

CRMP2 翻译后修饰及相关信号通路的研究进展

魏艳艳 王高华 何静 吴作天 肖玲 王惠玲

430060 武汉大学人民医院精神卫生中心

通信作者: 王高华, Email: wgh6402@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2018.07.011

【摘要】 脑衰反应调节蛋白2(CRMP2)在发育中及成年后神经系统中均高度表达,参与神经系统的发育以及神经可塑性,与多种神经精神疾病的发生密切相关。CRMP2存在多种翻译后修饰方式,包括磷酸化、氧化、蛋白水解、泛素化等,其中最重要的修饰方式即为磷酸化修饰,CRMP2的磷酸化会影响其与细胞骨架蛋白以及其他下游分子的结合,影响神经系统的多种功能。现就CRMP2翻译后修饰形式及相关信号通路作一综述。

【关键词】 脑衰反应调节蛋白2; 磷酸化; 信号通路; 细胞骨架; 综述

基金项目: 国家自然科学基金项目(81571325)

Post-translational modification of CRMP2 and the related signaling pathway Wei Yanyan,

Wang Gaohua, He Jing, Wu Zuotian, Xiao Ling, Wang Huiling

Mental Health Center, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Corresponding author: Wang Gaohua, Email: wgh6402@163.com

【Abstract】 CRMP2 is highly expressed in the developing and adult nervous systems and regulates skeletal dynamics by interacting with cytoskeletal proteins. It plays an important role in the development of nervous system and neuroplasticity, and is closely related to the occurrence of many neuropsychiatric diseases. There are many post-translational modifications (PTMs), including phosphorylation, oxidation, proteolysis and ubiquitination. Among them, the most important modification is phosphorylation. Phosphorylation of CRMP2 can affect its binding to the cytoskeletal proteins and other downstream molecules, then affect many functions of the nervous system. This article reviews the posttranslational modifications and related signaling pathways.

【Key words】 CRMP2; Phosphorylation; Signal pathway; Cytoskeleton; Review

Fund program: The National Natural Science Foundation of China (81571325)

在神经系统发育过程中神经元的生长、迁移、轴突树突的极化以及神经突触、神经环路的形成都需要进行精准的调控,任何一步出错都可能导致神经结构及功能的损害,引起神经精神疾病的发生。神经元极性以及细胞骨架的重塑在此过程中起着非常重要的作用,受多种生长及导向因子的调控。胞外生长及导向因子作用于其细胞膜上的受体后会启动一系列下游分子影响细胞骨架的重排,调节微丝与微管的聚合与解聚,从而进行神经网络的建立及重塑。脑衰反应调节蛋白2(collapsin response mediator protein 2, CRMP2)最先是作为轴突导向因子Sema3A通路的下游信号被发现,其靶结构为细胞骨架,通过与微管蛋白二聚体的相互作用调节细胞骨架的活动。此后研究发现除调节细胞骨架动态性外,CRMP2还参与调节轴突的运输、蛋白胞吞

作用、神经递质释放等,大量研究均证实其在神经系统发育、神经可塑性及神经精神疾病方面发挥重要作用^[1]。CRMP2的活性及功能受其修饰状态的调节,磷酸化的CRMP2与微管蛋白及Numb等下游分子的结合能力受损,影响微管聚合以及轴突运输等功能^[2]。蛋白磷酸酶2A(protein phosphatase 2A, PP2A)可以通过使CRMP2去磷酸化发挥促进轴突生长延伸的功能。除磷酸化外,CRMP2还存在多种翻译后修饰形式,包括氧化、蛋白水解、糖基化、脱酰胺基作用、泛素化等,并且多种上游信号通路介导了CRMP2的翻译后修饰过程。同时CRMP2在转录水平以及转录后水平亦受多种因子的调节,影响其表达。

一、CRMP2的结构及表达

CRMP2是脑衰反应蛋白家族(CRMPs)最先被

发现的成员,其在Sema3A介导的脊背根神经节生长锥塌陷通路的研究中被发现,被认为是此通路中关键的胞内信号蛋白。CRMP2具有同源四聚体结构,包含2A与2B两种亚型,2A(分子质量约75 kDa)主要分布在神经元的胞体和轴突,在树突中缺乏表达,2B(分子质量为62~66 kDa)主要分布在神经元的轴突和树突,在神经元胞体及少突胶质细胞亦有表达,是CRMP2的主要形式。研究发现CRMP2广泛表达于脑部高度可塑性区域,包括皮层、海马、嗅球、小脑、纹状体,此外在视网膜神经节、脊髓以及背根神经节亦有表达。其表达水平在胎孕中期及产后早期处于高峰,随后有所下降,但依然持续表达^[2]。在神经系统,CRMP2通过与其下游目标分子相互作用调节神经系统功能,其下游目标分子主要包括微管蛋白、Actin、Vimentin,驱动蛋白kinesin,动力蛋白dynein,钙结合蛋白,N型钙离子门控通道CaV2.2以及电压门控离子通道NaV1.7等^[3-4]。因此CRMP2参与多种神经功能,包括神经突触的延伸,轴突/树突的分化,神经元极化,kinesin依赖的轴突转运功能,神经递质的释放以及钙离子通道的调节等。除了在神经系统表达以外,CRMP2还在成纤维细胞以及T淋巴细胞等非神经细胞中表达,提示CRMP2除了调节神经系统功能外,可能还发挥其他作用。

二、CRMP2的翻译后修饰及相关信号通路

(一)CRMP2的磷酸化修饰

CRMP2磷酸化修饰是最主要的翻译后修饰形式,存在多个修饰位点,并通过多种信号通路实现,与其活性及功能密切相关。

1. Sema3A信号通路:在神经系统发育过程中,神经元必须迁移到正确的位置以及神经元轴突抵达正确的目标位置后才能形成正常的突触连接及神经网络,在这个过程中轴突导向因子起重要作用。Semaphorin是轴突导向因子中的一类,其家族包含20余个成员,其中Sema3A是最典型以及最先被确认的,研究发现其具有诱导脊背根神经节生长锥塌陷的作用。随后研究发现CRMP2是Sema3A的下游信号,Sema3A通过多种途径促进CRMP2的磷酸化从而导致CRMP2与微管蛋白解聚诱导生长锥塌陷^[5]。(1)Sema3A与其受体神经丛素(plexins)及neuropilins(NPRs)结合后通过激活其下游信号Fyn(一种Src型酪氨酸激酶)进而磷酸化细胞周期依赖性蛋白激酶5(cyclin-dependent kinases 5, Cdk-5)使其激活。Cdk-5激活后可使CRMP2在Ser522位点被磷酸化,从而降低CRMP2与微管蛋白、Numb分

子的结合,使轴突生长以及Numb介导的胞吞作用受到抑制^[5]。(2)Sema3A与其受体结合后可激活Rho家族的三磷酸鸟苷激酶(Rho GTPases)中Rac1,进而激活糖原合成激酶(GSK3 β),GSK3 β 可以使CRMP2的Thr509、Thr514以及Ser518位点磷酸化。并且研究发现GSK3 β 只有在Cdk-5预先导致CRMP2 Ser522磷酸化的前提下才能发挥使CRMP2其他位点磷酸化的作用^[5-6]。CRMP2被GSK3 β 磷酸化后降低了与微管蛋白、驱动蛋白轻链(kinesin light chains, KLC)以及突触结合蛋白样蛋白(synaptic binding protein like protein, Slp1)的结合,导致神经细胞极性及顺行性囊泡运输能力受损^[6-7]。此外,研究发现支架蛋白Axin亦可影响CRMP2的磷酸化水平,Cdk-5可使Axin磷酸化,促进Axin与GSK3 β 的结合,导致GSK3 β 活性被抑制,使CRMP2磷酸化水平降低。(3)Sema3A亦能通过激活下游酪氨酸激酶Fps/Fes、Fer,使CRMP Tyr32位点发生磷酸化。此外,Fyn亦可使CRMP2 Tyr32位点发生磷酸化,从而介导Sema3A信号通路引起的生长锥塌陷^[8]。(4)Sema3A可促使CRMP2氧化后再发生磷酸化。研究发现Sema3A可通过刺激CasL相互作用分子(molecule interacting with CasL, MICAL)产生过氧化氢,导致CRMP2被氧化,氧化后CRMP2会与硫氧还蛋白(thioredoxin, TRX)相互作用形成复合物,进而使CRMP2被GSK3 β 磷酸化导致生长锥塌陷。TRX在连接氧化CRMP2与磷酸化CRMP2之间起到关键作用^[9]。

2. Ras/PI3K/Akt/GSK3 β /CRMP2通路:Ras蛋白为一种小G蛋白,在细胞生殖及分化中起重要作用。既往研究发现磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)在神经元轴突发育中起重要作用,PI3K的抑制剂可使神经元发展受阻,影响轴突的形成和生长。Akt又称蛋白激酶B(protein kinase B, PKB),属于色氨酸/苏氨酸蛋白激酶,持续激活的Akt会导致多个轴突的产生。研究发现Ras蛋白可以激活PI3K,PI3K作为Akt上游激动剂,可以通过磷脂酰肌醇三磷酸(PIP3)以及磷脂酰肌醇依赖性激酶(PDK)使Akt Ser473以及Thr308位点磷酸化,从而激活Akt。Akt可进一步使其下游蛋白GSK3 β 磷酸化,GSK3 β 的Ser9位点被磷酸化后活性被抑制,会使CRMP2的磷酸化水平下降,进而促进轴突的发生、生长及成熟。而此通路中若GSK3 β 上游分子活性被抑制,则会使其GSK3 β 活性增加,促进CRMP2在Thr509、Thr514以及Ser518位点的磷酸化,导致轴突回缩^[10]。研究发

现脑源性神经营养因子(BDNF)以及神经营养因子3(NT3)可通过此通路发挥调节CRMP2磷酸化水平的作用^[6]。BDNF及NT3作为酪氨酸激酶(Trk)的配体,可激活Trk,进一步激活PI3K,提高Akt及GSK3 β 的磷酸化水平,进而降低CRMP2的磷酸化水平。沉默CRMP2会引起NT3及BDNF对轴突延长及分支作用的缺失,说明CRMP2对于BDNF及NT3的轴突延长及分支作用是必要的。Rho GAP α 2-chimaerin在神经营养因子介导的CRMP2通路中起着重要作用, α 2-chimaerin的敲除会影响CRMP2的磷酸化水平^[11]。

3. Rho激酶相关通路:研究发现另一种轴突导向因子 ephrinA5 与其受体 Eph 结合后可激活 Rho/Rho 激酶(ROCK)通路,进而促使 CRMP2 在 Thr555 位点发生磷酸化,降低 CRMP2 与微管蛋白二聚体、微管及 Numb 的结合能力,但与肌动蛋白的结合未受影响^[12]。溶血磷脂酸(LPA)是一种细胞外信号分子,与其受体结合后可激活 RhoA-GTPases,继而增强其下游 ROCK 活性,使 CRMP2 在 Thr555 位点发生磷酸化。

CRMP2 在 Thr555 位点的磷酸化可能是依赖于 Nogo-66 受体 1(NgR1),其可能是 NgR1 激活后的下游成分。研究发现 NgR1 基因敲除的小鼠 Thr555-CRMP2 磷酸化水平明显下降,同时自身免疫性脑脊髓膜炎的发病以及轴突退行性病变减少。Nogo-66 与 NgR1 结合后可明显激活 Rho/ROCK 通路,引起 CRMP2 磷酸化水平增加,而 NgR1 特异性拮抗剂 NAP2 可以抑制 ROCK 的激活,导致 CRMP2 磷酸化水平的下降^[13]。

4. CaMK II 介导的 CRMP2 磷酸化:研究发现异常的 Ca²⁺ 流会使多种有害的胞内蛋白激酶及蛋白酶激活导致细胞骨架的崩解以及轴突运输的干扰,进而使神经元变性死亡。Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II, CaMK II) 在神经元的延伸以及神经可塑性中发挥重要作用。在研究谷氨酸兴奋毒性时发现, CaMK II 可使 CRMP2 在 Thr555 位点磷酸化并加重脑损伤,而 CaMK II 的抑制剂可有效阻断 CRMP2 的磷酸化^[14]。

5. Yes 相关通路:在研究趋化因子 CXCL-12 处理的 Jurkat T 细胞时发现, CXCL-12 可以导致 CRMP2 动态定位于迁移的 T 淋巴细胞的弹性结构尾足,并促进其与骨架蛋白 Vimentin 的结合。同时 CXCL-12 可降低 GSK3 β 引起的 CRMP2 Thr509 及

Thr514 位点的磷酸化水平,增加非受体型 Src 酪氨酸激酶 Yes 导致的 CRMP2 Tyr479 位点的磷酸化水平,进而调节细胞骨架的重塑^[15]。

(二)CRMP2 的蛋白水解修饰

研究发现在缺血性脑损伤以及视神经急性轴突变性时, CRMP2 可被钙蛋白酶 Calpain 水解形成短 CRMP2,从而影响 CRMP2 的功能,并且,研究提示轴突的退化变性可能并不是由于裂解的 CRMP2 片段导致,而是通过完整 CRMP2 的丢失介导^[1]。

此外,有研究发现来源于 CRMP2B 亚型 C 端的短 CRMP2(58kDa)在细胞核中亦有表达,短 CRMP2 可引起神经胶质母细胞瘤细胞神经突起以及皮层神经元轴突的生长受到抑制,而全长 CRMP2 可促进神经突起的延长,提示胞质全长 CRMP2 与核转位的短 CRMP2 之间可能存在动态平衡,共同调节神经元突起的生长^[16]。

在脑缺血以及体外细胞谷氨酸兴奋毒性时, Calpain 介导的 CRMP2 裂解是发生在 CaMK II 介导的 CRMP2 磷酸化之后,抑制 CaMK II 介导的磷酸化可以增加 Calpain 对 CRMP2 的裂解作用。CaMK II 及 Calpain 均能作用于 CRMP2,两者单独或协同发挥调节 CRMP2 的作用^[14]。

(三)CRMP2 的泛素化修饰

研究发现 CRMP2 可被小的泛素类修饰物(small ubiquitin-like modifier, SUMO)进行泛素化修饰(SUMOylation),并且此修饰可被 Cdk5 的磷酸化机制增强,但可被 Fyn 预先引起的磷酸化机制所抑制。CRMP2 的泛素化修饰可调节 CRMP2 与 NaV1.7 离子通道的结合,从而影响 NaV1.7 的运输、膜表达以及电流强度, NaV1.7 的膜定位与神经性疼痛密切相关,因此, CRMP2 的泛素化修饰可能影响到神经性疼痛的发生^[4]。

三、CRMP2 转录水平及转录后调节

除了翻译后修饰外, CRMP2 也可进行转录水平的调节。研究发现转录因子 SMAD1 的下游骨形态蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)信号系统可以抑制 CRMP2 的转录水平,进而抑制神经元迁移以及突起的生长^[17]。转录因子 SP1、E2F、GATA1/2 可作用于 CRMP2 基因的转录起始位点上游区域调节 CRMP2 的表达。此外,胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)可以通过 GDNF/RET 酪氨酸激酶信号通路加强 CRMP2 的表达,胞外信号调节激酶(extracellular regulated kinase, ERK)参与此通路对 CRMP2 表达的影响,而与 PI3K 及 Src 家族激酶的激活无关^[18]。

并且,研究发现 CRMP2 亦存在转录后水平的调节。miRNA-181c 可作用于 CRMP2 mRNA 的 3' 端非翻译区,并在转录后水平下调 CRMP2 的表达,此机制可能与阿尔茨海默病的病理机制有关^[19]。

综上所述,CRMP2 在神经系统的发展以及神经系统相关疾病中有重要作用。CRMP2 存在多种修饰形式,并且受多种信号通路的调控,目前其磷酸化修饰方式研究最广泛。关于其他修饰方式对其活性及功能的影响需要进一步深入研究,随着更多相关信号通路的发现,CRMP2 可以为神经精神疾病的治疗以及新药的研发提供重要思路。

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 论文构思与设计为魏艳艳、肖玲,文献收集及整理为魏艳艳、何静、吴作天,文章撰写为魏艳艳,文章审校与修订为王高华及王惠玲

参 考 文 献

- [1] Zhang JN, Koch JC. Collapsin response mediator protein-2 plays a major protective role in acute axonal degeneration[J]. *Neural Regen Res*, 2017, 12(5): 692-695. DOI: 10.4103/1673-5374.206631.
- [2] Khanna R, Wilson SM, Brittain JM, et al. Opening Pandora's jar: a primer on the putative roles of CRMP2 in a panoply of neurodegenerative, sensory and motor neuron, and central disorders[J]. *Future Neurol*, 2012, 7(6): 749-771. DOI: 10.2217/FNL.12.68.
- [3] Martins-De-Souza D, Cassoli JS, Nascimento JM, et al. The protein interactome of collapsin response mediator protein-2 (CRMP2/DPYSL2) reveals novel partner proteins in brain tissue[J]. *Proteomics Clin Appl*, 2015, 9(9/10): 817-831. DOI: 10.1002/prea.201500004.
- [4] Dustrude ET, Moutal A, Yang X, et al. Hierarchical CRMP2 posttranslational modifications control Nav1.7 function[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(52): E8443-E8452. DOI: 10.1073/pnas.1610531113.
- [5] Uchida Y, Ohshima T, Sasaki Y, et al. Semaphorin3A signalling is mediated via sequential Cdk5 and GSK3beta phosphorylation of CRMP2: implication of common phosphorylating mechanism underlying axon guidance and Alzheimer's disease[J]. *Genes Cells*, 2005, 10(2): 165-179. DOI: 10.1111/j.1365-2443.2005.00827.x.
- [6] Yoshimura T, Kawano Y, Arimura N, et al. GSK-3beta regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity[J]. *Cell*, 2005, 120(1): 137-149. DOI: 10.1016/j.cell.2004.11.012.
- [7] Arimura N, Kimura T, Nakamuta S, et al. Anterograde transport of TrkB in axons is mediated by direct interaction with Slp1 and Rab27 [J]. *Dev Cell*, 2009, 16(5): 675-686. DOI: 10.1016/j.devcel.2009.03.005.
- [8] Uchida Y, Ohshima T, Yamashita N, et al. Semaphorin3A signaling mediated by Fyn-dependent tyrosine phosphorylation of collapsin response mediator protein 2 at tyrosine 32 [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(40): 27393-27401. DOI: 10.1074/jbc.M109.000240.
- [9] Morinaka A, Yamada M, Itofusa R, et al. Thioredoxin mediates oxidation-dependent phosphorylation of CRMP2 and growth cone collapse[J]. *Sci Signal*, 2011, 4(170): a26. DOI: 10.1126/scisignal.2001127.
- [10] Yoshimura T, Arimura N, Kawano Y, et al. Ras regulates neuronal polarity via the PI3-kinase/Akt/GSK-3beta/CRMP-2 pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340(1): 62-68. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.11.147.
- [11] Ip JP, Shi L, Chen Y, et al. alpha2-chimaerin controls neuronal migration and functioning of the cerebral cortex through CRMP-2 [J]. *Nat Neurosci*, 2011, 15(1): 39-47.
- [12] Arimura N, Menager C, Kawano Y, et al. Phosphorylation by Rho kinase regulates CRMP-2 activity in growth cones [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(22): 9973-9984. DOI: 10.1128/MCB.25.22.9973-9984.2005.
- [13] Sun Z, Dai X, Li Y, et al. A novel Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes neurite regeneration in vitro[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2016, 71: 80-91. DOI: 10.1016/j.mcn.2015.12.011.
- [14] Hou ST, Jiang SX, Aylsworth A, et al. CaMKII phosphorylates collapsin response mediator protein 2 and modulates axonal damage during glutamate excitotoxicity [J]. *J Neurochem*, 2009, 111(3): 870-881. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2009.06375.x.
- [15] Varrin-Doyer M, Vincent P, Cavagna S, et al. Phosphorylation of collapsin response mediator protein 2 on Tyr-479 regulates CXCL12-induced T lymphocyte migration[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(19): 13265-13276. DOI: 10.1074/jbc.M807664200.
- [16] Rogemond V, Auger C, Giraudon P, et al. Processing and nuclear localization of CRMP2 during brain development induce neurite outgrowth inhibition[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(21): 14751-14761. DOI: 10.1074/jbc.M708480200.
- [17] Sun Y, Fei T, Yang T, et al. The suppression of CRMP2 expression by bone morphogenetic protein (BMP)-SMAD gradient signaling controls multiple stages of neuronal development[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(50): 39039-39050. DOI: 10.1074/jbc.M110.168351.
- [18] Kodama Y, Murakumo Y, Ichihara M, et al. Induction of CRMP-2 by GDNF and analysis of the CRMP-2 promoter region[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 320(1): 108-115. DOI: 10.1074/jbc.M110.168351.
- [19] Zhou H, Zhang R, Lu K, et al. Deregulation of miRNA-181c potentially contributes to the pathogenesis of AD by targeting collapsin response mediator protein 2 in mice[J]. *J Neurol Sci*, 2016, 367: 3-10. DOI: 10.1016/j.jns.2016.05.038.

(收稿日期: 2018-05-10)

(本文编辑: 戚红丹)