

## STRESZCZENIE PRACY DOKTORSKIEJ – K. Szade

### Ochrona hematopoetycznych komórek macierzystych przed przedwczesnym starzeniem – rola oksygenazy hemowej-1.

Hematopoetyczne komórki macierzyste (HSC) podtrzymują produkcję wszystkich komórek krwi przez okres całego życia, jednakże wraz ze starzeniem się organizmu stopniowo tracą swój potencjał regeneracyjny. Zmiany w HSC związane ze starzeniem się są dobrze poznane, ale mechanizmy odpowiadające za ochronę komórek HSC przed tymi zmianami pozostają w dużej mierze niewyjaśnione. Ważnym białkiem cytoprotekcyjnym i antyapoptotycznym biorącym udział w ochronie dojrzałych komórek hematopoetycznych jest oksygenaza hemowa-1 (HO-1). Nie wiadomo jednak, czy enzym ten wpływa na funkcjonowanie HSC.

Ponadto, w ostatnich latach pojawiły się doniesienia sugerujące, że potencjał do różnicowania hematopoetycznego w postnatalnym organizmie posiadają także komórki spoza linii hematopoetycznej. Jedną z takich domniemyanych populacji, nazwaną VSEL (*ang. very small embryonic-like cells*), zdefiniowano jako komórki macierzyste o właściwościach pluripotencjalnych, charakteryzujące się małymi rozmiarami, niewykazujące ekspresji markerów dojrzałych komórek krwi (*ang. lineage markers, Lin*) oraz hematopoetycznego markera CD45, ale posiadające ekspresję Sca-1 (czyli: Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>). Postulowane właściwości VSEL nie zostały jednak zweryfikowane na poziomie pojedynczej komórki, co jest niezbędne do potwierdzenia ich wielokierunkowego różnicowania hematopoetycznego

Celem niniejszej pracy było zbadanie, czy komórki krwi w organizmie postnatalnym mogą wywodzić się z niehematopoetycznej frakcji Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>, czy też wyłącznie ze zdefiniowanych HSC. Po sprawdzeniu tej możliwości, kolejnym krokiem było zweryfikowanie hipotezy, że aktywność HO-1 chroni komórki macierzyste przed przedwczesnym starzeniem się i wyczerpaniem hematopoetycznego potencjału regeneracyjnego.

W pierwszym etapie badań wykazaliśmy, że ekspresja markerów c-Kit i KDR wyróżniła spośród komórek o fenotypie Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> trzy subpopulacje: c-Kit<sup>+</sup>KDR<sup>-</sup>, c-Kit<sup>-</sup>KDR<sup>+</sup>, c-Kit<sup>-</sup>KDR<sup>-</sup>. Analiza z wykorzystaniem cytometrii przepływowej i obrazowej

(ImageStream) wykazała, że subpopulacja c-Kit<sup>+</sup>KDR<sup>-</sup> zawiera wyłącznie małe komórki (FSC<sup>low</sup>), spełniające kryterium wielkości komórek VSEL. Subpopulacja c-Kit<sup>-</sup>KDR<sup>+</sup> zawierała wyłącznie większe komórki, natomiast subpopulacja c-Kit<sup>-</sup>KDR<sup>-</sup> była wzbogacona w komórki apoptotyczne wiążące aneksynę V. Analizy RT-PCR nie wykazały ekspresji pluripotencjalnego markera Oct-4A w całym szpiku, subpopulacji Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>FSC<sup>low</sup>, jak również w sortowanych, pojedynczych komórkach Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>FSC<sup>low</sup>.

Pojedynczo sortowane komórki Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup> nie tworzyły kolonii hematopoetycznych, nawet w kokulturze z komórkami OP9, w przeciwieństwie do hematopoetycznych komórek progenitorowych Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>. Dalsze badania wykazały, że populacja Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup> jest wzbogacona w komórki wczesnoapoptotyczne charakteryzujące się fragmentacją chromatyny. Może być również zanieczyszczona jądrami usuwanymi z erytroblastów podczas erytropoezy.

Pierwszy etap naszych doświadczeń wykazał więc, że mysia populacja komórek szpiku kostnego o fenotypie Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>FSC<sup>low</sup> jest heterogenna i nie ma ekspresji czynnika transkrypcyjnego Oct4A, charakterystycznego dla komórek pluripotencjalnych. Co najważniejsze, populacja ta nie wykazuje potencjału hematopoetycznego i jest wzbogacona w komórki wczesnoapoptotyczne. Dlatego w dalszym etapie badań skoncentrowaliśmy się na określeniu roli HO-1 w starzeniu się ściśle zdefiniowanych komórek HSC.

Wykazaliśmy, że młode myszy pozbawione genu HO-1 (HO-1<sup>-/-</sup>) charakteryzują się ekspansją długoterminowo odnawiających się hematopoetycznych komórek macierzystych w szpiku kostnym (*ang. long term HSC, LT-HSC*) zdefiniowanych jako Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>CD48<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup> oraz przewagą komórek linii mieloidalnej nad linią limfoidalną wśród komórek krwi. Komórki LT-HSC z myszy HO-1<sup>-/-</sup> wykazywały również wyższy sygnał fosforylowanej formy histonu  $\gamma$ H2aX, który jest markerem uszkodzeń DNA. Komórki LT-HSC z myszy HO-1<sup>-/-</sup> przeszczepione do naświetlonych myszy typu dzikiego (HO-1<sup>+/+</sup>) rekonstruowały hematopoezę w mniejszym stopniu, niż kontrolne komórki typu dzikiego. Wszystkie powyższe zaburzenia komórek LT-HSC obserwowane u młodych myszy HO-1<sup>-/-</sup> pojawiały się w komórkach LT-HSC u starych HO-1<sup>+/+</sup>.

Otrzymane wyniki wskazują, że brak oksygenazy hemowej-1 powoduje przedwczesne starzenie się komórek LT-HSC. Jest ono związane z ich wzmożoną aktywacją i proliferacją. Zaobserwowaliśmy, że u młodych myszy HO-1<sup>-/-</sup> więcej komórek LT-HSC jest w fazach G1 i G2/S/M cyklu komórkowego, a mniej w fazie G0 w porównaniu do myszy HO-1<sup>+/+</sup>. LT-HSC z myszy HO-1<sup>-/-</sup> wykazują także niższy poziom ATP, co może świadczyć o zaburzonym metabolizmie.

Dla prawidłowego funkcjonowania komórek LT-HSC niezbędna jest wyspecjalizowana nisza szpikowa. Kolejne doświadczenia miały na celu wyjaśnienie, czy przedwczesne starzenie się LT-HSC u myszy HO-1<sup>-/-</sup> jest związane z brakiem HO-1 w samych komórkach LT-HSC, czy w komórkach niszy. Wykazaliśmy, że najwyższa ekspresja HO-1 w szpiku kostnym charakteryzuje komórki śródbłonna oraz siateczkowate komórki mezenchymalne (*ang. CXCL12-abundant reticular cells, CAR*), które tworzą niszę HSC. Natomiast w samych hematopoetycznych komórkach macierzystych i progenitorowych ekspresja HO-1 była niska.

W celu sprawdzenia, czy aktywność HO-1 w niszy szpikowej jest kluczowa dla ochrony komórek LT-HSC, przeszczepiliśmy komórki LT-HSC z myszy HO-1<sup>+/+</sup> do myszy-biorców HO-1<sup>+/+</sup> lub HO-1<sup>-/-</sup>. Po 32 tygodniach myszy-biorcy o genotypie HO-1<sup>-/-</sup> wykazywały mniejszy chimeryzm we krwi obwodowej, a także posiadały w szpiku kostnym mniej LT-HSC pochodzących od przeszczepionych komórek. Następnie, komórki pochodzące od dawcy ze szpiku kostnego pierwszych biorców HO-1<sup>+/+</sup> lub HO-1<sup>-/-</sup> zostały przeszczepione do kolejnych biorców drugorzędowych, wyłącznie o genotypie HO-1<sup>+/+</sup>. Jedynie komórki, które pierwotnie przeszczepione były do myszy HO-1<sup>+/+</sup> rekonstruowały układ hematopoetyczny u biorców drugorzędowych, w przeciwieństwie do komórek przeszczepionych pierwotnie do biorców HO-1<sup>-/-</sup>, które nie przyczyniały się do chimeryzmu u biorców drugorzędowych.

Podsumowując, HO-1 zmniejsza proliferację i aktywację hematopoetycznych komórek macierzystych, oraz zmniejsza w nich poziom uszkodzeń DNA. HO-1 jest również niezbędna do prawidłowego funkcjonowania niszy szpikowej, a jej brak w niszy hematopoetycznej powoduje przedwczesne starzenie i wyczerpywanie się potencjału regeneracyjnego komórek LT-HSC.

**Lista publikacji, na podstawie których została przygotowana rozprawa:**

1. Comment on: The proper criteria for identification and sorting of very small embryonic-like stem cells, and some nomenclature issues.

**Szade K**, Bukowska-Strakova K, Nowak WN, Jozkowicz A, Dulak J.

Stem Cells Dev. 2014 Apr 1;23(7):714-6. doi: 10.1089/scd.2014.0028..

2. Role of heme oxygenase-1 in postnatal differentiation of stem cells: a possible cross-talk with microRNAs.

Kozakowska M, **Szade K**, Dulak J, Jozkowicz A.

Antioxid Redox Signal. 2014 Apr 10;20(11):1827-50. doi: 10.1089/ars.2013.5341.  
Epub 2014 Jan 30.

3. Murine bone marrow Lin<sup>-</sup>Sca<sup>-1</sup>CD45<sup>-</sup> very small embryonic-like (VSEL) cells are heterogeneous population lacking Oct-4A expression.

**Szade K**, Bukowska-Strakova K, Nowak WN, Szade A, Kachamakova-Trojanowska N, Zukowska M, Jozkowicz A, Dulak J.

PLoS One. 2013 May 17;8(5):e63329. doi: 10.1371/journal.pone.0063329. Print 2013.