

糖原合酶激酶-3 β 调节 9G8 介导的 tau 外显子 10 的可变剪接 *

丁绍红^{1, 3)**} 尹晓敏^{1, 2)**} 施建华^{1, 2)} 钱 慰^{1, 2)} 刘 飞^{1, 2)***}

⁽¹⁾ 南通大学江苏省神经再生重点实验室, 南通 226001; ⁽²⁾ 南通大学医学院生物化学与分子生物学教研室, 南通 226001;

⁽³⁾ 南通大学公共卫生学院, 南通 226007)

摘要 Tau 外显子 10 的可变剪接产生含 3 个微管结合片段或 4 个微管结合片段的 tau 蛋白变体(3R-tau 和 4R-tau)。正常成年人脑中, 3R-tau 和 4R-tau 的表达水平相近, 这种比例对于维持正常脑功能非常重要。9G8 是剪接因子 SR 蛋白家族中的成员之一, 参与多种基因转录产物的剪接调控, 它的功能和活性受磷酸化高度调节。糖原合酶激酶(GSK)-3 β 是体内重要的蛋白激酶, 已有研究显示它参与调节 tau 外显子 10 的可变剪接。利用微型 tau 基因研究了 9G8 在不同细胞系中对 tau 外显子 10 可变剪接的作用以及 GSK-3 β 对 9G8 介导的 tau 外显子 10 可变剪接的影响。结果显示, 过表达 9G8 抑制 tau 外显子 10 的表达, GSK-3 β 在体外可催化 9G8 的磷酸化, GSK-3 β 可以被 9G8 从大鼠脑匀浆中沉降(pull-down), 提示它们之间可能存在相互作用, 在培养的细胞中, GSK-3 β 与 9G8 之间存在共定位, 过表达 GSK-3 β 抑制 9G8 对外显子 10 可变剪接的作用, 有利于 4R-tau 的产生。这些结果显示 GSK-3 β 影响 9G8 介导的 tau 外显子 10 的剪接。

关键词 9G8, 糖原合酶激酶 3 β (GSK-3 β), tau, 可变剪接

学科分类号 R745.7, Q513

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00528

Tau 是存在于神经元中主要的微管相关蛋白, 其生物学功能是促进微管的聚合和稳定微管的结构。正常成年人脑表达有 6 种 tau 的变体, 这 6 种变体是由单一基因编码, 通过对外显子 2、3 和 10 的可变剪接(alternative splicing)而产生的^[1-2]。外显子 10 的编码与否决定了 tau 蛋白是含有 3 个或 4 个微管结合重复片段(three or four microtubule binding repeats, 3R-tau 或 4R-tau)^[3]。4R-tau 比 3R-tau 具有更强的刺激微管组装的能力, 但也更容易被磷酸化而聚集形成 PHF 结构^[4]。在正常人脑中, 3R-tau 和 4R-tau 的表达比例大约是 1, 但在某些 17 号染色体连锁性额颞叶痴呆合并帕金森综合征(frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17, FTDP-17)的患者, 至少发现有 15 种发生在 tau 基因上的突变引起 tau 外显子 10 的可变剪接失调, 导致患者脑中 3R-tau 和 4R-tau 的比例失衡^[5]。此外, 3R-tau/4R-tau 比例失调还见于皮克病(Pick disease, 3R-tau > 4R-tau)、渐进性核上性麻痹(progressive supranuclear palsy, 3R-tau < 4R-tau)、基底节病变(corticobasal degeneration, 3R-tau < 4R-tau)

以及唐氏综合征(Down syndrome, 3R-tau > 4R-tau)等^[6-7]。因此, 研究 tau 外显子 10 表达调控对我们深入认识 tau 病理疾病(tauopathy)分子机制有非常重要的意义。

Tau 外显子 10 的可变剪接受顺式元件和反式作用剪接因子共同调控。许多研究表明, SR 蛋白作为一类重要的剪接因子家族, 在 tau 外显子 10 可变剪接的调控中起重要作用^[8]。SR 蛋白是由于其在羧基端含有精氨酸-丝氨酸的重复结构而得名, 这些丝氨酸残基可被多种蛋白激酶磷酸化进而影响它们的功能和定位^[9]。

9G8 是 SR 蛋白家族成员之一。研究显示 9G8 的过表达抑制 tau 外显子 10 的编码, 有利于 3R-tau 的产生^[10-11]。像其他的 SR 蛋白一样, 9G8

* 国家自然科学基金(30770468, 30801202)和江苏省自然科学基金(BK2009159)资助项目。

** 共同第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 0513-85051813, E-mail: feiliu63@hotmail.com

收稿日期: 2009-09-08, 接受日期: 2009-12-10

的细胞内定位和活性受磷酸化高度调控^[12]。糖原合酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)催化多种蛋白磷酸化, 包括 tau 蛋白。越来越多的证据表明 GSK-3 β 在 Alzheimer's disease (AD) 致病过程中起重要作用^[13]。最近有研究证明, GSK-3 β 磷酸化剪接因子 SC35, 影响其对 tau 外显子 10 可变剪接的调节^[14]。但是, GSK-3 β 是否调节 9G8 对 tau 外显子 10 的剪接还未见报道。在本研究中, 我们研究了 GSK-3 β 对 9G8 磷酸化作用, 探讨了 GSK-3 β 与 9G8 的相互关系, 并在细胞内过表达 GSK-3 β , 研究了其对 9G8 介导 tau 外显子 10 可变剪接的影响, 结果显示 GSK-3 β 抑制 9G8 对 tau 外显子 10 可变剪接。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和质粒. COS-7、HEK293、HEK293T 和 HeLa 细胞购自美国 ATCC 公司; pCDNA3/GSK-3 β 由西班牙马德里 Avila 教授惠赠; pCEP4/9G8-HA 由台湾“中央研究院”生物医学研究所谭婉玉教授惠赠; 微型 tau 基因 pCI/SI9-SI10、pCI/SI9-LI10 和 pCI/SI9-LI10-M14 由美国波士顿医学院周建华教授馈赠。

1.1.2 抗体. 抗 GST 抗体为上海睿星生物公司产品; 抗 GSK-3 β 抗体为美国 Cell Signaling 公司产品; 鼠抗 HA 的单克隆抗体为 Sigma 公司产品; 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠、羊抗兔 IgG 抗体为美国 Jackson Immuno Research Laboratories 产品。

1.1.3 其他试剂和材料. GSK-3 β 为 CalBiochem 公司产品; Lipofectamine2000 为 Invitrogen 公司产品; [γ -³²P]ATP 为美国 Biomedicals 公司产品; 胎牛血清购自杭州四季青生物公司; RNA 抽提试剂盒为 Qiagen 公司产品; 逆转录试剂盒购自 Invitrogen 公司; PrimeSTAR HS DNA 聚合酶为 Takara 公司产品; 培养板及相关细胞实验耗材购自 Corning 公司; 蛋白酶抑制剂 Cocktail 购自 Roche 公司; ECL 化学发光试剂盒为 Pierce 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染. COS7、HEK293、HEK293T 和 HeLa 细胞培养在含 10%胎牛血清的常规 DMEM 培养基中, 每 2 天换一次液。在转染前一天, 将细胞培养在 12 孔板上, 用 Lipofectamine 2000, 按说明书的方法转染微型 tau 基因或共转染 pCEP4/9G8-HA 与 pCDNA3/GSK-3 β 。

1.2.2 Tau 外显子 10 可变剪接的检测. 用 RNeasy Mini Kit(QIAGEN)按照说明书操作提取细胞总 RNA。取 2 μ g 总 RNA 按照 QIAGEN 逆转录试剂盒说明书进行第一链 cDNA 的合成。以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增反应, 微型 tau 基因的上游引物, 5' GGTGTCCACTCCCAGTTCAA 3', 下游引物, 5' CCCTGGTTTATGATGGATGTTGCTAATGAG 3'。反应条件设定为: 95 $^{\circ}$ C, 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳分离, 用 Molecular Imager system(Bio-Rad) 进行分析。

1.2.3 GST-9G8 融合蛋白的表达和纯化. 将从以 pCEP4/9G8 为模板扩增的 9G8 cDNA 插入至 pGEX-4T, BL-21 大肠杆菌用 IPTG 诱导表达 5 h, 细菌经超声波裂解后的裂解产物用还原型谷胱甘肽 (GSH)交联的琼脂糖珠亲和纯化 GST-9G8, 用免疫印迹(Western blot)分析鉴定。

1.2.4 GSK-3 β 对 9G8 的体外磷酸化. 不同浓度的重组 GSK-3 β (0.5~16 arbitrary unit)在反应缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 10 mmol/L β - 巯基乙醇, 10 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L [³²P]- γ -ATP)中, 与 0.2 g/L GST-9G8 或 GST 反应 30 min, 反应产物经 SDS-PAGE 分离后, 用考马氏亮蓝染色, 最后用 Phospho-Image 检测同位素磷的掺入。

1.2.5 GST-pull down. 新鲜大鼠脑组织用缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 8.5%蔗糖, 50 mmol/L NaF, 1 mmol/L Na₃VO₄, 50 nmol/L 冈田酸(okadaic acid, OA), 0.1% Triton X-100, 2 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF, 10 mg/L 抑蛋白酶肽, 10 mg/L 亮抑蛋白酶肽和 10 mg/L 胃蛋白酶抑制剂)进行机械匀浆, 15 000 g 离心 10 min, 上清液与未被从 GSH- 琼脂糖珠上洗脱的 GST-9G8 孵育, 在充分洗去未结合的蛋白质后, 用 2 $\times$ 蛋白质上样缓冲液洗脱后进行免疫印迹分析。

1.2.6 蛋白质免疫印迹分析. 蛋白质经 SDS-PAGE 分离后, 通过电转致 PVDF 膜上, 然后用 5%脱脂牛奶封闭 30 min, 一抗室温孵育过夜, 经含 0.5% Tween 20 的 TBS(TBST)洗涤后, 与辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2 h, 再经 TBST 洗涤后, 用 ECL 化学发光试剂盒按照说明书方法检测。

1.2.7 免疫荧光细胞化学. 转染前一天在 24 孔培养板内种入适量 HeLa 细胞, 用 Lipofactamine 2000 按说明书转染 pcDNA3/GSK-3 β 和 pCEP4/9G8-HA。48 h 后用 PBS 洗涤细胞, 4%多聚甲醛室温固定

30 min. 固定结束后用 PBS 洗涤, 加入含 0.2% Triton X-100 的 10% 山羊血清, 37℃ 封闭 2 h. 然后加入一抗(鼠 anti-HA 1:1 000, 兔 anti-GSK-3 β 1:1 000) 4℃ 孵育过夜. 洗去未结合的一抗, 加入相应的荧光二抗(TRITC-conjugated goat anti-rabbit IgG 和 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG, 1:200) 室温孵育 2 h. 在充分洗去未结合的荧光二抗之后, 加入细胞核染料 5 mg/L Hoechst 33342 反应 15 min. PBS 洗涤细胞, 加入 15 μ l 荧光封片剂, 盖上盖玻片, 立即用 Leica TCS-SP2 激光共聚焦显微镜拍摄或 4℃ 保存.

2 结 果

2.1 9G8 过表达抑制 tau 外显子 10 的编码

为了进一步阐明 9G8 对 tau 外显子 10 可变剪接的作用, 我们在 COS7 和 HEK293 细胞中, 共转染 9G8 与微型 tau 基因. 本研究所用的 3 种微型 tau 基因均含有 tau 外显子 9, 10, 11 和部分内含子 9 和 10 (SI9-SI10) 或全长的外显子 10 (SI9-LI10) (图 1a). M14 表示在内含子 10 的第 14 位碱基由胞嘧啶 C 突变为胸腺嘧啶 T. 这种突变见于 FTDP-17

病人, 结果 4R-tau 的表达增加. 我们分别转染这 3 种 tau 的微型基因致 COS7 或 HEK293 细胞, 48 h 后, 抽提总 RNA, 用 RT-PCR 检测 tau 外显子 10 的可变剪接. 结果显示, 在 COS7 和 HEK293 细胞中, tau 外显子 10 可变剪接产物呈现不同编码水平, COS7 细胞体系有利于 tau 外显子 10 的编码 (图 1b). 比较不同的 tau 微型基因在 COS7 细胞中对外显子 10 可变剪接的影响, 我们观察到 SI9-SI10 和 SI9-LI10 呈现相似的外显子编码水平, 但 M14 的突变明显增加外显子 10 的编码 (图 1b). 过表达 9G8, 无论是在 COS7 还是 HEK293 细胞, 抑或是用不同的微型 tau 基因, 9G8 都不同程度地抑制 tau 外显子 10 的编码 (图 1b). 这种抑制作用在 COS7 细胞系中共转染 pCI-SI9/SI10 或是 HEK293 中共转染 pCI-SI9/LI10-M14 更为明显 (图 1b).

2.2 GSK-3 β 在体外催化 9G8 的磷酸化

为了检测 GSK-3 β 是否磷酸化 9G8, 我们用纯化的 GST-9G8 和 GST, 以 [γ - ^{32} P]-ATP 为供体底物, 用重组的 GSK-3 β 磷酸化 GST-9G8 和 GST. 结果显示, GST-9G8 可被 GSK-3 β 磷酸化 (图 2a),

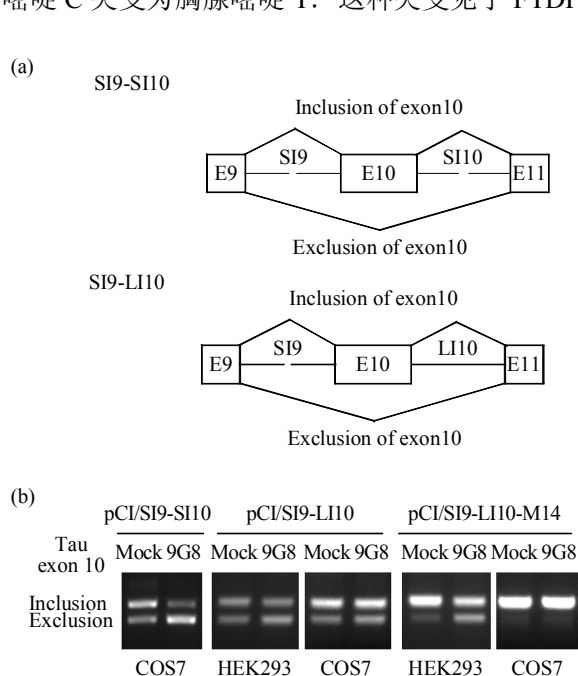


Fig. 1 9G8 suppresses the inclusion of tau exon 10

(a) Schematic diagram of mini-tau genes pCI/SI9-SI10 and pCI/SI9-LI10. Exon (E) 10 is alternative spliced. SI9, SI10 and LI10 represent partial intron 9, partial intron 10 and full length intron 10, respectively. (b) 9G8 suppressed the inclusion of tau E10. pCEP4 (mock) or pCEP4/9G8 was transfected together with mini-tau gene into HEK293 or COS7 cells. After 48 h, the cells were collected and lysed for total RNA extraction. Tau exon 10 splicing products were analyzed by RT-PCR.

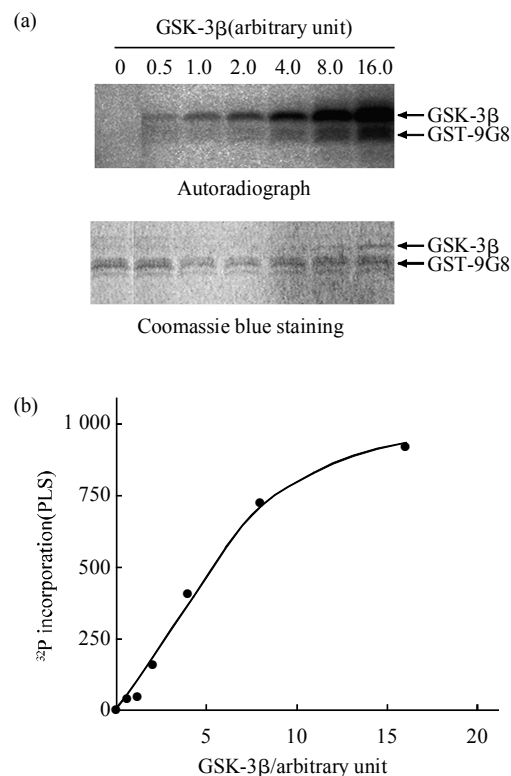


Fig. 2 GSK-3 β phosphorylates 9G8 in vitro

GST-9G8 was incubated with the indicated concentrations of GSK-3 β at 30℃ for 30 min, and the reaction products were separated by SDS-PAGE. Incorporation of ^{32} P into GST-9G8 was detected by Phosphorimage (a) and the quantifications are shown in (b).

但 GST 则不能被磷酸化, 且掺入到 GST-9G8 融合蛋白中的磷呈现明显的酶浓度依赖性(图 2b); 若没有 GSK-3 β 的存在, 就没有磷的掺入(图 2a). 这些结果证明 GSK-3 β 在体外可以有效地磷酸化 9G8.

另外, GSK-3 β 本身也被磷酸化(图 2a).

2.3 GSK-3 β 与 9G8 之间存在相互作用

我们利用 GST-pull down 测定研究 9G8 与 GSK-3 β 之间的相互作用. 结果显示, GST-9G8 可以将 GSK-3 β 从大鼠脑组织抽提液中沉降(pull down), 但 GST 不能将它沉降(图 3a), 这提示 9G8 和 GSK-3 β 存在相互作用. 为了研究 GSK-3 β 与 9G8 在细胞内的定位, 我们选择 HeLa 细胞共表达 GSK-3 β 和带 HA 标签的 9G8, 然后用特异的抗

GSK-3 β 及抗 HA 的抗体, 对这些细胞进行了免疫细胞化学染色, 用共聚焦显微镜观察它们细胞内的定位. 结果显示, 9G8 主要定位在细胞核中, GSK-3 β 则在细胞核和细胞浆中均有分布(图 3b), 因此 GSK-3 β 之间有共定位, 这使 GSK-3 β 调节 9G8 的功能成为可能.

2.4 GSK-3 β 抑制 9G8 对 tau 外显子 10 可变剪接的作用

由于 9G8 的活性和功能高度受磷酸化调控, 在体外 GSK-3 β 可磷酸化 9G8, 因此, 我们猜测 GSK-3 β 可能影响 9G8 对 tau 外显子 10 可变剪接的调节. 为了验证此设想, 我们在 HEK293T 细胞中将微型 tau 基因 pCI/SI9-LI10 或 pCI/SI9-SI10 与 pCEP4/9G8 以及 pcDNA3/GSK-3 β 共表达, 并用 RT-PCR 检测了 tau 外显子 10 的可变剪接. 结果发现, 过表达 GSK-3 β 减弱了 9G8 对 tau 外显子 10 编码的抑制, 并且随着 GSK-3 β 浓度的增加, 这种作用愈加明显(图 4).

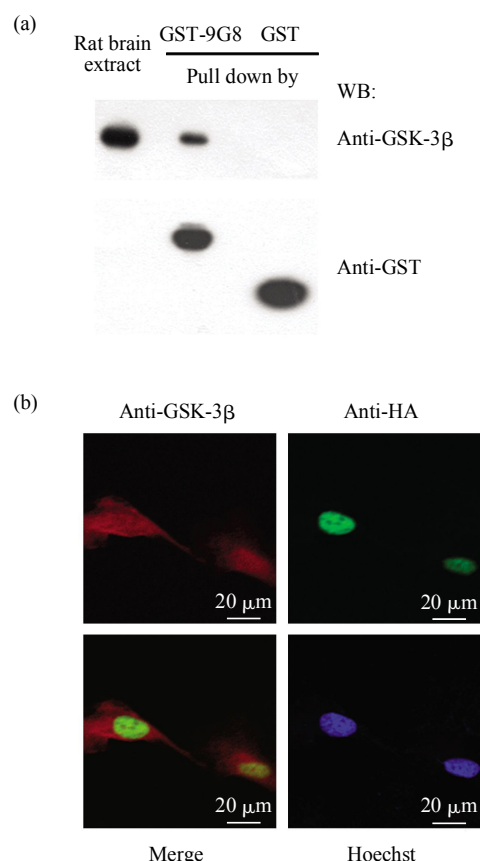


Fig. 3 9G8 interacts with GSK-3 β

(a) GSK-3 β was pulled-down from rat brain extract by GST-9G8. GST-9G8 or GST coupled onto glutathione-Sepharose beads was incubated with rat brain extract. After washing, the bound proteins were subjected to Western blots by using anti-GST and anti-GSK-3 β , respectively. (b) 9G8 was co-localized with GSK-3 β . HA-9G8 and GSK-3 β were co-transfected into HeLa cells. After 48 h transfection, the cells were fixed and immunostained by monoclonal anti-HA and polyclonal anti-GSK-3 β , followed by TRITC conjugated anti-rabbit IgG (red) and FITC conjugated anti-mouse IgG (green), respectively. Hoechst (blue) was used for nuclear staining.

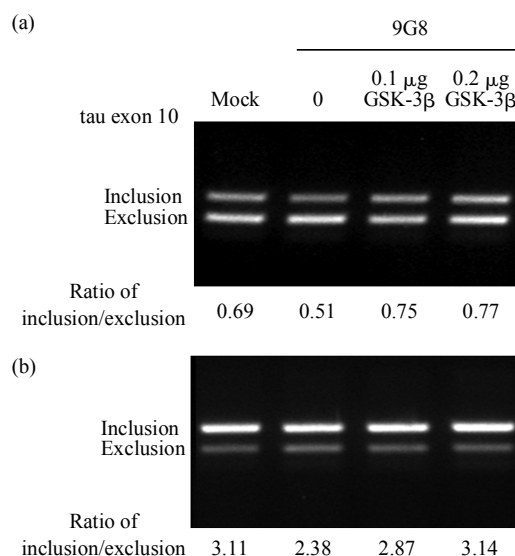


Fig. 4 GSK-3 β inhibits 9G8-regulated tau exon 10 exclusion

Mini-tau gene pCI-SI9-LI10 (a) or pCI-SI9-SI10 (b) was co-transfected with pCEP4/9G8 and pcDNA3/GSK-3 β or their empty vectors into HEK293 cells. The total RNA was extracted after 48 h transfection and subjected to measurement of tau exon 10 splicing by RT-PCR. The ratio indicated was mean value from two independent experiments.

3 讨 论

Tau 外显子 10 的可变剪接受顺式元件和反式作用因子共同调节. SR 蛋白家族中许多剪接因子参与此调控作用. 我们最近的研究发现, 剪接因子

ASF(alternative splicing factor) 促进 tau 外显子 10 表达, Dyrk1A 磷酸化 ASF, 并抑制其对外显子 10 编码的促进作用^[15]. 9G8 和 ASF 为 SR 蛋白家族成员. 与 ASF 的作用相反, 9G8 则抑制外显子 10 的编码. 在本研究中, 我们利用 3 种 tau 的微型基因, 在不同的细胞系研究了 9G8 对 tau 外显子 10 的可变剪接, 发现 9G8 均不同程度地抑制外显子 10 的表达.

剪接因子通过作用于顺式元件调节 mRNA 前体的可变剪接. Gao 等^[10]在 COS7 细胞中研究了 9G8 对 tau 外显子 10 可变剪接的影响, 他们发现, 9G8 抑制 pCI/SI9-LI10 外显子 10 的编码, 但不影响 pCI/SI9-LI10-M14 中外显子 10 的编码, 从而认为 9G8 通过作用与 tau 内含子 10 近 5'端的部分碱基结合从而调控 tau 外显子 10 的剪接, 外显子 10 的+14 位胞嘧啶 C 对于 9G8 的结合非常重要. 我们用 COS7 细胞得到相似的结果. 但是, 当用 HEK293 细胞进行分析时, 我们发现 9G8 也明显抑制其外显子 10 的编码, 提示 9G8 不一定需要外显子 10 的+14 位胞嘧啶 C (图 1b).

在不同的细胞中, tau 外显子 10 可变剪接的表型不同, 9G8 对外显子 10 可变剪接的调控能力也呈现差异. 在 COS7 细胞中, 9G8 抑制外显子 10 编码的能力比在 HEK293 细胞中弱, 这可能是由于 COS7 细胞中抑制外显子 10 编码的剪接因子活力较强. 另外, 9G8 抑制 SI9-SI10 中外显子 10 编码的能力比抑制 SI9-LI10 中外显子 10 编码强. SI9-SI10 比 SI9-LI10 少了内含子 10 的中间片段, 后者可能减弱了 9G8 对外显子 10 编码的抑制.

GSK-3 β 作为主要的 tau 蛋白激酶, 它催化 tau 蛋白在多个位点磷酸化^[16-17]. GSK-3 β 是脯氨酸指导的蛋白激酶, 它催化 S/TP 中丝氨酸或苏氨酸残基的磷酸化. 9G8 分子含有 6 个类似的序列, 均位于 RS 结构域, 是 GSK-3 β 潜在的磷酸化位点. 另外, GSK-3 β 对某些位点的磷酸化需要在其下游的第 4 个丝氨酸或苏氨酸的磷酸化(Ser/ThrXXpSer/pThr). 已有的研究显示, SRPK、CLK1/2、Dyrk1A 等蛋白激酶也磷酸化 SR 蛋白的 RS 结构域, 并调节其介导的可变剪接的功能^[10, 18-19]. 因此, 在细胞内, 由于 9G8 处于磷酸化状态, 推测 GSK-3 β 催化 9G8 磷酸化的作用可能还要强些. 在本研究中, 我们发现 GSK-3 β 磷酸化 9G8, 并影响它调节的 tau 外显子 10 可变剪接. 至于具体的磷酸化位点有待于进一步的研究.

参 考 文 献

- [1] Goedert M, Spillantini M G, Jakes R, *et al.* Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*, 1989, **3**(4): 519-526
- [2] Andreadis A, Brown W M, Kosik K S. Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry*, 1992, **31**(43): 10626-10633
- [3] Graveley B R. Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA*, 2000, **6**(9): 1197-1211
- [4] Alonso A D, Zaidi T, Novak M, *et al.* Interaction of tau isoforms with Alzheimer's disease abnormally hyperphosphorylated tau and *in vitro* phosphorylation into the disease-like protein. *J Biol Chem*, 2001, **276**(41): 37967-37973
- [5] Goedert M, Jakes R. Mutations causing neurodegenerative tauopathies. *Biochim Biophys Acta*, 2005, **1739**(2-3): 240-250
- [6] Andreadis A. Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta*, 2005, **1739**(2-3): 91-103
- [7] Liu F, Gong C X. Tau exon 10 alternative splicing and tauopathies. *Mol Neurodegener*, 2008, **3**(8): 1326-1338
- [8] D'Souza I, Schellenberg G D. Regulation of tau isoform expression and dementia. *Biochim Biophys Acta*, 2005, **1739**(2-3): 4-15
- [9] Zahler A M, Lane W S, Stolk J A, *et al.* SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors. *Genes Dev*, 1992, **6** (5): 837-847
- [10] Gao L, Wang J, Wang Y, *et al.* SR protein 9G8 modulates splicing of tau exon 10 *via* its proximal downstream intron, a clustering region for frontotemporal dementia mutations. *Mol Cell Neurosci*, 2007, **34**(1): 48-58.
- [11] Kanopka A, Muhlemann O, Peterson-Mahrt S, *et al.* Regulation of adenovirus alternative RNA splicing by dephosphorylation of SR proteins. *Nature*, 1998, **393**(6681): 185-187
- [12] Swartz J E, Bor Y C, Misawa Y, *et al.* The shuttling SR protein 9G8 plays a role in translation of unspliced mRNA containing a constitutive transport element. *J Biol Chem*, 2007, **282** (27): 19844-19853
- [13] Gong C X, Liu F, Grundke-Iqbal I, *et al.* Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, 2005, **112**(6): 813-838
- [14] Hernández F, Pérez M, Lucas J J, *et al.* Glycogen synthase kinase-3 plays a crucial role in tau exon 10 splicing and intranuclear distribution of SC35. Implications for Alzheimer's disease. *J Biol Chem*. 2004, **279**(5): 3801-3806
- [15] Shi J, Zhang T, Zhou C, *et al.* Increased dosage of Dyrk1A alters alternative splicing factor (ASF)-regulated alternative splicing of tau in Down syndrome. *J Biol Chem*, 2008, **283**(42): 28660-28669
- [16] Fei Liu, Khalid Iqbal, Inge Grundke-Iqbal, *et al.* Involvement of aberrant glycosylation in phosphorylation of tau by cdk5 and GSK-3 β . *FEBS Letters*, 2002, **530**(1-3): 209-214
- [17] 刘 飞, 施建华, 丁绍红, 等. 糖元合成酶激酶 3 β (GSK-3 β)对微

- 管相关蛋白 tau 的磷酸化作用. 生物化学与生物物理进展, 2007, **34**(9): 945-951
- Liu F, Shi J H, Ding S H, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2007, **34**(9): 945-951
- [18] Gui J F, Tronchère H, Chandler S D, *et al.* Purification and characterization of a kinase specific for the serine- and arginine-rich pre-mRNA splicing factors. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, **91**(23): 10824-10828
- [19] Colwill K, Feng L L, Yeakley J M, *et al.* SRPK1 and Clk/Sty protein kinases show distinct substrate specificities for serine/arginine-rich splicing factors. J Biol Chem, 1996, **271**(40): 24569-24575

GSK-3 β Modulates 9G8-mediated Alternative Splicing of Tau Exon 10*

DING Shao-Hong^{1,3)**}, YIN Xiao-Min^{1,2)**}, SHI Jian-Hua^{1,2)}, QIAN Wei^{1,2)}, LIU FEI^{1,2)***}

⁽¹⁾ Jiangsu Key Laboratory of Neuroregeneration, Nantong University, Nantong 226001, China;

⁽²⁾ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical School, Nantong University, Nantong 226001, China;

⁽³⁾ School of Public Health, Nantong University, Nantong 226007, China)

Abstract Alternative splicing of tau exon 10 generates tau isoforms with 3 or 4 microtubule-binding repeats. In normal adult human brain, approximately equal levels of 3R-tau and 4R-tau are expressed, which is required for maintaining normal brain functions. 9G8, one member of SR protein family, is involved in the splicing of many genes. The function of 9G8 is highly regulated by the phosphorylation. It was reported that GSK-3 β regulates the alternative splicing of tau exon 10. Mini-tau gene were used to study the regulation of 9G8 on tau exon 10 splicing and the effect of GSK-3 β on 9G8-mediated tau exon 10 splicing. It was found that 9G8 inhibited the inclusion of tau exon 10. GSK-3 β phosphorylated 9G8 *in vitro* and interacted with 9G8. Overexpression of GSK-3 β inhibited 9G8-mediated tau exon 10 inclusion.

Key words 9G8, glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), tau, alternative splicing

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00528

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30770468, 30801202) and The Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK2009159).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-513-85051813, E-mail: feiliu63@hotmail.com

Received: September 8, 2009 Accepted: December 10, 2009