

## Streszczenie pracy doktorskiej Jacka Stępniewskiego

pt. *Nowe mechanizmy otrzymywania oraz różnicowania indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych: wpływ ścieżki Nrf2/HO-1 oraz cukrzycy.*

Reprogramowanie komórek somatycznych za pomocą zdefiniowanych czynników transkrypcyjnych umożliwia otrzymywanie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (ang. *induced pluripotent stem cells*, iPSCs), które następnie mogą być różnicowane w inne typy komórek (Takahashi, Yamanaka. *Cell* 2006). Metoda ta stwarza ogromne możliwości aby: i) uzyskiwać specyficzne dla pacjenta komórki macierzyste i różnicować je w komórki dotknięte chorobą – ma to szczególne znaczenie w przypadku schorzeń, które upośledzają funkcjonowanie komórek trudno dostępnych do izolacji i badań, np. cukrzycy, ii) wykorzystać tak zróżnicowane komórki w celu badania nowych związków terapeutycznych, iii) w przyszłości zastosować je w medycynie regeneracyjnej oraz iv) badać mechanizmy różnicowania *in vitro*. Dla lepszego wykorzystania tego potencjału konieczne jest poznanie mechanizmów reprogramowania. Dotychczasowe badania pokazały, że w przypadku najczęściej wykorzystywanych komórek – fibroblastów, pierwszy etap tego procesu stanowi przejście mezenchymalno-nabłonkowe, w trakcie którego komórki te tracą mezenchymalny, a uzyskują nabłonkowy fenotyp, charakterystyczny dla macierzystych komórek zarodkowych. Niemniej zmiany te przebiegają z bardzo mało wydajnością, a główną barierą dla skutecznego reprogramowania stanowi białko p53, aktywowane przez stres komórkowy wywołany wprowadzeniem czynników transkrypcyjnych inicjujących proces powstawania iPSCs. Jednym z mediatorów działania p53 jest z kolei cząsteczka mikroRNA – miR-34a, której zwiększona ekspresja prowadzi do zahamowania wzrostu komórek i apoptozy (Choi *et al.* *Nat Cell Biol.* 2011).

Jednym z głównym mechanizmów odpowiedzi komórek na stres, w tym stres oksydacyjny, jest aktywacja czynnika transkrypcyjnego Nrf2, który indukuje ekspresję wielu białek odpowiedzialnych za utrzymanie odpowiedniej homeostazy komórkowej. Wśród nich ważną rolę odgrywa oksygenaza hemowa-1 (HO-1), enzym prowadzący reakcję degradacji hemu z wytworzeniem tlenku węgla (CO), jonów żelaza oraz biliwerdyny. Produkty aktywności enzymatycznej HO-1 pełnią funkcje przeciwutleniające, anty-apoptotyczne, przeciwzapalne oraz pro-angiogenne, co ma szczególne znaczenie w funkcjonowaniu m.in. śródbłonna i jego upośledzenia w przypadku cukrzycy, kiedy może dochodzić do obniżenia poziomu HO-1 w komórkach. Co ważne, HO-1 odgrywa również istotną rolę w różnicowaniu komórek macierzystych. W szczególności, HO-1 wpływa na biogenezę cząsteczek mikroRNA i w konsekwencji na różnicowanie mioblastów do mięśni szkieletowych (Kozakowska, Cieśla *et al.* *Antioxid Redox Signal* 2012). Brak genu *Hmox1* (kodującego HO-1) wpływa także na rozwój zarodkowy. Biorąc pod uwagę złożoną naturę procesu reprogramowania, potencjał komórek iPSC w badaniu podłoża różnych chorób oraz ważny wpływ ścieżki sygnałowej Nrf2/HO-1 na funkcjonowanie komórek macierzystych w niniejszej pracy podjęto próbę określenia roli Nrf2 oraz HO-1 w otrzymywaniu i różnicowaniu komórek iPSCs.

W pierwszym etapie opracowano metody izolacji pierwotnych fibroblastów z mysich ogonów oraz produkcji policistronowych wektorów lentiwirusowych przenoszących sekwencje kodujące cztery czynniki reprogramujące: OCT4, KLF4, SOX2 oraz c-MYC w obrębie jednej kasety ekspresyjnej (wektory STEMCCA). Umożliwiło to zoptymalizowanie procesu reprogramowania mysich komórek, a przez to zbadania w nim roli białek HO-1 i Nrf2. Wykorzystanie w doświadczeniach komórek izolowanych z myszy kontrolnych oraz pozbawionych genu *Hmox1* (*Hmox1*<sup>-/-</sup>) pozwoliło zaobserwować zmniejszoną wydajność otrzymywania kolonii iPSCs w przypadku komórek *Hmox1*<sup>-/-</sup>. Komórki te nie wykazywały

zwiększonego poziomu reaktywnych form tlenu oraz zwiększonej apoptozy w pierwszych dniach reprogramowania, natomiast zaobserwowano w nich podwyższony poziom p53 oraz regulowanych przez p53: cząsteczki miR-34a oraz białka 14-3-3 $\sigma$ , które hamuje komórki w fazie G2/M cyklu komórkowego. Dalsza analiza pozwoliła zaobserwować takie zahamowanie cyklu komórkowego w fibroblastach pozbawionych HO-1. Zmniejszoną wydajność reprogramowania komórek *Hmox1*<sup>-/-</sup> potwierdziła również analiza białek charakterystycznych dla przejścia mezenchymalno-nabłonkowego: obniżona ekspresja specyficznej dla fenotypu nabłonkowego E-kadheryny oraz podwyższona ekspresja specyficznej dla fenotypu mezenchymalnego N-kadheryny w porównaniu z fibroblastami kontrolnymi. Dodatkowo, zastosowanie protoporfiryny IX kobaltu, która indukuje ekspresję *Hmox1* w komórkach zwiększało wydajność procesu reprogramowania. Następnie sprawdzono, czy związki drobnocząsteczkowe, których pozytywny wpływ na efektywność otrzymywania iPSCs opisano w literaturze (Huangfu *et al.* Nat Biotech 2008) regulują ekspresję HO-1 w mysich fibroblastach. Okazało się, że kwas walproinowy, będący inhibitorem deacetylaz histonowych, obniża poziom HO-1 w komórkach i zarazem zmniejsza wydajność reprogramowania pierwotnych mysich fibroblastów. Podobnie jak w przypadku fibroblastów *Hmox1*<sup>-/-</sup>, komórki wyizolowane z myszy pozbawionych genu kodującego Nrf2 (*Nfe2l2*<sup>-/-</sup>) reprogramowały z niższą wydajnością w porównaniu z fibroblastami kontrolnymi oraz wykazywały obniżoną ekspresję *Hmox1*. Natomiast aktywacja czynnika Nrf2 za pomocą sulforafanu pozwoliła zwiększyć efektywność otrzymywania komórek iPSC.

Komórki iPSC kontrolne oraz *Hmox1*<sup>-/-</sup> wykazywały ekspresję białek charakterystycznych dla macierzystych komórek zarodkowych, takich jak Oct4, Sox2 i alkaliczna fosfataza, a także obecność antygenu powierzchniowego SSEA1 oraz wiązanie barwnika CDy1 (Im *et al.* Angew Chem Int Ed Engl. 2010). Dodatkowo były one zdolne do różnicowania *in vitro* w komórki pochodzące z wszystkich trzech listków zarodkowych, niemniej iPSCs *Hmox1*<sup>-/-</sup> tworzyły mniejszą liczbę kurczących się kardiomiocytów oraz nie tworzyły potworniaków po podskórnym podaniu do myszy z upośledzonym układem immunologicznym, w przeciwieństwie do komórek kontrolnych.

W badaniach uzyskano ponadto komórki iPSC z myszy *Lep<sup>db/db</sup>*, będących modelem cukrzycy typu drugiego oraz reprogramowano ludzkie fibroblasty izolowane z pacjentów z cukrzycą monogenową typu HNF1A MODY (Stepniewski *et al.* Sci Rep 2015). Otrzymane w mysie *db/db* iPSCs wykazywały ekspresję białek charakterystycznych dla komórek pluripotencjalnych oraz posiadały zdolność do różnicowania *in vitro* i *in vivo* do komórek pochodzących ze wszystkich trzech listków zarodkowych. Niemniej dalsza analiza pozwoliła zaobserwować obniżoną ekspresję HO-1 w tych komórkach, ich zmniejszoną zdolność do różnicowania w kierunku komórek o fenotypie śródbłonkowym, które dodatkowo wykazywały obniżony potencjał angiogeny. Ludzkie fibroblasty poddane procesowi reprogramowania przekształciły się w komórki wykazujące ekspresję białek charakterystycznych dla macierzystych komórek zarodkowych, były również zdolne do różnicowania *in vitro* w kierunku komórek trzustki, charakteryzujących się ekspresją insuliny oraz produkujących glukagon.

Podsumowując, ścieżka sygnałowa Nrf2/HO-1 odgrywa rolę w procesie reprogramowania komórek somatycznych w kierunku komórek pluripotencjalnych. Brak genów kodujących oba te czynniki obniża wydajność tego procesu a ich aktywacja zwiększa liczbę otrzymywanych kolonii iPSCs. HO-1 może regulować te przemiany poprzez wpływ na białko p53 oraz zależne od niego miR-34a oraz czynnik 14-3-3 $\sigma$ . Co więcej, komórki pozbawione HO-1 wykazują również upośledzony potencjał do różnicowania *in vitro* i *in vivo*. Prowadzone badania mogą się przyczynić do lepszego zrozumienia mechanizmów schorzeń takich jak cukrzyca czy choroby układu krążenia, w których HO-1 odgrywa ważną rolę.

30.03.2016  
Janek Stepniewski