

淀粉样前体蛋白修饰、转运及其剪切加工研究进展

崔华清, 殷菲* (重庆理工大学, 药物化学与分子药理学重庆市重点实验室, 重庆 400054)

摘要: 阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)是一种常见的神经系统退行性疾病, 其患病率随着年龄的增加而升高。越来越多的研究表明, 淀粉样蛋白前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)经 β -, γ -分泌酶切割产生 β 淀粉样蛋白(β -amyloid, A β)的代谢过程异常是 AD 形成的主要原因。近年来, 人们对 APP 的修饰及加工过程进行了大量的研究, 取得了重要的进展, 为 AD 的防治提供了新的靶点和思路。本文就有关 APP 修饰及剪切加工的研究进展做一综述。

关键词: 阿尔茨海默病; 淀粉样前体蛋白; 修饰; 加工

中图分类号: R963 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2018)03-0444-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.03.032

引用本文: 崔华清, 殷菲. 淀粉样前体蛋白修饰、转运及其剪切加工研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(3): 444-447.

Advance of Modification, Trafficking and Processing of Amyloid Precursor Protein

CUI Huaqing, YIN Fei* (Chongqing University of Technology, Chongqing Key Lab of Medicinal Chemistry & Molecular Pharmacology, Chongqing 400054, China)

ABSTRACT: Alzheimer's disease(AD), the most common cause of dementia, is an irreversible, progressive brain disorder. The greatest risk factor is increasing age. An impressive number of references showed that the aggregation and deposit of β -amyloid(A β) produced from amyloid precursor protein(APP) were the major cause of the development of AD. Although the resource and mechanisms of AD development need to be explored, there are some progresses on the modification, trafficking, sorting and degradation of APP in recently years. Here, APP modification, trafficking and processing *in vitro* and *in vivo* was summarized.

KEY WORDS: Alzheimer disease; amyloid precursor protein; modification; processing

阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)亦称老年性痴呆, 是一种中枢神经系统退行性疾病, 是老年痴呆中最常见的一种类型。AD 主要表现为渐进性记忆障碍、认知功能障碍、人格改变及语言障碍等神经精神症状^[1]。尽管到目前为止, AD 的病因及发病机制仍不十分清楚, 但是, 淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)异常代谢产生的 β -淀粉样蛋白(β -amyloid protein, A β)聚合、沉积被认为是 AD 形成的重要原因^[2]。

1 APP 剪切加工

哺乳动物中, APP 基因位于 21 号染色体, 共有 8 个亚型, 其亚型一般含有 365~770 个氨基酸残基。最常见的是 APP695、APP751 和 APP770, 其中 APP695 在中枢神经中高度表达。APP 属 I 型跨膜糖蛋白, 分子量约 110~130 kDa, 具有较大的膜外(氨基端)结构域和较小的胞质尾区(胞内羧基端)^[3]。APP 主要通过淀粉样(β 途径)和非淀粉样

(α 途径)2 种途径进行代谢。淀粉样途径即 APP 被 β 分泌酶切割成为 sAPP β 和 1 个含有 99 个氨基酸的 C 端片段; 后者进一步被 γ 分泌酶切割成为 A β 和 ACID, 这种途径生成的 A β 占 A β 总量的 90%~95%, 包括 A β 1-40 和 A β 1-42 2 种类型, 其中 A β 1-40 的含量较高, 但 A β 1-42 具有强疏水作用, 其毒性较大, 而且易于聚合。这些 A β 碎片会在线粒体、溶酶体以及内质网中积累, 从而导致这些亚细胞器功能失调^[4]。在基于 α 分泌酶的非淀粉样质源途径中, α 分泌酶将 APP 切割为 sAPP 和 1 个含有 83 个氨基酸的 C 端片段, 然后被 γ 分泌酶切割产生 P3 和 ACID, 但这些小的片段会被神经元清除掉。

APP 基因突变可引起蛋白表达异常或水解改变, 从而影响 A β 在细胞中的含量和组成变化。A β 在脑内主要以 A β 40 和 A β 42 2 种形式存在, 其中 A β 42 含量虽低(<10%), 但易于聚合, 进而纤维化

基金项目: 重庆市杰出青年项目(cstc2014jcyj10003); 重庆高校创新团队建设项目(CXTDX201601031)

作者简介: 崔华清, 女, 硕士生 Tel: (023)62563182 E-mail: 1406364204@qq.com *通信作者: 殷菲, 女, 博士, 教授 Tel: (023)62563182 E-mail: fyin@cqut.edu.cn

而沉积,从而形成弥散性老年斑(senile plaque),这也是 AD 的主要病理特征之一。而且,APP 在细胞膜上经 β -和 γ -分泌酶切割后产生的 A β 可以引起氧化应激、钙离子内流,进而损伤线粒体,导致神经细胞障碍,激活凋亡相关蛋白和因子,最终启动细胞的凋亡程序。另外,A β 还可以通过引起脑内炎症反应和神经纤维缠结间接导致神经元凋亡,是 AD 形成和发展的重要原因^[5-6]。

2 APP 在细胞中的转运及定位

近年来,越来越多的学者开始关注 APP 在细胞内的分布、定位和降解,以期发现 AD 发病的新机制^[7-8]。正常情况下,在内质网上合成后,APP 经分泌途径转运到细胞膜,其中一部分又经内吞(endocytosis)途径转运到内体(endosome)系统。大量数据显示,A β 存在于内质网、线粒体、核内体、细胞核及高尔基体等不同的细胞器中^[9]。为了保持 A β 的蛋白水平平衡,一些定位于不同细胞器中的蛋白酶如脑啡肽酶、胰岛素降解酶、组织蛋白酶和人类前序列蛋白酶(human presequence protease, hPreP)^[10-11]等,在清除细胞的 A β 中扮演着重要的角色。但是,到目前为止,APP 在细胞中是如何被分选、如何被转运到各细胞器,又是如何被降解的,还有待于进一步深入研究。

研究人员在死后 AD 患者的大脑中发现,线粒体中有大量 A β 的聚积,同时细胞和转基因老鼠模型中的研究结果也证实了这一结论。除此之外,还有研究证实,A β 不仅定位于线粒体,而且与线粒体靶蛋白存在相互作用。除 Drp 1 外,与 A β 相互作用的线粒体特征蛋白还有 A β 结合乙醇脱氢酶(A β -binding alcohol dehydrogenase, ABAD)、亲环蛋白(cyclophilin D, CypD)、细胞色素 C 氧化酶、电压依赖性阴离子通道(voltage dependent anion channel, VDAC)和 hPreP 等^[12-17]。Del Prete 等研究发现,线粒体相关膜(mitochondria-associated membranes, MAMs)结构变化对 AD 的形成和发展具有十分重要的作用。在过表达 APP 的转基因小鼠和 APP 基因突变的 AD 转基因小鼠的脑内,不仅 APP 及其代谢物大量存在于 MAMs,而且 β -、 γ -分泌酶也大量共存于此,并具有 APP 剪切、加工活性。他们还在过表达 APP^{swe} 的细胞模型上进一步研究发现,APP 及其代谢产物与 MAMs 关键蛋白相互作用会使内质网与线粒体的结合位点明显增加,直接影响线粒体和内质网的功能^[18]。

另外,在 AD 模型小鼠中,APP 酪氨酸(Tyr)

的磷酸化也发生了改变^[19-20]。在 YENPTY 基序(定位于 APP695 的 682~687 位氨基酸序列)中,Tyr682 的磷酸化和去磷酸化对 APP 是否能够进行正常的内吞非常重要^[21]。而且,Tyr682 在激活某些 APP 信号通路使 APP 与胞质内的衔接蛋白(adaptor proteins, AP)结合这一过程中扮演着“开关”的角色^[22]。网格蛋白(Clathrin)介导的内吞作用在调节 APP 的转运和 A β 产生中是不可缺少的^[23],但网格蛋白不与膜蛋白直接结合,而是通过与定位在不同细胞区室的衔接蛋白(如 AP1-4 等)特异性结合来调控 APP 的转运及在神经元中的定位^[24]。Rebello 等^[25]研究证实,YENPTY 基序的酪氨酸磷酸化会延长 APP 在高尔基体和内质网中的停留时间,进而延迟其转运到质膜。另外,增加 APP 酪氨酸的磷酸化会破坏 APP 的结构,减少与网格蛋白和衔接蛋白(AP2)的结合,进而改变 APP 在细胞浆中的转运和分选。除此之外,酪氨酸的磷酸化还会直接影响 APP 与网格蛋白和衔接蛋白的结合,以此影响 APP 的内吞和转运。Martone 等前期研究中也发现当 Tyr682 突变后会阻止 APP 与网格蛋白和衔接蛋白结合导致严重的神经元缺陷^[26-28]。

3 APP 修饰与降解

APP 在高尔基体(Golgi)、初级内体(early endosome)和次级内体(late endosome)等酸性环境中经 β -和 γ -分泌酶切割产生 A β ,同时也可以进入多囊内体(multivesicular endosomes, MVE)和溶酶体进行降解^[29]。然而,在内质网应激条件下,APP 还可通过泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)快速降解。Tam 等^[30]研究证实,AP-3 可与 APP 相互作用促进 APP 转运,并经溶酶体途径降解;他们进一步研究发现,突变 APP 在细胞膜尾部的酪氨酸位点以及磷酸化 APP 的丝氨酸位点都会影响 AP-3 与 APP 的相互作用,抑制 APP 向溶酶体的转运。还有学者研究发现,Beclin 1 可通过与细胞膜上的 APP 相互作用募集自噬/溶酶体调节蛋白 PI3KC 和 UVRAG(UV radiation resistance-associated gene),促进 APP 内吞,并被分选到内体和内溶酶体上降解,间接抑制 A β 的产生^[31]。上述研究结果表明,APP 的修饰对其在细胞内的分布和降解具有十分重要的作用,调节 APP 的修饰不仅会影响 APP 在细胞内的分布、降解,而且还可间接下调 A β 的产生。

泛素化修饰是膜蛋白进入溶酶体降解的重要途径。首先,泛素化修饰能促进膜蛋白从细胞膜

表面内吞回到细胞内；其次，到达内体膜后，泛素化修饰的膜蛋白能够被 ESCRT(endosomal sorting complex required for transport)系统招募并分选到多囊内体的内腔膜泡(intraluminal vesicles, ILV)。多囊内体与溶酶体的进一步融合，促使膜蛋白在溶酶体上降解^[32-33]。有研究发现，VHL 作为 APP 的泛素连接酶，可对 APP 进行 K63 连接的多聚泛素化修饰，促进成熟形式的 APP 从细胞膜表面内吞，并分选到多囊内体内腔，进而通过溶酶体降解，最终起到负调控 A β 产生的作用^[34]。Zhang 等研究中也发现，UBLN1 基因单核苷酸多态性与迟发性 AD 有关，它的蛋白产物 Ubiquilin-1 会调控 APP 的成熟，也会导致 A β 的积累。Ubiquilin 蛋白是一个 UBL 蛋白，属于 UBL-泛素相关(UBL-UBA)家族^[35]。Ubiquilin-1 的 UBL 和 UBA 区域均参与了 PS 的降解^[36]。PS 蛋白被认为是 γ -分泌酶催化的核心部分^[37]，高水平的 Ubiquilin 可能会通过减少 PS 碎片的形成来降低 γ -分泌酶的活性。另外，过表达 Ubiquilin-1 还会下调 PEN-2 和 NCT 的水平，并抑制 A β 的降解，促进 γ -分泌酶切割 APP，间接提高 A β 蛋白水平^[38-39]。

与此同时，其他学者也在泛素化连接酶与 APP 降解和 A β 生成的相关研究中取得了重要进展。Kaneko 课题组研究发现，另外一个泛素化连接酶 HRD1(Hmg-CoA reductase degradation ligase, 也称 Synoviolin)与 APP 共同在神经元中大量表达，而且存在相互作用。HRD1 还能促进 APP 泛素化降解，直接减少 A β 产生；并且，抑制 HRD1 表达可诱导 APP 水平上调，并最终导致 A β 水平升高^[40]。不仅如此，HRD1 还与 A β 42 寡聚物通过 XBP-1s 调节 β 分泌酶的表达水平有关^[41]。尤其重要的是，在 AD 患者大脑皮层中，伴随 A β 水平的增加，HRD1 蛋白水平明显下调，因此，调节 HRD1 表达可能是防治 AD 的重要策略^[42]。

4 结语与展望

大量实验结果显示，神经元内 A β 积累在 AD 早期发生，并可能在突触损伤，特别是突触前区的结构功能异常改变、淀粉样斑块形成、神经元死亡中起重要作用。APP 的不同修饰方式不仅影响其被不同细胞器识别、转运，而且还对其降解及代谢途径产生 A β 有重要影响。尽管到目前为止 APP 分子的神经学功能尚不十分清楚，但很可能与突触的可塑性有关，而且 APP 代谢产生的 A β 成分积累、折叠和构象改变在 AD 的发展中扮演中

心角色，因此，进一步探明 APP 在细胞内的分布、剪切加工方式及位点，不仅对于明确 APP 的剪切、加工途径有重要意义，而且可能为 AD 的防治提供新的思路。

随着人口日益老龄化，人们迫切需要了解 AD 的发病机制以及如何防治。在过去的数年里，研究人员基于 A β 级联假说、Tau 蛋白磷酸化变化以及神经炎症等开发了许多生物标志物，以期能够在认知功能障碍出现之前，做到对 AD 的检测和追踪，比如针对 A β 的抗体和疫苗、 β 和 γ 分泌酶抑制剂、A β 聚合抑制剂等。然而令人遗憾的是，到目前为止，几乎所有基于 A β 的疫苗、抗体、抑制剂的临床试验都以失败告终。

不过，随着人们对 AD 发病机制的进一步深入了解，研究人员愈发相信，对于 AD 的干预效果可能依赖于在更早阶段启动治疗措施。由于 A β 形成的淀粉样蛋白斑的形成一般早于出现明显的神经退行性病变大约 15 年左右，因此，AD 的早期发现和干预可能是今后 AD 研究的重点；而且，基于 A β 级联早期阶段的药物仍有可能在 AD 的防治中发挥重要作用。当然，对于 AD 药物研发领域，更多样化的靶点发现对于 AD 的防治尤为重要。

REFERENCES

- [1] VIANA R J, NUNES A F, RODRIGUES C M. Endoplasmic reticulum enrollment in Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2012, 46(2): 522-534.
- [2] GOLDE T E. Alzheimer disease: Host immune defence, amyloid-beta peptide and Alzheimer disease [J]. *Nat Rev Neurol*, 2016, 12(8): 433-444.
- [3] NALIVAEVA N N, TURNER A J. The amyloid precursor protein: a biochemical enigma in brain development, function and disease [J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(13): 2046-2054.
- [4] O'BRIEN R J, WONG P C. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2011, 34: 185-204.
- [5] FOGARTY M P, DOWNER E J, CAMPBELL V. A role for c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1), but not JNK2, in the beta-amyloid-mediated stabilization of protein p53 and induction of the apoptotic cascade in cultured cortical neurons [J]. *Biochem J*, 2003, 371(Pt 3): 789-798.
- [6] SONDAG C M, COMBS C K. Amyloid precursor protein cross-linking stimulates beta amyloid production and pro-inflammatory cytokine release in monocytic lineage cells [J]. *J Neurochem*, 2006, 97(2): 449-461.
- [7] MOREL E, CHAMOUN Z, LASIECKA Z M, et al. Phosphatidylinositol-3-phosphate regulates sorting and processing of amyloid precursor protein through the endosomal system [J]. *Nat Commun*, 2013(4): 2250. Doi: 10.1038/ncomms3250.
- [8] WILLEM M, TAHIROVIC S, BUSCHE M A, et al. η -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus [J]. *Nature*, 2015, 526(7573): 443-447.

- [9] PENKE B, TOTH A M, FOLDI I, et al. Intraneuronal beta-amyloid and its interactions with proteins and subcellular organelles [J]. Electrophoresis, 2012, 33(24): 3608-3016.
- [10] LEISSRING M A. The AbetaCs of Abeta-cleaving proteases [J]. J Biol Chem, 2008, 283(44): 29645-29649.
- [11] NALIVAEVA N N, BECKETT C, BELYAEV N D, et al. Are amyloid-degrading enzymes viable therapeutic targets in Alzheimer's disease? [J]. J Neurochem, 2012, 120(Suppl 1): 167-185.
- [12] SCHMIDT C, LEPSVERDIZE E, CHI S L, et al. Amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide bind to ATP synthase and regulate its activity at the surface of neural cells [J]. Mol Psychiatry, 2008, 13(10): 953-969.
- [13] ALIKHANI N, GUO L, YAN S, et al. Decreased proteolytic activity of the mitochondrial amyloid-beta degrading enzyme, PreP peptidase, in Alzheimer's disease brain mitochondria [J]. J Alzheimers Dis, 2011, 27(1): 75-87.
- [14] DU H, GUO L, FANG F, et al. Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease [J]. Nat Med, 2008, 14(10): 1097-1105.
- [15] DU H, GUO L, ZHANG W, et al. Cyclophilin D deficiency improves mitochondrial function and learning/memory in aging Alzheimer disease mouse model [J]. Neurobiol Aging, 2011, 32(3): 398-406.
- [16] HERNANDEZ-ZIMBRON L F, LUNA-MUNOZ J, MENA R, et al. Amyloid-beta peptide binds to cytochrome C oxidase subunit I [J]. PLoS One, 2012, 7(8): e42344.
- [17] SEO J S, LEE K W, KIM T K, et al. Behavioral stress causes mitochondrial dysfunction via ABAD up-regulation and aggravates plaque pathology in the brain of a mouse model of Alzheimer disease [J]. Free Radic Biol Med, 2011, 50(11): 1526-1535.
- [18] DEL PRETE D, SUSKI J M, OULES B, et al. Localization and processing of the amyloid-beta protein precursor in mitochondria-associated membranes [J]. J Alzheimers Dis, 2017, 55(4): 1549-1570.
- [19] GEORGAKOPOULOS A, XU J, XU C, et al. Presenilin 1/gamma-secretase promotes the EphB2-induced phosphorylation of ephrinB2 by regulating phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains/Csk binding protein [J]. FASEB J, 2011, 25(10): 3594-3604.
- [20] YANG X, YANG Y, LIU J, et al. Increased phosphorylation of tau and synaptic protein loss in the aged transgenic mice expressing familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 mutation [J]. Neurochem Res, 2012, 37(1): 15-22.
- [21] MULLER U C, ZHENG H. Physiological functions of APP family proteins [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012, 2(2): a006288.
- [22] MATRONE C. A new molecular explanation for age-related neurodegeneration: the Tyr682 residue of amyloid precursor protein [J]. Bioessays, 2013, 35(10): 847-852.
- [23] KELLY B T, GRAHAM S C, LISKAN N, et al. Clathrin adaptors. AP2 controls clathrin polymerization with a membrane-activated switch [J]. Science, 2014, 345(6195): 459-463.
- [24] POULSEN E T, IANNUZZI F, RASMUSSEN H F, et al. An aberrant phosphorylation of amyloid precursor protein tyrosine regulates its trafficking and the binding to the clathrin endocytic complex in neural stem cells of Alzheimer's disease patients [J]. Front Mol Neurosci, 2017, 10: 59.
- [25] REBELO S, VIEIRA S I, ESSELMANN H, et al. Tyrosine 687 phosphorylated Alzheimer's amyloid precursor protein is retained intracellularly and exhibits a decreased turnover rate [J]. Neurodegener Dis, 2007, 4(2/3): 78-87.
- [26] MATRONE C, LUVISSETTO S, LA ROSA L R, et al. Tyr682 in the Abeta-precursor protein intracellular domain regulates synaptic connectivity, cholinergic function, and cognitive performance [J]. Aging Cell, 2012, 11(6): 1084-1093.
- [27] LA ROSA L R, PERRONE L, NIELSEN M S, et al. Y682G mutation of amyloid precursor protein promotes endo-lysosomal dysfunction by disrupting APP-SorLA interaction [J]. Front Cell Neurosci, 2015(9): 109.
- [28] POULSEN E T, LARSEN A, ZOLLO A, et al. New Insights to clathrin and adaptor protein 2 for the design and development of therapeutic strategies [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(12): 29446-29453.
- [29] JOSHI G, WANG Y. Golgi defects enhance APP amyloidogenic processing in Alzheimer's disease [J]. Bioessays, 2015, 37(3): 240-247.
- [30] TAM J H, COBB M R, SEAH C, et al. Tyrosine binding protein sites regulate the intracellular trafficking and processing of amyloid precursor protein through a novel lysosome-directed pathway [J]. PLoS One, 2016, 11(10): e0161445.
- [31] SWAMINATHAN G, ZHU W, PLOWEY E D. BECN1/Beclin 1 sorts cell-surface APP/amyloid beta precursor protein for lysosomal degradation [J]. Autophagy, 2016, 12(12): 2404-2419.
- [32] RAIBORG C, STENMARK H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins [J]. Nature, 2009, 458(7237): 445-452.
- [33] EDGAR J R, WILLEN K, GOURAS G K, et al. ESCRTs regulate amyloid precursor protein sorting in multivesicular bodies and intracellular amyloid-beta accumulation [J]. J Cell Sci, 2015, 128(14): 2520-8.
- [34] 单春燕. VHL 促进 APP 的泛素化和溶酶体降解[D]. 北京: 北京大学, 2013.
- [35] ZHANG D, RAASI S, FUSHMAN D. Affinity makes the difference: nonselective interaction of the UBA domain of Ubiquitin-1 with monomeric ubiquitin and polyubiquitin chains [J]. J Mol Biol, 2008, 377(1): 162-180.
- [36] LEE J E, JEON I S, HAN N E, et al. Ubiquitin 1 interacts with Orai1 to regulate calcium mobilization [J]. Mol Cells, 2013, 35(1): 41-46.
- [37] SCHROETER E H, ILAGAN M X, BRUNKAN A L, et al. A presenilin dimer at the core of the gamma-secretase enzyme: insights from parallel analysis of Notch 1 and APP proteolysis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(22): 13075-13080.
- [38] HE G, QING H, CAI F, et al. Ubiquitin-proteasome pathway mediates degradation of Aβ-1 [J]. J Neurochem, 2006, 99(5): 1403-1412.
- [39] HONG L, HUANG H C, JIANG Z F. Relationship between amyloid-beta and the ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease [J]. Neurol Res, 2014, 36(3): 276-282.
- [40] KANEKO M, KOIKE H, SAITO R, et al. Loss of HRD1-mediated protein degradation causes amyloid precursor protein accumulation and amyloid-beta generation [J]. J Neurosci, 2010, 30(11): 3924-3932.
- [41] GERAIS Y, DUNYS J, BAUER C, et al. Aβ42 oligomers modulate beta-secretase through an XBP-1s-dependent pathway involving HRD1 [J]. Sci Rep, 2016(6): 37436. Doi: 10.1038/srep37436.
- [42] KANEKO M, SAITO R, OKUMA Y, et al. Possible involvement of ubiquitin ligase HRD1 insolubilization in amyloid beta generation [J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35(2): 269-272.

收稿日期: 2017-06-28

(本文责编: 曹粤锋)