

微管相关蛋白 tau 在动物死亡后被快速去磷酸化*

殷冬梅¹⁾ 施建华¹⁾ 顾建兰¹⁾ 沈勤¹⁾ 龚成新²⁾ 刘飞^{1,2)**}

(¹⁾南通大学基础医学院生物化学教研室, 南通 226001;

²⁾Department of Neurochemistry, New York State Institute for Basic Research in Developmental Disabilities,
Staten Island, New York 10314, USA)

摘要 tau 蛋白是神经细胞中主要的微管相关蛋白, 它的异常过度磷酸化被认为是阿尔茨海默病 (AD) 致病过程中的关键因素. 由于法律、社会、家庭等诸多因素使得获取的人脑组织标本常常在死亡后 2~3 h 以上, 因此了解死亡不同时间后 tau 蛋白磷酸化的改变, 对研究 tau 蛋白的功能及在 AD 致病过程中作用显得十分重要. 用位点特异的、磷酸化依赖的抗 tau 蛋白抗体检测正常大鼠脑中 tau 蛋白磷酸化程度及死亡后其磷酸化的变化情况, 再用非同位素的点印迹技术测定鼠脑中 tau 蛋白激酶、磷酸酶在不同温度下的活性. 结果发现, 正常鼠脑中 tau 蛋白除了 Ser262, Ser409, Ser422 外, 在 Thr181, Ser199, Ser202, Thr205, Thr212, Ser214, Thr217, Ser396 和 Ser404 存在不同程度的磷酸化, 并且在死亡后 3 h, 出现 tau 的多位点的去磷酸化及 tau 蛋白迁移加快, 6 h 后更为明显, 但 tau 蛋白水平即使在大鼠死亡后 6 h, 仍未见有明显的改变. 用点印迹测定蛋白激酶和磷酸酶活性结果显示, tau 蛋白激酶、磷酸酶活性均有温度依赖性降低, 在 25℃ 时激酶活性降低远大于磷酸酶活性的降低, tau 蛋白在死亡后的快速去磷酸化与相对高的磷酸酶作用有关.

关键词 tau, 蛋白质磷酸化, 动物尸检时间, 阿尔茨海默病

学科分类号 Q786

tau 蛋白是存在于神经细胞中的主要微管相关蛋白, 它的主要生物学功能是促进微管的组装和稳定微管的结构. tau 蛋白是一磷蛋白, 正常情况下每分子 tau 蛋白含有 2~3 个磷酸基团, 但在阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 患者的脑中, tau 蛋白被异常过度磷酸化, 平均每摩尔的 tau 蛋白则连有 9~10 mol 的磷酸, 并聚集成双螺旋丝 (paired helical filaments, PHFs)^[1]. 后者是 AD 的主要病理标志之一——神经纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs) 的主要组成成分^[2,3]. 过度磷酸化的 tau 蛋白不但失去其生物学功能和易聚集成 PHF 结构, 还变成毒性分子, 猎获正常的微管相关蛋白, 使得微管结构崩解, 神经细胞退化^[4,5]. 因此, tau 蛋白的过度磷酸化被认为是 AD 致病过程中的关键事件, 对 tau 蛋白磷酸化的研究成为 AD 研究领域的热点之一.

由于法律、社会、家庭等诸多因素, 使得我们获取病人的病理组织常常在病人死亡后 2~3 h 以上. 而且, 对于科学研究, 获得完全相同的死亡后尸检时间也并非易事. 因此, 了解死亡后不同的尸检时

间是否影响研究的主题, 对如何设计实验和依据实验结果得出正确的结论变得相当必要. 在比较 AD 患者和正常人的 tau 蛋白磷酸化程度时, 研究死亡后不同的尸检时间是否成为影响 tau 蛋白磷酸化程度的因素和在正常动物脑中 tau 蛋白在哪些位点存在磷酸化, 对于正确地了解和研究 tau 蛋白的功能和调节, 以及 tau 蛋白的磷酸化在 AD 发病机理中的作用, 有着很重要的意义. 在本研究中, 我们用 CO₂ 处死的大鼠, 在室温 (25℃) 下放置不同的时间, 以模拟死亡后不同的尸检时间, 然后用位点特异的、磷酸化依赖的抗 tau 蛋白的抗体, 检测大鼠脑中和死亡后不同时间 tau 蛋白在各个位点的磷酸化程度, 并通过测定在不同温度下 tau 蛋白激酶和磷酸酶的活性, 探讨动物死亡后 tau 蛋白磷酸化程度的改变以及可能的酶学基础.

* 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2004047).

** 通讯联系人.

Tel: 0513-5051744, E-mail: feiliu63@hotmail.com

收稿日期: 2005-05-30, 接受日期: 2005-07-31

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物. 本实验所用的 10 个月大的 Wistar 大鼠从美国 Jackson 实验室购入。

1.1.2 抗体. 抗 tau[pS181]、tau[pS199]、tau[pS202]、tau[pT205]、tau[pT212]、tau[pS214]、tau[pT217]、tau[pS231]、tau[pS262]、tau[pS396]、tau[pS404]、tau[pS409]、tau[pS422] (多克隆抗体, 识别特异位点磷酸化的 tau 蛋白) 为美国 Biosource International 公司产品, 92e 和 R134d (多克隆抗体, 识别磷酸化和非磷酸化的 tau 蛋白) 为美国纽约州立基础研究所神经化学系自行研制。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体为美国 Jackson-ImmunoResearch Laboratories 产品。

1.1.3 其他试剂和材料. ECL 化学发光试剂盒为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品, Immobilon™-P PVDF 膜为 Millipore 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 动物处理和脑组织匀浆制备

用 CO₂ 处死大鼠后, 置大鼠于室温 (25℃) 0、3 和 6 h, 然后, 取出大脑皮层, 每克组织用 9 ml 匀浆缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L 氯化钠, 10 mmol/L β- 磷酸甘油, 10 mmol/L β- 巯基乙醇, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L PMSF, 2 mmol/L Benzimidazole, 1.0 mmol/L 正砷酸钠, 50 mmol/L 氟化钠和 2.0 mg/L 的 Leupeptin、Pepstatin、Aprotinin) 制备匀浆, 然后分装冻存于 -70℃ 待用。

蛋白激酶和蛋白磷酸酶测定用的大鼠脑抽提液制备: 大鼠的大脑皮层用含 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 8.5% 蔗糖, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF 和 2.0 mg/L 的 Leupeptin、Pepstatin、Aprotinin 的匀浆缓冲液按上述方法匀浆后, 16 000 g 离心 10 min, 上清液被用作蛋白激酶和磷酸酶活性测定 (见下文)。

1.2.2 蛋白质印迹分析按已发表的方法完成^[6]。

1.2.3 点印迹分析按已发表的方法进行^[7]。

1.2.4 P-tau 的制备. 按已发表的方法进行^[8], 主要是用 PKA 和 CDK5/p25 联合磷酸化 tau441。按这种方法, 每个 tau 蛋白平均被修饰有 3.5 个磷酸基团。

1.2.5 tau 蛋白激酶活性测定. tau 蛋白激酶的活性

通过在 30 μl 含有 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L β- 巯基乙醇, 0.2 g/L tau441, 0.2 mmol/L ATP, 1 μmol/L okadaic acid (OA), 0.2 mg/L 的抽提液和 2.0 mg/L 的 Leupeptin、Pepstatin、Aprotinin 在不同的温度下保温 15 min, 反应通过加入 5% 的乙酸终止, 用点印迹法, 检测 tau 蛋白在 Thr212 位点上的磷酸化程度来确定蛋白激酶的活性。

1.2.6 tau 蛋白磷酸酶活性的测定. 在 30 μl 的反应体积中含 50 mmol/L HEPES, 10 mmol/L β- 巯基乙醇, 1.0 mmol/L MnCl₂, 1.5 mmol/L CaCl₂, 1.5 μmol/L CaM, 5 μmol/L 花生四烯酰 CoA, 2.0 mg/L 的 Leupeptin、Pepstatin、Aprotinin, 0.2 mg/L P-tau, 0.1 g/L 的脑抽提液, 在不同的温度保温 15 min, 通过测定在 Thr212 位点上的去磷酸化程度反映 tau 磷酸酶的活性。

2 结 果

2.1 正常的鼠脑 tau 蛋白在多个位点被磷酸化

我们首先将 10 个月大的成年大鼠置于一密闭箱中, 通入 CO₂ 处死之。随即取出大脑皮层, 按实验方法中所描述的方法快速匀浆。然后, 进行 10% SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质, 在电转移到 PVDF 膜上后, 用位点特异的磷酸化依赖的抗 tau 抗体对印迹到 PVDF 膜上的蛋白质进行分析。结果显示, 正常的成年大鼠 tau 蛋白在 Ser181、Ser199、Ser202、Thr205、Thr212、Ser214、Thr217、Ser396、Ser404 位点上不同程度地被磷酸化 (图 1), 但在 Ser262, Ser409, Ser422 位点, 即使每个泳道上样量高达 25 μg 蛋白质, 仍不能检测到磷酸化信号 (数据未显示)。因此, 在正常的成年大鼠脑中, tau 蛋白在这些位点几乎未被磷酸化。

2.2 动物死亡后 tau 蛋白在多个位点被去磷酸化

为了研究在动物死亡后, tau 磷酸化水平是否改变, 我们在动物被处死后, 置于室温 (25℃) 以模拟人体死亡后不同的尸检时间, 然后取出大脑皮层检测其 tau 蛋白在各个位点的磷酸化程度。图 2 显示, 随着动物在室温放置不同的时间, 由 92e 和 R134d 抗体识别的总 tau 蛋白量并没有明显的改变, 即在死亡后的 6 h 内, tau 蛋白没有明显的降解 (图 2), 但可见明显的 tau 蛋白分子的迁移加快, 图 2a 中箭头所指的条带在大鼠死亡后 3 h 即消失。

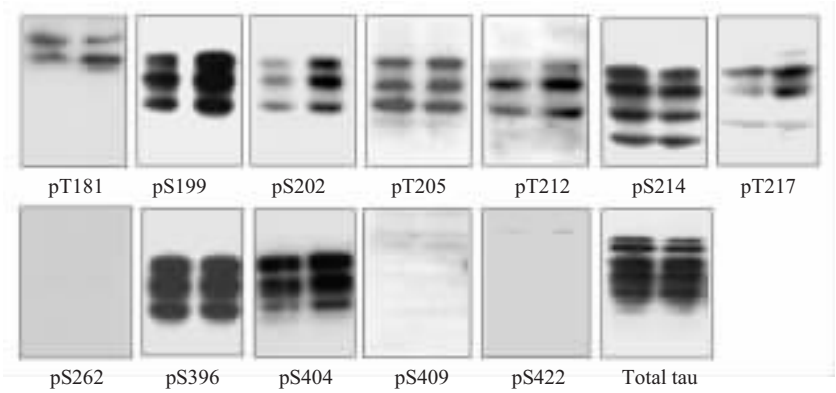


Fig. 1 Phosphorylation of tau at multiple sites detected here in normal rat brain

Western blot analysis of tau at each site (labeled under each blot) in brain homogenate from two rats were carried out by using site-specific and phosphorylation dependent anti-tau antibodies and phosphorylation independent anti-tau antibodies (92e and R134d) to detect total tau.

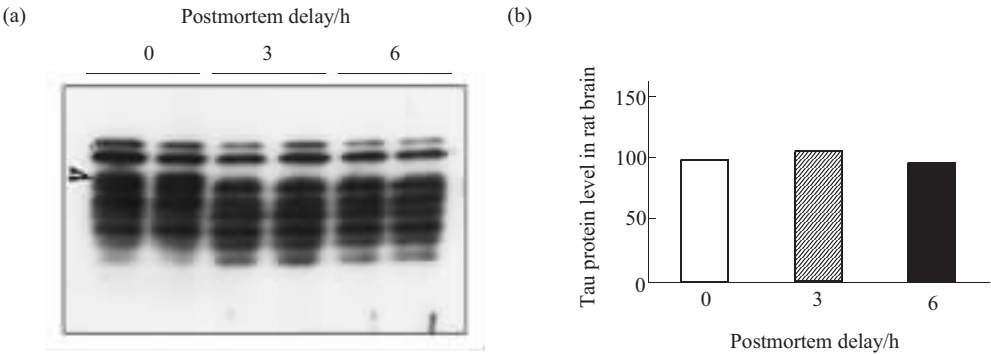


Fig. 2 Tau levels in rat brain after postmortem delay for various period of time

(a) Western blot of tau in rat brain homogenates was carried out by using a mixture of 92e and R134d, two phosphorylation independent anti-tau antibodies. Arrowhead points the band that disappeared at 3 and 6 h of postmortem delay.
(b) Quantitation of Western blots as shown in (a). Tau protein level did not change during postmortem delay.

对 tau 蛋白在各个位点磷酸化程度的免疫印迹分析显示, tau 蛋白在所有检测到的磷酸化位点 (Ser181, Ser199, Ser202, Thr205, Thr212, Ser214, Thr217, Ser396, Ser404) 都呈现明显的时间依赖性的去磷酸化现象(图 3), 而且, 这种去磷酸化现象不是由于 tau 蛋白的降解, 因为由 92e 和 R134d 免疫印迹检测到的总 tau 蛋白水平并没有减少(图 2).

2.3 死亡动物体温的降低影响 tau 蛋白激酶和磷酸酶的活性

tau 蛋白的磷酸化程度取决于 tau 蛋白激酶和磷酸酶的相对活性. 动物死亡后体温迅速降低至环境温度. 为了研究死亡后 tau 蛋白如何快速去磷酸

化, 我们测定了这两种酶在不同温度下的相对活性. 我们以 tau 蛋白和磷酸化的 tau (P-tau) 为底物, 测定不同温度下脑抽提液中的总 tau 蛋白激酶和磷酸酶的活性. 图 4a 表示 tau 蛋白和 P-tau 分别受大鼠脑抽提液中的蛋白激酶和磷酸酶催化, tau 蛋白磷酸化水平的点印迹结果, 对其进行密度分析以定量反映脑抽提液中不同温度下 tau 蛋白激酶和磷酸酶相对于 37℃ 的活性 (图 4b), 结果不论是蛋白激酶或磷酸酶其活性都呈现明显的温度依赖性降低; 并且, 特别在 25℃ 时, 蛋白激酶的活性降低了 80%, 但磷酸酶活性降低了 40%(图 4b), tau 蛋白激酶的活性明显低于磷酸酶的活性. 对其他磷酸化位点的分析也显示相似的结果 (结果未显示).

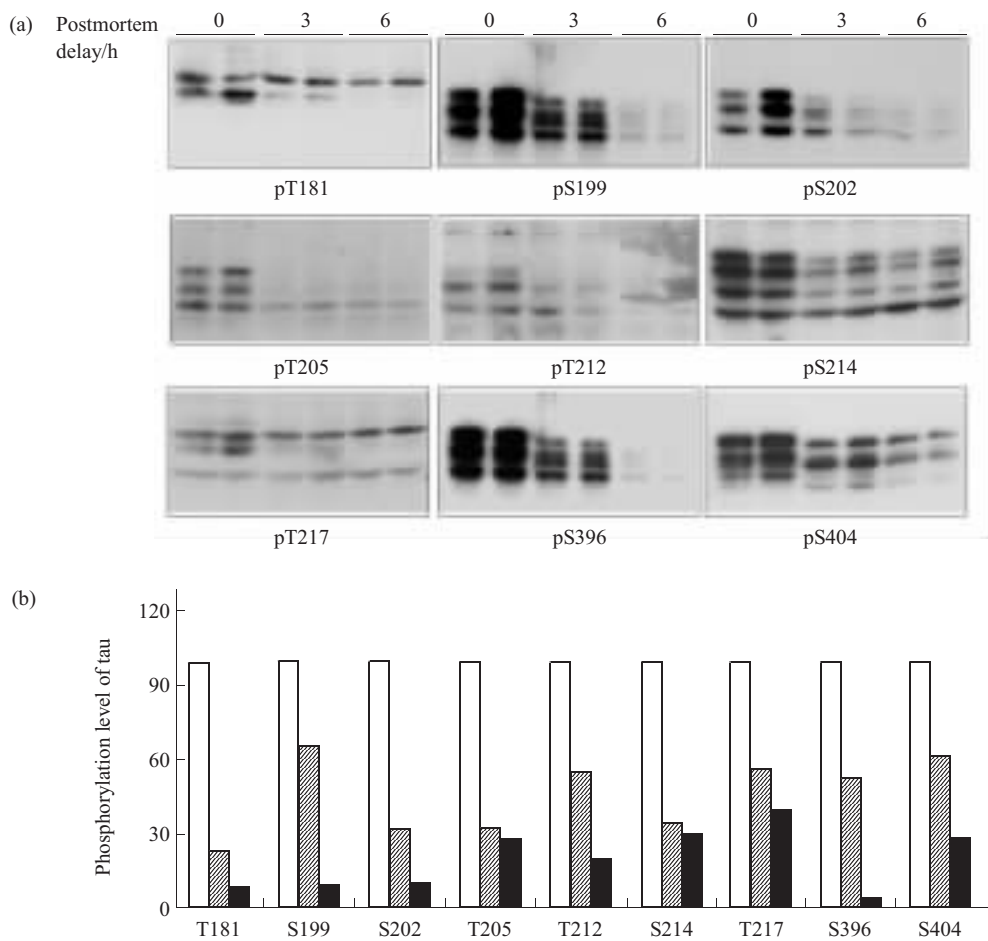


Fig. 3 Dephosphorylation of tau at many sites during postmortem delay

(a) Brain homogenates of rat with 0, 3, and 6 h of postmortem delay were analyzed for tau phosphorylation level at each site (labeled under each blot) by Western blots using site-specific and phosphorylation dependent anti-tau antibodies. (b) Quantitation of Western blots as shown in panel (a) after normalization with total tau level. Tau was found to be dephosphorylated quickly after death of animals. □: 0 h; ▨: 3 h; ■: 6 h.

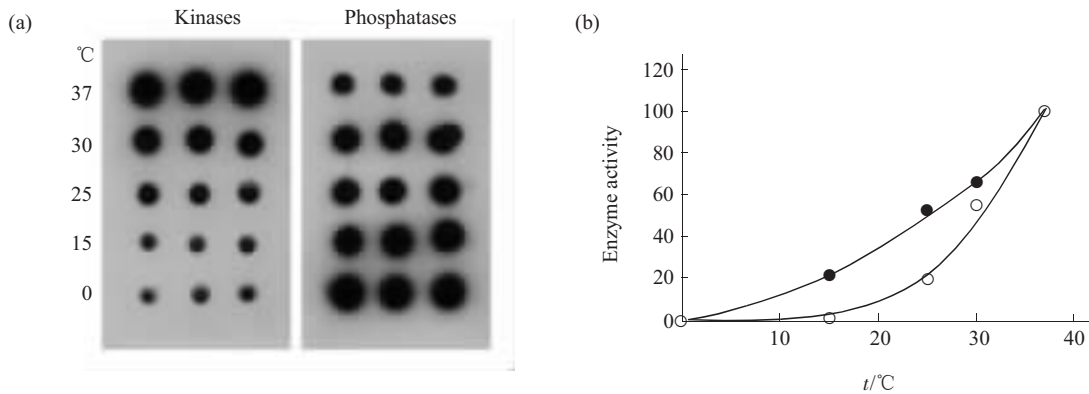


Fig. 4 Activities of rat brain tau kinases and phosphatases at various temperatures

(a) Dot blot analysis of tau phosphorylation at Thr212 of reaction products from kinase and phosphatase assays. Tau or P-tau were incubated in reaction buffers with tau kinases (left panel) and phosphatases (right panel) of rat brain extract, respectively, at different temperatures, as indicated at left side of the blot, and dot blot analysis was carried out to determine the phosphorylation of tau at Thr212. (b) Tau kinase and phosphatase activities of rat brain at different temperatures. The phosphorylation of tau at Thr212 catalyzed by tau kinases and phosphatases shown in (a) was quantitated, and plotted after normalization with total tau level against the temperature used for assay. The activity of kinase or phosphatase assayed at 37°C was defined as 100. ●—●: tau phosphatases; ○—○: tau kinases.

3 讨 论

在 AD 病人脑中, tau 蛋白被异常过度磷酸化, 因而丧失其生物学活性. 已有研究证明 PHF-tau 上 30 多个位点被磷酸化, 这些磷酸化位点均发生在 tau 蛋白的丝氨酸、苏氨酸残基上^[9]. 为了便于比较死亡后 AD 和正常对照组 tau 蛋白的磷酸化程度, 我们首先绘制正常大鼠 tau 蛋白的磷酸化位点图谱. 实验结果显示, 正常鼠脑 tau 蛋白存在多个磷酸化的位点. 在 Ser181, Ser199, Ser202, Thr205, Thr212, Ser214, Thr217, Ser396 和 Ser404 有不同程度的磷酸化, 但在 Ser262, Ser409, Ser422 几乎没有被检出的磷酸化信号. 正常 tau 蛋白的适量磷酸化是其生物学功能所需. 胎儿期脑内 tau 处于高度磷酸化阶段, 发育成熟后其磷酸化程度逐渐降低, 使正常 tau 与微管蛋白结合, 其结构稳定不易被磷酸化. PHF-tau 与胎儿时期 tau 磷酸化位点的比较, Ser262、Ser409、Ser422 只存在于 PHF-tau 而不在胎儿期的磷酸化位点中^[10], 正常鼠脑也未出现这三个位点的磷酸化, 提示这些位点的磷酸化可能与 tau 蛋白的功能及聚集有关.

通过研究动物死亡后 tau 蛋白各个位点磷酸化的动态变化, 我们发现各位点都呈现明显的时间依赖性的快速去磷酸化现象. 而用 92e 和 R134d 抗体识别的总 tau 蛋白量并没有明显的改变. 即死亡后 6 h 内, tau 蛋白没有明显降解, 说明这种去磷酸化现象不是由于 tau 蛋白的降解引起的. 而且在 92e 和 R134d 抗体 (非磷酸化依赖性抗 tau 抗体) 的蛋白质印迹分析中, 可见明显的 tau 蛋白分子的迁移加快, 而这种迁移的加快是由于 tau 蛋白去磷酸化, 特别是其羧基末端磷酸化位点的去磷酸化所致^[11].

tau 蛋白的磷酸化水平主要取决于蛋白激酶和蛋白磷酸酶的相对活性. 动物死亡后由于供血供氧终止, 因此蛋白质磷酸化所需要的供体底物 ATP 会短缺, 从而使得蛋白激酶的活性及其产物——蛋白质的磷酸化降低甚至停止. 除此之外, 由于动物的死亡, 体温也会下降, 并与室温达到平衡. 温度的下降会影响酶的活性. 因而, 我们进一步测定温度对大鼠脑抽提液中的总 tau 蛋白激酶和磷酸酶活性的影响. 结果发现, 蛋白激酶和磷酸酶的活性均呈明显的温度依赖性降低. 然而在 25℃ 时, 磷酸酶活性的降低远小于激酶活性的下降, 因此, 在此温度时, tau 蛋白磷酸酶的活性相对较高. 即 tau 蛋白

在机体死亡 3 h 后被快速去磷酸化是由于相对高的磷酸酶活性所致. 在正常脑组织中, 在死亡后由于相对高的磷酸酶活性, 使得 tau 蛋白被快速去磷酸化. 而在 AD 病人脑中, 由于脑组织中主要的 tau 蛋白磷酸酶 PP2A 的活性下降了 50%^[9], 所以, 相对于正常脑组织, AD 病人脑组织中 tau 蛋白磷酸化程度随着尸检时间的延长而被进一步扩大, 即使我们选用相对一致的尸检时间, 仍然不能真实反映正常与 AD 病人脑组织中 tau 蛋白磷酸化的差别. 推而广之, 若要检测尸检组织其他蛋白质的磷酸化程度或与磷酸化有关的酶活性, 应在患者死亡后尽早尸检, 低温保存, 以防止激酶、特别是磷酸酶的作用而影响实验结果的客观性.

参 考 文 献

- 1 Köpke E, Tung Y C, Shaikh S, *et al.* Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J Biol Chem*, 1993, **268** (32): 24374~24384
- 2 Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung Y C, *et al.* Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83** (13): 4913~4917
- 3 Lee V M, Balin B J, Otvos L Jr, *et al.* A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. *Science*, 1991, **251** (4994): 675~678
- 4 Alonso A del C, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, *et al.* Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (12): 5562~5566
- 5 Iqbal K, Alonso Ade C, Chen S, *et al.* Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta*, 2005, **1739** (2~3): 198~210
- 6 Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, *et al.* O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (29): 10804~10809
- 7 Liu F, Zaidi T, Iqbal K, *et al.* Aberrant glycosylation modulates phosphorylation of tau by protein kinase A and dephosphorylation of tau by protein phosphatase 2A and 5. *Neuroscience*, 2002, **115** (3): 829~837
- 8 Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, *et al.* Dephosphorylation of tau by protein phosphatase 5: impairment in Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, 2005, **280** (3): 1790~1796
- 9 Gong C X, Liu F, Grundke-Iqbal I, *et al.* Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, 2005, **112** (6): 813~838
- 10 Matsuo E S, Shin R W, Billingsley M L, *et al.* Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron*, 1994, **13** (4): 989~1002
- 11 Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, *et al.* Involvement of aberrant glycosylation in phosphorylation of tau by cdk5 and GSK-3beta. *FEBS Lett*, 2002, **530** (1~3): 209~214

Rapid Dephosphorylation of Microtubule-associated Protein tau During Postmortem Period*

YIN Dong-Mei¹⁾, SHI Jian-Hua¹⁾, GU Jian-Lan¹⁾, SHEN Qin¹⁾, GONG Cheng-Xin²⁾, LIU Fei^{1,2)}**

¹⁾Department of Biochemistry, Basic Medical School, Nantong University, Nantong 226001, China;

²⁾Department of Neurochemistry, New York State Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, Staten Island, New York 10314, USA)

Abstract Tau is one of the major microtubule-associated proteins in neuron. The abnormal hyperphosphorylation of tau is believed to be critical for pathogenesis of Alzheimer disease. The autopsied human brain tissue is commonly available with longer than 2~3 h of postmortem delay. Therefore, understanding whether and how postmortem delay affects tau phosphorylation is very important for studies of the function of tau and the role of tau phosphorylation in AD pathogenesis. Tau phosphorylation in normal rat brain and its change during postmortem delay were measured by using site-specific and phosphorylation dependent anti-tau antibodies. It was found that tau in normal rat brain was phosphorylated with different extents at Thr181, Ser199, Ser202, Thr205, Thr212, Ser214, Thr217, Ser396, and Ser404, but not at Ser262, Ser409, and Ser422. Tau was rapidly dephosphorylated at all of the sites measured in 3 h after death and the dephosphorylation continued till 6 h postmortem delay although total tau level did not change during this period of time. The activities of both tau kinase and tau phosphatase in rat brain were found decreased upon temperatures, and the kinase activity was more sensitive to temperature than phosphatases activity at 25°C. The rapid dephosphorylation of tau after animal death was due to the relative higher activity of tau phosphatase in the brain.

Key words tau, protein phosphorylation, postmortem delay, Alzheimer disease

*This work was supported by a grant from The Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK2004047).

**Corresponding author. Tel: 86-513-5051744, E-mail: feiliu63@hotmail.com

Received: May 30, 2005 Accepted: July 31, 2005