

甲醛诱导的磷酸化减弱 Tau 蛋白 与 DNA 相互作用*

卢 静^{1, 2)} 苗君叶^{1, 2)} 潘 荣¹⁾ 赫荣乔^{1)**}

(¹⁾中国科学院生物物理研究所, 脑与认知科学国家重点实验室, 北京 100101; (²⁾中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 异常磷酸化 Tau 蛋白是神经纤维缠结的主要成分, 也是老年痴呆的典型病理特征之一. 本实验室前期报道了 Tau 蛋白具有保护 DNA 的作用, 但磷酸化对 Tau 与 DNA 相互作用的影响需要进行探索, 这对于揭示 Tau 蛋白异常磷酸化与神经细胞死亡之间的关系具有一定的参考价值. 本文采用甲醛孵育 N2a 细胞, 引起了细胞内 Tau 蛋白的过度磷酸化. 实验结果进一步显示, 甲醛孵育组的细胞核内磷酸化 Tau 蛋白与 DNA 非共定位存在, 而对照组细胞核内 Tau 蛋白与 DNA 存在一定程度的共定位现象. 电泳迁移率实验检测 GSK-3 β 催化的磷酸化 Tau 蛋白与 DNA 的结合情况, 可以观察到磷酸化减弱了 Tau 蛋白与 DNA 的相互结合. 这些结果表明, 异常磷酸化可以使 Tau 蛋白丧失对 DNA 的保护作用, 这可能是 Tau 蛋白异常磷酸化引起 DNA 损伤甚至细胞死亡的原因之一.

关键词 内源甲醛, Tau 蛋白, 磷酸化, DNA, 保护作用, 细胞死亡, 认知功能损伤

学科分类号 Q42, O65

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00451

神经 Tau 属于细胞骨架微管结合蛋白, 具有启动微管组装和稳定微管系统的作用. 同时, Tau 蛋白能与 DNA 相结合, 具有稳定 DNA 双螺旋结构^[1]和保护 DNA 免受自由基攻击的作用^[2]. Tau 蛋白(等)的异常修饰、错误折叠及其在脑内的聚积是包括阿尔兹海默氏症在内的很多神经退行性疾病的共同病理特征^[3-4]. 过度磷酸化^[5]、糖基化^[6-7]、硝基化^[8]等异常修饰能够导致 Tau 蛋白结构改变和功能丧失.

甲醛(formaldehyde, FA)普遍存在于自然环境中. 空气中甲醛含量达到约 0.1 mg/m³ 时, 会引起人体的不适; 达到约 30 mg/m³ 时, 可能危及人的生命. 生物体内普遍存在甲醛(内源甲醛), 不同细胞及细胞器内的甲醛含量不同^[9-10]. 内源甲醛来源于 DNA、组蛋白脱甲基化^[11]、以及某些细胞器(如: 线粒体、内质网、过氧化物酶体等)的代谢过程^[12]. 甲胺、多胺等能通过氨基脒敏感性胺氧化酶(semicarbazide-sensitive amine oxidase, SSAO)的作用生成甲醛^[13]. 脂质过氧化是体内产生甲醛的另一途径^[14]. 甲醛可以直接与蛋白质侧链的 α -/ ϵ - 氨基

反应, 产生羟甲基化衍生物^[15-16], 进而引起蛋白质分子聚积^[17]. 近期研究表明, 甲醛暴露可引起大鼠空间认知功能障碍^[18], 内源甲醛异常升高, 可导致中枢神经系统等损伤, 表现出学习、记忆、情感等异常^[9, 19]. 因此, 内源甲醛与老年认知功能损伤的关系受到越来越多的关注^[20-21].

Tau 蛋白的过度磷酸化是神经退行性疾病的重要病理特征, 但是, 甲醛是否引起神经细胞内 Tau 蛋白的异常磷酸化尚无报道. 如果能够证实甲醛引起神经细胞内 Tau 蛋白的异常磷酸化, 从而使该蛋白质失去保护 DNA 的功能, 这将为研究 Tau 蛋白的异常磷酸化与细胞死亡之间关系提供一种新的思

* 国家重点基础研究发展计划资助项目(2010CB912303, 2012CB911004), 中国科学院创新方向项目(CAS-KSCX2-YW-R-119), 中国科学院创新预研项目(KSCX2-YW-R-256)和国家自然科学基金面上项目(30970695).

** 通讯联系人.

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

收稿日期: 2011-10-08, 接受日期: 2011-11-23

路,对进一步研究神经退行性疾病发生发展的机制也具有参考价值。

本实验室长期以来研究 Tau 蛋白的结构与功能,提出 Tau 蛋白是一种“DNA 分子伴侣”,具有保护 DNA 的作用^[2,22];重视醛类对神经系统蛋白质的修饰及因修饰而产生的生物学效应^[16,23-24],初步证实了内源甲醛与认知功能损伤之间具有相关性^[18],从而认为甲醛应激对中枢神经系统造成的慢性损伤是老年认知功能障碍的重要危险因素之一^[20]。本文报道甲醛诱导神经细胞内 Tau 蛋白的异常磷酸化,并且发现异常磷酸化能明显减弱 Tau 与 DNA 的相互作用,从而使 Tau 蛋白丧失对 DNA 的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

表达人类神经 Tau 23 异构体的 BL21 菌株,由英国剑桥大学 Geodert 教授馈赠;小鼠神经母细胞瘤 N2a 细胞来自于中国医学科学院基础医学研究所(北京)。

组蛋白 H1 和 BSA 购自 Amresco 公司(美国); GSK-3 β 激酶(500 000 U)购自 NEB 公司(英国); Hoechst 33258 购自于碧云天公司(中国);总 Tau 蛋白抗体(Tau5)和 Tau 磷酸化(anti-pS396)抗体均购自 Millipore 公司(美国);Tau 磷酸化(anti-pT181)抗体购自 SAB 公司(美国); β -actin 抗体和 F-actin 染料 phalloidin 购自 Sigma 公司(美国);DMEM 培养基购自 Gibco 公司(美国);胎牛血清购自 PAA 公司(奥地利);细胞活力测定试剂盒(CCK-8)购自日本株式会社同仁化学研究所(日本);细胞裂解液购自赛驰公司(中国),ECL 超敏化学发光液购自普利来公司(中国);BCA 试剂盒购自 Pierce 公司(美国)。

1.2 样品制备

神经 Tau 蛋白 Tau 23 的表达、菌体匀浆、可溶性蛋白的收集,以及采用 SP-sepharose、Q-sepharose 柱层析对 Tau 23 进行纯化的过程,参考 Qu 等^[25]使用的方法。如图 4a 所示,分离纯化后的 Tau 23 蛋白在 SDS-PAGE 和蛋白质印迹膜上(单克隆抗体 Tau5)均为单一条带。通过“微管蛋白聚集”法测定显示,提取的 Tau 23 的活性与国际同行所报道的一致^[26]。

脱氧寡核苷酸的制备:首先合成 26 bp 的多核

苷酸随机序列。为了有效退火,在每条核苷酸序列 5'端多连入一个核苷酸。通过 95℃水浴 5 min 后缓慢降至室温,退火形成 dsDNA。通过紫外分光光度仪检测(A_{260})确定 dsDNA 的浓度,参照 Qu 等^[25]的方法。

1.3 细胞培养、甲醛孵育以及细胞活力的测定

N2a 细胞培养。培养于 DMEM 培养基+10%胎牛血清(FBS)中,37℃,5% CO₂ 培养箱,每隔 2~3 天传代一次。细胞初始接种密度为 5×10^5 ,接种到 96 孔板中,细胞培养 24 h 贴壁后,加入不同浓度甲醛继续培养 24 h 后,采用细胞活力测定试剂盒(CCK-8)进行细胞活力测定。

1.4 Western blotting

N2a 细胞以 5×10^5 个/ml 的密度接种于直径为 10 cm 的培养皿中,培养 24 h 贴壁后,加入甲醛使其终浓度分别为 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 mmol/L。经 4 h 后,收集甲醛孵育培养后的 N2a 细胞用细胞裂解液进行裂解,离心后取上清,得到细胞蛋白,用 BCA 试剂盒测定蛋白质的浓度,对蛋白质进行 SDS 凝胶电泳分离,然后将其转印到 PVDF 膜上。5%脱脂牛奶封闭后,进行一抗孵育(4℃过夜),用 TBST(Tween-20)洗 3 次(5 min/次)后,进行二抗孵育(室温,2 h),再 TBST 洗 3 次(5 min/次)后,使用 ECL 超敏化学发光液显影。

1.5 细胞免疫荧光染色

N2a 细胞以 2×10^5 个/ml 的密度接种于含有包被好玻片的 24 孔板中,培养 24 h 贴壁后加入终浓度为 0.2 mmol/L 的甲醛。用 PBS 清洗 3 次后用 4%多聚甲醛进行固定,0.1% PBST(Triton-X100)透膜,清洗后,加入 10%的羊血清 37℃温育 30 min,然后加入一抗进行温育(4℃过夜)。之后用 PBS 洗去一抗,加入荧光标记的二抗,并用 Hoechst 33258 和 phalloidin 对 DNA 以及 F-actin 进行染色(37℃,温育 30 min),用 PBS 洗 3 次。甘油封片后,用于共聚焦显微镜观察。

1.6 磷酸化 Tau 蛋白的制备

10 μ mol/L Tau 23 和 500 000 U GSK-3 β 在 25 μ l 的反应体系中(20 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L DTT, 200 μ mol/L ATP, pH 7.5)于 25℃反应 1 h。然后通过 Western blotting 用磷酸化 Tau 的抗体(anti-pT181 和 anti-pS396)检测磷酸化情况。

1.7 电泳迁移率实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

将 26 bp 双链 DNA(dsDNA)与 10 $\mu\text{mol/L}$ Tau 23, 10 $\mu\text{mol/L}$ 磷酸化 Tau 23, 10 $\mu\text{mol/L}$ 组蛋白 H1 和 10 $\mu\text{mol/L}$ BSA 进行温育 10 min, 然后通过 20%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 dsDNA- 蛋白复合物(分离条件: 电压 100 V, 4 $^{\circ}\text{C}$, 2 h; 缓冲液 1 \times TBE: 89 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷, 89 mmol/L 硼酸和 2 mmol/L EDTA, pH 8.3). 凝胶用 EB (0.5 mg/L)染色 30 min, 然后用凝胶成像系统(UVP Image store 7500)进行观察(Dingyong Co., 中国). 为了进一步验证磷酸化的作用, 首先将 Tau 蛋白与 DNA 进行反应形成复合物, 然后加入 GSK-3 β 催化 Tau 蛋白磷酸化, 并进行相同条件下的 EMSA

检测.

2 结 果

2.1 甲醛诱导 Tau 蛋白磷酸化

为了研究磷酸化对 Tau 蛋白与 DNA 结合能力的影响, 在 N2a 细胞(接种密度 5×10^5 个/ml)的培养液中加入不同浓度的甲醛, 培养 4 h 后收获细胞, 采用 Western blotting 对 Tau 的磷酸化位点(T181, S396)进行检测. 如图 1a 所示, 0.5 mmol/L 甲醛孵育下的 N2a 细胞内 Tau 蛋白 T181 的磷酸化显著升高, 相对而言, 0.2 mmol/L 甲醛已经可以使 S396 位点的磷酸化明显高于正常水平. 以上结果提示, 甲醛能够诱导细胞内 Tau 蛋白的异常磷酸化.

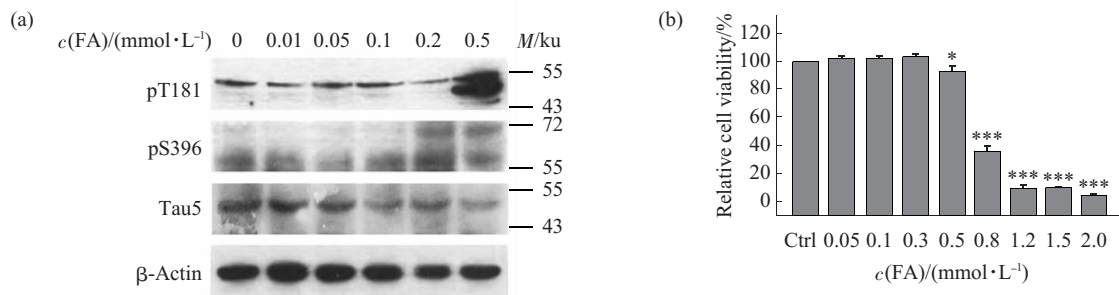


Fig. 1 Changes in Tau phosphorylation, total Tau and cell viability of N2a cells treated with different concentrations of formaldehyde

N2a cells were seeded at a concentration of 5×10^5 cells/ml, cultured for 24 h and then treated with different concentrations of formaldehyde for another 4 h. Changes in the phosphorylation of Tau at residues S396 and T181 and total Tau were measured by Western blotting (a). Cell viability cultured for 24 h was assayed by CCK-8 and shown in columns (b). Signals of anti-pT181 and anti-pS396 (monoclonal antibodies) increased in the presence of formaldehyde, but those of Tau5 (a monoclonal antibody against total Tau) did not increase. The viability of cells decreased to 90% under the experimental conditions. This demonstrates that formaldehyde is able to induce hyperphosphorylation of Tau *in vivo*.

作者对甲醛的细胞毒性进行了测定, 在 N2a 细胞中加入不同浓度的甲醛后培养 24 h. 结果表明, 当甲醛浓度达到或高于 0.5 mmol/L 时, 细胞活力下降至 90%左右(图 1b). 提示 Tau 的异常磷酸化是细胞对环境中甲醛浓度升高的应答.

2.2 细胞核内磷酸化 Tau 蛋白与 DNA 非共定位

为了进一步证实甲醛能够诱导 N2a 细胞内 Tau 蛋白的异常磷酸化, 作者采用共聚焦显微镜观察 Tau 蛋白 T181 位点磷酸化信号. 如图 2 所示, 在甲醛存在下, Tau 蛋白的 T181 位点被明显磷酸化, 并且磷酸化 pT181(红色)信号与 DNA(蓝色)没有明显的共定位现象. 在相同条件下, Tau 蛋白的

S396 位点也出现了磷酸化, 且磷酸 pS396(红色)信号与 DNA 的(蓝色)信号也无明显共定位现象. 单克隆抗体 Tau5(红色)识别细胞总 Tau 蛋白. 在甲醛作用下, Tau5 的信号(红色)与 DNA(蓝色)信号出现一定程度的重合, 而大多数为非共定位. 说明在实验条件下, 多数 Tau 蛋白被磷酸化, 而仍有部分 Tau 蛋白处于非磷酸化状态.

未加入甲醛的对照组细胞(图 3), Tau 蛋白的 T181 和 S396 两个位点的磷酸化不明显. 也就是说, 在甲醛的诱导下, N2a 细胞内 Tau 蛋白发生过度磷酸化, 且磷酸化影响了 Tau 蛋白与 DNA 的结合能力.

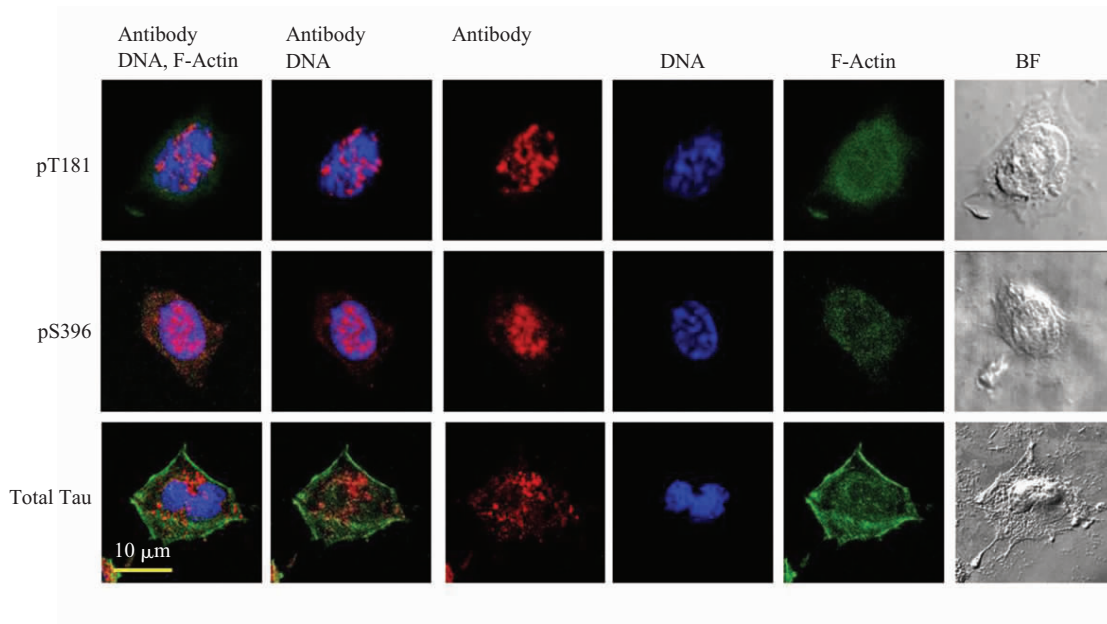


Fig. 2 Signals of phosphorylated Tau (pT181 and pS396) and total Tau (Tau5) after cells were treated with formaldehyde for 4 h

Phosphorylated Tau was detected by anti-pT181 and anti-pS396 antibodies, and total Tau was assayed with Tau5 antibody. Nuclei and F-actin were stained with Hoechst-33258 (blue) and phalloidin (green), respectively. The signals of anti-pT181 and anti-pS396 strikingly increased in nuclei of N2a cells, and most of them were rarely co-localized with the DNA staining. A small part of Tau5 signals were co-localized with DNA except for most of them.

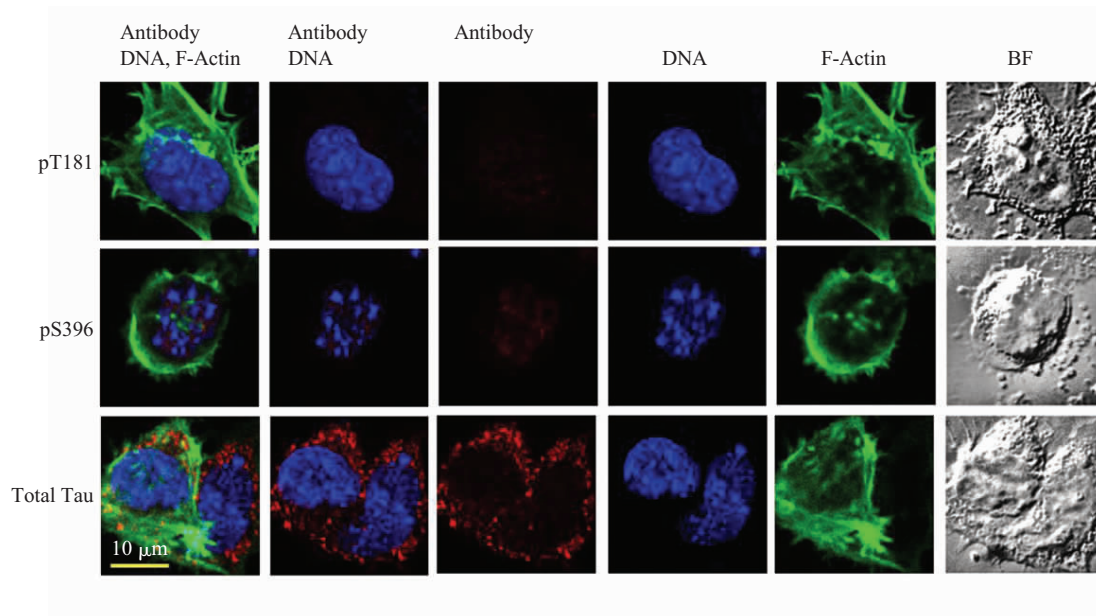


Fig. 3 Signals of phosphorylated Tau (pT181 and pS396) and total Tau (Tau5) from cells in the absence of formaldehyde under the same experimental conditions

The signals of both anti-pT181 and anti-S396 in the absence of formaldehyde were much less than those in the presence of formaldehyde (Figure 1) except for Tau5.

2.3 磷酸化削弱 Tau 蛋白与 DNA 相互作用

以上结果显示, 磷酸化有可能减弱细胞核内 Tau 与 DNA 的相互作用, 为了进一步验证磷酸化是否导致了 Tau 蛋白与 DNA 解离, 作者表达并分离纯化了 Tau 蛋白. 如图 4a 所示, Tau 蛋白在 SDS-PAGE 上显示为单一条带. 并且由 Tau5 单克隆抗体得到验证. 采用 GSK-3 β 进行催化, 制备磷酸化 Tau 蛋白, 可以观察到, 用磷酸化抗体 anti-pT181 和 anti-pS396 检测的 Tau 蛋白, 均呈现阳性结果(图 4b). 说明经过 GSK-3 β 催化后的 Tau 蛋白, 其 T181 以及 S396 位点均被磷酸化.

通过电泳迁移率实验, 可以观察到非磷酸化 Tau 与 DNA 之间有明显的相互作用(图 4c, 泳道 2). 当 Tau 蛋白被磷酸化后, 再与 DNA 保温, 其相互作用明显减弱(图 4c, 泳道 5); Tau 蛋白先与 DNA 保温, 再加入 GSK-3 β 使 Tau 蛋白进行磷酸化, 同样可以干扰 Tau 与 DNA 的相互结合(图 4c, 泳道 6). 在相同条件下, 作为阴性对照的 BSA 以及单独 DNA, 没有表现出 DNA 迁移的阻滞现象(图 4c, 泳道 1, 4); 而作为阳性对照的组蛋白 H1, 表现出与 DNA 明显的相互作用(图 4c, 泳道 3). 以上结

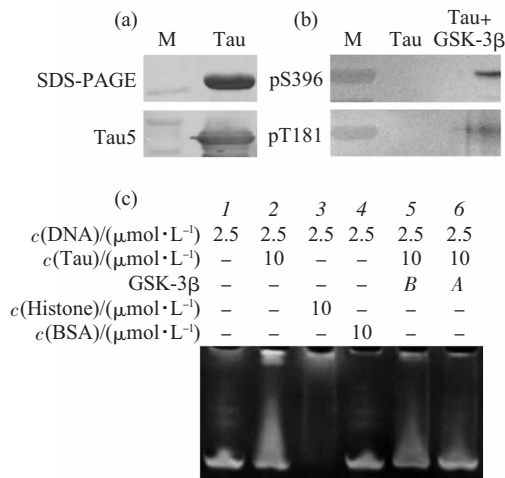


Fig. 4 Phosphorylation interferes with Tau binding to DNA *in vitro*

(a) The purity of Tau isoform Tau 23 was demonstrated by SDS-PAGE and confirmed by Western blotting (antibody Tau5). (b) Recombinant GSK-3 β was reacted with Tau 23 at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h. Phosphorylated Tau was detected with the antibodies anti-pS396 and anti-pT181. Both residues (S396 and T181) of Tau 23 were phosphorylated. (c) Electrophoretic mobility-shift assay of DNA using phosphorylated Tau 23. BSA and histone H1 were used as negative and positive controls, respectively. Recombinant GSK-3 β was added before (B) and after (A) formation of the DNA-Tau complex. Phosphorylated Tau dissociated from DNA.

果证明, 磷酸化可以显著降低 Tau 与 DNA 的相互作用, 从而干扰 Tau 对 DNA 的保护作用.

3 讨 论

甲醛不但广泛存在于人类生活的环境中, 也存在并产生于我们的体内. 最近研究显示, 随着衰老(大于 65 岁), 人体内甲醛的水平逐渐升高^[19], 并与认知功能的损伤程度呈正相关^[18]. 老年痴呆的致病因素十分复杂^[27], 国内外学者在相关领域开展了广泛的研究^[28-29], 从不同角度探索痴呆的发病机制, 如淀粉样蛋白聚集^[30-32]、氧化应激^[33-35]、胶质细胞功能异常^[36-37]、离子通道代谢失调^[38-39]等. 尽管关于老年痴呆发病机制的学说有多种, 但 Tau 蛋白的异常磷酸化且在脑内聚积是其典型的病理表现. Tau 蛋白的磷酸化不但存在于脑内, 在脑脊液中也检出^[31]. 临床调查显示, 约有 30%~40% 老年痴呆病人伴有尿甲醛水平的异常升高^[40]. 这些结果显示, Tau 蛋白的异常磷酸化与甲醛之间的关系研究具有重要的科学意义.

异常磷酸化 Tau 蛋白是配对螺旋样二聚体 (paired helical filaments, PHFs) 的主要组成成分, 在病人脑内的含量与其认知功能障碍呈正相关^[41]. PHF-Tau 丧失与微管系统结合的功能, 导致细胞骨架结构稳定性下降, 甚至崩解^[42]. 本工作提示, 甲醛可以引起细胞内 Tau 异常磷酸化, 异常磷酸化干扰 Tau 与 DNA 的结合, 使 Tau 蛋白失去保护 DNA 的作用, 从而使 DNA 受到自由基(包括甲醛)等危险因素的攻击, 导致 DNA 的损伤(图 5). 提出这一观点的根据是: a. Western blotting 结果显示, 甲醛明显引起 N2a 细胞内 Tau 蛋白的磷酸化(图 1a). b. 细胞免疫荧光染色显示, N2a 细胞内, 特别是细胞核 Tau 被磷酸化(pT181、pS396), 相同条件下, 对照细胞的 Tau 蛋白没有出现明显的磷酸化(图 3). 这些结果证明, 甲醛可以诱导细胞内 Tau 蛋白的异常磷酸化. c. 细胞荧光染色结果可以看到, 在甲醛存在下, pT181 和 pS396 的信号与 DNA 染色几乎没有共定位, 而 Tau5 识别的总 Tau 蛋白包含磷酸化与一定程度的非磷酸化两种形式, 非磷酸化的 Tau 蛋白仍能与 DNA 结合. d. 体外实验表明, 磷酸化可以使 Tau 蛋白从 DNA 上解离(图 4). 这些结果说明磷酸化 Tau 蛋白与 DNA 的结合能力显著降低. e. Tau 蛋白具有防止 DNA 变性和促进 DNA 复性以及稳定双螺旋的作用^[1]. f. Tau 蛋白具有保护和防止 DNA 被活性氧自由基

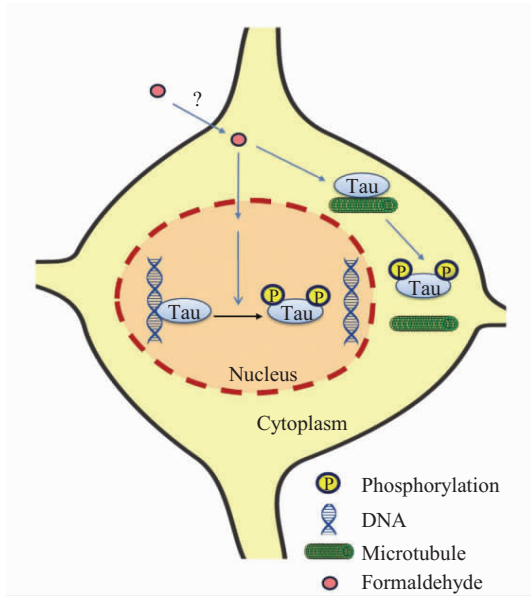


Fig. 5 Diagram of Tau hyperphosphorylation in overloaded formaldehyde

Tau protein, phosphorylated in the cytoplasm has long been reported to be dissociated from microtubules^[47], leading to disruption of the microtubule system^[48]; here we further show that phosphorylation may induce nuclear Tau to be dissociated from DNA and inactivated in the protection of DNA^[2, 22]. This might be a cause of DNA damage and cell dysfunction.

攻击的作用^[2]. g. 失去 Tau 蛋白保护的 DNA 容易被 DNAase 降解^[22]. 小结以上结果, 不难看出, 甲醛诱导 Tau 蛋白异常磷酸化, 从而干扰 Tau 蛋白与 DNA 的结合和保护作用. 这可能是甲醛导致细胞 DNA 损伤的机制之一.

甲醛过量所导致的 Tau 蛋白异常磷酸化是细胞的一种应激状态, 即甲醛应激. 甲醛应激可能导致细胞的损伤, 乃至死亡^[20]. 需要说明的是, 在甲醛应激状态下, 导致细胞死亡的途径可能是多方面的. 甲醛不但可与蛋白质发生作用, 也可以与 DNA 进行反应, 导致 DNA 分子交联. 然而, 在细胞核内 Tau 蛋白与 DNA 结合, 形成“串珠样”结合模式, 形成对 DNA 的保护^[43]. 当 Tau 蛋白被磷酸化后, 与 DNA 结合的能力显著下降, DNA 失去了 Tau 的保护, 从而更容易受到自由基等危险因素的损伤.

在甲醛应激的状态下, Tau 蛋白会发生异常磷酸化, 但在细胞内什么激酶参与了 Tau 蛋白的磷酸化, 值得进行讨论. T181 和 S396 的磷酸化通常是 GSK-3 β ^[44]、CDK5^[45]以及 SAP 激酶^[46]等激酶的作用位点. 因此, 甲醛应激状态下引起 Tau 蛋白磷酸化

的激酶及其作用机制, 需要在未来的工作中进一步研究.

致谢 感谢英国剑桥大学 Geodert 教授馈赠表达人类神经 Tau 23 异构体的 BL21 菌株; 感谢生物物理研究所技术平台的滕岩老师在激光共聚焦显微镜观察方面提供的技术指导.

参 考 文 献

- [1] Hua Q, He R Q. Human neuronal tau is able to bind DNA and increase the melting temperature. Chinese Scientific Bul, 2000, **45**(11): 166-169
- [2] Hua Q, He R Q. Tau could protect DNA double helix structure. Biochim Biophys Acta, 2003, **1645**(2): 205-211
- [3] Stefani M, Dobson C M. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. J Mol Med (Berl), 2003, **81**(11): 678-699
- [4] Zhou J. Recent progress in neurodegenerative disorder research in China. Sci China Life Sci, **53**(3): 348-355
- [5] Geschwind D H. Tau phosphorylation, tangles, and neurodegeneration: the chicken or the egg?. Neuron, 2003, **40**(3): 457-460
- [6] Chen L, Wei Y, Wang X, *et al.* D-Ribosylated Tau forms globular aggregates with high cytotoxicity. Cell Mol Life Sci, 2009, **66**(15): 2559-2571
- [7] Chen L, Wei Y, Wang X, *et al.* Ribosylation rapidly induces alpha-synuclein to form highly cytotoxic molten globules of advanced glycation end products in molten globules with high cytotoxicity. PLoS One, 2010, **5**(2): e9052
- [8] Liu Y Y, Min Qiang, Wei Y, *et al.* A novel molecular mechanism for nitrated α -synuclein-induced cell death. J Mol Cell Biol, 2010, **3**(4): 239-249
- [9] 童志前, 万有, 罗文鸿, 等. 内源性甲醛及其相关人类重大疾病. 自然科学进展, 2008, **18**(11): 1201-1210
Tong Z Q, Wang Y, Luo W H, *et al.* Prog Natural Sci, 2008, **18**(11): 1201-1210
- [10] 苏涛, 魏艳, 赫荣乔. 改良 2, 4-二硝基苯肼法测定脑内源甲醛. 生物化学与生物物理进展, 2011, **38**(12): 1171-1177
Su T, Wei Y, He R Q. Prog Biochem Biophys, 2011, **38**(12): 1171-1177
- [11] Kalasz H. Biological role of formaldehyde, and cycles related to methylation, demethylation, and formaldehyde production. Mini Rev Med Chem, 2003, **3**(3): 175-192
- [12] Denk H, Moldeus P W, Schulz R A, *et al.* Hepatic organelle interaction. Mechanism of succinate enhancement of formaldehyde accumulation from endoplasmic reticulum N-dealkylations. J Cell Biol, 1976, **69**(3): 589-598
- [13] Lyles G A. Mammalian plasma and tissue-bound semicarbazide-sensitive amine oxidases: biochemical, pharmacological and toxicological aspects. Int J Biochem Cell Biol, 1996, **28**(3): 259-274
- [14] Gulec M, Songur A, Sahin S, *et al.* Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation products in heart tissue of subacute and subchronic formaldehyde-exposed rats: A preliminary study.

- Toxicol Ind Health, 2006, **22**(3): 117-124
- [15] Nie C L, Zhang W, Zhang D, *et al.* Changes in conformation of human neuronal tau during denaturation in formaldehyde solution. *Protein Pept Lett*, 2005, **12**(1): 75-78
- [16] Nie C L, Wei Y, Chen X, *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
- [17] 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 Neurosci*, 2007, **8**(9)(doi: 10.1186/1471-2202-8-9)
- [18] Tong Z, Zhang J, Luo W, *et al.* Urine formaldehyde level is inversely correlated to mini mental state examination scores in senile dementia. *Neurobiol Aging*, 2011, **32**(1): 31-41
- [19] 童志前, 韩婵帅, 苗君叶, 等. 内源性甲醛异常蓄积与记忆衰退. *生物化学与生物物理进展*, 2011, **38**(06): 575-579
Tong Z Q, Han C S, Miao J Y, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2011, **38**(06): 575-579
- [20] He R, Lu J, Miao J. Formaldehyde stress. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(12): 1399-1404
- [21] Naqvi Sajjad Haider, 王维山, 苗君叶, 等. 甲醛诱导 Tau 蛋白形成“孔道样”聚集结构. *生物化学与生物物理进展*, 2010, **37**(11): 1195-1203
Naqvi S H, Wang W S, Miao J Y, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2010, **37**(11): 1195-1203
- [22] 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
- [23] Chen L, Wei Y, Wang X, *et al.* Ribosylation rapidly induces alpha-synuclein to form highly cytotoxic molten globules of advanced glycation end products. *PLoS One*, 2010, **5**(2): e9052
- [24] Li F, Yang Z, Lu Y, *et al.* Malondialdehyde suppresses cerebral function by breaking homeostasis between excitation and inhibition in turtle *Trachemys scripta*. *PLoS One*, 2010, **5**(12): e15325
- [25] 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
- [26] Goedert M, Jakes R. Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J*, 1990, **9**(13): 4225-4230
- [27] Zhou J. Recent progress in neurodegenerative disorder research in China. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(3): 348-355
- [28] Goedert M, Jakes R, Spillantini M G, *et al.* Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature*, 1996, **383**(6600): 550-553
- [29] Zhang M, Zhao Z, He L, *et al.* A meta-analysis of oxidative stress markers in schizophrenia. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(1): 112-124
- [30] Lansbury P T, Lashuel H A. A century-old debate on protein aggregation and neurodegeneration enters the clinic. *Nature*, 2006, **443**(7113): 774-779
- [31] Zheng Y, He J, Hong T. Biomarkers of Alzheimer's disease in body fluids. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(4): 490-496
- [32] Lu L, Gu L, Liang Y, *et al.* Dual effects of alpha-synuclein on neurotoxicity induced by low dosage of rotenone are dependent on exposure time in dopaminergic neuroblastoma cells. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(5): 590-597
- [33] Andersen J K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?. *Nat Med*, 2004, **10**(Suppl): S18-25
- [34] Sun P, Zhang Q, Han J, *et al.* TLR4 signaling induced TLR2 expression in the process of mimic cerebral ischemia/reperfusion *in vitro*. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(2): 223-228
- [35] Yan B, A J, Hao H, *et al.* Metabonomic phenotype and identification of "heart blood stasis obstruction pattern" and "qi and yin deficiency pattern" of myocardial ischemia rat models. *Sci China C Life Sci*, 2009, **52**(11): 1081-1090
- [36] Miller D W, Cookson M R, Dickson D W. Glial cell inclusions and the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neuron Glia Biol*, 2004, **1**(1): 13-21
- [37] Duan S. Progress in glial cell studies in some laboratories in China. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(3): 330-337
- [38] Ehling P, Bittner S, Budde T, *et al.* Ion channels in autoimmune neurodegeneration. *FEBS Lett*, 2011 (doi: 10.1016/j.febslet.2011.03.065)
- [39] Wang Y, Xu T. Ion channels in neuronal survival. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(3): 342-347
- [40] 王维山, 郝智慧, 张 力, 等. 正常老年人与阿尔茨海默病患者尿甲醛浓度的研究. *中华老年心脑血管病杂志*, 2010, **12**(8): 721-722
Wang W S, Hao Z H, Zhang L, *et al.* *Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis*, 2010, **12**(8): 721-722
- [41] Matsuoka Y, Jouroukhin Y, Gray A J, *et al.* A neuronal microtubule-interacting agent, NAPVSIPQ, reduces tau pathology and enhances cognitive function in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008, **325**(1): 146-153
- [42] Nieto A, Correas I, Lopez-Otin C, *et al.* Tau-related protein present in paired helical filaments has a decreased tubulin binding capacity as compared with microtubule-associated protein tau. *Biochim Biophys Acta*, 1991, **1096**(3): 197-204
- [43] 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
- [44] Voss K, Gamblin T C. GSK-3beta phosphorylation of functionally distinct tau isoforms has differential, but mild effects. *Mol Neurodegener*, 2009, **4**: 18(doi:10.1186/1750-1326-4-18)
- [45] Town T, Zolton J, Shaffner R, *et al.* p35/Cdk5 pathway mediates soluble amyloid-beta peptide-induced tau phosphorylation *in vitro*. *J Neurosci Res*, 2002, **69**(3): 362-372
- [46] Buee-Scherrer V, Goedert M. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases in intact cells. *FEBS Lett*, 2002, **515**(1-3): 151-154
- [47] Hardy J. A hundred years of Alzheimer's disease research. *Neuron*, 2006, **52**(1): 3-13
- [48] Goedert M, Jakes R, Spillantini M G, *et al.* Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature*, 1996, **383**(6600): 550-553

Formaldehyde-mediated Hyperphosphorylation Disturbs The Interaction Between Tau Protein and DNA *

LU Jing^{1,2)}, MIAO Jun-Ye^{1,2)}, PAN Rong¹⁾, HE Rong-Qiao^{1)**}

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

²⁾ Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Hyperphosphorylation of Tau protein and related neuron death is one of the most important characteristics of Alzheimer's disease. Our laboratory has shown that Tau protein is able to bind and protect DNA. It is still unknown whether phosphorylation affects the binding of Tau to DNA. Therefore, it is of importance to investigate the effect of phosphorylation on the interaction of Tau with DNA in cells. In this work, we treated N2a cells with formaldehyde and found that Tau protein was hyperphosphorylated in the cells under the experimental conditions. Phosphorylation was remarkably observed at both T181 and S396 of Tau protein in the cells in the presence of formaldehyde compared with those in the absence of formaldehyde. Cytoimmunofluorescence hardly showed that most of the nuclear phosphorylated Tau protein was co-localized with DNA, while Tau protein was partially co-localized with DNA in the absence of formaldehyde as control. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) showed that phosphorylated Tau catalyzed by GSK-3 β reduced the interaction between Tau protein and DNA *in vitro*. These findings reveal that hyperphosphorylation declines Tau protein to protect DNA, and may thereafter lead to damage of DNA and even cell death, giving a novel viewpoint to the pathology of Alzheimer's disease.

Key words endogenous formaldehyde, Tau protein, hyperphosphorylation, DNA, protection, cell death, cognitive impairment

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00451

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2010CB912303, 2012CB911004), Key Innovative Project of The Chinese Academy of Sciences(CAS-KSCX2-YW-R-119, KSCX2-YW-R-256) and The National Natural Science Foundation of China (30970695).

**Corresponding author.

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

Received: October 8, 2011 Accepted: November 23, 2011