

研究快报

神经 tau 聚集物诱导乳酸脱氢酶的失活与构象变化*

田 瑞^{1, 2)} 曲梅花¹⁾ 刘 纓¹⁾ 赫荣乔^{1)**}⁽¹⁾中国科学院视觉信息加工开放实验室, 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 100039)

摘要 在 37℃, pH 7.2 条件下, 人类神经 tau 经过保温形成自聚集物, 从而丧失对微管蛋白组装的功能. 进一步的实验表明, 天然 tau 具有促进乳酸脱氢酶活性的作用, 而 tau 聚集物却诱导乳酸脱氢酶活性的降低.

关键词 tau, 自聚集, 微管蛋白, 组装, 乳酸脱氢酶, 老年性痴呆

学科分类号 Q344

神经 tau 属微管结合蛋白 (microtubule-associated protein, MAP), 具有稳定微管系统、调节细胞生长发育的功能^[1], 在神经系统形成和轴突传导中起至关重要的作用^[2]. 自从 1975 年 Weingarten 等^[3]发现神经 tau 以来, 该蛋白质就成为神经分子生物学以及老年性痴呆 (Alzheimer disease, AD) 病理学研究的重要分子之一^[4~6]. 老年性痴呆的主要病理特征之一是形成神经纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFT)^[7], 由 tau 为主要成分的不可溶配对螺旋样纤维 (paired helical filament, PHF) 组成, 主要沉积在受损神经细胞的细胞体和树突部位^[8]. 最近有报道老年斑中也存在 tau 聚集物^[9], 因此, tau 分子的聚集成为 AD 研究的热点之一. 另一方面, AD 常常伴有脑能量代谢的异常^[10~12]. 有研究表明, 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 的表达与活性在 AD 病人脑中表现异常^[13, 14]. 本文报道 tau 聚集物可诱导 LDH 的失活与分子聚集.

1 材料与方法

1.1 实验材料

Q-Sepharose 及 SP-Sepharose 购自 Pharmacia 公司. 实验中使用的 tau40 是由 441 个氨基酸残基组成的, 分子质量为 45 ku. 重组人类神经 tau40 (recombinant human neuronal tau40) 的 cDNA 由英国剑桥大学 Goedert 制备提供, 表达载体为 Prk172, 其载体菌为 *E. coli* BL21 (DE3). 所表达的蛋白质与天然人类神经 tau 的序列一致. 微管蛋白由市售的新鲜猪脑中提取. 兔肌的乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 购自 Sigma 公司. 其他试剂均为分析纯. 内源荧光和光散射使用 Hitachi F-4500

荧光分光光度仪监测. 蛋白质吸光度和酶活性通过 Hitachi UV-2010 紫外可见分光光度仪测定.

1.2 人类神经 tau 的表达与分离纯化

重组人类神经 tau40 通过 *E. coli* BL21 (DE3) 表达扩增后, 菌体匀浆并离心 (12 000 r/min, 4℃, 10 min), 上清液过 Q-Sepharose 柱以及 SP-Sepharose 柱. 收集蛋白质峰过 Sephadex G50 柱后脱盐冷冻干燥备用^[15]. 采用 10% 聚丙烯酰胺凝胶 (含 0.1% SDS) 电泳检验所表达 tau40 分离纯化的纯度 (电压 150 V). 采用 Bradford^[16] 方法, 对 tau 进行定量.

1.3 微管蛋白的分离纯化

根据 Weingarten 等^[3]报道的方法, 取新鲜的猪脑, 置于冰上, 去掉表面的血管和脑膜. 在预冷的缓冲液 A (0.1 mmol/L Mes, 1 mmol/L EGTA, 0.5 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L β-ME, 0.1 mmol/L EDTA 和 1 mmol/L GTP, KOH 调 pH 至 6.4) 中将猪脑切成小块, 用预冷的缓冲液 A 冲洗 2 次. 按照每克脑组织 0.75 ml 预冷的缓冲液 A 的比例对脑组织进行匀浆, 超速离心 (4℃, 100 000 g, 1 h), 弃沉淀. 量取与上清等体积的缓冲液 A (含 8 mol/L 甘油), 37℃保温 20 min, 超速离心 (25℃, 100 000 g, 1 h), 弃上清. 沉淀重新悬浮于缓冲液 A 中 (每毫升缓冲液 A 中悬浮 5 g 脑组

* 国家自然科学基金资助项目 (90206041, 30170297) 和中国科学院创新方向性项目 (KSCX2-SW214-1).

** 通讯联系人.

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

收稿日期: 2004-06-11, 接受日期: 2004-06-22

织), 冰浴 30 min 后, 超速离心 (4°C , $100\,000\text{ g}$, 1 h), 弃沉淀. 量取与上清等体积的缓冲液 A (含 8 mol/L 甘油), 加入 1 mmol/L ATP, 37°C 保温 20 min 后, 超速离心 (25°C , $100\,000\text{ g}$, 1 h), 弃上清. 沉淀即为初步纯化的微管蛋白. 沉淀 (终浓度 15 g/L) 重悬于预冷的缓冲液 B (0.1 mol/L Mes, 1 mmol/L EGTA, 0.5 mmol/L MgCl_2 , 1 mmol/L GTP, KOH 调 pH 至 6.4) 中, 过 P11 磷酸纤维素离子交换柱, 穿过峰即为微管蛋白, -70°C 保存. 10% 聚丙烯酰胺凝胶 (含 0.1% SDS) 电泳检验蛋白质的纯度 (电压 150 V). 微管蛋白定量采用 Bradford^[16] 的方法.

1.4 Tau 聚集物的制备

根据 Wilson 和 Binder 所述^[17], 将 tau40 ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) 溶于含 20 mmol/L DTT 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.2), 37°C 保温 36 h. 监测其荧光发射光谱 ($\lambda_{\text{ex}} = 295\text{ nm}$) 和光散射 ($\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}} = 480\text{ nm}$) 的变化, 直到强度基本不变为止. 以 BSA 作为对照.

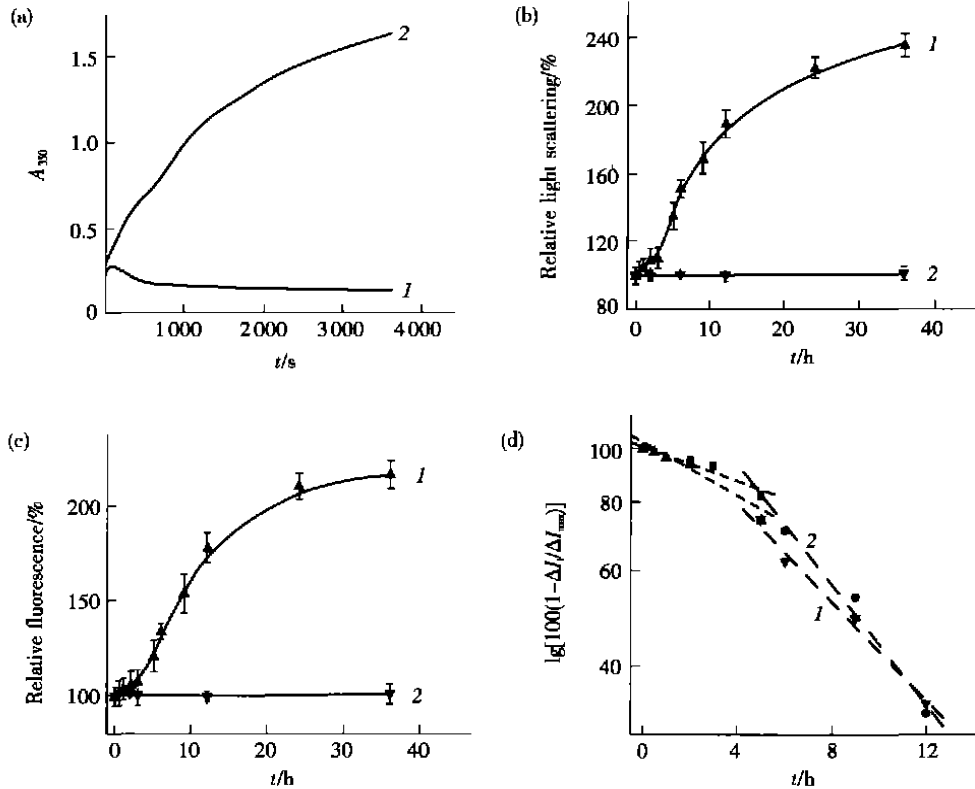


Fig 1 Changes in light scattering and fluorescence of self-aggregated tau

For preparation of aggregated tau, as described by Wilson and Binder^[17], tau ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) was incubated in the 0.1 mol/L phosphate buffer (pH 7.2) containing 20 mmol/L DTT at 37°C for 36 h. Aggregated tau (curve 1) and native tau (curve 2) were added into the tubulin (1 g/L) solution at 37°C followed by measuring the turbidity at 350 nm , respectively. (b) and (c) illustrate changes in light scattering and intrinsic fluorescence during tau aggregating (curve 1). BSA (curve 2) was used as control. (d) The data is same as (b) and (c) plotted by semi-logarithmically in $[\text{lg}[100(1 - \Delta I/\Delta I_{\text{max}})]]$ according to Tsou^[20]. Curves 1 and 2 represent the changes in light scattering and fluorescence, respectively. ΔI_t and ΔI_{max} stand for the changes at any time and those when the reaction reached the completion, respectively.

1.5 聚集的 tau 对微管蛋白组装的影响

tau 聚集物 ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) 与 1 g/L 微管蛋白溶液 (0.1 mol/L 磷酸缓冲液 pH 7.2 配制) 37°C 保温, 立刻进行吸光度 (A_{350}) 扫描^[18].

1.6 聚集的 tau 对 LDH 活性和内源荧光的影响

如上 1.4 中, 制备 $100\text{ }\mu\text{mol/L}$ 聚集的 tau, 含 20 mmol/L DTT. 制备的 tau 聚集物和天然 tau (不含 DTT) 分别与 LDH ($5\text{ }\mu\text{mol/L}$) 以不同摩尔比 (tau/LDH) 溶于 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.2), 25°C 保温 16 h, 测定 LDH 的酶活性^[19] 和内源荧光 ($\lambda_{\text{ex}} = 295\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 340\text{ nm}$).

2 结果与讨论

2.1 神经 tau 的聚集

纯化的 tau40 和微管蛋白在 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中均为单一条带. 神经 tau 的主要功能之一就是促进微管的组装和稳定微管系统, 从而维持细胞骨架的形态. 正如图 1a 显示, 天然的 tau 在体外促进微管组装, 导致溶液吸光度 (A_{350})

的上升. 说明分离纯化得到的 tau 具有生物活性. 但是, 经过 36 h (pH 7.2, 37°C) 的保温, tau 失去了与微管蛋白相互作用的能力, 不能促进微管的组装 (图 1a). 神经 tau 自聚集后失去促进微管组装的功能, 必将影响神经细胞的正常结构. 特别是 AD 病人, 其老年斑和 PHF 中存在大量 tau 聚集物^{8, 9)}, 这些丧失正常功能的聚集物可能影响细胞的结构与信息传导, 最终导致细胞功能失调甚至死亡.

蛋白质分子的聚集使其溶液光散射强度增加. Wilson 和 Binder 发现^[17], tau 在体外接近生理条件下, 可以聚集成类似老年痴呆患者脑中的 PHF 结构. 我们的实验表明 (图 2b), tau 在 480 nm 的光散射强度随保温时间而不断增加, 在 24 h 变化基本稳定. 相同条件下, 作为对照的 BSA 溶液光散射没有明显变化. 保温 24 h, tau 分子可完全聚集.

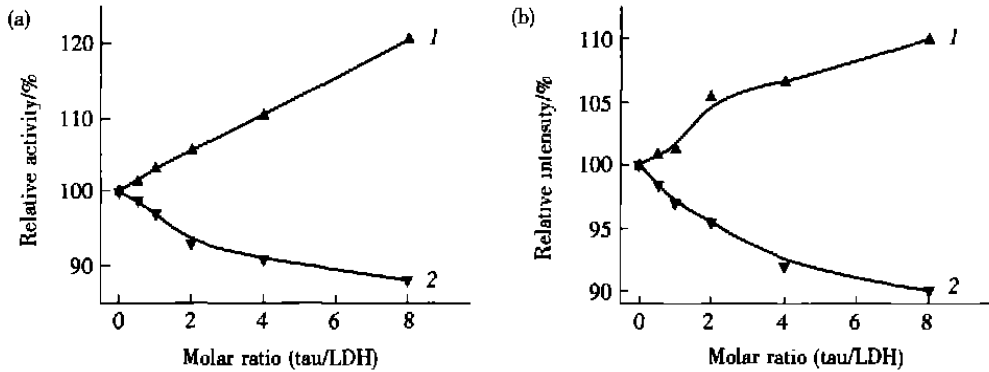


Fig 2 Enzymic activity and intrinsic fluorescence of LDH in the presence of aggregated tau

LDH (final concentration, 5 μmol/L) in the presence of native tau (curve 1) and aggregated tau (curve 2) were incubated in the phosphate buffer at 25°C for 16 h, and then enzyme activity at 334 nm and intrinsic fluorescence at 340 nm ($\lambda_{ex} = 295$ nm) were measured at room temperature. Assay of LDH was carried out as described previously^[19]. (a) Changes in relative activity of LDH in the presence of native tau and aggregated tau. (b) Changes in relative intensity of intrinsic fluorescence of LDH in the presence of native tau and aggregated tau.

为了进一步证实神经 tau 分子在保温后的聚集, 我们测定了 tau 溶液的荧光强度变化. 根据 Luo 等^[21]的报道, 正常的天然 tau 以 295 nm 作为激发波长时, 该蛋白质在 305 nm 处有内源荧光特征发射峰, 而当其聚集后, 在 333 nm 出现一新的发射峰, 该荧光可以作为标记神经 tau 分子聚集的探针. 如图 1c 所示, 在 tau 保温过程中, 333 nm 的荧光强度随时间而增加, 在 24 h 达到最大. 动力学分析表明 (图 1d 和表 1), 分子聚集 (光散射强度增加) 与 333 nm 荧光的变化均为两相, 即慢相和快相, 快相一级动力学常数是慢相的 10 倍以上. 荧光变化慢相和快相一级动力学常数与光散射相应一级动力学常数类似, 暗示神经 tau 分子聚集伴随着构象变化过程.

2.2 聚集的 tau 对 LDH 活性和内源荧光的影响

LDH 是细胞广泛分布的参与糖代谢的重要酶之一. 有报道显示 AD 常常伴有脑能量代谢异常^[10-12], 特别是 LDH 在 AD 脑中的水平与活性出现异常^[13, 14]. 神经 tau 在细胞中的异常聚集是否会导致能量代谢的障碍是值得研究的. 如图 2a 和 2b 所示, 随着 tau 聚集物的增加, 乳酸脱氢酶的活性和内源荧光 ($\lambda_{em} = 340$ nm) 相应降低. 作为对照的天然 tau 分子促进 LDH 酶活力的增加, 同时也使 LDH 的内源荧光强度升高. 在我们以前的研究发现天然的 tau 对 LDH 具有类似分子伴侣的功能, 抑制酶的变性和促进其复性. 所以我们推测神经 tau 促进 LDH 的活力, 是由于 tau 稳定了 LDH 分子结构的缘故. 相反, tau 聚集物可以诱导 LDH 的变性与失活, 表现出内源荧光和活力的降低. 相同条件下的实验结果表明, 不同浓度的 DIT 没有显示对 LDH 活力降低的作用 (表 2). 推测 tau 聚集物可能作为“种子”诱导和促进 LDH 变性, 从而导致酶分子的聚集, 进而影响与 LDH 相关的能量代谢. 然而, 在体内 tau 聚集物是否影响 LDH 生物活性还需要进一步验证.

Table 1 The first order rate constants of changes in light scattering and fluorescence of tau during self-aggregation

	Slow phase/h ⁻¹	Fast phase/h ⁻¹
Light scattering	$(4.73 \pm 0.58) \times 10^{-2}$	$(56.8 \pm 8.61) \times 10^{-2}$
Fluorescence	$(3.27 \pm 0.42) \times 10^{-2}$	$(52.5 \pm 6.94) \times 10^{-2}$

Data are ($\bar{x} \pm s$) from four experiments (n=4).

Table 2 Changes in activity of DTT-incubated LDH

c_{DTT} (final) / (mmol·L ⁻¹)	Relative activity/%
0	100.00 ± 6.51
0.5	101.84 ± 9.24
1	106.18 ± 6.64
2	103.63 ± 2.16
4	100.40 ± 9.26
8	100.71 ± 5.42

Data are ($\bar{x} \pm s$) from four experiments ($n = 4$).

致谢 加拿大 McGill 大学 Paudel 博士提供了本文所用的人类神经 tau 的克隆。

参 考 文 献

- Brion J P, Guillemot J, Couchie D, *et al.* Both adult and juvenile tau microtubule-associated proteins are axon specific in the developing and adult rat cerebellum. *Neuroscience*, 1988, **25** (1): 139~146
- 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
- Weingarten M D, Lockwood A H, Hwo S Y, *et al.* A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1975, **72** (5): 1858~1862
- 聂春来. 配对螺旋样纤维 (PHF)-Tau 与神经细胞的死亡. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28** (3): 441~443
Nie C L. *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28** (3): 441~443
- 华茜, 聂春来, 陈永辉, 等. 乙醛对人类神经 tau 磷酸化的影响. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28** (5): 761~763
Hua Q, Nie C L, Chen Y H, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28** (5): 761~763
- Miyazono M, Iwaki T, Kitamoto T, *et al.* Wide-type distribution of tau in the astrocytic elements of glial tumors. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1993, **86** (3): 236~241
- Beyreuther K and Masters C L. Alzheimer's disease. Tangle disentanglement. *Nature*, 1996, **383** (6600): 476~477
- Li L, von Bergen M, Mandelkow E M, *et al.* Structure, stability, and aggregation of paired helical filaments from tau protein and FTDP-17 mutants probed by tryptophan scanning mutagenesis. *J Biol Chem*, 2002, **277** (44): 41390~41400
- Dickson D W. The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1997, **56** (4): 321~339
- Blass J P, Gibson G E, Hoyer S. The role of the metabolic lesion in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 2002, **4** (3): 225~232
- Gibson G E, Sheu K F, Blass J P. Abnormalities of mitochondrial enzymes in Alzheimer disease. *J Neural Transm*, 1998, **105** (8~9): 855~870
- Sheu K F, Blass J P. The alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, **893**: 61~78
- Bigl M, Bruckner M K, Arendt T, *et al.* Activities of key glycolytic enzymes in the brains of patients with Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, 1999, **106** (5~6): 499~511
- Liguri G, Taddei N, Nassi P, *et al.* Changes in Na⁺, K⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase and some soluble enzymes related to energy metabolism in brains of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 1990, **112** (2~3): 338~342
- Paudel H K. The regulatory Ser262 of microtubule-associated protein tau is phosphorylated by phosphorylase kinase. *J Biol Chem*, 1997, **272** (3): 1777~1785
- Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72** (35): 248~254
- Wilson D M, Binder L I. Polymerization of microtubule-associated protein tau under near-physiological conditions. *J Biol Chem*, 1995, **270** (41): 24306~24314
- Felbus A, Francon J, Lemon A M, *et al.* Microtubule assembly *in vitro*. *Eur J Biochem*, 1977, **78** (1): 167~174
- Ma Y Z, Tsou C L. The effect of ammonium sulfate in the denaturation and renaturation of lactate dehydrogenase. *Biochem J*, 1991, **277** (pt 1): 207~211
- Tsou C L. Kinetics of irreversible modification of enzyme activity. *Acta Biochemica et Biophysica Sinica*, 1965, **5** (4): 398~417
- Luo J Y, He R Q, Li W. The fluorescence characterization of the polymerized microtubule-associated protein tau. *Int J Biol Macromol*, 2000, **27** (4): 263~268

Aggregated tau Induces The Inactivation and Conformational Changes of Lactate Dehydrogenase*

TIAN Rui^{1, 2)}, QU Mei-Hua¹⁾, LIU Ying¹⁾, HE Rong-Qiao^{1)**}

¹⁾Laboratory of Visual Information Processing, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²⁾Graduate School, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract Human neuronal tau aggregates by incubation at 37 °C (pH 7.2) and the aggregated tau is inactivated in promoting tubulin assembly. Furthermore, aggregated tau induces inactivation and conformational changes of rabbit muscle lactate dehydrogenase, although native tau can promote LDH activity. It suggests that tau aggregation may affect the energy metabolism in which LDH is involved.

Key words tau, self-aggregate, tubulin, assembly, lactate dehydrogenase, Alzheimer's disease

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (90206041, 30170297) and The Key Foundation of Chinese Academy of Sciences (KSCX2-SW2141).

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

Received: June 11, 2004 Accepted: June 22, 2004