

利用受体漂白荧光共振能量转移技术研究 β -分泌酶在活细胞内的二聚化*

陆锦玲 储 军 杨 杰 曾绍群 骆清铭 张智红**

(华中科技大学 Britton Chance 生物医学光子学研究中心, 武汉光电国家实验室(筹), 武汉 430074)

摘要 β 淀粉样肽(A β)在阿尔茨海默病(AD)患者脑内的产生、聚集和沉积是 AD 的一个固有病理特征, 也被普遍认为是 AD 的重要发病机理之一. β -分泌酶(BACE)对淀粉样前体蛋白(APP)的裂解是 A β 产生的关键步骤, β -分泌酶抑制剂是 AD 药物治疗的一个重要发展方向, 因此对 BACE 结构的了解具有重要意义. 利用受体漂白荧光共振能量转移(FRET)技术首次在活细胞内研究 BACE 的二聚化结构. 通过基因工程技术分别构建了青色荧光蛋白(CFP)和黄色荧光蛋白(YFP)标记的全长 BACE (BACE-FL)和 BACE 活性部分(BACE-NT), 应用共聚焦荧光显微镜和受体漂白 FRET 技术研究了 BACE-FL 和 BACE-NT 在细胞中的表达和定位, 以及它们在活细胞内的存在形式. 实验结果表明: a. BACE-FL 在内质网至细胞膜均有表达, 主要分布在高尔基体、细胞膜和内体等细胞器中, 而 BACE-NT 则被滞留在内质网里. b. BACE-NT 是单体结构, 而 BACE-FL 在活细胞内则以二聚体的形式存在. 证明, BACE 的跨膜序列和 C 端对 BACE 的转运和定位具有重要作用, 其二聚体结构由这些序列决定, 而不由其活性位点决定.

关键词 β -分泌酶, 二聚化, 阿尔茨海默病, 荧光共振能量转移, 受体漂白

学科分类号 Q631

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种常见的中枢神经系统退行性疾病, 其主要的病理特征为胞内神经纤维缠结和胞外淀粉样斑块(senile plaque)的沉积. 淀粉样斑块的主要组成是 4 ku 的 β 淀粉样肽 (amyloid β -peptide, A β). 目前已有多种证据表明淀粉样蛋白在 AD 病人脑内产生、聚集以及沉积是这种神经退行性疾病的一个固有的病理特征. A β 是由其前体蛋白——淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP)经两种蛋白酶(β -分泌酶和 γ -分泌酶)依次酶切水解而产生^[1].

由于 β -分泌酶是 A β 产生的关键酶, 与 AD 的发生密切相关, 因此被认为是 AD 治疗的重要靶标. 然而, 直到 1999 年, β -分泌酶的基因才被 4 个独立的研究小组用不同的方法同时鉴定出来^[2~5]. β -分泌酶 (beta-site APP cleaving enzyme, BACE) 是一种 I 型跨膜天冬氨酸蛋白酶, 基因定位于人 11 号染色体长臂 2 区 3 带(11q23), 在脑组织中高度表达. BACE 编码 501 个氨基酸残基, 其中大部分为 N 端胞外区域(1~460), 是蛋白质的活性部位. 另外, 还有一个跨膜区域(461~477)以及一小

段胞质内 C 端尾巴(478~501). BACE 有 2 个活化位点, 分别位于 93~96 和 289~292 氨基酸残基位置, 2 个活化位点都包括天冬氨酸蛋白酶的保守序列 DT/SGT/S.

BACE 基因的鉴定使针对 β -分泌酶的抑制剂开发成为可能. 目前, BACE 的活性部分, 即截去跨膜序列的可溶性 BACE (BACE-NT, 对应于氨基酸残基 1~454), 已经被克隆和纯化, 广泛应用于体外 β -分泌酶抑制剂的筛选^[6]. 然而, 在基于可溶性 BACE 结构来设计抑制剂的过程中遇到了困难, 因为其晶体结构中有一个异常的大缝隙. 因此, 对 BACE 结构与功能关系的进一步了解具有重要意义. 最近, Haass 小组利用非变性凝胶电泳和免疫共沉淀的方法, 发现 BACE 以同源二聚体的形式存在^[7,8]. 然而, 这些传统的生物化学方法都需要对细胞进行破碎, 无法提供活细胞生理条件下的实验

* 国家高技术研究发展计划(863) (2006AA020801)和国家自然科学基金(90508003)资助项目.

** 通讯联系人. Tel: 027-87792033, E-mail: czyzh@mail.hust.edu.cn

收稿日期: 2007-07-12, 接受日期: 2007-09-28

结果.

本文利用荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 技术首次在活细胞条件下无损伤地研究 BACE 的二聚化. FRET 是指能量从一个受激发的荧光基团以非辐射的方式转移到另一个荧光基团的物理现象. 这 2 个荧光基团分别称为供体(donor)和受体(acceptor). 当供体和受体之间存在发射/激发光谱重叠, 并且具有适当的偶极方向和距离范围(1~10 nm)时就能发生 FRET, 将供体的能量转移到受体上. 绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的颜色突变体——青色荧光蛋白(cyan fluorescent protein, CFP)和黄色荧光蛋白(yellow fluorescent protein, YFP)是最常用的 FRET 荧光对. 目前, 已有多种 CFP 和 YFP 可供选择, 如荧光增强型的 CFP(ECFP)和 YFP(EYFP), 量子产率更高、寿命更长的 CFP(Cerulean)^[9], 成熟更快、更抗酸性的 YFP(Venus 和 Citrine)^[10,11]. 为了避免由于荧光蛋白自身的二聚化倾向所引起的二聚化假象, 我们选择单体的 Cerulean (monomeric Cerulean, mCerulean)^[9]和单体的 Citrine (monomeric Citrine, mCitrine)^[10]作为 FRET 荧光对.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和细胞株. pBACE-FL 和 pBACE-NT 质粒由德国 Ludwig Maximilians 大学的 Haass 博士惠赠, 是将全长的 BACE(BACE-FL)和 BACE-NT 基因克隆到 pcDNA4Myc/His/A 载体 (Invitrogen) 的 *EcoR* I 和 *Xho* I 位点所构建而成的^[7]. pmCerulean-N1 和 pmCitrine-N1 质粒分别由美国密歇根医学院的 Swanson 博士和美国 Vanderbilt 大学的 Piston 博士赠送. pEYFP-ER 质粒购自 Clontech 公司. HeLa 细胞系和大肠杆菌菌株 DH5 α 由本室保存.

1.1.2 试剂. 小牛血清、DMEM 培养基为 Gibco BRL 产品; 转染试剂 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司; 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、exTaq 保真 DNA 聚合酶购自日本 TaKaRa 公司; 引物由北京奥科公司合成; 质粒小量抽提试剂盒购自北京博大泰克公司.

1.1.3 共聚焦成像系统. Olympus FV1000 (Olympus corp, 日本).

1.2 质粒的构建

为了构建荧光蛋白(fluorescent proteins, FPs)标记的 BACE 融合蛋白 (BACE/FPs), 分别以

pmCerulean-N1 和 pmCitrine-N1 为模板, 用 PCR 方法扩增 mCerulean 和 mCitrine. 由于 mCerulean 和 mCitrine 都是 GFP 的突变体, 其序列具有同源性, 故用同一套引物进行 PCR 扩增. 上游引物为 5' AAT CTC GAG GGT GGC TCT GGA GGT TCT ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG 3' (下划线部分为 *Xho* I 酶切位点), 下游引物为 5' AGA ACC GGT GTC GAC CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC 3' (下划线部分为 *Age* I 酶切位点). 用 exTaq 保真聚合酶进行 PCR 反应(94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 共 30 个循环). PCR 产物用 *Xho* I 和 *Age* I 酶切后分别克隆到 pBACE-FL 和 pBACE-NT 质粒载体中, 构建出 pBACE-FL/CFP, pBACE-FL/YFP, pBACE-NT/CFP 和 pBACE-NT/YFP 质粒, 如图 1 所示. 所构建的质粒均通过酶切和测序鉴定.

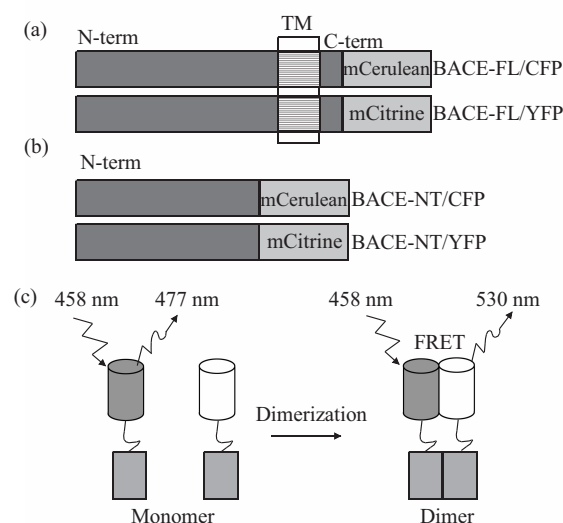


Fig. 1 Construction of BACE/FPs fusion proteins

(a) CFP and YFP were fused to c-terminus of full length BACE (BACE-FL) which has a luminal catalytic ectodomain and a transmembrane domain (TM). (b) CFP and YFP were fused to BACE-NT that lacks the TM region and the cytoplasmic tail. (c) Illustration of the occurrence of FRET between donor and acceptor.

1.3 细胞培养和转染

HeLa 细胞用含 10% 的小牛血清、100 mg/L 链霉素和 100 U/ml 青霉素的 DMEM 培养基, 置于 37 °C、CO₂ 浓度为 5% 的培养箱中培养. 细胞转染根据 Lipofectamine 2000 的说明书进行操作. 转染前一天, 将生长状态良好的 HeLa 细胞接种到自制的具有盖玻片小室的 35 mm 培养皿中(5×10⁵ 个/孔). 将重组质粒按照一定比例混合转染 HeLa 细胞, 每皿质粒用量为 300 ng. 转染 24 h 后用激光扫描共聚焦荧光显微镜观察荧光蛋白表达情况和进

行 FRET 检测。

1.4 共聚焦成像及 FRET 检测

使用 Olympus 的 FV1000 激光共聚焦扫描荧光显微镜系统对细胞进行多通道荧光成像。成像时使用 60×/NA1.35 油镜, 3×Zoom。分别用氩离子激光器的 458 nm 和 515 nm 激光作为 CFP 和 YFP 的激发光源, 选择带通 BP 470~500 nm 通道选择性探测 CFP 的荧光, 称为 CFP 通道, YFP 荧光采用带通 BP 530~580 nm 通道进行检测, 称为 YFP 通道。所有的转染细胞均在转染 24 h 后在无酚红的 DMEM (Sigma 公司)培养基中进行活体成像。

FRET 检测采用受体漂白技术。受体漂白 FRET (acceptor photobleaching FRET, apFRET)是新近发展起来的一种检测 FRET 的方法。其基本原理如下: 如果 2 个荧光分子存在能量转移, 对受体进行光漂白后其供体的荧光就会升高。通过检测供体荧光的增强计算 FRET 效率^[2]。受体漂白方案参考前人工作^[3]。具体如下: 在漂白前, 通过 CFP 通道(激光功率 3%)和 YFP 通道(激光功率 0.3%)分别获取 5 帧 CFP 和 YFP 的荧光图, 每帧图像间隔 1 s, 然后用氩离子激光器的 515 nm 激光对所感兴趣区域(region of interest, ROI)的 YFP 进行受体光漂白。激光功率设置为 20%, 设定漂白扫描次数为 20 次, 漂白时间为 3~10 s, 取决于漂白区域的大小。漂白完毕后, 立即以与漂白前相同的参数获取 5 帧 CFP 和 YFP 的荧光图。FRET 效率以供体荧光增强的百分数表示, 计算公式为: $E_F = (I' - I) \times 100 / I'$ 。其中 I 和 I' 分别是漂白前和漂白后的供体 CFP 的荧光强度。

1.5 统计学分析

每组实验都有 20 个以上相同的重复样品, 数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 。采用 t 检验进行实验组和对照组间的比较。 $P \leq 0.05$ 时认为有显著差异。采用 Origin 6.1 分析软件的双样品 t -test 进行分析。

2 结 果

2.1 荧光融合蛋白质粒的构建

为了在活细胞内检测 BACE 的二聚化, 将 mCerulean 和 mCitrine 分别连接到 BACE 的 C 端, 构建了 CFP 和 YFP 标记的融合蛋白, 如图 1 所示。全长的 BACE 包括一大段 N 端区域, 一个跨膜区域(TM)以及一小段胞质内 C 端尾巴, 为了与 BACE-NT 区别, 故称为 BACE-FL (full length BACE)。mCerulean 和 mCitrine 标记的 BACE-FL

分别命名为 BACE-FL/CFP 和 BACE-FL/YFP (图 1a)。BACE-NT (truncated BACE)是截去跨膜序列的可溶性 BACE (对应于氨基酸残基 1~454), 是 BACE 的活性部分。mCerulean 和 mCitrine 标记的 BACE-NT 分别命名为 BACE-NT/CFP 和 BACE-NT/YFP (图 1b)。为了简便起见, 下文提到 mCerulean 和 mCitrine 时均用 CFP 和 YFP 表示。

在 BACE 和 FPs 之间是柔性序列 GGSGGS, 使 BACE 能够自由地转动。如果 2 个 BACE 分子相互靠近并形成二聚体, FRET 供体(CFP)的能量将转移到受体(YFP)上, 从而检测到 FRET 的发生, 如图 1 c 所示。

2.2 荧光融合蛋白在 HeLa 细胞中的表达及定位

将 pBACE-FL/CFP 或 pBACE-NT/CFP 与 pEYFP-ER 按 1:1 的比例(150 ng:150 ng)转染 HeLa 细胞。pEYFP-ER 编码一个 EYFP, 在 EYFP 的 5'端有一段内质网(endoplasmic reticulum, ER)的定位序列, 3'端有一个 KDEL 的保留序列, 从而使 EYFP 融合蛋白能够定位并保留在内质网中, 该融合蛋白用于在活细胞内作内质网的标记。

共转染 24 h 后, 在共聚焦显微镜下观察 BACE-FL 和 BACE-NT 的表达和定位。图 2a 显示了 BACE-FL/CFP 与 EYFP-ER 共转染的 HeLa 细胞中 BACE-FL/CFP 和 EYFP-ER 的分布情况。可见, BACE-FL 在内质网至细胞膜均有表达, 主要分布在高尔基体、细胞膜和内体等位置(图 2a), 与文献报道的 BACE 主要定位一致, 说明荧光蛋白的连接没有影响 BACE 在细胞中的运输和定位。而缺乏跨膜序列和 C 端的 BACE-NT 则被滞留在内质网中, 与内质网标记蛋白 EYFP-ER 的定位一致(图 2b), 证明 BACE 的跨膜序列和 C 端对其正常的运输和定位具有重要的作用。

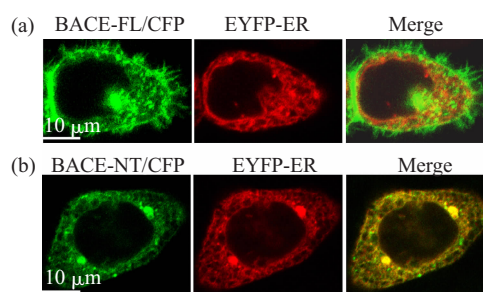


Fig. 2 Expression of BACE-FL and BACE-NT in HeLa cells 24 hours after transfection

(a) HeLa cells were co-transfected with pBACE-FL/CFP and pEYFP-ER.
(b) HeLa cells were co-transfected by pBACE-NT/CFP and pEYFP-ER.

2.3 受体漂白 FRET 检测 BACE 二聚化

为了验证 BACE-FL 在活细胞内是否以二聚体的形式存在, 采用受体光漂白的方法进行 FRET 检测. 将 BACE-FL/CFP 和 BACE-FL/YFP 以 1:2 的比例(100 ng:200 ng) 共转染 HeLa 细胞, 转染 24 h 后, 在共聚焦荧光显微镜下进行 FRET 检测. 进行光漂白前, 在显微镜下找到荧光表达适度的细胞, 用固定的成像参数对其分别进行 CFP 通道和 YFP 通道成像. 固定的成像参数设置如下: CFP 通道, 3%激光功率, PMT1 增益为 700; YFP 通道, 0.3%激光功率, PMT2 增益为 700. 如果 $I_{YFP} / I_{CFP} > 1$, 即对该细胞进行受体光漂白检测.

受体漂白方案详见实验方法部分. 漂白前和漂白后的 CFP 和 YFP 荧光图像如图 3a 所示, 受体漂白后, 漂白区域的 YFP 荧光被漂白, 而 CFP 荧光则有所增加. 图 3b 显示漂白前和漂白后的 CFP 和 YFP 荧光值变化曲线. I 值为 847.92, I' 为 1 028.42, FRET 效率为 17.55%. 说明 CFP 和 YFP 之间存在能量转移, BACE-FL 在细胞中以二聚体的形式存在.

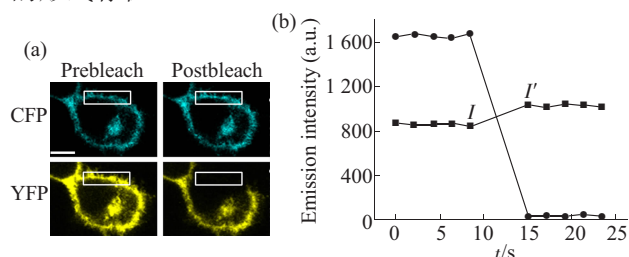


Fig. 3 Detection of BACE-FL dimerization by apFRET

(a) HeLa cells were co-transfected with BACE-FL/CFP and BACE-FL/YFP. A plasma membrane region (marked by the white rectangle) was photobleached 20 times at 515 nm. The fluorescence of CFP and YFP channels before and after bleaching was imaged. The scale bar represents 10 μ m. (b) The change of CFP and YFP fluorescence intensity in ROI before and after photobleaching. ■—■: CFP; ●—●: YFP.

以同样的方法研究 BACE-NT 在细胞内的存在状况. 将 BACE-NT/CFP 和 BACE-NT/YFP 以 1:2 的比例(100 ng:200 ng) 共转染 HeLa 细胞. 转染 24 h 后, 对 BACE-NT/CFP 和 BACE-NT/YFP 共表达的 HeLa 细胞进行受体漂白分析. 受体漂白方案与 BACE-FL 实验组一致. 从图 4 可看出, 受体漂白前后的 CFP 荧光强度变化不大, I 和 I' 分别为 372.96 和 374.63, FRET 效率仅为 0.4%. 这些结果说明, CFP 和 YFP 之间并没有发生 FRET, BACE-NT 在活细胞内没有形成二聚体, 以单体形式存在.

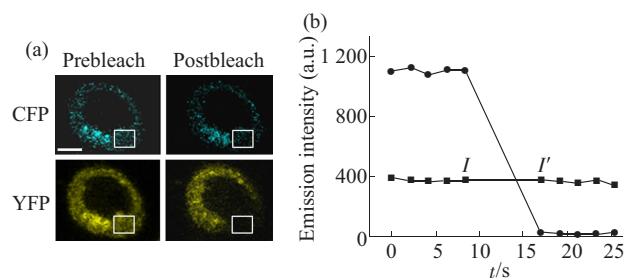


Fig. 4 Detection of FRET between BACE-NT/CFP and BACE-NT/YFP by acceptor photobleaching

(a) HeLa cells were co-transfected with BACE-NT/CFP and BACE-NT/YFP. A ROI (marked by the white rectangle) was photobleached 20 times at 515 nm. The fluorescence of CFP and YFP channels before and after bleaching was imaged. The scale bar represents 10 μ m. (b) The change of CFP and YFP fluorescence intensity in ROI before and after photobleaching. ■—■: CFP; ●—●: YFP.

实验组和对照组的 FRET 效率统计结果如图 5 所示. 以单独转染 BACE-FL/CFP 的细胞作为阴性对照, 从图 5 中可看出其 FRET 效率为 $(3.32 \pm 0.55)\%$. BACE-FL 实验组的 E_F 为 $(12.90 \pm 0.73)\%$, 与阴性对照有显著性差异 ($P < 0.05$), 而 BACE-NT 实验组的 E_F 仅为 $(3.80 \pm 0.74)\%$, 与对照组没有显著差异 ($P > 0.05$). 这些结果表明, BACE-FL/CFP 和 BACE-FL/YFP 在细胞内能够发生能量转移, 证明 BACE-FL 在活细胞内以二聚体的形式存在, 而 BACE-NT 则以单体形式存在.

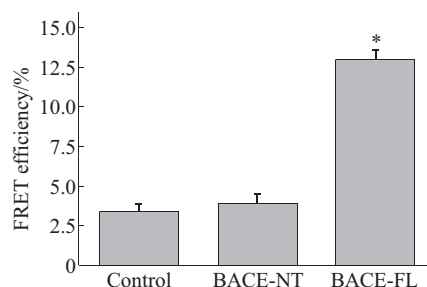


Fig. 5 The efficiency of FRET (E_F) of BACE/FPs

The E_F was calculated by the formula $E_F = (I' - I) \times 100 / I'$ ($n > 20$). A significant difference ($P < 0.05$) in FRET efficiency was observed between the BACE-FL/FPs group and the control group. There is no significant difference between control and BACE-NT/FPs groups ($P > 0.05$).

3 讨 论

BACE 对 APP 的酶解是 $A\beta$ 产生的起始步骤, 在 AD 的发生和发展中具有重要作用, 但是目前对 BACE 活性的细胞调节机制还知之甚少. 本文通过 FRET 技术研究 BACE 在活细胞内是否以二聚体形式存在. 发现全长的 BACE 在活细胞内以二聚体的形式存在, 而且其在活细胞内的运输、定位及二

聚化与其 C 端紧密相关, 而与活性部位无关。

BACE 合成为一个 N-糖基化的具有 24 个氨基酸前肽的大蛋白质, 当合成的 BACE 离开内质网后, BACE 前蛋白区域在高尔基体外侧网络(trans-Golgi network, TGN)中被 Furin 类的蛋白酶切除。与其他天冬氨酸蛋白酶不同, 即使没有被去除前蛋白区域, BACE 依然会显示很强的 β -分泌酶活性, 所以不能通过抑制前蛋白的切割来抑制 BACE 的活性^[14]。BACE 可通过分泌途径从高尔基体中分泌到质膜上, 从质膜上可被内吞到内体中。也有一部分 BACE 直接从 TGN 进入内体^[15]。本文通过 EYFP-ER 特异性标记内质网, 转染 24 h 后, BACE-FL 在细胞内除了表达在内质网中, 在细胞膜上也有高表达。另外, 胞内的非内质网位置也有点状分布, 可能是一些分泌泡及内体, 核周的团状高表达部分为高尔基体位置。而 BACE-NT 在转染 24 h 以后, 与内质网的标记 EYFP-ER 表达位置重叠, 在转染 36 h 后观察的结果仍然如此(数据没显示), 说明缺失跨膜序列和 C 端的 BACE-NT 被滞留在内质网中, 不能有效分泌。这些结果证实 BACE 的跨膜序列和 C 端对其正常的运输和定位具有重要的作用。

BACE 的活性部分——BACE-NT 和全长的 BACE 一样, 具有分泌酶的活性, 目前已广泛用于体外评价 β -分泌酶的抑制剂。但是, 与可溶性 BACE-NT 相比, 从膜系统中纯化出来的 BACE-FL 二聚体与 APP 瑞典突变底物具有更高的亲和力和转换率^[7]。提示 BACE-FL 的二聚化对于 BACE 与 APP 的结合和运输都具有重要作用。本文利用 FRET 技术检测了 BACE 在活细胞中的存在状态。FRET 技术是一种严格依赖于距离的检测技术, FRET 效率与供体受体间的距离成 6 次幂的关系, 所以 FRET 效率对距离的变化非常灵敏, 当两者距离变大, 其能量转移效率就会迅速下降。因此, 可通过 FRET 效率检测蛋白质的相互作用。在本文中, 活细胞中 BACE-FL/CFP 和 BACE-FL/YFP 之间的 FRET 效率为 $(12.90 \pm 0.73)\%$, 与阴性对照的 FRET 效率存在显著差异, 而 BACE-NT 组的 FRET 效率仅为 $(3.80 \pm 0.74)\%$, 与阴性对照组没有统计差异。这些结果显示, 全长的 BACE 在活细胞中以二聚体的形式存在, 而 BACE-NT 则以单体形式存在, 说明 BACE 的跨膜序列和 C 端不仅影响对 BACE 的运输和定位, 还会影响它在细胞中的存在结构。

传统的生物物理或生物化学方法, 例如蛋白质亲和层析、免疫共沉淀等方法, 都需要破碎细胞或对细胞造成伤害, 无法做到在活细胞生理条件下实时地对细胞内蛋白质-蛋白质间相互作用进行动态研究。FRET 技术的发展为实时无损地研究蛋白质相互作用提供了新的检测工具。

目前已发展了多种 FRET 检测方法, 最常用的是基于荧光强度的三通道方法。这种方法通过激发供体, 检测受体的发射来实现 FRET 检测。这种方法虽然简单易行, 但是由于存在严重的荧光串扰问题, 从而需要非常复杂的 FRET 可靠性分析。与这种基于荧光强度的 FRET 检测方法相比, 受体漂白方法具有荧光串扰影响小等优点, 在蛋白质相互作用研究领域受到越来越广泛的关注。早期使用宽场显微镜进行受体漂白, 在这种方法中, 漂白通常需要 1~5 min^[16]。而激光扫描共聚焦显微镜的应用能够对感兴趣区域快速漂白, 从而提高了速度和准确率, 实现活细胞的实时检测。在本文的光漂白实验中, 通常只需几秒的漂白时间就能够对受体进行有效的漂白, 从而实现了活细胞中 BACE 二聚化检测。

参 考 文 献

- 1 Selkoe D J. Alzheimer's disease: Genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*, 2001, **81**(2):741~766
- 2 Hussain I, Powell D, Howlett D R, *et al.* Identification of a novel aspartic protease (asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci*, 1999, **14**(6): 419~427
- 3 Yan R, Bienkowski M J, Shuck M E, *et al.* Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature*, 1999, **402**(6761): 533~537
- 4 Vassar R, Bennett B D, Babu-Khan S, *et al.* Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease bace. *Science*, 1999, **286**(5440): 735~741
- 5 Sinha S, Anderson J P, Barbour R, *et al.* Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature*, 1999, **402**(6761): 537~540
- 6 魏晓超, 李恒, 纪建国, 等. BACE 蛋白的表达、纯化和活性测定. *生物化学与生物物理学报*, 2002, **34**(4): 498~501
Wei X Z, Li H, Ji J G, *et al.* *Acta Biochem Biophys Sin*, 2002, **34**(4): 498~501
- 7 Westmeyer G G, Willem M, Lichtenthaler S F, *et al.* Dimerization of beta-site beta-amyloid precursor protein cleaving enzyme. *J Biol Chem*, 2004, **279**(51): 53205~53212
- 8 Schmechel A, Strauss M, Schlicksupp A, *et al.* Human bace forms dimers and colocalizes with APP. *J Biol Chem*, 2004, **279**(38): 39710~39717
- 9 Rizzo M A, Springer G H, Granada B, *et al.* An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat Biotechnol*, 2004, **22**(4): 445~449

- 10 Nagai T, Ibata K, Park E S, *et al.* A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol*, 2002, **20**(1): 87~90
- 11 Zacharias D A, Violin J D, Newton A C, *et al.* Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science*, 2002, **296**(5569): 913~916
- 12 Kenworthy A K. Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Methods*, 2001, **24**(3): 289~296
- 13 Karpova T S, Baumann C T, He L, *et al.* Fluorescence resonance energy transfer from cyan to yellow fluorescent protein detected by acceptor photobleaching using confocal microscopy and a single laser. *J Microsc*, 2003, **209**: 56~70
- 14 Zhou W, Qing H, Tong Y, *et al.* BACE1 gene expression and protein degradation. *Ann NY Acad Sci*, 2004, **1035**: 49~67
- 15 Yan R, Han P, Miao H, *et al.* The transmembrane domain of the Alzheimer's beta-secretase (BACE1) determines its late Golgi localization and access to beta -amyloid precursor protein (APP) substrate. *J Biol Chem*, 2001, **276**(39): 36788~36796
- 16 Day R N, Periasamy A, Schaefele F. Fluorescence resonance energy transfer microscopy of localized protein interactions in the living cell nucleus. *Methods*, 2001, **25**(1):4~18

Detection of β -Secretase Dimerization in Living Cells Using Acceptor Photobleaching FRET *

LU Jin-Ling, CHU Jun, YANG Jie, ZENG Shao-Qun, LUO Qing-Ming, ZHANG Zhi-Hong**

(Britton Chance Center for Biomedical Photonics, Wuhan National Laboratory for Optoelectronics,
Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract Generation, aggregation, and deposition of amyloid β -peptide ($A\beta$) in the brains of Alzheimer's disease (AD) patients are inherent pathological features of AD. Cleavage of the amyloid precursor protein (APP) by the β -secretase (BACE) is the first step in the generation of $A\beta$. Inhibition of BACE activity is a promising therapeutic strategy for the treatment of AD. Therefore, understanding the structure of BACE is very important. Using blue native gel electrophoresis it has been found that BACE exists as a homodimer. However, it is currently unknown whether in living cells BACE forms homodimer. To address this issue, the dimerization of BACE in intact living cells was monitored by using confocal microscopy and acceptor photobleaching FRET. Using bioengineering technique, fluorescence proteins (FPs)-tagged BACEs (BACE/FPs) was constructed. They are cyan fluorescent protein (CFP) or yellow fluorescent protein (YFP) tagged full length BACE (BACE-FL) and truncated BACE (BACE-NT). The CFP- and YFP- tagged BACE-FL (BACE-FL/FPs) or CFP- and YFP- tagged BACE-NT (BACE-NT/FPs) plasmids were transfected into HeLa cells, and the expression and location of BACE-FL and BACE-NT were observed by confocal microscopy. The dimerization of BACE was evaluated by the FRET between CFP- and YFP- tagged BACE which was detected by acceptor photobleaching method. The results show that the BACE-FL can be transported to the Golgi apparatus, plasma membrane and endosomes. However, the BACE-NT is found in the ER 24 hours after transfection. The FRET efficiency of BACE-FL/FPs group is $(12.90 \pm 0.73)\%$, significantly higher than that of control group $(3.32 \pm 0.55\%)$ ($P < 0.05$). The FRET efficiency of BACE-NT/FPs group is $(3.80 \pm 0.74)\%$, which is not statistically different from that of control group. These results indicate that the BACE-FL exists as a dimer in living cells, but the BACE-NT exists as a monomer, suggesting the transmembrane and C-terminus regions are important for normal transport and localization, and is necessary for the dimerization of BACE.

Key words β -secretase (BACE), dimerization, Alzheimer's disease (AD), fluorescence resonance energy transfer (FRET), acceptor photobleaching

*This work was supported by a grant from Hi-Tech Research and Development Program of China (2006AA020801) and The National Natural Science Foundation of China (90508003).

**Corresponding author. Tel: 86-27-87792033, E-mail: czyzzh@mail.hust.edu.cn

Received: July 12, 2007 Accepted: September 28, 2007