

Streszczenie

Przez długi czas uważano, że w siatkówce oka, jedynymi fotoreceptorami zdolnymi do odbioru bodźca świetlnego są pręciki i czopki. Pogląd ten został zmieniony pod koniec XX wieku, dzięki badaniom nad rytmem okołodobowym. Zarówno u myszy pozbawionych pręcików i czopków jak również u ludzi niewidomych wykazano zdolność do regulacji cyklu dzień/noc, dowodząc tym samym istnienia nowego rodzaju fotoreceptora, który może być również aktywowany światłem. Komórkami w obrębie siatkówki, posiadającymi taką właśnie zdolność okazały się być światłoczułe komórki zwojowe, niewielka subpopulacja komórek zwojowych zawierających fotoreceptor - melanopsynę. Wykazano, iż melanopsyna ma kluczowe znaczenie dla wielu neurofizjologicznych funkcji, takich jak rytm okołodobowy, odruch źreniczny, sen czy nawet nastrój.

Jednak z powodu trudności z izolacją tego białka i brakiem struktury krystalograficznej badania nad tym fotopigmentem ciągle pozostają wyzwaniem a mechanizm zależnego od melanopsyny szlaku transdukcji sygnału jest nadal słabo poznany. Wiadomo, że światło niebieskie aktywuje melanopsynę, powodując izomeryzację 11-*cis*-retinalu do all-*trans*-retinalu, która z kolei prowadzi do aktywacji białka G oraz fosfolipazy C (PLC), skutkującą wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. W niniejszej rozprawie doktorskiej, skupiono się na potwierdzeniu roli fosfolipazy C oraz wykazaniu, która izoforma tego białka jest niezbędna w szlaku sygnałowym. W tym celu użyto modelu komórkowego HEK293 z stabilną ekspresją melanopsyny. Naświetlając komórki światłem niebieskim wykazano, iż tylko PLC β 1 oraz PLC β 4 mogą brać udział w fototransdukcji sygnału. W celu weryfikacji, która izoforma jest wiodąca, użyto dwóch różnych metod. Pierwsza polegała na użyciu inhibitora fosfolipazy C-U73122 oraz inhibitora białka G-BIM46187, druga natomiast na wyciszeniu ekspresji genów przy wykorzystaniu siRNA PLC β 1 oraz PLC β 4. Wykorzystując techniki RT-PCR, Western Blot oraz pomiary wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia, wykazano że tylko PLC β 4 może uczestniczyć w szlaku aktywacji melanopsyny. Co ciekawe wzrost stężenia diacylogliceroli (DAG) pod wpływem naświetlania zaobserwowano jedynie dla komórek HEK293 ze stabilną ekspresją melanopsyny inkubowanych z 11-*cis*-retinalem. Wykazano również, że jego poziom DAG może być zależny od czasu naświetlania światłem niebieskim. Co więcej użycie inhibitora PLC U73122 oraz wyciszenie genu PLC β 4 spowodowało zahamowanie odpowiedzi od DAG. Biorąc pod uwagę, że aktywacja PLC prowadzi do hydrolizy substratu generując dwa produkty: diacyloglicerol oraz trifosforam

inozytolu, wynik ten wskazuje na potencjalną rolę diacylogliceroli jako przekaźników drugiego rzędu w szlaku sygnałowym melanopsyny.

Stosunkowo słabo poznaną częścią szlaku sygnałowego melanopsyny jest postulowany udział kinaz białkowych, w tym m.in. kinazy białkowej C (PKC), która może być aktywowana przez zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia diacylogliceroli oraz jonów wapnia. Wyniki niniejszej pracy pokazały, że spośród całej rodziny kinaz białkowych C, pod wpływem naświetlania światłem niebieskim, jedynie PKC α oraz PKC ζ wykazują wzrost poziomu mRNA oraz białka. Użycie inhibitorów dla PKC - Gö6976 oraz wyciszenia genów PKC α i PKC ζ pozwoliło zweryfikować, że jedynie izoforma PKC ζ bierze udział w szlaku aktywacji melanopsyny.

Istotne w niniejszej pracy było również zbadanie zakresu spektralnego aktywności ludzkiej melanopsyny na modelu komórkowym *in vitro*. W związku z tym, że proces izolacji tego białka jest trudny i charakteryzuje się bardzo niską wydajnością, stąd analiza widma aktywności przeprowadzana jest na układach modelowych. Poprzez naświetlanie światłem w różnym zakresie długości fali (365 nm, 405 nm, 425 nm, 445 nm, 485 nm oraz 530 nm) analizowano przeżywalność oraz wybrane parametry molekularne komórek HEK293 z stabilną ekspresją ludzkiej melanopsyny. Przy naświetlaniu promieniowaniem o długości fali 425, 445 oraz 485 nm, można zaobserwować wzrost poziomu mRNA oraz białka PLC β 4, PKC ζ oraz FOS (stosowanego jako marker aktywności melanopsyny). Dodatkowo, zaobserwowany został wzrost poziomu diacylogliceroli przy ekspozycji na wyższe długości fali. Wyniki badań wskazują maksimum aktywności melanopsyny przy długości fali 485 nm. Niemniej jednak, efekt ten szybko zanika przy większych długościach fali, ponieważ przy 530 nm nie zaobserwowano w ogóle odpowiedzi od badanych białek oraz diacylogliceroli.

Najsilniejszym naturalnym źródłem niebieskiego światła jest promieniowanie słoneczne, coraz częściej jednak, ludzkie oczy narażone są na działanie sztucznego źródła światła niebieskiego, w tym pochodzącego z urządzeń elektronicznych, takich jak telefony komórkowe czy ekrany komputerów jak również świetlówki i diody LED. Długotrwała ekspozycja na intensywne światło niebieskie może zaburzać rytm dobowy, sen, nastrój, a nawet prowadzić do uszkodzenia siatkówki. Dlatego też celem rozprawy doktorskiej było również zbadanie wpływu długotrwałego naświetlania komórek (6 - 24 godziny) światłem niebieskim na szlak sygnałowy melanopsyny, w szczególności na ich przeżywalność a także aktywność białek uczestniczących w procesach transdukcji sygnału. W wyniku tych badań wykazano, iż

wraz ze wzrostem czasu naświetlania, następował spadek przeżywalności komórek zawierających melanopsynę, co wykazano przy użyciu testu przeżywalności MTT, barwienia jodkiem propidyny oraz cytometrii przepływowej. Dodatkowo, wraz z czasem naświetlania, następował spadek poziomu mRNA jak i białka dla PLC β 4, PKC ζ , FOS oraz obserwowano obniżenie poziomu diacylogliceroli. Dane te sugerują, iż długotrwałe naświetlanie światłem niebieskim może prowadzić do zmniejszenia aktywności szlaku melanopsyny, a co za tym idzie, do zaburzenia podstawowych funkcji tego białka.

W rozprawie doktorskiej zbadano udział fosfolipazy C oraz kinazy białkowej C wyszczególniając, która izoforma jest niezbędna w szlaku sygnałowym melanopsyny. Po raz pierwszy wykazano, iż pod wpływem światła niebieskiego, następuje wzrost poziomu diacylogliceroli w komórkach HEK293 z stabilną ekspresją ludzkiej melanopsyny. Zbadano również fotoaktywność melanopsyny, sugerując wzrost aktywności od 425 nm do uzyskania maksimum przy długości fali 485 nm. Badając efekt długotrwałego naświetlania światłem niebieskim, wykazano spadek przeżywalności komórek z nadekpresją melanopsyny oraz zaburzenie szlaku sygnałowego tego białka. Warty zauważenia jest, iż od roku 2002, zidentyfikowano sześć podtypów światłoczułych komórek zwojowych, jednak większość badań dotyczy typu M1, powodując trudności związane z badaniem między innymi szlaku transdukcji sygnału. Analizowane były także różne modele komórkowe, w których bada się procesy związane z udziałem melanopsyny, nie dały jednak one jednoznacznych wyników. Brak struktury krystalograficznej, związany z trudnością izolacji melanopsyny, wciąż utrudnia badania tego białka. Wyniki uzyskane w rozprawie doktorskiej, dodają nowych informacji w badaniach nad melanopsyną, niemniej jednak wciąż są niewiadome, wymagające dodatkowych eksploracji tego białka.

Heleny Jura

OUU