

BARBARA MAJEWSKA

Zakład Neurofizjologii

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

e-mail:

MIEDZY TRWAŁOŚCIĄ A PLASTYCZNOŚCIĄ — CYTOSZKIELET MIKROTUBULARNY KOMÓRKI NERWOWEJ

WSTĘP

Mikrotubule są ważnym elementem cytoszkieletu komórek eukariotycznych, odpowiedzialnym m. in. za utrzymywanie ich kształtu. Kształt komórki nienerwowej może ulegać pewnym zmianom bez większego wpływu na jej prawidłowe funkcjonowanie. Cytoszkielet mikrotubularny takiej komórki jest strukturą dynamiczną, podlegającą ciągłym procesom polimeryzacji i depolimeryzacji wchodzących w jego skład mikrotubul. Dzięki temu kształt komórki może ulegać zmianom, co ma szczególnie istotne znaczenie dla komórek podejmujących aktywność mitotyczną.

Funkcjonowanie dojrzałej komórki nerwowej jest natomiast ściśle uzależnione od jej

prawidłowego kształtu związanego z obecnością wypustek nerwowych: aksonu i dendrytów. Dlatego też mikrotubule neuronu muszą być strukturami stabilnymi, zapewniającymi utrzymanie właściwego kształtu wypustek. Stabilność mikrotubul neuronalnych jest osiągana dzięki białkom związanym z mikrotubulami (ang. microtubule-associated proteins, MAP), które łącząc się z nimi usztywniają ich strukturę. Białka MAP, które występują w neuronach szczególnie obficie, lub wręcz są specyficzne dla komórek nerwowych, to MAP1, MAP2 i Tau (AVILA i współaut. 1994). Ich budowa i funkcje zostaną omówione w niniejszym artykule.

STRUKTURA I FUNKCJA MIKROTUBUL

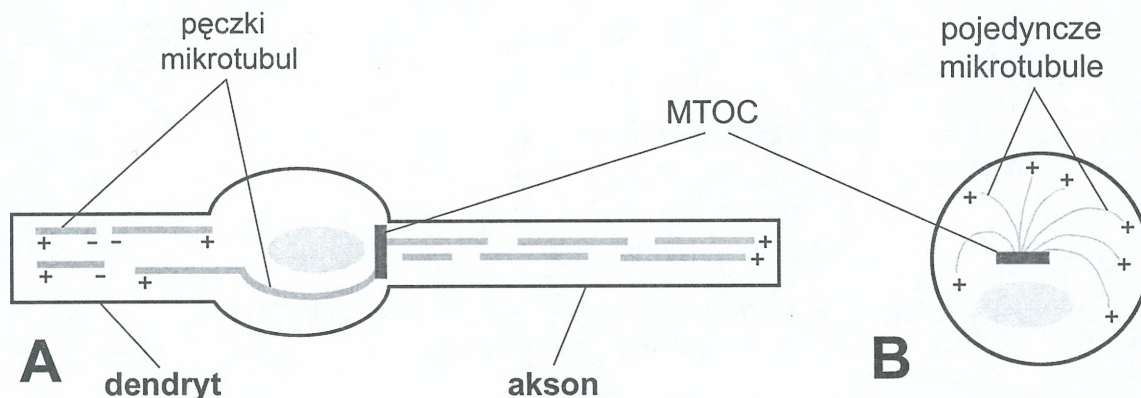
Mikrotubule to struktury w kształcie walca o średnicy 25 nm, którego ściany zbudowane są z 13 tak zwanych protofilamentów, liniowych polimerów tubuliny α i β (SULLIVAN 1988). Uczestniczą one m. in. w regulacji kształtu komórki, w wewnątrzkomórkowym transporcie organelli oraz w podziałach komórkowych. Są strukturami niezwykle dynamicznymi i podlegają ciągłym procesom polimeryzacji i depolimeryzacji, których mechanizm wyjaśnia się współcześnie modelem dynamicznej niestabilności (ang. dynamic instability), zaproponowanym w 1984 r. przez MITCHISONA i KISCHERA (1984). Według tego modelu długość mikrotubuli wzrasta wskutek polimeryzacji do momentu, w którym następuje nagle zdarzenie, zwane „katastrofą”, prowadzące do całkowitego rozpadu mikrotubuli lub jej znacznego skrócenia. Wydłużanie mikrotubuli zachodzi szybciej na jednym z koń-

ców, nazywanym końcem plus. Polimeryzacja na końcu przeciwnym, który jest na ogół zakończony w strukturze zwanej centrum organizacji mikrotubul (ang. microtubule organizing centre, MTOC) przebiega dużo wolniej. Koniec ten nazywany jest końcem minus. Proces polimeryzacji jest zależny od GTP i zachodzi tak długo, jak długo w koniec mikrotubuli wbudowywane są podjednostki tubulinowe (dimery α/β) ze związanym GTP. Hydroliza GTP i pojawienie się w zakończeniu mikrotubuli kompleksu GDP-tubulina prowadzi do jej rozpadu (AVILA 1990).

W komórce nienerwowej dynamiczne mikrotubule połączone są końcem minus z centrum organizacji mikrotubul, zlokalizowanym w pobliżu jądra komórkowego, i stąd rozchodzą się promieniście ku obwodowi komórki (Ryc. 1). Nie tworzą one pęczków i nieustannie podlegają

procesom polimeryzacji/depolimeryzacji, co nie zakłóca ich prawidłowego funkcjonowania. Zróżnicowane komórki nerwowe są komórkami nie ulegającymi podziałom i posiadającymi skomplikowaną morfologię, od której zależy ich

ograniczone jest wyłącznie do jednego z przedziałów komórki — somatodendrytycznego lub aksonalnego. Takie rozmieszczenie elementów subkomórkowych jest efektem działania procesów transportu wewnątrzkomórkowego, który



Ryc. 1. Różnice w budowie cytoszkieletu mikrotubularnego w komórce nerwowej (A) i nie nerwowej (B).

W neuronie tylko nieliczne mikrotubule zachowują kontakt z centrum organizacji mikrotubul (MTOC), większość tworzy pęczki o odmiennej orientacji w dendrytach i w aksonie. W komórce nienerwowej mikrotubule nie tworzą pęczków, rozchodzą się promieniście z MTOC zachowując jednakową orientację.

funkcja. Muszą one zatem posiadać stabilny cytoszkielet, zapewniający morfologiczną niezmienność. Polaryzacja morfologii neuronu jest zewnętrznym przejawem jego biegunowości ultrastrukturalnej. Występowanie pewnych struktur komórkowych, białek, a nawet mRNA,

odbywa się głównie wzdłuż szlaków wytyczonych mikrotubulami (MAJEWSKA 1999). A zatem, integralność mikrotubul stanowi warunek niezbędny dla utrzymania prawidłowej morfologii i funkcji neuronu.

BIAŁKA ZWIĄZANE Z MIKROTUBULAMI

Białka związane z mikrotubulami wyróżniono jako odrębną grupę na podstawie obserwacji wskazujących na ich silne wiązanie z tubuliną. Białka te są obecne w ekstraktach mikrotubul otrzymanywanych na drodze repolimeryzacji tubuliny z homogenatów mózgu. Obserwowana *in vitro* zdolność MAP do stymulowania polimeryzacji tubuliny nadaje im szczególne znaczenie w kształtowaniu neuronalnego cytoszkieletu mikrotubularnego (WEINGARTEN i współaut. 1975, SLOBODA i współaut. 1976, KUZNETSOV i współaut. 1981, RIEDERER i współaut. 1986). Białka MAP mają postać włókienek tworzących mostki między mikrotubulami, co zapewnia utrzymanie stałych odległości między nimi. W ten sposób białka te z jednej strony zapewniają integralność cytoszkieletu mikrotubularnego, z drugiej zaś przyczyniają się do ustalenia stosunków przestrzennych między mikrotubulami oraz zachowania średnicy wypustek nerwowych (SCHOENFELD i OBAR 1994). Strukturę mikrotubul dodatkowo wzmacnia ich „przyczepianie” się poprzez MAP do innych elementów cytoszkieletu, takich jak neurofilamenty i filamenty

aktywne, oraz, bezpośrednio lub pośrednio, do błony komórkowej (MATUS 1988). Opisano cztery rodziny białek z tej grupy: MAP1, MAP2, MAP3/4 i Tau (AVILA i współaut. 1994), z których większość to białka specyficzne dla tkanki nerwowej. Każdą z tych rodzin charakteryzuje występowanie dwóch zasadniczych grup MAP, tzw. białek wczesnych i późnych. Białka wczesne pojawiają się we wczesnych etapach rozwoju układu nerwowego i wykazują niższe od białek późnych masy cząsteczkowe. W miarę dojrzewania tkanki nerwowej całkowicie lub częściowo zastępują je białka późne. Ekspresja tych ostatnich narasta z wiekiem i jest szczególnie wysoka u zwierząt dorosłych. W pewnych obszarach dojrzałego układu nerwowego neurony zachowują jednak zdolność do syntezy białek wczesnych. Są to te regiony, w których wypustki komórek nerwowych podlegają procesom strukturalnej plastyczności również w wieku dojrzałym. Fakt ten, jak i szereg danych doświadczalnych pokazujących, że wczesne MAP, w przeciwieństwie do ich późnych odpowiedników, sprzyjają utrzymaniu dynamicznych wła-

ściwości mikrotubul, skłonił badaczy do wysunięcia hipotezy mówiącej, że obecność wczesnych MAP sprzyja plastyczności neuronalnej, podczas gdy rola późnych form, polegająca na ograniczeniu dynamiki cytoszkieletu, sprzyja jego stabilności i utrzymaniu właściwej morfologii komórki nerwowej (TUCKER 1990). Oprócz zróżnicowania rozwojowego, ekspresję MAP charakteryzuje zróżnicowanie przestrzennego rozmieszczenia w komórce, zwane przedziałowością (ang. compartmentation). Występowanie pewnych MAP jest ograniczone do dendrytów, innych do aksonów, część MAP wykazuje z kolei równomierne rozmieszczenie na obszarze całego neuronu (SCHOENFELD i OBAR 1994).

MAP1

MAP1 występuje w dwóch izoformach, 1A i 1B, których cząsteczki są zbudowane z ciężkich i lekkich łańcuchów będących produktami różnych genów (GARNER i współaut. 1990). Ciężkie łańcuchy (350 i 320 kDa) wykazują podobieństwo sekwencji, zwłaszcza dodatnio naładowanego odcinka przy końcu N, który zawiera wielokrotne powtórzenia sekwencji (Lys/Arg)(Lys/Arg)(Glu/Asp) i tworzy domenę wiążącą tubulinę (NOBLE i współaut. 1989). Z domeną wiążącą tubulinę łańcuchów ciężkich związane są łańcuchy lekkie LC1 (34 kDa), LC2 (30 kDa) lub LC3 (19 kDa). Łańcuchy MAP1A i LC2 są pochodnymi polipeptydu syntetyzowanego w oparciu o jeden transkrypt, podobnie jak MAP1B i LC1. Pochodzenie LC3 nie jest znane (SCHOENFELD i OBAR 1994). Obie izoformy MAP1 występują przede wszystkim w tkance nerwowej, a ich ekspresja w ośrodkowym układzie nerwowym kręgowców pozostaje się pod silną kontrolą rozwojową.

Ekspresja MAP1A w tkance nerwowej ulega nasileniu w miarę dojrzewania (RIEDERER i MATUS 1985). Białko MAP1A jest wykrywane w ciałach neuronów, dendrytach i aksonach oraz w oligodendrocytach (BLOOM i współaut. 1984). Poszczególne typy neuronów mogą różnić się między sobą zawartością MAP1A (HUBER i MATUS 1984). Poziom mRNA MAP1A jest niski we wczesnych fazach rozwoju, choć u szczura jego śladowe ilości są już wykrywalne w 19 dniu rozwoju embrionalnego, czyli znacznie wcześniej od pojawienia się białka - w 10 dniu po narodzeniu (TUCKER i współaut. 1989). Na przykład, u chomika ekspresja mRNA MAP1A zaczyna wzrastać począwszy od 9 dnia po narodzeniu (OBLINGER i KOST 1994) i, podobnie jak u szczura, osiąga wysoki poziom w wieku dorosłym. Pewne ilości mRNA MAP1A są wykrywane w proksymalnych odcinkach dendrytów, np. nie-

których korowych neuronów piramidowych (MATUS i RIEDERER 1986).

MAP1B znane jest również jako MAP1.2 (ALETTA i współaut. 1988), MAP1X (CALVERT i ANDERTON 1985) i MAP5 (RIEDERER i współaut. 1986). Jest białkiem wczesnym, pojawiającym się w ośrodkowym układzie nerwowym jako pierwsze z białek MAP (CALVERT i współaut. 1987, TUCKER i współaut. 1988). W miarę dojrzewania obserwuje się spadek ekspresji MAP1B zarówno na poziomie białka (BLOOM i współaut. 1985), jak i na poziomie mRNA (SAFAEI i FISCHER 1989, OBLINGER i KOST 1994). W ośrodkowym układzie nerwowym dojrzałym zwierząt MAP1B jest obecne w tych rejonach, gdzie przez całe życie zwierzęcia zachodzą procesy różnicowania i wzrostu wypustek nerwowych, np. w opuszkach węchowych (TUCKER i współaut. 1989, VIERECK i współaut. 1989) i w siatkówce (TUCKER i MATUS 1988). Ponadto, wysoki poziom MAP1B obserwuje się w obwodowym układzie nerwowym dorosłych zwierząt (MA i współaut. 1997). Komórkowa lokalizacja MAP1B w neuronie obejmuje perykarion, dendryty i akson (BLOOM i współaut. 1985, RIEDERER i współaut. 1986, GARNER i współaut. 1989), choć niektóre doniesienia wskazują, że największą koncentrację MAP1B osiąga w aksonie (BLACK i współaut. 1994). Postuluje się ponadto obecność MAP1B w astrocytach i w oligodendrocytach (BLOOM i współaut. 1985, FISCHER i współaut. 1990, ULLOA i współaut. 1994b).

Zarówno MAP1A, jak i MAP1B ulegają fosforylacji. Procesy fosforylacji MAP1B stały się obiektem szczególnie intensywnych badań z powodu ich roli we wzroście i plastyczności aksonów. Zidentyfikowano dwa główne typy ufosforylowania MAP1B, tzw. typ I i II (ang. mode I, II), które obejmują liczne miejsca fosforylacji (PEDROTTI i współaut. 1996). Miejsca fosforylacji typu I są zlokalizowane w C-końcowym fragmencie cząsteczki, a enzymy katalizujące te reakcje należą do grupy kinaz PDPK (ang. proline directed protein kinases) i są to np. kinazy MAP (kinazy białkowe aktywowane mitogenami, ang. mitogen activated protein kinases) lub kinazy zależne od cyklin (ULLOA i współaut. 1993a, GARCIA ROCHA i AVILA 1995, JOHNSTONE i współaut. 1997). Defosforylację tych miejsc katalizują fosfatazy białkowe 2A oraz 2B (kalcyneuryna) (ULLOA i współaut. 1993a). Obecność I typu ufosforylowania MAP1B jest charakterystyczna dla rosnących aksonów (CALVERT i współaut. 1987, GORDON-WEEKS i współaut. 1993, ULLOA i współaut. 1994a), a szczególnie dla ich odcinków dystalnych i stożków wzrostu (MANSFIELD 1992). W miarę dojrzewania neuro-

nów poziom fosforylacji typu I obniża się i staje się prawie niewykrywalny w dojrzałym mózgu (FISCHER i ROMANO-CLARKE 1990, ULLOA i współaut. 1993a). Wyjątek stanowią te obszary ośrodkowego układu nerwowego, które zachowują potencjał plastyczności strukturalnej, m. in. opuszki węchowe, podwzgórze, fimbria, siatkówka (NOTHIAS i współaut. 1996, RAMÓN-CUETO i AVILA 1997). Ponadto stwierdzono, że u schyłku synaptogenezy w korze somatosensorycznej u myszy, w trzecim tygodniu życia pozapłodowego, następuje przejściowa re-ekspresja I typu fosforylacji MAP1B, co może świadczyć o tym, że część aksonów badanego obszaru korowego zostaje ponownie czasowo wyposażona w potencjał ulegania zmianom plastycznym (MAJEWSKA i SKANGIEL-KRAMSKA 2000). Poziom fosforylacji typu I pozostaje wysoki w obwodowym układzie nerwowym dorosłych zwierząt, gdzie zdolności regeneracyjne są zachowane przez całe życie zwierzęcia (BUSH i współaut. 1996).

Fosforylacja MAP1B typu II dotyczy miejsc N-końca cząsteczki i jest przypuszczalnie katalizowana przez kinazę kazeinową II (DÍAZ-NIDO i współaut. 1988, ULLOA i współaut. 1993b). Miejsca te są defosforylowane przez fosfatazy białkowe 1 i 2A (ULLOA i współaut. 1993a). Fosforylacja typu II zachodzi zarówno w aksonach, jak i w przedziale somatodendrycznym neuronu (ULLOA i współaut. 1994a) i, w przeciwieństwie do fosforylacji typu I, intensywność tego procesu nie spada w miarę rozwoju układu nerwowego (ULLOA i współaut. 1993a, RIEDERER 1995).

Różnice czasowo-przestrzenne w rozmieszczeniu MAP1B w zależności od sposobu ufosforylowania wskazują, że białko to pełni odmienną funkcję, kiedy fosforylacji ulegają miejsca typu I, a inną, kiedy ufosforylowane są miejsca typu II fosforylacji. O ile istnieją przesłanki pozwalające sądzić, że typ II ufosforylowania sprzyja wiązaniu MAP1B z mikrotubulami (DÍAZ-NIDO i współaut. 1990, ULLOA i współaut. 1993a), a co za tym idzie ich stabilizacji, to niewiele wiadomo na temat wpływu, jaki typ I ufosforylowania wywiera na powinowactwo MAP1B do mikrotubul. Wczesna ekspresja oraz postępująca w rozwoju defosforylacja tych miejsc wskazują, że typ I ufosforylowania MAP1B przyczynia się do utrzymania mikrotubul w stanie dynamicznym obserwowanym np. w trakcie wzrostu aksonów (SABRY i współaut. 1991, TANAKA i KIRSCHNER 1991). Specyficzna defosforylacja tych miejsc w aksonach dojrzałych neuronów skutkowałaby zatem pojawieniem się stabilnych mikrotubul. Warto również wspomnieć, że w obrębie dystroficznych akso-

nów i pęczków neurofibrylarnych, znajdujących w mózgu pacjentów z chorobą Alzheimera, zaobserwowano obecność formy MAP1B nadmiernie ufosforylowanej głównie w miejscach cząsteczki, gdzie zachodzi fosforylacja typu I (HASEGAWA i współaut. 1990), co może mieć związek z nieprawidłowym wzrostem wypustek nerwowych charakterystycznym dla choroby Alzheimera (MASLIAH i współaut. 1991).

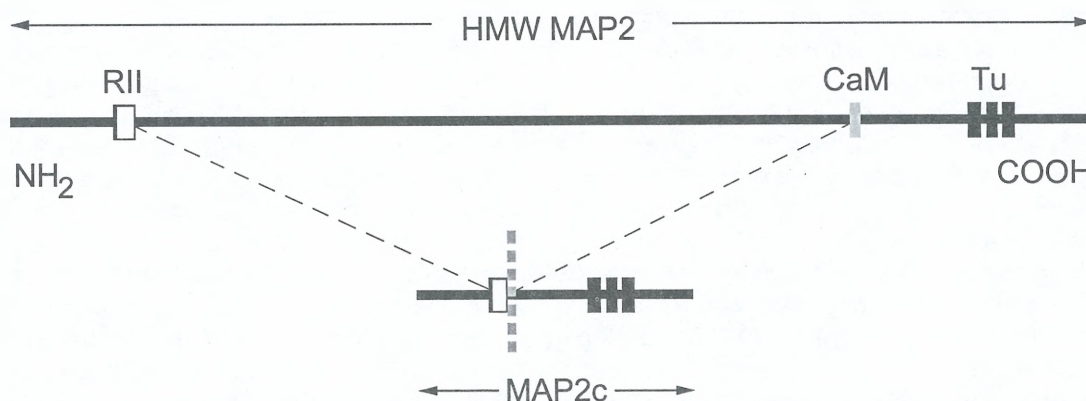
Udział MAP1B w kształtowaniu wypustek neuronu potwierdzono w wielu modelach doświadczalnych. Doniesienia wskazują na rolę MAP1B w procesach wzrostu wypustek komórkowych (BRUGG i MATUS 1988, DÍAZ-NIDO i współaut. 1991, BRUGG i współaut. 1993) i utrwalania morfologii wypustek nerwowych (SHEA i BEERMANN 1994, DITTELLA i współaut. 1996). Wyniki tych badań sugerują, że rola MAP1B w morfogenezie neuronu dotyczy jednak raczej stabilizacji wypustek aksonalnych, a nie początkowych etapów ich wzrostu, oraz że rola ta jest możliwa dzięki fosforylacji białka.

MAP2

Znane są obecnie cztery izoformy MAP2, oznaczane jako 2a, 2b, 2c i 2d (MAJEWSKA 1995). Dwie pierwsze to formy wysokocząsteczkowe (ang. high molecular weight, HMW), o masie cząsteczkowej około 280 kDa (KIM i współaut. 1979), natomiast dwie pozostałe to formy niskocząsteczkowe (ang. low molecular weight, LMW), o masie cząsteczkowej około 70 kDa (RIEDERER i MATUS 1985, DOLL i współaut. 1993). Wszystkie izoformy MAP2 są produktami jednego genu (KALCHEVA i współaut. 1995). MAP2b i LMW MAP2 są syntetyzowane w oparciu o, odpowiednio, mRNA o długości 9 kb i 6 kb, które stanowią transkrypty powstające na drodze alternatywnego składowania eksonów (GARNER i MATUS 1988). Nie jest natomiast jasne, czy MAP2a jest produktem alternatywnego składowania mRNA, czy stanowi potranslacyjną modyfikację MAP2b (BINDER i współaut. 1984). Uderzającą cechą cząsteczek HMW MAP2 i MAP2c jest obecność trzech nieidentycznych powtórzeń sekwencji 18 aminokwasów, oddzielonych od siebie fragmentami 13-aminokwasowymi (LEWIS i współaut. 1988) (cząsteczka MAP2d zawiera cztery takie powtórzenia; FERHAT i współaut. 1994). Powtórzenia te występują w pobliżu dodatkowo naładowanego końca C cząsteczki i odgrywają rolę w wiązaniu tubuliny, stąd region ten nazywano domeną wiążącą tubulinę (LEWIS i współaut. 1988). Za jej pośrednictwem cząsteczka białka MAP2 łączy się z mikrotubulą, podczas gdy pozostały, N-końcowy fragment, wystaje z jej ściany (VALLEE 1980).

Swobodny odcinek cząsteczki, zwany domena projekcyjną, jest niemal w całości usuwany w procesie alternatywnego składania podczas syntezy MAP2c (Ryc. 2). W efekcie MAP2c sta-

współaut. 1989), hipokampie (FERHAT i współaut. 1994) i siatkówce (TUCKER i MATUS 1988). MAP2d wykazuje odmienny od MAP2c wzór ekspresji. W korze mózgowej i opuszkach wę-



Ryc. 2. Schemat budowy cząsteczki izoform MAP2 — wysokocząsteczkowych (HMW) i niskocząsteczkowej (MAP2c).

RII — miejsce wiązania podjednostki regulatorowej RII kinazy białkowej A; CaM — miejsce wiązania kalmoduliny; Tu — domena wiążąca tubulinę. Cienką linią przerywaną zaznaczono miejsca cięcia mRNA w procesie alternatywnego składania. Gruba linia przerywana wskazuje rejon łączący skrajne odcinki mRNA MAP2c.

nowi małą cząsteczkę zbudowaną z około 470 aminokwasów, złożoną ze skrajnych odcinków sekwencji MAP2b (1830 aminokwasów) (PAPAN-DRIKOPOULOU i współaut. 1989, KINDLER i współaut. 1990).

Ekspresja LMW i HMW MAP2 również podlega regulacji rozwojowej. U szczura ekspresję MAP2b, zarówno na poziomie mRNA, jak i na poziomie białka, wykrywa się już w okresie prenatalnym, w 19 dniu rozwoju embrionalnego (TUCKER i współaut. 1989). Utrzymuje się ona na mniej więcej stałym poziomie przez całe życie zwierzęcia (RIEDERER i MATUS 1985, FERHAT i współaut. 1994). Obserwowany podczas rozwoju myszy wzrost poziomu białka HWM MAP2 (CRANDALL i FISCHER 1989) jest wynikiem pojawienia się, między 10 a 20 dniem po narodzeniu, białka MAP2a, którego poziom osiąga maksimum pod koniec trzeciego tygodnia życia, po czym nieznacznie spada (RIEDERER i MATUS 1985, FERHAT i współaut. 1994). Ekspresja mRNA MAP2c oraz samego białka jest znacząca w tkance nerwowej zwierząt w okresie okołonarodzeniowym i obniża się, niekiedy aż do zupełnego zaniku, w miarę dojrzewania układu nerwowego (RIEDERER i MATUS 1985, FERHAT i współaut. 1994). Natomiast w dojrzałym układzie nerwowym ekspresja MAP2c jest wykrywalna, na poziomie mRNA i białka, w tych obszarach, które przez całe życie podlegają procesom plastyczności synaptycznej, np. w opuszkach węchowych (CRANDALL i FISCHER 1989, VIREECK i

chowych poziom jego mRNA jest stosunkowo niski u szczurów w okresie okołonarodzeniowym, natomiast wysoki u zwierząt dorosłych (FERHAT i współaut. 1994). Dane te wymagają dalszego potwierdzenia, niemniej mogłyby wskazywać, że wysoki poziom ekspresji LMW MAP2 w niektórych okolicach mózgu dorosłych zwierząt odzwierciedla raczej obecność izoformy 2d, niż 2c.

Oprócz regulacji rozwojowej, ekspresja białek MAP2 podlega przestrzennej regulacji w obrębie komórki nerwowej. HMW MAP2 są w zasadzie ograniczone do somatodendrytycznego przedziału neuronu, czyli do obszaru perykarionu i dendrytów (MATUS i współaut. 1981, De CAMILLI i współaut. 1984). Co ciekawe, w dendrytach występuje również transkrypt form wysokocząsteczkowych — mRNA o długości 9 kb (GARNER i MATUS 1988, KLEIMAN i współaut. 1994). Z kolei białko MAP2c jest obecne w dendrytach i w aksonach komórek nerwowych (TUCKER i MATUS 1988, TUCKER i współaut. 1988, ALBALA i współaut. 1995). Nie stwierdzono jednak obecności jego transkryptu, mRNA o długości 6 kb, poza obszarem ciała komórki (KINDLER i współaut. 1996). MAP2d wykazuje przypuszczalnie przestrzenny wzór ekspresji zbliżony do MAP2c, jednak jak dotąd brak na ten temat jednoznacznych danych doświadczalnych (FERHAT i współaut. 1994). Istotnym aspektem ekspresji białek MAP2 jest jej specyficzność komórkowa. HMW MAP2 są uważane za

białka specyficzne dla neuronów (MATUS i współaut. 1981), natomiast MAP2c wykrywa się również w astrocytach (MATSUNAGA i współaut. 1999), prekursorowych komórkach gleju (ROSSER i współaut. 1997) i hodowanych komórkach Schwanna (TUCKER i współaut. 1988). Ponadto w komórkach glejowych obficie występuje białko MAP2d (DOLL i współaut. 1993).

Białka MAP2 stanowią substraty wielu kinaz białkowych. Badania *in vitro* wykazały, że MAP2 ulegają fosforylacji pod wpływem białkowej kinazy zależnej od cAMP (SLOBODA i współaut. 1975, MURTHY i współaut. 1985) i kinazy II zależnej od wapnia/kalmoduliny (YAMAMOTO i współaut. 1983), a ponadto białkowej kinazy C (AKIYAMA i współaut. 1986), kinaz PDPK, takich jak kinazy MAPK (HOSHI i współaut. 1992) oraz kinaz tyrozynowych (AKIYAMA i współaut. 1986), np. kinazy receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGF) i kinazy receptora insuliny. Stwierdzono, że fosforylację MAP2 *in vivo* katalizują: kinaza białkowa zależna od cAMP (VALLEE 1980), kinaza zależna od wapnia/kalmoduliny, kinaza białkowa C (TSUYAMA i współaut. 1987, DÍAZ-NIDO i współaut. 1993) oraz kinazy PDPK (SÁNCHEZ i współaut. 1995). Oprócz wymienionych, powszechnie znanych kinaz białkowych, w fosforylacji MAP2 biorą udział kinazy serynowo-treoninowe należące do zidentyfikowanej niedawno rodziny MARK (ang. MT-affinity regulating kinases) (DREWES i współaut. 1997). Fosforylacja różnych miejsc w cząsteczce MAP2, a w szczególności w domenie wiążącej tubulinę, prowadzi do odłączania MAP2 od mikrotubul, a zatem sprzyja wytworzeniu dynamicznego stanu mikrotubul (TSUYAMA i współaut. 1987, DREWES i współaut. 1998). Należy jednak pamiętać, że powinowactwo MAP2 do mikrotubul zależy nie tylko od stopnia ufosforylowania cząsteczki, ale również od miejsca fosforylacji (BRUGG i MATUS 1991). Stopień ufosforylowania MAP2 *in vitro* wpływa również na jego podatność na działanie kalpainy w taki sposób, że silna fosforylacja MAP2 wzmacnia oporność cząsteczki na proteolizę (JOHNSON i współaut. 1991). Stan ufosforylowania MAP2 jest stanem dynamicznym i podlega zmianom w wyniku współistnienia procesów fosforylacji i defosforylacji. Defosforylację MAP2 katalizuje kalcyneuryna (GOTO i współaut. 1985).

Jak już wspomniano, MAP2 jest białkiem głównie dendrytycznym (jedynie MAP2c jest formą wykrywaną również w aksonach). Kwestią otwartą pozostaje odpowiedź na pytanie, jak to się dzieje, że MAP2 w dojrzałym neuronie nie występuje w aksonie. Dendrytyczna lokalizacja MAP2 może być efektem transportu białka do dendrytów (KWEI i współaut. 1998). Inną przy-

czyną wyłącznej obecności MAP2 w dendrytach może być lokalna synteza białka w oparciu o dendrytyczny mRNA, w tym przypadku transport dotyczyłby nie białka, a jego transkryptu (GARNER i MATUS 1988, KLEIMEN i współaut. 1994).

Nieco więcej, niż na temat przyczyn obecności MAP2 w dendrytach, wiadomo o pełnionej tam przez nie funkcji. MAP2 wiążąc się z mikrotubulami wpływa na ich oddziaływania między sobą oraz z pozostałymi elementami cytoszkieletu. Domena wiążąca tubulinę łączy się z dime-rem tubulinowym w ścianie mikrotubuli, a domena projekcyjna cząsteczki MAP2 wystaje, niczym wyciągnięte ramię, utrzymując odległość między sąsiednimi mikrotubulami. Wśród badaczy panuje spór na temat, czy ramię domeny projekcyjnej pozostaje bierne i pozwala jedynie na fizyczne oddalenie mikrotubul (FERRALLI i współaut. 1994), czy też „łapie” sąsiednią mikrotubulę i w ten sposób umożliwia zachowanie dystansu (FRIEDRICH i ASZÓDI 1991). MAP2 sprzyja utrzymaniu integralności mikrotubul, a co za tym idzie stabilności dendrytów (MATUS 1994). Oddziaływanie MAP2 jest pod tym względem dwojakie. MAP2 obniża dynamikę mikrotubul głównie przez obniżenie tempa zdarzeń dynamicznych (wydłużanie i skracanie mikrotubul) i wydłużenie czasu pomiędzy tymi zdarzeniami (DHAMODHARAN i WADSWORTH 1995). Ponadto, MAP2 indukuje łączenie mikrotubul w pęczki, co zwiększa ich stabilność (WEISSHAAR i MATUS 1993). MAP2c również może indukować powstawanie pęczków mikrotubul, jednak jego działanie jest dużo słabsze; wykazano np., że domena bogata w prolinę, występująca w cząsteczce HMW MAP2, a nieobecna w cząsteczce MAP2c, istotnie zwiększa efektywność wiązania z mikrotubulami (FERRALLI i współaut. 1994). Z kolei, brak całej domeny projekcyjnej uniemożliwia cząsteczce MAP2c łączenie mikrotubul z innymi elementami cytoszkieletu, a zatem również przyczynia się do uplastycznienia mikrotubul (KINDLER i współaut. 1990). Stąd też uważa się, że obecność MAP2c w neuronach pozwala na utrzymanie plastyczności wypustek nerwowych, bowiem dynamika mikrotubul determinujących morfologię wypustek jest w dużej mierze zachowana (TUCKER 1990).

Poprzez swój wpływ na cytoszkielet neuronu, MAP2 bierze udział w jego morfogenezie. Badania nad wpływem ekspresji MAP2 na wzrost i różnicowanie wypustek komórek nerwowych i nienerwowych pomagają lepiej zrozumieć rolę tego białka w kształtowaniu morfologii komórki. Transfekcja niezróżnicowanych, uniesmiertelnionych komórek neuronalnych cDNA MAP2c prowadzi do wytworzenia krótkich wy-

pustek komórkowych (LANGKOPF i współaut. 1995). Ekspresja MAP2 sprzyja rozgałęzianiu wypustek nerwowych. Stwierdzono, że *in vitro* wypustki neuronów immunododatnich pod względem MAP2 są rozgałęzione znacznie silniej niż wypustki neuronów immunoujemnych, które niemal w ogóle nie ulegają rozgałęzianiu (CHAMAK i współaut. 1987). Na intensywność rozgałęziania wypustek nerwowych wpływa nie tylko zawartość MAP2, ale również stopień jego ufosforylowania. *In vitro* fosforylacja przy udziale kinazy zależnej od mitogenu (MAPK) hamuje zdolność MAP2 do indukowania polimeryzacji tubuliny, co prowadzi do wzrostu dynamiki mikrotubul, a zatem może sprzyjać reorganizacji cytoszkieletu niezbędnej podczas tworzenia rozgałęzień (HOSHI i współaut. 1992). Rola ufosforylowanego MAP2 mogłaby również polegać na fizycznym rozpychaniu pęczków mikrotubul, co prowadziłoby do dychotomicznego podziału rosnącej wypustki nerwowej (FRIEDRICH i ASZÓDI 1991). Istotnie, zauważono, że wzmożonej fosforylacji MAP2 towarzyszy rozgałęzianie wypustek hodowanych neuronów hipokampa (DIEZ-GUERRA i AVILA 1993). W innych badaniach wykazano spadek liczby rozgałęzień w hodowanych neuronach hipokampa, będący efektem podania inhibitorów kinaz białkowych, oraz nasilenie rozgałęziania wypustek pod wpływem inhibitorów fosfataz (AUDESIRK i współaut. 1997). Dalszych dowodów na udział MAP2 w morfogenezie neuronów dostarczyły badania, w których hamowano ekspresję MAP2 w komórkach. Podanie sekwencji antysensownych wobec mRNA MAP2 o długości 6 kb i 9 kb hodowanym komórkom potworniaka złośliwego przed zadziałaniem czynnika indukującego morfogenezę, powodowało znaczące obniżenie liczby komórek wytwarzających wypustki. W komórkach, które podjęły różnicowanie, pomimo zahamowania ekspresji MAP2, zaobserwowano, że powstające wypustki są dużo krótsze, niż w procesie niezakłóconego różnicowania. Co więcej, stwierdzono, że zahamowanie ekspresji MAP2 zapobiega przerwaniu cyklu komórkowego i że transfekowane komórki dzielą się nadal w tempie podobnym do tempa proliferacji niezróżnicowanych komórek. Wyniki te wskazują, że udział MAP2 w różnicowaniu neuronu zaczyna się już na bardzo wczesnym etapie tego procesu, na etapie zatrzymania cyklu komórkowego (DINSMORE i SOLOMON 1991). Przytoczone dane stanowią wyniki badań *in vitro*, a zatem sytuacji doświadczalnej odbiegającej od warunków panujących w organizmie zwierzęcia. Również pierwotne hodowle neuronów nie pozwalają na pełne odtworzenie warunków *in vivo*. Należy także pamiętać, że czas życia

hodowli neuronalnych często nie pozwala na prowadzenie obserwacji w bardziej zaawansowanych stadiach różnicowania komórek. Na początkowych etapach różnicowania neuronu wszystkie powstające wypustki są równocenne i charakteryzują się nie tylko jednakową morfologią, ale również zawartością tych samych białek cytoszkieletowych (CACERES i współaut. 1986). Wszystkie te ograniczenia sprawiają, że w hodowanych komórkach trudno jednoznacznie określić, które wypustki są dendrytami, a które aksonami.

BIAŁKA TAU

Wszystkie izoformy białek Tau są produktami jednego genu i powstają na drodze alternatywnego składowania mRNA (LEE i współaut. 1988). W mózgu szczura ekspresję mRNA wczesnych form Tau wykrywa się już w 13 dniu rozwoju zarodkowego. Począwszy od 8 dnia po narodzeniu obserwuje się gwałtowny spadek ekspresji mRNA form wczesnych i pojawienie się mRNA form późnych (KOSIK i współaut. 1989). Białka wczesne charakteryzują się obecnością trzech powtórzeń w sekwencji wiążącej tubulinę, która znajduje się przy końcu C cząsteczki (porównaj z budową cząsteczki MAP2). Domena wiążąca tubulinę w cząsteczce późnych białek Tau posiada cztery takie powtórzenia (LEE 1990). Silniejsze wiązanie późnych Tau z mikrotubulami, będące wynikiem obecności czterech powtórzeń sekwencji, prowadziłoby zatem do usztywnienia cytoszkieletu przez ograniczenie dynamiki mikrotubul. Formy wczesne, z uwagi na mniejszą siłę wiązania tubuliny, sprzyjałyby natomiast zachowaniu pewnej plastyczności cytoszkieletu neuronalnego (BUTNER i KIRSCHNER 1991). W mózgu mogą występować 2–3 wczesne, niskocząsteczkowe formy Tau, o masach cząsteczkowych około 48 kDa, oraz 5–6 niskocząsteczkowych form późnych, o masach cząsteczkowych 50–65 kDa. Wysokocząsteczkowe formy Tau (110–120 kDa) zidentyfikowano w obwodowym układzie nerwowym (GEORGIEFF i współaut. 1991), ale ich obecność stwierdzono także w mózgu. Są one produktami tego samego genu, co formy niskocząsteczkowe, i posiadają cztery powtórzenia sekwencji w domenie wiążącej tubulinę (MAVILIA i współaut. 1993). Rozwojowej regulacji ich ekspresji nie poznano jeszcze dokładnie, niemniej wykazano, że w 18 dniu rozwoju zarodkowego w zwojach korzonków grzbietowych nerwów rdzeniowych szczura następuje pełna zamiana ekspresji mRNA niskocząsteczkowych form Tau na mRNA form wysokocząsteczkowych (NOTHIAS i współaut. 1995).

Na różnorodność form Tau wpływają dodatkowo procesy fosforylacji. Białka Tau stanowią substrat wielu kinaz białkowych, w tym białkowej kinazy A (PKA), kinazy II zależnej od wapnia i kalmoduliny (CaMKII), białkowej kinazy C (PKC), kinaz kazeinowych I i II oraz prolinowych kinaz białkowych (PDPK), takich jak kinazy aktywowane mitogenem (MAPK), kinazy zależne od cyklin oraz kinaza syntazy glikogenu (AVILA i współaut. 1994). Dla niektórych spośród wymienionych kinaz zidentyfikowano miejsca fosforylacji, i tak np. stwierdzono, że fosforylacja katalizowana przez PKA (SCOTT i współaut. 1993) i PKC (CORREAS i współaut. 1992) dotyczy seryny zlokalizowanej w obrębie domeny wiążącej tubulinę. Zarówno ten typ fosforylacji, jak i fosforylacja zachodząca przy udziale kinaz PDPK (PELECH 1995) obniża powinowactwo Tau do mikrotubul, ograniczając w ten sposób jego rolę stabilizującą.

Immunocytochemiczne badania *in situ* z zastosowaniem monoklonalnego przeciwciała Tau-1 wskazywały na specyficzną dla aksonów lokalizację białka Tau (BINDER i współaut. 1985). Jednak późniejsze doświadczenia wykazały, że niemożność wykrycia w somatodendrytycznym przedziale neuronu epitopu rozpoznawanego przez przeciwciało Tau-1 była spowodowana fosforylacją reszty serynowej w tym właśnie regionie cząsteczki (PAPASOZOMENOSI BINDER 1987). Co więcej, w obrębie samego aksonu zawartość ufosforylowanego w ten sposób Tau *in vitro* spada w odcinkach oddalonych od ciała komórki nerwowej, czego efektem jest obserwowany wzrost intensywności znakowania przeciwciałem Tau-1 w dystalnych obszarach aksonu (REBHAN i współaut. 1995). Przerzonne rozmieszczenie ufosforylowanej i nieufosforylowanej formy Tau podlega rozwojowej regulacji. Stwierdzono na przykład, że w korze nowej nowonarodzonych szczurów ufosforylowane Tau jest obecne w ciałach komórkowych, dendrytach apikalnych i aksonach komórek piramidowych, natomiast w tkance zwierząt do-

rosłych obraz immunocytochemiczny wskazuje na somatodendrytyczną lokalizację jego formy nieufosforylowanej (lub zdefosforylowanej) (TASHIRO i współaut. 1997). Uważa się jednak, że choć białko Tau może występować we wszystkich rejonach komórki nerwowej, to jego zawartość w aksonie jest najwyższa. W proksymalnych odcinkach aksonu stwierdzono obecność mRNA Tau (LITMAN i współaut. 1993), a siła wiązania Tau z mikrotubulami jest w aksonie większa niż w dendrytach (HIROKAWA i współaut. 1996).

Udział Tau w różnicowaniu komórek nerwowych potwierdzono w wielu badaniach (CACERES i współaut. 1991, HANEMAALJER i GINZBURG 1991). Wydaje się, że polega on przede wszystkim na wspomaganiu wydłużania wypustek nerwowych, a nie na jego indukowaniu. Utrzymanie wewnątrzkomórkowej równowagi zapewniającej właściwe oddziaływanie Tau z mikrotubulami ma zatem kluczowe znaczenie dla zachowania prawidłowej morfologii, a co za tym idzie, i funkcji neuronu. Dotyczy to zarówno utrzymania określonego poziomu syntezy białka, jak i jego fosforylacji. Nadekspresja Tau, obserwowana np. w epilepsji płatów skroniowych, prowadzi do przerostu aksonów, a w konsekwencji do wytworzenia nieprawidłowych połączeń między neuronami (POLLARD i współaut. 1994). Najbardziej znanym przykładem patologii, której towarzyszą zmiany fosforylacji Tau, jest choroba Alzheimera. W przebiegu tej choroby, Tau w tkance mózgowej ulega nadmiernej i nieprawidłowej fosforylacji, w wyniku czego agreguje ono w postaci tzw. splotów neurofibrylarnych, a procesowi temu towarzyszy rozpad mikrotubul (ALONSO i współaut. 1994). Osiągnięciem ostatnich dwóch lat w badaniach nad związkiem Tau z chorobami neurodegeneracyjnymi jest wykrycie punktowych mutacji w genie *Tau*, uznanych za przyczynę demencji czołowo-skroniowych i jednej z odmian choroby Parkinsona (GOEDERT i współaut. 1998, VOGEL 1998).

MAP W PLASTYCZNOŚCI NEURONALNEJ

Wpływ białek MAP na ewentualną modyfikację morfologii neuronu w odpowiedzi na zmiany zachodzące w środowisku jest efektem ich oddziaływania z mikrotubulami.

MAP1

Udział ufosforylowanych form MAP1B w procesach regeneracyjnych potwierdzają badania, w których dokonuje się lokalnych uszko-

dzeń w ośrodkowym układzie nerwowym. Uszkodzenie brzuszno-podstawnego jądra wzgórze prowadzi do indukcji fosforylacji MAP1B w aksonach biegnących przez miejsce uszkodzenia, ale pochodzących z obszarów położonych poza jego zasięgiem (SOARES i współaut. 1998). Niezależnie od zmian fosforylacji MAP1B, w procesach regeneracyjnych obserwuje się również zmiany ekspresji samego białka. U szczura np. stwierdzono indukcję ekspresji białka MAP1B

w komórkach Schwanna otaczających nerw kulszowy w procesie jego regeneracji po przecięciu (MA i współaut. 1999). W tym przypadku pojawienie się białka MAP1B może mieć związek ze zmianami strukturalnymi wypustek komórek Schwanna, towarzyszącymi odnawianiu osłonki mielinowej regenerujących aksonów. Ekspresja MAP1B podlega regulacji również w stanach chorobowych nie będących wynikiem mechanicznego przzerwania ciągłości połączeń nerwowych. Obserwowano zmiany ekspresji MAP1B zarówno na poziomie mRNA, jak i białka, u szczurów po farmakologicznym wywołaniu drgawek mających naśladować atak epileptyczny u ludzi (WAGNER i współaut. 1998). Wydaje się, że poziom ekspresji MAP1B może z jednej strony odzwierciedlać rozmiar uszkodzenia tkanki, z drugiej zaś być wyrazem procesów uruchamianych w celu naprawy uszkodzeń. O udziale MAP1B w plastyczności neuronalnej świadczą nie tylko dane pochodzące z opisu doświadczalnych, bądź naturalnych stanów patologicznych. Stwierdzono np., że MAP1B ulega defosforylacji w obszarze fosforylacji typu II w komórkach skrawków hipokampa po podaniu NMDA (kwasu *N*-metylo-*D*-asparaginowego). Efekt ten blokuje podanie APV (kwasu 5-aminofosfonowalerianowego), antagonisty receptora NMDA (SÁNCHEZI i współaut. 1997). Biorąc pod uwagę, że fosforylacja MAP1B typu II sprzyja wiązaniu białka z mikrotubulami, należy przypuszczać, że defosforylacja wywołana aktywacją receptora NMDA może prowadzić do odłączania MAP1B od mikrotubul i uplastycznienia cytoskieletu neuronu. W tym miejscu warto przypomnieć, że receptor NMDA jest jednym z typów receptora glutaminianu, głównego neuroprzekaźnika pobudzeniowego kory mózgowej. Receptorowi temu przypisuje się szczególne znaczenie w rozmaitych przejawach plastyczności neuronalnej, a zwłaszcza w procesach uczenia i pamięci (KACZMAREK i współaut. 1997).

MAP2

MAP2 jest wrażliwe na różnego typu uszkodzenia tkanki nerwowej. Obniżenie immunoreaktywności MAP2 uznano za wskaźnik neurodegeneracji wywołanej niedokrwieniem mózgu (MAIESIC i LIN 1994, AOKI i współaut. 1995) oraz zaburzeniami metabolicznymi (PANG i współaut. 1996). Stwierdzono również spadek immunoreaktywności MAP2 w neuronach, w których w patogenezie choroby Alzheimera obszar somatodendrytyczny zostaje zajęty przez nieprawidłowo ufosforylowane białko Tau (McKEE i współaut. 1989) oraz w skrawkach kory śródwęcho-

wej pobranych *post mortem* od chorych na schizofrenię (ARNOLD i współaut. 1991).

Do ciekawych wniosków na temat udziału MAP2 w plastyczności komórek nerwowych prowadzą doświadczenia, w których bada się zachowanie MAP2 w odpowiedzi na stymulację receptorów glutaminianu. W hodowlach komórek ziarnistych hipokampa wykazano, że podawanie NMDA prowadzi do wzrostu poziomu mRNA MAP2 zarówno w ciałach komórkowych, jak i w dendrytach (JOHNSTON i MORRIS 1994). Badania wykazały ponadto zmianę strukturalnej organizacji mikrotubularnego cytoskieletu na skutek aktywacji receptorów glutaminianu. Stymulowanie hodowanych neuronów korowych różnymi aminokwasami pobudzającymi (glutaminianem, NMDA, kainianem i AMPA) powodowało, że tubulina i MAP2, rozmieszczone w komórkach przed stymulacją w sposób rozproszony, przyjmowały postać usieciowanych włókien. Autorzy sugerują, że aktywacja jonotropowych (takich, których aktywacja prowadzi do otwarcia kanału jonowego) receptorów glutaminianu, czyli receptora np. NMDA lub AMPA, uruchamia kaskadę zdarzeń prowadzących do związania MAP2 z mikrotubulami i ustrukturyzowania cytoskieletu (BIGOT i współaut. 1991). Jednym z procesów uruchamianych na drodze aktywacji receptorów są reakcje fosforylacji i defosforylacji. Stwierdzono, że w hodowanych skrawkach hipokampa pobranych od dorosłych szczurów stymulacja receptorów glutaminianu prowadzi do przejściowego wzrostu poziomu fosforylacji MAP2 zależnego od receptorów metabotropowych (takich, których aktywacja uruchamia wewnątrzkomórkową kaskadę sygnałową, np. układ fosfatydyloinozytometry), po którym następuje faza trwałej defosforylacji zależna od receptora NMDA (faza ta rozwija się później w ontogenezie, co może mieć znaczenie dla promowania we wczesnych etapach rozwoju stanu wysokiego ufosforylowania MAP2, który sprzyja plastyczności wypustek nerwowych). W obu przypadkach odpowiednie kinazy białkowe aktywowane są przez podwyższenie stężenia jonów Ca^{2+} w wyniku rozpoczęcia kaskady sygnału po aktywacji receptorów metabotropowych, bądź otarcia kanału jonowego receptora NMDA (QUINLAN i HALPAIN 1996). Zmiany poziomu fosforylacji MAP2 obserwowano nie tylko w doświadczeniach *in vitro*, ale również w wyniku manipulacji dokonywanych *in vivo*. Stwierdzono na przykład, że w rozwoju kory wzrokowej kota poziom fosforylacji MAP2 zależy od dopływu bodźca. W tak zwanym okresie krytycznym dla rozwoju pierwotnej kory wzrokowej (u kota trwa on przez pierwsze cztery miesiące życia) poziom ufosforylowania MAP2

przy braku dopływu światła jest wysoki, a ekspozycja na światło prowadzi do jego defosforylacji (AOKI i SIEKEVITZ 1985). Można zatem przypuszczać, że do momentu otwarcia oczu pierwotna kora wzrokowa jest bardzo plastyczna i podatna na zmiany, bowiem cytoszkielec jej neuronów pozostaje dynamiczny, dzięki wysokiemu poziomowi ufosforylowania MAP2. W momencie, w którym zaczynają dopływać bodźce, kora podlega określonej reorganizacji, ustalają się połączenia, które muszą zostać utrwalone, a zatem wymagane jest usztywnienie cytoszkieletu, które jest osiągane m. in. dzięki defosforylacji MAP2.

BIAŁKO TAU

Reorganizacji połączeń międzyneuronalnych towarzyszą również zmiany ekspresji i fosforylacji białka Tau. Stwierdzono, że odnerwienie zakrętu zębatego hipokampa, któremu towarzyszy tzw. „sprouting” aksonów, czyli tworzenie bocznych odgałęzień, prowadzi do przejściowych zmian immunoreaktywności Tau. Dwa dni po uszkodzeniu kory śródmózgowej dającej projekcję do zakrętu zębatego, w odnerwionym obszarze zakrętu zębatego następuje spadek immunoreaktywności Tau. Jednocześnie w nieodnerwionym obszarze tego regionu obserwuje się wzrost poziomu immunoreaktywności. Czasowy przebieg nasilenia intensywności reakcji z przeciwciałem jest zgodny, a nawet wyprzedza uruchomienie procesów sproutingu, co skłania badaczy do wniosku, że wzrost

immunoreaktywności Tau odzwierciedla zmiany syntezy białka, które przyczyniają się do sproutingu aksonów (BUSCIGLIO i współaut. 1987). Podczas interpretacji tych danych należy jednak pamiętać, że użyte przeciwciało rozpoznaje epitop, który ulega zamaskowaniu pod wpływem fosforylacji, zatem obserwowane zmiany immunoreaktywności mogą wskazywać na zmiany fosforylacji białka, a nie jego poziomu. Zaburzenia fosforylacji Tau wykazano w doświadczeniach, w których uszkodzono łącznie dopaminergiczną i cholinergiczną projekcję do hipokampa. Pojawieniu się immunoreaktywności świadczącej o nieprawidłowej fosforylacji Tau towarzyszyły zniekształcenia dendrytów apikalnych komórek ziarnistych zakrętu zębatego (TORACK i MILLER 1995). Opierając się na zaobserwowanych własnościach wczesnych białek MAP zasugerowano, że regeneracji uszkodzonego nerwu towarzyszy reorganizacja cytoszkieletu, która powinna zachodzić łatwiej w obecności wczesnych form białek MAP. Istotnie, stwierdzono, że regeneracji przeciętego nerwu kulszowego u szczura towarzyszy wzrost poziomu mRNA wczesnych form Tau, przy zachowaniu stałego poziomu form późnych (CHAMBERS i MUMA 1997). Zagadnienie to jednak wymaga dalszego wyjaśnienia, bowiem badania immunocytochemiczne u szczura nie wykazały wznowienia ekspresji wczesnych form Tau w neuronach korzonków grzbietowych nerwu kulszowego po jego przecięciu (NOTHIAS i współaut. 1995).

PODSUMOWANIE

Mikrotubule tworzą w komórce nerwowej szkielec, na którym rozpięte są jej wypustki. Strukturę tego szkieletu wzmacnia obecność białek związanych z mikrotubulami, które, działając jak zaczepy, łączą ze sobą podjednostki tubuliny w ścianie mikrotubuli. W ten sposób powstaje trwała podstawa, dzięki której neuron zachowuje prawidłową morfologię niezbędną w procesie przewodzenia informacji. Struktura cytoszkieletu mikrotubularnego nie jest jednak bezwzględnie sztywna. Subtelne przesunięcia równowagi w procesach fosforylacji/defosforylacji białek MAP oraz zmiany ich ekspresji mogą skutkować ich odłączaniem od mikrotubul i stwarzać warunki do rozpadu mikrotubul i tworzenia nowych struktur cytoszkieletowych. Zjawiska te mają podstawowe znaczenie w tworzeniu nowych połączeń między neuronami, np. w procesach uczenia się i regeneracji, ale mogą również być przyczyną po-

wstawiania połączeń nieprawidłowych, a tym samym prowadzić do rozwoju patologii. Nie ulega wątpliwości, że mikrotubule przyczyniają się do utrzymania prawidłowego przepływu informacji w układzie nerwowym. Ich wyjątkowa rola została również dostrzeżona przez badaczy teoretyków zajmujących się teorią świadomości. Wybitny matematyk, Roger Penrose, zauważył w mikrotubulach struktury idealnie dostosowane do zachodzenia w nich zjawisk kwantowych. Penrose zbudował, by się tak wyrazić, na mikrotubulach swoją interpretację kwantowej teorii świadomości (PENROSE 1994). Choć jego koncepcja budzi liczne kontrowersje i być może nie oprze się narastającej krytyce, to fakt, że czyni ona z mikrotubul „siedlisko” świadomości skłania do pomnożenia wysiłków badawczych na drodze dokładnego poznania, jak funkcjonują te struktury.

BETWEEN STIFFNESS AND PLASTICITY — MICROTUBULAR CYTOSKELETON OF THE NERVE CELL

Summary

Microtubules are one of the major components forming the cytoskeleton of all eukaryotic cells. In neurons several microtubule-associated proteins such as MAP1, MAP2 and Tau maintain the stability of microtubular cytoskeleton. These proteins bind to tubulin subunits and play a role as internal cross-linkers that stiffen the microtubular structure. The expression of these proteins is developmentally regulated. MAPs and Tau are phosphorylated by several protein kinases such as PKC, MAPK, casein kinase II or Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II. Phosphorylation as well as changes in the expression of these proteins may lead

to detachment of microtubule-associated proteins from microtubules leading to an increase in their instability. The more labile the cytoskeletal structure of neurons, the more flexible their processes. This accounts for the potential to establish new interneuronal connections, a phenomenon crucial in such processes as regeneration of neurons or learning. On the other hand, any disturbance in the subtle balance between phosphorylation and dephosphorylation processes may result in pathology, as in the case of Alzheimer's disease.

LITERATURA

- AKIYAMA T., NISHIDA E., ISHIDA J., SAJI N., OGAWARA H., HOSHI M., MIYATA Y., SAKAI H., 1986. Purified protein kinase C phosphorylates microtubule-associated protein 2. *J. Biol. Chem.* 261, 15648–15651.
- ALBALA J.S., KRESS Y., LIU W. K., WEIDENHEIM K., YEN S. H., SHAFIT-ZAGARDO B., 1995. Human microtubule-associated protein-2c localizes to dendrites and axons in fetal spinal motor neurons. *J. Neurochem.* 64, 2480–2490.
- ALETTA J. M., LEWIS S. A., COWAN N. J., GREENE L. A., 1988. Nerve growth factor regulates both the phosphorylation and steady-state levels of microtubule-associated protein 1.2 (MAP1.2). *J. Cell Biol.* 106, 1573–1581.
- ALONSO A.C., ZAIDI T., GRUNDKE-IGBAL I., IQBAL K., 1994. Role of abnormally phosphorylated Tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 5562–5566.
- AOKI C., SIEKEVITZ P., 1985. Ontogenetic changes in the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-stimulatable phosphorylation of cat visual cortex proteins, particularly of microtubule-associated protein 2 (MAP 2): effects of normal and dark rearing and of the exposure to light. *J. Neurosci.* 5, 2465–2483.
- AOKI M., ABE K., YOSHIDA T., HATTORI A., KOGURE K., ITOYAMA Y., 1995. Early immunohistochemical changes of microtubule based motor proteins in gerbil hippocampus after transient ischemia. *Brain Res.* 669, 189–196.
- ARNOLD S. E., LEE V. M., GUR R. E., TROJANOWSKI J. G., 1991. Abnormal expression of two microtubule-associated proteins (MAP2 and MAP5) in specific subfields of the hippocampal formation in schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10850–10854.
- AUDESIRK G., CABELL L., KERN M., 1997. Modulation of neurite branching by protein phosphorylation in cultured rat hippocampal neurons. *Dev. Brain Res.* 102, 247–260.
- AVILA J., 1990. Microtubule dynamics. *FASEB J.* 4, 3284–3290.
- AVILA J., DOMINGUEZ J., DIAZ NIDO J., 1994. Regulation of microtubule dynamics by microtubule-associated protein expression and phosphorylation during neuronal development. *Int. J. Dev. Biol.* 38, 13–25.
- BIGOT D., MATUS A., HUNT S. P., 1991. Reorganization of the cytoskeleton in rat neurons following stimulation with excitatory amino acids in vitro. *Eur. J. Neurosci.* 3, 551–558.
- BINDER L. I., FRANKFURTER A., KIM H., CACERES A., PAYNE M. R., REBHUN L. I., 1984. Heterogeneity of microtubule-associated protein 2 during rat brain development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5613–5617.
- BINDER L. I., FRANKFURTER A., REBHUN, L. I., 1985. The distribution of Tau in the mammalian central nervous system. *J. Cell Biol.* 101, 1371–1378.
- BLACK M. M., SLAUGHTER T., FISCHER I., 1994. Microtubule-associated protein 1b (MAP1b) is concentrated in the distal region of growing axons. *J. Neurosci.* 14, 857–870.
- BLOOM G. S., LUCA F. C., VALLEE R. B., 1984. Widespread cellular distribution of MAP-1A (microtubule-associated protein 1A) in the mitotic spindle and on interphase microtubules. *J. Cell Biol.* 98, 331–340.
- BLOOM G. S., LUCA F. C., VALLEE R. B., 1985. Microtubule-associated protein 1B: identification of a major component of the neuronal cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5404–5408.
- BRUGG B., MATUS A., 1988. PC12 cells express juvenile microtubule-associated proteins during nerve growth factor-induced neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* 107, 643–650.
- BRUGG B., MATUS A., 1991. Phosphorylation determines the binding of microtubule-associated protein 2 (MAP2) to microtubules in living cells. *J. Cell Biol.* 114, 735–743.
- BRUGG B., REDDY D., MATUS A., 1993. Attenuation of microtubule-associated protein 1B expression by antisense oligodeoxynucleotides inhibits initiation of neurite outgrowth. *Neuroscience* 52, 489–496.
- BUSCIGLIO J., FERREIRA A., STEWARD O., CACERES A., 1987. An immunocytochemical and biochemical study of the microtubule-associated protein Tau during post-lesion afferent reorganization in the hippocampus of adult rats. *Brain Res.* 419, 244–252.
- BUSH M. S., TONGE D. A., WOOLF C., GORDON WEEKS P. R., 1996. Expression of a developmentally regulated, phosphorylated isoform of microtubule-associated protein 1B in regenerating axons of the sciatic nerve. *Neuroscience* 73, 553–563.
- BUTNER K.A., KIRSCHNER M.W., 1991. Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *J. Cell Biol.* 115, 717–730.
- CACERES A., BANKER G. A., BINDER L., 1986. Immunocytochemical localization of tubulin and microtubule-associated protein 2 during the development of hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* 86, 714–722.
- CACERES A., POTREBIC S., KOSIK K. S., 1991. The effect of Tau antisense oligonucleotides on neurite formation of cultured cerebellar macroneurons. *J. Neurosci.* 11, 1515–1523.
- CALVERT R., ANDERTON B. H., 1985. A microtubule-associated protein (MAP1) which is expressed at elevated levels during development of the rat cerebellum. *EMBO J.* 4, 1171–1176.

- CALVERT R. A., WOODHAMS P. L., ANDERTON B. H., 1987. Localization of an epitope of a microtubule-associated protein 1x in outgrowing axons of the developing rat central nervous system. *Neuroscience* 23, 131-141.
- CHAMAK B., FELLOUS A., GLOWINSKI J., PROCHIANTZ A., 1987. MAP2 expression and neuritic outgrowth and branching are coregulated through region-specific neuro-astroglial interactions. *J. Neurosci.* 7, 3163-3170.
- CHAMBERS C.B., MUMA N.A., 1997. Tau mRNA isoforms following sciatic nerve axotomy with and without regeneration. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 48, 115-124.
- CORREAS I., DIAZ-NIDO J., AVILA J., 1992. Microtubule-associated protein Tau is phosphorylated by protein kinase C on its tubulin binding domain. *J. Biol. Chem.* 267, 15721-15728.
- CRANDALL J. E., FISCHER I., 1989. Developmental regulation of microtubule-associated protein 2 expression in regions of mouse brain. *J. Neurochem.* 53, 1910-1917.
- DE CAMILLI P., MILLER P.E., NAVONE F., THEURKAUF W.E., VALLEE R. B., 1984. Distribution of microtubule-associated protein 2 in the nervous system of the rat studied by immunofluorescence. *Neuroscience* 11, 817-846.
- DHAMODHARAN R., WADSWORTH P., 1995. Modulation of microtubule dynamic instability in vivo by brain microtubule associated proteins. *J. Cell Sci.* 108, 1679-1689.
- DIAZ-NIDO J., SERRANO L., MENDEZ E., AVILA J., 1988. A casein kinase II-related activity is involved in phosphorylation of microtubule-associated protein MAP-1B during neuroblastoma cell differentiation. *J. Cell Biol.* 106, 2057-2065.
- DIAZ-NIDO J., SERRANO L., HERNANDEZ M. A., AVILA J., 1990. Phosphorylation of microtubule proteins in rat brain at different developmental stages: comparison with that found in neuronal cultures. *J. Neurochem.* 54, 211-222.
- DIAZ-NIDO J., ARMAS PORTELA R., AVILA J., 1991. Addition of protease inhibitors to culture medium of neuroblastoma cells induces both neurite outgrowth and phosphorylation of microtubule-associated protein MAP-1B. *J. Cell Sci.* 98, 409-414.
- DIAZ-NIDO J., MONTORO R. J., LOPEZ BARNEO J., AVILA J., 1993. High external potassium induces an increase in the phosphorylation of the cytoskeletal protein MAP2 in rat hippocampal slices. *Eur. J. Neurosci.* 5, 818-824.
- DIEZ-GUERRA F. J., AVILA J., 1993. MAP2 phosphorylation parallels dendrite arborization in hippocampal neurones in culture. *Neuroreport* 4, 419-422.
- DINSMORE J. H., SOLOMON F., 1991. Inhibition of MAP2 expression affects both morphological and cell division phenotypes of neuronal differentiation. *Cell* 64, 817-826.
- DITTELLA M. C., FEIGUIN F., CARRI N., KOSIK K. S., CACERES A., 1996. MAP-1B/Tau functional redundancy during laminin-enhanced axonal growth. *J. Cell Sci.* 109, 467-477.
- DOLL T., MEICHSNER M., RIEDERER B. M., HONEGGER P., MATUS A., 1993. An isoform of microtubule-associated protein 2 (MAP2) containing four repeats of the tubulin-binding motif. *J. Cell Sci.* 106, 633-639.
- DREWES G., EBNETH A., PREUSS U., MANDELKOW E. M., MANDELKOW E., 1997. MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* 89, 297-308.
- DREWES G., EBNETH A., MANDELKOW E. M., 1998. MAP, MARKs and microtubule dynamics. *Trends Biochem. Sci.* 23, 307-311.
- FERHAT L., BERNARD A., RIBAS de POUPLANA L., BEN ARI Y., KHRESTCHATSKY M., 1994. Structure, regional and developmental expression of rat MAP2d, a MAP2 splice variant encoding four microtubule-binding domains. *Neurochem. Int.* 25, 327-338.
- FERRALLI J., DOLL T., MATUS A., 1994. Sequence analysis of MAP2 function in living cells. *J. Cell Sci.* 107, 3115-3125.
- FISCHER I., ROMANO-CLARKE G., 1990. Changes in microtubule-associated protein MAP1B phosphorylation during rat brain development. *J. Neurochem.* 55, 328-333.
- FISCHER I., KONOLA J., COCHARY E., 1990. Microtubule associated protein (MAP1B) is present in cultured oligodendrocytes and co-localizes with tubulin. *J. Neurosci. Res.* 27, 112-124.
- FRIEDRICH P., ASZÓDI A., 1991. MAP2: a sensitive cross-linker and adjustable spacer in dendritic architecture. *FEBS Lett.* 295, 5-9.
- GARCIA ROCHA M., AVILA J., 1995. Characterization of microtubule-associated protein phosphoisoforms present in isolated growth cones. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 89, 47-55.
- GARNER C. C., MATUS A., 1988. Different forms of microtubule-associated protein 2 are encoded by separate mRNA transcripts. *J. Cell Biol.* 106, 779-783.
- GARNER C. C., MATUS A., ANDERTON B., CALVERT R., 1989. Microtubule-associated proteins MAP5 and MAP1x: closely related components of the neuronal cytoskeleton with different cytoplasmic distribution in the developing brain. *Mol. Brain Res.* 5, 85-92.
- GARNER C. C., GARNER A., HUBER G., KOZAK C., MATUS A., 1990. Molecular cloning of microtubule-associated protein 1 (MAP1A) and microtubule-associated protein 5 (MAP1B): identification of distinct genes and their differential expression in developing brain. *J. Neurochem.* 55, 146-154.
- GEORGIEFF I.S., LIEM R.K., MELLADO W., NUNEZ J., SHELANSKI, M. L., 1991. High molecular weight Tau: preferential localization in the peripheral nervous system. *J. Cell Sci.* 100, 55-60.
- GOEDERT M., CROWTHER R. A., SPILLANTINI M. G., 1998. Tau mutations cause frontotemporal dementias. *Neuron* 21, 955-958.
- GORDON-WEEKS P. R., MANSFIELD S. G., ALBERTO C., JOHNSTONE M., MOYA F., 1993. A phosphorylation epitope on MAP 1B that is transiently expressed in growing axons in the developing rat nervous system. *Eur. J. Neurosci.* 5, 1302-1311.
- GOTO S., YAMAMOTO H., FUKUNAGA K., IWASA T., MATSUKADO Y., MIYAMOTO E., 1985. Dephosphorylation of microtubule-associated protein 2, Tau factor, and tubulin by calcineurin. *J. Neurochem.* 45, 276-283.
- HANEMAAIJER R., GINZBURG I., 1991. Involvement of mature Tau isoforms in the stabilization of neurites in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* 30, 163-171.
- HASEGAWA M., ARAI T., IHARA Y., 1990. Immunochemical evidence that fragments of phosphorylated MAP5 (MAP1B) are bound to neurofibrillary tangles in Alzheimers disease. *Neuron* 4, 909-918.
- HIROKAWA N., FUNAKOSHI T., SATO-HARADA R., KANAI Y., 1996. Selective stabilization of Tau in axons and microtubule-associated protein 2C in cell bodies and dendrites contributes to polarized localization of cytoskeletal proteins in mature neurons. *J. Cell Biol.* 132, 667-679.
- HOSHI M., OHTA K., GOTOH Y., MORI A., MUROFUSHI H., SAKAI H., NISHIDA E., 1992. Mitogen-activated-protein-kinase-catalyzed phosphorylation of microtubule-associated proteins, microtubule-associated protein 2 and microtubule-associated protein 4, induces an alteration in their function. *Eur. J. Biochem.* 203, 43-52.
- HUBER G., MATUS A., 1984. Immunocytochemical localization of microtubule-associated protein 1 in rat cerebellum using monoclonal antibodies. *J. Cell Biol.* 98, 777-781.
- JOHNSON, G. V., LITERSKY, J. M., JOPE, R. S., 1991. Degradation of microtubule-associated protein 2 and brain spectrin by calpain: a comparative study. *J. Neurochem.* 56, 1630-1638.

- JOHNSTON H. M., MORRIS B. J., 1994. Selective regulation of dendritic MAP2 mRNA levels in hippocampal granule cells by nitric oxide. *Neurosci. Lett.* 177, 5–10.
- JOHNSTONE M., GOOLD R. G., BEI D., FISCHER I., GORDON-WEEKS P. R., 1997. Localisation of microtubule-associated protein 1B phosphorylation sites recognised by monoclonal antibody SMI-31. *J. Neurochem.* 69, 1417–1424.
- KACZMAREK L., KOSSUT M., SKANGIEL-KRAMSKA J., 1997. Glutamate receptors in cortical plasticity: molecular and cellular biology. *Physiol. Rev.* 77, 217–255.
- KALCHEVA N., ALBALA J., O'GUIN K., RUBINO H., GARNER C., SHAFIT ZAGARDO B., 1995. Genomic structure of human microtubule-associated protein 2 (MAP-2) and characterization of additional MAP-2 isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10894–10898.
- KIM H., BINDER L. I., ROSENBAUM J. L., 1979. The periodic association of MAP2 with brain microtubules in vitro. *J. Cell Biol.* 80, 266–276.
- KINDLER S., SULIZ B., GOEDERT M., GARNER C. C., 1990. Molecular structure of microtubule-associated protein 2b and 2c from rat brain. *J. Biol. Chem.* 265, 19679–19684.
- KINDLER S., MULLER R., CHUNG W. J., GARNER C. C., 1996. Molecular characterization of dendritically localized transcripts encoding MAP2. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 36, 63–69.
- KLEIMAN R., BANKER G., STEWARD O., 1994. Development of subcellular mRNA compartmentation in hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* 14, 1130–1140.
- KUZNETSOV S. A., RODIONOV V. I., GELFAND V. I., ROSENBALAT V. A., 1981. Microtubule-associated protein MAP1 promotes microtubule assembly in vitro. *FEBS Lett.* 135, 241–244.
- KOSIK K. S., ORECCHIO L. D., BAKALIS S., NEVE R. L., 1989. Developmentally regulated expression of specific Tau sequences. *Neuron* 2, 1389–1397.
- KWEI S. L., CLEMENT A., FAISSNER A., BRANDT R., 1998. Differential interactions of MAP2, Tau and MAP5 during axogenesis in culture. *Neuroreport* 9, 1035–1040.
- LANGKOPF A., GUILLEMINOT J., NUNEZ J., 1995. Tau and microtubule-associated protein 2c transfection and neurite outgrowth in ND 7/23 cells. *J. Neurochem.* 64, 1045–1053.
- LEE G., 1990. Tau protein: an update on structure and function. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 15, 199–203.
- LEE G., COWAN N., KIRSCHNER M., 1988. The primary structure and heterogeneity of Tau protein from mouse brain. *Science* 239, 285–288.
- LEWIS S. A., WANG D. H., COWAN N. J., 1988. Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule binding motif with Tau protein. *Science* 242, 936–939.
- LITMAN P., BARG J., RINDZOONSKI L., GINZBURG I., 1993. Subcellular localization of Tau mRNA in differentiating neuronal cell culture: implications for neuronal polarity. *Neuron* 10, 627–638.
- MA D., NOTHIAS F., BOYNE L. J., FISCHER I., 1997. Differential regulation of microtubule-associated protein 1B (MAP1B) in rat CNS and PNS during development. *J. Neurosci. Res.* 49, 319–332.
- MA D., CHOW S., OBROCKA M., CONNORS T., FISCHER I., 1999. Induction of microtubule-associated protein 1B expression in Schwann cells during nerve regeneration. *Brain Res.* 823, 141–153.
- MAJEWSKA B., 1995. Białko MAP-2 w ośrodkowym układzie nerwowym. *Post. Bioch.* 41, 175–182.
- MAJEWSKA B., 1999. Jak powstaje przedziałowość neuronu, czyli o transporcie wewnątrzkomórkowym. *Post. Biol. Kom.* 26, 45–58.
- MAJEWSKA B., SKANGIEL-KRAMSKA J., 2000. Phosphorylated MAP-1B isoforms in the developing mouse barrel cortex. *Int. J. Devl. Neurosci.* 18, 113–119.
- MANSFIELD S. G., 1992. The distribution and phosphorylation of the microtubule-associated protein MAP 1B in growth cones. *J. Neurocytol.* 21, 1007–1022.
- MASLIAH E., MALLORY M., HANSEN L., ALFORD M., ALBRIGHT T., DeTERESA R., TERRY R., BAUDIER J., SAITOH T., 1991. Patterns of aberrant sprouting in Alzheimers disease. *Neuron* 6, 729–739.
- MAIESIC D. F., LIN R. C., 1994. Microtubule-associated protein 2 as an early indicator of ischemia-induced neurodegeneration in the gerbil forebrain. *J. Neurochem.* 63, 1012–1020.
- MATSUNAGA W., MIYATA S., HASHIMOTO Y., LIN S. H., NAKASHIMA T., KIYOHARA T., MATSUMOTO T., 1999. Microtubule-associated protein-2 in the hypothalamo-neurohypophysial system: low-molecular-weight microtubule-associated protein-2 in pituitary astrocytes. *Neuroscience* 88, 1289–1297.
- MATUS A., 1988. Microtubule-associated proteins: their potential role in determining neuronal morphology. *Annu. Rev. Neurosci.* 11, 29–44.
- MATUS A., 1994. Stiff microtubules and neuronal morphology. *Trends. Neurosci.* 17, 19–22.
- MATUS A., RIEDERER B., 1986. Microtubule-associated proteins in the developing brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 466, 167–179.
- MATUS A., BERNHARDT R., HUGH JONES T., 1981. High molecular weight microtubule-associated proteins are preferentially associated with dendritic microtubules in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3010–3014.
- MAVILA C., COUCHIE D., MATTEI M.G., NIVEZ M.P., NUNEZ J., 1993. High and low molecular weight Tau proteins are differentially expressed from a single gene. *J. Neurochem.* 61, 1073–1081.
- McKEE A. C., KOWALL N. W., KOSIK K. S., 1989. Microtubular reorganization and dendritic growth response in Alzheimers disease. *Ann. Neurol.* 26, 652–659.
- MITCHISON T., KIRSCHNER M., 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 237–242.
- MURTHY A. S., BRAMBLETT G. T., FLAVIN M., 1985. The sites at which brain microtubule-associated protein 2 is phosphorylated in vivo differ from those accessible to cAMP-dependent kinase in vitro. *J. Biol. Chem.* 260, 4364–4370.
- NOBLE M., LEWIS S. A., COWAN N. J., 1989. The microtubule binding domain of microtubule-associated protein MAP1B contains a repeated sequence motif unrelated to that of MAP2 and Tau. *J. Cell Biol.* 109, 3367–3376.
- NOTHIAS F., BOYNE L., MURRAY M., TESSLER A., FISCHER I., 1995. The expression and distribution of Tau proteins and messenger RNA in rat dorsal root ganglion neurons during development and regeneration. *Neuroscience* 66, 707–719.
- NOTHIAS F., FISCHER I., MURRAY M., MIRMAN S., VINCENT J. D., 1996. Expression of a phosphorylated isoform of MAP1B is maintained in adult central nervous system areas that retain capacity for structural plasticity. *J. Comp. Neurol.* 368, 317–334.
- OBLINGER M. M., KOST S. A., 1994. Coordinate regulation of tubulin and microtubule associated protein genes during development of hamster brain. *Dev. Brain Res.* 77, 45–54.
- PANG Z., UMBERGER G. H., GEDDES J. W., 1996. Neuronal loss and cytoskeletal disruption following intrahippocampal administration of the metabolic inhibitor malonate: lack of protection by MK-801. *J. Neurochem.* 66, 474–484.
- PAPANDRIKOPOULOU A., DOLL T., TUCKER R. P., GARNER C. C., MATUS A., 1989. Embryonic MAP2 lacks the cross-linking sidearm sequences and dendritic targeting signal of adult MAP2. *Nature* 340, 650–652.
- PAPASOZOMENOS S. C., BINDER L. I., 1987. Phosphorylation determines two distinct species of Tau in the central nervous system. *Cell Motil. Cytoskeleton* 8, 210–226.

- PEDROTTI B., ULLOA L., AVILA J., ISLAM K., 1996. *Characterization of microtubule-associated protein MAP1B: phosphorylation state, light chains, and binding to microtubules*. *Biochemistry* 35, 3016-3023.
- PELECH S. L., 1995. *Networking with proline-directed protein kinases implicated in Tau phosphorylation*. *Neurobiol. Aging* 16, 247-56.
- PENROSE R., 1994. *Shadows of the mind. A search for the missing science of consciousness*. Oxford University Press, New York-Oxford.
- POLLARD H., KHRESTCHATISKY M., MOREAU J., BEN-ARI Y., REPRESA A., 1994. *Correlation between reactive sprouting and microtubule protein expression in epileptic hippocampus*. *Neuroscience* 61, 773-787.
- QUINLAN E. M., HALPAIN S., 1996. *Postsynaptic mechanisms for bidirectional control of MAP2 phosphorylation by glutamate receptors*. *Neuron* 16, 357-368.
- RAMÓN-CUETO A., AVILA J., 1997. *Differential expression of microtubule-associated protein 1B phosphorylated isoforms in the adult rat nervous system*. *Neuroscience* 77, 485-501.
- REBHAN M., VACUN G., ROSNER H., 1995. *Complementary distribution of Tau proteins in different phosphorylation states within growing axons*. *Neuroreport* 6, 429-432.
- RIEDERER B. M., 1995. *Differential phosphorylation of MAP1b during postnatal development of the cat brain*. *J. Neurocytol.* 24, 45-54.
- RIEDERER B., MATUS A., 1985. *Differential expression of distinct microtubule-associated proteins during brain development*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6006-6009.
- RIEDERER B., COHEN R., MATUS A., 1986. *MAP5: a novel brain microtubule-associated protein under strong developmental regulation*. *J. Neurocytol.* 15, 763-775.
- ROSSER A. E., TYERS P., BORG M., DUNNET S. B., SVENDSEN C. N., 1997. *Co-expression of MAP-2 and GFAP in cells developing from rat EGF responsive precursor cells*. *Dev. Brain Res.* 98, 291-295.
- RAYMOND SABRY J. H., O'CONNOR T. P., EVANS L., TOROIAN RAYMOND A., KIRSCHNER M., BENTLEY D., 1991. *Microtubule behavior during guidance of pioneer neuron growth cones in situ*. *J. Cell Biol.* 115, 381-395.
- SAFAEI R., FISCHER I., 1989. *Cloning of a cDNA encoding MAP1B in rat brain: regulation of mRNA levels during development*. *J. Neurochem.* 52, 1871-1879.
- SÁNCHEZ C., DÍAZ-NIDO J., AVILA J., 1995. *Variations in vivo phosphorylation at the proline-rich domain of the microtubule-associated protein 2 (MAP2) during rat brain development*. *Biochem. J.* 306, 481-487.
- SÁNCHEZ C., ULLOA L., MONTORO R. J., LOPEZ-BARNEO J., AVILA J., 1997. *NMDA-glutamate receptors regulate phosphorylation of dendritic cytoskeletal proteins in the hippocampus*. *Brain Res.* 765, 141-148.
- SCHOENFELD T. A., OBAR R. A., 1994. *Diverse distribution and function of fibrous microtubule-associated proteins in the nervous system*. *Int. Rev. Cytol.* 151, 67-137.
- SCOTT C. W., SPREEN R. C., HERMAN J. L., CHOW F. P., DAVISON M. D., YOUNG J., CAPUTO C. B., 1993. *Phosphorylation of recombinant Tau by cAMP-dependent protein kinase. Identification of phosphorylation sites and effect on microtubule assembly*. *J. Biol. Chem.* 268, 1166-1173.
- SHEA T. B., BEERMANN M. L., 1994. *Respective roles of neurofilaments, microtubules, MAP1B, and Tau in neurite outgrowth and stabilization*. *Mol. Biol. Cell* 5, 863-875.
- SLOBODA R. D., RUDOLPH S. A., ROSENBAUM J. L., GREENGARD P., 1975. *Cyclic AMP-dependent endogenous phosphorylation of a microtubule-associated protein*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 177-181.
- SLOBODA R. D., DENTLER W. L., ROSENBAUM J. L., 1976. *Microtubule-associated proteins and the stimulation of tubulin assembly in vitro*. *Biochemistry* 15, 4497-4505.
- SOARES S., FISCHER I., RAVAILLE-VERON M., VINCENT J. D., NOTHIAS F., 1998. *Induction of MAP1B phosphorylation in target-deprived afferent fibers after kainic acid lesion in the adult rat*. *J. Comp. Neurol.* 396, 193-210.
- SULLIVAN K. F., 1988. *Structure and utilization of tubulin isoforms*. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4, 387-716.
- TANAKA E. M., KIRSCHNER M. W., 1991. *Microtubule behavior in the growth cones of living neurons during axon elongation*. *J. Cell Biol.* 115, 345-363.
- TASHIRO K., HASEGAWA M., IHARA Y., IWATSUBO T., 1997. *Soma-dendritic localization of phosphorylated Tau in neonatal and adult rat cerebral cortex*. *Neuroreport* 8, 2797-2801.
- TORACK R. M., MILLER J. W., 1995. *Denervation induced abnormal phosphorylation in hippocampal neurons*. *Brain Res.* 669, 135-139.
- TSUYAMA S., TERAYAMA Y., MATSUYAMA S., 1987. *Numerous phosphates of microtubule-associated protein 2 in living rat brain*. *J. Biol. Chem.* 262, 10886-10892.
- TUCKER R. P., 1990. *The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review*. *Brain Res. Rev.* 15, 101-120.
- TUCKER R. P., MATUS A. I., 1988. *Microtubule-associated proteins characteristic of embryonic brain are found in the adult mammalian retina*. *Dev. Biol.* 130, 423-434.
- TUCKER R. P., BINDER L. I., MATUS A. I., 1988. *Neuronal microtubule-associated proteins in the embryonic avian spinal cord*. *J. Comp. Neurol.* 271, 44-55.
- TUCKER R. P., GARNER C. C., MATUS A., 1989. *In situ localization of microtubule-associated protein mRNA in the developing and adult rat brain*. *Neuron* 2, 1245-1256.
- ULLOA L., AVILA J., DÍAZ-NIDO J., 1993a. *Heterogeneity in the phosphorylation of microtubule-associated protein MAP1B during rat brain development*. *J. Neurochem.* 61, 961-972.
- ULLOA L., DÍAZ-NIDO J., AVILA J., 1993b. *Depletion of casein kinase II by antisense oligonucleotide prevents neurogenesis in neuroblastoma cells*. *EMBO J.* 12, 1633-1640.
- ULLOA L., DIEZ-GUERRA F. J., AVILA J., DÍAZ-NIDO J., 1994a. *Localization of differentially phosphorylated isoforms of microtubule-associated protein 1B in cultured rat hippocampal neurons*. *Neuroscience* 61, 211-223.
- ULLOA L., IBARROLA N., AVILA J., DIEZ-GUERRA F. J., 1994b. *Microtubule-associated protein 1B (MAP1B) is present in glial cells phosphorylated different than in neurones*. *Glia* 10, 266-275.
- VALLEE R., 1980. *Structure and phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP 2)*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3206-3210.
- VIERECK C., TUCKER R. P., MATUS A., 1989. *The adult rat olfactory system expresses microtubule-associated proteins found in the developing brain*. *J. Neurosci.* 9, 3547-3557.
- VOGEL G., 1998. *Tau protein mutations confirmed as neuron killers (news)*. *Science* 280, 1524-1525.
- WAGNER A. P., FISCHER B., SCHMOLL H., PLATT D., KESSLER C., 1998. *Altered expression of microtubule-associated protein 1B in cerebral cortical structures of pentylentetrazole-treated rats*. *J. Neurosci. Res.* 51, 646-657.
- WEINGARTEN M. D., LOCKWOOD A. H., HWO S. Y., KIRSCHNER M. W., 1975. *A protein factor essential for microtubule assembly*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 1858-1862.
- WEISSHAAR B., MATUS A., 1993. *Microtubule-associated protein 2 and the organization of cellular microtubules*. *J. Neurocytol.* 22, 727-734.
- YAMAMOTO H., FUKUNAGA K., TANAKA E., MIYAMOTO E., 1983. *Ca²⁺- and calmodulin-dependent phosphorylation of microtubule-associated protein 2 and Tau factor, and inhibition of microtubule assembly*. *J. Neurochem.* 41, 1119-1125.