

学校编码: 10384

类号____密级____

学号:21620070153806

UDC _____

廈門大學

博 士 学 位 论 文

***Rps23r1* 基因家族编码的蛋白抑制 A β 产生
和 tau 蛋白磷酸化**

**The *Rps23r1* gene family encodes proteins that inhibit
Alzheimer's β -amyloid generation and tau phosphorylation**

黄 秀 梅

指导教师姓名：许华曦 教授

专 业 名 称：细胞生物学

论文提交日期：2010 年 4 月

论文答辩时间：2010 年 5 月

学位授予时间：2010 年 月

答辩委员会主席：_____

评 阅 人：_____

2010 年 5 月

Rps23r1 基因家族编码的蛋白抑制 A β 产生和 tau 蛋白磷酸化

黄秀梅

指导教师

许华曦 教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（）课题（组）的研究成果，获得（）课题（组）经费或实验室的资助，在（）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘 要

含有 β -淀粉样蛋白 ($A\beta$) 的老年斑 (Senile plaques) 和由过度磷酸化的微管相关蛋白 tau 组成的神经元纤维缠结 (Neurofibrillary tangles) 是阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's disease, AD) 的两大病理学特征。鉴定可以调节 $A\beta$ 产生和 tau 蛋白过度磷酸化的新基因蛋白并阐明其作用机理, 对于 AD 的治疗非常重要。

我们最近鉴定出一个起源于核糖体蛋白 S23 mRNA 返座的小鼠 *Rps23r1* 基因。我们的研究发现, RPS23R1 蛋白通过与腺苷酸环化酶 (Adenylate cyclases) 相互作用上调 cAMP 水平和蛋白激酶 A (PKA) 的活性, 从而抑制糖原合成酶激酶 3 (GSK-3) 的活性以及 $A\beta$ 产生和 tau 蛋白磷酸化。*Rps23r1* 基因在包括人类在内的各种系细胞内以及过量表达 RPS23R1 的转基因小鼠体内均有作用, 并且将此转基因小鼠与三重转基因 AD 小鼠杂交后, AD 小鼠的病理特征改善, 突触标志物蛋白水平提高。

我们进一步发现, *Rps23* mRNA 的返座在不同的物种中多次发生, 但我们只在小鼠中发现了一个有功能的 *Rps23r1* 同源基因 *Rps23r2*。与亲本基因 *Rps23* 相比, *Rps23r1* 和 *Rps23r2* 都是逆转录的, 在各种组织都有表达。与 RPS23R1 蛋白相似, RPS23R2 蛋白也可以通过与腺苷酸环化酶相互作用而上调 PKA 的活性, 抑制 GSK-3 的活性以及 $A\beta$ 的产生和 tau 蛋白磷酸化。但是, RPS23R2 的作用要弱于 RPS23R1, 这种差异可能是由于 RPS23R2 具有一个额外的具有抑制作用的羧基端造成的。

总之, 我们的研究揭示了一条新的调节 AD 病理的信号通路, 并且发现了一个返座基因家族及其在调节蛋白激酶信号通路中的作用。

关键词: 阿尔茨海默氏病; *Rps23r1*; 基因返座; β -淀粉样蛋白; tau 蛋白; 糖原合成酶激酶-3

Abstract

Senile plaques consisting of β -amyloid ($A\beta$) and neurofibrillary tangles composed of hyperphosphorylated tau are major pathological hallmarks of Alzheimer's disease (AD). Elucidation of factors that modulate $A\beta$ generation and tau hyperphosphorylation is crucial for AD intervention.

Here, we identify a mouse *Rps23r1* gene that originated through retroposition of ribosomal protein S23. We demonstrate that RPS23R1 proteins reduce the levels of $A\beta$ and tau phosphorylation by interacting with adenylate cyclases to activate cAMP/PKA and thus inhibit GSK-3 activity. The function of *Rps23r1* gene is demonstrated in cells of various species including human, and in transgenic mice overexpressing RPS23R1. Furthermore, the AD-like pathologies of triple transgenic AD mice were improved and levels of synaptic marker proteins increased after crossing them with *Rps23r1* transgenic mice.

We also show that retroposition of *Rps23* mRNA occurred multiple times in different species but only generated another functional *Rps23r1*-homologous gene *Rps23r1* in the mice. Both *Rps23r1* and *Rps23r2* are reversely transcribed compared to the parental *Rps23* gene, expressed in various tissues, and encode proteins interacting with adenylate cyclase. Similar to the RPS23R1 protein, RPS23R2 can upregulate PKA activity for inhibiting the activity of GSK-3, $A\beta$ generation, and tau phosphorylation. But the effects of RPS23R2 are weaker than RPS23R1 and such a difference is attributed to an extra carboxyl-terminal region of RPS23R2 that RPS23R1 lacks, which might have inhibitory effects.

Together our studies reveal a new target/pathway for regulating AD pathologies and uncover a retrogene family and its role in regulating protein kinase pathways.

Keywords: Alzheimer's disease; *Rps23r1*; Retroposition; β -amyloid; tau; Glycogen synthase kinase-3

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 阿尔茨海默氏病概述.....	1
1.2 AD 的发病机制.....	2
1.2.1 β -淀粉样蛋白级联假说.....	2
1.2.2 神经元细胞骨架变质假说.....	9
1.2.3 $A\beta$ 、GSK-3 和 tau 之间的相互影响.....	10
1.3 随机同源基因干扰技术.....	11
1.4 本课题的主要目的和意义.....	12
第二章 实验材料及方法	13
2.1 实验材料.....	13
2.1.1 细胞和主要试剂.....	13
2.1.2 抗体和化学药品.....	13
2.1.3 溶液配制.....	14
2.1.4 主要实验设备.....	15
2.2 实验方法.....	15
2.2.1 细胞培养.....	15
2.2.2 细胞转染.....	15
2.2.3 随机同源基因干扰技术.....	16
2.2.4 <i>Rps23r1</i> 基因克隆.....	16
2.2.5 序列分析.....	16
2.2.6 膜分级分离.....	16
2.2.7 免疫印迹分析.....	17
2.2.8 细胞膜表面蛋白生物素标记.....	17
2.2.9 免疫细胞化学染色.....	17
2.2.10 酶联免疫吸附测定.....	17
2.2.11 药物处理.....	18
2.2.12 <i>Rps23r1</i> RNA 干扰和实时荧光定量 PCR.....	18

2.2.13 原位杂交.....	18
2.2.14 <i>Rps23r1</i> 转基因小鼠与 3xTg AD 小鼠杂交.....	18
2.2.15 免疫组织化学材料及染色方法.....	18
2.2.16 体外活性分析和 cAMP 含量测定.....	19
2.2.17 免疫共沉淀.....	19
2.2.18 逆转录聚合酶链式反应.....	19
第三章 实验结果及分析.....	21
3.1 小鼠 <i>Rps23r1</i> 基因降低 AD Aβ 水平和 Tau 蛋白磷酸化.....	21
3.1.1 随机同源基因干扰技术筛选调节 A β 产生的基因.....	21
3.1.2 <i>Rps23r1</i> 基因的鉴定.....	22
3.1.3 RPS23R1 是 Ib 型跨膜蛋白.....	25
3.1.4 过量表达 RPS23R1 可以降低 A β 水平、GSK-3 活性以及 tau 蛋白磷酸化.....	25
3.1.5 RPS23R1 通过与腺苷酸环化酶相互作用上调 cAMP 水平和 PKA 活性.....	30
3.1.6 在 AD 小鼠模型脑中过量表达 RPS23R1 可以降低 A β 水平、GSK-3 活性以及 tau 蛋白磷酸化.....	32
3.2 小鼠 <i>Rps23r1</i> 基因家族起源于 <i>Rps23</i> mRNA 的基因返座并且其编码的蛋白抑制 Aβ 产生和 tau 蛋白磷酸化.....	35
3.2.1 <i>Rps23r1</i> 基因家族的鉴定.....	35
3.2.2 <i>Rps23r1</i> 基因家族起源于 <i>Rps23</i> mRNA 的基因返座.....	36
3.2.3 <i>Rps23r1</i> - <i>Rps23r5</i> , <i>Rps23</i> mRNA 和其他类似序列的进化关系.....	37
3.2.4 RPS23R1 家族蛋白抑制 A β 产生和 Tau 蛋白磷酸化.....	39
第四章 讨论及展望.....	41
参考文献.....	44
致 谢.....	55
攻读学位期间发表的学术论文目录.....	56

Catalog

Chapter 1 Introduction	1
1.1 Introduction of AD	1
1.2 Mechanism of AD	2
1.2.1 β -amyloid Cascade Hypothesis.....	2
1.2.2 Neuronal Cytoskeletal Degeneration Hypothesis.....	9
1.2.3 $A\beta$, GSK-3 and Tau.....	10
1.3 Random Homozygous Gene Perturbation	11
1.4 Aims and Significance	12
Chapter 2 Materials and Methods	13
2.1 Materials	13
2.1.1 Cells and Reagents.....	13
2.1.2 Antibodies and Chemicals.....	13
2.1.3 Solution Preparation.....	14
2.1.4 Equipments.....	15
2.2 Methods	15
2.2.1 Cells Cultures.....	15
2.2.2 Cell Transfection.....	15
2.2.3 Random Homozygous Gene Perturbation.....	16
2.2.4 <i>Rps23r1</i> Gene cloning.....	16
2.2.5 Sequence Analyses.....	16
2.2.6 Membrane Fractionation.....	16
2.2.7 Western Blot.....	17
2.2.8 Biotinylation.....	17
2.2.9 Immunocytochemistry.....	17
2.2.10 $A\beta$ ELISA Assay.....	17
2.2.11 Pharmacological Treatment.....	18
2.2.12 <i>Rps23r1</i> RNA Interference and Quantitative Real-Time PCR.....	18
2.2.13 In Situ Hybridization.....	18

2.2.14	Crossing <i>Rps23r1</i> Transgenic Mice with 3xTg AD Mice.....	18
2.2.15	Immunohistochemistry.....	18
2.2.16	In Vitro Activity Assays and cAMP Assay.....	19
2.2.17	Coimmunoprecipitation.....	19
2.2.18	Reverse Transcription-PCR.....	19
Chapter 3 Results and Analyses.....		21
3.1 The Mouse <i>Rps23r1</i> Reduces Aβ Levels and Tau Phosphorylation.....		21
3.1.1	Screening for Genes that Regulates A β Generation.....	21
3.1.2	Identification of the <i>Rps23r1</i> Gene.....	22
3.1.3	RPS23R1 Is a Type Ib Transmembrane Protein.....	25
3.1.4	RPS23R1 Overexpression Reduces A β Levels, GSK-3 Activity, and Tau Phosphorylation.....	25
3.1.5	RPS23R1 Interacts with Adenylate Cyclases to Upregulate cAMP Levels and PKA Activity.....	30
3.1.6	Overexpression of RPS23R1 Reduces A β Levels, GSK-3 Activity, and Tau Phosphorylation in the Brain of the Triple Transgenic AD Mice.....	32
3.2 The <i>Rps23r1</i> gene family originates through retroposition of the ribosomal protein S23 mRNA and encodes proteins that inhibit Alzheimer's β-amyloid generation and tau phosphorylation.....		35
3.2.1	Identification of the <i>Rps23r1</i> Gene Family.....	35
3.2.2	The <i>Rps23r1</i> gene family originated through retroposition of <i>Rps23</i> mRNA.....	36
3.2.3	Phylogenic relationships of <i>Rps23r1-Rps23r5</i> , <i>Rps23</i> mRNAs and other <i>Rps23</i> -like sequences.....	37
3.2.4	RPS23R1 family proteins interact with adenylate cyclases, activate PKA, and reduce GSK-3 activity, A β generation, and tau phosphorylation.....	39
Chapter 4 Discussion and Perspective.....		41

References	44
Acknowledgement	55
Publications	56

厦门大学博硕士论文摘要库

英文缩略词

英文缩写	英文全名	中文名称
AD	Alzheimer's disease	阿尔茨海默氏病; 老年痴呆症
ADAM10	A Disintegrin And Metalloprotease 10	解整合素样金属蛋白酶 10
AICD	APP intracellular domain	APP 被 γ -分泌酶切割后产生的胞内结构域
AMPK	AMP- Activated Protein Kinase	AMP 激活的蛋白激酶
APH-1	Anterior pharynx-defective 1	γ -分泌酶复合体的组分之一
ApoE	Apolipoprotein E	载脂蛋白 E
APP	β -amyloid precursor protein	β -淀粉样蛋白前体蛋白
A β	β -amyloid	β -淀粉样蛋白
BACE	β -site APP cleaving enzyme	β -分泌酶
CaMK-II	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II	钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II
CTF	C-terminal fragments	羧基末端片段
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate	环腺苷酸
CDK5	Cyclin-dependent kinase-5	周期蛋白依赖性蛋白激酶
cDNA	Complementary DNA	互补脱氧核糖核酸
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Dulbecco's 的改良 Eagle's 培养基
EDTA	Ethylenediamine tetracetic acid	乙二胺四乙酸
ER	Endoplasmic Reticulum	内质网
FAD	Familial Alzheimer's disease	家族性阿尔茨海默氏病
GSK-3	Glycogen synthase kinase-3	糖原合酶激酶 3
LRP	low-density lipoprotein receptor-related protein	低密度脂蛋白受体相关蛋白
mRNA	Messenger RNA	信使 RNA
MAP	Microtubule associated protein	微管相关蛋白
NCT	Nicastrin	γ -分泌酶复合体的组分之一
NFTs	Neurofibrillar tangles	神经元纤维缠结
NICD	Notch intracellular domain	Notch 被 γ -分泌酶切割后产生胞内结构域
NTF	N-terminal fragments	氨基末端片段
NSAIDs	Non-steroid anti-inflammatory drugs	非类固醇抗炎药物
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
PEN-2	Presenilin enhancer 2	γ -分泌酶复合体的组分之一
PHFs	Paired-helical filament	双螺旋纤维
PKA	Protein kinase A	cAMP 依赖性蛋白激酶
PSs	Presenilins	早老素
RHGP	Random Homozygous Gene Perturbation	随机同源基因干扰技术

rRNA	Ribosome RNA	核糖体 RNA
RNAi	Interference RNA	RNA 干扰技术
SAD	Sporadic Alzheimer's disease	散发性阿尔茨海默氏病
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基磺酸钠
SF	Straight filament	束状细丝
SP	Senile plaques	老年斑
UTR	Untranslation region	非翻译区
TACE	Tumor necrosis factor- α Converting Enzyme	α 肿瘤坏死因子转化酶
TGN	Trans Golgi network	反式高尔基网状结构
wt	Wild type	野生型

第一章 绪论

1.1 阿尔茨海默氏病概述

阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's disease, AD) 又称老年痴呆症, 是一种以进行性智能衰退为特征的中枢神经系统退行性疾病, 由德国神经病理学家 Alois Alzheimer 在 1907 年发现。65 岁以上的人群中有约 10% 的人、85 岁以上的人群中有约 50% 的人患有此病^[1]。AD 主要的临床症状表现为记忆和认知能力的逐渐丧失, 严重者失去生活自理能力。据统计, 全世界患 AD 的病人超过 2000 万, 而随着世界人口的老龄化, 这一数字还会上升。中国已经进入老龄化社会, 目前我国 60 岁以上人口约为 1.2 亿, 占全国总人口的 10% 以上。北京老年病医疗研究中心公布的一项大型调查结果显示, 我国 65 岁以上老年性痴呆患者估计超过 500 万, 约占世界总病例数的四分之一。由于 AD 的发病率逐年升高, 而且发病后对其照料和治疗的巨大费用, 引起了全世界的重视, 世界各国正在积极研究 AD 的病因和治療措施。

临床研究表明 AD 可分为多见的、散发的 AD (Sporadic AD, SAD) 及少数 (约占 15%~20%) 有家族遗传史的家族性 AD (Familial AD, FAD)。早年发病的类型只占 2%~7% 的比例, 通常是由遗传性基因突变所引起^[2]; 常见的散发类型影响 65 岁以上的老年人, 其发病率随年龄的增长而增高。Jorm 等分析了 7 个有关 AD 的流行病学调查后发现在 65 岁以上人群中 AD 发病率每隔 4 年半就要加倍^[3]。女性发病率约为男性的一倍, 可能是由于女性的寿命比男性长, 但女性性别亦可能是一个危险因素^[4,5]。

AD 患者的病理改变主要发生在前脑基底、海马和大脑皮层。神经元纤维缠结 (Neurofibrillary tangles, NFTs) 和细胞外的老年斑 (Senile plaques, SPs) (图 1-1) 是患者脑内的两大主要异常结构。其它病理特征还包括脑皮质普遍萎缩、突触及神经元的丢失、神经细胞内颗粒空泡样变性、双螺旋纤维 (Paired helical filaments, PHFs) 增多、淀粉样物质沉积脑血管 (Amyloid-laden cerebral vessels) 等^[6]。

研究认为 AD 的发生与多种因素有关, 其中与遗传因素关系非常密切^[7]。已被认可的是: 迟发性 AD 由一些易感基因或遗传修饰基因决定其发病风险,

其中以载脂蛋白 E (ApoE) $\epsilon 4$ [8] 等位基因和 $\alpha 2$ 巨球蛋白 (A2M) [9] 为主要的风险基因；早发性、家族性 AD 可由淀粉样前体蛋白 APP 基因和早老素 (Presenilins, PSs) 基因的突变所致 [10,11]。

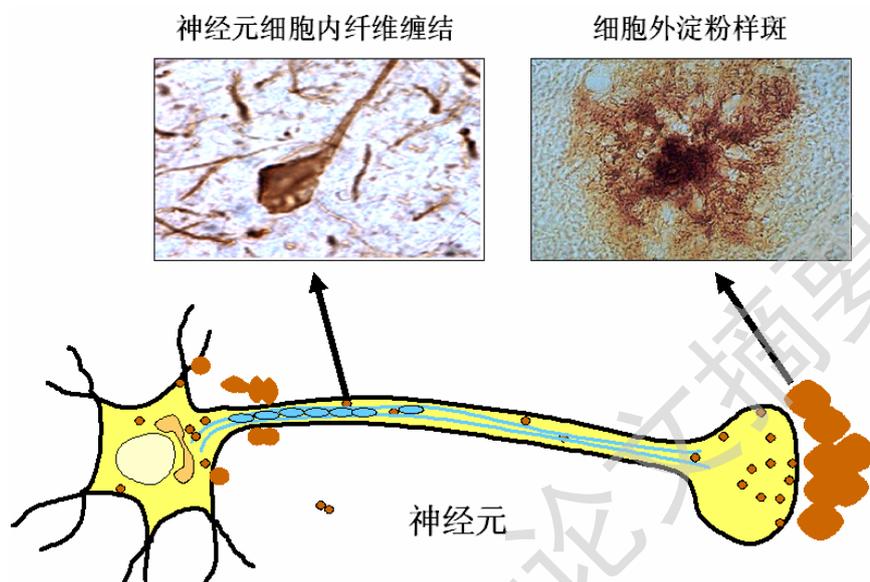


图 1-1. AD 的两个重要病理学特征

Figure 1-1. Pathological hallmarks of AD

引自《分子细胞生物学》，陈晔光等著，2006年9月

1.2 AD 的发病机制

1.2.1 β -淀粉样蛋白级联假说

AD 的发病机制至今仍不清楚。主要有两种假说，即神经元细胞骨架变质假说 (Neuronal cytoskeletal degeneration hypothesis) [12] 和淀粉蛋白级联假说 (Amyloid cascade hypothesis) [13]。前者认为高度磷酸化的 tau 蛋白引起微管蛋白组装的紊乱导致神经元细胞骨架的变质，神经元纤维缠结的形成是 AD 发病的重要事件；后者强调在 β -淀粉蛋白的形成过程中 β -淀粉蛋白前体蛋白 (β -amyloid precursor protein, APP) 的非正常地剪切加工造成的诸多事件引发了神经元的衰退而最终导致 AD。

研究表明， β -淀粉蛋白可以引发活性氧簇的形成，引起 Ca^{2+} 内流，诱导 tau 蛋白的磷酸化进而导致神经元纤维缠结的形成。因此， $\text{A}\beta$ 的形成是 AD 发病过

程中非常关键的事件。

1984年, Glenner 和 Wong 最早纯化出脑中血管周围的淀粉样蛋白沉淀(包括大脑血管的淀粉样病变)中的 $A\beta$, 并进行测序^[14]。1985年, Masters 等人^[15]在 AD 脑的老年斑中纯化出 $A\beta$, 并且发现该种多肽与 Glenner 和 Wong 纯化的是同一种肽。

$A\beta$ 是由它的前体蛋白 APP 经过蛋白酶解加工而成的。 $A\beta$ 的序列被报道后, 许多研究组^[16, 17]几乎同时宣布鉴定了产生该种多肽的基因。该基因编码一种由 365 个氨基酸组成的具有 I 型跨膜结构的蛋白^[16], 定位于第 21 号染色体, 在 FAD 座位的附近^[17]。该基因编码的蛋白被称为 APP。 $A\beta$ 的序列在 APP 的内部, 包括跨膜区。虽然只有一个 APP 基因, 但是很快鉴定出许多长度各异的不同转录本, 提示存在选择性的 mRNA 剪接^[18-20]。三种主要的转录本编码的蛋白分别含有 695、751 和 770 个氨基酸。这些蛋白的功能至今仍不十分清楚。尽管 APP 的两种异构体 APP751 和 APP770 在胞外结构域含有蛋白酶抑制子结构域^[21, 22], 但是神经元细胞主要表达更短的 APP695, 而 APP695 不包含蛋白酶抑制子结构域。APP 基因敲除小鼠只表现出中间型的表现型^[23], 这可能是因为 APP 的两种同源物 APLP1 和 APLP2 提供了功能上富余的信息。三种基因联合敲除导致小鼠在胚胎期死亡, 但是脑部并没有表现出组织学上的异常^[24]。因此, APP 及其同源物在脑中的生理功能还不清楚。

APP 在合成后进行多种翻译后修饰: 酪氨酸硫酸化、N-和 O-糖基化以及磷酸化^[25, 26]。但是与 AD 相关的最重要的翻译后修饰是它的蛋白酶解加工。在 $A\beta$ 的前体 β APP 的代谢过程中, α -分泌酶, β -分泌酶和 γ -分泌酶起着非常重要的作用^[27-30]。APP 是 I 型跨膜蛋白, 分别有两条代谢途径。一方面, APP 的胞外区可以首先被 β -分泌酶在 $A\beta$ 的 1 或 11 位置水解, 所产生的跨膜片段 β CTF 再进一步被 γ -分泌酶在膜双分子层内水解, 从而生成 $A\beta$ 40 或 $A\beta$ 42 (见图 1-2)。另一方面, APP 在其胞外区更靠近膜的位置 ($A\beta$ 的 17 位置) 可以被 α -分泌酶水解生成可溶性分子 sAPP α 和跨膜片段 α CTF。 α CTF 进一步被 γ -分泌酶水解生成 p83 片段。

$A\beta$ 非常容易发生聚集, 并能在体外环境中发生, 在脑薄壁组织的细胞外空间, $A\beta$ 的聚集明显不需要其它的蛋白或者共因子^[31, 32]。在两种主要的 $A\beta$ 形

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库