Piotr Rieske

© Aktualn Neurol 2006, 6 (3), p. 164-168

Received: 24.08.2006
Accepted: 08.09.2006
Published: 30.09.2006

Czy potrzebny jest nowy model neuropoezy?

Do we need a new model of neuropoiesis?

Zakład Patologii Molekularnej i Neuropatologii Katedry Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Czechosłowacka 8/10, 92-216 Łódź, tel.: 042 675 76 30, e-mail: piotrrieske@yahoo.com
Praca finansowana ze środków własnych

Streszczenie

Modele neuropoezy pozwalają określać, na jakim etapie różnicowania znajdują się komórki neuralne. Modele te oddają stan naszej wiedzy o neuropoezie, niemniej mają również znaczenie praktyczne. Stwierdzenie w warunkach *in vitro*, czy neuralne komórki macierzyste różnicują się do progenitorów neuronalnych, astrocytarnych czy oligodendrocytarnych, jest bardzo ważne dla transplantologów komórkowych. Wydaje się bowiem, że stosowanie właśnie progenitorów, a nie komórek w pełni zróżnicowanych czy komórek macierzystych, daje transplantologom największe szanse na sukces terapeutyczny – komórki macierzyste mogą wybrać szlak różnicowania inny niż planowany przez transplantologa, natomiast komórki dojrzałe, takie jak np. neurony, nie są odporne na zmiany środowiska. Ustalenie, z jakim progenitorem mamy do czynienia, wymaga obecnie określenia ekspresji markerów uznawanych za specyficzne dla danych komórek. Badania prowadzone od kilku lat Badania prowadzone od kilku lat pokazują jednak, iż w przypadku wielu markerów taka strategia nie jest właściwa. Dla przykładu, białko GFAP uznawane do niedawna za marker astrocytów ulega ekspresji także w niektórych nerwowych komórkach macierzystych. Odkrycie to prowadzi do poważnego zamętu w sposobie definiowania komórek. Ponadto wyniki badań zespołu, do którego należy autor niniejszej publikacji, wskazują, że komórki macierzyste mogą wykazywać koekspresję markerów komórek glejowych i neuronalnych. Dla modelu neuropoezy skonstruowanego w oparciu o tego typu wyniki zaproponowano nazwę: „model supresji niespójnych fenotypów".

SŁOWA KLUCZOWE: neuropoeza, neuralne komórki macierzyste, supresja niespójnych fenotypów, astrocyty, neurony

Summary

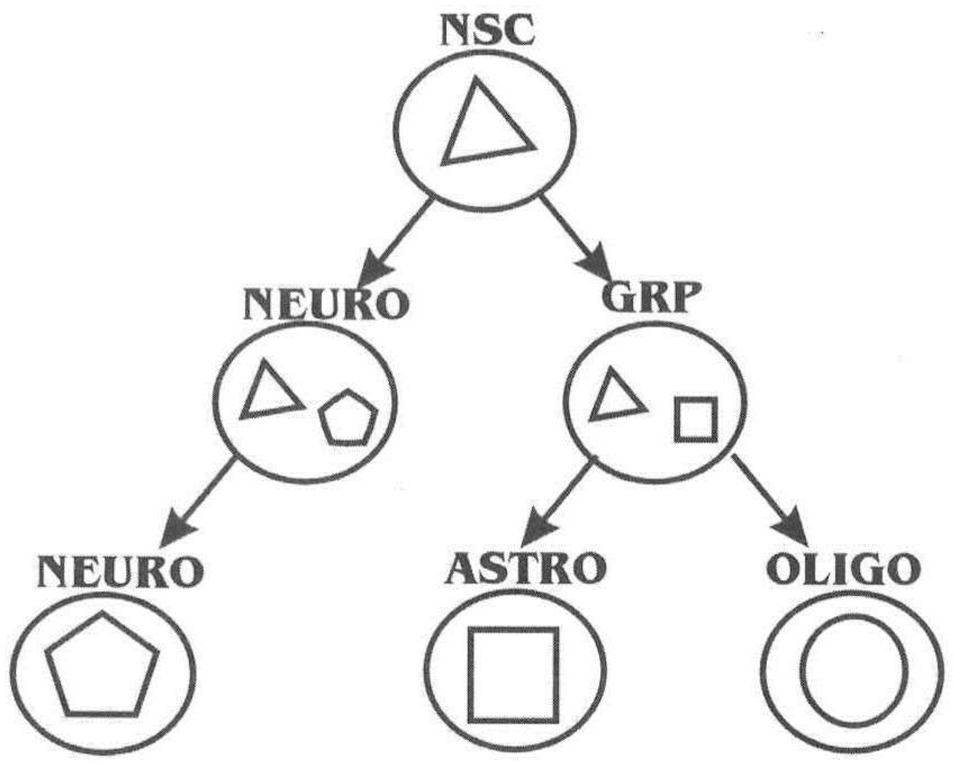
Models of neuropoiesis make it possible to determine at what stage of differentiation are neuronal cells. These models reflect our current knowledge about neuropoiesis, but they have also practical significance. *In vitro* determination whether neuronal stem cells differentiate to neuronal, astrocytic or oligodendrocytic progenitors is of utmost importance for cellular transplantologists. It seems that the use of progenitor cells and not fully differentiated cells or stem cells provides transplantologists with the greatest chance for therapeutic success: stem cells may choose a differentiation pathway other than planned by transplantologist, while mature cell, e.g. neurons, are quite sensitive to environmental changes. Determination of the progenitor type currently requires screening of expression of markers recognized as specific for particular cell type. Studies conducted for several years indicate that in the case of many markers this strategy is not appropriate. For example, the GFAP protein considered until recently a specific marker of astrocytes is also expressed in some neuronal stem cells. This discovery has led to a considerable chaos in the way cells are being defined. Furthermore, results of studies of the team where the author of this publication belongs indicate that stem cells may show coexpression of glial and neuronal markers. For the neuropoiesis model constructed upon this kind of data, a name "model of suppression of discordant phenotypes" has been proposed.

KEY WORDS: neuropoiesis, neural stem cells, suppression of discordant phenotypes, astrocytes, neurons

Neuropoezę przedstawia się za pomocą „neuropoetycznych" modeli różnicowania. Istnieje wiele takich modeli. Różnice między nimi nie dotyczą jednak fundamentalnego założenia, w myśl którego neuropoeza, podobnie jak hematopoeza, zachodzi dzięki asymetrycznym podziałom multipotencjalnej komórki pnia na komórki należące do odpowiednich linii di- lub unipotencjalnych[1,2]. W przypadku neuropoezy są to: linia glejowa i neuronalna. Linia glejowa (dipotencjalna) ulega następnie rozdzieleniu na linię szeregu astrocytarnego i linię szeregu oligodendrocytarnego[3]. Schematy różnicowania przypominają więc drzewo (rys. 1), w którym komórka macierzysta o największym potencjale stanowi pień, linie – gałęzie, a punkty rozwidlenia – węzły. Modele, w których przedstawia się tego typu zależności między komórkami macierzystymi a komórkami zróżnicowanymi, nazywa się hierarchicznymi. Klasyczne, hierarchiczne modele neuropoezy sugerują, że w trakcie różnicowania pojawiają się białka komórek wyspecjalizowanych (GFAP, astrocyty, β-III-tubulina, komórki neuronalne, MBP – oligodendrocyty) i zanikają białka komórek niewyspecjalizowanych (nestyna, sox-2).

Zgodnie z tymi modelami komórki NSC (ang. *neural stem cells*, nerwowe komórki macierzyste) wykazują początkowo ekspresję nestyny i sox-2. W pierwszym etapie neuropoezy komórki NSC ulegają przeobrażeniu do prekursora neuronalnego i glejowego – GRP (ang. *glial restricted precursor*). Prekursory to komórki, które są zadedykowane (ang. *committed*) do różnicowania się w kierunku wybranych komórek wyspecjalizowanych. Można powiedzieć, że prekursory to komórki „zaręczone" określonym liniom. W świetle klasycznych modeli bardzo trudno (o ile to w ogóle możliwe) zmienić ich przeznaczenie. Prekursor neuronalny można rozpoznać na podstawie ekspresji β-III-tubuliny i braku ekspresji białka NeuN (NeuN pojawia się w neuronach). Prekursory glejowe GRP wykazują ekspresję A2B5 i nestyny. Glejowe prekursory ulegają bifurkacji do prekursorów astrocytarnych i oligodendrocytarnych. Prekursory oligodendrocytów wykazują ekspresję antygenu A2B5, PDGFRα (ang. *platelet-derived growth factor alpha receptor*), nestyny i olig1/2. Prekursory astrocytów syntetyzują nestynę, CD44, a zarazem inicjują syntezę GFAP. Dojrzewające oligodendrocyty charakteryzuje obecność PDGFRα, O4 (antygen 4 oligodendrocytów) i GalC (galaktocerebrozyd). Natomiast dojrzałe oligodendrocyty wykazują ekspresję takich białek, jak CNP (fosfodiesteraza cyklicznych nukleotydów) i MBP (zasadowe białko mieliny). Dla odróżnienia, dojrzałe astrocyty to komórki wykazujące ekspresję GFAP i białka S100-β. W trakcie ostatecznego różnicowania prekursorów neuronalnych obserwuje się utratę β-III-tubuliny i pozyskanie na przykład neurofilamentów NF-160. Wraz z kolejnymi etapami różnicowania neuronalnego pojawiają się takie białka, jak hydroksylaza tyrozynowa – TH, dekarboksylaza glutaminianu – GAD65 (ang. *glutamic acid decarboxylase 65*) czy transporter dopaminy – DAT (ang. *dopamine transporter*). Białka te pełnią funkcje w wybranych typach neuronów, np. TH w neuronach syntetyzujących katecholaminy, GAD65 w neuronach produkujących GABA. Ten przykładowy model został stworzony na podstawie wybranych artykułów odnoszących się do neuropoezy[3-5].

Jak już wspomniano, tworząc modele neuropoezy, opierano się często na założeniu, że proces ten przebiega według zasad obowiązujących w ogólnym hierarchicznym modelu hematopoezy. Odwoływano się także do tzw. „modeli instrukcyjnych" albo „indukcyjnych" hematopoezy (ang. *instructive model, inductive model*). Poszukiwano czynników wzrostu, które zdeterminowałyby losy różnicujących się nerwowych komórek pnia, narzucając im niejako kierunek różnicowania[6,7]. Dla przykładu, w prezentowanym tu modelu rolę taką mógłby odegrać PDGFα, skierowując komórki GRP na drogę różnicowania do oligodendrocytów[8]. Wspomnieć tu jednak należy, że hierarchiczny model hematopoezy jest obecnie kwestionowany przez hematologów[9-15]. W hematologii dominują raczej zwolennicy modelu stochastycznego, w którym przyjmuje się, że czynniki wzrostu nie determinują losu różnicujących się komórek, a jedynie je selekcjonują – umożliwiają przetrwanie komórkom, których los w trakcie różnicowania został już wcześniej przesądzony. Model stochastyczny jest często postrzegany jako niespójny



Rys. 1. Klasyczny, hierarchiczny model neuropoezy. Figury geometryczne oznaczają markery linii komórek układu nerwowego. Markery komórek dojrzałych pojawiają się w komórkach zadedykowanych (ang. committed*) i pozostają w komórkach w pełni zróżnicowanych. Symbolizują je tu: pięciokąt, kwadrat i okrąg. Komórki te nie posiadają markerów komórek niedojrzałych; na schemacie symbolizuje tego typu markery trójkąt. Zmiany wielkości figur geometrycznych symbolizują zmiany poziomu ekspresji markerów. NSC – nerwowa (neuralna) komórka macierzysta (ang.* neural stem cell*); GRP – prekursor linii glejowej (ang.* glial restricted precursor*); neuro – linia neuronalna; astro – linia astrocytarna; oligo – linia oligodendrocytarna*

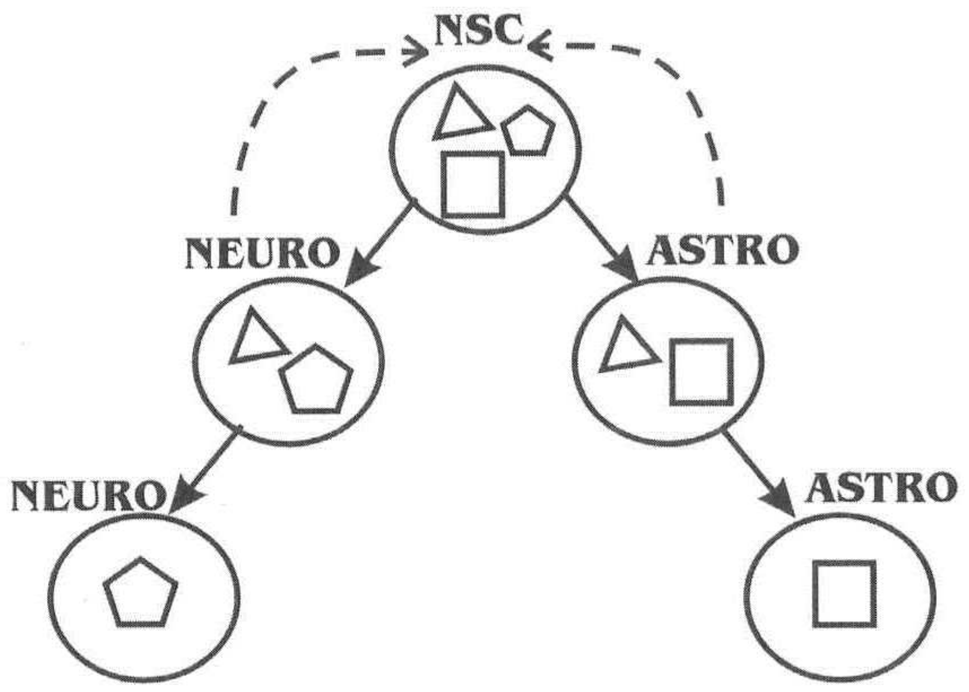
z modelem hierarchicznym[11,12]. Tym bardziej więc próby zapożyczania – na przykład do modeli neuropoetycznych – niektórych rozwiązań, które posłużyły do stworzenia hierarchicznego modelu hematopoezy, mogą okazać się intelektualnym nadużyciem. Klasyczny (tradycyjny), hierarchiczny model neuropoezy został zakwestionowany przez autorów badań, w których dowiedli oni istnienia nerwowych komórek pnia wykazujących koekspresję GFAP i nestyny[2,16,17]. Białko GFAP uznawane jest powszechnie za wysoce swoisty marker astrocytów. Fenotyp GFAP+, nestyna+ trudno wkomponować w model, w którym zakłada się sekwencyjną zamianę białek komórek niezróżnicowanych na białka komórek dojrzałych. Obserwując ekspresję nestyny w GFAP-pozytywnych neuralnych komórkach macierzystych, można by raczej twierdzić, że różnicowanie astrocytarne umożliwiają utrata ekspresji nestyny i zachowanie GFAP, a nie utrata nestyny i pozyskanie GFAP.

Ostatnio zaproponowano alternatywny model różnicowania neuralnego[18]. Odkryto bowiem komórki o cechach nerwowych (neuralnych) komórek pnia, wykazujące koekspresję β-III-tubuliny, GFAP, nestyny. Komórki te określono mianem „NSC" (ang. *neural stem cells*), opierając się przede wszystkim na fakcie, że dokonano udanego ich różnicowania do komórek astrocytarnych, komórek neuronalnych linii GABA-ergicznej i katecholaminergicznej, a także komórek oligodendrocytarnych.

Koekspresji β-III-tubuliny, nestyny i GFAP w komórkach macierzystych nie można wytłumaczyć, opierając się na tradycyjnych modelach neuropoezy, takich jak np. zaprezentowany w pracy Kimelberga[3]. Zaobserwowano bowiem, iż linia astrocytarna powstawała przy zachowaniu ekspresji GFAP i wyeliminowaniu ekspresji β-III-tubuliny. Z kolei wytworzenie linii neuronalnej możliwe było dzięki zwiększeniu poziomu β-III-tubuliny i wyeliminowaniu ekspresji GFAP (rys. 2). Nie można więc w tym przypadku mówić o utracie ekspresji markerów komórek niezróżnicowanych i pojawieniu się markerów komórek wyspecjalizowanych.

Kierunek różnicowania komórek wykazujących koekspresję GFAP i nestyny, jak również kierunek różnicowania komórek wykazujących koekspresję β-III-tubuliny i nestyny określono, przeprowadzając kolejne analizy immunocytochemiczne. Stwierdzono, że większość komórek β-III-tubulinoimmunopozytywnych przeobraża się w komórki produkujące głównie GABA i znacznie mniejszą grupę, wykazującą wysoką ekspresję hydroksylazy tyrozynowej. Zaobserwowano także pojawianie się komórek wykazujących ekspresję GFAP i posiadających typową morfologię astrocytarną po utracie ekspresji nestyny. Również dojrzewaniu komórek o morfologii neuronalnej towarzyszył zanik ekspresji nestyny, z tym że w przypadku komórek linii neuronalnej typowe dla neuronów zmiany morfologiczne pojawiły się jeszcze przed zanikiem ekspresji nestyny. Wyniki te stanowiły potwierdzenie hipotezy, według której komórki o fenotypie β-III-tubulina+, nestyna+ przeobrażają się w dalszych etapach różnicowania w neurony, a komórki o fenotypie GFAP+, nestyna+ – w astrocyty.

W oparciu o wyżej przytoczone wyniki zespół, do którego należy autor artykułu, zaproponował nowy model neuropoezy[18]. Model ten nazwano „modelem supresji niespójnych fenotypów" (rys. 2, 3). W jego ramach przyjęto, że różnicowanie neuralne opiera się na eliminacji białek zbędnych i pozostawieniu (a nie nabywaniu) białek użytecznych w danej linii komórkowej. Hematolodzy podobne rozważania prowadzą już od pewnego czasu. Autorzy badań nad hematopoezą już dawno wskazywali na możliwość ekspresji białek komórek dojrzałych w hematopoetycznych komórkach pnia[19]. Na problem porządkowania zwrócili też uwagę Egusa i wsp., opisując neuronalne różnicowanie komórek stromalnych szpiku. Zdaniem badaczy ich wyniki dowodzą supresji niespójnych fenotypów (w oryginale *suppression of discordant phenotypes*) w różnicujących się komórkach macierzystych dorosłych poprzez wyciszanie zbytecznych (nadmiarowych) grup genów (w oryginale *silencing of superfluous gene clusters*)[20]. Nazwa proponowanego tu modelu alternatywnego wobec klasycznego, hierarchicznego modelu neuropoezy została więc niejako zapożyczona z pracy Egusy i wsp. Już w roku 2004 Zipori w swoim artykule w „Nature Reviews. Genetics" stwierdzał, że obserwacje



Rys. 2. Modyfikacja klasycznego modelu neuropoezy (porównaj z rys. 1). ***Model supresji niespójnych fenotypów.*** *Komórka pnia dokonuje ekspresji markera komórek linii neuronalnej (pięciokąt – β-III-tubulina) i astrocytarnej (kwadrat – GFAP), a także komórek niedojrzałych (trójkąt – nestyna). Komórki różnicujące się tracą nestynę i odpowiednio β-III-tubulinę lub GFAP. Wielkość figur geometrycznych reprezentuje poziom ekspresji białek obserwowany w badaniach własnych. NSC – nerwowa (neuralna) komórka macierzysta (ang.* neural stem cell*); neuro – linia neuronalna; astro – linia astrocytarna. Ponieważ dotychczas prowadzone badania własne nad linią oligodendrocytarną nie pozwalają stwierdzić, czy powstaje ona w zgodzie z modelem hierarchicznym czy niehierarchicznym (stochastycznym), nie umieszczamy tutaj tej linii*