05 KWI. 2016

mgr Eliza Zimoląg
Zakład Biologii Komórki WBBiB UJ

Promotor:
prof. dr hab. Zbigniew Madeja

„Rola endogennego pola elektrycznego w ukierunkowanej migracji mezenchymalnych komórek macierzystych w procesie gojenia rany"

Gojenie rany jest wieloetapowym procesem, w którego przebieg zaangażowane są m.in. komórki skóry, komórki układu odpornościowego oraz komórki budujące naczynia krwionośne. Coraz więcej danych wskazuje, że również mezenchymalne komórki macierzyste mogą być mobilizowane ze szpiku do miejsca zranienia i uczestniczyć w procesie gojenia przez różnicowanie w komórki skóry lub wydzielanie cytokin i czynników wzrostu. Skoordynowanie poszczególnych etapów gojenia wymaga aktywnej migracji komórek w obrębie rany oraz obecności różnych czynników naprowadzających, takich jak cytokiny, czynniki wzrostu oraz białka macierzy zewnątrzkomórkowej. Istotną rolę w naprowadzaniu komórek w miejsce zranienia mogą pełnić również endogenne pola elektryczne prądu stałego o słabym natężeniu (50-200 mV/mm) tworzące się w skórze w wyniku zaniku potencjału transepitelialnego. Wiele typów komórek po umieszczeniu w polu elektrycznym wykazuje wzmożoną, ukierunkowaną aktywność migracyjną zwaną elektrotaksją (lub galwanotaksją). W przeważającej większości komórki migrują w kierunku katody, której położenie odpowiada loży rany. Chociaż zjawisko elektrotaksji znane jest już od końca XIX wieku wciąż nie zostały w pełni poznane mechanizmy leżące u jego podstaw. W poniższej pracy zbadano wpływ pola elektrycznego na migrację mysich komórek pochodzenia szpikowego oraz przeanalizowano jego rolę jako potencjalnego czynnika rekrutującego komórki pochodzenia szpikowego do miejsca zranienia.

Wykazano, że adherentna frakcja komórek mysiego szpiku kostnego (BMAC) składa się z dwóch populacji komórek migrujących w polu elektrycznym w zakresie 100 – 300 mV/mm w przeciwnych kierunkach: jedna populacja nazwana A-BMAC migruje do anody, druga (K-BMAC) do katody. Obie populacje komórek wykazują najwyższą kierunkowość ruchu przy natężeniu pola 300 mV/mm. Komórki obu populacji zostały z powodzeniem rozdzielone przy zastosowaniu fluorescencyjnie aktywowanego sortera komórkowego względem obecności antygenu CD45. W toku dalszych badań komórki A-BMAC scharakteryzowano jako rezydujące w szpiku kostnym makrofagi, natomiast komórki K-BMAC jako mezenchymalne komórki macierzyste pochodzenia szpikowego.

Analiza zaangażowania wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału w reakcję obu populacji komórek na pole elektryczne wykazała istotne różnice pomiędzy komórkami A-BMAC i K-BMAC. Elektrotaksja komórek A-BMAC wydaje się w większym stopniu zależeć od małych białek G z

rodziny Rho. Natomiast, szczególnie w początkowych etapach reakcji, w komórkach K-BMAC istotną rolę pełni 3-kinaza fosfatydyloinozytolu i kompleks Arp2/3. Pomimo obserwowanego wzrostu fosforylacji kinazy Erk1/2 pod wpływem pola elektrycznego w obu populacjach komórek, farmakologiczne zahamowanie ścieżki ERK nie prowadziło do obniżenia kierunkowości ruchu komórek. Ponadto, tylko w komórkach A-BMAC pole elektryczne wywołuje polaryzację centrum organizacji mikrotubul od strony anody, a depolimeryzacja mikrotubul z zastosowaniem kolchicyny zdecydowanie obniża kierunkowość ruchu tych komórek. Chociaż hamowanie ścieżek sygnałowych wykazało różnice w ich zaangażowaniu w kierunkową odpowiedź obu populacji komórek szpikowych na pole elektryczne, to zastosowane inhibitory powodowały jedynie częściowe obniżenie kierunkowości ruchu komórek.

Zanalizowano również udział białek błonowych w elektrotaksji komórek K-BMAC i A-BMAC. W obu populacjach zahamowanie napływu jonów przez zależne od naprężenia kanały jonowe nie przyniosło zniesienia kierunkowości migracji. Na podstawie różnicowej analizy proteomicznej komórek A-BMAC i K-BMAC wytypowano do przebadania błonowe białka receptorowe opisywane, jako zaangażowane w odpowiedź elektrotaktyczną komórek. W wyniku tych doświadczeń stwierdzono, że w elektrotaksji komórek K-BMAC nie biorą udziału takie białka jak: IGF1R, PDGFRβ, Fzd. Pomimo spolaryzowanego rozkładu receptora EGF w komórkach K-BMAC umieszczonych w polu jego zahamowanie także nie zniosło reakcji elektrotaktycznej komórek. Co interesujące, analiza prędkości nawrotu komórek po zamianie położenia elektrod względem komórki wykazała, że pierwsze zmiany w polaryzacji komórki zachodzą już po 30 sekundach, a całkowita repolaryzacja następuje po 5 (komórki A-BMAC) lub 10 (komórki K-BMAC) minutach.

Podsumowując, pole elektryczne prądu stałego może stanowić istotny czynnik naprowadzający w procesie gojenia oddziałujący również na komórki przedostające się do rany z krwiobiegu w momencie zranienia, jak np. mezenchymalne komórki macierzyste pochodzenia szpikowego. Chociaż proponowanych jest kilka mechanizmów odbierania przez komórkę informacji o kierunku ruchu w polu elektrycznym szybkość, z jaką zachodzi ta reakcja wskazuje, że nie są one związane z przemieszczaniem receptorów w dwuwarstwie lipidowej na drodze elektroforezy lub elektroosmozy. Obserwowane różnice dotyczące wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału wydają się wynikać raczej z różnic w organizacji cytoszkieletu pomiędzy badanymi komórkami, a nie różnic związanych z kierunkiem ich ruchu w polu elektrycznym.