

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学 号: 30520101152494

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

ST6Gal2 为 BACE1 的水解底物并且能够诱导
细胞凋亡

ST6Gal2 Is a Substrate of BACE1 and Can Induce
Apoptosis

杨佳晔

指导教师姓名: 张云武教授

专业名称: 化学生物学

论文提交日期: 年 月 日

论文答辩时间: 年 月 日

学位授予日期: 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2013 年 月

ST6Gal12 为 BACE1 的水解底物并且能够诱导细胞凋亡

杨佳晔

指导教师

张云武教授

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

A β (β -amyloid, A β) 的沉积是阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 发病过程的中心环节。A β 是由 β 淀粉样蛋白前体蛋白 (β -amyloid precursor protein, APP) 经过 β -分泌酶和 γ -分泌酶顺序切割产生的。 β -位点 APP 剪切酶 1 (β -site APP cleaving enzyme 1, BACE1) 是主要的 β -分泌酶, 也是 A β 形成的限速酶, 与 AD 密切相关。BACE1 的调节和功能还不十分清楚, 但研究表明 BACE1 主要定位于高尔基体及内含体, 且含有众多水解底物, 其生理功能也是通过其水解产物来体现。因此, 对 BACE1 水解底物的寻找一直是 AD 研究的热点之一。

ST6Gal2 (β -galactoside α -2,6-sialyltransferase 2, ST6Gal2) 是 ST6Gal 唾液酸转移酶家族的第二个成员, 同家族的 ST6Gal1 是体内主要的 α -2,6-唾液酸转移酶, 并且已经被证实是 BACE1 的水解底物。然而 ST6Gal2 的功能仍不清楚。在本论文的研究中, 我们通过实验证实 ST6Gal2 是 BACE1 的水解底物, 并且其分泌依赖于 BACE1 的切割。我们还发现, 在细胞中过量表达全长 ST6Gal2 能够激活细胞内质网应激 (ER Stress) 进而引起细胞凋亡。BACE1 可以通过对全长 ST6Gal2 进行水解来缓解由 ST6Gal2 引起的细胞凋亡。在神经元中, 抑制 BACE1 的活性, 同样出现 ST6Gal2 的细胞内堆积和细胞凋亡现象。这些结果共同证明 ST6Gal2 的细胞凋亡作用是受 BACE1 调控的。

总之, 我们的研究不仅发现了 BACE1 的新的水解底物——ST6Gal2, 同时阐明了 ST6Gal2 诱导细胞凋亡的功能及其调控机制。这些发现丰富了 BACE1 的生物学功能研究。

关键词: 细胞凋亡; BACE1; ST6Gal2

Abstract

Accumulation of the insoluble β -amyloid ($A\beta$) peptides in the brain is central to the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). $A\beta$ is derived from sequential cleavages of β -amyloid precursor protein (APP) by β -secretase and γ -secretase. β -site APP cleaving enzyme 1 (BACE1), which is considered to be the major β -secretase, is closely linked to AD. Although the regulation and function of BACE1 are still unclear, plenty evidence shows that BACE1 is mainly localized in Golgi and endosomes. BACE1 has many substrates, and its function is reflected by its cleavage products. Hence, identifying new substrates of BACE1 is one of the hot spots in AD research.

ST6Gal2 (β -galactoside α -2,6-sialyltransferase 2, ST6Gal2) is the second member of the ST6Gal family. The other ST6Gal family member, ST6Gal1, is the major α -2, 6-sialyltransferase in cells and it has been demonstrated to be one substrate of BACE1. However, little is known about the function of ST6Gal2. In our study, we showed that ST6Gal2 is the substrate of BACE1 and that its secretion depends on the cleavage of BACE1. Meanwhile, we also found that overexpression of full-length ST6Gal2 in cells can activate ER Stress and induce cell apoptosis; and BACE1 can rescue cell apoptosis induced by ST6Gal2 through cleaving full-length ST6Gal2. In neurons, when BACE1 activity was blocked, we also observed intracellular accumulation of ST6Gal2 and cell apoptosis. Together, our results demonstrate that ST6Gal2 can induce cell apoptosis and this function can be regulated by BACE1.

Thus, our research has not only identified a new substrate of BACE1, but also found pro-apoptotic function of ST6Gal2 and the underlying regulation by BACE1. These findings enrich our understanding on the physiological function of BACE1.

Key words: Apoptosis; BACE1; ST6Gal2

目 录

第一章 前言	1
1 阿尔茨海默症	1
1.1 概述.....	1
1.2 主要病理特征.....	2
1.3 AD 发病相关因素.....	3
2 Aβ 与 Aβ 级联假说	4
2.1 A β 的产生.....	4
2.2 A β 级联假说.....	6
2.3 A β 的功能和毒性.....	7
3 APP 与三种分泌酶	8
3.1 APP 及其功能.....	8
3.2 α -分泌酶.....	9
3.3 β -分泌酶.....	9
3.4 γ -分泌酶.....	10
4 BACE1 研究进展	11
4.1 BACE1 是主要的 β -分泌酶.....	11
4.2 BACE1 的结构.....	11
4.3 BACE1 的合成、修饰与转运.....	13
4.4 BACE1 的生物学功能.....	15
5 细胞凋亡	16
5.1 线粒体途径.....	16
5.2 死亡受体途径.....	17
5.3 内质网途径.....	17
6 ST6Gal2	17
6.1 唾液酸转移酶.....	17
6.2 ST6Gal1 唾液酸转移酶家族.....	18
7 本论文的研究内容与意义	20
第二章 材料与方法	22
1 材料	22
1.1 细胞株及菌种.....	22
1.2 质粒.....	22
1.3 工具酶和分子量标准.....	22
1.4 抗体.....	22
1.5 试剂.....	23
1.6 其它所需试剂和材料.....	26
2 主要仪器	26
3 实验方法	28
3.1 质粒构建.....	28
3.2 感受态细胞制备.....	29
3.3 质粒提取.....	29

3.4 细胞培养.....	32
3.5 细胞传代.....	32
3.6 原代神经元分离与培养.....	32
3.7 TurboFect 试剂转染法瞬时转染.....	34
3.8 免疫印迹 (Western blot)	34
3.9 分泌蛋白检测.....	36
3.10 免疫荧光.....	36
3.11 细胞膜分离.....	37
3.12 ST6Gal2 肽段的体外切割实验.....	38
3.13 细胞凋亡分析.....	38
第三章 结果与分析.....	39
1 ST6Gal2 是 BACE1 的水解底物	39
2 ST6Gal2 被 BACE1 水解的体外切割实验	41
3 ST6Gal2 的 L46 氨基酸残基影响 BACE1 的水解作用	43
4 ST6Gal2 可以诱导细胞凋亡	44
5 ST6Gal2 通过激活 ER Stress 引起细胞凋亡.....	47
6 BACE1 可以缓解由 ST6Gal2 引起的细胞凋亡.....	49
7 神经元内抑制 BACE1 活性导致 ST6Gal2 细胞内堆积.....	52
第四章 讨论与展望.....	54
参考文献.....	57
致 谢.....	66

Table of Contents

Chapter 1. Introduction	1
1 Alzheimer's Disease	1
1.1 Overview	1
1.2 Major Pathologic Features of AD	2
1.3 Factors Related to AD Pathology.....	3
2 Aβ and Aβ Cascade Hypothesis	4
2.1 Production of A β	4
2.2 A β Cascade Hypothesis.....	6
2.3 A β Function and Toxicity.....	7
3 APP and Secretases	8
3.1 APP and Its Function.....	8
3.2 α -secretase	9
3.3 β -secretase	9
3.4 γ -secretases	10
4 BACE1	11
4.1 BACE1 Is the Major β -secretases	11
4.2 Structure of BACE1	11
4.3 Production, Modification and Trafficking of BACE1	13
4.4 Biological Function of BACE1	15
5 Apoptosis	16
5.1 The Mitochondria Pathway.....	16
5.2 The Death Receptor Pathway.....	17
5.3 The ER Pathway.....	17
6 ST6Gal2	17
6.1 Sialyltransferase	17
6.2 ST6Gal Family	18
7 Purposes and Contents of This Thesis	20
Chapter 2. Materials and Methods	22
1 Materials	22
1.1 Cell Lines and Bacteria	22
1.2 Plasmids	22
1.3 Enzymes and Markers	22
1.4 Antibodies	22
1.5 Reagents	23
1.6 Other Reagents and Materials	26
2 Equipments	26
3 Methods	28
3.1 Construction of Plasmids	28
3.2 Preparation of Competent Cells	29
3.3 Plasmid Extraction	29

3.4 Cell Culture	32
3.5 Cell Subculture	32
3.6 Isolation and Culture of Mouse Primary Neurons	32
3.7 Transient Transfection.....	34
3.8 Western Blot	34
3.9 Detection of Proteins in Media	36
3.10 Immunofluorescence	36
3.11 Membrane Fractionation	37
3.12 <i>In vitro</i> Cleavage of ST6Gal2 Peptide	38
3.13 TUNEL.....	38
Chapter 3. Results and Analysis	39
1 ST6Gal2 Is a Substrate of BACE1	39
2 ST6Gal2 Peptide Can be Cleaved by BACE1 <i>in vitro</i>.....	41
3 Leu46 Residue of ST6Gal2 Is Impotrant for the Cleavage of BACE1.....	43
4 ST6Gal2 Can Induce Cell Apoptosis	44
5 Overexpression of ST6Gal2 Induces ER Stress.....	47
6 BACE1 Attenuates the ER Stress Induced by ST6Gal2	49
7 Inhibition of BACE1 Activity Leads to Intracellular ST6Gal2 Accumulation in Neurons	52
Chapter 4. Discussion and Prospect.....	54
Reference.....	57
Acknowledgment.....	66

英文缩略词

英文缩写	英文全名	中文名称
AD	Alzheimer's Disease	阿尔茨海默症
A β	β -Amyloid	β -淀粉样蛋白
APP	β -Amyloid Precursor Protein	β -淀粉样前体蛋白
ACDL	Acidic Cluster Dipeptide	酸性成簇双亮氨酸
ADAM	A Disintegrin and Metallo proteinase	分离整合素金属蛋白酶
AICD	APP Intracellular Domain	APP 胞内区域
ApoE	Apolipoprotein E	载脂蛋白 E
APLPs	Amyloid Precursor-like Proteins	淀粉样前体类似蛋白
BACE1	β -site APP Cleaving Enzyme 1	β -位 APP 剪切酶 1
cDNA	Complementary DNA	互补脱氧核糖核酸
CTFs	C-terminal Fragments	C-端片段
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Dulbecco 改良 Eagle 培养基
ER	Endoplasmic Reticulum	内质网
ER Stress	Endoplasmic Reticulum Stress	内质网应激
FAD	Familial AD	家族性 AD
LRP-1	Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein-1	低密度脂蛋白受体相关蛋白-1
MAP	Microtubule-associated Protein	微管相关蛋白
NFT	Neurofibrillar Tangles	神经元纤维缠结
NMDA	N-Methyl-D-Aspartate	N-甲基-D-天冬氨酸
NRG-1	Neuregulin-1	神经调节蛋白-1

P3	3 kDa Peptide	3kDa 多肽
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
PS	Presenilin	早老素
PHF	Paired-helical Filament	配对螺旋纤维
PEN-2	Presenilin Enhancer 2	早老素增强蛋白 2
SAD	Sporadic AD	散发性 AD
sAPP	Soluble APP N-terminus	可溶性 APP N 端
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis	SDS-凝胶电泳
ST6Gal1	β -galactoside α -2,6 sialyltransferase 1	β -半乳糖苷 α -2,6- 唾液酸转移酶 1
ST6Gal2	β -galactoside α -2,6 sialyltransferase 2	β -半乳糖苷 α -2,6- 唾液酸转移酶 2
TCA	Trichloroacetic Acid	三氯乙酸
TGN	Trans-Golgi Network	反式高尔基网状膜 囊
VGSC β	Voltage-gated Sodium Channel β subunits	电压门控钠离子通 道 β 亚基

第一章 前言

1 阿尔茨海默症

1.1 概述

阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD), 旧称老年痴呆症, 2012 年中国有关专业机构已申请对“老年痴呆”进行更名, 更名为阿尔兹海默症。AD 是发生在老年期及老年前期的一种进行性的神经退行性疾病, 临床表现为认知功能障碍、记忆力不断恶化、人格和行为改变、语言障碍以及日常生活能力进行性衰退等^[1]。其主要特征性病理变化为大脑皮层萎缩, 并伴有 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid, A β) 沉积, 神经纤维缠结 (Neurofibrillary tangles, NFTs), 记忆性神经元数目减少, 以及老年斑 (Senile plaque, SP) 的形成。目前对于阿尔兹海默症尚无明显有效的治疗方法或治疗药物。

1907 年, 德国医生 Alois Alzheimer 第一次对一个死于痴呆症的 55 岁的女性病人进行了临床特征描述, 通过医学解剖发现在病人大脑组织中存在大量明显的淀粉样沉积斑和神经纤维缠结^[2], 这两种病理学特征至今仍作为 AD 的主要病理学特征。为纪念与表彰 Alzheimer 医生在 AD 研究中的重要贡献, 将 Alzheimer 描述的这种疾病命名为 Alzheimer's disease。

AD 是一种与年龄密切相关的疾病, 发病过程迟缓且不可逆, 患者的日常生活能力下降, 最终导致死亡。阿尔兹海默症病人的平均生存期为 5.5 年, 已成为继心血管疾病、脑血管疾病和癌症之后, 威胁老人健康的“第四大杀手”。据统计, 在 65 岁的人群中大约有 10% 患有此病, 而在 85 岁以上的人群中, 其发病率更是高达 50%^[3]。中国阿尔兹海默症协会 2011 年公布的调查结果显示, 在我国, 65 岁以上的老人患病率达到 6.6%。保守估计全国患有阿尔兹海默症的病人人数高达 800 万。随着人们对 AD 的关注度逐渐提高, 国家在 AD 发病机理及药物研发等发面加大了支持力度, 但由于 AD 本身的复杂性, 近年来并没有取得实质性的科研进展, AD 的早期诊断和临床治疗仍然是亟待攻克的一大难题, 需要更深入的研究。

1.2 主要病理特征

1907年，德国 Alois Alzheimer 医生第一次对 AD 病理特征进行了描述，通过解剖他发现在患者脑中存在神经元丢失、神经元内神经元纤维缠结（Neurofibrillar Tangles, NFT）以及神经元外淀粉样斑（Amyloid Plaques）（图 1.1）。时至今日，神经元纤维缠结和神经元外淀粉样斑仍被描述为 AD 的两个主要病理特征，同时也是临床诊断阿尔茨海默症的病理学依据^[4,5]。

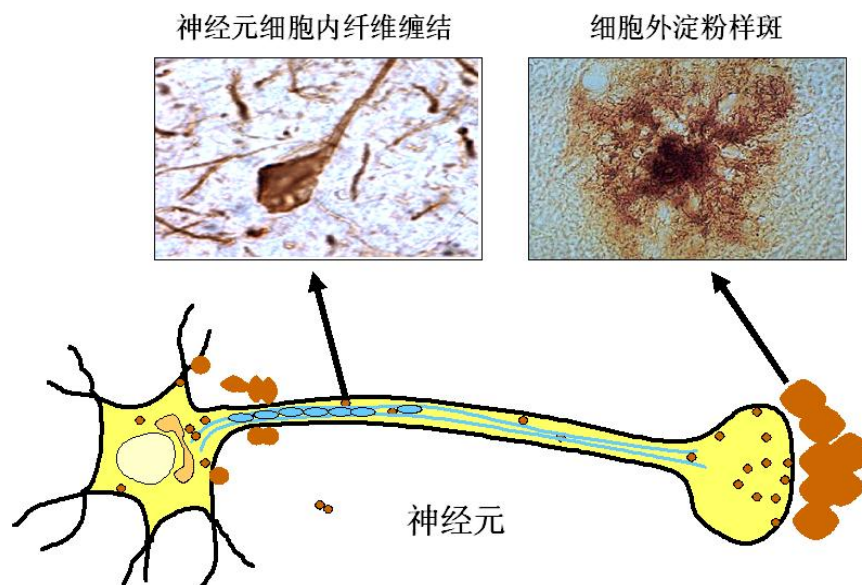


图 1.1 AD 的两个重要病理学特征

Fig.1.1 Two major pathologic characteristics of AD

注：引自陈晔光等，《分子细胞生物学》，2006年9月

神经纤维缠结（Neurofibrillar Tangles, NFTs）是 AD 的主要病理特征，存在于神经元内，它的出现直接导致神经元功能障碍。NFTs 的基本单位是双股螺旋纤维（Paired-helical filament, PHF），即成对的相互缠绕成螺旋的细丝，它主要是由磷酸化的 Tau 蛋白组成的^[6]。Tau 蛋白是一种可溶、亲水性强、非折叠的微管相关蛋白（Microtubule-associated protein, MAP），大小约 55kDa，亚细胞定位于细胞质，在神经元轴突中大量表达^[7]。过度磷酸化的 Tau 蛋白在神经元内的异常聚集是出现 NFTs 的直接原因，并且，这种异常磷酸化 Tau 蛋白的聚集程度与 AD 患者的临床痴呆程度呈正相关^[8]。

Tau 蛋白是神经元中主要的微管相关蛋白，其生理功能是催化微管装配、增加微管的稳定性和细胞骨架的整体性^[9]。Tau 的过度磷酸化使其与微管蛋白的结

合只有正常 Tau 蛋白的 10%，这一现象降低了 Tau 蛋白对微管的稳定作用，使得 Tau 更容易聚集，形成 PHF 和 NFTs。过度磷酸化的 Tau 蛋白不仅与正常微管相关蛋白互相竞争，影响微管形成，而且 Tau 蛋白能促进正常微管相关蛋白与微管的分离，使微管解聚，导致神经元轴突变性，影响神经递质的合成、运输和释放，造成神经细胞间的物质运输障碍，导致神经退行性病变^[10, 11]。Tau 蛋白功能异常改变是神经元功能障碍和死亡的必经环节。

AD 的另一个主要病理学特征是在大脑皮层和海马区出现大量淀粉样老年斑 (Senile plaques, SP)，SP 的主要成分是由淀粉样前体蛋白 (Amyloid precursor protein, APP) 水解生成的 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid, A β) 组成^[12]。A β 一般由 39-43 个氨基酸残基构成，大小约为 4kDa。由于其基本结构中含 β 片层结构，因此 A β 很容易聚集成不溶性纤维，形成极难溶的沉淀，聚集形成不溶性淀粉样斑^[13]。A β 的氨基酸序列在生物物理学方面呈现微观不均一性。研究发现，在细胞中 A β 1-42 占 A β 总数的 5% 左右，A β 1-40 占 95%^[14]，A β 1-42 更倾向于以聚集形式出现，因此 A β 1-42 被认为是构成老年斑的基本成分。

1.3 AD 发病相关因素

AD 一种与年龄相关的神经退行性疾病，临床表现为记忆力衰退，持续性认知能力下降以及运动障碍等。AD 的发病机制非常复杂，经过一个多世纪的研究，至今仍未全面明确病因。目前，公认的与 AD 发病相关的因素包括：遗传因素、环境因素和衰老老化因素等。

AD 具有家族遗传性，据此，可将 AD 分为散发性 AD (Sporadic AD, SAD) 和家族性 AD (Familial AD, FAD) 两大类。SAD 发病较晚，一般在 65 岁之后，SAD 约占所有 AD 病人的 90%-95%，而 FAD 则发病较早，常在 30 或 40 岁左右发病，FAD 约占所有 AD 病人的 5%-10%。遗传因素与 SAD 和 FAD 的发生均有密切关系。目前，至少发现 4 种基因与 AD 相关，这些基因的突变或基因多型性都可能导致 AD，这些基因有：淀粉样蛋白前体 (APP) 基因、早老素 1 基因 (PS-1)、早老素 2 基因 (PS-2) 和载脂蛋白 (ApoE) 基因^[15]。目前已经确定在 APP、PS1 和 PS2 基因的突变与 FAD 相关^[16]，而 ApoE 的等位基因 ϵ 4 (ApoE4) 则与晚发性 AD 密切相关^[17]。研究发现，这四个基因的突变都对 A β 的产生和沉积有一定的影响：APP、PS1 和 PS2 基因的突变会导致 A β 含量的增加^[18]，而 ApoE4 基因

突变又会导致 $A\beta$ 沉积率的增加^[17]。若能应用基因治疗, 修补缺陷或突变的基因, 可以降低 $A\beta$ 的产生, 减少脑组织中淀粉样斑的数量, 最终可以治疗 AD。

与AD发病相关的环境因素, 主要指金属离子对AD的影响。很多研究表明, 铜、锌、铁、钙等离子在AD病人中均出现不同程度的失衡。例如, 在AD患者脑中的淀粉样斑中能检测到高浓度的铜离子及其他金属离子, 金属离子很可能参与 $A\beta$ 的沉积和淀粉样斑的形成^[19]。AD病人的死亡也是由于脑组织中钙含量的急剧增加, 大量的钙离子流入神经元而导致神经元死亡^[20]。目前, 对金属离子与AD关系的研究仍处于初级阶段, 可以肯定的是, 金属离子失衡与AD的发病存在一定的联系。

AD是一种年龄相关的疾病, 随着年龄的增加, 身体各个器官都会发生不同程度的老化, 一些有害的因子, 如 $A\beta$ 、铁离子以及自由基等也逐步堆积, 同时, 机体代谢减慢, 使得体内对这些有害物质的代谢和清除能力减弱, 这些有害物质综合作用, 逐渐出现AD的症状, 这也是SAD多发于65岁以后的老年群体的原因。然而, 很多老年人至死都未出现AD的症状, 这与目前众多的研究结果一致, 即老化、遗传和环境等因素需要交互作用才能引发AD。

2 $A\beta$ 与 $A\beta$ 级联假说

2.1 $A\beta$ 的产生

AD 的主要病理特征是在大脑皮层和海马区出现大量淀粉样老年斑, 这些老年斑是由淀粉样前体蛋白 APP 经蛋白酶水解生成的 β -淀粉样蛋白 $A\beta$ 沉积而成。APP 基因位于人基因组第 21 号染色体, 有 19 个外显子, 转录后经过剪切拼接形成多种不同长度的转录子, 在人体中主要有三种转录子, 编码的蛋白分别为: APP695, APP751 和 APP770 (氨基酸长度分别为 695, 751 和 770) ^[21, 22]。在神经元中, APP 主要以 APP695 的形式存在^[23]。APP 在内质网合成, 经高尔基体加工修饰后, 转移至高尔基体 TGN 处。 $A\beta$ 由 39-43 个氨基酸残基构成, 大小约为 4kDa, 主要产生于内质网或高尔基体/TGN^[24], 另有研究发现, $A\beta$ 也可在内含体和溶酶体中产生^[25, 26]。

APP 蛋白为 I 型跨膜蛋白, 在 N-端具有一个大的胞外结构域, 在 C-端有一个短的胞内区。APP 的水解有两种途径, 即不产生 $A\beta$ 的非淀粉源途径

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.

廈門大學博碩士論文摘要庫