

综述与专论

钙/钙调蛋白依赖性丝氨酸蛋白激酶的结构和功能*

刘煜 赵晓航** 吴旻

(中国医学科学院 肿瘤研究所, 分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021)
(中国协和医科大学)

摘要 钙/钙调蛋白依赖性丝氨酸蛋白激酶 (calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase, CASK) 属于膜相关鸟苷酸激酶 (membrane associated guanylate kinase, MAGUK) 家族。CASK 具有多个不同蛋白质结合结构域, 在细胞膜的特定区域, 与其他蛋白质形成多种蛋白质复合体, 参与组成细胞骨架。它通过衔接细胞外信号蛋白和细胞内骨架蛋白, 协助功能蛋白质的转运和定位, 以及细胞内的信号传递。此外 CASK 还可以进入细胞核影响基因转录调控, 以及作用在神经突触膜上参与神经递质的释放。

关键词 CASK, 蛋白质-蛋白质相互作用, 蛋白质结合结构域, 蛋白质定位, 信号传递, 转录调控

学科分类号 Q51

钙/钙调蛋白依赖性丝氨酸蛋白激酶 (calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase, CASK) 是膜相关鸟苷酸激酶 (membrane associated guanylate kinase, MAGUK) 家族的一个重要成员。它首先在线虫中被克隆^[1], 随后在果蝇和哺乳类动物中都发现了其同源蛋白质^[2,3], 其分子在进化上比较保守。目前认为它的生物学主要功能是作为一个支架蛋白质 (scaffolding protein), 即利用其蛋白质分子中的不同结构域, 分别结合其他蛋白质, 形成蛋白质复合体, 参与细胞膜蛋白骨架的构建, 细胞连接的形成, 以及调节功能蛋白质的分布, 细胞的信号传导和基因调控等许多重要的细胞生理过程。

1 CASK 的理化性质和分布

CASK 属于 MAGUK 的第四个亚家族, 它具有 MAGUK 家族的共同结构和功能特征。MAGUK 是一个新近发现的支架蛋白质家族, 其成员大多定位于细胞连接处, 可以直接结合跨膜蛋白的胞浆侧终末端, 同时募集信号分子形成蛋白质复合体, 参与质膜上的多种信号传递途径, 提高信号传递的效率和特异性并参与维持质膜的特殊结构。该家族成员归为一类是因为它们都具有如下特征: 即 1~3 个 PDZ 结构域、1 个 SH₃ 结构域和 1 个 GUK 结构域。

PDZ 结构域是根据 3 个 MAGUK 蛋白而命名的, 它们分别是突触后致密蛋白-95 (postsynaptic

density-95, PSD-95), 盘巨大蛋白 (discs large protein, Dlg), 紧密连接蛋白-1 (zonula occludens-1, ZO-1)。该结构域不仅存在于 MAGUK 家族, 在许多非 MAGUK 蛋白家族中也存在, 目前已经发现了 50 余个蛋白质具有该结构域。PDZ 结构域大约包含 80~100 个氨基酸, 可以和许多蛋白质的 C 端相结合, 其识别序列通常仅为 3~5 个氨基酸^[4]。此外含有 PDZ 结构域的蛋白质之间也能通过该结构域相互结合。由于 PDZ 结构域广泛参与了许多蛋白质间的相互作用, 因此有人称之为分子粘胶。

SH₃ 结构域是一个 Src 蛋白 3 同源结构域, 广泛存在于参与信号传导的多种蛋白质以及细胞骨架蛋白中, 这些蛋白质可以直接参与蛋白质间的相互作用, 多蛋白质复合物的形成, 以及蛋白质的亚细胞定位等。

GUK 结构域与哺乳动物和酵母中的胞浆鸟苷酸激酶高度同源, 并因此而得名。该鸟苷酸激酶利用 ATP 提供磷酸基团能够催化 GMP 转变成 GDP, 其催化活性中心有 ATP 和 GMP 的结合位点。在 MAGUK 家族中 CASK 和 p55 亚家族的 GUK

* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (G19980512) 和国家自然科学基金重大项目 (39990570) 资助。

** 通讯联系人。

Tel: 010-67709015, E-mail: zhaoxh@pubem.cicams.ac.cn

收稿日期: 2001-04-06, 接受日期: 2001-05-24

结构域仍具有完整的 GMP 和 ATP 的结合位点, 其他家族成员在这两个位点处的氨基酸都存在一定的缺失, 但到目前为止, 仅从细菌重组的 p55 蛋白中发现了微弱的鸟苷酸激酶活性, 而在生理条件下的 p55 及其他的 MAGUK 成员都没有检测到鸟苷酸激酶的活性. 研究同时表明, MAGUK 蛋白中的 GUK 结构域也类似于 PDZ 和 SH₃ 结构域可以参与蛋白质间相互作用. 因而该类蛋白质尽管被命名为鸟苷酸激酶, 但其主要生物学功能的发挥可能并不依赖鸟苷酸激酶的酶活性存在.

CASK 除具有上述的 3 个特征性结构域外, 在其 N 端还拥有一个特殊的结构域, 该结构域与钙/钙调蛋白依赖性激酶高度同源, 因而被命名为 CAMK 结构域. 钙/钙调蛋白依赖性激酶在催化中心部位有一段自身的氨基酸序列, 可以阻止与底物的结合, 从而抑制酶的活性, 在生理条件下钙/钙调蛋白与该蛋白激酶结合后可以移开这段序列, 使一个保守的苏氨酸发生磷酸化, 最终酶得以活化. 在 CASK 的 CAMK 结构域中也存在一个保守的钙调蛋白结合区 (calmodulin-binding domain, CBD), 钙调蛋白可以与之结合, 这一结合作用也同样受到钙离子的调控, 但至今无论在重组的还是生理条件下的 CASK 中都没有检测到钙/钙调蛋白依赖性激酶的活性. 在对线虫中的研究结果表明, CASK 的同源蛋白 LIN-2, 虽然也缺乏钙/钙调蛋白依赖性激酶活性, 但并没有影响其生物学功能. 钙/钙调蛋白依赖性激酶通常可以形成二聚体, 并参与由电压门控通道和配体门控通道介导的信号传导途径, 尽管 CASK 事实上并没有钙/钙调蛋白依赖性激酶的活性, 但同样可以利用 CAMK 结构域, 募集相关的信号分子, 参与这些信号传导途径, 同时它也可以与其他的钙/钙调蛋白依赖性激酶形成异源二聚体. 因此目前认为 CASK 的 CAMK 结构域主要发挥蛋白质支架作用, 而这种作用并不依赖于其激酶的活性^[5].

此外, 在 GUK 和 SH₃ 结构域之间还包含一个富含赖氨酸的保守序列, 该序列也存在于其他 MAGUK 成员分子中, 可以和肌动蛋白结合蛋白 4.1 (actin-binding protein 4.1) 或其结构类似的蛋白如 ezrin, radixin, moesin, merlin 和 talin 等相结合, 所有这些蛋白质都能与肌动蛋白结合, 参与细胞骨架的形成 (图 1)^[6].

人的 CASK 于 1996 年被克隆, 其基因定位于 X 染色体短臂^[7]. 分子质量约为 112 ku, 其蛋白质

序列与大鼠和线虫的序列相比较, 同源性分别达到 99%、52%, 已经发现的人基因转录本有 3 个, 分别为 3.1 kb, 4.4 kb 和 8.5 kb. 其中 4.4 kb 转录本普遍存在于心、脑、肺、胎盘、肝、骨骼肌、肾和胰腺等多种成人组织中, 3.1 kb 主要存在于胎盘和肾脏, 8.5 kb 主要存在于心、脑、骨骼肌和胰腺等组织. 这 3 个转录本都具有完整的编码框. 在不同上皮细胞中 CASK 的定位有所不同. 通常位于邻接基底膜的细胞膜一侧或靠近基底部的细胞膜的侧面, 少量分布在细胞质中. 如在肝细胞, 脉络膜细胞中, CASK 主要定位在基底面, 小肠, 结肠上皮细胞定位于靠近基底部的细胞膜的侧面, 而在胰腺和肾的远曲小管上皮细胞中, 上述的两种定位方式都存在. 在脑中 CASK 主要定位于神经细胞的突触前膜上.

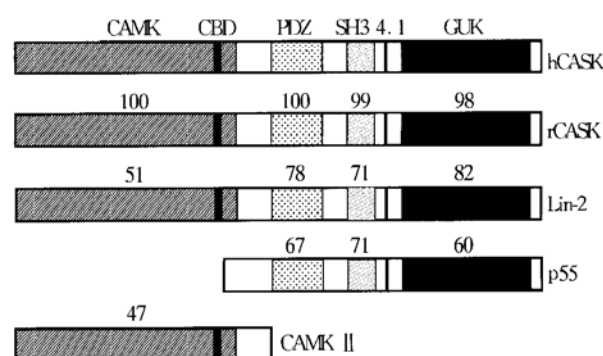


Fig. 1 Comparative domain organization and homogeneity of hCASK-related proteins

图 1 人 CASK 和相关蛋白质的结构域和同源性比较
人 CASK (hCASK) 的蛋白质序列与大鼠 CASK (rCASK), 线虫 LIN-2, 人红细胞 p55 蛋白及大鼠脑 CAMK II 的 α 亚基同源. 人 CASK 包含 CAMK II 的同源结构域 (CAMK), 保守的钙调蛋白结合区 (CBD), PDZ 结构域, SH₃ 结构域, 肌动蛋白结合蛋白 4.1 结合区 (4.1) 和鸟苷酸激酶同源的结构域 GUK. 图中的数字为氨基酸同源性的百分比值.

2 CASK 的生物学功能

2.1 参与细胞内外信号传递

Cohen 和 Hsueh 等研究显示在人上皮细胞膜和神经突触处, CASK 可以利用 PDZ 结构域与 Sydecarr-2 和 Sydecarr-3 结合, Sydecans 是一类重要的细胞外基质蛋白受体, 可以调节细胞的形态并参与细胞与细胞外基质的相互作用. 它可以结合层粘连蛋白, 纤连蛋白, 胶原蛋白等多种细胞外基质成分, 同时它还可以与具有酪氨酸蛋白激酶活性的受体形成低亲和性的复合受体, 如 Sydecarr-2 可以与

结合了 β FGF 的成纤维细胞生长因子受体形成复合物^[8]。尽管这种结合作用较弱,但它可以起到富集多肽因子并正确呈递给相应受体的作用。因而可以认为它是一类重要的信号传递蛋白。CASK 与 Sydecarr 2 蛋白相互作用,一方面可能有助于 Sydecans-2 定位于具有酪氨酸蛋白激酶活性的受体附近,另一方面也可能通过募集受体的下游分子,从而恰当地应答细胞外的信号。研究中还发现,在同一细胞中的同一部位, CASK 还可以结合肌动蛋白结合蛋白 4.1 (图 2), 并通过该蛋白与肌动蛋白等细胞骨架连接起来。这一结果提示, CASK 可能作为一个桥梁,将细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 及其受体 Sydecans 与细胞内骨架联系起来。这种相互作用模式在其他的 MAGUK 蛋白中也存在,例如 p55 一边可以连接膜蛋白 glycophorin C, 同时可以经肌动蛋白结合蛋白 4.1 连接 spectrin/actin 细胞骨架, h-Dlg 和肌动蛋白结合蛋白 4.1 蛋白间也存在类似的相互作用^[6,9]。

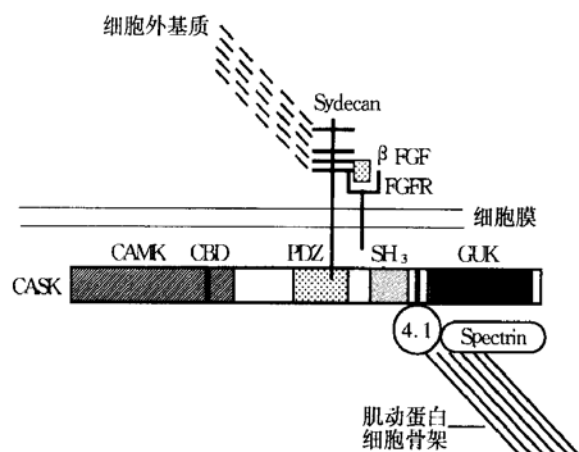


Fig. 2 A model of hCASK mediating a direct link between extracellular matrix and actin cytoskeleton by binding to syndecan and protein 4.1

图 2 CASK 介导细胞外基质和细胞骨架间联系的模式图

CASK 通过直接与细胞外基质蛋白的受体 Syndecan 和细胞内 actin/spectrin 结合蛋白 4.1 结合而把 ECM 与 actin 细胞骨架连接起来。hCASK 经 PDZ 结构域结合 Syndecan, 经 SH₃ 和 GUK 结构域之间的一段序列与 4.1 蛋白结合, Syndecans 可以结合多种 ECM 成分, 并与 β FGFR 等具有酪氨酸激酶活性的受体形成非共价结合的复合受体。CASK 有可能起到募集 β FGFR 的下游信号分子的作用, 或者直接作为受体的底物而发挥作用。

2.2 参与细胞核内基因转录调控

GUK 是 CASK 的另一个结构域, Hsueh 等^[10]通过对 CASK 中 GUK 结构域的研究, 发现了

CASK 的另一特殊作用。他们以 CASK 的 GUK 结构域作为“诱饵”, 通过酵母双杂交技术从鼠胎脑 cDNA 文库中, 找到了一个与之相互特异结合的蛋白质 T-brain 1 (Tbr-1)。该蛋白质属于 T 盒蛋白质家族, 作用部位在细胞核内, 是一个转录调节因子。CASK 与 Tbr-1 的相互作用经细胞内免疫共沉淀, 双标记抗体免疫定位等多方面实验得以验证。在对活细胞的观察发现, CASK 可以从细胞膜进入细胞核。而且, 当细胞膜上的 Sydecarr 3 过量表达时, 这一过程受到阻遏。该实验结果提示 Sydecarr-3 可能调节 CASK 在细胞核内外的分布。CASK 与 Tbr-1 结合, 可以协同调节 T 元件相关基因的表达, 例如 Reelin, 一个与脑皮质发育有关的重要的细胞外基质蛋白, 参与神经细胞的迁移和定位。Reelin 基因的 5' 上游调控区包含 T 元件的部分序列, Tbr-1 可以结合这一序列, 并上调 Reelin 的表达, 但这一调节作用较弱, 当 CASK 与 Tbr-1 协同作用时可大大增加 Reelin 基因的表达。这一结果丰富了对 CASK 功能的认识, 一个位于细胞连接处的膜骨架蛋白, 可以进入细胞核, 并调节基因的转录过程, 提示 CASK 有可能具有将细胞外信号直接传入细胞核内的功能。目前这一作用在其他 MAGUK 成员中尚未发现。

2.3 参与功能蛋白质的细胞内定位

CASK 除参与细胞连接、信号传导和基因调控外, 还能协同转运某些功能蛋白质, 使其最终定位于细胞的特定部位。在研究线虫发育的过程中, Simske 等发现 CASK 的同源蛋白质 LIN-2 可以影响 LET-23 在细胞膜上的分布。LET-23 是表皮生长因子受体的同源蛋白, 它对线虫生殖腔前体细胞的分化具有重要作用。当 LIN-2 发生突变后, 线虫的生殖腔前体细胞不能形成, 其发生机制并非 LET-23 的蛋白表达发生改变, 而是该蛋白质在膜上的定位出现异常, 它不再定位于细胞膜邻近基底膜的一侧, 而是在细胞膜上呈现弥散性的分布, 这样对于来自细胞膜基底侧的类似 EGF 等的分子信号, 不能恰当地应答, 进而造成了发育的异常。研究发现, 在这一过程中 LIN-2、LIN-7、LIN-10 三个分子可以形成一个蛋白质分子支架, 对 LET-23 的细胞膜正确定位和浓集起到重要作用, 其中任一分子因突变而丧失功能, 都会造成 LET-23 的定位异常, LIN-2 在这个支架复合物形成过程中至关重要, 它通过 LIN-7 结合结构域结合 LIN-7, 通过 CAMK 结构域结合 LIN-10。而 LET-23 的 C 端则

可以直接与 LIN-7 的 PDZ 结构域相结合^[11,12].

在哺乳动物细胞中,有关 CASK 参与蛋白质转运和定位的研究也有一些新的发现. Mitsutoshi 等在研究大鼠脑细胞中的 N-甲基-D 天冬氨酸受体 (N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR) 的装配和运输时发现 CASK 与该过程有关. NMDA 受体是一个与神经冲动传导有关的突触前膜受体,它包括 NR1 和 NR2B 两个亚基,其中 NR2B 从细胞质运送到突触前膜,需要一个分子马达 KIF-17. KIF-17 可以沿着细胞内的微管滑动,将 NR2B 运到膜上,但 KIF-17 并不能与 NR2B 直接相互作用,而是需要一些中间蛋白质作为衔接物,经研究发现脊椎动物中 LIN-7 的同源蛋白 Veli/LIN-7 (vertebrate homolog of LIN-7), LIN-10 同源蛋白 Mint1/LIN-10 以及 CASK/LIN-2 三者间形成的复合物,在这一过程发挥着重要的连接作用.

2.4 参与神经递质的释放

SH₃ 结构域在许多蛋白质中都存在,它可以选

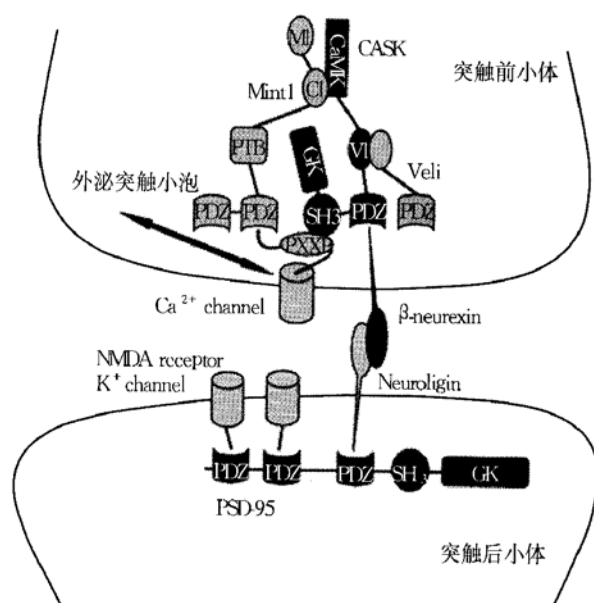


Fig 3 Proposed macromolecular signaling complex in the synapse

图3 位于神经突触部位的信号分子复合物的假定模型
PSD-95 中的 3 个 PDZ 结构域分别与 K⁺ 离子通道, NMDA 受体及 Neuroligins 相结合, Neuroligins 与 β -neurexin 相互作用介导突触前后细胞形成非对称连接, CASK 利用 PDZ 结构域与 β -Neurexins 蛋白的细胞内尾部结合,从而将 CASK, Mint1, Veli 三个具有接头作用的蛋白质定位在突触的轴心上. Ca²⁺ 离子通道通过与 CASK 的 SH₃ 及 Mint1-1 的 PDZ 结构域结合而和这一巨大的分子复合体联结起来. 这个分子复合体使得突触前膜的 Ca²⁺ 离子通道, 与 Ca²⁺ 离子通道相连接的突触小泡, 以及突触后膜上的受体规律地排列, 并最终通过 Neuroligins 与 neurexin 的相互作用而定位在突触的轴心部位

择性地结合 Pro-X-X-Pro 序列. Maximov 等^[13] 发现 CASK 可以通过其 SH₃ 结构域, 结合 N 型 Ca²⁺ 离子通道的 α_{1B} 亚基的 C 端富含脯氨酸的区域. 该通道位于突触前膜, 调控 Ca²⁺ 离子的内流和突触小泡中神经递质的释放. 同时, 研究中还发现该离子通道的 C 端还可以结合 Mint1/LIN10 的 PDZ 结构域, 而 CASK 与 Mint1/LIN10、Veli/LIN-7 在突触前细胞内又可以形成三元复合物, 因而这一复合体可能对 Ca²⁺ 离子通道的确切定位起到关键的作用, 在已有研究资料的基础上, Maximov 等提出了一个神经突触部位的 CASK 与其他分子间相互作用的假定模式 (图 3).

此外 CASK 的 PDZ 结构域还能够结合 neurexins, 该类蛋白质定位于神经突触, 与神经递质的释放方向和轴突的粘附有关^[14].

3 展 望

综上所述 CASK 不仅具有多个结构域, 而且每个结构域都可以和不同的蛋白质结合, 因此 CASK 在不同的细胞中可能扮演不同的角色, 参与不同的生化过程. 目前有关 CASK 的研究, 主要集中在脑神经系统和胚胎发育方面. 而且, 有确凿的实验证明当 CASK 发生突变时会干扰发育过程的信号传导, 和/或影响神经系统的功能. 但有关 CASK 在生物整体发育以及相关疾病, 如肿瘤中的作用, 研究尚少. 如前所述, CASK 主要定位于细胞连接处, 并参与细胞连接的构建, 而细胞连接在调节细胞间的相互作用、细胞增殖乃至细胞癌变等过程中都发挥重要的作用. 有些研究发现 MAGUK 家族的其他成员参与肿瘤形成和发展过程, 例如, ZO-1 基因在乳腺癌的患者中存在杂合性丢失的现象; hDlg 可以与抑癌蛋白 APC 间形成复合物, 而影响 APC 的抑癌作用. 我们实验室近期也发现, CASK 在食管癌中的表达和在细胞膜上的分布显著异常, 但这些现象与癌变的关系还有待于深入研究. 随着研究资料的积累和蛋白质组学技术的进步, 使得了解 CASK 在不同细胞中与之相互作用的各种蛋白质的分子网络及其相关功能成为可能. 同时, 建立哺乳动物中该蛋白质的基因敲除模型, 将有助于认识 CASK 在生物整体发育以及相关疾病中的作用.

参 考 文 献

- 1 Hoskins R, Alex F H, Stacey A, et al. The *C. elegans* vulval

- induction gene *lir2* encodes a member of the MAGUK family of cell junction proteins. *Development*, 1996, **122** (1): 99~ 117
- 2 Hata Y, Butz S, Sudhof T C. CASK: a novel dlg/PSD95 homolog with an N-terminal calmodulin-dependent protein kinase domain identified by interaction with neuexins. *J Neurosci*, 1996, **16** (8): 2488~ 2494
 - 3 Dimitratos S D, Woods D F, Bryant P J. Camguk, Lir-2, and CASK: novel membrane-associated guanylate kinase homologs that also contain CaM kinase domains. *Mech Dev*, 1997, **63** (1): 127 ~ 130
 - 4 Songyang Z, Fanning A S, Fu C, *et al.* Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science*, 1997, **275** (5296): 73~ 77
 - 5 Dimitratos S D, Woods D F, Stathakis D G, *et al.* Signaling pathway are focused at specialized regions of the plasma membrane by scaffolding proteins of the MAGUK family. *BioEssays*, 1999, **21** (11): 912~ 921
 - 6 Cohen A R, Woods D F, Marfatia S M, *et al.* Human CASK/LIN-2 binds syndecan-2 and protein 4.1 and localizes to the basolateral membrane of epithelial cells. *J Cell Biol*, 1998, **142** (1): 129~ 138
 - 7 Blair H J, Reed V, Gormally E, *et al.* Positioning of five genes (CASK, ARX, SAT, IMAGE cDNAs 248928 and 253949) from the human X chromosome short arm with respect to evolutionary breakpoints on the mouse X chromosome. *Mamm Genome*, 2000, **11** (8): 710~ 712
 - 8 Carey D J. Syndecans: multifunctional cell surface co-receptors. *Biochem J*, 1997, **327** (Pt 1): 1~ 16
 - 9 Hsueh Y P, Yang F C, Kharazia V, *et al.* Direct interaction of CASK/LIN-2 and syndecan heparan sulfate proteoglycan and their overlapping distribution in neuronal synapses. *J Cell Biol*, 1998, **142** (1): 139~ 151
 - 10 Hsueh Y P, Wang T F, Yang F C, *et al.* Nuclear translocation and transcription regulation by the membrane-associated guanylate kinase CASK/LIN-2. *Nature*, 2000, **404** (6775): 298~ 302
 - 11 Kaech S M, Whitfield C W, Kim S K. The LIN-2/LIN-7/LIN-10 complex mediates basolateral membrane localization of the *C. elegans* EGF receptor LET-23 in vulval epithelial cells. *Cell*, 1998, **94** (6): 761~ 771
 - 12 Simske J S, Kaech S M, Harp S A, *et al.* LET-23 receptor localization by the cell junction protein LIN-7 during *C. elegans* vulval induction. *Cell*, 1996, **85** (2): 195~ 204
 - 13 Maximov A, Sudhof T C, Bezprozvanny I. Association of neuronal calcium channels with modular adapter proteins. *J Biol Chem*, 1999, **274** (35): 24453~ 24456
 - 14 Puschel A W, Betz H. Neuexins are differentially expressed in the embryonic nervous system of mice. *J Neurosci*, 1995, **15** (4): 2849~ 2856

Structure and Function of Calcium/ Calmodulin-dependent Serine Protein Kinase^{*}

LIU Yu, ZHAO Xiao-Hang^{**}, WU Min

(National Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute,

Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

Abstract Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (CASK) is a member of membrane associated guanylate kinase (MAGUK) family. CASK has multiple protein-binding domains which can interact with other kinds of proteins. CASK acts as a molecular scaffold organizing multiprotein complexes at special areas of the plasma membrane. Mediating a direct link between extracellular matrix and actin cytoskeleton of plasma, CASK might help some proteins to localize to the functional places and be involved in multiple functions of signal transduction, neurotransmitter release in the synapses, nuclear translocation, and transcriptional control.

Key words CASK, protein-protein interaction, protein-binding domains, proteins localization, signal transduction, transcriptional control

^{*} This work was supported by grants from National Natural Sciences Foundation of China (39990570).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-10-67709015, E-mail: zhaoxh@pubem.cicams.ac.cn

Received: April 6, 2001 Accepted: May 24, 2001