

Received: 19.10.2007

Accepted: 19.10.2007

Published: 14.12.2007

Rola białka PrP^c w procesie różnicowania neuralnego *in vitro* i neurogenezy

The role of PrP^c protein in process of neural differentiation *in vitro* and neurogenesis

Zakład Patologii Molekularnej i Neuropatologii Katedry Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Adres do korespondencji: Zakład Patologii Molekularnej i Neuropatologii Katedry Onkologii UM w Łodzi, ul. Czechosłowacka 8/10, 92-216 Łódź, tel.: 042 679 14 77, 042 675 76 11

Praca finansowana ze środków własnych

Streszczenie

Różnicowanie neuralne *in vitro* lub proces neurogenezy *in vivo* to zjawiska angażujące szereg białek komórkowych, będących ogniwami szlaków sygnalizacyjnych sterujących tymi procesami. Białkiem, którego funkcja również wydaje się związana z procesem różnicowania, jest białko prionu, izoforma komórkowa PrP^c – produkt genu *PRNP*. Pionierskie badania w tej dziedzinie ujawniły wzrost poziomu ekspresji genu *PRNP* podczas neurogenezy czy też różnicowania neuronalnego *in vitro*, aczkolwiek większość wyników uzyskano z wykorzystaniem modeli neurogenezy zwierząt lub linii komórkowych pochodzenia nowotworowego. Najnowsze badania, w których jako model eksperymentalny wykorzystywane są neuralne komórki macierzyste/progenitorowe, potwierdzają zarysowany uprzednio obraz, sugerując udział PrP^c w różnicowaniu neuronalnym. Kolejne analizy, będące próbą sprecyzowania funkcji PrP^c w tym zjawisku, ukazują to białko jako potencjalne ogniwo szlaków sygnalizacyjnych sterujących procesami różnicowania. Co więcej, wydaje się, iż PrP^c jest białkiem, którego aktywność związana jest z nabywaniem oraz realizowaniem przez komórki funkcji specyficznych dla neuronów. Komórki pozbawione białka PrP^c nadal są jednak zdolne do różnicowania neuronalnego, chociaż proces ten jest opóźniony. Kwestią kontrowersyjną jest natomiast ekspresja genu *PRNP* w trakcie różnicowania komórek glejowych, czego dowodem jest brak spójnych doniesień, poczynając od danych sugerujących, iż obecność PrP^c w astrocytach jest niezbędna dla prawidłowego przebiegu różnicowania neuralnego, na wynikach definitywnie wykluczających obecność PrP^c w linii glejowej kończąc. Analiza danych z literatury nie pozwala więc stworzyć uniwersalnego wzorca ekspresji genu *PRNP* w procesie różnicowania neuralnego. Wydaje się, iż jest to cecha, którą należy rozpatrywać indywidualnie dla danego typu komórek oraz konkretnego procesu metabolicznego, towarzyszącego zjawiskom tak złożonym, jak proces różnicowania neuralnego *in vitro* czy neurogeneza *in vivo*.

SŁOWA KLUCZOWE: PrP^c, *PRNP*, różnicowanie neuralne, neurogeneza, linia neuronalna, linia glejowa

Summary

The phenomena of neural differentiation *in vitro* and neurogenesis *in vivo* involve a numerous cellular proteins to create the differentiation signaling pathways. The role of the cellular isoform of prion protein PrP^c – a product of the *PRNP* gene, seems also to be connected with a process of neural differentiation. The primary investigations in this field revealed increase of *PRNP* gene expression during both neurogenesis and neural differentiation *in vitro*; however, the majority of results were obtained with the use of animal models or cancer-derived cell lines. The latest experiments using neural stem/progenitor cells as an experimental models, seem to confirm the previous results, suggesting participation of PrP^c in a neural differentiation. On the basis of the further analyses, PrP^c appears to be a part of differentiation signaling pathways. Moreover, PrP^c activity may contribute to acquire and maintain the functions specific for neurons. Surprisingly, the prion protein-deficient cells are still able to differentiate into neurons, although the process of differentiation is delayed. The controversy nevertheless persists about expression of *PRNP* gene during glial cells differentiation that is reflected in inconsistent published results, beginning with hypothesis postulating the importance of “astrocytic” PrP^c for neural differentiation, ending with data presenting no PrP^c expression in glial lineage. Studying the litera-

ture data does not allow to create the uniform *PRNP* expression pattern during neural differentiation. It rather seems to be an individual feature, which should be considered in the broader context of particular cell type and the specificity of metabolic processes accompanying neural differentiation *in vitro* or neurogenesis *in vivo*.

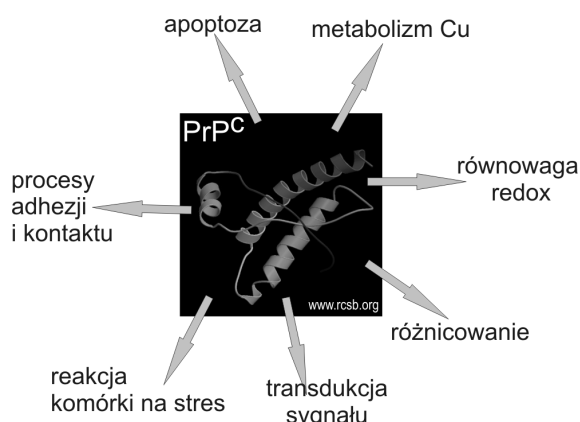
KEY WORDS: PrP^c, *PRNP*, neural differentiation, neurogenesis, neuronal lineage, glial lineage

WSTĘP

PrP^c (*cellular isoform of prion protein*) jest glikoproteiną o wysoce konserwatywnej strukturze, zakotwiczoną dzięki reszcie GPI (*glycosylphosphatidylinositol*) w błonie komórkowej. Obecność izoform białka stwierdzono w szerokiej gamie tkanek organizmu, przy czym najwyższy poziom PrP^c cechuje komórki nerwowe, szczególnie zaś ośrodkowy układ nerwowy. Cechy PrP^c, takie jak duża homologia międzygatunkowa oraz powszechne występowanie w tkankach organizmu, mogą sugerować, iż PrP^c jest białkiem odgrywającym rolę w podstawowych procesach biochemicznych zachodzących w komórkach⁽¹⁻⁵⁾.

Badania z wykorzystaniem myszy typu *knock-out* z uszkodzonym genem *Prnp* nie przyniosły jednoznacznych wyników, bowiem zwierzęta te nie wykazywały poważnych zaburzeń rozwojowych i funkcjonalnych⁽⁶⁻⁸⁾. Z drugiej jednak strony nadekspresja PrP^c wywołana w komórkach w warunkach *in vitro* prowadzi do zmian poziomu ekspresji wielu innych genów⁽⁹⁾.

Analiza możliwych interakcji PrP^c z innymi molekułami komórkowymi to drugi z kierunków prowadzonych badań, mających na celu sprecyzowanie roli PrP^c. Ich rezultatem są wstępne wnioski sugerujące, iż białko PrP^c może być ogniwem różnych szlaków sygnalizacyjnych, zaś aktywność białka może być związana z reakcją komórki na warunki stresowe^(2,10-14), zachowaniem równowagi redox w komórkach⁽¹⁵⁻¹⁷⁾, zjawiskami warunkującymi przeżycie bądź śmierć komórki^(2,13,18-23). Ponadto PrP^c, pełniąc rolę receptorową, może brać udział w procesach transdukcji sygnału oraz w zjawisku adhezji i kontaktu pomiędzy komórkami^(24,25) (rys. 1).



Rys. 1. Potencjalne fizjologiczne funkcje białka PrP^c

Pomimo licznych hipotez sugerujących, iż fizjologiczna aktywność PrP^c może przejawiać się w wielu procesach metabolicznych komórek, dotychczas nie udało się jednoznacznie określić, jaką fizjologiczną funkcję spełnia to białko.

Jednak zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo*, mających na celu przybliżenie roli białka PrP^c, zaobserwowano wzrost ekspresji genu *PRNP/Prnp* w trakcie procesu różnicowania komórkowego w hodowlach różnego typu⁽²⁶⁻²⁸⁾ oraz w poszczególnych tkankach organizmu w procesie embriogenezy i rozwoju postnatalnego⁽²⁹⁻³¹⁾. Dlatego też jeden z kierunków badań dotyczących roli PrP^c jest próbą sprecyzowania funkcji białka w powyższych procesach.

Dotychczas uzyskane dane sugerują, że PrP^c może być zaangażowane m.in. w zjawisko różnicowania hematopoetycznego (leukocytów, megakariocytów), komórek układu odpornościowego (komórek dendrytycznych)^(27,32-34), różnicowania komórek linii zarodkowej (*germ cells*) podczas spermatogenezy⁽³⁵⁾ oraz różnicowania komórek mięśni⁽³⁶⁾.

Jednak wysoki poziom PrP^c w tkance nerwowej, jak również prawdopodobny udział białka w procesach swoistych dla neuronów oraz potencjalne zagrożenie konwersją do patologicznej izoformy – PrP^{Sc} to przyczyny, dla których określenie roli PrP^c w różnicowaniu komórek nerwowych ma szczególne znaczenie.

BIAŁKO PRP^c W RÓŻNICOWANIU NEURALNYM

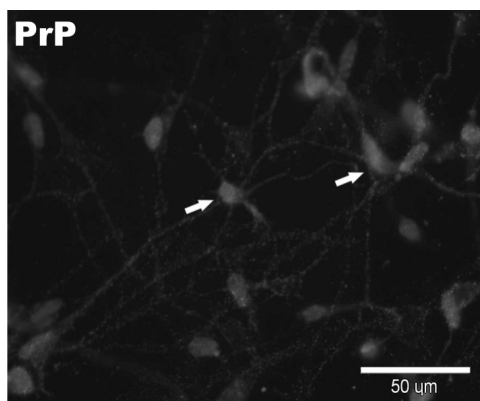
WZÓR EKSPRESJI GENU *PRNP/Prnp* W TRAKCIE RÓŻNICOWANIA NEURALNEGO IN VITRO I NEUROGENEZY

Punktem wyjścia dla badań nad rolą PrP^c w różnicowaniu komórek nerwowych stały się eksperymenty mające na celu ustalenie wzoru ekspresji genu *PRNP/Prnp* w trakcie tego procesu, z wykorzystaniem jako modeli neurogenezy *in vivo* u zwierząt oraz neuronalnych linii komórkowych w warunkach *in vitro*. Analiza *in vivo* ujawniła, iż w początkowych stadiach neurogenezy ekspresja genu *Prnp* jest bardzo niska, aczkolwiek poziom produktów genu *Prnp* wzrasta w kolejnych etapach rozwoju embrionalnego i postnatalnego^(29,31). Natomiast analiza lokalizacji PrP^c w dojrzałym mózgu wykazała, iż wyższym poziomem białka cechują się obszary o zwiększonej plastyczności w porównaniu z ustabilizowanymi w czasie rozwoju strukturami^(37,38).

Większość obserwacji z wykorzystaniem neuronalnych linii komórkowych (PC12, 1C11, B104), prowadzonych w warunkach indukujących proces różnicowania *in vitro*, przedstawia podobny obraz ekspresji genu *Prnp*, ukazując wzrost ekspresji badanego genu na poziomie mRNA i białka. Choć uzyskane wyniki wydają się spójne z obserwacjami *in vivo*, nie sposób pominąć faktu, iż większość modeli eksperymentalnych *in vitro* to linie wywodzące się z nowotworów. Analiza porównawcza ujawniła, iż badane linie komórkowe wykazują znaczące różnice nie tylko w poziomie białka PrP^c, cechują się także odmiennym wzorcem glikozylacji PrP^c (26). Obrazem typowym dla tkanki nerwowej jest natomiast obecność trzech izoform PrP^c: formy di-, mono- oraz nieglikozylowanej (39). Wykazano, iż w trakcie procesu neurogenezy zmienia się stosunek poszczególnych form tej glikoproteiny; w początkowych stadiach przeważają obie formy glikozylowane (30-34 kDa), a w późniejszych etapach pojawia się forma nieglikozylowana PrP^c (25-28 kDa) (5). W najnowszych badaniach *in vitro*, skupiających się wokół fizjologicznych bądź patologicznych aspektów związanych z białkiem prionu, jako model eksperymentalny bliższy warunkom *in vivo* wykorzystywane są neuralne komórki macierzyste (*neural stem cells*, NSCs) lub progenitorowe (28,40,41).

Wyniki badań Steele i wsp. prowadzonych z wykorzystaniem neuronalnych progenitorów myszy ujawniły wzrost poziomu PrP^c w trakcie różnicowania linii neuronalnej, począwszy od bardzo niskiego poziomu tego białka w komórkach niezróżnicowanych nestynopozytywnych, a skończywszy na wysokiej ekspresji obserwowanej w zróżnicowanych komórkach neuronalnych cechujących się ekspresją markerów swoistych dla komórek nerwowych: MAP-2, NeuN (28).

Wykazano, iż zarówno w rozwijającym się, jak i dojrzałym mózgu komórkami o cechach progenitorów neural-



Rys. 2. Wynik barwienia immunocytochemicznego demonstrujący ekspresję PrP^c w komórkach linii glikowej i neuronalnej uzyskanych w wyniku różnicowania neuronalnego *in vitro*. Komórki linii neuronalnej po różnicowaniu (strzałki) cechują się wyższym poziomem białka PrP^c

nych mogą być także GFAP-pozytywne komórki astrocytarne (42-44). Podobny wynik, ujawniający wzrost poziomu PrP^c w trakcie różnicowania linii neuronalnej, uzyskano, dokonując analizy ekspresji genu *PRNP* w trakcie różnicowania *in vitro* GFAP-pozytywnych neuronalnych komórek progenitorowych człowieka zdolnych do generacji linii neuronalnej i glikowej (45,46) (rys. 2).

Badania *in vivo* Tremblay i wsp. precyzują, że podczas rozwoju układu nerwowego ekspresja genu *Prnp* jest niewykrywalna w aktywnych mitotycznie progenitorach neuronalnych, dopóki komórki te nie zaprzestaną aktywności podziałowej i nie wejdą na drogę różnicowania neuronalnego (5).

W przedstawiony obraz wpisują się także badania Adle-Biasette i wsp., których wyniki, bazujące na modelu neurogenezy człowieka, ujawniły, że wzrost poziomu PrP^c, niewykrywalnego w początkowych stadiach rozwoju układu nerwowego, następuje w różnicujących neuronach po zakończeniu procesu migracji (47).

ROLA PrP^c W PROCESACH METABOLICZNYCH TOWARZYSZĄCYCH RÓŻNICOWANIU NEURONALNEMU

Drugi z aktualnych trendów badawczych ma na celu sprecyzowanie roli PrP^c w konkretnych procesach metabolicznych towarzyszących różnicowaniu.

Stwierdzono, iż PrP^c może pełnić rolę receptora lub białka adhezyjnego biorącego udział w procesach migracji i adhezji neuronów – zjawiskach towarzyszących różnicowaniu oraz mających znaczenie w utrzymaniu właściwej architektury tkanki nerwowej. Powyższe funkcje białka PrP^c mogą być realizowane poprzez tworzenie kompleksu PrP^c – laminina. Laminina znana jest bowiem jako białko zaangażowane m.in. w procesy proliferacji, różnicowania, migracji i śmierci komórki (2,48). Wykazano ponadto, że oddziaływanie kompleksu PrP^c – laminina może mieć wpływ na konsolidację procesów pamięciowych (49).

Wydaje się, iż PrP^c to białko mogące mieć znaczenie dla tworzenia i wzrostu wypustek nerwowych, za czym przemawia fakt, iż jego zwiększony poziom obserwowany jest w rosnących aksonach (47). Ta aktywność białka PrP^c może być realizowana również poprzez oddziaływanie z lamininą, co, jak wykazały badania *in vitro*, stymuluje powstawanie wypustek nerwowych, ma wpływ na ich wzrost i zachowanie integralności, jak również wydaje się mieć znaczenie w zjawisku plastyczności neuronalnej (2,48,50). Powyższe procesy mogą angażować białko PrP^c także poprzez interakcje z N-CAM (*neural cell adhesion molecule*) (51), które to białko, pełniąc funkcję receptora dla PrP^c, pośredniczy w aktywacji kinazy Fyn, czego efektem jest stymulacja wzrostu neurytów (52). Udział w powstawaniu wypustek nerwowych jest jedną z funkcji białka LPR/LR (37/67 kDa laminin receptor), które także ma zdolność oddziaływania z PrP^c (13). Relacja ta, obser-

wowana m.in. w komórkach neuronalnych, może być także istotna w komunikacji międzykomórkowej oraz przekazywaniu sygnału związanego z przeżyciem komórki⁽²⁵⁾. W spójności z powyższymi badaniami *in vitro* pozostają wyniki uzyskane *in vivo* w trakcie neurogenезy człowieka, gdzie obecność PrP^c obserwowano głównie w rosnących aksonach. Ponadto zjawiskiem, dla którego charakterystyczny był wzrost poziomu PrP^c, był proces synaptogenezy⁽⁴⁷⁾.

Wykazano także, iż PrP^c może być ogniwem szlaków sygnalizacyjnych sterujących mechanizmami różnicowania neuronalnego, o czym wydaje się świadczyć wzrost ekspresji genu *Prnp* w liniach komórek neuronalnych, uwarunkowany czynnikami stymulującymi *in vitro* proces różnicowania, takimi jak NGF czy insulina⁽⁵³⁻⁵⁵⁾. W przypadku powyższych badań nasuwa się jednak pytanie, czy NGF jest czynnikiem bezpośrednio aktywującym proces transkrypcji genu *Prnp*, jak zasugerowano w pracy Zawlik i wsp., czy też czynnikiem sprawczym powodującym wzrost ekspresji genu *Prnp* jest sam proces różnicowania, co sugerują wyniki Mouillet-Richard i wsp.^(55,56) Zaobserwowano również, że wzór ekspresji genu *Prnp* w trakcie różnicowania neuronalnego może być zależny od docelowego fenotypu komórek, co w badaniach Mouillet-Richard i wsp. przejawia się obniżeniem poziomu ekspresji genu *Prnp* w przypadku wejścia komórek na „drogę serotonergiczną”, w przeciwieństwie do różnicowania w kierunku komórek o fenotypie neuronów noradrenergicznych⁽⁵⁶⁾. Interesujący wydaje się również fakt, iż, jak pokazały późniejsze badania, proces różnicowania komórek IC11, zainfekowanych patologiczną izoformą białka – PrP^{sc} nie przebiega normalnie, czego przejawem są zaburzenia powstawania neurytów oraz syntezy i metabolizmu serotoniny⁽⁵⁷⁾.

Badania Mouillet-Richard i wsp. z wykorzystaniem jako modelu linii IC11 ukazują PrP^c jako ogniwo kaskady sygnalizacyjnej, której końcowym efektem jest aktywacja kinaz ERK1/2. Uzyskane wyniki sugerują jednak, iż proces ten przebiega odmiennie w przypadku komórek nie zróżnicowanych oraz w pełni zróżnicowanych komórek o fenotypie serotonergicznym lub noradrenergicznych neuronów⁽⁴⁷⁾. Wynik ten pozwala przypuszczać, że rola białka PrP^c może przejawiać się różnie, zależnie od stopnia zróżnicowania komórek. Hipotezę tę wydają się potwierdzać badania Kellermann i wsp., które wskazują, iż jedną z funkcji białka PrP^c jest „dostrajanie” procesów specyficznych wyłącznie dla zróżnicowanych neuronów⁽⁵⁸⁾.

UDZIAŁ BIAŁKA PRIONU W PROCESACH SPECYFICZNYCH DLA NEURONÓW

Dotychczasowe wyniki badań sugerują, iż białko PrP^c może być ogniwem kaskad sygnalizacyjnych powiązanych z procesami metabolicznymi swoistymi dla komórek nerwowych. Udział PrP^c w szlaku sygnalizacyjnym

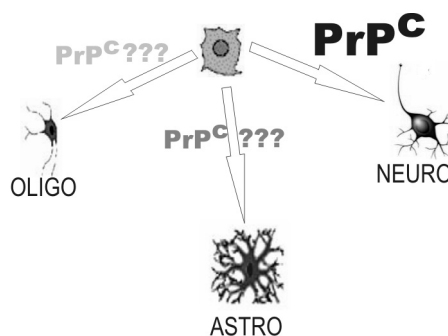
związanym z aktywnością kinazy tyrozynowej Fyn stwierdzono w warunkach *in vitro* w przypadku zróżnicowanych komórek linii neuronalnej IC11 o fenotypie serotonergicznym i noradrenergicznym neuronów⁽⁵⁸⁾. Wyniki eksperymentów prowadzonych z wykorzystaniem tej samej linii komórkowej pozwalają ponadto przypuszczać, iż PrP^c może modulować aktywność sygnalizacyjną receptorów serotonergicznym (5-HT), których działanie związane jest z syntezą, magazynowaniem i transportem serotoniny^(17,59).

Analiza lokalizacji PrP^c w komórkach nerwowych pozwoliła stwierdzić obecność białka głównie w błonie komórkowej oraz w obszarze presynaptycznym zakończeń neuronów, jak również diktiosomów i organelli recyklingu komórkowego^(60,61). Ponadto wykazano, że w pewnych warunkach biochemicznych PrP^c może mieć wpływ na procesy pobudliwości neuronów oraz przekaznictwo synaptyczne⁽⁶¹⁾, posiada także zdolność interakcji z białkami biorącymi udział w zjawiskach synaptycznych, np. synapsyną I^(13,62).

Sugeruje się również udział białka PrP^c w zachowaniu homeostazy wapniowej w neuronach oraz homeostazy jonów Cu²⁺ w obrębie połączeń synaptycznych^(2,13,61,63).

Na podstawie wyników badań z wykorzystaniem myszy typu *knock-out* pod względem genu *Prnp* (*Prnp*^{-/-}) wysunięto hipotezy postulujące udział PrP^c w wyższych funkcjach układu nerwowego, stwierdzono, iż aktywność białka prionu może być związana z procesami uczenia i pamięci oraz rytmem snu i czuwania⁽⁶⁻⁸⁾.

Wobec powyższych doniesień na temat roli PrP^c w procesach różnicowania oraz funkcjonowania komórek nerwowych zaskakujący jest fakt, że myszy z nieaktywnym genem *Prnp* nie wykazują istotnych zaburzeń w rozwoju organizmu^(2,7) oraz funkcjonowaniu układu nerwowego^(2,8,64). Badania prowadzone *in vitro* z wykorzystaniem neuronalnych linii komórkowych, w których wyeliminowano gen *Prnp* (*Prnp*^{-/-}), wykazały, iż brak białka PrP^c nie



Rys. 3. Schemat ekspresji genu PRNP/Prnp w procesie różnicowania neuralnego. Badania *in vitro* i *in vivo* wykazały wzrost ekspresji genu PRNP/Prnp w procesie różnicowania komórek nerwowych, kwestią kontrowersyjną natomiast jest ekspresja PrP^c w różnicujących komórkach gleju

uniemożliwia różnicowania, a jedynie spowalnia ten proces, czego przejawem jest opóźnienie ekspresji poszczególnych markerów różnicowania neuronalnego^(28,65).

W świetle powyższych obserwacji pojawia się jednak pytanie, na ile znacząca jest funkcja białka PrP^c w różnicowaniu neuronalnym, skoro nie jest ono niezbędne. Czy, jak sugerują Chiarini i wsp., komórki pozbawione PrP^c uruchamiają swoisty mechanizm kompensujący brak aktywności tego białka podczas różnicowania⁽¹²⁾, czy też PrP^c nie odgrywa w tym zjawisku kluczowej roli, a towarzyszący różnicowaniu neuronalnemu wzrost ekspresji genu *PRNP/Pmp* jest odzwierciedleniem innych procesów metabolicznych zachodzących w komórkach?

Z drugiej zaś strony w warunkach *in vitro* nadekspresja PrP^c wpływa na zmianę ekspresji genów związanych z procesami specyficznymi dla komórek układu nerwowego⁽⁹⁾.

EKSPRESJA GENU PRNP/Pmp W KOMÓRKACH GLEJU

Chociaż dominującym aspektem rozważanych tu doniesień jest ustalenie roli PrP^c w różnicowaniu i funkcjonowaniu komórek nerwowych, nie można pominąć badań zmierzających do określenia wzoru ekspresji genu *PRNP/Pmp* oraz roli PrP^c w komórkach gleju, tym bardziej że w procesie neurogenezy różnicowanie komórek nerwowych i glejowych to zjawiska współistniejące i najprawdopodobniej wzajemnie od siebie zależne. Dotychczas uzyskane wyniki badań nie dają pod tym względem spójnych rezultatów, pozwalających jednoznacznie określić wzór ekspresji genu *PRNP/Pmp* w komórkach glejowych. Pionierskie badania Moser i wsp. wykazały obecność transkryptu genu *Pmp* w astrocytach mózgu chomika i szczura na poziomie zbliżonym do komórek nerwowych oraz ujawniły dwukrotny wzrost ekspresji genu podczas rozwoju postnatalnego⁽⁶⁶⁾. Z kolei inne badania z wykorzystaniem komórek myszy potwierdziły ekspresję genu *Pmp* w astrocytach, wykazując jednak, iż jego ekspresja może być uwarunkowana różnymi czynnikami, związanymi nie tylko z procesem różnicowania⁽⁶⁷⁾. Wyniki jednych z najnowszych badań ujawniły natomiast, że obecność PrP^c w astrocytach wydaje się niezbędna dla prawidłowego przebiegu różnicowania neuronalnego w kokulturze, ma wpływ na tworzenie i wzrost wypustek nerwowych, zachowanie właściwej struktury lamininy – białka istotnego dla różnicowania oraz na przeżycie różnicujących neuronów⁽⁶⁸⁾.

Analiza ekspresji genu *PRNP* w procesie różnicowania neuronalnego *in vitro* na modelu GFAP-pozytywnych progenitorów neuronalnych człowieka ujawniła obecność PrP^c w różnicującej linii glejowej, aczkolwiek poziom tego białka nie zmienił się w uzyskanej po różnicowaniu populacji komórek glejowych w stosunku do nieodróżnianej populacji wyjściowej⁽⁴⁵⁾.

W badaniach *in vivo* Adle-Biasette i wsp. zidentyfikowano natomiast pewną populację astrocytów, która w trakcie

procesu neurogenezy charakteryzowała się wzrostem ekspresji genu *PRNP*⁽⁴⁷⁾.

W opozycji do przedstawionych doniesień pozostaje jedynie praca Steele i wsp., której autorzy, wykorzystując jako model różnicowania neuronalnego progenitory myszy, nie odnotowali ekspresji PrP^c w trakcie różnicowania linii glejowej, począwszy od stadium wyjściowego, a na zróżnicowanych komórkach wykazujących ekspresję specyficznych markerów glejowych skończywszy⁽²⁸⁾. Udowodniono ponadto, iż aktywność białka PrP^c w astrocytach może być istotna nie tylko dla procesów różnicowania, białko to może być zaangażowane również w procesy związane z metabolizmem glutaminy i miedzi^(69,70).

Wątkiem pobocznym towarzyszącym powyższym badaniom jest analiza ekspresji genu *PRNP/Pmp* w trakcie różnicowania mikrogleju i oligodendrocytów. W badaniach *in vivo* Adle-Biasette i wsp. stwierdzono okresowy wzrost poziomu PrP^c we wczesnym stadium różnicowania mikrogleju⁽⁴⁷⁾. Natomiast wyniki Steele i wsp. w warunkach *in vitro* nie wykazały obecności PrP^c w komórkach oligodendrocytów uzyskanych w procesie różnicowania neuronalnego progenitorów myszy⁽²⁸⁾.

Podsumowaniem powyższych badań jest obraz ekspresji genu *PRNP/Pmp* w trakcie różnicowania neuronalnego przedstawiony na rys. 3.

HETEROGENNOŚĆ POZIOMU PrP^c W RÓZNICUJĄCYCH KOMÓRKACH

Pomimo istnienia doniesień jednoznacznie sugerujących udział PrP^c w różnicowaniu neuronalnym różnicujące komórki cechują się odmiennym wzorem ekspresji genu kodującego to białko, nie tylko w przypadku różnych linii neuronalnych, ale nawet w przypadku tej samej linii komórkowej.

Analiza poziomu białka PrP^c w populacji MAP-2-pozytywnych komórek neuronalnych uzyskanych w procesie różnicowania neuronalnego *in vitro* progenitorów neuronalnych człowieka ujawniła, iż badana populacja komórek cechuje się heterogennością pod względem poziomu badanego białka. Wynik ten nasuwa pytanie, dlaczego komórki o tym samym fenotypie określonym ekspresją markera neuronalnego – MAP-2, znajdujące się w końcowych etapach różnicowania, reprezentują tak odmienny poziom PrP^c, począwszy od komórek o prawie niewykrywalnej ekspresji, a skończywszy na wykazujących stosunkowo wysoką immunoreaktywność⁽⁴⁵⁾.

Próba stworzenia uniwersalnego wzorca ekspresji genu *PRNP/Pmp* w procesie różnicowania neuronalnego wydaje się wobec tego nadmiernym uproszczeniem. Analiza powyższych rozważań nasuwa wniosek, iż jest to swoista cecha, którą należy rozpatrywać indywidualnie dla danego typu komórek, drogi różnicowania w kierunku określonego fenotypu czy stopnia zaawansowania różnicowania.

Rozpatrując rolę PrP^c podczas różnicowania komórek neuronalnych *in vitro* czy też podczas neurogenezy *in vivo*, nie sposób pominąć faktu, iż są to zjawiska złożone, obejmujące również inne procesy, takie jak apoptoza czy migracja komórek, które potencjalnie angażują białko PrP^c, w związku z czym ekspresja PrP^c w komórkach może stanowić wypadkową różnych procesów metabolicznych^(2,13,71,72).

Jeżeli, jak sugeruje lektura bieżącego piśmiennictwa, jedną z funkcji PrP^c jest udział w procesie różnicowania neuralnego, to pozostaje pytanie, czy aktywność tego białka jest czynnikiem sprawczym, czy też raczej skutkiem tego zjawiska.

PIŚMIENNICTWO:

BIBLIOGRAPHY:

- Riesner D.: Biochemistry and structure of PrP(C) and PrP(Sc). *Br. Med. Bull.* 2003; 66: 21-33.
- Martins V.R., Mercadante A.F., Cabral A.L. i wsp.: Insights into the physiological function of cellular prion protein. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2001; 34: 585-595.
- Bendheim P.E., Brown H.R., Rudelli R.D. i wsp.: Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology* 1992; 42: 149-56.
- Horiuchi M., Yamazaki N., Ikeda T. i wsp.: Cellular form of prion protein (PrP^c) exists in many non-neuronal tissues of sheep. *J. Gen. Virol.* 1995; 76: 2583-2587.
- Tremblay P., Bouzamondo-Bernstein E., Heinrich C. i wsp.: Developmental expression of PrP in the post-implantation embryo. *Brain Res.* 2007; 1139: 60-67.
- Liberski P.P.: Pasażowalne encefalopatie gąbczaste. *Wyd. Upowszechnianie Nauki – Oświata „UN-O” Sp. z o.o., Warszawa 1999.*
- Sakaguchi S.: Roles of prion protein and prion protein-protein in neurodegeneration: implication in the pathogenesis of prion diseases. W: Doupher V.B.: Prions: New research. Nova Science Publishers Inc., 2006.
- Weissmann C., Flechsig E.: PrP knock-out and PrP transgenic mice in prion research. *Br. Med. Bull.* 2003; 66: 43-60.
- Satoh J., Yamamura T.: Gene expression profile following stable expression of the cellular prion protein. *Cell Mol. Neurobiol.* 2004; 24: 793-814.
- Lopes M.H., Hajj G.N., Muras A.G. i wsp.: Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. *J. Neurosci.* 2005; 25: 11330-11339.
- Zanata S.M., Lopes M.H., Mercadante A.F. i wsp.: Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J.* 2002; 21: 3307-3316.
- Chiarini L.B., Freitas A.R., Zanata S.M. i wsp.: Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J.* 2002; 21: 3317-3326.
- Lasmezas C.I.: Putative functions of PrP(C). *Br. Med. Bull.* 2003; 66: 61-70.
- Brown D.R., Besinger A.: Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem J.* 1998; 334: 423-429.
- Schneider B., Mutel V., Pietri M. i wsp.: NADPH oxidase and extracellular regulated kinases 1/2 are targets of prion protein signaling in neuronal and nonneuronal cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2003; 100: 13326-13331.
- Malaise M.E., Brabeck C., Klotz U. i wsp.: Roles of cellular prion protein in oxidative stress and mitochondrial function. *PRION 2006 Strategies, advances and trends towards protection of society.* 3rd-6th October, 2006, Torino.
- Mouillet-Richard S., Schneider B., Pradines E. i wsp.: Cellular prion protein signaling in serotonergic neuronal cells. *Ann. NY Acad. Sci.* 2007; 1096: 106-119.
- Kim B.H., Lee H.G., Choi J.K. i wsp.: The cellular prion protein (PrP^c) prevents apoptotic neuronal cell death and mitochondrial dysfunction induced by serum deprivation. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2004; 124: 40-50.
- Roucou X., Giannopoulos P.N., Zhang Y. i wsp.: Cellular prion protein inhibits proapoptotic Bax conformational change in human neurons and in breast carcinoma MCF-7 cells. *Cell Death Differ.* 2005; 12: 783-795.
- Christensen H.M., Harris D.A.: Cellular lifesaver: exploring the role of cellular prion protein in neuroprotection. *PRION 2006 Strategies, advances and trends towards protection of society.* 3rd-6th October, 2006, Torino.
- Paitel E., Fahraeus R., Checler F.: Cellular prion protein sensitizes neurons to apoptotic stimuli through Mdm2-regulated and p53-dependent caspase 3-like activation. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 10061-10066.
- Saghafi S., Spilman P., Tanz Z. i wsp.: PrP topology as a determinant of pro- or anti-apoptotic function. *PRION 2005 Between fundamentals and society's needs.* 19th-21st October, 2005, Dusseldorf.
- Saghafi S., Spilman P.R., DeArmond S.J. i wsp.: Regulation of PrP^c topology is developmentally dependent. *PRION 2006 Strategies, advances and trends towards protection of society.* 3rd-6th October, 2006, Torino.
- Pan T., Wong B.S., Liu T. i wsp.: Cell-surface prion protein interacts with glycosaminoglycans. *Biochem. J.* 2002; 368: 81-90.
- Gauczynski S., Peyrin J.M., Haik S. i wsp.: The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *EMBO J.* 2001; 20: 5863-5875.
- Monnet C., Marthiens V., Enslin H. i wsp.: Heterogeneity and regulation of cellular prion protein glycoforms in neuronal cell lines. *Eur. J. Neurosci.* 2003; 18: 542-548.
- Starke R., Harrison P., Mackie I. i wsp.: The expression of prion protein PrP^c in the megakaryocyte lineage. *J. Thromb. Haemost.* 2005; 36: 1266-1273.
- Steele A.D., Emsley J.G., Ozdinler P.H. i wsp.: Prion protein (PrP^c) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2006; 103: 3416-3421.
- Manson J., West J.D., Thomson V. i wsp.: The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development.* 1992; 115: 117-122.
- Miele G., Alejo Blanco A.R. i wsp.: Embryonic activation and developmental expression of the murine prion protein gene. *Gene Expr.* 2003; 11: 1-12.
- Lazarini F., Deslys J.P., Dormont D.: Regulation of the glial fibrillary acidic protein, beta actin and prion protein mRNAs during brain development in mouse. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1991; 10: 343-346.
- Zhang C.C., Steele A.D., Lindquist S. i wsp.: Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2006; 103: 2184-2189.
- Martinez del Hoyo G., Lopez-Bravo M., Metharom P. i wsp.: Prion protein expression by mouse dendritic cells is restricted to the nonplasmacytoid subsets and correlates with the maturation state. *J. Immunol.* 2006; 177: 6137-6142.

34. Dodelet V.C., Cashman N.R.: Prion protein expression in human leukocyte differentiation. *Blood* 1998; 91: 1556-1561.
35. Fujisawa M., Kanai Y., Nam S.Y. i wsp.: Expression of Prnp mRNA (prion protein gene) in mouse spermatogenic cells. *J. Reprod. Dev.* 2004; 50: 565-570.
36. Massimino M.L., Stella R., Ferrari J. i wsp.: Pursuing the biological function of PrP^c by means of a novel experimental paradigm. PRION 2006 Strategies, advances and trends towards protection of society. 3rd-6th October, 2006, Torino.
37. Sales N., Hassig R., Rodolfo K. i wsp.: Developmental expression of the cellular prion protein in elongating axons. *Eur. J. Neurosci.* 2002; 15: 1163-1177.
38. Moya K.L., Sales N., Hassig R. i wsp.: Immunolocalization of the cellular prion protein in normal brain. *Microsc. Res. Tech.* 2000; 50: 58-65.
39. Lawson V.A., Collins S.J., Masters C.L. i wsp.: Prion protein glycosylation. *J. Neurochem.* 2005; 93: 793-801.
40. Lehmann S., Casanova D., Milhavet O.: Neural stem cells can propagate prions in culture. PRION 2005 Between fundamentals and society's needs. 19th-21st October, 2005, Dusseldorf.
41. Milhavet O., Casanova D., Chevallier N. i wsp.: Neural stem cell model for prion propagation. *Stem Cells* 2006; 24: 2284-2291.
42. Doetsch F., Caille I., Lim D.A. i wsp.: Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 1999; 97: 703-716.
43. Seri B., Garcia-Verdugo J.M., McEwen B.S. i wsp.: Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J. Neurosci.* 2001; 21: 7153-7160.
44. Horner P.J., Palmer T.D.: New roles for astrocytes: the nightlife of an "astrocyte". *La vida loca! Trends Neurosci.* 2003; 26: 597-603.
45. Witusik M., Gresner S.M., Hulas-Bigoszewska K. i wsp.: Neuronal and astrocytic cells, obtained after differentiation of human neural GFAP-positive progenitors, present heterogeneous expression of PrP^c. *Brain Res.* 2007; 1186: 65-73.
46. Rieske P., Azizi S.A., Augelli B. i wsp.: A population of human brain parenchymal cells express markers of glial, neuronal and early neural cells and differentiate into cells of neuronal and glial lineages. *Eur. J. Neurosci.* 2007; 25: 31-37.
47. Adle-Biassette H., Verney C., Peoc'h K. i wsp.: Immunohistochemical expression of prion protein (PrP^c) in the human forebrain during development. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2006; 65: 698-706.
48. Graner E., Mercadante A.F., Zanata S.M. i wsp.: Cellular prion protein binds laminin and mediates neuriteogenesis. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2000; 76: 85-92.
49. Coitinho A.S., Freitas A.R., Lopes M.H. i wsp.: The interaction between prion protein and laminin modulates memory consolidation. *Eur. J. Neurosci.* 2006; 24: 3255-3264.
50. Graner E., Mercadante A.F., Zanata S.M. i wsp.: Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. *FEBS Lett.* 2000; 482: 257-260.
51. Schmitt-Ulms G., Legname G., Baldwin M.A. i wsp.: Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. *J. Mol. Biol.* 2001; 314: 1209-1225.
52. Santuccione A., Sytnyk V., Leshchynska I. i wsp.: Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* 2005; 169: 341-354.
53. Chen S., Mange A., Dong L., Lehmann S., Schachner M.: Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. *Mol. Cell Neurosci.* 2003; 22: 227-233.
54. Kuwahara C., Kubosaki A., Nishimura T. i wsp.: Enhanced expression of cellular prion protein gene by insulin or nerve growth factor in immortalized mouse neuronal precursor cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 268: 763-766.
55. Zawlik I., Witusik M., Hulas-Bigoszewska K. i wsp.: Regulation of PrPC expression: nerve growth factor (NGF) activates the prion gene promoter through the MEK1 pathway in PC12 cells. *Neurosci. Lett.* 2006; 400: 58-62.
56. Mouillet-Richard S., Laurendeau I., Vidaud M. i wsp.: Prion protein and neuronal differentiation: quantitative analysis of prnp gene expression in a murine inducible neuroectodermal progenitor. *Microbes Infect.* 1999; 1: 969-976.
57. Mouillet Richard S., Nishida N., Laude H. i wsp.: Prion infection interferes with the serotonergic differentiation of the murine 1C11 neuronal progenitor. PRION 2006 Strategies, advances and trends towards protection of society. 3rd-6th October, 2006, Torino.
58. Kellermann O., Lafay-Chebassier C., Ermonval M. i wsp.: From stem cells to prion signalling. *C.R. Biol.* 2002; 325: 9-15.
59. Mouillet-Richard S., Pietri M., Schneider B. i wsp.: Modulation of serotonergic receptor signaling and cross-talk by prion protein. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 4592-4601.
60. Bailly Y., Haerberle A.M., Blanquet-Grossard F. i wsp.: Prion protein (PrP^c) immunocytochemistry and expression of the green fluorescent protein reporter gene under control of the bovine PrP gene promoter in the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 2004; 473: 244-269.
61. Herms J., Tings T., Gall S. i wsp.: Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J. Neurosci.* 1999; 19: 8866-8875.
62. Spielhauer C., Schatzl H.M.: PrP^c directly interacts with proteins involved in signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 44604-44612.
63. Herms J.W., Korte S., Gall S. i wsp.: Altered intracellular calcium homeostasis in cerebellar granule cells of prion protein-deficient mice. *J. Neurochem.* 2000; 75: 1487-1492.
64. Brandner S.: CNS pathogenesis of prion diseases. *Br. Med. Bull.* 2003; 66: 131-139.
65. Barenco M.G., Valon C., Hammann J. i wsp.: The N-terminal domain of the cellular prion protein is not necessary to induce neuronal differentiation and neurite outgrowth. PRION 2006 Strategies, advances and trends towards protection of society. 3rd-6th October, 2006, Torino.
66. Moser M., Colello R.J., Pott U. i wsp.: Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron* 1995; 14: 509-517.
67. Lazarini F., Castelnau P., Chermann J.F. i wsp.: Modulation of prion protein gene expression by growth factors in cultured mouse astrocytes and PC-12 cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1994; 22: 268-274.
68. Lima F.R., Arantes C.P., Muras A.G. i wsp.: Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. *J. Neurochem.* 2007; 103: 2164-2176.
69. Brown D.R., Mohn C.M.: Astrocytic glutamate uptake and prion protein expression. *Glia* 1999; 25: 282-292.
70. Brown D.R.: Role of the prion protein in copper turnover in astrocytes. *Neurobiol. Dis.* 2004; 15: 534-543.
71. McClellan K.A., Slack R.S.: Novel functions for cell cycle genes in nervous system development. *Cell Cycle* 2006; 5: 1506-1513.
72. Yu S., Zhang I.Z., Xu Q.: Genes associated with neuronal differentiation of precursors from human brain. *Neuroscience* 2006; 141: 817-825.