

Zmiany w ekspresji izoform białka tau w mózgu myszy w zależności od wieku*)

EWA USAREK, MAGDALENA KUŻMA*, BEATA KAŻMIECZAK, CHRISTOPH MUENCH**, ALBERT C. LUDOLPH**, ANNA BARAŃCZYK-KUŻMA

Katedra i Zakład Biochemii I Wydziału Lekarskiego AM, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

*Klinika Neurologii Wydziału Lekarskiego AM, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

**Klinika Neurologii Uniwersytetu w Ulm, Oberer Eselsberg 45, 89081 Ulm, Niemcy

Usarek E., Kuźma M., Kaźmieczał B., Muench C., Ludolph A. C., Barańczyk-Kuźma A.
Age-related changes in tau protein isoform expression in mice brains

Summary

Tau is a microtubule-associated protein important for the assembly and stabilization of microtubules. Six tau isoforms are produced in the central nervous system from one single gene as a result of the alternative splicing of exons 2, 3 (N-terminal part) and exon 10 (C-terminal part). The shortest isoform (2-3-10-, 0N 3R) is characteristic for fetal brains, whereas the remaining (2+3-10-, 1N 3R; 2+3+10-, 2N 3R; 2-3-10+, 0N 4R; 2+3-10+, 1N 4R; 2+3+10+, 2N 4R) for adult brains.

The aim of the study was to establish a profile of tau protein variants in the C57BL/6J mouse frontal cortex during the aging process. The total RNA was isolated from tissues, followed by reverse transcription and PCR reaction. It was found that the sequence encoded by exon 10 was absent in the youngest 5-day old newborns (isoform 3R), while it was present in 21, 70 and 140-day old animals (isoform 4R). The most abundant isoform in 5-day old mice was 1N and accounted for 66% of the total tau protein. The percentage of 1N isoforms lowered with age and was 31% in 140-day old animals. The total percentage of 0N isoforms was 11% in 5-day old mice and was approximately threefold lower than in each of the older groups. It may be concluded that alternative splicing of the tau protein undergoes age-dependent regulation in the mouse brain cortex.

Keywords: tau protein, mouse, brain

Mechanizmy starzenia się komórki oraz całego organizmu są procesami wysoce skomplikowanymi i jak dotąd nie do końca poznanymi. Pewne jest, że wraz z wiekiem zwiększa się ryzyko zachorowania na wiele chorób, w tym związanych z neurodegeneracją i nowotworzeniem.

Białko tau należy do rodziny białek związanych z mikrotubulami (microtubule-associated proteins, MAPs) (16). Odgrywa ono istotną rolę w regulacji tempa polimeryzacji mikrotubul, przez co bierze udział w utrzymywaniu kształtu komórek. Białko tau ulega ekspresji głównie w neuronach ośrodkowego układu nerwowego (13). W pewnych warunkach może ono podlegać modyfikacjom, głównie przez fosforylację, ale też ubikwitynację, glikozylację i glikację (15). Nadmiernie ufosforylowane izoformy białka tau są głównymi składnikami blaszek neurofibrylarnych, typowych dla schorzeń neurologicznych, zwanych tauopatiami, do których należą: choroba Alzheimera, postępujące porażenie nadjądrowe, zwyrodnienie korowpodstawne oraz stwardnienie boczne zanikowe (SLA) wraz z odmianą SLA z wyspy Guam (14).

Na skutek alternatywnego składania, na matrycy pojedynczego genu powstaje 6 różnych form mRNA i w konsekwencji 6 izoform białka tau różniących się wielkością oraz obecnością lub brakiem trzech insertów kodowanych przez eksony 2, 3 i 10 (1). Fragmenty kodowane przez eksony 2 i 3 znajdują się w N-końcowej części białka i odgrywają rolę w stabilizacji oraz organizacji aksonów (2, 6). Są również zaangażowane w przekazanie sygnałów w komórce poprzez oddziaływanie z rodziną kinaz tyrozynowych src oraz z fosfolipazą C (7, 10). Ekson 10 koduje jedną z czterech wysoce homologicznych domen zlokalizowanych w części C-końcowej białka tau. Domeny te wiążą mikrotubule i są odpowiedzialne za ich stabilizację oraz tempo polimeryzacji (zwiększenie szybkości polimeryzacji i hamowanie depolimeryzacji) (4, 9). Brak fragmentu kodowanego przez ekson 10, w efekcie czego zamiast izoformy 4R powstaje izoforma 3R, powoduje zmniejszenie powinowactwa białka tau do mikrotubul i ma istotne znaczenie dla plastyczności komórek nerwowych w trakcie ich różnicowania (11).

Celem obecnej pracy było ustalenie wariantów składania białka tau w mózgu zdrowych myszy (szczepu C57BL/6J) w zależności od wieku. Przedstawione

*) Praca wykonana w ramach projektu badawczego PBZ-MIN-001/P05/08.

badania są częścią projektu, którego celem jest określenie roli białka tau w procesie neurodegeneracji.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 24 myszach, samcach szczepu C57BL/6J, podzielonych na cztery grupy wiekowe: 5-dniowe noworodki, 21-dniowe myszy młode (natychmiast po oddzieleniu od matki i zmianie odżywiania na stałe), 70- i 140-dniowe zwierzęta dorosłe. W każdej grupie było po 6 myszy. Myszy pochodziły ze Zwierzętarni Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN. Natychmiast po dekapitacji izolowano korę płata czołowego mózgu, a z niej całkowite RNA (NucleoSpin® RNA II, MN, Germany, według instrukcji producenta).

W celu określenia alternatywnych wariantów składowania mRNA dla białka tau, przeprowadzono reakcję RT-PCR. Jako wewnętrzną kontrolę oznaczano ekspresję mRNA rybosomalnego białka S12 (housekeeping gene). Produkty reakcji PCR rozdzielano w żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny. Poziom ekspresji poszczególnych izoform białka tau określano półilościowo jako stosunek gęstości optycznej (OD) prążka tau do gęstości optycznej prążka S12. Wartości wyrażające ekspresję izoform 0N (2-3-), 1N (2+3-) i 2N (2+3+) sumowano, a następnie obliczano procentowy udział poszczególnych izoform. Obecność lub brak fragmentu kodowanego przez ekson 10 stwierdzano na podstawie wielkości produktu reakcji PCR (12).

Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne z uwzględnieniem odchylenia standardowego (SD). Każde oznaczenie wykonywano w dwóch powtórzeniach. Analizę statystyczną przeprowadzono testem istotności t-Studenta przy pomocy programu Statistica software (StatSoft 6.1).

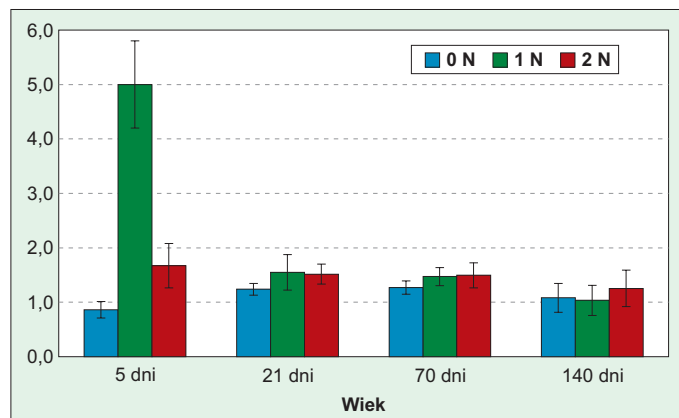
Badania przeprowadzono za zgodą II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach przy Akademii Medycznej w Warszawie (nr 69/2002 i nr 36/2004).

Wyniki i omówienie

Stwierdzono, że całkowita ekspresja białka tau w korze płata czołowego 5-dniowych noworodków mysich wynosiła 7,53 i była prawie dwukrotnie wyższa niż u zwierząt młodych (21-dniowych) i dorosłych (70-dniowych), gdzie wynosiła odpowiednio 4,31 i 4,23. U myszy starszych (140-dniowych) całkowita ekspresja białka tau spadała do wartości 3,37.

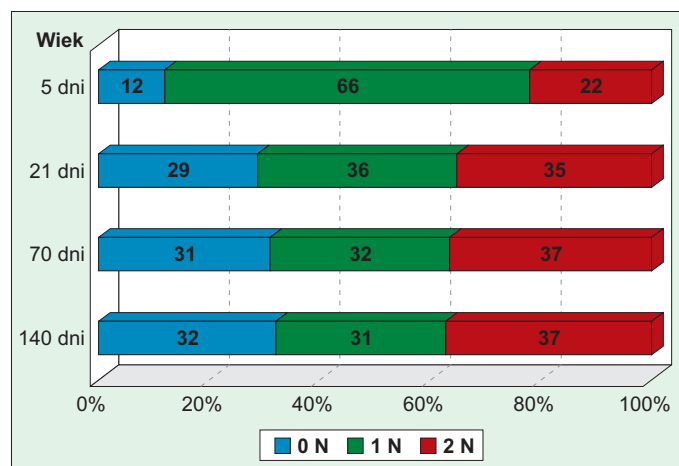
Badając alternatywne składowanie eksonów 2 i 3 mRNA białka tau, stwierdzono najwyższy poziom ekspresji izoformy 1N w korze mózgowej 5-dniowych noworodków, który wynosił $5,0 \pm 0,8$ (66% całkowitej ilości białka tau) (ryc. 1 i 2). Poziom ekspresji tej izoformy spadał gwałtownie u myszy 21-dniowych, gdzie wynosił $1,55 \pm 0,33$, a więc był ponad 3-krotnie niższy niż u 5-dniowych zwierząt. W starszych grupach wiekowych obniżał się nieznacznie i u 70-dniowych myszy wynosił $1,47 \pm 0,16$, a u 140-dniowych $1,04 \pm 0,28$ (ryc. 1).

Porównując poziom ekspresji poszczególnych izoform stwierdzono, że w korze płata czołowego zwierząt młodych (21-dniowych) ekspresja izoform 1N i 2N była podobna ($1,55 \pm 0,33$ i $1,52 \pm 0,18$), ale zna-



Ryc. 1. Ekspresja izoform białka tau w mózgu myszy w zależności od wieku

Objaśnienia: Ekspresję izoform 0N (2-3-), 1N (2+3-) i 2N (2+3+) oznaczano w korze płata czołowego metodą RT-PCR, jak podano w rozdziale Materiał i metody. Każdy wynik jest średnią \pm SD z oznaczeń wykonanych na 6 myszach w dwóch powtórzeniach

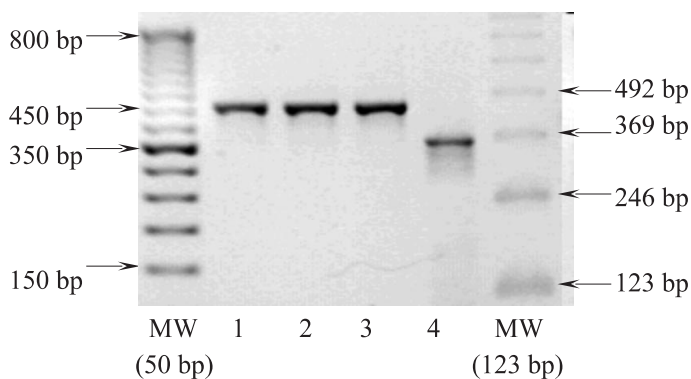


Ryc. 2. Procentowy rozkład izoform białka tau w korze płata czołowego mózgu myszy w zależności od wieku

Objaśnienie: Za 100% przyjęto całkowitą ekspresję białka tau w poszczególnych grupach wiekowych

miennie wyższa niż izoformy 0N ($1,24 \pm 0,11$, $p < 0,01$). U zwierząt dorosłych (70-dniowych) poziom ekspresji poszczególnych izoform był analogiczny jak w grupie młodych i wynosił $1,27 \pm 0,12$ (0N), $1,47 \pm 0,16$ (1N) i $1,49 \pm 0,23$ (2N). Ekspresja izoform 1N i 2N w tej grupie wiekowej była znacząco wyższa niż izoformy 0N ($p < 0,01$). W grupie zwierząt najstarszych (140-dniowych) poziom ekspresji poszczególnych izoform wynosił: $1,08 \pm 0,26$ (0N), $1,04 \pm 0,28$ (1N) i $1,25 \pm 0,34$ (2N) – różnice nie były istotne statystycznie (ryc. 1).

W korze płata czołowego 5-dniowych noworodków procentowy rozkład poszczególnych izoform, podobnie jak poziom ekspresji, różnił się wyraźnie od obserwowanego w pozostałych grupach wiekowych (ryc. 2). Wraz z wiekiem zmniejszał się procentowy udział izoformy 1N (z 66 do 31%) na korzyść pozostałych izoform, których ekspresja wzrastała w przypadku izoformy 0N z 11 do 32%, a w przypadku izoformy 2N z 22 do 37% (ryc. 2).



Ryc. 3. Identyfikacja wariantów składania części C-końcowej białka tau w korze płata czołowego mózgu myszy podczas starzenia

Objaśnienia: Zmienne składanie eksonu 10 badano w korze czołowej metodą RT-PCR, jak podano w rozdziale Materiał i metody. MW – marker wielkości; 1 – myszy 21-dniowe; 2 – myszy 70-dniowe; 3 – myszy 140-dniowe; 4 – myszy 5-dniowe

Ponadto, u badanych noworodków mysich nie wykazano obecności sekwencji kodowanej przez ekson 10, która była obecna we wszystkich pozostałych grupach zwierząt (ryc. 3). Stwierdzono więc, że u 5-dniowych myszy, podobnie jak u 8-dniowych szczurów (8), w wyniku zmiennego składania eksonu 10 powstaje izoforma 3R. U szczura ekspresja tej izoformy spada gwałtownie po 8 dniach od urodzenia, zanikając całkowicie u osobnika dorosłego (8, 12). Isoforma 3R nie występuje także w mózgu młodych (21-dniowych) i dorosłych (70- i 140-dniowych) myszy, u których, podobnie jak u szczura (12), obecna jest izoforma 4R (ryc. 3). W przeciwieństwie do myszy i szczura u człowieka izoforma 3R pojawia się w okresie życia płodowego, jest obecna po urodzeniu i u osób dorosłych nie zanika, ale występuje w ilości równoważnej do izoformy 4R (5).

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że w mózgu myszy szczepu C57BL/6J proces alternatywnego składania białka tau zależy od wieku. Wraz z wiekiem wyrównuje się poziom ekspresji izoform powstających w wyniku zmiennego składania eksonów 2 i 3 kodujących domeny białka kluczowe dla stabilizacji i organizacji aksonów. Ponadto, obecność sekwencji kodowanej przez ekson 10 w korze płata czołowego 21-dniowych myszy świadczy o zmniejszonej plastyczności komórek nerwowych i zwiększonej stabilności cytoszkieletu u młodych zwierząt.

Badania ekspresji białka tau będą kontynuowane na grupie myszy transgenicznym będącym modelem stwardnienia bocznego zanikowego, choroby neurodegeneracyjnej o nieznanym etiologii i patogenezie.

Piśmiennictwo

1. *Andreadis A., Brown W. M., Kosik K. S.*: Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* 1992, 31, 10626-10633.
2. *Brandt R., Lee G.*: Functional organization of microtubule-associated protein tau. *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 3414-3419.
3. *Brandt R., Leger J., Lee G.*: Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J. Cell Biol.* 1995, 131, 1327-1340.

4. *Drechsel D. N., Hyman A. A., Cobb M. H., Kirschner M. W.*: Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol. Biol. Cell* 1992, 3, 1141-1154.
5. *Goedert M.*: Tau protein and neurodegeneration. *Seminars in Cell&Developmental Biology* 2004, 15, 45-49.
6. *Georgieff I. S., Liem R. K., Couchie D., Mavilia C., Nunez J., Shelanski M. L.*: Expression of high molecular weight tau in the central and peripheral nervous systems. *J. Cell Sci.* 1993, 105, 729-737.
7. *Hwang S. C., Jhon D. Y., Bae Y. S., Kim J. H., Rhee S. G.*: Activation of phospholipase C-gamma by the concerted action of tau proteins and arachidonic acid. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 18342-18349.
8. *Kosik K. S., Orecchio L. D., Bakalis S., Neve R. L.*: Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* 1989, 2, 1389-1397.
9. *Lee G., Neve R. L., Kosik K. S.*: The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron* 1989, 2, 1615-1624.
10. *Lee G., Newman S. T., Gard D. L., Band H., Panchamoorthy G.*: Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J. Cell Sci.* 1998, 111, 3167-3177.
11. *Panda D., Goode B. L., Feinstein S. C., Wilson L.*: Kinetic stabilization of microtubule dynamics at steady state by tau and microtubule-binding domains of tau. *Biochemistry* 1995, 34, 11117-11127.
12. *Pizzi M., Valerio A., Belloni M., Arrighi V., Alberici A., Liberini P., Spano F., Memo M.*: Differential expression of fetal and mature tau isoforms in primary cultures of rat cerebellar granule cells during differentiation in vitro. *Molecular Brain Research* 1995, 34, 38-44.
13. *Schoenfeld T. A., Obar R. A.*: Diverse distribution and function of fibrous microtubule-associated proteins in the nervous system. *Int. Rev. Cytol.* 1994, 151, 67-137.
14. *Spillantini M. G., Goedert M.*: Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* 1998, 21, 428-433.
15. *Tawana K., Ramsden D. B.*: Progressive supranuclear palsy. *Mol. Pathol.* 2001, 54, 427-434.
16. *Weingarten M. D., Lockwood A. H., Hwo S. Y., Kirschner M. W.*: A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1975, 72, 1858-1862.

Adres autora: prof. dr hab. Anna Barańczyk-Kuźma, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa; e-mail: akuzma@amwaw.edu.pl