

学校编码: 10384

分类号_密级

学 号: 32320111153299

UDC

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**CEND1 在阿尔茨海默病致病过程中的作用
与机制研究**

**The effect of CEND1 and its underlying
mechanism in the pathogenesis of
Alzheimer's disease**

周 婷 文

指导教师姓名: 张云武 教授

张 杰 教授

专 业 名 称: 化学生物学

论文提交日期: 2014 年 4 月 7 日

论文答辩时间: 2014 年 5 月 15 日

学位授予日期:

答辩委员会主席:

评 阅 人:

2014 年 4 月

CEN1 在阿尔茨海默病致病过程中的作用与机制研究

周婷文

指导教师

张云武教授

张杰教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘 要

阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 是一种以渐进性记忆力丧失和认知障碍为主要症状的神经退行性疾病, 在此过程中会伴随神经元的大量死亡, 该疾病严重影响人类健康。由于神经元的不可再生性, 因此目前还没有有效的治愈 AD 的方法。因此研究 AD 致病过程中更早期的细胞紊乱变化, 对于预防和干预神经元凋亡具有重要的意义。最近研究发现, AD 病人大脑中分裂后期的神经元重新进入细胞周期, 这些细胞周期重新激活的神经元并不能分裂而是开启了细胞凋亡的途径。我们称之为 Cell Cycle Related Neuronal Death(CRND)。而神经元细胞周期的紊乱是目前已知的关于 AD 最早期的细胞功能紊乱。研究了解在 AD 病理条件下成熟神经元的细胞周期是如何被重新激活及其诱导的神经元凋亡机制对于阐述 AD 的病理过程具有重要的意义。Cyclin Dependent Kinase 5(CDK5) 是细胞周期蛋白激酶家族中一个特异的成员。CDK5 具有抑制分裂后期神经元重新进入细胞周期的功能。

我们实验室前期鉴定出了 CDK5 的一个新的磷酸化底物—CEND1 (cell cycle exit and neuronal differentiation 1)。CEND1 是在神经系统特异性地高表达, 目前已知的主要功能是在神经系统的发育过程中协调神经前体细胞的细胞分裂进程和细胞分化过程, 促进神经前体细胞发育为成熟的神经元。CEND1 通常定位于细胞质, 而我们发现在 AD 病人大脑的神经元中 CEND1 大量聚集在细胞核内; β -淀粉样蛋白处理原代神经元也会诱导 CEND1 的核定位。我们进一步研究发现 CDK5 可以磷酸化 CEND1 的第 87 位丝氨酸, 87 位丝氨酸的磷酸化减弱了 CEND1 对细胞增殖的抑制作用以及对神经元迁移的影响。除此之外, 我们还发现, 人源的 CEND1 而不是鼠源的 CEND1 可以发生 N 链接糖基化, 并且糖基化修饰可以增加 CEND1 蛋白稳定性; 而 Ser87 位点的磷酸化会降低 CEND1 的糖基化水平。综上所述, 我们发现 CDK5 可以通过 CEND1 的磷酸化而影响到其在细胞内的定位、蛋白稳定性、糖基化等方面。该位点的磷酸化在 CEND1 调控细胞增殖和迁移的方面也有重要的作用。由于在 AD 中, CDK5 被异常激活, 上述对 CEND1 功能的改变在 AD 的致病过程中有着重要的作用。

关键词: 阿尔茨海默病; CDK5; CEND1; 细胞周期; 磷酸化; 糖基化

Abstract

Alzheimer disease (AD) is one kind of neurodegenerative diseases, which is characterized by memory loss, cognitive disorder gradually and mass mortality of neurons during this process. This disease severely threatens the human health. So far, AD can not be cured effectively because of the non-renewable of neurons. Therefore, the researches focusing on the change of earlier cell disorders in AD pathogenesis play a significant role in preventing and intervening the neuronal apoptosis. According to the current researches, post-mitotic neurons reenter into the cell cycle in AD patients' brains. However, those neurons start the cell apoptosis pathway rather than dividing, which is termed of Cell Cycle Related Neuronal Death (CRND). While, the cell cycle disorder of neuron is known as the earliest pathology in AD so far. It is very important that the researches concentrating on understanding how the mature neuron is induced to restart the cell cycle process which induces neuronal apoptosis for illustrating the AD pathology. Cyclin Dependent Kinase 5 (CDK5) is a non-traditional member of CDKs family. CDK5 can suppress the cell cycle process in post-mitotic neurons.

CEND1 (cell cycle exit and neuronal differentiation 1) is identified as a new substrate of CDK5 in our lab. It is highly specific expressed in nervous system, which can coordinate the cell division and cell differentiation during the development of nervous system and promote the development of neural precursor cell. Normally, CEND1 is localized in cytoplasm, however, we found that CEND1 is massively accumulated in nucleus in AD patients' brains. CEND1 is induced to localize to nucleus in neurons treated by A β . According to our further researches, CEND1 is shown to be phosphorylated by CDK5 at Ser87. The phosphorylation of Ser87 impairs the cell cycle depression of CEND1 and the effect of CEND1 on cell migration. Moreover, the Homo CEND1 rather than Mus CEND1 is modified by N-glycosylation and the glycosylation promotes the stability of CEND1 protein. Nevertheless, the phosphorylation of Ser87 decreases the glycosylation level of CEND1. In conclusion, we uncovered that the CDK5 can be involved in affecting the CEND1 subcellular localization, CEND1 protein stability, and glycosylation level through the phosphorylation of CEND1. The phosphorylation of Ser87 also influences the function of CEND1 in cell proliferation

and migration. Because CDK5 is abnormally activated in AD, the changes of CEND1 function play an important role in AD pathogenesis.

Key words: Alzheimer disease; CDK5; CEND1; cell cycle; phosphorylation; glycosylation

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录	
第一章 前言	1
1. 阿尔茨海默病症	1
1.1 阿尔茨海默病症概述.....	1
1.2 阿尔茨海默病症的病理特征.....	1
2. 阿尔茨海默病症中的神经元细胞周期失调	2
2.1 神经元中的细胞周期相关的细胞死亡.....	3
2.2 CDK5 对神经元细胞周期的抑制作用.....	3
3. CEDN1	5
4. 本论文的研究内容与意义	7
第二章 材料与amp;方法	8
1. 实验材料	8
1.1 细胞株、菌种和动物.....	8
1.2 质粒.....	8
1.3 抗体.....	9
1.4 化学药品及试剂盒.....	9
1.5 溶液配制.....	10
1.6 培养基配制.....	11
1.7 其它所需试剂和材料.....	12
2. 主要实验设备	12
3. 实验方法	13
3.1 GFP-CEND1 表达质粒及其突变体和缺失片段突变体的构建.....	13
3.2 碱裂解法大量提取质粒.....	16
3.3 细胞培养.....	17
3.4 原代神经元培养.....	17
3.5 质粒转染.....	18
3.6 细胞核和细胞质蛋白的提取.....	18
3.7 免疫印迹.....	19

3.8 免疫荧光.....	20
3.9 子宫胚胎电穿孔技术.....	21
4.0 胎鼠大脑切片及 Brdu 染色.....	21
4.1 统计学处理.....	22
第三章 结果与分析.....	23
1. CEND1 的表达.....	23
1.1 CEND1 为脑特异性高表达蛋白.....	23
1.2 CEND1 不仅定位于细胞膜, 在细胞质和细胞核内也有存在.....	24
2. CEND1 的亚细胞定位的改变.....	25
2.1 在 AD 大脑中 CEND1 亚细胞定位的变化.....	25
2.2 A β 诱导 CEND1 向细胞核内聚集.....	25
2.3 激活 CDK5(CDK5/P25)诱导 CEND1 向细胞核内聚集.....	26
3. CEND1 上第 87 位丝氨酸被 CDKs 磷酸化.....	27
3.1 在 AD 病人样品大脑中鉴定出 CEND1 上磷酸化位点.....	27
3.2 CEND1-S87 突变对其亚细胞定位的影响.....	28
3.3 CEND1 缺失突变体的构建以及其在细胞内的定位.....	29
3.4 CEND1-S87 磷酸化在小鼠胚胎发育过程中对神经元增殖和迁移的影响.....	240
4. CEND1 可以被糖基化修饰.....	33
4.1 CEND1 糖基化修饰的鉴定.....	33
4.2 糖基化修饰对 CEND1 蛋白稳定性的影响.....	34
4.3 AD 病人中 CEND1 糖基化修饰水平明显降低.....	245
4.4 CEND1Ser87 位点的过磷酸化使 CEND1 糖基化修饰水平降低.....	236
5. γ-secretase 对 CEND1 的切割.....	37
第四章 讨论与展望.....	Error! Bookmark not defined.0
参考文献.....	403
致谢.....	48

Catalog

Chapter 1 Introduction	1
1. Alzheimer’s disease	1
1.1 Alzheimer’s disease overview	1
1.2 Pathological characteristics of Alzheimer’s disease	1
2. The cell cycle disorder of neuron in Alzheimer’s disease	2
2.1 Cell cycle related neuron death	3
2.2 The inhibition effect of CDK5 on neuronal cell cycle	3
3. CEND1	5
4. Purposes and contents of this thesis	7
Chapter 2 Materials and Methods	8
1. Materials	8
1.1 Cell lines, bacteria and animals	8
1.2 Plasmids	8
1.3 Antibodies	9
1.4 Chemicals and kits	9
1.5 Solution preparation	100
1.6 Medium preparation	12
1.7 Other reagents and materials	12
2. Major apparatus	12
3. Methods	13
3.1 Construction of GFP-CEND1 expression plasmids and its mutants	13
3.2 Alkaline lysis method for plasmid extraction	16
3.3 Cell culture	17
3.4 Primary neuron culture	17
3.5 Plasmid transfection	18
3.6 Extraction of protein in cytoplasm and nucleus	18
3.7 Western blotting	19

3.8 immunofluorescence	220
3.9 Utero electrorotation	181
4.0 Brain slices and Brdu staining	201
4.1 Statistical analysis	202
Chapter 3 Results and Analyses	23
1. The expression of CEND1	23
1.1 CEND1 is highly specific expressed in the brain	23
1.2 CEND1 is localized in membrane, cytoplasm and nucleus	24
2. The change of subcellular localization of CEND1	25
2.1 The change of subcellular localization of CEND1 in AD brains	25
2.2 CEND1 is induced to localize to nucleus by A β	25
2.3 CEND1 is induced to localize to nucleus by activated CDK5	26
3. The Ser87 of CEND1 is phosphorylated by CDKs	27
3.1 The phosphorylation site of CEND1 is identified in AD brains	27
3.2 The effect of CEND1-S87 mutation on subcellular localization	28
3.3 Construction of CEND1 deletion of mutants and their subcellular localization.....	29
3.4 The effect of CEND1-S87 phosphorylation on neuronal proliferation and migration in the mice embryonic development.....	23
4. CEND1 can be modified by glycosylation .Error! Bookmark not defined.3	
4.1 The glycosylation of CEND1 is identified	233
4.2 The glycosylation affect the CEND1 protein stability	244
4.3 The glycosylation of CEND1 is significantly decreased in AD patients...245	
4.4 The glycosylation level is decreased in CEND1-S87D	236
5. CEND1 is cleaved by γ secretase	37
Chapter 4 Discussion and Prospect	Error! Bookmark not defined.0
References.....	403
Acknowledgements.....	48

第一章 前言

1. 阿尔茨海默病症

1.1 阿尔茨海默病症概述

阿尔茨海默病症是一种渐进地、与年龄密切相关的神经退行性疾病^[1]。阿尔茨海默病病人大脑中海马和皮层神经元特异性地凋亡，从而导致患者出现记忆力衰退、意识错乱、逐渐丧失思考及判断能力。1906年德国神经病理学家 Alois Alzheimer 首次对这种疾病进行了报道，在一个死于精神疾病的 55 岁女性病人的脑组织中首次发现了异常，在其脑中与记忆有关及其他关键区域发现了神经细胞的缺失，并阐述了在患者脑中发现的病理特征，主要是淀粉样斑（amyloid plaques）和神经纤维缠结（neurofibrillary tangles, NFTs）。在这之后，神经纤维缠结和淀粉样斑成为诊断阿尔茨海默病的两个重要的病理学特征^[2-3]。为了纪念他的贡献，在 1910 年是以他的名字来命名此疾病。

临床研究表明 AD 可分为散发型的 AD（sporadic AD, SAD）以及有家族遗传史的家族型 AD（familial AD, FAD）。早年发病的类型只占 2%-7% 的比例，通常是由遗传性基因突变所致^[4]；常见的散发类型 AD 则主要影响 65 岁以上的老年人，并且其发病率随年龄的增加而增高，据统计在 65 岁以上的人群中有约 10% 的人，85 岁以上的人群中有约 50% 的人患有此病^[5]。目前中国正在进入老龄化社会，高龄人群逐渐增加，阿尔茨海默病患者也随之增加。阿尔茨海默病患者由于生活无法自理，不仅给患者自身带来很大的痛苦，也逐渐成为一个十分重要的社会问题。因此，AD 发病机理的研究及药物开发对于人类的健康来说越来越重要。

1.2 阿尔茨海默病症的病理特征

AD 患者的病理改变主要发生在海马和大脑皮层。AD 有两个主要的病理特征：一个是神经细胞内的神经纤维缠结（neurofibrillary tangles, NFTs），另一个是胞外的淀粉样斑沉积（amyloid plaques）^[6]（图 1.1）。

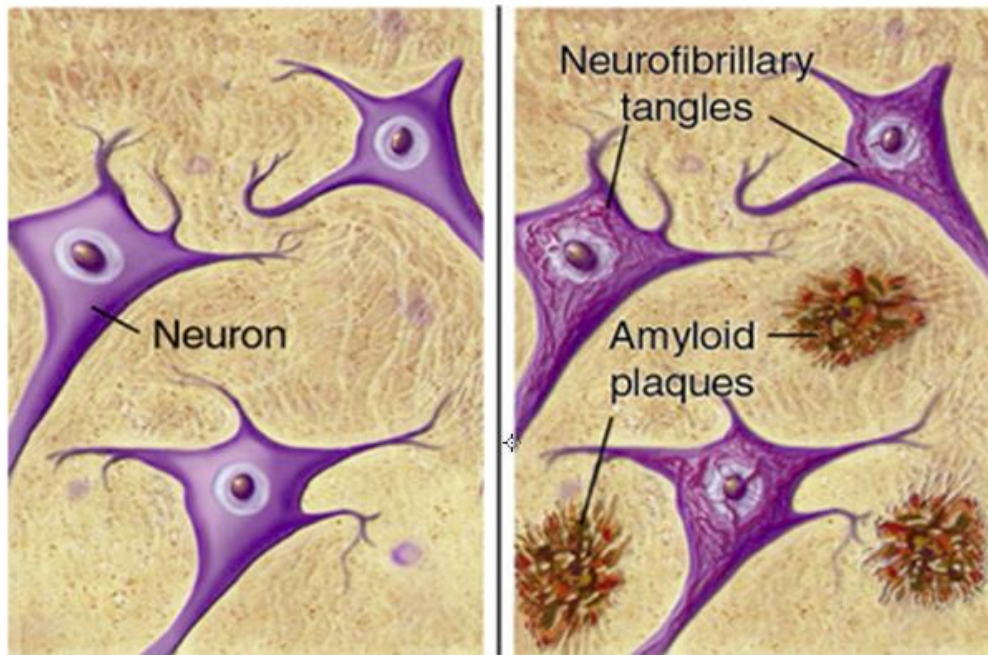


图 1.1 AD 的两个重要病理学特征

Figure 1.1 Two major pathologic characteristics of AD

(引自 http://www.ad921.com/Professional_Articles/005/Article_ab4f5c64-7cff-4f65-bf45-161219294b65.htm)

NFT 是由于微管相关蛋白 tau 的过度磷酸化导致异常聚合形成的, tau 是微管相关蛋白家族中的一员, 自身具有很多的磷酸化位点, 在大脑中广泛表达^[7]。正常生理条件下, tau 能促进微管蛋白的组装从而增加微管的稳定性和细胞骨架的整体性^[8]; 在某些病理条件下 (如阿尔茨海默病) tau 会被过度的磷酸化, 然而过度磷酸化的 tau 不仅不能与微管蛋白结合而发挥其正常生理功能, 而且还容易聚集, 形成 NFT^[9]。在 AD 病人中, NFT 引起轴突整体性的丧失, 并导致突触连接性的减弱^[10]。这些研究表明, tau 在 AD 的发病中发挥重要作用。

神经元细胞外的淀粉样斑是由 β -淀粉样蛋白 ($A\beta$) 聚合形成的多聚体堆积而成。 $A\beta$ 具有神经毒性, 用 $A\beta$ 处理神经元活将 $A\beta$ 注入老鼠的大脑都会引起细胞死亡, 因此 $A\beta$ 的过度产生被认为是导致 AD 的重要病因^[11]。最近的研究表明, $A\beta$ 的产生、聚集以及沉积可能在 AD 发病中起到了重要的作用。

2. 阿尔茨海默病症中的神经元细胞周期失调

2.1 神经元中的细胞周期相关细胞死亡

在中枢系统发育的过程中，当发育的神经元离开脑室和脑室下区，这些神经元一旦成熟并迁移到一定的位置，它就会进入细胞周期的静止期，不会再分裂^[12]。当成熟的、完全分化的神经元暴露在有毒的环境下（阿尔茨海默病的重要致病蛋白： β -淀粉样蛋白；氧化 A 损伤剂等）被胁迫重新诱导进入细胞周期时，这些神经元将会发生细胞死亡，这种现象称之为细胞周期相关死亡（cell cycle related neuron death, CRND）^[13-17]。最近的研究发现，神经元细胞周期的紊乱在神经退行性疾病的发病过程中有十分重要的作用。神经元细胞周期的紊乱直接导致神经元重新进入细胞周期，从而诱发神经元凋亡，病理上表现为脑萎缩^[18-19]。在 AD 的发生发展中，发现大量的神经元重新表达细胞周期相关蛋白（Cyclins, CDK, PCNA, K167），并且伴有 DNA 复制的现象。这是迄今为止在 AD 中发现的最早的细胞功能紊乱^[20-23]。如图 1.2 所示，神经元细胞周期的激活远远早于 β -淀粉样蛋白的沉积以及由此所诱导的神经元凋亡。



图 1.2 AD 病人大脑神经元的病理变化

Figure 1.2 The change of AD pathology

神经元细胞周期凋亡的过程又有其自身的特点。在 AD 病人的大脑中，细胞周期阳性的神经元约有 5%-10%，而一个典型的细胞凋亡过程约需 12 小时。假如这些被激活细胞周期的神经元都立刻凋亡的话，那么一半的大脑神经元会在一周内死亡，95% 的神经元会在一个月内凋亡。众所周知 AD 从发病到死亡长达 10 年，显而易见这些神经元并没有在短时间内死亡，这个凋亡过程一般为 6 个月到 1 年的时间。因此由细胞周期诱导的分裂后期神经元的凋亡是一个非常缓慢的过程，对于其凋亡机理的研究至今还不清楚。

2.2 CDK5 对神经元细胞周期的抑制作用

CDK5 是细胞周期蛋白激酶家族中的一个特异的成员。CDK5 最初被克隆鉴定是根据它的序列与细胞周期蛋白激酶 CDK2 和 CDK3 十分相似^[24-25]。CDK5 几乎在机体的各个组织器官中都有表达, 但不同其他 CDKs, CDK5 不被 Cyclins 激活, 而被与 Cyclin 截然不同源的蛋白 P35 和 P39 所激活^[26-27]。尽管 CDK5 的表达范围很广泛, 但其激酶活性主要体现在神经系统中^[28]。这是由于 P35 和 P39 是神经系统特异表达的蛋白^[29]。长期的研究表明 CDK5 对于神经元的功能有非常重要的作用和影响, 包括神经元迁移^[30-31], 细胞骨架动态平衡^[32], 神经突触生长^[33], 神经递质传递^[34]等。

作为 CDK 家族的一员, 一直没有发现 CDK5 对细胞周期的促进作用。张杰等经过长期的研究第一次发现细胞核 CDK5 具有抑制细胞周期的作用^[35-39]。在 CDK5 基因敲出的小鼠大脑皮层中发现大量神经元重新进入了细胞周期, 通过蛋白质定位的研究, 又发现只有 CDK5 定位在细胞核时才具有对细胞周期抑制的功能。通过对 AD 病人大脑切片的免疫染色分析, 重新进入细胞周期的神经元的 CDK5 被转移出了细胞核, 而细胞核 CDK5 的缺失直接导致了成熟神经元细胞周期抑制功能的丧失^[35]。张杰等又进一步阐述了细胞核 CDK5 抑制细胞周期的机制, 通过使用胚胎子宫电穿孔技术在体的验证了 CDK5 对神经元细胞周期的抑制功能。E2F1 (E2F transcription factor 1) 是一个十分重要的转录因子, 可以通过和另外一个转录因子 DP1 的结合而激活细胞周期相关基因的表达 (cyclinA、cyclinE、CDK1), 从而促进细胞周期的进程。研究发现, 当 CDK5 定位在细胞核时, 可以与 P35、P27 及 E2F1 的相互作用形成四分子复合物 (CDK5-P35-P27-E2F1)。此复合物形成时, E2F1 丧失了和 DP1 的结合能力, 进而降低了 E2F1 的转录活性, 进而阻滞细胞周期的进展^[36]。通过对不同 CDK5 蛋白片段的定位研究, 发现 CDK5 含有内源性的细胞质定位信号 (NES-Nuclear Export Signal), 可以通过 CRM1 依赖的出核通路从细胞核转移到细胞质。CDK5 并不含细胞核定位信号 (NLS-Nuclear Localization Signal), 因此其细胞核的定位是不依赖 importin 和 NLS 的作用进入细胞核。进一步研究发现, CDK5 的细胞核定位依赖于与 P27 的结合, 通过缺失或者点突变的方式阻止 CDK5 和 P27 的结合后, CDK5 也就丧失了其在细胞核内定位的能力^[37]。近期的研究还发现 CDK5 在细胞周期 S 期被特异性的降解, 其降解过程是通过泛素化连接酶 E3-

APC^{cdh1} 介导降解途径实现的[40]。图 1.3 说明了 CDK5 的工作模式。生理状态下，CDK5 在细胞核内通过失活 E2F1 而抑制神经元细胞周期。当在病理状态下，CDK5 丧失和 P27 的结合能力，通过 NES-CRM1 而被转运到细胞质，从而激活细胞周期；细胞质 CDK5 又可通过 APC^{cdh1} 在泛素化途径中被降解。

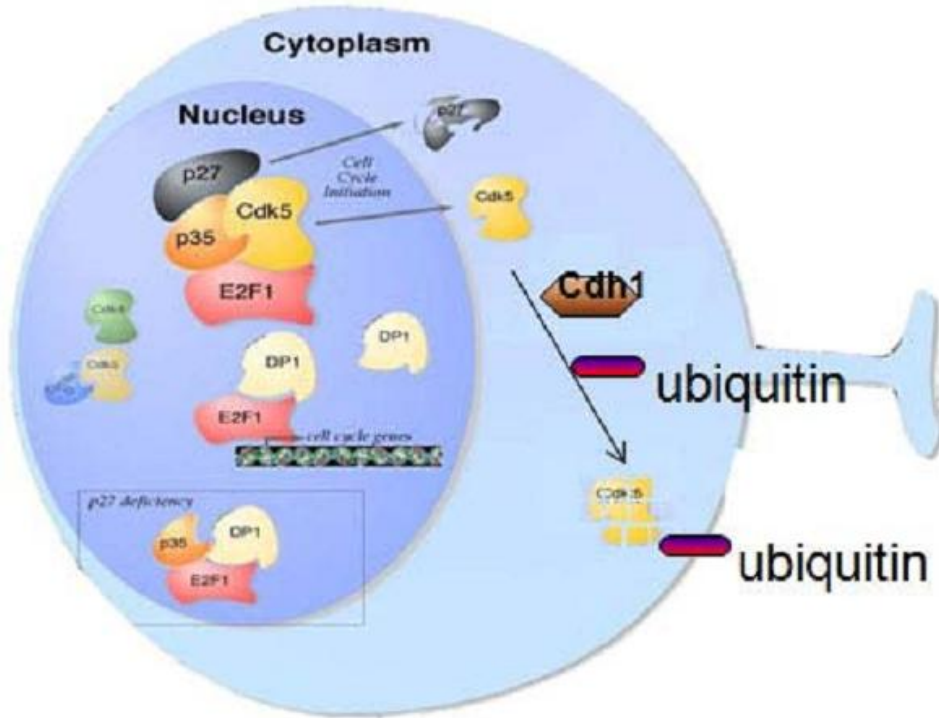


图 1.3 CDK5 对神经元细胞周期的调控模式

Figure 1.3 A model of the regulation of the neuronal cell cycle by Cdk5
(引自 Jie Zhang et al. Cdk5 Suppresses the Neuronal Cell Cycle by Disrupting the E2F1–DP1 Complex 2010)

3. CEND1

CEND1 (cell cycle exit and neuronal differentiation) 是从哺乳动物和鸡的大脑中克隆出来的^[41]。CEND1 是大脑内特异性高表达一次跨膜蛋白，由软件预测分析我们得知，1-125 的蛋白肽段位于细胞质，126-146 的蛋白肽段构成了 CEND1 蛋白的跨膜区，147-149 的肽段则位于细胞外。主要定位在细胞器膜上，例如内质网膜和线粒体外膜上^[41]。最初认为 CEND1 蛋白是在成年神经系统中高表达。然而，通过一系列的研究发现，在啮齿类和鸡的神经细胞发育的整个过程中

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫