

Abstract The cDNAs of κ chain and Fd fragment of anti-gastric cancer mAb 3H11 were amplified by RT-PCR using degenerate primers for framework region 1 (FR1) and cloned into an Fab expression vector. Expression of Fab could be detected but with no antigen binding activity. Then the $V\kappa$ and Fd genes were corrected to its genuine sequence by PCR mediated mutagenesis. The reconstructed Fab containing either

corrected κ chain or Fd or both were expressed in *E. coli* at similar level. Correction of any one of the V region genes could partially resume the antigen binding activity. This result indicated that PCR primers introduced $V\kappa$ and Fd N terminal changes may seriously affect the antigen binding activity.

Key words anti-human gastric cancer mAb, Ig variable gene, Fab

蛋白激酶对 τ 蛋白阿尔茨海默样磷酸化的调节作用*

王建枝 王 群 吴琼莉 I. GRUNDKE-IQBAL K. IQBAL

(同济医科大学病理生理教研室, 武汉 430030)

摘要 微管相关蛋白 τ 的异常磷酸化是阿尔茨海默病 (AD) 神经原纤维退变的重要机制之一。研究发现: 酪蛋白激酶-1 (CK-1), cAMP 依赖性蛋白激酶 (PKA) 和糖原合成酶激酶-3 (GSK-3) 均可不同程度催化重组 τ 蛋白发生磷酸化, 从而不同程度抑制 τ 蛋白促微管组装的生物学功能。如果先将 τ 蛋白与 PKA 预温 2 h 后再和 GSK-3 温育, 则发现 τ 蛋白磷酸化程度比单纯用 GSK-3 处理显著增高, 生物学活性则显著降低, 电镜检测几乎看不见微管形成。结果提示: PKA 和 GSK-3 在 τ 蛋白的 AD 样磷酸化及其功能抑制中具有正性协同作用。

关键词 蛋白激酶, 阿尔茨海默病, τ 蛋白, 异常磷酸化

学科分类号 R745.7, Q513

阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 是由慢性进行性脑退变引起的最常见的成人痴呆症, 其发病率随年龄增长而急剧上升。研究证明: 神经细胞内的神经原纤维缠结的形成是 AD 患者微管结构崩溃, 神经原纤维退化, 神经元死亡的基础^[1]。神经原纤维缠结的主要组成成分是异常过度磷酸化和异常糖基化的 τ 蛋白^[2,3]。

AD 脑中 τ 蛋白的异常磷酸化与蛋白激酶和蛋白磷酸酯酶调节失衡有关。对蛋白磷酸酯酶在 τ 蛋白异常磷酸化中的作用已有深入研究^[1], 而对蛋白激酶的有关作用却知之甚少, 其主要原因是蛋白激酶在体外催化 τ 磷酸化的反应具有非常缓慢的动力学^[4]。根据丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的催化序列是否依赖脯氨酸, 可将其分为脯氨酸指导的蛋白激酶 (PDPK) 和非脯氨酸指导的蛋白激酶 (non-PDPK)。在 AD τ 蛋白已经发现的 21 个异常磷酸化位点中, 有 10 个 PDPK 和 11 个 non-PDPK 位点。可见, PDPK 和 non-PDPK 可能均参与了 AD 的发病过程。因此, 本研究分别选用 GSK-3 (PDPK) 和 CK-1 及 PKA (non-PDPK), 探讨 PDPK

和 non-PDPK 对 τ 蛋白磷酸化的调节作用, 以期部分阐明蛋白激酶与 AD 神经原纤维退化的联系。

1 材料与方法

1.1 蛋白质样品的制备

含 C 端四个串联重复序列和 N 端一个插入子的重组人类 τ (τ 3L, 图 1) cDNA 由 Goedert 博士提供。大肠杆菌中表达的 τ 3L 的制备根据 Goedert 法^[5]进行如下改良: 将收获的含重组 τ 3L 的细胞于 80 mmol/L Mes (pH 6.8) 含 5 mmol/L DTT 的溶液中进行超声破碎, 120 000 g 离心后, 取上清液用磷酸纤维素柱层析分离, 用免疫印迹法确定 τ 的洗脱峰, 收集富含 τ 的级分于沸水浴中煮沸 5 min 后用过氯酸进行抽提。所纯化的 τ 蛋白达凝胶电泳蛋白染色单点纯, 其得率平均为 5 mg/L 培养基。CK-1 和 GSK-3 由 Singh^[6]提供。GSK-3 制剂含 α 和 β 同工异构体的比例为 1:3。1 单位 CK-1 或 GSK-3 分别定义为在 30℃ 每分钟催化 1 nmol

* 国家自然科学基金资助项目 (39770175)。

收稿日期: 1998-06-19, 修回日期: 1998-12-29

^{32}P 掺入去磷酸化的酪蛋白 (4 g/L) 或鞘脂碱性蛋白 (1 g/L) 所需的酶量. PKA 催化亚基从

Sigma 公司购买. 蛋白质含量测定用改良 Lowry 法.

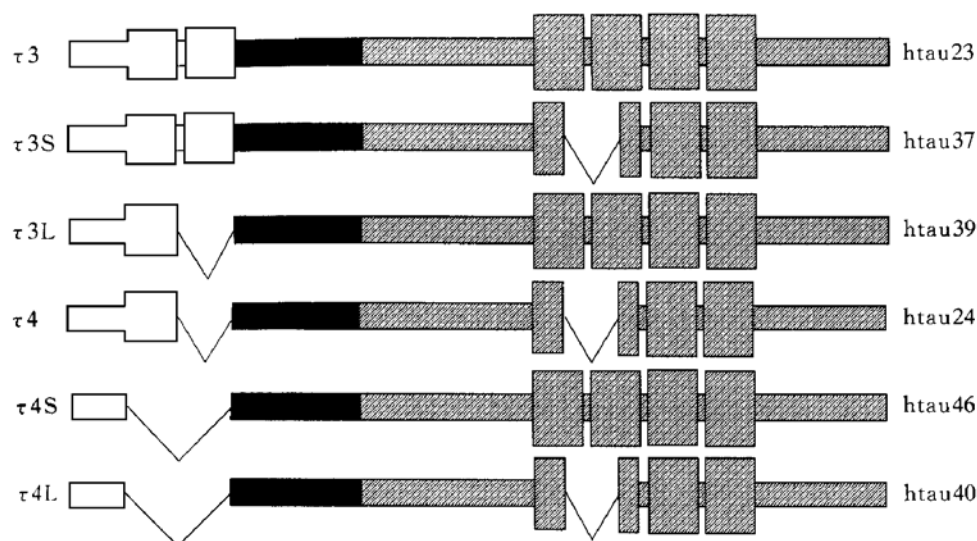


图1 τ 蛋白异构体结构示意图

1.2 τ 蛋白的磷酸化反应

将 $\tau 3\text{L}$ (1 g/L) 分别与 CK-1 (400 U/L), PKA (6 mg/L) 和 GSK-3 (350 U/L) 在磷酸化缓冲液 (7 mmol/L MgCl_2 , 12 mmol/L $\beta\text{-ME}$, 0.5 mmol/L ATP, 20 mmol/L Hepes pH 7.5) 中 30℃ 保温 4 h. 在研究蛋白激酶的协同效应时, 先加入 CK-1 或 PKA 和非标记 ATP 保温 2 h, 于 95℃ 加热 5 min, 10 000 g 离心 10 min 后, 于上清液中加入 GSK-3 和 ^{32}P -ATP 再保温 4 h.

1.3 τ 蛋白磷酸化的定量分析

将一定量磷酸化样品加在 Waterman 一号滤纸, 用 24% 三氯醋酸 (TCA) 变性固定后, 在含 1% TCA 和 0.1 mol/L NaCl 的水溶液中层析约 20 min, 使磷酸化的 τ 蛋白与游离磷酸分离, 再用 Cherekov 计数法测 $\tau 3\text{L}$ 的标记率.

1.4 τ 蛋白促微管组装实验

将上述不同处理的 τ (20 mg/L) 与新鲜纯化的微管蛋白 (2 g/L) 以及组装缓冲液 (100 mmol/L Mes, 1 mmol/L EGTA 和 1 mmol/L GTP) 在冰浴中混匀, 迅速加至 1 cm 石英比色皿后在 37℃ 连续记录 350 nm 时光吸收的变化.

1.5 负染电子显微镜技术检测微管结构

在微管组装实验进行到 15 min 时, 迅速取出 10 μL 反应液加在 300 mesh 碳素包被的铜网上, 经 5% 戊二醛 (glutaraldehyde) 固定并用 2% 磷钨酸 (phosphotungstic acid, PTA) 染色后, 电镜观察微管结构.

2 结 果

2.1 PKA 和 GSK-3 对 τ 磷酸化的协同作用

将 τ 蛋白分别与 GSK-3, PKA 及 CK-1 保温 4 h, 测得 ^{32}P 的掺入量分别为 (1.7 $\pm$ 0.3), (2.1 $\pm$ 0.5) 和 (4.0 $\pm$ 0.2) mol/mol; 若将 τ 蛋白先与 CK-1 或 PKA 及非标记 ATP 保温 2 h, 再与 GSK-3 及 ^{32}P -ATP 反应 4 h, 其 ^{32}P 的掺入量分别为 (1.2 $\pm$ 0.4) 和 (3.2 $\pm$ 0.3) mol/mol (表 1).

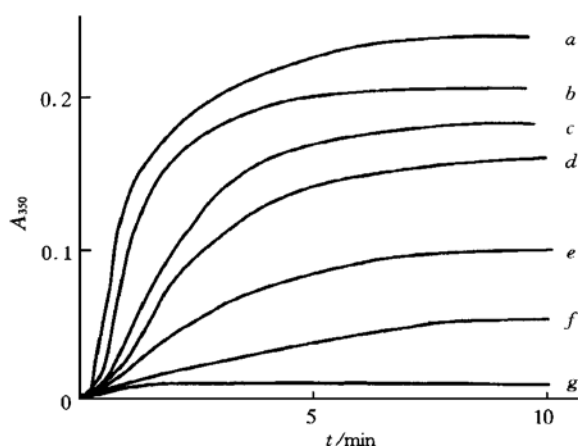
表 1 不同蛋白激酶对 τ 的磷酸化作用

蛋白激酶	^{32}P 掺入量/mol $\cdot$ mol $^{-1}$
GSK-3	1.7 $\pm$ 0.3
PKA	2.1 $\pm$ 0.5
CK-1	4.0 $\pm$ 0.2
CK-1+ GSK-3	1.2 $\pm$ 0.4 ¹⁾
PKA+ GSK-3	3.2 $\pm$ 0.3 ¹⁾

$\bar{x} \pm s$, $n = 12$, ¹⁾ 仅显示 GSK-3 催化的 ^{32}P 掺入量.

2.2 蛋白激酶对 τ 功能抑制的协同作用

CK-1, GSK-3 和 PKA 的磷酸化对 τ 蛋白促微管组装的生物学功能具有强度递增的抑制效应; CK-1 及 PKA 与 GSK-3 的联合使用进一步增强对 τ 蛋白活性的抑制, 在本文所检测的蛋白激酶中, PKA 与 GSK-3 联合应用的抑制作用最强 (图 2).

图2 τ 蛋白的促微管组装曲线

a: 重组 τ 3 L, b~f: 分别依次为 CK-1, GSK-3, PKA, CK-1+ GSK-3 和 PKA+ GSK-3 处理的 τ 3 L, g: 微管蛋白。

2.3 负染电子显微镜检测生成的微管

CK-1, GSK-3 和 PKA 磷酸化的 τ 蛋白与管蛋白反应生成大量微管 (图 3b~ d), 其电镜结构与未经处理的重组 τ 蛋白 (图 3a) 无差异; CK-1 加

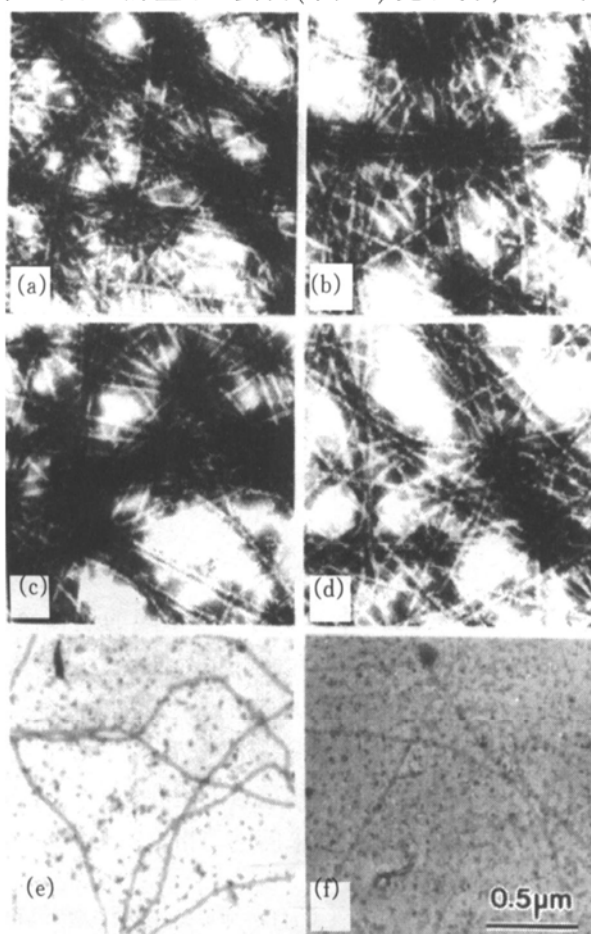


图3 负染电子显微镜显示微管结构

(a) 重组 τ 3 L, (b) ~ (f) 分别依次为 CK-1, GSK-3, PKA, CK-1+ GSK-3 和 PKA+ GSK-3 处理的 τ 3 L。

GSK-3 或 PKA 加 GSK-3 处理的 τ 蛋白与管蛋白的反应液在电镜下几乎不见微管生成 (图 3e, f)。

3 讨 论

3.1 蛋白激酶 CK-1, PKA 和 GSK-3 可在体外催化重组 τ 蛋白磷酸化, 将 CK-1, PKA 和 GSK-3 单独与 τ 蛋白保温 4 h, τ 蛋白的 ^{32}P 掺入量分别为 4.0, 2.1 和 1.7 mol/mol. PKA 预处理可明显增强 GSK-3 对 τ 蛋白的磷酸化作用, 其 ^{32}P 掺入量比单纯用 GSK-3 增高约 1 倍, 而 CK-1 的预处理则不促进 GSK-3 对 τ 的磷酸化作用. CK-1 和 PKA 是 non-PDPK, 而 GSK-3 是 PDPK, 可见, non-PDPK 的预处理可对 PDPK 促 τ 蛋白磷酸化起不同的调节作用。

3.2 微管组装实验证明: CK-1, PKA 和 GSK-3 单独处理的 τ 蛋白的促微管组装生物学活性比未经处理的 τ 蛋白明显降低, 但在电镜下仍可见大量微管生成, 电镜检测属定性观察, 尚不能准确反应 τ 蛋白功能抑制的程度. CK-1 或 PKA 和 GSK-3 联合处理的 τ 蛋白微管组装活性显著降低 (图 2), 且在电镜下几乎不见微管生成 (图 3)。根据 ^{32}P 的掺入量, 当分别使用上述蛋白激酶时, CK-1 使 τ 蛋白磷酸化的作用最强 (表 1), 但是, 与 PKA 和 GSK-3 相比, CK-1 的磷酸化对 τ 生物学活性抑制作用最弱 (图 2); 此外, GSK-3 虽然在 CK-1 的基础上只加上少量磷酸, 但确明显增强对 τ 蛋白生物学活性的抑制. 可见, τ 蛋白生物学活性的抑制除与其分子的磷酸化程度有关外, 其分子特定位点的磷酸化可能起更重要的作用. 根据本文研究结果, 我们得出如下初步结论: τ 蛋白的 AD-样异常磷酸化与 CK-1, PKA 和 GSK-3 等多种蛋白激酶有关, 且这些蛋白激酶在 τ 蛋白的 AD-样转变反应中起不同的调节作用. 这一研究结果为 AD 的发病机制提供了新理论, 为其防治途径的探讨提供了新线索。

参 考 文 献

- 1 Iqbal K, Alonso A, Gong C X, *et al.* τ Phosphatase. In: Kosik K, Avila J, eds. Brain microtubule associated proteins: modifications and diseases. New York: Harwood Academic Publishers, 1997. 95~ 111
- 2 Wang J Z, Gong C X, Zaidi T, *et al.* Dephosphorylation of Alzheimer paired helical filaments by PP-2A and PP-2B. J Biol Chem, 1995, **270** (9): 4854~ 4860

(下转第 402 页, Continued on page 402)

参 考 文 献

- 1 Boman H G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immun*, 1995, **13**: 61~ 92
- 2 Lehrer R I, Lichtenstein A K, Ganz T. Defensins-antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immun*, 1993, **11**: 105~ 108
- 3 Hultmark D H, Steiner H, Rasinuson T, *et al.* Insect immunity, purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur J Biochem*, 1980, **106** (1): 7~ 16
- 4 Taniai K, Kato Y, Hirochika H, *et al.* Isolation and nucleotide sequence of cecropin B cDNA clones from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1132** (2): 206~ 209
- 5 Lidholm D A, Gudmundur H G, Lleanthis G X, *et al.* Insect immunity: cDNA clones coding for the precursor for ms of cecropins A and D antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *FEBS Letter*, 1987, **226** (1): 8~ 12
- 6 Gudmundur H G, Dan A L, Asling B, *et al.* Cloning and expression of a gene cluster encoding three antibacterial peptides in *Hyalophora cecropia*. *J Biol Chem*, 1991, **266** (18): 15510~ 11517
- 7 Van Hofsten P, Faayee L, Kockum K, *et al.* Molecular Cloning, cDNA Sequencing, and Chical synthesis of cecropia B from *Hyalophora cecropia*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82** (8): 2240~ 2243
- 8 Morishima I, Suginaka T U, Hirane H, *et al.* Isolation and structure of cecropins, inducible antibacterial peptides from the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp Biochem Physiol*, 1990, **95B** (3): 551~ 554
- 9 张双全, 屈贤铭, 戚正武 (Zhang S Q, Qu X M, Qi Z W). 昆虫免疫应答及抗菌肽应用前景. *生物化学杂志 (J Biochem)*, 1987, **3** (3): 1118~ 1120
- 10 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analy Biochem*, 1987, **162** (1): 156~ 169
- 11 王 瑛 (Wang Y). PCR 产物直接分子克隆的比较研究. *生物工程进展 (Prog Biotech)*, 1996, **16** (5): 55~ 57
- 12 王亚明 (Wang Y M). 白暨豚、江豚和虎的分子进化遗传学研究: [学位论文]. 南京: 南京师范大学研究生处, 1995

Sequencing Partial Fragment of Cecropin A cDNA in the Silkworm *Bombyx mori* From China. LI Jiar-Min, ZHOU Kai-Ya, ZHANG Shuang-Quan, DAI Zhu-Ying (*Department of Biology, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China*); ZHU Chang-Liang, YE Xin-Hai (*Department of Biology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China*).

Abstract Total RNA was prepared from fat body of the silkworm, *Bombyx mori*, 9 hours after injected by *E. coli* K12D31. Single-strand cDNA was synthesized by reverse transcription (RT). Partial fragments of cecropin A cDNA were obtained, cloned and sequenced, by PCR technique with a pair of degenerate primers designed according to the amino acid sequence of CM4 in *Bombyx mori* and cecropin A in *Hyalophora*. These laid a foundation for further research on preparation of the probes of cecropin A for screening the silkworm cDNA library.

Key words cecropin A gene, *Bombyx Mori*, cDNA sequence

(上接第 375 页, Continued from page 375)

- 3 Wang J Z, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Glycosylation of microtubule associated protein tau: an abnormal posttranslational modification in Alzheimer dis 4 Singh T J, Grundke Iqbal I, Wu Q L, *et al.* Protein kinase C and calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylate three repeat and four-repeat tau isoforms at different rates. *Mol Cell Biochem*, 1997, **168** (1): 141~ 148
- 5 Goedert M, Jake R. Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J*, 1990, **9** (2): 4225~ 4230
- 6 Singh T J, Wang J Z, Novak M, *et al.* Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylates tau at ser-262 but only partially inhibits its binding to microtubules. *FEBS Lett*, 1996, **387** (1): 145~ 148

Modulation of Protein Kinases on an Alzheimer-like Phosphorylation of τ . WANG Jiar-Zhi, WANG Qun, WU Qiong-Li, I. GRUNDKE-IQBAL, K. IQBAL (*Department of Pathophysiology, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China*).

Abstract Abnormal phosphorylation of microtubule

associated protein τ is one of the major mechanism in Alzheimer neurofibrillary degeneration. It was found that casein kinase-1 (CK-1), cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA) and glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) differentially phosphorylate human τ (τ 3L) and thus inhibit its biological activity. Moreover, the phosphorylation and inhibition of this activity of τ by GSK-3 is significantly increased if τ is prephosphorylated by PKA. Under this condition, only neglectable microtubules could be seen by electron microscopy. The data suggest that a synergistic role of PKA and GSK-3 might be involved in abnormal phosphorylation and functional inhibition of τ in Alzheimer disease.

Key words protein kinase, Alzheimer disease, τ protein, abnormal phosphorylation