

## STRESZCZENIE

Obwodowy układ nerwowy (OUN) wywodzi się z komórek grzebienia nerwowego, które występują jedynie u kręgowców. Tworzenie OUN jest inicjowane już na wczesnym etapie rozwoju zarodkowego, gdy tworzy się grzebień nerwowy, od którego komórki następnie oddzielają się i migrują w obrębie rozwijającego się organizmu. Formowanie OUN jest wieloetapowym i złożonym procesem zależnym od wielu mechanizmów na poziomie komórkowym i molekularnym. Należą do nich działanie czynników transkrypcyjnych, kaskady ekspresji genów, funkcjonowanie białek komórkowych czy oddziaływanie komórek ze środowiskiem pozakomórkowym. W okresie formowania OUN dochodzi m.in. do intensywnej migracji komórek grzebienia nerwowego, tworzenia się zwojów rdzeniowych, wydłużania aksonów przez neurony czuciowe, unerwienia miejsc docelowych, a także migracji i różnicowania się prekursorów komórek glejowych, które są również źródłem melanocytów. We wszystkich tych procesach istotną rolę pełnią adhezja oraz migracja komórki, czyli procesy zależne od oddziaływania komórki ze środowiskiem pozakomórkowym. Oddziaływania te aktywują wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałne oraz wpływają na reorganizację struktur komórkowych związanych z cytoszkieletem aktynowym.

Funkcjonowanie struktur związanych z cytoszkieletem aktynowym, ale również ogólnie procesy migracji i adhezji, są zależne od wielu białek. Czynnikiem pozakomórkowym, który ma kluczowe znaczenie dla tych procesów jest laminina. Natomiast do białek komórkowych, związanych z tymi procesami oraz pozwalającymi komórce reagować na obecność lamininy w przestrzeni pozakomórkowej, należą m.in. żelsolina (GSN), nieintegrynowy receptor lamininy (LamR) oraz kinaza zależna od integryn (ILK). Badania, prowadzone przez naszą Grupę, pokazały, że żelsolina tworzy kompleksy z białkiem ILK oraz LamR w komórkach ludzkiego czerniaka skóry, czyli stransformowanych nowotworowo melanocytach. W związku z tym w niniejszej pracy doktorskiej postanowiono zbadać, jaką rolę pełnią te białka w kształtowaniu OUN podczas rozwoju zarodkowego kury, skoro są one ważne dla biologii czerniaka, a melanocyty powstają m.in. z komórek rozwijającego się OUN. Wybór modelu badawczego podyktowany był faktem, że powstawanie OUN oraz melanocytów u kury jest zbliżone do genezy ww. układu i komórek u człowieka.

W pierwszym etapie badań określono wzór oraz poziom ekspresji *RPSA* oraz *ILK* podczas rozwoju zarodkowego kury. Dla *GSN* zostało to już wcześniej zbadane przez naszą Grupę. Wykazano, że zarówno *ILK*, jak również *RPSA* wykazują ekspresję już na wczesnym etapie embriogenezy kury. Dodatkowo analiza wzoru ekspresji badanych genów wskazuje na

ich ekspresję na wysokim poziomie w tkankach i narządach związanych z formowaniem OUN oraz melanocytów.

Następnie określono wpływ wyciszenia ekspresji genów *RPSA*, *GSN* oraz *ILK* na komórki tułowiowego grzebienia nerwowego *in ovo*, analizując procesy delaminacji oraz migracji tych komórek, a także rozmieszczenie i rozwój ich pochodnych. Wykazano, że wyciszenie ekspresji genu *RPSA* powoduje defekt w delaminacji komórek grzebienia nerwowego, a wyciszenie ekspresji genu *GSN* w zasiedlaniu specyficznych miejsc dla ich migracji. Jednak wyciszenie żadnego z genów nie skutkowało zaburzeniem rozwoju pochodnych komórek grzebienia nerwowego.

Zbadano również lokalizację białek LamR, GSN i ILK w komórkach grzebienia nerwowego oraz na ich powierzchni, jak również ich wpływ na zależną od lamininy-1 i wybranych peptydów delaminację i migrację komórek grzebienia nerwowego. W tym celu zaburzono funkcjonowanie badanych białek za pomocą specyficznych dla nich przeciwciał. Dane potwierdziły obecność wszystkich trzech białek w komórkach grzebienia nerwowego. Jednak tylko żelsolina nie była obecna na zewnętrznej stronie błony komórkowej tych komórek i nie wpływała na ich migrację. Natomiast białka LamR oraz ILK okazały się być znaczące dla tych procesów. Co ciekawe, zaobserwowano, że komórki grzebienia nerwowego wydzielają białko GSN do medium. Mimo że wszystkie trzy białka wpływały na zdolność tych komórek do formowania ognisk adhezyjnych, to tylko białka GSN i LamR miały znaczenie w formowaniu filopodiów, czyli struktur zaangażowanych w migrację i adhezję.

W dalszej kolejności zbadano lokalizację oraz rolę badanych białek w funkcjonowaniu kształtujących się zwojów rdzeniowych, skupiając się na parametrach określających zdolność neurytów do wydłużania się oraz prekursorów komórek Schwanna do migracji. W tym celu zaburzono funkcjonowanie badanych białek za pomocą specyficznych dla nich przeciwciał. Zaobserwowano różną lokalizację badanych białek w neuronach czuciowych oraz komórkach glejowych. Dodatkowo żelsolina jako jedyne białko była obecna w medium z hodowli DRG. Wykazano, że białka LamR, ILK i GSN pełnią rolę w wydłużaniu neurytów, ich orientacji oraz w migracji komórek glejowych. Biorą one również udział w reorganizacji filamentarnej aktyny w stożkach wzrostu - strukturach ważnych dla ruchu i nawigacji neurytów.

**Podsumowując, białka GSN, LamR oraz ILK są zaangażowane w różnym stopniu w zależny od lamininy-1 rozwój OUN podczas embriogenezy kury. Rola tych białek w ww. procesach nie została do tej pory zbadana dla zarodka kurzego, zatem przedstawione wyniki w ramach rozprawy doktorskiej wnoszą nową wiedzę do biologii rozwoju kury w odniesieniu do właściwości biologicznych badanych białek.**