

阿尔次海默病 tau 蛋白异常修饰与其功能的关系

王建枝 龚成新¹⁾ I. GRUNDKE-IQBAL¹⁾ K. IQBAL¹⁾

(同济医科大学病理生理教研室, 武汉 430030)

摘要 阿尔次海默病易溶型胞浆 tau 和难溶型双螺旋丝中的 tau 均被异常磷酸化和异常糖基化修饰. 异常修饰的 tau 丧失其促微管组装活性, 用不同蛋白磷酸酯酶对难溶型双螺旋丝中的 tau 去磷酸化处理后可不同程度恢复其促微管组装生物学活性. 单纯去糖基化处理只在很小限度恢复 tau 的功能, 但去糖基化预处理可增强去磷酸化对 tau 上述活性的恢复. 提示: a. tau 的异常磷酸化是导致其功能活性丧失的直接因素, 而糖基化修饰可能通过对其结构的影响而间接对 tau 功能活性发挥作用; b. 蛋白磷酸酯酶可部分抑制和逆转阿尔次海默病的脑病理损伤.

关键词 阿尔次海默病, 微管组装, 去磷酸化, 去糖基化, tau 蛋白

学科分类号 R745.7, Q513

微管是维持神经细胞骨架完整性及神经细胞胞体和轴突物质转运所必需的结构. 在阿尔次海默病 (Alzheimer disease, AD) 的神经元, 特别是在其海马神经元中, 微管被双螺旋丝 (paired helical filaments, PHF) 结构取代^[1]. PHF 以神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFT) 存在于神经元的胞体; 以神经毡和神经炎性斑存在于受累神经元的退化树突^[2]. 微管相关蛋白 tau 是 PHF 的主要组成成分. 在 AD 脑中, 特别是在 PHF 结构中的 tau 被异常过度磷酸化^[3,4]. 用磷酸化依赖的特异抗 tau 抗体以及质谱检测法, 已证明 PHF 中的 tau 蛋白至少有 21 个异常磷酸化位点^[5].

成人脑中 tau 至少有 6 种同功异构体, 根据分子质量最大的 tau 同功异构体的编码序列, tau 分子中绝大部分的磷酸化位点均集中在两个区域: 一个是氨基端的 Ser198 至 Thr217, 另一个是羧基端 (Ser396~ Ser422) 至微管结合重复区 (Glu244~ Gly367). 由于异常过度磷酸化, 使 tau 表观分子质量明显增大^[6]. 根据 AD tau 的水溶性, 可将其分为易溶型异常磷酸化的 tau (AD P-tau) 和难溶型 PHF-tau.

除异常过度磷酸化外, AD 脑中的 tau 还被异常糖基化^[7]. 异常修饰的 tau 丧失其促微管组装生物学活性. 我们的研究已经证明: AD P-tau 经去磷酸化处理可不同程度恢复其生物学活性^[8]. 在本研究中, 我们进一步探讨了, a. 蛋白磷酸酯酶 PP-2A 或 PP-2B 的去磷酸化作用是否能使 PHF 中的 tau 恢复其生物学活性; b. tau 的异常糖基化修饰与其生物学功能的关系.

1 材料与方法

1.1 组织来源

该实验中所用的人脑组织来源于死后 6 h 内的尸体解剖, 收集的人脑组织均贮存于 -75℃ 直至使用. AD 患者均经过尸检脑病理学切片检查而确诊.

1.2 AD P-tau 和 PHF-tau 的制备

AD P-tau 的制备参照 Kopke 的方法^[9]. 大致步骤为: 先从 AD 脑匀浆中离心得到 27 000 g 至 200 000 g 的上清液, 这一级分富含 AD P-tau 和单个 PHF 结构. 为了将 AD P-tau 与此 PHF 分离, 我们采用了 8 mol/L 尿素抽提, 酸沉淀, 磷酸纤维素层析和 2- (N-吗啡啉) 乙磺酸 (Mes) 缓冲液透析等处理步骤. AD 脑中 PHF-tau 的制备参照 Iqbal 等的长程序分离法^[10].

1.3 去糖基化反应和去磷酸化反应

除非特别指出外, AD P-tau 和 PHF/NFT 的去糖基化作用条件如下: 去糖基化反应混合液中含 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液, pH 6.8, 1.0 mmol/L EDTA, 1 g/L Triton X-100, 10 g/L β -巯基乙醇, 蛋白酶抑制剂 aprotinin, penstatin 和 Leupentin 各 0.01 g/L, 0.2 g/L PHF 或 AD P-tau, 2 000 U/L 内切糖苷酶 F/N-糖苷酶 F, 反应在 37℃ 进行 30 min. 反应通过加入糖苷酶起始, 加入 4 倍体积预冷丙酮终止. 去糖基化作用的检测用免疫印迹法^[3].

除特别标明外, 去磷酸化反应均在 37℃ 进行 45 min. 反应混合液中含 50 mmol/L Tris-HCl

¹⁾ 美国纽约州立基础研究所化学病理实验室, 纽约 10314.

收稿日期: 1997-12-05, 修回日期: 1998-05-04

(pH 7.0), 20 mmol/L β -巯基乙醇, 0.1 g/L 牛血清白蛋白, 1.0 mmol/L $MnCl_2$; aprotinin, Leupeptin 和 pepstatin 0.01 g/L, 0.07 g/L PHF-tau, 2 000 U/L PP-2A 或 5 000 U/L PP-2B (1 U PP-2A 或 PP-2B 分别指在 30 °C, 每分钟催化磷酸化酶 a 或磷酸化酶激酶释放 1.0 nmol 磷酸的酶量). 在用 PP-2B 进行的去磷酸化反应液中, 还含有 1 mmol/L $CaCl_2$ 和 1 μ mol/L 钙调素. AD P-tau 的去磷酸化反应条件除用低磷酸酶浓度外, 其余同 PHF-tau 的去磷酸化条件. 去磷酸化位点的检测用免疫印迹法^[3].

1.4 PHF-tau 的抽提

参照文献 [11], 将未经处理或经 PP-2A 或 PP-2B 去磷酸化的 PHF-tau 样品用 50 mmol/L, pH 7.0 的磷酸缓冲液洗涤两次, 再用 5 mmol/L Mes, 0.05 mmol/L 乙二醇双(2-氨基乙基)四乙酸(EGTA), pH 6.8 缓冲液洗涤两次, 接着用探头超声破碎法反复抽提 PHF 中的 tau 蛋白, 这些 tau 蛋白经浓缩处理后将用于体外微管组装实验. 未经处理以及经磷酸酶处理的 AD P-tau 样品则用 100 mmol/L Mes, 1 mmol/L EGTA pH 6.8 的溶液透析后直接用于微管组装实验.

1.5 体外微管组装

体外微管组装实验在 37 °C, 1 cm 石英比色皿中进行. 反应混合液中含管蛋白 (3 g/L) 和如上述所制备并处理的 tau 蛋白 (0.2 g/L) 以及微管组装缓冲液 (100 mmol/L Mes, 1 mmol/L EGTA 和 2 mmol/L GTP). 所形成微管的量通过检测 350 nm 波长处光密度的变化而估算. 在反应达稳

定期时, 取出定量溶液经负性染色后进行电子显微镜检查, 以确证微管的生成及其超微结构变化.

2 结 果

2.1 去磷酸化使 PHF-tau 恢复活性

未经去磷酸化处理的 PHF-tau 与管蛋白一起在 37 °C 保温时只产生很低的光吸收值 (图 1), 负染电子显微镜检测未见微管生成 (图 2b). 与此相反, 经 PP-2A 或 PP-2B 处理的 PHF-tau 的光吸收显著增高 (图 1). 电镜下可见大量微管生成 (图 2c 和 2d). 经 PP-2A 去磷酸化的 PHF-tau 的光吸收值显著高于 PP-2B 处理的样品 (图 1). 去磷酸化的 PHF-tau 与管蛋白所形成的微管与正常人类 tau 在相同反应条件下所形成的微管在电镜结构上无显著差异 (图 2a, c 和 d).

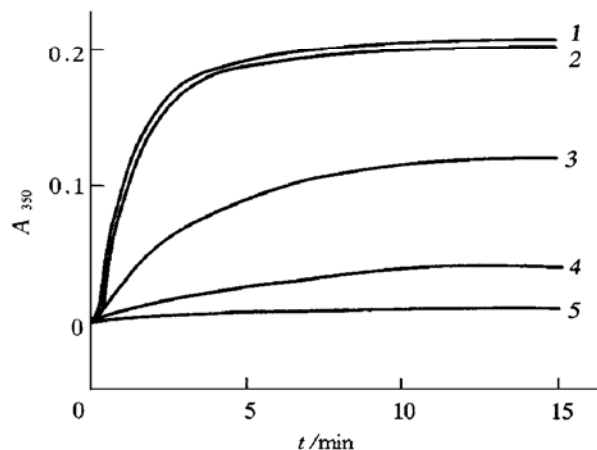


图 1 去磷酸化对 PHF-tau 促微管组装活性的影响

1: 正常人类 tau; 2: 经 PP-2A 处理的 PHF-tau; 3: 经 PP-2B 处理的 PHF-tau; 4: 管蛋白; 5: 未经处理的 PHF-tau.

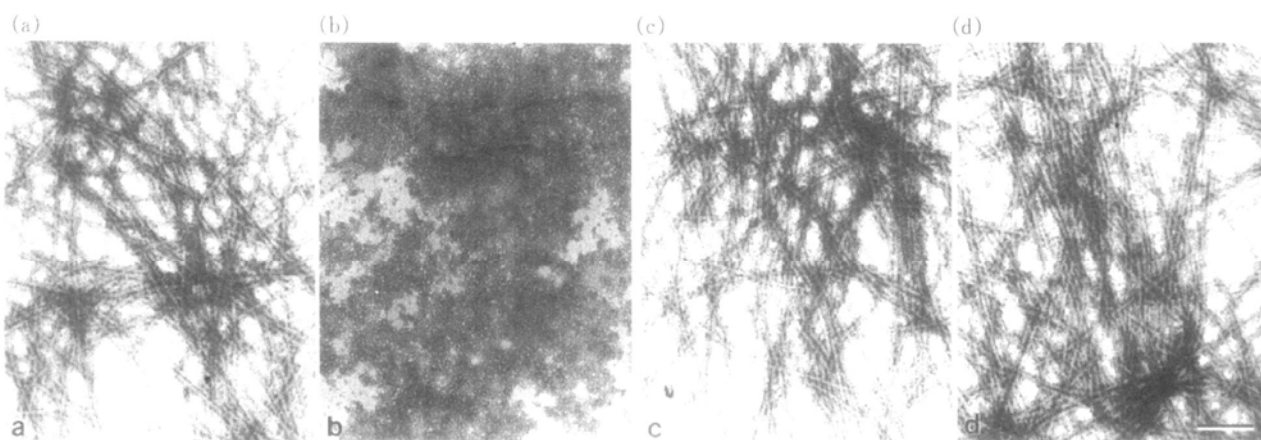


图 2 负染电子显微镜显示微管组装生成的产物

(a) 正常人类 tau; (b) 未经去磷酸化处理的 PHF-tau; (c) 经 PP-2A 或 (d) PP-2B 处理的 PHF-tau.

2.2 去糖基化对 tau 蛋白活性的影响

单纯去糖基化几乎不能增加 AD P-tau 的促微管

组装活性 (图 3a 3), 所以负染电镜检查未见微管结构 (图 4b). 此外, 单纯去糖基化轻度增加 PHF-tau

在 350 nm 的光吸收 (图 3b-3), 但电镜下几乎不见微管形成 (图 4f). 然而, 经去糖基化处理的样品再去磷酸化 (图 3a 和 3b-1) 比单纯去磷酸化 (图 3a 和 3b-2) 的样品有更强的促微管组装活性, 电镜下可见大量微管形成 (图 4d, 4h, 4c 和 4g). 这些结

果提示, 虽然单纯去糖基化不能明显恢复 AD P-tau 和 PHF-tau 的生物学活性, 但糖苷酶的预处理可使异常磷酸化的 tau 更易受蛋白磷酸酯酶水解. 这一结果通过对神经原纤维缠结经上述处理后所释放的游离 tau 蛋白的定量分析得到了进一步证实^[7].

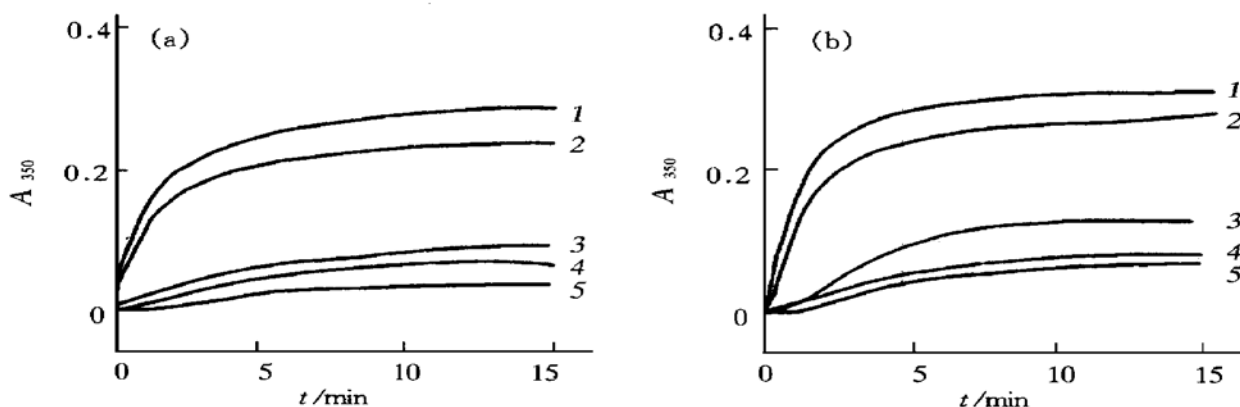


图 3 去糖基化对 AD P-tau (a) 和 PHF-tau (b) 促微管组装活性的影响

1: 去糖基化和去磷酸化双重处理的 tau; 2: 去磷酸化处理的 tau; 3: 去糖基化处理的 tau;
4: 未经处理的 tau; 5: 管蛋白.

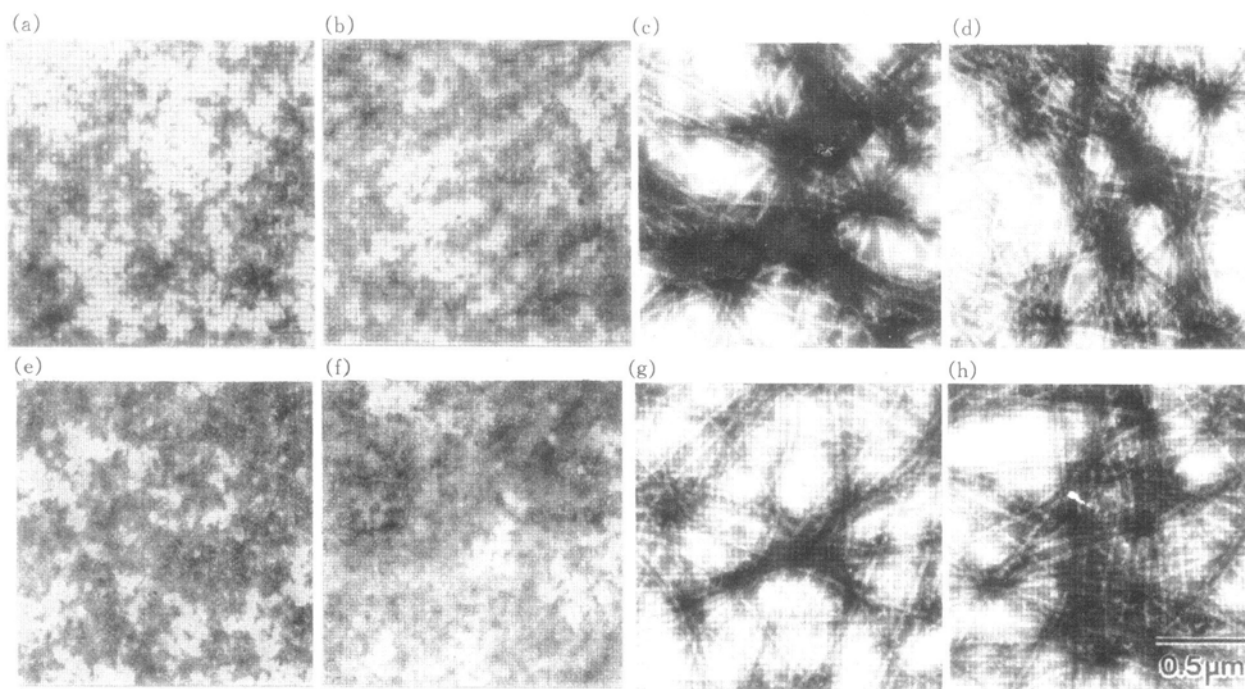


图 4 负染电子显微镜显示微管组装生成的产物

(d), (h): 去糖基化和去磷酸化双重处理的 tau; (c), (g): 去磷酸化处理的 tau; (b), (f): 去糖基化处理的 tau
(a), (e): 未经处理的 tau; (a), (b), (c), (d): AD P-tau; (e), (f), (g), (h): PHF-tau.

3 讨 论

3.1 在本研究中, 我们首先证明: 当 AD P-tau 进一步聚集形成神经原纤维缠结后, 蛋白磷酸酯酶

PP-2A 或 PP-2B 的去磷酸化作用仍可不同程度恢复其 tau 蛋白的促微管组装功能. 这些研究资料进一步证明了 AD 患者脑病理损伤的可逆性. PP-2A 比 PP-2B 去磷酸化的 PHF-tau 样品具有显著增

高的促微管组装活性. 这一结果提示: a. tau 蛋白 Ser235 位的磷酸化可能与其促微管组装活性无关, 因为 PP-2B 可使该位点去磷酸化, 而 PP-2A 却不能^[12, 13]; b. tau 蛋白分子中可能存在一个或多个决定其生物学活性的磷酸化位点, 这些位点可被 PP-2A 而不是 PP-2B 去磷酸化. 在同等条件下, PP-2A 可水解 AD P-tau 磷酸基的 60%, 而 PP-2B 只能水解 36%, 其研究结果支持了上述假设^[8]. 关于这种差异的性质尚待进一步研究探讨. 虽然 PP-2A 比 PP-2B 处理的样品有明显增高的吸光值, 但电泳下所形成微管的超微结构未见显著差异.

3.2 通过检测 AD P-tau 和 PHF-tau 的促微管组装活性, 我们研究了 tau 蛋白的糖基化作用与其功能的关系. 因为单纯去糖基化几乎不改变 350 nm 时的光吸收值, 我们推断: 单纯去糖基化作用不能恢复 tau 蛋白的促微管组装活性, 然而, 糖苷酶的预处理可使 AD P-tau 和 PHF-tau 更容易受磷酸酯酶作用, 从而比单纯去磷酸化显示出更高的促微管组装活性. 这一结果提示: tau 蛋白的异常磷酸化是造成其功能活性丧失的决定因素, 而糖基化作用可能只通过一种现在尚不清楚的机制间接影响 tau 的功能.

参 考 文 献

- 1 Terry R D, Gonatas N K, Weiss M. Ultrastructural studies in Alzheimer presenile dementia. *Am J Pathol*, 1964, **44** (12): 269 ~ 297
- 2 Braak H, Braak E, Grundke Iqbal I, *et al.* Occurrence of neurofibrillary threads in the senile human brain and in Alzheimer disease: a third location of paired helical filaments outside of neurofibrillary tangles and neuritic plaques. *Neurosci Lett*, 1986, **65** (3): 351~ 355
- 3 Grundke Iqbal I, Iqbal K, Quilley M, *et al.* Microtubule-associated protein tau: a component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem*, 1986, **261** (13): 6084~ 6089
- 4 Iqbal K, Grundke Iqbal I, Smith A, *et al.* Identification and localization of a tau peptide to paired helical filaments of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86** (14): 5646~ 5650
- 5 Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, *et al.* Proline-directed and non-proline-directed protein kinase phosphorylation of PHF-tau. *J Biol Chem*, 1995, **270** (2): 823~ 829
- 6 Goedert M, Spillantini M G, Jakes R, *et al.* Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer disease. *Neuron*, 1989, **3** (4): 519~ 526
- 7 Wang J-Z, Grundke Iqbal I, Iqbal K. Glycosylation of microtubule-associated protein tau: An abnormal posttranslational modification in Alzheimer disease. *Nature Med*, 1996, **2** (8): 871~ 876
- 8 Wang J-Z, Grundke Iqbal I, Iqbal K. Restoration of biological activity of Alzheimer abnormally phosphorylated tau by dephosphorylation with protein phosphatase 2A, -2B and -1. *Mol Brain Res*, 1996, **38** (2): 200~ 208
- 9 Kopke 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
- 10 Iqbal K, Zaidi T, Thompson C H, *et al.* Alzheimer paired helical filaments: bulk isolation, solubility and protein composition. *Acta Neuropathol*, 1984, **62** (3): 167~ 177
- 11 Wang J-Z, Gong G-Z, Zaidi T, *et al.* Dephosphorylation of Alzheimer paired helical filaments by protein phosphatase 2A and -2B. *J Biol Chem*, 1995, **270** (9): 4854~ 4860
- 12 Gong G-X, Singh T, Grundke Iqbal I, *et al.* Alzheimer disease abnormally phosphorylated tau is dephosphorylated by protein phosphatase 2B (calcineurin). *J Neurochem*, 1994, **62** (2): 803~ 806
- 13 Gong G-X, Grundke Iqbal I, Iqbal K, *et al.* Dephosphorylation of Alzheimer disease abnormally phosphorylated tau by protein phosphatase 2A. *Neurosci*, 1994, **61** (4): 765~ 772

The Relationship Between Abnormal Modification of tau and Its Biological Activity in Alzheimer Disease.

WANG Jiann-Zhi, GONG Cheng-Xin¹⁾, I. GRUNDKE-IQBAL¹⁾, K. IQBAL¹⁾ (*Department of Pathophysiology, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China; ¹⁾ Chemical Neuropathology Department, NYS Institute for Basic Research, New York 10314, USA*).

Abstract Both soluble abnormally phosphorylated tau and tau in paired helical filaments are abnormally glycosylated. Abnormally modified tau is incompetent in promoting the assembly of microtubules. Dephosphorylation of insoluble tau with various phosphatases restores differentially the biologic activity of tau in promoting the assembly of microtubules. Deglycosylation of tau enhances the above-mentioned activity caused by dephosphorylation although deglycosylation alone has no significant effect on restoring the biological activity of tau. These data suggest that abnormal phosphorylation of tau might be the direct factor for its deficient function whereas glycosylation might be an indirect one by affecting the structure of tau; that protein phosphatases might arrest and reverse the lesions in Alzheimer brain.

Key words Alzheimer disease, microtubule assembly, dephosphorylation, deglycosylation, tau