

乙醛对人类神经 tau 磷酸化的影响*

华茜 聂春来 陈永辉 张岱¹⁾ 赫荣乔**

(视觉信息加工开放实验室, 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 用乙醛对人类神经 tau 进行醛胺化, 通过 NCLK (neuronal cdc2-like protein kinase) 和 [γ -³²P] ATP 对其磷酸化. 磷酸化的产物经胃蛋白酶降解及 HPLC (C-18) 分析降解片段, 发现醛胺化 tau 的降解物中有两个新的磷酸化肽段 (A4 和 A6).

关键词 tau, 磷酸化, 乙醛, 老年性痴呆

学科分类号 Q344

人类神经 tau 蛋白具有稳定细胞微管系统、调控神经细胞生长发育的功能^[1], 并在神经系统的形成和轴突的通讯传导中起着至关重要的作用^[2]. tau 是一种磷酸化蛋白, 其功能主要通过磷酸化调节. 超磷酸化可导致 tau 蛋白分子的聚集, 形成配对螺旋样纤维^[3], 这是老年性痴呆在病理学上的基本病变之一. 研究表明, NCLK 可以催化 tau 蛋白的磷酸化, 在体外能引起 tau 分子聚集^[4].

最近, Cullen 和 Halliday^[5]在慢性酒精中毒导致的痴呆病人脑中发现了配对螺旋样纤维的存在. 我们观察到乙醇和乙醛在体外较低浓度下能导致 tau 分子聚集^[6,7]. 乙醇在体内被乙醇脱氢酶转变为乙醛, 后者是毒性较强的分子, 导致大脑等器官的损伤. 因此我们研究了乙醛对 tau 蛋白磷酸化的影响.

1 材料与方法

1.1 实验材料

分离纯化基因重组人类神经 tau (htaur-40) 所用 Q-Sepharose 及 SP-Sepharose 树脂购于 Pharmacia 公司. [γ -³²P] ATP 和肝素分别购于 DuPont 和 Sigma 公司. 人类神经 tau 的全基因克隆由英国剑桥大学 Goedert 提供^[8], 所表达出的蛋白质与天然序列一致, 宿主菌为 *E. coli* BL21-DE3. 通过摇瓶培养、匀浆、离心 (12 000 r/min, 4℃, 10 min), 上清液过 Q-Sepharose、SP-Sepharose 及 Sephadex G50, 收集蛋白质. 其他试剂均为分析纯级.

1.2 tau 蛋白的醛胺化

取 0.5 mg tau, 溶于 0.1 mol/L 磷酸缓冲液

(pH 7.0), 加入 0.05% 乙醛, 25℃ 过夜. 过 Sephadex G25 分子筛柱 (1 cm × 30 cm), 收集蛋白质 (280 nm), 冷冻干燥备用.

1.3 tau 蛋白的磷酸化

NCLK 的分离纯化见参考文献 [9]. 取 0.5 mg tau 蛋白, 溶于 500 μ l 50 mmol/L Hepes 缓冲液 (15 mmol/L MgCl₂; 1.0 mmol/L DTT; 1.0 mmol/L PMSF; 0.5 mmol/L [γ -³²P] ATP; lupeptin 和 pepstatin 各 0.5 μ l, pH 7.2), 加入 100 U NCLK, 30℃ 保温过夜. 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 检验磷酸化的效果^[10]. 按所需浓度将肝素 (200 mg/L) 加入反应体系. 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后抽干用于放射自显影.

1.4 放射性计数

将磷酸化样品 (2 μ l) 置于滤纸上用闪烁计数器进行放射性计数.

2 结果与讨论

2.1 人类神经 tau 蛋白的醛胺化

用不同浓度的乙醛与人类神经 tau-40 保温, 醛胺化 tau 在 SDS-PAGE 上的迁移率变慢 (图 1), 并且随乙醛浓度的增加而变得明显. tau 含有 44 个 Lys 残基, 其正电荷对于稳定分子的天然构象有重要作用^[11], 醛基能与 N 端 α 及 Lys ϵ 氨基反应,

* 国家自然科学基金 (39970236) 及国家重点基础研究发展规划项目 (G1999054007).

¹⁾ 北京大学第六医院.

** 通讯联系人.

Tel: 010-64889876, E-mail: herq@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2001-04-29, 接受日期: 2001-07-05

形成 Schiff's 碱基, 分子所含正电荷减少, 使得 tau 的构象发生改变. 这种结构上的改变可能导致 tau 蛋白在 SDS-PAGE 中的迁移变慢^[12].

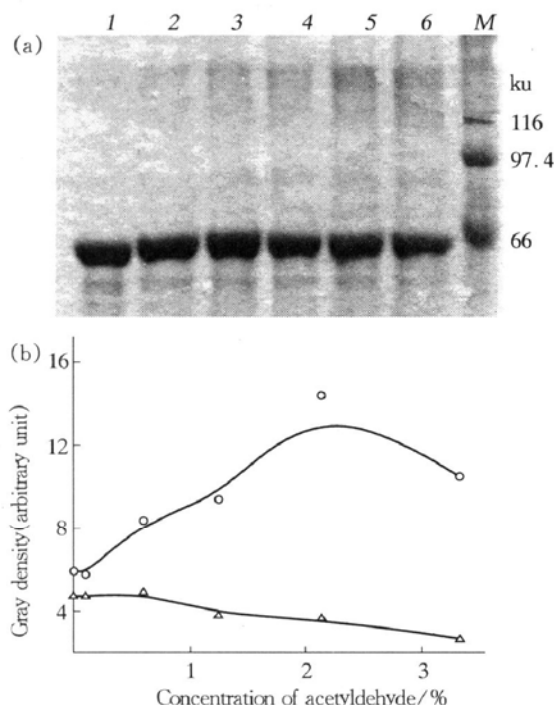


Fig. 1 Tau was treated with acetyldehyde at different concentrations

(a) the acetyltau on SDS-PAGE. 1 ~ 6: tau treated with acetyldehyde at 0.0, 0.1, 0.6, 1.25, 2.14 and 3.33%, respectively; M molecular marker. (b) the same data are from the SDS-PAGE with a measurement of the gray density of the protein bands. 1, 2: the gray density of tau monomers and that of tau dimers, respectively.

2.2 醛胺化 tau 的磷酸化

在相同条件下, NCLK 磷酸化的醛胺化 tau 产物与对照样品相比在 SDS-PAGE 中的迁移速率明显变慢 (图 2). Paudel 等^[4]报道, tau 被磷酸化的程度越高, 电泳迁移速度越慢. 因此, 图 2 的结果提示经乙醛处理的 tau 可能有更多的位点发生磷酸化. 另外需要说明的是, tau-40 在表达过程中不形成包涵体^[13], 具有完全的生物活性, 因此, 本文所获得的结果与天然 tau 蛋白一致.

2.3 醛胺化对磷酸化的影响

老年性痴呆和慢性酒精中毒患者的大脑中均已观察到配对螺旋样纤维 (PHF) 的存在^[14], 并且 PHF 中的 tau 分子被超磷酸化^[5]. 我们将 NCLK 磷酸化的醛胺化 tau 用胃蛋白酶水解, 通过 HPLC G-18 反向柱分离, 观察到了两个放射性标记的新肽段 (A4 和 A6), 它们分别在 35 和 49 min 被洗

脱出来 (表 1), 而在对照样品中没有这两个放射性标记片段. 结果提示在 NCLK 的作用下, 乙醛可能使 tau 分子错折叠而产生超磷酸化^[15].

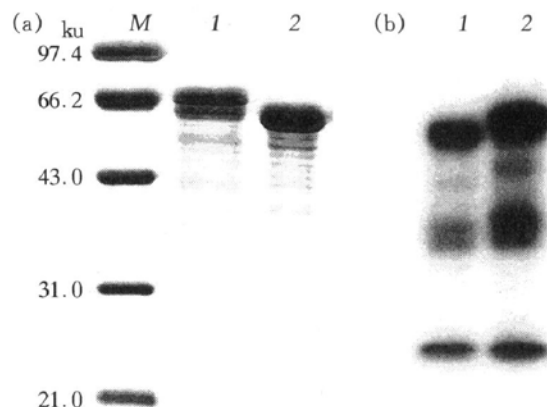


Fig. 2 Phosphorylation of tau and acetyltau on SDS PAGE

Tau (1.0 mg/ml) was phosphorylated by NCLK (100 U) in 50 mmol/L Hepes buffer (pH 7.2) containing 15 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF, 0.5 mmol/L ATP and aprotinin (0.5 μl) at 30 °C overnight. (a) 1: phosphorylated tau; 2: tau as control. (b) autoradiograph. 1: phosphorylated tau (Ptau); 2: phosphorylated acetyltau (PAtau).

Table 1 Isolation of the peptides from Ptau and PAtau digested by pepsin with HPLC

Ptau		PAtau	
Peptides' number	t (elution) / min	Peptides' number	t (elution) / min
P1	22.75	A1	22.70
P2	29.30	A2	29.10
P3	30.80	A3	31.20
		A4	35.63
P4	40.10	A5	40.00
		A6	49.52

P: Elution time for Ptau; A: Elution time for PAtau.

致谢 加拿大 McGill 大学 Paudel 博士提供了人类神经 tau 蛋白克隆; 刘阳在该工作中给予了大量帮助, 在此一并表示感谢.

参 考 文 献

- 1 Drechsel D N, Hyman A A, Cobb M H, *et al.* Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell*, 1992, **3** (10): 1141~1154
- 2 Brion J P, Guilleminot J, Couchie D, *et al.* Both adult and juvenile tau microtubule-associated proteins are axon specific in the developing and adult rat cerebellum. *Neurosci*, 1988, **25** (1): 139~146
- 3 Beyreuther K, Masters C L. Alzheimer's disease: tangle disentanglement. *Nature*, 1996, **383** (6600): 476~477

- 4 Paudel H K. Phosphorylation by neuronal cdc2-like protein kinase promotes dimerization of tau protein *in vitro*. J Biol Chem, 1997, **272** (45): 28328~ 28334
- 5 Cullen K M, Haliday G M. Neurofibrillary tangles in chronic alcoholics. Neuropath Appl Neurobiol, 1995, **21** (4): 312~ 318
- 6 Luo J Y, Li W, He R Q. Formation of a new fluorescence of human neuronal tau protein. Chin Sci Bul, 1999, **44** (3): 233~ 235
- 7 Luo J Y, He R Q. Effect of acetaldehyde on aggregation of human neuronal tau. Pro Pep Lett, 1999, **6** (2): 105~ 110
- 8 Goedert M, Spillantini M G, Potier M C, *et al.* Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. EMBO J, 1989, **8** (2): 393~ 399
- 9 Zhong Q, Huang Q Q, Lee K Y, *et al.* Reconstitution of neuronal cdc2-like kinase from Bacteria-expressed Cdc-5 and an active fragment of the brain-specific activator. J Biol Chem, 1995, **270** (18): 10847~ 10854
- 10 Hemant K P. The regulatory Ser262 of microtubule-associated protein tau is phosphorylated by phosphorylase kinase. J Biol Chem, 1997, **272** (3): 1777~ 1785
- 11 Goedert M, Jakes R, Spillantini M G, *et al.* Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer'-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. Nature, 1996, **383** (6600): 550~ 553
- 12 Scott C W, Fieles A, Sygowski L A, *et al.* Aggregation of tau protein by aluminum. Brain Research, 1993, **628** (1~ 2): 77~ 84
- 13 冯小黎. 重组包涵体蛋白的折叠复性. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28 (4): 482~ 489
Feng X L. Prog Biochem Biophys, 2001, 28 (4): 482~ 489
- 14 聂春来. 配对螺旋样纤维 (PHF) -tau 与神经细胞的死亡. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28 (4): 441~ 443
Nie C L. Prog Biochem Biophys, 2001, 28 (4): 441~ 443
- 15 周筠梅. 蛋白质的错折叠与疾病. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27 (6): 576~ 578
Zhou J M. Prog Biochem Biophys, 2000, 27 (6): 576~ 578

Effect of Acetaldehyde on Phosphorylation of Human Neuronal tau^{*}

HUA Qian, NIE Chun-Lai, CHEN Yong-Hui, ZHANG Dai¹⁾, HE Rong-Qiao^{**}

(Laboratory of Visual Information Processing, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Human neuronal tau-40 was acetylated and then phosphorylated by neuronal cdc2-like kinase (NCLK) with [γ -³²P] ATP, and then the phosphorylated acetyl-tau (PAtau) was digested with pepsin. Compared with the phosphorylated tau (Ptau), two new fractions of radioactivity from PAtau were obtained as it was eluted by C-18 column on HPLC.

Key words Tau, phosphorylation, acetaldehyde, Alzheimer's disease

^{*} This work was supported by grants from the National Natural Foundation of Sciences (39970236) and National Key Foundation of Development and Research (G1999054007).

¹⁾ The Sixth Hospital, Rejing University.

^{**} Corresponding author. Tel: 86-10-64889876, E-mail: herq@sun5.ibp.ac.cn

Received: April 29, 2001 Accepted: July 5, 2001