

研究简报

Caspase-3 对磷酸化 tau 蛋白截断作用的研究*

段萍 李夏春 邓艳秋 张蕪 王建枝**

(华中科技大学同济医学院病理生理教研室, 武汉 430030)

摘要 磷酸化 tau 是阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的特征性病理改变——神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs) 的主要组成部分。最近的研究显示: NFT 存在 Glu³⁹¹ 和 Asp⁴²¹ 位点被截断的 tau 片段, 然而, tau 蛋白的磷酸化是否会影响 caspase-3 的切割作用尚不清楚。首先纯化重组 tau 蛋白, 然后利用蛋白激酶 A (PKA)、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (CaMK II) 和乳鼠海马组织抽提液对其磷酸化, 并用 caspase-3 对不同磷酸化的 tau 蛋白进行切割, 比较 caspase-3 对非磷酸化和不同蛋白激酶磷酸化的 tau 蛋白的切割特性。结果显示: 除切割非磷酸化 tau 蛋白外, caspase-3 在体外可分别切割被 PKA、CaMK II 和乳鼠海马组织抽提液磷酸化的 tau 蛋白。这一结果提示: 磷酸化修饰的 tau 蛋白仍然是 caspase-3 的底物。

关键词 阿尔茨海默病, tau 片段, 磷酸化, 胱天蛋白酶-3, 细胞凋亡

学科分类号 R745.7, Q513

细胞中蛋白质降解是凋亡 (apoptosis) 的关键机制之一^[1]。细胞骨架蛋白如肌动蛋白 (actin)、fodrin、gelsolin 和 GAS2 等, 是凋亡蛋白酶的底物^[2-5]。已有研究发现: 在神经退行性疾病中如亨廷顿病 (Huntington's disease, HD) 和阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)^[6], 神经元大量丢失, 但对其细胞死亡丢失的机制尚不清楚。越来越多的证据显示: 微管相关蛋白 tau (microtubule associated protein, tau) 在 AD 和其他的 tau 疾病中被异常切割^[7-10]。在 AD 神经元中被切割的 tau 蛋白标记与神经细胞死亡的标记具有相关性。在神经细胞凋亡的细胞模型中, tau 片段的生成是早期的、可逆的, 并且 caspase-3 和 calpain 被证实参与切割 tau 蛋白^[11]。当一系列长度不一的重组人类 tau 片段在体外不同细胞中表达时, 表现出不同的诱导凋亡的能力^[12]。研究证明 tau 蛋白是凋亡蛋白酶的底物, 而 tau 蛋白在被切割后又可促进细胞凋亡。

因此, 已有学者提出: tau 蛋白可能参与细胞内正反馈循环。在此循环中, 阈下的凋亡刺激因子激活凋亡蛋白酶, 而 tau 蛋白是凋亡蛋白酶的底物, 并且蛋白酶切割 tau 蛋白所产生的 tau 片段可以诱导凋亡。这种细胞内的毒性循环被认为可能是不同神经退行性疾病的发病基础^[13]。

在 AD 患者脑中, tau 蛋白被异常修饰并聚集成细胞内双螺旋纤维 (paired helical filaments, PHF), 它们的蛋白质组成成分是 PHF-tau 蛋白。与

AD 相关的过度磷酸化 tau 蛋白, 可能是由于激酶活性的增加或者是磷酸酶活性降低引起^[14], 异常磷酸化的 tau 蛋白和正常 tau 蛋白的生化特性不同^[15]。本研究试图阐明 tau 蛋白经过磷酸化修饰后, 是否会影响 caspase-3 对它的切割作用。该研究结果将为 tau 蛋白磷酸化对细胞凋亡/生存命运的影响提供有用的信息。

1 材料与方法

1.1 材料

含全长重组人类 tau 蛋白 (tau40) cDNA 的表达载体 (pRK172) 由 Goedert 博士 (牛津大学) 提供。工程菌株为 *E.coli* BL21 (DE3)。P11 Cellulose Phosphate 和 Sephacryl S-300 分别为 Whatman 和 Pharmacia 公司产品; 多克隆抗体 111e 由 Iqbal 教授赠送 (纽约大学医学院); Protein Kinase A (PKA)、人类重组活性 caspase-3、CaMK II、P262 抗体和 BCA 蛋白检测试剂盒分别购于 Alexis Biochemicals、CalBiochem、Sigma、Biosource 和 Pierce 公司。

*国家自然科学基金资助项目 (30170221, 30430270)。

** 通讯联系人。

Tel: 027-83692625, Email: Wangjz@mails.tjmu.edu.cn

收稿日期: 2004-06-11, 接受日期: 2004-08-31

1.2 方法

1.2.1 Tau40 蛋白的制备. Tau 40 质粒转化细菌 (*E. coli* Bl 21 DE3)^[6]. 大规模培养转化菌, 加入 IPTG (0.4 mmol/L) 培养 3~5 h, 4℃ 离心取沉淀并加入裂解缓冲液 (50 mmol/L Mes, 5 mmol/L DTT, 5 mmol/L PMSF, 0.005 mol/L benzanirdine, 10 μmol/L leupeptin, 2 mg/L apotinine, 1 mg/L pepstatin A, pH 6.8), 超声破碎后离心取上清液 (保留样品 1). 将上清液加入等量体积的溶液 (1 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L EDTA), 沸水煮后, 再次 4℃ 离心取上清液 (保留样品 2) 用磷酸纤维素柱 (P11) 层析分离, 用免疫印迹法确定 tau 蛋白的洗脱峰, 收集富含 tau 蛋白的组分 (保留样品 3). 用聚乙二醇 (分子质量 20 000) 浓缩样品 3, 离心取上清液 (保留样品 4) 用凝胶过滤层析 (Sephacryl S-300) 分离蛋白质, 测收集液 A₂₈₀, 收集蛋白质峰组分, 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和蛋白质印迹 (Western blot) 鉴定, 合并含 tau 蛋白的组分 (保留样品 5). 所纯化的 tau 蛋白达凝胶电泳蛋白染色单点纯. 纯化的 tau 蛋白透析后冷冻干燥待用.

1.2.2 tau 蛋白的磷酸化. 将纯化的 tau40 (1 g/L) 分别与 PKA (2 g/L) 和 CaMK II (2 mg/L) 在磷酸化缓冲液 (40 mmol/L HEPES, 6 mmol/L MgCl₂, 2 mmol/L DTT, 2 mmol/L ATP) 中 30℃ 保温 4 h. PKA 磷酸化反应 pH 6.8; CaMK II 磷酸化反应 pH 7.5, 并加入 90 mg/L CaM 和 0.3 mmol/L CaCl₂. 于 95℃ 加热、离心、收集上清液待用. 取新生 3 天的鼠海马组织, 匀浆 (50 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L

EGTA, 2 mmol/L dithiothreitol, 50 mmol/L NaF, 1 mmol/L Na₃VO₃, 1 mmol/L PMSF, pH 8.0) 后, 100 000×g 离心 10 min, 4℃. 将 1 μl 海马提取液与 20 μl 0.5 g/L tau40 蛋白在磷酸化缓冲液 (40 mmol/L HEPES, 3 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L EGTA, 2 mmol/L ATP, 10 mmol/L KCl, 1 mmol/L PMSF, pH 7.2) 中 37℃ 保温 16 h. 于 95℃ 加热、离心、收集上清液待用.

1.2.3 体外 caspase-3 切割磷酸化 tau 蛋白. 将纯化的非磷酸化 tau40, 以及 PKA、CaMK II 和鼠海马提取液磷酸化的 tau40 分别与 75 U/ml caspase-3 在缓冲液 (50 mmol/L HEPES, 50 mmol/L NaCl, 0.1% CHAPS, 10 mmol/L EDTA, 5% 甘油, 10 mmol/L DTT, pH 7.2) 中 37℃ 保温 2 h. 于 95℃ 加热 10 min, 离心, 收集上清液待用.

1.2.4 Tau 蛋白的鉴定及含量测定. 用 10% SDS-PAGE 和考马氏亮蓝染色鉴定 tau 蛋白的纯度, 用蛋白质印迹、多克隆 tau 抗体 111e 和 P262 检测 tau 蛋白的磷酸化和被 caspase-3 的切割作用. 以牛血清白蛋白作标准用 BCA 法测定蛋白质浓度, 方法参照试剂说明书.

2 结 果

2.1 tau40 蛋白的纯化和鉴定

Tau40 经离心、离子交换和凝胶过滤层析纯化后, 采用 SDS-PAGE 考马斯亮蓝和蛋白质印迹进行分析鉴定. 结果显示: 在对应于 tau 蛋白的位置出现单条显色带 (图 1).

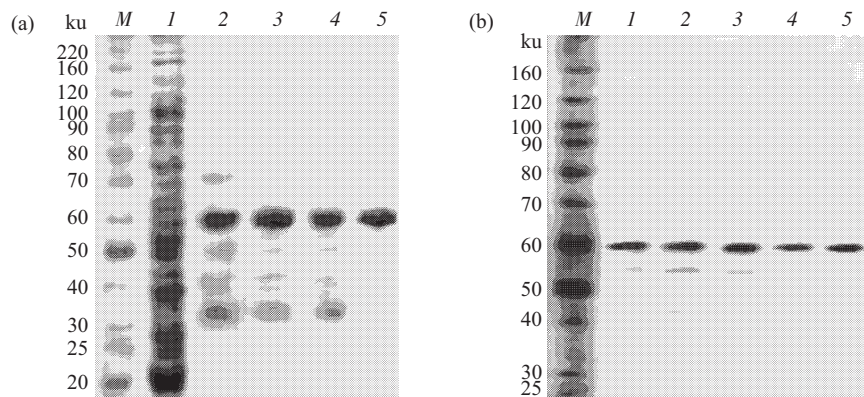


Fig.1 Purification and identification of tau protein

(a) Coomassie blue staining; (b) Immunoblot against 111e. 1: extracts from *E. coli* cells expressing recombinant tau; 2: samples after heat treatment and centrifugation; 3: sample after ion-exchange chromatography; 4: sample after polyglycol-20 000 concentration; 5: sample after gel filtration chromatography. M indicates molecular mass markers.

2.2 Caspase-3 切割磷酸化 tau 蛋白

将纯化的 tau 蛋白在体外用 CaMK II、PKA 和乳鼠海马提取液 (HpE, 含各种蛋白激酶) 磷酸化后, 免疫印迹显色可见磷酸化 tau 蛋白迁移率降低, 其分子质量位于 60~70 ku 之间. 其中, 被 PKA 磷酸化的 tau 蛋白电泳迁移率降低最明显 (图 2a(1)). 由于乳鼠脑组织自身含有 tau 蛋白, 为

排除外源性 tau 蛋白的影响, 用加入同等含量乳鼠脑组织提取液作为对照进行免疫印迹检测, 结果证明对照组呈阴性反应 (图 2a(2)、(3)), 说明所用乳鼠脑组织提取液中 tau 蛋白含量极低, 不干扰蛋白质印迹结果. 此外, tau 蛋白被 CaMK II 磷酸化后可被识别 Ser262 位点磷酸化的多克隆抗体 P262 显色 (图 2a(3)).

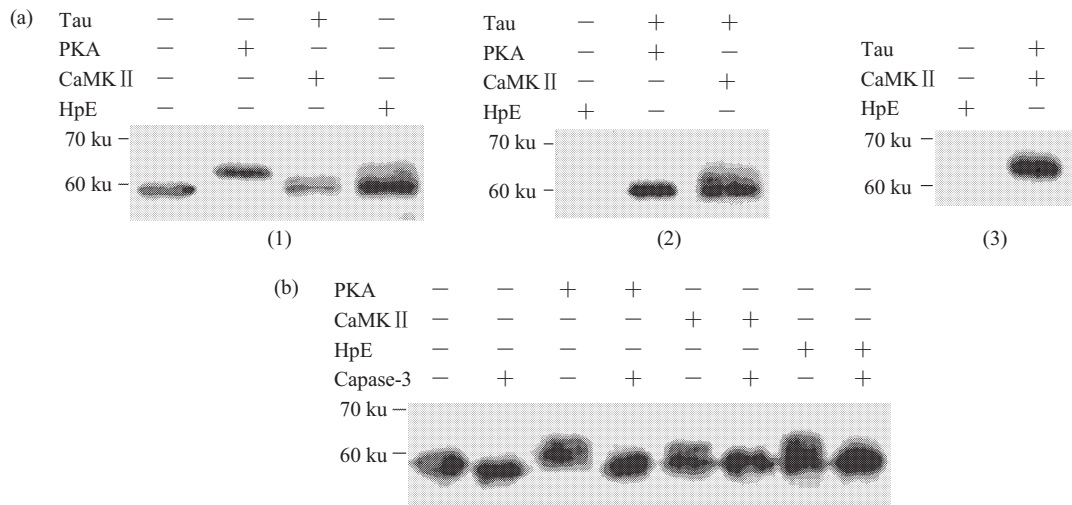


Fig.2 Tau40 phosphorylated *in vitro* and truncated by caspase-3

(a) Tau40 phosphorylated by PKA, CaMK II and rat hippocampi extract (HpE) probed by 111e (panel (1) and (2)) and tau40 phosphorylated by CaMK II probed by P262 (panel (3)). (b) Cleavage of unphosphorylated and phosphorylated tau by caspase-3 probed by 111e.

将非磷酸化 tau 以及不同蛋白激酶磷酸化的 tau 与 caspase-3 共同温育后, 发现非磷酸化 tau 蛋白和磷酸化的 tau 蛋白显色条带迁移率增加, 证明体外非磷酸化 tau 蛋白以及被 CaMK II、PKA 和乳鼠海马提取液磷酸化的 tau 蛋白都可被 caspase-3 切割, 并产生一个比切割前分子质量减小的 tau 片段, 这个片段同样可以与多克隆抗体 111e 结合, 可以用免疫印迹法检测 (图 2b).

3 讨 论

最近, Gamblin 等^[17]报道在 AD 患者脑 NFTs 中存在 Glu391 和 Asp421 位点被截断的 tau 片段, 并且确定 Asp421 位点截断的 tau 片段由 caspase-3 切割所产生. 体外实验证明, caspase-3 可在 Asp421 位点切割 tau 蛋白^[13], 生成被截断的 tau 蛋白 (氨基酸残基 1~421), 从而获得新的功能表型, 例如在体外纤维组装能力增强等. Caspase-3 在 Asp421 位点降解 tau 蛋白并从它的 C 端截除 20 个氨基酸残基, 在体外已证明切除氨基端可以显著抑

制 tau 蛋白聚集^[17]. 本研究已经证明除了非磷酸化 tau 蛋白以外, 在体外分别被 PKA、CaMK II 和乳鼠海马组织提取液磷酸化的 tau 蛋白也是 caspase-3 的底物, 即磷酸化修饰并不能使 tau 蛋白逃避 caspase-3 切割.

在培养的神细胞凋亡模型中, tau 降解片段的生成显示出早期可逆的特性. 一系列 tau 片段在细胞中表达可以促进细胞凋亡^[18], 这些片段中包括 tau1~391 和 tau1~422, tau 蛋白 Asp421 位点是一个关键点, 随着 tau 片段向 C 端延伸, tau 片段的促进凋亡作用丧失. 已有一些学者提出假设: tau 可能是 AD 及相关 tau 疾病患者神经细胞毒性循环的一部分. 在这一循环中, tau 不仅是蛋白酶的底物, 可以被阈下的促凋亡刺激激活的蛋白酶切割, 同时它也可通过由这些蛋白酶作用所产生的片段来诱导凋亡. 这种 tau 参与的正反馈细胞内毒性循环, 类似于在 AD 患者观察到的细胞外循环, 即淀粉样前体蛋白 (APP) 被 caspase-3 切割产生毒性片段, 该毒性片段反过来又诱导细胞凋亡^[19].

过去在这方面的研究报道都集中在非磷酸化的 tau 蛋白及其降解的 tau 片段上, 然而在 AD 中蛋白激酶和磷酸酯酶失衡, tau 蛋白是以异常磷酸化等多种异常修饰参与 AD 患者的神经原纤维变性. tau 蛋白的磷酸化修饰可影响蛋白质构象, 可能会影响到 tau 片段的生成. 因此在本研究中, 我们采用最长的 tau 蛋白同工异构体——人类重组 tau40 蛋白, 探讨磷酸化修饰是否会导致 tau 蛋白逃避被 caspase-3 切割. 结果证明, 体外分别被 PKA、CaMK II 和乳鼠海马组织提取液磷酸化的 tau 蛋白都可以被 caspase-3 切割, 并生成比 tau40 更小的片段. 已有报道在 tau 蛋白中共有三段序列可以被 caspase-3 识别, 分别位于 tau 蛋白的氨基酸 22~25(I), 338~341(II) 和 418~421(III). 从迁移率下移程度粗略判断, 磷酸化和非磷酸化的 tau 蛋白被 caspase-3 切割的位点可能不同. 下一步将采用位点突变和氨基酸序列分析技术进一步确认这一问题.

总之, 本研究从 tau 蛋白毒性片段假说入手, 对 tau 的磷酸化在此假说中的作用进行了初步的探讨, 第一次将 tau 磷酸化与其被 caspase-3 切割性质的改变联系在一起, 将有助于理解 tau 蛋白磷酸化在 AD 发病机制中的作用.

参 考 文 献

- Salvesen G S, Dixit V M. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, 1997, **91** (4): 443~446
- Brancolini C, Benedetti M, Schneider C. Microfilament reorganization during apoptosis: the role of Gas2, a possible substrate for ICE-like proteases. *EMBO J*, 1995, **14** (21): 5179~5190
- Mashima T, Naito M, Noguchi K, *et al.* Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis. *Oncogene*, 1997, **14** (9): 1007~1012
- Geng Y J, Azuma T, Tang J X, *et al.* Caspase-3-induced gelsolin fragmentation contributes to actin cytoskeletal collapse, nucleolysis, and apoptosis of vascular smooth muscle cells exposed to proinflammatory cytokines. *Eur J Cell Biol*, 1998, **77** (4): 294~302
- Janicke R U, Ng P, Sprengart M L, *et al.* Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *J Biol Chem*, 1998, **273** (25): 15540~15545
- Ona V O, Li M, Vonsattel J P, *et al.* Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. *Nature*, 1999, **399** (6733): 263~267
- Ugolini G, Cattaneo A, Novak M. Co-localization of truncated tau and DNA fragmentation in Alzheimer's disease neurones. *Neuroreport*, 1997, **8** (17): 3709~3712
- Spillantini M G, Goedert M. Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci*, 1998, **21** (10): 428~433
- Goedert M, Spillantini M G, Cairns N J, *et al.* Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron*, 1992, **8** (1): 159~168
- Johnson G V, Seubert P, Cox T M, *et al.* The tau protein in human cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease consists of proteolytically derived fragments. *J Neurochem*, 1997, **68** (1): 430~433
- Canu N, Dus L, Barbato C, *et al.* Tau cleavage and dephosphorylation in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *J Neurosci*, 1998, **18** (18): 7061~7074
- Fasulo L, Ugolini G, Visintin M, *et al.* The neuronal microtubule-associated protein tau is a substrate for caspase-3 and an effector of apoptosis. *J Neurochem*, 2000, **75** (2): 624~633
- Yuan J, Yankner B A. Caspase activity sows the seeds of neuronal death. *Nat Cell Biol*, 1999, **1** (2): E44~45
- Trojanowski J Q, Lee V M. Phosphorylation of paired helical filament tau in Alzheimer's disease neurofibrillary lesions: focusing on phosphatases. *FASEB J*, 1995, **9** (15): 1570~1576
- Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, *et al.* Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev*, 2000, **33** (1): 95~130
- J. 萨姆步鲁克, D.W. 拉塞尔. 黄培堂等译. 分子克隆. 北京: 科学出版社, 2001. 87~93
Sambrook J, Russell D W. Translated by Huang P T, *et al.* *Molecular Cloning*. Beijing: Science Press, 2001. 87~93
- Gamblin T C, Berry R W, Binder L I. Tau polymerization: role of the amino terminus. *Biochemistry*, 2003, **42** (7): 2252~2257
- Gamblin T C, Chen F, Zambrano A, *et al.* Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (17): 10032~10037
- Gervais F G, Xu D, Robertson G S, *et al.* Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation. *Cell*, 1999, **97** (3): 395~406

Truncation of Caspase-3 on Phosphorylated tau*

DUAN Ping, LI Xia-Chun, DENG Yan-Qiu, ZHANG Qi, WANG Jian-Zhi**

(Pathophysiology Department, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract It is reported recently that truncated tau at Glu391 and Asp421 presents in the patients of Alzheimer's disease (AD) brain, and caspase-3 is involved in tau truncation at Asp421. *In vitro* studies show that caspase-3 can cleaved tau only at Asp421 and the proteolytic cleavage of tau at Asp421 by caspase-3 generates a truncated tau fragment namely tau1-421, which enhances filament assembly *in vitro*. Expression of tau1-421 in neurons promotes apoptosis. It is not known that if phosphorylated tau is also a substrate of caspase-3. To understand the question, recombinant human tau protein was purified and phosphorylated with protein kinase A (PKA), calcium/calmodulin dependent protein kinase II (CaMK II) or kinases from newborn rat hippocampi extract, and then these different tau species were cleaved by caspase-3. It was demonstrated that tau phosphorylated by PKA, CaMK II and newborn hippocampi extract is also cleaved by caspase-3. As the phosphorylated tau also can be cleaved by caspase-3, it was speculated that phosphorylation tau is still the substrate of caspase-3.

Key words Alzheimer's disease, tau fragment, caspase-3, apoptosis

*This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30170221, 30430270).

**Corresponding author. Tel: 86-27-83692625, E-mail: Wangjz@mails.tjmu.edu.cn

Received: June 11, 2004 Accepted: August 31, 2004