

Ekspresja transferazy S-glutationowej pi w transgenicznym mysich modelach neurodegeneracji*)

BEATA KAŹMIERCZAK, EWA USAREK, MAGDALENA KUŹMA-KOZAKIEWCZ*, ANNA BARAŃCZYK-KUŹMA

Katedra i Zakład Biochemii, *Katedra i Klinika Neurologii AM, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

Kaźmierczak B., Usarek E., Kuźma-Kozakiewicz M., Barańczyk-Kuźma A.

Expression of glutathione S-transferase pi in transgenic mouse models of neurodegeneration

Summary

Glutathione S-transferase pi (GST pi) inactivates a large variety of toxic, electrophilic compounds. The substrates of GST pi include environmental toxins and intracellular reactive oxygen species, factors significant in the pathogenesis of neurodegenerative diseases.

The aim of the present study was to investigate the expression of glutathione S-transferase pi in transgenic mouse models of neurodegeneration on both the mRNA and protein levels. Experiments were conducted on the frontal cortex of transgenic B6-C3H hybrids SOD1, Cra1 and SOD1/Cra1, aged 70 and 140 days. The SOD1 mice express a human SOD1^{G93A} mutation, the Cra1 strain carries mutation in the cytoplasmic dynein heavy chain 1 (Dnchc1), and the double heterozygote SOD1/Cra1 mice show a delayed disease progression as well as an increased lifespan compared with the SOD1 strain. A wild strain of mice were used as a control. The expression of GST pi mRNA in younger mice (age 70 days) was found to be similar in all studied groups of animals. In older (aged 140 days) controls and Cra1 mice the GST pi expression was at a similar level and it did not significantly differ from younger animals. In SOD1 and SOD1/Cra1 strains, the mRNA-GST pi expression was lower when compared to 140-day-old controls and the Cra1 strain. Moreover, it was significantly lower than in corresponding 70-day-old animals. A decrease in the GST pi expression on the mRNA level was accompanied by a decrease in the protein level.

High and unchanged GST pi expression in the frontal cortex of Cra1 mice indicates that the antioxidant-detoxification system plays an important role in protection against neurodegeneration. A significant decrease of GST pi expression in the frontal cortex of SOD1 and SOD1/Cra1 mice at the symptomatic stage of the disease suggests that the expression of this enzyme is related more to the G93A mutation in the SOD1 gene than to the efficient axonal transport.

Keywords: glutathione S-transferase pi, neurodegeneration, transgenic mice models

Jedną z najcięższych chorób neurologicznych o wciąż nie poznanej patogenie jest stwardnienie boczne zanikowe (SLA). Choroba charakteryzuje się postępującym i wybiórczym uszkodzeniem neuronów ruchowych rogów przednich rdzenia i kory ruchowej. Utrata neuronów prowadzi do niedowładu i zaniku mięśni. U ludzi śmierć następuje po 3-5 latach, najczęściej na skutek niewydolności oddechowej (15). Około 2% przypadków SLA związane jest z wystąpieniem mutacji G93A w genie dysmutazy ponadtlenkowej (SOD1) (4, 12). Objawy degeneracji neuronu ruchowego stwierdzono także u myszy transgenicznych z nadekspresją ludzkiego genu SOD1^{G93A} (5, 20). U zwierząt tych, już w okresie embrionalnym, zaobserwowano wystąpienie zaburzeń szybkiego transportu aksonalnego wzdłuż mikrotubul (9). W ostatnich la-

tach wykazano, że mutacje w obrębie łańcucha ciężkiego dyneiny (Dnchc1), białka odpowiedzialnego za transport aksonalny, prowadzą do rozwoju SLA w modelach zwierzęcych (Cra1 lub Loa) (6, 9). Transgeniczne myszy z punktową mutacją w genie Dnchc1 wykazują przykurcze tylnych kończyn i nieprawidłowe skrzywienie ciała (6, 7, 14). Ekspresja mutacji Dnchc1 w podwójnie transgenicznym modelu SOD1/Cra1 opóźnia wystąpienie objawów choroby i wydłuża czas przeżycia zwierząt z mutacją SOD1^{G93A} (9). Jak wykazano ostatnio, wiąże się to z całkowitą odbudową prawidłowo działającego transportu wstecznego (9, 18).

Pomimo że etiologia stwardnienia bocznego zanikowego nie jest znana, uważa się, że istotnym czynnikiem zwiększającym ryzyko wystąpienia degeneracji układu nerwowego mogą być zarówno środowiskowe, jak i wewnątrzkomórkowe toksyczne związki chemiczne, a także wolne rodniki tlenowe (1, 17). Wiele spo-

*) Badania były finansowane z tematu statutowego Akademii Medycznej w Warszawie, nr 1WK/N/2006 i 2007.

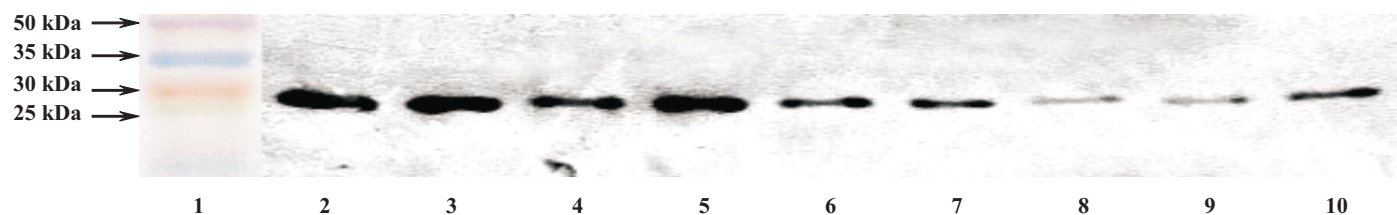
śród związków toksycznych ma charakter elektrofilowy, a więc mogą się one wiązać z kwasami nukleowymi i białkami, powodując ich uszkodzenia. Enzymem zobojętniającym związki elektrofilowe, a także organiczne nadtlarki i inne reaktywne formy tlenu jest transferaza S-glutationowa (GST, EC 2.5.1.18). Katalizuje ona sprzężanie powyższych związków ze zredukowanym glutationem (2, 3, 16). Powstałe produkty są mniej toksyczne, bardziej hydrofilne, a przez to łatwiej usuwane z organizmu. Znaczna skuteczność transferazy S-glutationowej wynika nie tylko z niskiej specyficzności substratowej, która umożliwia detoksykację znacznej liczby związków chemicznych, ale także z tego, że występuje ona w postaci licznych izoenzymów. U ssaków stwierdzono obecność 8 klas genów kodujących izoenzymy transferazy S-glutationowej (8, 10, 11, 13). W mózgu ssaków dominującym izoenzymem jest GST pi (19).

Celem badań było określenie ekspresji GST pi w korze mózgowej trzech szczepów myszy transgenicznyc – SOD1, Cra1 i SOD1/Cra1 – wykazujących objawy neurodegeneracji takie, jak obserwowane w SLA u ludzi.

Materiał i metody

Zwierzęta. Badania prowadzono na korze czołowej hybrydowych myszy transgenicznyc szczepu C3H-B6. Grupę I stanowiły myszy z mutacją G93A w ludzkim genie dysmutazy ponadtlenkowej (SOD1), grupę II z mutacją w genie ciężkiego łańcucha dyneiny (Cra1), grupę III – podwójne heterozygoty (SOD1/Cra1). Grupę kontrolną stanowiły myszy szczepu dzikiego (WT). Badano samce w wieku 70 i 140 dni. W każdej grupie było 6 zwierząt. Z powodu różnic w długości życia, badane myszy szczepu SOD1 były w stadium bezobjawowym (wiek 70 dni) i objawowym (wiek 140 dni), podczas gdy pozostałe grupy zwierząt nie wykazywały objawów chorobowych.

Badanie ekspresji na poziomie mRNA i białka. Całkowite RNA otrzymywano przy użyciu zestawu NucleoSpin® (Macherey-Nagel). Poziom ekspresji genu GST pi badano metodą RT-PCR (Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction).



Ryc. 2. Ekspresja GST pi na poziomie białka

Objaśnienia: Ekspresję oznaczano metodą Western blottingu, jak podano w rozdziale Materiał i metody. 1 – marker wielkości; 2 – standard GSTpi (100 ng/μl); 3 – myszy 70-dniowe, szczep dziki (16,85 ng/μl); 4 – myszy 70-dniowe, SOD1/Cra1 (11,21 ng/μl); 5 – myszy 70-dniowe, Cra1 (16,96 ng/μl); 6 – myszy 70-dniowe, SOD1 (6,94 ng/μl); 7 – myszy 140-dniowe, szczep dziki (6,40 ng/μl); 8 – myszy 140-dniowe, SOD1/Cra1 (3,20 ng/μl); 9 – myszy 140-dniowe, SOD1 (3,00 ng/μl); 10 – myszy 140-dniowe, Cra1 (6,05 ng/μl)

Jako wewnętrzną kontrolę oznaczano ekspresję mRNA rybosomalnego białka S12 (housekeeping gene). Produkty reakcji PCR rozdzielano w żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny. Poziom ekspresji określano półilościowo, jako stosunek gęstości optycznej (OD) prążka GST pi do gęstości optycznej prążka S12. Każde oznaczenie wykonywano w dwóch powtórzeniach.

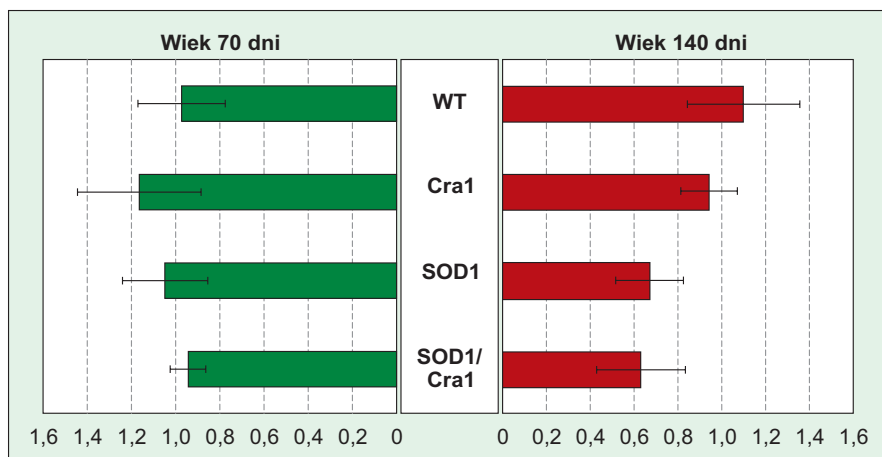
Poziom białka GST pi oznaczano metodą Western blottingu, według standardowych procedur. Białko do analizy uzyskiwano homogenizując tkankę w buforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS). Stosowano królicze, poliklonalne przeciwciała anti-GST pi (Novocastra). Jako kontroli używano oczyszczonego białka GST pi z łożyska człowieka (Sigma). Każde oznaczenie wykonywano dwukrotnie w dwóch powtórzeniach.

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy pomocy testu istotności t-Studenta.

Badania przeprowadzono za zgodą II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach przy Akademii Medycznej w Warszawie.

Wyniki i omówienie

U młodszych myszy (wiek 70 dni) ekspresja GST pi na poziomie mRNA była podobna we wszystkich badanych grupach zwierząt i wynosiła: $0,97 \pm 0,2$ w szczepie dzikim, $1,16 \pm 0,28$ w Cra1, $1,05 \pm 0,19$ w SOD1 i $0,94 \pm 0,08$ w Cra1/SOD1 (ryc. 1). U myszy starszych (wiek 140 dni) w szczepie dzikim i Cra1



Ryc. 1. Ekspresja GST pi na poziomie mRNA

Objaśnienie: Ekspresję oznaczano metodą RT-PCR, jak podano w rozdziale Materiał i metody. Każdy wynik jest średnią ± SD z oznaczeń wykonanych na 6 myszach, w dwóch powtórzeniach

ekspresja utrzymywała się na podobnym poziomie i nie różniła istotnie od ekspresji w korze zwierząt młodszych (ryc. 1). Natomiast w szczepach SOD1 i Cra1/SOD1 poziom ekspresji mRNA-GST pi był obniżony w stosunku do 140-dniowej kontroli oraz grupy Cra1 o około 35% i wynosił, odpowiednio, $0,67 \pm 0,15$ i $0,63 \pm 0,2$ ($p < 0,001$) (ryc. 1). Był też znacząco niższy ($p < 0,001$) niż w odpowiednich grupach zwierząt młodszych.

Spadkowi ekspresji GST pi na poziomie mRNA towarzyszył spadek poziomu białka, który w korze czołowej 70- i 140-dniowych myszy z mutacją SOD1 wynosił około 40% w porównaniu do szczepu dzikiego (ryc. 2). Ekspresja białka GST pi była także obniżona u myszy Cra1/SOD1, jednak spadek był nieco mniejszy niż w szczepie SOD1 (odpowiednio, do 66,5% i 50% u 70- i 140-dniowych). U myszy Cra1 poziom ekspresji białka GST pi był niezmienny w obu grupach wiekowych (ryc. 2).

Uzyskane przez nas wyniki dotyczące ekspresji GST pi odzwierciedlają obserwacje neurologiczno-behawioralne poczynione przez innych badaczy. Wiadomo, że średnia długość życia myszy transgenicznych z mutacją G93A w ludzkim genie SOD1 jest znacznie krótsza niż szczepu dzikiego i wynosi 147 dni (18). Masa ciała jest niższa, a aktywność ruchowa słabsza już we wczesnym okresie życia. Znaczne nasilenie objawów klinicznych związanych z degeneracją neuronu ruchowego następuje u zwierząt w wieku około 115 dni (18). W przeciwieństwie do myszy SOD1, masa ciała myszy Cra1, jak również przeżywalność neuronów ruchowych nie są znacząco zmienione w stosunku do szczepu dzikiego. Jednak już u 80-dniowych zwierząt zaobserwowano znaczący spadek aktywności ruchowej wskazujący na początek procesu neurodegeneracji (6). Podwójnie transgeniczne myszy SOD1/Cra1 żyją o 20 dni dłużej niż myszy SOD1, przy czym wykazują łagodniejszy fenotyp i opóźniony postęp choroby. Wydłużenie przeżycia zwierząt z mutacją SOD1^{G93A} w podwójnie transgenicznym modelu SOD1/Cra1 jest spowodowane ekspresją zmutowanego genu Dnchc1, co wiąże się z całkowitą odbudową prawidłowo działającego aksonalnego transportu wstecznego (9, 18). Pomimo łagodniejszego przebiegu choroby u myszy SOD1/Cra1, jej efekt końcowy jest letalny (9, 18).

Wysoki, nie zmieniony w stosunku do szczepu dzikiego poziom ekspresji GST pi w korze czołowej myszy Cra1 świadczy o dużym znaczeniu sprawnego systemu antyoksydacyjno-detoksykacyjnego w ochronie przed neurodegeneracją. Znaczące obniżenie ekspresji GST pi w korze mózgowej myszy transgenicznych z mutacją G93A w ludzkim genie dysmutazy ponadtlenkowej (SOD1 i SOD1/Cra1) w stadium objawowym choroby wskazuje, że ekspresja tego enzymu w większym stopniu ma związek z mutacją w genie SOD1 niż ze sprawnie działającym transportem aksonalnym.

Piśmiennictwo

1. *Al-Chalabi A., Powell J. F., Leigh P. N.*: Neurofilaments, free radicals, excitotoxins, and amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 1995, 18, 540-545.
2. *Baez S., Segura-Aguilar J., Widersten M., Johansson A.-S., Mannervik B.*: Glutathione transferase catalyse the detoxication of oxidized metabolites (o-quinones) of catecholamines and may serve as an antioxidant system preventing degenerative cellular processes. *Biochem. J.* 1997, 324, 25-28.
3. *Barańczyk-Kuźma A., Kuźma M., Gutowicz M., Kaźmierczak B., Sawicki J.*: Glutathione S-transferase pi as a target for tricyclic antidepressants in human brain. *Acta Biochim. Polon.* 2004, 5, 207-212.
4. *Dal Canto M. C., Gurney M. E.*: Neuropathological changes in two lines of mice carrying a transgene for mutant human CuZn SOD and in mice overexpressing wild type human SOD: a model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res.* 1995, 676, 25-40.
5. *Gurney M. E., Pu H., Chiu A. Y., Dal Canto M. C., Polchow C. Y., Alexander D. D., Caliendo J., Hentati A., Kwon Y. W., Deng H. X., Chen W., Zhai P., Sufit R. L., Siddique T.*: Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 1994, 264, 1772-1775.
6. *Hafezparast M., Klocke R., Ruhrberg C., Marquardt A., Ahmad-Annuar A., Bowen S., Lalli G., Witherden A. S., Hummerich H., Nicholson S., Morgan P. J., Oozageer R., Priestley J. V., Averill S., King V. R., Ball S., Peters J., Toda T., Yamamoto A., Hiraoka Y., Augustin M., Korhauz D., Wattler S., Wabnitz P., Dickneite C., Lampel S., Boehme F., Peraus G., Popp A., Rudelius M., Schlegel J., Fuchs H., Hrabe de Angelis M., Schiavo G., Shima D. T., Russ A. P., Stumm G., Martin J. E., Fisher E. M.*: Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science* 2003, 300, 808-812.
7. *Hrabe de Angelis M. H., Flawinkel H., Fuchs H., Rathkolb B., Soewarto D., Marschall S., Heffner S., Pargent W., Wuensch K., Jung M., Reis A., Richter T., Alessandrini F., Jakob T., Fuchs E., Kolb H., Kremmer E., Schaeble K., Rollinski B., Roscher A., Peters C., Meitinger T., Strom T., Steckler T., Holsboer F., Klopstock T., Gekeler F., Schindewolf C., Jung T., Avraham K., Behrendt H., Ring J., Zimmer A., Schughart K., Pfeiffer K., Wolf E., Balling R.*: Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis. *Nat. Genet.* 2000, 25, 444-447.
8. *Islam M. Q., Platz A., Szpirer C., Szpirer C., Levan G., Mannervik B.*: Chromosomal localization of human glutathione transferase genes of classes alpha, mu and pi. *Hum. Genet.* 1989, 82, 338-342.
9. *Kieran D., Hafezparast M., Bohnert S., Dick J. R., Martin J., Schiavo G., Fisher E. M., Greensmith L.*: A mutation in dynein rescues axonal transport defects and extends the life span of ALS mice. *J. Cell Biol.* 2005, 169, 561-567.
10. *Mannervik B., Awasthi Y. C., Board P. G., Hayes J. D., Di Ilio C., Ketterer B., Listowsky L., Morgenstern R., Muramatsu M., Pearson W. R., Pickett C. B., Sato K., Wilderstein M., Wolf C. R.*: Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem. J.* 1992, 282, 305-306.
11. *Mannervik B., Danielson U. H.*: Glutathione transferases – structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 1988, 23, 283-337.
12. *Mulder D. W., Kurland L. T., Offord K. P., Beard C. M.*: Familial adult motor neuron disease: amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 1986, 36, 511-517.
13. *Pickett C. V., Lu A. Y.*: Glutathione S-transferases, gene structure, regulations, biological function. *Annu. Rev. Biochem.* 1989, 58, 743-764.
14. *Rastan S., Hough T., Kierman A., Hardisty R., Erven A., Gray I. C., Voeling S., Isaacs A., Tsai H., Strivens M., Washbourne R., Thornton C., Greenaway S., Hewitt M., McCormick S., Selley R., Wells C., Tymowska-Lalanne Z., Roby P., Mburu P., Rogers D., Hagan J., Reavill C., Davies K., Glenister P., Fisher E. M., Martin J., Vizor L., Bouzyk M., Kelsell D., Guenet J. L., Steel K. P., Sheardown S., Spurr N., Gray I., Peters J., Nolan P. M., Hunter A. J., Brown S. D.*: Towards a mutant map of the mouse – new models of neurological, behavioural, deafness, bone, renal and blood disorders. *Genetica* 2004, 122, 47-49.
15. *Rowland L. P.*: Hereditary and acquired motor neuron diseases, [w:] Merritt's Textbook of Neurology. Williams & Wilkins, Baltimore 1995, 742-749.
16. *Sawicki J., Kuźma M., Barańczyk-Kuźma A.*: The effect of serotonin, its precursors and metabolites on brain glutathione-S-transferase. *Neurochem. Res.* 2001, 26, 469-472.
17. *Terro F., Lesort M., Viader F., Ludolph A., Hugon J.*: Antioxidant drugs block in vitro the neurotoxicity of CSF from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport* 1996, 7, 1970-1972.
18. *Teuchert M., Fisher D., Schwalemstoecker B., Habisch H. J., Bockers T. M., Ludolph A. C.*: A dynein mutation attenuates motor neuron degeneration in SOD1(G93A) mice. *Exp. Neurol.* 2006, 198, 271-274.
19. *Theodore C., Singh S. V., Hong T. D., Awasthi Y. C.*: Glutathione S-transferases of human brain. Evidence for two immunologically distinct types of 26500-Mr subunits. *Biochem. J.* 1985, 225, 375-382.
20. *Tu P. H., Raju P., Robinson K. A., Gurney M. E., Trojanowski J. Q., Lee V. M.*: Transgenic mice carrying a human mutant superoxide dismutase transgene develop neuronal cytoskeletal pathology resembling human amyotrophic lateral sclerosis lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93, 3155-3160.

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