

HeLa、HEK293、SH-SY5Y 细胞中的 Tau 蛋白*

盛之玲^{1, 2, 3)**} 曲梅花^{1)**} 何海进¹⁾ 赫荣乔^{1)***}

(¹⁾中国科学院生物物理研究所, 北京 100101; (²)中国科学院研究生院, 北京 100049; (³)郑州大学医学院, 郑州 450052)

摘要 通过间接免疫荧光测定了 HeLa、HEK-293、SH-SY5Y 细胞内 Tau 蛋白的分布, 观察到在细胞间期单克隆抗体 Tau-1 的荧光信号分布于细胞质和胞核中. 特别是 HeLa 细胞, 其胞核内具有相对较高的 Tau 蛋白免疫荧光信号. 通过分离 SH-SY5Y 的细胞核, 更为清楚地显示了 Tau 蛋白在细胞核中的分布, 并且免疫荧光信号与 DNA 的 Hoechst33258 染色信号相重合. Western blotting 的测定结果进一步证明了 SH-SY5Y 细胞的胞质和胞核中均含有 Tau 蛋白的不同异构体. 以上结果提示, Tau 蛋白不仅存在于神经、肌肉等细胞内, 也存在于肿瘤细胞系, 并且分布于间期的胞核中.

关键词 Tau 蛋白, 神经 Tau, 肿瘤细胞, 细胞核, Tau 与 DNA 相互作用

学科分类号 Q5, Q6, Q7

1975 年, Weingarten 等^[1]在采用猪脑分离纯化微管蛋白的同时, 发现了一种与细胞骨架结构微管系统组装密切相关的蛋白质, 并命名为 Tau 蛋白. 后来大量的实验证明, 该蛋白质能够启动微管蛋白组装, 同时还具有稳定微管系统的作用^[2]. Tau 蛋白分布于神经细胞的胞质, 且在轴突和树突的生长点分布较为集中^[3]. 因此, Tau 蛋白被称为神经 Tau, 即 neuronal Tau. 由于 Tau 蛋白与神经细胞的发育、细胞形态、物质运输、信号转导等相关^[4~6], 特别是发现该蛋白质是老年性痴呆病人脑内神经缠结的主要组成成分, 使得 Tau 蛋白成为神经退行性疾病等相关研究领域的重要热点分子^[7]. 异常修饰如磷酸化、糖基化等可以导致 Tau 及其他某些神经退行性疾病相关蛋白质的错误折叠、分子聚集^[8~10], 并且沉积在神经细胞内, 引起细胞功能障碍和变性死亡^[11, 12].

近年来研究表明, Tau 可能是一种多功能蛋白质, 不但存在于神经系统之中, 而且存在于骨骼肌、心肌细胞中^[13]. Loomis 等^[14]发现 Tau 蛋白存在于人类成神经细胞瘤的细胞核中. 1995 年, Brady 等^[15]从人类脑细胞的细胞核中分离出了 Tau 蛋白. Cross 等^[16]从非神经系统的人类纤维细胞(human fibroblast)和 Huh-7 肝细胞瘤(Huh-7 hepatoma)胞核中分离出了 Tau 蛋白. 这些研究结果进一步支持了 Tau 蛋白存在于神经组织以外, 并具有多种功能的

假设.

令人感兴趣的是, 已经有报道将脑脊液中 Tau 蛋白的含量作为白血病的研究指标之一^[17], 说明国际同行开始注意到了 Tau 蛋白与肿瘤之间的关系. 中国科学院生物物理研究所的研究人员观察到, Tau 蛋白能够与 DNA 结合并具有稳定其双螺旋结构^[18]的作用, Tau 蛋白能够与组蛋白竞争结合 DNA, 形成“串珠样”(beads-on-string)复合物^[19]. Tau 蛋白能够抑制 DNA 的复制, 但对 RNA 的转录不产生影响^[20]. 最近, 作者实验室证明了 Tau 蛋白与 DNA 双螺旋的小沟(minor groove)结合, 并诱导 DNA 链的弯曲. Tau 蛋白的脯氨酸富集域(Pro rich domain)和微管结合域(microtubule binding domain)上的 Lys 残基为必需氨基酸^[21]. Tau 在神经细胞内的分布与功能已经有了大量的研究和报道, 然而, Tau 蛋白在其他组织细胞内的分布, 特别是在肿瘤细胞内, 在不同细胞周期的分布值得进一步关注. 在此, 本文报道 Tau 蛋白在 HeLa、HEK-293、

* 国家自然科学基金(90206041, 30570536), 国家重点基础研究发展计划(973)(2006CB500703), 中国科学院知识创新项目(KSCX2-YW-R-119)资助.

** 共同第一作者. *** 通讯联系人.

Tel: 010-64889876, E-mail: herq@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2008-07-17, 接受日期: 2008-09-12

SH-SY5Y 细胞质和细胞核中的分布情况, 同时强调该蛋白质在细胞间期可能与 DNA 有相互作用。

1 材料和方法

1.1 材料

表达人类神经异构体 Tau23 的菌株 BL21 以及单克隆抗体 Tau-1 分别由英国剑桥大学 Geodert 教授和龚成新教授(The New York State Institute for Basic Research in Developmental Disabilities)馈赠。人成神经瘤细胞 SH-SY5Y 由美国 Sloan Kettering 癌症中心的 Biedler 博士馈赠。SP-sepharose、Q-sepharose 柱填料购自 Amersham Biosciences (USA); DMEM、F12 培养基、新生牛血清、马血清、青霉素、四环素、FITC-羊抗小鼠 IgG 购于 Hyclone 公司; 视黄酸、蛭蛭菌素、氨苄青霉素、IPTG 购自 Sigma 公司; 紫外吸收光谱通过 Hitachi UV-2010(Japan)紫外分光光度计测定。

1.2 方法

1.2.1 Tau23 蛋白的表达纯化。Tau 蛋白的表达参考文献[22]。用划线法将保存菌种接种于 LB 固体培养基(含 100 mg/L 氨苄青霉素)中培养过夜(37℃)后, 转接种于 LB 液体培养基(含 100 mg/L 氨苄青霉素)并扩大培养, 培养至 $A_{600}=0.5\sim 0.7$ 。向培养液中加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG, 继续培养 3~4 h, 离心(6 500 r/min, 4℃, 20 min)收集菌体。按 10 ml/L 培养物的比例将菌体重悬于含有蛋白酶抑制剂(2 mmol/L Aprotinin, 0.2 mmol/L PMSF)和 2 mmol/L DTT 的 Pipes 缓冲液中, 菌悬液中加入溶菌酶(终浓度为 20 mg/L)及 1% TritonX-100 和 10 mmol/L β -巯基乙醇。冰浴下超声处理。经离心后对上清液沸水浴 20 min, 再次离心(15 000 r/min, 20 min, 4℃)收集上清液。上清液先后过 Q-Sepharose 和 SP-Sepharose 离子交换柱, 用 Pipes 缓冲液(含 0.3 mol/L NaCl)特异性洗脱, 收集蛋白质。蛋白质经 10 mmol/L Pipes (pH 6.4)缓冲液透析后, 置 -70℃ 保存备用。SDS-PAGE 检测 Tau23 的纯度, 以 Tau 的单克隆抗体 Tau-1 为一抗进行 Western blot 鉴定, BCA 试剂盒(Pierce 公司, USA)进行蛋白质浓度的测定。

1.2.2 微管蛋白的分离纯化。参考 Williams 等建立的方法, 分离纯化新鲜猪脑的微管蛋白。微管蛋白有在 0℃ 解聚、37℃ 聚集的特性, 可通过 4℃、25℃(两次)循环超速离心分离、纯化微管蛋白, 继而通过 P11 磷酸纤维素离子交换柱, 除去吸附的

Tau 蛋白^[23,24]。具体步骤: 将新鲜猪脑置于冰上, 小心剥去血管与脑膜, 用事先预冷的缓冲液(0.1 mol/L Mes, 1 mmol/L EGTA, 0.5 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L β -ME, 0.1 mmol/L EDTA, pH 6.4)冲洗 2 次, 按 0.75 ml 缓冲液每克脑组织的比例进行匀浆。超速离心匀浆液(100 000 g, 4℃, 1 h)弃沉淀。取与上清等体积的含有 8 mol/L 甘油的 Mes 缓冲液(含终浓度为 1 mmol/L 的 GTP), 与上清混匀保温(37℃, 20 min), 超速离心(100 000 g, 25℃, 1 h), 弃上清, 沉淀按 0.2 ml Mes 缓冲液每克脑组织比例重悬(冰浴 30 min, 每隔 5 min 轻摇一次)。超速离心(100 000 g, 4℃, 1 h), 弃沉淀。取与上清等体积含有 8 mol/L 甘油 Mes 缓冲液(1 mmol/L GTP)与上清混匀保温(37℃, 20 min)。超速离心(100 000 g, 25℃, 1 h)弃上清。沉淀重悬于预冷的 Mes-EDTA 缓冲液(25 mmol/L Mes, 0.5 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L β -ME, 0.1 mmol/L EDTA, pH 6.4)中, 过 P11 磷酸纤维素离子交换柱, 收集穿过峰。SDS-PAGE 和 BCA 蛋白质定量试剂盒鉴定所纯化的蛋白质样品。

1.2.3 Tau 蛋白的活性鉴定。根据国际同行普遍采用的“微管蛋白聚集”法^[25], 观察微管蛋白聚集时在 350 nm 处发生紫外吸收值的变化, 来测定 Tau 蛋白的活性。用 Mes-EDTA 缓冲液分别配制 Tau 蛋白(0.1 g/L)和微管蛋白(0.4 g/L)溶液, 将微管蛋白先置于 20℃ 温育 5 min, 迅速提高水浴温度至 37℃, 加入终浓度为 1 mmol/L GTP, 在紫外分光光度计上测定 350 nm 的光吸收值。在其他条件保持不变的情况下, 加入不同浓度 Tau 蛋白(终浓度: 0.1 g/L、0.2 g/L), 并测定 350 nm 的吸收值。结果表明 Tau 蛋白可以促进微管在体外的聚集, 与文献报道一致。而相同条件下, 作为对照的神经 Tau 或微管蛋白自身均未观察到聚集的现象, 说明经分离纯化后得到的 Tau 蛋白有生物活性(结果未显示)。

1.2.4 细胞培养及免疫组化检测。人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 在 DMEM/F12 培养基(青霉素 100 U/ml, 四环素 100 mg/L)中, 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养^[26]。培养基中含有 10% 的新生牛血清和 5% 的马血清。每 3 天换液至细胞在 100 mm 培养瓶中形成 70% 融合。用 10 μ mol/L 视黄酸(retinoic acid)和 3 mmol/L 蛭蛭菌素(aphidicolin)处理 5 天后, 继续以 10 μ mol/L 视黄酸处理 4 周使细胞分化。消化细胞并种植到培养板上, 在分化培养情况下继续培养 3 天。细胞在 37℃ 下经磷酸盐缓冲液冲洗 2 次后, 在 PIPES (pH 6.8)缓冲液中以 4% 多聚

甲醛室温固定 10 min. 在 100 mmol/L PIPES, 5 mmol/L EGTA, 2 mmol/L $MgCl_2$ 缓冲条件下, 用 0.1% Triton X-100 处理 3 min, 以增加细胞的通透性. 磷酸盐缓冲液冲洗后, 在 50 mmol/L Tris (pH 7.6), 200 mmol/L NaCl 中, 以 3% BSA 封闭 1 h. 细胞用单克隆抗体 Tau-1 (1:50 000) 在湿润环境中孵育过夜. 37℃ 下用磷酸盐缓冲液洗去未结合的单抗. 细胞再经 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 的二抗在 37℃ 孵育 1 h 后, 37℃ 磷酸缓冲液冲洗 3 次. 盖上盖玻片, 细胞在 Zeiss Axioskop 荧光显微镜上检测并照相.

1.2.5 间接免疫荧光检测 Tau 蛋白在 SH-SY5Y 细胞核中的定位. SH-SY5Y (或 HEK-293) 细胞培养至 1×10^6 个/ml, 离心 (3 000 r/min, 4℃, 5 min), 10 ml 4℃ 预冷 PBS 清洗细胞. 10 ml TM-2 缓冲液重悬细胞, 室温孵育 1 min 后转移至冰浴 5 min (TM-2 缓冲液: 10 mmol/L Tris-HCl, pH7.4, 2 mmol/L $MgCl_2$, 0.5 mmol/L PMSF). 加入 Trion X-100 至终浓度为 0.5% (体积比), 冰浴 5 min. 剪切细胞, 取 5 μ l 加到 22 mm² 玻璃盖玻片上, 相差显微镜下检查细胞核. 离心 (800 r/min, 4℃, 10 min), 分离细胞核与细胞质, 10 ml TM-2 缓冲液清洗细胞核 2 遍. 加入 0.5 ml TM-2, 置于 4℃. 取 10 μ l 涂片, 4% 多聚甲醛固定后进行间接免疫荧光观察.

1.2.6 Western blotting 检测 SH-SY5Y 细胞内的 Tau 蛋白. 以细胞裂解液 (50 mmol/L PIPES, 2 mmol/L Aprotinin, 0.2 mmol/L PMSF, 2 mmol/L DTT, pH7.2) 裂解细胞, 用量为 100 μ l/ 1×10^6 细胞, 沸水浴 5 min. 取 20 μ l 进行 12% SDS-PAGE 检测. 一块胶进行考马氏亮蓝染色; 另一块胶转膜后进行 Western blot 鉴定: 以单克隆抗体 Tau-1 为一抗, HRP-羊抗鼠 IgG 为二抗, H_2O_2 为底物, DAB 为显色剂.

2 结 果

2.1 Tau 蛋白在 SH-SY5Y 细胞系中的分布

大量文献业已证明, 神经 Tau 蛋白分布在神经细胞的胞体, 并富集在轴突的生长点. 作者采用抗 Tau 蛋白的单克隆抗体 Tau-1 通过免疫标记观察到, 在细胞分裂间期, SH-SY5Y 细胞质和核内 Tau 蛋白都有分布, 但在胞核内的分布更为明显 (图 1a). 在有丝分裂中期, Tau 蛋白主要分布在中心粒上 (图 1b). 中心粒的主要成分是微管, Tau 蛋白是微管结合蛋白家族中的重要成员, 因此, Tau 与中心粒结合, 具有稳定中心粒的作用. 同样, 在

有丝分裂后期, Tau 蛋白主要分布在细胞质内, 而细胞核内仅具有轻度的点状分布 (图 1c). 但是, 这种点状分布需要进一步通过实验证明, 以排除并非相关位置细胞质内的 Tau 蛋白覆盖胞核所造成的假象, 而是 Tau 蛋白在细胞核内存在的信号. 以上实验结果提示, 在细胞间期, Tau 蛋白分布在细胞胞质和胞核中, 而在有丝分裂期, Tau 蛋白与 DNA 结合的现象不明显.

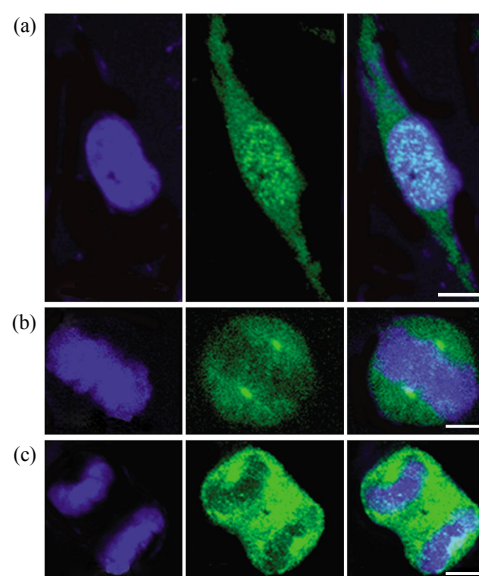


Fig. 1 The localization of Tau and DNA in SH-SY5Y cells by double immunofluorescence

SH-SY5Y cells were cultured and fixed as described under **Materials and methods**, followed by the incubation with a monoclonal anti-Tau antibody (Tau-1). FITC-conjugated immunoglobulin (green) and Hoechst 33258 (blue) were used to reveal endogenic Tau with anti-Tau staining and DNA, respectively. Double immunofluorescence shows the colocalization of endogenic Tau with DNA in the nuclei in the interphase (panel a). During cell division (metaphase, panel b and anaphase, panel c), few Tau-1 signals were observed in the nuclei under the same conditions. Bars=10 μ m.

2.2 Tau 蛋白分布在 HeLa 细胞的胞质和胞核中

为了验证 Tau 蛋白也分布在其他来源的肿瘤细胞中, 作者选择了 HeLa 细胞系作为研究对象, 在相同条件下对其胞内的 Tau 蛋白进行了测定. 如图 2 所示, 处于间期的 HeLa 细胞, 其胞质和胞核内均含有 Tau 蛋白, 尤其在细胞核内, Tau 蛋白的免疫荧光信号十分明显, 以至于在表观上仿佛细胞核充满了 Tau 蛋白 (图 2a, b). 然而, 在细胞分裂中期, 染色体集中在赤道板上, Tau-1 抗体定位于染色体的信号强度很小 (图 2c), 说明 Tau 蛋白在有丝分裂期, 与 DNA 的相互作用不明显. 同样, 在细胞分裂后期, Tau 蛋白的免疫荧光在细胞核内的定

位也较少(图 2d), 以致难以分辨是胞质内的信号重合在胞核的相关位置, 还是 Tau 蛋白在细胞核内的信号. 因此, 需要采用其他的实验来进行验证.

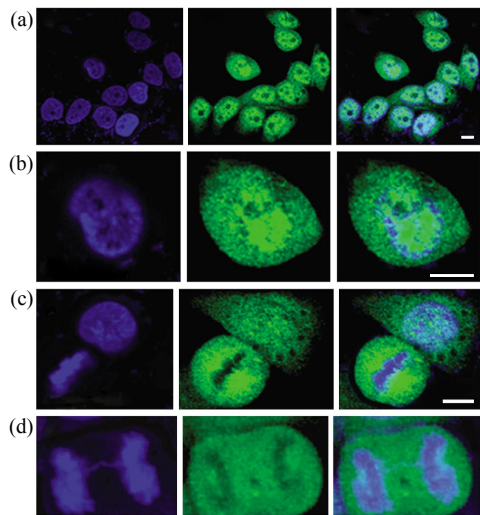


Fig. 2 The localization of Tau and DNA in HeLa cells by double immunofluorescence
Conditions were as for Figure 1, except HeLa were employed in the culture. FITC-conjugated immunoglobulin (green) and Hoechst 33258 (blue) were used to reveal endogenic Tau and DNA in the cells at different cell phases interphase (panel a and b), metaphase (panel c) and anaphase (panel d). Bars=10 μ m.

2.3 HEK-293 细胞核中有 Tau 蛋白的绿色荧光信号

与 SH-SY5Y 和 HeLa 不同的是, Tau 蛋白的免疫显色信号主要分布在 HEK-293 的胞核中(图 3), 并且在细胞核内呈点状分布. Tau 蛋白的绿色点状显色与 Hoechst33258 (蓝色)染色信号的定位相重合. 提示 HEK-293 细胞内的 Tau 蛋白有可能与 DNA 相结合.

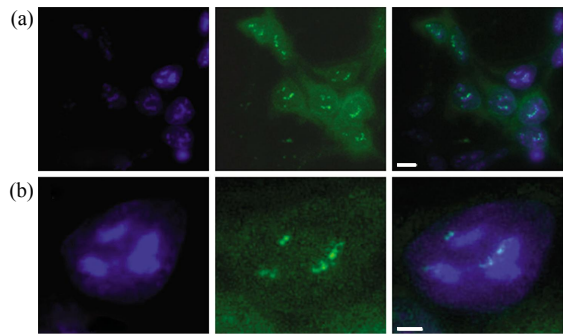


Fig. 3 The localization of Tau and DNA in HEK-293 cells by double immunofluorescence
Conditions were referred to Figure 1, except HEK-293 cells (panel c) were cultured. FITC-conjugated immunoglobulin (green) and Hoechst 33258 (blue) were used to reveal endogenic Tau and DNA (panel a), respectively. The cells from panel (a) were magnified (panel b). Bars=10 μ m.

2.4 SH-SY5Y、HEK-293 细胞核 Tau 蛋白的测定

为了进一步验证 Tau 是否存在于细胞核内, 作者分离出了 SH-SY5Y 的细胞核(图 4). 通过免疫荧光可以看到, 所分离出的细胞核内存在 Tau 蛋白, 并且其染色信号与 Hoechst33258 染色信号相重合. 该结果提示, Tau 蛋白存在于细胞核内, 并且可能与染色质结合(图 4a, b). Western blotting 的结果进一步显示, SH-SY5Y 的胞质和胞核中均含有 Tau 蛋白. 与胞质中所含的 Tau 蛋白一样, 胞核中的 Tau 蛋白亦为多种异构体(图 5).

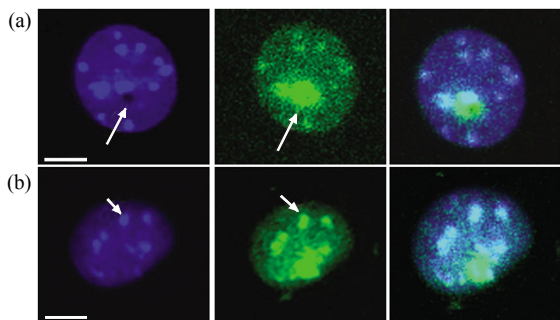


Fig. 4 Localization of Tau protein in the nuclei of SH-SY5Y cells

The protocol for isolation of nuclei was as described previously (Belgrader PA *et al.*, 1991). The isolated nuclei of SY5Y (panel a) and HEK-293 (panel b) cells in the interphase show the immunofluorescence signals of Tau-1 monoclonal antibody are co-localized with DNA. Bars=2 μ m.

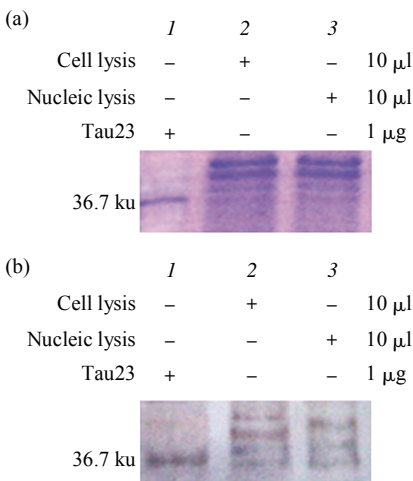


Fig. 5 Western blotting of Tau protein in cell and nucleus extract

The lysis solutions of SH-SY5Y cells and the isolated nuclei were prepared as described under the **Materials and methods**. The protein of the cell lysis (lane 2) and nucleus lysis (lane 3) were exhibited on SDS-PAGE (panel a) and Western blotting (panel b). Tau23 was used as control (lane 1).

3 讨 论

Tau 蛋白最初以细胞骨架结合因子被发现, 由于所分离提纯的样品来自猪脑, 在其后的十几年中该蛋白质一直被称为神经 Tau. 随着 Tau 蛋白在心肌、骨骼肌以及淋巴细胞中被观察到, 使相关同行认识到 Tau 不仅仅是一种神经系统中特异存在的蛋白质. 因此, 关于 Tau 蛋白生物学功能的研究被扩展到了心血管等领域^[13].

尽管 Tau 蛋白在 PC12 和 SH-SY5Y 细胞系中较早就被观察, 并且这两种细胞系也是研究 Tau 蛋白结构与功能的常用模型, 也已经有研究小组开始重视 Tau 蛋白在儿童体内的水平及其与白血病之间的关系^[17], 但是国际同行很少重视 Tau 蛋白在肿瘤细胞中的作用. 至少 Tau 蛋白在细胞骨架方面的生理作用可以设想到与肿瘤细胞的分裂、繁殖、分化等方面密切相关. 从本文研究结果来看, Tau 蛋白在肿瘤细胞中的分布可以分为两种形式, 即在细胞间期, Tau 蛋白主要分布在肿瘤细胞的胞核中, 而在分裂期则不然. 至少在肿瘤细胞系中可以观察到, Tau 蛋白在间期进入细胞核以发挥某种生物学功能. 值得注意的是, HeLa 细胞核内含有相对较高浓度的 Tau 蛋白(图 2), 其生物学意义尚不清楚, 或许不同来源的肿瘤细胞系所表达 Tau 蛋白的水平以及在细胞内的分布有所不同.

以往结果显示, 组蛋白可以将结合在 DNA 上的 Tau 蛋白置换下来^[19], 也就是说, Tau 蛋白难以结合到以核小体方式存在的 DNA 上. 当细胞进入有丝分裂时, DNA 处于高度螺旋和折叠的状态, 即以染色体的方式存在. 因此, Tau 蛋白很少有机会结合到染色体 DNA 上. 然而, Tau 蛋白在细胞间期却能分布于细胞核内, 而此时的 DNA 正处于基因表达时相, 局部解螺旋, 即呈所谓的染色质状态. 由图 4 可见, Tau 蛋白的免疫荧光与 DNA 的 Hoechst 染色相重合, 这一现象暗示, Tau 蛋白可能与染色质之间存在相互作用的机会. 然而, 我们所用的 Tau-1 抗体是位点特异性和磷酸化依赖的抗 Tau 的抗体, 它识别在 195~202 位非磷酸化的 Tau 蛋白. 在分裂期在染色体上检测不到 Tau 的存在, 提示 Tau 可能不与 DNA 结合, 但也不能排除在分裂期 Tau 蛋白被磷酸化, 而干扰了荧光信号. 在下一步工作中, 作者拟采用非磷酸化抗 Tau 抗体, 如 Tau-5, 进行进一步研究.

在最近的工作中, 作者提出了 Tau 蛋白可能是

一种 DNA 分子伴侣的假设. Travers 等^[27]在 1994 年发现了一个称为 HU 的 DNA 结合蛋白家族, 并认为那些蛋白质起到“DNA 分子伴侣”的作用. 作者认为 Tau 在细胞核内可能具有类似 DNA 分子伴侣的作用, 其依据是: a. Tau 蛋白与 DNA 结合无序列特异性^[28]; b. Tau 蛋白与 DNA 双螺旋的小沟结合^[21]; c. Tau 蛋白与 DNA 结合形成串珠样(beads-on-string)复合物, 并诱导 Tau 蛋白的结合使 DNA 双螺旋弯曲^[22]; d. Tau 蛋白具有促进热变性的 DNA 恢复其双螺旋, 并提高其 T_m 值的作用^[29]; e. Tau 与 DNA 主要以静电的方式相互作用, 其中脯氨酸富集区和微管结合区的 Lys 对相互作用具有贡献^[21]. 而当 Tau 发生变性或在甲醛的诱导下发生错误折叠时, 将失去与 DNA 的结合能力^[30,31].

参 考 文 献

- 1 Weingarten M D, Lockwood A H, Hwo S Y, *et al.* A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975, **72**(5): 1858~1862
- 2 Drechsel D N, Hyman A A, Cobb M H, *et al.* Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell*, 1992, **3**(10): 1141~1154
- 3 Drechsel D N, Hyman A A, Cobb M H, *et al.* Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell*, 1992, **3**(10): 1141~1154
- 4 Binder L I, Frankfurter A, Rebhun L I. The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol*, 1985, **10** (14): 1371~1378
- 5 Papasozomenos S C, Binder L I. Phosphorylation determines two distinct species of Tau in the central nervous system. *Cell Motil Cytoskel*, 1987, **8**(3): 210~226
- 6 Khatoon S, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Levels of normal and abnormally phosphorylated Tau in different cellular and regional compartments of Alzheimer disease and control brains. *FEBS Lett*, 1994, **351**(1): 80~84
- 7 Goedert M, Wischik C M, Crowther R A, *et al.* Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: Identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**(11): 4051~4055
- 8 Goedert M, Spillantini M G, Potier M C, *et al.* Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein Tau containing four tandem repeats: differential expression of Tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J*, 1989, **8** (2): 393~399
- 9 盛之玲, 刘延英, 陈 岚, 等. 非酶糖基化对 α -synuclein 分子构象的影响. *生物化学与生物物理进展*, 2008, **35**(10): 1202~1208
Sheng Z L, Liu Y Y, Cheng L, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2008, **35**(10): 1202~1208
- 10 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's disease. *Neuron*, 1989, **3**(4): 519~526
- 11 李芳序, 卢 静, 许亚杰, 等. 老年性痴呆发病过程中内源性甲醛慢性损伤机制. *生物化学与生物物理进展*, 2008, **35**(4): 393~400
 - Li F X, Lu J, Xu Y J, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2008, **35**(4): 393~400
 - 12 赫荣乔, 陈 岚, 柯 莎, 等. 多因素异常修饰导致体内蛋白质选择性错误折叠和功能丧失. *生物化学与生物物理进展*, 2006, **33**(10): 940~941
 - He R Q, Chen L, Ke S, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2006, **33**(10): 940~941
 - 13 Murakami N, Ishiguro K, Ihara Y, *et al.* Tau protein immunoreactivity in muscle fibers with rimmed vacuoles differs from that in regenerating muscle fibers. *Acta Neuropathologica*, 1995, **90**(5): 467~471
 - 14 Loomis P A, Howard T H, Castleberry R P, *et al.* Identification of nuclear Tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**(21): 8422~8426
 - 15 Brady R M, Zinkowski R P, Binder L I. Presence of tau in isolated nuclei from human brain. *Neurobiol Aging*, 1995, **16**(3): 479~486
 - 16 Cross D C, Munoz J P, Hernandez P, *et al.* Nuclear and cytoplasmic tau proteins from human nonneuronal cells share common structural and functional features with brain tau. *J Cell Biochem*, 2000, **78**(2): 305~317
 - 17 Muszyńska-Roslan K, Krawczuk-Rybak M, Protas P T, *et al.* Level of Tau protein in children treated for acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Neurol*, 2006, **34**(5): 367~371
 - 18 Hua Q, He R Q. Human neuronal Tau is able to bind DNA and increase the melting temperature. *Chin Scientific Bul*, 2000, **45**(11): 166~169
 - 19 Hua Q, He R Q, Haque N, *et al.* Microtubule associated protein Tau binds to double-stranded but not single-stranded DNA. *Cell Mol Life Sci*, 2003, **60**(2): 413~421
 - 20 Li W, Wang X S, Qu M H, *et al.* Human protein tau represses DNA replication *in vitro*. *Biochim Biophys Acta*, 2005, **1726**(3): 280~286
 - 21 Wei Y, Qu M H, Wang X S, *et al.* Binding to the minor groove of the double-strand, tau protein prevents DNA from damage by peroxidation. *PLoS ONE*, 2008, **3**(7): e2600
 - 22 Qu M H, Li H, Tian R, *et al.* Neuronal tau induces DNA conformational changes observed by atomic force microscopy. *Neuroreport*, 2004, **15**(18): 2723~2727
 - 23 Williams R C Jr, Lee J C. Preparation of tubulin from brain. *Methods Enzymol*, 1982, **85**Pt B: 376~385
 - 24 Yuon A M, Wadsworth P. Region-specific microtubule transport in motile cells. *J Cell Biol*, 2000, **151**(5): 1003~1012
 - 25 Paudel H K. The regulatory Ser262 of microtubule-associated protein tau is phosphorylated by phosphorylase kinase. *J Biol Chem*, 1997, **272**(3): 1777~1785
 - 26 Haque N, Tanaka T, Iqbal K. *et al.* Regulation of expression, phosphorylation and biological activity of tau during differentiation in SY5Y cells. *Brain Res*, 1999, **838**(1~2): 69~77
 - 27 Travers A A, Ner S S, Churchill M E A. DNA chaperones: a solution to a persistence problem?. *Cell*, 1994, **77**(2): 167~169
 - 28 Hua Q, He R Q. Tau could protect DNA double helix structure. *Biochim Biophys Acta*, 2003, **1645**(2): 205~211
 - 29 Hua Q, He R Q. Effect of phosphorylation and aggregation on tau binding to DNA. *Protein Pept Lett*, 2002, **9**(4): 349~357
 - 30 Nie C L, Wang X S, Liu Y, *et al.* Amyloid-like aggregates of neuronal tau induced by formaldehyde promote apoptosis of neuronal cells. *BMC Neuroscience*, 2007, **8**: 9
 - 31 Nie C L, Wei Y, Chen X Y, *et al.* Formaldehyde at low concentration induces protein Tau into globular amyloid-like aggregates *in vitro* and *in vivo*. *PLoS ONE*, 2007, **2**(7): e629

Localization of Tau Protein in SH-SY5Y, HeLa and HEK293 Cells*

SHENG Zhi-Ling^{1,2,3)**}, QU Mei-Hua^{1)**}, HE Hai-Jin¹⁾, HE Rong-Qiao^{1)***}

¹⁾State Key Laboratory of Brain and Cognitive Sciences, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²⁾Graduate School of The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

³⁾Medical College, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract Using the Tau-1 (or Tau-13) monoclonal antibody, the distribution of endogenetic Tau in the SH-SY5Y cells, HEK-293 cells and HeLa cells have been observed, and the localization of the indirect immunofluorescent signals in both cytoplasm and nuclei in the interphase have been found. In particular, the fluorescent signals were significantly strong in HeLa nuclei. During cell division (metaphase and anaphase), few Tau-1 signals were observed in the nuclei under the same conditions. To confirm the nucleoplasm localization of Tau, the nuclei of SH-SY5Y cells were isolated and it was observed that Tau-1 signals were co-localized with Hoechst33258 (blue) in nucleoplasm using double immunofluorescence. Western-blotting also exhibited tau protein isoforms localized in both cytoplasm and nucleoplasm. It indicates that Tau protein is localized in tumor cells, and also in their nucleoplasm.

Key words Tau protein, neuronal Tau, tumor cell, nucleoplasm, Tau associated with DNA

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (90206041, 30570536), National Basic Research Program of China (2006CB500703) and Key Innovative Project of The Chinese Academy of Sciences (KSCX2-YW-R-119).

**QU Mei-Hua and SHENG Zhi-Ling contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-10-64889876, E-mail: herq@sun5.ibp.ac.cn

Received: July 17, 2008 Accepted: September 12, 2008