

DOROTA NOWICKA

*Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego
Pasteura 3, 02-093 Warszawa
E-mail: d.nowicka@nencki.gov.pl*

KWAS HIALURONOWY W MACIERZY ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ MÓZGU*

WSTĘP

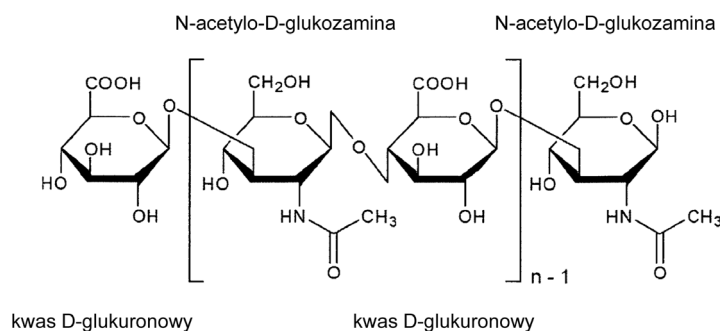
Kwas hialuronowy (ang. hyaluronic acid, HA) jest długołańcuchowym, nierozgałęzionym polisacharydem, należącym do rodziny glikozaminoglikanów, cząsteczek zbudowanych z naprzemiennie ułożonych cząsteczek kwasu uronowego i aminocukru, połączonych wiązaniami β -glikozydowymi. Jest substancją występującą powszechnie w macierzy zewnątrzkomórkowej praktycznie wszystkich

tkanek i organów kręgowców. Największe ilości HA w organizmie człowieka znajdują się w skórze, oprócz tego w tkance chrzęstnej, galarecie Whartona (substancja wypełniająca sznur pępowinowy), ciele szklistym oka oraz w mózgu. Szacuje się, że ciało dorosłego człowieka o masie ok. 70 kg zawiera 15 g kwasu hialuronowego (CSOKA i STERN 2013).

STRUKTURA KWASU HIALURONOWEGO

Kwas hialuronowy jest polimerem jednostek disacharydowych, z których każda złożona jest z kwasu glukuronowego (GlcUA) i N-acetyloglukozaminy (GlcNAc), połączonych między sobą wiązaniami $\beta(1\rightarrow3)$ i $\beta(1\rightarrow4)$ glikozydowymi (Ryc. 1). Długość łańcucha HA nie jest ściśle zdefiniowana. Substancja

ta może przybierać formę cząsteczek o różnej długości, od kilku reszt cukrowych (tetramery i heksamery), do długich łańcuchów zawierających 2×10^3 – 10^5 reszt cukrowych, co odpowiada masie 4×10^2 – 2×10^4 kDa (CSOKA i STERN, 2013). Cząsteczki HA należą do najdłuższych w przyrodzie. Łańcuch HA, zło-



Ryc. 1. Wzór chemiczny kwasu hialuronowego.

*Praca finansowana z grantu NCN 2012/05/B/NZ3/00851.

żony z 10^4 reszt cukrowych, po rozciągnięciu będzie miał długość 10 μm , równą średnicy ludzkiego erythrocytu. Ponieważ HA ma charakter polianionu, ma silne właściwości wiązania cząsteczek wody i jest substancją odpowiedzialną za prawidłowe uwodnienie tkanek. Długie łańcuchy otoczone płaszczem hydratacyjnym zajmują dużą objętość w roztworze, ograniczając dostęp innym makrocząsteczkom, w tym również innym cząsteczkom kwasu hialuronowego. Co ciekawe,

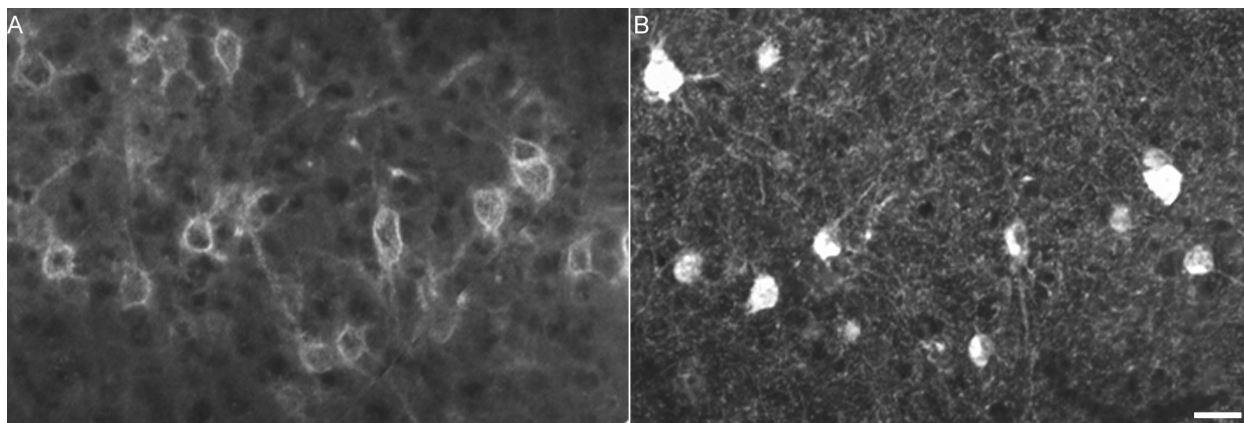
mimo wielu lat badań (kwas hialuronowy wyizolowany został z oka krowy w 1934 r.), ciągle toczy się spór dotyczący przestrzennej struktury kwasu hialuronowego w roztworach o fizjologicznym stężeniu HA czy w tkance. Obecnie uważa się, że cząsteczki HA przyjmują formę helisy o różnej liczbie osi symetrii (YAFFE i współaut. 2010), chociaż niektórzy badacze sugerują istnienie również struktury trzeciorzędowej w postaci β -kartki (SCOTT i HEATLEY 2002).

LOKALIZACJA HA W TKANCE NERWOWEJ

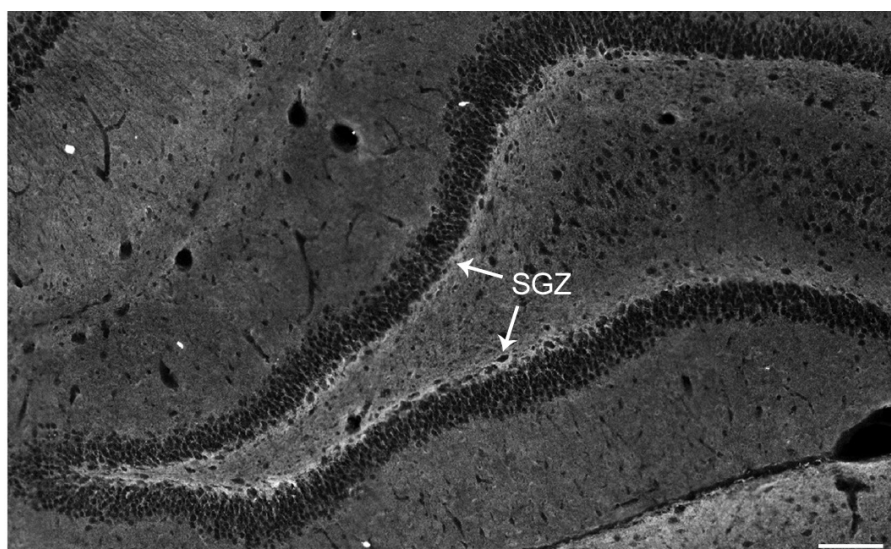
W mózgu kwas hialuronowy jest, obok proteoglikanów chondroitynosiarczanowych, głównym składnikiem macierzy zewnątrzkomórkowej. Zawartość HA w mózgu zmienia się z wiekiem: w mózgu szczura najwyższą wartość osiąga siódmego dnia życia, po czym gwałtownie spada, w ciągu trzech dni o połowę, osiągając wartości charakterystyczne dla dorosłego mózgu (czyli zaledwie 28% wartości maksymalnej) w 18 dniu życia. Co ciekawe, wykazano, że w mózgu naczelnych zawartość HA ponownie rośnie podczas starzenia (CARGILL i współaut. 2012). Występuje powszechnie w neuropilu w formie nieupostaciowanej, ale obecny jest także w siatkowatych strukturach okrywających niektóre neurony. Struktury te, tzw. sieci perineuronalne, mają postać siatki o heksagonalnych oczkach i utworzone są z długich nici HA, do których za pomocą białek łączących (ang. link proteins) przyłączone są cząsteczki proteoglikanów chondroitynosiarczanowych: agrekanu, brewikanu, neurokanu, wersikanu i fosfakanu (FRISHK-

NECHT i GUNDELFINGER, 2012), które z kolei łączą się ze sobą za pośrednictwem agregatów tenascyny R. Sieci perineuronalne związane są z konkretnym typem komórek: neuronów GABA-ergicznymi, zawierających parwalbuminę (Ryc 2). Szczegółowych danych na temat lokalizacji HA w mózgu jest niewiele. COSTA i wsp. (2007) w korze mózgowej myszy wykazali obecność zarówno rozproszonej formy HA w neuropilu, jak i formy ustrukturalizowanej wokół komórek piramidowych i niepiramidowych warstwy V i w mniejszym stopniu III i IV. Podobną, dwójakiego rodzaju lokalizację pokazano w hipokampie, mózdzku i wzgórzu (COSTA i współaut. 2007).

Zwiększoną zawartość HA zaobserwowano w obszarach, w których w dorosłym mózgu zachodzi neurogenеза, czyli w strefie przykomorowej (ang. subventricular zone SVZ) oraz strefie podziarnistej zakrętu zębatego (ang. subgranular zone, SGZ) (PRESTON i SHERMAN 2011, LINDWALL i współaut. 2013) (Ryc. 3).



Ryc. 2. A. sieci perineuronalne w korze somatosensorycznej myszy, wyznakowane fluorescencyjnie za pomocą lektyny *Wisteria floribunda*. B. odpowiadające im komórki wyznakowane przeciwciałem przeciwko parwalbuminie.



Ryc. 3. Kwas hialuronowy w niszy neurogennej w strefie podziarnistej zakrętu zębatego wyznakowany fluorescencyjnie przy pomocy białka HABP. Strzałki wskazują strefę podziarnistą. Skala 100 μ m.

METABOLIZM KWASU HIALURONOWEGO

SYNTEZA HA

Znane są trzy syntazy kwasu hialuronowego: HAS1, HAS2 i HAS3 (ang. hyaluronic acid synthase 1, 2, 3) (VIGETTI i współaut. 2014). Wszystkie należą do grupy glikozylotransferaz i mają zdolność naprzemiennego podstawiania dwu reszt cukrowych, UDP-kwasu glukuronowego i UDP-N-acetyloglukozaminy (aktywowane formy cukrów). HAS1-3 są izoenzymami o dużej homologii sekwencji (30–70% u ssaków) (CSOKA i STERN 2013). Wszystkie posiadają 6-8 domen wewnątrzłonowych i zlokalizowane są w zewnętrznej błonie cytoplazmatycznej. Wykorzystują do syntezy cząsteczek HA znajdujące się w cytoplazmie prekursorzy i transportują łańcuch HA na zewnątrz komórki. Kwas hialuronowy syntetyzowany jest więc, w odróżnieniu od innych glikozaminoglikanów, nie w aparacie Golgiego, ale na powierzchni błony komórkowej. Co więcej, sugeruje się, że HA może pozostać połączony z syntazą, która staje się w ten sposób białkiem kotwiczącym cząsteczkę HA do błony cytoplazmatycznej (WEIGEL i DEANGELIS 2007). Wydaje się, że każda z syntaz produkuje łańcuchy HA o określonej długości i właściwościach, np. HAS2 odpowiedzialna jest za produkcję szczególnie długich cząsteczek HA, o masie 2×10^4 kDa i długości nawet 2×10^5 reszt cukrowych, podczas

gdy HAS1 i HAS3 wytwarzają HA o szerokim spektrum masy od 2×10^2 do 2×10^3 kDa (CSOKA i STERN 2013). Regulacja syntezy HA jest procesem skomplikowanym, obejmującym regulację ekspresji syntaz HA, ich modyfikacje potranslacyjne i transport do zewnętrznej błony komórkowej, jak również podaż substratów, czyli UDP-GlcUA i UDP-GlcNAc (TAMMI i współaut. 2011). Ekspresja genów HAS podlega gwałtownym zmianom w procesie embriogenezy i związana jest z występującą wówczas migracją komórek i tworzeniem organów. W dorosłym organizmie indukowana jest przez uszkodzenie tkanek, stan zapalny i rozrost nowotworowy. Na ekspresję HAS wpływa wiele czynników, takich jak czynniki wzrostowe, cytokiny, interferon-, oraz prostaglandyny, kortykosteroidy i retinoidy (TAMMI i współaut. 2011).

Wszystkie syntazy ulegają ekspresji także w tkance nerwowej. HAS1 wykazuje się najniższą i najbardziej ograniczoną przestrzennie ekspresją z wszystkich trzech, jest też enzymem o najniższej aktywności (SUSKONEN i współaut. 2015). Nasiloną ekspresję HAS1 obserwuje się podczas rozwoju, np. w rdzeniu kręgowym największe ilości mRNA HAS1 wykrywa się od 3. do 7. dnia życia, natomiast po 14. dniu mRNA jest niewykrywalne (CARULLI i współaut. 2006, GALTREY i współaut. 2008). W mózgu dorosłej myszy jej

obecność stwierdzono w astrocytach strefy przykomorowej oraz w komórkach śródbłonka naczyń krwionośnych, co sugeruje, że naczynia mogą być zaangażowane w produkcję mózgowego HA (LINDWALL i współaut. 2013). Podobnie do HAS1, ekspresję HAS2 stwierdzono w astrocytach strefy przykomorowej i w śródbłonku naczyń krwionośnych (LINDWALL i współaut. 2013). Obecność mRNA HAS2 wykazano też w komórkach Golgiego i dużych neuronach pobudzających głębokich jąder mózdzku posiadających na swojej powierzchni sieci perineuronalne (CARULLI i współaut. 2006). HAS3 zlokalizowano w wielu neuronach rdzenia kręgowego (GALTREY i współaut. 2008) i w hipokamie (MCRAE i współaut. 2012). Sugeruje się, że wszystkie komórki posiadające sieć perineuronalną na swojej powierzchni mają ekspresję którejś z syntaz, zwykle HAS3 (KWOK i współaut. 2010). O kluczowym znaczeniu tej izoformy dla mózgu świadczy fakt, że knockout HAS3 skutkuje znacznym obniżeniem zawartości HA w tkance nerwowej, większym niż w przypadku dwu pozostałych (ARRANZ i współaut. 2014). Brakuje niestety szczegółowych informacji na temat komórkowej lokalizacji syntaz HA w rozmaitych obszarach mózgu, choć wiadomo z badań przeprowadzonych metodą qRT PCR, że na poziomie mRNA wszystkie ulegają ekspresji w korze mózgowej (XING i współaut. 2014).

DEGRADACJA HA

Kwas hialuronowy podlega dynamicznym przemianom w tkankach. Szacuje się, że w ludzkim organizmie każdego dnia jedna trzecia puli HA ulega wymianie. Okres półtrwania HA zależy od rodzaju tkanki: we krwi wynosi od 2 do 5 minut, w skórze około doby, a w tkance chrzęstnej, która jest dość stabilna, 2–3 tygodnie (CSOKA i STERN 2013). Za ten niezwykle szybki obrót odpowiedzialne są hialuronidazy, tnące cząsteczkę kwasu hialuronowego wewnątrz nici na odcinki o różnej długości, charakterystycznej dla izoformy enzymu (STERN 2004). W ludzkim genomie znane jest sześć sekwencji potencjalnie kodujących hialuronidazy: *HYAL-1-4*, *SPAM1* i *HYALP1*, przy czym ostatnia sekwencja jest pseudogenem i nie obserwuje się jej produktu białkowego. Co ciekawe, u myszy i u naczelnych (i być może u innych ssaków) sekwencja *HYALP1* jest genem w pełni funkcjonalnym. W genomie myszy występuje jeszcze jedna sekwencja kodująca dodatkową hialuronidazę *HYAL5* (CSOKA i STERN 2013).

Hialuronidazy są enzymami o dużej specyficzności tkankowej. W mózgu wykrywa się trzy podstawowe izoformy: HYAL1, HYAL2 i HYAL3 (LINDWALL i współaut. 2013). Stwierdzono również obecność tych samych izoform w glejakiach oraz w mózgu po uszkodzeniu (JUNKER i współaut. 2003, XING i współaut. 2014). Istnieje jedno doniesienie dotyczące ekspresji HYAL4 w układzie nerwowym, pokazujące jej wzrost w astrocytach uszkodzonego rdzenia kręgowego kilka tygodni po urazie (TACHI i współaut. 2015). Jednak HYAL4, w przeciwieństwie do innych hialuronidaz nie wykazuje zdolności rozkładu HA, trawi natomiast łańcuchy siarczanów chondroityny, jest więc jedyną jak dotąd poznaną endogenną chondroitynazą u kręgowców (CSOKA i STERN 2013). Wydaje się więc, że HYAL4, będąca hialuronidazą tylko z nazwy, może być zaangażowana w trawienie reszt chondroitynosiarczanowych związanych z proteoglikanami i w procesy naprawcze w układzie nerwowym.

HYAL1 jest enzymem lizosomalnym, o maksimum aktywności przy pH 3.8. Co ciekawe, aktywną HYAL1 wykrywa się w dużych ilościach w osoczu i w moczu, a jej źródło jest nieznane. W warunkach *in vitro* HYAL1 rozkłada HA o różnych długościach (STERN 2004). Ponieważ jednak długie cząsteczki HA nie występują w komórce, uważa się, że HYAL1 trawi krótsze odcinki HA, powstałe w wyniku wstępnego cięcia HA przez HYAL2, która zlokalizowana jest na powierzchni błony komórkowej. Produktem aktywności enzymatycznej HYAL1 są głównie tetrasacharydy, degradowane następnie do pojedynczych cząsteczek kwasu glukuronowego i N-acetyloglukozaminy przez β -egzoglikozydazy lizosomalne (STERN 2004).

HYAL2 znajduje się na powierzchni błony komórkowej. Jest białkiem posiadającym glikofosfatydyloinozytolową kotwicę (GPI), występującym najczęściej w obrębie kawol, współwystępującym z CD44 (głównym receptorem HA), HAS2 oraz prawdopodobnie NHE-1, antyporterem $\text{Na}^+\text{-H}^+$, zapewniającym kwaśne środowisko odpowiednie dla HYAL2 (BOURGUIGNON i współaut. 2004). Enzym ten ma dużo mniejszą aktywność niż inne hialuronidazy i wykazuje silną preferencję do trawienia długołańcuchowego HA (LEPPERDINGER i współaut. 2001). Produktem rozkładu HA przez tę hialuronidazę są krótsze odcinki HA o masie ok. 20 kDa, co odpowiada odcinkom 50–60 dwusacharydowych jednostek, które następnie są internalizowane

na drodze endocytozy i trawione do tetramerów przez HYAL1 (LEPPERDINGER i współaut. 1998, JEDRZEJAS i STERN 2005). Jak dotąd nie udało się potwierdzić aktywności enzymatycznej HYAL3. W transfekowanych wektorem niosącym HYAL3 komórkach nie obser-

wuje się procesów degradacji HA. Wydaje się natomiast, że koekspresja HYAL3 i HYAL1 w warunkach *in vitro* powoduje zwiększenie ekspresji tej ostatniej izoformy, w ten sposób wpływając na metabolizm HA (HEMMING i współaut. 2008).

ODDZIAŁYWANIE HA Z INNYMI CZĄSTECZKAMI MACIERZY ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ

LEKTYKANY: AGREKAN, NEUROKAN, BREWIKAN I WERSIKAN

Proteoglikany chondroitynosiarczanowe (ang. chondroitine sulfate proteoglycans, CSPGs), obok HA, są głównym składnikiem macierzy zewnątrzkomórkowej mózgu. Podgrupą CSPGs są lektyny, które charakteryzują się obecnością N-końcowej domeny wiążącej niekowalencyjnie HA i domeny C-końcowej, rozpoznawanej przez tenascynę R. Pomiędzy nimi znajduje się domena, do której przyłączane są łańcuchy siarczanu chondroityny, polisacharydu o podobnej strukturze do HA, zbudowanego z powtarzających się disacharydów kwasu D-glukuronowego i N-acetylo D-galaktozaminy. Należą do nich: agrekan, niosący na swej cząsteczce ok. 100 łańcuchów siarczanu chondroityny, neurokan i brewikan, mające po kilka reszt siarczanu chondroityny, oraz versikan, który ma ich 12-16 (IOZZO i MURDOCH 1996). Kompleks HA-CSPGs-tenascyna R, w którym oddziaływanie HA-CSPG stabilizowane jest białkiem łączącym, tworzy wspomniane już sieci perineuronalne, struktury obecne na powierzchni neuronów hamujących.

CD44

CD44 (ang. cluster of differentiation 44) jest głównym receptorem HA (choć HA nie jest jedynym ligandem CD44), znajdowanym powszechnie w zewnętrznej błonie cytoplazmatycznej komórki. Jest białkiem wielofunkcyjnym, występującym w wielu wariantach (wynikających z alternatywnego składowania eksonów), którego rola w tkance nerwowej jest dopiero poznawana. W części zewnątrzkomórkowej (najbardziej zmiennej) posiada miejsce wiązania HA, proteoglikanów, glikoprotein, czynników wzrostowych czy cytokin (DZWONEK i WILCZYŃSKI 2015), a w części cytoplazmatycznej miejsca rozpoznające białka szlaków sygnałowych kinaz z rodziny src oraz aktywatory białek Rho, jak również miejsce wiązania cytoskieletu (DZWONEK i WILCZYŃSKI 2015). Zdolność

CD44 do wiązania HA jest uwarunkowana stopniem glikozylacji, który z kolei zależy od konkretnych eksonów, wchodzących w skład cząsteczki CD44 (LESLEY i współaut. 1995). W tkance nerwowej główną izoformą jest wersja standardowa CD44s (standard CD44) (DZWONEK i WILCZYŃSKI 2015). Wykrywa się ją głównie w komórkach glejowych, przede wszystkim astrocytach, ale także w oligodendrocytach. Ekspresję CD44 stwierdzono również w neuronach, w których występuje w postaci innych niż CD44s izoform, (tzw. „variant isoforms”, CD44v) (KAAIJK i współaut. 1997). Wydaje się, że ekspresja CD44 w neuronach jest regulowana rozwojowo: w mózgach osobników rozwijających się kształtuje się na wyższym poziomie, stąd też prawdopodobnie wynika niewielka liczba doniesień na temat CD44 w organizmach dorosłych. Neuronalna i glejowa ekspresja izoform CD44 może być indukowana np. uszkodzeniem, przy czym komponenta neuronalna wykrywana jest w obszarach położonych dalej od miejsca uszkodzenia, w przeciwieństwie do glejowej, obecnej w uszkodzonej tkance. Bardziej szczegółowe informacje na temat ekspresji CD44 w mózgu znaleźć można w pracy przeglądowej DZWONEK i WILCZYŃSKIEGO (2015).

Funkcja kompleksu HA/CD44 w mózgu jest słabo poznana, a badania są dodatkowo skomplikowane przez fakt, że CD44 ulega ekspresji i w gleju, i w neuronach. Sugeruje się udział HA/CD44 w procesach rozwojowych wzrostu aksonów. W badaniach *in vitro* wykazano, że obecność CD44 ma wpływ hamujący na rosnące włókna neuronów zwojowych siatkówki, formując prawidłowe skrzyżowanie wzrokowe. Kompleks HA/CD44 wydaje się regulować również proces transmisji synaptycznej, wykazano bowiem, że podczas embriogenezy CD44 w kompleksie z c-Met regulują przekazanie w sieci neuronów generujących rytm oddechowy (DZWONEK i WILCZYŃSKI 2015). Wiadomo też, że HA ma zdolność modulowania zależnych od napięcia (LVDCCs) kanałów wapniowych

typu L, podobnie jak kinaza Src, fosforyluje jedną z podjednostek kanału (DZWONEK i WILCZYŃSKI 2015). Niewykluczone więc, że obserwowany efekt jest zależny od szlaku sygnałowego HA/CD44/Src. Ostatnio wykazano, że CD44 wywiera hamujący wpływ na rozrost drzewka dendrytycznego neuronów piramidowych hipokampa *in vitro* i *in vivo* poprzez ścieżkę sygnałową kinazy Src (SKUPIEN i współaut. 2014). Co ciekawe, wyciszenie ekspresji CD44, oprócz efektu na rozrost drzewka, miało również wpływ na morfologię aparatu Golgiego, prowadząc do dyspersji struktur i rozproszenia na większej powierzchni, zjawiska obserwowanego również w procesach wzrostu i przemodelowania drzewek dendrytycznych i aksonalnych oraz stymulowanego aktywnością neuronalną. Wynik ten jest sprzeczny z tym, co obserwowano w komórkach nieneuronalnych, w których aktywacja kinazy Src prowadziła do rozproszenia cystern aparatu Golgiego (DZWONEK i WILCZYŃSKI 2015). Może to świadczyć o odmiennych rolach kompleksu HA/CD44 w neuronach i astrocytach, wynikających np. z ekspresji innych izoform w tych komórkach.

Rola HA i CD44 w astrocytach jest mało znana. Stwierdzono, że oddziaływanie HA z CD44 stymuluje kinazę PKN gamma i fosforylację jednego z białek cytoszkieletu, kortaktyny, co z kolei pobudza astrocyty hodowane *in vitro* do migracji (BOURGUIGNON i współaut. 2007). Nadekspresja CD44 w komórkach prekursorowych neuronów inicjuje ich migrację, pozostając bez wpływu na różnicowanie (DZWONEK i WILCZYŃSKI 2015). Wydaje się więc, że CD44 w układzie nerwowym reguluje szeroko pojętą ruchliwość, obejmującą zarówno wzrost wypustek, jak i przemieszczanie się komórek.

RHAMM

RHAMM (ang. receptor for HA-mediated motility), w przeciwieństwie do CD44, nie jest białkiem błonowym. Zlokalizowany jest w cytoplazmie i pod wpływem nieznanymi jeszcze czynników jest transportowany do przestrzeni międzykomórkowej, również w nieznanym sposób. Wewnątrzkomórkowo RHAMM jest białkiem występującym w centrosomie, odpowiedzialnym za prawidłowe uformowanie wrzeciona mitotycznego (MAXWELL i współaut. 2008), natomiast zewnątrzkomórkowo oddziałuje z CD44 i wiąże HA, prawdopodobnie stymulując komórki do migracji (TURLEY i współaut. 1993). W ukła-

dzie nerwowym RHAMM znaleziony został w cytoplazmie neuronów i oligodendrocytów (LYNN i współaut. 2001, CARULLI i współaut. 2006) oraz w astrocytach i mikrogleju *in vitro*, gdzie tworzył agregaty na obrzeżu komórek w miejscu kontaktu z innymi komórkami (TURLEY i współaut. 1994). W korze mózgowej szczura i człowieka RHAMM wykryto w licznych neuronach rozproszonych we wszystkich warstwach kory. Szczególnie wysoką ekspresję zaobserwowano w strefie przykomorowej SVZ i w RMS (ang. rostral migratory stream) w komórkach progenitorowych neuronów (LINDWALL i współaut. 2013). Rola RHAMM w dorosłych neuronach prawdopodobnie polega na oddziaływaniu z HA i umożliwianiu wzrostu neurytów, wykazano bowiem *in vitro*, że deaktywacja RHAMM przeciwciałem blokującym wiązanie z HA hamuje ten wzrost (NAGY i współaut. 1995). Astrocyty *in vivo* raczej nie wykazują ekspresji RHAMM, ale w mózgu uszkodzonym, np. po udarze, astrocytarna ekspresja RHAMM wzrasta w obszarze okołolezyjnym, prawdopodobnie przygotowując zaktywowane astrocyty do migracji (LINDWALL i współaut. 2013). Białko to występuje powszechnie w glejakach, gdzie reguluje ruchliwość komórek a poziom ekspresji koreluje ściśle ze stopniem złośliwości (im wyższy, tym bardziej złośliwy nowotwór).

LYVE-1

LYVE-1 (ang. lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1) jest receptorem HA, typowym dla komórek śródbłona naczyń limfatycznych, wykazującym 51% homologii do CD44 (BANERJI i współaut. 1999). W mózgu wykryto go w ciałach neuronów i aksonach pacjentów chorych na stwardnienie rozsiane (CHAITANYA i współaut. 2013). Obecność LYVE-1 w mózgu potwierdzają też badania ekspresji mRNA (BANERJI i współaut. 1999). W układzie limfatycznym prawdopodobnie bierze udział w obrocie HA i jego degradacji w węzłach chłonnych i być może również w transporcie leukocytów przez ścianę naczyń (JACKSON 2009). Rola tego białka w tkance nerwowej jest całkowicie nieznaną.

HARE

HARE (ang. hyaluronan receptor for endocytosis) (inaczej stabilina-2) jest białkiem obecnym przede wszystkim w komórkach sinusoidalnych śródbłona węzłów chłonnych i wątroby, gdzie bierze udział w usuwaniu

co najmniej 14 ligandów, m.in. HA i siarczanów chondroityny z organizmu na drodze endocytozy zależnej od klatryny (PANDEY i WEIGEL 2014). Ulega jednak ekspresji również w innych organach, m.in. w komórkach wyściełających komory mózgu (FALKOWSKI i współaut. 2003), gdzie prawdopodobnie bierze udział w lokalnym obrocie HA. Sugeruje się, że HARE zlokalizowany w komórkach wyściółki komór mózgowych może być zaangażowany w usuwanie nadmiaru HA z płynu mózgowo-rdzeniowego i zapewnieniu jego płynności. Molekularny mechanizm działania HARE jest obecnie intensywnie ba-

dany, choć niestety nie w mózgu. Wiadomo, że kompleks HA/HARE aktywuje ścieżkę sygnałową MAPK/ERK (KYOSSEVA i współaut. 2008) i NF-κB (PANDEY i WEIGEL 2014), ale tylko w odpowiedzi na niektóre z ligandów, w których endocytozie pośredniczy. Wydaje się więc, że HARE, oprócz funkcji zmiatacza polisacharydów będących produktami degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej, pełni bliżej jeszcze nieznaną funkcję sygnałową, być może związane z procesami zapalnymi, co wydaje się potwierdzać zaangażowanie ścieżki NF-κB.

FUNKCJE KWASU HIALURONOWEGO W MÓZGU

Kwas hialuronowy występuje w tkankach pod postacią cząsteczek o wielu długościach, posiadających często przeciwstawne funkcje i właściwości. Wysokocząsteczkowy HA służy jako „wypełniacz” przestrzeni międzykomórkowej, ale też strukturalizuje ją, wchodząc w interakcje z proteoglikanami i glikoproteinami przestrzeni międzykomórkowej (CSOKA i STERN 2013). W mózgu przykładem struktur, w których tworzeniu HA ma znaczący udział są wspomniane wyżej sieci perineuronalne. Okrywają ciała tych neuronów i proksymalne części dendrytów, stabilizując istniejące tam synapsy i blokując tworzenie nowych, tym samym utrudniając reorganizację połączeń synaptycznych i ograniczając plastyczność neuronalną (FAWCETT 2015). Enzymatyczna degradacja sieci perineuronalnych w korze wzrokowej przywraca jej młodzieńczą zdolność reagowania przebudową sieci połączeń na w odpowiedzi na bodźce wzrokowe (PIZORUSSO i współaut. 2006). Silny ładunek ujemny sprzyja gromadzeniu wody wokół cząsteczek i prawidłowemu uwodnieniu tkanki (DICKER i współaut. 2014), jak również sprawia, że skondensowana wokół neuronów macierz zewnątrzkomórkowa może być magazynem jonów i cząsteczek, np. kationów Ca^{2+} , cząsteczek sygnałowych, jak np., Sem3A czy Otx2 (FAWCETT 2015). W mózgu embrionalnym i zwierząt krótko po urodzeniu zawartość HA jest szczególnie wysoka, co sprzyja procesom migracji komórek i wzrostowi wypustek nerwowych (MARGOLIS i współaut. 1975). W mózgu zwierząt dorosłych HA jest produkowany w dużej ilości w pobliżu miejsca uszkodzenia, np. w tkance okołoudarowej, występuje też obficie w niszach neurogennych, tzn. w SGZ i SVZ. W

obu tych przypadkach jego zwiększona obecność rozluźnia macierz zewnątrzkomórkową, przygotowując tkankę okołolezyjną na przyjęcie migrujących komórek, i umożliwiając migrację komórek ze stref neurogennych (LINDWALL i współaut. 2013, DICKER i współaut. 2014). Długołańcuchowy HA w tkankach, w tym również w mózgu, ma działanie antyangiogenne, antyapoptotyczne, przeciwzapalne i immunosupresyjne (DICKER i współaut. 2014). W warunkach *in vitro* i *in vivo* zmniejsza aktywację mikrogleju i proliferację astrocytów, jak też produkcję utrudniającą regenerację siarczanów chondroityny w uszkodzonym rdzeniu kręgowym (KHAING i współaut. 2011). Immunosupresyjne działanie HA może mieć również potencjalne znaczenie w przypadku sieci perineuronalnych, sugeruje się bowiem ich ochronną funkcję w niektórych chorobach neurodegeneracyjnych (FAWCETT 2015). Co ciekawe, HA niskocząsteczkowy (oligosacharydy o długości 10–1000 reszt cukrowych) wydaje się mieć działanie przeciwstawne: angiogenne i prozapalne (DICKER i współaut. 2014). W mózgu stan zapalny pojawia się w ciągu doby od uszkodzenia (np. udaru), w tym samym czasie obserwuje się również wzrost ekspresji hialuronidaz w obszarze w pobliżu uszkodzenia (LINDWALL i współaut. 2013). Niskocząsteczkowy HA wykrywa się w tkance udarowej *post mortem*, jak również w osoczu pacjentów z udarem. Możliwe więc, że obok długołańcuchowego HA, wywierającego na komórki w początkowej fazie efekt łagodzący, pojawiają się w mózgu krótsze fragmenty, które za pośrednictwem receptorów przekazują z macierzy zewnątrzkomórkowej do komórki sygnał o zagrożeniu, działają prozapal-

nie i zapoczątkowują proces gojenia. Co ciekawe, bardzo małe oligosacharydy HA (6-7 reszt cukrowych) mają odwrotne działanie: antyapoptotyczne, antyangiogenne i przeciwzapalne. Wydaje się więc, że coraz to mniejsze cząsteczki HA, powstające w procesach katabolicznych, mają zdolność hamowania działania swoich większych poprzedników i odwracania, lub przynajmniej modyfikowania efektów ich działania (STERN i współaut. 2006).

Podwyższoną ekspresję niskocząsteczkowego HA i jego receptorów CD44 i RHAMM obserwuje się w glejakach (STERN i współaut. 2006, DICKER i współaut. 2014). *In vitro*, niskocząsteczkowy HA (10-16 reszt cukrowych) indukuje proteolityczną degradację swojego głównego receptora CD44. Podobnej wielkości oligosacharydy powstają również w komórkach nowotworowych, m.in. glejaków, w których często obserwuje się podwyższoną ekspresję hialuronidaz (STERN i współaut. 2006). Wysoka ekspresja hialuronidaz skorelowana jest z wysokim stopniem złośliwości nowotworu (DICKER i współaut. 2014). Być może ten rodzaj autokrynej regulacji jest strategią komórek nowotworowych, pozwalającą im na uwolnienie się

spod kontroli czynników zależnych od CD44. Co ciekawe, bardzo małe oligosacharydy HA (6-7 reszt cukrowych) mają działanie hamujące na wzrost komórek nowotworowych *in vitro* (STERN i współaut. 2006).

Kwas hialuronowy jest cząsteczką o prostej strukturze, ale skomplikowanej i wielorakiej funkcji w organizmie. W mózgu stanowi podstawowy składnik macierzy zewnątrzkomórkowej, mimo to do niedawna uważany był jedynie za wypełniacz przestrzeni międzykomórkowej. Dziś przypisuje mu się udział w regulacji migracji komórek nerwowych na wczesnych etapach rozwoju mózgu, modyfikacji drzewka dendrytycznego i aksonalnego oraz w regulacji plastyczności neuronalnej (jako składnikowi sieci perineuronalnych), jak również udział w procesach naprawczych po uszkodzeniu. Mimo to mechanizmy działania HA w mózgu są bardzo słabo poznane. W porównaniu z tym, co wiemy o innych tkankach i organach, brakuje podstawowej wiedzy na temat ekspresji i mechanizmów działania jego receptorów w mózgu, ekspresji i aktywności enzymów syntetyzujących i degradujących czy na temat wielkości cząsteczek HA w tkance nerwowej.

KWAS HIALURONOWY W MACIERZY ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ MÓZGU

Streszczenie

Kwas hialuronowy jest liniowym polisacharydem o różnej długości, składającym się z wielokrotnie powtórzonych dimerów kwasu glukuronowego i N-acetyloglukozaminy, wchodzącym w skład macierzy zewnątrzkomórkowej większości tkanek i organów, w tym również mózgu. Jest syntetyzowany w zewnętrznej błonie komórkowej przez trzy syntazy, HAS1-3 i degradowany częściowo w błonie zewnątrzkomórkowej przez hialuronidazę 2 (HYAL2), internalizowany na drodze endocytozy i kierowany do lizosomów, gdzie ulega dalszej degradacji przez HYAL1 i egzoglikozydazy. Pomimo prostej budowy chemicznej, HA pełni w mózgu wiele funkcji, zależnie od wielkości cząsteczki. Wielkocząsteczkowy HA jest obecny w dużych ilościach w mózgu embrionalnym, sprzyjając migracji neuronów, jest też obecny w niszach neurogennych w mózgu dorosłym, gdzie pełni tę samą

funkcję. Wchodzi również w skład sieci perineuronalnych, struktur okrywających niektóre neurony i ograniczających plastyczność synaptyczną. Zarówno wielkocząsteczkowy jak i niskocząsteczkowy HA ma zdolność wiązania do receptorów zewnątrzkomórkowych i aktywowania szlaków przekazywania wewnątrzkomórkowego, regulując wzrost aksonów i dendrytów, migrację astrocytów, procesy zapalne i naprawcze w uszkodzonym mózgu. Ulega ekspresji w glejakach, gdzie promuje rozwój guza i przerzuty. Funkcje kwasu hialuronowego w mózgu, chociaż intensywnie badane, wciąż nie są w pełni znane. Pogłębienie wiedzy na temat mechanizmów leżących u podstaw procesów regulowanych przez HA niesie nadzieję na stworzenie narzędzi dla nowych terapii do walki z efektami uszkodzenia mózgu czy z nowotworami.

HYALURONIC ACID IN THE EXTRACELLULAR MATRIX OF THE BRAIN

Summary

Hyaluronic acid (HA) is a non-branched polysaccharide of various size, with repeats of a disaccharide unit consisting of D-glucuronic acid and N-acetyl-D glucosamine. It is synthesized by three synthases, HAS1-3, at the plasma membrane, and

degraded partially at the same localization by hyaluronidase Hyal-2, endocytosed and directed to lysosomes, where final degradation by Hyal-1 and exoglycosidases takes place. Despite its chemical simplicity, hyaluronic acid exhibits an array of functions in

the brain, depending on molecular size of the molecule. High molecular weight HA is abundantly expressed in the embryonic brain extracellular matrix (ECM) and also in adults, where, on the surface of selected neurons, together with other constituents, it forms perineuronal nets, the structures that impede synaptic plasticity. In developing brain it promotes neuronal migration and in adult brain it is abundant in neurogenic niches, where it plays the same role. Both high and low molecular weight HA interacts with various proteins and proteoglycans to organize the ECM, binds with cell surface receptors and

activates signaling pathways which regulate axonal and dendritic growth, as well as regulates astrocyte migration, inflammation and healing in the injured brain. It is up regulated in gliomas and involved in tumor progression and metastasis. Although extensively studied in other tissues, the function and the molecular basis of action of hyaluronic acid in the brain is far from understood. A deeper knowledge of the mechanisms underlying the roles of HA in various physiological processes can provide new insights and tools for intervening therapies in case of brain injury or cancer.

LITERATURA

- ARRANZ A. M., PERKINS K. L., IRIE F., LEWIS D. P., HRABE J., XIAO F., ITANO N., KIMATA K., HRABETOVA S., YAMAGUCHI Y., 2014. *Hyaluronan deficiency due to Has3 knock-out causes altered neuronal activity and seizures via reduction in brain extracellular space*. J. Neurosci. 34, 6164–6176.
- BANERJI S., NI J., WANG S.-X., CLASPER S., SU J., TAMMI R., JONES M., JACKSON D. G., 1999. *LYVE-1, a New Homologue of the CD44 Glycoprotein, Is a Lymph-specific Receptor for Hyaluronan*. J. Cell Biol. 144, 789–801.
- BOURGUIGNON L. Y., SINGLETON P. A., DIEDRICH F., STERN R., GILAD E., 2004. *CD44 interaction with Na⁺-H⁺ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion*. J. Biol. Chem. 279, 26991–7007.
- BOURGUIGNON L. Y., GILAD E., PEYROLLIER K., BRIGHTMAN A., SWANSON R. A., 2007. *Hyaluronan-CD44 interaction stimulates Rac1 signaling and PKN gamma kinase activation leading to cytoskeleton function and cell migration in astrocytes*. J. Neurochem. 101, 1002–1017.
- CARGILL R., KOHAMA S. G., STRUVE J., SU W., BANINE F., WITKOWSKI E., BACK S. A., SHERMAN L. S., 2012. *Astrocytes in aged nonhuman primate brain gray matter synthesize excess hyaluronan*. Neurobiol. Aging 33, 830.e13–830.e 24.
- CARULLI D., RHODES K. E., BROWN D. J., BONNERT T. P., POLLACK S. J., OLIVER K., STRATA P., FAWCETT J. W., 2006. *Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components*. J. Comp. Neurol. 494, 559–577.
- CHAITANYA G. V., OMURA S., SATO F., MARTINEZ N. E., MINAGAR A., RAMANATHAN M., GUTTMAN B. W., ZIVADINOV R., TSUNODA I., ALEXANDER J. S., 2013. *Inflammation induces neuro-lymphatic protein expression in multiple sclerosis brain neurovasculature*. J. Neuroinflammat. 10, 125.
- COSTA C., TORTOSA R., DOMÈNECH A., VIDAL E., PUMAROLA M., BASSOLA A., 2007. *Mapping of aggrecan, hyaluronic acid, heparan sulphate proteoglycans and aquaporin 4 in the central nervous system of the mouse*. J. Chem. Neuroanat. 33, 111–123.
- CSOKA A. B., STERN R., 2013. *Hypotheses on the evolution of hyaluronan: a highly ironic acid*. Glycobiology 23, 398–411.
- DICKER K. T., GURSKI L. A., PRADHAN-BHATT S., WITT R. L., FARACH-CARSON M. C., JIA X., 2014. *Hyaluronan: a simple polysaccharide with diverse biological functions*. Acta Biomater. 10, 1558–1570.
- DZWONEK J., WILCZYNSKI G. M., 2015. *CD44: molecular interactions, signaling and functions in the nervous system*. Front. Cell. Neurosci. 9, 175.
- FALKOWSKI M., SCHLEDZEWSKI K., HANSEN B., GOERDT S., 2003. *Expression of stabilin-2, a novel fasci- clin-like hyaluronan receptor protein, in murine sinusoidal endothelia, avascular tissues, and at solid/liquid interfaces*. Histochem. Cell Biol. 120, 361–369.
- FAWCETT J. W., 2015. *The extracellular matrix in plasticity and regeneration after CNS injury and neurodegenerative disease*. Prog. Brain Res. 218, 213–226.
- FRISCHKNECHT R., GUNDELFINGER E. D., 2012. *The brain's extracellular matrix and its role in synaptic plasticity*. Adv. Exp. Med. Biol. 970, 153–171.
- GALTREY C. M., KWOK J. C., CARULLI D., RHODES K. E., FAWCETT J. W., 2008. *Distribution and synthesis of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan, link proteins and tenascin-R in the rat spinal cord*. Eur. J. Neurosci. 27, 1373–1390.
- HEMMING R., MARTIN D. C., SLOMINSKI E., NAGY J. I., HALAYKO A. J., PIND S., TRIGGS-RAINE B., 2008. *Mouse Hyal3 encodes a 45- to 56-kDa glycoprotein whose overexpression increases hyaluronidase 1 activity in cultured cells*. Glycobiology 18, 280–289.
- IOZZO R. V., MURDOCH A. D., 1996. *Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function*. FASEB J. 10, 598–614.
- JACKSON D. G., 2009. *Immunological functions of hyaluronan and its receptors in the lymphatics*. Immunol. Rev. 230, 216–231.
- JEDRZEJAS M. J., STERN R., 2005. *Structures of vertebrate hyaluronidases and their unique enzymatic mechanism of hydrolysis*. Proteins 61, 227–238.
- JUNKER N., LATINI S., PETERSEN L. N., KRISTJANSEN P. E., 2003. *Expression and regulation patterns of hyaluronidases in small cell lung cancer and glioma lines*. Oncol. Rep. 10, 609–616.
- KAAIJK P., PALS S. T., MORSINK F., BOSCH D. A., TROOST D., 1997. *Differential expression of CD44 splice variants in the normal human central nervous system*. J. Neuroimmunol. 73, 70–76.
- KHAING Z. Z., MILMAN B. D., VANSKOY J. E., SEIDLITS S. K., GRILL R. J., SCHMIDT C. E., 2011. *High molecular weight hyaluronic acid limits astrocyte activation and scar formation after spinal cord injury*. J. Neural. Eng. 8, 046033.
- KWOK J. C., CARULLI D., FAWCETT J. W., 2010. *In vitro modeling of perineuronal nets: hyaluronan synthase and link protein are necessary for their formation and integrity*. J. Neurochem. 114, 1447–1459.
- KYOSSEVA S. V., HARRIS E. N., WEIGEL P. H., 2008. *The hyaluronan receptor for endocytosis mediates*

- hyaluronan-dependent signal transduction via extracellular signal-regulated Kinases. *J. Biol. Chem.* 283, 15047-15055.
- LEPPERDINGER G., STROBL B., KREIL G., 1998. *HYAL2, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity.* *J. Biol. Chem.* 273, 22466-22470.
- LEPPERDINGER G., MÜLLEGGER J., KREIL G., 2001. *Hyal2-less active, but more versatile?* *Matrix Biol.* 20, 509-514.
- LESLEY J., ENGLISH N., PERSCHL A., GREGOROFF J., HYMAN R., 1995. *Variant cell lines selected for alterations in the function of the hyaluronan receptor CD44 show differences in glycosylation.* *J. Exp. Med.* 182, 431-437.
- LINDWALL C., OLSSON M., OSMAN A. M., KUHN H. G., CURTIS M. A., 2013. *Selective expression of hyaluronan and receptor for hyaluronan mediated motility (Rhamm) in the adult mouse subventricular zone and rostral migratory stream and in ischemic cortex.* *Brain Res.* 1503, 62-77.
- LYNN B. D., LI X., CATTINI P. A., TURLEY E. A., NAGY J. I., 2001. *Identification of sequence, protein isoforms, and distribution of the hyaluronan-binding protein RHAMM in adult and developing rat brain.* *J. Comp. Neurol.* 439, 315-330.
- MARGOLIS R. U., MARGOLIS R. K., CHANG L. B., PRETI C., 1975. *Glycosaminoglycans of brain during development.* *Biochemistry* 14, 85-88.
- MAXWELL C. A., MCCARTHY J., TURLEY E., 2008. *Cell-surface and mitotic-spindle RHAMM: moonlighting or dual oncogenic functions?* *J. Cell Sci.* 121, 925-932.
- MCRÆ P. A., BARANOV E., ROGERS S. L., PORTER B. E., 2012. *Persistent decrease in multiple components of the perineuronal net following status epilepticus.* *Eur. J. Neurosci.* 36, 3471-3482.
- NAGY J. I., HACKING J., FRANKENSTEIN U. N., TURLEY E. A., 1995. *Requirement of the hyaluronan receptor RHAMM in neurite extension and motility as demonstrated in primary neurons and neuronal cell lines.* *J. Neurosci.* 15, 241-252.
- PANDEY M. S., WEIGEL P. H., 2014. *A hyaluronan receptor for endocytosis (HARE) link domain N-glycan is required for extracellular signal-regulated kinase (ERK) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling in response to the uptake of hyaluronan but not heparin, dermatan sulfate, or acetylated low density lipoprotein (LDL).* *J. Biol. Chem.* 289, 21807-21817.
- PIZZORUSSO T., MEDINI P., LANDI S., BALDINI S., BERARDI N., MAFFEI L., 2006. *Structural and functional recovery from early monocular deprivation in adult rats.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 8517-8522.
- PRESTON M., SHERMAN L. S., 2011. *Neural stem cell niches: roles for the hyaluronan-based extracellular matrix.* *Front. Biosci. (Schol Ed.)* 3, 1165-1179.
- SCOTT J. E., HEATLEY F., 2002. *Biological properties of hyaluronan in aqueous solution are controlled and sequestered by reversible tertiary structures, defined by NMR spectroscopy.* *Biomacromolecules* 3, 547-553.
- SIISKONEN H., OIKARI S., PASONEN-SEPPÄNEN S., RILLA K., 2015. *Hyaluronan synthase 1: a mysterious enzyme with unexpected functions.* *Front. Immunol.* 6, 43.
- SKUPIEN A., KONOPKA A., TRZASKOMA P., LABUS J., GORLEWICZ A., SWIECH L., BABRAJ M., DOLEZYCZEK H., FIGIEL I., PONIMASKIN E., WŁODARCZYK J., JAWORSKI J., WILCZYŃSKI G. M., DZWONEK J., 2014. *CD44 regulates dendrite morphogenesis through Src tyrosine kinase-dependent positioning of the Golgi.* *J. Cell Sci.* 127, 5038-5051.
- STERN R., 2004. *Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway.* *Eur. J. Cell Biol.* 83, 317-325.
- STERN R., ASARI A. A., SUGAHARA K. N., 2006. *Hyaluronan fragments: an information-rich system.* *Eur. J. Cell Biol.* 85, 699-715.
- TACHI Y., OKUDA T., KAWAHARA N., KATO N., ISHIGAKI Y., MATSUMOTO T., 2015. *Expression of hyaluronidase-4 in a rat spinal cord hemisection model.* *Asian Spine J.* 9, 7-13.
- TAMMI R. H., PASSI A. G., RILLA K., KAROUSOU E., VIGETTI D., MAKKONEN K., TAMMI M. I., 2011. *Transcriptional and post-translational regulation of hyaluronan synthesis.* *FEBS J.* 278, 1419-1428.
- TURLEY E. A., AUSTEN L., MOORE D., HOARE K., 1993. *Ras-transformed cells express both CD44 and RHAMM hyaluronan receptors: only RHAMM is essential for hyaluronan-promoted locomotion.* *Exp. Cell Res.* 207, 2772-2782.
- TURLEY E., HOSSAIN M. Z., SOROKAN T., JORDAN L. M., NAGY J. I., 1994. *Astrocyte and microglial motility in vitro is functionally dependent on the hyaluronan receptor RHAMM.* *Glia* 12, 68-80.
- VIGETTI D., KAROUSOU E., VIOLA M., DELEONIBUS S., DE LUCA G., PASSI A., 2014. *Hyaluronan: biosynthesis and signaling.* *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 2452-2459.
- WEIGEL P. H., DEANGELIS P. L., 2007. *Hyaluronan synthases: a decade-plus of novel glycosyltransferases.* *J. Biol. Chem.* 282, 36777-36781.
- YAFFE N. R., ALMOND A., BLANCH E. W., 2010. *A new route to carbohydrate secondary and tertiary structure using Raman spectroscopy and Raman optical activity.* *J. Am. Chem. Soc.* 132, 10654-10655.
- XING G., REN M., VERMA A., 2014. *Divergent temporal expression of hyaluronan metabolizing enzymes and receptors with craniotomy vs. controlled-cortical impact injury in rat brain: A pilot study.* *Front. Neurol.* 5, 173.