

CADASIL – rola systemu sygnałowego Notch 3 w patomechanizmie choroby

CADASIL – role of Notch 3 signaling system in pathomechanism of the disease

¹ Katedra i Klinika Neurologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

² Zakład Neuropatologii Doświadczalnej i Klinicznej, IMDiK PAN, Warszawa

Adres do korespondencji: Dorota Dziewulska, Katedra i Klinika Neurologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1 A, 02-097 Warszawa,

tel.: 22 599 28 58, faks: 22 599 18 57, e-mail: dorota.dziewulska@wum.edu.pl

Praca finansowana ze środków własnych

Streszczenie

System sygnałowy Notch jest bardzo konserwatywnym systemem komunikacji międzykomórkowej, odgrywającym istotną rolę zarówno w rozwoju naczyń, jak i w patogenezie niektórych chorób naczyniowych. Jednym z takich schorzeń jest genetycznie uwarunkowana choroba małych naczyń o nazwie CADASIL (*cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy*). Choroba ta wiąże się z występowaniem mutacji w genie *NOTCH 3* kodującym transbłonowy receptor o tej samej nazwie obecny w naczyniach tylko na komórkach mięśniówki gładkiej i pericytach. W przebiegu choroby uszkodzone są głównie małe naczynia tętnicze i naczynia włosowate, w których ścianie stwierdza się zwrodnienie i ubytek komórek wykazujących ekspresję Notch 3 oraz gromadzenie się zewnątrzkomórkowej domeny receptora Notch 3 (N3-ECD) i złogów gęstego osmoofilnego materiału (GOM) zawierającego N3-ECD. Chociaż patogenеза CADASIL-u jest nadal nieznana, obecnie istnieją dwie zasadniczo odmienne hipotezy dotyczące przyczyn rozwoju tego schorzenia. Pierwsza z nich zakłada, że choroba jest związana z nieprawidłowym funkcjonowaniem zmutowanego receptora Notch 3, który nabywa nowych właściwości. Według drugiej hipotezy CADASIL – podobnie jak wiele innych chorób neurodegeneracyjnych – jest proteinopatią spowodowaną odkładaniem się w ścianie naczyń patologicznych złogów białkowych. Niniejsza praca stanowi przegląd aktualnej wiedzy dotyczącej roli Notch 3 w biologii naczyń krwionośnych i hipotetycznego udziału tego systemu sygnałowego w patogenezie CADASIL-u.

Słowa kluczowe: CADASIL, choroba małych naczyń mózgu, GOM, leukoencefalopatia, Notch 3

Summary

Notch signaling is a very conservative system of cell-cell communications playing an essential role in vascular development and human vascular diseases. One of such diseases is a hereditary vascular degenerative disorder known as cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarct and leukoencephalopathy (CADASIL). The disorder is caused by mutations in the *NOTCH 3* gene encoding a transmembrane receptor of the same name present in vessels only on vascular smooth muscle cells and pericytes. The disease involves mainly small arteries and capillaries in which degeneration and loss of cells expressing Notch 3 receptor is observed. In the affected vessels accumulation of Notch 3 extracellular domain (N3-ECD) and granular osmiophilic material (GOM) containing N3-ECD are also found. Although pathogenesis of CADASIL is still unknown there are two main distinct hypotheses concerning its development. The first of them assumes that the disease is caused by dysfunction of the mutated Notch 3 receptor which acquires a new properties. According to the second hypothesis, CADASIL – as many other neurodegenerative diseases – is a proteinopathy due to accumulation of proteinaceous aggregates in vessel wall. This paper is an overview of recent findings concerning the role of Notch 3 in vascular biology and hypothetical participation of that signaling system in CADASIL pathogenesis.

Key words: CADASIL, CADASIL, cerebral small vessel disease, GOM, leukoencephalopathy, Notch 3

WPROWADZENIE

Istnieje pogląd, że naukowców zajmujących się biologią *NOTCH* można podzielić na dwie grupy: tych, którzy prowadzą badania nad tym genem, i tych, którzy jeszcze nie wiedzą, że to właśnie robią. Dzięki tak intensywnym pracom naukowym wiemy już wiele o funkcji genów *NOTCH*, mimo że same mechanizmy ich działania są jeszcze nie do końca poznane.

Geny z rodziny *NOTCH* należą do bardzo konserwatywnego międzykomórkowego systemu sygnałowego. Ortologiczne geny *NOTCH* o wysokim stopniu podobieństwa występują u wielu gatunków, począwszy od nicieni. U ssaków obecne są 4 geny *NOTCH*. Wywodząca się z języka angielskiego nazwa *notch* ('ząbkowany') została nadana genowi, gdy wykryto, że jest on odpowiedzialny za występowanie charakterystycznie postrzępionych skrzydeł u muszki *Drosophila melanogaster*. Również oryginalne nazwy niektórych ligandów Notch (Serrate – 'złobkowany' i Delta – 'trójkątny') pochodzą od fenotypu skrzydeł muszki.

Geny *NOTCH* odgrywają zasadniczą rolę w rozwoju tkanek pochodzących ze wszystkich trzech listków zarodkowych i decydują o kierunku różnicowania się komórek prekursorowych. W okresie ontogenezy *NOTCH* utrzymuje komórki prekursorowe w stanie niezróżnicowanym, co umożliwia im przekształcenie się w różne typy komórek w odpowiedzi na działające w danym momencie bodźce⁽¹⁾. O istotnym znaczeniu *NOTCH* w tym okresie świadczy fakt, że w wielu przypadkach mutacje genów *NOTCH* są letalne.

ROLA GENÓW *NOTCH* W ROZWOJU UKŁADU NACZYNIOWEGO

ROLA GENÓW *NOTCH* W OKRESIE PRZEDURODZENIOWYM (PRENATALNYM)

U ludzi układ naczyniowy zaczyna rozwijać się około 3. tygodnia życia zarodka, kiedy to jego potrzeby odżywcze nie mogą być już dłużej zaspokajane na drodze dyfuzji⁽²⁾. Rola *NOTCH* w rozwoju układu naczyniowego w okresie zarodkowym jest kontrowersyjna. Wielu badaczy uważa, że gen *NOTCH* nie wpływa na rozwój angioblastów i waskulogenezę, a znaczącą rolę zaczyna odgrywać dopiero w późniejszym okresie rozwoju naczyń, tj. podczas angiogenezy.

W trakcie trwania angiogenezy dochodzi do przekształcenia się zbudowanych tylko z komórek śródbłonna cew naczyniowych w dojrzałe naczynia krwionośne. Podczas tego procesu system sygnałowy Notch wykazuje dużą aktywność i wpływa na: 1) przebudowę naczyń (*remodeling*), 2) nabywanie przez niezróżnicowane naczynia krwionośne cech fenotypowych i biochemicznych charakterystycznych dla tętnic lub żył (*specification*) oraz 3) stabilizację ściany naczyń.

Pod wpływem sygnałów Notch zbudowane z komórek śródbłonna jednakowe morfologicznie i funkcjonalnie cewy naczyniowe zaczynają rozrastać się, co prowadzi do powstania naczyń większego kalibru. Następnie dołączają się do nich pericyty

lub komórki mięśniówki gładkiej naczyń (KMGN), co stabilizuje nowo utworzoną ścianę naczynia. Następnie KMGN i pericyty proliferują i zaczynają wytwarzać składniki macierzy zewnątrzkomórkowej. Po ukształtowaniu się ściany naczynia rozpoczyna proces różnicowania się na naczynia tętnicze i żyłne. Komórki śródbłonna naczyń tętnicznych pod wpływem *NOTCH* zaczynają wykazywać między innymi ekspresję efryny B2 i neuropiliny-1, a żyły ekspresję efryny B4 i neuropiliny-2⁽³⁾. Nieprawidłowa czynność szlaku sygnałowego Notch w tym okresie prowadzi do utraty ekspresji białek charakterystycznych dla naczyń tętnicznych i zastępowania ich przez białka występujące w naczyniach żylnych, jak również do nieprawidłowego rozmieszczenia i zmniejszenia się liczby komórek w ścianie naczynia⁽⁴⁾. *NOTCH 3* jest niezbędny do różnicowania się KMGN i nabywania przez nie właściwości charakterystycznych dla mięśniówki gładkiej tętnic. Wskazują na to między innymi wyniki badań doświadczalnych, w których u myszy pozbawionych genu *NOTCH 3* stwierdzono brak smuteliny – białka charakterystycznego dla dojrzałych KMGN o fenotypie kurczliwym występującego tylko w naczyniach tętnicznych⁽⁵⁾. Badania doświadczalne wykazały obecność różnego rodzaju wad naczyń krwionośnych spowodowanych mutacjami *NOTCH*^(4,6,7). Do rozwoju patologicznych naczyń prowadzą również mutacje ligandów Notch, np. u myszy z mutacjami liganda Delta 4 nie dochodziło do rozwoju naczyń włosowatych⁽⁸⁾.

ROLA GENÓW *NOTCH* W OKRESIE POURODZENIOWYM

Rola *NOTCH* nie ogranicza się tylko do okresu prenatalnego. Po urodzeniu geny *NOTCH* odgrywają rolę w komunikacji międzykomórkowej, w przekazywaniu sygnałów między komórkami a substancją zewnątrzkomórkową, w dojrzewaniu ściany tętnic oraz w fenotypowej stabilizacji KMGN. System sygnałowy Notch 3 decyduje, czy KMGN pozostaną wysoko zróżnicowane, czy też w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne przekształcą się w mniej dojrzały fenotyp proliferacyjny (syntetyczny)⁽⁹⁾. W okresie pourodzeniowym aktywność Notch 3 chroni KMGN przed apoptozą, wywiera wpływ na ich aktywny cytoszkielet i reguluje odpowiedź na czynniki mechaniczne oddziałujące na ścianę naczynia⁽¹⁰⁻¹²⁾.

RECEPTOR *NOTCH 3* – BUDOWA I FUNKCJE

Receptory z rodziny Notch są transbłonowymi glikoproteinaми o podobnej budowie, które u człowieka występują w czterech formach (Notch 1-4). Białko receptorowe Notch składa się z części zewnątrzkomórkowej, transbłonowej i wewnątrzkomórkowej. Budowa Notch 1 i 2 jest bardzo podobna, natomiast Notch 3 i 4 wykazują niewielkie odmienności dotyczące głównie budowy domeny wewnątrzkomórkowej. Notch 3 i 4 charakteryzują się także bardziej ograniczonym występowaniem niż dwa pierwsze typy receptorów – ekspresję Notch 3 stwierdza się na błonie komórkowej KMGN i pericytów oraz niektórych subpopulacji tymocytów⁽¹³⁾ i limfocytów T⁽¹⁴⁾. Receptory Notch i ich ligandy obecne są przede wszystkim w naczyniach

tętnicznych i włosowatych, jednakże istnieją doniesienia o ich obecności – chociaż w mniejszej ilości – również w naczyniach żylnych^(15,16).

Białko Notch 3 zbudowane jest z 2321 aminokwasów i składa się z 3 podjednostek: leżącej na powierzchni błony komórkowej części zewnątrzkomórkowej o masie 210 kDa (*Notch 3 extracellular domain*, N3-ECD), części transbłonowej oraz części cytoplazmatycznej o masie 97 kDa (*Notch 3 intracellular domain*, N3-ICD) (rys. 1).

W obrębie podjednostki N3-ECD obecne są 34 powtarzające się sekwencje polipeptydowe o budowie przypominającej budowę receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu (*epidermal growth factor*, EGF). Każda z tych sekwencji zawiera 6 cząsteczek cysteiny połączonych 3 mostkami siarczkowymi. Sekwencje aminokwasowe w obrębie powtórzeń 10. i 11. są odpowiedzialne za interakcje między receptorem a jego ligandami. Trzy bogate w cysteinę sekwencje Lin12 umiejscowione przy błonie komórkowej zapobiegają niezależnej od ligandów aktywacji receptora⁽¹⁷⁾.

Wewnątrzkomórkowa domena N3-ICD składa się z kompleksu czynników transkrypcyjnych CSL/RBP-J κ , powtórzeń sekwencji ankirynowych i sekwencji PEST (prolina, kwas glutaminowy, seryna, treonina). Sekwencje ankirynowe stanowią miejsce wiązania się domeny N3-ICD z różnymi białkami i są odpowiedzialne za modyfikację aktywności receptora. Sekwencja PEST ma właściwości destabilizujące cząsteczkę białka i ułatwia szybką degradację receptora na drodze proteolizy.

Białko Notch 3 jest syntetyzowane w formie pojedynczego łańcucha polipeptydowego o masie 300 kDa. W szorstkiej siateczce endoplazmatycznej prekursorowa forma białka ulega pierwszej glikozylacji przez O-transferazę fukozyłową. Reakcja ta zachodzi w obrębie sekwencji EGF białka i ma wpływ na powinowactwo receptora do ligandów.

Prekursorowa forma Notch 3 jest następnie transportowana do aparatu Golgiego, gdzie fragment jej cząsteczki ulega proteolitycznemu odcięciu przez enzym konwertazy furyny (rys. 2). W niektórych subpopulacjach komórek Notch 3 podlega dodatkowej N-glikozylacji przez glikozotransferazę Fringe, co odbywa się w aparacie Golgiego⁽¹⁸⁾. Proces ten ma wpływ na

zdolność wiązania się receptora z ligandami. Po modyfikacjach w aparacie Golgiego dojrzałe białko Notch 3 jest transportowane na powierzchnię błony komórkowej i po aktywacji może uczestniczyć w przekazywaniu sygnałów.

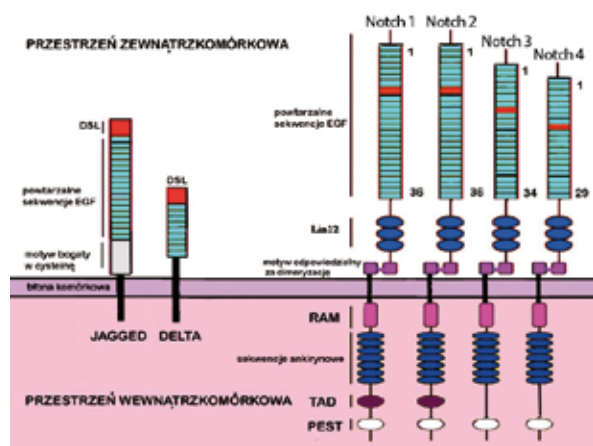
Podobnie jak i inne receptory powierzchniowe, Notch 3 usuwany jest z błony komórkowej na drodze endocytozy. Zamknięty we wczesnym endosomie receptor może ulec degradacji albo ponownie zostać przetransportowany na powierzchnię komórki (odzyskiwanie – *recycling*). Kluczową rolę w tych procesach odgrywa białko o nazwie ubikwityna, które łącząc się z Notch 3, inicjuje endocytozę.

LIGANDY RECEPTORA NOTCH 3

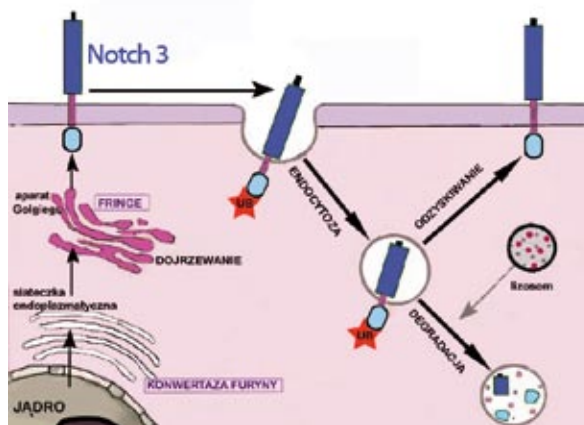
U człowieka ligandami łączącymi się z receptorem Notch 3 jest 5 białek należących do 2 rodzin: Delta (DLL1, DLL3 i DLL4) i Jagged (JAG1 i JAG2). Na komórkach śródbłonka obecne są ligandy DLL1, DLL4 i JAG1, natomiast na KMGN występują JAG1, JAG 2 oraz DLL1⁽⁴⁾.

Budowa molekularna ligandów Delta i Jagged jest podobna do budowy receptorów Notch (rys. 1). Cząsteczka liganda jest również białkiem transbłonowym z dużą domeną zewnątrzkomórkową zawierającą kilka powtarzających się sekwencji EGF, sekwencję DSL odpowiedzialną za jej wiązanie się z receptorem oraz krótką, zakotwiczoną w błonie komórkowej częścią wewnątrzkomórkową, odgrywającą rolę podczas endocytozy liganda^(19,20). Różnica między ligandami Delta i Jagged polega przede wszystkim na obecności w tych ostatnich dodatkowych sekwencji łączących umiejscowionych pomiędzy sekwencjami EGF oraz bogatego w cysteinę motywu o budowie podobnej do czynnika von Willebranda⁽¹¹⁾ (rys. 1).

Oprócz ligandów zakotwiczonych na błonie komórkowej istnieją również tzw. ligandy rozpuszczalne. Cząsteczki ligandów mogą być cięte proteolitycznie przez enzym TACE (*tumour necrosis factor- α converting enzyme*), co powoduje uwolnienie ich zewnątrzbłonowej części do przestrzeni zewnątrzkomórkowej⁽²¹⁾ (rys. 3). Biologiczna rola ligandów rozpuszczalnych jest kontrowersyjna. Uważa się, że mogą one być zarówno agonistami, jak i antagonistami receptora Notch⁽²²⁾, przy czym ligandy



Rys. 1. Budowa receptorów Notch (na podstawie⁽³⁴⁾)



Rys. 2. Cykl przemian białka Notch 3 (na podstawie^(19,20))

rozpuszczalne wykazują większe powinowactwo do receptora niż ligandy zakotwiczone w błonie komórkowej⁽²³⁾. Wiadomo również, że antagonistyczne działanie ligandów jest zależne od ich ilości; duże stężenie ligandów ma hamujący wpływ na receptor Notch 3, podczas gdy niskie stężenie aktywuje szlak sygnałowy^(24,25).

SZLAK SYGNAŁOWY NOTCH 3

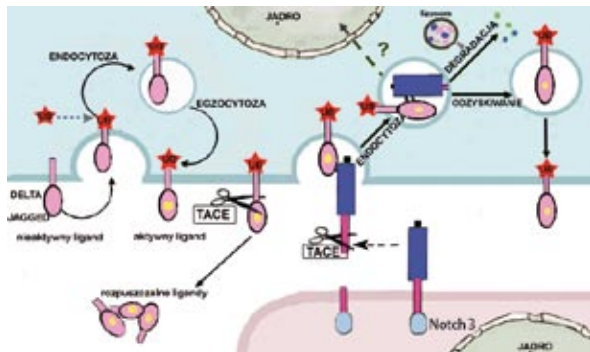
Klasyyczny szlak sygnałowy Notch 3 (rys. 4)

Przekazywanie sygnałów przez szlak Notch 3 jest ograniczone tylko do sąsiadujących ze sobą komórek wykazujących ekspresję receptora i ligandów^(19,20). W klasycznym szlaku sygnałowym połączenie się receptora Notch 3 z ligandem doprowadza do przyłączenia do wewnątrzkomórkowej domeny liganda cząsteczki ubikwityny, co inicjuje jego endocytozę⁽²⁶⁾. Częściowe wciągnięcie w obręb pęcherzyka endocytarnego połączonego z receptorem Notch 3 liganda wywołuje zmiany konformacyjne w białku Notch 3 i odsłania jego fragment wrażliwy na działanie proteolityczne enzymu TACE. Cięcie przez TACE białka Notch 3 powoduje „zrzucenie” (*shedding*) z powierzchni błony komórkowej zewnętrznej domeny receptora (N3-ECD) i jej wchłonięcie na drodze endocytozy przez komórkę wykazującą ekspresję liganda.

Kolejne cięcie proteolityczne Notch 3 przez kompleks γ -sekre-taza/presenilina odcina od części transbłonowej wewnątrzkomórkowy fragment receptora (N3-ICD), który przemieszcza się do jądra komórki. W jądrze komórkowym N3-ICD łączy się z kompleksem białek regulującym transkrypcję DNA^(27,28). Związanie się N3-ICD z kompleksem białek regulatorowych prowadzi do odłączenia się od tego kompleksu białek hamujących transkrypcję i przyłączenia białek aktywujących ten proces, co w efekcie powoduje odblokowanie transkrypcji i umożliwia ekspresję różnych genów.

Alternatywne szlaki sygnałowe Notch 3

W klasycznej drodze aktywacji szlaku sygnałowego Notch 3 połączenie się ligandów z receptorem uruchamia przekazywanie sygnałów między sąsiadującymi ze sobą komórkami. Wiadomo jednak, że nie zawsze interakcje ligand – receptor uruchamiają



Rys. 3. Cykl przemian ligandów receptora Notch 3 (na podstawie^(13,23))

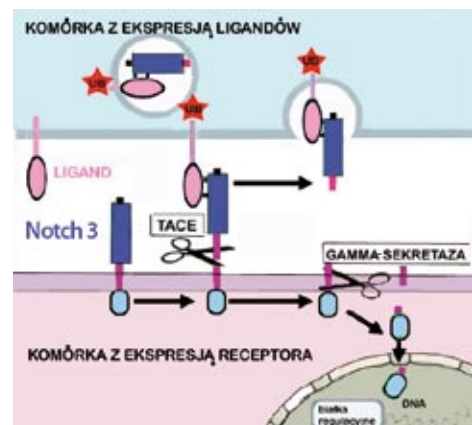
kaskadę sygnałową Notch 3⁽²⁹⁾, a ponadto istnieją niezależne od tych interakcji cytoplazmatyczne mechanizmy aktywujące ten szlak sygnałowy. Jeden z tych mechanizmów polega na uwolnieniu wewnątrzkomórkowego fragmentu liganda i jego translokacji do jądra komórkowego, gdzie, podobnie jak N3-ICD, odblokowuje on proces transkrypcji genów w tej samej komórce⁽³⁰⁾. Inny niezależny od ligandów mechanizm aktywacji drogi sygnałowej Notch 3 polega na łączeniu się z domeną N3-ICD białek cytoplazmatycznych, co powoduje uruchomienie kaskady sygnałowej.

Czynniki modyfikujące przekazywanie sygnałów Notch 3

Szereg procesów może oddziaływać na receptor Notch 3 lub jego ligandy, zmieniając aktywność szlaku sygnałowego. Takimi procesami mogą być wspomniana już glikozylacja Notch 3, modulacja transkrypcji receptora i ligandów, dołączanie cząsteczki ubikwityny do receptora i ligandów, obecność ligandów w formie rozpuszczalnej i transbłonowej, które mogą być zarówno agonistami, jak i antagonistami receptora Notch 3, czy też dołączanie do N3-ICD różnych białek (np. Numb, α -adaptyna i Deltex), przez co zahamowaniu ulega przemieszczenie się N3-ICD do jądra komórkowego i odblokowanie transkrypcji genów⁽³¹⁾ (rys. 2). Receptor Notch 3 może też przekazywać sygnały na drodze zarówno klasycznej, jak i alternatywnej^(12,19,32). Tak liczne i różnorodne mechanizmy wpływające na aktywność systemu sygnałowego Notch 3 sprawiają, że badania nad rolą Notch 3 w patogenezie CADASIL-u są skomplikowane.

ROLA SYSTEMU SYGNAŁOWEGO NOTCH 3 W PATOMECHANIZMIE CADASIL-u

Obecnie istnieją dwie główne koncepcje patogenetyczne CADASIL-u. Pierwsza z nich zakłada, że w wyniku mutacji receptor Notch 3 nabywa nowych właściwości prowadzących do rozwoju zmian zwyrodnieniowych w naczyniach. Według drugiej hipotezy CADASIL – podobnie jak wiele chorób neurodegeneracyjnych – jest proteinopatią, w której odkładanie się złogów N3-ECD i GOM odpowiada za uszkodzenie ścian naczynia.



Rys. 4. Klasyyczny szlak sygnałowy Notch 3 (na podstawie⁽¹³⁾)

HIPOTEZA 1. – CADASIL JAKO WYNIK NOWYCH WŁAŚCIWOŚCI ZMUTOWANEGO RECEPTORA NOTCH 3

Badania wykazały, że mimo spowodowanej mutacjami nieprawidłowej budowy Notch 3 przekazywanie sygnałów przez ten receptor jest zachowane⁽³³⁾. A zatem to nie brak aktywności systemu sygnałowego Notch 3 leży u podstaw patogenezy CADASIL-u. Potwierdzają to wyniki badań doświadczalnych, w których wykazano, że u myszy pozbawionych genu *NOTCH 3* występują różne wady naczyniowe, ale nie zmiany charakterystyczne dla CADASIL-u^(8,34,35). Obecnie uważa się, że przyczyną powstawania tych zmian może być nabycie przez zmutowany receptor Notch 3 nowych własności.

Notch 3 jest receptorem bardzo wrażliwym na stymulację mechaniczną^(36,37). Jest on też głównym regulatorem napięcia mięśniowego w oporowych tętnicach mózgu⁽³⁸⁾. W warunkach fizjologicznych naczynia te są w stanie niewielkiego skurczu (tzw. napięcie miogenne), co umożliwia ich szybką reakcję na zmieniające się wartości ciśnienia krwi (tzw. odpowiedź miogenna). Odpowiedź miogenna odgrywa ważną rolę w miejscowej regulacji przepływu krwi i chroni naczynia włosowate przed wzrostem ciśnienia⁽³⁹⁾. W przeciwieństwie do dużych tętnic typu elastycznego, w tętnicach oporowych wzrost ciśnienia krwi powoduje ich skurcz. Długo utrzymujący się skurcz prowadzi do przebudowy ściany tętnic oporowych, co pozwala na trwałe zachowanie zmniejszonej czynnościowo średnicy naczynia i stabilizację napięcia miogenne⁽⁴⁰⁾. Taki proces może zachodzić w CADASIL-u. Wiadomo, że aktywacja szlaku sygnałowego Notch 3 w KMGN prowadzi do zmian w ich aktywnym cytoskielecie i modulacji reakcji na działanie sił związanych z ciśnieniem przepływającej krwi⁽⁵⁾. Ponieważ w CADASIL-u przekazywanie sygnału przez zmutowany Notch 3 jest zachowane, miocyty tętnic oporowych mogą odbierać fizjologiczne wartości ciśnienia tętniczego jako nieprawidłowe, np. zbyt wysokie. Komórki te znajdowałyby się więc w stanie przewlekłego stresu mechanicznego, który uruchamiałyby proces przebudowy ściany tętnic oporowych, podobnie jak ma to miejsce na przykład w nadeścienniu tętniczym. Inicjacja zmian w miocytach prowadząca do przebudowy naczyń tętnicznych mogłaby być tym momentem w patomechanizmie CADASIL-u, w którym po okresie angiogenezy ponownie uaktywniałby się szlak sygnałowy Notch 3. Taka ponowna aktywacja systemu sygnałowego Notch 3 w komórkach „wadliwych genetycznie” prowadziłaby do uruchomienia kaskady patologicznych procesów, powstawania zmian morfologicznych, a w efekcie objawów klinicznych CADASIL-u.

Zgodnie z przedstawioną powyżej hipotezą pierwotną przyczyną CADASIL-u byłyby więc wrodzone zaburzenia czynności skurczowo-rozkurczowej miocytów tętnic oporowych. Zaburzenia te byłyby związane z nieprawidłową aktywnością szlaku Notch 3 w późnym okresie angiogenezy, co z kolei powodowałoby brak w KMGN cech charakterystycznych dla miocytów naczyń tętnicznych. Za tą koncepcją przemawiają wyniki badań, w których zarówno u pacjentów z CADASIL-em⁽⁴¹⁻⁴⁵⁾, jak i w zwierzęcym modelu choroby^(37,46-48) stwierdzono obecność

zaburzeń autoregulacji przepływu w naczyniach mózgowych. Co ważne, zaburzenia te obserwowano bardzo wcześnie, jeszcze przed wystąpieniem charakterystycznych zmian morfologicznych.

W świetle hipotezy 1. występujące we wczesnym okresie CADASIL-u napady migreny z aurą mogą więc być pierwszym objawem zaburzeń czynnościowych mięśniówki naczyń. Zaburzenia te mogą również prowadzić do przewlekłego niedokrwienia podkorowego, co potwierdzają badania neuroobrazowe pacjentów z CADASIL-em wskazujące na wczesną obecność zmniejszonego metabolizmu i przepływu krwi w istocie białej mózgu⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾.

Nieprawidłowa aktywność systemu sygnałowego Notch 3 w CADASIL-u mogłaby też wpływać destabilizująco na fenotyp KMGN i powodować przejściowy wzrost liczby miocytów o fenotypie proliferacyjnym (syntetycznym). Wzrost ten mógłby być konsekwencją: 1) wzmożonej proliferacji niewielkiej puli miocytów syntetycznych fizjologicznie obecnych w tętnicach oporowych lub 2) zmiany fenotypu KMGN kurczliwych w kierunku mniej dojrzałego fenotypu syntetycznego („odróżnicowanie”). Obecność mniej dojrzałych miocytów syntetycznych związana jest ze zmniejszeniem się w tych komórkach ilości białek kurczliwych, co z kolei prowadzi do pogłębienia się zaburzeń reaktywności tętnic i powstania błędnego koła chorobowego.

Pojawieniu się mniej dojrzałych miocytów syntetycznych może towarzyszyć również przebudowa macierzy zewnątrzkomórkowej spowodowana ich wzmożoną aktywnością wydzielniczą. Synteza przez KMGN nowych składników macierzy zewnątrzkomórkowej mogłaby prowadzić do zmian w jej składzie i właściwościach, co z kolei może wywoływać odrywanie się komórek od podłoża, uruchomienie w nich szlaku apoptozy i obumieranie na drodze *anoikis*.

HIPOTEZA 2. – CADASIL JAKO PROTEINOPATIA

Druga hipoteza patogenetyczna zakłada, że CADASIL – podobnie jak choroba Alzheimera, Parkinsona czy Huntingtona – jest proteinopatią spowodowaną toksycznym wpływem odkładających się w ścianie naczyń złogów N3-ECD i GOM.

W CADASIL-u w wyniku mutacji *NOTCH 3* liczba reszt cysteinowych w powtarzalnych sekwencjach EGF białka Notch 3 staje się nieparzysta. W warunkach prawidłowych reszty te połączone są trzema mostkami siarczkowymi. Nieparzysta liczba reszt cysteinowych sprawia, że jedno z wiązań siarczkowych jest wolne, co może prowadzić do nieprawidłowego fałdowania się łańcucha polipeptydowego (*folding*) podczas procesu syntezy białka i zmian w budowie przestrzennej cząsteczki Notch 3. Zwykle białka o nieprawidłowej budowie są usuwane z komórki przy udziale systemu ubikwityna-proteasom. Z nieznanych przyczyn nieprawidłowemu białku Notch 3 udaje się uniknąć skierowania na drogę degradacji i pojawia się ono na powierzchni komórki. W hodowli KMGN pochodzących od pacjentów chorych na CADASIL stwierdzono nieprawidłową ekspresję 11 różnych białek, które uczestniczą między innymi w procesie tworzenia trójwymiarowej struktury białek i ich degradacji⁽⁵²⁾. Może to wskazywać, że w CADASIL-u dochodzi

zarówno do zaburzeń w procesie fałdowania się białek, jak i nieprawidłowego funkcjonowania systemów eliminujących je z komórki. Obecność tych drugich zaburzeń potwierdzają wyniki badań, w których po zastosowaniu związków blokujących funkcje proteasomów komórki wykazujące ekspresję zmutowanego Notch 3 obumierały znacznie szybciej niż komórki prawidłowe⁽⁵³⁾.

Nieprawidłowa budowa Notch 3 może blokować proces jego endocytozy⁽⁵⁴⁾ (rys. 2), co prowadzi do gromadzenia się w ścianie naczyń złogów N3-ECD. Prawidłowe białko Notch 3 posiada zdolność łączenia się w większe cząsteczki i tworzenia oligomerów i multimerów białkowych, a proces ten zachodzi przy udziale mostków siarczkowych. Badania wykazały, że powstałe w wyniku mutacji nieprawidłowe białko Notch 3 wykazuje nasiloną tendencję do spontanicznej multimeryzacji i tworzenia dużych agregatów białkowych⁽⁵⁵⁾. Może to wyjaśniać, dlaczego w CADASIL-u dochodzi do gromadzenia się złogów GOM i N3-ECD. Nie wiadomo jednak, czy pierwsze powstają złogi GOM czy N3-ECD. Być może złogi GOM tworzą się na powierzchni komórek wtórnie do obecności zmutowanego Notch 3, który może działać jak ziarno nukleacji, rozpoczynając proces tworzenia się włókienek, a potem agregatów białkowych. Obecne na powierzchni komórek złogi GOM mogą z kolei wpływać na przyleganie i relacje komórka – macierz zewnątrzkomórkowa, prowadząc do obumierania komórek na drodze *anoikis*.

PIŚMIENNICTWO: BIBLIOGRAPHY:

- Leong K.G., Karsan A.: Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. *Blood* 2006; 107: 2223-2233.
- Karsan A.: The role of Notch in modeling and maintaining the vasculature. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2005; 83: 14-23.
- Shawber C.J., Kitajewski J.: Notch function in the vasculature: insights from zebrafish, mouse and man. *Bioessays* 2004; 26: 225-234.
- Hofmann J.J., Iruela-Arispe M.L.: Notch signaling in blood vessels. Who is taking to whom about what? *Circ. Res.* 2007; 100: 1556-1568.
- Domenga V., Fardoux P., Lacombe P. i wsp.: *Notch3* is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells. *Genes Dev.* 2004; 18: 2730-2735.
- Noguera-Troise I., Daly C., Papadopoulos N.J. i wsp.: Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature* 2006; 444: 1032-1037.
- Ridgway J., Zhang G., Wu Y. i wsp.: Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature* 2006; 444: 1083-1087.
- Krebs L.T., Xue Y., Norton C.R. i wsp.: Characterization of *Notch3*-deficient mice: normal embryonic development and absence of genetic interactions with a *Notch1* mutation. *Genesis* 2003; 37: 139-143.
- Campos A.H., Wang W., Pollman M.J., Gibbons G.H.: Determinants of Notch-3 receptor expression and signaling in vascular smooth muscle cells: implications in cell-cycle regulation. *Circ. Res.* 2002; 91: 999-1006.
- Owens G.K., Kumar M.S., Wamhoff B.R.: Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol. Rev.* 2004; 84: 767-801.
- Roca C., Adams R.H.: Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling. *Genes Dev.* 2007; 21: 2511-2524.
- Wang T., Baron M., Trump D.: An overview of Notch3 function in vascular smooth muscle cells. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2008; 96: 499-509.
- Felli M.P., Maroder M., Mitsiadis T.A. i wsp.: Expression pattern of Notch1, 2 and 3 and Jagged1 and 2 in lymphoid and stromal thymus components: distinct ligand-receptor interactions in intrathymic T cell development. *Int. Immunol.* 1999; 11: 1017-1025.
- Anastasi E., Campese A.F., Bellavia D. i wsp.: Expression of activated Notch3 in transgenic mice enhances generation of T regulatory cells and protects against experimental autoimmune diabetes. *J. Immunol.* 2003; 171: 4504-4511.
- Mailhos C., Modlich U., Lewis J. i wsp.: Delta4, an endothelial specific Notch ligand expressed at sites of physiological and tumor angiogenesis. *Differentiation* 2001; 69: 135-144.
- Vorontchikhina M.A., Zimmermann R.C., Shawber C.J. i wsp.: Unique patterns of Notch1, Notch4 and Jagged1 expression in ovarian vessels during folliculogenesis and corpus luteum formation. *Gene Expr. Patterns* 2005; 5: 701-709.
- Hurlbut G.D., Kankel M.W., Lake R.J., Artavanis-Tsakonas S.: Crossing paths with Notch in the hyper-network. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2007; 19: 166-175.
- Blair S.S.: Notch signaling: Fringe really is a glycosyltransferase. *Curr. Biol.* 2000; 10: R608-R612.
- Gridley T.: Notch signaling in vascular development and physiology. *Development* 2007; 134: 2709-2718.
- Gray G.E., Mann R.S., Mitsiadis E. i wsp.: Human ligands of the Notch receptor. *Am. J. Pathol.* 1999; 154: 785-794.
- Ikeuchi T., Sisodia S.S.: The Notch ligands, Delta1 and Jagged2, are substrates for presenilin-dependent "γ-secretase" cleavage. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 7751-7754.
- Sakamoto K., Ohara O., Takagi M. i wsp.: Intracellular cell-autonomous association of Notch and its ligands: a novel mechanism of Notch signal modification. *Dev. Biol.* 2002; 241: 313-326.
- Shimizu K., Chiba S., Kumano K. i wsp.: Mouse Jagged1 physically interacts with Notch2 and other Notch receptors. Assessment by quantitative methods. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 32961-32969.
- Klein T., Brennan K., Arias A.M.: An intrinsic dominant negative activity of serrate that is modulated during wing development in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 1997; 189: 123-134.
- Micchelli C.A., Rulifson E.J., Blair S.S.: The function and regulation of *cut* expression on the wing margin of *Drosophila*: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate. *Development* 1997; 124: 1485-1495.
- Krämer H.: Neuralized: regulating Notch by putting away delta. *Dev. Cell* 2001; 1: 725-726.
- Artavanis-Tsakonas S., Rand M.D., Lake R.J.: Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999; 284: 770-776.
- Lasky J.L., Wu H.: Notch signaling, brain development, and human disease. *Pediatr. Res.* 2005; 57: 104R-109R.
- Ladi E., Nichols J.T., Ge W. i wsp.: The divergent DSL ligand Dll3 does not activate Notch signaling but cell autonomously attenuates signaling induced by other DSL ligands. *J. Cell Biol.* 2005; 170: 983-992.
- LaVoie M.J., Selkoe D.J.: The Notch ligands, Jagged and Delta, are sequentially processed by α-secretase and presenilin/γ-secretase and release signaling fragments. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 34427-34437.
- Lai E.C.: Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* 2004; 131: 965-973.
- Wu J., Bresnick E.H.: Bare rudiments of Notch signaling: how receptor levels are regulated. *Trends Biochem. Sci.* 2007; 32: 477-485.

33. Karlström H., Beatus P., Dannaeus K. i wsp.: A CADASIL-mutated Notch 3 receptor exhibits impaired intracellular trafficking and maturation but normal ligand-induced signaling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2002; 99: 17119-17124.
34. Kitamoto T., Takahashi T., Takimoto H. i wsp.: Functional redundancy of the *Notch* gene family during mouse embryogenesis: analysis of *Notch* gene expression in *Notch3*-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 331: 1154-1162.
35. Arboleda-Velasquez J.F., Zhou Z., Shin H.K. i wsp.: Linking Notch signaling to ischemic stroke. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2008; 105: 4856-4861.
36. Sedding D.G., Seay U., Fink L. i wsp.: Mechanosensitive p27^{Kip1} regulation and cell cycle entry in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2003; 108: 616-622.
37. Morrow D., Sweeney C., Birney Y.A. i wsp.: Cyclic strain inhibits Notch receptor signaling in vascular smooth muscle cells in vitro. *Circ. Res.* 2005; 96: 567-575.
38. Belin de Chantemèle E.J., Retailleau K., Pinaud F. i wsp.: Notch3 is a major regulator of vascular tone in cerebral and tail resistance arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008; 28: 2216-2224.
39. Davis M.J., Wu X., Nurkiewicz T.R. i wsp.: Integrins and mechanotransduction of the vascular myogenic response. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001; 280: H1427-H1433.
40. Heerkens E.H.J., Izzard A.S., Heagerty A.M.: Integrins, vascular remodeling, and hypertension. *Hypertension* 2007; 49: 1-4.
41. Hussain M.B., Singhal S., Markus H.S., Singer D.R.: Abnormal vasoconstrictor responses to angiotensin II and norepinephrine in isolated small arteries from patients with cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL). *Stroke* 2004; 35: 853-858.
42. Gobron C., Vahedi K., Vicaut E. i wsp.: Characteristic features of *in vivo* skin microvascular reactivity in CADASIL. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2007; 27: 250-257.
43. Stenborg A., Kalimo H., Viitanen M. i wsp.: Impaired endothelial function of forearm resistance arteries in CADASIL patients. *Stroke* 2007; 38: 2692-2697.
44. Pfefferkorn T., von Stuckrad-Barre S., Herzog J. i wsp.: Reduced cerebrovascular CO₂ reactivity in CADASIL: a transcranial Doppler sonography study. *Stroke* 2001; 32: 17-21.
45. Chabriat H., Pappata S., Ostergaard L. i wsp.: Cerebral hemodynamics in CADASIL before and after acetazolamide challenge assessed with MRI bolus tracking. *Stroke* 2000; 31: 1904-1912.
46. Ruchoux M.M., Domenga V., Brulin P. i wsp.: Transgenic mice expressing mutant Notch3 develop vascular alterations characteristic of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Am. J. Pathol* 2003; 162: 329-342.
47. Lacombe P., Oligo C., Domenga V. i wsp.: Impaired cerebral vasoreactivity in a transgenic mouse model of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy arteriopathy. *Stroke* 2005; 36: 1053-1058.
48. Dubroca C., Lacombe P., Domenga V. i wsp.: Impaired vascular mechanotransduction in a transgenic mouse model of CADASIL arteriopathy. *Stroke* 2005; 36: 113-117.
49. Chabriat H., Bousser M.G., Pappata S.: Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy: a positron emission tomography study in two affected family members. *Stroke* 1995; 26: 1729-1730.
50. Mellies J.K., Baumer T., Muller J.A. i wsp.: SPECT study of a German CADASIL family: a phenotype with migraine and progressive dementia only. *Neurology* 1998; 50: 1715-1721.
51. Tuominen S., Miao Q., Kurki T. i wsp.: Positron emission tomography examination of cerebral blood flow and glucose metabolism in young CADASIL patients. *Stroke* 2004; 35: 1063-1067.
52. Ihalainen S., Soliymani R., Iivanainen E. i wsp.: Proteome analysis of cultivated vascular smooth muscle cells from a CADASIL patient. *Mol. Med.* 2007; 13: 305-314.
53. Takahashi K., Adachi K., Yoshizaki A. i wsp.: Mutations in NOTCH3 cause the formation and retention of aggregates in the endoplasmic reticulum, leading to impaired cell proliferation. *Hum. Mol. Genet.* 2010; 19: 79-89.
54. Dziewulska D., Rafałowska J.: Is the increased expression of ubiquitin in CADASIL syndrome a manifestation of aberrant endocytosis in the vascular smooth muscle cells? *J. Clin. Neurosci.* 2008; 15: 535-540.
55. Opherk C., Duering M., Peters N. i wsp.: CADASIL mutations enhance spontaneous multimerization of NOTCH3. *Hum. Mol. Genet.* 2009; 18: 2761-2767.