

Neurytogeneza komórek PC12-Tet-On warunkowana indukowaną ekspresją genów kodujących warianty receptorowej kinazy tyrozynowej TrkC

Neurotrofiny stanowią grupę białek warunkujących wzrost, przeżycie i prawidłowy rozwój komórek nerwowych. Neurotrofinami są NGF (nerwowy czynnik wzrostu), BDNF (czynnik wzrostu pochodzenia mózgowego), NT3 (neurotrofina 3) i NT4 (neurotrofina 4/5), które wiążą się z wysokim powinowactwem do receptorowych kinaz tyrozynowych rodziny Trk. NGF jest ligandem dla TrkA, BDNF i NT4 dla TrkB, natomiast NT3 dla TrkC. NT3 może łączyć się z mniejszym powinowactwem także z TrkA i TrkB. W ośrodkowym układzie nerwowym powszechnie jest występowanie TrkB i TrkC na tych samych komórkach nerwowych, co uzasadnia poszukiwanie różnic w swoistości receptorów neurotrofin. Białka Trk zawierają domenę zewnątrzkomórkową warunkującą odpowiednie związanie liganda, domenę trans-membranową oraz domenę cytoplazmatyczną, zawierającą rdzeń kinazy tyrozynowej i sekwencje regulatorowe. Trk występuje w formie dimera i połączenie neurotrofiny z receptorem prowadzi do zmiany konformacji w domenach cytoplazmatycznych, które umożliwiają wzajemną fosforylację reszt tyrozyn w domenach cytoplazmatycznych. Skutkuje to utworzeniem miejsc przyłączenia (ang. docking sites) dla cytoplazmatycznych białek adaptorowych i enzymu fosfolipazy $C\gamma 1$ (PLC $\gamma 1$), zawierających domeny PTB i SH2, uruchamiających wewnątrzkomórkowe kaskady sygnałowe, takie jak szlaki sygnałowe Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt oraz PLC $\gamma 1$ prowadzącą do powstania wtórnych przekaźników sygnału. Warunkiem niezbędnym do fosforylacji i aktywacji PLC $\gamma 1$ przez Trk jest rekrutacja PLC $\gamma 1$ do fosforylowanej reszty tyrozyny w regionie C-końcowym Trk. Celem sprawdzenia, czy różnica tylko dwóch reszt aminokwasowych w regionach C-końcowych TrkB i TrkC, a ściślej w pozycjach -3 (S/T) i -1 (V/I) bezpośrednio przed miejscem przyłączenia PLC $\gamma 1$ do receptora jest wystarczająca do wywołania zróżnicowanego wzrostu neurytów po aktywacji receptorów, a także znaczenia reszty tyrozyny w miejscu rekrutacji PLC $\gamma 1$ do TrkC, metodami ukierunkowanej mutagenyzy otrzymano następujące warianty TrkC: typu dzikiego; z substytucjami T817S I819V przed miejscem wiązania PLC $\gamma 1$ (z C-końcem takim jak w TrkB); z substytucją Y820F (z inaktywowanym miejscem wiązania PLC $\gamma 1$).

Celem badań było wyjaśnienie znaczenia sekwencji regulatorowych w C-końcu TrkC w procesie neurytogenezy pobudzanej przez TrkC: miejsca wiązania PLC $\gamma 1$ oraz sekwencji bezpośrednio poprzedzającej miejsce wiązania PLC $\gamma 1$.

Wyprowadzono i scharakteryzowano klonów komórek PC12-Tet-On, stabilnie transfekowane genami *trkC* znajdującymi się pod kontrolą transkrypcyjną promotora tetracyklinowego. Transkrypcję genu kodującego pożądaną wariant TrkC w klonach potwierdzono przez sekwencjonowanie. Wykazano zależność ekspresji genu *trkC* od stężenia doksycykliny, która w systemie Tet-On indukuje ekspresję genów znajdujących się pod kontrolą promotora tetracyklinowego. Na powierzchni komórek potwierdzono obecność białka TrkC oczekiwanej wielkości. Wykazano fosforylację kinaz białkowych ERK1/2 w następstwie pobudzenia egzogennej TrkC przez neurotrofinę 3. Kinetyka fosforylacji ERK1/2 była podobna w badanych klonach, co jest zgodne z wynikami wcześniejszych badań innych autorów. Wyniki własnych badań wskazują na tendencję do wyższego poziomu fosforylacji ERK1/2 w klonach z wariantami TrkC zdolnymi do rekrutacji PLC $\gamma 1$ niż w klonach z wariantem TrkC Y820F.

Proces neurytogenezy (czyli tworzenia struktur neuryto-podobnych) zachodził w otrzymanych klonach komórek PC12-Tet-On w następstwie pobudzenia przez neurotrofinę 3 komórek zawierających TrkC typu dzikiego. Traktowanie neurotrofiną 3 nie indukowało neurytogenezy lub jej poziom był

bardzo niski w komórkach zawierających TrkC Y820F, co wskazuje na znaczenie reszty tyrozyny w miejscu wiązania PLC γ 1 dla procesu neurytogenezy. Wykazano statystycznie istotną tendencję do mocniej pobudzonej przez neurotrofinę 3 neurytogenezy komórek klonu zawierającego wariant TrkC T817S I819V w porównaniu z klonem zawierającym TrkC typu dzikiego. Wskazuje to, że dla pobudzanego przez neurotrofiny wytwarzania struktur neuryto-podobnych, oprócz kluczowej reszty tyrozyny w miejscu przyłączenia PLC γ 1 do receptora neurotrofiny, znaczenie mają także reszty aminokwasów w regionie C-końcowym TrkC znajdujące się poza właściwym miejscem rekrutacji PLC γ 1.

Podsumowując, zarówno miejsce dokowania PLC γ 1 w regionie C-końcowym TrkC, jak i reszty aminokwasowe bezpośrednio je poprzedzające, są znaczące dla pobudzanego przez TrkC wzrostu neurytów w komórkach PC12-Tet-On.