

爪蟾 p21 活化激酶 2 参与卵母细胞胞质分裂过程不依赖于 Cdc42*

程大也^{1,2)**} 梁彬^{1,3)**} 李丰^{1)***}

¹⁾中国医科大学, 细胞生物学卫生部重点实验室, 沈阳 110001; ²⁾中国医科大学附属第一医院输血科, 沈阳 110001;

³⁾中国医科大学高等职业技术学院, 沈阳 110001)

摘要 研究 p21 活化激酶 2 (p21-activated kinase 2, PAK2) 在卵母细胞成熟过程中的作用. 以爪蟾卵母细胞为模型, 分别向爪蟾卵母细胞显微注射 PAK2-N 端 (PAK2-N-terminal, PAK2-NT) 和 PAK2-N 端突变体 (PAK2-N-terminal mutation, PAK2-NTm) mRNA, 荧光显微镜下观察胚泡破裂发生. 采用共聚焦显微镜, 时间延迟摄影法观察正常卵母细胞、PAK2-NT mRNA 注射组和 PAK2-NTm mRNA 注射组卵母细胞胞质分裂、极体形成及与 Cdc42 活性的关系. 结果表明, PAK2-NT mRNA 和 PAK2-NTm mRNA 注射组的卵母细胞与正常卵母细胞胚泡破裂发生相似, 但 PAK2-NT mRNA 和 PAK2-NTm mRNA 注射组未见胞质分裂和极体形成. 结果提示, PAK2 参与卵母细胞胞质分裂和极体形成可能不依赖于 Cdc42 的调节过程.

关键词 p21 活化激酶, 爪蟾, 卵母细胞, 胞质分裂, 极体, Cdc42

学科分类号 R329.2+8

爪蟾卵母细胞释放极体是一种不对称的细胞分裂, 其中微管束和细胞核向动物极方向移动, 中期 I 纺锤体的一端与卵母细胞皮质层接触, 启动后期 I (anaphase I) 和极体的形成^[1]. Ma 等^[2]的研究证明, 在爪蟾卵母细胞中, 一种小 GTP 酶 Cdc42 调控肌动蛋白极化和不对称细胞分裂. 抑制 Cdc42 能够完全阻断极体的形成. 在酵母的研究中发现, P21 活化激酶 (p21-activated kinase, PAK) 协同 Cdc42 共同完成了肌动蛋白的极化、出芽和胞质分裂过程. 酵母的出芽过程类似不对称的细胞分裂过程, 同样需要纺锤体的一端与出芽的皮质层接触从而启动胞质分裂. PAK 功能的抑制使酵母极化功能缺失, 抑制出芽过程^[3]. 但 PAK 是否参与卵母细胞胞质分裂过程目前尚无文献报道.

PAKs 是结构上高度保守的丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶, 它们通过作用于肌动蛋白和微管的细胞骨架来调控细胞极化和细胞分裂. PAK 具有一个 p21 结合区域 (p21-binding domain, PBD), 能够与小 GTP 酶 Cdc42 结合, 使 PAK 活化从而发挥生物学功能^[4]. 目前在爪蟾中发现 4 种 PAK 类型: PAK1、PAK2、PAK3 和 PAK5. 研究表明, PAK1 在整个

卵母细胞成熟过程中保持无活性状态, 对 Cdc42 信号无应答^[5]. 在卵母细胞和成熟的卵细胞中未检测到 PAK3^[6], PAK5 只出现在胚胎中^[7]. Cau 等^[8]研究证明, 在爪蟾卵母细胞成熟过程中显微注射 Cdc42V12 (constitutively active Cdc42, 活化型 Cdc42) 后, PAK2 的活性增高约 50 倍, 提示 PAK2 可能是 Cdc42 优先选择的效应器, 参与卵母细胞成熟过程. 本研究采用 2 种特性质粒, PAK2 N 端 (PAK2-N-terminal, PAK2-NT) 和 PAK2 N 端突变体 (PAK2-N-terminal mutation, PAK2-NTm), 利用两者均能够结合 PAK2 C 端激酶活性区域进而抑制激酶活性的特点^[9], 着重探讨在爪蟾卵母细胞分裂过程中 PAK2 是否参与爪蟾卵母细胞胞质分裂和极体形成.

*国家自然科学基金(30370736, 30570966)、教育部博士点基金(20050159023)和教育部回国人员科研启动基金资助项目.

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人. Tel: 024-23261056, E-mail: fli@mail.cmu.edu.cn

收稿日期: 2007-01-18, 接受日期: 2007-05-21

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、动物. PCS2-HA-PAK2-NT 质粒 (PCS2-HA-PAK2-NT 是含有 PAK2-NT 片段的质粒, 编码 PAK2 1~217 位氨基酸) 和 PCS2-HA-PAK2-NTm 质粒 (PAK2-NT 的突变体, PAK2-NT 74 和 77 位的组氨酸突变为亮氨酸) 由加拿大渥太华大学 CIVIC 医院惠赠. GFP-wGBD 质粒 (含有 WASP 片段的质粒, 其表达蛋白能结合活性 Cdc42, 并与 Cdc42 结合 PAK2 的位点相互重叠). 爪蟾由中国医科大学动物中心提供.

1.1.2 主要试剂. 罗丹明 - 微管蛋白 (Rhodamine-tubulin, Molecular probes 公司); 体外合成 mRNA 试剂盒 (Ambion 公司); HA-tag 单克隆抗体 (Santa Cruz 公司); 限制性内切酶 *Bam*H I (Promega 公司); Qia Midiprep Kit (QIAGEN 公司); 胶原酶 (Sigma 公司); ECL 发光试剂盒 (Pierce 公司).

1.2 方法

1.2.1 体外合成 PAK2-NT 和 PAK2-NTm mRNA. 将 PCS2-HA-PAK2-NT 和 PCS2+HA-PAK2-NTm 质粒用 *Bam*H I 进行酶切线性化, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定. 以线性化的质粒 DNA 为模板, 体外合成 PAK2-NT 和 PAK2-NTm 的 mRNA, -70°C 保存备用.

1.2.2 爪蟾卵母细胞的准备. 实验前 3 日将爪蟾皮下注射孕马血清促性腺激素 (serum gonadotrophin, PMSG), 实验当日断头处死爪蟾, 取腹腔两侧卵巢组织并在显微镜下将其撕裂成 10~15 个卵左右的碎片, 以胶原酶 (1 g/L) 消化 3 h, 显微镜下观察卵细胞状态并取大小相似、发育成熟的 VI 期卵母细胞, 置于无 Ca^{2+} 1×OR2 培养液中, 室温震荡培养 4 h.

1.2.3 爪蟾卵母细胞显微注射. 在无 Ca^{2+} 1×OR2 培养液中, 将卵母细胞分成 3 组: 对照组为正常卵母细胞, 只注射 GFP-wGBD 质粒. PAK2-NT 注射组和 PAK2-NTm 注射组是除了注射 GFP-wGBD 质粒外, 分别在每个卵母细胞中显微注射 20 nl PAK2-NT mRNA 和 PAK2-NTm mRNA, 孵育 12~16 h 后, 用 1 $\mu\text{mol/L}$ 孕酮刺激, 以动物极出现白点来判断卵母细胞是否发生胚泡破裂 (germinal vesicle breakdown, GVBD).

1.2.4 爪蟾卵母细胞裂解液的准备. 冷裂解缓冲液

(EB 缓冲液: 20 mmol/L pH 7.3 HEPES, 80 mmol/L 磷酸甘油, 20 mmol/L EGTA, 15 mmol/L MgCl_2 , 1 mmol/L 二硫苏糖醇, 10 $\mu\text{mol/L}$ ATP, 150 mmol/L NaF, 10 mg/L 抑 (蛋白) 酶醛肽, 200 $\mu\text{mol/L}$ 苯甲磺酰氟, 25 mg/L 苯甲脒) 10 μl 裂解对照组、PAK2-NT 和 PAK2-NTm 注射组的卵母细胞, 4°C 条件下, 13 000 g 离心 5 min, 留取上清液, 与 2×SDS 样品缓冲液和 β - 巯基乙醇混合, -20°C 贮存.

1.2.5 蛋白质印迹检测. 分别取 3 组卵母细胞胚泡期 (germinal vesicle, GV) 和 GVBD 发生后的卵母细胞裂解液, 15% SDS-PAGE 分离, 电转移至硝酸纤维素膜, 以 10% BSA 封闭 1 h, 与抗 HA 抗体孵育 2 h, 相应的二抗孵育 1 h, ECL 发光法检测.

1.2.6 荧光显微镜观察 DNA 染色. 观察对照组、PAK2-NT 注射组和 PAK2-NTm 注射组爪蟾卵母细胞 GVBD 发生情况, 按 GVBD 发生时间, 收集单个卵母细胞, 转移到新鲜配置的 1 × OR2 培养液中. GVBD 发生后 80 min, 将卵母细胞放置在含有 Hoechst 染料 (1 : 5 000) 的溶液中, 染色 10 min 后, 荧光显微镜延迟摄影法 (time-lapse) 观察 3 组卵母细胞染色体的变化.

1.2.7 共聚焦显微镜观察爪蟾卵母细胞胞质分裂过程. 用 50 nl 0.25 g/L GFP-wGBD mRNA 和 50 nl Rhodamine-tubulin (3 g/L) 共同注射入对照组、PAK2-NT mRNA 和 PAK2-NTm mRNA 注射组的爪蟾卵母细胞, 室温孵育过夜. 翌日用 1 $\mu\text{mol/L}$ 孕酮刺激, 在此条件下, 绝大部分卵母细胞经历 GVBD, 但未装配形成 MI 纺锤体. 利用共聚焦显微镜观察 3 组卵母细胞的形态变化, 扫描间隔 2 μm , 延迟摄影方法观察.

2 结 果

2.1 荧光显微镜下 GVBD 的结果分析

与对照组相比, 注射了 PAK2-NT mRNA 和 PAK2-NTm mRNA 的爪蟾卵母细胞 GV 和 GVBD 未见明显形态学变化, 孕酮诱导的 GVBD 也未见明显异常 (图 1).

2.2 蛋白质印迹检测结果

PAK2-NT mRNA 和 PAK2-NTm mRNA 注射组和对照组 GV 期和 GVBD 发生后卵母细胞裂解液的蛋白质印迹结果 (图 2).

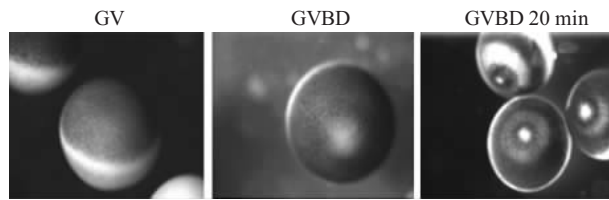


Fig. 1 Oocyte morphological changes during GV and GVBD

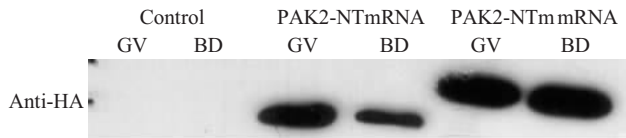


Fig. 2 Anti-HA Western-blot of oocyte lysis at GV and BD

2.3 荧光显微镜观察 DNA 染色结果

卵母细胞 GVBD 90 min 后 Hoechst DNA 染色结果: 对照组卵母细胞, 正常的胞质分裂并且形成极体; PAK2-NT mRNA 和 PAK2-NTm mRNA 注射组染色体完成复制, 未见极体形成 (图 3)。

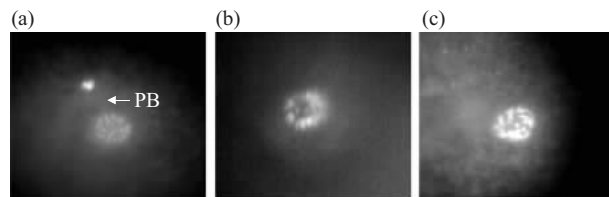


Fig. 3 Hoechst DNA staining after oocyte GVBD

(a) En face figures showing polar body formation in control oocyte. (b) No polar body formation in oocyte injected with PAK2-NT mRNA. (c) No polar body formation in oocyte injected with PAK2-NTm mRNA. PB: First polar body.

2.4 共聚焦显微镜观察爪蟾卵母细胞胞质分裂过程

GFP-wGBD 探针 (绿色) 可观察卵母细胞内 Cdc42 活性变化. 对照组的卵母细胞, GV 和 GVBD 期, 未观察到 Cdc42 活性的变化. 在极体释放的数分钟前, 纺锤体 (红色) 的微管上方可见微弱的 Cdc42 活性, 2~4 min 内, 活性逐渐增强, 随后细胞分裂收缩环形成, 胞质分裂发生, 活性的 Cdc42 向下扩展, 包绕整个极体 (图 4a). PAK2-NT 注射组未见明显的 Cdc42 活性变化, 但可见纺锤体的形态发生与对照组相似的变化, 最终未形成极体 (图 4b). PAK2-NTm 注射组可见 Cdc42 的活性出现在纺锤体的上方, 持续数分钟, 但是没有形成收缩环, 未见极体形成 (图 4c). 与对照组相比, PAK2-NT mRNA 和 PAK2-NTm mRNA 注射组极体

发生率明显下降, 3 组极体发生率出现明显差异 ($P < 0.01$) (图 4d).

3 讨 论

PAK2 为丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶, 是 Rho 家族中 GTP 酶的重要效应物. PAK2 通过对肌动蛋白细胞骨架的调节, 在细胞形态学和动力学的调控上起重要的作用. PAK2 具有高度保守的 C 端激酶域和 N 端 Cdc42/Rac 相互作用域 (Cdc42/Rac interactive binding domain, CRIB), 又名 GTP 酶结合域. 该区域与 PAK2 N 端的自身抑制域 (auto-inhibitory domain, AID) 部分重叠, 调节 PAK2 的激酶活性. 非活性 PAK2 自身折叠使自身抑制域与 C 端激酶域结合, 活化环无法暴露, 抑制其激酶活性. 当 Cdc42 与 PAK2 结合时, 导致 PAK2 构象改变, 这个过程会缓解 PAK2 自身抑制并且激活 PAK2 的活性^[9]. 目前文献报道, 在出芽酵母中, Cla4 (酵母中的 PAK) 调节酵母出芽和形态学, Cla4 激酶活性受 Cdc42 的调节, Cla4 和 Cdc42 共同调节酵母的极化和出芽过程^[10].

动物细胞的胞质分裂是以形成收缩环的方式完成的, 收缩环在细胞分裂的后期形成, 由大量平行排列的肌动蛋白和结合在上面的肌球蛋白等成分组成. 胞质分裂整个过程可以简单地归纳为 4 个步骤, 即分裂沟位置的确立、肌动蛋白聚集和收缩环形成、收缩环收缩、收缩环处细胞膜融合并形成 2 个子细胞^[11]. 在卵母细胞成熟过程中, 中期 I 纺锤体的一端与卵母细胞皮质层接触而诱发胞质分裂, 形成极体和成熟卵细胞. 小 GTP 酶 Cdc42 在纺锤体迁移、胞质分裂和极体形成过程中, 定位纺锤体、聚集肌动蛋白, 并且触发胞质分裂^[2]. 作为 PAK2 的上游调节子, Cdc42 是通过 Cdc42/PAK2 途径调节胞质分裂过程, 还是独立于 PAK2 的途径, 抑或是 PAK2 独立作用于胞质分裂过程, 尚不清楚.

我们利用 2 种特异性质粒——PAK2-NT 和 PAK2-NTm, PAK2-NT 是把 N 端的 AID 构建成为质粒, PAK2 N 端能够结合 PAK2 C 端的激酶活性区域和 Cdc42, 且其结合 Cdc42 的位点与 wGBD 与 Cdc42 结合的位点有所重叠^[2]. PAK2-NT 可能通过上述作用抑制自身磷酸化, 进而抑制了激酶活性^[9]. PAK2-NTm 是 N 端自身抑制区域的 2 个位点 (74 和 77 位组氨酸 → 亮氨酸) 发生突变, 突变后的 PAK2-NTm 不能结合 Cdc42, 但是不影响与 PAK2 C 端激酶活性区域的结合, PAK2 活性仍受到抑制.

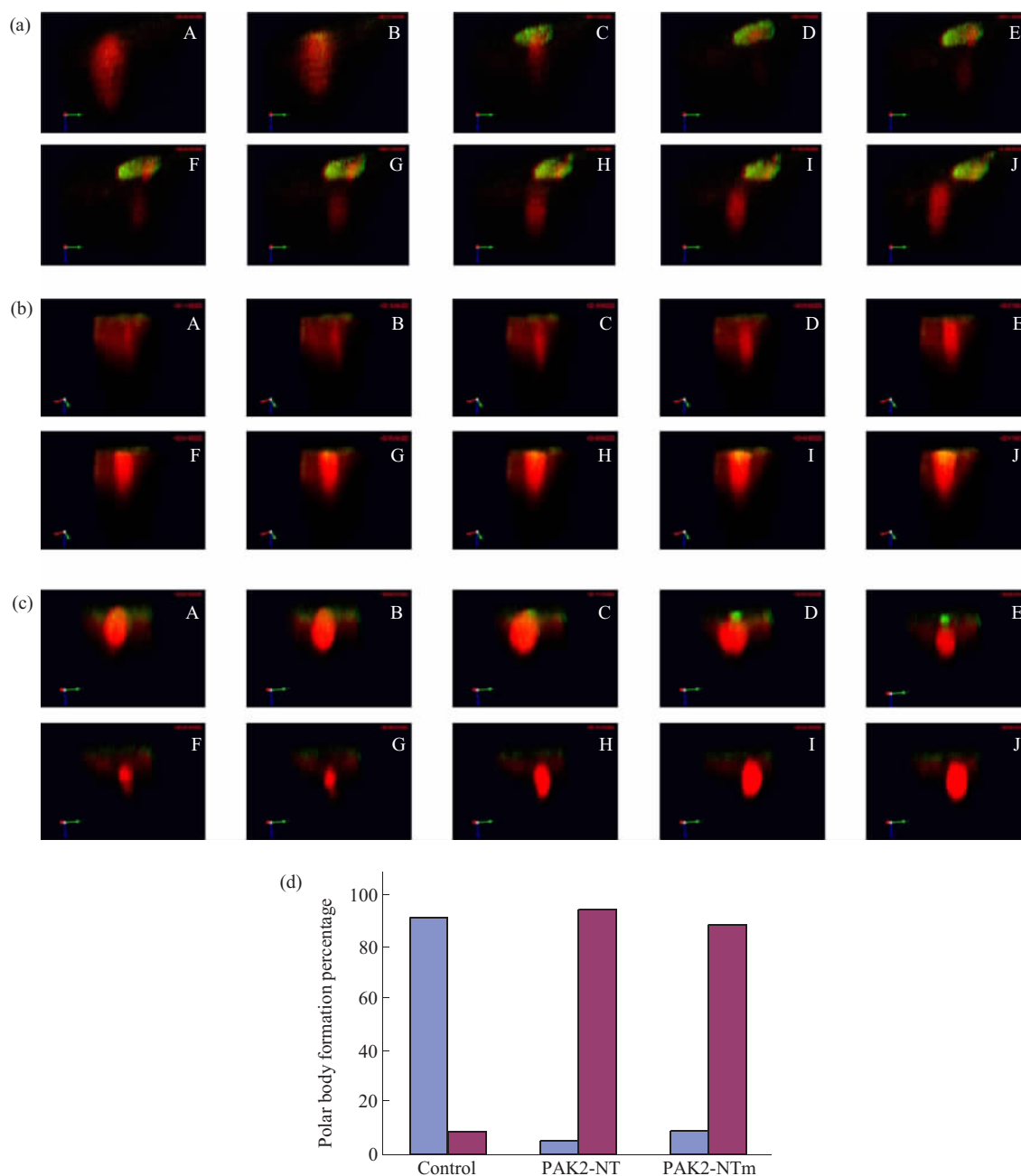


Fig. 4 PAK2-NT and PAK2-NTm inhibit cytokinesis and polar body formation

(a) Control oocyte. (b) Oocyte injected with PAK2-NT mRNA. (c) Oocyte injected with PAK2-NTm mRNA. (d) Polar body formation percentage among controls, oocytes injected with PAK2-NT mRNA and oocytes injected with PAK2-NTm mRNA. ■: Polar body formation; ■: Others.

实验结果表明, 无论是 PAK2-NT 还是 PAK2-NTm 注射组均抑制了极体形成. 在某种意义上来说, 这种抑制是特异的, 因为在卵母细胞成熟过程中, 注射 PAK2-NT 和 PAK-NTm 的卵母细胞无论是 GVBD, 还是中期 I 纺锤体的形成、迁移、定位在皮质层都没有受到影响. PAK2-NTm 注射组的实验现象表明, PAK2-NTm 抑制极体的形成是不依赖

于 Cdc42 的, 因为 PAK2-NTm 不能结合 Cdc42, Cdc42 活性未受到抑制, 这样排除了 Cdc42 对胞质分裂及极体形成的影响. 对比 3 组共聚焦显微镜的 time-lapse 实验结果, 对照组的卵母细胞: 在极体释放数分钟前, Cdc42 活性逐渐增强, 随后细胞分裂收缩环形成, 胞质分裂发生. 活性的 Cdc42 向下扩展, 包绕整个极体. PAK2-NT 注射组与

PAK2-NTm注射组虽然均没有形成极体,但是2组的形态学存在差异.PAK2-NT注射组未见Cdc42的活性,是否由于PAK2-NT抑制了PAK2活性,同时伴有PAK2-NT竞争GFP-wGBD对Cdc42的结合而导致?PAK2-NTm注射组可见Cdc42活性出现并增强,但是最终没有发生胞质分裂.由此我们推断,在爪蟾卵母细胞PAK2参与胞质分裂和极体形成可能是不依赖于Cdc42活性.

既然PAK2可能参与卵母细胞胞质分裂和极体释放过程,那么PAK2通过调控哪些重要因子参与此过程呢?有文献表明,在哺乳动物中Cdc42通过调节Borg3,而后者作用于septin来影响细胞分裂^[13],并且PAK(Cla4)在酵母出芽过程中通过调节septin而形成了支架蛋白复合物,该复合物在出芽分裂过程中发挥了壁垒的作用,从而抑制出芽颈部的物质不外流,最终完成出芽的过程^[14].因此我们推测, a. PAK2-NT是否抑制PAK2活性的同时,也抑制了septin环的形成,使分裂沟部位缺少了抑制物质外流的屏障,导致Cdc42活性弥散和肌动蛋白不能聚集于固定的区域,因此胞质分裂失败. b. 目前的实验证明,无论是Cdc42还是PAK均参与调节septin环,并且调节胞质分裂和极体形成,因此细胞分裂可能并不是受单一信号通路进行调节.Cdc42下游效应器具有复杂性,也许PAK2只是信号通路中的一个重要枢纽. c. Zhao等^[15]研究表明,哺乳动物细胞中的PAKs的定位并不依赖于Cdc42结合.至于PAK2对卵母细胞分裂作用受哪一种机制调节还有待进一步探讨.

参 考 文 献

- 1 Na J, Zernicka-Goetz M. Asymmetric positioning and organization of the meiotic spindle of mouse oocytes requires Cdc42 function. *Curr Biol*, 2006, **16** (12): 1249~1254
- 2 Ma C, Ha Benink, Cheng D Y, *et al.* Cdc42 activation couples spindle positioning to first polar body formation in oocyte maturation. *Curr Biol*, 2006, **16** (2): 214~220
- 3 Cvrckova F, de Virgilio C, Manser E, *et al.* Ste20-like protein kinases are required for normal localization of cell growth and for cytokinesis in budding yeast. *Genes Dev*, 1995, **9** (15): 1817~1830
- 4 Bokoch G M. Biology of the p21-activated kinases. *Annu Rev Biochem*, 2003, **72**: 743~781
- 5 Cau J, Faure S, Vigneron S, *et al.* Regulation of *Xenopus* p21-activated kinase (X-PAK2) by Cdc42 and maturation-promoting factor controls *Xenopus* oocyte maturation. *J Biol Chem*, 2000, **275** (4): 2367~2375
- 6 Souopgui J, Solter M, Pieler T. XPak3 promotes cell cycle withdrawal during primary neurogenesis in *Xenopus laevis*. *Embo J*, 2002, **21** (23): 6429~6439
- 7 Faure S, Cau J, de Santa Barbara P. *Xenopus* p21-activated kinase 5 regulates blastomeres adhesive properties during convergent extension movements. *Dev Biol*, 2005, **277** (2): 472~492
- 8 Chu P C, Wu J, Liao X C, *et al.* A novel role for p21-activated protein kinase 2 in T cell activation. *J Immunol*, 2004, **172** (12): 7324~7334
- 9 李晓东, 李彦妹, 李丰, 等. p21 活化激酶的生物活性及其与肿瘤的关系. *细胞生物学杂志*, 2006, **28** (3): 399~404
Li X D, Li Y S, Li F, *et al.* *Chinese Journal of Cell Biology*, 2006, **28** (3): 399~404
- 10 Leveleki L, Mahlert M, Sandrock B, *et al.* The PAK family kinase Cla4 is required for budding and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, 2004, **54** (2): 396~406
- 11 Bluemink J G, Delaat S W. New membrane formation during cytokinesis in normal and cytochalasin B-treated eggs of *Xenopus laevis*. Electron microscope observation. *J Cell Biol*, 1973, **59** (1): 89~108
- 12 Li Z, Aizenman C D, Cline H. Regulation of rho GTPases by crosstalk and neuronal activity *in vivo*. *Neuron*, 2002, **33** (5): 741~750
- 13 Joberty G, Perlungher R R, Sheffield P J, *et al.* Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42. *Nat Cell Biol*, 2001, **3** (10): 861~866
- 14 Versele M, Thorner J. Septin collar formation in budding yeast requires GTP binding and direct phosphorylation by the PAK, Cla4. *J Cell Biol*, 2004, **164** (5): 701~715
- 15 Zhao Z S, Manser E, Chen X Q, *et al.* A conserved negative regulating region in alphaPAK: inhibition of PAK kinases reveals their morphological roles downstream of Cdc42 and Rac1. *Mol Cell Biol*, 1998, **18** (4): 2153~2163

p21-Activated Kinase 2 Involved in Cytokinesis Independent of Cdc42 During *Xenopus* Oocyte Maturation*

CHENG Da-Ye^{1,2)}**, LIANG Bin^{1,3)}**, LI Feng¹⁾***

¹⁾Key Laboratory of Cell Biology of Ministry of Health of China, China Medical University, Shenyang 110001, China;

²⁾Transfusion Department, China Medical University, Shenyang 110001, China;

³⁾Advanced Technical College, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract p21-Activated kinases including p21-activated kinase 2 contributed to the regulation of actin cytoskeleton and cell dynamics. In order to investigate the function of PAK2 on the maturation of *Xenopus* oocyte, PAK2-NT (PAK2-N-terminal, PAK2-NT) and PAK2-NTm (PAK2-N-terminal mutation) mRNA were microinjected into *Xenopus* oocyte respectively. Under fluorescent microscopy germinal vesicle breakdown was observed during cytokinesis. To further observe the relationship of oocyte cytokinesis, polar body formation and Cdc42 activity, confocal microscopy with time-lapse was employed. As a result, occurrences of germinal vesicle breakdown in oocytes were similar to those oocytes injected with PAK2-NT mRNA or injected with PAK2-NTm mRNA, but no cytokinesis and polar body formation were observed in oocytes injected with PAK2-NT mRNA or PAK2-NTm mRNA. These results indicated that PAK2 involved in *Xenopus* oocytes cytokinesis and polar body formation independent of Cdc42 activity.

Key words p21-activated kinase, *Xenopus*, oocyte, cytokinesis, polar body, Cdc42

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30370736, 30570966), Doctoral Fund of Ministry of Education of China (20050159023) and Scientific Research Foundation for Returned Scholars, Ministry of Education of China.

**CHENG Da-Ye and LIANG Bin contributed equally to this work.

***Corresponding author. Tel: 86-24-23261056, E-mail: fli@mail.cmu.edu.cn

Received: January 18, 2007 Accepted: May 21, 2007