

## Molekulare Medizin

# Live Cell Imaging zeigt, wie Tau den axonalen Transport ausbremst

CHRISTIAN CONZE<sup>1</sup>, NATALIYA I. TRUSHINA<sup>1</sup>, ROLAND BRANDT<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>ABTEILUNG NEUROBIOLOGIE, UNIVERSITÄT OSNABRÜCK

<sup>2</sup>CENTER FOR CELLULAR NANOANALYTICS, UNIVERSITÄT OSNABRÜCK

<sup>3</sup>INSTITUT FÜR KOGNITIONSWISSENSCHAFTEN, UNIVERSITÄT OSNABRÜCK

**Tau is a cytoskeletal protein that regulates microtubule polymerization in the axon. In diseases such as Alzheimer's disease, tau forms insoluble aggregates in the somatodendritic compartment. How tau regulates microtubule assembly without disrupting axonal transport and how tau dysfunction contributes to disease remains unclear. Here, we show how live cell imaging and super-resolution microscopy can help solve key questions about the physiological and pathological role of tau.**

DOI: 10.1007/s12268-023-1958-z

© Die Autorinnen und Autoren 2023

Das Tau-Protein, die *tubulin associated unit*, ist ein neuronales Protein, das in gesunden Nervenzellen vor allem im längsten Nervenzellausläufer, dem Axon angereichert ist. Es kommt in verschiedenen Isoformen vor, die von einem Gen codiert werden, das evolutionär durch Genduplikation bei der Entstehung von Wirbeltieren entstanden ist und dessen Genprodukte durch alternatives Spleißen variiert werden [1]. Der carboxyterminale Teil von Tau ist evolutionär konserviert und enthält die Mikrotubuli-bindende Region (**Abb. 1A**). Der aminoterminaler Teil enthält IDRs (*intrinsically disordered regions*), die eine hohe Bindungspromiskuität aufweisen und an verschiedenen Signal- und Regulationsprozessen beteiligt sind [2].

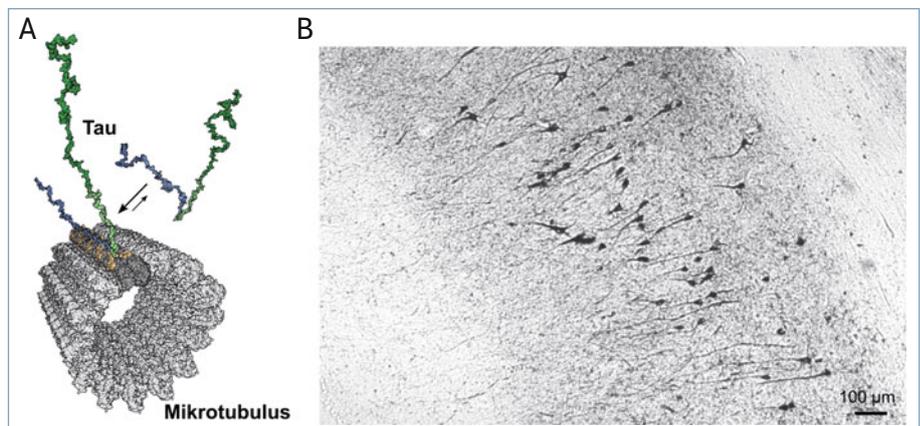
Mehrere neurodegenerative Erkrankungen, die Tauopathien, sind durch die Bildung von unlöslichen Aggregaten des Tau-Proteins mit einer veränderten Phosphorylierung charakterisiert (**Abb. 1B**). Die häufigste Tauopathie ist die Alzheimer-Krankheit, bei der die Tau-Pathologie von der Bildung extrazellulärer Amyloidplaques begleitet ist [3]. Bei der Aggregation werden Beta-Faltblatt-Strukturen in der Mikrotubuli-Bindungsregion von Tau gebildet, was dann über lösliche Zwischenstufen zur Bildung hochgeordneter Filamente führt. Die Entwicklung der Tau-

Pathologie korreliert mit dem Absterben von Nervenzellen in den betroffenen Hirnregionen, sodass vermutlich die Bildung der Tau-Aggregate oder löslicher Zwischenstufen die Degeneration einleitet. Daher ist das Tau-Protein seit einiger Zeit Ziel therapeutischer Interventionen, auch wenn noch kein entsprechendes Medikament auf dem Markt ist [4]. Welche Veränderungen von Tau aber

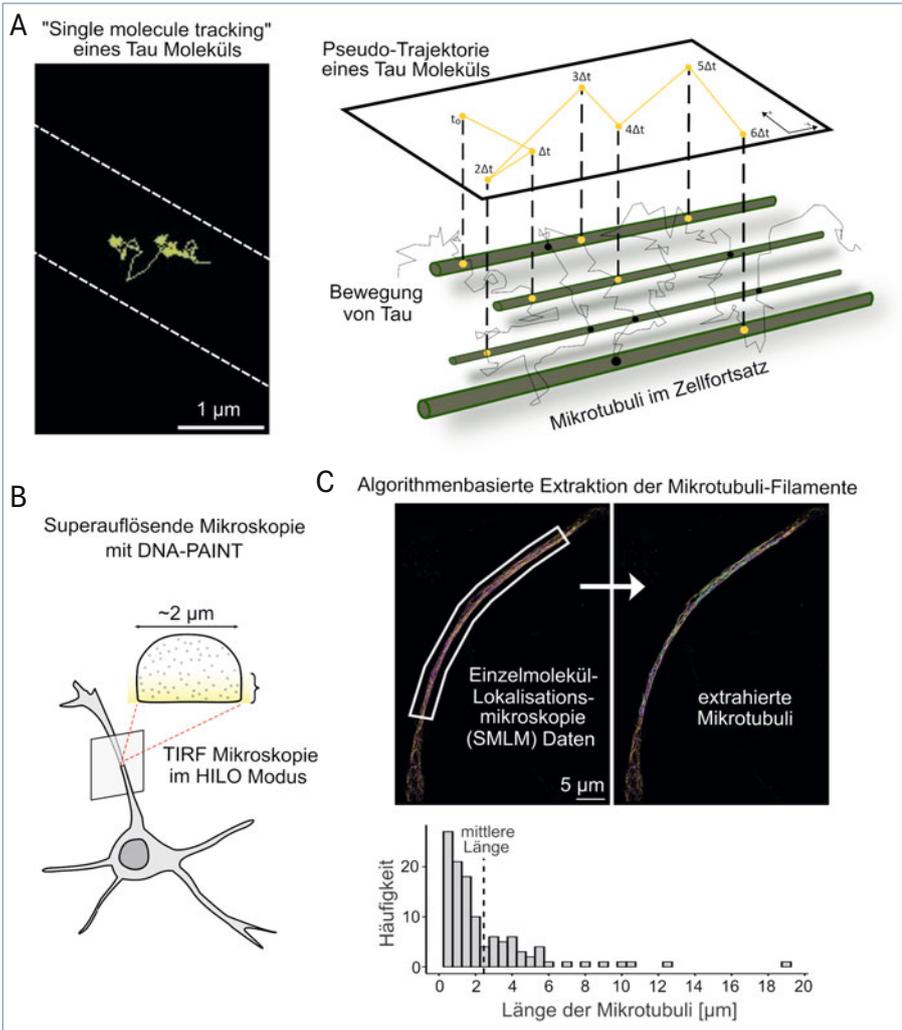
dazu führen, dass ein lösliches Protein aggregiert und toxisch wird, ist unklar. Vermutlich spielen posttranslationale Veränderungen eine entscheidende Rolle und es ist bekannt, dass einige Tau-Modifikationen mit dem Altern oder dem Beginn der Tau-Pathologie korrelieren. Dazu gehören eine verstärkte Phosphorylierung an bestimmten Positionen (Hyperphosphorylierung) und ein proteolytischer Abbau, der zu toxischen Tau-Fragmenten führen kann. Der Schlüssel zu einem Verständnis der Prozesse, die zum Entstehen der Krankheit beitragen, liegt jedoch zunächst darin, die Funktion von Tau in gesunden Nervenzellen zu verstehen.

### Regulation der Organisation axonaler Mikrotubuli durch *kiss-und-hop*-Interaktion

Die Rolle von Tau in Nervenzellen ist durch das Auftreten zweier Paradoxien gekennzeichnet. Es wird häufig angenommen, dass Tau für die Stabilisierung der Mikrotubuli im Axon verantwortlich ist. Im Verlauf der Erkrankung käme es dann zu einem Funktionsverlust durch die Aggregation von Tau, die Mikrotubuli zerfallen und die Nervenzellen sterben ab. Im Gegensatz dazu



▲ **Abb. 1:** Tau und Tauopathien. **A**, Schema der Tau-Mikrotubuli-Interaktion. Die 3D-Strukturen sind mit PyMOL ([www.pymol.org](http://www.pymol.org)) visualisiert, wie früher beschrieben [2]. Taus carboxyterminaler Teil mit der Mikrotubuli-bindenden Region ist blau gezeigt, der aminoterminaler Teil grün. **B**, Teil der Großhirnrinde eines Alzheimer-Patienten, gefärbt mit einem phosphorylierungsabhängigen Antikörper gegen Tau (AT8-Antikörper). Die dunkle Farbe zeigt, dass falsch phosphoryliertes Tau im somatodendritischen Kompartiment vieler Nervenzellen angereichert ist.



▲ **Abb. 2:** Tau und Mikrotubuli im Neuriten. **A,** Einzelmolekülverfolgung eines Tau-Moleküls in einem Neuriten und Schema der *kiss-and-hop*-Interaktion von Tau mit dem axonalen Mikrotubuli-Bündel. **B,** Schema der suprauflösenden Mikroskopie von Mikrotubuli in Neuriten; der Schräg- oder HILO (*highly inclined and laminated optical sheet*)-Modus erlaubt eine tiefere Bildgebung in der Zelle. **C,** Algorithmenbasierte Extraktion von Mikrotubuli aus Einzelmolekül-Lokalisierungsdaten und Histogramm von Mikrotubuli-Längen. Für Einzelheiten zu den Daten siehe [8].

zeigen aber Knockout-Mäuse, die kein Tau mehr haben, oder Nervenzellen, bei denen Tau akut inaktiviert wurde, keine Auffälligkeiten, die auf eine größere Instabilität des axonalen Zellskeletts hindeuten.

Das zweite Paradoxon ist zellbiologischer Natur. Ein effektiver axonaler Transport, der vor allem an Mikrotubuli erfolgt, ist für die gesunde Funktion von Nervenzellen unerlässlich. Tau ist ein relativ häufiges Protein, das an der Oberfläche von Mikrotubuli bindet. Da die Bindungsstellen von Tau mit den Bindungsstellen von Kinesinen, den Motorproteinen, die für den axonalen Transport verantwortlich sind, überlappen, würde man erwarten, dass Tau den axonalen Transport negativ beeinflusst. Jedoch verändert weder eine Überexpression noch das Fehlen von

Tau die axonale Transportrate *in vivo* [5]. Um dieses Paradoxon aufzulösen, haben wir die Bindung einzelner Tau-Moleküle an axonale Mikrotubuli durch Einzelmolekülverfolgung analysiert. Dazu markierten wir einzelne Tau-Moleküle, die wir als Fusion mit einem HaloTag in Nervenzellen exprimierten, mit einem Fluoreszenzfarbstoff (TMR-HTL) und verfolgten ihre Bewegung in einer dünnen Zellschicht mit einem TIRF (*total internal reflection fluorescence*)-Mikroskop mit hoher zeitlicher Auflösung. Zu unserer Überraschung fanden wir, dass ein einzelnes Tau-Molekül nur sehr kurz mit einer Bindungsstelle auf einem axonalen Mikrotubulus interagiert, bevor es zur nächsten Bindungsstelle springt (**Abb. 2A**). Im Schnitt dauerte ein Bindungsereignis nur etwa 40 Millise-

kunden, weshalb wir dieses Verhalten als *kiss-and-hop* bezeichnet haben [6]. Obwohl die überwiegende Mehrheit der Tau-Population zu jedem Zeitpunkt an Mikrotubuli gebunden ist (in quantitativen Photoaktivierungsstudien konnten wir die Bindung von mehr als 80 Prozent des Tau-Proteins nachweisen [7]), bindet jedes einzelne Molekül also nur für einen sehr kurzen Zeitraum. Es stellte sich nun die Frage, ob diese kurze Interaktion von Tau ausreicht, um die Mikrotubuli-Polymerisation zu regulieren.

Neuronale Zellausläufer sind dicht mit Mikrotubuli gefüllt, die aber nicht kontinuierlich den gesamten Zellfortsatz durchspannen, sondern als vergleichsweise kurze Fragmente in Bündeln vorliegen. Allerdings liegt der Abstand der einzelnen Mikrotubuli weit unter der Auflösungsgrenze klassischer lichtmikroskopischer Verfahren. Wir haben daher eine suprauflösende Mikroskopiermethode unter Anwendung der DNA-PAINT-Technik (*points accumulation for imaging in nanoscale topography*) eingesetzt, um die Verteilung der Mikrotubuli in den Ausläufern quantitativ zu bestimmen (**Abb. 2B**). Die Grundidee besteht darin, dass die Mikrotubuli mit Nanobodies markiert werden, an die wiederum kurze Oligonukleotidstränge gebunden sind. Eine transiente Hybridisierung wird genutzt, um frei diffundierende, farbstoffmarkierte Oligonukleotidstränge an die Nanobodies zu binden. Damit sind theoretisch unbegrenzte Bildgebungszyklen möglich, sodass viele Photonen von einer einzigen Position gesammelt und somit eine sehr hohe Lokalisierungsgenauigkeit von unter zehn Nanometern erreicht werden kann. In einem zweiten Schritt können dann die Mikrotubuli-Filamente algorithmenbasiert extrahiert und ihre Längenverteilung bestimmt werden (**Abb. 2C**). Mit dieser Methode fanden wir heraus, dass die Mikrotubuli in den Zellfortsätzen eine mittlere Länge von etwa 2,4 µm haben [8]. Es stehen also viele Mikrotubuli-Enden für eine lokale Polymerisation in den Zellausläufern zur Verfügung.

Um die Wirkung von Tau auf die Mikrotubuli-Polymerisation zu bestimmen, quantifizierten wir die Menge an polymerisiertem Tubulin in den Neuriten lebender Modellneuronen unter Verwendung eines FDAP (*fluorescence decay after photoactivation*)-Ansatzes. Dazu koexprimierten wir Tau oder ein Kontrollprotein zusammen mit  $\alpha$ -Tubulin, das wir mit einem photoaktivierbaren GFP-Konstrukt (PAGFP) fusioniert hatten. Nach

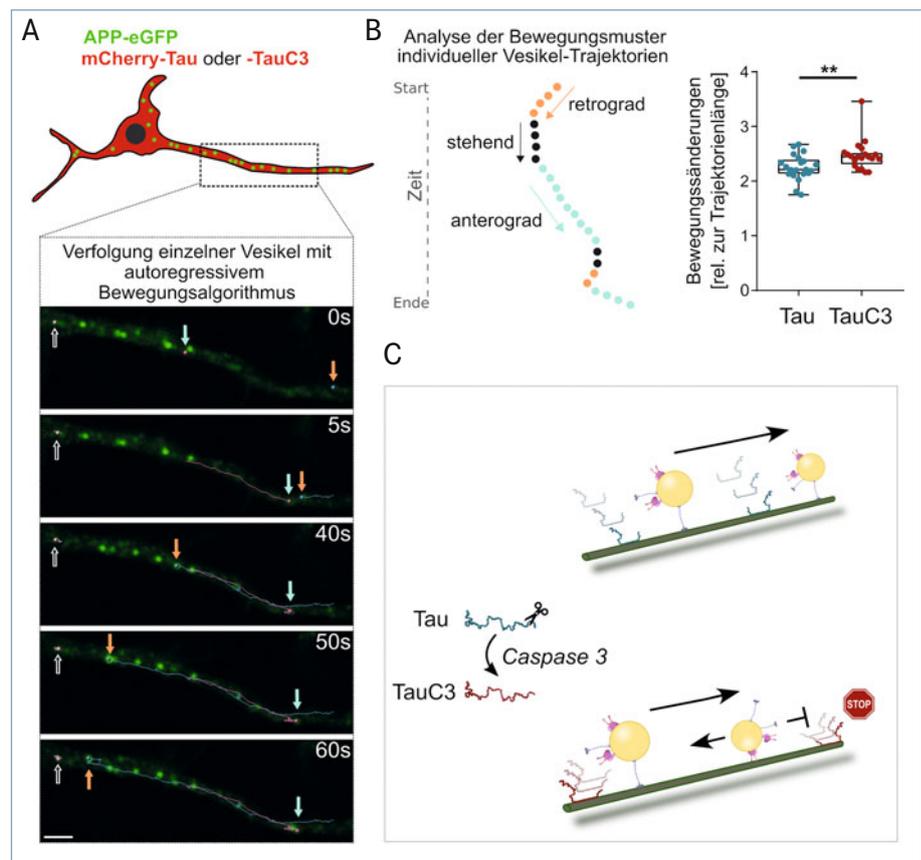
fokaler Aktivierung der Fluoreszenz mit einem konventionellen Laserscannmikroskop bestimmten wir den zeitlichen Fluoreszenzabfall und modellierten die FDAP-Kurven mit einem Reaktions-Diffusions-Modell [9]. Tatsächlich zeigte sich, dass Tau die Mikrotubuli-Polymerisation in den Zellfortsätzen signifikant um etwa zehn Prozent erhöhte. Somit bindet Tau kurz genug, um den Transport nicht zu behindern, und lange genug, um die Polymerisation der Mikrotubuli lokal zu regulieren.

### Wie Tau den axonalen Transport ausbremst

Wenn die Hypothese richtig ist, dass Tau einen effektiven axonalen Transport nicht stört, weil es nur für eine sehr kurze Zeit an Mikrotubuli bindet, dann sollten Bedingungen, die zu einer verlängerten Bindung führen, einen negativen Einfluss haben. Wir untersuchten daher systematisch den Einfluss der carboxyterminalen Sequenz von Tau auf die Regulation der Mikrotubuli-Bindung. Bemerkenswerterweise führte die Verkürzung des äußersten C-Terminus außerhalb der Mikrotubuli-Bindungsregion zu einer verstärkten Interaktion von Tau mit Mikrotubuli [10].

Eine Spaltung von Tau in diesem Bereich könnte daher pathologische Folgen haben. Tatsächlich wurde zuvor eine proteolytische Spaltung am carboxyterminalen Ende von Tau beschrieben, die ein um 20 Aminosäuren verkürztes Tau-Molekül erzeugt. Die Spaltung erfolgt durch Caspase-3, die beim programmierten Zelltod, also der Apoptose, aktiviert wird, aber auch nicht apoptotische Funktionen hat. Wir konnten zeigen, dass dieses verkürzte Tau-Fragment, TauC3, vermehrt im Hippocampus alternder Mäuse gebildet wird und auch im Gehirn von Alzheimer-Patienten erhöht ist [11].

Wie wirkt sich nun diese Verkürzung auf die Bindung von Tau an Mikrotubuli aus? Auch dafür haben wir FDAP-Experimente durchgeführt, diesmal mit Tau, das wir mit PAGFP fusioniert hatten. Die Bestimmung der effektiven Diffusionskonstanten aus den FDAP-Kurven zeigte, dass die C-terminale Verkürzung das Bindungsgleichgewicht zwischen freiem und an Mikrotubuli gebundenem Tau nicht beeinflusste. Allerdings waren die Bindungskonstanten ( $k_{on}^*$  - und  $k_{off}$ -Raten) für TauC3 im Vergleich zu ungespaltenem Tau drastisch reduziert. Die Bestimmung der Bindung einzelner Tau-Moleküle an axonale Mikrotubuli durch Einzelmolekül-



▲ **Abb. 3:** Wie pathologisches Tau den axonalen Transport ausbremst. **A**, Algorithmusbasierte Verfolgung einzelner Vesikel in einem Neuriten in Gegenwart von Tau oder dem C-terminal verkürzten TauC3. Um die Vesikel sichtbar zu machen, wurde eGFP-markiertes APP mit mCherry-markiertem Tau koexprimiert. Die Bewegung beispielhafter Vesikel ist durch Pfeile markiert. Maßstab 10  $\mu$ m. **B**, Analyse und Quantifizierung der Bewegungsmuster einzelner Vesikel im Neuriten. Links ist die beispielhafte Bewegung eines einzelnen Vesikels in einem Zellausläufer in retrograder (zum Zellkörper hin) oder anterograder Richtung (vom Zellkörper weg) dargestellt. **C**, Schema, wie die Verkürzung von Tau den axonalen Transport beeinträchtigt und Bewegungsänderungen induziert. Die altersabhängige Tau-Spaltung führt dazu, dass TauC3 weniger dynamisch mit axonalen Mikrotubuli interagiert und den Vesikeltransport ausbremst, da das Tau-Fragment häufiger im Weg steht und eine Richtungsänderung der Vesikelbewegung induziert. Für Einzelheiten zu den Daten siehe [8].

verfolgung bestätigte, dass die Verweildauer von Tau an einer einzelnen Bindungsstelle signifikant erhöht war. Im Schnitt war Tau 50 Prozent länger gebunden.

Wie wirkt sich nun die verlängerte Bindung von Tau an Mikrotubuli auf den Transport aus? Wir untersuchten dazu den Einfluss des verkürzten Tau-Proteins auf den Vesikeltransport. Dazu versahen wir APP (*amyloid precursor protein*), ein Schlüsselprotein, das im Axon transportiert wird, mit einem Fluoreszenzmarker und koexprimierten Tau oder das verkürzte Tau-Fragment (TauC3) in den Modellneuronen (**Abb. 3A**). Die Bewegung einzelner markierter Vesikel in den Zellfortsätzen verfolgten wir dann mit einem autoregressiven Bewegungsalgorithmus nach schneller Bildaufnahme mit einem Spinning-Disk-Mikroskop. TauC3 beeinflusst

weder den Anteil der transportierten Vesikel, noch änderte es ihre Geschwindigkeit. Allerdings war die Prozessivität des Transports der APP-Vesikel in TauC3-exprimierenden Zellen im Vergleich zu Zellen, die Tau in voller Länge exprimierten, signifikant reduziert. Die Analyse des Bewegungsmusters der einzelnen Trajektorien ergab eine höhere Häufigkeit von Bewegungsänderungen, sodass dadurch die Effektivität des Transports deutlich beeinträchtigt war (**Abb. 3B**).

### Von der Beschreibung zur Intervention

Die Ergebnisse zeigen somit, dass eine altersabhängige Zunahme der Tau-Spaltung durch Caspase-3 eine Tau-Spezies erzeugt, die weniger dynamisch ist und den axonalen Transport ausbremst (**Abb. 3C**). Nun wäre es

gut, die Methodik der quantitativen Lebendzellmikroskopie auch zu nutzen, um Strategien für eine Intervention zu entwickeln. In den letzten Jahren sind Mikrotubuli ein Ziel potenzieller therapeutischer Interventionen bei verschiedenen Krankheiten geworden. Eine bereits klinisch erprobte Substanzgruppe sind die niedermolekularen Mikrotubuli-Stabilisatoren der Epothilon-Familie [12]. Epothilone wirken ähnlich wie das in der Krebstherapie eingesetzte Paclitaxel, das die Depolymerisation der Mikrotubuli in der Mitosespindel stört und so die Zellteilung hemmt. Im Gegensatz zu Paclitaxel können die Epothilone jedoch die Blut-Hirn-Schranke passieren und somit auch im Gehirn wirken und der Destabilisierung axonaler Mikrotubuli bei neurodegenerativen Erkrankungen entgegenwirken. Wir haben getestet, ob das Epothilon-Derivat EpoD die Interaktion von Tau mit Mikrotubuli beeinflusst. Tatsächlich haben wir festgestellt, dass niedrige nanomolare Konzentrationen von EpoD die Interaktion von TauC3 mit den Mikrotubuli in den Zellausläufern weitgehend normalisieren. Das war ein sehr ermutigendes Ergebnis. Allerdings beeinflusste EpoD den Vesikeltransport negativ, vermutlich indem es strukturelle Änderungen an den Mikrotubuli induzierte, die den Transport beeinträchtigten.

Dennoch zeigen die Experimente, dass die quantitative Lebendzellmikroskopie zur Bestimmung der Dynamik des neuronalen Cytoskeletts und der Effizienz des axonalen Transports ein vielversprechender methodischer Ansatz ist, um pathologische Veränderungen des Cytoskeletts zu erkennen und potenziell therapeutisch wirkende Substanzen zu identifizieren. Gefragt sind nun Substanzen, die pathologisch veränderte Interaktionen von Cytoskelettkomponenten normalisieren, aber gleichzeitig physiologische Transportprozesse nicht beeinflussen. ■

## Literatur

[1] Trushina NI, Bakota L, Mulikidjanian AY, Brandt R (2019) The Evolution of Tau Phosphorylation and Interactions. *Front Aging Neurosci* 11: 256

[2] Brandt R, Trushina NI, Bakota L (2020) Much More Than a Cytoskeletal Protein: Physiological and Pathological Functions of the Non-microtubule Binding Region of Tau. *Front Neurol* 11: 590059

[3] Arendt T, Stieler JT, Holzer M (2016) Tau and tauopathies. *Brain Res Bull* 126: 238–292

[4] Bakota L, Brandt T (2016) Tau Biology and Tau-Directed Therapies for Alzheimer's Disease. *Drugs* 76: 301–313

[5] Yuan A, Kumar A, Peterhoff C et al. (2008) Axonal transport rates in vivo are unaffected by tau deletion or overexpression in mice. *J Neurosci* 28: 1682–1687

[6] Janning D, Igaev M, Sündermann F et al. (2014) Single-molecule tracking of tau reveals fast kiss-and-hop interaction with microtubules in living neurons. *Mol Biol Cell* 25: 3541–3551

[7] Weissmann C, Reyher HJ, Gauthier A et al. (2009) Microtubule binding and trapping at the tip of neurites regulate tau motion in living neurons. *Traffic* 10: 1655–1668

[8] Conze C, Trushina NI, Holtmannspötter M et al. (2022) Super-resolution imaging and quantitative analysis of microtubule arrays in model neurons show that epothilone D increases the density but decreases the length and straightness of microtubules in axon-like processes. *Brain Res Bull* 190: 234–243

[9] Igaev M, Janning D, Sündermann F et al. (2014) A refined reaction-diffusion model of tau-microtubule dynamics and its application in FDAP analysis. *Biophys J* 10: 2567–2578

[10] Niewidok B, Igaev M, Sündermann F et al. (2016) Presence of a carboxy-terminal pseudorepeat and disease-like pseudohyperphosphorylation critically influence tau's interaction with microtubules in axon-like processes. *Mol Biol Cell* 27: 3537–3549

[11] Conze C, Rierola M, Trushina NI et al. (2022) Caspase-cleaved tau is senescence-associated and induces a toxic gain of function by putting a brake on axonal transport. *Mol Psychiatry* 27: 3010–3023

[12] Soliman A, Bakota L, Brandt R (2022) Microtubule-modulating Agents in the Fight Against Neurodegeneration: Will it ever Work? *Curr Neuropharmacol* 20: 782–798

**Funding note:** Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.  
**Open Access:** Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

## Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Roland Brandt  
 Abteilung Neurobiologie der Universität  
 Osnabrück  
 Barbarastraße 11  
 D-49076 Osnabrück  
 robrandt@uni-osnabrueck.de

## AUTORINNEN UND AUTOREN



### Christian Conze

Bachelor- und Masterstudium der Biotechnologie an der FH Aachen mit Abschlussarbeiten 2013 und 2016 am Fraunhofer-Institut für Lasertechnik in Aachen sowie am Fraunhofer IME-ScreeningPort in Hamburg. 2016–2022 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Osnabrück in der Abteilung Neurobiologie und anschließender Promotion. Seit 2022 tätig als Lichtmikroskopie-Spezialist am Leibniz-Institut für Virologie (LIV) in Hamburg.



### Nataliya I. Trushina

2012–2018 Diplomstudium („Specialist programme“) in Biotechnik und Bioinformatik an der Lomonossow-Universität Moskau, Russland. 2018–2021 Stipendiatin im internationalen Graduiertenkolleg „EvoCell – Zelluläre Mechanismen der evolutionären Innovation“. Seit 2018 Doktorandin in der Abteilung Neurobiologie an der Universität Osnabrück mit Schwerpunkt Neurobiologie und Bioinformatik.



### Roland Brandt

Biochemie- und Philosophiestudium an den Universitäten Tübingen und Berlin. 1990 Promotion am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin. 1990–1994 Post-Doc am Center for Neurologic Diseases (CND), Harvard Medical School, Boston. 1994–2002 Gruppenleiter am Interdisziplinären Zentrum für Neurowissenschaft (IZN) der Universität Heidelberg. Seit 2002 Professor für Neurobiologie und Leiter der Abteilung Neurobiologie an der Universität Osnabrück.