综述 ·

细胞周期素依赖性激酶-5 研究进展

王颖 综述 王韵 * 审校

【摘要】 细胞周期素依赖性激酶-5 属于小丝氨酸/苏氨酸周期素依赖性激酶家族成员,虽与其他成员序列具有同源性,但功能却完全不一样,即与细胞周期关系不大,却在中枢神经系统的发育和神经元正常功能的维持中发挥重要作用,并与一些退行性疾病及药物成瘾有密切联系,是神经系统中重要的蛋白激酶之一,可能成为防治中枢神经系统疾病的靶分子。现就细胞周期素依赖性激酶-5 的一些最新研究进展进行综述。

【关键词】 细胞周期蛋白质依赖激酶类; 中枢神经系统疾病; 药物成瘾

真核细胞的细胞分裂周期(cell division cycle, Cdc)受磷酸化/脱磷酸化事件调控,参与调控的分子成员由 Cdc2 同源催化亚单位和属于细胞周期素家族成员的调节亚单位细胞周期素组成。由于这些激酶需要与细胞周期素结合才具有激酶活性,因此称为周期素依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, Cdk)。Cdk5 最早是从筛选 Cdc2 相关激酶中得到的[1],属于小丝氨酸/苏氨酸周期素依赖性激酶家族成员,它与人的 Cdc2 和 Cdk2 同源性分别为 58 %和 62 %。尽管该酶与细胞分裂周期激酶有高度同源性,也可以与细胞分裂周期素 D1、D2 结合,但结合后没有激酶活性,与细胞分裂周期也没有关系,却与神经系统发育、神经元正常功能的维持密切相关,参与发育过程中神经元的迁移、神经突起的生长、轴突运输、胞吐、药物成瘾等,在该激酶家族中可谓"标新立异"。现重点介绍 Cdk5 研究的最新进展。

Cdk5 的细胞学定位

Cdk5 蛋白由 292 个氨基酸残基组成,相对分子质量为 33×10^3,与小鼠 Cdk1 激酶氨基酸序列同源性为 58 %。在不同种属(人、牛、大鼠、小鼠)之间,氨基酸序列同源性达到 99 %,表明该蛋白在脊椎动物中是高度保守的。

1. Cdk5 在细胞系中的表达:Cdk5 在细胞系中的转录体表达含量高,在 Nalm6(前 B 细胞白血病)、T98G(胶质母细胞瘤)、SKNSH(神经母细胞瘤)、WI38(双倍体人纤维母细胞)、SAOS2(骨肉瘤)、293(腺病毒转化的人肾上皮细胞)和 HepG2(肝癌)9 种细胞系中也都能检测到 Cdk5 的蛋白表达。

2. Cdk5 在组织中的表达分布:对于 Cdk5 在组织中的表达情况,研究者发现 Cdk5 mRNA 在成年鼠脑内表达最高,在肾、胸腺、结肠、睾丸、卵巢、空肠、回肠和十二指肠有中等程度的表达,肝、心脏、脾、胃和肺几乎不表达。Ino H 等[2]对 Cdk5 在神经系统的分布进行了细致的研究,发现 Cdk5 转录体几乎存在于整个中枢和外周神经系统的神经元,但是也有例外,如小脑粒细胞;Cdk5 在一些大神经元,如海马的锥体细胞、小脑蒲肯野细胞、皮层神经元、脊髓运动神经元、脑干和外周感觉神经元等表达更高,提示其大量 mRNA 可能聚集在胞体中。此外,他们发现 Cdk5 不仅分布在胞浆内,也分布在细胞核中,如小脑蒲肯野细胞核内、分子层一些未知细胞核内、外周神经系统的感觉神经元细胞核内,但没有在核仁中检测到 Cdk5 的信号。

Cdk5 的激酶活性

与传统的细胞周期素依赖性激酶不同,Cdk5 虽然可以同 cyclin D1、cyclin D2 结合,但是并没有激酶活性。Cdk5 的激酶活性分布局限,主要存在于脑内。

1. Cdk5 激酶活性调节因子 p35 和 p39:大部分 Cdk5 以单体形式存在,没有激酶活性,只有与调节因子 p35 或 p39 结合才表现酶活性,而 p35 和 p39 主要存在于脑和神经元细胞系。p35 和 p39 可以单独活化 Cdk5,二者的氨基酸序列同源性达 57 %,这就不免使人产生疑惑,为什么脑内要存在两种功能相似的分子呢? Zheng 等研究发现,P35 蛋白和 mRNA 水平在成年大鼠脑内表达更高,而 p39 主要在脊髓中表达。p35 结合及活化 Cdk5 的能力更强。在神经系统发生过程中,二者的表达开始时间和表达区域都很相似,但 p35 在喙侧前脑表达水平高,提示在端脑的形态发生上主

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371635);国家重点基础研究计划"脑功能和脑重大疾病的基础研究"资助项目(G1999054000)

作者单位:100083 北京大学神经科学研究所(教育部神经科学重点实验室)

通讯作者:王韵, E-mail: wangy66@bjmu.edu.cn

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

要是 p35 发挥作用。Ko J 等[3]进一步证实,p35 缺失(p35-/-)小鼠对 Cdk5 的功能影响更严重,p39 代偿性上调也不能完全替代 p35 的功能;相反,p35 可以完全代偿 p39 的功能,p39 缺失也没有明显的缺陷。p35 和 p39 均缺陷的小鼠,没有 Cdk5 激酶活性,缺陷表型与 Cdk5 缺陷小鼠一样,说明不论是否存在 Cdk5 其他调节因子,至少在发育过程中,两种调节因子对 Cdk5 的影响是不能被其他分子代替的。

2. Cdk5 活化的机制:(1) p35 引起 Cdk5 活化的机制。p35 氨基末端的氨基酸残基与激酶的结合和活化有关,150～291 位氨基酸残基可以活化 Cdk5,其中 150～200 位的氨基酸残基与 Cdk5 结合,而离体活化 Cdk5 还需要 279～291 位氨基酸残基。尽管 p35 的序列与细胞周期素几乎没有一致性,也不具有周期素所特有的周期素盒子(cyclin box),但是计算机模型(computer modeling)和突变研究预测 p35 活化 Cdk5 的机制可能与细胞周期素活化其他激酶的机制相似。最近对 Cdk5 和 p25(p35 羧基末端 208 个氨基酸残基)复合体晶体结构的研究也证实,p25 在与 Cdk5 作用时,其形成的折叠结构类似于周期素盒子的折叠结构。Cdk5 的 159 位丝氨酸决定着 Cdk5 和 p35 相互作用的特异性,如果换为苏氨酸则 Cdk5 不能结合 p35,但是,如果替换为丙氨酸则不影响二者的结合,也不影响 Cdk5 的激酶活性。(2) Cdk5 磷酸化对激酶活性的影响。对于周期素依赖性激酶来说,要使它们完全激活需要与细胞周期素结合及磷酸化激酶 T 环上的苏氨酸或丝氨酸残基两个事件的协同作用,这样才能解除 T 环形成的障碍,打开催化位点,允许底物进入,从而表现激酶活性。完全激活 Cdk5 是否也遵循这些原则呢?Poon 等在 1997 年发现,Cdk5 与 p25 的相互作用可以使未磷酸化的 Cdk5 的 T 环完全伸展,与发生磷酸化的 Cdk2-cyclin-A 的构象完全一样;而且可以磷酸化几乎全部 Cdk 激酶的 Cdk7/cyclin H 复合体(CAK)不能磷酸化 Cdk5,所以得出磷酸化不影响 Cdk5 活化的结论。但是另一方面,让人感到困惑的是,其他细胞周期激酶/周期素复合体很快就可以被激活,而 Cdk5 需要与 p25 孵育几个小时才能达到最大活化水平,磷酸化的 Cdk5/p25 复合体要比未磷酸化的复合体活性高出 5 倍。进一步的研究也发现,虽然 CAK 不能磷酸化 Cdk5,但是酪蛋白激酶 I (casein kinase I)却可以磷酸化 Cdk5,159 位的丝氨酸和其后的丙氨酸和谷氨酸残基恰好构成酪蛋白激酶的磷酸化位点,与其他周期激酶一样,159 位的丝氨酸同样也是 Cdk5 的磷酸化位点[4]。这些证据都说明 Cdk5 磷酸化后也可以促进其活化。

3. Cdk5 激酶的作用底物:Cdk5 属于脯氨酸指向性(proline-directed)激酶,可以磷酸化丝氨酸和苏氨酸残基。其作用底物均含有一致性序列(S/T) PX(K/H/R),S 或 T 是可以进行磷酸化的丝氨酸或苏氨酸残基,X 代表任意的氨基酸,P 是 +1 位上的脯氨酸残基。+1 位的脯氨酸残基是必需的,而且在 +3 位最好有一个碱性(basic)残基。目前为止,发现的 Cdk5 的激酶底物各种各样,大约有十几种,包括 Tau、ERBB、pRb、actin 结合蛋白 caldesmon、神经纤维蛋白 NF-M 和 NF-H 等。Cdk5 的调节因子 p35 或 p39 是否赋予了 Cdk5 底物的特异性,目前还不清楚。

Cdk5 在中枢神经系统中的作用

1. Cdk5 与中枢神经系统的发育有关:基因打靶研究表明,P35/Cdk5 激酶活性与正常神经元的迁移、轴突形成及哺乳类动物的皮层发育有关。(1) Cdk5/p35 参与分化神经元的神经突起的生长:Cdk5/p35 的激酶活性随中枢神经系统的发生过程而增强,表明 Cdk5 在神经元分化过程中起作用。进一步研究发现,在轴突形成过程中,Cdk5 和 p35 出现重新分布,从发育神经元的胞体迁移到生长锥上,这种新的定位与 Cdk5 调节轴突形成过程中的细胞骨架动力学有关。Cdk5 的负显性突变体(dominant-negative mutants)和 p35 反义质粒都可以抑制突起的生长;相反,若过表达 Cdk5 或 p35,则突起将会变长。但是,研究者也发现,只有当神经元生长在含 laminin 的介质上时,Cdk5/p35 与轴突延伸才有这种较好的时空相关关系,当神经元只生长在多聚赖氨酸上时,这种相关关系就不存在了。而且,Cdk5 或 p35 的反义寡核苷酸抑制其表达时,只选择性抑制那些可以被 laminin 强化的轴突延伸,并不改变那些小突起的伸展[5],其他研究也支持尽管 Cdk5 与轴突发育有关,但是它并不是轴突生长所必需的观点[6]。(2) 与皮层正常板层结构的形成有关:成年哺乳动物的六层板层结构是通过神经元的正确迁移而形成的。在 p35 或 Cdk5 缺失突变的小鼠中,神经元的迁移模式不再遵循"inside-out"模式(即早期神经元在深层,晚期神经元向外迁移),导致皮层板层结构严重紊乱,Cdk5 缺失突变小鼠在出生前死亡。对 p35 突变小鼠的进一步研究发现,最早生成的皮层板层神经元(cortical neuron)的迁移是正常的,但是随后生成的神经元却只能停留在这些神经元的下面,表明 p35/Cdk5 在皮层神经元超越已经存在的神经元而向表面迁移的过程中是非常重要的[7]。以上研究表明,p35/Cdk5 激酶活性在神经元迁移及皮层板层结构的正确形成中起了重要的作用[8,9]。应该指出的是,Cdk5 缺失突变比 p35 缺失突变的表型缺陷更严重,而且是致死性的,在出生前即死亡,而 p35 突变小鼠可以存活,这可能是由于在 p35 缺失小鼠中,其他调节分子如 p39 起了一定的代偿作用[3]。

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

2. Cdk5 与神经退行性病变有关:微管相关蛋白如 Tau 蛋白和神经丝蛋白的异常磷酸化与几种神经退行性病变,如阿尔茨海默病、Down's 综合征、进行性核上瘫、帕金森氏病等有关。这些退行性疾病的显著特点是出现神经纤维缠结,后者是由于 Tau 蛋白的过度磷酸化形成的。参与 Tau 蛋白磷酸化的激酶是 p25-Cdk5 复合体。过度表达人 p25 的转基因小鼠中 Tau 蛋白和神经丝蛋白高度磷酸化,细胞骨架紊乱,特别是在杏仁核、丘脑/下丘脑和皮层中更为严重,calpain 裂解 p35 为 p25,可以使 Cdk5 发生重新定位并增强其稳定性及激酶活性,促进 Tau 蛋白的异常磷酸化效应,导致细胞骨架破坏及神经元凋亡。在阿尔茨海默病患者脑中 Cdk5/p25 的异常增高主要出现在前额叶皮层。阿尔茨海默病的另一个特点是淀粉样病变,是由 amyloid-β(Aβ)肽的过度聚集而形成的。用 Aβ 肽处理原代神经元可以活化 calpain,后者促进 p25 生成,导致 Tau 蛋白过度磷酸化。Cdk5 抑制剂可以减轻 Aβ 肽引起的神经毒性变化,进一步证明在神经毒性条件下 Cdk5 可以促进神经退行性病变的发生过程。另一项研究发现,Jun N 末端激酶(jun N-terminal kinase,JNK)通路和 Cdk5 活化是 Aβ 肽引发细胞死亡的始动信号。最近发现,p35 上的一段 126 个氨基酸残基可以有效抑制 Cdk5 的活性,称为 Cdk5 抑制肽(Cdk5 inhibitory peptide,CIP),该肽还可以抑制 Tau 蛋白的过度磷酸化,对其进一步的研究,有助于更好地了解阿尔茨海默病的发生机制[10]。

3. Cdk5 与药物成瘾有关:慢性可卡因给药可以促进 Cdk5 的 mRNA、蛋白水平表达升高,并增强其激酶活性。同时,Cdk5 的抑制剂可以有效抑制因可卡因反复给药引起的行为敏化[11]。在可卡因成瘾中,活化的蛋白激酶 A(protein kinase A,PKA)通路通过磷酸化多种蛋白,包括电压和配体门控性离子通道来介导可卡因的效应。PKA 一个重要的靶蛋白是 DARPP-32,其磷酸化可以抑制蛋白磷酸酶 PP-1,从而延长其底物如一些离子通道和 cAMP 反应元件结合蛋白(cyclic AMP-response element binding protein,CREB)等的活性。但是 Cdk5 可以使 Thr75 磷酸化,恢复 PP-1 的活性并抑制 PKA 活性。因此,Cdk5 通过磷酸化 Thr75 将 DARPP-32 由 PP-1 抑制剂转变为 PKA 抑制剂,削弱可卡因效应。在可卡因自身给药大鼠模型上发现,戒断第一天时腹侧被盖区 Cdk5 蛋白表达水平升高,但伏核在戒断期间没有 Cdk5 表达水平的改变[12]。

与可卡因的研究结果相反,在吗啡成瘾时前额叶皮层的 Cdk5 和 p35 的表达水平都下降[13],可能 Cdk5/p35 复合体在与成瘾有关的 PKA 通路上所起的调节作用不同,其中神经纤维丝 NF-H 的过度磷酸化与 p35 下调有很好的相关性。

另一项关于乙醇和 Cdk5 的研究发现,尽管皮层和小脑中的 Cdk5 蛋白水平没有明显变化,但是 Cdk5 激酶活性显著增高,特别是在皮层,可能与乙醇引起的神经元损伤及酒精性退行性病变有关[14]。

结 语

由于 Cdk5 分布的广泛性及其调节分子的局限性,它在神经系统中的作用正日益得到人们的关注与研究,随着对其作用机制及相应信号通路的深入研究,必将有助于理解中枢神经系统多种病变,从而进行有效的预防和治疗。近来发现一些可以和 p35 结合的蛋白,如分布在肝肾或一些肿瘤细胞系中的 IC53-2,对于这些蛋白的深入研究,也许可以进一步拓展对 Cdk5 功能的认识。

参 考 文 献

1 Meyerson M, Enders GH, Wu CL, et al. A family of human cdc2-related protein kinases. EMBO J, 1992, 11(8): 2909-2917.

2 Ino H, Ishizuka T, Chiba T, et al. Expression of CDK5 (PSSALRE kinase), a neural cdc2-related protein kinase, in the mature and developing mouse central and peripheral nervous systems. Brain Res, 1994, 661(1-2): 196-206.

3 Ko J, Humbert S, Bronson RT, et al. p35 and p39 are essential for cyclin-dependent kinase 5 function during neurodevelopment. J Neurosci, 2001, 21(17): 6758-6771.

4 Sharma P, Sharma M, Amin ND, et al. Regulation of cyclin-dependent kinase 5 catalytic activity by phosphorylation. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(20): 11156-11160.

5 Paglini G, Pigino G, Kunda P, et al. Evidence for the participation of the neuron-specific CDK5 activator P35 during laminin-enhanced axonal growth. J Neurosci, 1998, 18(23): 9858-9869.

6 Connell-Crowley L, Le-Gall M, Vo DJ, et al. The cyclin-dependent kinase Cdk5 controls multiple aspects of axon patterning in vivo. Curr Biol, 2000, 10(10): 599-602.

7 Kwon YT, Tsai LH. A novel disruption of cortical development in p35(-/-) mice distinct from reeler. J Comp Neurol, 1998, 395(4): 510-522.

8 Ohshima T, Ward JM, Huh CG, et al. Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(20): 11173-11178.

9 Chae T, Kwon YT, Bronson R, et al. Mice lacking p35, a neuronal specific activator of Cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality.

(下转第 505 页)

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

凝固,但是临床出血要比血友病轻得多,甚至很少发生出血。其机制仍有待于阐明。

第一例异常纤维蛋白原血症于 1965 年首次报道,截止目前共发现了约 200 个患有该疾病的家系。纤维蛋白原的功能异常涉及纤维蛋白形成和稳定的所有重要步骤。将纤维蛋白原转化为不可溶的纤维蛋白多肽首先需要凝血酶将纤维蛋白原裂解,释放出纤维蛋白多肽 A 和 B,产生纤维蛋白单体,纤维蛋白单体再进行多聚化。因子 XIIIa 可以稳定多聚化的纤维蛋白。异常纤维蛋白原血症是由于可溶性纤维蛋白原向不可溶的纤维蛋白转化的过程发生了障碍。最常见的缺陷是纤维蛋白多聚化缺陷。有些异常纤维蛋白原血症患者产生的纤维蛋白不能被纤溶过程所溶解,这部分患者表现为发生血栓性疾病的倾向。异常纤维蛋白原血症是常染色体显性遗传性疾病,具有很高的外显率,绝大多数为杂合子。约 40 %无症状,45 %～50 %的病例表现为出血性疾病,而其余患者表现为血栓性疾病,或同时表现为出血和血栓形成的倾向。另外还有自发性流产、伤口愈合不良等临床表现。

参 考 文 献

1 王振义,李家增,阮长耿,等. 血栓与止血基础理论与临床. 第 2 版. 上海:上海科学技术出版社,1995. 11.

2 Duga S, Asselta R, Santagostino E, et al. Missense mutations in the human beta fibrinogen gene cause congenital afibrinogenemia by impairing fibrinogen secretion. Blood, 2000, 95(4): 1336-13341.

3 Brummel KE, Butenas S, Mann KG. An integrated study of fibrinogen during blood coagulation. J Biol Chem, 1999, 274(32): 22862-22870.

4 Xu W, Chung DW, Davie EW. The assembly of human fibrinogen. The role of the amino-terminal and coiled-coil regions of the three chains in the formation of the alphagamma and betagamma heterodimers and alphabetagamma half-molecules. J Biol Chem, 1996, 271(44): 27948-27953.

5 Okumura N, Terasawa F, Tanaka H, et al. Analysis of fibrinogen gamma-chain truncations shows the C-terminus, particularly gammaIle387, is essential for assembly and secretion of this multichain protein. Blood, 2002, 99(10): 3654-3660.

6 Brummel KE, Butenas S, Mann KG. An integrated study of fibrinogen during blood coagulation. J Biol Chem, 1999, 274(32): 22862-22870.

7 Neerman-Arbez M, de-Moerloose P, Bridel C, et al. Mutations in the fibrinogen aalpha gene account for the majority of cases of congenital afibrinogenemia. Blood, 2000, 96(1): 149-152.

8 van 't-Hooft FM, von-Bahr SJ, Silveira A, et al. Two common, functional polymorphisms in the promoter region of the beta-fibrinogen gene contribute to regulation of plasma fibrinogen concentration. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999, 19(12): 3063-3070.

9 Renner W, Cichocki L, Forjanics A, et al. G-455A polymorphism of the fibrinogen beta gene and deep vein thrombosis. Eur J Clin Invest, 2002, 32(10): 755-758.

10 Brown ET, Fuller GM. Detection of a complex that associates with the Bbeta fibrinogen G-455-A polymorphism. Blood, 1998, 92(9): 3286-3293.

11 Iacoviello L, Vischetti M, Zito F, et al. Genes encoding fibrinogen and cardiovascular risk. Hypertension, 2001, 38(5): 1199-1203.

12 Vu D, Bolton-Maggs PH, Parr JR, et al. Congenital afibrinogenemia: identification and expression of a missense mutation in FGB impairing fibrinogen secretion. Blood, 2003, 102(13): 4413-4415.

(收稿日期:2004-03-03)
(本文编辑:杨庆华)

(上接第 502 页)

Neuron, 1997, 18(1): 29-42.

10 Zheng YL, Li BS, Amin ND, et al. A peptide derived from cyclin-dependent kinase activator (p35) specifically inhibits Cdk5 activity and phosphorylation of tau protein in transfected cells. Eur J Biochem, 2002, 269(18): 4427-4434.

11 Bibb JA, Chen J, Taylor JR, et al. Effects of chronic exposure to cocaine are regulated by the neuronal protein Cdk5. Nature, 2001, 410(6826): 376-380.

12 Lu L, Grimm JW, Shaham Y, et al. Molecular neuroadaptations in the accumbens and ventral tegmental area during the first 90 days of forced abstinence from cocaine self-administration in rats. J Neurochem, 2003, 85(6): 1604-1613.

13 Ferrer-Alcon M, La-Harpe R, Guimon J, et al. Downregulation of neuronal cdk5/p35 in opioid addicts and opiate-treated rats: relation to neurofilament phosphorylation. Neuropsychopharmacology, 2003, 28(5): 947-955.

14 Rajgopal Y, Vemuri MC. Ethanol induced changes in cyclin-dependent kinase-5 activity and its activators, P35, P67 (Munc-18) in rat brain. Neurosci Lett, 2001, 308(3): 173-176.

(收稿日期:2004-01-06)
(本文编辑:张卡琳)

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.