

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika

HANNA NIEZNAŃSKA

Zakład Biochemii Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN Pasteura 3, 02-973 Warszawa E-mail: h.nieznanska@nencki.gov.pl

ODDZIAŁYWANIE BIAŁKA PRIONOWEGO Z MIKROTUBULAMI

WSTĘP

Zaburzenia struktury i funkcji cytoszkieletu, a w szczególności tej jego części, która zbudowana jest z mikrotubul (nazywanej cytoszkieletem mikrotubularnym), również obserwowane są w szeregu chorób neurodegeneracyjnych, w tym w pasażowalnych encefalopatiach gabczastych (ang. transmissible spongiform encephalopathies, TSE), znanych również jako choroby prionowe. Badania przeprowadzone w ciągu ostatnich lat sugerują, że procesy neurodegeneracyjne, zachodzące w niektórych chorobach prionowych, mogą być wynikiem bezpośredniego oddziaływania białka prionowego z tubuliną.

TUBULINA

Cytoszkielet mikrotubularny pełni kluczową rolę w licznych procesach komórkowych, takich jak transport organelli i makromolekuł, segregacja chromosomów, podział komórki, procesy wydzielnicze, różnicowanie i ruch komórek, a także determinacja morfologii i polarności komórki (NOGALES 2000). Głównym składnikiem cytoszkieletu mikrotubularnego są spolimeryzowane heterodimery złożone z α- i β-tubuliny, o masie cząsteczkowej, odpowiednio, 55 i 53 kDa (NOGALES 2000). Łańcuchy dimerów tubuliny tworzą protofilamenty, które ułożone równolegle formują cylindryczną strukturę zwaną mikrotubulą (MT) (Ryc. 1A). Ilość protofilamentów w mikrotubuli może się wahać od 9 do 16, chociaż zazwyczaj wynosi 13, co daje zewnętrzną średnicę ~25 nm, a wewnętrzną ~17 nm (WADE 2009, HAWKINS i współaut.

2010, BREUSS i współaut. 2017). MT jest strukturą biegunową, gdyż wszystkie dimery ułożone są w tym samym kierunku. Koniec MT, na którym znajduje się β -tubulina, jest nazywany końcem plus, szybko rosnącym, natomiast biegun zakończony α -tubuliną jest nazywany końcem minus, wolno rosnącym. To właśnie sieć mikrotubul tworzy w komórce cytoszkielet mikrotubularny.

U człowieka zidentyfikowano co najmniej osiem izoform a-tubuliny i siedem β-tubuliny (LUDUEÑA 2013). Izoformy te kodowane są przez różne geny i charakteryzują się zróżnicowaną ekspresją tkankową oraz pojawiają się na różnych etapach rozwoju organizmu (PARKER i współaut. 2017). Między poszczególnymi izoformami występuje duża homologia strukturalna w obrębie domeny na końcu aminowym (N-końcu), jak i środkowej. Domena na końcu karboksylowym (C-końcu) jest najmniej konserwowana, a jej nieustrukturyzowany końcowy frag-ment, złożony z 18-24 reszt aminokwasowych jest miejscem licznych modyfikacji potranslacyjnych, takich jak np.: detyrozynacja, acetylacja, glutamylacja, glicylacja, fosforylacja (patrz WłOGA oraz KLISZCZ i KASPRZAK w tym zeszycie KOSMOSU; WESTERMANN i WEBER 2003, JANKE 2014, BREUSS i współaut. 2017). Fragment ten zaangażowany jest w oddziaływania z wieloma innymi białkami (MACCIONI i współaut. 1988, CROSS i współaut. 1991, MELKI i współaut. 1991, JOURDA-IN i współaut. 1997, AL-BASSAM 2002, WADE 2009) (opisano w dalszej części artykułu).

Model struktury przestrzennej heterodimeru tubuliny został opracowany przy wykorzystaniu krystalografii elektronowej (Ryc.

Słowa kluczowe: białko prionowe, choroby prionowe, mikrotubule, tubulina

1 B) (NOGALES i współaut. 1998, DOWNING i NOGALES 1998, LOWE i współaut. 2001). Oba białka wykazują wysoki stopień homologii struktury III-rzędowej, przy 40% homologii struktury I-rzędowej. Domena N-końcowa zbudowana jest z sześciu równoległych harmonijek β połączonych helisami a. W domenie tej znajduje się kieszeń wiążącą GTP w tzw. miejscu "N" a-tubuliny (ang. non--exchangeable) oraz wiążąca GTP/GDP w miejscu "E" β-tubuliny (ang. exchangeable) (DOWNING i NOGALES 1998). GTP związany z β-tubuliną jest hydrolizowany do GDP, natomiast nukleotyd związany z a-tubuliną nie ulega hydrolizie. Środkowy region tworzą cztery harmonijki β oraz trzy helisy α . W tym rejonie cząsteczki znajduje się też miejsce wiązania małych cząsteczek regulacyjnych, np. taksolu. C-końcową domenę tworzą dwie antyrównoległe helisy usytuowane na zewnętrznej powierzchni mikrotubuli. Na modelu krystalograficznym nie widać ostatnich 10 reszt aminokwasowych a-tubuliny i 18 reszt β-tubuliny, ze względu na wysoki stopień nieustrukturyzowania tych sekwencji.

Mikrotubule są dynamicznymi strukturami, które moga ulegać rozpadowi i odbudowie (depolimeryzacji mikrotubul i polimeryzacji tubuliny). Ta właściwość tubuliny, nazywana dynamiczną niestabilnością, jest kluczowa dla wielu pełnionych przez nią funkcji (WADE 2009). Stabilność mikrotubul jest regulowana przez liczną grupę białek związanych z mikrotubulami (ang. mikrotubule associated proteins, MAP) (SCHOENFELD i OBAR 1994, Cassimeris i Spittle 2001, Akhmanova i STEINMETZ 2008). Do grupy tej zaliczamy klasyczne lub tzw. strukturalne MAP (np.: MAP1, MAP2, MAP3, MAP4, MAPT) oraz białka pełniące inne funkcje, takie jak: motory molekularne (kinezyny, dyneiny), białka śledzące koniec plus mikrotubuli (np.: CLIP-170, CLIP-115, EB1, EB2) oraz białka związane z centrosomami. Z punktu widzenia niniejszego artykułu najistotniejsze są klasyczne MAP, do których zaliczamy MAP2 oraz MAPT, czyli białko Tau (ang. tubulin associated unit). Oba białka syntetyzowane są w neuronach, ale różnią się lokalizacją wewnątrzkomórkową, MAP2 dominuje w dendrytach i ciele komórki nerwowej, zaś Tau w aksonie (RAMKUMAR i współaut. 2017). Białka te oddziałują z tubuliną zazwyczaj w obrębie ujemnie naładowanych C-końcowych domen a- i B-tubuliny, zlokalizowanych, tak jak już wspomniano, na powierzchni mikrotubul. Oddziaływanie to jest regulowane przez modyfikacje potranslacyjne MAP, głównie przez fosforylację reszt seryny/treoniny (CASSIMERIS i SPITTLE 2001). Zwiększenie poziomu ufosforylowania MAP



Ryc. 1. Budowa tubuliny i mikrotubul.

(A) Schemat przedstawiający heterodimer tubuliny oraz mikrotubule. Na rycinie zaznaczono koniec szybko rosnący (+) i wolno rosnący (-) MT. (B) Model struktury przestrzennej heterodimeru α - i β -tubuliny, otrzymany w kompleksie z taksolem. Na rycinie zaznaczono miejsca wiązania nukleotydów (GTP i GDP) oraz taksolu. Nieustrukturyzowane C-końcowe fragmenty, nie są widoczne w strukturze krystalograficznej (wg PDB 10.2210/pdb1TUB/pdb, NOGALES i współaut. 1998, zmodyfikowana).

zmniejsza ich powinowactwo do tubuliny, co z kolei obniża stabilność mikrotubul i wpływa na dynamikę tych struktur (DRECHSEL i współaut. 1992, BIERNAT i współaut. 1993, BRAMBLETT i współaut. 1993). Najlepiej poznaną kinazą fosforylującą zarówno MAP2, jak i Tau jest kinaza 3 syntazy glikogenu, GSK-3. Białka te mogą być również fosforylowane przez wiele innych kinaz np.: kinazę białkową A (PKA), kinazę białkową C (PKC), kinazę białkową zależną od Ca²⁺ i kalmoduliny (CaMKII). W warunkach fizjologicznych modulacja poziomu ufosforylowania MAP stanowi precyzyjny mechanizm regulujący dynamikę cytoszkieletu MT. Natomiast w warunkach patologicznych np. w chorobie Alzheimera (AD - Alzheimer's disease),



dochodzi do hiperfosforylacji białka Tau, co prowadzi do jego agregacji i w konsekwencji utraty wspomnianej stabilizującej funkcji (ŠIMIĆ i współaut. 2016). Co ciekawe, podwyższony poziom ufosforylowania Tau obserwowany jest także w chorobach prionowych (SIKORSKA i współaut. 2009). Hiperfosforylacja Tau, jak i MAP2 opisywana jest również dla modeli doświadczalnych tych chorób (PEREZ i współaut. 2003, BAUTISTA i współaut. 2006).

Poza białkami stabilizującymi strukturę MT, znanych jest szereg białek ją destabilizujących, takich jak katanina, spastyna czy fidżetyna, oraz uniemożliwiających formowanie mikrotubul poprzez sekwestrację heterodimerów tubuliny, jak statmina (JOURDAIN i współaut. 1997, ZHANG i współaut. 2007). Co ciekawe, od niedawna, do puli białek destabilizujących mikrotubule możemy zaliczyć również białko prionowe.

BIAŁKO PRIONOWE

Białko prionowe (ang. prion protein, PrP) jest glikoproteiną u ssaków wysoce zachowaną w toku ewolucji. Ponadto, homologi białka prionowego zidentyfikowano w organizmach przedstawicieli wielu gromad kręgowców (PREMZL i współaut. 2004, RIVERA-MILLA i współaut. 2006). Białko to ulega ekspresji w wielu różnych tkankach i narządach np.: w mięśniach szkieletowych, mięśniu sercowym, nerkach, trzustce, płucach, ale w najwyższym stężeniu występuje w komórkach ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego (BENDHEIM i współaut. 1992). PrP jest polipeptydem składającym się z 253 aminokwasów (u człowieka) (Ryc. 2). Na końcach aminowym i karboksylowym cząsteczki, białko to posiada sekwencje sygnałowe (reszty aminokwasowe 1-22 oraz 231-253). Podczas procesu tzw. dojrzewania białka sekwencje te ulegają odcięciu. N-końcowy peptyd sygnałowy odcinany jest podczas transportu cząsteczki PrP do wnętrza siateczki endoplazmatycznej (ER), zaś odcięcie peptydu C-końcowego związane jest z dołączeniem grupy glikozylofosfatydyloinozytolowej (GPI), za pomocą której białko kotwiczone



Ryc. 2. Budowa PrP.

(A) Schemat przedstawiający cząsteczkę PrP człowieka. Na schemacie zaznaczono: (SP) - peptydy sygnałowe, (OR) - ośmio-aminokwasowe powtórzone sekwencje, (TM) - domenę transbłonową, (NLS) - sekwencje sygnałowe lokalizacji jądrowej, (S-S) - mostek dwusiarczkowy, (GPI) - miejsce dołączenia kotwicy glikozylofosfatydyloinozytolowej, (Asn181 i Asn179) - reszty asparaginy ulegające glikozylacji oraz struktury drugorzędowe: helisy α oraz struktury β. Strzałkami zaznaczono miejsca, w których dochodzi do proteolitycznego cięcia białka prowadzącego do powstania fragmentów N1 i N2. (B) Model struktury przestrzennej cząsteczki PrP człowieka. Na rycinie zaznaczono struktury a-helikalne: H1, H2 i H3 oraz struktury β. Linią przerywaną zaznaczono N-końcowy nieustrukturyzowany fragment, niewidoczny w strukturze krystalograficznej (wg PDB 10.2210/pdb1QLX/ pdb, ZAHN i współaut. 2000, zmodyfikowana).

jest w błonie komórkowej (BASLER i współaut. 1986, STAHL i współaut. 1987, TURK i współaut. 1988). Dojrzałe białko prionowe człowieka zbudowane jest z 208 reszt aminokwasowych i posiada masę cząsteczkową około 23 kDa (AGUZZI i współaut. 2008). Białko PrP ulega również innym modyfikacjom potranslacyjnym, takim jak: N-glikozylacja reszt asparaginy Asn181 i/lub Asn197, utworzenie mostka dwusiarczkowego między resztami Cys179 i Cys214 oraz proteolitycznej obróbce cząsteczki (PRUSINER 1998). W mózgach zdrowych organizmów w wyniku ograniczonej proteolizy w obrębie reszt 110-112 cząsteczki PrP, powstają fragmenty oznaczane jako N1 oraz C1 (CHEN i współaut. 1995). Z kolei w mózgach organizmów



Ryc. 3. Mikrofotografie przedstawiające struktury tubuliny powstające pod wpływem PrP w warunkach sprzyjających tworzeniu mikrotubul (NIE-ZNANSKI i współaut. 2006), uzyskane za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej.

(A) Preparaty tubuliny inkubowanej w nieobecności i (B) w obecności PrP (zdjęcia niepublikowane).

cierpiących na choroby prionowe dochodzi do proteolitycznego cięcia w obrębie reszty 90, a powstające fragmenty nazywane są: N2 oraz C2 (CHEN i współaut. 1995). Cząsteczka PrP składa się z dwóch głównych regionów. Pierwszy jest nieustrukturyzowany i obejmuje reszty 23~125 (RIEK i współaut. 1997). Region ten zawiera dwa ciągi zasadowych reszt (23-27 oraz 101-110). Sekwencje te pokrywają się z regionami stanowiącymi sygnał lokalizacji jądrowej PrP (ang. nuclear localization signals, NLS; reszty 23-28 i 95-110) (GU i współaut. 2003). W regionie N-końcowym zlokalizowane są także wielokrotnie powtórzone sekwencje złożone z ośmiu reszt aminokwasowych, (ang. octarepeats, OR; reszty: ~50-91), które w cząsteczce PrP stanowią główne miejsce wiązania jonów miedzi (HORNSHAW i współaut. 1995). Drugi region cząsteczki, to domena globularna obejmująca reszty 126-230. Domena ta utworzona jest przez trzy a-helisy oraz dwie krótkie struktury β , a stabilizowana jest przez pojedynczy mostek dwusiarczkowy (RIEK i współaut. 1997). W cząsteczce PrP można wyróżnić także region hydrofobowy, który może pełnić funkcję domeny transbłonowej (reszty 113-135) (LOPEZ i współaut. 1990).

W tkankach zdrowych organizmów PrP występuje głównie zewnątrzkomórkowo, w formie zakotwiczonej na powierzchni błony komórkowej, w obrębie struktur zwanych tratwami (ang. rafts) (TAYLOR i HOOPER 2006) i jest oznaczane jako PrPc. Patologicznym konformerem białka prionowego, związanym z chorobami prionowymi jest PrP^{TSE} (od ang. spongiform transmissible encephalopathy) lub PrPsc (od ang. scrapie; gabczastej encefalopatii występującej u owiec). Uważa się, że konwersja PrP^c do PrP^{TSE} jest kluczowym procesem prowadzącym do rozwoju chorób prionowych (PRUSINER 1998). W procesie tym dochodzi do zwiększenia zawartości struktury β i zmniejszenia zawartości struktury a w cząsteczce białka prionowego, co prowadzi do agregacji patogennego konformeru w postaci uporządkowanych struktur zwanych amyloidami (PRUSINER 1998). Jednak mechanizm konwersji, jak i czynnik neurotoksyczny odpowiedzialny za rozwój TSE nie zostały jak dotąd scharakteryzowane. Poza zewnątrzkomórkowym PrPc, w zdrowych organizmach opisano również wewnatrzkomórkowo zlokalizowane białko prionowe, tzw. cytoplazmatyczne PrP (cytoPrP). Występuje ono np. w niektórych subpopulacjach neuronów hipokampa, wzgórza i kory nowej (MIRONOV i współaut. 2003). Tym niemniej cytoPrP uważane jest również za formę patologiczną. Ponadto, znane są błonowe formy białka prionowego: NtmPrP oraz CtmPrP (YOST i współmat. 1990, Hegde i współaut. 1998, KIM i współaut. 2001, KIM i HEGDE 2002). Te patologiczne formy usytuowane są w błonie siateczki endoplazmatycznej za pomocą domeny hydrofobowej z C-końcowym (forma NtmPrP) lub N-końcowym (forma ^{Ctm}PrP) regionem eksponowanym na cytoplazmę. Podczas gdy forma ^{Ntm}PrP opisywana była jak dotąd jedynie in vitro, forma ^{Ctm}PrP występuje również in vivo, a jej stężenie w mózgach organizmów chorych na TSE wzrasta nawet do 30% całkowitego białka prionowego. Do wzrostu stężenia tej transbłonowej formy PrP prowadzą mutacje w obrębie domeny hydrofobowej, związane z chorobami prionowymi np. występująca w GSS (choroba Gerstmanna-Strausslera-Scheinkera) mutacja Pro105Leu czy Ala117Val (HEGDE i współaut. 1998, KIM i HEGDE 2002). Do wzrostu poziomu cytoplazmatycznej formy PrP, niezwiązanej z błoną ER, dochodzi w przypadku innych mutacji wykrywanych w GSS, Trp145Stop i Gln160Stop. Powstaje wówczas skrócona forma PrP pozbawiona C-końcowej domeny (ZANUSSO i współaut. 1999, HESKE i współaut. 2004).

W tych przypadkach obserwowana jest obniżona translokacja PrP do ER i akumulacja PrP w cytoplazmie lub w jądrze komórkowym (ZANUSSO i współaut. 1999, MIESBAUER i współaut. 2010). Inną przyczyną wzrostu stężenia PrP we wnętrzu komórki może być transport zwrotny z ER, jak zostało to opisane dla mutacji Asp177Asn, powiązanej ze śmiertelną rodzinną bezsennością (ang. fatal familial insomnia, FFI) oraz rodzinną postacią choroby Creutzfeldta-Jakoba (ang. Creutzfeldt-Jakob disease, CJD) (MA i LINDQUIST 2001). Zaburzenia w translokacji PrP mogą być również związane ze stresem ER (ORSI i współaut. 2006). PrP gromadzące się w cytoplazmie ulega zazwyczaj szybkiej ubikwitynacji i proteasomalnej degradacji (YEDIDIA i współaut. 2001). Stąd zaburzenia aktywności proteasomu mogą prowadzić do wzrostu stężenia cytoplazmatycznej formy PrP. Takie zjawisko obserwujemy w chorobach prionowych, gdzie patologiczna forma PrPsc, hamując bezpośrednio aktywność proteasomu, w konsekwencji prowadzi do wzrostu stężenia cyto-PrP (MA i LINDQUIST 2001, MANGE i współaut. 2004). Nadprodukcja cytoplazmatycznej formy PrP jest obserwowana nie tylko w rodzinnych postaciach chorób prionowych, ale także w licznych doświadczalnych modelach TSE (CHAKRABARTI i współaut. 2009, MIESBAUER i współaut. 2010).

Szereg badań wskazuje, że cytoPrP może być białkiem neurotoksycznym (MA i współaut. 2002, GRENIER i współaut. 2006, WANG i współaut. 2009), chociaż molekularny mechanizm toksyczności tej formy białka prionowego nie został jak dotąd w pełni poznany. Oddziaływanie cytoPrP z niektórymi cytoplazmatycznymi białkami jak np.: Bcl-2 (ang. B-cell lymphoma 2 protein), Mgrn (ang. mahogunin) czy NRAGE (ang. neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog), prowadzi do ich agregacji i utraty fizjologicznych funkcji tych białek (BRAGASON i PALSDOTTIR 2005, RAM-BOLD i współauat. 2006, CHAKRABARTI i HEG-DE 2009). Co ciekawe, do białek, które mogą oddziaływać z nieprawidłowo zlokalizowanym PrP, należy tubulina, a konsekwencją tego oddziaływania jest hamowanie formowania MT (NIEZNANSKI i współaut. 2005). Sądzimy więc, że nieprawidłowa lokalizacja PrP, umożliwiająca oddziaływanie cytoPrP z białkami, które nie są jego fizjologicznymi partnerami, może leżeć u podstawy neurotoksyczności tej formy białka prionowego w TSE (MIESBAUER i współaut. 2010, Nieznanski 2010, Zajkowski i współaut. 2015).

ODDZIAŁYWANIE PrP Z TUBULINĄ

Pierwsze badania wskazujące na oddziaływanie białka prionowego z tubuliną zosta-

ły przeprowadzone przez BROWNA i współaut. (1998). Z badań tych wynikało, że syntetyczny peptyd odpowiadający sekwencji 106-126 białka prionowego (PrP 106-126), wiąże się z - α , jak i β -tubuliną z ekstraktów mózgu. Peptyd ten hamował proces formowania mikrotubul, a wprowadzenie mutacji Ala117Val, związanej z GSS, prowadziło do jeszcze silniejszego hamowania polimeryzacji tubuliny (BROWN 2000). Efekt ten obserwowano jednak wyłącznie w obecności białka Tau, co mogło wskazywać, iż peptyd PrP 106-126 asocjuje z tubuliną za pośrednictwem tego właśnie białka. W kolejnych badaniach pokazano, że pełnej długości PrP ulega koimmunoprecypitacji z tubuliną (KE-SHET i współaut. 2000). Zauważono również kolokalizację N-końcowego fragmentu PrP z mikrotubulami w hodowlach komórek neuroblastomy N2a (linia wyprowadzona z nerwiaka zarodkowego myszy) transfekowanych konstruktami GFP-PrP, jak i jego koimmunoprecypitację z tubuliną w lizatach z tych komórek (HACHIYA i współaut. 2004a). Autorzy zidentyfikowali reszty 1-91 cząsteczki PrP jako odpowiedzialne za tę kolokalizację. Badania te pozwoliły wówczas na wyciągniecie wniosku, że PrP i tubulina mogą asocjować ze sobą za pośrednictwem innych cząsteczek. Ponadto pokazano, że transport wewnatrzkomórkowy konstruktów GFP-PrP jest zależny od mikrotubul i odbywa się z udziałem motorów molekularnych z rodziny dynein i kinezyn (HACHIYA i współaut. 2004b) oraz związany jest z obecnością dwóch sekwencji w cząsteczce PrP: reszt 23-33 oraz 53-91. Podobne obserwacje potwierdziły też inne badania, przeprowadzone na komórkach N2a, z których wynikało, że również transport PrPSc do jądra komórkowego zachodzi tylko wówczas, gdy komórki posiadają nienaruszony cytoszkielet mikrotubularny (MANGE i współaut. 2004). Dowodów na bezpośrednie oddziaływanie białka prionowego z tubuliną dostarczyły dopiero nasze badania wykorzystaniem metody kosedymentacji z oczyszczonych białek oraz ich kowalencyjnego sprzęgania z użyciem EDC [1-etylo-3-(3dimetyloaminopropylo)karbodiimid], czynnika sieciującego o tzw. zerowej długości (NIE-ZNANSKI i współaut. 2005). Badanie te wykazały, że pełnej długości PrP^c z ekstraktów z mózgu świni oddziałuje z oczyszczoną tubuliną. Produktu sieciowania nie obserwowano dla PrP C1, czyli fragmentu pozbawionego końca N. Ponadto, oczyszczone rekombinowane białko prionowe (rPrP) również wiązało się do wyizolowanej tubuliny. Ciekawą obserwacją było to, że PrPc z mózgu świni współoczyszcza się z tubuliną, co może stanowić kolejny dowód na silne oddziaływanie tych białek ze sobą.

Istotną konsekwencją bezpośredniego oddziaływania białka prionowego z tubuliną jest jego wpływ na polimeryzację tubuliny (NIEZNANSKI i współaut. 2006). Z badań wykorzystujących pomiar rozproszenia światła (ang. light scattering), metode standardowo stosowaną do monitorowania tempa polimeryzacji tubuliny oraz transmisyjną mikroskopię elektronową (ang. transmission electron microscopy, TEM) wynika, że PrP hamuje polimeryzację tubuliny prowadząc do jej oligomeryzacji, a następnie agregacji. Tak zagregowana tubulina nie jest zdolna do formowania mikrotubul (Ryc. 3). Wykorzystanie, w naszych badaniach, mutantów delecyjnych PrP pozwoliło na zidentyfikowanie dodatnio naładowanego fragmentu 23-32, jako głównego miejsca oddziaływania z tubuliną (OSIECKA i współaut. 2009). Z kolei zastosowanie ograniczonej proteolizy a- i β -tubuliny za pomocą trypsyny, chymotrypsyny oraz subtylizyny pozwoliło na identyfikację fragmentów a-tubuliny odpowiadających resztom aminokwasowym 339-438 β-tubuliny 281-433, jako potencjalnych i miejsc oddziaływania z PrP. Przeprowadzone badania wykazały, że peptyd PrP 23-32 wiąże się z tubuliną i wywołuje jej oligomeryzację, co prowadzi do hamowania tworzenia mikrotubul. Zastosowanie peptydu PrP 1-30, posiadającego dodatkowo sekwencję sygnałową 1-22, która umożliwia mu penetrację poprzez błonę komórkową (LUNDBERG i współaut. 2002), prowadzi do rozpadu cytoszkieletu mikrotubularnego komórek nabłonkowych linii HEp-2 (OSIECKA i współaut. 2009). Obserwacja ta została później potwierdzona na komórkach HeLa, transfekowanych plazmidem kodującym cytoPrP (PrP 23-231) (LI i współaut. 2011). Bardzo ciekawą obserwacją jest to, że zmiany indukowane przez peptyd PrP 1-30 są hamowane w komórkach HEp-2 transfekowanych plazmidem kodującym białko Tau (OSIECKA i współaut. 2011). Badania na wyizolowanych białkach potwierdziły, że zarówno frakcja białek MAP, jak i Tau hamuje indukowaną przez PrP agregację tubuliny. Z kolei fosforylacja białka Tau prowadzi do utraty tej protekcyjnej zdolności (OSIECKA i współaut. 2011). Ponadto, w badaniach na komórkach neurosekrecyjnych PC12 (linia wyprowadzona ze szczurzych komórek guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy), peptyd 1-30 prowadził do formowania nieprawidłowych wrzecion podziałowych. W badaniach z wykorzystaniem doświadczeń kosedymentacyjnych oraz testu ruchliwości (ang. motility assay) okazało się, że PrP osłabia przyłączanie kinezyny Ncd (ang. non-claret disjunctional) do mikrotubul i w ten sposób hamuje zależny od niej transport po mikrotubulach. Ponadto, z doświadczeń kosedymentacyj-

nych wynikało, że PrP nie konkuruje z Tau o miejsce wiązania na MT, a zatem obserwowane efekty można tłumaczyć zmianami strukturze mikrotubul spowodowanymi w bezpośrednim oddziaływaniem PrP-tubulina (NIEZNANSKA i współaut. 2012). Ponieważ Ncd jest motorem molekularnym odpowiedzialnym za prawidłową organizację wrzeciona podziałowego, można przypuszczać, że wyżej opisane formowanie nieprawidłowych wrzecion może być związane z zaburzeniem funkcji kinezyn. W badaniach przeprowadzonych na komórkach PC12, poddanych działaniu czynnika wzrostu neuronów NGF (ang. nerve growth factor), pod wpływem którego komórki zmieniają się fenotypowo z neurosekrecyjnych na komórki wysuwające wypustki podobne do neurytów neuronów ośrodkowego układu nerwowego wykazano, że peptyd PrP 1-30 prowadzi do rozpadu cytoszkieletu mikrotubularnego i zaniku tych cytoplazmatycznych wypustek. Co istotne, nasze badania przeprowadzone na hodowlach neuronów pierwotnych szczura pokazały, że peptyd PrP 1-30 dodany do hodowli prowadzi do rozpadu cytoszkieletu mikrotubularnego, zaniku neurytów, a ostatecznie do śmierci nekrotycznej komórek nerwowych (ZAJKOW-SKI i współaut. 2015). Zaobserwowano również zmniejszenie liczby kolców dendrytycznych na neuronach traktowanych PrP 1-30. Ponieważ kolce są strukturami tworzącymi postsynaptyczną część synaps pobudzających (KASAI i współaut. 2003), uważa się, że zmiany w gęstości, jak i morfologii kolców związane są ściśle z plastycznością synaptyczną (KASAI i współaut. 2010). Co ciekawe, zmniejszenie gęstości kolców dendrytycznych obserwowano u zwierząt zakażonych TSE (JOHNSTON i współaut. 1997, BROWN i współaut. 2001). Wiadomo, że oprócz aktyny, istotną rolę w morfologii kolców odgrywa tubulina (DENT 2017). Zatem, wpływając na transport mikrotubularny oraz stabilność cytoszkieletu mikrotubularnego można się spodziewać zmian w stabilności i morfologii kolców, co w konsekwencji może prowadzić do zaburzeń w prawidłowym funkcjonowaniu synaps. Wykazano również, że zastosowanie czynnika stabilizującego MT, jakim jest taksol, który wiąże się z mikrotubulami i w sposób nieodwracalny stabilizuje ich strukturę (SCHIFF i współaut. 1997), prowadziło do ochrony komórek nerwowych przed szkodliwym działaniem PrP 1-30 (ZAJKOWSKI i współaut. 2015). Co ciekawe, podobny efekt zaobserwowano stosując inhibitory kinazy białkowej GSK-3, która, jak już wcześniej wspomniano, odpowiada za fosforylację białek MAP. Obniżenie poziomu ufosforylowania Tau i MAP 2 przez zastosowanie LiCl, niespecyficznego inhibitora kinazy GSK-3 (FOR-



Ryc. 4. Schemat przedstawiający hipotetyczny mechanizm działania cytoPrP na cytoszkielet mikrotubularny.

Wzrost poziomu ufosforylowania Tau, obserwowany w TSE, prowadzi do destabilizacji mikrotubul (ufosforylowane Tau dysocjuje od MT). Tubulina pozbawiona stabilizującego wpływu Tau może ulegać oligomeryzacji/agregacji przez cytoPrP, którego podwyższone stężenie obserwowane jest w TSE. Koagregacja cytoPrP i tubuliny prowadzi do zahamowania tworzenia MT. Obniżenie poziomu ufosforylowania Tau, przez zastosowanie inhibitorów kinazy GSK-3 prowadzi do stabilizacji MT i ochrony przed toksycznym działaniem cytoPrP (wg OSIECKA i współaut. 2011, zmodyfikowana).

LENZA i współaut. 2014) oraz CHIR98014, specyficznego inhibitora tej kinazy (RING i współaut. 2003), chroniło neurony przed wyżej opisaną cytotoksycznością wywołaną przez PrP 1-30 (ZAJKOWSKI i współaut. 2015).

Przedstawione obserwacje wskazują jednoznacznie, że cytoPrP może być formą neurotoksyczną białka prionowego, a toksyczność jest związana z jego bezpośrednim oddziaływaniem z tubuliną, prowadzącym do rozpadu cytoszkieletu mikrotubularnego. Obniżenie poziomu ufosforylowania klasycznych MAP i stabilizowanie w ten sposób MT, chroni komórki nerwowe przed destrukcyjnym działaniem cytoplazmatycznej formy PrP i może stanowić potencjalny kierunek w terapii niektórych chorób prionowych (Ryc. 4).

Streszczenie

Nieprawidłowo sfałdowane białko prionowe (PrP^{TSE}) uważane jest za główny czynnik prowadzący do rozwoju zakaźnych chorób neurodegeneracyjnych, zwanych pasażowalnymi encefalopatiami gąbczastymi (TSE). Mechanizm konwersji fizjologicznej formy białka prionowego PrP^C do patologicznej PrP^{TSE}, jak i forma neurotoksyczna tego białka, nie zostały jak dotąd w pełni scharakteryzowane. W warunkach fizjologicznych PrP^C występuje głównie zewnątrzkomórkowo, gdzie przyczepione jest za pomocą kotwicy GPI do powierzchni błony komórkowej. Znane są jednak, również zlokalizowane w cytoplazmie formy PrP, zwane cytoPrP. Co ciekawe, stężenie cytoPrP znacząco wzrasta w TSE. Badania ostatnich lat dowodzą, że nieprawidłowo zlokalizowane w cytoplazmie PrP może być czynnikiem neurotoksycznym, a mechanizm neurotoksyczności związany jest prawdopodobnie z bezpośrednim oddziaływaniem tej formy białka prionowego z tubuliną. Oddziaływanie to prowadzi do agregacji tubuliny, zahamowania formowania MT, rozpadu cytoszkieletu mikrotubularnego i w konsekwencji śmierci komórki. Stabilizacja MT, np. przez obniżenie poziomu ufosforylowania związanych z mikrotubulami białek MAP chroni neurony przed toksycznością cytoplazmatycznej formy PrP.

LITERATURA

- AGUZZI A., BAUMANN F., BREMER J., 2008. The prion's elusive reason for being. Annu. Rev. Neurosci. 31, 439-477.
- AKHMANOVA A., STEINMETZ M. O., 2008. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9, 309-322.
- AL-BASSAM J., OZER R. S., SAFER D., HALPAIN S., MILLIGAN R. A., 2002. MAP2 andtau bind longitudinally along the outer ridges of microtu-bule pro-tofilaments. J. Cell Biol. 157, 1187-1196
- BASLER K., OESCH B., SCOTT M., WESTAWAY D., WALCHLI M., GROTH D. F., MCKINLEY M. P., PRUSINER S. B., WEISSMANN C., 1986. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. Cell 46, 417-428.
- BAUTISTA M. J., GUTIERREZ J., SALGUERO F. J., FERNANDEZ DE MARCO M. M., ROMERO-TREVEJO J. L., GOMEZ-VILLAMANDOS J. C., 2006. BSE infection in bovine PrP transgenic mice leads to hyperphosphorylation of tau-protein. Vet. Microbiol. 115, 293-301.
- BENDHEIM P. E., BROWN H. R., RUDELLI R. D., SCALA L. J., GOLLER N. L., WEN G. Y., KASC-SAK R. J., CASHMAN N. R., BOLTON D. C., 1992. Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. Neurology 42, 149-156.
- BIERNAT J., GUSTKE N., DREWES G., MANDELKOW E. M., MANDELKOW E., 1993. Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. Neuron 11, 153-163.
- BRAGASON B. T., PALSDOTTIR A., 2005. Interaction of PrP with NRAGE, a protein involved in neu-ronal apoptosis. Mol. Cell. Neurosci. 29, 232-244.
- BRAMBLETT G. T., GOEDERT M., JAKES R., MERRICK S. E., Trojanowski J. Q., Lee V. M., 1993. Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule bin-ding. Neuron 10, 1089-1099.
- BREUSS M. W., LECA I., GSTREIN T., HANSEN A. H., KEAYS D. A., 2017. Tubulins and brain development The origins of functional speci-fication. Mol. Cell. Neurosci., doi: 10.1016/j. mcn.2017.03.002.
- BROWN D., BELICHENKO P., SALES J., JEFFREY M., FRASER J. R., 2001. Early loss of dendritic spines in murine scrapie revealed by confocal analysis. Neuroreport 12, 179-183.
 BROWN D. R., 2000. Altered toxicity of the prion protein peptide PrP106-126 carrying the Ala-(117)-->Val mutation. Biochem. J. 346, 785-791.
- BROWN D. R., SCHMIDT B., KRETZSCHMAR H. A., 1998. Prion protein fragment interacts with

PrP-deficient cells. J. Neurosci. Res. 52, 260-267.

- CASSIMERIS L., SPITTLE C., 2001. Regulation of microtubule-associated proteins. Int. Rev. Čytol. 210, 163-226.
- CHAKRABARTI O., ASHOK A., HEGDE R. S., 2009. Prion protein biosynthesis and its emerging role in neurodegeneration. Trends. Biochem. Sci. 34, 287-295.
- CHAKRABARTI O., HEGDE R. S., 2009. Functional depletion of mahogunin by cytosolically exposed prion protein contributes to neurodegene-ration. Cell 137, 1136-1147.
- CHEN S. G., TEPLOW D. B., PARCHI P., TELLER J. K., GAMBETTI P., AUTILIO-GAMBETTI L., 1995. Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. J. Biol. Chem. 270, 19173-19180.
- CROSS D., DOMINGUEZ J., MACCIONI R. B., AVILA J., 1991. MAP-1 and MAP-2 binding sites at the C-terminus of beta-tubulin. Studies with syn-thetic tubulin peptides. Biochemistry 30, 4362-4366.
- DENT E. W., 2017. Of microtubules and memory: implications for microtubule dynamics indendrites and spines. Mol. Biol. Cell. 28, 1-8.
- DOWNING K. H, NOGALES E., 1998. New insights into microtubule structure and function from the atomic model of tubulin. Eur. Biophys. J. 27, 431-436.
- DRECHSEL D. N, HYMAN A. A, COBB M. H, KIRSCH-NER M. W., 1992. Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. Mol. Biol. Cell 3, 1141-1154.
- FORLENZA O. V., DE-PAULA V. J., DINIZ B. S., 2014. Neuroprotective effects of lithium: implications for the treatment of Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders. ACS Chem. Neurosc. 5, 443-450. GRENIER C., BISSONNETTE C., VOLKOV L., ROUCOU
- X., 2006. Molecular morphology and toxicity of cytoplasmic prion protein aggregates in neuro-nal and non-neuronal cells. J. Neurochem. 97, 1456-1466.
- Y., HINNERWISCH J., FREDRICKS R., KALEPU S. GU MISHRA R. S., SINGH N., 2003. Identification of cryptic nuclear localization signals in the prion protein. Neurobiol. Dis. 12, 133-149.
- HACHIYA N. S., WATANABE K., SAKASEGAWA Y., KA-NEKO K., 2004a. Microtubulesassociated intracellular localization of the NH2-terminal cellular prion protein fragment. Biochem. Biophys. Res. Commun. 313, 818-823.
- HACHIYA N. S., WATANABE K., YAMADA M., SAKASE-GAWA Y., KANEKO K., 2004b. Anterograde and retrograde intracellular trafficking of fluores-cent cellular prionprotein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 315, 802-807.
- HAWKINS T., MIRIGIAN M., SELCUK YASAR M., ROSS J. L., 2010. Mechanics of microtubules. J. Biomech. 43, 23-30.
- HEGDE R. S., MASTRIANNI J. A., SCOTT M. R., DE-FEA K. A., TREMBLAY P., TORCHIA M., DEAR-MOND S. J., PRUSINER S. B., LINGAPPA V. R. A., 1998. A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. Science 279, 827-834. HESKE J., HELLER U., WINKLHOFER K. F., TATZELT
- J., 2004. The C-terminal globular domain of the prion protein is necessary and sufficient for import into the endoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. 279, 5435-5443. HORNSHAW M. P., MCDERMOTT J. R., CANDY J. M.,
- 1995. Copper binding to the N-terminal tan-dem repeat regions of mammalian and avian

prion protein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 207, 621-629. JANKE C., 2014. The tubulin code: molecular com-

- ponents, readout mechanisms, and functions.
- J. Cell Biol. 18, 461-472. JOHNSTON A. R., BLACK C., FRASER J., MACLEOD N., 1997. Scrapie infection alters the mem-brane and synaptic properties of mouse hippocampal CA1 pyramidal neurones. J. Physiol. 500, 1-15.
- JOURDAIN L., CURMI P., SOBEL A., PANTALONI D., CARLIER M. F., 1997. Stathmin: a tubulin-se questering protein which forms a ternary T2S complex with two tubulin molecules. Biochemi-
- stry 36, 10817-10821.
 KASAI H., MATSUZAKI M., NOGUCHI J., YASUMATSU N., NAKAHARA H., 2003. Structurestability-function relationships of dendritic spines. Trends Neurosci. 26, 360-368.
- KASAI H., FUKUDA M., WATANABE S., HAYASHI-TAKA-GI A., NOGUCHI J., 2010. Structural dynamics
- of dendritic spines in memory and cognition. Trends. Neurosci. 33, 121-129.
 KESHET G. I., BAR-PELED O., YAFFE D., NUDEL U., GABIZON R., 2000. The cellular prion protein colocalizes with the dystroglycan complex in the brain L Neuroscher 75 1880 1897.
- Conscurzes with the aystroglycan complex in the brain. J. Neurochem. 75, 1889-1897.
 KIM S. J., HEGDE R. S., 2002. Cotranslational partitioning of nascent prion protein into multiple populations at the translocation channel. Mol. Biol. Cell 13, 3775-3786.
 KIM S. J. RAHBAR R. HEGDE P. S. 2001. Complexity of the second second
- Mol. Biol. Cell 13, 3775-3786.
 KIM S. J., RAHBAR R., HEGDE R. S., 2001. Combinatorial control of prion protein biogenesis by the signal sequence and transmembrane domain. J. Biol. Chem. 276, 26132-26140.
 LI X. L., WANG G. R., JING Y. Y., PAN M. M., DONG C. F., ZHOU R. M., WANG Z. Y., SHI Q., GAO C., DONG X. P., 2011. Cytosolic PrP induces apoptosis of cell by disrupting microtubule assembly. J. Mol. Neurosci. 43, 316-325.
- assembly. J. Mol. Neurosci. 43, 316-325. LOPEZ C. D., YOST C. S., PRUSINER S. B., MYERS R. M., LINGAPPA V. R., 1990. Unusual topogenic sequence directs prion protein biogenesis. Science 248, 226-229.
- LOWE J., LI H., DOWNING K. H., NOGALES E., 2001. Refined structure of alpha betatubulin at 3.5 A resolution. J. Mol. Biol. 313, 1045-1057.
- LUDUEÑA R. F., 2013. A hypothesis on the origin and evolution of tubulin. Int. Rev. Cell Mol. Biol. 302, 41-185.
- Biol. 302, 41-185.
 LUNDBERG P., MAGZOUB M., LINDBERG M., HÄLL-BRINK M., JARVET J., ERIKSSON L. E., LANGEL U., GRÄSLUND A., 2002. Cell membrane trans-location of the Nterminal (1-28) part of the prion protein. Biochem. Biophys. Res. Com-mun. 299, 85-90.
 MA J., LINDQUIST S., 2001. Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are sub-ject to retrograde transport and protegoome
- ject to retrograde transport and proteasome degradation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 14955-14960.
- MA J., WOLLMANN R., LINDQUIST S., 2002. Neuro-toxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. Science 298, 1781-1785.
- MACCIONI R. B., RIVAS C. I., VERA J. C., 1988. Differential interaction of syntheticpeptides from the carboxyl-terminal regulatory domain
- of tubuliny with microtubule-associated pro-teins. EMBO J. 7, 1957-1963. MANGE A., CROZET C., LEHMANN S., BERANGER F., 2004. Scrapie-like prion protein is translocated to the nuclei of infected cells independently of protectioned inhibition and interacts with obre proteasome inhibition and interacts with chromatin. J. Cell Sci. 117, 2411-2416.

- Melki R., Kerjan P., Waller J. P., Carlier M. F., 1991. Pantaloni D. Interaction of microtu-F., 1991. Fanalitation D. Interaction of microtubules: bule-associated proteins with microtubules: yeast lysyl-and valyl-tRNA synthetases and tau 218–235 synthetic peptide asmodel sys-tems. Biochemistry 30, 11536-11545.
 MIESBAUER M., RAMBOLD A. S., WINKLHOFER K. F., TATZELT J., 2010. Targeting of the prion protein to the cytosol: mechanisms and con-sequences Curr Issues Mol Biol 12, 109-
- sequences. Curr. Issues. Mol. Biol. 12, 109-118.
- MIRONOV A. JR., LATAWIEC D., WILLE H., BOUZA-MONDO-BERNSTEIN E., LEGNAME G., WILLIAMSON R. A., BURTON D., DEARMOND S. J., PRUSINER S. B., PETERS P. J., 2003. Cytosolic prion pro-tein in neurons. J. Neurosci. 23, 7183-7193.
- NIEZNANSKA H., DUDEK E., ZAJKOWSKI T., SZCZESNA E., KASPRZAK A. A., NIEZNANSKI K., 2012. Prion protein impairs kinesin-driven transport. Biochem. Biophys. Res. Commun. 425, 788-793.
- NIEZNANSKI K., 2010. Interactions of prion protein with intracellular proteins: so manypartners and no consequences? Cell. Mol. Neurobiol. 30, 5, 653-666.
- NIEZNANSKI K., NIEZNANSKA H., SKOWRONEK K. J., OSIECKA K. M., STEPKOWSKI D., 2005. Direct interaction between prion protein and tubulin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 334, 403-411.
- NIEZNANSKI K., PODLUBNAYA Z. A., NIEZNANSKA H., 2006. Prion protein inhibits microtubule assembly by inducing tubulin oligomerization. Biochem. Biophys. Res. Commun. 349, 391-399.
- NOGALES E., 2000. Structural insights into microtu-bule function. Annu. Rev. Biochem. 69, 277-302.
- NOGALES E., WOLF S. G., DOWNING K. H., 1998. Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. Nature 391, 199-203. ORSI A., FIORITI L., CHIESA R., SITIA R., 2006.
- Conditions of endoplasmic reticulum stress fa-
- Contations of enaoptasmic reticulum stress fa-vor the accumulation of cytosolic prion protein.
 J. Biol. Chem. 281, 41, 30431-30438.
 OSIECKA K. M., NIEZNANSKA H., SKOWRONEK K. J., KAROLCZAK J., SCHNEIDER G., NIEZNANSKI K., 2009. Prion protein region 23-32 interacts with tubulin and inhibits microtubule assembly. Proteins 77, 279-296.
 OSIECKA K. M., NIEZNANSKA H., SKOWRONEK K. J.
- OSIECKA K. M., NIEZNANSKA H., SKOWRONEK K. J., JOZWIAK J., NIEZNANSKI K., 2011. Tau inhibits
- bolzwikk o., MEZINANSKI K., 2011. Idu tutulits tubulin oligomerization induced by prion prote-in. Biochim. Biophys. Acta 1813, 1845-1853.
 PARKER A. L., TEO W. S., MCCARROLL J. A., KA-VALLARIS M., 2017. An Emerging Role for Tu-bulin Isotypes in Modulating Cancer Biology and Chemotherary Resistance. Int. J. Mol. and Chemotherapy Resistance. Int. J. Mol.
- Sci.18, E1434. PEREZ M., ROJO A. I., WANDOSELL F., DIAZ-NIDO J., AVILA J. 2003. Prion peptide induces neuronal cell death through a pathway involving glycogen synthase kinase 3. Bioch. J. 372, 129-136.
- PREMZL M., GREADY J. E., JERMIIN L. S., SIMONIC T., MARSHALL GRAVES J. A., 2004. Evolution of vertebrate genes related to prion and Shadoo proteins-clues from comparative genomic ana-lysis. Mol. Biol. Evol. 21, 2210-2231. PRUSINER S. B., 1998. Prions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 13363-13383.
- RAMBOLD A. S., MIESBAUER M., RAPAPORT D., BARTKE T., BAIER M., WINKLHOFER K. F., TAT-ZELT J., 2006. Association of Bcl-2 with mis-folded prion protein is linked to the toxic po-tential of cytosolic PrP. Mol. Biol. Cell 17, 8, 3356-3368.

- RIEK R., HORNEMANN S., WIDER G., GLOCKSHUBER R., WÜTHRICH K., 1997. NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). FEBS Lett. 413, 282-288.
- RAMKUMAR A., JONG B. Y., ORI-MCKENNEY K. M., 2017. ReMAPping the microtubule landscape: How phosphorylation dictates the activities of microtubule-associated proteins. Dev. Dyn., doi: 10.1002/dvdy.24599.
- RING D. B., JOHNSON K. W., HENRIKSEN E. J., NUSS J. M., GOFF D., KINNICK T. R., MA S. T., REEDER J. W., SAMUELS I., SLABIAK T., WAG-MAN A. S., HAMMOND M. E., HARRISON S. D., 2003. Selective glycogen synthase kinase 3 in-hibitors potentiate insulin activation of glucose transport and utilization in vitro and in vivo.
- Diabetes 52, 588-595. Rivera-Milla E., Oldtmann B., Panagiotidis C. H., BAIER M., SKLAVIADIS T., HOFFMANN R., ZHOU Y., SOLIS G. P., STUERMER C. A., MALAGA-TRIL-LO E., 2006. Disparate evolution of prion protein domains and the distinct origin of Doppeland prion-related loci revealed by fish-to-mam-mal comparisons. FASEB J. 20, 317-319. SCHIFF P. B., FANT J., HORWITZ S. B., 1979. Pro-motion of microtubule assembly in vitro by
- taxol. Nature 277, 665-667. SIKORSKA B., LIBERSKI P. P., SOBÓW T., BUDKA H., IRONSIDE J. W., 2009. Ultrastructural study of florid plagues in surger for the literation of the study of florid plaques in variant Creutzfeldt-Jakob disease: a comparison with amyloid plaques in kuru, sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease. Neu-
- ropathol. Appl. Neurobiol. 35, 46-59. Schoenfeld T. A., OBAR R. A., 1994. Diverse distribution and function of fibrous
- Structuon and function of fibrous
 microtubule-associated proteins in the nervous system. Int. Rev. Cytol. 151, 67-137.
 STAHL N., BORCHELT D. R., HSIAO K., PRUSINER S. B., 1987. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. Cell 51, 229-240.
- ŠIMIĆ G., BABIĆ LEKO M., WRAY S., HARRINGTON C., DELALLE I., JOVANOV-MILOŠEVIĆ N., BAŽADONA D., BUÉE L., DE SILVA R., DI GIOVANNI G.,

WISCHIK C., HOF P. R., 2016. Tau protein hyperphosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease and other tauopathies, and possible neuroprotective strategies. Biomolecules 6, 6.

- TAYLOR D. R., HOOPER N. M., 2006. The prion protein and lipid rafts. Mol. Memb. Biol. 23, 89-99.
- TURK E., TEPLOW D. B., HOOD L. E., PRUSINER S. B., 1988. Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. Eur. J. Biochem. 176, 21-30.
 WADE R. H., 2009. On and around microtubules:
- an overview. Mol. Biotechnol. 43, 177-191.
- WANG X., BOWERS S. L., WANG F., PU X.-A. A., NELSON R. J., MA J., 2009. Cytoplasmic prion protein induces forebrain neurotoxicity. Bio-chim. Biophys. Acta. 1792, 6, 555-563. WESTERMANN S., WEBER K., 2003. Post-translation-
- al modifications regulate microtubul function. Nat. Rev. Mo. Cell Biol., 4, 938-947. KOWSKI T., NIEZNANSKA H., NIEZNANSKI K.,
- ZAJKOWSKI T., 2015. Stabilization of microtubular cytoskele-ton protects neurons from toxicity of N-terminal fragment of cytosolic prion protein. Biochim. Biophys. Acta 1853, 2228-2239.
- ZANUSSO G., PETERSEN R. B., JIN T., JING Y., KA-NOUSH R., FERRARI S., GAMBETTI P., SINGH N., 1999. Proteasomal degradation and N-terminal protease resistance of the codon 145 mutant prion protein. J. Biol. Chem. 274, 23396-23404.
- ZHANG D., ROGERS G. C., BUSTER D. W., SHARP D. J., 2007. Three microtubule severing enzymes contribute to the "Pacman-flux" machinery that moves chromosomes. J. Cell Biol.
- 177, 231-242. YOST C. S., LOPEZ C. D., PRUSINER S. B., MYERS R. M., LINGAPPA V. R., 1990. Non-hydrophobic extracytoplasmic determinant of stop transfer in the prion protein. Nature 343, 669-672. YEDIDIA Y., HORONCHIK L., TZABAN S., YANAI A., TARABOULOS A., 2001 Proteasomes and ubiq-
- uitin are involved in the turnover of the wildtype prion protein. EMBO J. 20, 5383-5391.

KOSMOS Vol. 67, 1, 121-130, 2018

HANNA NIEZNAŃSKA

Department of Biochemistry, Nencki Institute of Experimental Biology PAS, 3 Pasteur Str., 02-973 Warsaw, E-mail: h.nieznanska@nencki.gov.pl

INTERACTION OF PRION PROTEIN WITH MICROTUBULES

Summary

Misfolded prion protein (PrPTSE) is known as a major agent leading to infectious neurodegenerative diseases, known as transmissible spongiform encephalopathies (TSE). The mechanism of conversion of the physiological form of prion protein (PrP^c) into the pathological PrP^{TSE} as well as the identity of neurotoxic form of this protein is not fully characterized. Under physiological conditions, PrPc one, is predominantly extracellular, tethered to the plasma membrane surface through the GPI anchor. However, cytosolic forms of PrP, termed as cytoPrP have also been found. Interestingly, a significant increase in the concentration of cytoPrP is observed in TSE. Recently, it was shown that mislocalized PrP can be a neurotoxic agent. The mechanism of neurotoxicity might be linked to the direct interaction of this form of PrP with tubulin. This interaction leads to tubulin aggregation, inhibition of microtubules (MT) assembly, disruption of microtubular cytoskeleton and eventually cell death. MT stabilization, by decreasing the level of MAP phosphorylation, can protect neurons from toxic effect of cytosolic forms of PrP.

Key words: microtubules, prion diseases, prion protein, tubulin