2 / LIS. 2017

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Tytuł: Rola dokomórkowych prostowniczych kanałów potasowych Kir w elektrotaksji fibroblastów Swiss 3T3

Autor: mgr Sławomir Lasota

Endogenne pola elektryczne odgrywają istotną rolę w przebiegu wielu ważnych procesów biologicznych, takich jak embriogeneza, gojenie ran i regeneracja tkanek. Jednym z najważniejszych, odpowiedzialnych za to zjawisk jest elektrotaksja, czyli zdolność do kierunkowej migracji komórek w polu elektrycznym. Ukierunkowany ruch komórek w procesie elektrotaksji opiera się na skoordynowanej aktywacji wielu ścieżek sygnalizacyjnych, typowych dla kierunkowej migracji wywołanej innymi bodźcami fizycznymi lub chemicznymi. Jednakże, dotychczas nie poznano nadrzędnego mechanizmu detekcji pola elektrycznego przez migrujące komórki.

W ramach niniejszej pracy doktorskiej badano mechanizmy odpowiadające za reakcję elektrotaktyczną mysich fibroblastów Swiss 3T3. W toku badań scharakteryzowano ich odpowiedź na pole o różnym natężeniu i zbadano dynamikę reakcji, zarówno na pierwotną aplikację pola, jak i zamianę jego biegunów. Wyniki przeprowadzonych badań potwierdziły, że fibroblasty wykazują silną tendencję do ruchu w kierunku katody w polu elektrycznym o natężeniu zbliżonym do występujących naturalnie endogennych pól elektrycznych (1 V/cm). Wykazano, że reakcja komórek na pole jest stosunkowo szybka (rzędu 1-2 min od zadziałania pola). Obserwacja ta wskazywała, że w badanym modelu trudno jest tłumaczyć mechanizm reakcji jedynie przez wywołaną działaniem pola elektrycznego polaryzacją rozkładu białek błonowych, np. receptorów dla chemoatraktantów. Ponieważ alternatywnym mechanizmem reakcji na pola elektryczne jest aktywacja błonowych kanałów jonowych, bazując na ostatnich doniesieniach literaturowych, zbadano wpływ aktywności dokomórkowych prostowniczych kanałów potasowych Kir na reakcję elektrotaktyczną komórek Swiss 3T3. Kanały te są odpowiedzialne za utrzymanie potencjału błonowego na odpowiednim poziomie, co szczególnie dobrze scharakteryzowano w funkcjonowaniu układu nerwowego. Jednakże, obecność tych kanałów wykazano również w błonach komórkowych licznych innych komórek organizmów wyższych, w tym także badanych komórkach, co potwierdzono w pracy. Wykazano,

że zahamowanie aktywności kanałów Kir i zahamowanie ekspresji podjednostki Kir4.2 obniża znacznie zdolność do elektrotaksji komórek Swiss 3T3 oraz wywiera wpływ na jej kinetykę. Podobny efekt otrzymano wpływając na poziom wewnątrzkomórkowych poliamin oraz jonów Mg2+, fizjologicznych regulatorów aktywności kanałów Kir.

Ponieważ analiza kinetyki reakcji komórek 3T3 pozwoliła stwierdzić, że po 1-2 min od zmiany kierunku pola elektrycznego można już zaobserwować reakcję komórki polegającą na skurczu komórki od strony anody i indukcji tworzenia wypustek od strony katody, w kolejnych doświadczeniach podjęto próbę określenia mechanizmów indukcji tych zjawisk. Analiza mechanizmów leżących u podstaw generowania skurczu komórki od strony anody wykazała, że jest on uzależniony od aktywacji miozyny II (spadek wartości kosinusa kierunkowego do 38% kontroli po zadziałaniu blebbistatyny). Co ciekawe, zahamowanie aktywności kinazy MLCK (głównego aktywatora miozyny II) nie powodowało obniżenia reakcji kierunkowej w polu elektrycznym. Obserwacja ta została potwierdzona wykazaniem niewielkiej zależności elektrotaksji komórek 3T3 od obecności jonów wapnia (głównego aktywatora MLCK). Wartość kosinusa kierunkowego w pożywce bez jonów wapnia, w obecności EGTA oraz w obecności BAPTA wynosiła odpowiednio 78, 70 i 86% kontroli. Nie stwierdzono również zmian w poziomie wewnątrzkomórkowych jonów wapnia pod wpływem pola elektrycznego. Obserwacje te wydają się potwierdzać doniesienia literaturowe wskazujące, że nie we wszystkich modelach obecność jonów wapnia jest niezbędna dla wydajnej elektrotaksji. Alternatywnym mechanizmem komórkowym związanym z generowaniem skurczu jest aktywacja miozyny II przez zależną od białek Rho kinazę ROCK. Spadek kierunkowości do 51% kontroli po zahamowaniu kinazy ROCK poprzez działanie inhibitora Y-27632 wskazuje, że w badanym modelu ten mechanizm może być związany z indukowaniem skurczu od strony anody. Ciekawą obserwacją było jednak stwierdzenie, że zahamowanie białek Rho nie powoduje obniżenia wydajności reakcji elektrotaktycznej komórek 3T3. Również nie stwierdzono aktywacji białek Rho pod wpływem pola elektrycznego, ani metodą G-LISA, ani badając aktywację biosensora RhoA (RhoA-FLARE.sc) działającego w oparciu o zjawisko FRET. Wskazuje to na konieczność poszukiwania alternatywnych mechanizmów aktywacji kinazy ROCK w procesie elektrotaksji.

W celu określenia mechanizmów związanych z indukcją tworzenia wypustek migracyjnych od strony katody zobrazowano dynamikę cytoszkieletu aktynowego,

wykorzystując mikroskopię fluorescencyjną całkowitego wewnętrznego odbicia (TIRFM) i komórki Swiss 3T3 wykazujące ekspresję białka LifeAct-GFP. Stwierdzono znaczne obniżenie kierunkowości ruchu (spadek cos kierunkowego do 48% kontroli) na skutek zahamowania aktywności białka Rac1, co sugeruje jego istotną rolę w indukowaniu powstających wypustek po stronie katody. Podobnego efektu nie obserwowano w przypadku zahamowania aktywności formin, kompleksu Arp2/3 czy innego z małych białek G z rodzin Rho, białka Cdc42.

Podsumowując, w przedstawionej pracy stwierdzono, że fibroblasty wykazują silną reakcję elektrotaktyczną, która charakteryzuje się dużą dynamiką i jest zależna od aktywności dokomórkowych prostowniczych kanałów potasowych Kir. Obserwowana w przebiegu reakcji indukcja skurczu komórki związana jest z aktywacją miozyny II za pośrednictwem kinazy ROCK. Natomiast obserwowana równolegle aktywacja tworzenia lamellipodiów jest uzależniona od aktywacji białek Rac.