的磷酸化水平<sup>[3-4]</sup>。酪氨酸磷酸酶在生理过程和病理过程中的重要作用,已成为国内外的研究热点<sup>[1,5-6]</sup>。

纹状体蛋白质酪氨酸磷酸酶(striatal-enriched protein tyrosine phosphatase, STEP/PTPN5)是一种经典的 PTP,特异性地表达于中枢神经系统中。STEP 调控其在神经组织中的磷酸酶底物,如细胞外调节蛋白激酶(ERK)、P38、蛋白质酪氨酸激酶 2(PYK2),以及 N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)的酪氨酸磷酸化水平。STEP 功能失调将导致包括老年痴呆在内的多种神经系统功能性疾病<sup>[7-8]</sup>。因此,STEP 成为近年来重要的治疗神经类疾病的潜在药物靶点。晶体结构显示,与其他经典 PTP 相同,STEP 包含保守的、约含 280 个氨基酸的催化结构域,由 5 个平行的  $\beta$  折叠构成中心,两侧被  $\alpha$  螺旋所围绕<sup>[9-12]</sup>。为容纳其特异性底物——磷酸化酪氨酸,所有经典 PTP 的活性中心,都由一些保守的 loop 所围绕,包括 P-loop (PTP-loop)、WPD loop、Q-loop 和 pY-loop。其中,P-loop 包含 C-(Xaa)<sub>5</sub>-R 特征序列,在与底物的结合中起重要作用。STEP 的 WPD loop 包含酸碱催化所必需的 461 位天冬氨酸(D461),Q-loop 包含最后一步催化反应中帮助释放磷酸根的保守残基——540 位谷氨酰胺(Q540),而 pY-loop 中的 328 位酪氨酸(Y328)在识别磷酸酪氨酸残基中起重要作用<sup>[13]</sup>。

许多决定 PTP 活性的重要氨基酸参与催化反应的机制还未阐明。本文应用酶学分析手段和定点突变技术,对 STEP 中 330 位的苏氨酸(T330)和 541 位的苏氨酸(T541)在催化中所起的作用进行研究。

## 1 材料与方法

1.1 主要试剂 人源 PTPN5 cDNA (GenBank: BC039897.1) 购自美国 Thermo 公司,表达载体 PET-15b<sup>[14]</sup> 由本实验室保存。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶及 PfuDNA 聚合酶购自美国 Thermo 公司。小分子磷酸根化合物包括  $\beta$ -萘基磷酸( $pK_a = 9.38$ )、4-甲基伞形酮磷酸酯( $pK_a = 7.80$ )、4-硝基苯磷酸二钠(pNPP, $pK_a = 7.14$ )均购自上海生工生物工程有限公司,O-磷酸-L-酪氨酸( $pK_a = 10.07$ )购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 实验仪器 分子克隆采用美国 Thermo Fisher Scientific Piko 快速 PCR 仪;蛋白纯化使用购自美国 GE Healthcare 公司的 ÄKTAFPLC 蛋白纯化仪。Ni-NTA resin 及强阴离子交换柱分别购自上海生工生物工程有限公司及美国 GE Healthcare 公司。

### 1.3 方法

1.3.1 重组表达载体的构建 通过 PCR 及双酶切的方法,将人源 PTPN5 cDNA 表达序列(STEP231-563 Swiss-Prot 蛋白序列数据库,编号 P54829)亚克隆到带有 His 标签的 PET-15b 表达载体,构建重组的 STEP 野生型(STEP-WT)表达载体<sup>[14]</sup>。在此基础上,使用 Quick-change 方法构建突变体 STEP-T<sub>330</sub>D 及 STEP-T<sub>541</sub>A。

1.3.2 蛋白表达和纯化 将重组质粒转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 中,挑取单个菌落接种于含 0.1 mg/mL 氨苄西林的 LB 培养基中,37 °C 培养过夜,按照 1:100 的比例接种,并在 37 °C 继续培养至 A<sub>600</sub> 达 0.4 ~ 0.6,加入 IPTG 后 18 °C 诱导过夜。离心收集菌体,并用高压细胞破碎仪破碎。离心后将上清加入 Ni-NTA resin,垂直混匀 1 h,收集 beads 后用咪唑 (20 mmol/L Tris, pH 8.0; 300 mmol/L NaCl; 5 ~ 500 mmol/L 咪唑) 梯度洗脱蛋白。将洗脱蛋白上样到强阴离子交换柱,NaCl 线性梯度洗脱蛋白。根据 A<sub>280</sub> 吸收峰收集蛋白,采用 15% SDS-PAGE 进行蛋白纯度分析。

1.3.3 酶活性测定 STEP 催化小分子底物的反应均在 37 °C 进行,反应 buffer 为: 50 mmol/L 琥珀酸 (pH5.0 ~ 6.0), 50 mmol/L DMG (pH6.0 ~ 7.3),

50 mmol/L Tris (pH7.5 ~ 9.0), 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 加入 NaCl 调整离子强度  $I = 0.15$  mol/L。底物浓度在  $1/5 \sim 5 K_m$  之间, 加酶混匀并启动反应。将数据拟合到米氏方程, 得到相应的  $K_m$  及  $k_{cat}$ 。pH 依赖性的数据拟合到公式(1)和公式(2)中。

$$k_{cat} = (k_{cat})^{lim} / (1 + H/K_1^{app} + K_2^{app}/H) \quad (1)$$

$$k_{cat}/K_m = (k_{cat}/K_m)^{lim} / [(1 + H/K_{S2}) (1 + H/K_{E1} + K_{E2}/H)] \quad (2)$$

其中,  $(k_{cat})^{lim}$  和  $(k_{cat}/K_m)^{lim}$  为独立于 pH 的最大反应常数, H 为氢离子浓度,  $K_1^{app}$  和  $K_2^{app}$  分别为限速反应步骤中酶的表现酸碱解离常数,  $K_{S2}$  为催化中底物的酸碱解离常数,  $K_{E1}$  和  $K_{E2}$  反映酶的酸碱解离常数<sup>[15-16]</sup>。

	pY-loop	Q-loop		pY-loop	Q-loop
STEP	323 VRK <sup>323</sup> NR <sup>324</sup> Y <sup>325</sup> KTILP <sup>333</sup>	495 RGGMI <sup>495</sup> QT <sup>496</sup> CE <sup>497</sup> Q <sup>498</sup> Y <sup>499</sup> Q <sup>500</sup>	MEG2	328 LEK <sup>328</sup> NR <sup>329</sup> Y <sup>330</sup> G <sup>331</sup> DV <sup>332</sup> PC <sup>333</sup>	554 RAF <sup>554</sup> SI <sup>555</sup> QT <sup>556</sup> PE <sup>557</sup> Q <sup>558</sup> Y <sup>559</sup> Y <sup>560</sup>
HEPTP	225 ASK <sup>225</sup> DR <sup>226</sup> Y <sup>227</sup> KTILP <sup>235</sup>	435 RGGMI <sup>435</sup> QT <sup>436</sup> A <sup>437</sup> E <sup>438</sup> Q <sup>439</sup> Y <sup>440</sup> Q <sup>441</sup>	PTPIA2	735 IK <sup>735</sup> KNR <sup>736</sup> HP <sup>737</sup> DF <sup>738</sup> LP <sup>745</sup>	949 RP <sup>949</sup> GL <sup>950</sup> V <sup>951</sup> RS <sup>952</sup> KD <sup>953</sup> Q <sup>954</sup> FE <sup>960</sup>
PCPTP1	416 GT <sup>416</sup> KNR <sup>417</sup> Y <sup>418</sup> KTILP <sup>426</sup>	627 RGGMV <sup>627</sup> QT <sup>628</sup> SE <sup>629</sup> Q <sup>630</sup> Y <sup>631</sup> E <sup>638</sup>	SAP1	845 NAK <sup>845</sup> NR <sup>846</sup> Y <sup>847</sup> R <sup>848</sup> NV <sup>849</sup> LP <sup>855</sup>	1059 R <sup>1059</sup> PL <sup>1060</sup> M <sup>1061</sup> V <sup>1062</sup> Q <sup>1063</sup> TEA <sup>1064</sup> Q <sup>1065</sup> Y <sup>1066</sup> V <sup>1070</sup>
PTP $\alpha$	266 KE <sup>266</sup> KNR <sup>267</sup> Y <sup>268</sup> V <sup>269</sup> NILP <sup>276</sup>	481 RC <sup>481</sup> Q <sup>482</sup> M <sup>483</sup> V <sup>484</sup> QT <sup>485</sup> DM <sup>486</sup> Q <sup>487</sup> Y <sup>488</sup> V <sup>492</sup>	HDPTP	1218 SL <sup>1218</sup> KNR <sup>1219</sup> H <sup>1220</sup> Q <sup>1221</sup> D <sup>1222</sup> V <sup>1223</sup> MP <sup>1228</sup>	1450 VR <sup>1450</sup> H <sup>1451</sup> VE <sup>1452</sup> Q <sup>1453</sup> VL <sup>1454</sup> QR <sup>1455</sup> HG <sup>1461</sup>
PTP $\beta$	1648 RG <sup>1648</sup> KNR <sup>1649</sup> Y <sup>1650</sup> NNILP <sup>1658</sup>	1943 RV <sup>1943</sup> H <sup>1944</sup> M <sup>1945</sup> V <sup>1946</sup> QT <sup>1947</sup> EC <sup>1948</sup> Q <sup>1949</sup> Y <sup>1954</sup>	PTP1B	41 KN <sup>41</sup> NR <sup>42</sup> NR <sup>43</sup> Y <sup>44</sup> RD <sup>45</sup> V <sup>46</sup> SP <sup>51</sup>	257 RM <sup>257</sup> GL <sup>258</sup> I <sup>259</sup> QT <sup>260</sup> AD <sup>261</sup> QL <sup>268</sup> R <sup>268</sup>
PTP $\delta$	965 KP <sup>965</sup> KNR <sup>966</sup> Y <sup>967</sup> AN <sup>968</sup> VIA <sup>975</sup>	1592 RN <sup>1592</sup> Y <sup>1593</sup> M <sup>1594</sup> V <sup>1595</sup> QT <sup>1596</sup> ED <sup>1597</sup> Q <sup>1598</sup> Y <sup>1603</sup> I <sup>1603</sup>	PTPBAS	2159 LAK <sup>2159</sup> NR <sup>2160</sup> Y <sup>2161</sup> K <sup>2162</sup> NILP <sup>2169</sup>	2428 RH <sup>2428</sup> GM <sup>2429</sup> V <sup>2430</sup> QT <sup>2431</sup> ED <sup>2432</sup> Q <sup>2433</sup> Y <sup>2439</sup> I <sup>2439</sup>
PTP $\gamma$	875 KH <sup>875</sup> KNR <sup>876</sup> Y <sup>877</sup> INILA <sup>885</sup>	1099 RN <sup>1099</sup> Y <sup>1100</sup> LV <sup>1101</sup> QT <sup>1102</sup> EE <sup>1103</sup> Q <sup>1104</sup> Y <sup>1110</sup> I <sup>1110</sup>	PTPIA2	771 VP <sup>771</sup> KNR <sup>772</sup> SLA <sup>773</sup> V <sup>774</sup> LT <sup>781</sup>	985 RP <sup>985</sup> GM <sup>986</sup> V <sup>987</sup> QT <sup>988</sup> KE <sup>989</sup> Q <sup>990</sup> FE <sup>996</sup>
PTP $\epsilon$	160 RE <sup>160</sup> KNR <sup>161</sup> Y <sup>162</sup> PNILP <sup>170</sup>	374 RP <sup>374</sup> Q <sup>375</sup> M <sup>376</sup> V <sup>377</sup> QT <sup>378</sup> DM <sup>379</sup> Q <sup>380</sup> Y <sup>385</sup> T <sup>385</sup>	MEG1	680 IS <sup>680</sup> KNR <sup>681</sup> Y <sup>682</sup> RD <sup>683</sup> IS <sup>690</sup>	891 RA <sup>891</sup> MMI <sup>892</sup> QT <sup>893</sup> PS <sup>894</sup> Q <sup>895</sup> Y <sup>902</sup> R <sup>902</sup>
PTP $\zeta$	1751 KH <sup>1751</sup> KNR <sup>1752</sup> Y <sup>1753</sup> INIVA <sup>1762</sup>	1972 RN <sup>1972</sup> Y <sup>1973</sup> LV <sup>1974</sup> QT <sup>1975</sup> EE <sup>1976</sup> Q <sup>1977</sup> Y <sup>1983</sup> V <sup>1983</sup>	PTPH1	671 LD <sup>671</sup> KNR <sup>672</sup> Y <sup>673</sup> KD <sup>674</sup> VLP <sup>681</sup>	881 RA <sup>881</sup> MMV <sup>882</sup> QT <sup>883</sup> SS <sup>884</sup> Q <sup>885</sup> Y <sup>892</sup> K <sup>892</sup>
PTP $\kappa$	928 RA <sup>928</sup> KNR <sup>929</sup> Y <sup>930</sup> GNIA <sup>938</sup>	1222 RI <sup>1222</sup> N <sup>1223</sup> M <sup>1224</sup> V <sup>1225</sup> QT <sup>1226</sup> EE <sup>1227</sup> Q <sup>1228</sup> Y <sup>1233</sup> I <sup>1233</sup>	PTPTYP	184 RE <sup>184</sup> KNR <sup>185</sup> Y <sup>186</sup> RD <sup>187</sup> ILP <sup>194</sup>	383 RS <sup>383</sup> GM <sup>384</sup> V <sup>385</sup> QT <sup>386</sup> KE <sup>387</sup> Q <sup>388</sup> Y <sup>394</sup> H <sup>394</sup>
PTP $\lambda$	914 VK <sup>914</sup> GSR <sup>915</sup> Q <sup>916</sup> EPMPA <sup>924</sup>	1124 RV <sup>1124</sup> NMI <sup>1125</sup> QT <sup>1126</sup> EE <sup>1127</sup> Q <sup>1128</sup> Y <sup>1135</sup> I <sup>1135</sup>	DEP1	1066 RG <sup>1066</sup> KNR <sup>1067</sup> Y <sup>1068</sup> NNVLP <sup>1076</sup>	1278 R <sup>1278</sup> PL <sup>1279</sup> M <sup>1280</sup> V <sup>1281</sup> QT <sup>1282</sup> ED <sup>1283</sup> Q <sup>1284</sup> Y <sup>1289</sup> V <sup>1289</sup>
PTP $\rho$	913 RN <sup>913</sup> KNR <sup>914</sup> Y <sup>915</sup> GNII <sup>923</sup> S <sup>923</sup>	1123 RV <sup>1123</sup> NLV <sup>1124</sup> QT <sup>1125</sup> EE <sup>1126</sup> Q <sup>1127</sup> Y <sup>1134</sup> V <sup>1134</sup>	SHP1	271 KG <sup>271</sup> KNR <sup>272</sup> Y <sup>273</sup> K <sup>274</sup> NILP <sup>281</sup>	495 RS <sup>495</sup> GM <sup>496</sup> V <sup>497</sup> QT <sup>498</sup> EA <sup>499</sup> Q <sup>500</sup> Y <sup>506</sup> K <sup>506</sup>
PTP $\sigma$	1417 KP <sup>1417</sup> KNR <sup>1418</sup> Y <sup>1419</sup> AN <sup>1420</sup> VIA <sup>1427</sup>	1628 RN <sup>1628</sup> Y <sup>1629</sup> M <sup>1630</sup> V <sup>1631</sup> QT <sup>1632</sup> ED <sup>1633</sup> Q <sup>1639</sup> Y <sup>1639</sup> S <sup>1639</sup>	GLEEP1	963 RC <sup>963</sup> KNR <sup>964</sup> Y <sup>965</sup> T <sup>966</sup> NILP <sup>973</sup>	1175 RM <sup>1175</sup> SM <sup>1176</sup> V <sup>1177</sup> QT <sup>1178</sup> EE <sup>1179</sup> Q <sup>1186</sup> Y <sup>1186</sup> I <sup>1186</sup>
PTP $\mu$	923 RM <sup>923</sup> KNR <sup>924</sup> Y <sup>925</sup> GNIIA <sup>933</sup>	1134 RV <sup>1134</sup> NMV <sup>1135</sup> QT <sup>1136</sup> EE <sup>1137</sup> Q <sup>1138</sup> Y <sup>1145</sup> V <sup>1145</sup>	PCPTP1	416 GT <sup>416</sup> KNR <sup>417</sup> Y <sup>418</sup> KTILP <sup>426</sup>	627 RGGMV <sup>627</sup> QT <sup>628</sup> SE <sup>629</sup> Q <sup>630</sup> Y <sup>638</sup> E <sup>638</sup>
LYP	55 IK <sup>55</sup> KNR <sup>56</sup> Y <sup>57</sup> KDILP <sup>65</sup>	269 RP <sup>269</sup> SLV <sup>270</sup> QT <sup>271</sup> QE <sup>272</sup> Q <sup>273</sup> Y <sup>280</sup> E <sup>280</sup>	PTPS31	2061 RAK <sup>2061</sup> NR <sup>2062</sup> FP <sup>2063</sup> NIK <sup>2071</sup> P <sup>2071</sup>	2271 RM <sup>2271</sup> CM <sup>2272</sup> V <sup>2273</sup> QNLA <sup>2274</sup> Q <sup>2282</sup> Y <sup>2282</sup> I <sup>2282</sup>
PEST	59 VK <sup>59</sup> KNR <sup>60</sup> Y <sup>61</sup> KDILP <sup>69</sup>	273 RHS <sup>273</sup> AV <sup>274</sup> QT <sup>275</sup> KE <sup>276</sup> Q <sup>277</sup> Y <sup>284</sup> E <sup>284</sup>	SHP2	273 KN <sup>273</sup> KNR <sup>274</sup> Y <sup>275</sup> K <sup>276</sup> NILP <sup>283</sup>	501 RS <sup>501</sup> GM <sup>502</sup> V <sup>503</sup> QT <sup>504</sup> EA <sup>505</sup> Q <sup>512</sup> Y <sup>512</sup>
BDP1	57 VR <sup>57</sup> KNR <sup>58</sup> Y <sup>59</sup> KD <sup>60</sup> VLP <sup>67</sup>	271 RPA <sup>271</sup> AV <sup>272</sup> QT <sup>273</sup> EE <sup>274</sup> Q <sup>275</sup> Y <sup>282</sup> R <sup>282</sup>	PTPD1	923 ER <sup>923</sup> NR <sup>924</sup> F <sup>925</sup> Q <sup>926</sup> D <sup>927</sup> VILP <sup>933</sup>	1147 RM <sup>1147</sup> ML <sup>1148</sup> V <sup>1149</sup> Q <sup>1150</sup> TLC <sup>1151</sup> Q <sup>1158</sup> Y <sup>1158</sup> T <sup>1158</sup>
LAR	1376 KP <sup>1376</sup> KNR <sup>1377</sup> Y <sup>1378</sup> AN <sup>1379</sup> VIA <sup>1386</sup>	1878 RP <sup>1878</sup> AMV <sup>1879</sup> QT <sup>1880</sup> ED <sup>1881</sup> Q <sup>1882</sup> Y <sup>1889</sup> Q <sup>1889</sup>	PTPD2	934 AER <sup>934</sup> SRI <sup>935</sup> REV <sup>936</sup> V <sup>944</sup> P <sup>944</sup>	1160 RM <sup>1160</sup> FM <sup>1161</sup> I <sup>1162</sup> QT <sup>1163</sup> IA <sup>1164</sup> Q <sup>1171</sup> Y <sup>1171</sup> K <sup>1171</sup>
CD45	678 QN <sup>678</sup> KNR <sup>679</sup> Y <sup>680</sup> V <sup>681</sup> DILP <sup>688</sup>	897 RCL <sup>897</sup> MV <sup>898</sup> Q <sup>899</sup> VEA <sup>900</sup> Q <sup>909</sup> Y <sup>909</sup>			

图1 37种经典PTP的pY-loop和Q-loop的序列比对  
红色标记为保守序列。

Fig. 1 Sequence alignment of pY-loop and Q-loop from 37 classical PTPs  
The conserved sequences are marked in red.

2.2 STEP-T<sub>330</sub>D/T<sub>541</sub>A 对小分子底物 pNPP 催化的稳态动力学研究

2.2.1 蛋白的表达和纯化 为研究 STEP 的 T330 和 T541 在催化过程中所起的作用, 我们将 T330 突变为在大部分其他 PTP 酶中保守的 D, 将 T541 突变为没有侧链的氨基酸 A, 并研究它们与 STEP-WT 在催化小分子底物 pNPP 过程中的差异。通过质粒测序确认 STEP 突变体构建成功后, 我们在大肠杆菌中表达了 STEP-WT 及 STEP-T<sub>330</sub>D/T<sub>541</sub>A 的蛋白, 并通过 Ni-NTA 亲和层析柱和强阴离子交换柱

1.3.4 STEP 结构模型的生成 在最近解析的 STEP 结构 (PDB 2CJZ) 的基础上, 使用 PyMOL V1.5 (美国 DeLano Scientific 软件公司) 生成 STEP-T541 结构模型。

## 2 结果

2.1 经典 PTP pY-loop 和 Q-loop 的序列比对 如图 1 所示, STEP 在其 pY-loop 区有 Y328XT330 特征性序列, 与大部分 PTP 家族成员的保守 YXD 序列不同。而在 Q-loop 保守的 Q540 之后, 有保守的 T541。在 37 个经典的 PTP 中, 有 33 个磷酸酶中 T541 的对应位置为 T。

(Mono-Q) 纯化蛋白, 蛋白纯度达到 95% 以上 (图 2A ~ 2C)。

2.2.2 基本酶学常数的测定 利用纯化的重组蛋白, 我们检测了 STEP-WT、STEP-T<sub>330</sub>D 和 STEP-T<sub>541</sub>A 催化人工合成的小分子 pNPP 水解的稳态动力学。如图 2D 所示, 将实验结果与米氏曲线拟合后, 与 STEP-WT 相比, STEP-T<sub>330</sub>D 的磷酸酶活性无明显改变, 而 STEP-T<sub>541</sub>A 的活性出现了明显降低。表 1 列出了 STEP-WT 及 STEP-T<sub>330</sub>D/T<sub>541</sub>A 催化的基本酶学常数。与 SETP-WT 相比, SETP-T<sub>330</sub>D 的

$K_m$  值无明显变化,约为 0.3 mmol/L;STEP-T<sub>541</sub>A 的

$K_m$  仅轻微增加。

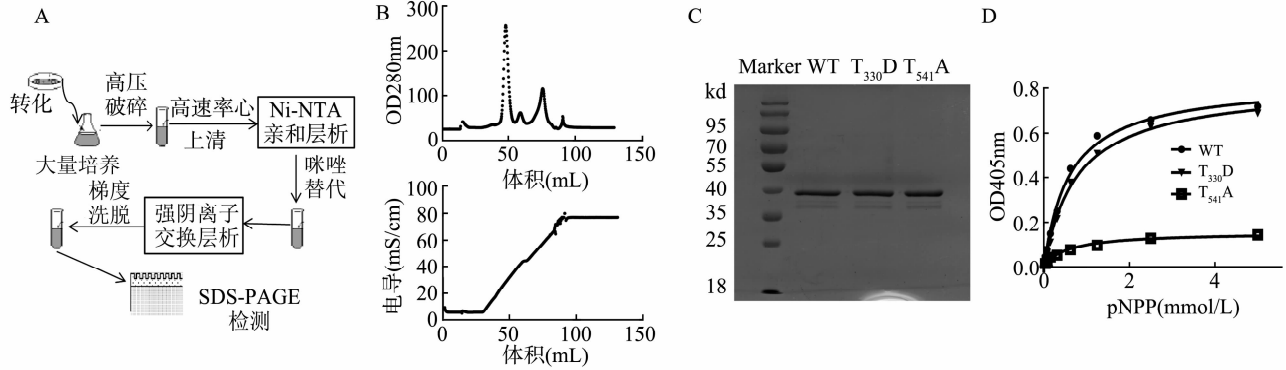


图 2 STEP 的表达纯化和酶稳态动力学研究

A:STEP 重组蛋白的表达和纯化流程图; B:强阴离子交换柱(Mono-Q)纯化 STEP 的连续梯度洗脱层析图; C:纯化的 STEP 重组蛋白的电泳图; D:STEP 催化 pNPP 水解的米氏曲线。

Fig. 2 Expression, purification and steady-kinetics study of STEP

A: Procedure of expression and purification of recombinant STEP; B: Continuous gradient elution chromatography figure of STEP purification by Mono-Q column; C: SDS-PAGE analysis of purified STEP -WT and its mutants; D: Michaelis-Menten curve of STEP catalyzing hydrolysis of pNPP.

表 1 STEP 水解 pNPP 的稳态动力学常数

STEP	$K_m$ (mmol/L)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ [10 <sup>3</sup> (mol/L) <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]
WT	0.31 ± 0.05	0.66 ± 0.12	2.13 ± 0.44
T <sub>330</sub> D	0.32 ± 0.04	0.52 ± 0.08	1.64 ± 0.65
T <sub>541</sub> A	0.40 ± 0.09	0.20 ± 0.09	0.49 ± 0.18

注:STEP 的稳态动力学研究均在 50 mmol/L DMG, pH = 7.0, 1 mmol/L EDTA, I = 0.15 mol/L, 1 mmol/L DTT,37 °C 的条件下进行。

### 2.3 NaVO<sub>3</sub> 对 STEP-WT 及 STEP-T<sub>330</sub>D/T<sub>541</sub>A 的抑制作用

对 NaVO<sub>3</sub> 抑制 STEP-WT 进行 Lineweaver-Burk 双倒数作图法分析,如图 3 所示,NaVO<sub>3</sub> 对 STEP-WT 的抑制为竞争性抑制,与 NaVO<sub>3</sub> 对 PTP1B 的抑制相同<sup>[17]</sup>;NaVO<sub>3</sub> 抑制 STEP-WT 及 STEP-T<sub>330</sub>D/T<sub>541</sub>A 的  $K_i$  分别为 (1.26 ± 0.12)、(0.98 ± 0.25) 和 (1.19 ± 0.19) μmol/L,均在 1 μmol/L 左右,互相间无显著差异。

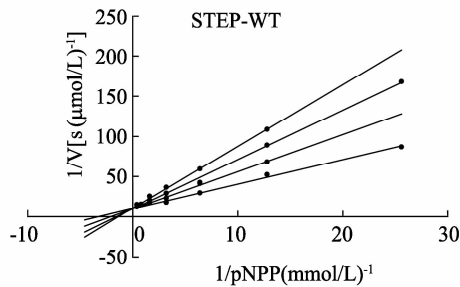


图 3 NaVO<sub>3</sub> 抑制 STEP-WT 的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线图

Fig. 3 Lineweaver-Burk double-reciprocal plot of the inhibition of STEP-WT by NaVO<sub>3</sub>

### 2.4 STEP-WT 及 STEP-T<sub>330</sub>D/T<sub>541</sub>A 催化过程的 pH 依赖性

2.4.1 STEP-WT 的 pH 依赖性 见图 4 和表 2、表 3。STEP-WT 催化 pNPP 水解的  $k_{cat}/K_m$  随 pH 变化

的曲线呈典型的钟形,酸性一侧的  $k_{cat}/K_m$  随 pH 增加而增加,斜率为 2;碱性一侧随 pH 减小而减小,斜率为 -1。催化反应过程中,有 2 个主要基团需要处于去质子化,另外有 1 个主要基团需要质子化。如表 2 所示,STEP-WT 的  $pK_{E1}$  = 6.81,可能是活性中心的半胱氨酸在 pH = 6.8 时有 1/2 的残基可以去质子化,以参与催化反应。而 STEP-WT 的  $pK_{E2}$  = 5.16,可能是其催化残基 D461 的  $pK_a$  接近 5.16。

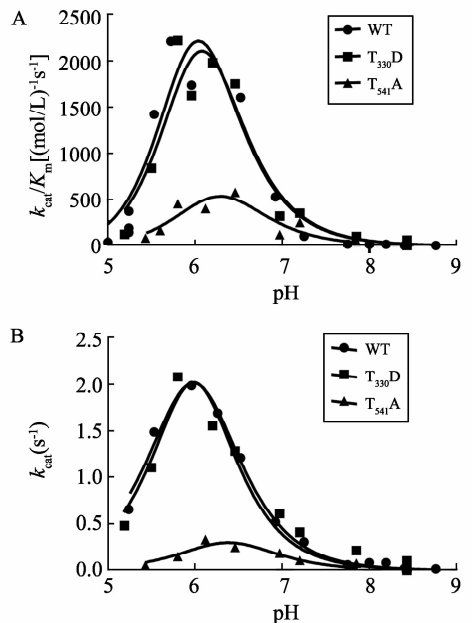


图 4 STEP-WT 及 STEP-T<sub>330</sub>D/T<sub>541</sub>A 的 pH 依赖性 A:STEP-WT 及其突变体的  $k_{cat}/K_m$  的 pH 依赖曲线; B:STEP-WT 及其突变体的  $k_{cat}$  的 pH 依赖曲线。

Fig. 4 pH dependence of STEP-WT 及 STEP-T<sub>330</sub>D/T<sub>541</sub>A catalyzing pNPP hydrolysis

A:  $k_{cat}/K_m$  versus pH profiles of STEP-WT and its mutants; B:  $k_{cat}$  versus pH profiles of STEP-WT and its mutants.



表2 拟合图4A获得的酶动力学常数

$k_{cat}/K_m$	$pK_{E1}$	$pK_{E2}$	$(k_{cat}/K_m)^{lim} [10^4 (\text{mol/L})^{-1} \text{s}^{-1}]$
WT	$6.81 \pm 0.61$	$5.16 \pm 0.22$	$3.56 \pm 0.75$
T <sub>330</sub> D	$6.62 \pm 1.04$	$5.25 \pm 0.41$	$3.04 \pm 0.67$
T <sub>541</sub> A	$6.57 \pm 0.89$	$5.63 \pm 0.93$	$0.05 \pm 0.09$

表3 拟合图4B获得的酶动力学常数

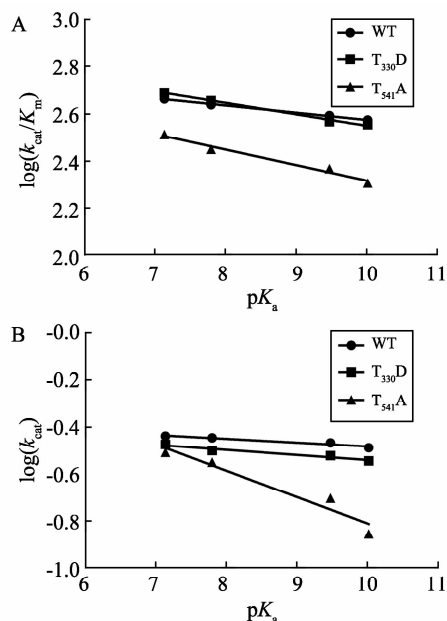
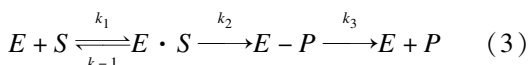
$k_{cat}$	$pK_1^{app}$	$pK_2^{app}$	$(k_{cat})^{lim} (\text{s}^{-1})$
WT	$6.64 \pm 0.31$	$5.32 \pm 0.12$	$22.35 \pm 6.14$
T <sub>330</sub> D	$6.76 \pm 0.24$	$5.35 \pm 0.68$	$23.42 \pm 4.65$
T <sub>541</sub> A	$6.13 \pm 0.29$	$6.73 \pm 0.49$	$1.953 \pm 0.33$

2.4.2 STEP突变体的pH依赖性 STEP-T<sub>330</sub>D与STEP-WT的pH依赖的 $k_{cat}/K_m$ 相差很小,STEP-T<sub>541</sub>A的曲线 $pK_{E1}$ 和 $pK_{E2}$ 分别有一定的左移和右移,但在实验误差范围内,所以根据当前的实验结果还无法判定其变化。STEP-T<sub>330</sub>D的 $(k_{cat}/K_m)^{lim}$ 与STEP-WT相比仅下降了14%,但STEP-T<sub>541</sub>A的 $(k_{cat}/K_m)^{lim}$ 却显著下降了7倍。

不同于 $k_{cat}/K_m$ ,STEP-WT及突变型 $k_{cat}$ 的pH依赖性曲线中酸性一侧和碱性一侧的斜率均为1。与STEP-WT相比,STEP-T<sub>330</sub>D的pH依赖性 $k_{cat}$ 曲线变化不显著,而STEP-T<sub>541</sub>A的曲线峰值明显降低,其pH依赖性不明显, $(k_{cat})^{lim}$ 较野生型下降了至少10倍。STEP-T<sub>541</sub>A的表现 $pK_1^{app}$ 和 $pK_2^{app}$ 较STEP-WT分别显著减小和增大。

2.5 STEP-WT及STEP-T<sub>330</sub>D/T<sub>541</sub>A酶活对底物解离基团 $pK_a$ 的依赖性 我们进一步检测了STEP对解离基团 $pK_a = 7.14 \sim 9.99$ 的一系列磷酸化小分子化合物的活性。图5A为STEP-WT及突变体 $\log(k_{cat}/K_m)$ 对底物解离基团 $pK_a$ 依赖性的线性关系。STEP-T<sub>330</sub>D的曲线与STEP-WT基本重合,而STEP-T<sub>541</sub>A的Bronsted斜率 $\beta_{1g}$ 较STEP-WT降低。图5B为STEP-WT及突变体 $\log(k_{cat})$ 对底物解离基团 $pK_a$ 依赖性的线性关系。STEP-WT与STEP-T<sub>330</sub>D的Bronsted斜率 $\beta_{1g}$ 均接近0(表4),而STEP-T<sub>541</sub>A的 $k_{cat}$ 的Bronsted斜率(表2) $\beta_{1g}$ 值较野生型有显著变化,增加了5倍。

2.6 T541在催化中发挥作用的结 构基础 STEP催化结构域的晶体结构已经获得了解析<sup>[12]</sup>(蛋白质数据库编号2CJZ)。通过对其晶体结构的分析,如图6所示,T541与WPD loop上Q462的主链羰基形成长距离氢键,与WPD loop有重要的相互作用。同时,T541与Q540之间也存在着直接相互作用。STEP的催化过程如公式(3)所描述:

图5 STEP-WT及STEP-T<sub>330</sub>D/T<sub>541</sub>A催化活性对底物解离基团 $pK_a$ 的依赖性

A:STEP-WT及其突变体 $\log(k_{cat}/K_m)$ 对底物解离基团 $pK_a$ 的依赖性曲线; B:STEP-WT及其突变体 $k_{cat}$ 对底物解离基团 $pK_a$ 的依赖性曲线。

Fig. 5 Leaving group dependence of STEP and STEP-T<sub>330</sub>D/T<sub>541</sub>A

A: Leaving group dependence curve of the  $\log(k_{cat}/K_m)$ ; B: Leaving group dependence curve of the  $\log(k_{cat})$ .

表4 STEP-WT及突变体催化小分子磷酸化底物水解的 $\beta_{1g}$ 值

STEP	$\beta_{1g}(k_{cat}/K_m)$	$\beta_{1g}(k_{cat})$
WT	$-0.05 \pm 0.005$	$-0.02 \pm 0.002$
T <sub>330</sub> D	$-0.04 \pm 0.004$	$-0.02 \pm 0.004$
T <sub>541</sub> A	$-0.07 \pm 0.007$	$-0.10 \pm 0.009$

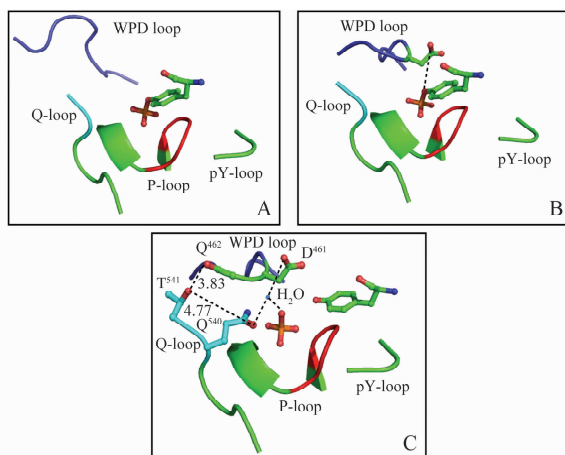


图6 T541在催化中发挥作用的结 构基础

A:结合底物前STEP活性中心的结构; B:STEP结合磷酸化酪氨酸后的结构,WPD loop发生了闭环; C:STEP释放无机磷酸根的过程。

Fig. 6 Structure representation of STEP catalysis

A: Before the binding of phosphor-tyrosine to STEP; B: Binding of the phosphor-tyrosine with STEP; C: Releasing of the phosphate.

### 3 讨论

酪氨酸磷酸酶家族成员催化过程中起重要作用的一些保守氨基酸已经清楚,如 PTP1B 中的 C215<sup>[18]</sup>、D356<sup>[19]</sup>, YopH 中的 Q446, PRL 中的 A110、V112, LYP 中的 R263、R266<sup>[11,14,20]</sup>,但是 STEP 的催化机制仍未明了。PTP 的催化过程如公式 3 所描述,在反应的第一步,磷酸酪氨酸与 PTP 酶的活性中心结合,形成酶-底物复合物(图 6A)<sup>[21]</sup>,这一过程用参数  $k_1$  和  $k_{-1}$  来描述。底物与酶结合后,由于保守的 P-loop 上的 R 与底物磷酸根的相互作用,带动 WPD loop 发生明显的构型变化,使催化中起重要作用的天冬氨酸(STEP 中 D461)处于适于催化的位置。如图 6B 所示,反应第二步中 P-O 键断裂,在苯环氧上产生一个负电荷,需要 WPD loop 中的天冬氨酸提供一个质子来稳定,从而生成产物磷酸根和失去磷酸基团的酪氨酸<sup>[19,22-23]</sup>,可用动力学参数  $k_2$  来描述。如图 6C 所示,反应第三步涉及活性中心磷酸根的释放。这一步主要由 WPD loop 中的 D461 完成,Q-loop 中的 Q540 为这一过程运输所需的水分子<sup>[24-25]</sup>。

本研究探讨了 T<sub>330</sub>D 和 T<sub>541</sub>A 两个突变体对 STEP 酶学特性的影响,发现 T541 对 STEP 的酶活十分重要,而 T330 对 STEP 的内在 PTP 酶活无重要作用。

在标准的米氏方程中, $k_{cat}$  反映的是产物生成和磷酸根释放的限速步骤,且  $k_{cat} = k_2 \cdot k_3$ 。在 pH = 7.0, T<sub>541</sub>A 突变对 STEP 的  $K_m$  影响很小的情况下, $k_{cat}$  较野生型降低了 3 倍。这说明 T541 在 STEP 催化机制中的作用主要是通过影响  $K_2$  或  $K_3$  两步来实现的,在此过程中,Q-loop 和 WPD loop 的相互协调是完成催化反应的基础。在 T<sub>541</sub>A 突变体中,NaVO<sub>3</sub> 抑制磷酸酶活力的  $K_i$  保持不变,钒酸根为磷酸根类似物,结构与磷酸基转移反应里中间态的磷酸相近,它可与 PTP 活性中心的半胱氨酸形成巯基钒酸酯键,与催化反应中形成的巯基磷酸键相似<sup>[26]</sup>。这一结果说明,T<sub>541</sub>A 不影响 STEP 活性中心 P-loop 与钒酸根的结合;T<sub>541</sub>A 突变体对 STEP 活性中心结构也无明显影响。NaVO<sub>3</sub> 抑制的实验结果说明,T<sub>541</sub>A 活力的降低不是发生在底物结合的步骤。

为进一步阐明 T541 参与 STEP 催化反应的机制,我们研究了 STEP 及其突变体的 pH 和底物解离基团的依赖性。相比于 STEP-WT,STEP-T541A 的

( $k_{cat}$ )<sup>lim</sup> 显著降低, $k_{cat}$  的 pH 依赖性曲线中的  $pK_2^{app}$  显著增大。因为  $k_{cat}$  反映的是产物生成和磷酸根释放的限速步骤。所以,STEP 的 T<sub>541</sub>A 或者影响了产物生成,或者影响了磷酸根释放的限速步骤。

检测 STEP 催化反应中底物解离基团的  $pK_a$  依赖性可以判断 STEP 的 D461 在反应中所起的作用。如前所述, $k_{cat}$  反映的是催化反应中的限速步骤,是形成磷酸根-酶复合物水解及释放磷酸根的过程。pH = 8.0 时,STEP-WT 和 T<sub>330</sub>D  $k_{cat}$  的解离基团  $pK_a$  依赖性的 Bronsted 斜率  $\beta_{1g}$  均接近零。对此有两种解释:①磷酸根从酶解离是野生型 STEP 的限速步骤;②D461 在 pH = 8.0 的条件下依然具有通用酸的功能,可以非常有效地催化中间产物的水解。将 T541 突变为 A 后,酶的  $k_{cat}$  解离基团  $pK_a$  依赖性受到了明显的影响,其 Bronsted 斜率  $\beta_{1g}$  明显增大,接近 STEP  $k_{cat}/K_m$  解离基团  $pK_a$  依赖性的 Bronsted 斜率  $\beta_{1g}$ 。T<sub>541</sub>A 的催化依赖于解离基团的  $pK_a$ 。该数值的变化说明,T<sub>541</sub>A 反应的限速步骤是磷与苯基氧之间单键的断裂和苯基氧得到质子的过程。已上结果说明,T541 参与了稳定过渡态,并与 WPD loop 的构型变化相互协调,在催化过程中起作用。从 STEP 的晶体结构(图 6C)可知,T541 可通过与 Q462 的直接相互作用,影响 D461 在催化过程中的准确位移和定位,或者影响 Q540 配位水分子来介导磷酸根释放的功能,因此推测,STEP 可能参与了 WPD loop 在催化过程中的构型变化,或者影响了参与磷酸根释放的 Q-loop 对水分子的转运等功能。T541 突变体晶体结构的解析将极大地帮助我们理解 STEP 的催化机制。

以上酶学实验结果揭示了针对 T541 设计新型 PTP 抑制剂的可能性。目前国内外对于 PTP 抑制剂的研究已经取得了大的进展<sup>[9-11,27-29]</sup>,最近研究证实,WPD loop 的运动在不同 PTP 之间也有很大差异。我们在以 STEP 作为对象进行的上述研究中发现,T541 是影响 WPD loop 运动的重要因素之一。因此,特异性针对 T541 的抑制剂可以阻断 T541 与 WPD loop 的相互作用,从而有效阻碍 WPD loop 的功能,最终特异性地抑制 PTP 的酶活性。

综上所述,本文发现在 STEP Q-loop 中的 T541 和 pY-loop 中的 T330 两个残基中,T541 对 STEP 内在酶活力的发挥有着重要作用,它可能主要参与了产物生成的过程。鉴于抑制 STEP 有可能治疗多种神经系统疾病,而 T541 对 STEP 的活力发挥着重要作用,未来设计以 STEP 为靶点的药物,可考虑针对 T541 位点进行。

## 参考文献:

- [1] 陈明, 孙金鹏, 刘晶, 等. 糖尿病中蛋白酪氨酸磷酸酶的研究进展[J]. 生理学报, 2010, 62(2):179-189.
- [2] 柳江, 刘芳. 蛋白酪氨酸磷酸酶非受体型 22 基因多态性与 2 型糖尿病的研究进展[J]. 上海医学, 2010, 33(1):91-94.
- [3] Hunter T. Signaling-2000 and beyond[J]. Cell, 2000, 100(1):113-127.
- [4] Neel B G, Tonks N K. Protein tyrosine phosphatases in signal transduction[J]. Curr Opin Cell Biol, 1997, 9(2):193-204.
- [5] 张薇, 杨金莲, 胡中倩, 等. SHP-2 酪氨酸磷酸酶激活突变导致小鼠髓系异常增殖[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(4):682-687.
- [6] 班振英, 曾宪旭, 焦艳, 等. 蛋白酪氨酸磷酸酶 PRL-3 在乳腺癌中表达及意义[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2012, 26(4):349-351.
- [7] Baum M L, Kurup P, Xu J, et al. A STEP forward in neural function and degeneration[J]. Commun Integr Biol, 2010, 3(5):419-422.
- [8] Kurup P, Zhang Y, Venkitaramani D V, et al. The role of STEP in Alzheimer's disease[J]. Channels (Austin), 2010, 4(5):347-350.
- [9] Sun J P, Fedorov A A, Lee S Y, et al. Crystal structure of PTP1B complexed with a potent and selective bidentate inhibitor[J]. J Biol Chem, 2003, 278(14):12406-12414.
- [10] Yu X, Sun J P, He Y, et al. Structure, inhibitor, and regulatory mechanism of Lyp, a lymphoid-specific tyrosine phosphatase implicated in autoimmune diseases[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(50):19767-19772.
- [11] Sun J P, Wu L, Fedorov A A, et al. Crystal structure of the Yersinia protein-tyrosine phosphatase YopH complexed with a specific small molecule inhibitor[J]. J Biol Chem, 2003, 278(35):33392-33399.
- [12] Eswaran J, von Kries J P, Marsden B, et al. Crystal structures and inhibitor identification for PTPN5, PTPRR and PTPN7: a family of human MAPK-specific protein tyrosine phosphatases[J]. Biochem J, 2006, 395(3):483-491.
- [13] Yu X, Chen M, Zhang S, et al. Substrate specificity of lymphoid-specific tyrosine phosphatase (Lyp) and identification of Src kinase-associated protein of 55 kDa homolog (SKAP-HOM) as a Lyp substrate[J]. J Biol Chem, 2011, 286(35):30526-30534.
- [14] Sun J P, Wang W Q, Yang H, et al. Structure and biochemical properties of PRL-1, a phosphatase implicated in cell growth, differentiation, and tumor invasion[J]. Biochemistry, 2005, 44(36):12009-12021.
- [15] Zhang Z Y. Kinetic and mechanistic characterization of a mammalian protein-tyrosine phosphatase, PTP1 [J]. J Biol Chem, 1995, 270(19):11199-11204.
- [16] Zhang Z Y, Palfey B A, Wu L, et al. Catalytic function of the conserved hydroxyl group in the protein tyrosine phosphatase signature motif[J]. Biochemistry, 1995, 34(50):16389-16396.
- [17] Denu J M, Lohse D L, Vijayalakshmi J, et al. Visualization of intermediate and transition-state structures in protein-tyrosine phosphatase catalysis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(6):2493-2498.
- [18] Huyer G, Liu S, Kelly J, et al. Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate[J]. J Biol Chem, 1997, 272(2):843-851.
- [19] Guan K L, Dixon J E. Evidence for protein-tyrosine-phosphatase catalysis proceeding via a cysteine-phosphate intermediate[J]. J Biol Chem, 1991, 266(26):17026-17030.
- [20] Zhang Z Y, Wang Y, Dixon J E. Dissecting the catalytic mechanism of protein-tyrosine phosphatases[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(5):1624-1627.
- [21] Lohse D L, Denu J M, Santoro N, et al. Roles of aspartic acid-181 and serine-222 in intermediate formation and hydrolysis of the mammalian protein-tyrosine-phosphatase PTP1[J]. Biochemistry, 1997, 36(15):4568-4575.
- [22] Hengge A C, Sowa G A, Wu L, et al. Nature of the transition state of the protein-tyrosine phosphatase-catalyzed reaction[J]. Biochemistry, 1995, 34(43):13982-13987.
- [23] Pannifer A D, Flint A J, Tonks N K, et al. Visualization of the cysteinyl-phosphate intermediate of a protein-tyrosine phosphatase by x-ray crystallography[J]. J Biol Chem, 1998, 273(17):10454-10462.
- [24] Zhao Y, Wu L, Noh S J, et al. Altering the nucleophile specificity of a protein-tyrosine phosphatase-catalyzed reaction. Probing the function of the invariant glutamine residues[J]. J Biol Chem, 1998, 273(10):5484-5492.
- [25] Barrett W C, DeGnore J P, Konig S, et al. Regulation of PTP1B via glutathionylation of the active site cysteine 215[J]. Biochemistry, 1999, 38(20):6699-6705.
- [26] Liu J, Chen M, Li R, et al. Biochemical and functional studies of lymphoid-specific tyrosine phosphatase (Lyp) variants S201F and R266W[J]. PLoS One, 2012, 7(8):e43631.
- [27] 刘霞, 冯长根. 蛋白酪氨酸磷酸酶-1B 抑制剂研究进展[J]. 科技导报, 2012, 30(10):72-79.
- [28] 庞晓斌, 谢欣梅, 王守宝, 等. 人源蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTP1B) 抑制剂的高通量筛选[J]. 药学学报, 2011, 46(9):1058-1064.
- [29] 李婉南, 李莹, 庄妍, 等. 蛋白质酪氨酸磷酸酶 SHP-1 的中药抑制剂筛选[J]. 吉林大学学报:理学版, 2008, 46(6):1211-1216.