

蛋白激酶 D1 催化结构域在昆虫细胞/杆状病毒表达系统内的表达、纯化和活性测定

李志红^{1,2}, Qiming Jane Wang²

1 三峡大学医学院, 湖北 宜昌 443002

2 Department of Pharmacology and Chemical Biology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15261, USA

李志红, Qiming Jane Wang. 蛋白激酶 D1 催化结构域在昆虫细胞/杆状病毒表达系统内的表达、纯化和活性测定. 生物工程学报, 2014, 30(8): 1291-1298.

Li ZH, Wang QJ. Expression, purification and characterization of catalytic domain of protein kinase D1 in baculovirus-insect cell expression system. Chin J Biotech, 2014, 30(8): 1291-1298.

摘要: 蛋白激酶 D (Protein kinase D, PKD) 是一种新的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族和甘油二酯 (Diacylglycerol, DAG) 受体, 参与细胞内多种生理生化过程。为获得高纯度的 PKD1 的催化结构域 (PKD1-cat) 用于晶体学结构的研究, 将带有 GST 标签的 PKD1-cat 基因克隆到杆状病毒转移载体 pFastBac1 中, 构建了重组质粒。将重组质粒转化到含穿梭载体 Bacmid 的 DH10Bac 感受态细胞中, 转座后获得了含目的基因 GST-PKD1-cat 的重组 Bacmid。重组 Bacmid DNA 转染 Sf9 昆虫细胞后, 获得重组杆状病毒并扩毒。将毒种以 5 PFU/cell 的感染复数感染悬浮培养的 T.ni 昆虫细胞, SDS-PAGE 和 Western blotting 检测表达产物。结果显示, 表达产物在分子量约 68 kDa 处有一特异条带可与 GST 单克隆抗体发生反应。经谷胱甘肽琼脂糖凝胶亲和层析纯化和 PreScission Protease 切除 GST 标签后, 得到了纯度很高的分子量约 42 kDa 的目的蛋白 PKD1-cat。体外 PKD 激酶活性实验结果显示, 随着 PKD1-cat 浓度的增加, 激酶活性增高。这些结果显示截短的重组 PKD1-cat 有很高的催化活性和纯度, 为采用核磁共振或晶体学方法解析 PKD1-cat 的三维结构奠定了基础。

关键词: 蛋白激酶 D, 催化结构域, 昆虫细胞, 杆状病毒表达系统, 表达, 纯化

Received: October 9, 2013; **Accepted:** December 16, 2013

Supported by: Scientific Research Foundation for the Talents of China Three Gorges University (No. KJ2008B054).

Corresponding author: Zhihong Li. Tel/Fax: +86-717-6396818; E-mail: lizhihong923@163.com

QJ Wang. Tel: +1-412-383-7754; Fax: +1-412-648-1945; E-mail: qjw1@pitt.edu

三峡大学人才科研启动基金 (No. KJ2008B054) 资助。

网络出版时间: 2014-02-17

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.130517.html>

Expression, purification and characterization of catalytic domain of protein kinase D1 in baculovirus-insect cell expression system

Zhihong Li^{1,2}, and Qiming Jane Wang²

¹ College of Medical Science, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China

² Department of Pharmacology and Chemical Biology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15261, USA

Abstract: Protein kinase D (PKD) is a novel family of serine/threonine kinases and diacylglycerol (DAG) receptors and has been documented in a variety of cellular processes. To get high purity catalytic domain of PKD1 (PKD1-cat) for crystallography study, the GST-tagged PKD1-cat gene was cloned into a baculovirus transfer vector pFastBac1 (donor plasmid). When the recombinant plasmid was transformed into DH10Bac competent *Escherichia coli*, which contains a baculovirus shuttle vector (bacmid), transposition occurs to generate a recombinant bacmid containing the gene of interest (GST-PKD1-cat). The recombinant bacmid DNA was transfected into *Spodoptera frugiperda* Sf9 insect cells to generate recombinant baculovirus, which was then amplified through multiple rounds of infection in Sf9 cells. After that, *Trichoplusia ni* insect cells in suspension culture were infected with baculoviral stock at a multiplicity of infection (MOI) of 5 PFU/cell. SDS-PAGE and Western blotting analysis confirmed the detection of a 68 kDa protein by the glutathione S-transferase (GST) monoclonal antibody. The recombinant protein was purified by Glutathione sepharose affinity chromatography and cleaved by PreScission Protease to remove GST tag, and a highly pure 42 kDa protein which was consistent with the molecular weight of the expected PKD1-cat protein was detected on SDS-PAGE. The activity of purified PKD1-cat protein was determined by *in vitro* PKD kinase assay. Our data showed that the kinase activity increased with the concentration of purified PKD1-cat protein. These results showed that the truncated recombinant PKD1-cat protein was highly active and pure, and could potentially be used for solving 3D structure of this protein by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) or crystallography.

Keywords: protein kinase D, catalytic domain, insect cell, baculovirus expression system, protein expression, purification

蛋白激酶 D (Protein kinase D, PKD) 是一种新的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族和甘油二酯 (Diacylglycerol, DAG) 受体, 能传递 G 蛋白偶联受体或酪氨酸激酶受体的信号^[1]。目前已鉴定的 PKD 家族成员有 3 个: PKD1、PKD2 和 PKD3。3 种 PKD 亚型都包含 N 端的调节结构域和 C 端的催化结构域。N 端调节域内有几个保守的模体: 丙氨酸-脯氨酸富集的非极性区域、富含半胱氨酸的 DAG 结合结构域、酸性结构域和可能参与催化活性抑制调节的普列克底物蛋白同源域^[2-3]。

PKD 在细胞内具有多种功能, 如参与细胞增殖与分化、细胞凋亡与细胞保护、高尔基复合体功能的调节、细胞迁移、浸润和粘附等^[4-8]。由于 PKD 参与了细胞内诸多的生理生化过程, 因此作为一个潜在的肿瘤治疗靶位, 在最近几年受到了更多的关注^[9-14]。然而遗憾的是, 到目前为止, 尚无任何一个关于 PKD 蛋白或其功能域的三维结构的研究成果, 这极大地阻碍了我们对 PKD 所介导的信号转导通路的深入认识, 也影响了以 PKD 及其配体为特异靶点的化学抑制药物的筛选研究^[15-18]。

要想获得 PKD 的晶体结构信息, 首先必须得到高纯度、高活性的蛋白。由于 PKD 蛋白分子量较大、其结构域复杂难于获得全长蛋白的结晶, 本文首先在昆虫细胞/杆状病毒表达系统中表达并纯化得到了高纯度、高活性的 PKD1 的催化结构域 (PKD1-cat), 为后续 PKD1-cat 晶体学结构的研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和细胞

大肠杆菌 *Escherichia coli* 菌株 DH10Bac 和质粒 pFastBac1 购自 Invitrogen 公司; 草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* Sf9 昆虫细胞购自美国 ATCC; 粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 昆虫细胞购自 Allele 公司; pGEX6p-PKD1-cat 重组质粒由本实验室构建。

1.1.2 酶和主要试剂

pfx DNA 聚合酶购自 Invitrogen 公司; T4 DNA 连接酶、*EcoR* I 和 *Spe* I 限制性内切酶购自 BioLabs 公司; 蛋白酶抑制剂 (Protease Inhibitor) 购自 Roche 公司; PreScission Protease 购自 GE 公司; Cellfectin II 试剂购自 Invitrogen 公司; n-Octyl- β -D-Glucopyranoside (OG) 购自 Anatrace 公司; 谷胱甘肽琼脂糖 (Glutathione Sepharose) 购自 GE 公司; 鼠 GST 单克隆抗体购自 Santa Cruz

公司, 羊抗鼠 IgG-HRP 购自 Bio-Rad 公司; ECL 显色试剂盒购自 Thermo 公司; 蛋白质定量检测试剂盒购自 Bio-Rad 公司; Sf-900 II SFM 培养基购自 Gibco 公司; HyClone SFX-Insect 培养基购自 Thermo 公司; 胎牛血清购自 Invitrogen 公司; [γ - 32 P]ATP 购自 Perkin Elmer Life Sciences 公司; Histone Deacetylase 5 (HDAC5) 由 Biobasic Canada Inc 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 目的基因 GST-PKD1-cat 的 PCR 扩增

以本实验室构建并保存的 pGEX6p-PKD1-cat 质粒为模板, 以 *GST-EcoR* I -F 为正向引物, 以 *PKD1-Spe* I -R 为反向引物 (表 1, 由 Invitrogen 公司合成), 扩增 GST-PKD1-cat 目的基因。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 以 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 68 $^{\circ}$ C 退火及延伸 3 min 为 1 个循环, 共 30 个循环; 最后 68 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应结束后, 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.2 重组质粒 pFastBac-GST-PKD1-cat 的构建及鉴定

PCR 产物经 *EcoR* I 和 *Spe* I 双酶切后, 克隆到同样酶切的 pFastBac1 载体中, 转化 *E. coli* XL-1 Blue 感受态细胞, 提取重组质粒进行 *EcoR* I 和 *Spe* I 双酶切鉴定, 筛选出的重组质粒由 Invitrogen 公司进行测序。测序无误后将重组质粒命名为 pFastBac-GST-PKD1-cat, 于 -20 $^{\circ}$ C 冷冻保存。

表 1 文中所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Restriction enzyme
GST- <i>EcoR</i> I -F	GATCGAGA <u>AATTC</u> ATGTCCCCTATACTAGGTTATTG	<i>EcoR</i> I
PKD1- <i>Spe</i> I -R	GATCGAA <u>CTAGTTC</u> AGAGGATGCTGACACGCTCACCGAGGGC	<i>Spe</i> I
M13-F	GTTTTCCAGTCACGAC	
M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC	

The underlined sequences indicate restriction enzyme site.

1.2.3 重组 Bacmid 的构建及鉴定

按照 Invitrogen 公司 Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expression System 说明书进行。简述如下：将重组质粒 pFastBac-GST-PKD1-cat 转化到含穿梭载体 Bacmid 的感受态细胞 DH10Bac 中，蓝白斑法筛选重组菌落。挑取白色菌落提取 Bacmid DNA，利用 M13 正向 (M13-F) 和反向 (M13-R) 引物 (表 1) 用 PCR 检测 Bacmid DNA 中是否含有目的基因。如果转座成功，PCR 产物的大小应约为 2 300 bp + 目的基因大小。

1.2.4 Sf9 昆虫细胞的培养和重组杆状病毒的获得

Sf9 昆虫细胞于 Sf-900 II SFM 培养基 (含 10% 胎牛血清) 中培养，培养温度 27 °C。重组 Bacmid DNA 在 Cellfectin II 试剂介导下转染生长状态良好的 Sf9 昆虫细胞，具体转染方法按 Invitrogen 公司的 Cellfectin II 试剂说明书进行。待细胞出现明显病变后收集上清作为 P1 代重组病毒。将 P1 代病毒按 1 : 10 稀释后，感染 Sf9 细胞，27 °C 培养 48–72 h，待细胞出现明显病变后收集上清即得 P2 代病毒。用空斑试验 (见 Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expression System 说明书) 进行病毒滴度测定。

1.2.5 Western blotting 检测重组蛋白 GST-PKD1-cat 的表达

收集有明显病变的 Sf9 细胞液，1 200 r/min 离心 5 min，沉淀内加入细胞裂解液 (PBS，内含蛋白酶抑制剂和 1% OG) 裂解 30 min，12 000 r/min 离心 25 min。取上清加入 SDS-PAGE 上样缓冲液混合，煮沸 5 min 后，进行 SDS-PAGE。SDS-PAGE 电泳后，将凝胶上的蛋白电转印至硝酸纤维素膜。将转印好的硝酸

纤维素膜用 5% 脱脂奶粉封闭，然后与鼠 GST 单克隆抗体结合。经 TBST 洗涤后与 HRP 标记羊抗鼠 IgG 作用，最后以 ECL 显色，观察特异性条带。

1.2.6 T.ni 昆虫细胞的大量悬浮培养和病毒感染

在 500 mL 无菌锥形瓶中 (内装培养基 200 mL) 进行 T.ni 细胞的大量悬浮培养，所用培养基为 HyClone SFX-Insect (勿需添加胎牛血清)，培养条件为 27 °C，95 r/min。每天进行细胞计数，将细胞的生长密度控制在 0.5×10^6 – 2×10^6 个/mL。当细胞密度达到 2×10^6 个/mL 后，将细胞铺板到 15 cm 的培养皿内，使细胞密度为 70%–80%。待细胞贴壁后 (约 10 min)，以感染复数 (MOI) 为 5 pfu/cell 的比例加入 P2 代病毒，于 27 °C 培养箱内进行病毒感染。

1.2.7 PKD1-cat 的纯化和 SDS-PAGE 检测

病毒感染 72 h 后，细胞出现明显病变。收集细胞液，1 200 r/min 离心 5 min。细胞沉淀内加入细胞裂解液裂解 30 min，12 000 r/min 离心 25 min。取上清与 Glutathione Sepharose Beads 在 4 °C 结合 1 h，500×g 离心 5 min 沉淀 Beads。用 PBS 洗 Beads 去除杂蛋白后，在 Beads 中加入切割缓冲液 (20 mmol/L Tris，pH 7.0，150 mmol/L NaCl，1 mmol/L DTT，0.5 mmol/L EDTA，1% OG) 和 PreScission Protease，4 °C 切割过夜。10 000×g 离心 5 min，取上清，该上清中即含有纯化的目的蛋白。取少量上清进行蛋白质浓度测定和 SDS-PAGE 分析。蛋白质浓度测定采用 Bio-Rad 公司的蛋白质定量检测试剂盒，具体方法按试剂盒说明书进行。其余上清用超滤管浓缩后于 4 °C 保存备用。

1.2.8 纯化蛋白 PKD1-cat 的活性检测

以Histone Deacetylase 5 (HDAC5) 为底物, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 为磷的供体进行纯化蛋白的体外激酶活性实验^[19]。反应混合物中含1.2 $\mu\text{mol/L}$ HDAC-5, 1 μCi $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, 不同浓度的纯化蛋白PKD1-cat, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 4 mmol/L MgCl_2 和10 mmol/L β -巯基乙醇。在30 $^\circ\text{C}$ 反应10 min后, 取反应液25 μL 置于

Whatman P81滤纸上。为排除同位素直接黏附到滤纸或底物蛋白的可能性, 将滤纸吹干后, 用0.5%磷酸溶液洗3次, 每次5 min, 以洗去未掺入底物的 $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ 。将滤纸烘干, 置于含10 mL蒸馏水的液闪瓶中, 用Beckman LS6500液闪仪测定放射活性 (cpm), 并按以下公式计算激酶的活性 (pmol/min)。每个样品同时做3个平行管。

$$\text{激酶活性 (pmol / min)} = \frac{\text{校正后的放射活性 (cpm)}}{\frac{5 \mu\text{L} [\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP 的放射活性 (cpm)} \times \text{反应时间 (min)}}{\text{ATP 的量 (pmol)}}} \times \frac{\text{反应体积} (\mu\text{L})}{\text{点样体积} (\mu\text{L})}$$

其中, 校正后的放射活性=所测放射活性 - 空白管的放射活性, 反应时间为10 min, 反应体积为50 μL , 点样体积为25 μL 。

2 结果与分析

2.1 目的基因 PCR 产物和重组质粒的鉴定

以pGEX6p-PKD1-cat质粒为模板, 采用PCR技术扩增 GST-PKD1-cat 基因。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 在1 500–2 000 bp 之间出现特异性条带, 长度与预期值 (约1 800 bp) 相符 (图1A)。PCR产物经 *EcoR* I 和 *Spe* I 双酶切后, 克

隆到同样酶切的 pFastBac1 载体上, 构建重组质粒。提取重组质粒进行 *EcoR* I 和 *Spe* I 酶切鉴定, 电泳后检测到2条谱带: 1条为 pFastBac1 载体, 另1条约1 800 bp, 与目的条带 GST-PKD1-cat 的预期结果相符 (图1B)。测序结果显示该重组质粒中确实含有目的基因片段, 且读码框正确, 表明重组质粒 pFastBac-GST-PKD1-cat 构建成功。

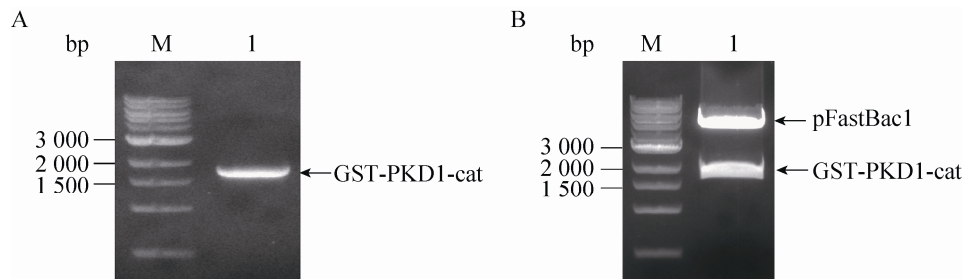


图1 GST-PKD1-cat 的 PCR 产物鉴定 (A) 和重组质粒的酶切鉴定 (B)

Fig. 1 Identification of PCR product of GST-PKD1-cat (A) and recombinant plasmid by enzyme digestion (B). (A) M: DNA marker; I: PCR product. (B) M: DNA marker; I: recombinant plasmid digestion by *EcoR* I and *Spe* I.

2.2 重组 Bacmid 的鉴定

重组质粒 pFastBac-GST-PKD1-cat 转化含穿梭载体 Bacmid 的 DH10Bac 细胞,挑取白色菌落提取 Bacmid DNA。用 M13 引物进行 PCR 扩增。琼脂糖凝胶电泳显示在约 4 100 bp 处出现了特异性条带 (图 2), 与预期结果 (约 2 300 bp + 目的片段大小 1 800 bp) 一致, 表明转座成功, 目的基因已转座到 Bacmid 上, 得到了重组 Bacmid。

2.3 Western blotting 检测重组蛋白 GST-PKD1-cat 的表达

重组 Bacmid DNA 转染生长状态良好的 Sf9 昆虫细胞, 待细胞出现明显病变后收集细胞。裂解细胞, 用鼠 GST 单克隆抗体作为一抗, 对细胞裂解液进行 Western blotting 分析。结果显示, 表达产物在蛋白相对分子质量约 68 kDa 处有一特异条带 (图 3), 与预计的 GST-PKD1-cat 融合蛋白的相对分子质量相同 (GST 的相对分子质量约 26 kDa, PKD1-cat 约 42 kDa), 表明 GST-PKD1-cat 融合蛋白在 Sf9 昆虫细胞中得到成功表达。

2.4 GST-PKD1-cat 的大量表达及 PKD1-cat 的纯化

大量悬浮培养 *T. ni* 昆虫细胞, 感染重组杆状

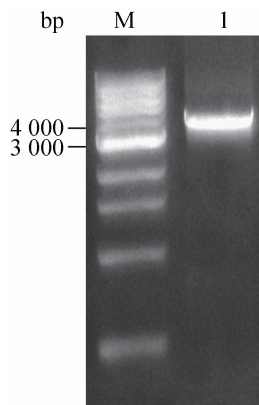


图 2 重组 Bacmid 的 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of PCR product of recombinant bacmid. M: DNA marker; 1: PCR product of recombinant bacmid using primer M13.

病毒, 收集有明显病变的细胞裂解、离心。上清液与 Glutathione Sepharose Beads 结合, 用 PBS 洗去杂蛋白后, 加入 PreScission Protease 切除 GST 标签。离心后取上清, 经 SDS-PAGE 电泳检测, 在蛋白相对分子质量约 42 kDa 处出现单一条带 (图 4), 与预期的 PKD1-cat 的相对分子质量相同, 表明 PKD1-cat 得到成功纯化。采用 Bio-Rad 公司的蛋白定量检测试剂盒进行蛋白质浓度测定, 通过对不同批次纯化的 PKD1-cat 蛋白的浓度测定, 1 000 mL 培养基培养的细胞均可纯化得到高纯度的 PKD1-cat 蛋白约 1 mg。

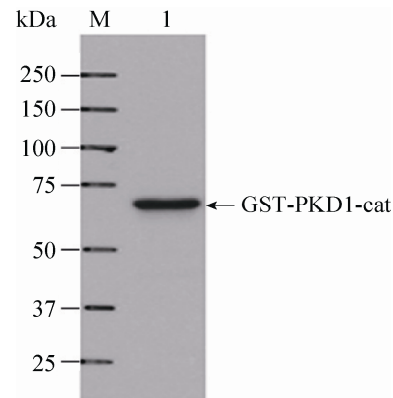


图 3 表达产物的 Western blotting 分析

Fig. 3 Western blotting analysis of expression product. M: protein marker; 1: lysate of Sf9 cells infected with recombinant bacmid.

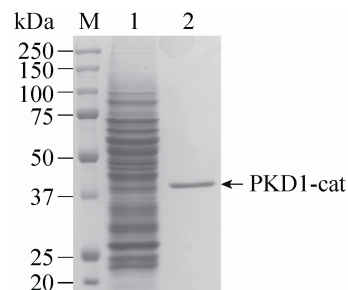


图 4 SDS-PAGE 分析纯化结果

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purified protein. M: protein marker; 1: lysate of Sf9 cells infected with recombinant baculovirus; 2: purified PKD1-cat.

2.5 纯化蛋白 PKD1-cat 的活性检测

以 HDAC-5 为底物, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 为磷的供体进行纯化蛋白的体外激酶活性实验。反应混合物中含 $1.2\ \mu\text{mol/L}$ HDAC-5, $1\ \mu\text{Ci}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 和不同浓度的 PKD1-cat。30 °C 反应 10 min 后, 用液闪仪测定放射活性 (cpm) 并计算不同浓度下激酶的活性 (pmol/min)。结果显示 (表 2), 随着 PKD1-cat 浓度的增加, 激酶活性增高, 说明纯化的 PKD1-cat 有很好的催化活性。

表 2 PKD1-cat 的体外激酶活性实验结果
Table 2 Result of *in vitro* kinase assay using purified PKD1-cat

Concentration of PKD1-cat (ng)	Radio activity of $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ (cpm)	Kinase activity (pmol/min)
10	151 464	8.02
50	574 631	30.41
100	744 559	39.41
500	918 173	48.60

3 讨论

PKD最早于1994年由Valverde等^[20]发现, 曾一度被认为是PKC家族中的一类非典型成员 (Protein kinase C μ , PKC μ)^[21], 但在随后的研究中发现PKD的激酶结构域 (Kinase domain) 与钙/钙调素依赖性蛋白激酶 (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase, CAMK) 家族的同源性要高于PKC家族, 故现已归类为CAMK家族激酶^[22]。

PKD 在细胞内发挥信号转导作用, 需要其 DAG 结合结构域与 DAG 结合, 以及其催化结构域与底物结合, 因此这两个结构域对其功能的实现极其重要^[2,23]。考虑到 PKD 蛋白分子量较大 (110 kDa)、且结构域复杂难于得到全长蛋白的结晶, 我们选择了首先在体外表达 PKD1

的催化结构域 (PKD1-cat)。

昆虫细胞/杆状病毒表达系统是近年来应用较多的真核表达系统。在该系统中表达的外源蛋白产量高, 能够进行翻译后修饰、加工, 且表达的外源蛋白大多是可溶性的, 其生物学活性、结构与功能等与天然蛋白极其相似, 因此选择该系统作为本研究的蛋白表达系统^[24]。

为提高该蛋白在昆虫细胞中的表达产量, 我们对表达条件进行了优化。首先, 对于重组杆状病毒的扩增, 我们选择在贴壁生长的 Sf9 昆虫细胞中进行。用于感染细胞的病毒不易传代过多, 一般使用 P2、P3 代毒种进行细胞的病毒感染。其次, 对于蛋白的大量表达, 我们选择在 T.ni 昆虫细胞中进行。可用 500 mL、1 000 mL 或更大体积的锥形瓶进行 T.ni 细胞的大量悬浮培养, 锥形瓶内所装培养基的体积不超过锥形瓶容积的 2/5。在 27 °C、95 r/min 的培养条件下, T.ni 细胞生长很快, 一般 21 h 可扩增一代。每天进行细胞监测, 控制细胞密度在 $0.5\times 10^6\text{--}2\times 10^6$ 个/mL。当细胞密度达到 2×10^6 个/mL 后, 将悬浮培养的 T.ni 细胞铺板到 15 cm 的培养皿内, 待细胞贴壁后再进行病毒感染, 因为在贴壁生长的细胞中, 病毒感染效率更高。

在蛋白纯化方面, 为便于纯化蛋白, 我们先表达了带 GST 标签的 GST-PKD1-cat 融合蛋白, 再通过 Glutathione Sepharose 亲和层析纯化和 PreScission Protease 切除 GST 标签, 获得了 PKD1-cat 目的蛋白。经 SDS-PAGE 电泳检测, 该蛋白纯度高, 无其他杂蛋白, 体外激酶活性实验也显示该蛋白具有很好的催化活性, 可用于蛋白结晶条件的筛选。因此本研究为 PKD1-cat 晶体学结构的研究奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Rykx A, De Kimpe L, Mikhalap S, et al. Protein kinase D: a family affair. *FEBS Lett*, 2003, 546(1): 81–86.
- [2] Wang QJ. PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. *Trends Pharmacol Sci*, 2006, 27(6): 317–323.
- [3] Van Lint J, Rykx A, Maeda Y, et al. Protein kinase D: an intracellular traffic regulator on the move. *Trends Cell Biol*, 2002, 12(4): 193–200.
- [4] Rozengurt E. Protein kinase D signaling: multiple biological functions in health and disease. *Physiology*, 2011, 26(1): 23–33.
- [5] Huynh QK, McKinsey TA. Protein kinase D directly phosphorylates histone deacetylase 5 via a random sequential kinetic mechanism. *Arch Biochem Biophys*, 2006, 450(2): 141–148.
- [6] Ochi N, Tanasanvimon S, Matsuo Y, et al. Protein kinase D1 promotes anchorage-independent growth, invasion, and angiogenesis by human pancreatic cancer cells. *J Cell Physiol*, 2011, 226(4): 1074–1081.
- [7] Azoitei N, Kleger A, Schoo N, et al. Protein kinase D2 is a novel regulator of glioblastoma growth and tumor formation. *Neuro Oncol*, 2011, 13(7): 710–724.
- [8] Chen J, Deng F, Singh SV, et al. Protein kinase D3 (PKD3) contributes to prostate cancer cell growth and survival through a PKCepsilon/PKD3 pathway downstream of Akt and ERK 1/2. *Cancer Res*, 2008, 68(10): 3844–3853.
- [9] Sundram V, Chauhan SC, Jaggi M. Emerging roles of protein kinase D1 in cancer. *Mol Cancer Re*, 2011, 9(8): 985–996.
- [10] George KM, Frantz MC, Bravo-Altamirano K, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of PKD inhibitors. *Pharmaceutics*, 2011, 3(2): 186–228.
- [11] Monovich L, Vega RB, Meredith E, et al. A novel kinase inhibitor establishes a predominant role for protein kinase D as a cardiac class IIa histone deacetylase kinase. *FEBS Lett*, 2010, 584(3): 631–637.
- [12] Evans IM, Bagherzadeh A, Charles M, et al. Characterization of the biological effects of a novel protein kinase D inhibitor in endothelial cells. *Biochem J*, 2010, 429: 565–572.
- [13] Gamber GG, Meredith E, Zhu Q, et al. 3,5-diarylazoles as novel and selective inhibitors of protein kinase D. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21(5): 1447–1451.
- [14] Harikumar KB, Kunnumakkara AB, Ochi N, et al. A novel small-molecule inhibitor of protein kinase D blocks pancreatic cancer growth *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(5): 1136–1146.
- [15] LaValle CR, George KM, Sharlow ER, et al. Protein kinase D as a potential new target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1806(2): 183–192.
- [16] Sharlow ER, Mustata Wilson G, Close D, et al. Discovery of diverse small molecule chemotypes with cell-based PKD1 inhibitory activity. *PLoS ONE*, 2011, 6(10): e25134.
- [17] Bravo-Altamirano K, George KM, Frantz MC, et al. Synthesis and structure-activity relationships of benzothienothiazepinone inhibitors of protein kinase D. *ACS Med Chem Lett*, 2011, 2(2): 154–159.
- [18] Tandon M, Johnson J, Li Z, et al. New pyrazolopyrimidine inhibitors of protein kinase D as potent anticancer agents for prostate cancer cells. *PLoS ONE*, 2013, 8(9): e75601.
- [19] Sharlow ER, Giridhar KV, LaValle CR, et al. Potent and selective disruption of protein kinase D functionality by a benzoxoloazepinone. *J Biol Chem*, 2008, 283(48): 33516–33526.
- [20] Valverde AM, Sinnett-Smith J, Van Lint J, et al. Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(18): 8572–8576.
- [21] Johannes FJ, Prestle J, Eis S, et al. PKCμ is a novel, atypical member of the protein kinase C family. *J Biol Chem*, 1994, 269(8): 6140–6148.
- [22] Manning G, Whyte DB, Martinez R, et al. The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 2002, 298(5600): 1912–1934.
- [23] Rozengurt E, Rey O, Waldron RT. Protein kinase D signaling. *J Biol Chem*, 2005, 280(14): 13205–13208.
- [24] Possee RD. Baculovirus as expression vector. *Curr Opin Biotechnol*, 1997, 8(5): 569–572.

(本文责编 陈宏宇)