

TOMASZ RADZIK

Wpływ zaburzeń homeostazy wapniowej na procesy sygnalizacji indukowane chemokiną CCL5 w różnicowanych komórkach PC12

Praca doktorska

Promotor pracy: prof. dr hab. Ludmiła Żylińska

STRESZCZENIE

Prawidłowe funkcjonowanie każdej komórki jest ściśle związane z homeostazą wapniową, czyli stanem równowagi, w której cytozolowe stężenie wapnia jest utrzymywane na określonym, niskim poziomie wobec ~10000 razy wyższego na zewnątrz komórki. Zachowanie tej równowagi możliwe jest dzięki istnieniu szeregu białek zaangażowanych w krążenie Ca^{2+} między cytoplazmą a przestrzenią pozakomórkową. Jednym z najważniejszych transporterów jest plazmatyczna pompa wapniowa (PMCA), enzym o wysokiej czułości i zdolności do precyzyjnej regulacji spoczynkowego poziomu Ca^{2+} w komórce. PMCA występuje w postaci 4 głównych izoform, przy czym PMCA2 i PMCA3 są specyficzne dla tkanki nerwowej. Skuteczna regulacja homeostazy wapniowej jest szczególnie ważna w ośrodkowym układzie nerwowym z uwagi na przekaźnictwo nerwowe i ciągłą sygnalizację wapniową. Dlatego też dysfunkcja PMCA skutkuje zachwianiem delikatnej równowagi komórkowej. Ma to miejsce w trakcie starzenia organizmu oraz w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych. Komórki cechujące się zaburzoną homeostazą wapniową są bardziej podatne na wszelkiego rodzaju czynniki stresowe takie, jak stres oksydacyjny czy stany zapalne. Dodatkowym czynnikiem może być postępujące z wiekiem rozszerzenie bariery krew-mózg. Jej przepuszczalność zwiększa się wraz z wiekiem i prowadzi do infiltracji tkanki nerwowej przez czynniki prozapalne, m.in. interleukiny i chemokiny, a także komórki immunologiczne.

W niniejszej rozprawie podjęto próbę określenia wpływu zaburzonej homeostazy wapniowej na odpowiedź komórek stymulowanych prozapalną chemokiną CCL5. Model doświadczalny stanowiły zmodyfikowane linie zróżnicowanych komórek PC12 o obniżonym poziomie neurospecyficznych izoform PMCA2 (2) lub PMCA3 (3), co skutkowało zwiększonym stężeniem cytozoluowego Ca^{2+} .

Przeprowadzona analiza immunologiczna wykazała obecność receptorów chemokiny CCL5, tj. CCR1, CCR3 i CCR5, przy czym w liniach ze zmienionym składem izoform PMCA

zaobserwowano różnice w ilości receptorów w stosunku do kontrolnych komórek PC12. Poziom CCR1 był wyższy w linii _3, podczas gdy w linii _2 zwiększona była ilość CCR3. Ponadto, komórki obu linii wykazywały istotny statystycznie wzrost CCR5. Receptory chemokinowe są białkami błonowymi i aby móc wiązać obecne w przestrzeni międzykomórkowej ligandy, muszą występować w błonie plazmatycznej. Dlatego też, następnym etapem prac była immunocytochemiczna analiza ich lokalizacji przy zastosowaniu mikroskopii konfokalnej. CCR1 i CCR3 były obecne w niewielkiej ilości, głównie w cytoplazmie komórek, a więc prawdopodobnie mogły mieć niewielki udział w sygnalizacji indukowanej CCL5. Natomiast CCR5 cechował się w znacznym stopniu lokalizacją błonową i co szczególnie interesujące, jego ilość w błonie komórki była większa w liniach _2 i _3.

Znaczenie powyższych obserwacji analizowano w kolejnych etapach pracy przyjmując hipotezę, że w warunkach bezwapniowych, sygnalizacja uruchamiana przez CCL5 zachodzi poprzez aktywację PLC, zaś wytworzony IP_3 poprzez receptory uwalnia Ca^{2+} z siateczki śródplazmatycznej. Odpowiedzią komórek na ekspozycję CCL5 był wzrost sygnału wapniowego, bardziej intensywny w liniach modyfikowanych, szczególnie w linii _2. Zastosowanie specyficznych inhibitorów poszczególnych etapów potencjalnej ścieżki sygnałowej potwierdziło drogę sygnału CCL5.

Z uwagi na fakt, że to receptory IP_3 wydają się być ostatecznymi efektorami CCL5, przeprowadzono analizę ich ekspresji na poziomie mRNA i funkcjonalnego białka. Wynikiem obu analiz była obserwacja, że w modyfikowanych komórkach PC12 obniżała się ilość IP_3R-1 i IP_3R-2 w stosunku do komórek kontrolnych, natomiast wzrastał poziom ekspresji IP_3R-3 . Może to sugerować pewien rodzaj adaptacji komórek, gdyż IP_3R-3 cechuje się niższym powinowactwem do IP_3 niż pozostałe izoformy. Zmiana taka może przyczyniać się do zwiększenia odporności komórek z zaburzoną homeostazą wapniową na sygnalizację powodującą opróżnienie magazynów Ca^{2+} w siateczce śródplazmatycznej. Należy jednak podkreślić, że procesy kompensacyjne wydają się skuteczniej przeciwdziałać skutkom wzrostu sygnału wapniowego w linii ze zredukowaną ilością PMCA3, co sugeruje, że w warunkach fizjologicznych PMCA2 najszybciej i w największym stopniu odpowiada za wygaszanie sygnału Ca^{2+} . Tak więc osłabienie działania tej „szybkiej” izoformy i związane z tym zaburzenia homeostazy wapniowej mogą być znacznie bardziej destrukcyjne dla komórki nerwowej.

SUMMARY

The proper functioning of each cell is closely related to calcium homeostasis under the state of equilibrium, in which the cytosolic calcium concentration is maintained at a certain low level compared to ~ 10,000 times higher extracellular Ca^{2+} . Preservation of this balance is possible due to presence of a number of proteins involved in Ca^{2+} circulation between the cytoplasm and the extracellular space. One of the most important transporters is the plasma calcium pump (PMCA), an enzyme with high sensitivity and the ability to precisely regulate the resting level of Ca^{2+} in the cell. PMCA exists in four major isoforms, with PMCA2 and PMCA3 being specific for neural tissue. Effective regulation of calcium homeostasis is particularly important in the central nervous system due to nerve transmission and continuous calcium signaling. Therefore, PMCA dysfunction results in disturbance of a delicate cellular balance. Such process occurs during aging and in the course of neurodegenerative diseases. Cells with disturbed calcium homeostasis are more susceptible to all type of harmful factors, such as oxidative stress or inflammation. An additional cause may be the age-related leaking of the blood-brain barrier. Permeability of BBB increases with age and leads to infiltration of nervous tissue by pro-inflammatory molecules, including interleukin and chemokines, as well as immune cells.

This dissertation attempts to determine the effect of disturbed calcium homeostasis on the cellular response induced by a pro-inflammatory chemokine CCL5. The experimental model consisted of modified lines of differentiated PC12 cells with a decreased level of neurospecific isoforms PMCA2 (_2) or PMCA3 (_3), which resulted in increased basal concentration of cytosolic Ca^{2+} .

In the lines with altered composition of the PMCA isoforms immunoassay analysis revealed the presence of the CCL5 receptors, i.e. CCR1, CCR3 and CCR5, with differences in their amount in comparison to the control PC12 cells. The level of CCR1 was higher in the _3 line, while the amount of CCR3 was increased in the _2 line. In addition, in both lines a statistically significant increase in CCR5 was detected. The functionally active chemokine receptors must be present in the plasma membrane to be able to bind ligands present in the extracellular space. Therefore, the next step was immunocytochemical detection of their location using confocal microscopy. CCR1 and CCR3 were present in a small amount, mainly in the cytoplasm area, and thus probably could have a small contribution in CCL5-induced signaling. In contrast, CCR5 was predominantly present in cell membrane and, what is particularly interesting, its amount was higher in the _2 and _3 lines.

The significance of the above observations was analyzed in subsequent steps of work assuming the hypothesis that in the absence of calcium, the signaling activated by CCL5 occurs through the activation of PLC, and IP₃ produced releases Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum through the specific receptors. The cells' response to the CCL5 exposure was the increase in the calcium signal, more intense in the modified lines, especially in the _2 line. The use of specific inhibitors of the potential signal path confirmed the route of the CCL5 signal.

Due to the fact that IP₃ receptors appear to be the ultimate effectors of CCL5, their expression was analyzed at the mRNA and functional protein levels. The results showed that in the modified PC12 cells the amount of IP₃R-1 and IP₃R-2 decreased in relation to control cells, while the level of IP₃R-3 expression increased. This may suggest some type of cell adaptation, because IP₃R-3 exhibits lower affinity towards IP₃ than other isoforms. Such a change may contribute to the increase of resistance of cells with disturbed calcium homeostasis to signaling causing emptying Ca²⁺ stores in the endoplasmic reticulum. However, it should be emphasized that compensatory processes seem to more effectively counteract the effects of an increase of calcium signal in line with a reduced amount of PMCA3, suggesting that under physiological conditions mainly PMCA2 is responsible for the quenching of the Ca²⁺ signal. Thus, the weakening of the action of this "fast" isoform and the associated calcium homeostasis disorders can be much more destructive to the nerve cells.