



Dr hab. Leonora Bużańska

Neuralne komórki macierzyste: podejmowanie decyzji rozwojowych

Leonora Bużańska, Ilona Szabłowska-Gadomska, Marzena Zychowicz

Zakład Neurobiologii Naprawczej, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk, Warszawa

e-mail: buzanska@imdik.pan.pl

Hierarchia rozwojowa komórek macierzystych

Komórki macierzyste charakteryzują się zdolnością do samoodnawiania i potencjałem do różnicowania w przynajmniej jeden spośród wszystkich wyspecjalizowanych komórek organizmu. Podczas rozwoju ontogenetycznego komórki macierzyste stopniowo zawężają swój potencjał do różnicowania w określone typy komórek. Zygota, czyli zarodek jednokomórkowy wykazuje totipotencjalność. Oznacza to możliwość do różnicowania we wszystkie typy komórek i stworzenia całego nowego organizmu, z błonami płodowymi i łożyskiem włącznie. Kolejnym etapem w hierarchii rozwojowej jest pluripotencjalność, którą wykazują komórki węzła zarodkowego blastocysty, różnicujące się w komórki trzech listków zarodkowych, które dają początek nowemu organizmowi. W hodowli *in vitro* komórki te noszą nazwę zarodkowych komórek macierzystych (*Embryone Stem Cells*; ESC) Różnica między komórkami totipotencjalnymi i pluripotencjalnymi polega na braku zdolności tych ostatnich do tworzenia błon płodowych. Etap pluripotencjalności jest okresem aktywności genów chromosomu X przy jednoczesnym braku aktywności genów charakterystycznych dla komórek zróżnicowanych. W okresie tworzenia listków zarodkowych, a następnie specyfikacji tkankowej, zdolność do różnicowania komórek

jest dalej zawężana i stają się one multipotencjalne. Takie komórki różnicują się w obrębie jednego listka zarodkowego, lub jednej tkanki i noszą nazwę somatycznych komórek macierzystych (*Somatic Stem Cells*; SSC). Neuralne komórki macierzyste (*Neural Stem Cells*; NSC) są jednym z rodzajów SSC i dają początek komórkom ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego. Hierarchia rozwojowa komórek macierzystych przedstawiona jest graficznie na Rycinie 1, jako zwięzająca się piramida potencjału do różnicowania. Komórki macierzyste tracą ten potencjał stopniowo na określonych etapach rozwoju. Potencjał do różnicowania w alternatywne linie, np. linię epidermalną i linię prekursorów neuralnych jest permanentnie ograniczony, natomiast potencjał do różnicowania w kolejne podlinie, np. neuronalną lub glejową podlega jedynie czasowej supresji lub zawieszeniu, aż do momentu, kiedy pojawią się odpowiednie czynniki stymulujące program różnicowania [19]. Różne mechanizmy molekularne decydują o wyciszeniu lub aktywacji określonych genów podczas rozwoju, a włączanie tych programów zależy od sygnałów z otaczającego środowiska (niszy) komórek macierzystych. Koncepcję korelacji stopniowej utraty zdolności do wielokierunkowego różnicowania z wyborem drogi rozwojowej zależnej od warunków otoczenia, po raz pierwszy zaprezentował Conrad Waddington w 1957 roku. Swoją teorię dotyczącą wpływu czynników epigenetycznych na losy komór-



Ryc. 1. Korelacja hierarchii rozwojowej komórek macierzystych z ich statusem epigenetycznym. Hierarchia rozwojowa i potencjał do różnicowania komórek macierzystych są ściśle związane z ich statusem epigenetycznym. Trzy kolory: czerwony, zielony i pomarańczowy w piramidzie rozwojowej oznaczają związek stanu metylacji histonu H3 (domen: represyjnej i permissywnej, odpowiednio – K27 i K4) oraz metylacji DNA z aktywnością transkrypcyjną wybranych trzech grup genów rozwojowych: pluripotencjalnych, różnicowania neuronalnego i różnicowania glejowego. Dostępna literatura wskazuje na to, że w komórkach totipotencjalnych chromatyna generalnie charakteryzują się brakiem metylacji DNA i stanem bivalentnym, czyli wysoką metylacją lizyn 4 i 27 histonu 3, ale w totipotencjalnej zygotie - zarodku jednokomórkowym nie jest to jednoznaczne, z uwagi na różny poziom metylacji zarówno DNA jak i histonów w przedjadrze męskim i żeńskim (dlatego na schemacie umieszczono znak zapytania) [47, 49]. W pluripotencjalnych komórkach ESC geny pluripotencjalności są aktywne (kolor zielony) (demetylacja DNA w odcinkach promotorowych, hypermetylacja domeny permissywnej H3K4), natomiast geny różnicowania neuronalnego i glejowego pozostają nieaktywne, ale w stanie bivalentnym, czyli w każdej chwili gotowe do ekspresji. Multipotencjalne komórki NSC charakteryzują się represją genów pluripotencjalnych (kolor czerwony) (metylacja promotorów DNA i hypermetylacja domeny represywnej H3K27) oraz stanem bivalentnym genów różnicowania neuronalnego i glejowego. Rozpoczęcie neurogenezy w piramidzie rozwojowej zaznaczone jest linią przerywaną. Faza rozwojowa neurogenna związana jest z brakiem ekspresji genów pluripotencjalnych i genów różnicowania glejowego oraz aktywnością genów różnicowania neuronalnego. Faza gliogenna, występująca po fazie neurogennej, związana jest z aktywnością genów różnicowania glejowego i represją genów pluripotencjalności oraz różnicowania neuronalnego

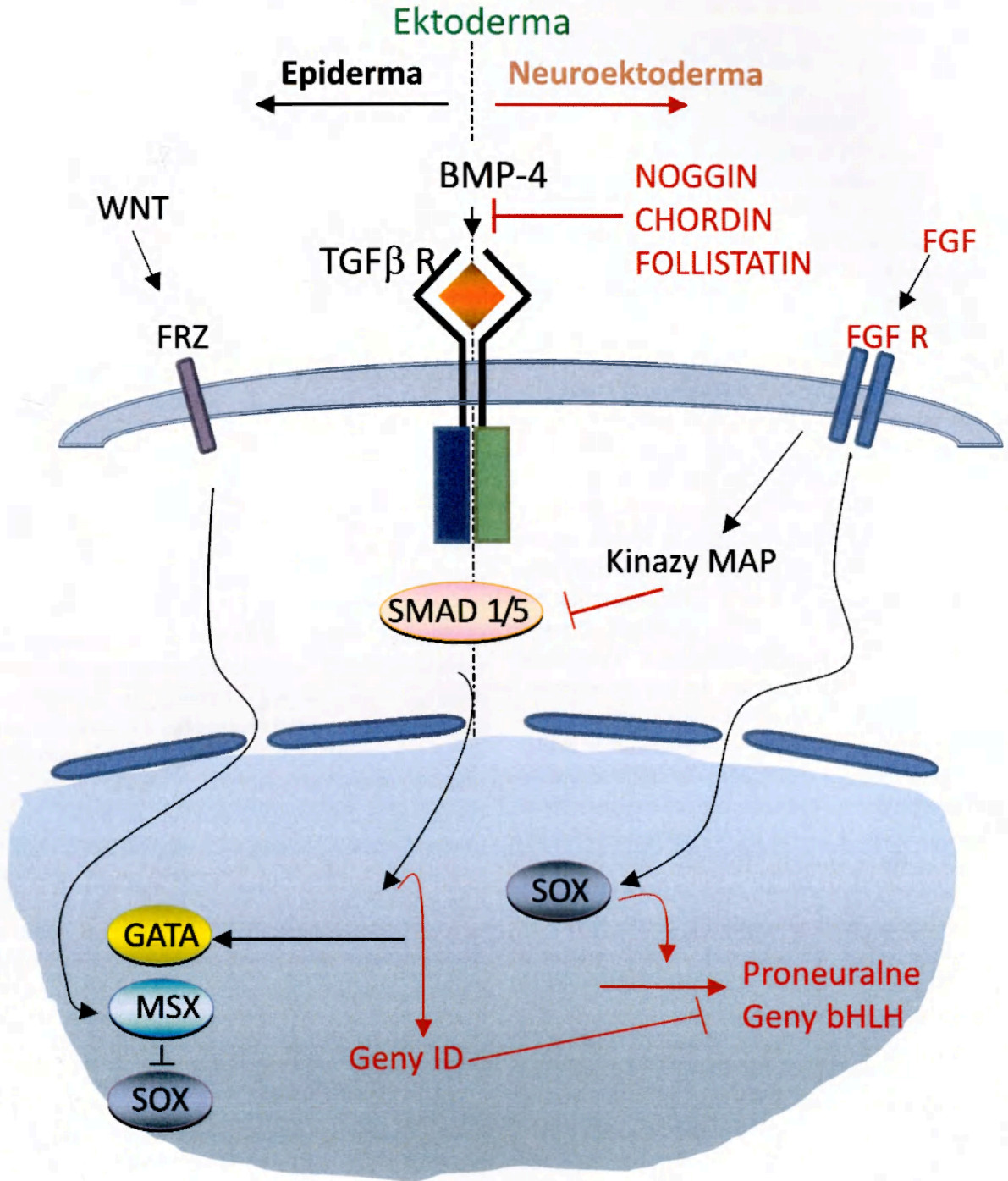
rek podczas rozwoju ontogenetycznego Waddington nazwał „epigenetycznym ukształtowaniem powierzchni” („epigenetic landscape”) i zobrazował graficznie jako kulkę toczącą się ze szczytu góry w dół, która ma do wyboru różne drogi wytyczone ukształtowaniem powierzchni. Według tej koncepcji populacje komórek wybierające ustaloną drogę charakteryzują się wzorem epigenetycznym, który decyduje o ich potencjale do różnicowania [20]. Rycina 1 przedstawia

piramidę hierarchii rozwojowej, w której różnym grupom genów rozwojowych, odpowiedzialnych za: 1. pluripotencjalność; 2. różnicowanie neuronalne; 3. różnicowanie glejowe (np. astrocytarnie), przypisano określone stany aktywności transkrypcyjnej: ekspresję (kolor zielony), brak ekspresji (kolor czerwony) lub gotowość do aktywacji – stan bivalentny (kolor pomarańczowy). Stan aktywności transkrypcyjnej określonej grupy genów skorelowany jest m.in.

z wzorem epigenetycznym w odcinku chromatyny, w którym się znajdują. Wzór ten zależy od zmian posttranslacyjnych, takich jak: przyłączanie grup metylowych do fragmentów nici DNA promotorów genów zwanych „wyspami CpG” (patrz rozdział 4) oraz grup metylowych i acetylowych do motywów N-końcowych (ogonów) histonów. Hipermetylacja „wysp CpG” promotorów jest związana z wyciszeniem ekspresji sąsiadujących genów. Zmiany posttranslacyjne histonów i DNA wpływają na stopień kondensacji chromatyny i aktywność genów. Na Rycinie 1 podano przykładowo korelację metylacji lizyny 4 (K4) histonu trzeciego (H3) (znacznik aktywności transkrypcyjnej genu) i metylacji lizyny 27-mej histonu trzeciego (znacznik represji transkrypcyjnej genu) oraz metylacji DNA ze stanem genowej aktywności różnych grup genów rozwojowych. W domenach biwalentnych chromatyny (gotowość genów do aktywacji) metylacja występuje w dwóch lokalizacjach lizyn histonu trzeciego: potrójna metylacja zarówno lizyny w pozycji 4-tej (H3K4me3) jak też 27-mej (H3K27me3). W totipotencjalnej zygocie wzór metylacji DNA jest „wymazywany” (całkowicie jedynie w przedjądrzu męskim), uważa się również, że większość domen chromatyny jest w stanie gotowości transkrypcyjnej (metylacja histonów w miejscach zarówno represji – H3K27me3, jak i aktywności transkrypcyjnej – H3K4me3), nie jest to jednak do końca wyjaśnione z uwagi na zróżnicowany poziom metylacji chromatyny pochodzącej od ojca i od matki [30, 47, 49]. Ekspresji genów na wszystkich poziomach hierarchii rozwojowej towarzyszy metylacja lizyny 4-tej histonu trzeciego H3 i brak metylacji lizyny 27-mej (H3K4me3), natomiast zahamowanie ekspresji jest związane z metylacją lizyny 27-mej i brakiem metylacji lizyny 4-tej (H3K27me3). Powyższy schemat zmian struktury chromatyny na różnych etapach rozwoju w określonych grupach genów, przedstawiony jako zależność od stanu metylacji histonów i DNA, jest uproszczony, ponieważ nie uwzględnia innych czynników, między innymi poziomu acetylowania histonów i metylacji lizyny 9 histonu 3 (H3K9me3). Wiadomo jednak, że wzmożona acetylowanie histonów powoduje dekondensację chromatyny i aktywację transkrypcji, natomiast usunięcie grup acetylowych przez HDAC (*histon deacetylase*) powoduje kondensację chromatyny i w konsekwencji zahamowanie transkrypcji [21] (patrz rozdział Regulacja epigenetyczna podejmowania decyzji rozwojowych przez NSC).

Regulacja molekularna indukcji neurogenezy i gliogenezy rozwojowej

Indukcja neurogenezy rozwojowej rozpoczyna się na etapie tworzenia trzech listków zarodkowych. Izolacja fragmentów zarodka w różnych stadiach rozwoju pozwoliła ustalić, kiedy tkanka jest zdeterminowana w kierunku neuralnym. Okazało się, że część apikalna zarodka wyizolowana w stadium pregastruli, rozwija się *in vitro* w komórki epidermy, natomiast w stadium gastruli, gdy mamy do czynienia z tworzeniem trzeciego listka zarodkowego – mezodermy, rozwija się w kierunku neuralnym. Wpuklająca się warstwa komórek mezodermalnych (dorsalna mezo-derma – tzw. Organizator Spemann’a) uwalnia szereg białek, które hamują ścieżkę sygnalizacyjną białka morfogenetycznego kości (*Bone Morphogenetic Protein*, BMP) promując rozwój neuroektodermy. Do takich molekuł należą CER (*Cerberus*), CHD (*Chordin*), NOG (*Noggin*) i FOL (*Follistatin*), (Ryc. 2). Obecnie funkcjonują dwa modele neuralnej indukcji. Pierwszy model „spontanicznego różnicowania” zakłada, że zablokowanie sygnałów szlaku BMP przez jeden z czynników uwalnianych z dorsalnej mezodermy (inhibicja połączenia BMP-4 z receptorem TGFβ R (*Transforming Growth Factor beta Receptor*) powoduje naturalny rozwój neuroektodermy. Drugi model „instrukcyjny” zakłada alternatywne działanie sygnałów, które pochodzą z endodermy (ekspresja białek DKK1 i CER-1, które są represorami szlaków WNT (*Wingless*) i BMP) lub mogą podlegać ekspresji w samej ektodermie, jak np. czynnik wzrostu fibroblastów (*Fibroblast Growth Factor*, FGF). FGF z jednej strony, za pośrednictwem szlaku MAP kinaz inhibuje wewnątrzkomórkowo białka SMAD (*Sma and Mad related*) odgrywające główną rolę w indukcji rozwoju epidermy, a z drugiej strony stymuluje bezpośrednio transkrypcję białek SOX (SRY related HMG Box), które aktywują geny proneuralne (Ryc. 2), [12]. Indukcja neuroektodermy wiąże się automatycznie ze stabilizacją neuronalnego losu tych komórek i dalszym różnicowaniem w kierunku neuronów. Rycina 3 przedstawia uproszczony schemat regulacji genetycznej poszczególnych etapów indukcji i stabilizacji różnicowania neuronalnego. Ekspresja FGF i genów antagonizujących BMP indukuje neurogenezę, podczas gdy ekspresja genów kodujących czynniki transkrypcyjne: *Sox* i *Zic1,3* stabilizuje neuralny los tych komórek, jednocześnie promując

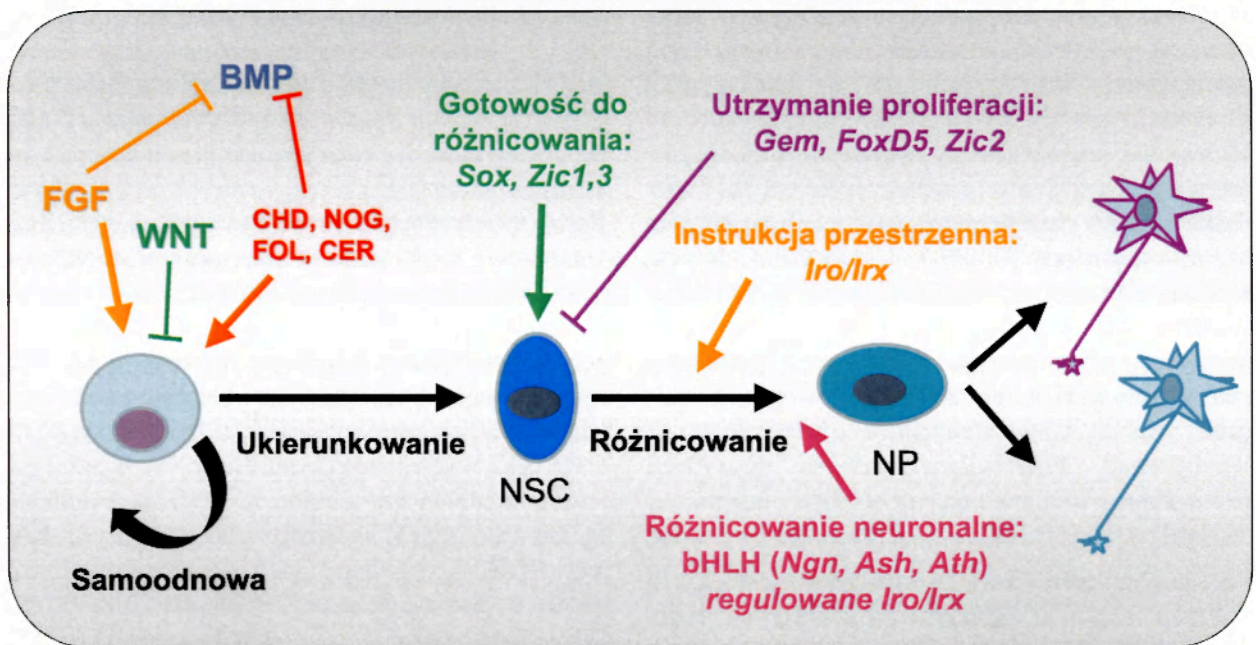


Ryc. 2. Regulacja molekularna indukcji neurogenezy. Obecny model neuralnej indukcji zakłada naturalną właściwość ektodermy do tworzenia epidermy przez aktywację drogi przekazywania sygnału BMP. BMP-4 w ektodermie stymuluje receptor TGF β , który aktywuje białka SMAD i w efekcie transkrypcję takich genów jak *Gata* i *Msx*. Białka MSX i GATA hamują transkrypcję genów *Sox*, koniecznych do indukcji różnicowania neuralnego. Czynniki transkrypcyjne SMAD aktywują transkrypcję białek ID, które hamują aktywację genów proneuralnych. Sygnał zewnątrzkomórkowy, ligand WNT na tym etapie rozwoju dodatkowo wzmacnia różnicowanie epidermalne stymulując transkrypcję genów *Msx*. Zablokowanie sygnału BMP przez jeden z wielu inhibitorów produkowanych w części zarodka zwanej „Organizator Spemann’a”, powoduje inaktywację drogi przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego BMP/SMAD, co umożliwia transkrypcję genów *Sox* i aktywację genów proneuralnych i różnicowanie w kierunku neuroektodermy. Stymulacja czynnikiem wzrostu FGF zapewnia alternatywną drogę rozwoju neuroektodermy, z jednej strony hamując drogę przekazywania sygnału SMAD, w której pośredniczy szlak kinaz MAP i z drugiej strony stymulując transkrypcję *Sox*. Zmodyfikowano za Sanes i wsp. [45]

różnicowanie. Inne geny, takie jak *FoxD5*, *Zic2* i *Geminin*, również stabilizują neuralny los komórek, ale antagonizują różnicowanie. IRO/IRX jest rodziną białek kodowanych przez geny homeotyczne i bierze udział w aktywacji czynników transkrypcyjnych bHLH (*basic Helix loop Helix*) typu „achaete-scute” (np. MASH1). Ekspresja tych białek oraz genów kodujących czynniki transkrypcyjne proneuralne typu bHLH indukuje końcowe różnicowanie w kierunku neuronów (Ryc. 3).

W rozwoju ontogenetycznym NSC powstają z komórek pluripotencjalnych rozwijającego się neuroepitelium w postaci komórek gleju gwiaździstego (*Radial Glia*; RG). RG organizują kształt cewy nerwowej. W części apikalnej tworzą między sobą połączenia ścisłe i adherentne, podczas, gdy w części bazalnej łączą się z błoną podstawną. Taka obustronna bariera determinuje przestrzennie rozwój i integralność tworzącego się Ośrodkowego Układu Nerwowego (OUN). Podczas rozwoju OUN neurony i komórki glejowe pojawiają się w sposób sekwencyjny:

neurogeneza rozpoczyna się w 5-tym tygodniu rozwoju człowieka i wyprzedza gliogenezę. Od 7–20 tygodnia obserwuje się migrację neuroblastów wzdłuż komórek RG. Migrujące neuroblasty dzielą się i przekształcają strukturę cewy nerwowej z jednowarstwowej w wielowarstwową. Gliogeneza rozpoczyna się dopiero po 20 tyg. rozwoju i związana jest z transformacją RG w komórki glejowe, a co za tym idzie zanikiem potencjalnej puli komórek RG do generacji nowych neuroblastów. Komórki astrogleju powstające bezpośrednio z RG posiadają potencjał proliferacyjny, dzięki któremu zwiększa się liczba powstających komórek glejowych w rozwijającym się OUN [26]. Mechanizmy leżące u podstaw indukcji gliogenezy nie są jeszcze do końca poznane, wiadomo jednak, że wiodącą rolę w tym procesie odgrywa szlak przekazywania sygnału JAK/STAT (*Janus Kinase-signal Transducer and Activator of Transcription*), aktywowany cytokinami rodziny IL-6 [18, 36]. Cytokina gliogenna CT-1 (*Cardiotrophin-1*), należąca do rodziny IL-6, jest produkowana w neuronach, co



Ryc. 3. Specyfikacja różnicowania neuralnego. Neurogeneza jest związana z „ucieczką” tworzących się komórek neuroektodermy przed instruktywnymi sygnałami innymi niż neuralne - głównie czynników wzrostowych z grupy BMP. Ekspresja FGF i genów antagonizujących BMP indukuje neurogenezę, podczas gdy ekspresja genów *Sox* i *Zic1,3* stabilizuje neuralny los tych komórek, jednocześnie promując różnicowanie. Inne geny, takie jak *FoxD5*, *Zic2* i *Geminin*, również stabilizują neuralny los tych komórek, ale antagonizują różnicowanie. Iro jest to rodzina białek aktywujących czynniki transkrypcyjne bHLH, typu „achaete-scute” i ekspresja tych białek oraz genów kodujących czynniki transkrypcyjne proneuralne typu bHLH indukuje dalszą neurogenezę. Zmodyfikowano za Moody i Je [38]

może być jednym z powodów indukcji gliogenezy po neurogenezie. Wykazano również, że w fazie gliogenezy rozwoju drogi przekazywania sygnału JAK/STAT, BMP i Notch działają synergistycznie [5, 36].

Decyzje rozwojowe Neural Stem Cells: molekularne podstawy różnicowania w kierunku neuronów lub komórek glejowych

Neurogeneza postnatalna różni się od rozwojowej brakiem inhibicyjnych oddziaływań czynników z grupy BMP, typowych dla rozwijającej się neuroektodermi. Obszary mózgu dorosłego człowieka, w których zachodzi aktywny i ciągły proces neurogenezy, zostały zidentyfikowane i zlokalizowane przez grupę Freda Gage'a [15] w strefie podziarnistej (*subgranular zone*; SGZ) zakrętu zębatego hipokampa oraz w strefie podkomorowej (*subventricular zone*; SVZ) wyściełającej komory bocznej mózgowia. Aktywność neurogenną stwierdzono również w innych częściach OUN człowieka, ale dotyczy to neurogenezy indukowanej zwykle uszkodzeniem lub innym bodźcem zewnętrznym. Neuralnym komórkom macierzystym w niszach neurogennych towarzyszą takie procesy rozwojowe, jak proliferacja, migracja i różnicowanie, które są precyzyjnie regulowane przez cały kontekst dynamicznych oddziaływań NSC z otaczającym mikrośrodowiskiem. Takie oddziaływania dotyczą kaskady czynników molekularnych (czynników wzrostowych i neurotroficznych oraz białek sygnalizacyjnych), strukturalnych (interakcji z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej i innymi komórkami) oraz fizycznych (dystrybucja w przestrzeni trójwymiarowej). Przykładem znaczenia dystrybucji przestrzennej komórek macierzystych w niszach, jest szczególna pozycja NSC w SVZ, które z jednej strony pojedynczym wyrostkiem (rzęską) sięgają płynu mózgowo-rdzeniowego, a z drugiej strony długimi wypustkami łączą się z naczyniami krwionośnymi. Takie ułożenie przestrzenne może mieć duże znaczenie dla stymulacji dróg przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego w NSC [37, 46]. Główne drogi przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego zaangażowane w określenie fenotypu neuralnego to Wingless, Hedgehog, Notch, BMP, JAK-STAT oraz MEK-ERK-Rsk.

Szlak kanoniczny Wingless jest związany z kontrolą samoodnowy i regulacją neurogenezy. Glikoproteina WNT łączy się z receptorem FZ (Frizzled) i aktywuje białko adaptorowe DVL (*Dishevelled*), które rozłącza kompleks kinazy serynowo/treoninowej GSK3- β z innymi białkami m.in. β -CAT (β -*kateninga*). β -CAT jest rozpuszczalnym białkiem cytoplazmatycznym degradowanym w komórkach niepobudzonych przez GSK3- β . Nagromadzona w cytoplazmie β -CAT jest transportowana do jądra i razem z czynnikiem transkrypcyjnym TCF/LEF indukuje transkrypcję genów odpowiedzialnych za proliferację i różnicowanie neuralne. WNT stymuluje samoodnowę i proliferację w NSC w trakcie rozwoju zarodkowego, natomiast w komórkach postnatalnych, w określonych warunkach stymuluje również neurogenezę. Główną rolę w różnicowaniu neuronalnym odgrywa glikoproteina WNT3a [22, 39].

Sonic Hedgehog (SHH) jest białkiem o charakterze morfogenu wpływającym na prawidłowy rozwój mózgu i rdzenia kręgowego. Aktywuje ścieżkę sygnalizacyjną hedgehog łącząc się z receptorem PTCH (*Patched*). W konsekwencji dochodzi do hamowania aktywności śródbłonowego białka SMO (*Smoothed*) i aktywacji czynników transkrypcyjnych GLI1-3, które po translokacji do jądra tworzą kompleks między innymi z czynnikiem transkrypcyjnym CtBP (*C-terminal Binding Protein*). Aktywacja szlaku hedgehog indukuje transkrypcję genów czynników wzrostowych i ich receptorów (np. *PdgfR*, *Igf-2*, *Ptc-1*, *Gli-1*, *Wnt*) oraz genów regulujących cykl komórkowy. GLI 1 podlega ekspresji w NSC [52].

Droga przekazywania sygnału Notch sprzyja utrzymaniu multipotencjalności NSC lub indukcji gliogenezy w zależności od etapu rozwojowego organizmu. NOTCH jest śródbłonowym receptorem aktywowanym po połączeniu z ligandem DELTA lub JAGGED. Aktywacja ścieżki sygnałowej Notch jest regulowana śródbłonowym białkiem PRES1 (*Presilinina 1*), która kontroluje enzymatyczną degradację receptora NOTCH, odcinając jego koniec cytoplazmatyczny i tworząc cząsteczkę regulatorową NICD (*Notch Intracellular Domain*). NICD przełącza funkcję czynnika transkrypcyjnego CBF1/CSL z represorowej na aktywującą, uwalniając CSL (białko wiążące DNA, znane również jako: suppressor of hairless, CBF, LAG1, RBP-JK) od represora CoR (ko-represor transkrypcji). W jądrze NICD tworzy kompleks z CoA (ko-aktywator transkrypcji), CSL, CoA (koaktywator transkrypcji) oraz MAML (*Mastermind*)

aktywując transkrypcję genów związanych między innymi z cyklem komórkowym oraz utrzymaniem multipotencjalności NSC [24]. Notch wpływa na utrzymywanie multipotencjalności NSC przez aktywację dróg „przeżycia” w komórce, czyli fosforylacji związanych z aktywną kinazą serynowo-treoninową AKT oraz kinazą PI3, ale również w określonych stadiach rozwoju indukuje gliogenezę [1, 40, 54].

BMPs – to grupa ligandów sekrecyjnych dla superrodziny TGF β (*Transforming Growth Factor-beta*). BMP po połączeniu z TGF β R aktywują białka SMAD, które po translokacji do jądra indukują transkrypcję genów. Aktywacja ścieżki przekazywania sygnału BMP może mieć różny efekt rozwojowy w NSC. Prowadzi bądź do hamowania indukcji neurogenezy (aktywacja ID1) [53], bądź do stymulacji gliogenezy (indukcja syntezy czynnika REST/NRSF (*RE1-Silencing Transcription Factor/Neuron Restrictive Silencing Factor*) w zależności od etapu rozwojowego komórek [36, 44].

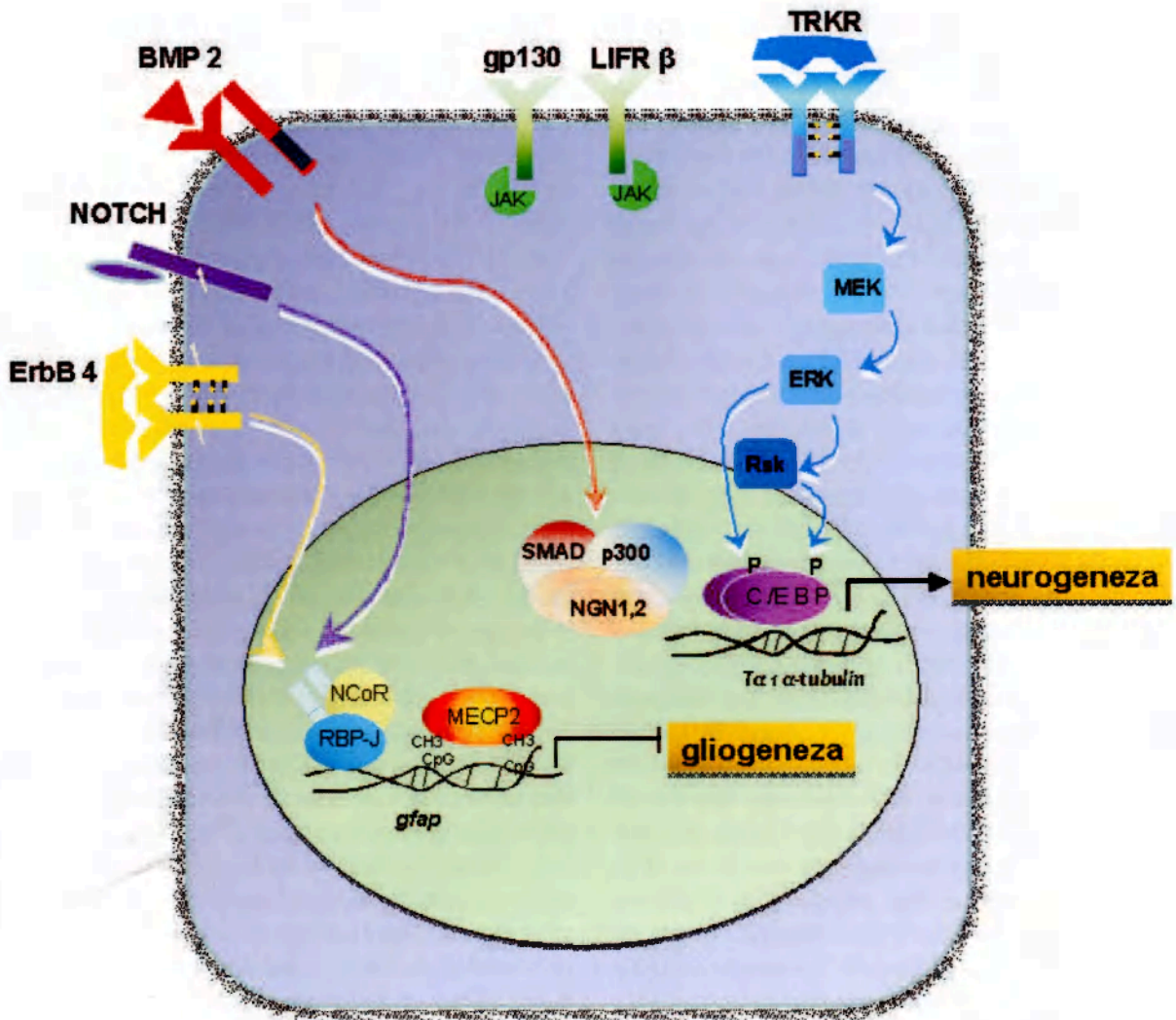
Kolejnym szlakiem przekazywania sygnału zaangażowanym w proces neurogenezy jest MEK-ERK-Rsk (*mitogen-activated protein kinases"/"extracellular signal-regulated kinases"/40S ribosomal protein S6 kinase*). MEK-ERK-Rsk działa jako kaskada wewnątrzkomórkowa kinaz serynowo-treoninowych, aktywowana czynnikami wzrostu jak np. NGF, PDGF czy BDNF. Kinazy MAP fosforylują czynniki transkrypcyjne regulujące ekspresję genów związanych z proliferacją, różnicowaniem, apoptozą i neuroprotekcją [41].

Rycina 4 jest schematem przedstawiającym współzależności między sygnałami zewnątrz i wewnątrzkomórkowymi w kaskadzie molekularnej zaangażowanej w różnicowanie neuronalne. Istotne w tej kaskadzie są białka typu bHLH (np. NGN1-2), które bezpośrednio promują transkrypcję genów neuronalnych, hamując jednocześnie gliogenezę przez sekwestrację ko-faktora p300/CBP. Aktywowany szlak BMP promuje neurogenezę, wpływając na tworzenie kompleksu ko-aktywatora p300/CPB z czynnikiem transkrypcyjnym SMAD. Dodatkowo TrkR (receptor kinazy tyrozynowej) po połączeniu z neurotrofinami i PDGF, aktywuje szlak MEK kinaz (MEK-ERK-Rsk), który indukuje fosforylację czynników transkrypcyjnych rodziny C/EBP (*Enhancer-Binding Proteins; CCAAT*). Aktywowane czynniki C/EBP indukują transkrypcję genów neuronalnych np. α -*tubulin 1*. W tym samym czasie transkrypcja genów odpowiedzialnych za gliogenezę jest zablokowana (Ryc. 4) [36].

Rozpoczęcie gliogenezy oraz długość jej trwania determinuje skoordynowana akcja trzech różnych efektorowych ścieżek przekazywania sygnału: JAK-STAT, Notch oraz BMP [25, 36], (Ryc. 5). W indukcję gliogenezy zaangażowane są cytokiny rodziny Interleukiny-6, w szczególności CNTF (*Ciliary Neurotrophic Factor*), LIF (*Leukemia Inhibitor Factor*) oraz CT-1 (*cardiotrophin-1*), które wiążą i dimeryzują ko-receptor gp130 i LIFRb. W efekcie następuje aktywacja kaskady przekazywania sygnału JAK-STAT, w której JAK jest kinazą zasocjowaną i aktywowaną przez gp130, natomiast STATs są czynnikami transkrypcyjnymi, fosforylowanymi i aktywowanymi przez JAK [16]. STAT3 tworzy kompleks z czynnikami SMAD, aktywowanymi przez sygnał od receptora BMP oraz z koaktywatorem p300/CBP. Kompleks STAT3/SMAD/p300/CBP łączy się z promotorem genów glejowych (np. *Gfap*) i indukuje transkrypcję tych genów. Cytokina CT-1 oprócz indukcji szlaku JAK-STAT wpływa na translokację represora białkowego NCoR z jądra do cytoplazmy. Jednocześnie aktywowana kaskada wewnątrzkomórkowa receptora NOTCH sprawia, że czynnik transkrypcyjny RBP-JK (*efektor drogi sygnałowej Notch*) łączy się z promotorem genu gliennego powodując jego transaktywację. Ostatnim etapem transaktywacji jest przyłączenie do promotora genu gliennego czynnika transkrypcyjnego NF1 (*Nuclear Factor 1*), co powoduje rozpoczęcie transkrypcji genów typowych dla różnicowania glejowego. W różnicujących się i dojrzałych komórkach glejowych geny odpowiedzialne za różnicowanie neuronalne są wyciszone. Jest to z jednej strony związane z inhibicyjną dimeryzacją genów bHLH z czynnikami ID oraz brakiem dostępności kompleksu ko-aktywatorowego p300/CBP, a z drugiej strony zmianami epigenetycznymi, które są omówione w następnym rozdziale.

Regulacja epigenetyczna podejmowania decyzji rozwojowych przez Neural Stem Cells

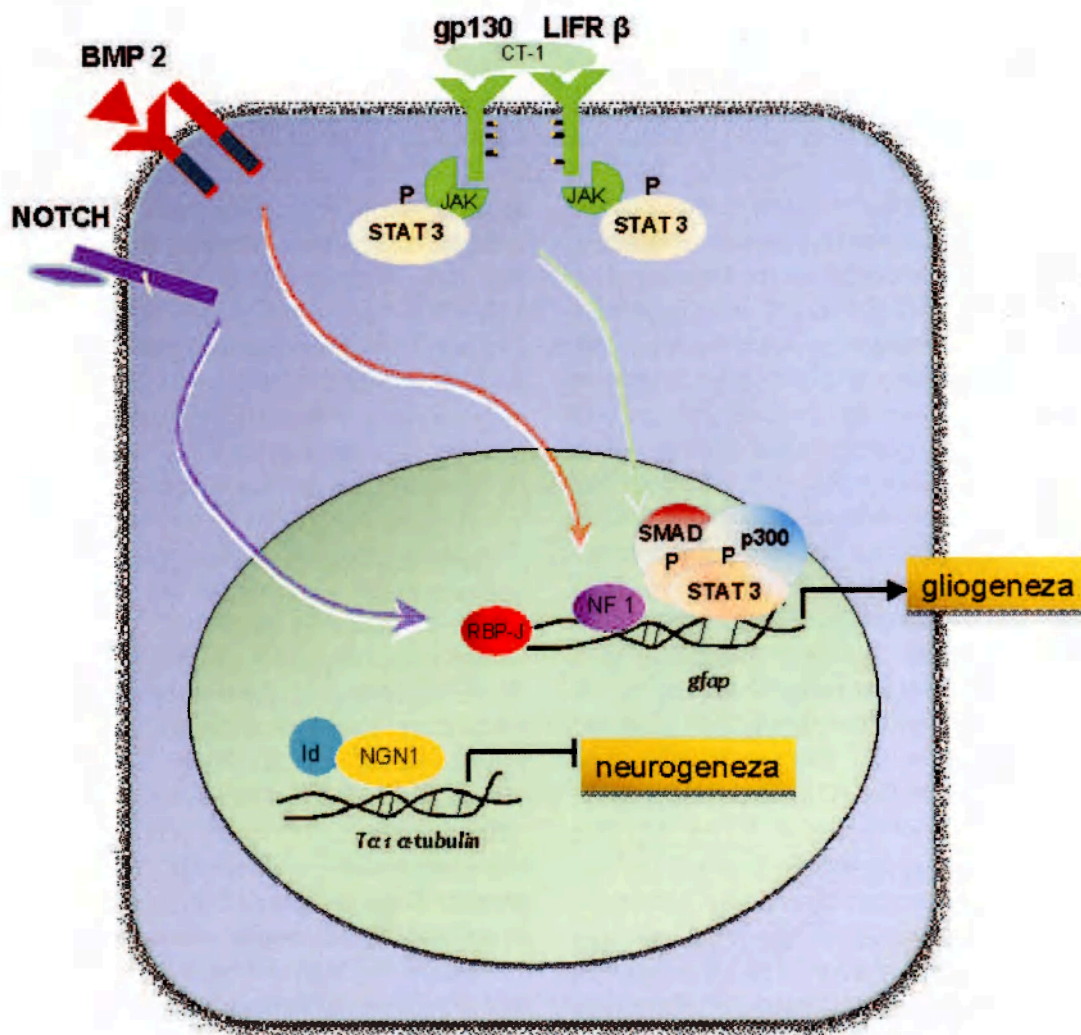
Pojęcie epigenetyki zostało wprowadzone przez Conrad Waddington w 1942 roku dla opisanego procesu powstawania fenotypu w wyniku oddziaływania pomiędzy genami i ich produktami [13]. Od tego czasu definicja epigenetyki ulegała wielokrotnie



Ryc. 4. Współdziałanie sygnałów wewnątrz i zewnątrz komórkowych w różnicowaniu neuronalnym. Liczne sygnały zewnątrz i wewnątrzkomórkowe determinują rozpoczęcie i długość trwania neurogenezy. Kluczowe w tej kaskadzie molekularnej są białka bHLH, które bezpośrednio promują transkrypcję genów neuronalnych, jednocześnie inhibując gliogenezę przez sekwestrację kofaktora p300/CBP. Podczas neurogenezy aktywacja szlaku BMP promuje neurogenezę, wpływając na tworzenie kompleksu ko-aktywatora p300/CPB z czynnikiem transkrypcyjnym SMAD. Dodatkowo TrkR (receptor kinazy tyrozynowej) po połączeniu z neurotrofinami i PDGF, aktywuje szlak MEK-ERK-Rsk, który indukuje fosforylację czynników transkrypcyjnych rodziny C/EBP. Aktywowane czynniki C/EBP indukują transkrypcję genów neuronalnych. W tym samym czasie geny indukujące gliogenezę są zablokowane przez hypermetylację promotorów DNA genów różnicowania glejowego i przyłączenie białka MECP2. Drugi mechanizm represyjny dotyczy aktywacji receptorów ErbB 4 i Notch przez łączenie odpowiednio neureguliny i ligandów DELTA/JAGGED. Efektem tej stymulacji jest translokacja do jądra represora NCoR i powstanie kompleksu represyjnego z białkiem RBP-Jk. Zmodyfikowano za Miller i Gauthier [36]

zmianom. Historycznie dotyczyła ona regulacji ekspresji genów przez czynniki zewnątrz i wewnątrzkomórkowe, które nie powodują zmiany sekwencji DNA. Według obecnie funkcjonującej definicji epigenetyka oznacza mitotyczne i mejotyczne dziedziczenie zmian ekspresji genów, które nie są kodowane w ich sekwencji DNA [27]. Taka definicja uwzględnia metylację DNA, która podlega propagacji zależnej od

replikacji i jest dziedziczona w liniach somatycznych, natomiast nie uwzględnia przejściowych/krótkotrwałych i odwracalnych modyfikacji posttranslacyjnych histonów (np. fosforylacji). W przypadku komórek postmitotycznych, jakimi są neurony, zmiany dziedziczone replikacyjnie mają mniejszy wpływ na regulację ekspresji genów niż niezależne od replikacji metylacje i inne zmiany posttranslacyjne, które mają



Ryc. 5. Współdziałanie sygnałów wewnątrz i zewnątrz komórkowych w różnicowaniu glejowym. Co najmniej trzy różne sygnały zewnątrzkomórkowe: ligandy CT-1, BMP2 oraz sygnał indukowany przez receptor NOTCH regulują w sposób skoordynowany moment rozpoczęcia gliogenezy. Głównym czynnikiem jest cytokina gliogenna CT-1 (*Cardiotrophin-1*), która wiąże i dimeryzuje ko-receptor gp130 i LIFR β . To indukuje kinazę JAK do fosforylacji i aktywacji czynników transkrypcyjnych STAT3. STAT3 tworzy kompleks z czynnikami SMAD, aktywowanymi przez sygnał od receptora BMP oraz z koaktywatorem p300/CBP. Kompleks STAT3/SMAD/ p300/CBP łączy się z promotorem genów glejowych, (np. *Gfap*) i indukuje transkrypcję tych genów. Cytokina CT-1 również wpływa na translokację z jądra do cytoplazmy represora białkowego NCoR. W tym samym czasie aktywacja NOTCH powoduje, że czynnik transkrypcyjny RBP-JK (efektor drogi sygnałowej NOTCH) łączy się z promotorem genu gliogennego i indukując jego transaktywację. Proastrocytalny czynnik transkrypcyjny NF1 indukowany drogą przekazywania sygnału BMP łączy się do promotora genu gliogennego wzmacniając jego trans aktywację. Zmodyfikowano za Miller i Gauthier [36]

wpływ na modyfikację struktury chromatyny [33]. Dlatego obecnie, według Narodowego Instytutu Zdrowia (NIH) epigenetyka dotyczy: „zarówno zmian dziedzicznych w aktywności genów jak też zmian długotrwałych w potencjale transkrypcyjnym, które nie muszą być dziedziczone” [31]. Różnicowanie i rozwój komórek jest wynikiem regulacji ekspresji genów, uwarunkowanych metylacją DNA, posttrans-

lacyjnymi modyfikacjami histonów i miRNA. W przypadku bliźniąt jednojajowych, które mają identyczny materiał genetyczny, mechanizmy epigenetyczne są główną przyczyną innego profilu ekspresji genów i innego fenotypu [12]. Młode bliźnięta monozygotyczne wykazują podobny poziom metylacji DNA, podczas gdy w starszym wieku różnice są znaczące [6].

Aktywność genów jest zależna od stopnia kondensacji chromatyny w miejscu kodowanym przez określony gen oraz od modyfikacji epigenetycznej DNA w miejscu inicjacji transkrypcji [7]. Wzajemne interakcje DNA z białkami chromatyny decydują o dostępności promotora określonego genu dla czynników inicjujących transkrypcję. DNA komórki eukariotycznej ma długość ok. 2 m, podczas gdy jądro komórki ma średnicę ok. 10 μm . Kondensacja takiej ilości materiału genetycznego jest możliwa dzięki interakcji białek chromatyny z DNA [2]. Chromatyna na najniższym poziomie upakowania ma strukturę nukleosomu (10 nm), wyższy poziom stanowi włókno 30 nm (dawniej solenoid). Najwyższy poziom kondensacji chromatyny stanowią chromosomy metafazowe, występujące podczas podziału komórkowego. Najbardziej rozpowszechniony obraz struktury chromatyny stanowi nukleonom, w którym oktamer histonów rdzeniowych (po dwie cząsteczki H2A, H2B, H3, H4) owinięty jest nicią DNA. Między nukleosomami, tzw. łącznikowe DNA (linker DNA), wiąże się z histonem H1, który stabilizuje układ „koralików na sznurku” [14, 43].

Modyfikacje histonów

Posttranslacyjne modyfikacje dotyczą zazwyczaj zewnętrznych, w stosunku do rdzenia nukleosomu, N-końcowych fragmentów („ogonów”) histonów tworzących rdzeń – H2A, H2B, H3, H4. Występują również modyfikacje C-końcowych fragmentów H2A i H2B. Aminokwasy mogą podlegać acetylacji (lizyna), metylacji (lizyna, arginina), fosforylacji (seryna) oraz ubiquitynacji (lizyna) [51]. Zasadowy koniec zawierający np. reszty lizynowe K (ładunek dodatni) wykazuje jonowe powinowactwo do DNA (ładunek ujemny). Modyfikacja N-końcowych fragmentów histonów przez acetylację powoduje zmniejszenie powinowactwa i rozluźnienie struktury włókna 30 nm. Dzięki temu możliwy jest dostęp czynników inicjujących transkrypcję i aktywacja ekspresji genów. Natomiast wpływ na aktywność genów innej modyfikacji – metylacji lizyny zależy od miejsca jej występowania [28]. Metylacja H3K4 (lizyny czwartej K4 histonu trzeciego H3), H3K36, H3K79 jest związana z aktywnością genów, podczas gdy, metylacje H3K9, H3K27, H4K20 zazwyczaj łączy się z represją ich transkrypcji. Poziom metylacji histonów (pojedyncza, podwójna lub potrójna) jest związany z różnymi poziomami aktywności lub

represji genów regulowanych aktywnością określonych szlaków komórkowych [29].

Za procesy przyłączania grup acetylowych odpowiadają enzymy – acetylotransferazy histonów tzw. HAT (Histone Acetyltransferase). Wykazano, że spośród wcześniej opisywanych białek mających związek z procesem aktywacji genów wiele ma aktywność enzymów HAT np. białko p55 i białko p300/CBP. W związku z tym, że proces acetylacji histonów i w konsekwencji aktywacji genów jest procesem odwracalnym, wykryto deacetylazy histonów, tzw. HDAC, enzymy, które usuwają przyłączone grupy acetylowe i tym samym przyczyniają się do wyłączenia aktywności genów [7].

Regulacja aktywności genów przez metylację i acetylację

Lizyna znajdująca się w pozycji 9 histonu trzeciego (H3K9) podobnie jak cytozyny w genomowym DNA mogą ulegać metylacji. Enzymy katalizujące reakcje przyłączania grupy CH_3 należą do metylotransferaz. Metylacje H3K9, jak również metylacja DNA, mają związek z utratą aktywności genów poprzez heterochromatynizację. Taki sposób wyciszania genów zachodzi np. w sytuacji wyłączania aktywności w zależności od etapu rozwojowego organizmu. W pierwszym etapie kluczową rolę odgrywa niekodujące dsRNA (dwuniciowe RNA) lub siRNA (small interfering RNA), później zachodzi aktywacja procesu deacetylacji histonów i metylacji lizyny 9 histonu 3. Główna metylotransferaza lizyny 9 histonu 3 – SU(VAR)3-9, współdziała z białkiem HP1 (Heterochromatin Protein1) [42]. Deacetylacja histonów i metylacja lizyny 9 histonu 3 indukuje metylację DNA. Metylowane cytozyny w pozycji C5 usytuowane w sąsiedztwie guanozyn tworzą dublety CpG. U kręgowców odcinki o długości 1–2 tys. par zasad z licznymi dubletami CpG nazywane są „wyspami CpG”. Wykryto białka, które rozpoznają i wiążą metylowane cytozyny: MBD lub meCP (methyl-CpG-binding protein). Dowiedziono, że białka te wchodzi w skład kompleksów deacetylaz histonów [7, 51]. Promotory genów metabolizmu podstawowego, których aktywność jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania organizmu oraz genów, których ekspresja jest specyficzna dla danego rodzaju komórki charakteryzują się de-metylacją wysp CpG.

W przypadku dziedziczenia profilu metylacji po rodzicach, mówimy o metylacji zachowawczej. Po

replikacji DNA reszty metylowe są przyłączane do cytydyny nowo syntetyzowanych nici potomnych, dokładnie w miejscach komplementarnych do obszarów metylacji nici rodzicielskich. Za proces ten odpowiada metylotransferaza DNA 1 (DNMT1), która katalizuje 97–99,9% procesu metylacji podczas mitozy. Za tworzenie nowego wzoru metylacji tzw. „metylacja *de novo*” odpowiadają metylotransferazy DNA 3a i 3b (DNMT3a i DNMT3b). Do rodziny wyżej wymienionych metylotransferaz należą jeszcze DNMT2 i DNMT3L, które nie wykazują właściwości katalitycznych. Rola pierwszej nie jest poznana, natomiast druga pełni funkcje pomocnicze w procesie metylacji *de novo* [7, 29, 31].

Za utrzymywanie wzoru ekspresji genów związanych z rozwojem komórek odpowiadają białka grupy Polycomb (białka PcG) oraz białka grupy Trithorax (TrxG). Obie grupy wykazują antagonizujące działanie, pierwsza powoduje wyciszenie genów, druga utrzymywanie ich aktywności. Wykazano, że niektóre komponenty kompleksów wchodzące w skład obu grup białek (PcG i TrxG) mają zdolność rozpoznawania specyficznych modyfikacji lizyny histonu trzeciego, inne zaś mają aktywność metylotransferazy H3K [50]. Białka PcG tworzą dwa kompleksy: PRC1 i PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 1 i 2*). Kompleks inicjujący wyciszenie genów PRC2, wykazuje aktywność deacetylazy histonów i metylotransferazy H3K27 natomiast PRC1 odpowiada za utrzymanie stanu wyciszenia. Białka PcG odgrywają kluczową rolę w tworzeniu i funkcjonowaniu domen biwalentnych (genów pozostających w gotowości do aktywacji) między innymi w ESC i NSC [29, 35]. W komórkach embrjonalnych, w których geny pluripotencjalności są aktywne, występuje metylacja lizyny 4 histonu 3 (H3K4me3 marker aktywności), podczas gdy geny rozwojowe np. w kierunku neuronalnym (*Ngns, Pax6, Sox1, Sox3, Nkx2.2 i Mash1*) [18, 33] mają zarówno markery epigenetyczne aktywności (H3K4me3) jak też markery represji (H3K27me3 – potrójna metylacja lizyny 27 histonu 3) (Ryc 6). Ten profil metylacji histonów zapobiega przedwczesnemu różnicowaniu komórek, ale zachowuje gotowość genów do ich aktywności. Neuralne komórki macierzyste wykazują biwalentny status chromatyny, stan gotowości („*Poised State*”) w obszarze genów związanych z różnicowaniem neuronalnym i glejowym [29]. Dodatkowo sugeruje się, że we wczesnym etapie rozwoju komórek NSC w fazie neurogennej wyspy CpG, znajdujące się

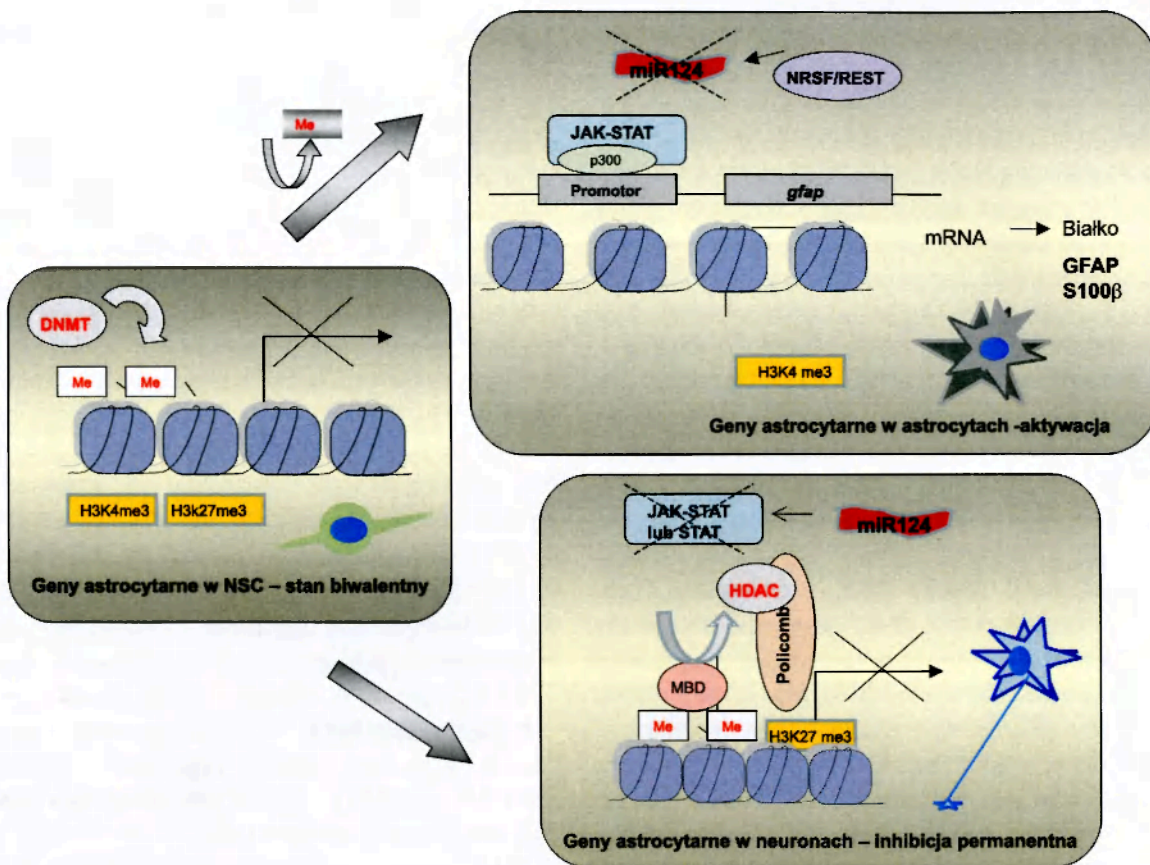
w promotorach genów astrocytarnych np. *gfap*, są hypermetylowane (Ryc. 5 i 6). Utrudnia to przyłączenie do nich kompleksu aktywującego różnicowanie astrocytarne (*STAT3-p300/CBP-SMADs*) i w rezultacie komórki nie wykazują zróżnicowania w kierunku astrocytów, nawet po stymulacji cytokinami. Podczas późniejszego etapu rozwoju komórek NSC, w fazie gliogennej, promotory genu *gfap* są słabo metylowane i dlatego stymulacja cytokinami np. LIF powoduje inicjację różnicowania w astrocyty [23, 48]. Białka PcG mają swój udział w przejściowym wyłączeniu kluczowych genów rozwojowych w komórkach embrjonalnych. W fazie gliogennej rozwoju komórek NSC białka PcG odpowiadają za permanentne wyłączenie genów związanych z różnicowaniem neuronalnym, podczas gdy w fazie neurogennej, proces metylacji DNA jest powiązany z przejściowym wyłączeniem genów związanych z różnicowaniem astrocytarnym [19].

Funkcjonalne RNA

Małe RNA (miRNA), jak też małe interferujące RNA (siRNA) pełnią istotne funkcje w mechanizmie regulacji ekspresji poszczególnych genów [7]. Okazało się, że miRNA może promować neurogenezę poprzez inhibicję szlaku STAT3, kluczowego w procesie różnicowania astrocytarnego (Ryc 6) [23, 26]. Inny mechanizm regulacji różnicowania neuronalnego i gliogenego zakłada występowanie NRSF/REST (*Neuron Restrictive Silencer Factor/Neuron-Restrictive Silencer Factor*), który działając hamująco na miR124a sprzyja ekspresji genów nie neuronalnych. Brak NRSF/REST sprzyja różnicowaniu neuronalnemu [11] (Ryc. 6).

Wpływ mikrośrodowiska *in vitro* na różnicowanie neuralnych komórek macierzystych – badania własne

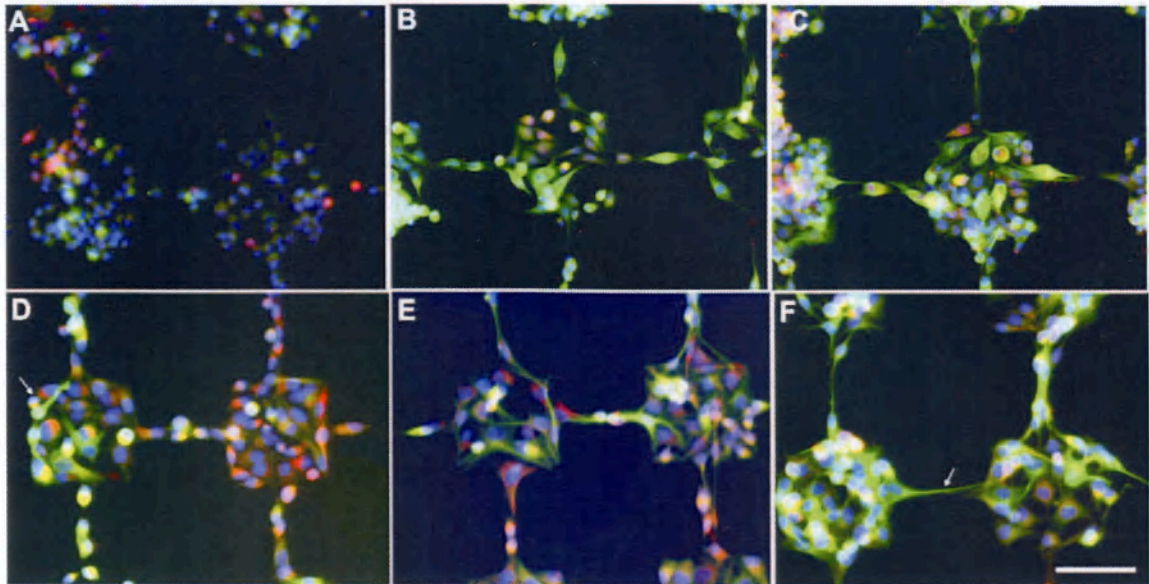
Jednym ze sposobów na odzwierciedlenie naturalnego mikrośrodowiska komórek macierzystych w warunkach laboratoryjnych jest zastosowanie domen biofunkcjonalnych. o cechach typowych dla naturalnej niszy komórek macierzystych (wykazujących właściwości biomimiczne). Struktura biomimiczna *in vitro* powinna zapewnić cały kontekst oddziaływań



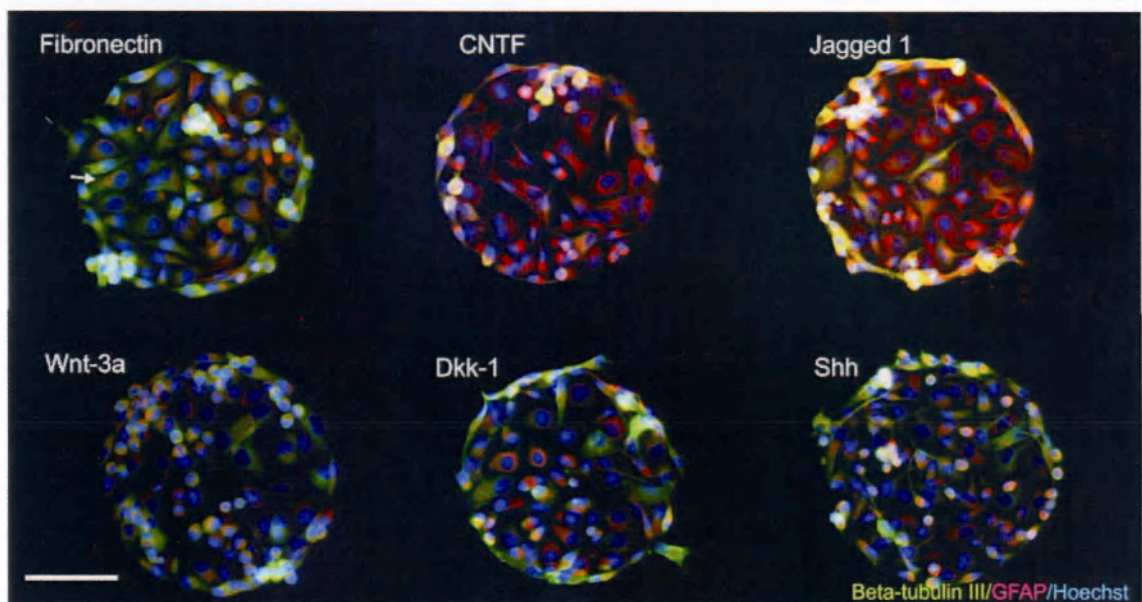
Ryc. 6. Status epigenetyczny genów różnicowania astrocytarnego podczas rozwoju neuralnych komórek macierzystych (NSC). Neuralne komórki macierzyste, podobnie jak ESC, w niektórych genach odznaczają się bivalentnym stanem chromatyny. Oznacza to, że posiadają potrójną metylację lizyny 4 histonu 3 (H3K4me3- znacznik aktywności genu), jak również potrójną metylację lizyny 27 histonu trzeciego (H3K27me3- znacznik braku aktywności genu). DNMT – metylo-transferaza DNA katalizuje proces przyłączania grup metylowych do cytozyny łańcucha DNA. Metylowane cytozyny są rozpoznawane przez białka posiadające domenę MBD (Metyl Binding Domains). W fazie neurogennej rozwoju NSC, hiper-metylacja promotorów genów astrocytarnych utrudnia przyłączenie kompleksu aktywującego JAK-STAT. NRSF/REST (Re1-silencing transcription factor) hamuje aktywność genu miR-124, natomiast miR-124 stymuluje neurogenezę poprzez inhibicję aktywności szlaku STAT. Kompleks Polycomb zawiera białka wykazujące aktywność metylotransferazy w stosunku do H3K27 oraz H1K27 (histon łącznikowy). Metylacja tego ostatniego może wpłynąć na przyłączanie białka HP1 związanego z heterochromatynizacją i wyłączeniem aktywności genów. Brak metylacji wysp CpG promotora genu *gfap* stwarza możliwość przyłączenia się do niego kompleksu STAT-p300. p300 poza funkcją ko-aktywatora transkrypcji wykazuje również aktywność enzymatyczną HAT(acetylotransferaza histonów). Acetylacja histonów wpływa na zmniejszenie powinowactwa DNA do białka, sprzyja rozluźnieniu chromatyny i w konsekwencji ekspresji genów

komórek z mikrośrodowiskiem m.in. kontakty międzykomórkowe i z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), jak również stymulację rozpuszczalnymi cząsteczkami sygnałowymi. W naszych badaniach domeny biofunkcjonalne, otrzymane zostały metodami nano/bioinżynierii polegającymi na zastosowaniu miękkiej litografii i drukowania mikrokontaktowego bądź automatycznego systemu dozującego mikrokrople (*piezoelectric non contact robotic spotting*). Charakteryzują się określoną geometrią i składem biomateriałowym, co stanowi

matrycę do immobilizacji neuralnych komórek macierzystych i ich kierunkowego różnicowania. Wykazano, iż kształt i wielkość domen może mieć wpływ na decyzje podejmowane przez komórki macierzyste. Hodowla neuralnych komórek macierzystych pochodzących z ludzkiej krwi pępowinowej (HUCB-NSC) [8] na matrycach, zawierających domeny, które pozycjonują pojedyncze komórki (małe kwadraty o boku 10 μm), powstrzymują te zapobiega różnicowaniu neuronalnemu, zaś cienkie linie o szerokości 10 μm promują ekspresję białek



Ryc. 7. Różnicowanie neuralnych komórek macierzystych HUCB-NSC na domenach biofunkcyjnych o zmiennej geometrii. Warunki hodowli oraz geometria domen biofunkcyjnych wpływają na różnicowanie komórek linii HUCB-NSC. Immunolokalizacja markera neuronalnego (β -tubuliny III, kolor zielony) i astrocytarnego (GFAP, kolor czerwony) w komórkach linii HUCB-NSC hodowanych na kwadratowych domenach z liniami łączącymi, mikrodrukowanymi poli-L-lizyną (**A-C**) i fibronektyną (**D-F**) w pożywce zawierającej 2% surowicy (**A i D**), surowicę z dodatkiem czynnika różnicującego dBcAMP (**B i E**) oraz w pożywce bezsurowicznej z dodatkiem dBcAMP (**C i F**). Strzałka obrazuje kierunkowanie wypustki neuronalnej w linii łączącej poszczególne domeny (**F**). Reprodukowano z Buzanska i wsp. [9], za zgodą Elsevier Ireland Ltd.



Ryc. 8. Wybór drogi rozwojowej neuralnych komórek macierzystych HUCB-NSC pod wpływem stymulacji białkami sygnalizacyjnymi. Komórki HUCB-NSC hodowano na domenach biofunkcyjnych, otrzymanych metodą dozowania mikrodropli. Domeny zawierają białko macierzy zewnątrzkomórkowej – FIBRONEKTYNĘ (białko referencyjne), oraz mieszaninę fibronektyny z określonymi białkami sygnalizacyjnymi: WNT3a, SHH, CNTF, JAGGED, DKK-1. Komórki pod wpływem WNT3a pozostają w większości niezróżnicowane, w obecności CNTF, JAGGED różnicują się w kierunku astrocytarnym, natomiast pod wpływem DKK-1 czy SHH w kierunku neuronalnym. Reprodukowano z Buzanska i wsp. [9], za zgodą Elsevier Ireland Ltd.

typowych dla neuronów (Zychowicz i inni, manuskrypt). Zastosowanie różnego składu domen biofunkcjonalnych wpływa na stopień zróżnicowania komórek. Poli-L-lizyna, użyta w procesie mikrodrukowania domen, oddziałująca niespecyficycznie z błoną komórkową na zasadzie sił elektrostatycznych, utrzymuje komórki w stanie niezróżnicowanym, proliferującym, natomiast białko macierzy zewnątrzkomórkowej – fibronektyna, poprzez specyficzne połączenia z receptorami integrynowymi, umożliwia silniejszą adhezję oraz ułatwia komórkom osiągnięcie neuronalnego fenotypu [10]. Dodatkowo geometria tych domen (np. linie łączące) wpływają na ukierunkowanie wzrostu aksonów i promują fenotyp neuronalny (Ryc. 7) [9]. W celu zbadania mechanizmów molekularnych leżących u podstaw podejmowania decyzji rozwojowych przez NSC, przeprowadzono aktywację określonych dróg przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego. Otrzymano i zastosowano wieloskładnikowe (mikronakropłone) domeny, zawierające oprócz białka adhezyjnego – fibronektyny, również cząsteczki sygnalizacyjne, takie, jak utrzymujące w stanie niezróżnicowania białko WNT, promujące różnicowanie astrocytarne białka CNTF, JAGGED i NOTCH, czy też wpływające pozytywnie na neurogenezę białko SHH i DKK1. Rycina 8 przedstawia wpływ określonych białek sygnalizacyjnych na specyfikację losu neuralnego HUCB-NSC [9]. Badanie wpływu mikrośrodowiska na decyzje rozwojowe komórek macierzystych jest istotnym elementem poznania mechanizmów leżących u podstaw podejmowania decyzji rozwojowych przez komórki macierzyste, a także umożliwia zastosowanie uzyskanej wiedzy w terapeutycznym wykorzystaniu tych komórek.

Podsumowanie

Regulacja potencjału do różnicowania komórek jest oparta na dwóch modelach wyciszania genów rozwojowych w określonym obszarze chromatyny: przejściowe wyciszenie (stan biwalentny) oraz wyciszenie długoterminowe lub permanentne. Stan biwalentny genów rozwojowych zapobiega przedwczesnemu różnicowaniu, ale jednocześnie umożliwia różnicowanie w tym samym kierunku w odpowiednim stadium rozwojowym, jest więc głównym regulatorem podejmowania decyzji rozwojowych przez komórki macierzyste. Permanentne wyciszenie genów

związane jest z nieodwracalnym zahamowaniem wcześniejszych lub alternatywnych dróg rozwojowych (np. geny pluripotencjalne w progenitorach neuralnych lub geny różnicowania neuronalnego w astrocytach). U podstaw wspomnianych powyżej dwóch modeli wyciszania genów rozwojowych leżą podobne mechanizmy molekularne, np. białka z grupy polycomb (PcG) w ESC są zaangażowane w przejściową represję głównych genów rozwojowych, natomiast ten sam kompleks PcG w NSC w fazie gliogennej powoduje permanentną inhibicję genów neuronalnych (Ryc. 6). Nie są jasne do końca mechanizmy decydujące o wyborze określonego modelu represji epigenetycznej w rozwoju komórek macierzystych. Jedną z hipotez zakłada, że w przypadku permanentnej represji przez PcG decydującą rolę może odgrywać „rozprzestrzenianie się” hypermetylacji lizyny 27 histonu H3 (H3K27me3) na sąsiednie nukleosomy, inne z kolei zakładają dodatkowy udział wyciszających mechanizmów, takich jak metylacja DNA oraz metylacja H3K9 [19]. Podejmowanie decyzji rozwojowych przez NSC jest związane z indukcją transkrypcji genów odpowiedzialnych za różnicowanie neuronalne lub glejowe w określonych fazach rozwoju i zależy od całego kontekstu współdziałania licznych dróg przekazywania sygnału wewnątrz komórki, aktywowanych czynnikami zewnętrznymi. Skoordynowana w czasie i miejscu dostępność czynników transkrypcyjnych i odpowiednia konfiguracja przestrzenna chromatyny determinowana modyfikacjami postranslacyjnymi decyduje o podjęciu decyzji rozwojowej przez NSC.

Wiadomo również, że w określonych warunkach geny rozwojowe wyciszone „permanentnie”, mogą podlegać aktywacji. Przykładem tego może być otrzymywanie indukowanych komórek pluripotencjalnych w warunkach *in vitro* [34], lub *in vivo* indukcja neurogenезy z dojrzałych astrocytów [4]. Badania nad mechanizmami leżącymi u podstaw tych procesów i ich kontrola są wyzwaniem współczesnej medycyny regeneracyjnej.

Piśmiennictwo:

1. Ables JL, Breunig JJ, Eisch AJ, Rakic P: Not(ch) just development: Notch signalling in the adult brain. *Nat Rev Neurosci*, 2011, 12, 269–283.
2. Allison LA: Podstawy biologii molekularnej. Wydawnictwa Uniwersytetu Warszawskiego, 2009, 393–413.

3. Altman J, Das GD: Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*, 1965, 124, 319–335.
4. Berninger B: Making neurons from mature glia: a far-fetched dream? *Neuropharmacology*, 2010, 58, 894–902.
5. Bhattacharya S, Das AV, Mallya KB, Ahmad I: Ciliary Neurotrophic Factor-Mediated Signaling Regulates Neuronal Versus Glial Differentiation of Retinal Stem Cells/Progenitors by Concentration Dependent Recruitment of Mitogen-Activated Protein Kinase and Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription Pathways in Conjunction with Notch Signaling. *Stem Cells*, 2008, 26, 2611–2624.
6. Brid A: Preceptions of epigenetics. *Nature*, 2007, 447, 396–398.
7. Brown TA: Genomy. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2009, 271–289.
8. Buzanska L, Jurga M, Stachowiak EK, Stachowiak MK, Domanska-Janik K: Neural stem-like cell line derived from a nonhematopoietic population of human umbilical cord blood. *Stem Cells Dev*, 2006, 15, 391–406.
9. Buzanska L, Zychowicz M, Ruiz A, Ceriotti L, Coecke S, Rauscher H, Sobanski T i wsp.: Neural stem cells from human cord blood on bioengineered surfaces-novel approach to multiparameter bio-tests. *Toxicology*, 2010, 270, 35–42.
10. Buzanska L, Ruiz A, Zychowicz M, Rauscher H, Ceriotti L, Rossi F, Colpo P i wsp.: Patterned growth and differentiation of Human Cord Blood-derived Neural Stem Cells on bio-functionalized surfaces. *Acta Neurobiol Exp*, 2009, 69, 1–14.
11. Conaco C, Otto S, Han JJ, Mandel G: Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *PNAS*, 2006, 103, 72422–72427.
12. Dang L, Tropepe V: Neural induction and neural stem cell development. *Regen Med*, 2006, 1, 635–652.
13. Dmitrzak-Węglarz M, Hauser J: Mechanizmy epigenetyczne w chorobach psychicznych i zaburzeniach funkcji poznawczych. *Psychiatria*, 2009, 6, 2, 51–60.
14. Epstain RJ: Biologia molekularna człowieka. Wydawnictwo Czelej Sp. zoo. Eds. Lewinski A, Liberski PP, Lublin, 2005.
15. Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH: Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, 1998, 4, 1313–1317.
16. Ernst M, Jenkins BJ: Acquiring signalling specificity from the cytokine receptor gp130. *Trends Genet*, 2004, 20, 23–32.
17. Gage FH: Mammalian neural stem cells. *Science*, 2000, 287, 1433–1438.
18. He F, Ge W, Martinowich K, Becker-Catania S, Coskun V, Zhu W, Wu H i wsp.: A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astroglialogenesis. *Nature Neuroscience*, 2005, 8, 616–625.
19. Hirabayashi Y, Gotoh Y: Epigenetic control of neural precursor cell fate during development. *Neuroscience*, 2010, 11, 377–387.
20. Hochedlinger K, Plath K: Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development*, 2009, 136, 509–523.
21. Hsieh J, Gage FH: Epigenetic control of neural stem cell fate. *Curr Opin Genet Dev*, 2004, 14, 5, 461–469.
22. Hubner R, Schmole AC, Liedmann A, Frech MJ, Rolfs A, Luo J: Differentiation of human neural progenitor cells regulated by Wnt-3a. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 400, 358–362.
23. Juliandi B, Abematsu M, Nakashima K: Epigenetic regulation in neural stem cell differentiation. *Develop Growth Differ*, 2010, 52, 493–504.
24. Kadesch T: Notch signaling: the demise of elegant simplicity. *Curr Opin Genet Dev*, 2004, 14, 506–512.
25. Kang MK, Kang SK: Interleukin-6 induces proliferation in adult spinal cord-derived neural progenitors via the JAK2/STAT3 pathway with EGF-induced MAPK phosphorylation. *Cell Prolif*, 2008, 41, 377–392.
26. Krichevsky AM, Sonntag KC, Isacson O, Kosik KS: Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem Cells*, 2006, 24, 857–864.
27. Kriegstein A, Alvarez-Buylla A: The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu. Rev. Neurosci*. 2009, 32, 149–184.
28. Levenson JM, Sweatt JD: Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat Rev Neurosci*, 2005, 6, 2, 108–118.
29. Li X, Zhao X: Epigenetic regulation of mammalian stem cells. *Stem cells and development*, 2008, 17, 1043–1052.
30. Lim AK, Knowles BB, Kai T, Messerschmitt DM: Inherent nuclear reprogramming in mammalian embryos. *Nuclear Reprogramming and Stem Cells*, 2011, 7–21.
31. Łukasik M, Karmalska J, Szutkowski M, Łukaszkiwicz J: Wpływ metylacji DNA na funkcjonowanie genomu. *Biul Wyzd Farm WUM*, 2009, 13–18.
32. McQuown S, Wood MA: Epigenetic regulation in substance use disorders. *Curr Psychiatry Rep*, 2010, 12, 145–153.
33. Meaney MJ, Ferguson-Smith AC: Epigenetic regulation of the neural transcriptome: the meaning of the marks. *Nat Neurosci*, 2010, 13, 1313–1318.
34. Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P i wsp.: Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*, 2007, 448, 553–560.
35. Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, Ku M, Wernig M, Schorderet P, Bernstein BE i wsp.: Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature*. 2008, 454, 49–55.
36. Miller FD, Gauthier AS: Timing Is Everything: Making Neurons versus Glia in the Developing Cortex. *Neuron*, 2007, 54, 357–369.
37. Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A: Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell*. 2008, 3, 265–278.
38. Moody SA, Je HS: Neural induction, neural fate stabilization, and neural stem cells. *Scientific World Journal*. 2002, 28, 2, 147–166.
39. Muoyama Y, Kondoh H, Takada S: Wnt proteins promote neuronal differentiation in neural stem cell culture. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313, 915–921.
40. Nagao M, Sugimori M, Nakafuku M: Cross talk between notch and growth factor/cytokine signaling pathways in neural stem cells. *Mol Cell Biol*, 2007, 27, 3982–3994.
41. Nguyen N, Lee SB, Lee YS, Lee KH, Ahn JY: Neuroprotection by NGF and BDNF against neurotoxin-exerted apoptotic death in neural stem cells are mediated

- through Trk receptors, activating PI3-kinase and MAPK pathways. *Neurochem Res*, 2009, 34, 942–951
42. Olszewska MJ: Heterochromatyna i „heterochromatynizacja”. *Postępy Biologii Komórki*, 2007, 34, 2, 391–407.
43. Olszewska MJ: Nukleosomy i regulacja aktywności chromatyny. *Postępy Biologii Komórki*, 2010, 37, 3, 657–670.
44. Sabo JK, Kilpatrick TJ, Cate HS: Effects of bone morphogenic proteins on neural precursor cells and regulation during central nervous system injury. *Neurosignals*, 2009, 17, 255–264.
45. Sanes DH, Reh TA, Harris WA: Neural Induction. In: *Development of the Nervous System*. Elsevier Academic Press, 2006, 1–28.
46. Shen Q, Wang Y, Kokovay E, Lin G, Chuang SM, Goderic SK, Roysam B, Temple S: Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell*, 2008, 11, 3, 289–300.
47. Szutorisz H, Dillon N: The epigenetic basis for embryonic stem cell pluripotency. *BioEssays*, 2005, 27, 1286–1293.
48. Takizawa T, Nakashima K, Namihira M, Ochiai W, Uemura A, Yanagisawa M, Fujita N, Nakao M, Taga T: DNA Methylation Is a Critical Cell-Intrinsic Determinant of Astrocyte Differentiation in the Fetal Brain. *Developmental Cell*, 2001, 1, 749–758.
49. van der Heijden GW, van der Berg IM, Baart EB, Derijck AAHA, Martini E, de Boer P: Parental origin of chromatin in human mononuclear zygotes revealed by asymmetric histone methylation patterns, differs between IVF and ICSI. *Mol Reprod Dev*, 2009, 76, 101–108.
50. Wawszczyk J, Pałyga J: Rola białek Polycomb i trithorax w rozwoju nowotworów. *Studia Medyczne*, 2008, 10, 59–66.
51. Węgleński P: *Genetyka molekularna*. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008, 159, 233–253.
52. Wu SM, Choo AB, Yap MG, Chan KK: Role of Sonic hedgehog signaling and the expression of its components in human embryonic stem cells. *Stem Cell Res*, 2010, 4, 38–49.
53. Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A: BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, 2003, 115, 281–292.
54. Zhou ZD, Kumari U, Xiao ZC, Tan EK: Notch as a molecular switch in neural stem cells. *IUBMB Life*, 2010, 62, 618–623.