

网络出版时间:2024-12-05 13:50:55 网络出版地址:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.001

◇基础医学研究◇

PDK1 在衰老小鼠小脑中的功能研究

彭文婕¹, 齐 翠¹, 刘 睿¹, 高 隽^{1,2}(¹南京医科大学基础医学院神经生物系, 南京 211166;²上海市颅颌面发育与疾病重点实验室, 复旦大学附属口腔医院, 上海 200001)

摘要 目的 研究3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶1(PDK1)在衰老小鼠小脑浦肯野细胞(PCs)中的功能。方法 采用足迹印记实验、高架平衡木实验和转棒实验来检测小鼠步态特征、运动平衡能力和运动协调能力。应用免疫荧光观察小鼠小脑结构和细胞形态学改变。免疫印迹法检测小鼠小脑组织中PDK1、 γ 型蛋白激酶C(PKC γ)和蛋白激酶B(AKT)蛋白表达水平及核糖体蛋白S6(rpS6)磷酸化水平变化。结果 随着年龄的增加,小鼠出现前后足重合程度、运动平衡和运动协调能力降低,小脑体积和PCs胞体体积减少,但PCs密度并未随着小鼠年龄增加而改变;此外,随着年龄的增加,小脑组织中PDK1蛋白表达水平下调, rpS6磷酸化水平、PKC γ 和AKT蛋白表达水平也下调。结论 随着年龄的增加,小鼠小脑体积及PCs胞体体积减少,这可能与小脑中PDK1表达下降以及rpS6磷酸化、PKC γ 和AKT表达水平降低有关,最终影响小脑相关运动调控功能。

关键词 衰老;浦肯野细胞;3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶1;核糖体蛋白S6; γ 型蛋白激酶C;蛋白激酶B

中图分类号 R 339.3+8

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)12-2065-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.001

衰老是一个复杂的过程,由细胞衰老、基因组不稳定和表观遗传改变等驱动^[1]。衰老在很大程度上受遗传因素影响,随着衰老进程,小脑的基因表达也会发生改变^[2]。衰老进程中运动能力缺陷往往与神经肌肉接头功能衰退、多巴胺能神经元丢失和小脑浦肯野细胞树突形态改变等因素相关^[3-4]。衰老进程中受到蛋白质磷酸化的多方调控,其中蛋白激酶A、G和C(AGC)家族中众多蛋白激酶参与到衰老进程调控中^[5-7]。

3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶1(3-phosphoinositide dependent protein kinase-1, PDK1)属于AGC蛋白激酶家族,是由556个氨基酸组成的多肽酶。PDK1参与多种AGC激酶家族蛋白质的磷酸化调控,并且PDK1许多下游分子都参与到衰老进程调控中,如哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合体1(mechanistic target of rapamycin complex 1, mTORC1)、 γ 型

蛋白激酶C(protein kinase C gamma, PKC γ)和蛋白激酶B(protein kinase B,也称AKT)等^[8-9]。此外,研究^[10]显示,用PDK1的抑制剂预处理人脐静脉内皮细胞后,促进了细胞衰老和凋亡。课题组前期研究^[11]也表明小脑浦肯野细胞特异性缺失PDK1,小脑体积以及浦肯野细胞的数量和体积均出现年龄依赖性降低,并出现相关运动功能障碍。因此,该研究通过比较不同年龄段C57/BL6小鼠的行为学和小脑形态学表型,并探究其中分子机制,为PDK1在小鼠小脑衰老中的作用提供新证据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF级C57/BL6健康雄性小鼠24只,2~15月龄,体质量21~35 g。实验小鼠按年龄分为年轻小鼠(<5月龄小鼠)和正在衰老的小鼠(10月龄和15月龄小鼠)。饲养在南京医科大学实验动物中心SPF级动物房,严格按照南京医科大学实验动物伦理委员会基本要求开展实验(编号:IACUC-1809031、IACUC-2404070、IACUC-2301003、IACUC-2301015)。小鼠出生当天计为出生后第0天。

1.2 主要试剂和仪器

1.2.1 主要试剂 BCA测定试剂盒、RIPA裂解液(货号:P0011、P0013E)均购于上海碧云天生物技术

2024-09-02 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:32371053、32100811);江苏省高等学校自然科学研究项目(编号:21KJB180008)

作者简介:彭文婕,女,硕士研究生;

高 隽,女,教授,博士生导师,通信作者, E-mail: gaojunkq@fudan.edu.cn;

刘 睿,男,讲师,通信作者, E-mail: liurui_njmu@njmu.edu.cn

有限公司;蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物、胎牛血清(货号:78440、A5669701)均购于美国 Thermo Fisher 公司);PVDF 膜(货号:IPVH00010)购于美国 Millipore 公司;多聚甲醛(货号:A500684)购于上海生工生物工程股份有限公司;抗浦肯野细胞特异性标记蛋白 Calbindin 抗体、抗 PDK1 抗体(货号:ab49899、ab52893)均购于英国 Abcam 公司;抗三磷酸肌醇受体 1 (inositol 1, 4, 5-triphosphate type 1 receptor, IP3R1)抗体(货号:sc-271197)购于美国 Santa Cruz 公司;山羊抗兔 IgG 二抗、山羊抗鼠 IgG 二抗、抗 β -Actin 抗体(货号:BS10250、BS50950、AP0060)均购于美国 Bioworld Technology 公司;抗 PKC γ 抗体、抗核糖体蛋白 S6(ribosomal protein S6, rpS6)抗体、抗磷酸化核糖体蛋白 S6 (phospho-S6 ribosomal protein, p-rpS6) (Ser235/236)抗体、抗 AKT 抗体、HRP 标记的山羊抗兔(货号:59090、2217、2211、9272、7074)均购于美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.2.2 主要仪器 离心机(型号:5417R,德国 Eppendorf 公司);凝胶成像系统(型号:Tanon2500,上海天能科技有限公司);冰冻切片机(型号:CM1950,德国 Leica Microsystems 公司);激光共聚焦显微镜(型号:FV1200,日本 Olympus 公司)。

1.3 方法

1.3.1 小鼠行为学实验

1.3.1.1 足迹印记实验 用彩色墨水分别将小鼠前肢和后肢染成红色和蓝色,引导小鼠在白色纸张上留下足印,并测量小鼠同侧前/后肢足心距离、步幅长度、前肢步宽和后肢步宽,以检测小鼠基本步态特征。

1.3.1.2 高架平衡木实验 记录小鼠在不同宽度(10、16、30 mm)的高架横杆上通过 80 cm 路程的时间,以及小鼠在通过该路程的时间段内后肢脱离横杆的次数,以检测小鼠运动平衡能力。

1.3.1.3 转棒实验 设置转棒仪的基线速度为 4 r/min,终止速度为 40 r/min,实验时间为 5 min,以匀加速方式运行。记录小鼠在棒时间,反映小鼠运动协调能力。

1.3.2 小鼠脑组织冰冻切片制备 2%戊巴比妥钠生理盐水溶液(40 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉小鼠,4%PFA 溶液心脏灌注固定小鼠组织。分离脑组织并置于 4% PFA 溶液中 4℃固定过夜,后将脑组织移入 30%蔗糖(PBS 缓冲液配制)溶液中 4℃浸泡。待脑组织沉底后用 OCT 包埋, -80℃冰箱保存备用。使用时,冰冻切片机上制备厚度 25 μ m 冰

冻组织切片, -80℃冰箱保存备用。

1.3.3 免疫荧光染色 冰冻切片从 -80℃冰箱取出复温后,进行抗原修复。修复后切片先用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min,后用 0.3% Triton-100 的 PBS (PBST) 穿透 30 min,随后于 0.3% PBST 配置的 10%牛血清溶液中常温封闭 2 h,于 4℃冰箱中一抗(抗 Calbindin 抗体, 1:1 000;抗 IP3R1 抗体: 1:100)孵育过夜。次日 PBST 清洗 5 次,每次 10 min,加入二抗(山羊抗兔 IgG 二抗, 1:500;山羊抗鼠 IgG 二抗, 1:500)室温孵育 4 h。随后 PBS 清洗 5 次,每次 10 min,甘油封片剂封片。利用激光共聚焦显微镜进行观察和拍摄,并使用 Image-Pro Plus 软件进行分析处理,统计小脑截面积大小、浦肯野细胞密度及胞体大小。

1.3.4 免疫印迹实验 为检测小鼠小脑组织中 PDK1、PKC γ 和 AKT 蛋白表达水平及 rpS6 磷酸化水平变化,将小鼠小脑组织放置在含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的裂解液中进行超声裂解,放于冰上静置 30 min。4℃、12 000 r/min 离心 15 min;取上清液;再次 4℃、12 000 r/min 离心 15 min,同样取上清液。随后使用 BCA 测定试剂盒测定蛋白含量。将等量蛋白样品用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,然后将蛋白转移到 PVDF 膜上,常温封闭 1 h,于 4℃冰箱中一抗(抗 PDK1 抗体, 1:1 000;抗 β -Actin 抗体, 1:2 000;抗 PKC γ 抗体, 1:1 000;抗 rpS6 抗体, 1:1 000;抗 p-rpS6 抗体, 1:1 000;抗 AKT 抗体, 1:1 000)孵育过夜。次日用含 0.1% Tween-20 的 TBS 缓冲溶液(TBST)洗涤后用二抗(HRP 标记的山羊抗兔, 1:10 000)在常温下孵育 1 h,再用 TBST 洗涤,然后进行显影。使用 ImageJ 软件分析结果。

1.4 统计学处理 使用 GraphPad Prism 9 软件对实验数据进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间数据比较分析应用 Student's *t*-test 方法,多组间数据比较分析应用单因素方差分析(one-way ANOVA)或双因素方差分析(two-way ANOVA),并应用 Tukey 法进行事后组间两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠前后足重合程度、运动平衡与运动协调能力与年龄的关系 足迹印记实验结果表明,15 月龄小鼠的同侧前/后肢足迹足心距离要大于年轻小鼠($P = 0.028$)(图 1A-1C),而 10 月龄小鼠与年轻小

鼠相比,在同侧前/后肢足迹足心距离(图1C)、步幅长度(图1D)、前肢步宽(图1E)和后肢步宽(图1F)这4项参数上均没有显著差异(均 $P > 0.05$)。进一步高架平衡木实验结果表明,10月龄小鼠与年轻小鼠在通过横杆的时间上没有显著差异($P > 0.05$)(图1G),但15月龄小鼠通过宽度分别为30、16、10 mm的固定长度横杆所需的时间长于年轻小鼠($P = 0.010, 0.003, P < 0.001$),且在通过10 mm横杆时也明显长于10月龄小鼠($P < 0.001$)(图1G);同时

这3个年龄段的小鼠在通过横杆时的后肢打滑次数上没有显著差异(均 $P > 0.05$)(图1H)。上述行为学结果提示,10月龄小鼠与<5月龄的年轻小鼠在活动能力上无显著差异,为了节约小鼠用量,所以在转棒实验和随后的形态学实验中仅观察了10月龄和15月龄小鼠。转棒实验结果显示,15月龄小鼠在训练和测试时,从转棒上跌落的时间均低于10月龄小鼠($t = 2.687, P = 0.031$)(图1I、1J)。上述结果表明,随着年龄的增加小鼠同侧前后肢足迹重合

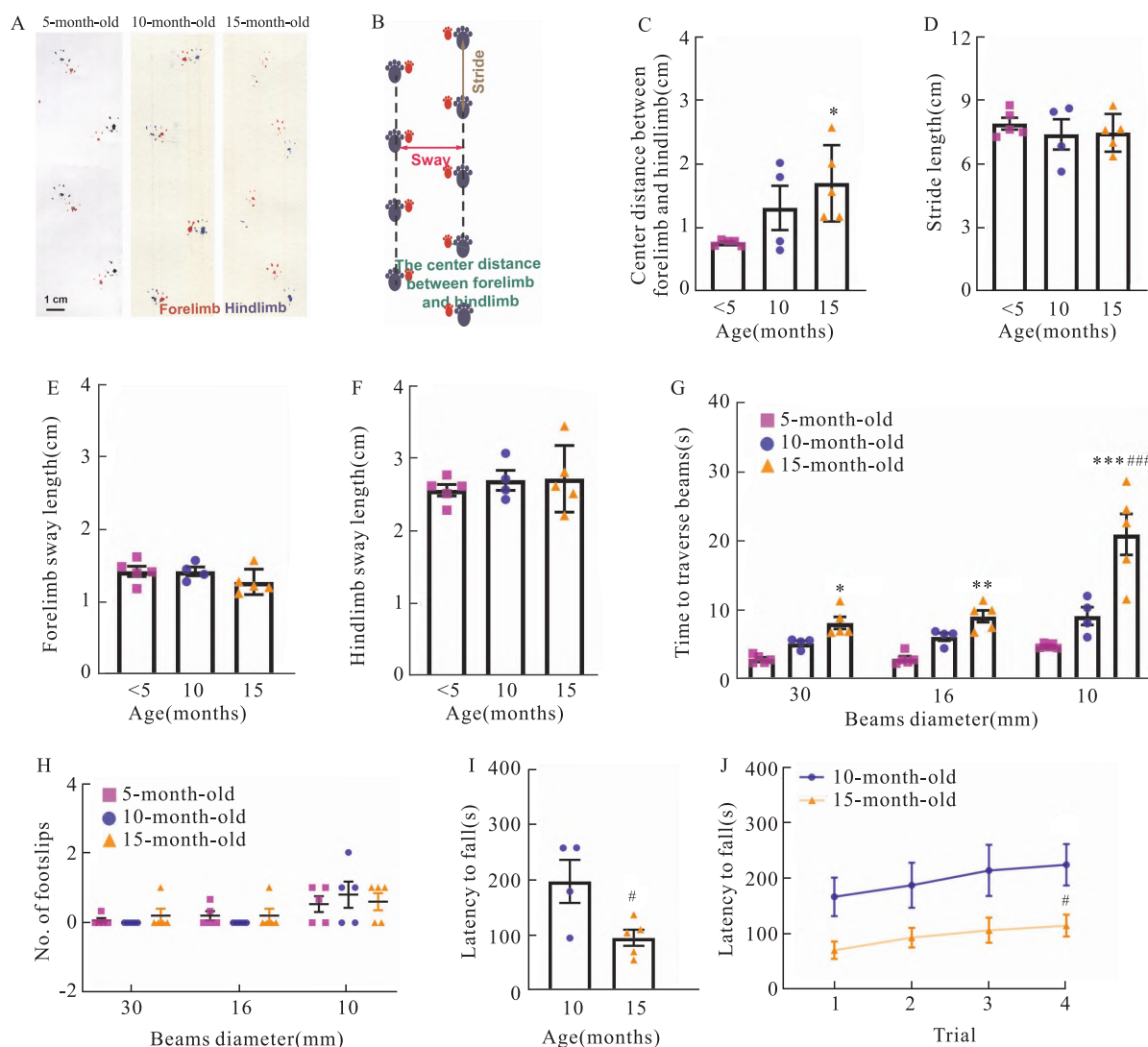


图1 不同年龄段小鼠足迹印记实验、高架平衡木实验和转棒实验结果

Fig.1 The results of footprint test, elevated beam-walk test and rotarod test in mice of different ages

A: Gait of <5-month-old, 10-month-old and 15-month-old mice tested with a footprint assay. The red and blue ink footprints represented the forelimb and hindlimb footprints of mice, respectively; B: Diagram of parameters measured in footprint analysis; C - E: Comparison of the center distance between forelimb and hindlimb, lengths of stride, forelimb sway length and hindlimb sway length in mice of different ages; G - H: Comparison of the average time of traverse the round beams and the average number of missteps for hindlimbs in mice of different ages; I: Comparison of latency to fall measurements of 10-month-old and 15-month-old mice in the rotarod test; J: Comparison of latency to fall measurements for each trial in rotarod test of 10-month-old and 15-month-old mice in the rotarod test; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs <5-month-old mice; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs 10-month-old mice group.

程度、运动平衡和运动协调能力出现缺陷。

2.2 随着年龄的增加,小鼠小脑截面积及浦肯野细胞胞体体积减少 小鼠小脑组织切片组织免疫荧光染色,10月龄和15月龄小鼠小脑正中矢状切横截面积的测量结果显示,与10月龄小鼠相比,15月龄小鼠的小脑横截面积减小($t = 2.899$, $P = 0.034$) (图2A、2B)。对小鼠小脑的第V和第VI小叶浦肯野细胞的密度和胞体体积进一步测量结果显示,与

10月龄小鼠相比,15月龄小鼠的浦肯野细胞胞体体积减少($t = 6.269, 3.927$, 均 $P < 0.01$),但细胞密度没有显著性差异(均 $P > 0.05$) (图2C-2H)。上述结果显示随着年龄的增加,小鼠小脑体积和浦肯野细胞胞体体积减少,但浦肯野细胞密度不受影响。

2.3 随着年龄的增加,小鼠小脑中 PDK1 蛋白表达量下调,且 rpS6 磷酸化和 PKC γ 蛋白表达量下调 免疫印迹分析结果显示,随着年龄的增加,

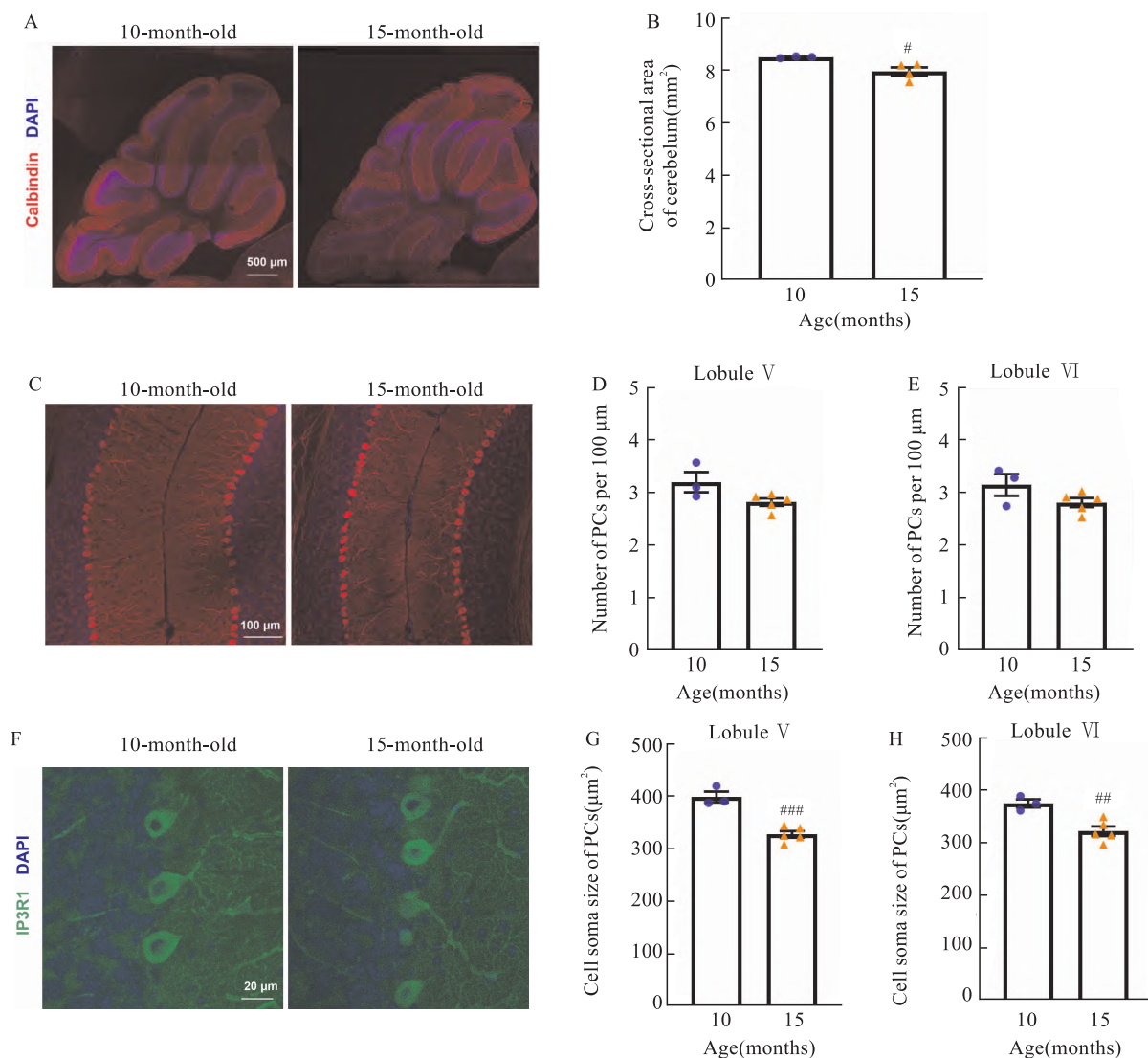


图2 不同年龄段小鼠小脑组织切片免疫荧光染色结果

Fig. 2 Results of immunofluorescence staining of cerebellum sections of mice of different ages

A: Immunostaining of cerebellar vermis median sagittal tissue sections in 10-month-old and 15-month-old mice; PCs and their protrusions were labeled with Calbindin antibody, and the nucleus was labeled with DAPI $\times 100$; B: Comparison of the sagittal cross-sectional area of the cerebellar vermis in mice of different ages; C: Immunostaining of cerebellar vermis median sagittal tissue sections in 10-month-old and 15-month-old mice $\times 200$; D, E: Comparison of the number of PCs per 100 μm length in the V and VI lobes of the cerebellum in mice of different ages; F: Immunostaining of cerebellar vermis median sagittal tissue sections in 10-month-old and 15-month-old mice; PCs with antibodies against IP3R1 $\times 800$; G, H: Comparison of the cell soma size of PCs in the V and VI lobes of the cerebellum in mice of different ages; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs 10-month-old mice.

PDK1 蛋白表达量降低 ($t = 3.255, P = 0.017$) (图 3A)。此外,15 月龄小鼠小脑中 PKC γ 蛋白表达水平低于年轻小鼠 ($t = 2.671, P = 0.037$) (图 3B),并且 15 月龄小鼠小脑中 rpS6 磷酸化水平低于年轻小鼠 ($t = 3.398, P = 0.015$) (图 3C)。结果表明随着年龄的增加,小鼠小脑中 PDK1 表达下调,并且 rpS6 磷酸化水平和 PKC γ 表达水平也下调。

2.4 随着年龄的增加,小鼠小脑中 AKT 蛋白表达量下调 免疫印迹分析检测结果显示,15 月龄小鼠小脑中 AKT 蛋白表达水平低于 <5 月龄小鼠 ($t = 2.956, P = 0.025$) (图 4),证明随着年龄增加,小脑

组织中 AKT 蛋白表达量下调。

3 讨论

小脑功能衰退会导致衰老进程中运动缺陷。本研究结果表明,与年轻小鼠 (<5 月龄) 相比,15 月龄小鼠表现出运动平衡和运动协调能力缺陷,而 10 月龄小鼠运动平衡和运动协调能力未受影响。上述结果证明,衰老进程伴随着运动调控功能缺陷的发生。同时,既往研究^[12]也证明小脑中细胞衰老的遗传标志物比大脑其他区域积累得更慢,进而导致小脑相较于其他脑区,其衰老进程发展较慢。这也有

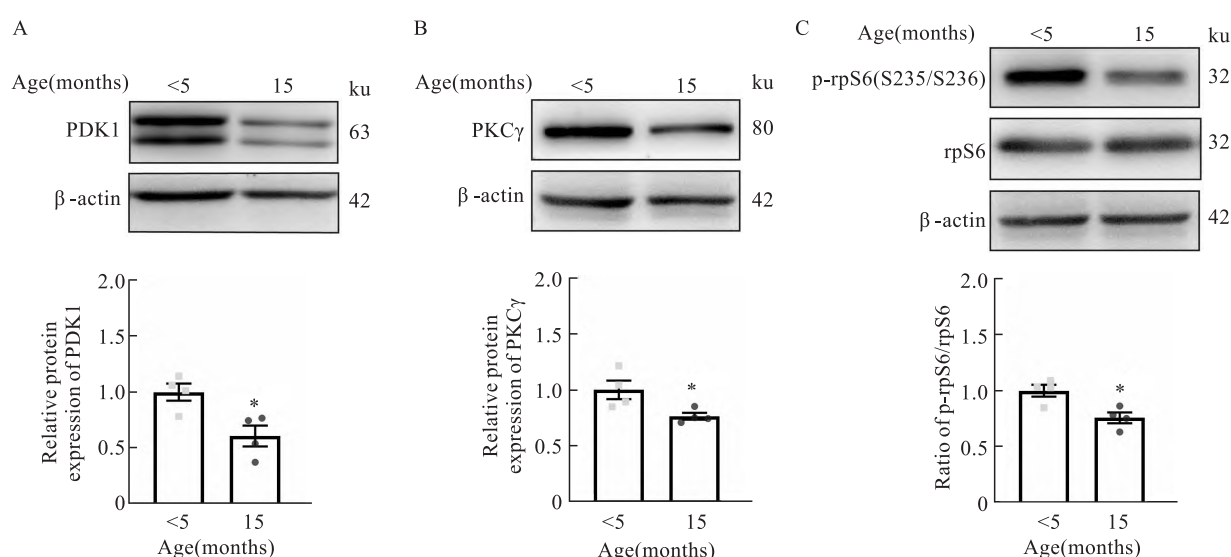


图 3 不同年龄段小鼠小脑组织中 PDK1、PKC γ 、rpS6、p-rpS6 蛋白表达水平的比较 ($n = 4$)

Fig. 3 Comparison of the expression level of the PDK1, PKC γ and the phosphorylation of rpS6 in the cerebellum of mice of different ages ($n = 4$)

A - C: Detection of PDK1 (A), PKC γ (B), rpS6, p-rpS6 (C) protein expression levels in the cerebellar tissues of mice by Western blot; * $P < 0.05$ vs <5-month-old mice.

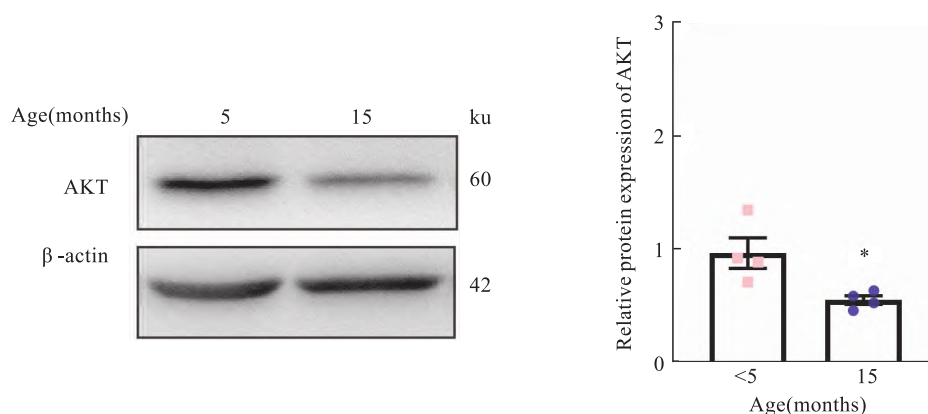


图 4 不同年龄段小鼠小脑组织中 AKT 蛋白表达水平的比较 ($n = 4$)

Fig. 4 Comparison of the expression level of the AKT in the cerebellum of mice of different ages ($n = 4$)

Detection of AKT protein expression levels in the cerebellar tissues of mice by Western blot; * $P < 0.05$ vs <5-month-old mice.

助于解释本研究结果中,小鼠直到 15 月龄才表现出运动平衡和运动协调能力缺陷。此外,本课题组之前的研究^[11]证明与对照小鼠相比,浦肯野细胞特异性缺失 PDK1 的小鼠表现出运动平衡与协调能力缺陷。上述结果提示,衰老与浦肯野细胞特异性缺失 PDK1 导致的小鼠出现运动能力障碍相似,因此研究小鼠衰老过程中的 PDK1 功能,有助于更好地理解衰老的发生发展。

蛋白激酶 PDK1 能够磷酸化并激活大部分 AGC 家族蛋白激酶。本课题组之前的研究^[11]证明浦肯野细胞中特异性缺失 PDK1 导致小鼠浦肯野细胞胞体体积降低和小脑体积减少。而本研究证明随着年龄的增加,小鼠小脑体积和浦肯野细胞胞体体积减小,但是小脑浦肯野细胞密度无显著改变。综上所述,浦肯野细胞中特异性缺失 PDK1 与年龄增加导致的小脑形态改变具有高度相似性。尽管进行了数十年的研究,但是 PDK1 在衰老进程中的调控机制在很大程度上仍然未知。既往研究^[10]发现抑制 PDK1 的表达促进了内皮细胞衰老和凋亡。但是有研究^[13]显示,抑制 PDK1 的表达能够通过降低 PDK1、AKT、核因子 κ B 激酶亚基 β 抑制因子和同源性磷酸酶张力蛋白的活性,抑制核糖核酸组成的正反馈通路,进而抑制核因子 κ B 和 mTOR 信号通路,最终逆转人真皮成纤维细胞的细胞衰老。上述研究对于 PDK1 在衰老进程中的调控方向持相反观点,但是依旧提示 PDK1 在衰老进程中可能起到一定作用。本研究结果表明随着年龄的增加,小脑中 PDK1 表达量降低,提示 PDK1 在小脑衰老进程中可能起着负调控作用,即 PDK1 可能具有延缓小脑衰老进程的作用。

小脑浦肯野细胞中高表达 PKC γ ,其编码基因 *Prkcg* 发生点突变,会导致浦肯野细胞退行,进而导致 14 型脊髓小脑共济失调^[14]。本课题组前期研究^[11]表明特异性浦肯野细胞 PDK1 的缺失能导致磷酸化 rpS6 水平和 PKC γ 蛋白表达水平下调,进而调控浦肯野细胞出生后的发育。本研究中也观察到随着年龄的增加,PDK1 蛋白质水平下降,并伴有 rpS6 磷酸化水平和 PKC γ 蛋白质表达水平的下降。此外,研究^[15]证明,骨骼肌中缺失 AKT 功能导致小鼠运动功能受损,进而导致其寿命缩短,提示 AKT 可能发挥延缓衰老的功能。并且 PDK1 能够通过磷酸化调控 AKT 活性进而抑制神经元凋亡^[11]。本研究观察到随着年龄的增加,AKT 蛋白水平下降。上述结果提示 PDK1 可能通过调控 rpS6 磷酸化以及

PKC γ 和 AKT 表达,调控生命进程中小脑体积和浦肯野细胞胞体体积,进而影响小脑相关的运动功能。

综上所述,PDK1 在衰老小鼠的浦肯野细胞形态维持和小脑运动功能调控中发挥重要作用,更详尽的分子机制有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 王旭蕾,储柱平,王惠敏,等. KAT7 促进软骨细胞衰老[J]. 安徽医科大学学报,2024,59(2):293-7. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.02.018.
- [1] Wang X L, Chu Z P, Wang H M, et al. KAT7 promotes the aging of cartilage cellular senescence [J]. Acta Univ Med Anhui,2024,59(2):293-7. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.02.018.
- [2] Haduch A, Danek P J, Kuban W, et al. Cytochrome P450 2D (CYP2D) enzyme dysfunction associated with aging and serotonin deficiency in the brain and liver of female Dark Agouti rats [J]. Neurochem Int,2022,152:105223. doi:10.1016/j.neuint.2021.105223.
- [3] Noda S, Sato S, Fukuda T, et al. Loss of Parkin contributes to mitochondrial turnover and dopaminergic neuronal loss in aged mice [J]. Neurobiol Dis,2020,136:104717. doi:10.1016/j.nbd.2019.104717.
- [4] Hu Z, Luo Y, Liu Y, et al. Partial inhibition of class III PI3K vps-34 ameliorates motor aging and prolongs health span [J]. PLoS Biol,2023,21(7):e3002165. doi:10.1371/journal.pbio.3002165.
- [5] Shin M G, Lee J W, Han J S, et al. Bacteria-derived metabolite, methylglyoxal, modulates the longevity of *C. elegans* through TORC2/SGK-1/DAF-16 signaling [J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2020,117(29):17142-50. doi:10.1073/pnas.1915719117.
- [6] Peterson P P, Liu Z. Identification and characterization of rapidly accumulating *sch9 Δ* suppressor mutations in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. G3,2021,11(7):jkab134. doi:10.1093/g3journal/jkab134.
- [7] Ogura M, Kaminishi T, Shima T, et al. Microautophagy regulated by STK38 and GABARAPs is essential to repair lysosomes and prevent aging [J]. EMBO Rep,2023,24(12):e57300. doi:10.15252/embr.202357300.
- [8] Yin Z, Guo X, Qi Y, et al. Dietary restriction and rapamycin affect brain aging in mice by attenuating age-related DNA methylation changes [J]. Genes,2022,13(4):699. doi:10.3390/genes13040699.
- [9] Chen Y R, Li Y H, Hsieh T C, et al. Aging-induced Akt activation involves in aging-related pathologies and A β -induced toxicity [J]. Aging Cell,2019,18(4):e12989. doi:10.1111/accel.12989.
- [10] Shan H, He Y, Hao S, et al. Vps15 is critical to mediate autophagy in AngII treated HUVECs probably by PDK1/PKC signaling pathway [J]. Life Sci,2019,233:116701. doi:10.1016/j.lfs.2019.116701.

- [11] Liu R, Xu M, Zhang X Y, et al. PDK1 regulates the maintenance of cell body and the development of dendrites of Purkinje cells by pS6 and PKC γ [J]. *J Neurosci*, 2020, 40(29): 5531–48. doi:10.1523/JNEUROSCI.2496–19.2020.
- [12] Liang K J, Carlson E S. Resistance, vulnerability and resilience: a review of the cognitive cerebellum in aging and neurodegenerative diseases [J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2020, 170:106981. doi:10.1016/j.nlm.2019.01.004.
- [13] An S, Cho S Y, Kang J, et al. Inhibition of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) can revert cellular senescence in human dermal fibroblasts [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(49):31535–46. doi:10.1073/pnas.1920338117.
- [14] Pilo C A, Baffi T R, Kornev A P, et al. Mutations in protein kinase C γ promote spinocerebellar ataxia type 14 by impairing kinase autoinhibition [J]. *Sci Signal*, 2022, 15(753): eabk1147. doi:10.1126/scisignal.abk1147.
- [15] Sasako T, Umehara T, Soeda K, et al. Deletion of skeletal muscle Akt1/2 causes osteosarcopenia and reduces lifespan in mice [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1):5655. doi:10.1038/s41467–022–33008–2.

Functional study of PDK1 in the cerebellum of aging mice

Peng Wenjie¹, Qi Cui¹, Liu Rui¹, Gao Jun^{1, 2}

(¹*Dept of Neurobiology, School of Basic Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 211166*; ²*Shanghai Key Laboratory of Craniomaxillofacial Development and Diseases, Shanghai Stomatological Hospital & School of Stomatology, Fudan University, Shanghai 200001*)

Abstract **Objective** To investigate the effects of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) on the purkinje cells (PCs) in aging mice. **Methods** The footprint test, elevated beam-walk test and rotarod test were used to measure the gait traits, motor balance and motor coordination of mice. Immunofluorescence was used to detect the structure of the cerebellum and the morphology of cells in the cerebellum. The expression level of PDK1, protein kinase C gamma (PKC γ) and protein kinase B (also known as AKT) and the phosphorylation of ribosomal protein S6 (rpS6) in the cerebellum were detected by Western blot. **Results** The mice showed motor defects in the overlap between forelimb and hindlimb, motor balance and motor coordination ability in an age-dependent manner. Furthermore, the cerebellum and the soma size of the PCs decreased in an age-dependent manner. However, the density of the PCs was not affected by age. Additionally, the expression level of the PDK1, PKC γ , AKT and the phosphorylation of rpS6 in the cerebellum were reduced with age. **Conclusion** The cerebellar size and the cell soma size of PCs decrease in the old mice. These effects may contribute to the reduction of the expression of PKC γ and AKT and the phosphorylation of rpS6 in the old mice, ultimately affecting the cerebellar motor coordination.

Key words aging; purkinje cells; PDK1; rpS6; PKC γ ; AKT

Fund programs National Natural Science Foundation of China (Nos. 32371053, 32100811); Natural Science Research Project in Higher Education Institutions of Jiangsu Province (No. 21KJB180008)

Corresponding authors Gao Jun, E-mail: gaojun_kq@fudan.edu.cn; Liu Rui, E-mail: liurui_njmu@njmu.edu.cn