

Cdk5/p35 激酶与肌动蛋白细胞骨架结合关系的鉴定

张昭军^{1,2} 齐 众^{2*} 乔明强^{1*}

(¹南开大学生命科学学院微生物系, 天津 300071; ²香港科技大学生物化学系, 香港)

摘要 Cdk5, 一种多功能的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 其活性只有通过结合其神经特异性调节亚基才能被激活。p35 是 Cdk5 的两个主要调节亚基之一。尽管 Cdk5/p35 激酶可以调控神经细胞中肌动蛋白细胞骨架的动态变化, 但直到目前为止 Cdk5/p35 激酶与肌动蛋白细胞骨架的结合关系仍不是很清楚。现利用几种不同的方法对两者的结合关系进行了初步鉴定。目前的试验结果表明在鼠脑组织中肌动蛋白细胞骨架是 Cdk5/p35 超大蛋白复合体的一个组分, p35 可以直接结合纤维状肌动蛋白, 这说明在鼠脑组织或神经细胞中 Cdk5 很有可能是通过 p35 结合到肌动蛋白细胞骨架上并进一步调控肌动蛋白细胞骨架的动态活动的。

关键词 Cdk5; p35; 肌动蛋白细胞骨架

细胞周期蛋白依赖性激酶 5 (cyclin dependent kinase 5, Cdk5), CDKs 家族的特殊成员, 是一种小分子、多功能的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。Cdk5 最早是利用生物化学的方法从牛脑组织中分离出来的^[1], 近年来人们对 Cdk5 的研究取得了巨大进展^[2]。单体 Cdk5 不具有酶活, 必须与其神经特异性调节亚基相结合才能激发其活性。到目前为止已经发现了 Cdk5 的两个神经特异性调节亚基: p35 和 p39 (两者的分子量分别为 35 kDa 及 39 kDa)^[3~5]。p35 在有丝分裂期后的神经元细胞或成熟小鼠的脑组织中表达量最高, Cdk5/p35 激酶的活性也最高^[6,7]。p39 是 p35 的蛋白类似物, 两者在结构及功能上具有一些相似之处。p39 在神经细胞中的时空表达不同于但互补于 p35, 说明两者在功能上具有一定的互补性。肌动蛋白细胞骨架是纤维状肌动蛋白在细胞中的分布网络, 具有维持细胞形状、调控胞质分裂、促进胞内物质运输、调控细胞黏连及细胞运动等重要功能。有文献报道 p35、Cdk5 及纤维状肌动蛋白三者共存于神经元细胞的轴突的生长锥部分^[8]。此外, p39 可与纤维状肌动蛋白结合, 并且其过量表达可以改变纤维状肌动蛋白在细胞中的分布^[9]。这些证据说明 Cdk5、p35 及纤维状肌动蛋白三者很可能存在于同一蛋白复合体中。然而目前为止还未见这方面的相关报道。本试验利用生物化学的方法分析鉴定了 Cdk5/p35 激酶与肌动蛋白细胞骨架共存于同一超大蛋白复合体

中, 并进一步确定了三者的结合关系, 为更深入地研究 Cdk5/p35 激酶对肌动蛋白细胞骨架的动态调节打下了基础。

1 材料与方法

1.1 抗体

试验中所用抗体为: 抗- α -肌动蛋白抗体(Sigma), 抗- β -肌动蛋白抗体(Sigma), 抗-p35 C-19 抗体(Santa Cruz), 抗-Cdk5 DC17 抗体(Santa Cruz)及抗-GST 抗体(Sigma)。

1.2 DNaseI 处理肌动蛋白细胞骨架组分

鼠脑组织中去污剂不溶性组分的制备: 将新鲜鼠脑(1只)取出后先用冰冷的 1×PBS 缓冲液冲洗 3 次, 然后将鼠脑尽量剪碎, 再用 10 ml 匀浆液(2% Triton X-100, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 2 mmol/L MgCl₂, 混合型蛋白酶抑制剂)将鼠脑组织全部转移至匀浆器中, 充分研磨直至无颗粒状组织为止, 此操作在冰上进行。所得匀浆液先经低速离心(5 000 g, 30 min)去除相对较大的组织碎片等, 然后取上清液, 上清液再经超高速离心(100 000 g, 1 h)后取沉淀部分, 因匀浆

收稿日期: 2008-01-28 接受日期: 2008-03-28

香港科研资助委员会资助项目(HKUST6414/05M)

* 通讯作者。乔明强: Tel: 022-23503340, Fax: 022-23503692, E-mail: mingqiangqiao@yahoo.com.cn; 齐众: Tel: 00852-23587273, E-mail: qirz@ust.hk

液中含有 2% 的去污剂 Triton X-100, 所以称此组分为去污剂不溶性组分。

细胞膜结合的肌动蛋白细胞骨架组分的制备及 DNaseI 的处理: 上述去污剂不溶性组分再用 3 ml 缓冲液(10% 蔗糖, 10 mmol/L Tris, 2 mmol/L $MgCl_2$, 混合型蛋白酶抑制剂)将其全部转移至匀浆器中进一步充分研磨, 然后进行非连续性蔗糖密度梯度(上下层的蔗糖浓度分为 10% 及 30%)离心 100 000 g, 3 h。10% 及 30% 蔗糖梯度的间介部分为鼠脑组织中细胞膜结合的肌动蛋白细胞骨架组分^[9]。此组分用 DNaseI 溶液(2 μ mol/L DNaseI, 20 mmol/L HEPES, 2 mmol/L $MgCl_2$, 5 mmol/L EGTA, 5 mmol/L ATP, 混合型蛋白酶抑制剂)在冰上处理 30 min 后离心(14 000 g, 30 min), 然后取等量上清液及沉淀用于蛋白质杂交分析 p35、Cdk5 及肌动蛋白的分布情况。试验中用 p39 作为与纤维状肌动蛋白结合的正对照。抗-p39 抗体从 Biogenes 公司定做, p39 的肽段 DPLVQQRNRENLLRKGRDPPDG 作为抗原。

1.3 Cdk5/p35 蛋白复合体从鼠脑组织膜组分中的分离

新鲜鼠脑(1 只)取出后先用冰冷的 1×PBS 缓冲液冲洗 3 次, 再用 10 ml 裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 混合型蛋白酶抑制剂)在匀浆器中充分研磨, 置于冰上 30 min。匀浆液经初步离心(5 000 g, 45 min)后取上清液组分, 此组分为鼠脑组织的粗匀浆液。粗匀浆液再经超高速离心(100 000 g, 1 h)。上清液组分用于大肠杆菌表达的 p35 与肌动蛋白细胞骨架的结合试验。沉淀组分(P)用于提取 Cdk5/p35 蛋白复合体^[8]。试验中将 5 种不同浓度不同类型去污剂溶在上述的裂解液中, 然后在冰上处理此膜组分 1 h, 处理后的膜组分再经超高速离心(100 000 g, 1 h), 然后分别取等量的上清液(提取液)及沉淀组分用于蛋白质杂交分析 Cdk5/p35 蛋白复合体的提取效果。

1.4 柱层析分析

0.2% sodium deoxycholate (DOC)提取液经 0.22 μ m 的滤器过滤后, 将 100 μ l (约 200 μ g)样品上样到 Superose 6 柱进行柱层析分析, 收集组分并用蛋白质杂交检测各组分中的 p35、Cdk5 及纤维状肌动蛋白的分布情况。所用柱层析液为 50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 混合型蛋白酶抑制剂。

1.5 Cdk5 或 p35 与纤维状肌动蛋白的体外共沉

淀试验

质粒 pGEX4T-1/p35 及 pGEX4-1/Cdk5 为实验室早前构建。GST-p35、GST-Cdk5 及 GST 在 *Escherichia coli* BL21(DE3)中的诱导表达及纯化参照文献^[10]中的方法。GST 及其融合蛋白在反应之前需要在 ATP-G 缓冲液(5 mmol/L Tris-HCl, 0.2 mmol/L ATP, 0.1 mmol/L $CaCl_2$, 0.5 mmol/L DTT, 0.02% NaN_3 , pH 8.0)中透析共 4 h (中间换一次缓冲液)。纤维状肌动蛋白是由单体肌动蛋白在 1×KMEI 缓冲液(50 mmol/L KCl, 1 mmol/L $MgCl_2$, 2 mmol/L EGTA, 10 mmol/L imadazol, pH 7.0) 中聚合至少 2 h 而成。上述透析过的 5 μ g GST 及其融合蛋白与 2 μ mol/L 纤维状肌动蛋白在室温下混合 1 h, 终体积为 100 μ l。以等体积、含有 10% 甘油的 1×KMEI 缓冲液为缓冲液进行超高速离心(100 000 g, 30 min), 取等量上清液及沉淀用于蛋白质杂交分析。

1.6 p35 与鼠脑组织中肌动蛋白细胞骨架的结合试验

将 3 μ g GST-p35 及 GST、25 μ l GSH-Sepharose 及 500 μ g 的鼠脑组织裂解液(100 000 g, 1 h 离心后的上清液组分)在室温转动混合 1 h, 反应体系中 BSA 的终浓度为 1 mg/ml, 反应总体积为 500 μ l。蛋白质结合液为 50 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 0.5% Triton X-100, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 混合型蛋白酶抑制剂。反应结束后, 用蛋白质结合液漂洗 GSH-Sepharose 3 次, 然后加入 40 μ l 1×SDS-PAGE 上样液煮沸 3 min, SDS-PAGE 分离。最后用蛋白质杂交技术分析两者的结合情况。

2 结果

2.1 Cdk5/p35 激酶结合于去污剂不溶性的肌动蛋白细胞骨架组分

为了验证 Cdk5/p35 激酶是否结合于肌动蛋白细胞骨架组分, 本试验从鼠脑组织中分离了结合于细胞膜的肌动蛋白细胞骨架组分(图 1A, b)。DNaseI 是单体肌动蛋白的结合蛋白, 可以用来测定单体肌动蛋白在溶液中的浓度^[11], 适当浓度的 DNaseI 也可以使纤维状肌动蛋白或细胞中的肌动蛋白细胞骨架解聚成单体肌动蛋白, 进而将纤维状肌动蛋白的结合蛋白释放出来。本试验中用 2 μ mol/L DNaseI 处理鼠脑组织中结合于细胞膜的肌动蛋白细胞骨架组分就可以将其结合蛋白 p39 释放出来。如果 Cdk5/p35 激酶结合于肌动蛋白细胞骨架, 则同样可以通过 DNaseI

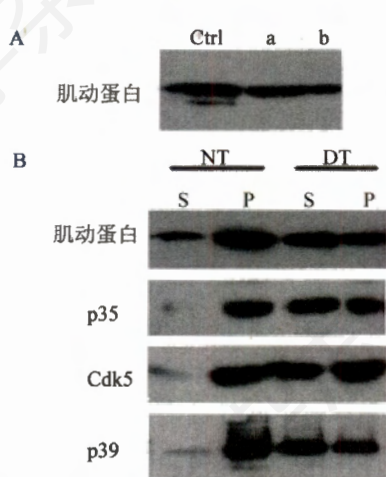


图1 DNaseI 处理结合于鼠脑组织细胞膜的肌动蛋白细胞骨架组分

A: 鼠脑组织中结合于细胞膜肌动蛋白细胞骨架组分的分离。Ctrl、a 及 b 分别代表鼠脑组织的粗匀浆液、去污剂不溶性肌动蛋白细胞骨架组分及结合于细胞膜的肌动蛋白细胞骨架组分; B: DNaseI 处理结合于细胞膜的肌动蛋白细胞骨架组分。NT 代表未用 DNaseI 处理; DT 代表用 DNaseI 处理。S 和 P 分别代表上清液及沉淀。

所导致的肌动蛋白细胞骨架的解聚而将 Cdk5 及 p35 释放出来。如图 1B 所示, 未用 DNaseI 处理的肌动蛋白细胞骨架组分中只有极少量的肌动蛋白释放出来, 而 p35 及 Cdk5 则几乎完全没有被释放出来。但此组分经 $2 \mu\text{mol/L}$ DNaseI 处理 30 min 后则有约 50% 的上述蛋白质被释放出来。这一试验结果说明在鼠脑组织中 Cdk5/p35 激酶与肌动蛋白细胞骨架是结合在一起的。

2.2 肌动蛋白细胞骨架与 Cdk5/p35 激酶共存于同一超大蛋白复合体中

DNaseI 处理鼠脑组织肌动蛋白细胞骨架组分的试验结果表明肌动蛋白细胞骨架与 Cdk5/p35 激酶是结合在一起的。同时, Cdk5/p35 激酶可以调控许多与肌动蛋白细胞骨架相关的功能也意味着肌动蛋白细胞骨架很可能是 Cdk5/p35 超大蛋白复合体的一个组分^[2,8,12]。为了验证上述假设, 本试验拟用柱层析技术分析在鼠脑组织中 Cdk5、p35 及肌动蛋白细胞骨架是否共存于同一蛋白复合体中。由于 Cdk5/p35 蛋白复合体很大程度存在于细胞膜上^[8,13], 因此本试验拟从鼠脑组织的细胞膜组分分离 Cdk5/p35 蛋白复合体。众所周知, 去污剂可以有效地破坏细胞膜的磷脂双分子层结构, 进而将大部分膜相关蛋白释放出来。DOC 是一种强度比较低的阴离子型去污剂, 用 0.2% DOC 溶液处理鼠脑组织的细胞膜可以将绝大部

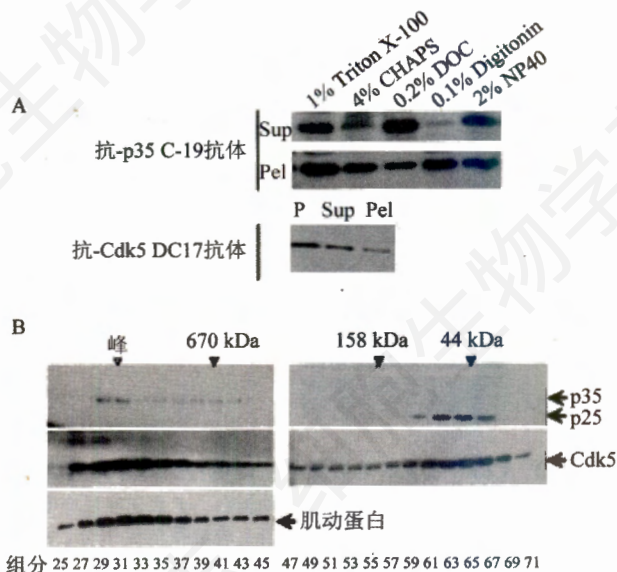


图2 肌动蛋白细胞骨架是 Cdk5/p35 超大蛋白复合体的一个组分

A: 0.2% DOC 可有效提取鼠脑组织细胞膜结合的 Cdk5/p35 蛋白复合体。试验中共用了 5 种不同的去污剂[1% Triton X-100, 4% CHAPS, 0.2% DOC, 0.1% 毛地黄皂苷(digitonin)及 2% NP-40]去处理鼠脑组织的细胞膜组分。用抗-p35 C-19 抗体检测了上清液及沉淀中 p35 的含量。同时用抗-Cdk5 DC17 抗体检测了 0.2% DOC 鼠脑组织细胞膜提取液中 Cdk5 的含量。Sup 及 Pel 分别代表上清液及沉淀组分。P 为未经处理的鼠脑组织细胞膜组分; B: 柱层析分析 0.2% DOC 去污剂的膜组分提取物。用蛋白质杂交方法检测了收集组分中的 p35、Cdk5 及肌动蛋白的分布。全部 p35 及部分 Cdk5 和肌动蛋白细胞骨架集中在 29~33 的组分中。部分 Cdk5 则分别以单体及 Cdk5/p25 蛋白二聚体的形式存在于其他组分中。图中的 p25 是存在于脑组织中的、p35 在钙蛋白酶的作用下产生的羧基端产物, 它与 Cdk5 的结合同样具有激酶活性。

分的 p35 及 Cdk5 释放出来(图 2A)。0.2% DOC 的提取物经柱层析分析后发现 Cdk5/p35 蛋白复合体仍然保持完整, 而且肌动蛋白细胞骨架也存在于远大于 670 kDa 的 Cdk5/p35 超大蛋白复合体中(图 2B)。此试验进一步证明了鼠脑组织中肌动蛋白细胞骨架与 Cdk5/p35 激酶存在于同一个超大蛋白复合体中。

2.3 p35 直接结合肌动蛋白细胞骨架

上述试验结果表明 Cdk5/p35 激酶与肌动蛋白细胞骨架共存于同一超大蛋白复合体中。但是目前我们仍不清楚肌动蛋白细胞骨架是直接结合于 Cdk5/p35 激酶还是通过复合体中的其他蛋白间接结合的。为此, 本试验拟用纤维状肌动蛋白的体外共沉淀试验分析两者的结合关系。纤维状肌动蛋白的一个重要特性是在超高速离心(100 000 g, 30 min)的情况下沉淀下来。如果某一蛋白质是纤维状肌动蛋白的结合蛋白, 那么在此超高速离心的情况下就会与纤维状肌

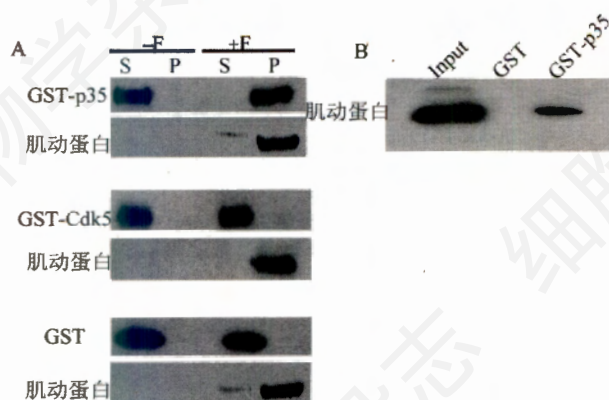


图3 Cdk5或p35与纤维状肌动蛋白的体外共沉淀

A: -F表示在反应中未加入纤维状肌动蛋白, +F表示在反应中已加入纤维状肌动蛋白。S和P分别代表上清液及沉淀组分。GST-p35、GST-Cdk5及GST的检测所用抗体为抗-GST抗体(Sigma), 肌动蛋白的检测所用抗体为抗- α -肌动蛋白抗体(Sigma); B: 图中Input占总投入鼠脑组织裂解液的5%。肌动蛋白的检测所用抗体为抗- β -肌动蛋白抗体(Sigma)。

动蛋白一起沉淀下来。如图3A所示, GST-p35可与纤维状肌动蛋白一起沉淀下来, 而GST-Cdk5及GST则仍存在于上清液组分中而不与纤维状肌动蛋白结合。这说明GST-p35与纤维状肌动蛋白的结合与GST标签蛋白是无关的, 两者可以共沉淀完全是因为两者可以直接结合。此外, 外源表达的GST-p35也可以与鼠脑组织中的肌动蛋白细胞骨架直接结合, 而GST则不具有此功能(图3B)。

3 讨论

GTP酶的家族成员(Rho, Rac1和Cdc42)和Pak激酶在调控肌动蛋白细胞骨架的动态活动和细胞形状等功能方面具有重要的作用^[14,15]。同时, Cdk5/p35激酶在轴突生长锥、细胞的片状伪足及线状伪足区域的分布, 表明该激酶具有调控肌动蛋白细胞骨架动态活动的功能^[8]。Cdk5/p35激酶是Rac1下游调控途径的靶蛋白, 结合有活性的Rac1以后Cdk5/p35激酶可以将Pak1磷酸化, 同时抑制了Pak1的活性。这种磷酸化修饰机制对神经细胞中肌动蛋白细胞骨架的动态调节具有一定的影响, 进而影响到细胞的迁移及生长^[8]。WAVE1是Arp2/3蛋白复合体的激活蛋白, 同时也是Cdk5/p35激酶的底物。WAVE1上存

在3个Cdk5/p35激酶的磷酸化位点, WAVE1被Cdk5/p35激酶的磷酸化在一定程度上抑制了Arp2/3蛋白复合体引发的肌动蛋白的聚合, 通过此机制同样表明Cdk5/p35激酶在调控肌动蛋白细胞骨架方面的功能^[12]。另外, 免疫细胞化学试验结果表明p39也与肌动蛋白细胞骨架共存于细胞周围的褶皱区域, 进一步肯定了该激酶在这方面的作用^[9]。

在神经细胞中细胞骨架蛋白主要包括中间纤维蛋白、微管蛋白及纤维状肌动蛋白等3种。其中Cdk5/p35激酶对中间纤维蛋白的两个家族成员NF-M及NF-H的磷酸化可以调控神经细胞的分化及轴突的生长^[16,17], 对微管蛋白的结合蛋白Tau及MAP2的磷酸化可以调控神经极性及微管蛋白的动态活动^[18], 而对于肌动蛋白细胞骨架, Cdk5/p35激酶可以通过对其底物如Pak1、Src、WAVE1等的磷酸化来调控肌动蛋白细胞骨架的动态活动^[8,12,19], 这些现象说明Cdk5/p35激酶具有调控神经细胞骨架蛋白的普遍功能。本研究利用几种不同的实验手段初步分析鉴定了Cdk5/p35激酶与肌动蛋白细胞骨架的结合关系。这种结合关系的确定对于进一步研究Cdk5/p35激酶调控肌动蛋白细胞骨架动态活动的机制具有重要的指导意义, 同时也为进一步研究Cdk5/p35激酶与其他神经细胞骨架蛋白的关系提供了很好的借鉴。

参考文献(References)

- [1] Lew J et al. *J Biol Chem*, 1992, **267**: 13383
- [2] Dhavan R et al. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, **2**: 749
- [3] Lew J et al. *Nature*, 1994, **371**: 423
- [4] Tsai LH et al. *Nature*, 1994, **371**: 419
- [5] Tang D et al. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 26897
- [6] Delalle I et al. *J Neurocytol*, 1997, **26**: 283
- [7] Zheng M et al. *J Neurobiol*, 1998, **35**: 141
- [8] Nicolic M et al. *Nature*, 1998, **395**: 194
- [9] Humbert S et al. *J Cell Sci*, 2000, **113**: 975
- [10] Fu X et al. *J Biol Chem*, 2006, **281**, **51**: 39014
- [11] Fox JE et al. *Anal Biochem*, 1981, **117**: 170
- [12] Kawauchi T et al. *Nat Cell Biol*, 2006, **8**: 17
- [13] Patrick GN et al. *Nature*, 1999, **402**: 615
- [14] Sells MA et al. *Curr Biol*, 1997, **7**: 202
- [15] Hall A. *Science*, 1998, **279**: 509
- [16] Lew J et al. *J Biol Chem*, 1992, **267**: 25922
- [17] Shetty KT et al. *Proc Natl Acad Sci*, 1993, **90**: 6844
- [18] Lew J et al. *Trends Biochem Sci*, 1995, **20**: 33
- [19] Kato G et al. *J Biochem*, 1999, **126**: 957

Characterization of Association of Actin Cytoskeleton with Cdk5/p35 Kinase

Zhao-Jun Zhang^{1,2}, Zhong Qi^{2*}, Ming-Qiang Qiao^{1*}

(¹Department of Microbiology, School of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China; ²Department of Biochemistry, Hong Kong University of Science and Technology, Clear Water Bay, Kowloon, Hong Kong, China)

Abstract Cdk5 is a small serine/threonine kinase and its activity requires association with its neuronal specific regulatory subunits. p35 is one of two regulatory subunits for Cdk5. Although the regulation of actin cytoskeleton is one of the most important functions of Cdk5/p35 kinase in neuronal central system, it is still unclear whether the actin cytoskeleton is associated with Cdk5/p35 kinase. In this study, the association of Cdk5/p35 kinase with actin cytoskeleton was characterized using several different methods. The present results demonstrated actin cytoskeleton was identified as one major component of Cdk5/p35 macrocomplex and p35 can directly bind to filamentous actin. Thus we deduce that Cdk5 might associate with actin cytoskeleton via its regulatory subunit p35 in brain to further regulate the actin cytoskeleton dynamics.

Key words Cdk5; p35; actin cytoskeleton

Received: January 28, 2008

Accepted: March 28, 2008

This work was supported by the Research Grants Council of Hong Kong (HKUST6414/05M)

*Corresponding author. Ming-Qiang Qiao: Tel: 86-22-23503340, Fax: 86-22-23503692, E-mail: mingqiangqiao@yahoo.com.cn

Zhong Qi: Tel: 00852-23587273, E-mail: qirz@ust.hk