

Luiza Stanaszek
Zakład Neurobiologii Naprawczej
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. M. Mossakowskiego PAN

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Regulacja procesu endogennej neurogenezy po ischemii mózgu: udział metaloproteinaz w przekazywaniu sygnałów z macierzy zewnątrzkomórkowej

Promotor: Prof. dr hab. Teresa Zalewska

Wyniki badań eksperymentalnych ostatnich dwudziestu lat wskazują na aktywację procesów neurogenezy w niektórych stanach patologicznych ośrodkowego układu nerwowego. Podwyższoną aktywność proliferacyjną komórek macierzystych/progenitorowych w strefach neurogennych mózgu - w warstwie komórek podziarnistych (SGZ) zakrętu zębatego oraz w okolicy komór bocznych (SVZ), ich migrację do uszkodzonych struktur mózgowia i różnicowanie do odpowiednich fenotypów zaobserwowano w różnych modelach niedokrwienia. Można zatem przypuszczać, że w niektórych sytuacjach środowisko dojrzałego mózgu prezentuje permissywny charakter indukując aktywację neurogenezy. Mechanizmy molekularne odpowiedzialne za pobudzenie endogennych komórek macierzystych/progenitorowych nie zostały jak dotąd w pełni zdefiniowane. Intensywne badania procesów neurogenezy w czasie rozwoju embrionalnego wskazują, że podstawowym mechanizmem sterującym procesami proliferacji, migracji i różnicowania komórek progenitorowych są czynniki otaczającego środowiska, w którym kluczową rolę wydają się pełnić białka macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, ang. extracellular matrix) i ich receptory. Przejście komórki macierzystej na kolejne etapy rozwoju zależy prawdopodobnie od zmiany struktury ECM, głównie na drodze proteolizy jej elementów białkowych. Za proteolityczne przemodelowanie macierzy zewnątrzkomórkowej w ośrodkowym układzie nerwowym odpowiadają głównie dwie metaloproteinazy należące do grupy żelatynaz – metaloproteinaza 2 (MMP-2) i metaloproteinaza 9 (MMP-9). Aktywacja tych enzymów prowadzi do zmian oddziaływania pomiędzy komórkami a białkami macierzy.

Zgodnie z takim założeniem, ścisła interakcja komórka-ECM mogłaby promować proliferację, natomiast osłabienie czy inhibicja wzajemnych oddziaływań byłaby sygnałem inicjującym migrację nowych komórek do miejsc przeznaczenia. Konsekwencją procesu proteolizy jest zmiana stopnia interakcji na linii komórka-ECM, modulacja wewnątrzkomórkowego szlaku przekazywania sygnałów i w końcu podjęcie decyzji o przejściu komórki macierzystej na kolejne etapy rozwoju. Zagadnienie roli sygnału z macierzy zewnątrzkomórkowej w procesach neurogenezy w dojrzałym mózgu nie było dotychczas przedmiotem badań. Natomiast wyjaśnienie tego problemu może umożliwić poznanie jednego z narzędzi kontroli nad ekspansją *in situ*, co w perspektywie czasu może przyspieszyć wprowadzenie terapii regeneracyjnej przez stymulację naturalnej repopulacji uszkodzonych komórek.

Celem prezentowanej rozprawy było określenie udziału przekazywania sygnału z macierzy zewnątrzkomórkowej w procesach neurogenezy endogennej po niedokrwieniu przodomózgowia dorosłych myszokoczków mongolskich.

Badania prowadzono na modelu krótkotrwałego (5 minut) całkowitego niedokrwienia przodomózgowia myszokoczka mongolskiego, które indukuje wybiórcze uszkodzenie neuronów piramidowych rejonu CA1 hipokampa, przy zachowaniu niezmienionej struktury zakrętu zębatego. W toku realizacji celu pracy określono *ex vivo* stopień neurogenezy w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego w różnym czasie reperfuzji po niedokrwieniu oraz aktywność metaloproteinaz – metaloproteinazy 2 i metaloproteinazy 9. Zbadano także wpływ inhibitorów metaloproteinaz na proliferację i różnicowanie komórek linii HUCB-NSC. Ostatni etap pracy obejmował określenie ekspresji i aktywności kinaz (FAK, PYK2, Src, ERK, JNK, Akt) uczestniczących w przekazywaniu sygnału z macierzy zewnątrzkomórkowej. Oznaczenia te wykonano zarówno w układzie *ex vivo* w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego jak i w komórkach linii HUCB-NSC.

Badania *ex vivo* prowadzono na dwóch fragmentach hipokampa, różniących się odpowiedzią na epizod niedokrwienności – fragmencie grzbietowym (ze strukturą CA1) i brzuszny (z zakrętem zębatym).

Proliferację komórek określano stopniem wbudowania 5-bromo-2-deoksyurydyny (BrdU) do DNA podczas jego replikacji w fazie S cyklu komórkowego. Fenotyp komórek identyfikowano immunohistochemicznie przy zastosowaniu specyficznych przeciwciał.

Aktywność metaloproteinaz oznaczano metodą zymografii *in situ*. Dla oznaczenia aktywności i ekspresji kinaz komórkowych zastosowano metodę Western blot.

Otrzymane wyniki wskazują na znaczącą stymulację proliferacji progenitorów neuralnych w SGZ zakrętu zębatego. Po upływie 2-4 tygodni od momentu niedokrwienia nowe komórki (wyznakowane BrdU) przemieszczają się do warstwy komórek ziarnistych i przekształcają w dojrzałe neurony. W przeciwieństwie do znaczącej stymulacji endogennej neurogenezy w zakręcie zębatym, w uszkodzonej w wyniku niedokrwienia warstwie piramidowej CA1 liczba komórek wbudowujących BrdU była niewiele wyższa w porównaniu z kontrolą. W pewnej ich liczbie obecne było nawet białko NF-200, pojawiające się na wczesnym etapie rozwoju neuronu. Niestety, komórki te nie przekształcały się w neurony dojrzałe, ulegając prawdopodobnie programowanej śmierci poprzedzającej ich dalszy rozwój. W toku prowadzonych badań nie znaleziono także, oczekiwanego przez autorkę pracy, dowodu przemieszczenia komórek progenitorowych z neurogennej strefy SGZ do uszkodzonej w wyniku niedokrwienia warstwy neuronów piramidowych. Zatem spodziewana zdolność kompensacji utraconych neuronów przez endogenne progenitory w opisanych warunkach eksperymentalnych wydaje się być iluzją.

Jedną z bardziej interesujących obserwacji jest wyraźna różnica poziomu aktywności metaloproteinaz w badanych strukturach hipokampa. Stymulacji rozwoju neuralnych komórek macierzystych w zakręcie zębatym po niedokrwieniu przodomózgowia towarzyszy wyraźny wzrost aktywności MMPs. Taki czasowo-przestrzenny związek pomiędzy aktywacją metaloproteinaz a przyspieszoną proliferacją komórek macierzystych/progenitorowych i ich późniejszym różnicowaniem do dojrzałych neuronów może sugerować istnienie przyczynowego związku pomiędzy tymi procesami. Za słuszością tej sugestii przemawiają wyniki eksperymentów wykonanych na hodowli komórek linii HUCB-NSC w obecności inhibitora metaloproteinaz – SB-3CT. Obecność inhibitora redukowała stopień proliferacji komórek oraz ich różnicowania w kierunku neuronów. W tym samym eksperymencie notowano, w porównaniu z kontrolą, wzrost liczby oligodendrocytów i astrocytów, wynikający prawdopodobnie ze wzrostu proliferacji. O roli MMPs świadczy również brak wpływu na proces neurogenezy inhibitorów proteinaz serynowych i furyny.

Zmiany aktywności badanych metaloproteinaz we fragmencie grzbietowym przebiegają według innego wzorca. Podczas gdy aktywność proteolityczna tych enzymów spada poniżej poziomu kontroli w warstwie uszkodzonych neuronów piramidowych, w *stratum oriens* i *stratum radiatum* notuje się wyraźny wzrost aktywności.

Logicznym ciągiem prowadzonych badań było sprawdzenie, czy i w jaki sposób opisane wyżej różnice aktywności metaloproteinaz modulują wewnątrzkomórkowy szlak przekazu z ECM. W tym celu określono aktywność/fosforylację dwóch kinaz tyrozynowych: kinazy FAK i kinazy PYK2, będących pierwszymi odbiorcami sygnału z macierzy zewnątrzkomórkowej, oraz ich potencjalnych substratów – kinazy Src, ERK, JNK i Akt. Wyniki uzyskane w toku badań wskazują na spadek fosforylacji kinazy FAK wyłącznie w zakręcie zębatym. Odpowiedź kinazy koreluje ze wzrostem aktywności metaloproteinaz. Można założyć, że obniżenie fosforylacji enzymu zmniejsza stopień adhezji do macierzy zewnątrzkomórkowej i ułatwia migrację komórek do strefy ziarnistej DG. Obniżenie fosforylacji kinazy PYK2 we fragmencie grzbietowym hipokampa przy zachowaniu stałego poziomu kinazy FAK wskazuje, że obie kinazy mają odmienne własności funkcjonalne pomimo wysokiej homologii. Konsekwencją obniżenia aktywności obu kinaz jest redukcja fosforylacji kinazy ERK, końcowego substratu obu enzymów. Na podstawie braku specyficzności odpowiedzi kinazy ERK trudno stwierdzić jej zaangażowanie w neurogenezę niedokrwioną.

Pomimo istniejących danych wskazujących na udział w regulacji proliferacji PI3/Akt i przeżycia neuralnych komórek macierzystych/progenitorowych w mózgu dojrzałym, nie odbiegający od kontroli poziom aktywacji/fosforylacji kinazy Akt jak i JNK stawia pod znakiem zapytania udział tych enzymów jako czynników krytycznych odpowiedzialnych za stymulację neurogenezy niedokrwiennej w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego. Należy jednak mieć na uwadze fakt, że strefa neurogenna zakrętu zębatego stanowi jedynie niewielką część objętości badanego fragmentu brzuszno-tyłowego hipokampa a heterogenne populacje komórek tej struktury mogą dawać niejednoznaczne odpowiedzi w warunkach eksperymentu.

Opisane badania *ex vivo* nad udziałem kinaz białkowych zostały powtórzone w modelu eksperymentalnym *in vitro* z zastosowaniem hodowli linii komórek HUCB-NSC. Odnotowany znaczący wzrost ufosforylowania kinazy FAK oraz ekspresji białka kinazy w czasie intensywnej proliferacji i różnicowania komórek HUCB-NSC może wskazywać na zaangażowanie enzymu w proces neurogenezy w tym układzie doświadczalnym. Obniżenie poziomu fosforylacji w komórkach traktowanych inhibitorem metaloproteinaz – SB-3CT koreluje z redukcją dynamiki podziałów komórkowych. Obecna w komórkach HUCB-NSC kinaza PYK2 prezentuje stały poziom przez cały czas prowadzonego eksperymentu i nie wydaje się pełnić roli w dojrzewaniu komórek HUCB-NSC. Podobnie kinazy MAP (ERK i JNK) oraz kinaza Akt od początku do końca eksperymentu (4-14 dni) pozostawały aktywne,

prezentując stały poziom fosforylacji i nie ulegały modulacji w warunkach wzrostu aktywności kinazy FAK. Na tle podwyższonej aktywności katalitycznej i ekspresji białka FAK zaskakuje brak zmian aktywności jej substratów, które w tym układzie nie wydają się być związane z przekazem sygnału na ścieżce ECM–integryna–FAK. Dowodem pośrednim może być także brak wpływu inhibitora metaloproteinaz.

Na podstawie tych danych nie jest możliwe wyjaśnienie roli aktywacji kinazy FAK w czasie proliferacji i różnicowania. Związanie liganda zewnątrzkomórkowego przez receptor integrynowy i aktywacja kinazy umożliwia przyłączenie około 50 białek sygnałowych i strukturalnych, które potencjalnie mogą być włączone w neurogenezę. Dodatkową trudność w określeniu roli kinazy kontaktów adhezyjnych stanowi fakt, że pośredniczy ona w dwukierunkowym przenoszeniu sygnału. Podczas gdy sygnały z zewnątrz kierują zmianą organizacji cytoszkieletu i jądrową ekspresją genów, białka sygnałowe przenoszące sygnał z wnętrza komórki wpływają na budowę ECM oraz na zachowanie sąsiednich komórek i tkanek. Nie wiemy czy i który kierunek przekazu sygnału jest uprzywilejowany w określonych warunkach doświadczalnych.

Uzyskane wyniki pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

- Całkowite niedokrwienie mózgu myszokoczka mongolskiego stymuluje neurogenezę w strefie podziarnistej (SGZ) zakrętu zębatego hipokampa.
- Czasowo-przestrzenna korelacja procesu neurogenety i aktywności metaloproteinaz w zakręcie zębatym wskazuje na zaangażowanie tych enzymów w rozwój komórek macierzystych/progenitorowych.
- Poniedokrwienna stymulacja neurogenety endogennej nie zapewnia repopulacji uszkodzonych komórek nerwowych sektora CA1 hipokampa.
- Aktywność metaloproteinaz w strukturach CA1 - *stratum oriens i radiatum* może być związana z procesami przemodelowania tkanki.
- Na podstawie uzyskanych wyników nie można jednoznacznie określić udziału badanych kinaz białkowych - przekaźników sygnału z macierzy zewnątrzkomórkowej, w neurogenety poniedokrwiennej w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego.