

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 95196569.7

C12N 15/54
A61K 39/395 C12N 9/12
A61K 38/46 C07C229/08
A61K 38/16 C07K 4/12
C12Q 1/42 C07K 16/40
C12Q 1/48

[43]公开日 1997 年 12 月 24 日

[11] 公开号 CN 1168699A

[22]申请日 95.10.30

[30]优先权

[32]94.10.28[33]EP[31]94117122.5

[86]国际申请 PCT/EP95/04258 95.10.30

[87]国际公布 WO96/13592 英 96.5.9

[85]进入国家阶段日期 97.6.2

[71]申请人 马普科技促进协会

地址 联邦德国柏林

[72]发明人 E·曼德尔考 E-M·曼德尔考

J·比尔纳特 G·德鲁斯

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标
事务所
代理人 张 闽

权利要求书 4 页 说明书 40 页 附图页数 17 页

[54]发明名称 新型蛋白激酶NPK-110

[57]摘要

本发明涉及一种编码一种神经元蛋白激酶(NPK)的DNA序列,这种酶能够在与微管结合的关键部位对tau蛋白和其它微管相关蛋白(MAPs)进行磷酸化。本发明还涉及丝氨酸或苏氨酸残基和所述MAPs上包括被NPK磷酸化的所述残基的表位,涉及与所述蛋白激酶特异地结合的抗体,包括所述蛋白激酶抑制剂的、特别是用于治疗老年性痴呆和癌症的药用组合物,涉及诊断试剂盒和用于检测老年性痴呆和癌症的体外诊断方法。

权 利 要 求 书

1. 一种 DNA 序列，它编码一种能够将 tau、MAP4、MAP2 和 MAP2c 里的 KXGS 基序磷酸化的神经元蛋白激酶（NPK）或其功能性片段，其特征在于具有以下特点：

- (a) 它能编码表 6 中的 MARK - 1 所示的氨基酸序列；
- (b) 它能编码表 6 中的 MARK - 2 所示的氨基酸序列；或
- (c) 它能与 (a) 或 (b) 的 DNA 杂交。

2. 如权利要求 1 的 DNA 序列，其中所述 NPK 的特征还在于具有如下特点：

- (a) 通过 SDS - PAGE 测得其表观分子量为 110KD；
- (b) 它能将人 tau 蛋白的丝氨酸残基 262、293、305、324 和 356 磷酸化；和
- (c) 它包括以下氨基酸序列：

KLDTFCGSPPYAAPELFQ GK
DRWMNVGHEEEELKPYAEP
(K) SSRQNI PCRNNI

3. 如权利要求 1 或 2 的 DNA 序列，其中，所述 NPK 的特征还在于具有如下特点：

- (d) 它能被磷酸酶 PP - 2A 失活；和
- (e) 它能将与 tau 有关的微管相关蛋白（MAPs）MAP2、MAP2c 和 MAP4 的下列丝氨酸或苏氨酸残基磷酸化：

MAP2/MAP2c： S37、S1536、S1676、S1707、S1792、S1796、S1799

MAP4： T829、T873、T874、T876、S899、S903、S928、S941、S1073

- (f) 它能导致 tau、MAP4、MAP2 和 MAP2c 与微管解离。

4. 如权利要求 1 - 3 中任一项的 DNA 序列，其中所述 NPK 可通过以下步骤从脑组织中获得：

- (a) 对脑提取物进行匀浆，随后进行离心处理；

(b)在磷酸纤维素上对在步骤 (a)中所获得的上清液进行层析, 其中, NPK 活性级分由 200~400mM NaCl 洗脱;

(c)用硫酸铵来沉淀在步骤 (b)所获得的活性级分, 并对沉淀进行透析;

(d)在 Q - Sepharose (Pharmacia)上对步骤 (c)中获得的透析液进行阴离子交换层析, 并洗脱 NPK 活性级分, 其中, 所述 NPK 活性级分以单峰形式由大约 0.2M NaCl 洗脱, 随后对活性级分进行透析;

(e)在 Mono S HR 10/10 (Pharmacia)上进行阳离子交换层析;

(f)在 Mono Q HR 5/5 上进行层析, 其中, NPK 活性级分由大约 250mM NaCl 洗脱;

(g)在 Superdex G - 200 上进行凝胶过滤层析, 其中, NPK 活性洗脱物的表观分子量为 100kD; 和

(h)在 ATP - 纤维素上进行亲和层析, 其中, 被洗脱的 NPK 活性级分的表观分子量经 SDS - PAGE 测定为大约 110kD;

其中, NPK 活性是这样测定的: 在存在放射性标记的 ATP 的条件下, 温育一种包括人成熟 tau 的 255~267 氨基酸残基的肽, 并测定掺入该肽中的放射性活性。

5. 如权利要求 1 - 4 中任一项所述的 DNA 序列, 其特征在于所述 NPK 是获自哺乳动物脑的 NPK。

6. 如权利要求 5 的 DNA, 其中所述哺乳动物脑是人或猪脑。

7. 一种由权利要求 1 - 6 中任一项的 DNA 序列编码的多肽或其功能片段。

8. 一种被权利要求 7 的多肽磷酸化的丝氨酸或苏氨酸残基, 所述丝氨酸或苏氨酸残基位于与 tau 相关的微管相关蛋白 (MAPs) MAP2、MAP2c 和 MAP4 的下列氨基酸位置:

MAP2/MAP2c: S37、S1536、S1676、S1707、S1792、S1796、S1799

MAP4: T829、T873、T874、T876、S899、S903、S928、S941、S1073

9. 一种包括权利要求 8 的丝氨酸或苏氨酸残基的表位。
10. 一种特异性结合权利要求 7 的多肽或其片段的抗体。
11. 一种特异性结合权利要求 9 的表位的抗体。
12. 如权利要求 10 或 11 的抗体，它是一种单克隆抗体或其衍生物或片段。
13. 如权利要求 10 或 11 的抗体，它是一种多克隆抗体或其衍生物或片段。
14. 一种药用组合物，它含有权利要求 7 的多肽或其片段的特异抑制剂，有选择地与一种可以药用的载体和/或稀释剂组合。
15. 如权利要求 14 的药用组合物用于治疗老年性痴呆。
16. 如权利要求 14 的药用组合物用于治疗癌症。
17. 如权利要求 11 - 13 中任一项的药用组合物，其中所述抑制剂是权利要求 10 - 13 中任一项的抗体；一种能将权利要求 7 的多肽或其片段脱磷酸化的磷酸酶，最好是磷酸酶 PP - 2A；一种权利要求 7 的多肽的活化激酶的抑制剂；一种包括 Ser 262 残基的由 tau 衍生的肽，或包括至少一个在权利要求 8 中提及的丝氨酸或苏氨酸残基的由 MAP4 或 MAP2/MAP2c 衍生的肽。
18. 一种诊断组合物，包括：
 - (a) 如权利要求 7 的多肽；
 - (b) 如权利要求 10 - 13 中任一项的抗体；和/或
 - (c) 一种包括权利要求 2 (e) 的丝氨酸残基的肽。
19. 一种用于体外诊断和/或监测老年性痴呆的方法，包括：分析患者的脑脊髓液提取物或对神经组织（例如，嗅上皮）进行活检，并检测所述组织中权利要求 7 的多肽或其片段的的存在。
20. 一种用于体外诊断和/或监测老年性痴呆的方法，包括：分析患者的脑脊髓液提取物或对神经组织进行活检，并检测所述组织中权利要求 7 的多肽或其片段的非生理量或活性的存在。
21. 如权利要求 19 或 20 的方法，其中所述 NPK 是用权利要求 10、12 或 13 中任一项的抗体进行检测的。
22. 一种用于体外诊断癌症或癌症发作的方法，包括：分析合适的

组织或体液，看其是否在如下位置上有与 tau 相关的微管相关蛋白（MAPs）MAP2、MAP2c 和 MAP4 的磷酸化丝氨酸或苏氨酸残基：

MAP2/MAP2c：S37、S1536、S1676、S1707、S1792、S1796、S1799

MAP4：T829、T873、T874、T876、S899、S903、S928、S941、S1073

或者检测其中权利要求 7 的多肽或其片段的非生理量或所述多肽或片段的特异磷酸酶的存在。

23. 一种通过用权利要求 7 的多肽或片段处理的方式在体外将正常 MAP2、MAP2c 或 MAP4 转化成在以下位置上磷酸化的蛋白的方法：

MAP2/MAP2c：S37、S1536、S1676、S1707、S1792、S1796、S1799

MAP4：T829、T873、T874、T876、S899、S903、S928、S941、S1073

所述磷酸化状态是癌症或癌症发作的指征。

24. 将权利要求 8 的 MAP 的磷酸化丝氨酸或苏氨酸残基或者权利要求 9 的包括所述残基的表位用于产生能指示癌症或癌症发作的特异性抗体的用途。

25. 一种互补于权利要求 1 - 6 中任一项的 DNA 序列的 RNA 序列。

新型蛋白激酶 NPK - 110

本发明涉及一种编码一种新型神经元蛋白激酶 (NPK) 的 DNA 序列, 这种酶能够在与微管结合的关键部位对 tau 蛋白和其它微管相关蛋白 (MAPs) 进行磷酸化。本发明还涉及丝氨酸或苏氨酸残基, 和所述 MAPs 上包括被 NPK 磷酸化的所述残基的表位, 涉及与所述蛋白激酶特异结合的抗体, 包括所述蛋白激酶抑制剂的、特别适于治疗老年性痴呆和癌症的药用组合物, 涉及诊断试剂盒和用于检测老年性痴呆和癌症的体外诊断方法。

微管相关蛋白 (MAPs) 能调节微管网络的广泛动力学和重排, 微管网络被认为能启动轴突生长 (见最近 Hirokawa 所做的综述, 1994)。有几条线索表明, MAPs 的磷酸化状态由蛋白激酶和磷酸酶以迄今未知的方式平衡, 它在所述反应的调节中起着重要作用。Tau 蛋白是哺乳动物脑中一类 MAPs (Cleveland 等, 1977), 在体内可在几个位点上被磷酸化 (Butler & Shelanski 1986; Watanabe 等, 1993), 而且, 在体外是很多种蛋白激酶的底物 (见 Lee 的综述, 1993; Goedert, 1993; Mandelkow 和 Mandelkow, 1993; Anderton, 1993)。在老年性痴呆的神经元降解过程中, tau 蛋白聚集成成对的螺旋丝 (PHFs), 这种螺旋丝是这种典型神经原纤维损害的主要纤维成分 (见 Lee 和 Trojanowski 的综述, 1992)。从所述聚集体中分离的 Tau 表现出一些生化变化, 其中最明显的变化是过磷酸化 (Grundke-Iqbal 等, 1986; Brion 等, 1991; Ksiezak-Reding 等, 1992; Goedert 等, 1992)。所报道的大部分异常磷酸化位点是 Ser/Thr-Pro 序列 (Lee 等, 1991; Biernat 等, 1992; Lichtenberg-Kraag 等, 1992; Gustke 等, 1992; Watanabe 等, 1993), 表明有一个针对脯氨酸的激酶调节异常 (Drewes 等, 1992; Mandelkow 等, 1992; Hanger 等, 1992; Vulliamt 等, 1992; Baumann 等, 1993; Paudel 等, 1993;

Kobayashi 等, 1993) 或相应的磷酸酶调节异常 (Drewes 等, 1993; Gong 等, 1994)。已由几个实验室 (Kondo 等, 1988; Lee 等, 1991; Mercken 等, 1992; Greenberg 等, 1992) 制备出能区分“正常的”tau 和过磷酸化的、“病理学的”形式的 tau 的磷酸化依赖型抗体。所有这类抗体都被证实是针对 Ser/Thr-Pro 类型表位的 (Lee 等, 1991; Biernat 等, 1992; Lichtenberg-Kraag 等, 1992; Lang 等, 1992; Watanabe, 1993)。

tau 的微管结合片段 (图 1) 包括 3 或 4 个有 31 个残基的假重复, 各自取决于同种型 (Lee 等, 1989; Goedert 等, 1989; Himmler 等, 1989)。该片段可能是成对螺旋丝的构件 (Kondo 等, 1988; Wischik 等, 1988; Ksiezak-Reding 和 Yen, 1991; Wille 等, 1992)。它不含有 14 - 16 个 Ser/Thr-Pro 基序中的任一个, 这些基序集中在所述重复的侧翼区域。不过, 它在第一个重复的序列 KIGS 中含有一个保守的丝氨酸残基 (Ser 262), 它被证实是脑组织提取物的主要磷酸化位点之一 (Gustke 等, 1992)。还发现 Alzheimer PHF-tau 上的该位点被磷酸化, 但在“正常”tau 或胎 tau 上的该位点未被磷酸化 (Hasegawa 等, 1992)。它是迄今所发现的在 tau 的重复域里的唯一病理性磷酸化位点。

最近, 用一种定点诱变方法证实, 在该位点所发生的 tau 磷酸化能显著降低其微管结合能力, 而在 Ser/Thr-Pro 基序上的磷酸化仅有很小的作用 (Biernat 等, 1993)。它引发了在具有在 Ser 262 上磷酸化 tau 的能力的神经元组织中寻找蛋白激酶的努力。本发明要解决的技术问题是提供一种蛋白激酶, 这种酶通过将人 tau 蛋白上关键的丝氨酸 262 残基磷酸化而导致老年性痴呆的发病, 还要提供一种相应的核苷酸序列。

通过提出在权利要求书中所限定的实施方案使上述技术问题得以解决。

因此, 本发明涉及一种 DNA 序列, 它编码一种能够将 tau、MAP4、MAP2 和 MAP2c 中的 KXGS 型基序磷酸化的神经元蛋白激酶 (NPK) 或其功能片段, 其特征在于:

(a) 它能编码表 6 中 MARK - 1 所示的氨基酸序列;

- (b) 它能编码表 6 中 MARK - 2 所示的氨基酸序列; 或
- (c) 它能与 (a) 或 (b) 的 DNA 杂交。

“ DNA 序列”一词包括任何 DNA 序列, 如基因组或 cDNA, 半合成 DNA 或合成 DNA。

我们惊奇地发现, 现有激酶中无一能够将 tau 重复域中的 4 个 KXGS 基序磷酸化到足以解释与所述磷酸化相关的生物学和病理学效应的程度。对于丝氨酸残基 262 来说尤为如此, 该残基是老年性痴呆发病的指示物。因此, 本发明提供了一种能编码一种具有上述特征的新型蛋白激酶的 DNA 序列, 这种蛋白激酶负责对老年性痴呆发病关键的氨基酸残基进行磷酸化。在本申请中, 所述蛋白激酶也被称作 NPK、 MARK - 1 或 MARK - 2。该申请中所涉及到的氨基酸残基的编号由 htau 40 序列而来, htau 40 是最长的人 tau 同种型 (441 个残基, Goedert 等, 1989)。

在一个优选实施方案中, 本发明还涉及一种 DNA 序列, 其中, 所述神经元蛋白激酶 (NPK) 的特征是:

- (a) 经 SDS - PAGE 测定其表观分子量为 110kD;
- (b) 它能将人 tau 蛋白的丝氨酸残基 262、 293、 305、 324 和 356 磷酸化; 和
- (c) 它包括以下氨基酸序列

KLDTFCGSPPYAAPELFQ GK
DRWMNVGHEEEELKPYAEP
(K) SSRQNIPRCRNNI

在本发明 DNA 序列的一种优选实施方案中, 所述 NPK 还具有以下特征:

- (d) 它被磷酸酶 PP - 2A 去活; 和
- (e) 它能将与 tau 有关的微管相关蛋白 (MAPs) MAP2、 MAP2c 和 MAP4 的下列丝氨酸或苏氨酸残基磷酸化:

MAP2/MAP2c: S37、 S1536、 S1676、 S1707、 S1792、 S1796、 S1799

MAP4: T829、 T873、 T874、 T876、 S899、 S903、 S928、

S941、S1073

(f) 它能导致 tau、MAP4、MAP2 和 MAP2c 与微管分离。

本发明的另一项惊人发现是：NPK 是通过对微管相关蛋白而非 tau 蛋白的磷酸化而导致这些蛋白与微管的分离。这种分离反过来引起所述微管的脱稳定作用，微管的一种增强的动力学不稳定性，并对细胞增殖、细胞分化或细胞退化产生影响。因此，本发明的 NPK 具有通过对 tau 或其它 MAPs 的磷酸化在大脑中调节微管的动力学和重排的能力。上述发现对于本发明的激酶在癌症发生中的作用有着重要的暗示意义。

这是因为，癌症基本上被认为是不受控制的细胞增殖。因此，许多抗癌药物是通过毒杀微管来干扰细胞分裂和增殖。另一方面，“癌基因”通常是其细胞调节受到损害的激酶。与本发明 NPK 相当或同源的激酶的脱调节化，可能会对各种类型细胞的微管的稳定性产生重要影响。由于微管在细胞分裂中起着重要作用，所述 NPK 的脱调节化会导致不受控制的细胞分裂并将正常细胞转化成癌细胞。另外，所述 NPK 的去调节化能够产生有丝分裂后的最终分化细胞，如神经元（它不发生分裂），刺激其分裂。这种“不正常的”刺激会导致所述神经元直接进入细胞程序死亡（并因此出现类老年性痴呆症状），因为由于其分化状态，它们不能够分裂。

在本发明 DNA 序列的另一种实施方案中，所述 NPK 可通过以下步骤从脑组织中获得：

(a) 对脑提取物进行匀浆，随后进行离心处理；

(b) 在磷酸纤维素上对在步骤 (a) 中所获得的上清液进行层析，其中，NPK 活性级分由 200~400mM NaCl 洗脱；

(c) 用硫酸铵来沉淀在步骤 (b) 所获得的活性级分，并对沉淀进行透析；

(d) 在 Q - Sepharose (Pharmacia) 上对步骤 (c) 中获得的透析液进行阴离子交换层析，并洗脱 NPK 活性级分，其中，所述 NPK 活性级分以单峰形式由大约 0.2M NaCl 洗脱，随后对活性级分进行透析；

(e) 在 Mono S HR 10/10 (Pharmacia) 上进行阳离子交换层析；

(f) 在 Mono Q HR 5/5 上进行层析, 其中, NPK 活性级分由大约 250mM NaCl 洗脱;

(g) 在 Superdex G - 200 上进行凝胶过滤层析, 其中, NPK 活性洗脱物的表观分子量为 100kD; 和

(h) 在 ATP - 纤维素上进行亲和层析, 其中, 被洗脱的 NPK 活性级分的表观分子量经 SDS - PAGE 测定为大约 110kD;

其中, NPK 活性是这样测定的: 在存在放射性标记的 ATP 的条件下, 温育一种包括人成熟 tau 的 255~267 氨基酸残基的肽, 并测定掺入该肽中的放射性活性。

在例 1 中提供了如何分离在一个实施方案中表观分子量为 110kD 的本发明的 NPK (NPK - 110) 的进一步细节。不过, 本领域技术人员从上面的教导中将会知道如何补充所述细节。

本发明的 NPK 可来自任何脊椎动物脑。在一种优选实施方案中, NPK 来自一种哺乳动物脑。

本发明还涉及一种互补于本发明 DNA 序列的 RNA 序列。

在一种特别优选的实施方案中, 所述哺乳动物脑是人脑或猪脑。

本发明还涉及一种由所述 DNA 序列编码的多肽或其功能片段或衍生物。所述多肽、片段或衍生物可进行翻译后修饰或化学修饰。在本说明书中, 术语 NPK 或 MARK (1 或 2) 也可以包括这些片段或衍生物, 即使没有特别说明。

本发明还涉及由 tau 相关的微管相关蛋白 (MAPs) MAP2、MAP2c 和 MAP4 的 NPK - 110 磷酸化的以下丝氨酸或苏氨酸残基:

MAP2/MAP2C: S37、S1536、S1676、S1707、S1792、S1796、S1799

MAP4: T829、T873、T874、T876、S899、S903、S928、S941、S1073

本发明还涉及包括所述磷酸化丝氨酸或苏氨酸残基的表位。

本发明还涉及与本发明的 NPK 特异性结合的抗体。

所述抗体可以是一种血清衍生的抗体或一种单克隆抗体。针对一种需要的表位的单克隆抗体和多克隆抗体的生产方法在本领域中是众所周

知的（例如，参见 Harlow 和 Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1988）。另外，所述抗体可以是一种天然抗体，或一种由遗传工程技术产生的抗体，如用本领域熟知的技术生产的嵌合抗体。此外，这里所说的抗体一词还指一种抗体的一个片段，该片段保留了其结合特异表位的能力，所述片段如一个 Fab、F(ab)₂ 或 Fv 片段。

另外，本发明涉及一种能特异结合包括 MAP2，MAP2C 和 MAP4 的以下磷酸化丝氨酸或苏氨酸残基的表位的抗体：

MAP2/MAP2C：S37、S1536、S1676、S1707、S1792、S1796、S1799

MAP4：T829、T873、T874、T876、S899、S903、S928、S941、S1073

同样，所述抗体可以是一种多克隆抗体或一种单克隆抗体，或其保留了其结合特异性的片段。

在一个优选实施方案中，本发明的抗体是一种单克隆抗体或其片段或衍生物。

在本发明的另一种优选实施方案中，所述抗体是一种多克隆抗体或其片段或衍生物。

本发明还涉及一种药用组合物，该组合物含有本发明 NPK 的特殊抑制剂，该抑制剂选择性地与一种可以药用的载体和/或稀释剂组合。

“本发明 NPK 的特殊抑制剂”一词是指能专门抑制本发明蛋白激酶的酶促活性的物质。酶，如蛋白激酶的抑制剂及其作用模式在本领域广为人知。例如，这种抑制剂可以与所述酶的催化功能域结合，从而使它不能转化其底物。

可以给需要用药的患者服用所述药用组合物，服用途径及剂量可由熟悉情况的医师合理定酌。可以药用的载体和/或稀释剂在本领域中众所周知，并可以根据服用途径或患者的具体症状进行配制。

在一种优选实施方案中，本发明涉及一种用于治疗老年性痴呆的药用组合物。

同样，可以给需要用药的患者服用所述药用组合物，服用途径和剂

量可以用主治医师合理定酌。

在另一种优选实施方案中，本发明的药用组合物被用于治疗癌症。

如上所述，本发明 NPK 的脱调节可导致各种类型的表达微管相关蛋白的细胞进入一个途径，该途径最终导致所述细胞的致瘤性转化。因此，药物有效量的 NPK 抑制剂将会抑制和/或逆转所述转化过程。所服用的抑制剂的量由负责相应病例的医师决定。

在本发明药用组合物的另一种优选实施方案中，所述抑制剂是本发明的抗体，一种能将本发明的 NPK 脱磷酸化的磷酸酶，最好是磷酸酶 PP - 2A，一种所述 NPK 的激活激酶的抑制剂，一种 tau 衍生的包括 Ser 262 残基的肽或一种 MAP2、2c 或 MAP4 衍生的包括至少一个下列 MAP2、MAP2C 或 MAP4 的丝氨酸或苏氨酸残基的肽：

MAP2/MAP2C： S37、S1536、S1676、S1707、S1792、S1796、S1799

MAP4： T829、T873、T874、T876、S899、S903、S928、S941、S1073

本文所说的“tau 衍生的包括 Ser 262 残基的肽和一种 MAP2、2c 或 MAP4 衍生的包括至少一个下列 MAP2、MAP2c 或 MAP4 的丝氨酸或苏氨酸残基的肽：

MAP2/MAP2C： S37、S1536、S1676、S1707、S1792、S1796、S1799

MAP4： T829、T873、T874、T876、S899、S903、S928、S941、S1073”

是指这样一种肽：其三维结构能重建 tau 蛋白或 MAP2、2c 或 4 蛋白包括丝氨酸残基 262（tau）或涉及上述（MAP）MAP2、MAP2C 和 MAP4 的其它残基的表位的天然构象。这种肽模拟本发明 NPK 的天然底物（即：tau 或 tau 相关 MAPs），但不表现出任何 NPK 相关的生物效应。所述肽的合成方法在本领域中众所周知，所合成的肽可以仅由所述表位组成，也可以包括其它侧翼氨基酸。

本发明还涉及一种诊断组合物，它包括：

（a）本发明的 NPK；

(b) 本发明的抗体或片段或衍生物；和/或

(c) 一种包括上述 tau、MAP2、MAP2C 或 MAP4 的可磷酸化的丝氨酸或苏氨酸的肽。

例如，所述诊断组合物可用于检测老年性痴呆或癌症或其发病。本发明的抗体可用于检测本发明 NPK 的异常，特别是高浓度或含量，即所述 NPK 的高度活性，这种异常是所述疾病的指征。随所述组合物一起输送的 NPK 可以用作一种内部控制剂。另一方面，上述肽可以用作检测本发明 NPK 异常活性的底物。同样，所述诊断组合物中所含 NPK 的活性也可用作一种内部控制剂。

能特异性地结合上述包含于 MAP4、MAP2 或 MAP2C 中的磷酸化丝氨酸残基的抗体或用于检测所述微管相关蛋白的异常磷酸化状态或模式，这种异常磷酸化是癌症的指征。

所述诊断组合物的其它用途如下。因此，在一种实施方案中，所述诊断组合物可以包括本发明的一种针对上述表位之一的抗体。例如，可以用一种能识别一个或几个所述表位的抗体处理获自表现出老年性痴呆或癌症相关症状的患者的样品，对这种样品进行检测。可以用针对本发明抗体的第二抗体对所述抗体-表位（半抗原）复合体进行显色，所述第二抗体用本领域已知方法进行标记（例如，参见 Harlow 和 Lane，出处同上）。

在本发明的另一种实施方案中，所述诊断组合物可以由一种上述表位和本发明的一种抗体组成。用所述抗体处理一种样品，可以得出有关患者的病症的结论，如果所述抗体和所述样品的结合与所述抗体和作为对照样品的上述表位的结合有关的话。

在另一种实施方案中，所述诊断组合物可以包括一个上述表位、本发明的 NPK 和本发明的一种抗体。可以样品磷酸化与本发明表位磷酸化的比较监测激酶活性。根据量化的 NPK 活性，可以推测出所述样品中所含 tau 蛋白或 MAP2、2c 或 4 的磷酸化状态，并进而推测出疾病状态。例如，可以通过向相同的反应中加入一种底物类似物判断激酶活性，可以根据酶促转化对这种底物进行目测。这些底物类似物在本领域中有广泛应用。另外，也可以在用本发明的激酶处理之后检测样品中磷酸化 tau

蛋白或 MAP2、2c 或 4 的量，处理时采用本发明针对所述磷酸化表位的抗体，并用由所述诊断组合物所提供的抗体-表位复合体的量作为内部标准，或者，例如用本领域已知的放射性示踪方法测定由 NPK 掺入 tau 蛋白或 MAP2、2c 或 4 的磷酸量。

不过，应当记住，本领域熟悉诊断原理的技术人员可以很容易地以不同方式对上述化合物进行组合，或向该组合物中补充标记过的或未标记过的二级或三级抗体，或酶和底物。这种方案也包括在本发明的范围内。

在另一个实施方案中，本发明涉及一种用于体外诊断和/或监测老年性痴呆的方法，该方法包括分析患者的脑脊髓液提取物或对神经组织进行活检（例如，嗅上皮），并检测所述组织中本发明 NPK 的存在。

本发明还涉及一种用于体外诊断和/或监测老年性痴呆的方法，包括分析患者的脑脊髓液提取物或对神经组织进行活检，并检测所述组织中本发明 NPK 的非生理量，或所述 NPK 的非生理活性。

适于上述活检的神经组织的一个例子是嗅上皮。

例如，可以用本发明的诊断组合物，特别是针对所述 NPK 的抗体实施本发明的方法。因此，在本发明的一种优选实施方案中，本发明的 NPK 是用本发明的特异地结合该 NPK 的抗体检测。

另外，本发明涉及一种用于体外诊断癌症或癌症发作的方法，该方法包括分析合适的组织或体液，看在以下位置上是否存在与 tau 有关的微管相关蛋白（MAPs）MAP2、MAP2C 和 MAP4 的磷酸化丝氨酸或苏氨酸残基：

MAP2/MAP2C：S37、S1536、S1676、S1707、S1792、S1796、S1799

MAP4：T829、T873、T874、T876、S899、S903、S928、S941、S1073

或检测是否存在本发明 NPK 的非生理量或一种 NPK 特异性磷酸酶。应当理解，丝氨酸或苏氨酸残基的磷酸化状态必需是非生理性的。测定这种磷酸化状态的方法已详细披露于 PCT/EP 9202829 中，该专利被收作参考。

例如，可以用一种专门识别所述磷酸化残基或包括所述残基的表位的抗体分析所述磷酸化丝氨酸或苏氨酸残基。

可以用专门针对 NPK 的抗体测定样品中的 NPK 量，或者用一种合适的底物测定其活性，例如，所述底物可以是非磷酸化状态的包括上述丝氨酸或苏氨酸的一种肽，或非磷酸化状态的 MAP2、MAP2C 和 MAP4 中的任一种。测定蛋白的磷酸化状态的方法详细披露于 PCT/EP 9202829 中。所述磷酸酶，如 PP - 2A、PPI 或钙调磷酸酶的活性，可以通过提供本发明的底物、NPK 进行测定，所述底物和 NPK 包含于本发明的诊断组合物中。

适用于本发明的体外方法的组织或体液是脑脊髓液、血液、活组织（如肝或皮肤）。

本发明的再一个目的是提供一种通过用本发明的 NPK 处理在体外将正常 MAP2、MAP2C 或 MAP4 转化成在以下位置上被磷酸化的蛋白的方法：

MAP2/MAP2C：S37、S1536、S1676、S1707、S1792、S1796、S1799

MAP4：T829、T873、T874、T876、S899、S903、S928、S941、S1073

所述磷酸化状态是癌症或癌症发作的指征。进行所述 MAPs 的磷酸化的条件，可以通过由本发明所提供的以下一般教导进行测定。磷酸化的 MAPs 可以由特异的抗体识别。上述体外方法的结果有助于进一步了解癌症的发生。

另外，可以试验能阻止正常 MAP 转化成在上述位置被磷酸化的 MAP 蛋白的抑制剂。所述“抑制剂”对于被磷酸化的表位来说可以是特异的，例如，阻遏所述表位，也可以针对本发明蛋白激酶 - NPK 上的各种结构域，只要其能够抑制或干扰其生物活性。另一种类型的抑制是发生在所述 MAPs 或 NPK 上的磷酸酶拮抗作用，或对所述 NPK 活化激酶的抑制作用。另外，由本发明方法所产生的 MAP 可用于在体外和体内进行结合微管结构的研究，从而阐释癌症发病的分子基础。

另外，本发明涉及将本发明 MAP 的磷酸化丝氨酸或苏氨酸残基或

包括所述残基的表位用于产生能指示癌症或癌症发作的特异抗体。

用于获得所述抗体的方法在本领域中广为人知；因此，可以用标准方法（例如，见 Harlow 和 Lane，出处同上）产生多克隆或单克隆抗体。如果将寡肽或多肽用于产生抗体，最好将包括所述表位的肽连接到一种合适的载体分子上，这种分子能够诱发或增强对所述表位的免疫响应，如牛血清白蛋白或匙孔 藻血蓝蛋白。连接半抗原（包括或等同于所述表位）和载体的方法也是众所周知的（Harlow 和 lane，出处同上）。可以理解，任何适用产生所需抗体的动物都可用于上述目的。

附图为：

图 1：是 tau（同种型 htau40，中枢神经组织中最大的一种，Goedert 等，1989）、结构 K18 的条图，K18 中带有所述 4 个重复和几个被获自脑的激酶活性磷酸化的位点（Gustke 等，1992）。靠近 N - 末端的画影线的框为插入片段，这些插入片段可由于不同的剪切而缺失，标有 1 - 4 的框表示 4 个重复，其中重复 2 可以缺失。大部分磷酸化位点在位于所述重复之外的 Ser-Pro 或 Thr-Pro 基序中，但是，脑激酶活性也能够将所述重复内的两个位点磷酸化，这两个位点是 Ser 262 和 Ser 356。

图 2：从猪脑中提取 NPK110。（A）将组织提取物加至磷酸纤维素柱上，并用 0.15~1M NaCl 分级洗脱。画斜线的条表示洗脱材料的总蛋白浓度，开放的条表示以 tau 结构 K18 为底物测得的活性。（B）被 0.35~0.5M NaCl 洗脱的材料用硫酸铵进行沉淀处理，对沉淀物进行透析，并加注到一个 Q - Sepharose 柱上。实线符号表示蛋白浓度，虚线符号表示活性曲线。梯度组成表示在右侧轴上。（C）对获自 Q - Sepharose 的级分 8 - 15 进行透析，并加注到一个 SP - Sepharose 柱上。（D）对获自 SP - Sepharose 的级分 12 - 16 进行透析，并加注到一个 Mono Q HR 5/5 柱上。（E）将获自 Mono Q 的级分 9 - 11 加注到一个 Superdex 200 凝胶过滤柱上。分子量标记的洗脱位置标在右侧轴上。

图 3：在 ATP - Sepharose 上进行亲和层析（SDS PAGE，泳道 1 - 3）对 NPK110 作最后纯化，并进行凝胶内磷酸化鉴定（放射性自显影，泳道 4 - 6）。将获自凝胶过滤柱的活性最大级分（泳道 1）加注到一个 ATP 亲和柱上。激酶由 5mM ATP 特异性洗脱（泳道 2，3）。

银染凝胶显现一条表观分子量约为 110kDal 的模糊带，和另一条分子量为 95kDal 的清晰带。泳道 4 - 6 表示泳道 1 - 3 中样品的凝胶内磷酸化的放射自显影图。tau (5 μ M) 作为一种底物聚合到凝胶基质中。在变性复原并与 g-³²P ATP 一起温育后，清楚地显示，只有 110kDal 的带表现出针对 tau 的激酶活性。

图 4： NPK110 对野生型 tau 和结构 K18 (微管结合域) 的磷酸化。在 37 $^{\circ}$ C 下，用 5 μ U/ml NPK110 和 2mM g-³²P-ATP 磷酸化 Htau 40 (10 μ M，泳道 1， 2) 和 K18 (20 μ M，泳道 3， 4) 2 小时。在 7 - 20 % SDS 梯度凝胶上对等分样品进行电泳：泳道 1、 2 表示磷酸化前后的 htau 40，泳道 3、 4 表示磷酸化前后的 K18。在泳道 2 和 4 中发现在磷酸化后发生小的分子量变化。右侧表示同一凝胶的放射自显影；磷酸化 htau 40 和 K18 如泳道 2 和 4 所示。

图 5： 用 NPK110 磷酸化的野生型 tau (htau 40) 和结构 K18 的胰蛋白酶磷酸肽谱。在 37 $^{\circ}$ C 下用 0.5 μ U NPK110 对 30 μ g tau 进行 2 小时磷酸化。(A) 全长 4 - 重复 tau (htau40)，(B) 结构 K18 (MT 结合片段，完整长度 tau 的残基 244 - 372)，(C) 更清楚的斑图：左上方的斑点 1 含有 Ser 262，右上方的斑点 2 含有 Ser 356，斑点 3 (下 1) 含有 Ser 305，斑点 4 (总是为重叠的双联体) 含有 Ser 324，斑点 5 含有 Ser 293 (这种胰蛋白酶肽 CGSK 不能从 HPLC 柱中回收，可能因为其体积小，但所述斑点可以通过定点诱变进行鉴定)。(D) 获自 (A) 和 (B) 中所示磷酸肽的相同计数量 (10,000cpm) 的混合物。(C) 中所示的磷酸化位点的鉴定是通过对 HPLC - 纯化的并测序的肽 (列于表 1 中) 进行双向分析而进行的。为了进行清楚的鉴定，分别对 10,000cpm 的纯化肽进行单独分析，并与示于 (A) 中的磷酸肽的 5000cpm 等分试样组合在一起进行分析。

图 6： Ser 262 的磷酸化破坏 tau 与微管结合。(A) 在下面的例 2 中所述的共沉降分析中测定 tau 与紫杉酚稳定的微管 (30 μ M) 的结合。预先用 NPK110 (终浓度为 8.5 μ U/ml) 在 37 $^{\circ}$ C 下对完整长度的野生型 tau (' wt' , htau40) 和 Ala 突变型 (A262) 的 Ser 262 (10 μ M) 进行磷酸化 2 小时。通过非线性回归获得曲线 (Biernat 等， 1993)。

野生型 tau 的结合会受到磷酸化的彻底破坏（实心圆），而 A262 突变型仍能结合，不过亲和性较低（三角）。为进行比较，还示出了未磷酸化 tau 的结合（空心圆）。

（B）微管结合的 tau 在由 NPK110 进行的磷酸化期间分离。将 htau40（ $10\mu\text{M}$ ）与紫杉酚稳定的微管（ $30\mu\text{M}$ ）一起温育。在 $t=0$ 时，以 $10\mu\text{U/ml}$ 的终浓度加入 NPK110，以 1~20 小时的时间间隔取出等分试样，并离心沉淀。通过 SDS 凝胶光密度测定法测定沉淀和上清液中的 Tau（实心圆）。通过对凝胶片进行 Cerenkov 计数测掺入的磷酸（空心圆），并示于右侧的轴上。证实在没有微管的情况下磷酸能更快地掺入 tau 中（方形）。

图 7：是微管的暗视野显微图象和 Ser 262 的磷酸化对 tau 的效果。在存在 $2.5\mu\text{M}$ tau（同种型 htau 40）和 $10\mu\text{U/ml}$ NPK110 的条件下，将微管（ $5\mu\text{M}$ 微管蛋白）在海胆精子轴突上进行成核。A，20 分钟无 ATP，B，有 ATP。在 A 中，微管连续生长，在 B 中，Ser 262 可被磷酸化，导致脱稳定化并缩短微管。线条长度= $10\mu\text{m}$ 。

图 8：非磷酸化 tau 和 NPK110 磷酸化 tau 对轴突成核微管长度的影响，通过暗视野显微法测得。在每种条件下测 500 - 600 个微管加末端的长度，给长度对时间作图。微管蛋白的浓度为 $5\mu\text{M}$ ；结果发现，在不加 tau 的情况下，在该浓度下观察不到微管。在所有情况下 Tau 都是 $2.5\mu\text{M}$ 。在对照实验中，ATP 被省略（‘- ATP’）。

（A）由 NPK110 预磷酸化的 Tau 不会促进微管生长（实心圆），但预磷酸化点突变型 A262 能够（三角形，根据图 6B 中的时间分辨结合试验）。

（B）在有（实心圆）或无（空心圆） 2mM Mg-ATP 的条件下将微管蛋白和 Tau 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下与 $10\mu\text{U/ml}$ NPK110（终浓度）混合。在 $t=0$ 时，将温度升高至 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。在有野生型 tau 和无 ATP 的条件下连续生长微管（空心圆）；用突变型 Ser 262-Ala（三角形）获得相同的结果。然而，野生型 tau 加 ATP 可导致初步生长，但随后又萎缩（实心圆）。（C - E）B 中相应曲线在 5 分钟和 30 分钟时的微管长度直方图。每个样品在 5 分钟后在 $20\mu\text{m}$ 附近出现一个显著的峰（空心圆）。如果 Mg-ATP 缺乏（C）或 Ser262 突变成 Ala（E），其分布变宽，并在 30 分钟时变

成较大长度。形成对比的是，tau 磷酸化可在培养 30 分钟时间内成功地减少平均微管长度（D）。

图 9：野生型 tau（htau40）和分别用（A）脑提取物、（B）NPK110、（C）PKC 或（D）PKA 对进行过磷酸化的结构 K18 的胰蛋白酶磷酸肽谱。斑点的编号与图 5 中类似（斑点 1：Ser262，斑点 2:Ser356，斑点 3：Ser305，斑点 4：Ser324，斑点 5：Ser293）。右侧图表示完整长度 tau 对每种激酶的相应的双向磷酸氨基酸分析。

图 10：表示不同磷酸化位点对 tau - 微管相互作用的影响的示意图。大部分 Ser/Thr-Pro 基序位于所述重复结构域的侧翼区，其对于 tau 的结合只有很少影响。重复的结构域含有几个可磷酸化的非 Ser-Pro 位点，特别是 4 个 KXGS 基序。其中，第一个 KIGS 基序中的 Ser 对于微管结合具有最大的影响。

图 11：由 NPK - 110 磷酸化的重组 MAP2C 的磷酸肽谱。该肽含有以下磷酸化残基：I=Ser 1707，II=Ser 1676，III=Ser37 和 Ser1536，IV=Ser 1792，Ser 1796 和 Ser 1799（残基编号按照 Albala 等的方法，1993）。

图 12：由 NPK - 110 磷酸化的 MAP4 融合蛋白的磷酸肽谱。该肽含有以下磷酸化残基：I=Thr 829，II=Ser 941，III=Ser 928，IV=Thr 873，Thr 874 和 Thr876，V=Ser899 和 Ser903，VI=Ser1073，VII=Ser928（残基编号按照 West 等的方法，1991）。

图 13：非磷酸化和 NPK - 110 - 磷酸化 MAP4、MAP2 和 MAP2C 对轴突成核微管长度的影响，通过暗视野显微法测得。在每种情况下测 500~600 个微管加末端的长度；用平均长度对时间作图。微管蛋白浓度为 5 μ M；MAPs 为 1 μ M。结果发现，不添加 MAPs，在该浓度下观察不到微管。

（a）在有（实心圆）或没有（空心圆）2mM Mg-ATP 的条件下，在 4℃ 温度下将微管蛋白和 MAP4 与 10 μ U/ml NPK - 110（终浓度）混合。在 t=0 时，将温度升高到 37℃。在有 MAP4 和无 APT 的条件下微管连续生长（空心圆）。不过，MAP4 加 ATP 会导致初步生长，但随后又萎缩（实心圆），因为 MAP4 被磷酸化，从微管上脱离下来，而微管脱稳定化。

（b）与（a）中相同的实验，但使用 MAP2，取得类似结果。

(c) 与 (a) 中相同的实验, 但使用 MAP2C, 取得了类似结果。
图 14: 以 MARK cDNA 为探针的成人和人胎组织的 Northern 印迹。

左侧: 成人组织

泳道 1: 胰腺 (Pa)

泳道 2: 肾 (Ki)

泳道 3: 肌肉 (Mu)

泳道 4: 肝 (Li)

泳道 5: 肺 (Lu)

泳道 6: 胎盘 (Pl)

泳道 7: 脑 (Br)

泳道 8: 心 (H)

右侧: 胎组织

泳道 9: 肾 (Ki)

泳道 10: 肝 (Li)

泳道 11: 肺 (Lu)

泳道 12: 脑 (Br)

图 15: 在受由 p110 MARK 进行的磷酸化的影响下重组野生型 MAP2C 和 MAP2C 点突变体与紫杉酚稳定的微管 (30 μ M 微管蛋白二体) 的结合。空心圆: 未磷酸化的野生型 MAP2C。这种结合是紧密的 (KD 大约为 0.25 μ M), 并以大约 17 μ M 的配体饱和, 或以每 2 个微管蛋白二体约 1 个 MAP2C 分子的比例饱和。实心圆: 野生型 MAP2C, 预先用 p110 MARK (2.5 毫单位/ml; 1 单位相当于在 30 $^{\circ}$ C 下每分钟有 1 μ mol 的磷酸盐转移到 MAP2C) 磷酸化 2 小时。结果发现, 基本上无结合。实心方形和空心方形: MAP2CA 319 和 MAP2CA 350, 预先用 p110 MARK (2.5 毫单位/ml) 磷酸化 2 小时。在所述突变型中, 在第一个或第二个重复中的 KXGS 基序里的 Ser 319 或 Ser 350 经点突变成为丙氨酸。与微管的亲和性明显下降 (KD $\approx$ 7 μ M), 不过, 其化学计量依然与野生型 MAP2C 相似。三角: MAP2C A 319/A350, 预先用 p110 MARK (2.5 毫单位/ml) 磷酸化 2 小时。在该突变型中, Ser 319 和 Ser 350 同时突变成丙氨酸。其结合类似于未磷酸化的蛋白, 表明对磷酸化的敏感性已不再存在, 因为所述两个 KXGS 基序不再能够磷酸化。

图 16：未磷酸化的和由 p110 MARK 磷酸化的 MAP4 (A)、MAP2 (B)、MAP2C (C) 和 MAP2C 点突变 (D) 对自成核微管长度的影响，是通过暗视野显微法测定的。在每种情况下分析 500~800 个微管，并以平均长度对时间进行作图。在所有情况下微管蛋白的浓度均为 $10\mu\text{M}$ ，MAP4 和 MAP2 的浓度为 $1\mu\text{M}$ ，MAP2c 的浓度为 $2\mu\text{M}$ 。在对照实验中，ATP 被省略 (‘ - ATP ’)。

A、B 和 C 中的空心圆：将 MAPs 与 2.5mU/ml 的 p110MARK (终浓度) 预培养 30 分钟，其中没有 ATP。加入 $10\mu\text{M}$ 微管蛋白使微管成核，平均微管长度在 30 分钟内可增加高达大约 $20\mu\text{M}$ 。形成对照的是，如果存在 ATP，则不会发生自成核作用，这表明 MAPs 的磷酸化阻止了微管生成。通过添加轴突 ($10 - 100\text{fM}$) 促进接种的成核作用 (A、B、C 中的空心三角) 仅能观察到长约 $2\mu\text{m}$ 的短微管。

A、B 和 C 中的实心圆：在 4°C 下将微管蛋白和 MAP 与 2.5mU/ml 的 p110 MARK (终浓度) 混合，并迅速将温度升至 37°C (这样，起初 MAPs 是非磷酸化的)。在三种情况下微管生长都受到促进，但最终的平均微管长度仅为非磷酸化 MAPs 的大约一半 (比较空心圆)。

D：MAP2c 的磷酸化位点点突变效果。所有蛋白都按上述方法磷酸化 (预培养 30 分钟)。三角：野生型 MAP2c，实心圆：MAP2c A319 (第一个重复里的 KXGS 突变成 KXGA)，方形：MAP2cA 350 (第二个重复里的 KXGS 突变成 KXGA)，实心方形：MAP2cA 319/A 350 (在两个重复里的 KXGS 突变成 KXGA)。

实施例说明本发明。

关于实施例中所所述的 tau 蛋白，仅使用在大肠杆菌 (*E.coli*) 中表达的人 tau 蛋白。按照 M. Goedert 所披露的方法 (Goedert 等，1989) 制备 cDNA 克隆，并用 pET 表达载体的变体进行表达 (Studier 等，1990)。利用 tau 的热稳定性和 Mono S FPLC 纯化所述蛋白 (Hagestedt 等，1989)。结构 K18 来自 4 - 重复 tau 同种型，并包括微管结合区，残基 244~372 (Biernat 等，1993)。突变型 ‘ A262 ’ 是以最长的人的同种型为基础。用常规技术将单个残基 Ser 262 转变成丙氨酸。按照 Mandelkow 等 (1985) 的方法，从猪脑中制备磷酸纤维素纯化的微管蛋白 (PC - 微管蛋白)。蛋白激酶 A 催化亚单位 (自牛心中提取，基于肯普肽的活性为 $27\text{nU}/\mu\text{l}$ ，基于酪蛋白的活性为 $100\text{pU}/\mu\text{l}$) 购自

Promega 公司, 蛋白激酶 C (自大鼠脑中提取, 基于组蛋白 H1 的活性为 80pU/ μ l) 得自 Boehringer Mannheim。

例 1:

蛋白激酶 NPK110 的纯化和鉴定。

所有操作均在 4℃ 下进行。从当地的屠宰场获得新鲜猪脑(约 1kg), 并在 1 升缓冲液 A (50mM Tris,pH8.5, 含有 5mM EGTA, 100mM NaF, 1mM PMSF, 1mM 苄脒, 1mM Na₃VO₄, 1mM DTT, 0.1 % Brij-35) 中匀浆。在冰上将匀浆液转移到实验室中, 并在 30,000g 离心 1 小时。通过超速离心 (50,000g, 30 分钟) 澄清上清液, 将 pH 调至 6.8, 并加注到装有 150ml Whatman P11 的、用缓冲液 B (50mM MES pH6.8, 2mM EGTA, 50mM NaF、1mM PMSF、1mM 苄脒、1mM Na₃VO₄、1mM DTT、0.1 % Brij-35) 平衡的 Büchner 漏斗中, 施加小的真空度。用 500ml 缓冲液 B 洗涤磷酸纤维素, 并分别用含有 0.15M-1M NaCl 的 150ml 缓冲液 B 进行分级洗脱 (图 2A)。通过对 tau 结构 (K18) 进行磷酸化筛选活性级分, 所述 tau 结构由 4 个微管结合重复组成, 基本如上文所述 (Drewes 等, 1992)。通过硫酸铵沉淀分离活性级分。在冰上将所获得的饱和度为 30 - 50 % 的沉淀用缓冲液 A 透析过夜。通过超速离心澄清透析液 (约 50ml), 并用一个 Superloop (Pharmacia) 加注到一个阴离子交换柱 (Q - Sepharose HR, Pharmacia, 80 × 16mm) 上。在用 100ml 缓冲液洗柱, 并用 0 - 0.5M NaCl 的分级梯度进行洗脱 (图 2B, 流速 5ml/分钟, 级分体积 7ml) 后, 将活性级分 (约 40ml) 对缓冲液 B 进行透析, 并加注到一个阳离子交换柱 (SP - Sepharose HR, Pharmacia, 60 × 16mm) (图 2C, 流速 4ml/分, 级分体积 7ml)。用 0 - 0.5M NaCl 洗脱后, 收集活性级分 (大约 40ml), 在 Sephadex G25 柱 (300 × 26mm) 上换成缓冲液 A, 并加注到 Mono Q HR 5/5 柱 (Pharmacia) 上, 用陡 NaCl 梯度洗脱 (图 2D, 流速 0.5ml/分, 级分体积 1ml)。在一个 Centricon 30 微量浓缩器 (Amicon) 上将活性级分 (2 - 3ml) 浓缩 2 倍, 加注到凝胶过滤柱 (Superdex 200, Pharmacia, 300 × 16mm) 上, 用缓冲液 A (pH7.8, 含 150mM NaCl 和 10 % 甘油) 平衡并洗脱。流速为 0.2ml/分, 级分体积为 2ml。已用标记蛋白盒 (Pharmacia) 预先校准所述柱。收集活性级分, 并在 Sephadex G25 柱 (100 × 16mm) 上将缓冲液换成缓冲液 C (40mM β - 甘油磷酸盐,

10mM MgCl₂, 2mM EGTA, 1mM 苄脒, 0.2mM DTT, 0.1 % Brij-35)。以 0.1ml/分的速度将得自 G25 柱的蛋白收集液 (10 - 15ml) 加注到 ATP - Sepharose 柱 (Upstate Biotechnology 公司, Lake Placid, USA, 15 × 5mm) 上。用 5ml 缓冲液 C 洗柱, 并用 2ml 含有 5mM MgATP 的缓冲液 C 洗脱。浓缩洗脱液, 并在 Mono Q PC 1.6/5 柱 (‘Smart’ 系统, Pharmacia) 上除去 ATP 和缓冲物质, 用 25mM Tris-HCl, pH7.4 洗脱, 其含有 250mM NaCl, 1mM EGTA, 0.2mM DTT, 1mM 苄脒和 0.03 % Brij-35。将活性级分与 50 % (v/v) 甘油混合, 并在 - 20 °C 下保存。在这种条件下, 其活性能至少保持 1 个月。

通过以上 6 个层析步骤, 获得了来自猪脑组织提取物的纯化约 10,000 倍的 Ser 262 - 磷酸化活性。如图 2 所示, 磷酸纤维素 (A), 在 Q - 和 SP - Sepharose 和 Mono Q (B、C、D) 上进行离子交换, 凝胶过滤 (E), 最后用固定化 ATP 进行亲和层析。在所述组织中该激酶的活性约为 0.2mU/mg, 亲和纯化的激酶的活性约为 2U/mg (1 单位为每分钟转移 1μmol 的磷酸盐)。通过凝胶过滤后该酶的分子量约为 90~100kDal, 但活性峰较宽, 并表现出明显的拖尾 (图 2E)。在 SDS 凝胶上, 表观分子量约为 110kDal (图 3)。酶可在凝胶中进行复性; 如果将 tau 作为底物聚合到凝胶基质中, 并与 γ - ³²P - ATP 一起培养该凝胶, 在放射性自显影时, 110kDal 的带就变得突出 (图 3, 泳道 4 - 6), 而在银染凝胶上所观察到的污染物无可检测的活性。在用 NPK - 110 进行磷酸化之后, 在 SDS PAGE 上完整的 tau 和结构 K18 都表现出小但明显的迁移性变化 (图 4, 泳道 1 - 4)。磷酸盐的最终掺入量约为 1.8~2.5mol/mole tau, 在一定程度上取决于酶的浓度和活性; 在大约 2 小时后能获得这种磷酸化水平。磷酸化反应按以下方式进行:

磷酸化反应在 40mM Hepes, pH7.2 中进行, 含 2mM TAP, 5mM MgCl₂, 2mM EGTA; 1mM DTT, 0.1mM PMSF, 0.03 % Brij-35。当筛选提取物或激酶制剂的粗制级分时, 其中含有 50mM NaF 或 1μM 冈田酸 (LC Services, Woburn, MA, USA)。加热至 95 °C 中止反应。在 SDS 凝胶 (Steiner 等, 1990) 或在磷酸纤维素纸盘 (Gibco) (Casnellie, 1991) 上分析磷酸化。按照 Geahlen 等的方法 (1986) 进行凝胶内磷酸化分析。

以下述方法检测 NPK110 对 tau 的专一性: 用胰蛋白酶消化磷酸化

蛋白，随后进行双向薄层电泳和层析（图 5）。通过比较由重组全长 4 重复 tau 的磷酸化形式（图 5A）和 4 重复片段 K18 的磷酸化形式（图 5B）可以看出，大部分磷酸化肽出自重复结构域。通过分析两种样品的混合物证实了这一点（图 5D）。在另一种方法中，通过 HPLC 分辨胰蛋白酶消化物（未显示结果）。更具体地讲，是以以下方式实施上述方法的：

在磷酸化反应之后，通过在 0.5M NaCl/10mM DTT 中煮沸样品并离心而将激酶除去。Tau 蛋白仍保留在上清液中，用 15 % TCA 进行沉淀。通过过甲酸处理修饰半胱氨酸残基（Hirs, 1967）。在有 0.1mM CaCl_2 的条件下用胰蛋白酶（Promega，测序级）消化该蛋白质过夜，使用 1:10-1:20(w/w) 的二酶。按照 Boyle 等的方法（1991），在薄层纤维素板（Macherey 和 Nagel, Duren, FRG）上进行双向磷酸肽作图。简言之，第一向电泳是在甲酸（88 %）/乙酸/水（50/156/1794）中，在 pH1.9 下进行；第二向层析在 n - 丁醇/吡啶/乙酸/水（150/100/30/120）中进行。为了通过测序对磷酸化位点进行作图，用 NPK110 和 ^{32}P - ATP（100Ci/mol）对重组人 tau（200 μg ，克隆 htau40）进行磷酸化 2 小时。通过一个简单的热处理终止磷酸化。将蛋白与 6M 尿素和 2mM DTT 一起培养，并通过乙烯吡啶（Tarr 等，1983）或过甲酸处理封闭半胱氨酸。在对 10mM 碳酸氢铵进行透析后，将所述蛋白冻干并在有 0.1mM CaCl_2 的条件下用胰蛋白酶（1:20）进行消化。通过在 μRPC C2/C18 SC2.1/10 柱（‘Smart’系统，Pharmacia）上进行两轮连续的 HPLC 进行肽的分离。用乙酸（5 % v/v）酸化消化产物，并用在 10mM 乙酸铵中配制的乙腈梯度通过 HPLC 进行分离（流速 0.1ml/分，0 - 25 % 在 120 分钟内，25 - 50 % 在 20 分钟内）。通过在 214、254 和 280nm 处测 UV 吸收检测肽，并通过在闪烁计数器（Hewlett-Packard Tri Carb 1900CA）中测 Cerendov 辐射测定掺入的磷酸盐。用在 TFA 中配制的乙腈梯度对流通级分和来自该梯度的放射性峰进行进一步纯化（流速 0.1ml/分，0 % 乙腈/0.075 % TFA~66 % 乙腈/0.05 % TFA，在 60 分钟内）。用一台 477A 脉冲液相测序仪和一台 120A 联机 PTH 氨基酸分析仪（Applied Biosystems）对肽进行序列分析。通过气相测序（Meyer 等，1991）以脱氢丙氨酸的二硫苏糖醇加成物的形式鉴定磷酸丝氨酸。

由此产生几种标记肽，通过直接磷酸肽测序和磷酸氨基酸分析对所

述标记肽进行分析。磷酸氨基酸分析：在 6N HCl 中对等分消化样品进行部分水解（110 ℃，60min），并在 pH1.9 和 pH3.5 的条件下进行双向电泳（Boyle 等，1991）。磷酸肽测序的结果归纳于表 1 中。

表 1：

通过 HPLC 获得用 NPK110 磷酸化的来自 htau40 的胰蛋白酶解磷酸肽。序列是主放射活性峰的。列出了第二次纯化后的计数数、材料量、带有加星号的磷酸化残基（鉴定为 S - 乙基半胱氨酸）的序列、磷酸化位点（按照 htau40 编号）。结果发现，HPLC 检测不到来自第二个重复的胰蛋白酶解磷酸肽 CGSK（假设是因为其体积小和它的亲水性），因此，必须通过磷酸肽作图和定点诱变进行鉴定。

肽中的 cpm	测得的 pmoles	测得的 肽序列	磷酸化位点
400.00	1000	I ³ S* ³ TENLK	Ser-262
150.000	350	I ³ S* ³ LDNIPHVPG GGNHK	Ser-356
150.000	300	CGS* ³ LGNIHHK	Ser-324
60,000	200	HVPGGGS* ³ VQIVYK	Ser-305

大部分放射活性存在于含有磷酸化 Ser 262 的肽中。还发现 Ser 356（在第 4 个重复的 KIGS 基序中）和 Ser 324（获自第三个重复的 KCGS 基序）具有放射性标记。对这些纯化的肽进行双向分析，导致了图 5C 中所示的斑点的鉴定。它清楚地表明，Ser 262（斑点 1）是 tau 上 NPK110 的主要靶位点，其次是 Ser 356（斑点 2）。斑点 3 被鉴定为含有 Ser 305 的肽，斑点 4 为 Ser 324（在第三个重复的 KCGS 基序中），斑点 5 为 Ser 293（在第二个重复的 KCGS 基序中）。不能通过反向 HPLC 层析直接提取到相应的胰蛋白酶肽（²⁹¹CGSK），可能因为其较短和其亲水性。因此，通过定点诱变，用 K18 的点突变型发现，所有 4 个 KXGS 基序中的丝氨酸（Ser 262、293、324、356）都转化为丙氨酸。用 NPK110 进行磷酸化后发现，只有斑点 3（Ser 305）可见，而斑点 1、2、4 和 5 消失，因而证实斑点 5 中有 Ser 293（结果未显示）。

例 2:

Tau - 微管结合及动力学不稳定性。

以前发现, Ser 262 的磷酸化会明显降低 tau 和微管之间的相互作用; 即: 不仅是解离常数提高, 而且化学计量也降低。在对 tau 进行 NPK110 磷酸化后获得了类似结果, 从而证实了以上观察结果。事实上, 图 6A 表明了结合的降低更为明显: NPK110 在易达到的浓度范围内能完全破坏微管结合。由于结合变得太弱, 以致不再能够估计解离常数值和化学计量值。换言之, NPK110 能有效导致 tau 与微管结合力的丧失。按如下方法进行结合研究:

对 30 μ l 样品进行超速离心 (Beckman TL100), 通过测紫杉酚稳定的微管 (30 μ M) 和 tau 的共沉降进行结合研究。用 SDS - PAGE 和考马斯蓝染色分析沉淀和上清液的等分试样。将光密度扫描的干燥凝胶用于对蛋白的定量分析 (详情参见 Gustke 等, 1992)。

为了证实上述结果, 将一个点突变 (Ser 262 转变为 Ala) 引入 tau, 以使该位点不能再被磷酸化。在这种情况下, 与 NPK110 一起培养突变型, 微管结合能力大部分保持不变, 但亲和力和化学计量有一定程度的降低 (约 25 %, 图 6A)。这证实了现有研究中的两点: (i) Ser 262 的磷酸化是控制 tau 对微管亲和性的主要关键, (ii) 由激酶磷酸化的其它位点对所述结合有小的, 但可测到的影响 (即: 主要是重复 2, 3 和 4 的 KXGS 基序里相当的丝氨酸)。

随后的问题是: 微管是否能保护 tau 免受 NPK110 的磷酸化? 如果真是这样的话, 则 tau 一旦与微管结合将会保留其对微管的高度亲和。为了回答这一问题, 首先用 tau 饱和紫杉酚稳定的微管, 然后与 NPK110 一起培养。如图 6B 所示, 随着磷酸化的进行, tau 逐步从微管上解离下来。因此, 微管能够阻碍激酶对 tau 的磷酸化, 但不能阻止磷酸化的发生。

tau 的一个重要作用是稳定微管并抑制其动力学不稳定性 (Drechsel 等, 1992)。因此, 如果 tau 丧失其结合微管的能力, 就可以预见稳定的微管会变得活跃。通过对接种在鞭毛轴突上的单个微管进行暗视野显微成象可以证实上述结果 (图 7)。该实验是这样进行的:

基本上按公开的方法 (Trinczek 等, 1993) 对在轴突上成核的微管进行图象显微。简言之, 将 5 μ M PC - 微管蛋白, 2.5 μ M tau (未磷酸

化或磷酸化)和少量海胆精子轴突(10 - 100fM)在50mM Na - Dipes, pH6.9中混合,其中含有3mM MgCl₂、2mM EGTA、1mM GTP和1mM DTT。将1.0μl样品放在一块载玻片下,用18 × 18mm的盖玻片覆盖,密封,并在5秒钟内在温度受控的空气流中加热至37℃。由该空气流保持37℃的恒温。在温度改变后在时间为2.5、5、10、15、20、25和30分钟时记录轴突成核的微管。在每种条件和时间下分析一个样品的3 - 5个轴突和10 - 20个实验,并测500 - 600个微管加末端的长度。只考虑明确位于焦平面上的微管。溶液深度为3 - 4μm,而焦深为1-2μm。

在图8A的实验中,对微管蛋白的浓度进行选择(5μM),这样,微管自身不会组装,但在添加(未磷酸化的)tau后会生长。由NPK110磷酸化的tau不会支持生长,但突变型Ser 262 - Ala会。换句话说,在Ser 262上发生磷酸化的tau就象“无tau”一样,因为它不与微管相互作用,与此相反的是,突变型能够。更为突出的是,在所述激酶的影响下,微管从非活跃型向活跃型转化。在图8B的实验中,让微管在有tau的条件下长出轴突,而且记录到在20分钟时间里其平均长度增加到大约50μm。在一个平行实验中,将NPK110与ATP一起加入(或没有ATP,作为对照)。在对照实验中(无ATP),微管能够连续生长,并表现出很小的动力学不稳定性(图8B,空心圆)。随着ATP的加入,其平均长度仅增加到20μm,然后再次下降,因为tau逐步磷酸化同时微管变得活跃(实心圆)。当采用突变型Ser 262 - Ala时,即使在有激酶和ATP的情况下微管也能正常生长(三角形)。这些结果总结在图8C - D的长度直方图中。在开始组装后的初期,微管短且长度相当均匀(在5分钟时空心圆的峰),在无间断生长的后期,微管变长并出现一个宽的长度分布(图8C和8E中的实心圆)。不过,当用激酶对Ser 262进行磷酸化时(即:存在激酶、ATP、和有Ser 262的野生型tau),微管依然较短(图8D中的空心圆)。

例3:

能将tau的重复结构域磷酸化的其它激酶。

在体外,tau能被很多种激酶磷酸化,可用几个标准对这些激酶进行分类,根据功能、目标等。某些有希望用于诊断老年性痴呆的针对脯氨酸的激酶(因为由其所诱发的抗体反应)能将所述重复两侧的区域磷

酸化，但对 tau - 微管结合的影响似乎很小。相反，可以预见能将所述重复区磷酸化的激酶对微管结合有影响，因为 tau 重复被认为与该功能有关，而且这是由迄今所披露的 NPK110 的结果所证实的。随之而来的问题是，该激酶与其它激酶是如何在所述重复结构域对 tau 进行磷酸化的。到目前为止已有一些有关于此的报道（表 2）。

表 2：

磷酸化位点和激酶影响 tau 重复片段及相邻片段的总结（仅列出了不针对脯氨酸的激酶和位点）。主要位点用 X 表示，次要位点用（x）表示。注意，这些结果是通过不同方法获得的：（1）tau 磷酸化，随后是蛋白酶解降解，肽的分离和磷酸肽测序（Steiner 等，1990，Steiner，1993，Gustke 等，1992；Scott 等，1993）。（2）磷酸肽质谱分析结合测序（Hasegawa 等，1992；Watanabe 等，1993）。（3）合成肽的磷酸化（Correas 等，1992）。（4）磷酸肽 2D 作图结合测序（本文报道）。由于这些数据来自重复结构域 K18，其不含有在所述重复之外的可能的磷酸化位点的信息。

激酶或参考活性	S214	S262	S293	S305	S324	S356	S377	S409	S416
		KIGS	KCGS		KCGS	KIGS			
PKA Scott 等 , 1993	(x)				(x)	(x)		x	x
PKA Steiner, 1993	X		(x)		(x)	(x)		X	X
PKA 本文报道	ND	(x)	(x)	(x)	X	X		ND	ND
PKC Correias 等 ., 1992					X				
PKC Steiner, 1993	X	(x)		(x)	(x)		X		
PKC 本文报道	ND		(x)	(x)	(x)		ND		
CaMK Steiner 等 ., 1990									X
脑提取物, Gustke 等 ., 1992		X				X			
脑提取物, 本文报道		X				X			
PK 35/41 Biernat 等 ., 1993		X	(x)		(x)	X			
NPK110 本文报道		X	(x)	(x)	(x)	X			
活体脑									
老年性痴呆 : Hasegawa 等 ., 1992									X
成体 : Watanabe 等 , 1993									
--- 在重复片段中无位点 ---									
胎儿 : Watanabe 等 ., 1993									
--- 在重复片段中无位点 ---									

例如, PKA 主要磷酸化所述重复之外的 Ser 214、Ser 409 和 Ser 416, 但次要位点包括重复内的 Ser 324 和 Ser 356 (Scott 等, 1993; Steiner, 1993)。由于 Ser 262 不是上述位点之一, 因此, 预计它不会对微管结合产生重要影响, 这一结果符合我们的观察。PKC 位点包括重复 3 里的 KCGS 基序 (Correias 等, 1992; Steiner, 1993), 在我们的研究中, 它对微管的结合也没有重要影响。早先报导的 (Biernat 等, 1993) 部分纯化的激酶活性能够将所有 4 个 KXGS 基序磷酸化, 最后, 获自脑提取物的激酶活性能将 Ser/Thr-Pro 基序和 Ser 262 及 Ser 356 磷酸化 (Gustke, 1992), 由于 Ser262 而具有报导过的对微管结合的重大影响。本研究所采用的方法是, 由磷酸化的 tau 产生蛋白酶解片段, 然后通过 HPLC 分离, 并通过测序鉴定。这样通常会产生许多肽, 其回收通常不是线性的, 因此, 难于判断在不同位点上的相对磷酸化量。

由于上述不确定性, 因此决定通过不同的方法重新研究磷酸化位点。不仅要通过 HPLC 和测序分析磷酸肽, 而且要通过在薄层纤维素板上双向作图进行分析, 它能较清楚地反映出其相对分布。用脑提取物、NPK110、PKC 和 PKA 将全长 4 - 重复 tau 和重复结构域 (K18) 磷酸化。这样能够对 tau 重复结构域里的磷酸化位点进行比较, 并显示各种激酶在 htau 40 上的磷酸化程度。结果示于图 9 中, 其中, 来自 K18 的磷酸肽按照图 5 进行标记。通过让各样品与由 NPK110 磷酸化的 K18 样品一起走电泳鉴定由其它酶所产生的磷酸肽斑点 (资料未显示)。

图 9A 中所示的图形是通过用脑提取物对完整长度的 tau 和 K18 进行磷酸化而获得的。对完整长度的 tau 来说, 仅有斑点 1 (Ser 262) 清晰可见, 斑点 2 (Ser 356) 几乎不可见。这种现象在 K18 的磷酸化图形中更为突出。

当检测 NPK110 对 K18 的磷酸化时, 产生了类似于脑提取物的肽图形 (比较图 9A 和 9B); 最明显的斑点是 1 和 2, 其含有 Ser 262 和 Ser 356, 而 Ser 305 (斑点 3)、Ser324 (斑点 4) 和 Ser 293 (斑点 5) 表示微量成分。这证实了 NPK110 是主要的 Ser262 激酶。形成对比的是, 早期激酶活性的重新研究 (Biernat 等, 1993) 迄今已产生不一致的结果。尽管它磷酸化与 NPK110 情形中一样的丝氨酸, 但其重量不同, 而且脑提取物中的激酶活性至少要低 10 倍。这能解释上文所述的即使长时间温育 tau 与该激酶活性仅能部分抑制 tau 与微管结合的原因。

如图 9C 所示, PKC 只能将 K18 里的 Ser 305 (斑点 3)、Ser 324 (斑点 4) 和 Ser 293 (斑点 5) 磷酸化至显著程度。左侧最外面的不清晰的斑点 (箭头所示) 不是来自 tau 的磷酸肽, 因为该斑点也出现在对照实验中, 而在对照中未加入 tau 结构 (未显示)。其余两个斑点无法确认; 右上方的斑点 (带星号) 不反映 Ser 262 (斑点 1) 或 Ser 356 (斑点 2)。通过将该图形与获自全长 tau 的图形进行比较发现, PKC 的主要磷酸化位点位于重复结构域外面。在该图形中仅 Ser 305 (斑点 3) 勉强可见 (注意, 右上方的斑点与来自 K18 的右上方的斑点 (带星号) 不一致, 如由对照实验所证实的 (未显示))。

当用纯化的 PKA 对完整长度的 tau 和结构 K18 进行磷酸化时 (图 9D), 主要发现 Ser 356 (斑点 2)、Ser 305 (斑点 3)、Ser 324 (斑点 4) 和 Ser 293 (斑点 5)。Ser 262 (斑点 1) 仅为次要的磷酸化位点。全长 tau 的磷酸化 (图 9D, 左侧) 产生类似的斑点, 加上位于 tau 重复区外面的其它位点。上述结果大致符合早期的资料 (Scott 等, 1993; Steiner, 1993)。上述位点中的某一些在早先报导 (Biernat 等, 1993) 的 “35/41 kDal” 激酶活性中也出现过。在随后的实验中证实, 41kD 的成分是 PKA 的催化亚单位 (采用获自 H. Hilz 的抗 PKA 抗体, Hamburg, 未显示资料); 该结果能部分解释所述资料的重叠。PKC 主要能将 Ser 305、Ser 293 和 Ser 324 (后者与 Correia 等的报导一致) 磷酸化, 但不能将 Ser 262 磷酸化 (图 9C)。

例 4:

由激酶 NPK110 磷酸化的 MAP2 和 MAP4 位点。

MAP2 和 MAP4 是两种微管相关蛋白, 它们属于与 tau 相同的 MAP-家族, 因为它们与 3 或 4 个内部重复的片段具有高度的同源性, 所述蛋白质通过该片段与微管结合 (作为综述, 参见 Chapin & Bulinski, 1992)。MAP2 主要出现在脑中, 大部分在神经元的体树枝状腔中。与 tau 类似, MAP2 能够因不同的剪接而以不同方式表达 (Kindler 等, 1990): 第二个重复可以缺乏 (此为 “典型的” MAP2); 此外, 残基 152 - 1514 片段 (即: 1830 个残基中的 1363 个残基) 也可以缺失 (产生一种有 467 个残基的蛋白; 这种形式通常被称为 MAP2c)。本文所述的磷酸化实验是用在大肠杆菌中表达的重组 MAP2c 进行的 (表 3)。

表 3

获自第 2 柱的峰	肽编号. (图 11)	cpm	消光 (214 nm)	肽序列	磷酸化残基
1	I	300,000	0.05	1705:CGS*LK (在第二个重复中)	Ser1707
2	II	200,000	0.3	1674:IGS* TDNIK (在第一个重复中)	Ser1676
3	III	100,000	0.8	33:DQGS* GEGLSR 1535:SS*LPP	Ser 37 Ser1536
4	IV	100,000	0.6	1791:LS*NVSS* SGS*IN	Ser1792 Ser1796 Ser1799

注：在磷酸化残基后面标有星号。

残基编号按 Albala 等所述的方法 (1993)

MAP4 是一种普遍存在的 MAP，它可能与有丝分裂有关，它也以几种剪接同种型形式存在 (West 等, 1991)。用一个重组 MAP4 结构进行了磷酸化实验，它含有 C - 末端的 496 个残基 (包括重复结构域) 并在大肠杆菌中表达 (表 4)。

表 4

获自第 2 个柱的峰	肽号 (图 12)	cpm	消光 (214 nm)	肽序列	磷酸化残基
1	I	135,000	0.8	825:SPATT*LP	Thr829
2	II	150,000	0.35	939:VGS* TENIK (在第一个重复中)	Ser941
3	III	120,000	0.35	923:LATTVS* APDLK	Ser928
4	IV	100,000	0.8	872:NT*T*PT* GAAPP	Thr873 Thr874 Thr876
5	V	55,000	0.3	898:SS*GALS* VDK	Ser899 Ser903
6	VI	100,000	0.8	1071:VGS*LD (在第四个重复中)	Ser1073
7	VII	33,000	0.04	923:LATTVS* APDLK	Ser928

注：在磷酸化残基后加有星号

按 west 等 (1991) 的方法对残基进行编号。

磷酸化方法与在例 2 中所述方法相同。用 NPK110 对 MAP2 和 MAP4 进行磷酸化，磷酸化时使用有放射活性的 ATP，用胰蛋白酶消化磷酸化蛋白，并通过双向磷酸肽作图进行分析（图 11 为 MAP2c，图 12 为 MAP4 结构）。然后用 2 个 HPLC 梯度柱进行纯化。对纯化的放射性肽进行测序（用于鉴定磷酸化残基）并通过双向磷酸肽作图进行鉴定。

磷酸化对与微管相互作用的影响：

NPK110 对 MAP2 和 MAP4 的磷酸化作用的影响与 tau 是相同的，也就是说，与微管的亲和性下降几倍，而微管的动力学不稳定性变得更大。例如，这一点可以通过以下现象得到证实：在存在相关的 MAP、激酶 NPK110 和 ATP（为磷酸化所需）的条件下，微管的平均长度下降。图 13 表示采用 MAP4、MAP2 和 MAP2c 时的例子。微管组装从 0 时间开始。空心圆表示在缺少 ATP 时（无磷酸化发生）平均长度的增加。实心圆表示，在有 ATP 的条件下（因此有磷酸化的 MAPs）平均长度仅为对照的大约一半。

所述新型 NPK - 110 的生物学作用可总结如下：

NPK - 110 是作用于 tau、MAP2、MAP2c 和 MAP4 的重复结构域的有效激酶。它能将 tau 里的所有 4 个 KXGS 基序磷酸化，第一个和第 4 个（Ser 262 和 Ser 356）是最明显的位点。就此而言，该激酶再现了获自脑提取物的激酶活性的早先的观察结果（Gustke 等，1992，见图 9）。该激酶最为明显的作用是，它能基本上消除 tau 与微管的结合（图 6B），从而导致 tau 从微管上释放下来，而且它能将稳定的微管转化为动力学上不稳定的微管，如从显微图象上所能看到的。通过点突变型 Ser 262 - Ala 证实，这些作用主要取决于 Ser 262 的磷酸化。这些特征使得 NPK110 成为可用于控制微管在神经元中的组装状态的候选酶。这些作用也与“老年性痴呆的 tau 假说”一致，该假说认为，tau 不能结合微管且不能使微管稳定会导致其分解并停止轴突运输。上述现象既可因为 tau 从微管上解离而发生，又可因为抑制新合成的 tau 与微管结合而发生，这两种情形均因磷酸化而起。根据以上方案，可以减缓 NPK110 作用或终止其潜在的激活级联系统的措施，将适于治疗老年性痴呆。

另外还发现, 基序 KXGS 不仅保守于 tau 重复序列中, 而且也保守于其它 MAPs 中, 如神经元 MAP2 和普遍存在 MAP4 (作为综述, 参见 Chapin 和 Bulinski, 1992)。因此, NPK - 110 可能有一个更普通的作用, 即影响不同的 MAPs 和可能的其它蛋白。可以预计的一个作用是, NPK - 110 参与癌症的发生。

例 5:

对本发明 NPK 的进一步鉴定

cDNA 克隆的说明:

用获自脑 - p110MARK 肽序列的简并寡核苷酸筛选一个大鼠脑 cDNA 文库, 得到 9 个克隆, 对这些克隆进行测序。这些克隆编码来自至少两个不同基因的至少两种不同的激酶, 彼此之间的同源性的 70 %。该肽序列完全符合被称为 MARK - 1 (相当于 NPK - 110) 的较大克隆, 其 5' - 引导末端丢失 (编码蛋白的分子量约为 90kDa)。较小的 cDNA MARK - 2 编码一种 81kDa 的蛋白。在表 5 中列出了适于设计用于筛选所述 cDNA 文库的寡核苷酸的肽。被鉴定的克隆的氨基酸序列示于表 6 中。

同源性

对数据库进行同源性搜寻, 获得两种相关但不相同的序列:

MMKEM (X70764) 即编码一种功能不详的推定蛋白激酶的小鼠 cDNA (Inglis 等, 1993), 表现出与 MARK - 1 有 73 % 的同源性, 和与 MARK2 有 96 % 的同源性。

HUMP78A (M80359) 即一种未公开的人 cDNA 序列, 表现出与 MARK - 1 有 73 % 的同源性, 和与 MARK - 2 有 69 % 的同源性。所有激酶都表现出较低的 (约 25 %) 对获自酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的 KIN1 和 KIN2 蛋白的同源性 (Levin 等, 1987, 1990)。

组织分布

通过 Northern 印迹 (图 14) 判断, MARK - 1 和 MARK - 2 的 mRNA 能普遍在胎儿组织和成体组织中表达。在肌肉、脑和胎儿 (而不是成体) 肾中的表达水平最高。

活性

由脑制得的 p110/MARK 的活性至少比在大肠杆菌中表达的

MARK 高 100 倍。该活性取决于 MARK 本身在 Ser 和/或 Thr 残基上的磷酸化，因为在用磷酸酶脱磷酸化之后，所有活性丧失。

p110/MARK 的磷酸化在 SDS 凝胶上出现 110kD 的表观分子量，而由 cDNA 测序预测的分子量为 90kD。这种表观分子量的变化常见于磷酸蛋白。

目标

p110MARK 不仅能将 tau 蛋白磷酸化，而且能将相关的 MAPs，如 MAP2 或 MAP2c（神经元 MAPs 大部分限于体树枝状腔中）和 MAP4（一种遍在 MAP）磷酸化，表明了这种酶的普遍功能。在这些 MAPs 中的主要磷酸化位点是类似的，即位于重复结构域中的 KXGS 基序里的丝氨酸。磷酸化作用也相当，即 MAPs 的微管结合能力明显降低，因此丧失微管稳定性（作为实例见图 15、16）。

表 5

通过 LysC 降解从猪脑 MARK 制剂中得到的肽序列。
级分序列：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
21																				
33-12* P	D	R	W	M	N	V	G	H	E	E	E	E	L	K	P	Y	A	E	P	E
41	I	A	N	E	L	K														
47-16	A	E	N	L	L	L	D	A	D	M	N	I	K							
71-09*	X	S	S	R	Q	N	I	P	R	C	R	N	N	I	I					
85	I	L	N	H	P	N	I	V	K											
87-24*	L	D	T	F	C	G	S	P	P	Y	A	A	P	E	L	F	Q	G	K	
120	L	F	V	L	N	P	I	K												
121	L	F	R	E	V	R	I	X												
130-13	Y	R	I	P	F	Y	M	S	T	D	C	E	N							

140-9 F R Q I V S A V Q Y C H Q K
140-20 R I E I M V T M G F L

表 6

与获自大鼠 (*Rattus norvegicus*) cDNA 文库的 MARK - 1 和 MARK - 2 的 cDNA 序列相应的氨基酸序列。

MARK - 1 (较大, 部分 cDNA 克隆) 残基总数: 779 .

MARK - 2 (较小, 完整 cDNA 克隆) 残基总数: 722 .

表示两个对齐的残基的字母相同时用 ‘|’ 表示:

MARK-1	-	TENHTSVDGYTETHIPP-----TKSSSRQNIPRCRNSITS	-35
MARK-2	-	MSS-ARTPLPTLNERDTEQPTLGHLDSKPSSKSNMLRGRNSATS	-43
MARK-1	-	ATDEQPHIGNYRLQKTIGKGNFAKVKLARHVLTGREAVVKIIDKTQLNPT	-85
MARK-2	-	A-DEQPHIGNYRLKKTIGKGNFAKVKLARHILTGKEVAVKIIDKTQLNSS	-92
MARK-1	-	SLQKLFREVRIMKILNHPNIVKLFEVIETEXTLYLVMEYASGGGEVFDYLV	-135
MARK-2	-	SLQKLFREVRIMKVLNHPNIVKLFEVIETEXTLYLVMEYASGGGEVFDYLV	-142
MARK-1	-	AHGRMKEKEARAKFRQIVSAVQYCHQKCIVHRDLKAENLLLDADMNIKIA	-185
MARK-2	-	AHGRMKEKEARAKFRQIVSAVQYCHHKFIVHRDLKAENLLLDADMNIKIA	-192
MARK-1	-	DFGFSNEFTVGNKLDTCGSPPYAAPELFQGKKYDGP EVDVWSLGVILYT	-235
MARK-2	-	DFGFSNEFTVGNKLDTCGSPPYAAPELFQGKKYDGP EVDVWSLGVILYT	-242
MARK-1	-	LVSGSLPFDGQNLKELRERSCLRGKYRVPFYMSTDCENLLKKLLVLNPIK	-285
MARK-2	-	LVSGSLPFDGQNLKELRERV-LRGKYRIPFYMSTDCENLLKKFLILNPSK	-291

```

MARK-1 - PGSLEQIMKDRWMNVGHEEEELKPYSEPELDLNDIAKRIDIMVTMGFARDE -335
      || ||||| ||||| ||||| || || || || || || || ||
MARK-2 - RGTLEQIMKDRWMNVGHEDDELKPYVEPLPDYKDP RRTTELMVSMGYTREE -341

MARK-1 - INDALVSQKYDEVMTATYILLGRKPPEFEGGESLSSGNLCQSRSPSSDLNN -385
      || || || || ||||| ||||| || || || || || || || ||
MARK-2 - IQDSLVGQRYNEVMATYLLLGYKSSELEG-----DTITLKPRPSADLTN -385

MARK-1 - STLQSPAHLKVQRTISANQKQRRFSDHAGPSIPPAVSYTKRPQANSVESE -435
      | || || ||||| ||||| ||||| || || || || || || || ||
MARK-2 - SSAPSPSH-KVQRSVSANPKQRRSSDQAVPAIPTSNSSYSKKTQSNNNAENK -434

MARK-1 - QKEEWDKDTARRLGSTTVGSKSEVTASPLVGPDRKKSSAGPS-NNVYSGG -484
      || || || || || || || || || || || || || || || || ||
MARK-2 - RPEE---ETGRK-----ASSTAKVPASPLPGLDRKKTTPPTNSVLSTS -476

MARK-1 - SMTRRNTYVCERSTDRYAALQNGRDSSLTEMSASSMSSTGSTVASAGPSA -534
      || || || || || || || || || || || || || || || || ||
MARK-2 - TNRSRNSPLLDRLASLGQASIQNGKDST----- -503

MARK-1 - RPRHQKSMSTSGHPIKVTLPTIKDGSEAYRPGTAQRVPAASPSAHSISAS -584
      || || || || || || || || || || || || || || || || ||
MARK-2 - -----APQRPVVASPSAHNISS -521

MARK-1 - T--PDRTRFPRGSSSRSTFHGEQLRERR---SAAYSGPPASPSHDTAALA -629
      ||||| ||||| ||||| ||||| || || || || || || || || ||
MARK-2 - SGAPDRTNFPRGVSSSRSTFHAGQLRQVRDQQNLPGFVTPASPS---GHS -567

MARK-1 - HARRGTSTGIISKITSKFVRRDPSEGEASGRDTRAR---GSSGEPKDKE -675
      ||||| || || || ||||| ||||| || || || || || || || || ||
MARK-2 - QGRRGPSGSIFSFTSKFVRRNLNEPESKDRVETLRPHVVGGGGTDKEKE -617

MARK-1 - EGKEAKPR-LRFTWSMKTTSMDPNDMVREIRKVL DANTCDYEQRERFLL -724
      | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| || || || ||
MARK-2 - EFREAKPRSLRFTWSMKTTSMEPNEMMREIRKVL DANCQSELHERYML -667

MARK-1 - FCVHGDAHQDSLQVWEMEVCKLPRLSLNGVRFKRISGTSIAFKNIASKIA -774
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
MARK-2 - LCVHGTGPHENFVQWEMEVCKLPRLSLNGVRFKRISGTSMAFKNIASKIA -717

MARK-1 - NELKL -779
      |||||
MARK-2 - NELKL -722

```

参考文献:

Albala, J.S. Kalcheva, N., Schafit-Zagardo, B. (1993). 编码两种人微管相关蛋白 - 2 (MAP - 2) 的转录物的鉴定。 *Gene* 136, 377-378 .

Anderton, B.H. (1993). 老年性痴呆中病理性蛋白的表达和加工。 *Hippocampus* 3, 227 - 237 .

Baas, P.W., Pienkowski, T.P. , 和 Kosik, K.S. (1991). 由于 tau 在 Sf9 - 细胞中表达所诱发的过程, 具有类轴突微管结构。 *J. Cell Biol.* 115, 1333-1344 .

Baumann, K., Mandeldow, E.-M., Biernat, J., Piwnica-Worms, H., Mandelkow, E.(1993). 由细胞周期素依赖型激酶 cdk2 和 cdk5 对 tau 蛋白进行的异常类老年性痴呆磷酸化。

Berling, B., Wille, H., Röhl, B., Mandeldow, E.-M., Garner, C., Mandelkow, E.(1994). 由针对脯氨酸的激酶在体内和体外对微管相关蛋白 MAP2a、 b 和 MAP2c 的 Ser 136 进行的磷酸化。 *Eur. J. Cell Biol.* 64,120-130 .

Biernat, J., Mandelkow, E.-M., Schroter, C., Lichtenberg-Kraag, B., Steiner, B., Berling, B., Meyer, H.E., Mercken, M., Vandermeeren, A., Goedert, M., Mandelkow, E.(1992). tau 蛋白转换到类老年性痴呆状态, 包括位于微管结合区上游的两个丝氨酸 - 脯氨酸基序的磷酸化。 *EMBO J.* 11, 1593 - 1597 .

Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E.-M., Mandelkow, E.(1993). Ser262 的磷酸化明显降低 tau 蛋白与微管的结合: 类 PHF 免疫活性与微管结合的区别。 *Neuron* 11, 153 - 163 .

Boyle, W.J., Van der Geer, P.和 Hunter, T.(1991). 通过双向分离在薄层纤维素板上进行的磷酸肽作图和磷酸氨基酸分析。 *Methods Enzymol.* 201, 110-149 .

Bramblett, G.T., Goedert, M., Jakes, R., Merrick, S.E., Trojanowski, J. Q., 和 Lee, V.M.Y.(1993). 老年性痴呆 Ser (396) 的异常 tau 磷酸化, 重谈发展并导致微管结合下降。 *Neuron* 10, 1089-1099 .

Brandt, R.和 Lee, G.(1993). 微管相关蛋白 tau 的功能结构: 在体外影响微管生长、成核和束形成的区域的鉴定。 *J. Biol. Chem.* 268, 3414-3419.

Brion, J.P., Hanger, D.P., Couck, A.M., 和 Anderton, B.H.(1991). 老年性痴呆的 A68 蛋白是由几种磷酸化状态的 tau 同种型组成, 磷酸化会影响其电泳迁移率。 *Biochem. J.* 279, 831-836.

Brugg, B., 和 Matus, A.(1991). 在活细胞中决定微管相关蛋白 - 2 (MAP2) 与微管结合的磷酸化。 *J. Cell Biol.* 114, 735-743.

Butler, M.和 Shelanski, M.L.(1986). 微管相关 tau 蛋白的微不均一性是由于磷酸化的差异。 *J. Neurochem.* 47, 1517-1522.

Butner, K.A., 和 Kirschner, M.W.(1991). tau 蛋白通过一排灵活分布的弱位点与微管结合。 *J. Cell Biol.* 115, 717-730.

Casnelli, J.E. (1991). 用具有碱性残基的肽分析蛋白激酶与磷酸纤维素的结合。

Chapin, S.J.和 Bulinski, J.C.(1991). 非神经元 210kD Mn 微管相关蛋白 (MAP4) 含有一个与神经元 MAP2 和 tau 的微管结合域同源的结构域。 *J. Cell Sci.* 98, 27-36.

Chapin, S.J.和 Bulinski, J.C.(1992). 通过组装 - 促进微管相关蛋白的微管稳定化: 一种重复性能。 *Cell Mot. Cytoskel.* 23, 236-243.

Chen, J., Kanai, Y., Cowan, N., Hirokawa, No (1992). MAP2 与 tau 的突出结构域决定树突中的微管与轴突的间隙。 *Nature* 360, 674-677.

Cleveland, D.W., Hwo, S.-Y.和 Kirschner, M.W.(1977). tau - 一种由纯化的微管蛋白诱导微管组装的微管相关蛋白。 *J. Mol. Biol.* 116, 207-225.

Correas, I., Diaznido, J., 和 Avila, J.(1992). 微管相关蛋白 tau 上的微管蛋白结合域被蛋白激酶 C 磷酸化。 *J. Biol. Chem.* 267, 157221-15728.

Drechsel, D.N., Hyman, A.A., Cobb, M.H., 和 Kirschner,

M.W.(1992). 通过微管相关蛋白 tau 调节微管蛋白组装的动力学不稳定性。 *Mol. Biol. Cell* 3, 1141-1154 .

Drewes, G., Lichtenberg-kraag, B., Döring, F., Mandelkow, E.-M., Biernat, J., Goris J., Doree, M.和 Mandelkow, E.(1992).促分裂原活化蛋白 (MAP) 激酶将 tau 蛋白转化成类 Alzheimer 状态, *EMBO J.* 11, 2131-2138 .

Drewes, G., Mandelkow, E.-M., Baumann, K., Goris,J., Merlevede ,W., Mandelkow, E.(1993).由钙调磷酸酶和磷酸酶 - 2A 进行的 tau 蛋白和 Alzheimer 成对螺旋丝的脱磷酸化。 *FEBS Lett.* 336, 425-432 .

Drubin, D.和 Kirschner, M.(1986).Tau 蛋白在活细胞中的作用。 *J. Cell Biol.* 103, 2739-2746 .

Ennulat, D.J., Liem, R.K.H., Hashim, G.A.和 Shelanski, M.L.(1989). tau 的两个独立的有 18 个氨基酸的结构域能促进微管蛋白聚合。 *J. Biol. Chem.* 264, 5327-5330 .

Geahlen, R.L., Anostario, M., Low, P.S., 和 Harrison, M.L.(1986).在 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳中检测蛋白激酶活性。 *Anal. Biochem.*, 153, 151-158 .

Goedert, M., Spillantini, M., Jakes, R., Rutherford, D., 和 Crowther, R.A. (1989). 人微管相关蛋白 - tau 的多种同种型: 老年性痴呆的神经纤维缠结的序列和定位。 *Neuron* 3, 519 - 526 .

Goedert, M., Spillantini, G., Cairns, N.J.和 Crowther, R.A.(1992). Alzheimer 成对螺旋丝的 Tau 蛋白: 所有 6 种脑同种型的异常磷酸化。 *Neuron* 8, 159-108 .

Goedert, M.(1993).老年性痴呆的 Tau 蛋白和神经原纤维病理学。 *Trends in Neurosci.* 16, 460-465 .

Gong, C.X., Singh T.J., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K.(1994).通过蛋白磷酸酶 - 2b (钙调磷酸酶) 将老年性痴呆的异常磷酸化 tau 脱磷酸化。 *J. Neurochem.* 62, 803-806 .

Goode, B.L.和 Feinstein, S.C.(1994).鉴定位于 tau 的发育调节的内重复区内的一个新的微管结合和组装结构域。 *J. Cell Biol.* 124, 769-782 .

Greenberg, S.G., Davies, P., Schein, J.D., Binder, L. I.(1992). 氢氟酸处理的 tau - PHF 蛋白表现出与正常 tau 相同的生化特性。 J. Biol. Chem. 267, 564-569 .

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y., Quinlan, M., Wisniewski, H., Binder, L.(1986). Alzheimer 细胞骨架病理学中微管相关蛋白 tau 的异常磷酸化。 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 4913-4917 .

Gustke, N., Steiner, B., Mandelkow, E.-M., Biernat, J., Meyer, H.E., Goedert, M., Mandelkow, E.(1992). tau 蛋白的类 Alzheimer 磷酸化能减少微管结合并与 Ser-Pro 和 Thr-Pro 基序有关。 FEBS Letters 307, 199-205 .

Gustke, N., Trinczek, B., Biernat, J., Mandelkow, E.-M., Mandelkow, E.(1994). Tau 蛋白的结构域及与微管的相互作用。 生物化学 33 , 9511 - 9522 .

Hagestedt, T., Lichtenberg, B., Wille, H, Mandelkow, E.-M. 和 Mandelkow, E.(1989).磷酸化后 tau 蛋白变长变硬: 次晶结构与磷酸化程度之间的关系。 J. Cell Biol. 109, 1643-1651 .

Hanger, D., Hughes, K., Woodgett, J., Brion, J., Anderton, B.(1992).糖元合酶激酶 - 3 诱发 tau 的老年性痴呆样磷酸化: 成对螺旋丝表位的产生和激酶的神经元定位。 Neurosci. Lett. 147, 58-62 .

Hanks, S.K., 和 Quinn, A.M.(1991).蛋白激酶催化功能域序列数据库: 一级结构的保守特征的鉴定和家族成员的分类。 Meth. Enzymol. 200, 38-62 .

Hasegawa, M., Morishima-Kawashima, M., Takio, K., Suzuki, M., Titani, K., Ihara, Y.(1992).老年性痴呆患者脑中的 tau 的蛋白序列和质谱分析。 J. Biol. Chem. 267, 17047-17054 .

Himmler, A., Drechsel, D., Kirschner, M. 和 Martin, D.(1989).Tau 组成一组具有重复的 C - 末端微管结合域和可变的 N - 末端结构域的蛋白。 Molec. Cell. Biol. 9,1381-1388 .

Hirokawa, N.(1994).取决于微管相关蛋白的微管结构和动力学。 Curr Opin Cell Biol. 6, 74-81 .

Hirs, C.H.W.(1967). 半胱氨酸残基的修饰。 *Methods Enzymol.* 11, 325-329。

Inglis, J.D., Lee, M., Hill, R.E.(1993). Emk, 一种在酵母图与小鼠染色体 - 19 具有同源性的蛋白激酶。 *Mamm. Genome* 4, 401-403。

Ishiguro, K., Omori, A., Sato, K., Tomizawa, K., Imahori, K., 和 Uchida, T.(1991). 丝氨酸、苏氨酸、脯氨酸激酶活性包含于组成一种成对螺旋丝表位的 tau 蛋白激酶级分中。 *Neurosci. Lett.* 128, 195-198。

Joly, J.C., 和 Purich, D.L. (1990). 相应于图谱 - 2 上的第二个重复序列的肽能抑制微管相关蛋白与微管的结合。 *Biochemistry* 29, 8916-8920。

Kanemaru, K., Takio, K., Miura, R., Titani, K., 和 Ihara, Y.(1992). 成对螺旋丝上 tau 的胎儿型磷酸化。 *J. Neurochem.* 58, 1667-1675。

Kemp, B.E. 和 Pearson, R.B.(1990). 蛋白激酶识别序列基序。 *TIBS* 15, 342 - 346。

Kindler, S., Schwanke, B., Schulz, B. 和 Garner, C.C.(1990). 编码大鼠高分子量和低分子量 MAP2 的完整 cDNA 序列。 *Nucl. Acids Res.* 18, 2822。

Kobayashi, S., Ishiguro, K., Omori, A., Takamatsu, M., Arioka, M., Imahori, K., Uchida, T.(1993). 一种 cdc2-相关激酶 pssalre/cdk5 与 tau 蛋白激酶 - ii 的 30kDa 亚基同源, 它是一种针对脯氨酸的蛋白激酶, 与微管相关。 *FEBS Letters* 335, 171-175。

Kondo, J., Honda, T., Mori, H., Hamada, Y., Miura, R., Ogawara, M. 和 Ihara, Y.(1988). tau 上与成对螺旋丝紧密结合的第三个羧基。 *Neuron* 1, 827 - 834。

Ksiezak-Reding, H., 和 Yen, S.H.(1991). 成对螺旋丝的结构稳定性需要 tau 的微管结合域: 一种自体结合模式。 *Neuron* 6, 717 - 728。

Ksiezak-Reding, H., Liu, W.K., 和 Yen, S.H.(1992). 与成对螺旋丝相关的修饰 tau 的磷酸分析和脱磷酸化。 *Brain Res.* 597,

Lang, E., Szendrei, G.I., Lee, V. M.Y.和 Otvos, L.(1992). 老年性痴呆病中成对螺旋丝上磷酸化优势免疫表位的免疫及构象特征. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 187, 783-790 .

Lee, G., Neve, R.L.和 Kosik, K.S.(1989). tau 蛋白的微管结合域. *Neuron* 2, 1615-1624 .

Lee, V.M.Y., Balin, B.J., Otvos, L.和 Trojanowski, J.Q.(1991). A68-成对螺旋丝的主要亚基和正常 tau 的衍生化形式. *Science(wash.)* 251, 675-678 .

Lee, V.M.Y.和 Trojanowski, J.Q.(1992). 老年性痴呆中失调的神经元细胞骨架. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2, 653-656 .

Lee, G.和 Rook, S. (1992).tau 蛋白在非神经元细胞里的表达: 微管结合及稳定化. *J. cell Sci.* 102, 227-237 .

Lee, G.(1993).非运动微管相关蛋白. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 88-94 .

Levin, D.E., Bishop, J.M.(1990). 对粟酒裂殖酵母的生长极化有重要作用的一个推定蛋白激酶基因 (Kin1 +). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 8272-8276 .

Levin, D.E. Hammond, C.I., Ralston, R.O., Bishop, J.M.(1987). 编码不常见的蛋白激酶的两种植物基因. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 6035-6039 .

Lichtenberg-Kraag, B., Mandelkow, E.-M., Biernat, J., Steiner, B., Schröter, C., Gustke, N., Meyer, H.E., Mandelkow, E.(1992). 依赖于磷酸化的神经丝抗体与 tau 蛋白之间的相互作用: 表位、磷酸化位点、及与 Alzheimer tau 的关系. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 89, 5384-5388 .

Mandelkow, E.-M., Herrmann, M.和 Rühl, U.(1985).通过亚基特异抗体和有限蛋白酶解测到的微管蛋白结构域. *J. Mol. Biol.* 185, 311-327 .

Mandelkow, E.-M., Drewes, G., Biernat, J., Gustke, N., Van Lint, J., Vandenheede, J.R.和 Mandelkow, E.(1992).糖元合酶激酶 - 3 和微管相关蛋白 tau 的类 Alzheimer 状态. *FEBS Lett.* 314,

315-321 .

Mandelkow, E.-M.和 Mandelkow, E.(1993). 作为老年性痴呆标记的 tau. TIBS 18, 480 - 483 .

Mercken, M., Vandermeeren, M., Lübke, U., Six, J., Boons, J., Van de Voorde, A., Martin, J.-J.和 Gheuens, J.(1992). 具有对 Alzheimer tau 的选择特异性的单克隆抗体, 其针对磷酸酶敏感表位. Acta Neuropathol. 84, 265-272 .

Meyer, H.E., Hoffmann-Posorske, E. 和 Heilmeyer, L.M.G.(1991). 通过转化成 S - 乙基 - 半胱氨酸测定并定位蛋白和肽里的磷酸丝氨酸. Meth. Enzymol. 201, 169-185 .

Paudel, H., Lew, J., Ali, Z., Wang, J.(1993). 脑中针对脯氨酸的蛋白激酶能将位于与 Alzheimer's 成对螺旋丝相关的被异常磷酸化的 tau 上的位点磷酸化. J. Biol. Chem. 268, 23512-23518 .

Schweers, D., Schonbrunn-Hanebeck, E., Marx, A., Mandelkow, E.(1994). tau 蛋白和 Alzheimer 成对螺旋丝的结构研究, 未发现 β 结构. J. Biol. Chem. 269, 24290-24197 .

Scott, C., Spreen, R., Herman, J., Chow, F., Davison, M., Young, J., Caputo, C.(1993). 用依赖于 cAMP 的蛋白激酶对重组 tau 进行磷酸化: 鉴定微管组装的磷酸化位点和作用. J. Biol. Chem. 268, 1166-1173 .

Steiner, B., Mandelkow, E.-M., Biernat, J., Gustke, N., Meyer, H.E., Schmidt, B., Mieskes, G., Söling, H.D., Drechsel, D., Kirschner, M.W., Goedert, M.和 Mandelkow, E.(1990). 微管相关蛋白 tau 的磷酸化: Ca^{++} - 钙调蛋白依赖型位点的鉴定及与 Alzheimer 缠绕中 tau 磷酸化的关系. EMBO. J. 9, 3539-3544 .

Steiner, B.(1993). 微管相关蛋白 tau 的磷酸化及其在老年性痴呆中的作用. PhD Thesis, University of Hamburg .

Studier, W.F., Resenberg, A.H., Dunn, J.J.和 Dubendorff, J.W.(1990). 用 T7RNA 聚合酶指导克隆基因的表达. Meth. Enzym. 185, 60-89 .

Tarr, G.E., Black, S.D., Fujita, V.S.和 Coon, M.J.(1983). 获自兔肝微粒体的、苯巴比妥诱导的细胞色素 P - 450 同工酶 2 的

完整氨基酸序列及预测的膜拓扑结构。 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6552-6556。

Trinczek, B., Marx, A., Mandelkow, E.-M., Murphy, D.B.和 Mandelkow, E.(1993). 获自红细胞边缘带的微管动力学。 *Molec. Biol. Cell* 4, 323-335。

Vulliet, R., Halloran, S., Braun, R., Smith, A.和 Lee, G.(1992)。 人 tau 蛋白针对脯氨酸的磷酸化。 *J. Biol. Chem.* 267, 22570-22574。

Watanabe, A., Hasegawa, M., Suzuki, M., Takio, K., Morishima-Kawashima, M., Titani, K., Arai, T., Kosik, K.S., 和 Ihara, Y.(1993). 胎儿及成体大鼠 tau 的体内磷酸化位点。 *J. Biol. Chem.* 268., 25712-25717。

West, R.R., Tenbarge, K.M.,和 Olmsted, J.B.(1991). 一种微管相关蛋白 - 4 结构的模型: 通过比较人、小鼠和牛序列确定的结构域。 *J. Biol. Chem.* 266, 21886-21896。

Wille, H., Drewes, G., Biernat J., Mandelkow, E.-M., Mandelkow, E.(1992)。 由微管相关蛋白 tau 在体外形成的类 Alzheimer 成对螺旋丝和反平行双体。 *J. Cell Biol.* 118, 573-584。

Wischik, C., Novak, M., Thogersen, H., Edwards, P., Runswick, M., Jakes, R., Walker, J. Milstein, C, Roth, M.和 Klug, A.(1988)。 从老年性痴呆病的成对螺旋丝的核心提取 tau 片段。 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4506-4510。

Diagram illustrating the structure of the 1.2 kb BamHI fragment of the pTZ19 vector. The map shows the N (NheI) and C (ClaI) ends, and various functional regions and restriction sites. Key features include:

- SP (Shaded Region):** Located between 46 and 199, and between 235 and 396.
- TP (TetR binding site):** Located at 181 and 212.
- IGS (Initiation Start):** Located at 262.
- Restriction Sites:** SP (46), TP (181), TP (212), IGS (262), SP (235), SP (396), SP (404), and SP (422).
- Segments:** The map is divided into segments labeled 1, 2, 3, and 4.

Q244 **E372**

1	2	3	4
---	---	---	---

- 1 -

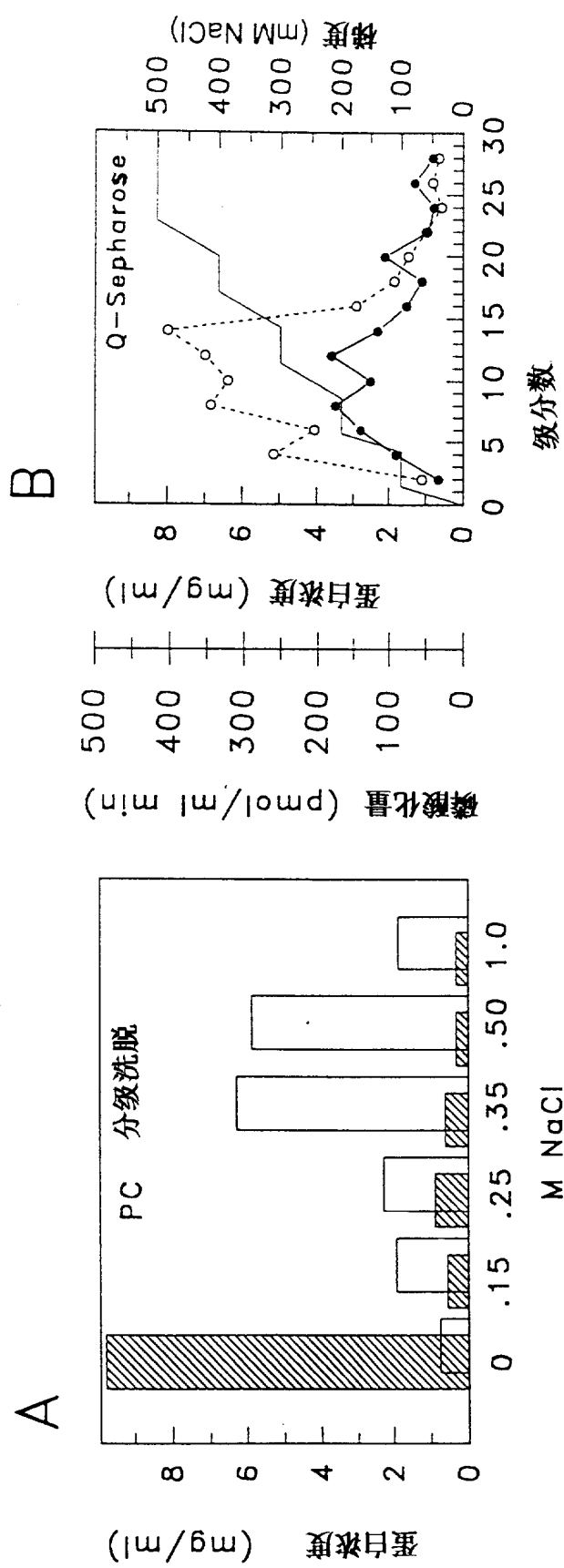
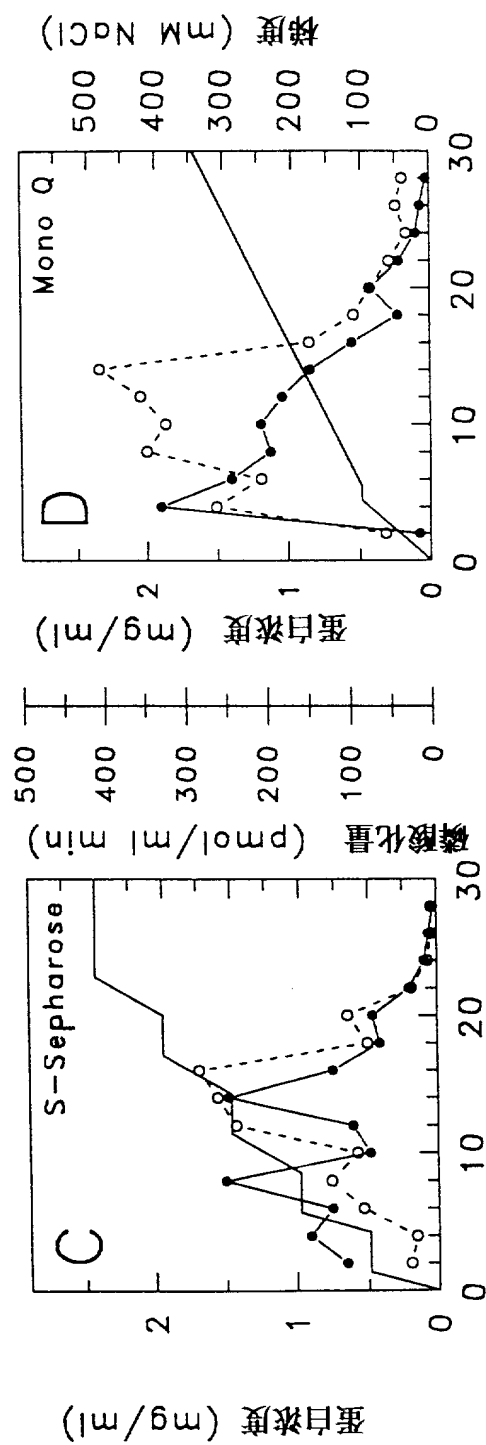
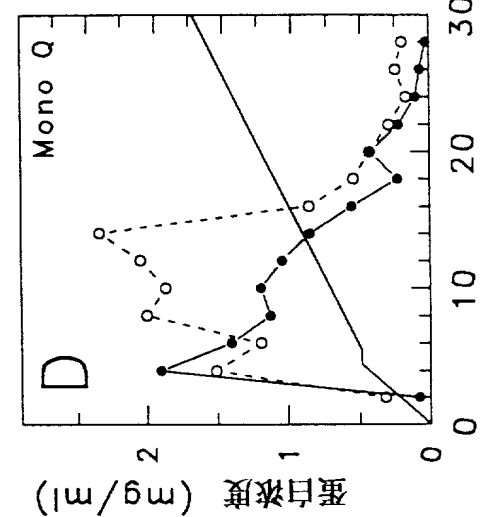
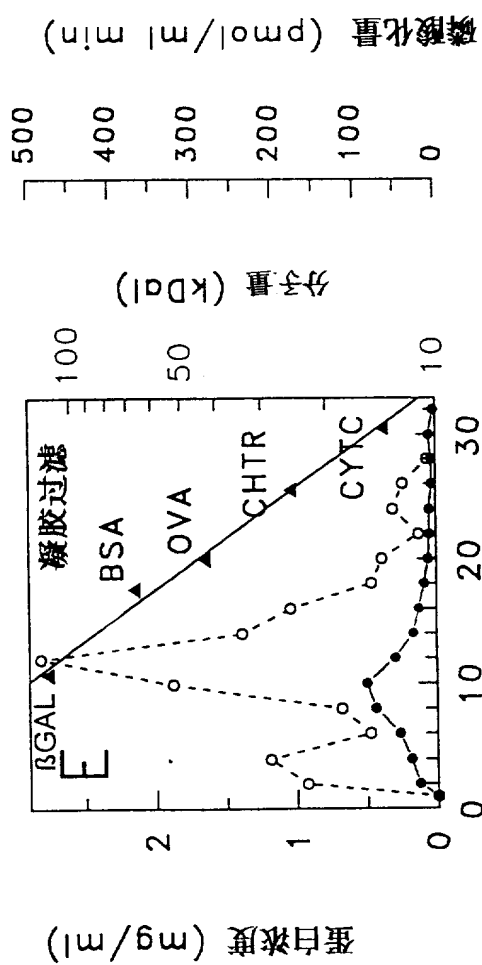


图 2 A,B



级分数



级分数

图 2 C,D,E

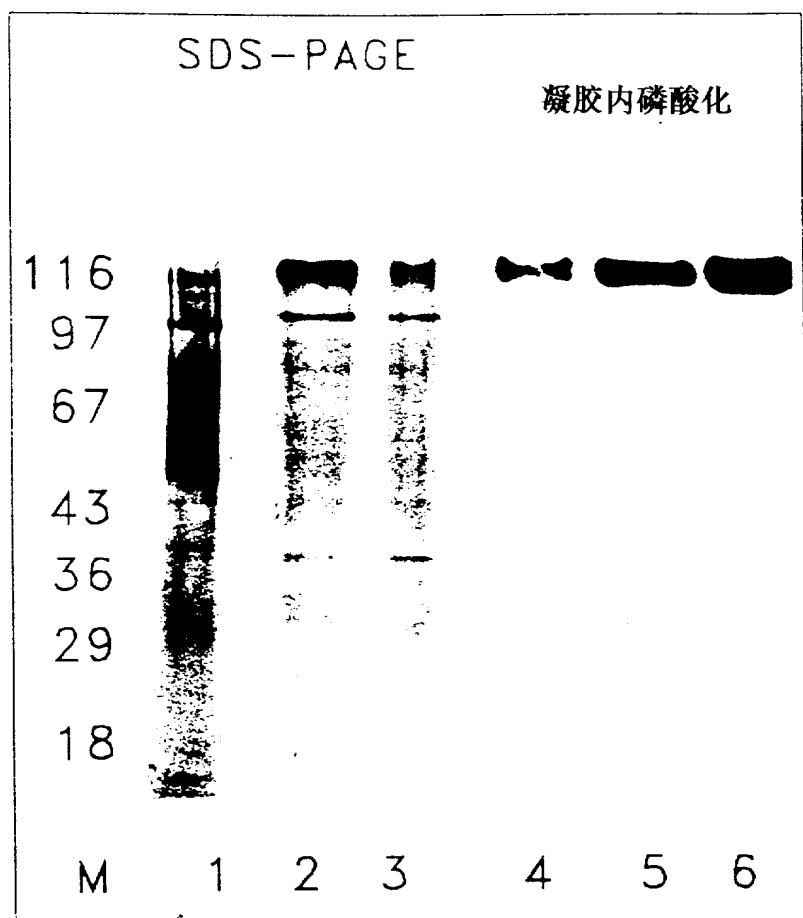


图3

放射性自显影

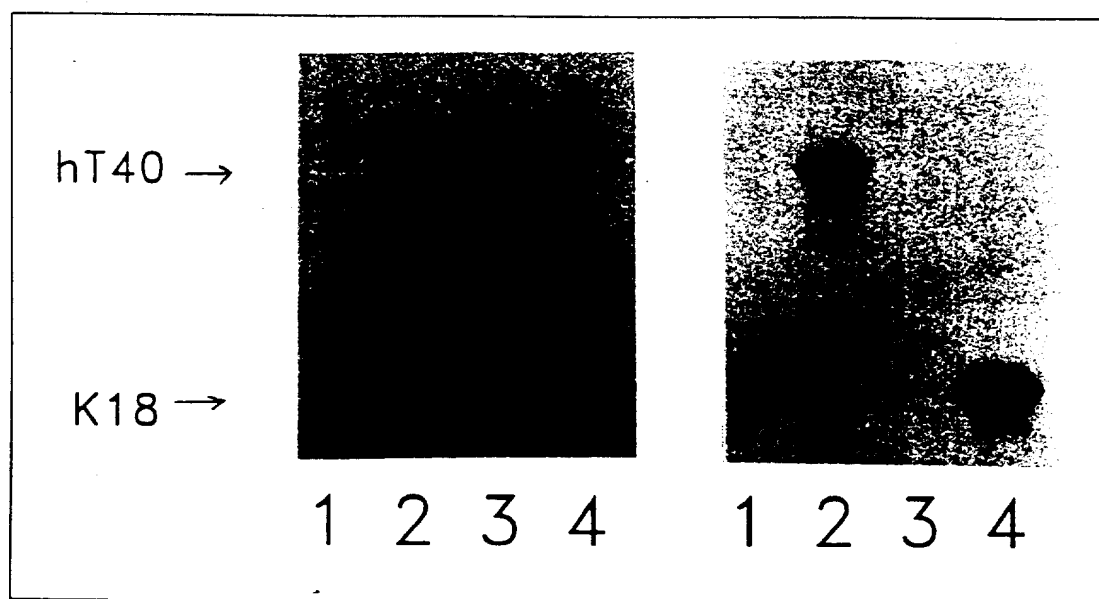


图 4

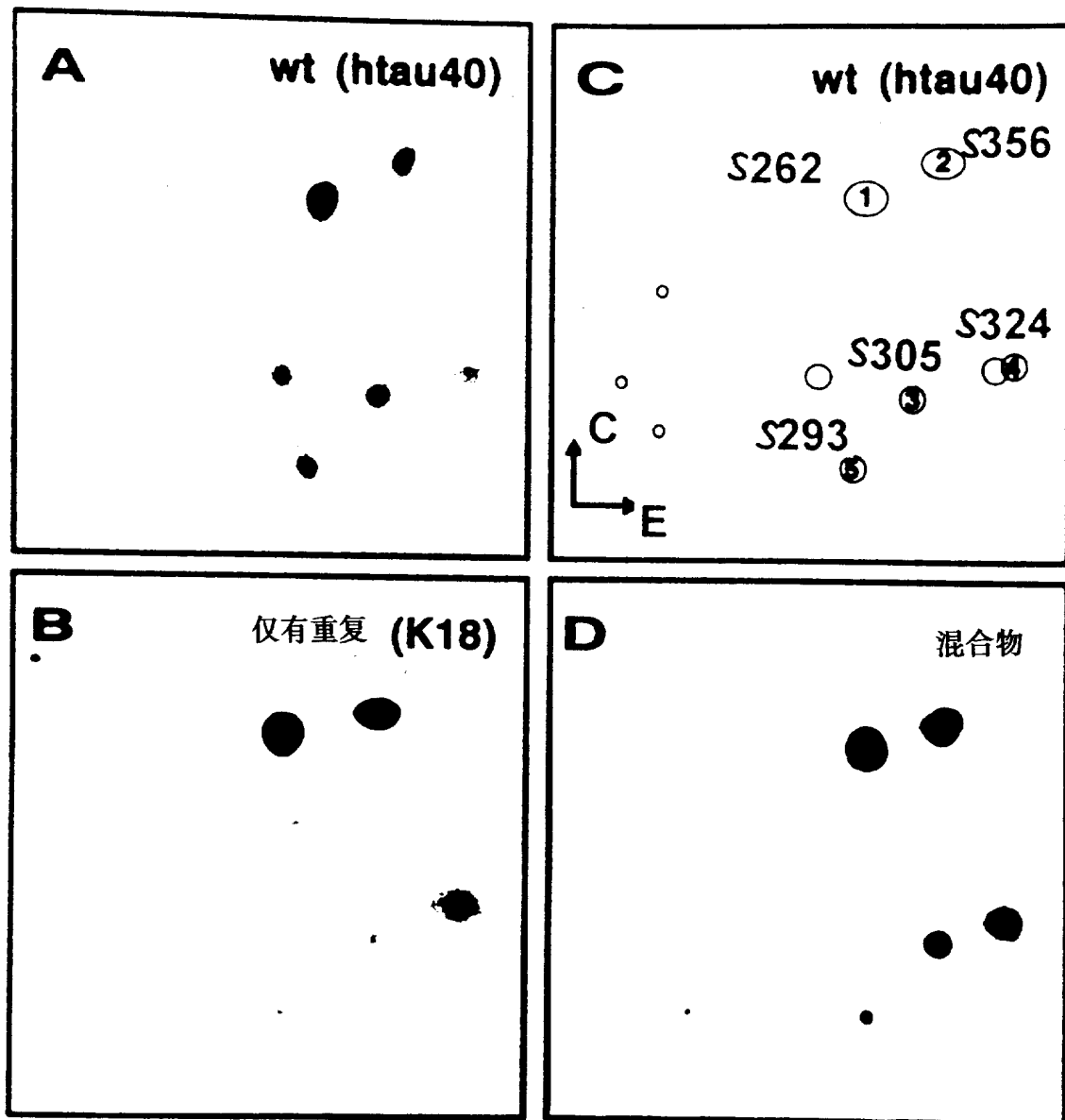


图 5

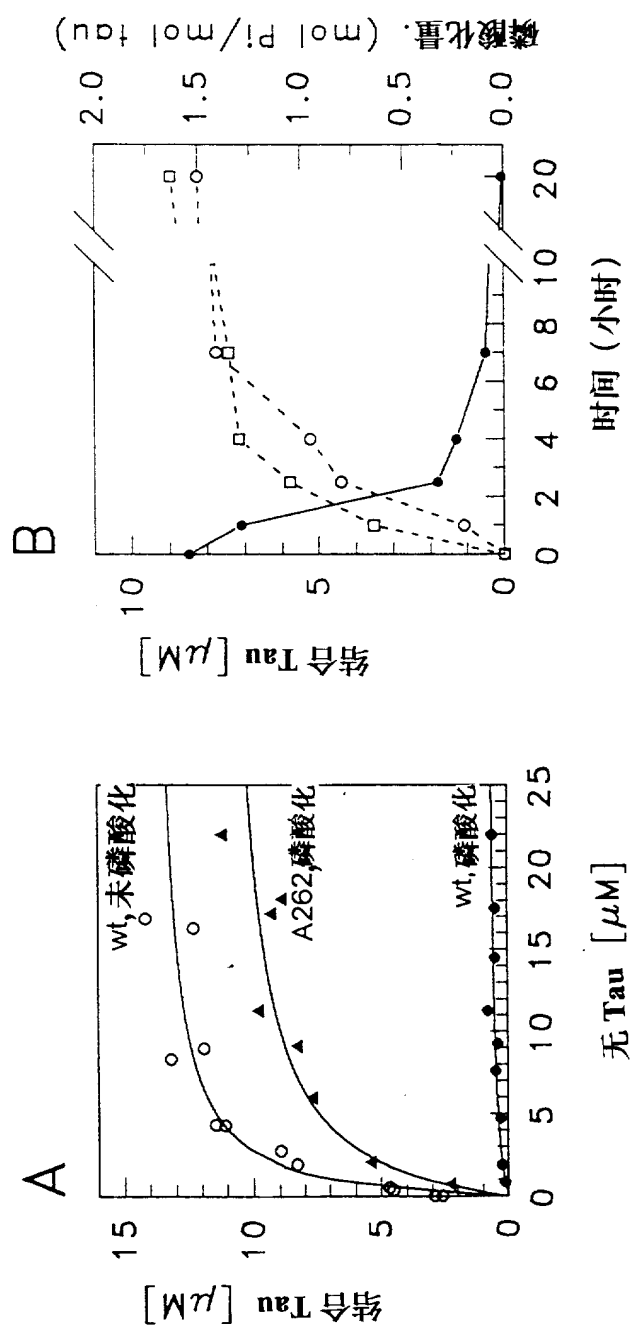
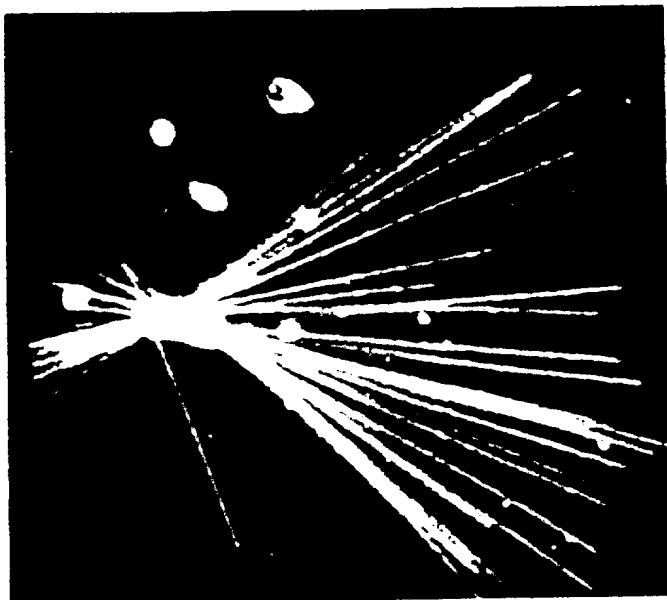


图 6

a)



b)



10 μm —

图7

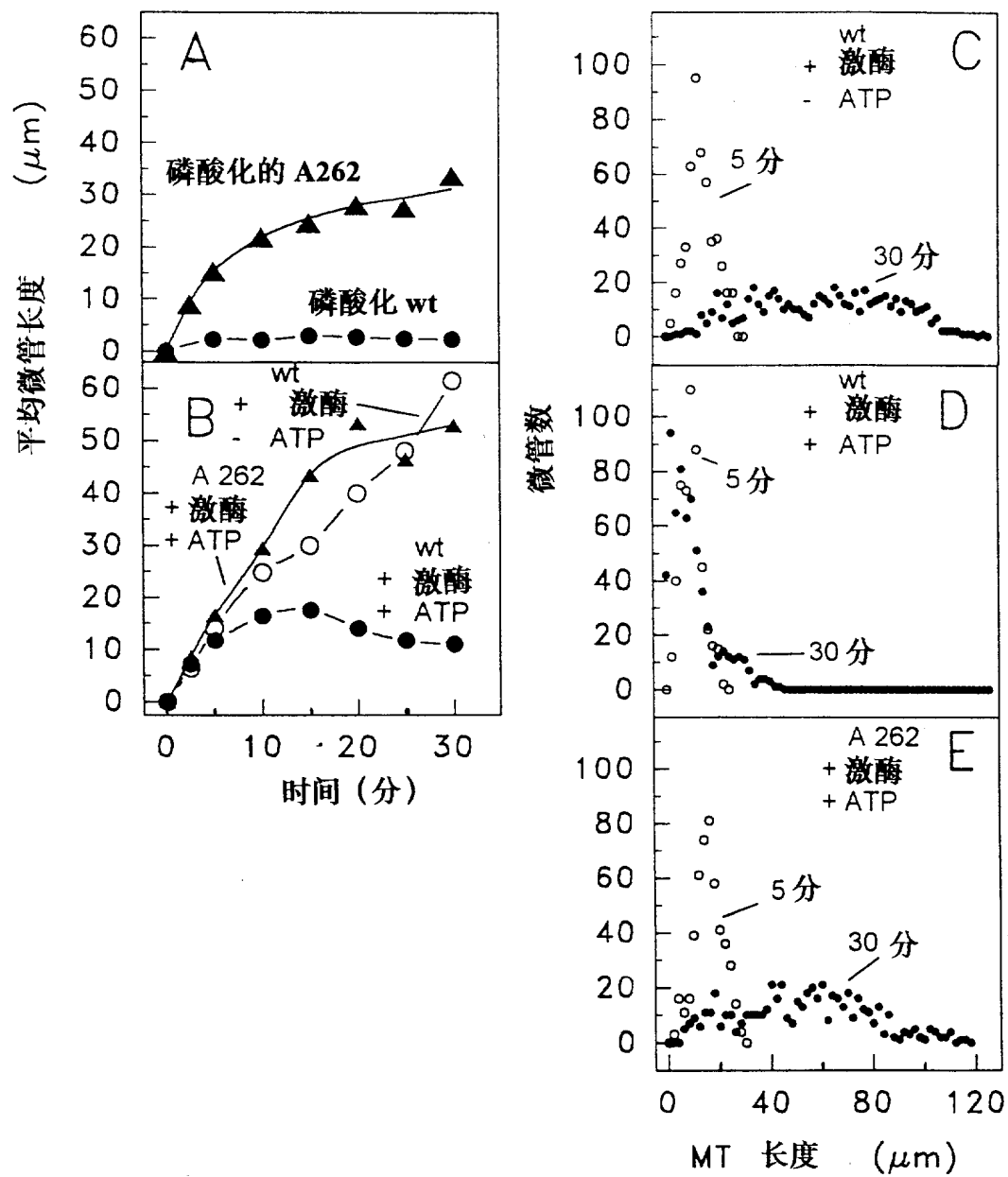


图 8

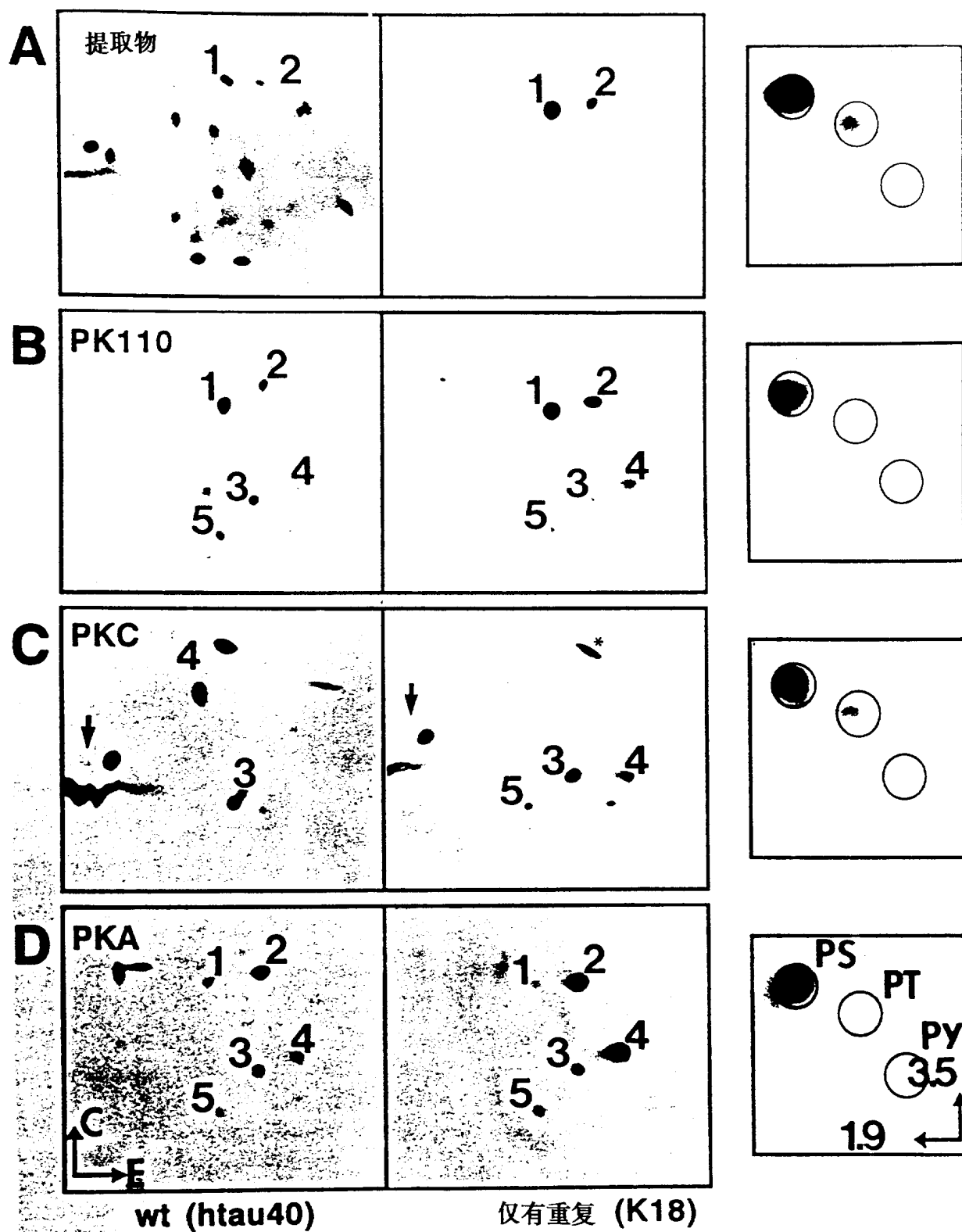


图 9

Ser262

磷酸化对微管结合的影响

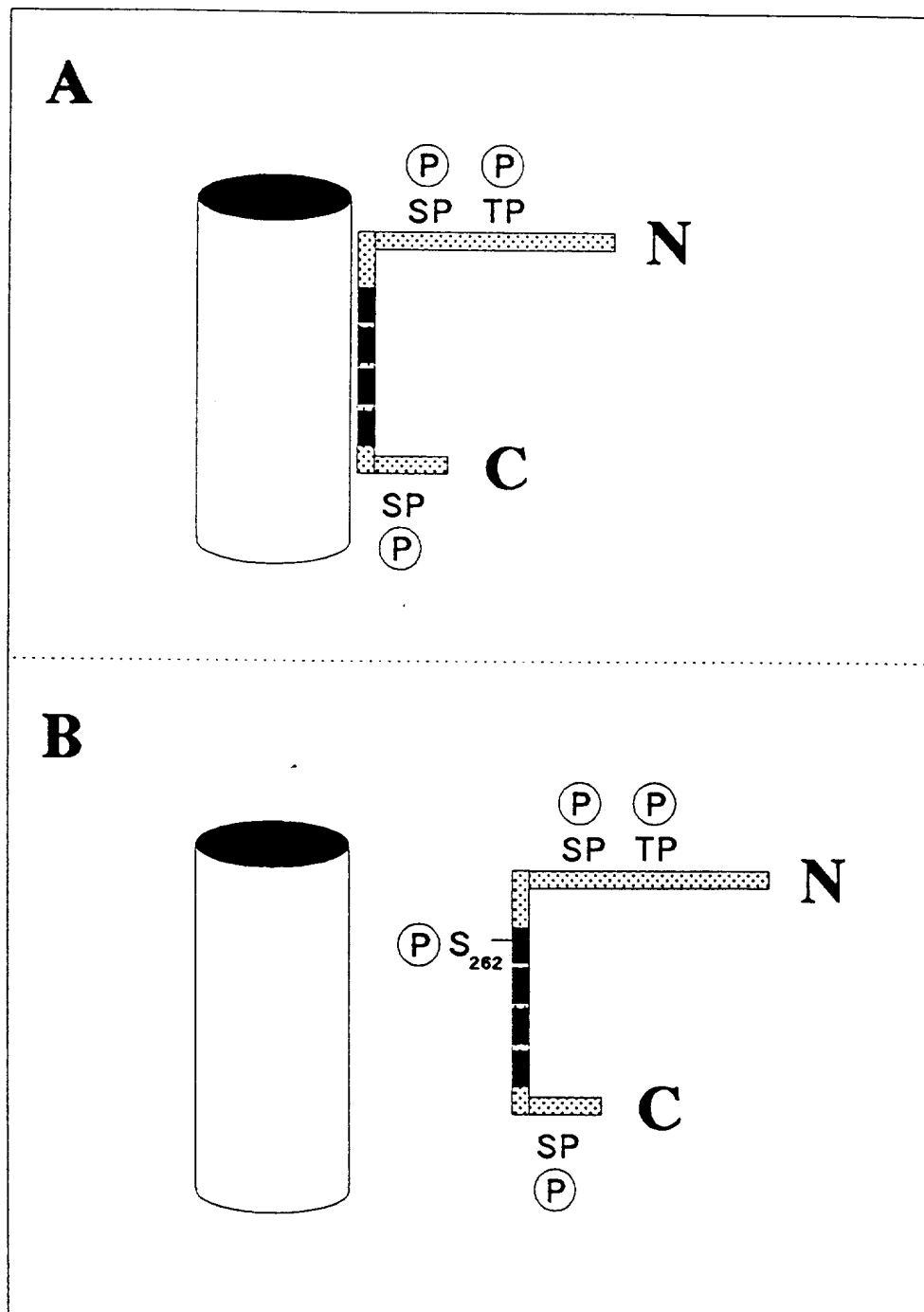


图 10

由 NPK110 磷酸化的 MAP2C(重组的) 磷酸肽图

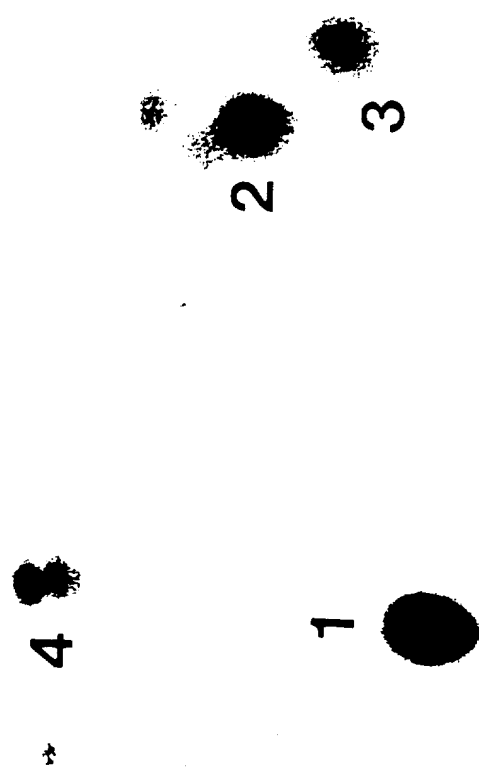


图 11

由 NPK110 磷酸化的 MAP4 融合蛋白的磷酸肽图

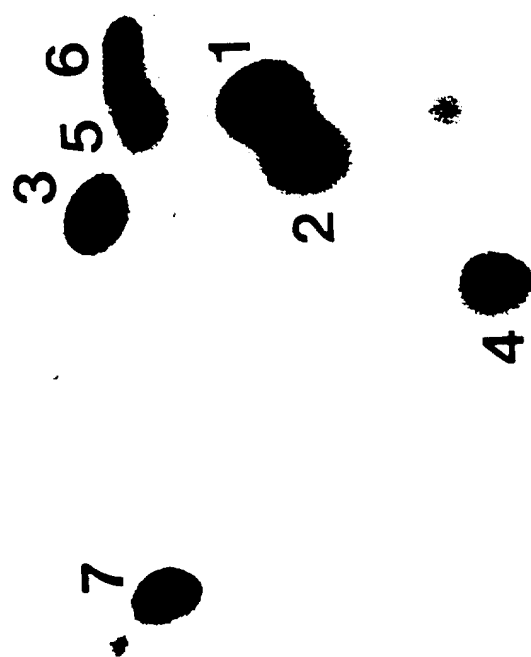


图12

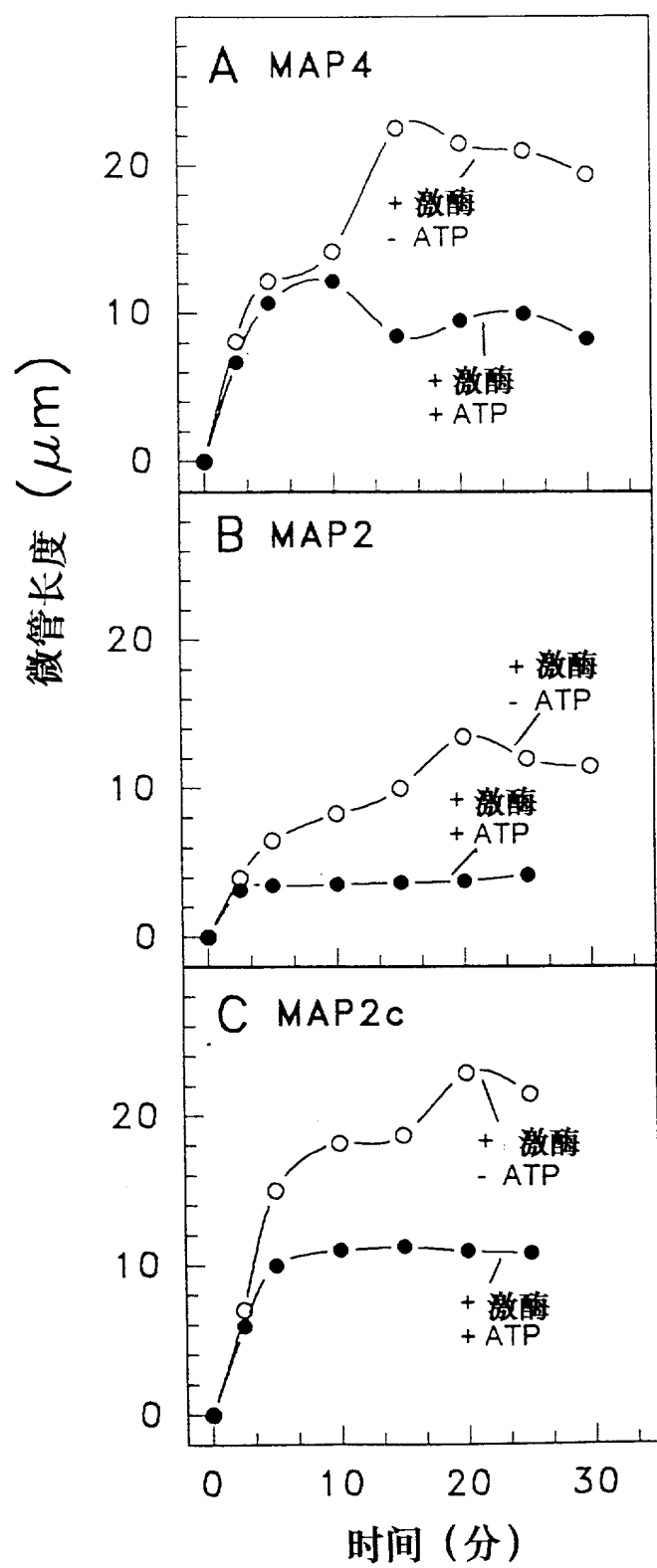


图13

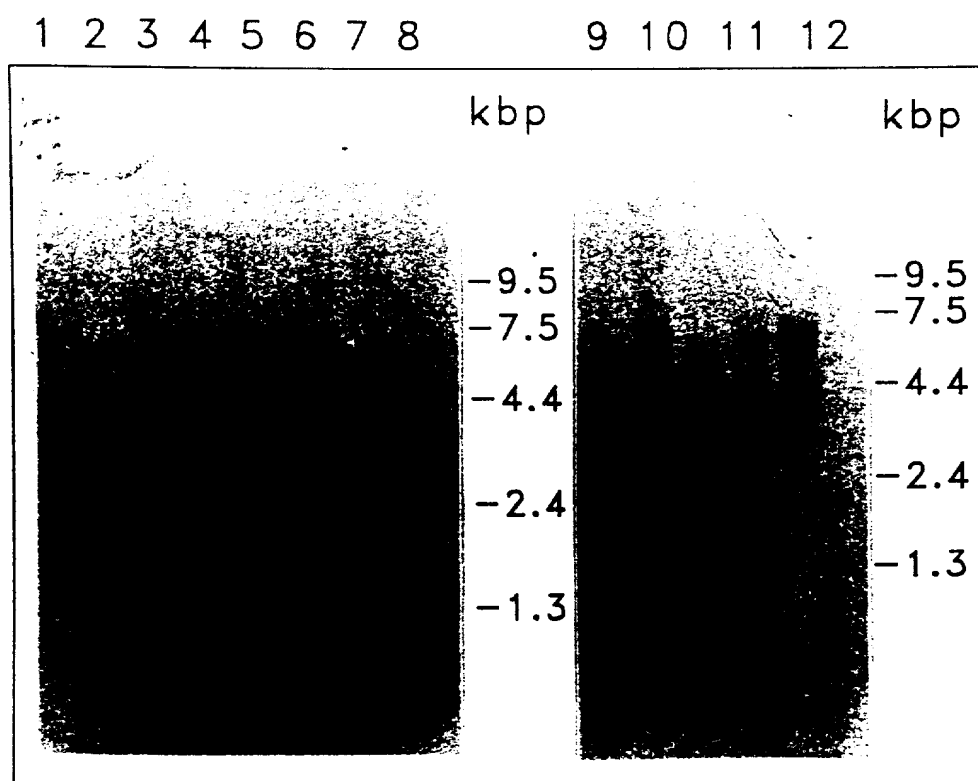


图 14

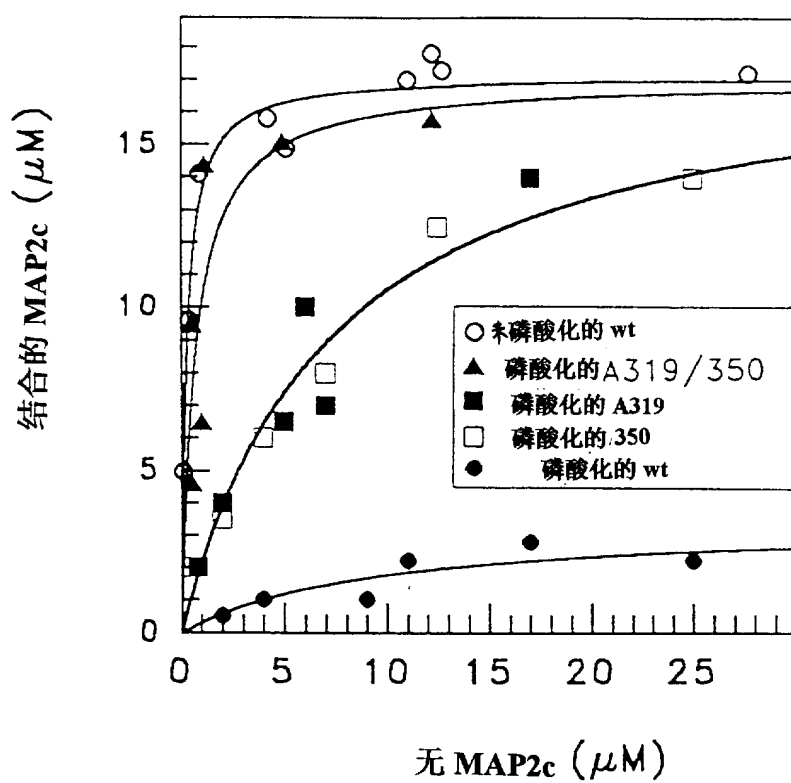


图 15

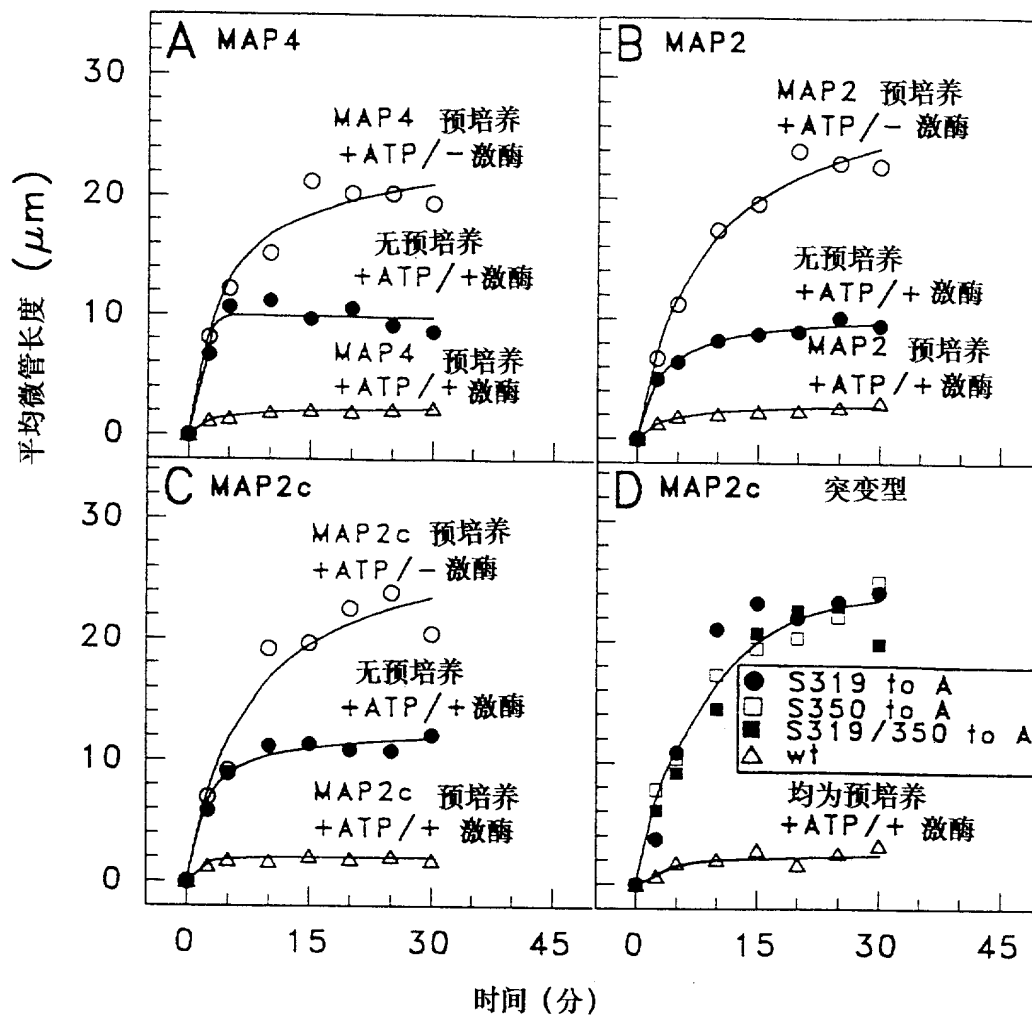


Fig. 16