



Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda
Polskiej Akademii Nauk
Laboratorium Immunobiologii Mikrobiomu

ROZPRAWA DOKTORSKA

Paweł Krawczyk

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

Neurite outgrowth in PC12-Tet-On cells
induced by the variants of receptor tyrosine kinase TrkC

promotor: Dr hab. Janusz Matuszyk

Wrocław 2022

Część wyników zawarta w rozprawie została opublikowana w:

1. Publikacje oryginalne

Krawczyk P., Twaróg E., Kurowska E., Kłopotowska D., Matuszyk J.:
“*Establishment of a cellular model to study TrkC- dependent neuritogenesis*”;
In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal (w druku). **IF 2013: 1.00**

2. Publikacje pogładowe

Krawczyk P., Matuszyk J.: „*Mechanizm aktywacji fosfolipazy C γ 1*”; Postępy Higieny
i Medycyny Doświadczalnej; 2011; 65: 470-477. **IF 2013: 0,633**

Praca finansowana przez grant N N401 063636 pt. „Rola fosfolipazy C w indukcji neurytogenezy przez receptorową kinazę tyrozynową TrkC. Badania *in vitro*”.

Spis treści

Wykaz ważniejszych stosowanych skrótów:.....	5
1. Wstęp.....	6
2. Założenia i cel pracy.....	32
3. Materiały i Metody.....	33
3.1. Materiały.....	33
3.1.1. Linie komórkowe.....	33
3.1.2. Wektory.....	33
3.1.3. Inne materiały.....	34
3.1.4. Odczynniki.....	35
3.1.5. Bufory.....	37
3.1.6. Źele.....	38
3.1.7. Sekwencje oligonukleotydów.....	38
3.1.8. Aparatura.....	38
3.2. Metody.....	40
3.2.1. Hodowle komórkowe.....	40
3.2.2. Plazmidy systemu tetracyklinowego.....	40
3.2.3. Transfekcja.....	41
3.2.3.1. Stabilna transfekcja komórek PC12-Tet-On.....	41
3.2.3.2. Przejściowa transfekcja komórek stabilnych transfektantów PC12-Tet-On za pomocą plazmidów zawierających gen reporterowy lucyferazy świetlika.....	41
3.2.4. Cytometria przepływowa.....	41
3.2.5. Izolacja RNA.....	42
3.2.6. Reakcja odwrotnej transkrypcji- RT.....	42
3.2.7. Reakcja PCR.....	42
3.2.8. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR).....	43
3.2.9. Pomiar stężenia RNA oraz DNA.....	43
3.2.10. Western Blot.....	43
3.2.11. Analiza DLR.....	44
3.2.12. Mikroskopia fluorescencyjna.....	45
3.2.13. Pomiar długości neurytów z zastosowaniem mikroskopu świetlnego z kontrastem fazowym.....	45
3.2.14. Statystyka.....	46
4. Wyniki.....	47

4.1. Otrzymanie stabilnych transfektantów komórek PC12-Tet-On	47
4.2. Potwierdzenie obecności funkcjonalnego receptora TrkC na powierzchni stabilnych transfektantów komórek PC12-Tet-On	54
4.3. Poziom ekspresji receptorów TrkA i p75 ^{NTR} w stabilnych transfektantach komórek PC12-Tet-On	59
4.4. Wpływ stężenia doksycykliny na ekspresję TrkC w stabilnych transfektantach komórek PC12-Tet-On	60
4.5. Analiza aktywacji kinaz białkowych ERK1/2 w komórkach stabilnych transfektantów TrkCwt 4.1	61
4.6. Analiza ekspresji TrkC, fosforylacji pTyr i wybranych kinaz białkowych.....	64
4.7. Próba określenia roli PLC γ 1 w aktywacji ERK1/2 na skutek aktywacji receptorowej kinazy tyrozynowej TrkC.....	70
4.8. Neurytogeneza stabilnych transfektantów komórek PC12-Tet-On.....	72
5. Dyskusja	79
5.1. Charakterystyka klonów komórek PC12-Tet-On z indukowaną przez Dox ekspresją TrkC typu dzikiego lub jego wariantów	81
5.2. Aktywacja kinaz białkowych przez warianty TrkC	81
5.3. NT3 pobudza zróżnicowaną neurytogenezę komórek klonów TrkC-Tet-On z różnymi wariantami TrkC.....	81
6. Wnioski	84
7. Streszczenie.....	85
8. Abstract	87
9. Piśmiennictwo	89
10. Spis rycin i tabel.....	96

Wykaz ważniejszych stosowanych skrótów:

PC12-Tet-On- linia komórkowa wyprowadzona z nowotworu rdzenia nadnerczy szczura, stabilnie transfekowana rtTA, umożliwia ekspresję genów w systemie tetracyklinowym typu Tet-On; **C2** – domena regulatorowa oddziałująca z błoną lipidową; **cSH2** – domena SH2 umiejscowiona w fosfolipazie C γ w kierunku C-końca w relacji do drugiej domeny SH2; **DAG** – diacyloglicerol; **EGF** – czynnik wzrostu naskórka (ang. epidermal growth factor); **EGFR** – receptor EGF; **GH** – hormon wzrostu (ang. growth hormone); **GHR** – receptor GH; **Grb2** – białko adaptorowe: białko 2 wiążące receptor czynnika wzrostu (ang. growth factor receptor-bound protein 2); **Gaq** – białko G oddziałujące z fosfolipazą C (ang. guanine nucleotide-binding protein); **Ins(1,4,5)P3** – trifosforan-1,4,5- inozytolu; **Jak2** – niereceptorowa kinaza tyrozynowa Janus (ang. Janus kinase 2); **NGF** – czynnik wzrostu nerwów (ang. nerve growth factor); **BDNF**- czynnik wzrostu pochodzenia mózgowego (ang. brain-derived neurotrophic factor) **NT3**- neurotrofina 3; **NT4**- neurotrofina 4; **Dox**- doksyicyklina; **RTK**- receptorowe kinazy tyrozynowe; **NRTK** – niereceptorowe kinazy tyrozynowe; **TrkA**- receptorowa kinaza tyrozynowa A; **TrkB**- receptorowa kinaza tyrozynowa B; **TrkC**- receptorowa kinaza tyrozynowa C; **nSH2** – domena SH2 umiejscowiona w fosfolipazie C γ w kierunku N-końca w relacji do drugiej domeny SH2; **PH** – domena wiążąca plekstrynę; **PI(3,4)P2** – difosforan-3,4-fosfatydyloinozytolu; **PI(3,4,5)P3** – trifosforan-3,4,5-inozytolu; **PI(4,5)P2** – difosforan-4,5-fosfatydyloinozytolu; **PI3K** – kinaza-3-fosfatydyloinozytolu; **PI3P** – fosforan-3-inozytolu; **PKA** – kinaza białkowa A; **PKC** – kinaza białkowa C; **PLC** – fosfolipaza C; **PLC γ 1** – fosfolipaza C γ 1; **PLC γ 2** – fosfolipaza C γ 2; **PO3-4** – reszta fosforanowa; **pTyr** – fosfotyrozyna; **Ras** – małe białko G; **SH2** – domena wiążąca reszty fosfotyrozyny (ang. Src homology 2); **SH3** – domena wiążąca sekwencje bogate w prolinę (ang. Src homology 3); **SHP-1** – fosfataza tyrozynowa 1C (PTP-1C); **SLP-76** – białko adaptorowe; **spPH** – rozdzielona domena regulatorowa PH w PLC γ 1; **Src** – niereceptorowa kinaza tyrozynowa Src; **Trk** – receptory o wysokim powinowactwie do neurotrofin; **XY** – domena katalityczna w fosfolipazie C; **MAPK**- kinazy aktywowane mitogenami (ang. mitogen-activated protein kinase); **ERK1/2** (ang. extracellular signal regulated kinase 1 and 2); **JNK 1-3** (ang. c-Jun N-terminal kinase 1 to 3); **TrkCwt** – plazmid pTRE-tight-trkC lub komórki PC12-Tet-On stabilnie transfekowane tym plazmidem; **TrkC820** – plazmid pTRE-tight-trkC-Y820F lub komórki PC12-Tet-On stabilnie transfekowane tym plazmidem; **TrkC817-819** – plazmid pTRE-tight-trkC-T817S/I819V lub komórki PC12-Tet-On stabilnie transfekowane tym plazmidem.

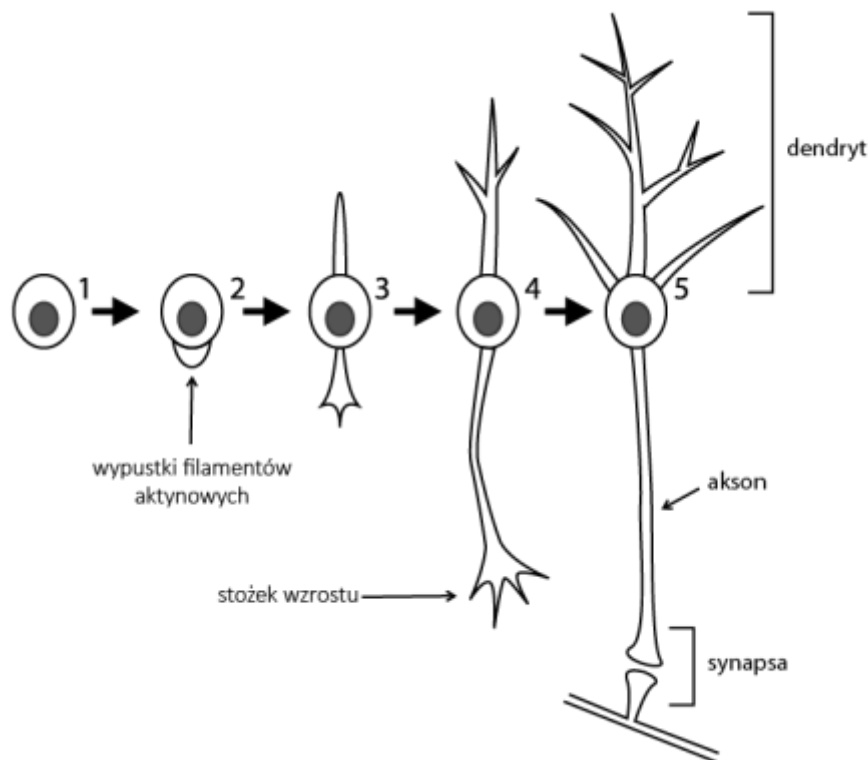
1. Wstęp

1.1. Neurytogeneza

Neurytogenezę definiuje się jako proces różnicowania neuronalnego i tworzenia wypustek nerwowych wyrastających z ciała komórki nerwowej. Mechanizm neurytogenezy polega głównie na rearanżacjach architektury cytoszkieletu, w których biorą udział mikrotubule oraz filamenty aktynowe (F-aktyna), a także na powiększeniu powierzchni błony komórkowej na drodze egzocytozy. [Tojima T., Ito E., 2004]. Nie została w pełni wyjaśniona natura prekursorów pęcherzyków błonowych w procesie zwiększania powierzchni plazmalemmy, natomiast wiadomo, że różnią się one od pęcherzyków transportujących neurotransmitery. Markerem dla omawianych struktur jest Ti-VAMP, który nie jest swoisty tylko dla prekursorowych pęcherzyków błonowych i występuje w takich organellach jak endosomy, czy lizosomy [D' Alessandro R. i współpr., 2010]. W procesie neurytogenezy możemy wyróżnić pięć stadiów:

- 1) Neuritogenesis (ang.)- etap inicjacji, czyli proces tworzenia małych wypustek aktynowych licznie wyrastających z ciała komórki;
- 2) Neurite outgrowth (ang.)- etap elongacji, czyli proces wydłużania się wypustek aktynowych;
- 3) Pathfinding (ang.)- odnajdywanie połączenia z komórką docelową oraz wytworzenie się struktury stożka wzrostu;
- 4) Targeting (ang.)- połączenie się z komórką docelową;
- 5) Synaptogenesis (ang.) proces wytworzenia połączeń synaptycznych.

Uproszczony schemat prezentujący zmiany morfologiczne w różnicującej się komórce nerwowej przedstawiono na **Ryc. 1**.



Ryc. 1. Zmiany morfologiczne w różnicującej się komórce nerwowej
(wg [Tojima T., Ito E., 2004])

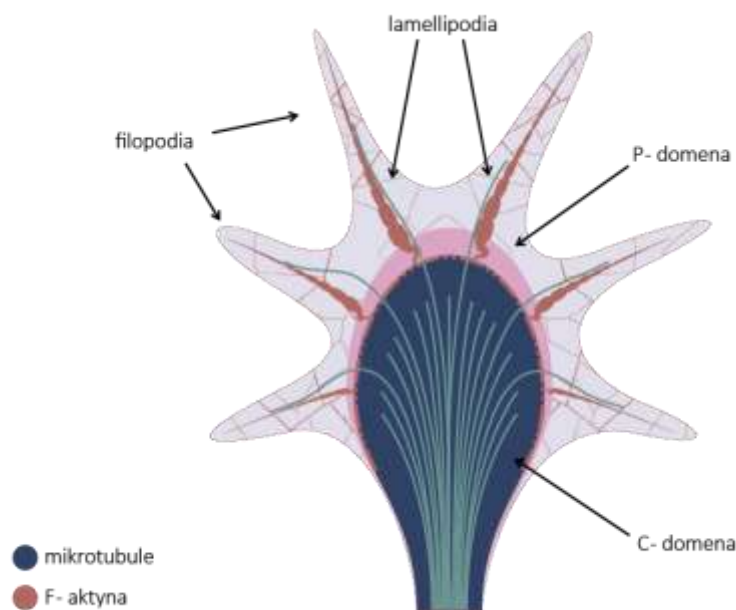
Struktura stożka wzrostu jest podzielona na dwie domeny:

- C-domena, zwana centralną, która zbudowana jest głównie z mikrotubul zorientowanych końcem + do domeny P;
- P-domena, zwana obwodową, którą tworzą filopodia i lamellipodia; jest zbudowana głównie z F-aktyny i odpowiada za motorykę stożka wzrostu.

Znajdujące się w obrębie P-domeny filopodia zbudowane są z dłuższych filamentów aktynowych „kolczasto” zakończonych i zorientowanych w kierunku przedniej krawędzi stożka wzrostu. Lamellipodia to z kolei przypadkowo ułożone fragmenty mniejszych filamentów aktynowych umiejscowionych pomiędzy filopodiami. Budowę stożka wzrostu przedstawiono na Ryc. 2. Montaż filamentów aktynowych zachodzi jedynie w części dystalnej filopodii i przedniej lamellipodii. Sieć uformowanych filamentów wydłuża się przy udziale miozyny w kierunku C-domeny, gdzie ulegają one demontażowi. W migracji stożka wzrostu uczestniczą także molekuly adhezyjne (ang. CAM; cell adhesion molecules), m.in. kadheryny i integryny, zaś montaż i demontaż sieci filamentów aktynowych zależy od białek wiążących aktyne, np. profiliny (montaż filamentów aktynowych filopodii) [Schluter K. i współprac., 1997], CapZ (zapobiega elongacji filamentów aktynowych) [Cooper J.A., Schafer D.A., 2000], czy gelsolina (wiąże się do F-aktyny i przecina ją na pół) [Burtneck L.D. i współprac., 2001]. Dotychczas opisano ponad 60 klas białek wiążących aktyne, które współdziałają z Rho GTP-azami, regulującymi proces neurytogenezy. Pozytywnymi regulatorami procesu neurytogenezy są Rho GTP-azy: Rac, Cdc42, zaś negatywnym regulatorem jest białko RhoA, które hamuje wzrost neurytów [Tojima T., Ito E., 2004]. Udział RhoA zależy od

stadium procesu neurytogenezy w jakim znajduje się komórka. W badaniach przeprowadzonych na komórkach PC12 [Seböck A., 1999] wykazano, że w fazie inicjacji RhoA hamuje proces wydłużania się neurytów podczas gdy jego inaktywacja promuje proces tworzenia się i wzrostu struktur neurytopodobnych.

W fazie elongacji i dalszych, gdy komórki ulegają różnicowaniu, RhoA przyspiesza wydłużanie neurytów, zaś jego inaktywacja spowalnia tempo neurytogenezy. W odniesieniu do regeneracji utraconych połączeń nerwowych aktywacja białka RhoA hamuje, zaś inaktywacja pobudza proces powstawania połączeń nerwowych.



Ryc. 2. Struktura stożka wzrostu

W procesie neurytogenezy powstaje *de novo* wiele białek, których synteza jest kontrolowana przez wtórne przekaźniki sygnału, np. cAMP lub wzrost poziomu Ca^{2+} . Wzrost poziomu Ca^{2+} w komórce powoduje modyfikację w dynamice tworzenia się filamentów aktynowych poprzez wpływ na formowanie się filopodiów, a tym samym stożka wzrostu i wydłużanie neurytów [Gomez T.M. i współprac., 2001].

W oparciu o badania przeprowadzone na neuralnej linii komórkowej NG108-15 (ang. clonal nerve cell line) [Tojima T., Ito E., 2004] opracowano szlak przekazywania sygnału w komórce w procesie neurytogenezy, który zaprezentowano na Ryc. 3.

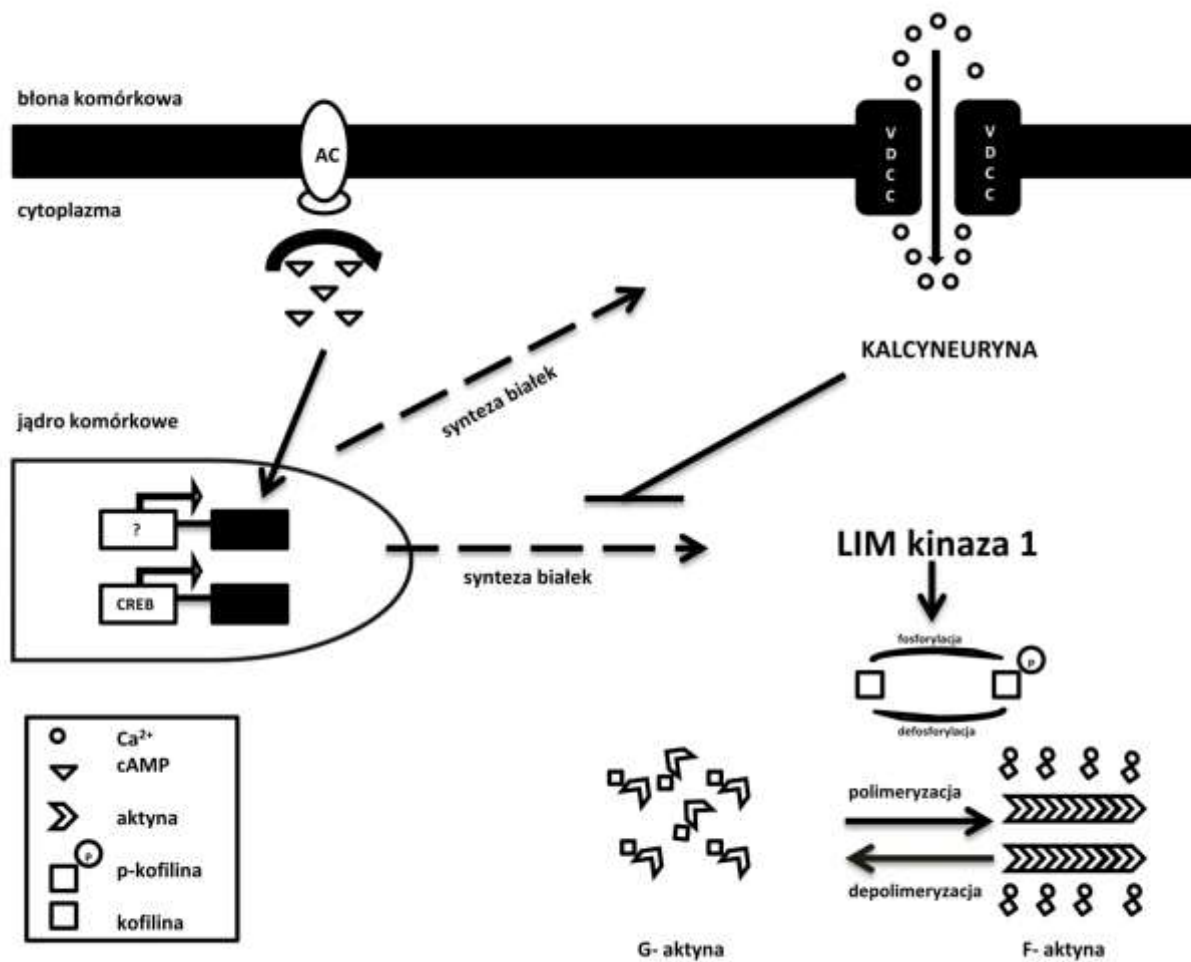
W następstwie aktywacji cyklicznej adenylanowej (AC) następuje wzrost stężenia cyklicznego AMP (cAMP) w komórce, który poprzez aktywację kinazy białkowej A (PKA) prowadzi do fosforylacji reszty seryny i aktywacji czynnika transkrypcyjnego CREB, co następnie prowadzi do uruchomienia dwóch niezależnych kaskad przekazywania sygnału:

- 1) wzrostu ekspresji LIM kinazy 1 (LIMK1), która fosforyluje kofilinę biorącą udział w polimeryzacji monomerów F-aktyny, a to z kolei prowadzi do indukcji neurytogenezy;

- 2) ekspresji kanałów wapniowych zależnych od napięcia (ang. VDCC; voltage-dependent Ca^{2+} channel), które negatywnie regulują ekspresję kinazy LIMK1. Poprzez VDCC jony Ca^{2+} dostają się do wnętrza komórki, aktywując kalcyneurynę, która jest silnym supresorem LIMK1. Obniżona aktywność LIMK1 skutkuje defosforylacją kofiliny, co prowadzi do depolimeryzacji F-aktyny i zahamowania procesu tworzenia się i wzrostu neurytów.

Jednym z ważniejszych czynników transkrypcyjnych w procesie neurytogenezy jest czynnik REST/NRSF (ang. RE1-Silencing Transcription factor (REST)/Neuron-Restrictive Silencer Factor (NRSF)), będący represorem genów neuronalnych w nieneuronalnych komórkach. Badania przeprowadzone na komórkach PC12 typu dzikiego *versus* PC12 z upośledzoną zdolnością do neurytogenezy wykazały, że komórki PC12, które nie tworzą neurytów charakteryzują się wysoką ekspresją REST. Ponadto wykazują one brak innych komponentów typowych dla różnicujących się komórek nerwowych, np. kanałów jonowych, receptorów, czy w ostateczności brakiem odpowiedzi na NGF [D' Alessandro R., 2008].

Do głównych markerów procesu neurytogenezy w komórkach PC12 należą: białko Gap-43 (ang. growth associated protein 43) i białko membrany presynaptycznej synapsyna I, która reguluje fuzję pęcherzyków synaptycznych i uwolnienie neurotransmiterów. Gap-43 może występować w formie fosforylowanej, jak i niefosforylowanej w mózgu i jest dystrybuowany w wydłużających się aksonach tworzących się neuronów. Jego występowanie udokumentowano również w strukturach stożków wzrostu wypustek wyrastających z neuronów. Gap-43 jest substratem dla kinazy białkowej C (PKC). W badaniach przeprowadzonych na komórkach PC12 zaobserwowano, że zahamowanie szlaku fosfolipazy $\text{C}\gamma 1$ (PLC $\gamma 1$) aktywowanego przez NGF powodowało obniżenie procesu tworzenia się i wzrostu neurytów poprzez zmniejszenie fosforylacji i aktywacji kinaz białkowych ERK1/2, co wpływało na ekspresję Gap-43 i synapsyny I. Zatem zmiany w ekspresji Gap-43 i synapsyny I korelują z różnicowaniem i neurytogenezą komórek PC12 [Das K.P. i współpr., 2004].



Ryc. 3. Proponowany szlak przekazywania sygnału w procesie neurytogenezy (wg [Tojima T., Ito E., 2004])

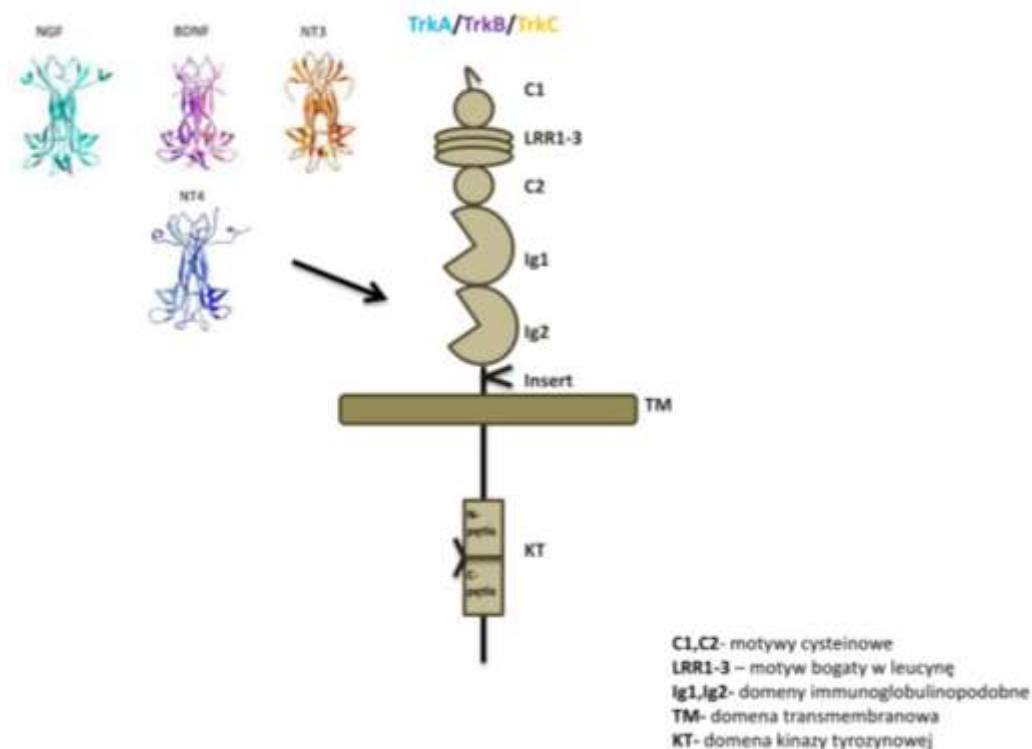
1.2. Receptorowe kinazy tyrozynowe

Procesy wyrastania wypustek z ciała komórki nerwowej są regulowane przez wiele czynników, w tym przez neurotrofiny i ich receptory: p75^{NTR} i receptorowe kinazy tyrozynowe rodziny Trk.

Receptorowe kinazy tyrozynowe (RTK) stanowią grupę białek zakotwiczonych w błonie komórkowej i są regulatorami kluczowych procesów zachodzących w komórce odpowiedzialnych za jej wzrost, różnicowanie, metabolizm, czy kontrolę cyklu komórkowego. Zaburzenia w funkcjonowaniu RTK są przyczyną powstawania zaburzeń i chorób, jak np. zapalenia, cukrzyca, arteriosklerozy, czy angiogenezy indukowanej przez nowotwór. Zidentyfikowano 58 rodzajów RTK u ludzi, które podzielono na 20 rodzin. Jedną z rodzin stanowią receptorowe kinazy tyrozynowe Trk, które są receptorami neurotrofin [Lemmon. M.A, Schlessinger J., 2010].

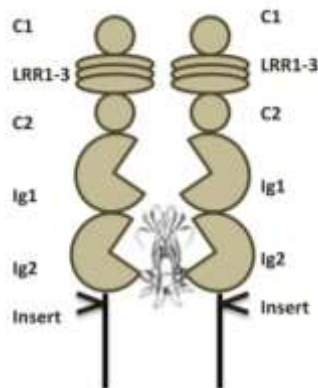
Receptory neurotrofin Trk (ang. tropomyosin-related kinases) uczestniczą w proliferacji i/lub różnicowaniu się komórek nerwowych. Do rodziny Trk należą: TrkA, który jest receptorem nerwowego czynnika wzrostu (NGF) i w mózgu występuje na neuronach cholinergicznym podstwy przodomózgowia; TrkB, który jest receptorem czynnika wzrostu pochodzenia mózgowego (BDNF) i neurotrofiny 4 (NT4); TrkC, który jest receptorem neurotrofiny 3 (NT3). W obwodowym układzie nerwowym TrkC występuje na neuronach proprioceptywnych, podczas gdy na neuronach ośrodkowego układu nerwowego (OUN) zasadniczo współwystępują TrkB i TrkC [Minichiello L. i współpr., 1999; Huang E.J., Reichardt L.F., 2001; Mach A. i współpr., 2007]. Aktywacja receptorów wymaga uprzedniego związania się swoistego liganda z receptorem Trk. Ligandami dla receptorów Trk są wspomniane już neurotrofiny NGF, BDNF, NT3, NT4. Neurotrofiny stanowią grupę białek warunkujących wzrost, przeżycie i prawidłowy rozwój komórek nerwowych. Wymienione czynniki wzrostu wiążą się z wysokim powinowactwem do receptorowych kinaz tyrozynowych rodziny Trk. Należy jednak zaznaczyć, że o ile NT3 wykazuje wysokie powinowactwo do TrkC, to jednak może mieć niższe powinowactwo także do pozostałych receptorów neurotrofin. Do receptorów wiążących wszystkie wymienione neurotrofiny z niskim powinowactwem (w porównaniu z receptorami Trk) zalicza się również receptor p75^{NTR}, który jest przedstawicielem rodziny receptorów czynnika martwicy nowotworów [Reichardt L.F., 2006]. Receptor p75^{NTR} odgrywa istotną rolę w procesie apoptozy, zaś receptorom z rodziny Trk przypisuje się udział w procesach wzrostu, różnicowania i przeżycia komórek, aczkolwiek w badaniach *in vitro* wykazano, że współwystępowanie receptorów p75^{NTR} i TrkA promowało wzrost i migrację komórek nerwowych [Mamidipudi V., Wooten M.W., 2002].

Receptorowe kinazy tyrozynowe Trk są białkami jednokrotnie przebijającymi błonę komórkową. Zbudowane są z domeny zewnątrzkomórkowej warunkującej związanie z ligandem, która składa się z krótkiej sekwencji sygnałowej, trzech 24-aminokwasowych motywów bogatych w leucynę otoczonych dwoma motywami cysteinowymi (ang. cysteine clusters, C1/C2). Do motywu C2 przylegają dwie domeny immunoglobulinopodobne (Ig1 i Ig2). Za związanie liganda w receptorach Trk odpowiada domena Ig2. Następnie występuje domena trans-membranowa, a za nią domena cytoplazmatyczna, która zawiera domenę kinazy tyrozynowej. W domenach cytoplazmatycznych receptorowych kinaz tyrozynowych rodziny Trk konserwowane są sekwencje reszt aminokwasów rdzenia katalitycznego, natomiast receptorowe kinazy tyrozynowe różnią się pod względem sekwencji reszt aminokwasów w miejscu przybłonowym, gdzie zachodzi rekrutacja szeregu białek adaptorowych [Huang E.J., Reichardt L.F., 2003] oraz w części C-końcowej. Budowę receptorów Trk przedstawiono na Ryc. 4.



Ryc. 4. Budowa receptorowych kinaz tyrozynowych Trk

Interakcja pomiędzy receptorem a swoistym dla niego ligandem prowadzi do wzajemnej fosforylacji reszt tyrozyn obecnych w domenach kinaz tyrozynowych dimeru. Skutkuje to utworzeniem tzw. miejsc przyłączenia (ang. docking sites) dla cytoplazmatycznych białek adaptorowych zawierających domeny PTB i SHC2, uruchamiających wewnątrzkomórkowe kaskady sygnałowe. Dimeryzacja receptora ma na celu stabilizację powstałego kompleksu ligand-receptor i wzajemne fosforylacje reszt tyrozyn w tzw. pętlach aktywacyjnych skutkujące aktywacją receptora. Na podstawie przeprowadzonych badań krystalograficznych wykazano, że w przypadku receptorowej kinazy tyrozynowej TrkA dimeryzacja receptora zachodzi w wyniku bezpośredniego kontaktu dimerów NGF jedynie z domeną zewnątrzkomórkową Ig2 w receptorze TrkA w stosunku stechiometrycznym 2:2 przypadającym na kompleks NGF/Ig2 (Ryc. 5.) [Wehrman T. i współprac., 2007]. Badania wskazują na możliwość występowania dimerów receptorów bez uprzedniej aktywacji na drodze związania liganda. Wiadomo natomiast, że istnieją mechanizmy przeciwdziałające aktywacji receptora nie pobudzonego przez ligand, jak np. blokada sferyczna domeny kinazy tyrozynowej w nieobecności liganda (EGFR), czy stabilizacja interakcji pomiędzy domeną przyblonową (ang. juxtamembrane segment) a nieaktywną domeną kinazy tyrozynowej (PDGF, EphR, receptory insulinowe). Aktywacja domeny wewnątrzkomórkowej jest wynikiem rearanżacji zmian konformacyjnych aktywnych dimerów. Może ona zachodzić poprzez trans-fosforylację w przypadku receptorów insulinowych, epiryryny, czy PDGFR lub tak jak w przypadku EGFR. Trans-fosforylacja domeny kinazy tyrozynowej w kontekście receptorów insulinowych powoduje odsłonięcie miejsc wiązania ATP i substratu, zaś w receptorze PDGFR zachodzi zniesienie interakcji pomiędzy segmentem przyblonowym a domeną katalityczną kinazy tyrozynowej. W przypadku receptora EGFR jego aktywacja wymaga utworzenia asymetrycznego dimeru receptorów, w którym kinaza tzw. „aktywatorowa” (ang. activator) monomeru EGFR aktywuje allosterycznie kinazę „biorcy” kolejnego monomeru EGFR (ang. receiver) [Endres N.F. i współprac., 2014].



Ryc. 5. Schemat interakcji dimerów neurotrofiny z monomerami receptorowej kinazy tyrozynowej Trk.

Receptorowe kinazy tyrozynowe są syntetyzowane w reticulum endoplazmatycznym (ER) i transportowane w aparacie Golgiego do powierzchni membrany. Internalizacja zachodzi wolniej niż ich recykling z endosomów i transport do błony komórkowej, dlatego RTK są akumulowane na powierzchni membrany, co zapewnia ich lepszą dostępność dla ligandów. RTK ulegają endocytozie zależnej i niezależnej od klatryny. Klatryna jest głównym składnikiem wpukleń błony komórkowej, będących miejscami endocytozy. Pęcherzyki klatrynowe ulegają fuzji z wczesnymi endosomami. Kompleks ligand-receptor pozostaje nienaruszony, chociaż niektóre ligandy już na tym etapie oddysocjują od receptora ze względu na kwaśne środowisko występujące w endosomach. Recykling RTK zachodzi na drodze połączenia wczesnych endosomów z: endosomami sortującymi (ang. SE, sorting endosomes), wielopęcherzykowymi ciałkami (ang. MVB, multivesicular bodies) lub poprzez transport w region centrosomu. Połączenie późnych endosomów z lizosomami skutkuje degradacją receptora i liganda [Goh L.K., Sorkin A., 2013]. Endocytoza niezależna od klatryny ma znaczenie w szczególnych przypadkach, jak np. w wyniku traktowania komórek wysokimi stężeniami liganda [Sorkin A., Goh L.K., 2009].

Ubikwitynacja RTK polega na transporcie receptorów do pęcherzyków klatrynowych przy współdziałaniu białek Eps15, Eps15R, epsyny oraz białek wiążących ubikwitynę. W procesie ubikwitynacji biorą udział enzymy aktywujące (E1), wiążące (E2) oraz ligujące (E3): Cbl, Nrdp1. Ligaza ubikwityny E3 determinuje swoistość substratową ubikwitynacji. Przy udziale ligazy E3 następuje związanie się ubikwityny z RTK, a następnie dołączenie białek epsyny, Eps lub Eps15R, które zawierają domeny wiążące ubikwitynę i mogą połączyć się również z heterotetramerycznym białkiem AP-2, prowadząc do unieczynnienia RTK [Goh L.K., Sorkin A., 2013].

1.3. TrkC

Gen *trkC* umiejscowiony jest na ramieniu długim (q) chromosomu 15 w regionie 25 (15q25) i koduje receptor o masie cząsteczkowej ok. 145 kDa wiążący z wysokim powinowactwem NT3. TrkC bierze udział w regulacji procesów komórkowych takich jak proliferacja i różnicowanie się komórek systemu nerwowego u ssaków, a w szczególności w rozwoju neuronów proprioceptywnych (czuciowych), przewodzących informacje od receptorów czucia głębokiego w tkankach i narządach ciała do ośrodkowego układu nerwowego [McGregor L.M. i współpr., 1994; Ernfors P. i współpr., 1994]. Obok opisywanej w literaturze grupy receptorów TrkC z funkcjonalną domeną katalityczną

(TK+, ang. tyrosine kinase domain +) wyróżniono kilka izoform receptora TrkC pozbawionych funkcjonalnej domeny katalitycznej (TK-) lub posiadających wstawki reszt aminokwasów w obrębie domeny kinazy tyrozynowej, bądź domeny zewnątrzkomórkowej.

W przypadku izoform TrkC posiadających wstawki 14-, 25- lub 39-aminokwasowe w domenie kinazy tyrozynowej u szczura zaobserwowano, że pomimo autofosforylacji receptora aktywacja szlaków sygnałowych prowadzących do inicjacji procesu neurytogenezy ulegała zahamowaniu [Tsoulfas P. i współprac., 1996]. Nie wykazano różnic pomiędzy izoformami TrkC z insertami reszt aminokwasowych w domenie zewnątrzkomórkowej, lecz sugeruje się, że mogą wiązać NT3 z różnym powinowactwem [Shelton D.L. i współprac., 1995].

Zaobserwowano występowanie u ludzi dwóch izoform TrkC, które w domenie zewnątrzkomórkowej zawierają 9-aminokwasowe wstawki pomiędzy regionami immunoglobulinopodobnymi a domeną trans-membranową. Występowanie opisywanych insertów skutkuje obniżoną aktywnością biologiczną receptorów na skutek zmniejszenia powinowactwa NT3 do receptora [Shelton D.L. i współprac., 1995].

Zidentyfikowano pięć izoform TrkC pozbawionych domeny kinazy tyrozynowej jednak w dostępnej literaturze zwrócono uwagę na izoformę TrkCNC2, która może występować osobno lub razem z receptorem TrkC zawierającym funkcjonalną domenę katalityczną. TrkCNC2 ulega ekspresji w neuronach piramidowych kory mózgu i powszechnie występuje w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym [Menn B. i współprac., 1998]. W neuronalnych komórkach macierzystych (NSC) ekspresja TrkCNC2 zaangażowana była w różnicowanie NSC w kierunku neuronów i komórek glejowych [Menn B. i współprac., 2000]. Badania Hapner i współprac. [1998] wskazywały na udział TrkCNC2 w procesie neurytogenezy komórek neuroektodermi razem z receptorem p75^{NTR}. Wykazano, że izoforma TrkCNC2 może być modyfikowana po syntezie białka z udziałem metaloproteinaz, co skutkuje powstaniem rozpuszczalnej ektodomeny (zewnątrzkomórkowej) oraz fragmentu zbudowanego z domeny trans-membranowej, przybłonowej i cytoplazmatycznej domeny niekatalitycznej NC2. Związana z komórką część błonowa z cytoplazmatyczną częścią niekatalityczną NC2 może tworzyć heterodimery z formą katalityczną TrkC i stanowić negatywny regulator procesu aktywacji receptora [Mateos S. i współprac., 2003]. W badaniach Esteban i współprac. [2006] zaproponowano szlak sygnałowy z udziałem TrkCNC2 na drodze aktywacji tej izoformy przez NT3. Związanie się NT3 z izoformą TrkCNC2 skutkuje rekrutacją białka tamaliny, która wiąże się do części cytoplazmatycznej receptora. Tamalina aktywuje czynnik wymiany nukleotydów guaninowych ARNO, który przekształca nieaktywny kompleks małego białka G Arf6-GDP (ang. ADP-ribosylation factor 6) na Arf6-GTP. Skutkuje to aktywacją Rac1 oraz jego rekrutacją do powierzchni błony komórkowej, gdzie następuje reorganizacja organizacji cytoszkieletu, która wpływa na fałdowanie błony komórkowej (ang. membrane ruffling).

1.3.1. Szlaki sygnałowe TrkC

W następstwie związania liganda (NT3) do receptora (TrkC) następuje aktywacja receptora, co skutkuje uruchomieniem szeregu wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału. Do najważniejszych kaskad sygnałowych w kontekście aktywacji TrkC należą: szlaki kinaz białkowych ERK1/2 aktywowanych mitogenami, szlaki fosfolipazy C γ 1 - kinazy białkowej C (PLC γ 1 - PKC), szlak kinazy 3 fosfatydyloinozytolu – kinazy białkowej B/Akt (PI3K - PKB/Akt) oraz szlaki kinazy białkowej A (PKA). Uproszczony schemat szlaków sygnałowych TrkC przedstawiono na Ryc. 6.

Szlak aktywacji kinaz białkowych ERK1/2

Kinazy białkowe aktywowane miogenami (ang. MAPK, mitogen activated kinases) należą do grupy kinaz serynowo - treoninowych, przenoszących grupę fosforylową (PO^{2-}_3) na substrat białkowy i uczestniczących w transdukcji sygnału z powierzchni do wnętrza komórki. Grupa ta obejmuje cztery rodziny kinaz:

- a) ERK1/2 (ang. Extracellular signal regulated kinase 1 and 2) o wielkości 42-44 kDa;
- b) JNK 1-3 (ang. c-Jun N- terminal kinase 1 to 3) o wielkości 46-54 kDa;
- c) p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ o wielkości 32-54 kDa;
- d) ERK5 (Big MAPK) o wielkości 110 kDa.

Kinazy białkowe ERK1/2 biorą udział w procesach proliferacji i wzrostu komórek, wpływają na morfologię komórek oraz plastyczność neuronów. Dysregulacja szlaku sygnałowego ERK1/2 prowadzi do degeneracji neuronów, powstawania zaburzeń w organizmie, np. cukrzycy oraz zachodzi w procesie powstawania nowotworów. Prowadzone są badania wskazujące na wpływ ERK1/2 na aktywację onkogenów. Kinazy p38 oraz JNK ulegają aktywacji w odpowiedzi na stres komórki wywołany hipoksją, stres oksydacyjny lub osmotyczny. Nieprawidłowości w funkcjonowaniu szlaków kinaz p38 i JNK mogą prowadzić do powstawania chorób o podłożu autoimmunologicznym, neurodegeneracyjnym, czy chorób sercowo-naczyniowych. Kinaza ERK5 uczestniczy zarówno we wzroście komórki, jak i warunkuje jej przeżycie w warunkach stresu [Plotnikov A. i współpr., 2011].

Interakcja pomiędzy receptorem TrkC a swoistym dla niego ligandem (NT3) prowadzi do aktywacji receptora i skutkuje utworzeniem tzw. miejsc przyłączania (ang. docking sites) dla cytoplazmatycznych białek adaptorowych zawierających domeny PTB (ang. phosphotyrosine binding domain) i SHC2 (ang. Src homology 2 domain). Białko adaptorowe Shc, poprzez przyłączenie do części przyblonowej receptora Trk, rekrutuje do powierzchni błony komórkowej kompleks białek: Grb2 (ang. growth factor receptor-bound protein 2), białko GAB1/2 oraz guaninowy czynnik wymiany nukleotydów, czyli białko Sos. Białko Sos przekształca nieaktywny Ras-GDP w aktywny Ras-GTP. Aktywny Ras rekrutuje kinazę białkową Raf1, która fosforyluje kinazy białkowe MEK1/2 wiążące się do ERK1/2. Fosforylacja i aktywacja kinaz białkowych ERK1/2 skutkuje ich translokacją do jądra komórkowego [Roskoski R. Jr., 2012]. Niefosforylowane ERK1/2 pozostają związane z MEK1/2 i są umiejscowione w cytoplazmie. Fosforylacja ERK1/2 skutkuje oddysocjowaniem od MEK1/2 i następuje translokacja kinaz białkowych ERK1/2 poprzez jeden z trzech mechanizmów. Pierwszy polega na dimeryzacji ERK1/2 i aktywnym transporcie do jądra komórkowego. Drugi mechanizm oparty jest o swobodną dyfuzję kinaz białkowych ERK1/2 przez pory jądrowe, natomiast trzeci rodzaj translokacji polega na bezpośrednim oddziaływaniu ERK1/2 z kompleksem porów jądrowych (NPC). ERK1/2 ulegają defosforylacji w jądrze komórkowym, a następnie przy udziale MEK1/2 są transportowane z powrotem do cytoplazmy. MEK1/2 swobodnie krążą pomiędzy cytozolem a jądrem komórkowym z uwagi na występowanie sekwencji NES (eksportu jądrowego) [Kondoh K. i współpr., 2008]. Udokumentowano ponad 175 substratów, z którymi oddziałują ERK1/2 zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze komórkowym [Yoon S., Seger R, 2006].

Aktywacja kinaz białkowych ERK1/2 może także zachodzić na drodze niezależnej od białka Ras. Mianowicie aktywacja TrkC może prowadzić do rekrutacji kompleksu białek FRS2, GRB2, białka adaptorowego CRK i guaninowego czynnika wymiany nukleotydów, białka C3G. C3G aktywuje białko Rap1, które fosforyluje białko B-Raf, które z kolei aktywuje MEK1/2. Aktywacja białka Rap1 skutkuje zahamowaniem szlaku szybkiej i krótkotrwałej aktywacji ERK1/2 zależnej od Ras.

Natomiast szlak zależny od Rap1 prowadzi do długotrwałej aktywacji kinaz białkowych ERK1/2 [Reichardt L.F., 2006].

Interesującym zagadnieniem jest model aktywacji białek Raf (A-Raf, B-Raf, C-Raf). Wszystkie rodzaje białek Raf zbudowane są z N-końcowej domeny wiążącej białko Ras (ang. RBD, Ras binding domain), domeny bogatej w cysteinę (ang. CRD, cysteine rich domain) biorącej udział w rekrutacji Raf do powierzchni błony komórkowej oraz z domeny kinazowej znajdującej się na C-końcu. Powyżej domeny katalitycznej znajduje się N-terminalny kwaśny motyw (ang. NtA, N-terminal acid motif), który zawiera reszty tyrozyny fosforylowane w określonych pozycjach: dla A-Raf jest to Tyr301/302, dla C-Raf jest to Tyr340/341 lub reszta kwasu asparaginowego w przypadku B-Raf, który jest fosforylowany w pozycji D448/449. Jedna reszta seryny jest konserwowana we wszystkich Raf. W przypadku A-Raf jest to Ser299, w C-Raf- Ser338 a w B-Raf Ser445 i tylko w B-Raf ulega ona konstytutywnej fosforylacji. Aktywowany Ras rekrutuje B-Raf do powierzchni membrany w postaci monomeru. Nie został jednak poznany molekularny mechanizm aktywacji B-Raf przez Ras. Związane z białkiem Ras białko B-Raf ulega aktywacji w kwaśnym motywie N-terminalnym i na skutek zmian konformacyjnych w cząsteczce białka możliwe staje się utworzenie heterodimeru z białkiem C-Raf. Cis-fosforylacja C-Raf powoduje fosforylację MEK, który fosforyluje Ser338 w NtA C-Raf zamieniając C-Raf na trans-aktywator. C-Raf dysocjuje od B-Raf i może utworzyć homodimery z kolejną cząsteczką C-Raf. Cykl ten prowadzi do amplifikacji sygnału w komórce [Cseh B i współpr., 2014].

Szlak PLC γ 1-PKC

Fosforylacja reszty tyrozyny w regionie C-końcowym TrkC, w pozycji 820, prowadzi do rekrutacji PLC γ 1 i hydrolizy fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (PI(4,5)P₂) prowadzącą do powstania wtórnych przekaźników sygnałów: trifosforanu-1,4,5-inozytolo (Ins(1,4,5)P₃) oraz diacyloglicerolu (DAG). Ins(1,4,5)P₃ powoduje uwolnienie jonów Ca²⁺ z przestrzeni wewnątrzkomórkowych, natomiast DAG aktywuje kinazę białkową C (PKC). Aktywowana PKC wpływa na uruchomienie szlaku sygnałowego Ras-Raf1-MEK1/2-ERK1/2. W komórkach PC12 ze stabilną ekspresją PLC γ 1 zaobserwowano aktywację ERK1/2 także na drodze szlaku sygnałowego Rap1- B-Raf- MEK1/2-ERK1/2 [Rong R. i współpr., 2003]. Szczegółowy opis budowy, mechanizmu aktywacji PLC γ 1 i czynników regulujących działanie enzymu zawarto w rozdziale 1.4.

Szlak PI3K-PKB/Akt

PI3K jest enzymem katalizującym reakcję hydrolizy fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (PI(4,5)P₂) prowadzącą do powstania trifosforanu-3,4,5-fosfatydyloinozytolo (PI(3,4,5)P₃). Domena plekstrynowa Akt/PKB i kinazy PDK-1 (ang. phosphoinositide-dependent kinase 1) wiąże powstały PIP₃, co skutkuje rekrutacją obu kinaz z cytoplazmy do powierzchni błony komórkowej, gdzie Akt ulega częściowej aktywacji poprzez fosforylację reszty Thr308. Do pełnej aktywacji Akt wymagana jest fosforylacja dodatkowo reszty Ser473, znajdującej się w obrębie hydrofobowego motywu domeny C-terminalnej. Fosforylacja Ser473 zachodzi z udziałem kompleksu mTORC2 (ang. mammalian target of rapamycin complex 2). Fosforylowany Akt ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie fosforyluje i aktywuje czynniki transkrypcyjne prowadząc do tworzenia się i wzrostu neurytów w komórkach PC12 [Park J.H., 2012; Krześlak A., 2010; Levresse i współpr., 2000].

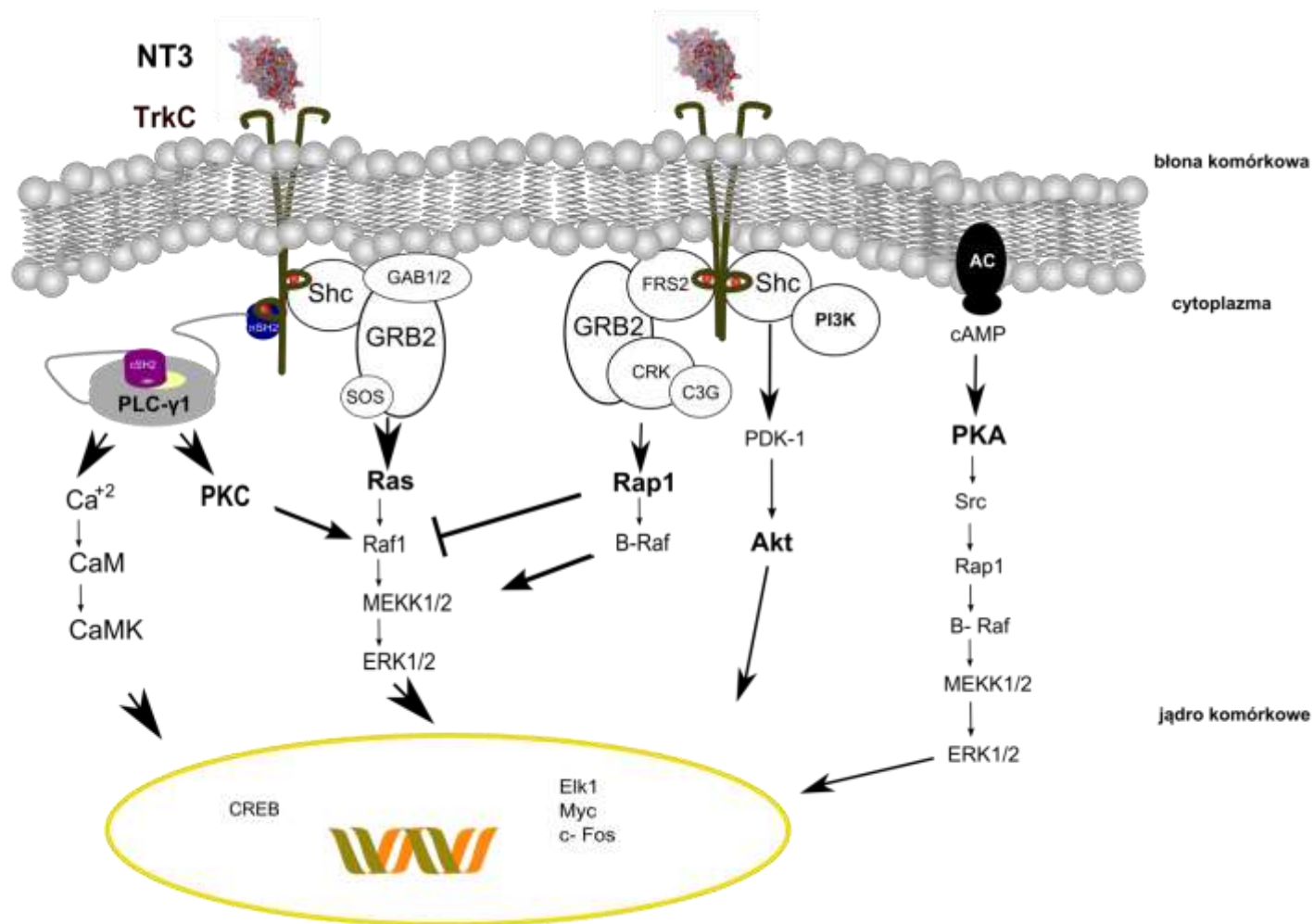
Wykazano, że na skutek aktywacji przez RTK dochodzi do bezpośredniego oddziaływania pomiędzy Akt a PLC γ 1. Fosforylacja reszty Tyr783 w PLC γ 1 prowadzi do zmian konformacyjnych w cząsteczce enzymu, która przyczynia się do odsłonięcia domeny SH3 PLC γ 1 i jej bezpośredniej

interakcji z domeną bogatą w prolinę w białku Akt, którego aktywacja zależy od PI3K. Ponadto oddziaływanie PLC γ 1-Akt umożliwia dodatkowo fosforylację reszty Ser1248 w PLC γ 1, co w konsekwencji zwiększa ruchliwość komórki. Akt bierze udział w procesach wzrostu komórki, metabolizmu i uczestniczy w regulacji apoptozy poprzez związanie się z czynnikami pro-apoptotycznymi, m.in. Bad, czy z kaspazą 9. PLC γ 1 jest zaangażowana w modelowanie cytoszkieletu. Pomimo różnej funkcji pełnionej w komórce PLC γ 1 i PI3K biorą udział w metabolizmie lipidów i korzystają z tego samego substratu jakim jest PI(4,5)P2. Szlaki PLC γ 1-PI3K-Akt odpowiadają za mitogenezę i poruszanie się komórki [Wang Y. i współpr., 2006; Park J.H., 2012].

Szlak PKA

Ca²⁺ oraz cAMP są głównymi przekaźnikami regulującymi funkcjonowanie neuronów. Napływ jonów Ca²⁺ do wnętrza komórki odbywa się za pośrednictwem kanałów jonowych typu L i zostaje wychwycony przez białko modulatorowe kalmodulinę, które jest niezbędne do aktywacji kinazy serynowo-treoninowej regulowanej stężeniem jonów Ca²⁺, a ta z kolei aktywuje cyklazę adenylanową (AC). Źródłem Ca²⁺ może być również jego uwolnienie z magazynu w retikulum endoplazmatycznym przez Ins(1,4,5)P3 w następstwie hydrolizy PI(4,5)P2 przez PLC γ 1. Aktywność AC prowadzi do zwiększenia stężenia cAMP w komórce i aktywacji PKA. Natomiast PKA fosforyluje niereceptorową kinazę tyrozynową Src w pozycji Ser17, co skutkuje aktywacją Rap1- B-Raf-MEK1/2-ERK1/2. Aktywowane ERK1/2 ulegają translokacji do jądra komórkowego, gdzie fosforylują m.in. czynniki transkrypcyjne CREB i Elk1. [Grewal S.S i współpr., 2000; Vossler M.R., 1997]. Szlak sygnałowy PKA- Rap1-ERK1/2 hamuje natomiast aktywację ERK1/2 zależną od białka Ras (Ras- Raf- MEK1/2- ERK1/2).

W badaniach przeprowadzonych na ludzkich komórkach nerwiaka zarodkowego (SH-SY5Y) wykazano, że zarówno PKA, jak i PI3K pełnią niezbędną rolę w procesie elongacji powstających neurytów. Zahamowanie szlaku sygnałowego PKA prowadzi do zaburzeń procesu inicjacji neurytogenezy, natomiast inhibicja szlaku PI3K skutkuje zanikaniem neurytów powstających w fazie inicjacji. W dalszych procesach różnicowania się komórek nerwowych istotne znaczenie ma szlak sygnałowy PI3K [Sánchez S. i współpr., 2004].



Ryc.6. Uproszczony szlak sygnałowy TrkC

1.4. Fosfolipaza C γ 1

1.4.1. Charakterystyka izoenzymów fosfolipazy C γ

Błona komórkowa to bardzo aktywna metabolicznie struktura, stanowiąca barierę chroniącą przed czynnikami zewnętrznymi, w obrębie której zachodzi wiele istotnych dla komórki procesów warunkujących m.in. wzrost, czy różnicowanie. Składa się ona z komponentu białkowego oraz lipidowego, tworzącego podwójną warstwę lipidową, stąd też często nazywana jest półprzepuszczalną, płynną mozaiką białkowo - lipidową. Przemiany fosfolipidów w błonie komórkowej są źródłem powstawania cząsteczek sygnałowych, przekazujących informacje z otoczenia do wnętrza komórki. Kaskada przemian inicjowana hydrolizą fosfatydyloinozytoli w wewnętrznej warstwie błony plazmatycznej stanowi jeden z istotniejszych systemów przekazywania sygnałów w komórce, a enzymem regulującym ten proces jest fosfolipaza C [EC.3.1.4.11].

Fosfolipaza C (PLC) to zależne od jonów Ca²⁺ rozpuszczalne białko cytosolowe, ulegające translokacji do powierzchni błony komórkowej, gdzie katalizuje reakcję hydrolizy fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (PI(4,5)P₂) i prowadzi do powstania dwóch wtórnych przekaźników sygnału, jakimi są: trifosforan-1,4,5-inozytoli (Ins(1,4,5)P₃) oraz diacyloglicerol (DAG) [Pawelczyk T., 1999]. Ins(1,4,5)P₃ powoduje uwolnienie jonów Ca²⁺ z przestrzeni wewnątrzkomórkowych, a także wpływa na regulację różnych procesów komórkowych, takich jak m.in. modelowanie cytoskieletu, cytokineza [Janetopoulos C., Devreotes P., 2006], endocytoza [Itoh T. i współpr., 2001; Martin T. F., 2001; Di Paolo G., De Camilli P., 2006], czy aktywacja błonowych kanałów jonowych zarówno sodowych, jak i potasowych [Suh B.C., Hille B., 2005]. Fosfatydyloinozytol jest substratem zarówno dla PLC, jak i kinazy fosfatydyloinozytolowej (PI3K), która pełni wiele ważnych funkcji w komórkach prawidłowych, np. w procesach ich różnicowania, migracji, adhezji, czy przeżycia, a także przyczynia się do rozwoju chorób [Kashiwada M. i współpr., 2007; Wong K.K. i współpr., 2010]. Natomiast DAG aktywuje kinazę białkową C (PKC), regulującą procesy odczulania receptorów, transport cząsteczek, bądź jonów przez membrany oraz uwalniania neuroprzekaźników [Ohno S., Nishizuka Y., 2002]. W kontekście procesów zachodzących w komórce długotrwale, PKC pełni istotną rolę w jej różnicowaniu, ruchliwości, przerzutowaniu nowotworów oraz w długotrwałej transmisji synaptycznej [Blobe G.C. i współpr., 1996; Way K.J., 2001].

Zidentyfikowano i opisano czternaście izoenzymów PLC w komórkach ssaków, które w oparciu o ich strukturę, a także mechanizmy regulacji, podzielono na sześć głównych grup: β (1-4), γ (1, 2), δ (1-4) oraz ϵ , ζ i η (1, 2) [Szumiło M., Rahdeń-Staroń I., 2008]. Wśród izoenzymów PLC wyróżnić można fosfolipazę C γ 1 o masie cząsteczkowej około 148 kDa oraz C γ 2 (około 147 kDa), których aktywność regulowana jest m.in. przez receptorowe kinazy tyrozynowe [PhosphoSite Plus]. Cechą charakterystyczną enzymów z rodziny fosfolipaz C γ jest występowanie w obrębie domeny katalitycznej XY tandemowych sekwencji homologicznych do domen Src: SH2, SH3 oraz rozdzielonej domeny PH (split PH - spPH). Fosfolipazy C γ 1 i C γ 2 mają identyczną strukturę domenową. Różnica dotyczy ich występowania oraz funkcji. Fosfolipaza C γ 2 ulega ekspresji w komórkach hematopoetycznych i jej występowanie stwierdzono w płucach, śledzionie i grasicy [Jakus Z. i współpr., 2009]. Wykazano, że pełni ona ważną funkcję w układzie odpornościowym, gdzie wspomaga rozwój limfocytów B [Khoshyomn S. i współpr., 1999]. Natomiast PLC γ 1 występuje powszechnie w tkankach ssaków [Szumiło M., Rahdeń-Staroń I., 2008]. Jej występowanie wykazano zwłaszcza w mózgu, grasicy i płucach. Najwyższym poziomem ekspresji PLC γ 1 charakteryzują się oligodendrocyty oraz astrocyty w mózgu dorosłego szczura [Suh B.C. i współpr., 2008]. Ponadto zaobserwowano wzmożoną aktywność PLC γ 1 w komórkach nowotworowych raka sutka, czy odbytu [Wells A., Grandis J.R., 2003].

1.4.2. Analiza *in silico* sekwencji reszt aminokwasowych fosfolipazy C γ

Na podstawie przeprowadzonej analizy sekwencji reszt aminokwasowych zaobserwowano, że sekwencja PLC γ 1 jest wysoce konserwowana pomiędzy różnymi gatunkami ssaków.

W Tabeli 1. porównano sekwencje aminokwasowe PLC γ 1 człowieka, myszy i szczura.

Tabela 1. Porównanie sekwencji reszt aminokwasowych fosfolipazy C γ 1 człowieka, myszy i szczura

GATUNEK	DŁUGOŚĆ [aa]	GATUNEK	DŁUGOŚĆ [aa]	HOMOLOGIA
CZŁOWIEK	1290	MYSZ	1302	95%
CZŁOWIEK	1290	SZCZUR	1290	96%
MYSZ	1302	SZCZUR	1290	98%

Wykazano 95% podobieństwo sekwencji reszt aminokwasowych w przypadku porównania PLC γ 1 człowieka i myszy. Homologia sekwencji aminokwasowych PLC γ 1 człowieka i szczura wynosiła 96%, zaś 98% podobieństwo sekwencji zaobserwowano w przypadku PLC γ 1 myszy i szczura.

Ludzka PLC γ 1 jest zbudowana z 1290 reszt aminokwasów, zaś PLC γ 2 składa się z 1265 reszt aminokwasów. W wyniku porównania sekwencji reszt aminokwasowych fosfolipazy C γ 1 oraz C γ 2 u człowieka wykazano występowanie 49% sekwencji homologicznych.

W Tabeli 2 zestawiono podobieństwo sekwencji poszczególnych domen fosfolipazy C γ 1 i C γ 2 u człowieka. Na podstawie przeprowadzonej analizy zauważono wysoki stopień homologii dla domeny katalitycznej X (77%), w obrębie której znajduje się fragment rozdzielonej domeny spPH. Podobieństwo sekwencji w przypadku domen SH2 wynosiło ponad 60%, a dla domeny SH3 59%. Wysoką homologię wykazano także dla domeny regulatorowej C2 (62%), aczkolwiek jej funkcji w odniesieniu do aktywności enzymu jeszcze nie poznano.

1.4.3. Budowa PLC γ 1

PLC γ 1 ma sekwencje tandemowe znajdujące się w obrębie domeny katalitycznej XY. Są to domeny: SH2 (nSH2, znajdująca się na końcu N sekwencji tandemowych oraz cSH2, znajdująca się dalej w kierunku końca C), SH3 oraz rozdzielona domena PH (spPH).

W obrębie domeny SH2 dochodzi do oddziaływań z rejonami białek zawierającymi fosforylowaną resztę tyrozyny, zaś w domenie SH3 z fragmentami bogatymi w resztę proliny (motyw PXXP) [Pawson T., 1994]. Domena spPH zawiera sekwencje odpowiedzialne za auto-inhibicję enzymu. Zaobserwowano, że C-końcowa część domeny spPH wiąże się bezpośrednio z kanałem wapniowym TRPC3 [Wen W. i współprac., 2006]. Funkcje domen SH2 i SH3 zostały zbadane przez Poulin i wsp. [2000] poprzez ich inaktywację, a następnie ekspresję otrzymanych

wariantów białek w pozbawionych PLC γ 1 mysich fibroblastach. Ci sami badacze pięć lat później wykazali wewnętrzną interakcję między fosforylowaną resztą Tyr783 i domeną cSH2, co w efekcie sprzyjało aktywacji PLC γ 1, wskazując na znaczącą rolę cSH2 w opisywanym procesie [Poulin B. i współprac., 2005].

Badania Serrano i współprac. [2005] dowodzą, że fosforylacja tyrozyny w pozycji 775 również wpływała na aktywację PLC γ 1, natomiast przeniesienie reszty fosforanowej na resztę tyrozyny w pozycjach 472, 771 i 1253 nie wpływało na mobilizację jonów Ca²⁺, a tym samym na aktywację szlaku sygnałowego PKC.

SLP-76 jest białkiem adaptorowym zaangażowanym w przekazywanie sygnałów przez receptory limfocytów T. Yablonski i współprac. [2001] wykazali, że oddziaływanie między domeną SH3 PLC γ 1 i białkiem adaptorowym SLP-76 sprzyjało zwiększeniu poziomu fosforylacji oraz aktywacji PLC γ 1. W przypadku domen regulatorowych PH, EF, czy C2 nie zaobserwowano znaczących różnic pod względem budowy w porównaniu do pozostałych izoenzymów PLC.

Niewiele wiadomo na temat ich udziału w aktywacji PLC γ 1, chociaż badania wskazują na szczególny udział PLC γ 1 w reorganizacji cytoszkieletu poprzez oddziaływanie domeny PH PLC γ 1 z β -tubuliną [Chang J.S. i współprac., 2005].

Aktywacja PLC γ 1 może przebiegać w sposób zależny od receptorowych kinaz tyrozynowych (RTK) albo od nich niezależny z udziałem: niereceptorowych kinaz tyrozynowych (NRTK), kwasu fosfatydowego [Jones G.A., Carpenter G., 1993], kwasu arachidonowego i białka tau (w komórkach pochodzenia nerwowego) lub jego analogu (w komórkach nie - neuronalnych) [Hwang S.C. i współprac., 1996], co wskazuje na allosteryczny mechanizm regulacji enzymu.

1.4.4. Aktywacja fosfolipazy C γ 1 w sposób zależny od receptorowych kinaz tyrozynowych

Fosfolipazy C γ 1 i C γ 2 są jedynymi izoenzymami w rodzinie białek PLC aktywowanymi w odpowiedzi na czynnik wzrostu przez receptorowe kinazy tyrozynowe, m.in. przez: EGFR, PDGFR, FGFR, czy Trk [Kaplan D.R., Miller F.D., 2000]. Ponadto wyróżniono także 3 rodziny niereceptorowych kinaz tyrozynowych aktywujących PLC γ 1: Src, Syk oraz Tec [Yablonski D., i współprac., 2001].

Aktywacja PLC γ 1 przez RTK wymaga uprzedniej fosforylacji i aktywacji samej RTK, a także fosforylacji reszty Tyr w miejscu RTK wiążącym PLC γ 1. Zastąpienie Tyr innym aminokwasem, np. fenyloalaniną (w sekwencji RTK w miejscu rekrutacji PLC γ 1), zapobiegało asocjacji PLC γ 1 z RTK oraz skutkowało zahamowaniem wytwarzania trifosforanu inozytolu (Ins(1,4,5)P₃) przez komórki NIH 3T3 (mysie fibroblasty). Mimo że ukierunkowana mutacja miejsc fosforylacji Tyr1021 w receptorze PDGF [Valius M. i współprac., 1993], Tyr785 w receptorze NGF [Machide M. i współprac., 2000], czy Tyr766 w receptorze FGF [Mohammadi M. i współprac., 1992] zapobiegała asocjacji PLC γ 1 z RTK i wytwarzaniu Ins(1,4,5)P₃ przez komórki, to jednak warianty receptorów z wprowadzoną mutacją wciąż pośredniczyły w fosforylacji PLC γ 1 zależnej od kinaz tyrozynowych.

Już na początku lat 90 ubiegłego wieku udowodniono, że fosforylacja PLC γ 1 pod wpływem działania czynników wzrostu takich jak PDGF i EGF zachodzi na resztach Tyr: 771, 783 oraz 1253 (w przypadku PLC γ 1 pochodzącej od szczura) lub 1254 (w przypadku ludzkiej PLC γ 1). Kolejne badania wykazały związek pomiędzy zwiększeniem poziomu fosforylacji enzymu i jego podwyższoną aktywnością. Na podstawie wyników badań Sekiya i współprac. [2004] stwierdzono, że fosforylacja i aktywacja PLC γ 1 zależy od rodzaju komórek oraz stosowanego stymulatora. Przeniesienie reszty

fosforanowej na Tyr1253 nie wpływało na aktywność enzymu, a fosforylacja jedynie Tyr783 jest niewystarczająca do pełnej aktywacji PLC γ 1.

PLC- γ Tabela 2. Porównanie sekwencji aminokwasowych poszczególnych domen fosfolipazy $C\gamma 1$ oraz $C\gamma 2$ u człowieka

enzym	domena PH+EF		domena X		domena nSH2		domena cSH2		domena SH3		domena Y		domena C2	
	długość [aa]	homologia	długość [aa]	homologia	długość [aa]	homologia	długość [aa]	homologia	długość [aa]	homologia	długość [aa]	homologia	długość [aa]	homologia
PLC $\gamma 1$	111	53%	145	77%	98	62%	83	63%	57	59%	118	54%	106	62%
PLC $\gamma 2$	117		146		104		83		57		175		106	

1.4.5. Molekularny mechanizm aktywacji fosfolipazy $\text{C}\gamma 1$

Molekularny mechanizm aktywacji $\text{PLC}\gamma 1$ w odpowiedzi na stymulację czynnikami wzrostu można podzielić na trzy zasadnicze etapy: rekrutacja enzymu do powierzchni błony komórkowej, fosforylacja $\text{PLC}\gamma 1$ oraz zmiany konformacyjne w cząsteczce enzymu prowadzące do odblokowania centrum aktywnego (ryc. 7.).

W przypadku braku stymulatora domena katalityczna XY enzymu jest zablokowana przez domenę cSH2. Nieaktywny enzym nie jest związany z błoną komórkową i pozostaje w cytosolu. Następnym etapem aktywacji RTK jest przyłączenie się domeny nSH2 $\text{PLC}\gamma 1$ do fosfotyrozyny w RTK, w wyniku czego następuje rekrutacja $\text{PLC}\gamma 1$ z cytoplazmy do powierzchni błony. Dochodzi wówczas do katalizowanej przez RTK reakcji przeniesienia reszty fosforanowej z ATP na resztę Tyr783 $\text{PLC}\gamma 1$, znajdującej się pomiędzy domenami cSH2 i SH3. Prowadzi to do połączenia domeny cSH2 z fosfotyrozyną w $\text{PLC}\gamma 1$. Skutkiem tego są zmiany konformacji cząsteczki enzymu, w efekcie których następuje zniesienie inhibicyjnego wpływu domeny cSH2, odblokowanie centrum aktywnego, a następnie hydroliza $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ do $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ oraz DAG. Następnie enzym dysocjuje od powierzchni błony i ulegając defosforylacji powraca do stanu nieaktywnego [Gresset A. i wspóln., 2010].

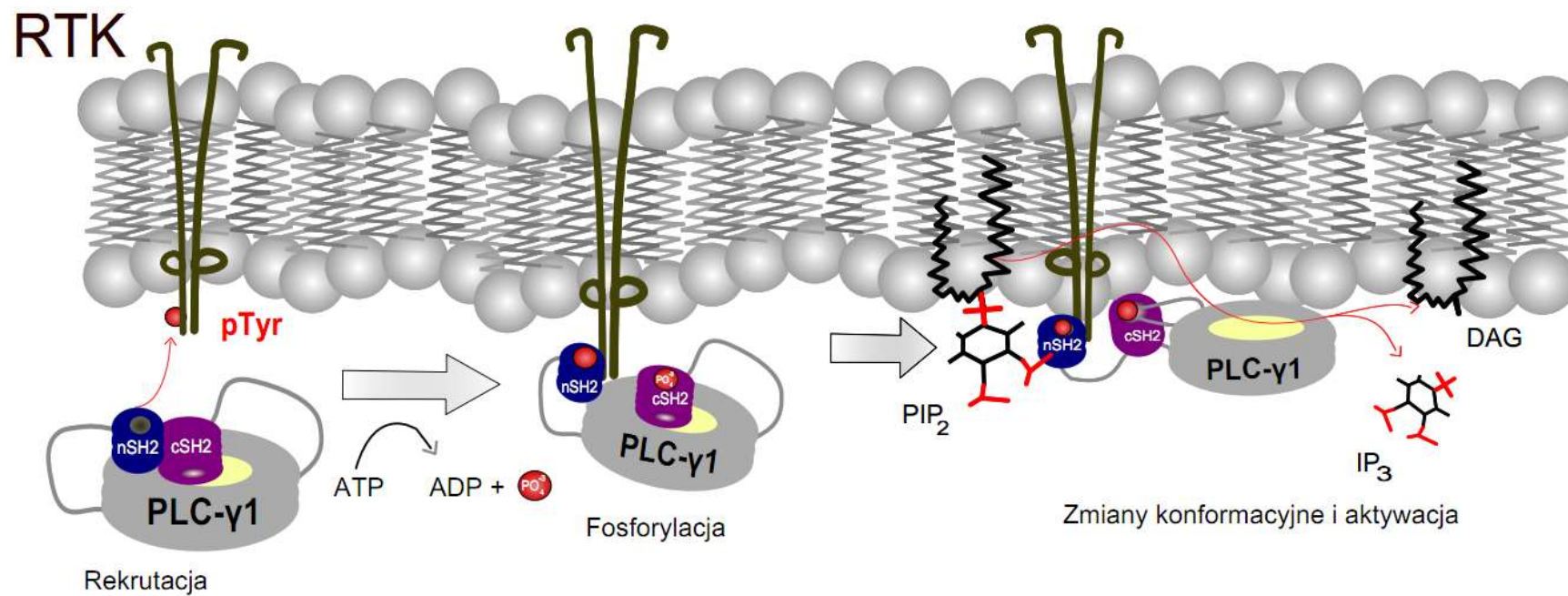
1.4.6. Regulatory procesu aktywacji fosfolipazy $\text{C}\gamma 1$

$\text{PLC}\gamma 1$ podlega pozytywnej i negatywnej regulacji. Do pozytywnych modulatorów procesu aktywacji $\text{PLC}\gamma 1$ należy trifosforan (3,4,5) fosfatydyloinozytolu ($\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$), a do negatywnych m.in.: kinazy białkowe fosforylujące reszty seryny i treoniny (PKA, PKC), fosfatazy tyrozynowe (PTP-azy: SHP-1, PTP-1B) i białka wiążące się z enzymem takie jak: Cbl, Grb2, czy kompleks Jak2/PTP-1B.

PI3K fosforyluje grupę hydroksylową $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ w pozycji 3 pierścienia inozytowego w wyniku czego powstaje $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$, który następnie ulega defosforylacji przez fosfatazę SHIP do $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$ oraz przez fosfatazę PTEN do fosforanu inozytolu $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$. Występowanie $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ oraz $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ uzależnione jest m.in. od uprzedniej stymulacji komórek czynnikami wzrostu. $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$, a także $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ pełnią funkcje wewnątrzkomórkowych przekaźników sygnału. Błonowy fosfolipid $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ może wspomagać rekrutację $\text{PLC}\gamma 1$ do błony komórkowej na skutek połączenia z N-końcową domeną PH oraz cSH2 $\text{PLC}\gamma 1$ [Bae Y.S. i wspóln., 1998]. Dzięki temu $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ wpływa na przejściową kumulację jonów Ca^{2+} w komórce, co potwierdzili Bae i wspóln. [1997]. Stosując farmakologiczny inhibitor PI3K (LY294002) zaobserwowano prawie 40% spadek produkcji $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ oraz kumulacji Ca^{2+} w komórkach NIH 3T3 stymulowanych PDGF. Z kolei Falasca i wspóln. [1998] wykazali wzmożoną aktywację $\text{PLC}\gamma 1$ przez $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$, wytwarzanym w szlaku PI3K, co podkreśla znaczącą rolę obydwu enzymów w metabolizmie fosfatydyloinozytoli, a przede wszystkim potwierdza mechanizm allosterycznej regulacji enzymu $\text{PLC}\gamma 1$. Dodatkowo Sekiya i wspóln. [2004] sugerują, że $\text{PLC}\gamma 1$ jest częściowo aktywna przy nieobecności $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$, co wskazuje na udział także innych czynników wytwarzanych w następstwie stymulacji przez PDGF w aktywacji enzymu. Jednym z nich jest kwas fosfatydowy, który powoduje zwiększenie stopnia fosforylacji enzymu i wzmacnia aktywację $\text{PLC}\gamma 1$ [Jones G.A., Carpenter G., 1993].

Aktywność $\text{PLC}\gamma 1$ może być również regulowana w wyniku fosforylacji reszt seryny/treoniny. Negatywne regulacje $\text{PLC}\gamma 1$ przez PKA, czy PKC udowodnili Alava i wspóln. [1992]. Badania Bae i wspóln. [2002] wykazały, że fosforylacja seryny w pozycji 1248 (Ser1248) przez PKC lub PKA, w odpowiedzi na stymulację komórek czynnikami wzrostu, skutkowała

inaktywacją enzymu zarówno w wyniku zmian strukturalnych w cząsteczce enzymu, jak i jego defosforylacją przez fosfatazy.

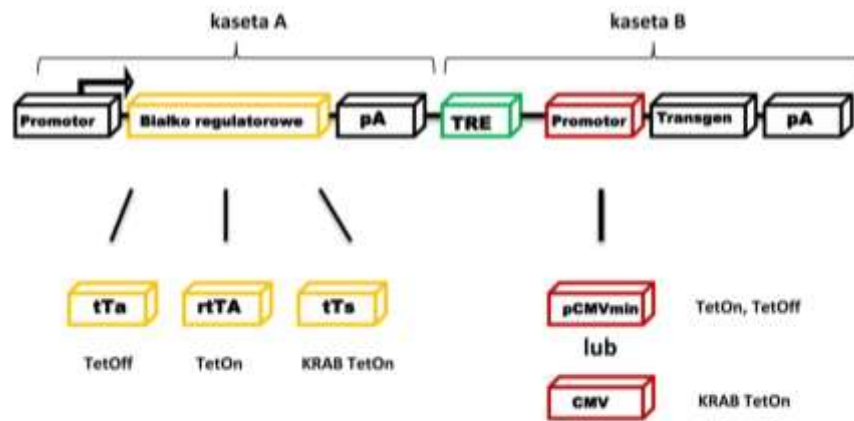
Ryc. 7. Molekularny mechanizm aktywacji PLC γ 1 (wg [Gresset A. i współpr., 2010])

1.5. Tetracyklinowe systemy indukcji ekspresji genów

Poznanie odpowiedzi biologicznej komórki na aktywację receptora neurotrofiny, do którego wprowadzono mutacje potencjalnie zmieniające jego funkcje, wymaga użycia odpowiedniego systemu ekspresji genu kodującego receptor, który zapewni zarówno uzyskanie pożądanego poziomu ekspresji, jak i umożliwi propagację stabilnie transfekowanych komórek.

Indukowalne systemy ekspresji genów stały się potężnym narzędziem zarówno w badaniach podstawowych, jak i klinicznych. System tetracyklinowy został skonstruowany i po raz pierwszy opisany przez Gossen i Bujard [Gossen M., Bujard H., 1992; Gossen M. i współprac., 1995] i jak dotąd jest jednym z najczęściej wykorzystywanych narzędzi badawczych. Wywodzi się on z operonu tetracyklinowego z transpozonu Tn10 bakterii *E. coli*, gdzie białko represorowe TetR hamuje transkrypcję genu tetracyklinowego poprzez związanie się do sekwencji DNA operatora Tet (TetO w DNA). W obecności tetracykliny lub jej pochodnej doksycykliny (Dox) białko represorowe TetR zmienia swoją konformację dysocjując od TetO i umożliwiając tym samym transkrypcję genów oporności na tetracyklinę [Berens C, Hillen W., 2003]. Wadą systemu tetracyklinowego jest jego nieszczelność, jednak w wyniku licznych modyfikacji jego poszczególnych elementów, system ten jest wciąż ulepszany. Wyróżniono pięć głównych rodzajów systemów tetracyklinowych opartych na budowie operonu bakteryjnego Tn10 *E. coli*: 1) Tet-On; 2) Tet-Off; 3) Krab Tet-On; 4) połączony Tet-On; 5) system tetracyklinowy oparty o pozytywne sprzężenie zwrotne TetOn-TetOff.

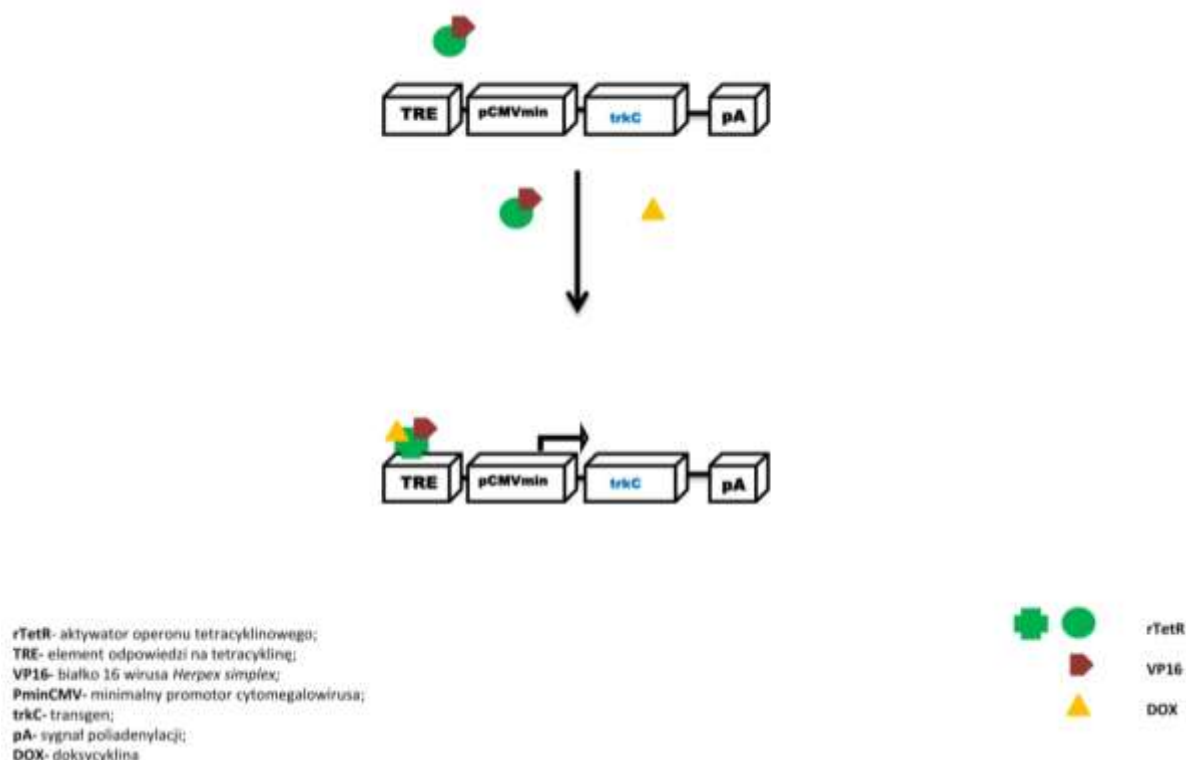
System tetracyklinowy składa się z dwóch kaset ekspresyjnych, czyli tzw. kasety A i kasety B. Kasety A koduje geny białek regulatorowych: transaktywatora regulowanego tetracykliną- tTA (w systemie typu Tet-Off), odwrotnego transaktywatora regulowanego tetracykliną- rtTA (w systemie Tet-On) oraz represora transkrypcji regulowanego tetracykliną- tTs (w systemie KRAB Tet-On). Kasety B się składa się z badanego transgenu pod kontrolą promotora tetracyklinowego. Promotor tetracyklinowy (Ptet) zbudowany jest z sekwencji TRE (elementu odpowiedzi na tetracyklinę), która zawiera siedem kopii sekwencji operatora tetracyklinowego TetO, który jest połączony z ludzkim promotorem genów wczesnej odpowiedzi cytomegalowirusa ($P_{Hcmv IE1}$) umiejscowionym poniżej sekwencji TRE. [Sato T., 2013; Kłopotowska D. i współprac., 2008]. W przypadku systemów typu Tet-On, czy Tet-Off zastosowano minimalny promotor cytomegalowirusa ($pCMV_{MIN}$) celem obniżenia niepożądanego ekspresji badanego genu, natomiast dla systemu Krab Tet-On charakterystyczny jest kompletny promotor CMV. Ogólny schemat budowy systemu tetracyklinowego zaprezentowano na Ryc. 8.



tTa- transaktywator regulowany tetracykliną;
rtTA- odwrotny transaktywator regulowany tetracykliną;
tTs- represor transkrypcji regulowany tetracykliną;
TRE- element odpowiedzi na tetracyklinę;
CMV- promotor cytomegalowirusa;
pCMVmin- minimalny promotor cytomegalowirusa;
pA- sygnał poliadenylacji

Ryc. 8. Schemat budowy systemu tetracyklinowego

System Tet-On składa się z odwrotnego transaktywatora regulowanego tetracykliną (rtTA) oraz promotora tetracyklinowego (Ptet), który reguluje ekspresję badanego genu. rtTA jest białkiem fuzyjnym, w którym białko rTetR (będące produktem mutagenезы represora tetracyklinowego TetR, który w wyniku mutacji stał się aktywatorem operonu tetracyklinowego, a ściślej odwrotnym represorem tetracyklinowym) zostało połączone z domeną aktywacyjną VP16, która jest silnym aktywatorem transkrypcji (ściślej, z C-końcową domeną białka VP16 pochodzącego od wirusa *Herpes simplex*).

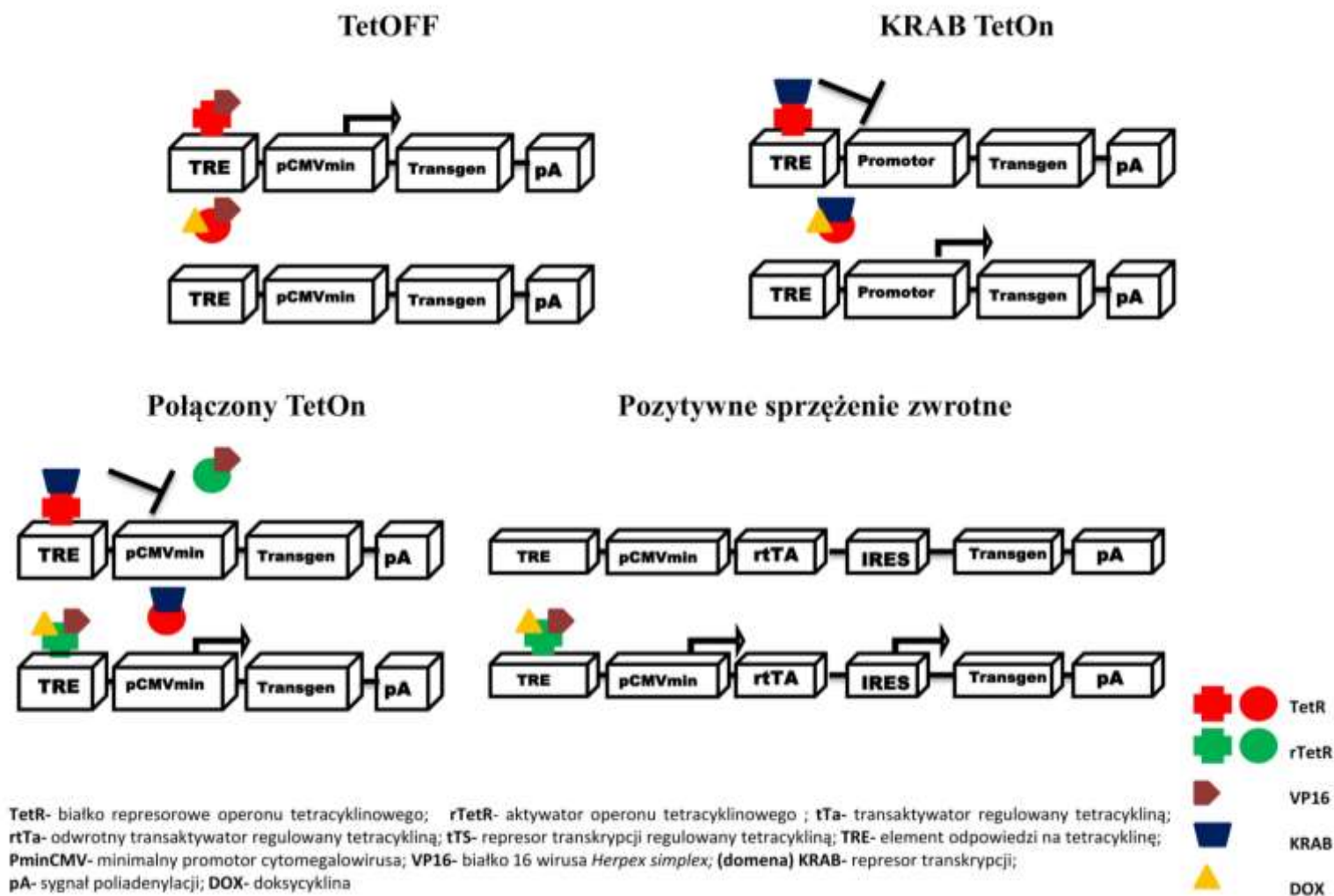


Ryc. 9. Schemat działania systemu typu Tet-On

W przypadku braku Dox w środowisku białko rtTA nie jest związane z sekwencją TRE, wobec czego nie zachodzi transkrypcja transgeny. W następstwie przyłączenia Dox do rTetR zachodzi zmiana konformacji białka rTetR, której skutkiem rTetR wiąże się do elementu odpowiedzi TRE w DNA i tym samym rekrutuje domenę aktywacyjną VP16 do regionu promotorowego transgeny, co skutkuje włączeniem transkrypcji transgeny. System typu Tet-On aktywowany jest jedynie przez Dox. Schemat działania systemu Tet-On zaprezentowano na **Ryc. 9**.

W systemie typu Tet-Off (**Ryc. 10**) transaktywator regulowany tetracykliną (tTA) jest związany z sekwencją TRE, wobec czego zachodzi konstytutywna ekspresja transgeny przy braku tetracykliny lub doksylicyny w środowisku. Dodatek induktorów (tetracyklina lub doksylicyna) do środowiska powoduje połączenie induktora z tTA i jako skutek zmianę konformacji białka tTA, a to z kolei skutkuje dysocjacją kompleksu od elementu odpowiedzi na tetracyklinę i wyłączeniem ekspresji transgeny. W trzecim rodzaju systemu tetracyklinowego represor transkrypcji regulowany tetracykliną (tTs), będący białkiem fuzyjnym składającym się z białka represorowego TetR oraz domeny represorowej KRAB białka Kox, umożliwia transkrypcję genów jedynie w obecności Dox.

W poszukiwaniach sposobów zmniejszenia poziomu niepożądanego ekspresji transgenów rozwinięto systemy: połączonego Tet-On oraz regulowany poprzez sprzężenie zwrotne system TetOn-TetOff (Ryc. 10.). Połączony system Tet-On zawiera zarówno rtTA, jak i tTs, ulegające równocześnie ekspresji. Przy braku Dox tTs pozostaje związany z sekwencją TRE i hamuje niepożądaną ekspresję transgenów. W obecności Dox, rtTA wiąże się do TRE i aktywuje ekspresję transgenów, podczas gdy tTs pozostaje niezwiązany. W przypadku systemu regulowanego poprzez sprzężenie zwrotne TetOn-TetOff białka rtTA lub tTA oraz transgen znajdują się pod kontrolą minimalnego promotora CMV oraz są od siebie oddzielone dodatkowo sekwencją IRES (ang. internal ribosomal entry site). Ekspresja białka represorowego oraz transgenów zachodzi jednocześnie na jednym transkrypcie. Przy braku Dox ekspresja badanego genu jest wyłączona, natomiast dodatek induktora włącza jego ekspresję. Zanim jednak proces transkrypcji transgenów zostanie zainicjowany musi powstać odpowiednia ilość białka rtTA lub tTA celem pełnej aktywacji systemu [Stieger K. i współprac., 2009].



Ryc. 10. Rodzaje systemów tetracyklinowych

2. Założenia i cel pracy

Neurotrofiny stanowią grupę białek warunkujących wzrost, przeżycie i prawidłowy rozwój komórek nerwowych. Czynniki neurotroficzne 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.

Szereg prac wskazuje na różnice pomiędzy efektami biologicznymi indukowanymi przez poszczególne neurotrofiny w komórkach nerwowych. W domenach cytoplazmatycznych receptorowych kinaz tyrozynowych rodziny Trk są konserwowane sekwencje reszt aminokwasów rdzenia katalitycznego, natomiast domeny cytoplazmatyczne receptorowych kinaz tyrozynowych różnią się pod względem sekwencji reszt aminokwasów w miejscu przybłonowym, gdzie zachodzi rekrutacja białek adaptorowych oraz w miejscu rekrutacji PLC γ 1 w regionie C-końcowym białka Trk.

W procesie tworzenia się i wzrostu neurytów (neurytogenezy) niezbędna jest aktywacja kinazy fosfatydyloinozytolu PI3K oraz kinaz białkowych rodziny MAPK, będąca wynikiem m.in. rekrutacji PLC γ 1 do receptorowych kinaz tyrozynowych Trk.

Zasadniczym celem przeprowadzonych badań było wyjaśnienie znaczenia sekwencji regulatorowych w C-końcowym regionie białka TrkC (zarówno wiążących PLC γ 1, jak i bezpośrednio poprzedzających miejsce wiązania PLC γ 1) w indukcji neurytogenezy zależnej od TrkC.

Celem pośrednim, a tym samym niezbędnym narzędziem do realizacji zadania badawczego, było:

1. Otrzymanie modelu komórkowego z kontrolowaną ekspresją TrkC.
2. Analiza szlaków sygnałowych i procesu neurytogenezy w następstwie aktywacji fosfolipazy C γ 1 w kontekście zarówno aktywacji TrkA przez NGF, jak i TrkC przez NT3 w otrzymanym modelu komórkowym.

3. Materiały i Metody

3.1. Materiały

3.1.1. Linie komórkowe

Linia komórkowa **PC12-Tet-On** wyprowadzona z guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy szczura, zakupiona z firmy Clontech (Heidelberg, Niemcy).

3.1.2. Wektory

Tabela 3. Wektory

nazwa	opis	pochodzenie	Piśmiennictwo
wektory systemu tetracyklinowego	Linear Hygromycin Marker	zawiera gen oporności na higromycynę	Clontech BD Tet-Off and Tet-On Gene Expression System User Manual
	pTRE-tight-trkCmyc3	kodujący funkcjonalny TrkC typu dzikiego (wt), posiadający 3 znaczniki myc na C-końcu	Dr Kłopotowska Kłopotowska D. (rozprawa doktorska, 2007) Krawczyk i współpr., 2015
	pTRE-tight-trkC-Y820F	mutant TrkC z inaktywowanym miejscem wiązania PLCγ1 poprzez zamianę Tyr na Phe w kodonie 820	Dr Kłopotowska Kłopotowska D. (rozprawa doktorska, 2007) Krawczyk i współpr., 2015
	pTRE-tight-trkC-T817S/I819V	mutant TrkC z regionem C-końcowym (z miejscem wiązania PLCγ1) takim jak w TrkB poprzez zamianę Thr na Ser w kodonie 817 oraz Ile na Val w kodonie 819	Dr Kłopotowska Kłopotowska D. (rozprawa doktorska, 2007)
wektory systemu GAL4	pFR-Luc	posiada syntetyczny promotor z 5 miejscami wiązania białka GAL4 drożdży oraz gen reporterowy dla lucyferazy świetlika	Stratagene Stratagene's PathDetect trans-Reporting System
	pFA2-Elk1	zawiera gen kodujący domenę białka Gal4 połączoną z domeną aktywacyjną Elk1 pod kontrolą promotora CMV IE	Stratagene Stratagene's PathDetect trans-Reporting System
pozostałe	phRG-B	zawiera gen dla lucyferazy <i>Renilla</i> , bez promotora	Promega Promega's manual

3.1.3. Inne materiały

- Bakterie chemikomententne szczepu *E. coli* DH5 α (Invitrogen)
- Butelki hodowlane (Sarstedt, USA)
- Płytki hodowlane (6-, 12-, 24- i 96-dołkowe; CytoOne, USA)
- Komory 8-dołkowe do mikroskopii fluorescencyjnej (CC chamber slides, 8-well, Nunc-Labtek)
- Pipety plastikowe (HTL, Polska)
- Końcówki do pipet automatycznych (Sarstedt, Niemcy)
- probówki:
 - do PCR (Sarstedt, USA)
 - typu eppendorf (Sarstedt, USA)
 - typu Falcon 5mL do cytometrii przepływowej (BD)
- Pipety automatyczne (Socorex, Szwajcaria)
- Zestaw do izolacji plazmidów (EURx Plasmid MiniPrep DNA Purification Kit oraz Syngen IE Plasmid Midi Kit; Polska)
- Zestaw do ukierunkowanej mutagenyzy Transformer Site-Directed Mutagenesis Kit (Clontech Laboratories, Inc.)
- Membrana nitrocelulozowa (Bio-Rad, USA)
- Bibuła Whatman 3MM (GE Healthcare, Wielka Brytania)

3.1.4. Odczynniki

- cielęca surowica płodowa FCS (Cytogen)
- surowica końska HS (Cytogen)
- trypsyna (Sigma)
- Cell Dissociation Solution Non-enzymatic 1x (Sigma)
- penicylina (Sigma)
- streptomycyna (Sigma)
- G418 (Lab Empire)
- higromycyna B (Invitrogen)
- doksycyklina (Sigma)
- ampicylina (Sigma)
- kanamycyna (Sigma)
- DMEM high Glucose with L- Glutamine (Cytogen)
- OPTI- MEM/GlutaMAX (Invitrogen)
- poli-L- lizyna (Sigma)
- Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen)
- Scienceware Cloning Discs (Sigma)
- NGF (Sigma)
- NT3 (Pepro Tech, Inc.)
- Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)
- Passive Lysis Buffer (Promega)
- TRI Reagent® RT and BAN BN 191 (MRC, Cincinnati, USA)
- M-MLV Reverse Transcriptase (Promega)
- Polimeraza Taq (Eurx)
- SG qPCR EURx Master Mix (EURx)
- Page Protein Ladder (Thermo)
- GeneRuler 100bp (Thermo)
- Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker, ready to use (Thermo)
- Lambda DNA/ HindIII Marker, ready to use (Thermo)
- Enzymy resktrycyjne: PvuII, NotI, XhoI, SpeI, VspI (Thermo)
- APS (Lab Empire)
- TEMED (Sigma)
- Agaroza (Star Lab)
- Rotiphorese Gel (37:5:1) (Roth)
- Przeciwciała skierowane przeciwko:
 - TrkC (Upstate)
 - β -aktyna (Sigma)
 - phospho- p44/42 MAPK (ERK1/2) (Cell Signaling)
 - p44/42 MAPK (ERK1/2) (Cell Signaling)
 - phospho- p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (Cell Signaling)
 - p38 MAPK (Cell Signaling)
 - phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (Cell Signaling)
 - phospho- Akt (Ser473) (Cell Signaling)
 - total PLC γ 1 (Santa Cruz Biotechnology)
 - IRDye 800CW goat anti-rabbit IgG secondary antibody koniugat (LI-COR Biosciences)

- IRDye 800CW donkey anti-goat IgG secondary antibody koniugat (LI-COR Biosciences)
- IRDye 680RD donkey anti-mouse IgG secondary antibody koniugat (LI-COR Biosciences)
- barwniki:
 - YO-PRO-1 iodide (Molecular Probes)
 - Biotyna (BD Biosciences)
 - Pe-Cy7 (BD Biosciences)
 - Cy3(Millipore)
- inhibitory:
 - U0126 (Sigma)
 - U73122 (Sigma)

3.1.5. Bufory

Tabela 4. Skład i przeznaczenie buforów

nazwa	skład	przeznaczenie
TAE	40 mM Tris 20 mM kwas octowy 2 mM EDTA	bufor do elektroforezy agarozowej
4x Upper Tris	0,5M Tris pH 6,8 0,4% SDS	bufor do żelu górnego
4x Lower Tris	1,5M Tris pH8,8 0,4% SDS	bufor do żelu dolnego
4x Laemmli Sample Buffer	0,25 M Tris pH 6,8 6% SDS 40% sacharoza 0,04% błękit bromofenolowy 5% β -merkaptioetanol	bufor obciążający
HS+NaF	50mM Tris- HCl pH 7,5 5M NaCl 0,5% Igepal 50 mM NaF 0,1 mM Na_3VO_4 inhibitory proteaz: (2.5 mg/ml leupeptyna, 2.5 mg/ml aprotynina, 15 mg/ml benzamidyna, 1 mg/ml trypsyna) 0.1 M PMSF 0.5 M dithiothreitol	bufor do lizy komórek
SDS- PAGE running buffer	25 mM Tris 192 mM glicyna 0,1% SDS	bufor do elektroforezy
Transfer buffer	25 mM Tris pH 8,5 192 mM glicyna 20% metanol	bufor do transferu
TBS	50 mM Tris-HCl 0,9% NaCl	bufor do płukania membrany nitrocelulozowej
TBS- T	50 mM Tris-HCl 0,9% NaCl 0,05% Tween 20	bufor do płukania membrany nitrocelulozowej
Blocking buffer	1% kazeina w TBS	bufor do blokowania

3.1.6. Żele

Tabela 5. Skład żeli agarozowych i poliakrylamidowych

nazwa	skład	przeznaczenie
żel agarozowy	1,5% agarosa w TAE	rozdzielenie prążków DNA
żel górny	Rotiphorese Gel (37.5:1) 3,3 mL 4x upper buffer 5 mL H ₂ O 11,6 mL 10% APS 60 µl TEMED 20 µl	żel zagęszczający próby w elektroforezie białkowej
żel dolny (12%)	Rotiphorese Gel (37.5:1) 10 mL 4x lower buffer 6.25 mL H ₂ O 8.75 mL 10% APS 130 µl TEMED 14 µl	żel rozdzielający próby w elektroforezie białkowej

3.1.7. Sekwencje oligonukleotydów

Tabela 6. Sekwencje starterów zastosowanych w metodzie PCR i real-time PCR

metoda	gen	sekwencja	dlugość fragmentu [pz]	T _A [°C]
PCR	β-aktyna (szczur)	F: CTGTATGCCTCTGGTTCGTAC R: GCATCGGAACCGCTCATTG	349	61
	TrkC 1	F: CCACTTCCTTAAGGAGCCCT R: TGGGCCCTGAGGAACTTGTT	717	60
	TrkC 2	F: CCACTTCCTTAAGGAGCCCT R: GGCTATCTGACTGGCGATG	815	60
real-time PCR	<i>mhp1t</i> (mysz)	F: GTCTGCTGGTGAAAAGGACC R: CCCTGAAGTACTCATTATAGT	100	60
	TrkC	F: TCTTCAACAAGCCCACCCACTACA R: AATCTGTGCTCTCTGGAAAGGGCT	125	60
	p75 ^{NTR}	F: CCAGTACAGTGGCGGATATG R: CAGCCAAGATGGAGCAATAGA	108	60
	TrkA	F: AGAGACCCAGTGGAGAAGAA R: ACTAGGAGGAGGGCAGAAA	101	60

3.1.8. Aparatura

- Komora laminarna (NU-440; NU-Aire Inc., USA)
- Inkubator do hodowli komórkowych (Binder, Niemcy)
- Cytometr przepływowy (BD Biosciences, USA)
- NanoPhotometer (Implen, USA)
- Wirówka stołowa bez chłodzenia (MiniSpin) oraz z chłodzeniem (Eppendorf, Niemcy)
- Termocykler (Mastercycler gradient; Eppendorf, Niemcy)
- Termocykler do real-time PCR (Illumina, Japonia)
- Termomikser (Eppendorf, Niemcy)

- Aparat do elektroforezy białkowej (Bio-Rad, USA)
- Aparat do transferu (Bio-Rad, USA)
- Skaner do podczerwieni Odyssey Imaging System (LI-COR Biosciences, Niemcy)
- Mikroskop fluorescencyjny i świetlny z kontrastem fazowym (Zeiss, Niemcy)
- Luminometr GloMax-20/20 (Promega, USA)

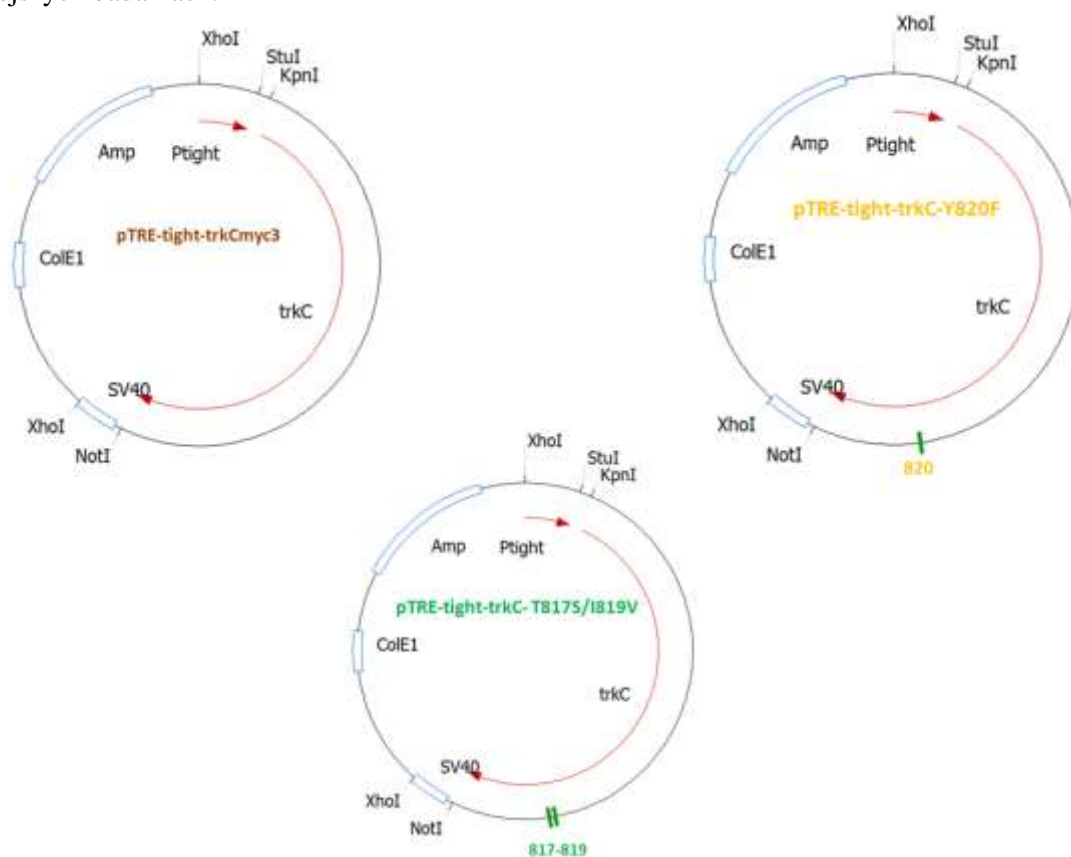
3.2. Metody

3.2.1. Hodowle komórkowe

Komórki PC12-Tet-On hodowane były w medium DMEM z dodatkiem: 4,5 g/L glukozy i L- Glutaminy, 10% surowicy końską i 5% cielęcej surowicy płodowej oraz w obecności antybiotyków: 100 U/mL penicyliny, 0.1 mg/mL streptomycyny i 0.1 mg/mL G418 w atmosferze z 5% CO₂ i w temperaturze 37°C.

3.2.2. Plazmidy systemu tetracyklinowego

Plazmid pMT21trkCmyc3 zawierający szczurzy gen *trkC* z 3 znacznikami c-Myc pochodził z firmy Regeneron Pharmaceutical, Inc (USA). Plazmid pTRE-tight-trkC (w skrócie: TrkCwt) otrzymano w wyniku wycięcia enzymami restrykcyjnymi XhoI/NotI fragmentu zawierającego cały gen *trkCmyc3* i wklonowania do plazmidu pTRE-tight w miejscach restrykcyjnych PvuII/NotI. Pozostałe plazmidy tj. pTRE-tight-trkC-Y820F (w skrócie TrkC820) oraz pTRE-tight-trkC-T817S/I819V (w skrócie: TrkC817-819) uzyskano drogą ukierunkowanej mutagenezy *in vitro* plazmidu pTRE-tight-trkC z zastosowaniem Transformer Site-Directed Mutagenesis Kit. Otrzymane plazmidy: TrkCwt, TrkC820 i TrkC817-819 umożliwiają ekspresję transgenu kodującego dany wariant TrkC zależną od induktora (doksycyliny, Dox) w systemie Tet-On. Szczegółowa metodyka otrzymania plazmidów systemu tetracyklinowego stanowiła przedmiot rozprawy doktorskiej Kłopotowska D., 2007. Poniższy schemat prezentuje plazmidy systemu tetracyklinowego użyte w niniejszych badaniach.



Ryc. 11. Plazmidy systemu tetracyklinowego

3.2.3. Transfekcja

3.2.3.1. Stabilna transfekcja komórek PC12-Tet-On

Komórki PC12-Tet-On wysiewano w medium DMEM bez dodatku antybiotyków w gęstości 150 000 kom./dołek na 24-dołkową płytkę hodowlaną opłaszczoną uprzednio poli-L-lizyną (rozcieńczoną w proporcji 1:1 przez PBS). Przed wykonaniem transfekcji plazmidy pTRE-tight-trkC, pTRE-tight-trkC-Y820F oraz pTRE-tight-trkC-T817S/I819V linearyzowano przy użyciu enzymów restrykcyjnych VspI (dla TrkCwt) oraz SpeI (dla TrkC820 i TrkC817-819). Po 24 h hodowli komórki transfekowano 660 ng/dołek plazmidowego DNA (pTRE-tight-trkC, pTRE-tight-trkC-Y820F lub pTRE-tight-trkC-T817S/I819V) oraz 33 ng/dołek Linear Hygromycin Marker (LHM) z zastosowaniem Lipofectamine 2000 zgodnie z załączonym protokołem przez producenta. Po 6 h od transfekcji medium hodowlane zastąpiono nowym medium z dodatkiem 0.1 mg/mL G418, a po trzech dniach dodano jako antybiotyk selekcyjny higromycynę B w stężeniu 0.15 mg/mL. Po trzech tygodniach trwania selekcji klony przenoszono na płytki 24-dołkowe opłaszczone poli-L-lizyną z użyciem krążków do klonowania. Następnie hodowle wybranych klonów prowadzono w obecności 0.1 mg/mL G418 oraz 0.075 mg/mL higromycyny B.

3.2.3.2. Przejściowa transfekcja komórek stabilnych transfektantów PC12-Tet-On za pomocą plazmidów zawierających gen reporterowy lucyferazy świetlika

Klony stabilnych transfektantów komórek PC12-Tet-On wysiewano w medium OPTI w gęstości 150 000 kom./dołek na 24-dołkową płytkę hodowlaną opłaszczoną uprzednio poli-L-lizyną. Po 24 h hodowli komórki transfekowano mieszaniną plazmidowego DNA zawierającą 400ng/dołek pHRG-B, 400ng/dołek pFR-Luc oraz 20 ng/dołek pFA2-Elk1 z zastosowaniem Lipofectamine 2000 zgodnie z załączonym protokołem przez producenta. Po 6 h od transfekcji medium OPTI zastąpiono nowym. Po 24 h od przeprowadzenia transfekcji komórki stymulowano Dox w stężeniu 1.0 $\mu\text{g/mL}$ przez 24 h. Komórki traktowane lub nietraktowane Dox następnie traktowano inhibitorem U73122 w stężeniu końcowym 1 μM przez 30 min., a następnie traktowano 10ng/mL NT3 przez 5 h. Po tym czasie przeprowadzono lizę komórek z zastosowaniem 100 μL buforu PLB. Do testu DLR użyto 5 μL lizatu.

3.2.4. Cytometria przepływowa

Komórki wybranych klonów wysiewano na płytkę 6-dołkową w gęstości $1,5 \times 10^6$ kom./dołek w medium z dodatkiem 0.1 mg/mL G418 oraz 0.075 mg/mL higromycyny B. Następnego dnia komórki traktowano 1.0 $\mu\text{g/mL}$ Dox przez 24 h. Komórki zawieszono w 1 mL Cell Dissociation Solution 1x i wirowano przez 5 min. przy 300 rpm. Następnie próbki płukano 2 x po 500 μL PBS z dodatkiem 2% FCS i wirowano przez 5 min. przy 300 rpm. Do prób właściwych dodano 5 μL PBS z 1% HS oraz 100 μL przeciwciała anti-TrkC (1:500) i inkubowano przez 20 min. na lodzie. Następnie komórki płukano 2 x po 500 μL PBS z dodatkiem 2% FCS i wirowano przez 5 min. przy 300 rpm. Dodano 5 μL PBS z 1% HS oraz 100 μL koniugatu przeciwciała z biotyną (1:500) i inkubowano przez 20 min. na lodzie, po czym powtórzono procedurę płukania. Następnie próby inkubowano w 100 μL Pe-Cy7Streptawidyna (1:1000) na lodzie przez 20 min., komórki płukano 2 x po 500 μL PBS z dodatkiem 2% FCS i ostatecznie zawieszono w 500 μL PBS z dodatkiem 2% FCS.

Próby kontrolne stanowiły próbki nieznakowane przeciwciałem lub znakowane jedynie koniugatem 100 μL Pe-Cy7Streptawidyna (1:1000). Odczyty wykonywano na cytometrze przepływowym firmy BD Biosciences, a wyniki analizowano z użyciem oprogramowania WinMDI.

3.2.5. Izolacja RNA

Komórki wybranych klonów wysiewano na płytkę 12-dołkową uprzednio opłaszczoną poli-L- lizyną w gęstości $5,8 \times 10^5$ kom./dołek w medium z dodatkiem 0.1 mg/mL G418 oraz 0.075 mg/mL higrymycyny B. Komórki stymulowano doksycykliną w stężeniach 0.01 $\mu\text{g/mL}$, 0.05 $\mu\text{g/mL}$, 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 1.0 $\mu\text{g/mL}$ i 5.0 $\mu\text{g/mL}$ przez 24 h. Po usunięciu medium hodowlanego przeprowadzono lizę komórek przy użyciu 1000 μl TRI Reagent RT. Lizaty pozostawiono na 7 min. w temperaturze pokojowej, a następnie dodano 50 μl odczynnika BAN, który służy do ekstrakcji RNA od DNA oraz białek. Próbki wirowano przez 15 min. przy 12000 x g w 4°C celem rozdzielenia faz. Fazę wodną, zawierającą RNA, pobrano do nowej probówki typu eppendorf i dodano 500 μL alkoholu izopropylowego w celu strącenia RNA. Próbki pozostawiono na 20 min. w temperaturze -20°C i wirowano przez 10 min., przy 12000 x g w 4°C. Odrzucono supernatant, a do powstałego osadu dodano 200 μl 75% alkoholu etylowego i wirowano przez 5 min. przy 7500 x g w 4°C. Usunięto resztki alkoholu etylowego i osad zawieszano w 20 μL sterylnej wody. Czystość RNA oceniano poprzez pomiar absorbancji przy długościach fali $\lambda = 260$ nm, $\lambda = 280$ nm, natomiast jego jakość poprzez wykonanie elektroforezy w 1.5% żelu agarozowym z zastosowaniem bromku etydyny.

3.2.6. Reakcja odwrotnej transkrypcji- RT

Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono z użyciem M-MLV Reverse Transcriptase. Próbki oczyszczonego RNA podzielono na dwie próby: kontrolną (RT⁻, w której wszystkie reagenty oprócz RNA zastąpiono przez 16.7 μL sterylnej wody wolnej od nukleaz) oraz właściwą (RT⁺). Mieszanina reakcyjna dla prób właściwych zawierała 1 μg RNA oraz 1 μL roztworu heksametrów. Następnie próbkę ogrzewano w termocyklerze przez 5 min. w 70°C, następnie dodano kolejno: 1,3 μL 10mM dNTP, 5 μL 10 x buforu dostarczonego przez producenta oraz 1 μL enzymu M-MLV Reverse Transcriptase. Reakcję prowadzono w objętości 25 μL . Próbki inkubowano przez 40 min. w 37°C, 40 min. w 42°C oraz 10 min. w 70°C. Do mieszaniny reakcyjnej dodano 25 μL sterylnej wody po zakończonej reakcji. Otrzymane cDNA przechowywano w temperaturze -20°C.

3.2.7. Reakcja PCR

Reakcję PCR prowadzono z użyciem polimerazy DNA Taq (Eurx) zgodnie z zaleceniami producenta. Mieszanina reakcyjna zawierała: 3,5 μL 1 x wyjściowo rozcieńczonego cDNA otrzymanego w reakcji RT, 2.5 μL Buforu A dostarczonego przez producenta, 3 μL MgCl_2 , 0.4 μL 5mM dNTP, 2.5 μL 4 μM starterów (sekwencje oligonukleotydów podano w dziale 3.1.7.) oraz 0.6 μL polimerazy Taq. Całość uzupełniano sterylną wodą do objętości końcowej 25 μL . Po wstępnej denaturacji matrycy przez 3 min. w 95°C zastosowano 29 cykli obejmujących: denaturację w 95°C (30 sek.), hybrydyzację w temperaturach 60°C (TrkC1/2) i 61°C (β -aktyna) przez 60 sek. oraz wydłużanie w temperaturze 72°C (60 sek.). Końcowe wydłużanie prowadzono przez 5 min. w temperaturze 72°C. Produkt PCR rozdzielany był w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem 0.5 $\mu\text{g/mL}$ bromku etydyny. Na żel nanoszono 10 μL mieszaniny reakcyjnej oraz 4 μL molekularnego standardu mas (Gene Ruler 100bp).

3.2.8. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR)

Reakcja real-time PCR prowadzona była na 48-dołkowych płytkach polipropylenowych w aparacie Eco Real-Time PCR System; Illumina. Każdy z dołków zawierał: 2.5 μL 10 x rozcieńczonej matrycy po reakcji RT, po 1.25 μL 4 μM starterów (sekwencje oligonukleotydów podano w dziale 3.1.7) oraz 5 μL enzymu SG qPCR EURx Master Mix, zawierającego barwnik fluorescencyjny SYBR Green interkalujący DNA. Po czasie aktywacji polimerazy przez 10 min. w 95°C w każdym cyklu następowała denaturacja matrycy (10 sek., 95°C), łączenie starterów (15 sek., 60°C) oraz synteza (15 sek. 72°C). Reakcję prowadzono przez 45 cykli. Wyniki normalizowano względem endogennej kontroli, którą był transkrypt genu fosforybozylotransferazy hipoksantynowo-guaninowej (*hprt*) i analizowano z zastosowaniem metody $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$.

3.2.9. Pomiar stężenia RNA oraz DNA

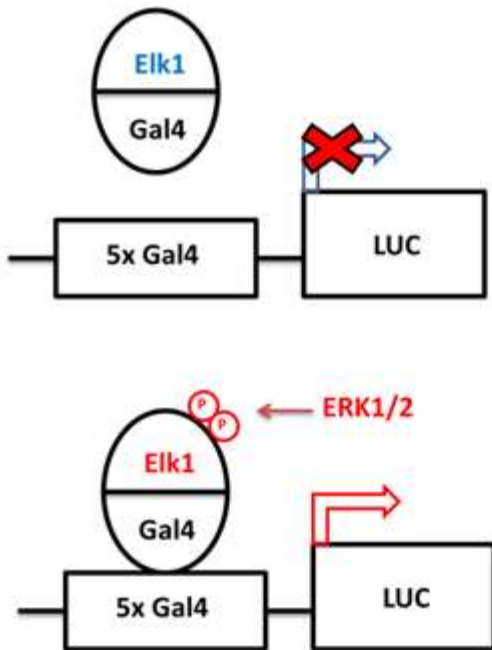
Pomiar stężenia i wyznaczenie współczynnika czystości wyizolowanych kwasów nukleinowych (DNA, RNA) oznaczano poprzez pomiar absorbancji przy długości fali $\lambda = 260 \text{ nm}$, $\lambda = 280 \text{ nm}$ oraz $\lambda = 320 \text{ nm}$ w aparacie NanoPhotometer.

3.2.10. Western Blot

Stabilne transfektanty komórek PC12-Tet-On wysiewano na płytkę 6-dołkową uprzednio opłaszczoną poli-L-lizyną w gęstości 1×10^6 kom./dołek i hodowano przez 24 h w medium z 0.5% zawartością FCS i 0.5% zawartością HS celem głodzenia komórek. Skład buforu został opisany w Tabeli 4 w rozdziale 3.1.5. Komórki stymulowano Dox w stężeniach 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ przez 24 h. Następnie dodawano 100 ng/mL NGF lub 100 ng/mL NT3 prowadząc stymulację w czasie 5 min., 15 min. i 5 h. Po tym czasie płytkę z komórkami umieszczono na lodzie, odebrano medium hodowlane, płukano 2 x PBS i poddano lizie z użyciem buforu HS z dodatkiem inhibitorów proteaz, fosfataz, 0.05% β -merkaptotanoolem i 4 x buforem Laemmli. Lizaty zebrano do probówek typu eppendorf i gotowano w 99°C przez 10 min. w termomikserze. Skład żeli poliakrylamidowych podano w Tabeli 5 w rozdziale 3.1.6. Elektroforezę prowadzono przez 35 min. przy 100V, a następnie 2 h przy 200V. Transfer na membranę nitrocelulozową prowadzono przez 2 h przy 200V i 200mA. Następnie membranę blokowano w 1% roztworze kazeiny w TBS przez 2 h i płukano 2 x TBS oraz 1 x TBS-T, po czym inkubowano przez noc w 4°C z odpowiednimi przeciwciałami skierowanymi przeciwko: TrkC (1:1000), β -aktyna (1:10000), phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (1:2000), p44/42 MAPK (ERK1/2) (1:1000), phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (1:1000), p38 MAPK (1:1000), phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (1:1000), phospho-Akt (Ser473) (1:1000). Membrany płukano 4 x TBS-T, a następnie inkubowano z przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z fluorochromami: IRDye 800CW anty-królicze IgG (ERK, p38, JNK, Akt, PLC γ 1, pTyr), IRDye 800CW anty-kozie IgG (TrkC) i IRDye 680RD anty-mysie IgG (β -aktyna) przez 1 h w temperaturze pokojowej. Po inkubacji membrany płukano 4 x TBS-T i wykonywano odczyty z wykorzystaniem skanera podczerwieni ODYSSEY Infrared Imaging System.

3.2.11. Analiza DLR

DLR (ang. dual luciferase assay; Promega) - podwójny system reporterowy lucyferazy polega na jednoczesnej ekspresji dwóch genów reporterowych, z których jeden koduje lucyferazę świetlika *Photinus pyralis* pod kontrolą promotora zawierającego 5 tandemowych powtórzeń miejsc wiązania drożdżowego białka Gal4 (Stratagene), natomiast drugi koduje lucyferazę gąbki morskiej *Renilla reniformis* i stanowi wewnętrzną kontrolę. Dodatkowo komórki są transfekowane plazmidem ekspresyjnym z genem kodującym białko fuzyjne składające się z domeny aktywacyjnej badanego czynnika transkrypcyjnego (tu: Elk1) i z domeny wiążącej DNA drożdżowego białka Gal4. Związanie się białka fuzyjnego z promotorem genu kodującego lucyferazę świetlika nie włącza ekspresji genu reporterowego, lecz dopiero w wyniku fosforylacji domeny aktywacyjnej czynnika transkrypcyjnego (tu: Elk1 przez ERK1/2) zostaje uruchomiony proces transkrypcji genu lucyferazy. Wobec powyższego wybrany system reporterowy umożliwia ilościowy pomiar aktywności Erk1/2 w transfekowanych komórkach.



Ryc. 12. Zasada działania systemu Gal4-Elk1.

Lizaty komórkowe otrzymane według procedury opisanej w punkcie 3.2.3.2. rozmrażano na lodzie. Przygotowywano roztwór substratu dla lucyferazy gąbki morskiej (Stop & Glo) poprzez zmieszanie 390 μ l buforu Stop & Glo z 7,8 μ l substratu Stop & Glo. Do próbek typu Eppendorf dodawano 15 μ l LARII (ang. Luciferase Assay Reagent II, substrat dla lucyferazy świetlika), a następnie dodawano 5 μ l lizatu komórkowego i po 15 sekundach od dodania lizatu mierzono luminescencję świadczącą o ilości lucyferazy świetlika w próbce lizatu. Kolejno do tej samej próbki dodawano 15 μ l przygotowanej mieszaniny Stop & Glo, mieszano i po 15 sekundach mierzono ponownie luminescencję, która tym razem świadczyła o ilości lucyferazy gąbki morskiej zawartej w tej samej próbce. Pomiar wykonywano 2 razy.

Aktywność lucyferazy świetlika (FLU) w przedstawionym układzie doświadczalnym uzależniona jest od warunków eksperymentalnych (tu: od traktowania komórek induktorem Dox oraz ligandem NT3 i inhibitorem U73122), natomiast aktywność gąbki morskiej (RLU) stanowi wewnętrzną kontrolę, która umożliwia otrzymanie wyników niezależnych od zmiennej wydajności transfekcji, niedokładności pipetowania i innych czynników. Wyniki przedstawiono jako znormalizowaną aktywność lucyferazy (FLU/RLU) dzieląc aktywność lucyferazy świetlika (FLU) przez aktywność lucyferazy gąbki morskiej (RLU).

3.2.12. Mikroskopia fluorescencyjna

Stabilne transfektanty komórek PC12-Tet-On wysiewano do komory 8-dołkowej uprzednio opłaszczonej poli-L-lizyną w gęstości 2×10^4 kom./dołek w medium DMEM z dodatkiem antybiotyków selekcyjnych G418 i higromycyny B. Komórki następnie traktowano $1 \mu\text{g/mL}$ Dox przez 24 h, bądź pozostawiono nietraktowane. Następnie komórki utrwalono przy użyciu 70% etanolu przez 10 min., płukano PBS z dodatkiem 0.01% Tween (PBS-T) i permeabilizowano przez 30 min. buforem PBS z 0.3% Triton X-100. Następnie komórki inkubowano przez 30 min. w roztworze 10% surowicy końskiej w PBS, a następnie znakowano przeciwciałem skierowanym przeciwko TrkC (1:700) przez 1 h. Po przemyciu preparatu PBS-T komórki inkubowano przez 30 min. z koniugatem przeciwciała z Cy3 (1:1200), a następnie przez 10 min. jądra komórek barwiono roztworem YO-PRO-1. Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego firmy Carl Zeiss Microscopy. Na preparatach jądra komórkowe wybarwione zostały na zielono (przez YO-PRO-1 interkalujący DNA), podczas gdy receptor TrkC został wybarwiony na kolor czerwony (przez koniugat Cy3).

3.2.13. Pomiar długości neurytów z zastosowaniem mikroskopu świetlnego z kontrastem fazowym

Stabilne transfektanty komórek PC12-Tet-On wysiewano na płytkę 96-dołkową uprzednio opłaszczoną poli-L-lizyną w gęstości 4×10^3 kom./dołek i hodowano przez 48 h w medium z 0.5% zawartością FCS i 0.5% zawartością HS w celu synchronizacji cyklu komórkowego i zahamowania proliferacji komórek na rzecz ich różnicowania się w kierunku komórek tworzących struktury neurypo-dobne. Komórki stymulowano $1 \mu\text{g/mL}$ Dox przez 24 h celem indukcji ekspresji TrkC, a następnie w niektórych próbach traktowano przez 30 min. inhibitorem kinaz MAPK (U0126) w stężeniu końcowym $10 \mu\text{M}$. Następnie komórki traktowano NGF lub NT3 w stężeniach $0,1 \text{ ng/mL}$, 10 ng/mL i 50 ng/mL , bądź pozostawiono komórki stymulowane jedynie Dox. Dox, U0126, NGF i NT3 były dodawane co drugi dzień wraz ze świeżym medium hodowlanym. Po siedmiu dniach prowadzenia hodowli oznaczono proporcję komórek wytwarzających neuryty do wszystkich komórek w danej hodowli oraz długości neurytów zostały zmierzone z wykorzystaniem oprogramowania Zeiss-ZEN. Jako komórki z neurytami („neurite-bearing cells”) oznaczano te komórki, które znajdowały się w fazie elongacji procesu neurytogenezy i wytwarzały wypustki z ciała komórki dłuższe niż jej średnica w środku geometrycznym komórki. Komórki z krótszymi wypustkami oznaczano jako te, które są w fazie inicjacji procesu neurytogenezy („sprouting cells”). Jako komórki różnicujące się oznaczano jako te komórki, które znajdowały się albo jeszcze w fazie inicjacji procesu neurytogenezy, albo już w fazie elongacji neurytogenezy. Do oceny procesu tworzenia się neurytów stosowano trzy parametry: procent komórek w fazie inicjacji, elongacji i długości neurytów w μm .

3.2.14. Statystyka

Obliczano średnią arytmetyczną i odchylenie standardowe jako wartość przeciętną i miarę rozrzutu wyników real-time PCR z niezależnych doświadczeń. Różnice między dwiema grupami komórek (ten sam klon, ale różne traktowanie) oceniano testem t Studenta. Liczby komórek z neurytami lub bez neurytów oceniano testem Fishera dla tabel 2x2. Rozkłady długości neurytów w dwóch porównywanych grupach oceniano testem U Manna-Whitneya. Obliczenia wykonano za pomocą programów znajdujących się na stronach internetowych *VassarStats.net* oraz *socscistatistics.com*. Hipoteza zerowa (brak różnicy) była odrzucana na poziomie istotności 0.05.

4. Wyniki

4.1. Otrzymanie stabilnych transfektantów komórek PC12-Tet-On

Linia komórkowa PC12 (pheochromocytoma) została wyprowadzona z nowotworu rdzenia nadnerczy szczura [Greene i Tischler, 1976]. Komórki PC12 w odpowiedzi na stymulację NGF różnicują się w kierunku komórek zbliżonych do neuronów. PC12 zostały poddane manipulacjom genetycznym (stabilna transfekcja genem kodującym rtTA) przez Jörnvall i współpracowników [2001], w wyniku których otrzymano linię komórek PC12-Tet-On, które umożliwiają ekspresję transgenu indukowaną przez Dox.

Komórki PC12-Tet-On były następnie (w badaniach własnych) stabilnie transfekowane genami kodującymi TrkC typu dzikiego (w skrócie: TrkCwt) oraz genami kodującymi dwa warianty białka TrkC z mutacjami w miejscu wiązania PLC γ 1 lub w bezpośrednim sąsiedztwie tego miejsca w części C-końcowej TrkC:

(1) wariant TrkC z inaktywowanym miejscem wiązania PLC γ 1 w wyniku zastąpienia reszty aminokwasu tyrozyny w kodonie 820 przez fenyloalaninę, TrkC-Y820F (w skrócie: TrkC820);

(2) wariant TrkC z C-końcem (zawierającym miejsce wiązania PLC γ 1) takim jak w TrkB w wyniku substytucji reszt aminokwasów: treoniny na serynę w kodonie 817 i izoleucyny na walinę w kodonie 819, TrkC-T817S/I819V (w skrócie: TrkC817-819).

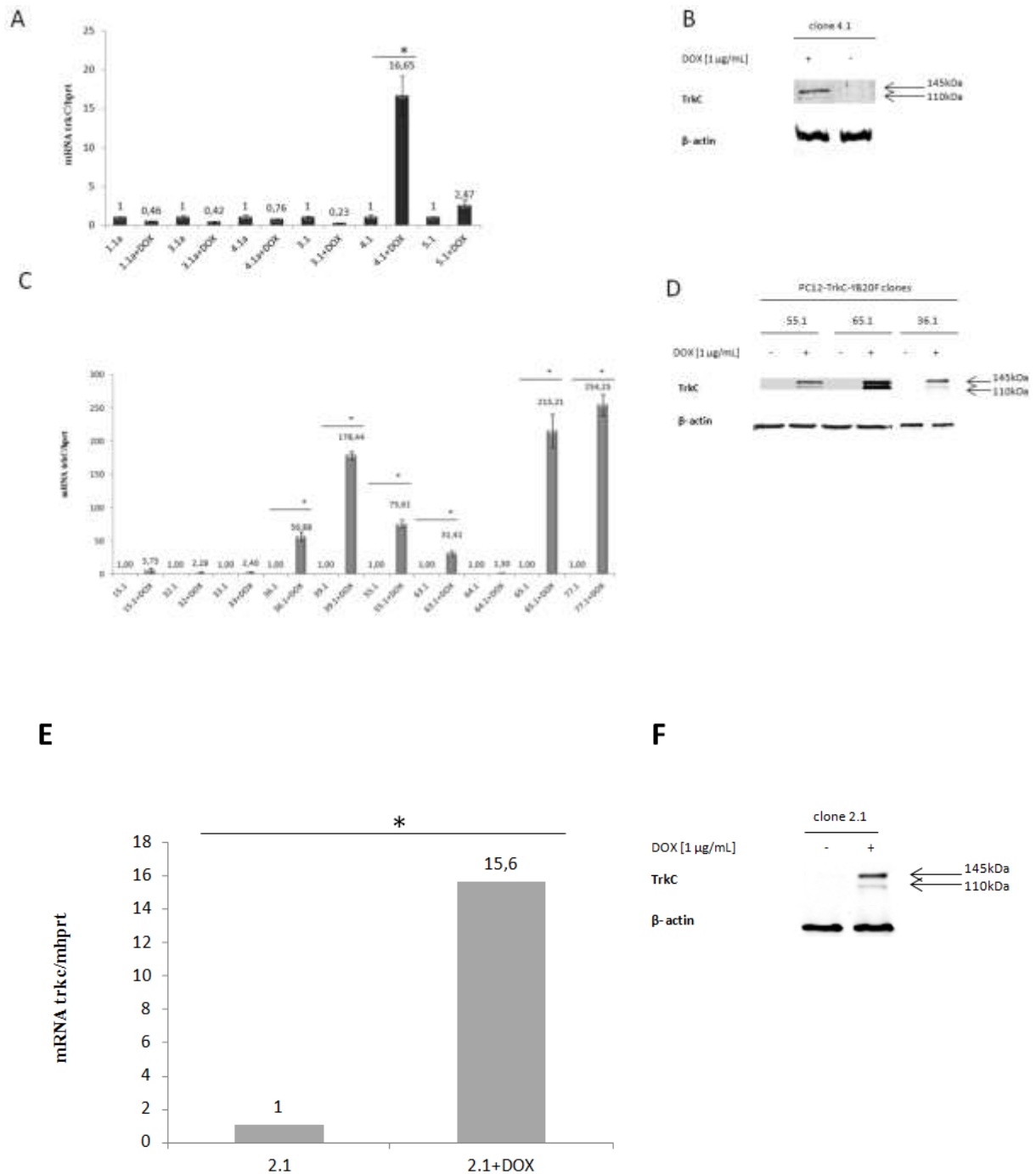
W otrzymanym modelu komórkowym ekspresja transgenu (*trkC*) znajduje się pod kontrolą promotora tetracyklinowego (P_{tight}) i może być uruchomiona przez białko rtTA połączone z Dox, czyli w następstwie dodania Dox do medium hodowlanego.

Spośród komórek PC12-Tet-On transfekowanych genami kodującymi warianty TrkC przeprowadzono selekcję klonów opornych na higromycynę, która polegała na badaniu ekspresji TrkC zależnej od Dox, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka.

Otrzymano 6 potencjalnych klonów komórek TrkCwt, w których techniką RT-PCR potwierdzono obecność mRNA *trkC*. Następnie komórki poddano traktowaniu 1 μ g/mL Dox, bądź pozostawiono nietraktowane i określono poziom ekspresji mRNA *trkC* z zastosowaniem techniki Real-Time PCR. Spośród 6 otrzymanych klonów komórek PC12-TrkC-wt jeden z nich charakteryzował się wykrywalną na poziomie białka ekspresją TrkC (Ryc. 13. A, B).

Odmianą strategię zastosowano w przypadku klonów TrkC820. W pierwszej kolejności 29 potencjalnych klonów komórek TrkC820 zostało poddanych traktowaniu 1 μ g/mL Dox przez 24 h, następnie wyizolowano z nich RNA i wykonano RT-PCR celem detekcji mRNA *trkC*. Tylko w 10 klonach potwierdzono obecność mRNA *trkC* i wykonano na nich reakcję Real-Time PCR. Sześć klonów TrkC820 charakteryzowało się wysoką ekspresją TrkC w wyniku stymulacji Dox na poziomie mRNA, natomiast dla 3 z nich (36.1, 55.1 i 65.1) wykazano ekspresję TrkC na poziomie białka (Ryc. C, D).

W przypadku komórek TrkC-T817S/I819V otrzymano 4 potencjalne klony komórek TrkC817-819, jednak tylko w jednym z nich wykazano ekspresję TrkC zależną od Dox na poziomie mRNA i białka (Ryc. E, F).



Ryc. 13. Ekspresja egzogenego TrkC w klonach stabilnych transfektantów komórek PC12-Tet-On pod kontrolą promotora tetracyklinowego P_{tight} . Wykresy prezentują zmiany poziomów mRNA *trkC* komórek traktowanych i nietraktowanych Dox. Ekspresja TrkC została wyrażona jako krotność poziomu mRNA komórek stymulowanych Dox do komórek nietraktowanych, znormalizowana względem mRNA *hprt* (A, C, E). Dane prezentują średnie z wyników otrzymanych z trzech niezależnych eksperymentów (* $p < 0.05$). Ekspresja TrkC została potwierdzona na poziomie białka (B, D, F). Prążki 145 kDa i 110 kDa odpowiadają glikozylowanej i nieglikozylowanej formie TrkC.

Do dalszych analiz wybrano następujące klony:

- a) TrkCwt- klon 4.1
- b) TrkC820- klony: 36.1; 55.1; 65.1
- c) TrkC817-819- klon 2.1

Celem potwierdzenia transkrypcji genu kodującego pożądaną wariant TrkC w otrzymanych klonach komórek PC12-Tet-On, wyizolowano z komórek RNA, otrzymano cDNA oraz wykonano reakcję amplifikacji fragmentu *trkC*, który następnie poddano sekwencjonowaniu. Na **Ryc. 14.** zaprezentowano sekwencję genów kodujących TrkC typu dzikiego i dwóch wariantów białka TrkC z mutacjami w miejscu wiązania PLC γ 1 lub w bezpośrednim sąsiedztwie tego miejsca.

A

TrkCwt 4.1- Forward

```

                                     starter
trkcwt      CCCGAGTCTGCCAAAAGAAGTATATGATGTCATGCTGGGGTGCTGGCAGAGGGAACCAC 2760
4.1F      -----

trkcwt      AACAGCGACTGAATATTAAGGAGATCTACAAAATCCTCCATGCTTTGGGGAAGGCCACCC 2820
4.1F      -----TGCTTTGGGGA-GGCCACCC 19
                                     *****

trkcwt      CAATCTACCTGGACATTCTTGGCGCCCGGGCGGAGAGCAGAAGCTGATATCCGAAGAAG 2880
4.1F      CAATCTACCTGGACATTCTTGGCGCCCGGGCGGAGAGCAGAAGCTGATATCCGAAGAAG 79
                                     *****

trkcwt      ACCTCGGCGGAGAGCAGAAGCTCATAAGTGAGGAAGACTTGGGCGGAGAGCAGAAGCTTA 2940
4.1F      ACCTCGGCGGAGA-----ATT----- 95
                                     *****
                                     * *
    
```

TrkCwt 4.1- Revers

```

                                     starter
trkcwt      CCCGAGTCTGCCAAAAGAAGTATATGATGTCATGCTGGGGTGCTGGCAGAGGGAACCAC 2760
4.1R      -----TTT-----CCAC 7
                                     * *                                     ****

trkcwt      AACAGCGACTGAATATTAAGGAGATCTACAAAATCCTCCATGCTTTGGGGAAGGCCACCC 2820
4.1R      AACAGCGACTGAATATTAAGGAGATCTACAAAATCCTCCATGCTTTGGGGAAGGCCACCC 67
                                     *****

trkcwt      CAATCTACCTGGACATTCTTGGCGCCCGGGCGGAGAGCAGAAGCTGATATCCGAAGAAG 2880
4.1R      CAATCTACCTGGAC----- 81
                                     *****
    
```

B

TrkCwt 4.1- Forward

```

                                     starter
trkc820     CCCGAGTCTGCCAAAAGAAGTATATGATGTCATGCTGGGGTGCTGGCAGAGGGAACCAC 2760
4.1F      -----

trkc820     AACAGCGACTGAATATTAAGGAGATCTACAAAATCCTCCATGCTTTGGGGAAGGCCACCC 2820
4.1F      -----TGCTTTGGGGA-GGCCACCC 19
                                     *****

trkc820     CAATCTTCCTGGACATTCTTGGCGCCCGGGCGGAGAGCAGAAGCTGATATCCGAAGAAG 2880
4.1F      CAATCTACCTGGACATTCTTGGCGCCCGGGCGGAGAGCAGAAGCTGATATCCGAAGAAG 79
                                     *****

trkc820     ACCTCGGCGGAGAGCAGAAGCTCATAAGTGAGGAAGACTTGGGCGGAGAGCAGAAGCTTA 2940
4.1F      ACCTCGGCGGAGA-----ATT----- 95
                                     *****
                                     * *
    
```

TrkCwt 4.1- Revers

```

                                     starter
trkc820     CCCGAGTCTGCCAAAAGAAGTATATGATGTCATGCTGGGGTGCTGGCAGAGGGAACCAC 2760
4.1      -----TTT-----CCAC 7
                                     * *                                     ****

trkc820     AACAGCGACTGAATATTAAGGAGATCTACAAAATCCTCCATGCTTTGGGGAAGGCCACCC 2820
4.1      AACAGCGACTGAATATTAAGGAGATCTACAAAATCCTCCATGCTTTGGGGAAGGCCACCC 67
                                     *****

trkc820     CAATCTTCCTGGACATTCTTGGCGCCCGGGCGGAGAGCAGAAGCTGATATCCGAAGAAG 2880
4.1      CAATCTACCTGGAC----- 81
                                     *****
    
```

C

TrkC820 36.1 Forward

```

TrkC820          CCGGAGTCTGCCCAAAGAAGTATATGATGTCATGCTGGGGTGCTGGCAGAGGGAACCAC 2760
36.1F          -----
TrkC820          AACAGCGACTGAATATTAAGGAGATCTACAAAATCCTCCATGCTTTGGGGAAGGCCACCC 2820
36.1F          -----TAA---ATCT-----CATGCTTTGGGGA-GGCCACCC 28
                  ***      ***          *****
TrkC820          CAATCTTCTCTGGACATTCCTTGGCGGCCCGGGCGGAGAGCAGAAGCTGATATCCGAAGAAG 2880
36.1F          CAATCTTCTCTGGACATTCCTTGGCGGCCCGGGCGGAGAGCAGAAGCTGATATCCGAAGAAG 88
                  *****
TrkC820          ACCTCGGCGGAGAGCAGAAGCTCATAAGTGAGGAAGACTTGGGCGGAGAGCAGAAGCTTA 2940
36.1F          ACCTCGGCGGAGA----- 101
                  *****
    
```

TrkC820 36.1 Revers

```

TrkC820          CCGGAGTCTGCCCAAAGAAGTATATGATGTCATGCTGGGGTGCTGGCAGAGGGAACCAC 2760
36.1R          -----TCCAC 5
                  ****
TrkC820          AACAGCGACTGAATATTAAGGAGATCTACAAAATCCTCCATGCTTTGGGGAAGGCCACCC 2820
36.1R          AACAGCGACTGAATATTAAGGAGATCTACAAAATCCTCCATGCTTTGGGGAAGGCCACCC 65
                  *****
TrkC820          CAATCTTCTCTGGACATTCCTTGGCGGCCCGGGCGGAGAGCAGAAGCTGATATCCGAAGAAG 2880
36.1R          CAATCTTCTCTGGACATC--TGGCGCCC--GTCGAGAGC-----GAYG----- 103
                  *****      * * * * *      * *
    
```

D

TrkC820 55.1 Forward

```

trkc820          CCGGAGTCTGCCCAAAGAAGTATATGATGTCATGCTGGGGTGCTGGCAGAGGGAACCAC 2760
55.1F          -----
trkc820          AACAGCGACTGAATATTAAGGAGATCTACAAAATCCTCCATGCTTTGGGGAAGGCCACCC 2820
55.1F          -----TGCTTTGGGGA-GGCCACCC 19
                  *****
trkc820          CAATCTTCTCTGGACATTCCTTGGCGGCCCGGGCGGAGAGCAGAAGCTGATATCCGAAGAAG 2880
55.1F          CAATCTTCTCTGGACATTCCTTGGCGGCCCGGGCGGAGAGCAGAAGCTGATATCCGAAGAAG 79
                  *****
trkc820          ACCTCGGCGGAGAGCAGAAGCTCATAAGTGAGGAAGACTTGGGCGGAGAGCAGAAGCTTA 2940
55.1F          ACCTCGGCGGAGA---AACC----- 96
                  *****      * *
    
```

TrkC820 55.1 Reverse

```

trkc820          CCGGAGTCTGCCCAAAGAAGTATATGATGTCATGCTGGGGTGCTGGCAGAGGGAACCAC 2760
55.1          -----CCAC 7
                  ****
trkc820          AACAGCGACTGAATATTAAGGAGATCTACAAAATCCTCCATGCTTTGGGGAAGGCCACCC 2820
55.1          AACAGCGACTGAATATTAAGGAGATCTACAAAATCCTCCATGCTTTGGGGAAGGCCACCC 67
                  *****
trkc820          CAATCTTCTCTGGACATTCCTTGGCGGCCCGGGCGGAGAGCAGAAGCTGATATCCGAAGAAG 2880
55.1          CAATCTTCTCTGGA----- 80
                  *****
    
```

E

TrkC820 65.1 Forward

```

trkc820          CCGGAGTCTGCCCAAAGAAGTATATGATGTCATGCTGGGGTGCTGGCAGAGGGAACCAC 2760
65.1F          -----
trkc820          AACAGCGACTGAATATTAAGGAGATCTACAAAATCCTCCATGCTTTGGGGAAGGCCACCC 2820
65.1F          -----ATGCTTTGGGGA-GGCCACCC 20
                      *****
trkc820          CAATCTTCTGGACATTCTTGGCGGCCCGGGCGGAGAGCAGAAGCTGATATCCGAAGAAG 2880
65.1F          CAATCTTCTGGACATTCTTGGCGGCCCGGGCGGAGAGCAGAAGCTGATATCCGAAGAAG 80
                      *****
trkc820          ACCTCGGCGGAGAGCAGAAGCTCATAAGTGAAGAACTTGGGCGGAGAGCAGAAGCTTA 2940
65.1F          ACCTCGGCGGAGA-----AAGT----- 97
                      *****

```

TrkC820 65.1 Revers

```

trkc820          CCGGAGTCTGCCCAAAGAAGTATATGATGTCATGCTGGGGTGCTGGCAGAGGGAACCAC 2760
65.1R          -----TTT-----CCAC 7
                      * *
trkc820          AACAGCGACTGAATATTAAGGAGATCTACAAAATCCTCCATGCTTTGGGGAAGGCCACCC 2820
65.1R          AACAGCGACTGAATATTAAGGAGATCTACAAAATCCTCCATGCTTTGGGGAAGGCCACCC 67
                      *****
trkc820          CAATCTTCTGGACATTCTTGGCGGCCCGGGCGGAGAGCAGAAGCTGATATCCGAAGAAG 2880
65.1R          CAATCTTCTGGAG----- 80
                      *****

```

F

TrkC817-819 2.1 Forward

```

TrkC817-819     CCGGAGTCTGCCCAAAGAAGTATATGATGTCATGCTGGGGTGCTGGCAGAGGGAACCAC 2760
2.1F          -----
TrkC817-819     AACAGCGACTGAATATTAAGGAGATCTACAAAATCCTCCATGCTTTGGGGAAGGCCTCCC 2820
2.1F          -----TAA-----ATCT-----CATGCTTTGGGGA-GGCCTCCC 28
                      ***      ****      *****
TrkC817-819     CAGTCTTACCTGGACATTCTTGGCGGCCCGGGCGGAGAGCAGAAGCTGATATCCGAAGAAG 2880
2.1F     CAGTCTTACCTGGACATTCTTGGCGGCCCGGGCGGAGAGCAGAAGCTGATATCCGAAGAAG 88
                      *****
TrkC817-819     ACCTCGGCGGAGAGCAGAAGCTCATAAGTGAAGAACTTGGGCGGAGAGCAGAAGCTTA 2940
2.1F     ACCTCGGCGGAGA----- 101
                      *****

```

TrkC817-819 2.1 Revers

```

TrkC817-819     CCGGAGTCTGCCCAAAGAAGTATATGATGTCATGCTGGGGTGCTGGCAGAGGGAACCAC 2760
2.1R          -----TCCAC 5
                      *****
TrkC817-819     AACAGCGACTGAATATTAAGGAGATCTACAAAATCCTCCATGCTTTGGGGAAGGCCTCCC 2820
2.1R     AACAGCGACTGAATATTAAGGAGATCTACAAAATCCTCCATGCTTTGGGGAAGGCCTCCC 65
                      *****
TrkC817-819     CAGTCTTACCTGGACATTCTTGGCGGCCCGGGCGGAGAGCAGAAGCTGATATCCGAAGAAG 2880
2.1R     CAGTCTTACCTGGACATC--TGGCG--CCCGACG-----AGAGGC--TAYC----- 104
                      *****

```

G

TrkC817-819 2.1 Forward

```

TrkC820                CCGGAGTCTGCCCAAAGAAGTATATGATGTCATGCTGGGGTCTGGCAGAGGGAACCAC 2760
2.1F                    -----
TrkC820                AACAGCGACTGAATATTAAGGAGATCTACAAAATCCTCCATGCTTTGGGGAAGGCCACCC 2820
2.1F                    -----TAA-----ATCT-----CATGCTTTGGGGA-GGCTCCC 28
                        ***      ****                *****      ***
TrkC820                CAATCTTCCTGGACATTCTTGGCGGCCCGGGCGGAGAGCAGAAGCTGATATCCGAAGAAG 2880
2.1F                    CAGTCTTACCTGGACATTCTTGGCGGCCCGGGCGGAGAGCAGAAGCTGATATCCGAAGAAG 88
                        ** ** *
TrkC820                ACCTCGGCGGAGAGCAGAAGCTCATAAGTGAGGAAGACTTGGGCGGAGAGCAGAAGCTTA 2940
2.1F                    ACCTCGGCGGAGA-----
                        *****
    
```

H

seqA	nazwa	długość	seqB	nazwa	długość	Homologia [%]
1	trkcwt	5201	2	4.1F	95	96.84
2	trkcwt	5201	2	4.1R	81	96.3
3	trkc820	5201	2	4.1F	95	95.79
4	trkc820	5201	2	4.1	81	95.06
5	trkc820	5201	2	36.1F	101	100.0
6	trkc820	5201	2	36.1R	103	97.09
7	trkc820	5201	2	55.1F	96	100.0
8	trkc820	5201	2	55.1R	80	100.0
9	trkc820	5201	2	65.1F	97	100.0
10	trkc820	5201	2	65.1R	80	96.25
11	trkc817-819	5201	2	2.1F	101	100.0
12	trkc817-819	5201	2	2.1R	104	96.15
13	trkc820	5201	2	2.1F	101	97.03
14	trkc820	5201	2	2.1R	103	97.09

Ryc. 14. Sekwencja genów kodujących TrkC typu dzikiego i genów z miejscami mutacji w regionie wiązania PLC γ 1. **A-** porównanie sekwencji TrkCwt 4.1 z plazmidem pTRE-tight-trkCmyc3 (w skrócie: TrkCwt). **B-** porównanie sekwencji TrkCwt 4.1 z plazmidem pTRE-tight-trkC-Y820F (w skrócie: TrkC820). **C-** porównanie sekwencji TrkC820 36.1 z plazmidem TrkC820. **D-** porównanie sekwencji TrkC820 55.1 z plazmidem TrkC820. **E-** porównanie sekwencji TrkC820 65.1 z plazmidem TrkC820. **F-** porównanie sekwencji TrkC817-819 2.1 z plazmidem pTRE-tight-trkC-T817S/I819V (w skrócie: TrkC817-819). **G-** porównanie sekwencji TrkC817-819 2.1 z plazmidem TrkC820. **H-** tabela porównująca długość i procent homologii analizowanych fragmentów. Na kolor **niebieski** zaznaczono sekwencję starterów użytych do sekwencjonowania (starter Forward: CCACAACAGCGACTGAATATTAAGGAG; starter Revers: CTCCGCCGAGGTCTTCTTC). Na kolor **czerwony** zaznaczono sekwencję w których nie wprowadzono (TrkCwt 4.1), bądź wprowadzono miejsce mutacji (TrkC820: 36.1, 55.1, 65.1; TrkC817-819 2.1). Kolorem czarnym zaznaczono wynik sekwencjonowania. Analizę wykonano z wykorzystaniem programu Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

Wyróżnione kolorem czerwonym kodony:

TAC koduje tyrozynę (Y)	ACC koduje treoninę (T)	ATC koduje izoleucynę (I)
TTC koduje fenyloalaninę (F)	TCC koduje serynę (S)	GTC koduje walinę (V)

Na **Ryc. 14.A** porównano sekwencję klonu TrkCwt 4.1 z plazmidem pTRE-tight-trkC-Y820F (w skrócie: TrkC820). W kodonie 820 plazmidu TrkC820 nastąpiła substytucja adeniny na tyminę (w sekwencji: **TAC** na **TTC**), co w konsekwencji prowadzi do inaktywacji miejsca wiązania PLC γ 1. Zamiana ta została zaznaczona w analizowanej sekwencji. Zgodność sekwencji w przypadku przeprowadzonej analizy *in silico* klonu TrkCwt 4.1 z plazmidem pTRE-tight-trkCmyc3 (w skrócie: TrkCwt) potwierdzono na **Ryc. 14.B**. W wyniku przeprowadzonej analizy sekwencji klonów TrkC820: 36.1, 55.1 i 65.1 z plazmidem TrkC820 otrzymano ponad 96% homologii porównywanych sekwencji nukleotydowych oraz potwierdzono występowanie mutacji w kodonie 820 (**Ryc. 14.C, D, E**). Porównanie sekwencji nukleotydowej TrkC817-819 2.1 z plazmidem pTRE-tight-trkC-T817S/I819V (w skrócie: TrkC817-819) potwierdza występowanie dwóch mutacji punktowych w klonie TrkC817-819 2.1 w kodonie 817 (zamiana **ACC** na **TCC**) oraz kodonie 819 (zamiana **ATC** na **GTC**), czego konsekwencją jest wytworzenie C-końcowego fragmentu białka (zawierającego miejsce wiązania PLC γ 1) w wariantowym białku TrkC takiego jak w TrkB (**Ryc. 14.F**).

Analiza sekwencji nukleotydowych potwierdza identyczność mRNA *trkC* w otrzymanych klonach z plazmidami kodującymi TrkC użytymi do stabilnej transfekcji komórek PC12-Tet-On.

Podsumowując podrozdział 4.1:

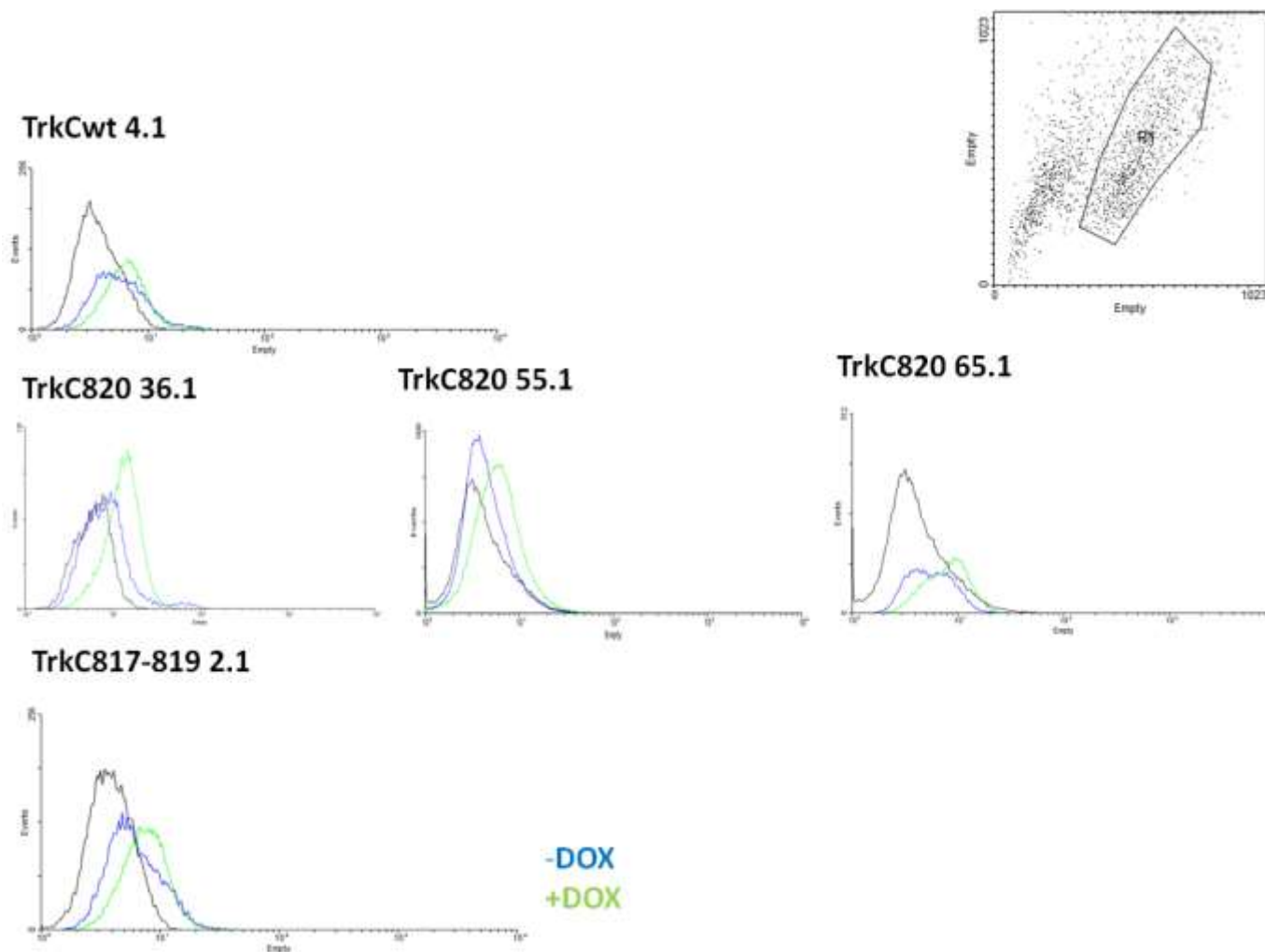
- Otrzymano klony komórek PC12-Tet-On z indukowaną przez doksycyklinę ekspresją genów kodujących warianty TrkC
- Ekspresję TrkC potwierdzono na poziomie mRNA i białka
- Identyfikacja sekwencji mRNA kodującego warianty TrkC z sekwencjami DNA użytymi do transfekcji komórek potwierdzono przez sekwencjonowanie

4.2. Potwierdzenie obecności funkcjonalnego receptora TrkC na powierzchni stabilnych transfektantów komórek PC12-Tet-On

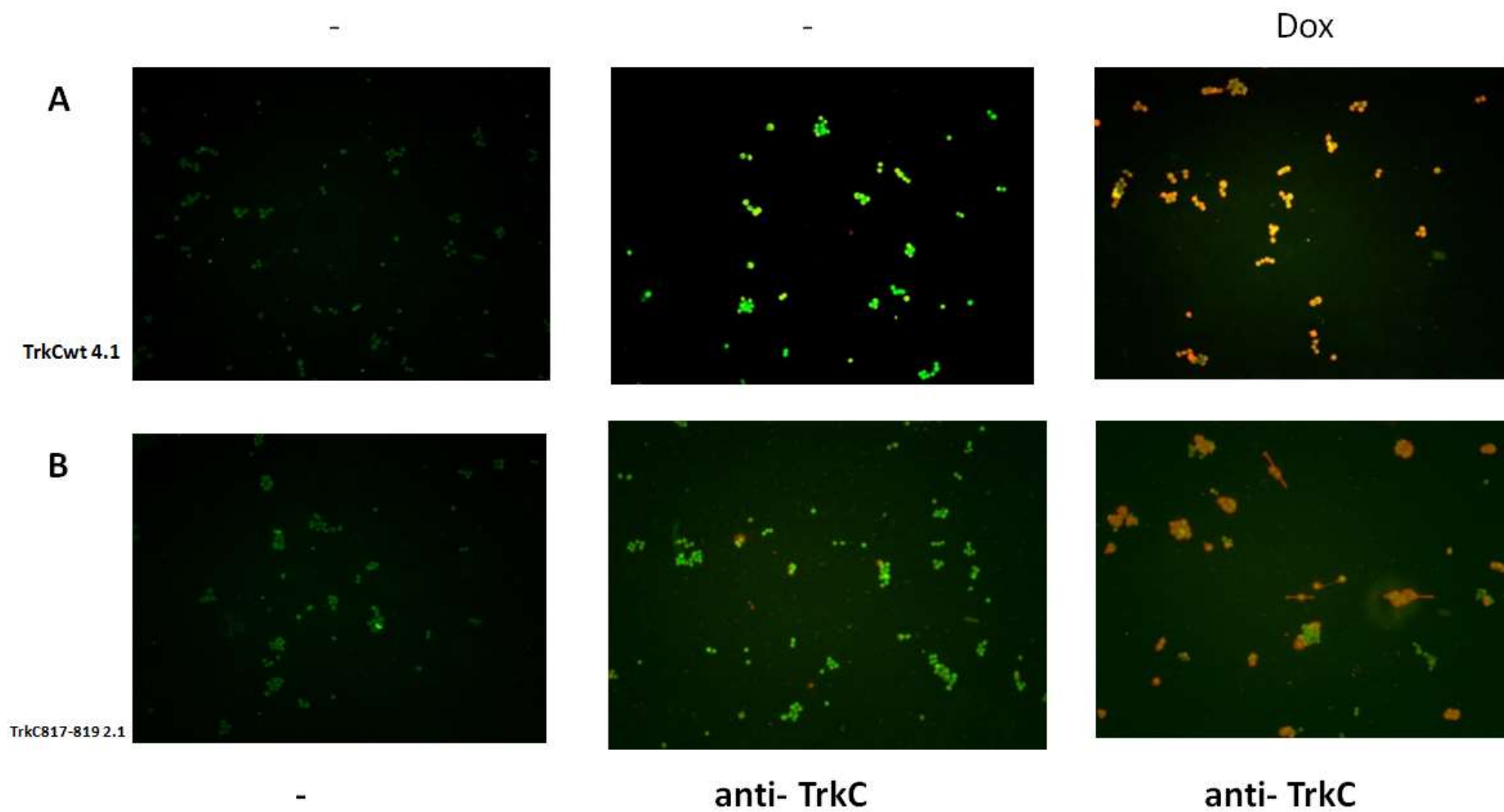
Jedną z metod potwierdzających obecność funkcjonalnego receptora na powierzchni komórek stabilnych transfektantów PC12-Tet-On stanowiła ich analiza na cytometrze przepływowym. Komórki

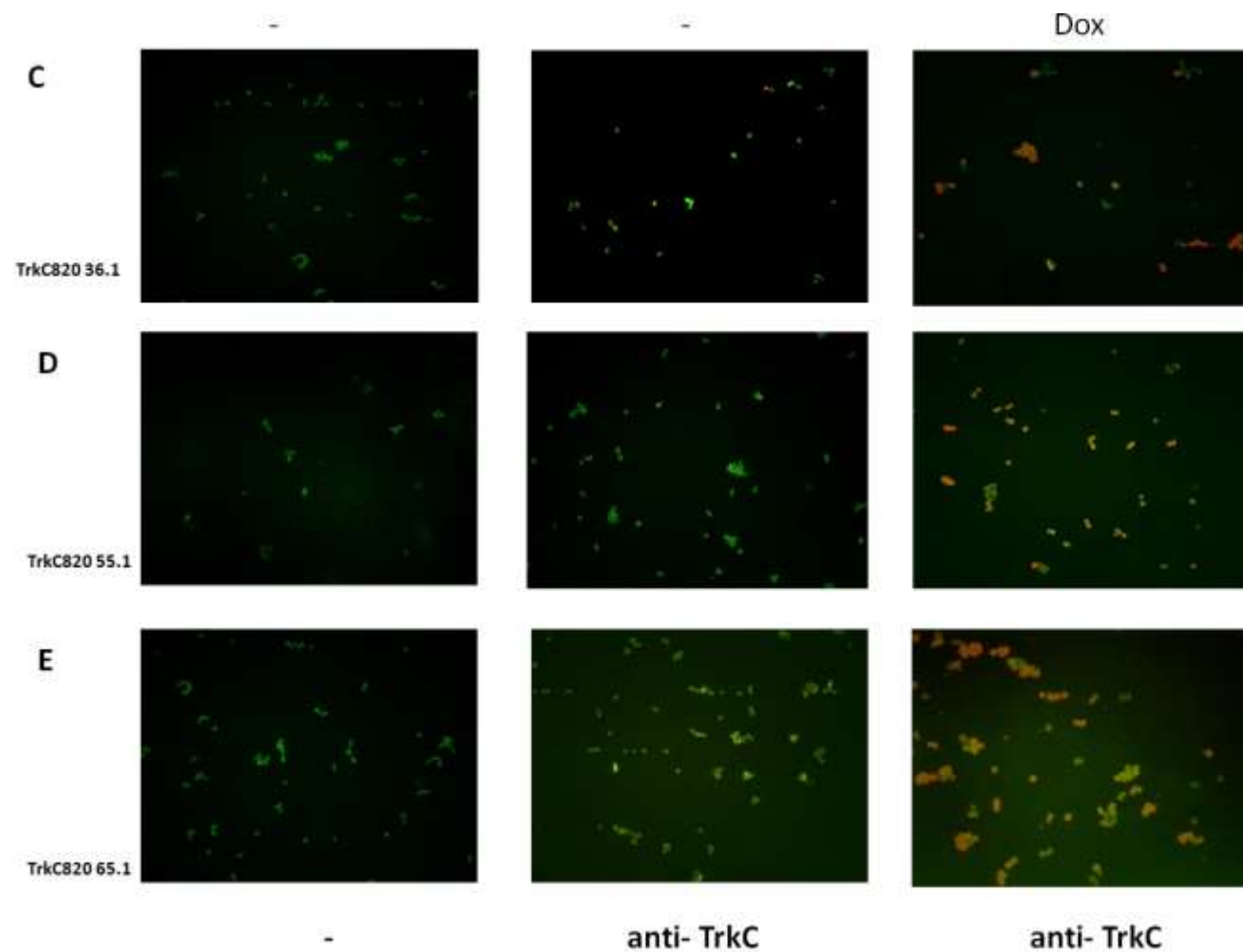
traktowano 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Dox przez 24 h lub w kontroli nietraktowano, następnie przyżyciowo (bez permeabilizacji błony komórkowej) znakowano przeciwciałem skierowanym przeciwko TrkC (części zewnątrzkomórkowej) i odpowiednim koniugatem, po czym poddano analizie na FACS. Na wykresie rozproszenia (Ryc. 15.) zaznaczono obszar R1, dla którego wykonywana była analiza. Dla każdego analizowanego klonu TrkCwt (4.1), TrkC820 (36.1, 55.1, 65.1) oraz TrkC817-819 (2.1) zaobserwowano pojawienie się charakterystycznego przesunięcia sygnału fluorescencji w kierunku wyższych wartości w porównaniu do grupy kontrolnej (barwionej, lecz nietraktowanej Dox), co sugeruje obecność domeny zewnątrzkomórkowej białka TrkC na powierzchni komórek stabilnych transfektantów komórek PC12-Tet-On.

Ekspresja białka TrkC była również sprawdzana z zastosowaniem techniki mikroskopii fluorescencyjnej. Komórki, uprzednio traktowane lub nietraktowane 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Dox przez 24 h, były permeabilizowane, a następnie wybarwiane immunocytochemicznie na obecność zewnątrzkomórkowej domeny TrkC. Mając na uwadze nie szczelność systemu tetracyklinowego, dla niewielkiego odsetka komórek nietraktowanych Dox w przypadku klonów TrkCwt (4.1), TrkC820 (36.1, 55.1, 65.1) oraz TrkC817-819 (2.1) wykazano szczątkową ekspresję receptora. W wyniku stymulacji komórek Dox, ekspresję receptora wykazywało ponad 70% komórek (Ryc. 16.).



Ryc. 15. Analiza klonów stabilnych transfektantów komórek PC12-Tet-On na cytometrze przeplywowym. Kontrolę (kolor czarny na histogramie) stanowiły komórki nieznakowane. Próby właściwe inkubowano z przeciwciałem przeciwko TrkC, następnie z koniugatem biotyny oraz barwiono Pe-Cy7 Streptawidyna. Komórki nietraktowane Dox zaznaczone są na kolor niebieski na histogramie, zaś traktowane 1 $\mu\text{g/mL}$ Dox- kolorem zielonym. Przedstawione dane pochodzą z trzech niezależnych doświadczeń.





Ryc. 16. Ekspresja zewnątrzkomórkowej domeny TrkC w klonach stabilnych transfektantów komórek PC12-Tet-On. Komórki traktowano 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Dox, bądź pozostawiano nietraktowane, a następnie inkubowano z przeciwciałem przeciwko TrkC i koniugatem z Cy3 (kolor czerwony). Jądra komórkowe zostały wybarwione z użyciem YO-PRO-1 na kolor zielony. Kontrole stanowiły komórki barwione jedynie YO-PRO-1 oraz nietraktowane Dox. **A-** TrkCwt klon 4.1. **B-** TrkC817-819 klon 2.1. **C-** TrkC820 klon 36.1. **D-** TrkC820 klon 55.1. **E-** TrkC820 klon 65.1. Przedstawiono reprezentacyjne zdjęcia pochodzące z dwóch niezależnych eksperymentów. Powiększenie 10x.

Podsumowując podrozdział 4.2:

Z wykorzystaniem technik cytometrii przepływowej oraz mikroskopii fluorescencyjnej potwierdzono obecność wariantów receptora TrkC na powierzchni komórek stabilnych transfektantów PC12-Tet-On.

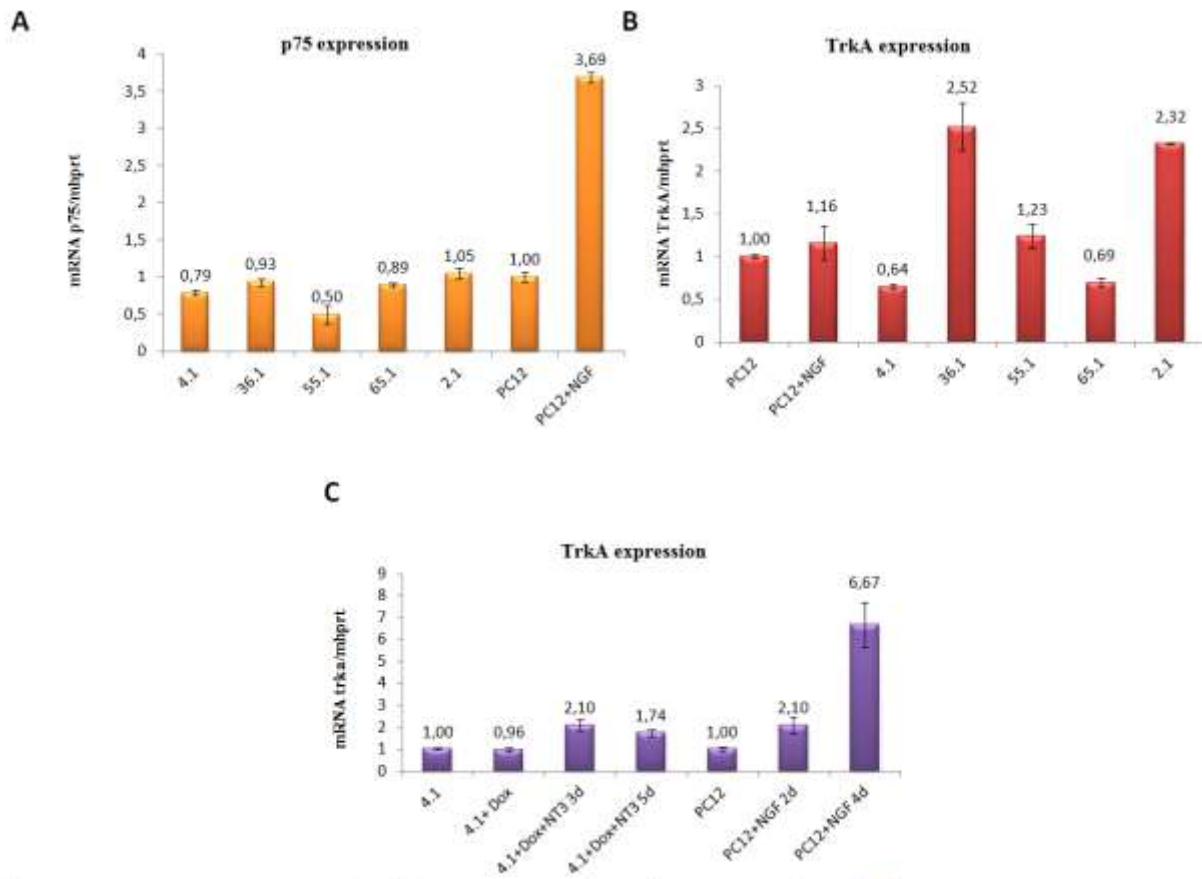
4.3. Poziom ekspresji receptorów TrkA i p75^{NTR} w stabilnych transfektantach komórek PC12-Tet-On

Komórki PC12-Tet-On posiadają powierzchniowe receptory TrkA (wiąże NGF) oraz p75^{NTR} (fenotyp: TrkA⁺/p75^{NTR+}/TrkC⁻). Receptor p75^{NTR} wykazuje zdolność wiązania kilku neurotrofin (NGF, NT3, NT4/5), lecz z niewielkim powinowactwem. Do receptorów Trk neurotrofiny wiążą się natomiast z wysokim powinowactwem [Mateos i współprac., 2003]. Otrzymane komórki stabilnych transfektantów PC12-Tet-On poza receptorami TrkA oraz p75^{NTR} posiadają dodatkowo egzogennie wprowadzony receptor TrkC, zatem genotyp komórek przedstawia się następująco: TrkA⁺/p75^{NTR+}/TrkC⁺.

W niniejszym doświadczeniu postanowiono sprawdzić poziom ekspresji receptorów TrkA i p75^{NTR}. Z komórek wyizolowano RNA, otrzymano cDNA i poddano reakcji amplifikacji z użyciem starterów na TrkA oraz p75^{NTR}. We wszystkich poddanych analizie klonach stabilnych transfektantów komórek PC12-Tet-On zaobserwowano porównywalny poziom ekspresji mRNA dla receptora p75^{NTR} (Ryc. 17.A).

Analiza ekspresji genu dla TrkA wykazała zróżnicowany poziom ekspresji dla klonów stabilnych transfektantów komórek PC12-Tet-On (Ryc. 17.B). W przypadku klonów TrkC820 36.1 oraz TrkC 817-819 2.1 poziom ekspresji TrkA był około 2-krotnie wyższy w porównaniu do nietransfekowanych komórek PC12-Tet-On. Klony TrkCwt 4.1 i TrkC820 65.1 wykazywały obniżony poziom ekspresji TrkA względem kontroli (komórek PC12-Tet-On traktowanych i nietraktowanych NGF), natomiast komórki TrkC 820 55.1 charakteryzowały się porównywalnym poziomem ekspresji mRNA *trkA* w porównaniu do kontroli.

Dodatkowo postanowiono sprawdzić ekspresję receptora TrkA w wyniku długotrwałej stymulacji komórek TrkCwt 4.1 Dox i NT3 przez 3 i 5 dni w porównaniu do nietransfekowanych komórek PC12-Tet-On nietraktowanych i traktowanych NGF przez 2 oraz 4 dni. W wyniku traktowania komórek TrkCwt 4.1 Dox + NT3 przez 3 dni ekspresja mRNA *trkA* była porównywalna do komórek PC12-Tet-On traktowanych NGF przez 2 dni. Ekspresja mRNA *trkA* traktowanych przez NGF przez 4 dni była ok. 3 razy większa w porównaniu do komórek PC12-Tet-On traktowanych NGF przez 2 dni, a także względem TrkCwt 4.1 traktowanych przez 3 lub 5 dni NT3 (Ryc 17.C). Obserwacje te znajdują potwierdzenie w badaniach innych autorów [Zhou J. i współprac. 1995], gdzie długotrwała ekspozycja komórek PC12 na NGF także skutkowała wzmożoną ekspresją *trkA* na poziomie mRNA oraz białka.



Ryc. 17. Poziom ekspresji receptorów TrkA i p75^{NTR} w stabilnych transfektantach komórek PC12-Tet-On. A- Poziom ekspresji receptora p75^{NTR}. B- poziom ekspresji receptora TrkA. C- Poziom ekspresji receptora TrkA w komórkach TrkCwt 4.1 traktowanych przez Dox i NT3 przez 3 i 5 dni.

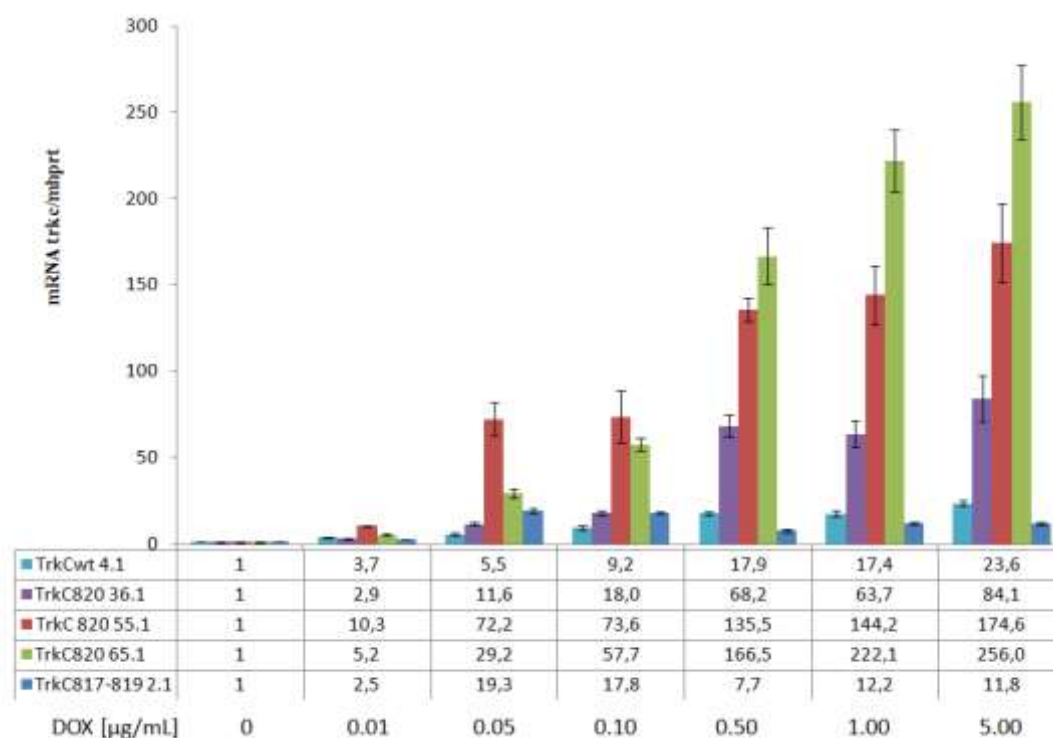
Podsumowując podrozdział 4.3:

W klonach komórek z ekspresją wariantów TrkC stwierdzono porównywalny poziom ekspresji mRNA dla p75^{NTR} i zróżnicowany poziom mRNA dla TrkA. Traktowanie NT3 przez pięć dni nie powodowało zmiany poziomu mRNA *trka* w klonie z ekspresją TrkCwt.

4.4. Wpływ stężenia doksykyliny na ekspresję TrkC w stabilnych transfektantach komórek PC12-Tet-On

Przy pomocy systemu tetracyklinowego w komórkach PC12-Tet-On można włączać ekspresję egzogenego białka TrkC. W kolejnym etapie badań postanowiono zbadać wpływ stężenia Dox na ekspresję TrkC.

Wyniki przedstawione na Ryc. 18. wskazują na zwiększanie poziomu mRNA *trkC* wraz ze zwiększaniem stężeniem Dox. Najwyższy poziom ekspresji TrkC zaobserwowano dla klonu TrkC820 65.1 przy stężeniu 5.0 $\mu\text{g/mL}$. W przypadku klonów TrkCwt 4.1 oraz TrkC820 36.1 i 55.1 także najwyższy poziom ekspresji odnotowano dla stężenia 5.0 $\mu\text{g/mL}$ Dox. Stosowana jako induktor ekspresji genu, Dox jest dobrze tolerowana przez komórki w trakcie krótkotrwałych stymulacji [Toniatti i współpr. 2004]. Jednak z uwagi na toksyczność Dox w wyższych stężeniach oraz konieczność prowadzenia długotrwałych stymulacji do dalszych badań wybrano stężenie 1.0 $\mu\text{g/mL}$.



Ryc. 18. Wpływ stężenia Dox na ekspresję TrkC w klonach stabilnych transfektantów komórek PC12-Tet-On. Komórki traktowano stężeniami Dox: 0.01; 0.05; 0.1; 0.5; 1.0 i 5.0 $\mu\text{g/mL}$ przez 24 h. Poziom ekspresji został wyrażony jako stosunek ekspresji mRNA *trkC* komórek traktowanych Dox do komórek nietraktowanych, znormalizowany względem mRNA *hprt*. Przedstawione dane pochodzą z czterech przeprowadzonych niezależnie eksperymentów.

Podsumowując podrozdział 4.4:

Wykazano zależność ekspresji badanego genu (*trkC*) od stężenia induktora (Dox).

4.5. Analiza aktywacji kinaz białkowych ERK1/2 w komórkach stabilnych transfektantów TrkCwt 4.1

Dobrze udokumentowanym w literaturze procesem jest odpowiedź komórek PC12 na traktowanie nerwowym czynnikiem wzrostu (NGF, swoistym ligandem TrkA) prowadząca do aktywacji kinaz białkowych ERK1/2 [Waetzig V., 2005; Vaudry D., 2002]. Aktywacja kinazy

fosfatydylinozytolu PI3K oraz kinaz białkowych rodziny MAPK jest niezbędna w procesie tworzenia się i wzrostu neurytów (neurytogenezy). Dane literaturowe sugerują, że jednymi z kinaz odpowiedzialnych za ten proces są kinazy białkowe ERK1/2, JNK oraz p38 MAPK. Za szybko (5 minut stymulacji NGF), ale krótkotrwałą aktywację ERK1/2 jest odpowiedzialna aktywacja białka Ras, zależna od białek adaptorowych Shc i Grb2 rekrutowanych do TrkA, podczas gdy długotrwałą (15 minut i dłużej) faza aktywacji ERK1/2 jest zależna od aktywacji białka Rap1 (zależna m.in. od FRS2 i PKA), który może także aktywować kinazę p38 MAPK [Lemmon M.A, 2010; Schlessinger J., 2000]. W tym kontekście szczególnie interesującym wydaje się poznanie białek rekrutowanych do receptora i związanych z nimi szlaków sygnałowych prowadzących do zainicjowania procesu neurytogenezy. Większość opublikowanych prac skupiała się na analizie szlaków sygnałowych pobudzanych w następstwie aktywacji receptora TrkA. W kolejnym etapie badań postanowiono zbadać szlak aktywacji kinaz białkowych ERK1/2 na drodze aktywacji egzogenego receptora TrkC przez NT3.

W przypadku traktowania komórek TrkCwt 4.1 neurotrofiną 3 (NT3) w stężeniach 0.1, 1.0, 10 i 100 ng/mL bez uprzedniego traktowania Dox, następowała jedynie nieznaczna aktywacja kinaz białkowych ERK1/2, wynikająca przypuszczalnie z nieszczelności systemu tetracyklinowego i z tego powodu aktywacji TrkC występującego w komórce na niskim poziomie (Ryc. 19.A, ścieżki 4-7). Traktowanie komórek 1.0 µg/mL Dox oraz wzrastającym stężeniem NT3 skutkowało zwiększoną aktywacją ERK1/2 osiągając maksimum przy użyciu 100 ng/mL NT3, przy czym poziom ekspresji TrkC pozostawał bez zmian (Ryc. 19.A, ścieżki 8-12), a więc traktowanie ligandem NT3 zgodnie z oczekiwaniami nie wpływało na poziom ekspresji receptora TrkC indukowanego przez Dox. Warto zwrócić uwagę, że przy maksymalnym zastosowanym stężeniu NT3 (100 ng/mL) poziom fosforylacji ERK1/2 był niższy w porównaniu do aktywacji kinaz białkowych ERK1/2 po stymulacji NGF (Ryc. 19.A, ścieżka 2), co sugeruje, że użyte stężenie Dox nie powodowało nadmiernej ekspresji TrkC i, co ważniejsze, nie prowadziło to do pobudzenia przez NT3 nadmiernej (nieprawidłowej) aktywacji szlaków sygnałowych.

W następnym etapie badań testowano krótkotrwałą (5 min.) i długotrwałą (15 min., 5 h) aktywację ERK1/2 w następstwie traktowania komórek TrkCwt 4.1 przez 100 ng/mL NT3. Oprócz 1.0 µg/mL Dox stosowano także dziesięciokrotnie niższe stężenie 0.1 µg/mL w celu indukcji ekspresji TrkC na niskim (śladowym) poziomie. Obserwowano silną krótkotrwałą (5 min. od rozpoczęcia stymulacji NT3) aktywację ERK1/2 (Ryc. 19.B, ścieżki 5 i 9) oraz słabszą długotrwałą aktywację ERK1/2 (Ryc. 19.B, ścieżki 6-7 i 10-11). Zaobserwowano także bardzo słabą aktywację ERK1/2 w wyniku stymulacji komórek jedynie Dox (Ryc. 19.B, ścieżki 4 i 8), która przypuszczalnie jest skutkiem autoaktywacji receptora w nieobecności liganda [Schlessinger J., 2000]. Ponadto, samo traktowanie NT3 nie wywoływało aktywacji ERK1/2 w komórkach PC12-Tet-On, które nie zostały poddane stabilnej transfekcji z użyciem genu kodującego TrkC (Ryc. 2B, ścieżka 14), co sugeruje, że obserwowane aktywacje ERK1/2 w komórkach z egzogenym TrkCwt są raczej skutkiem pobudzenia TrkC przez NT3, a nie działaniem NT3 poprzez TrkA.

Ryc. 19. Analiza aktywacji kinaz białkowych ERK1/2 w komórkach TrkCwt 4.1. **A-** Komórki TrkCwt 4.1 stymulowano Dox (1.0 µg/mL) przez 24 h celem indukcji ekspresji TrkC, bądź pozostawiano niestymulowane. Następnie komórki 4.1 traktowano różnymi stężeniami NT3, swoistym ligandem dla TrkC. Wzmoczoną aktywację ERK1/2 (p-ERK) zaobserwowano podczas traktowania komórek Dox + NT3. **B-** Przy pomocy Dox indukowano słabą (0.1 µg/mL Dox) lub silną (1.0 µg/mL Dox) ekspresję TrkC. Następnie komórki stymulowano 100 ng/mL NT3 przez 5 min., 15 min., 5 h lub pozostawiano nietraktowane. Zaobserwowano także wzrost poziomu fosforylacji ERK1/2 w wyniku traktowania komórek 4.1 oraz PC12-Tet-On nerwowym czynnikiem wzrostu (NGF, swoistym ligandem TrkA). M oznacza marker białkowy: Page Protein Ladder. Poziom ekspresji p-ERK został wyrażony w relatywnych jednostkach i znormalizowany względem total-ERK. Poziom TrkC został znormalizowany względem β-aktyny.

Podsumowując podrozdział 4.5:

Wykazano krótkotrwałą i długotrwałą aktywację ERK1/2 w komórkach TrkCwt 4.1 w następstwie pobudzenia egzogenego TrkC przez NT3.

4.6. Analiza ekspresji TrkC, fosforylacji pTyr i wybranych kinaz białkowych

W kolejnym etapie badań zbadano poziom ekspresji wybranych kinaz białkowych MAPK (ERK1/2, p38 oraz JNK), TrkC, pTyr (fosfo-tyrozyna) oraz pAkt (fosfo-Akt) w stabilnych transfektantach komórek PC12-Tet-On.

Analiza poziomu ekspresji TrkC i fosforylacji reszt tyrozyny (pTyr)

Podobnie jak w przypadku analizy poziomu ekspresji TrkC dla klonu TrkCwt 4.1 (Ryc. 19.B, ścieżki 4-11) wszystkie klony TrkC820 (36.1, 55.1 i 65.1) oraz klon TrkC81-819 2.1 wykazały względnie stały poziom ekspresji danego wariantu TrkC, zależny jedynie od stężenia Dox (Ryc. 20.B-D, ścieżki 5-12; 20.E, ścieżki 4-11). Oznaczenie poziomu fosfo-tyrozyny (pTyr) w stabilnych transfektantach komórek PC12-Tet-On miało dodatkowo na celu potwierdzenie funkcjonalności danego wariantu białka TrkC (Ryc. 20.A i 20.E, ścieżki 4-11; 20.B-D, ścieżki 5-12). Pomimo technicznej niedoskonałości wyników Western blot dla pTyr można zauważyć większą intensywność prążków w ścieżkach odpowiadających próbkom otrzymanym z komórek traktowanych 1.0 µg/mL Dox (wyższy poziom białka TrkC) niż w ścieżkach dla próbek otrzymanych z komórek traktowanych dziesięciokrotnie niższym stężeniem Dox (niższy poziom białka TrkC).

Analiza poziomu fosforylacji kinaz białkowych ERK1/2

W przypadku klonu TrkC817-819 2.1 zaobserwowano wyższą aktywację ERK1/2 w porównaniu do komórek TrkCwt 4.1 (Ryc. 20.B, ścieżki 5-12 vs Ryc. 19.B, ścieżki 4-11). Wzrost poziomu fosforylacji następował po 5 min. traktowania NT3 i fosforylacja ERK1/2 była wyraźnie niższa w wyniku długotrwałej (5 h) ekspozycji na NT3 (Ryc. 20.B, ścieżka 6 vs 8 oraz 10 vs 12). Natomiast klony TrkC820 (36.1, 55.1 oraz 65.1) (Ryc. 20.C-E) charakteryzowały się niższym w porównaniu do klonu TrkCwt 4.1 poziomem fosforylacji kinaz białkowych ERK1/2. Ponadto zaobserwowano trudną do wyjaśnienia niższą aktywację ERK1/2 przy zastosowaniu stężenia 1.0 µg/mL Dox w porównaniu do komórek traktowanych 0.1 µg/mL Dox, zwłaszcza w komórkach klonu 55.1 (Ryc. 20.D, ścieżki 6-8 vs 10-12). We wszystkich analizowanych klonach stwierdzono wyższą aktywację ERK1/2 w wyniku stymulacji NGF (100 ng/mL) w porównaniu do komórek traktowanych 1.0 µg/mL Dox i 100 ng/mL NT3 (Ryc. 20.B-E, ścieżka 2), co koresponduje

z wynikami otrzymanymi dla klonu TrkCwt 4.1 (Ryc 19.B, ścieżka 2). Wykazano również śladową fosforylację ERK1/2 dla komórek TrkC820 55.1 traktowanych jedynie NT3 (Ryc. 20.D, ścieżka 4) oraz wzmożoną aktywację ERK1/2 w komórkach stymulowanych jedynie NT3 w przypadku klonów TrkC817-819 2.1 i TrkC820 36.1 (Ryc 20.B-C, ścieżka 3), która jest trudna do wyjaśnienia (lecz może być spowodowana aktywacją przez NT3 receptora występującego na poziomie poniżej progu detekcji przez Western blot na skutek nieuszczelności systemu Tet-On w nieobecności Dox).

Analiza poziomu fosforylacji kinaz białkowych p38

W wyniku 5-15 min. ekspozycji komórek na traktowanie Dox + NT3 zaobserwowano nieznaczny wzrost fosforylacji kinaz białkowych MAPK p38 dla klonów TrkCwt 4.1 (Ryc. 20.A, ścieżki 5-6 i 9-10) oraz TrkC817-819 2.1 (Ryc. 20.B, ścieżki 6-7 i 10-11). Dla klonów TrkC820 (36.1, 55.1 oraz 65.1) nie stwierdzono znaczącej aktywacji kinaz białkowych p38 (Ryc. 20.C-D, ścieżki 6-8 i 10-12; 20.E, ścieżki 5-7 i 9-11).

Analiza poziomu fosforylacji kinaz białkowych JNK

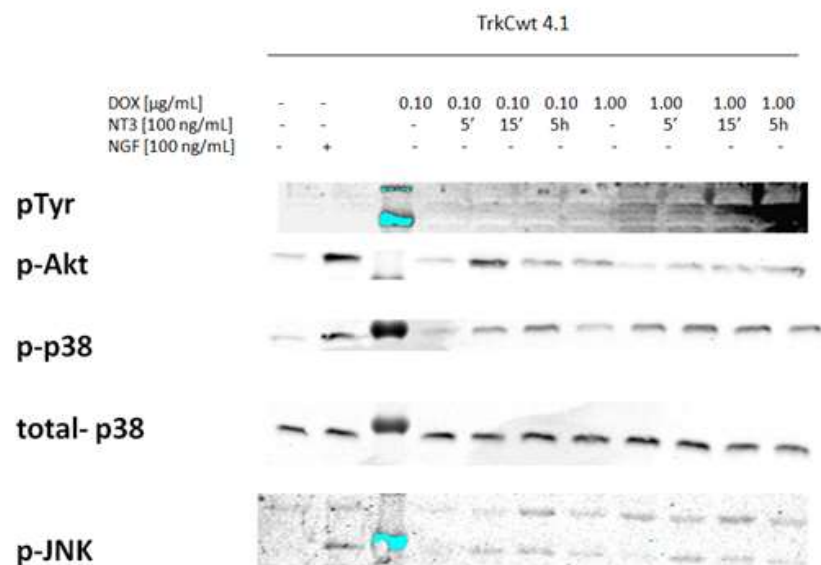
Klony TrkCwt 4.1 oraz TrkC817-819 2.1 wykazywały wzrost aktywacji kinaz białkowych JNK po 15 min. traktowania Dox i NT3 (Ryc. 20.A, ścieżki 6 i 10; 20.B, ścieżki 7 i 11). W przypadku klonów TrkC820 (36.1, 55.1 oraz 65.1) zaobserwowano nieznaczny wzrost aktywacji JNK w wyniku traktowania komórek Dox i NT3 jedynie w przypadku klonu 36.1 (Ryc. 20.C, ścieżki 6-8 i 10-11) oraz klonu 65.1 (Ryc. 20.E, ścieżki 5-6).

Analiza poziomu fosforylacji kinazy białkowej Akt

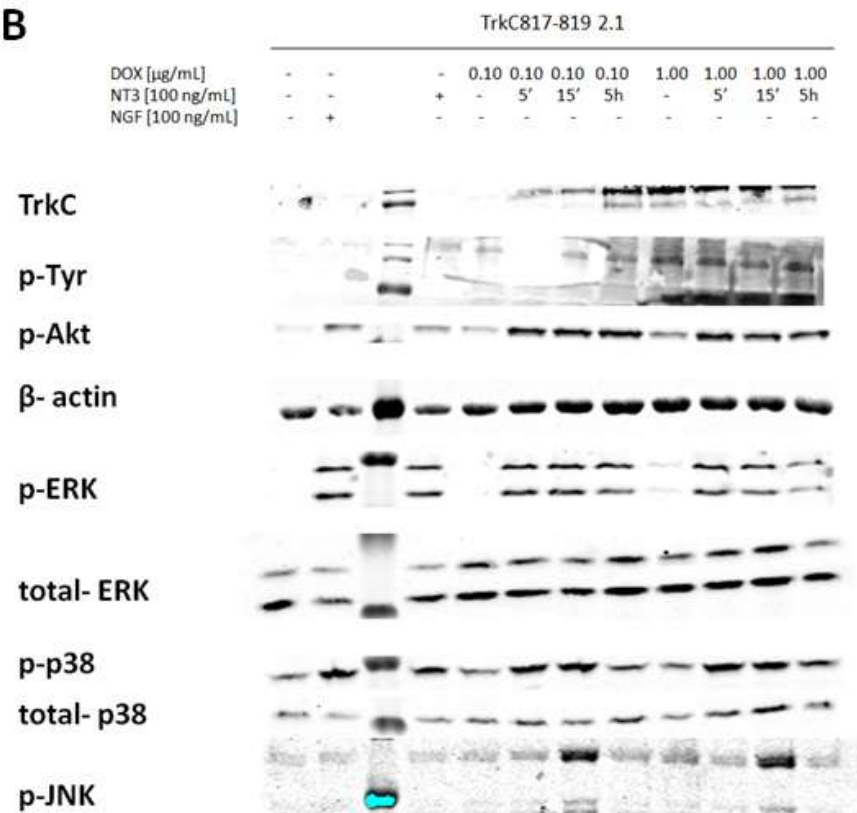
Aktywacja kinazy białkowej PKB/Akt jest zależna od aktywności kinazy fosfatydyloinozytolu PI3K i bierze udział w procesie neurytogenezy. Postanowiono zbadać poziom aktywacji Akt w klonach stabilnych transfektantów komórek PC12-Tet-On.

Zaobserwowano wzrost aktywacji kinazy białkowej Akt w następstwie 5 min. traktowania komórek NT3 utrzymujący się do 5 h po traktowaniu NT3 w przypadku klonów 2.1 i 4.1 (Ryc. 20.A, ścieżki 5-7 i 9-11; 20.B, ścieżki 6-8 i 10-12). W przypadku klonów TrkC820 36.1, 55.1 i 65.1 (Ryc. 20.C-E) nie stwierdzono znaczącego wzrostu aktywności kinazy białkowej Akt w następstwie stymulacji komórek NT3.

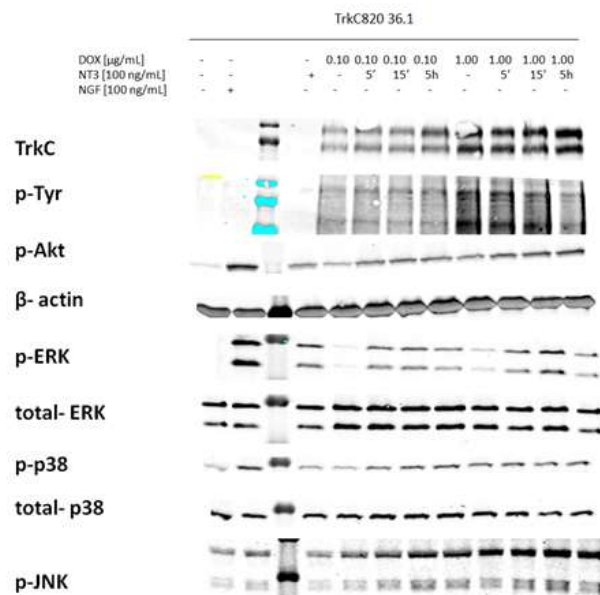
A



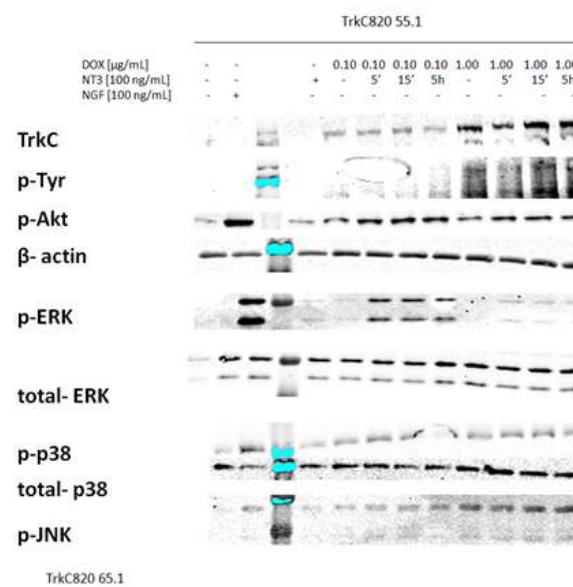
B



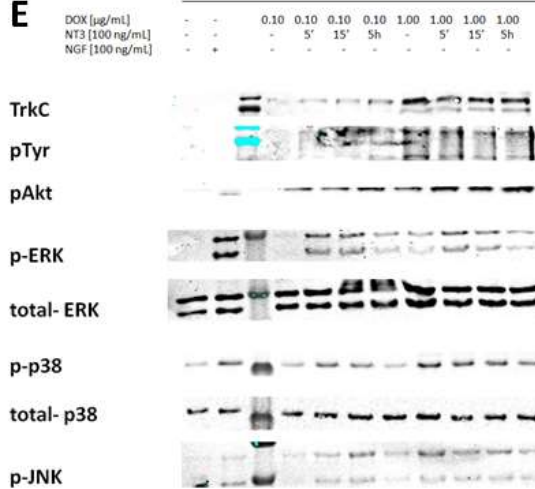
C



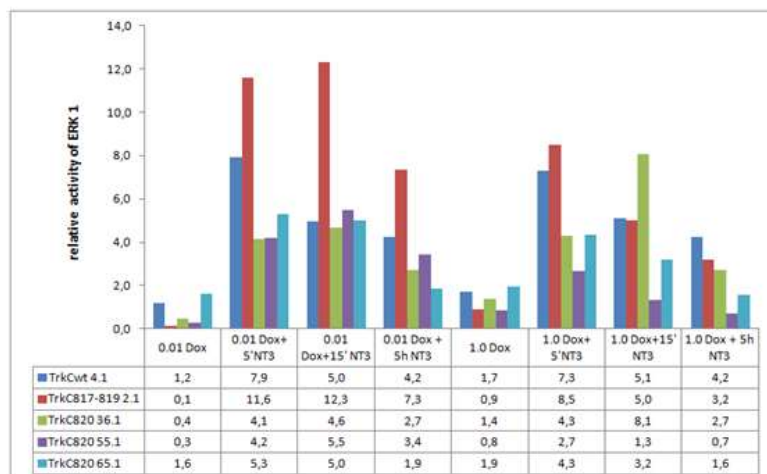
D



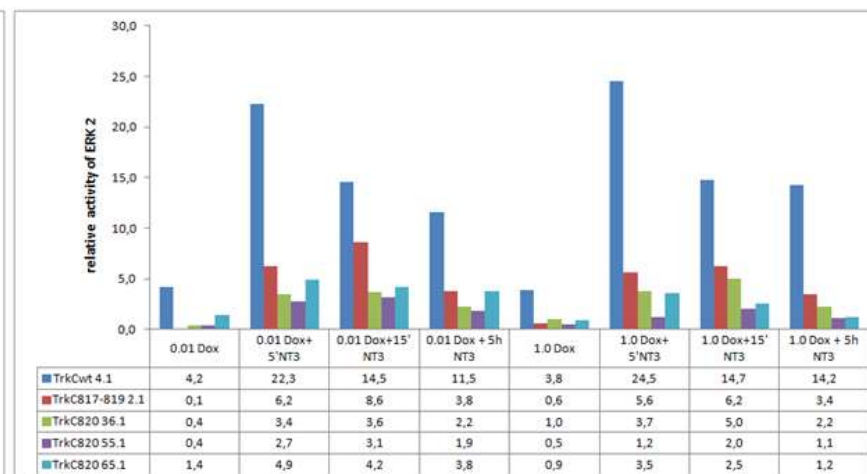
E



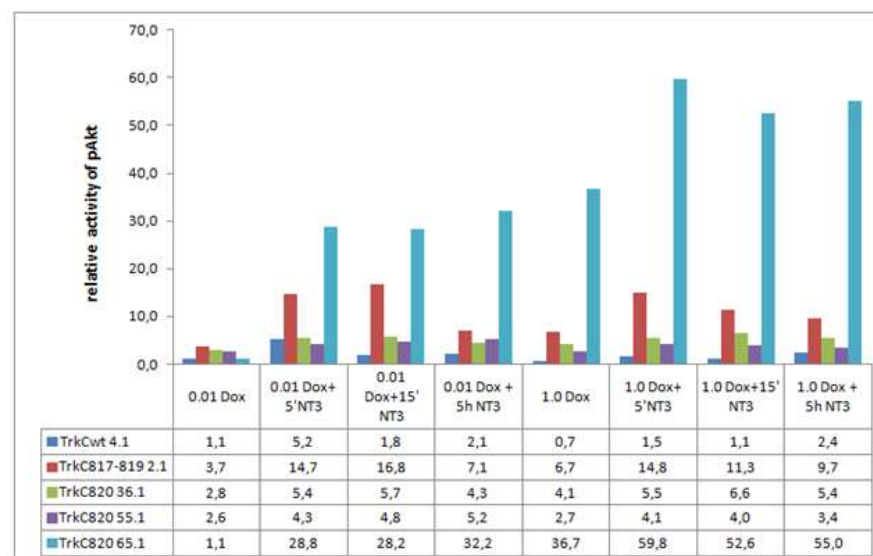
F



G



H



Ryc. 20. Analiza aktywacji kinaz białkowych ERK1/2, p38 i JNK oraz TrkC, pTyr i Akt w klonach stabilnych transfektantów komórek PC12-Tet-On. Komórki traktowano przez 24 h Dox w stężeniu 0.1 $\mu\text{g/mL}$ lub 1.0 $\mu\text{g/mL}$, następnie stymulowano 100 ng/mL NT3 przez 5 min., 15 min., 5 h lub pozostawiano nietraktowane. **A-** profil fosforylacji wybranych białek dla TrkCwt 4.1. **B-** profil fosforylacji wybranych białek dla TrkC817-819 2.1. **C-** profil fosforylacji wybranych białek dla TrkC820 36.1. **D-** profil fosforylacji wybranych białek dla TrkC820 55.1. **E-** profil fosforylacji wybranych białek dla TrkC820 65.1. **F-** analiza densytometryczna poziomu fosforylacji (aktywacji) ERK1 znormalizowana względem total-ERK1. **G-** analiza densytometryczna poziomu fosforylacji (aktywacji) ERK2 znormalizowana względem total-ERK2. **H-** analiza densytometryczna poziomu fosforylacji (aktywacji) kinazy białkowej Akt (pAkt) znormalizowana względem β -aktyny.

Podsumowując podrozdział 4.6:

Wskazano na znaczące różnice w fosforylacji (aktywacji) kinaz białkowych ERK1/2 przez warianty TrkC zdolne do rekrutacji PLC γ 1 (TrkCwt i TrkC817-819) i przez wariant TrkC niezdolny do rekrutacji PLC γ 1 (TrkC820). W przypadku klonów TrkC820 (36.1, 55.1 i 65.1) zauważono niższą aktywację ERK1/2 niż w komórkach TrkCwt 4.1 w następstwie traktowania NT3 przez 5 lub 15 minut oraz słabą fosforylację (aktywację) kinaz białkowych p38 MAPK i JNK. Klony TrkCwt 4.1 i TrkC817-819 2.1 charakteryzowały się zwiększoną aktywacją JNK i nieznaczoną aktywacją kinazy p38 MAPK w następstwie traktowania NT3 przez 15 minut. Zaobserwowano fosforylację (aktywację) kinazy białkowej Akt już w następstwie krótkotrwałego traktowania NT3 w przypadku komórek z ekspresją TrkC typu dzikiego lub wariantu TrkC817-819, natomiast komórki z wariantem receptora TrkC820 nie różniły się znacząco pod względem aktywacji Akt w następstwie stymulacji NT3.

W Tabeli 7. i Tabeli 8. zestawiono przedstawione już na Ryc. 19.B i Ryc. 20. wyniki analiz fosforylacji kinaz białkowych w porównywanych klonach.

Tabela 7. Pobudzana przez NT3 fosforylacja ERK1/2 w klonach PC12-Tet-On z indukowaną przez Dox ekspresją odpowiedniego wariantu TrkC. Komórki traktowano 1 $\mu\text{g/mL}$ Dox przez 24 h w celu indukcji ekspresji TrkC, następnie traktowano 100 ng/ml NT3 przez 5, 15 lub 300 min. lub pozostawiono nietraktowane w próbach kontrolnych.

Clone	ERK1/2				p-ERK1/2				p-ERK1 [w.j.d.]*				p-ERK2 [w.j.d.]			
	Czas stymulacji NT3 (minuty)				Czas stymulacji NT3 (minuty)				Czas stymulacji NT3 (minuty)				Czas stymulacji NT3 (minuty)			
	-	5	15	300	-	5	15	300	-	5	15	300	-	5	15	300
4.1									1.0	4.3	3.0	2.5	1.0	6.4	3.9	3.7
2.1									1.0	9.4	5.6	3.6	1.0	9.3	10.3	5.7
36.1									1.0	3.1	5.8	1.9	1.0	3.7	5.0	2.2
55.1									1.0	3.4	1.6	0.9	1.0	2.4	4.0	2.2
65.1									1.0	2.3	1.7	0.8	1.0	3.9	2.8	1.3

*[w.j.d.], względne jednostki densytometryczne

Tabela 8. Pobudzana przez NT3 fosforylacja Akt, JNK, p38 MAPK w klonach PC12-Tet-On z indukowaną przez Dox ekspresją odpowiedniego wariantu TrkC. Komórki traktowano 1 µg/mL Dox przez 24 h w celu indukcji ekspresji TrkC, następnie traktowano 100 ng/ml NT3 przez 5, 15 lub 300 min. lub pozostawiono nietraktowane w próbach kontrolnych. Wyniki analizy densytometrycznej względem prób kontrolnych przedstawiono poniżej prążków Western blot.

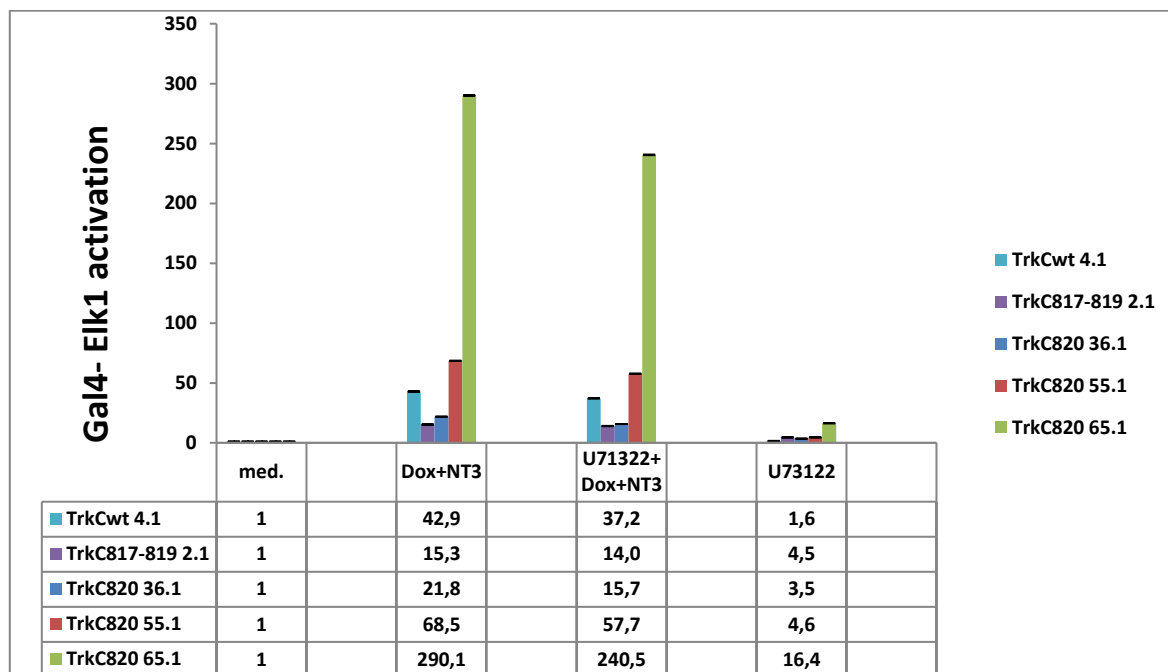
Clone	p-Akt				p-JNK				p-P38 MAPK			
	Czas stymulacji NT3 (minuty)				Czas stymulacji NT3 (minuty)				Czas stymulacji NT3 (minuty)			
	-	5	15	300	-	5	15	300	-	5	15	300
4.1												
	1.0	2.3	2.4	4.8	1.0	1.3	1.7	0.9	1.0	1.5	1.3	0.9
2.1												
	1.0	2.5	2.0	2.0	1.0	0.6	2.9	0.6	1.0	2.7	2.4	1.7
36.1												
	1.0	1.4	1.7	1.9	1.0	1.1	1.3	1.2	1.0	1.2	1.0	1.1
55.1												
	1.0	1.6	1.7	1.5	1.0	1.1	1.3	1.5	1.0	1.0	1.1	0.9
65.1												
	1.0	1.8	1.5	2.4	1.0	0.8	0.3	0.2	1.0	0.8	0.7	0.6

4.7. Próba określenia roli PLCγ1 w aktywacji ERK1/2 na skutek aktywacji receptorowej kinazy tyrozynowej TrkC

Wyniki poprzednich doświadczeń pokazały, że w następstwie aktywacji TrkC przez NT3 zaobserwowano niższy poziom fosforylacji ERK1/2 w przypadku komórek TrkC820 w porównaniu do fosforylacji ERK1/2 w klonach stabilnych transfektantów TrkCwt 4.1 i TrkC817-819 2.1.

Wprowadzenie punktowej mutacji (zamiana sekwencji kodującej resztę tyrozyny na sekwencję kodującą resztę fenyloalaniny) w genie kodującym receptorową kinazę tyrozynową TrkC w kodonie 820, w przypadku komórek TrkC820, skutkowało inaktywacją miejsca wiązania PLCγ1. Substytucja reszt aminokwasów kodowanych przez kodony 817 i 819 genu *trkC* w komórkach TrkC817-819 2.1 spowodowała wprowadzenie do TrkC regionu C końcowego (z miejscem wiązania PLCγ1) takiego jak w TrkB. Zakładając, że aktywacja wariantów TrkC może prowadzić do różnych poziomów aktywacji PLCγ1, postanowiono wyjaśnić udział PLCγ1 w aktywacji kinaz białkowych ERK1/2 z zastosowaniem systemu Gal4-Elk1. W tym celu komórki stabilnych transfektantów PC12-Tet-On transfekowano przejściowo plazmidami systemu Gal4 (pFR-Luc oraz pFA2-Elk1). Komórki zostały poddane traktowaniu Dox i NT3 oraz Dox + NT3 z zastosowaniem dodatkowo inhibitora PLCγ1 (U73122). W następstwie aktywacji receptora TrkC następuje fosforylacja kinaz białkowych ERK1/2, która powoduje aktywację czynnika transkrypcyjnego Elk1 w białku fuzyjnym z domeną wiążącą DNA drożdżowego białka Gal4. Nie zaobserwowano zmian w poziomie aktywacji czynnika

transkrypcyjnego Elk1 przypadku komórek TrkCwt 4.1 i TrkC817-819 2.1 po traktowaniu komórek inhibitorem PLC γ 1 (U73122) w porównaniu do komórek traktowanych jedynie Dox i NT3. Jedynie w przypadku jednego klonu TrkC820 36.1 po zastosowaniu inhibitora U73122 odnotowano przekraczający 20% spadek poziomu indukowanej przez NT3 fosforylacji czynnika transkrypcyjnego Elk1 (Ryc. 21).



Ryc. 21. Wpływ inhibitora U73122 na aktywację ERK1/2. Komórki traktowano 1.0 $\mu\text{g/mL}$ Dox przez 24 h i 10 ng/mL NT3 przez 5 h, a także 1.0 $\mu\text{g/mL}$ Dox przez 24 h, następnie 1 μM inhibitora PLC γ 1 (U73122) przez 30 min. oraz 10 ng/mL NT3 przez 5 h. Kontrolę stanowiły komórki nietaktowane oraz komórki traktowane jedynie inhibitorem PLC γ 1 (U73122).

Podsumowując podrozdział 4.7:

Inaktywacja miejsca wiążącego PLC γ 1 w komórkach TrkC820 (36.1, 55.1 i 65.1) skutkowałą osłabieniem aktywacji kinaz białkowych ERK1/2. Przy użyciu inhibitora farmakologicznego U73122 nie wykazano niezbędnego udziału aktywności PLC γ 1 dla aktywności ERK1/2 w jądrze komórkowym.

4.8. Neurytogeneza stabilnych transfektantów komórek PC12-Tet-On

Z danych literaturowych wiadomo, że komórki PC12 pod wpływem NGF zmieniają swoją morfologię poprzez tworzenie licznych wypustek z ciała komórki przypominających neuryty. Otrzymane klonów zbadano pod kątem zdolności do tworzenia struktur neuryto-podobnych. Analizując proces neurytogenezy w klonach stabilnych transfektantów komórek PC12-Tet-On przyjęto kryterium określone przez Bentley i współpracowników [2001], według którego komórki posiadające wypustki dłuższe od jej średnicy traktowano jako zróżnicowane, znajdujące się w fazie elongacji procesu neurytogenezy (ang. neurite-bearing cells). Dodatkowo analizowano komórki różniące się, znajdujące się w fazie inicjacji procesu tworzenia się neurytów, których wypustki pod względem długości nie przekraczały średnicy komórki. Proces neurytogenezy analizowano w aspekcie aktywacji receptorowej kinazy tyrozynowej TrkA (przez NGF) oraz aktywacji badanego wariantu TrkC (przez NT3 po uprzedniej indukcji ekspresji receptora przez Dox).

W pierwszym etapie badań komórki traktowano 50 ng/mL NGF. Kontrolę stanowiły nietransferowane komórki PC12-Tet-On traktowane NGF. W wyniku aktywacji receptorowej kinazy tyrozynowej TrkA przez NGF zaobserwowano, że ok. 10% ($\pm 5\%$) komórek TrkCwt 4.1 i ok. 9% ($\pm 6\%$) komórek TrkC817-819 2.1 było zdolnych do wytwarzania długich wypustek z ciała komórki (są to średnie arytmetyczne (\pm SD) z trzech niezależnie przeprowadzonych doświadczeń i wyniki zostały przedstawione w Tabeli 9.A). W Tabeli 10. przedstawiono wyniki zebrane ze wszystkich przeprowadzonych doświadczeń. Proporcje komórek klonów 4.1 i 2.1 z neurytami wynoszą odpowiednio ok. 10% i ok. 11%, a więc są to wartości zbliżone do podanych powyżej wartości średnich. W przypadku klonów TrkC820 (36.1, 55.1 i 65.1) w fazie elongacji procesu neurytogenezy indukowanej przez NGF znajdowało się odpowiednio ok. 4% ($\pm 2\%$), 5% ($\pm 2\%$) i 2% ($\pm 2\%$) (Tabela 9.A) natomiast proporcje komórek z neurytami wg danych połączonych ze wszystkich doświadczeń wynosiły odpowiednio ok. 3%, 4% i 2% (Tabela 10.). Dla porównania, 6.9% nietransferowanych komórek PC12-Tet-On traktowanych NGF wytwarzało neuryty. Jeżeli liczono wszystkie komórki różniące się, zarówno te w fazie inicjacji neurytogenezy, jak i te w fazie elongacji procesu neurytogenezy, to wówczas wykazano, że 87% ($\pm 9\%$) komórek TrkCwt 4.1 oraz ok. 61% ($\pm 10\%$) komórek TrkC817-819 2.1 i ok. 58-61% ($\pm 11-20\%$) komórek klonów TrkC820 (36.1, 55.1) było zdolnych do wytwarzania, bądź wytworzyło struktury neuryto-podobne. Komórki TrkC820 65.1 charakteryzowały się natomiast osłabioną zdolnością do różnicowania (ok. 28% $\pm 6\%$). W przypadku nietransfektowanych komórek PC12-Tet-On traktowanych NGF odnotowano 63% ($\pm 2\%$) komórek w fazach inicjacji i elongacji procesu neurytogenezy (Tabela 9.A).

W kolejnym etapie badań komórki traktowano 1.0 μ g/mL Dox celem indukcji ekspresji TrkC oraz 50 ng/mL NGF celem aktywacji TrkA. Nie obserwowano wzrostu odsetka komórek różniących się i zróżnicowanych. Traktowanie Dox + NGF powodowało natomiast obniżenie w niektórych próbach (m.in. klonów 2.1 i 36.1) odsetka komórek w fazie inicjacji i/lub elongacji neurytogenezy, co może być skutkiem hamującego (toksycznego) wpływu długotrwałego traktowania Dox na proces neurytogenezy (Tabela 9.A).

Tabela 9. Analiza inicjacji i elongacji procesu neurytogenezy komórek stabilnych transfektantów PC12-Tet-On. **A-** analiza inicjacji i elongacji procesu neurytogenezy w kontekście aktywacji receptorowej kinazy tyrozynowej TrkA. **B-** analiza inicjacji i elongacji procesu neurytogenezy w kontekście aktywacji danego wariantu receptorowej kinazy tyrozynowej TrkC. Komórkami zróżnicowanymi, które znajdowały się w fazie elongacji procesu neurytogenezy określano te komórki, które wytwarzały wypustki z ciała komórki dłuższe niż jej średnica w środku geometrycznym komórki. Natomiast komórkami różnicującymi się, które znajdowały się w fazie inicjacji procesu neurytogenezy, określano komórki z wypustkami krótszymi niż średnica komórki. Dane pochodzą z trzech niezależnie przeprowadzonych doświadczeń i są przedstawione średnie arytmetyczne (\pm SD, odchylenia standardowe).

A

traktowanie	Etap neurytogenezy	typ komórek					PC12-Tet-On
		TrkCwt 4.1	TrkC817-819 2.1	TrkC820 36.1	TrkC820 55.1	TrkC820 65.1	
NGF 50 ng/mL	Komórki w fazie elongacji	10.4 (\pm 5.1)	8.9 (\pm 5.5)	3.6 (\pm 1.9)	4.9 (\pm 2.0)	1.7 (\pm 1.5)	6.9 (\pm 21.2)
	Komórki w fazie inicjacji i elongacji	87.0 (\pm 9.1)	60.8 (\pm 9.7)	58.3 (\pm 19.9)	60.8 (\pm 10.7)	27.9 (\pm 5.9)	63.0 (\pm 0.9)
NGF 50 ng/mL + Dox 1 μ g/mL	Komórki w fazie elongacji	11.8 (\pm 8.5)	4.3 (\pm 4.0)	2.4 (\pm 0.7)	2.1 (\pm 2.9)	1.6 (\pm 1.1)	-
	Komórki w fazie inicjacji i elongacji	71.4 (\pm 12.6)	46.6 (\pm 21.6)	31.0 (\pm 0.2)	59.4 (\pm 2.7)	22.0 (\pm 1.1)	-

B

traktowanie	Etap neurytogenezy	typ komórek				
		TrkCwt 4.1	TrkC817-819 2.1	TrkC820 36.1	TrkC820 55.1	TrkC820 65.1
NT3 50 ng/mL	Komórki w fazie elongacji	1.3 (\pm 0.4)	4.8 (\pm 0.4)	0	0	0.9 (\pm 0.1)
	Komórki w fazie inicjacji i elongacji	17.4 (\pm 7.4)	20.5 (\pm 6.2)	2.5 (\pm 0.4)	19.7 (\pm 2.9)	5.9 (\pm 7.1)
Dox 1 μ g/mL + NT3 50 ng/mL	Komórki w fazie elongacji	29.3 (\pm 1.7)	27.11 (\pm 11.3)	1.4 (\pm 0.7)	1.6 (\pm 0.9)	8.2 (\pm 4.1)
	Komórki w fazie inicjacji i elongacji	81.9 (\pm 5.1)	65.1 (\pm 16.5)	12.8 (\pm 4.7)	18.9 (\pm 12.8)	21.4 (\pm 11.1)
Dox 1 μ g/mL + NT3 10 ng/mL	Komórki w fazie elongacji	10.0 (\pm 6.7)	24.8 (\pm 16.0)	1.6 (\pm 2.3)	0.3 (\pm 0.6)	3.5 (\pm 0.4)
	Komórki w fazie inicjacji i elongacji	51.6 (13.3)	58.0 (\pm 0.5)	13.0 (\pm 9.5)	21.6 (\pm 20)	29.1 (\pm 9.1)
Dox 1 μ g/mL + NT3 0.10 ng/mL	Komórki w fazie elongacji	5.3 (\pm 2.2)	5.1 (\pm 5.7)	0.7 (\pm 0.9)	0	1.0 (\pm 0.03)
	Komórki w fazie inicjacji i elongacji	39.7 (\pm 8.7)	22.5 (\pm 6.8)	2.7 (\pm 3.8)	9.5 (\pm 3.4)	13.0 (\pm 1.0)

Tabela 10. Neurytogeneza komórek PC12-Tet-On stabilnie transfekowanych aktywowanymi przez Dox genami kodującymi warianty TrkC. Komórki danego klonu były traktowane 24 h przez 1 µg/mL Dox w celu indukcji ekspresji TrkC lub pominięto traktowanie Dox w próbach kontrolnych. Następnie komórki przez siedem dni traktowano neurotrofiną (NT3 lub NGF) użytą we wskazanym stężeniu. Po siedmiu dniach analizowano obrazy komórek i liczono komórki z neurytami, tzn. komórki wytwarzające wypustki dłuższe niż średnica komórki poprowadzona przez środek geometryczny komórki. Przedstawiono łączne liczby komórek ze wszystkich przeprowadzonych doświadczeń oraz wyrażone w % proporcje komórek z neurytami.

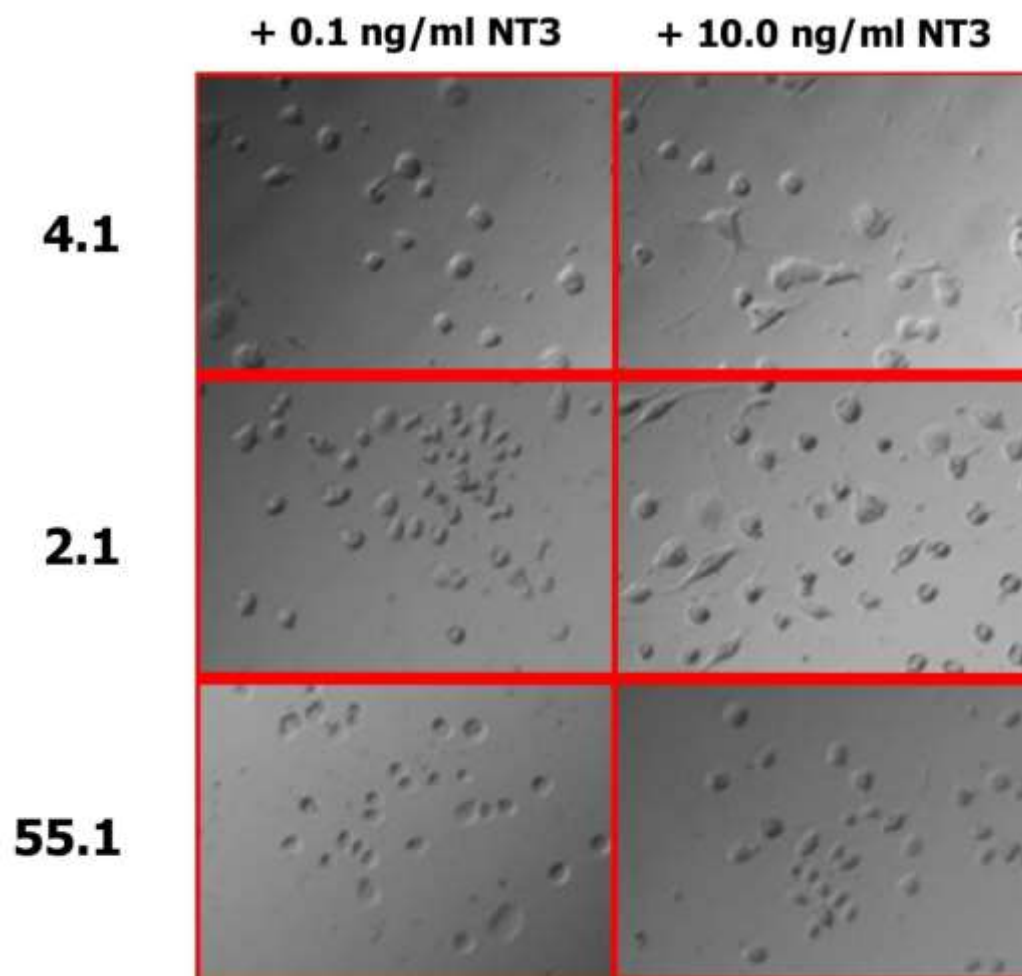
Klon	Traktowanie	Komórki z neurytami	Komórki bez neurytów	Proporcja
4.1	50.0 ng/mL NGF	37	344	9.7 %
	50.0 ng/mL NT3	3	256	1.2 %
	Dox + 0.1 ng/mL NT3	15	273	5.2 %
	Dox + 10.0 ng/mL NT3	30	265	10.2 %
	Dox + 50.0 ng/mL NT3	26	313	7.7 %
2.1	50.0 ng/mL NGF	23	178	11.4 %
	50.0 ng/mL NT3	9	88	9.3 %
	Dox + 0.1 ng/mL NT3	6	145	4.0 %
	Dox + 10.0 ng/mL NT3	27	113	19.3 %
	Dox + 50.0 ng/mL NT3	23	148	13.5 %
36.1	50.0 ng/mL NGF	11	318	3.3 %
	50.0 ng/mL NT3	0	101	0.0 %
	Dox + 0.1 ng/mL NT3	1	156	0.6 %
	Dox + 10.0 ng/mL NT3	2	107	1.8 %
	Dox + 50.0 ng/mL NT3	2	169	1.2 %
55.1	50.0 ng/mL NGF	13	281	4.4 %
	50.0 ng/mL NT3	0	195	0.0 %
	Dox + 0.1 ng/mL NT3	0	99	0.0 %
	Dox + 10.0 ng/mL NT3	1	167	0.6 %
	Dox + 50.0 ng/mL NT3	4	282	1.4 %
65.1	50.0 ng/mL NGF	7	331	2.1 %
	50.0 ng/mL NT3	1	154	0.6 %
	Dox + 0.1 ng/mL NT3	2	206	1.0 %
	Dox + 10.0 ng/mL NT3	3	81	3.6 %
	Dox + 50.0 ng/mL NT3	8	93	7.9 %

W kolejnym etapie badań stabilnie transfektanty komórek PC12-Tet-On traktowano Dox w celu indukcji ekspresji odpowiedniego wariantu TrkC i traktowano NT3 (w stężeniach 0.1, 10 i 50 ng/mL) w celu aktywacji receptora TrkC przez jego ligand (Tabela 9.B i Tabela 10.). W kontrolach pomijano Dox i traktowano komórki jedynie NT3 (są to komórki bez ekspresji TrkC lub, na skutek niewielkiej nieszczelności systemu Tet-On, komórki z co najwyżej bardzo niskim poziomem ekspresji). Można odnotować, że jedynie w przypadku klonu 2.1 traktowanie jedynie NT3 prowadziło do nieznacznej indukcji procesu neurytogenezy i $4.8\% \pm 0.4\%$ komórek miało neuryty (Tabela 9.B).

W następstwie traktowania komórek TrkCwt 4.1 przez 1.0 µg/mL Dox oraz 0.1 ng/mL NT3 zaobserwowano $5.3\% \pm 2.2\%$ komórek zdolnych do wytwarzania neurytów. W przypadku 100-krotnego wzrostu stężenia NT3 (10 ng/mL) stwierdzono blisko 2-krotnie zwiększoną liczbę komórek TrkCwt 4.1 ($10.0\% \pm 6.7\%$) w fazie elongacji procesu neurytogenezy. Natomiast

w odniesieniu do komórek TrkC817-819 2.1 przy zastosowaniu stężenia 1.0 $\mu\text{g/mL}$ Dox oraz 0.1 ng/mL NT3 5.1% \pm 5.7% komórek znajdowało się w fazie elongacji procesu neurytogenezy, podczas gdy 100-krotne zwiększenie stężenia NT3 (10 ng/mL) skutkowało ponad 4-krotnym zwiększeniem liczby komórek TrkC817-819 2.1 wytwarzających neuryty do 24.8% \pm 16.0%. Przedstawione wartości średnie z trzech niezależnych doświadczeń (Tabela 9.B) są zbliżone do wartości obliczonych proporcji z danych połączonych ze wszystkich wykonanych doświadczeń (Tabela 10.) dla porównywanych klonów 4.1 oraz 2.1 traktowanych NT3 w stężeniu 0.1 ng/mL, które jeszcze nie powodowało aktywacji ERK1/2, oraz w stężeniu 10 ng/mL, które wywoływało aktywację ERK1/2 zbliżoną do maksymalnej. Aktywację ERK1/2 przez 0.1 lub 10 ng/mL NT3 przedstawiono na Ryc. 19.A.

W przypadku komórek klonów TrkC820 (36.1, 55.1 oraz 65.1) odnotowano znacznie zmniejszoną indukcję procesu neurytogenezy w porównaniu do komórek TrkCwt 4.1 typu dzikiego i TrkC817-819 2.1, gdyż NT3 w stężeniu 10 ng/mL pobudzał tworzenie neurytów jedynie w mniej niż 4% komórek (Tabela 9.B i Tabela 10.). Na Ryc. 22. przedstawiono obrazy komórek klonów 4.1 (TrkCwt), 2.1 (TrkC817-819) oraz 55.1 (TrkC820) po traktowaniu NT3 i można odnotować liczne komórki z wypustkami w przypadku komórek klonów 4.1 oraz 2.1 traktowanych 10 ng/mL NT3, lecz nie komórek klonu 55.1.



Ryc. 22. Neurytogeneza komórek PC12-Tet-On z ekspresją wariantów TrkC. Komórki klonów 4.1 (TrkCwt), 2.1 (TrkC817-819) oraz 55.1 (TrkC820) traktowano 24 h przez 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Dox w celu indukcji ekspresji TrkC, następnie przez siedem dni traktowano 0.1 lub 10 ng/mL NT3. Obrazy komórek wykonano przy użyciu mikroskopu świetlnego z kontrastem fazowym. Można odnotować pobudzone przez 10 ng/mL NT3 tworzenie wydłużonych wypustek przez wiele komórek klonów 4.1 oraz 2.1, ale nie komórek klonu 55.1.

Poddano dokładniejszej analizie obserwowaną tendencję do mocniej pobudzonej przez NT3 neurytogenezy komórek klonu 2.1 w porównaniu z klonem 4.1. Zamieszczony w **Tabeli 11.** wynik analizy testem dokładnym Fishera dla tabel 2x2 wskazuje na istotną ($p < 0.05$) różnicę w liczbie komórek pobudzanych do neurytogenezy przez 10 ng/mL NT3 pomiędzy klonami 2.1 (wariant TrkC z takim jak w TrkB C-końcem zawierającym miejsce wiązania PLC γ 1) i 4.1 (TrkC typu dzikiego).

Tabela 11. Neurytogeneza komórek PC12-Tet-On z ekspresją wariantów TrkC. Komórki traktowano 1 µg/mL Dox przez 24 h w celu indukcji ekspresji TrkC, następnie przez siedem dni traktowano 0.1 lub 10 ng/mL NT3. W tabeli przedstawiono część danych już zawartych w Tabeli 10. Testem Fishera dla tabel 2x2 testowano różnice pomiędzy wskazanymi grupami.

Klon	Traktowanie	Komórki z neurytami			Test dokładny Fishera
		TAK	NIE	proporcja	
4.1	0.1 ng/ml NT3	15	273	5.2 %	p = 0.017773 (jednostronny)
4.1	10.0 ng/ml NT3	30	265	10.2 %	
2.1	0.1 ng/ml NT3	6	145	4.0 %	p = 0.000027 (jednostronny)
2.1	10.0 ng/ml NT3	27	113	19.3 %	
55.1	0.1 ng/ml NT3	0	99	0.0 %	p = 0.629213 (jednostronny)
55.1	10.0 ng/ml NT3	1	167	0.6 %	
4.1	0.1 ng/ml NT3	15	273	5.2 %	p = 0.644436 (dwustronny)
2.1	0.1 ng/ml NT3	6	145	4.0 %	
4.1	10.0 ng/ml NT3	30	265	10.2 %	p = 0.010014 (dwustronny)
2.1	10.0 ng/ml NT3	27	113	19.3 %	

W ostatnim etapie analizowano długość wytworzonych struktur neuryto-podobnych w stabilnych transfektantach komórek PC12-Tet-On. Wyniki przedstawiono w Tabeli 12. Zauważalnym jest, że w tym wypadku traktowanie Dox nie wpływało istotnie na długość wytwarzanych neurytów (Tabela 12.A). Można zaobserwować wytwarzanie dłuższych struktur neuryto-podobnych przez komórki TrkC817-819 2.1 w porównaniu z klonem TrkCwt 4.1 (Tabela 12.B), jednakże wobec szerokich rozkładów zmierzonych długości nie były to różnice statystycznie istotne (ocena testem nieparametrycznym U Manna-Whitneya, $p > 0.05$).

Tabela 12. Analiza długości wytworzonych struktur neuryto-podobnych w klonach komórek stabilnych transfektantów PC12-Tet-On. A- analiza długości wytworzonych neurytów w kontekście aktywacji receptorowej kinazy tyrozynowej TrkA. **B-** analiza długości wytworzonych neurytów w kontekście aktywacji receptorowej kinazy tyrozynowej TrkC. Długość neurytów analizowano z zastosowaniem oprogramowania Zeiss- ZEN i podano w μm . Dane pochodzą z doświadczeń, w których liczono komórki wytwarzające neuryty. Przedstawiono mediany i w nawiasach zakresy zmierzonych długości.

A

traktowanie	Analizowany parametr	typ komórek				
		TrkCwt 4.1	TrkC817-819 2.1	TrkC820 36.1	TrkC820 55.1	TrkC820 65.1
NGF 50 ng/mL	Długość neurytów [μm]	46 (17-141)	62 (39-116)	41 (16-354)	47 (21-105)	33 (18-132)
NGF 50 ng/mL + Dox 1 $\mu\text{g/mL}$	Długość neurytów [μm]	52 (32-685)	61 (23-143)	36 (22-78)	46 (20-68)	46 (28-76)

B

traktowanie	Analizowany parametr	typ komórek				
		TrkCwt 4.1	TrkC817-819 2.1	TrkC820 36.1	TrkC820 55.1	TrkC820 65.1
NT3 50 ng/mL	Długość neurytów [μm]	68 (27-89)	67 (34-324)	-	-	-
Dox 1 $\mu\text{g/mL}$ + NT3 50 ng/mL	Długość neurytów [μm]	86 (30-337)	105 (27-302)	48 (32-79)	145 (137-176)	92 (32-131)
Dox 1 $\mu\text{g/mL}$ + NT3 10 ng/mL	Długość neurytów [μm]	64 (21-451)	93 (37-240)	39 (27-59)	61 (53-67)	76 (44-83)
Dox 1 $\mu\text{g/mL}$ + NT3 0.10 ng/mL	Długość neurytów [μm]	75 (23-327)	151 (37-172)	52 (24-80)	-	72 (29-108)

Podsumowując podrozdział 4.8:

Otrzymane klony zbadano pod kątem zdolności do tworzenia struktur neuryto-podobnych. Zaobserwowano proces neurytogenezy zarówno w komórkach traktowanych NGF, jak i w następstwie traktowania NT3 komórek zawierających TrkC zdolny do rekrutacji fosfolipazy $\text{C}\gamma 1$ (TrkCwt 4.1, TrkC817-819 2.1). Traktowanie NT3 nie indukowało neurytogenezy w komórkach zawierających TrkC z inaktywowanym miejscem wiązania $\text{PLC}\gamma 1$ (TrkC820: 36.1 i 55.1) lub jej poziom był bardzo niski (TrkC820 65.1), co wskazuje na znaczący udział reszty tyrozyny w pozycji 820 TrkC w pobudzaniu neurytogenezy oraz sugeruje udział fosfolipazy $\text{C}\gamma 1$ w pobudzaniu procesu neurytogenezy przez TrkC. Ponadto wykazano statystycznie istotną tendencję do mocniej pobudzonej przez NT3 neurytogenezy komórek klonu 2.1 (wariant TrkC z C-końcem takim jak w TrkB) w porównaniu z klonem 4.1 (TrkC typu dzikiego).

5. Dyskusja

W obwodowym układzie nerwowym neurotrofiny są czynnikami niezbędnymi do przeżycia i różnicowania komórek nerwowych, których wydłużające się aksony rywalizują o dostęp do ograniczonej ilości neurotrofin wydzielanych w miejscach wymagających unerwienia [Huang E.J., Reichardt L.F., 2001]. Natomiast w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) neurotrofiny raczej nie są jedynymi determinantami rozwijającej się sieci połączeń pomiędzy komórkami nerwowymi, lecz można przypuszczać, że podczas rozwoju OUN neurotrofiny współdziałają wraz z innymi czynnikami i regulują takie procesy jak migracja neuronalnych komórek prekursorowych [Medina D.L. i wspópr., 2004], przeżycie lub zaprogramowana śmierć neuronów [Dekkers M.P. i wspópr., 2013], tworzenie rozgałęzień drzew kolców dendrytycznych [Joo W. i wspópr., 2014] oraz tworzenie rozgałęzień aksonów. Neurotrofiny mogą również regulować plastyczność synaptyczną, zarówno rozwijającego się, jak i już ukształtowanego OUN [Abraham W.C. i wspópr., 2019; Minichiello L., 2009; Talebian A. i wspópr., 2019], podczas gdy nieprawidłowe zmiany dotyczące plastyczności synaptycznej były rozpoznawane już wśród wczesnych zaburzeń rozwijającej się choroby neurodegeneracyjnej typu Alzheimerera [Ju Y., Tam K.Y., 2022]. Wśród zaburzeń zachodzących w rozwoju chorób neurodegeneracyjnych rozpoznawano także zahamowany transport neurotrofin do miejsc oddziaływania z odpowiednim receptorem rodziny Trk [Schindowski K. i wspópr., 2008]. Warto również odnotować doniesienie wskazujące na TrkB jako cel dla leków przeciwdepresyjnych, które oddziałują z trans-membranową częścią receptora BDNF [Casarotto P.C. i wspópr., 2021].

Zrozumienie subtelnych różnic w aktywacji białek sygnałowych przez różne receptory neurotrofin może mieć również znaczenie w terapii pacjentów z rzadko rozpoznawanymi nowotworami różnego typu, których jednak wspólną cechą jest nieprawidłowa ekspresją białek fuzyjnych zawierających część receptora rodziny Trk [Cocco E. i wspópr., 2018]. Wykazano, że onkogenem w raku gruczołu sutkowego może być białko fuzyjne zawierające niezależną od ligandu i konstytutywnie aktywną domenę katalityczną TrkC [Tognon C. i wspópr., 2002]. Ze względu na ekspresję w komórkach nowotworowych zarówno u osób dorosłych, jak i w nowotworach dzieci, białka fuzyjne zawierające domeny katalityczne receptorów Trk mogą być celem terapii przeciwnowotworowej z zastosowaniem drobnocząsteczkowych inhibitorów kinaz tyrozynowych [Bertrand T., 2017].

Wykazywany udział receptorów rodziny Trk zarówno w prawidłowym funkcjonowaniu OUN, jak i w nowotworach, uzasadnia poszukiwanie różnic w swoistości receptorów neurotrofin. Warto zauważyć, że powszechne w OUN jest występowanie TrkB i TrkC na tych samych komórkach nerwowych, w szczególności w neuronach kory mózgowej, w hipokampie i w części podstawnej przodomózgowia [Barnabe-Heider F., Miller F.D., 2003; Barbacid M., 1994]. Wykazano również, że neurotrofiny działające na te same nerwowe komórki macierzyste poprzez aktywację receptorów TrkB i TrkC, mogą pobudzać różne programy rozwojowe tych komórek [Vicario-Abejón C. i wspópr., 2000].

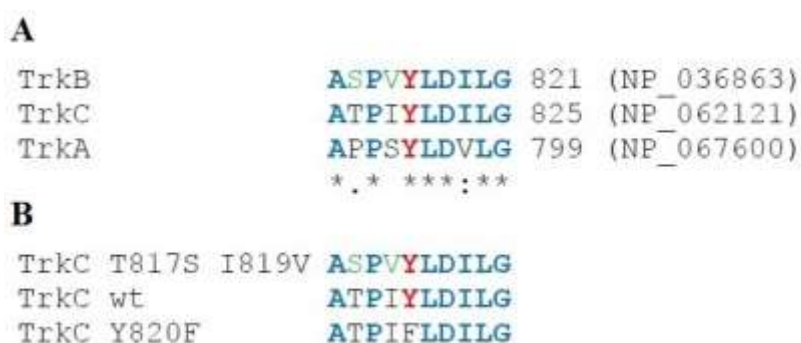
W części zewnątrzkomórkowej TrkB (receptor BDNF i NT4) oraz TrkC (receptor NT3) znacznie różnią się i mają tylko około 40% identycznych reszt aminokwasów. Natomiast cytoplazmatyczne domeny zawierające region katalityczny kinazy tyrozynowej mają ponad 80% identycznych reszt aminokwasów. Można przypuszczać, że różnice w skutkach pobudzenia receptorów Trk mogą wiązać się z ich różnym umiejscowieniem wewnątrz lub na zewnątrz tratw lipidowych w błonie komórkowej [Dekkers M.P. i wspópr., 2013], a także powinowactwem białek

adaptorowych oraz enzymu PLC γ 1 do fosforylowanych reszt tyrozyny w domenach cytoplazmatycznych receptorów pobudzanych przez neurotrofiny. Biorąc pod uwagę wysoki stopień homologii domen wewnątrzkomórkowych białek TrkB i TrkC, można rozważyć dwie zasadnicze przyczyny różnic w skutkach ich aktywacji w komórkach nerwowych:

- Aktywacje TrkB i TrkC przez ich ligandy prowadzą do pobudzania tych samych szlaków sygnałowych, zarówno jakościowo, jak i ilościowo, a obserwowane różnice w efektach biologicznych, będących skutkiem pobudzenia tych receptorów, mogą wynikać z różnic w umiejscowieniu TrkB i TrkC w komórce;
- Pomimo zbliżonego umiejscowienia w komórce, lecz niewielkich różnic w powinowactwie białek adaptorowych i enzymu PLC γ 1 do miejsc dokowania w pobudzonych receptorach TrkB i TrkC, może to prowadzić do różnic w poziomach fosforylacji kinaz białkowych i następnie co najmniej ilościowo różnych końcowych efektów biologicznych.

W części C-końcowej białka TrkB i TrkC różnią się dwiema resztami aminokwasowymi w pozycjach -3 (S/T) i -1 (V/I) bezpośrednio przed miejscem wiązania PLC γ 1 (Ryc. 23.), która jest rekrutowana do fosforylowanej reszty tyrozyny (w pozycji 820 w TrkC) w konsensusowej sekwencji: pY-(L/V/I)-X-(P/L/V/I) [McKercher M.A. i współpr., 2017]. Wobec powyższego zadano bardziej szczegółowe pytanie, czy nawet tak subtelna różnica między wariantami TrkC (nie bezpośrednio w miejscu rekrutacji PLC γ 1, lecz w regionie bezpośrednio poprzedzającym miejsce rekrutacji enzymu) byłaby już wystarczająca do wywołania zróżnicowanego efektu biologicznego w odpowiedzi na pobudzenie neurotrofiną. Jednocześnie włączony do badań wariant TrkC z zamianą 820 reszty aminokwasowej tyrozyny na strukturalnie podobną, lecz niezdolną do fosforylacji resztę fenyloalaniny umożliwiło:

- 1) posłużyć się kontrolą negatywną, gdyż taki receptor nie jest zdolny do rekrutacji i fosforylacji PLC γ 1 na reszcie tyrozyny, jak to zostało pokazane dla TrkA [Stephens R.M. i współpr., 1994];
- 2) badanie znaczenia rekrutacji PLC γ 1 do receptora neurotrofiny dla pobudzanego przez neurotrofinę procesu neurytogenezy.



Ryc. 23. C-końcowe sekwencje białek rodziny Trk oraz wykorzystanych w tej pracy wariantów TrkC. **A-** Porównanie sekwencji C-końca szczerzych receptorów Trk: TrkA (receptor NGF), TrkB (receptor BDNF i NT4), TrkC (receptor NT3). W nawiasach zostały podane numery dostępu do sekwencji w GenBank. **B-** Porównanie sekwencji C-końcowych wariantów TrkC kodowanych przez geny transfekowane do komórek PC-12-Tet-On: TrkC wt (typ dziki); TrkC z podstawieniami T817S, I819V zamieniającymi C-koniec TrkC na C-koniec TrkB; TrkC z podstawieniem Y820F niezdolny do rekrutacji PLC γ 1.

5.1. Charakterystyka klonów komórek PC12-Tet-On z indukowaną przez Dox ekspresją TrkC typu dzikiego lub jego wariantów

Aby sprawdzić, czy różnica tylko dwóch reszt aminokwasowych w regionach C-końcowych receptorów TrkB i TrkC, a dokładniej w miejscu bezpośrednio poprzedzającym miejsce przyłączenia PLC γ 1 do receptora (Ryc. 23.A), jest wystarczająca do wywołania zróżnicowanego wzrostu neurytów po aktywacji receptorów, uzyskano klony komórek PC12-Tet-On z indukowaną przez Dox ekspresją następujących wariantów TrkC (Ryc. 23.B):

- TrkC wt (klon TrkCwt: 4.1);
- TrkC T817S I819V (klon TrkC817-819: 2.1);
- TrkC Y820F (do dalszych badań wybrano klony TrkC820: 36.1; 55.1; 65.1).

Transkrypcję genu kodującego pożądaną wariant TrkC w otrzymanych klonach potwierdzono przez sekwencjonowanie (Ryc. 14.). We wszystkich testowanych klonach traktowanie Dox prowadziło do zależnego od użytego stężenia induktora wzrostu poziomu ekspresji mRNA *trkC* (Ryc. 18.). Potwierdzono indukowaną przez Dox syntezę białka TrkC oczekiwanej wielkości (Ryc. 13.) oraz występowanie TrkC na powierzchni komórek wyprowadzonych klonów (Ryc. 15.).

5.2. Aktywacja kinaz białkowych przez warianty TrkC

Wcześniejsze badania pobudzanego przez NGF receptora TrkA wskazywały na redundantny udział białek rekrutowanych do miejsc przyłączenia Shc/FRS2 oraz PLC γ 1 w aktywacji kinaz białkowych ERK1/2, gdyż dopiero mutacja obu miejsc (reszt tyrozyny) w TrkA skutkowała brakiem aktywacji p44 Erk-1 [Stephens R.M. i współprac., 1994]. W innych badaniach wykazano, że mutacja reszty tyrozyny w miejscu wiązania PLC γ 1 do TrkB co prawda nie uniemożliwiła fosforylacji ERK1/2 w odpowiedzi na pobudzenie TrkB przez BDNF, to jednak maksymalny poziom fosforylacji ERK1/2 zależał od fosforylacji reszt tyrozyny zarówno w miejscu dokowania białek adaptorowych Shc/FRS2, jak i w miejscu rekrutacji PLC γ 1 [Medina D.L. i współprac., 2004]. W związku z tym zbadano wpływ stymulacji NT3 na fosforylację ERK1/2 w stabilnych transfektantach PC12-Tet-On zawierających TrkC wt lub TrkC Y820F. Okazało się, że w badanych klonach przebieg czasowy fosforylacji ERK1/2 po 5, 15 i 300 minutach traktowania NT3 był zbliżony pomimo widocznych różnic w poziomach fosforylacji ERK1/2 [Tabela 7.: klon 4.1 *versus* klony 36.1, 55.1 i 65.1], co zasadniczo jest zgodne z cytowanymi wynikami wcześniejszych badań [Stephens R.M. i współprac., 1994; Medina D.L. i współprac., 2004]. W odniesieniu do aktywacji kinaz białkowych Akt, JNK i p38 MAPK nie stwierdzono zasadniczych różnic pomiędzy badanymi klonami [Tabela 8].

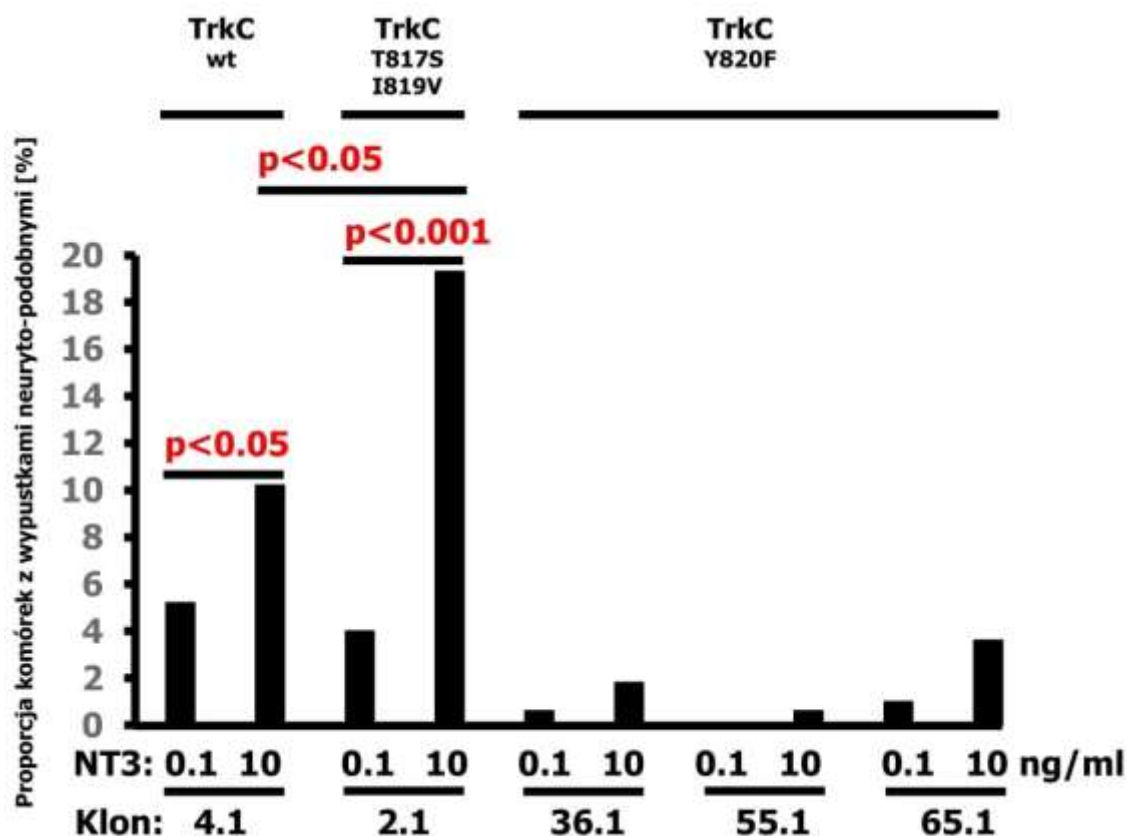
5.3. NT3 pobudza zróżnicowaną neurytogenezę komórek klonów TrkC-Tet-On z różnymi wariantami TrkC

Biorąc pod uwagę wyniki wcześniejszych badań wskazujące na udział PLC γ 1 w różnicowaniu komórek nerwowych [Jang H.J. i współprac., 2013; Ming G. i współprac., 1999] podjęto przy użyciu otrzymanych klonów z wariantami TrkC próbę odpowiedzi na dwa pytania:

- Czy zamiana reszty tyrozyny na resztę fenyloalaniny w miejscu rekrutacji PLC γ 1 do TrkC ma znaczenie dla procesu neurytogenezy?

- Czy różnica dwóch reszt aminokwasów (Ryc. 23.A: S/T, V/I) w regionie poprzedzającym miejsce rekrutacji PLC γ 1 do TrkB i TrkC może przekładać się na różnice w pobudzaniu neurytogenezy?

W tym celu komórki z indukowaną przez Dox ekspresją danego wariantu TrkC traktowano przez siedem dni NT3 i następnie oceniano proporcję komórek zawierających wypustki neuryto-podobne przyjmując te wartości jako miarę procesu wydłużania neurytów. Otrzymane wyniki dotyczące porównania neurytogenezy pobudzanej w klonach TrkC Y820F *versus* TrkC wt pokazały, że w przeciwieństwie do wcześniejszych wyników dotyczących wariantów TrkA [Loeb D.M. i współprac., 1994], stwierdzono jedynie 0.6%-3.6% komórek z neurytami po traktowaniu 10 ng/ml NT3 komórek klonów 36.1, 55.1, 65.1 z TrkC Y820F w porównaniu z 10.2% komórek z neurytami po traktowaniu komórek klonu 4.1 z TrkC wt (Tabela 10., Ryc. 24.). Wskazuje to (jak oczekiwano) na znaczenie reszty tyrozyny w pozycji 820 TrkC dla procesu neurytogenezy. Dla poprawności tego wniosku ma znaczenie stwierdzony wyższy poziom mRNA *trkC* w klonach TrkC820 w porównaniu z klonem TrkCwt (Ryc. 18.).



Ryc. 24. Neurytogeneza komórek PC12-Tet-On zawierających TrkC typu dzikiego (wt) lub wariant z substytucjami reszt aminokwasowych w regionie poprzedzającym (T817S I819V) lub w miejscu wiązania (Y820F) PLC γ 1. Komórki traktowano Dox w celu indukcji ekspresji TrkC, następnie przez siedem dni traktowano 0.1 lub 10 ng/mL NT3. Graficznie przedstawiono wyniki wraz z oceną statystyczną zawartą w Tabeli 11. Przedstawione wykresy słupkowe nie mają wąsów, ponieważ są to proporcje wyliczone z wyników zebranych ze wszystkich przeprowadzonych doświadczeń.

Co ciekawe, wariant TrkC T817S I819V okazał się skuteczniejszy niż TrkC wt w pobudzaniu wydłużania wypustek neuryto-podobnych, o czym świadczy blisko dwukrotnie wyższa (19.3% *vs* 10.2%) i statystycznie istotna ($p < 0.05$, Tabela 11.) proporcja komórek z wypustkami neuryto-podobnymi po stymulacji 10 ng/ml NT3 (Ryc. 24.). Wskazuje to, że przynajmniej w komórkach PC12-Tet-On 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.

6. Wnioski

1.

Otrzymano klony komórek PC12-Tet-On, do których wprowadzono znajdujące się pod kontrolą promotora tetracyklinowego geny kodujące receptorową kinazę tyrozynową TrkC typu dzikiego oraz warianty z modyfikacjami w regionie C-końcowym. Transkrypcję genu kodującego pożądanego wariant TrkC w klonach potwierdzono przez sekwencjonowanie. Wykazano zależność ekspresji egzogenego genu *trkC* od stężenia doksycykliny, która w systemie Tet-On indukuje ekspresję genów znajdujących się pod kontrolą promotora tetracyklinowego. Potwierdzono obecność białka TrkC na powierzchni komórek. We wszystkich klonach potwierdzono ekspresję p75^{NTR} (receptor neurotrofin) i TrkA (receptor nerwowego czynnika wzrostu), które są obecne w komórkach PC12-Tet-On wykorzystanych do uzyskania komórek stabilnie transfekowanych genami kodującymi TrkC.

2.

Wykazano fosforylację kinaz białkowych ERK1/2 w następstwie pobudzenia egzogenego TrkC przez neurotrofinę 3. Przebieg czasowy (kinetyka) pobudzanej przez neurotrofinę 3 fosforylacji ERK1/2 był podobny w badanych klonach, co zasadniczo 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 fosfolipazy C γ 1 niż w klonach z wariantem TrkC zawierającym substytucję reszty tyrozyny resztą fenyloalaniny w pozycji 820, który nie jest zdolny do rekrutacji fosfolipazy C γ 1.

3.

Proces neurytogenezy (czyli tworzenia struktur neuryto-podobnych) zachodził w otrzymanych klonach komórek PC12-Tet-On zarówno w następstwie pobudzania przez nerwowy czynnik wzrostu (ligand TrkA), jak i w następstwie pobudzania przez neurotrofinę 3 (ligand TrkC) komórek zawierających egzogeny TrkC zdolny do rekrutacji fosfolipazy C γ 1. Traktowanie neurotrofiną 3 nie indukowało neurytogenezy w komórkach zawierających TrkC z inaktywowanym miejscem wiązania PLC γ 1 lub jej poziom był bardzo niski, co wskazuje na znaczenie reszty tyrozyny w pozycji 820 TrkC dla neurytogenezy oraz sugeruje udział fosfolipazy C γ 1 w pobudzaniu procesu neurytogenezy przez TrkC.

4.

Wykazano statystycznie istotną tendencję do mocniej pobudzanej przez neurotrofinę 3 neurytogenezy komórek klonu zawierającego wariant TrkC T817S I819V (z C-końcem takim jak w TrkB) w porównaniu z klonem zawierającym TrkC typu dzikiego. Wskazuje to, że przynajmniej w komórkach PC12-Tet-On dla pobudzanego przez neurotrofiny wytwarzania struktur neuryto-podobnych, oprócz kluczowej reszty tyrozyny w miejscu przyłączenia fosfolipazy C γ 1 do receptora neurotrofiny, znaczenie mają także reszty aminokwasów regionu C-końcowego receptora znajdujące się poza właściwym miejscem rekrutacji fosfolipazy C γ 1.

7. Streszczenie

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 przyłączania (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 pożądany 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 egzogenego 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 pobudzania 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 $\gamma 1$ dla procesu neurytogenezy. Wykazano statystycznie istotną tendencję do mocniej pobudzanej 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.

8. Abstract

Neurotrophins are a group of proteins that determine the growth, survival and proper development of nerve cells. These neurotrophins are: NGF (nerve growth factor), BDNF (brain-derived neurotrophic factor), NT3 (neurotrophin 3) and NT4 (neurotrophin 4/5) that bind with high affinity to the Trk family receptor tyrosine kinases. NGF is a ligand for TrkA, BDNF and NT4 for TrkB, and NT3 for TrkC. NT3 can also binds with lower affinity to TrkA and TrkB. In the central nervous system, the presence of TrkB and TrkC on the same nerve cells is quite common, which subsequently justifies the search for differences in the specificity of neurotrophin receptors. Trk proteins contain an extracellular domain that determines proper ligand binding, a trans-membrane domain and a cytoplasmic domain, containing the tyrosine kinase core and regulatory sequences. Trk exists as a dimer and the binding of the neurotrophin to the receptor leads to a conformation change in the cytoplasmic domains that allow the mutual phosphorylation of tyrosine residues in the cytoplasmic domains. This results in the formation of docking sites for cytoplasmic adapter proteins and the enzyme phospholipase C γ 1 (PLC γ 1) containing the PTB and SH2 domains, triggering intracellular signaling cascades such as Ras / Raf / MEK / ERK, PI3K/Akt and PLC γ 1 leading to second messengers in signal transduction formation. The recruitment of PLC γ 1 to a phosphorylated tyrosine residue in the C-terminal region of the Trk is essential for the phosphorylation and activation of PLC γ 1 by Trk. In order to verify weather the difference of only two amino acid residues in the C terminal regions of TrkB and TrkC and more specifically in the -3 (S/T) and -1 (V/I) positions immediately before the PLC γ 1 binding site is sufficient to induce differential neurite growth following activation of the receptors as well as the importance of the tyrosine residue in the recruitment site of PLC γ 1 to TrkC, the following TrkC variants were obtained by site-directed mutagenesis: wild-type; with the substitutions T817S I819V prior to the PLC γ 1 binding site (with a C-terminus as in TrkB); with the Y820F substitution (with inactivated PLC γ 1 binding site).

The aim of this research was to explain the importance of regulatory sequences at the C-terminus of TrkC in TrkC-mediated neuritogenesis: the PLC γ 1 binding site and the sequence immediately preceding the PLC γ 1 binding site.

Clones (variants) of PC12-Tet-On cells stably transfected with *trkC* genes under the transcriptional control of the tetracycline promoter were established and characterized. The transcription of the gene encoding the desired TrkC variant in the clones was confirmed by sequencing. The dependence of the *trkC* gene expression on the concentration of doxycycline, which in the Tet-On system induces the expression of genes under the control of the tetracycline promoter, has been demonstrated. The TrkC protein of the expected size was confirmed on the cell surface. Phosphorylation of ERK1/2 protein kinases was demonstrated as a result of exogenous TrkC stimulation by neurotrophin 3. The phosphorylation kinetics of ERK1/2 was similar in the studied clones which is essentially consistent with the results of previous studies by different authors. The results of our work indicate the tendency for a higher level of ERK1/2 phosphorylation in clones with TrkC variants capable of recruiting PLC γ 1 than in clones with the TrkC Y820F variant.

Neuritogenesis, the formation of neurite-like structures, was observed in the obtained PC12-Tet-On cell clones following the stimulation of wild-type TrkC-containing cells by neurotrophin 3. Neurotrophin 3 treatment did not induce neuritogenesis or its level was very low in cells containing TrkC Y820F indicating the importance of a tyrosine residue at the PLC γ 1 binding site for the neuritogenesis process. In this study statistically significant trend was demonstrated for the neurotrophin 3-induced cell neuritogenesis of the clone containing the TrkC T817S I819V variant compared to the clone containing wild-type TrkC. This would indicate that for the neurotrophin-induced production of neurite-like structures, amino acid residues in the C-terminal region of TrkC located outside the proper PLC γ 1 recruitment site are also important despite the key tyrosine residue at the site of PLC γ 1 attachment to the neurotrophin receptor.

In summary, both the PLC γ 1 docking site at the C-terminal region of TrkC and preceding amino acid residues are significant for TrkC-triggered outgrowth of neurites from PC12-Tet-On cells.

9. Piśmiennictwo

1. Abraham W.C., Jones O.D., Glanzman D.L.: Is plasticity of synapses the mechanism of long-term memory storage? *NPJ Sci Learn.* 2019; 4: 9
2. Alava M.A., DeBell K.E., Conti A., Hoffman T., Bonvini E.: Increased intracellular cyclic AMP inhibits inositol phospholipid hydrolysis induced by perturbation of the T cell receptor/CD3 complex but not by G-protein stimulation. Association with protein kinase A - mediated phosphorylation of phospholipase C - γ 1. *J. Biochem.*, 1992; 284: 189-199
3. Bae S.S., Choi J.H., Oh Y.S., Yun S.U., Ryu S.H., Suh P.G.: Regulation of phospholipase C – γ 1 by protein kinase A - dependent phosphorylation. *Adv. Enzyme Regul.*, 2002; 42: 195-211
4. Bae Y.S., Cantley L.G., Chen C.S., Kim S.R., Kwon K.S., Rhee S.G.: Activation of phospholipase C - γ 1 by phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 4465- 4469
5. Bae Y.S., Kang S.W., Seo M.S., Baines I.C., Tekle E., Chock P.B., Rhee S.G.: Epidermal growth factor (EGF) - induced generation of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 217- 221
6. Barbacid M.: The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol.* 1994; 25: 1386-1403
7. Barnabe-Heider F., Miller F.D.: Endogenously produced neurotrophins regulate survival and differentiation of cortical progenitors via distinct signaling pathways. *J Neurosci.* 2003; 23: 5149-5160
8. Bentley J.K., Juilfs D.M., Uhler M.D.: Nerve growth factor inhibits PC12 cell PDE 2 phosphodiesterase activity and increases PDE 2 binding to phosphoproteins. *J Neurochem.* 2001; 76: 1252-1263
9. Berens C., Hillen W.: Gene regulation by tetracyclines. Constraints of resistance regulation in bacteria shape TetR for application in eukaryotes. *Eur J Biochem.* 2003; 20: 3109–3121
10. Bertrand T.: Crystal Structures of Neurotrophin Receptors Kinase Domain. *Vitam Horm.* 2017; 104: 1-18
11. Blobe G. C., Stribling S., Obeid L. M. and Hannun Y. A.: Protein kinase C isoenzymes: regulation and function. *Cancer Surv.*, 1996; 27: 213–248
12. Burtnick, L.D., Robinson, R.C., Choe, S.: Structure and function of gelsolin. *Results Probl. Cell Differ.*, 2001; 32: 201–211
13. Casarotto P.C., Girych M., Fred S.M., Kovaleva V., Moliner R., Enkavi G., Biojone C., Cannarozzo C., Sahu M.P., Kaurinkoski K., Brunello C.A., Steinzeig A., Winkel F., Patil S., Vestring S., Serchov T., Diniz C.R.A.F., Laukkanen L., Cardon I., Antila H., Rog T., Piepponen T.P., Bramham C.R., Normann C., Lauri S.E., Saarma M., Vattulainen I., Castrén E.: Antidepressant drugs act by directly binding to TRKB neurotrophin receptors. *Cell.* 2021; 184: 1299-1313.e19
14. Chang J.S., Kim S.K., Kwon T.K., Bae S.S., Min D.S., Lee Y.H., Kim S.O., Seo J.K., Choi J.H., Suh P.G.: Pleckstrin homology domains of phospholipase C - γ 1 directly interact with beta - tubulin for activation of phospholipase C - γ 1 and reciprocal modulation of beta - tubulin function in microtubule assembly. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 6897-6905
15. Cocco E., Scaltriti M., Drilon A.: NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018; 15: 731-747
16. Cooper, J.A., Schafer, D.A.: Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2000; 12: 97–103

17. Cseh B., Doma E., Baccarini M.: "RAF" neighborhood: protein-protein interaction in the Raf/Mek/Erk pathway. *FEBS Lett.* 2014; 588: 2398-2406
18. D'Alessandro R., Klajn A., Stucchi L., Podini P., Malosio M.L., Meldolesi J.: Expression of the neurosecretory process in PC12 cells is governed by REST. *J Neurochem.* 2008; 105:1369-1383
19. D'Alessandro R., Racchetti G., Meldolesi J.: Outgrowth of neurites is a dual process. *Commun Integr Biol.* 2010; 3: 576-578
20. Das K.P., Freudenrich T.M., Mundy W.R.: Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures. *Neurotoxicol Teratol.* 2004; 26: 397-406
21. Dekkers M.P., Nikolettou V., Barde Y.A.: Cell biology in neuroscience: Death of developing neurons: new insights and implications for connectivity. *J Cell Biol.* 2013; 203: 385-393
22. Di Paolo G., De Camilli P.: Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*, 2006; 443: 651- 657
23. Endres N.F., Barros T., Cantor A.J., Kuriyan J.: Emerging concepts in the regulation of the EGF receptor and other receptor tyrosine kinases. *Trends Biochem Sci.* 2014; 39: 437-446
24. Ernfors P., Lee K.F., Kucera J., Jaenisch R.: Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell.* 1994; 77: 503-512
25. Esteban P.F., Yoon H.Y., Becker J., Dorsey S.G., Caprari P., Palko M.E., Coppola V., Saragovi H.U., Randazzo P.A., Tessarollo L.: A kinase-deficient TrkC receptor isoform activates Arf6-Rac1 signaling through the scaffold protein tamalin. *J. Cell Biol.* 2006; 173: 291-299
26. Falasca M., Logan S.K., Lehto V.P., Baccante G., Lemmon M.A., Schlessinger J.: Activation of phospholipase C γ by PI3 – kinase induced PH domain - mediated membrane targeting. *EMBO J.*, 1998; 17: 414-422
27. Goh L.K., Sorkin A.: Endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013; 5: 1-17
28. Gomez, T.M., Robles, E., Poo, M., Spitzer, N.C.: Filopodial calcium transients promote substrate-dependent growth cone turning. *Science.* 2001; 291: 1983–1987
29. Gossen M., Bujard H.: Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1992; 89: 5547–5551
30. Gossen M., Freundlieb S., Bender G., Muller G., Hillen W., Bujard H.: Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science.* 1995; 268:1766–1769
31. Greene L.A., Tischler A.S.: Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976; 73: 2424-2428
32. Gresset A., Hicks S.N., Harden T.K., Sondek J.: Mechanism of phosphorylation-induced activation of phospholipase C-gamma isozymes. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 35836-35847
33. Grewal S.S., Horgan A.M., York R.D., Withers G.S., Banker G.A., Stork P.J.: Neuronal calcium activates a Rap1 and B-Raf signaling pathway via the cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol. Chem.* 2000; 275: 3722-3728
34. Hapner S.J., Boeshore K.L., Large T.H., Lefcort F.: Neural differentiation promoted by truncated trkC receptors in collaboration with p75(NTR). *Dev Biol.* 1998; 201: 90-100
35. Huang E.J., Reichardt L.F.: Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.* 2001; 24: 677-736

36. Huang E.J., Reichardt L.F.: Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 2003; 72:609-642
37. Hwang S.C., Jhon D.Y., Bae Y.S., Kim J.H., Rhee S.G.: Activation of phospholipase C - gamma by the concerted action of tau proteins and arachidonic acid. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 18342-18349
38. Itoh T., Koshiba S., Kigawa T., Kikuchi A., Yokoyama S., Takenawa T.: Roles of the ENTH domain in phosphatidylinositol - 4,5 - bisphosphate binding and endocytosis. *Science*, 2001; 291: 1047-1051
39. Jakus Z., Simon E., Frommhold D., Sperandio M., Mocsai A.: Critical role of phospholipase Cgamma2 in integrin and Fc - receptor - mediated neutrophil functions and the effector phase of autoimmune arthritis. *J. Exp. Med.*, 2009; 206: 577-593
40. Janetopoulos C., Deverotes P.: Phosphoinositide signaling plays a key role in cytokinesis. *J. Cell Biol.*, 2006; 174: 485-490
41. Jang H.J., Yang Y.R., Kim J.K., Choi J.H., Seo Y.K., Lee Y.H., Lee J.E., Ryu S.H., Suh P.G.: Phospholipase C- γ 1 involved in brain disorders. *Adv Biol Regul.* 2013; 53, 51-62
42. Jones G.A., Carpenter G.: The regulation of phospholipase C - γ 1 by phosphatidic acid. Assessment of kinetic parameters. *J. Biol. Chem.*, 1993; 268: 20845-20850
43. Joo W., Hippenmeyer S., Luo L.: Neurodevelopment. Dendrite morphogenesis depends on relative levels of NT-3/TrkC signaling. *Science*. 2014; 346: 626-629
44. Jörnvall H., Blokzijl A., ten Dijke P., Ibáñez CF.: The orphan receptor serine/threonine kinase ALK7 signals arrest of proliferation and morphological differentiation in a neuronal cell line. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 5140-5146
45. Ju Y., Tam K.Y.: Pathological mechanisms and therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Neural Regen Res.* 2022; 17: 543-549
46. Kaplan D.R., Miller F.D.: Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2000; 10: 381-390
47. Kashiwada M., Lu P., Rothman P.B.: PIP3 pathway in regulatory T cells and autoimmunity. *Immunol. Res.*, 2007; 39: 194- 224
48. Khoshyomn S., Penar P.L., Rossi J., Wells A., Abramson D.L., Bhushan A.: Inhibition of PLC gamma - 1 activation blocks glioma cell motility and invasion of fetal rat brain aggregates. *Neurosurgery*, 1999; 44: 568-577
49. Kłopotowska D.: Konstrukcja modelu badawczego do identyfikacji genów aktywowanych w komórkach neuralnych przez szlaki sygnałowe zależne od receptora neurotrofiny-3 (TrkC). *Rozprawa doktorska 2007*
50. Kłopotowska D., Strzadala L., Matuszyk J.: Inducibility of doxycycline-regulated gene in neural and neuroendocrine cells strongly depends on the appropriate choice of a tetracycline-responsive promoter. *Neurochem. Int.*, 2008; 52: 221-229
51. Kondoh K., Torii S., Nishida E.: Control of MAP kinase to the nucleus. *Chromosoma*. 2008; 114: 86-91
52. Krawczyk P., Twarog E., Kurowska E., Kłopotowska D., Matuszyk J.: Establishment of a cellular model to study TrkC-dependent neuritogenesis. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2015;51: 241-248
53. Krawczyk P., Matuszyk J.: Mechanizm aktywacji fosfolipazy C γ 1; *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*; 2011; 65: 470-477
54. Krześlak A.: Kinaza Akt: kluczowy regulator metabolizmu i progresji nowotworów. *Postępy Hig. Med. Dosw.* 2010; 64: 490-503
55. Lemmon M.A., Schlessinger J.: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2010; 141: 1117-1134

56. Levresse V., Butterfield L., Zentrich E., Heasley L.E.: Akt negatively regulates the cJun N-terminal kinase pathway in PC12 cells. *J Neurosci Res.* 2000; 62: 799-808
57. Loeb D.M., Stephens R.M., Copeland T., Kaplan D.R., Greene L.A.: A Trk nerve growth factor (NGF) receptor point mutation affecting interaction with phospholipase C-gamma 1 abolishes NGF-promoted peripherin induction but not neurite outgrowth. *J Biol Chem.* 1994; 269: 8901-8910
58. Mach A., Mirowska-Guzel D., Członkowski A., Członkowska A.: Czynniki neurotroficzne w chorobach neurodegeneracyjnych. *Farmakoter Psychiatr Neurol*, 2007; 4: 173-180
59. Machide M., Kamitori K., Kohsaka S.: Hepatocyte Growth Factor - induced differential activation of phospholipase Cg1 and phosphatidylinositol 3 - kinase is regulated by Tyrosine Phosphatase SHP-1 in astrocytes. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 31392-31398
60. Mamidipudi V., Wooten M.W.: Dual role for p75(NTR) signaling in survival and cell death: can intracellular mediators provide an explanation? *J Neurosci Res.* 2002; 68:373-384
61. Martin T.F.: PI(4,5)P2 regulation of surface membrane traffic. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2001; 13: 493- 499
62. Mateos S., Calothy G., Lamballe F.: The noncatalytic TrkCNC2 receptor is cleaved by metalloproteases upon neurotrophin-3 stimulation. *Oncogene.* 2003; 22: 740-745
63. McGregor L.M., Baylin S.B., Griffin C.A., Hawkins A.L., Nelkin B.D.: Molecular cloning of the cDNA for human TrkC (NTRK3), chromosomal assignment, and evidence for a splice variant. *Genomics.* 1994; 22: 267-272
64. McKercher M.A., Guan X., Tan Z., Wuttke D.S.: Multimodal Recognition of Diverse Peptides by the C-Terminal SH2 Domain of Phospholipase C- γ 1 Protein. *Biochemistry.* 2017; 56: 2225-2237
65. Medina D.L., Sciarretta C., Calella A.M., Von Bohlen Und Halbach O., Unsicker K., Minichiello L.: TrkB regulates neocortex formation through the Shc/PLCgamma-mediated control of neuronal migration. *EMBO J.* 2004; 23: 3803-3814
66. Menn B., Timsit S., Calothy G., Lamballe F.: Differential expression of TrkC catalytic and noncatalytic isoforms suggests that they act independently or in association. *J. Comp. Neurol.* 1998; 401: 47-64
67. Menn B., Timsit S., Represa A., Mateos S., Calothy G., Lamballe F.: Spatiotemporal expression of noncatalytic TrkC NC2 isoform during early and late CNS neurogenesis: a comparative study with TrkC catalytic and p75NTR receptors. *Eur. J. Neurosci.* 2000 9: 3211-3223
68. Ming G., Song H., Berninger B., Inagaki N., Tessier-Lavigne M., Poo M.: Phospholipase C-gamma and phosphoinositide 3-kinase mediate cytoplasmic signaling in nerve growth cone guidance. *Neuron.* 1999; 23: 139-148
69. Minichiello L.: TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat Rev Neurosci.* 2009; 10: 850-860
70. Minichiello L., Korte M., Wolfer D., Kühn R., Unsicker K., Cestari V., Rossi-Arnaud C., Lipp H.P., Bonhoeffer T., Klein R.: Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron.* 1999; 2: 401-444
71. Mohammadi M., Dionne C.A., Li W., Li N., Spivak T., Honegger A.M., Jaye M., Schlessinger J.: Point mutation in FGF receptor eliminates phosphatidylinositol hydrolysis without affecting mitogenesis. *Nature*, 1992; 358: 681- 684
72. Ohno S., Nishizuka Y.: Protein kinase C isotypes and their specific functions: prologue. *J. Biochem.*, 2002; 132: 509-511
73. Park J.H., Lee SB, Lee K.H., Ahn J.Y.: Nuclear Akt promotes neurite outgrowth in the early stage of neuritogenesis. *BMB Rep.* 2012; 4: 521-525

74. Pawełczyk T.: Przekazywanie sygnału w komórce z udziałem fosfotydyloinozytoloswoistych fosfolipaz C. *Postepy Hig. Med. Dośw.*, 1999; 53: 173-182
75. Pawson T.: SH2 and SH3 domains in signal transduction. *Adv. Cancer Res.*, 1994; 64: 87- 110
76. PhosphoSitePlus. <http://www.phosphosite.org> (07.06.2011)
77. Plotnikov A., Zehorai E., Procaccia S., Seger R.: The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011; 1813: 1619- 1633
78. Poulin B., Sekiya F., Rhee S.G.: Intramolecular interaction between phosphorylated tyrosine - 783 and the C - terminal src homology 2 domain activates phospholipase C γ 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005; 102: 4276-4281
79. Poulin, B., Sekiya, F., Rhee, S. G.: Differential roles of the src homology 2 domains of phospholipase C- gamma 1 (plc - gamma 1) in platelet- derived growth factor induced activation of PLC - gamma 1 in intact. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 6411-6416
80. Reichardt L.F.: Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006 361:1545-64
81. Rong R., Ahn J.Y., Chen P., Suh P.G., Ye K.: Phospholipase activity of phospholipase C- gamma1 is required for nerve growth factor-regulated MAP kinase signaling cascade in PC12 cells. *J. Biol. Chem*. 2003; 278: 52497-52503
82. Roskoski R. Jr.: ERK1/2 MAP kinases: Structure, function and regulation. *Pharmacol. Res*. 2012; 66: 105-143
83. Sánchez S., Jiménez C., Carrera A.C., Diaz-Nido J., Avila J., Wandosell F.: A cAMP-activated pathway, including PKA and PI3K, regulates neuronal differentiation. *Neurochem Int*. 2004; 44: 231-242
84. Sato T., Muroyama Y., Saito T.: Inducible gene expression in postmitotic neurons by an in vivo electroporation-based tetracycline system. *J. Neurosci. Methods*, 2013; 214: 170-176
85. Schindowski K., Belarbi K., Buée L.: Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. *Genes Brain Behav*. 2008; 7 Suppl. 1: 43-56
86. Schlessinger J.: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2000; 103: 211-225
87. Schluter, K., Jockusch, B.M., Rothkegel, M.: Profilins as regulators of actin dynamics. *Biochim. Biophys. Acta*, 1997; 1359: 97-109
88. Sebök A., Nusser N., Debreceni B., Guo Z., Santos M.F., Szeberenyi J., Tigyi G.: Different roles for RhoA during neurite initiation, elongation, and regeneration in PC12 cells. *J Neurochem*. 1999; 73:949-960
89. Sekiya F., Poulin B., Kim Y.J., Rhee S.G.: Mechanism of tyrosine phosphorylation and activation of phospholipase C - gamma 1. Tyrosine 783 is not sufficient for lipase activity. *J. Biol. Chem.*, 2004; 31: 32181-32190
90. Serrano C.J., Graham L., DeBell K., Rawat R., Veri M.C., Bonvini E., Rellahan B.L., Reischl I.G.: A new tyrosine phosphorylation site in PLC γ 1: the role of tyrosine 775 in immune receptor signaling. *J. Immunol.*, 2005; 174: 6233-6237
91. Shelton D.L., Sutherland J., Gripp J., Camerato T., Armanini M.P., Phillips H.S., Carroll K., Spencer S.D., Levinson A.D.: Human trks: molecular cloning, tissue distribution, and expression of extracellular domain immunoadhesins. *J. Neurosci*. 1995; 15:477-491
92. Sorkin, A., and Goh, L.K.: Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp. Cell Res*. 2009; 315: 683-696.
93. Stephens R.M., Loeb D.M., Copeland T.D., Pawson T., Greene L.A., Kaplan D.R.: Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses. *Neuron*. 1994; 12: 691-705

94. Stieger K., Belbellaa B., Le Guiner C., Moullier P., Rolling F.: In vivo gene regulation using tetracycline-regulatable systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2009; 61: 527-541
95. Suh B.C., Hille B.: Regulation of ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2005; 15: 370-378
96. Suh P.G., Park J.I., Manzoli L., Cocco L., Peak J.C., Katan M., Fukami K., Kataoka T., Yun S., Ryu S.H.: Multiple roles of phosphoinositide - specific phospholipase C isozymes. *BMB Rep.*, 2008; 41: 415-434
97. Szumiło M., Rahdeń - Staroń I.: Fosfolipaza C zależna od fosfatydyloinozytolu w komórkach ssaków - budowa, właściwości i funkcja. *Postepy Hig. Med. Dośw.*, 2008; 62: 47-54
98. Talebian A., Robinson-Brookes K., Meakin S.O.: TrkB Regulates N-Methyl-D-Aspartate Receptor Signaling by Uncoupling and Recruiting the Brain-Specific Guanine Nucleotide Exchange Factor, RasGrf1. *J Mol Neurosci.* 2019; 67: 97-110
99. Tognon C., Knezevich S.R., Huntsman D., Roskelley C.D., Melnyk N., Mathers J.A., Becker L., Carneiro F., MacPherson N., Horsman D., Poremba C., Sorensen P.H.: Expression of the ETV6-NTRK3 gene fusion as a primary event in human secretory breast carcinoma. *Cancer Cell.* 2002; 2: 367-376
100. Tojima T., Ito E.: Signal transduction cascades underlying de novo protein synthesis required for neuronal morphogenesis in differentiating neurons. *Prog Neurobiol.* 2004; 3:183-193
101. Toniatti C., Bujard H., Cortese R., Ciliberto G.: Gene therapy progress and prospects: transcription regulatory systems. *Gene Ther.* 2004; 11: 649-657
102. Tsoulfas P., Stephens R.M., Kaplan D.R., Parada L.F.: TrkC isoforms with inserts in the kinase domain show impaired signaling responses. *J Biol Chem.* 1996; 271: 5691-5697
103. Valius M., Bazenet C., Kazlauskas A.: Tyrosines 1021 and 1009 are phosphorylation sites in the carboxy terminus of the platelet-derived growth factor receptor beta subunit and are required for binding of phospholipase C gamma and a 64 - kilodalton protein, respectively. *Mol. Cell Biol.*, 1993; 13: 133-143
104. Vaudry D., Stork P.J., Lazarovici P., Eiden L.E.: Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. *Science.* 2002; 296: 1648-1649
105. Vicario-Abejón C., Collin C., Tsoulfas P., McKay R.D.: Hippocampal stem cells differentiate into excitatory and inhibitory neurons. *Eur J Neurosci.* 2000; 12: 677-688
106. Vossler M.R., Yao H., York R.D., Pan M.G., Rim C.S., Stork P.J.: cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell.* 1997 89: 73-82
107. Waetzig V., Herdegen T.: MEKK1 controls neurite regrowth after experimental injury by balancing ERK1/2 and JNK2 signaling. *Mol Cell Neurosci.* 2005; 30: 67-78
108. Wang Y., Wu J., Wang Z.: Akt binds to and phosphorylates phospholipase C-gamma1 in response to epidermal growth factor. *Mol Biol Cell.* 2006; 17: 2267-2277
109. Way K.J., Katai N., King G.L.: Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications. *Diabetic Med.*, 2001; 18: 945-959
110. Wehrman T., He X., Raab B., Dukipatti A., Blau H., Garcia K.C.: Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors, *Neuron* 53 (2007): 25-38.
111. Wells A., Grandis J.R.: Phospholipase C - gamma 1 in tumor progression. *Clin. Exp. Metastasis*, 2003; 20: 285- 290
112. Wen, W., Yan, J., Zhang M.: Structural characterization of the split pleckstrin homology domain in phospholipase C - gamma 1 and its interaction with TRPC3. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 12060-12068
113. Wong K.K., Engelman J.A., Cantley L.C.: Targeting the PI3K pathway in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2010; 20: 87-90

114. www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/
115. www.socscistatistics.com/
116. www.vassarstats.net/
117. Yablonski D., Kadlec T., Weiss A.: Identification of a phospholipase C - γ 1 (PLC γ 1) SH3 domain-binding site in SL - 76 required for T - Cell Receptor-mediated activation of PLC γ 1 and NFAT. *Mol. Cell. Biol.*, 2001; 21: 4208- 4218
118. Yoon S., Seger R.: The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 2006; 24: 21–44
119. Zhou J., Valletta J.S., Grimes M.L., Mobley W.C.: Multiple levels for regulation of TrkA in PC12 cells by nerve growth factor. *J Neurochem.* 1995; 65: 1146-1156

10. Spis rycin i tabel

Spis rycin

- Ryc. 1. Zmiany morfologiczne w różnicującej się komórce nerwowej
- Ryc. 2. Struktura stożka wzrostu
- Ryc. 3. Proponowany szlak przekazywania sygnału w procesie neurytogenezy
- Ryc. 4. Budowa receptorowych kinaz tyrozynowych Trk
- Ryc. 5. Schemat interakcji dimerów neurotrofiny z monomerami receptorowej kinazy tyrozynowej Trk.
- Ryc.6. Uproszczony szlak sygnałowy TrkC
- Ryc. 7. Molekularny mechanizm aktywacji PLC γ 1
- Ryc. 8. Schemat budowy systemu tetracyklinowego
- Ryc. 9. Schemat działania systemu typu Tet-On
- Ryc. 10. Rodzaje systemów tetracyklinowych
- Ryc. 11. Plazmidy systemu tetracyklinowego
- Ryc. 12. Zasada działania systemu Gal4-Elk1
- Ryc. 13. Ekspresja egzogennej TrkC w klonach stabilnych transfektantów komórek PC12-Tet-On pod kontrolą promotora tetracyklinowego P_{tight}
- Ryc. 14. Sekwencja genów kodujących TrkC typu dzikiego i genów z miejscami mutacji w regionie wiązania PLC γ 1
- Ryc. 15. Analiza klonów stabilnych transfektantów komórek PC12-Tet-On na cytometrze przepływowym
- Ryc. 16. Ekspresja zewnątrzkomórkowej domeny TrkC w klonach stabilnych transfektantów komórek PC12-Tet-On
- Ryc. 17. Poziom ekspresji receptorów TrkA i p75^{NTR} w stabilnych transfektantach komórek PC12-Tet-On
- Ryc. 18. Wpływ stężenia Dox na ekspresję TrkC w klonach stabilnych transfektantów komórek PC12-Tet-On
- Ryc. 19. Analiza aktywacji kinaz białkowych ERK1/2 w komórkach TrkCwt 4.1

- Ryc. 20. Analiza aktywacji kinaz białkowych ERK1/2, p38 i JNK oraz TrkC, pTyr i Akt w klonach stabilnych transfektantów komórek PC12-Tet-On
- Ryc. 21. Wpływ inhibitora U73122 na aktywację ERK1/2
- Ryc. 22. Neurytogeneza komórek PC12-Tet-On z ekspresją wariantów TrkC
- Ryc. 23. C-końcowe sekwencje białek rodziny Trk oraz wykorzystanych w tej pracy wariantów TrkC
- Ryc. 24. Neurytogeneza komórek PC12-Tet-On zawierających TrkC typu dzikiego (wt) lub wariant z substytucjami reszt aminokwasowych w regionie poprzedzającym (T817S I819V) lub w miejscu wiązania (Y820F) PLC γ 1

Spis Tabel

Tabela 1. Porównanie sekwencji reszt aminokwasowych fosfolipazy C γ 1 człowieka, myszy i szczura

Tabela 2. Porównanie sekwencji aminokwasowych poszczególnych domen fosfolipazy C γ 1 oraz C γ 2 u człowieka

Tabela 3. Wektory

Tabela 4. Skład i przeznaczenie buforów

Tabela 5. Skład żeli agarozowych i poliakrylamidowych

Tabela 6. Sekwencje starterów zastosowanych w metodzie PCR i real-time PCR

Tabela 7. Pobudzana przez NT3 fosforylacja ERK1/2 w klonach PC12-Tet-On z indukowaną przez Dox ekspresją odpowiedniego wariantu TrkC

Tabela 8. Pobudzana przez NT3 fosforylacja Akt, JNK, p38 MAPK w klonach PC12-Tet-On z indukowaną przez Dox ekspresją odpowiedniego wariantu TrkC

Tabela 9. Analiza inicjacji i elongacji procesu neurytogenezy komórek stabilnych transfektantów PC12-Tet-On

Tabela 10. Neurytogeneza komórek PC12-Tet-On stabilnie transfekowanych aktywowanymi przez Dox genami kodującymi warianty TrkC

Tabela 11. Neurytogeneza komórek PC12-Tet-On z ekspresją wariantów TrkC

Tabela 12. Analiza długości wytworzonych struktur neuryto-podobnych w klonach komórek stabilnych transfektantów PC12-Tet-On