

Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum  
Wydział Lekarski



**Maciej Sułkowski**

Zastosowanie ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych w terapii chorób neurodegeneracyjnych na przykładzie zwierzęcego modelu choroby Parkinsona

*Praca doktorska*

Promotorzy: Prof. dr hab. Marcin Majka,  
Prof. dr hab. Krystyna Ossowska.

Pracę wykonano w **Zakładzie Transplantologii** Katedry Immunologii Klinicznej i Transplantologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, którego kierownikiem jest prof. dr hab. Marcin Majka, oraz w **Zakładzie Neuro-psychofarmakologii** Instytutu Farmakologii Polskiej Akademii Nauk, którego kierownikiem jest prof. dr hab. Krystyna Ossowska.

Kraków, 2014



*Składam serdeczne podziękowania moim promotorom:  
**prof. dr hab. Marcinowi Majce** oraz **prof. dr hab. Krystynie Ossowskiej** za naukę, porady, liczne wskazówki dotyczące przygotowania niniejszej pracy oraz bardzo ożywcze dyskusje naukowe.*

*Dziękuję też wszystkim **pracownikom, doktorantom i magistrantom** Zakładu Transplantologii za pomoc, współpracę, cenne uwagi oraz stworzenie wspaniałej atmosfery pracy.*

*Dziękuję mojej **rodzinie oraz przyjaciołom** za ogrom cierpliwości, jaki dla mnie mieli w trakcie tego doktoratu.*

*Jestem również bardzo wdzięczny **twórcom ISD MOL MED** za zapewnienie mi wspaniałych, stymulujących studiów doktoranckich.*

## Spis treści

Wykaz skrótów .....	6
Użyte programy komputerowe .....	9
Źródła internetowe .....	9
Streszczenie .....	10
Abstract .....	12
1. Wstęp .....	14
1.1 Komórki macierzyste .....	14
1.1.1 Somatyczne komórki macierzyste .....	16
1.1.2 Embrionalne komórki macierzyste .....	18
1.1.3 Uzyskanie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych .....	21
1.1.4 Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste stwarzają nowe perspektywy .....	23
1.1.5 Metody uzyskiwania indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych .....	25
1.1.6 Potencjalne kliniczne zastosowanie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych .....	29
1.1.7 Ograniczenia zastosowań indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych oraz sposoby ich pokonywania .....	32
1.2 Choroba Parkinsona .....	37
1.2.1 Obecne strategie oraz perspektywy terapii choroby Parkinsona .....	40
1.2.2 Modele choroby Parkinsona .....	42
2. Cel pracy .....	47
3. Materiały i metody .....	48
3.1 Materiały i odczynniki .....	48
3.2 Metody .....	53
3.2.1 Hodowle komórkowe .....	53
3.2.2 Izolacja ludzkich keratynocytów z wyrwanego włosa .....	55
3.2.3 Izolacja i inaktywacja mitotyczna mysich embrionalnych fibroblastów (MEF) .....	55
3.2.4 Przygotowanie szalek opłaszczonych żelatyną, matryzelem oraz poliornityną/lamininą .....	56
3.2.5 Reprogramowanie ludzkich keratynocytów z użyciem wektora na bazie wirusa Sendai .....	57
3.2.6 Hodowla, pasaż, mrożenie oraz rozmrażanie komórek iPS .....	59
3.2.7 Różnicowanie komórek piPS do kardiomiocytów .....	60

3.2.8 Ocena ekspresji alkalicznej fosfatazy.....	60
3.2.9 RT-PCR.....	60
3.2.10 Barwienie immunocytofluorescencyjne .....	64
3.2.11 Barwienie i analiza cytofluorymetryczna komórek.....	66
3.2.12 Różnicowanie komórek iPS do neuronów dopaminergicznych.....	67
3.2.13 Identyfikacja dopaminy w medium hodowlanym metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektroskopią masową (HPLC-MS) .....	73
3.2.14 Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM) komórek produkujących melaninę .....	75
3.2.15 Identyfikacja melaniny metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) .....	75
3.2.16 Barwienie Fontany-Masson'a.....	76
3.2.17 Indukcja i weryfikacja szczurzego modelu choroby Parkinsona oraz przeszczepienie wyróżnicowanych komórek .....	76
3.2.18 Barwienie immunohistochemiczne skrawków mózgów szczurzych .....	79
3.2.19 Indukcja oraz ocena mysiego modelu choroby Parkinsona .....	80
3.2.20 Konstrukcja plazmidów .....	82
3.2.21 Produkcja i mianowanie wektorów lentiwirusowych.....	83
3.2.22 Modyfikacja genetyczna komórek .....	86
3.2.23 Test proliferacji komórek .....	87
3.2.24 Test komunikacji międzykomórkowej za pośrednictwem złącz szczelinowych (GJIC) oraz test efektu sąsiedztwa.....	88
3.2.25 Test tworzenia teratom oraz guzów nowotworowych po ksenotransplantacji komórek ludzkich do myszy z upośledzoną odpornością. Strategia terapii samobójczej <i>in vivo</i> .....	89
3.2.26 Analiza statystyczna .....	90
4. Wyniki .....	91
4.1 Izolacja i modyfikacja genetyczna ludzkich keratynocytów .....	91
4.2 Reprogramowanie ludzkich keratynocytów z wyrwanego włosa do komórek iPS oraz ich charakterystyka.....	93
4.3 Charakterystyka komórek piPS .....	97
4.4 Różnicowanie komórek piPS do neuronów dopaminergicznych.....	100
4.4.1 Protokół I.....	100
4.4.2 Protokół II.....	107
4.4.3 Protokół III .....	108

4.5 Analiza komórek produkujących czarny pigment.....	114
4.6 Opracowanie zwierzęcego modelu choroby Parkinsona oraz transplantacja uzyskanych zróżnicowanych komórek .....	123
4.7 Opracowanie <i>genetycznego zabezpieczenia</i> indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych opartego na <i>genie samobójczym</i> .....	128
4.7.1 Przygotowanie oraz produkcja wektorów wirusowych.....	128
4.7.2 Wyprowadzenie zmodyfikowanych genetycznie linii komórek Rh30.....	130
4.7.3 Test skuteczności strategii opartej o <i>gen samobójczy in vitro</i> .....	131
4.7.4 Test skuteczności strategii opartej o <i>gen samobójczy in vivo</i> .....	135
4.7.5 Wyprowadzenie zmodyfikowanych genetycznie linii komórek piPS.....	138
5. Dyskusja.....	140
5.1 Izolacja komórek somatycznych do reprogramowania .....	140
5.2 Reprogramowanie ludzkich keratynocytów do komórek iPS .....	141
5.3 Charakterystyka komórek piPS .....	145
5.4 Różnicowanie komórek piPS do neuronów dopaminergicznych.....	147
5.4.1 Protokół I.....	148
5.4.2 Protokół II.....	151
5.4.3 Protokół III .....	153
5.4.4 Alternatywa dla różnicowania komórek iPS <i>in vitro</i> .....	155
5.5 Analiza komórek produkujących czarny pigment.....	156
5.6 Opracowanie zwierzęcego modelu choroby Parkinsona oraz transplantacja uzyskanych komórek.....	162
5.7 Opracowanie <i>genetycznego zabezpieczenia</i> indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych opartego na <i>genie samobójczym</i> .....	167
5.8 Dalsze plany badawcze.....	172
6. Wnioski.....	174
Załącznik 1.....	176
Bibliografia .....	179

## Wykaz skrótów

- 3-MT**- 3-MetoksyTyramina,  
**3-NT** - 3-NitroTyrozyna,  
**6-OHDA** – 6-hydroksydopamina,  
**AA** – ang. *Ascorbic Acid*, kwas askorbinowy,  
**AP** - ang. *Alkaline Phosphatase*, alkaliczna fosfataza,  
**BDNF** – ang. *Brain Derived Neural Factor*, czynnik neuronalny pochodzenia mózgowego,  
**bFGF** – ang. *basic Fibroblast Growth Factor*, zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów,  
**BSA** - ang. *Bovine Serum Albumine*, albumina z surowicy wołowej,  
**cAMP** – 3',5'-cykliczny adenozybonomonofosforan,  
**CMC** – ang. *CarboxyMethyl Celulose*, karboksy-metylo-celuloza,  
**CMV** – ang. *CytoMegaloVirus*, wirus cytomegalii, cytomegalowirus,  
**COMT** - ang. *Catechol-O-Methyl Transferase*, katecholo-O-metylotransferaza,  
**DA** – dopamina,  
**DAT** – ang. *DA Transporter*, transporter dopaminy,  
**DMEM** – ang. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*,  
**DNA** – ang. *DeoxyriboNucleic Acid*, kwas deoksyrybonukleinowy,  
**dNTPs** – mieszanina deoksyrybonukleotydów,  
**DOPAC**- ang. *3,4-DihydroxyPhenylacetic ACid*, kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy  
**EB** - ang. *Embryoid Bodies*, ciała embrioidalne, kule zarodkowe,  
**EDGS** – ang. *EpiDermal Growth Supplement*, suplement do hodowli komórek naskórka,  
**EDTA** – ang. *EthyleneDiamineTetracetic Acid*, kwas etyleno-diamino-tetraoctowy,  
**EPR** – ang. *Electron Paramagnetic Resonance*, elektronowy rezonans paramagnetyczny,  
**ESC** - ang. *Embryonic Stem Cells*, embrionalne komórki macierzyste,  
**FBS** - ang. *Fetal Bovine Serum*, płodowa surowica bydłęca,  
**FGF** – ang. *Fibroblast Growth Factor*, czynnik wzrostu fibroblastów,  
**FITC** - ang. *Fluorescein IsoThioCyanate*, izotiocyjanian fluoresceiny,  
**GAPDH** – ang. *GlycerAldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase*, dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego,  
**GCV** - ang. *GanCycloVir*, gancyklowir,

**GDNF**- ang. *Glial Derived Neural Factor*, czynnik neuronalny pochodzenia glejowego,  
**GFAP** – ang. *Glial Fibrillary Acidic Protein*, kwaśne białko włókienkowe,  
**GFP** – ang. *Green Fluorescent Protein*, białko zielonej fluorescencji,  
**GJIC** – ang. *Gap-Junctional Intercellular Communication*, komunikacja międzykomórkowa za pośrednictwem złącz szczelinowych,  
**h** - przedrostek określający komórki/geny pochodzenia ludzkiego (od ang. *human*),  
**HBSS** – ang. *Hank's Buffered Salt Solution*, zbuforowany roztwór soli Hank'a,  
**HPLC** – ang. *High Pressure Liquid Chromatography*, wysokosprawna chromatografia cieczowa,  
**HPLC-MS** – ang. *High Pressure Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy*, wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektroskopią masową,  
**HSC** – ang. *Hematopoietic Stem Cells*, hematopoetyczne komórki macierzyste,  
**HVA** – ang. *HomoVanillic Acid*, kwas homowanilinowy,  
**iMEF** – ang. *inactivated Mouse Embryonic Fibroblast*, inaktywowane mitotycznie mysie embrionalne fibroblasty,  
**iPS** – ang. *induced Pluripotent Stem cells*, indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste,  
**IRES** – ang. *Internal Ribosome Entry Site*, sekwencja wewnętrznego wejścia rybosomu,  
**kiPS** – ang. *keratinocytes induced pluripotent Stem Cells*, indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste otrzymane z keratynocytów,  
**KSR** - ang. *Knockout Serum Replacement*, substytut surowicy do hodowli komórek macierzystych,  
**LRRK2** – ang. *Leucine-Rich Repeat Kinase 2*, kinaza bogata w powtórzenia leucynowe 2,  
**m** - przedrostek określający komórki/geny pochodzenia mysiego (od ang. *murine*),  
**MAO-B** – monoaminooksydaza B,  
**MEF** - ang. *Mouse Embryonic Fibroblasts*, mysie embrionalne fibroblasty,  
**MFB** - ang. *Medial Forebrain Bundle*, pęczek przyśrodkowy przodomózgowia,  
**MITF** - ang. *Microphthalmia-associated Transcription Factor*, czynniki transkrypcyjny związany z mikroftalmią,  
**MMLV** - ang. *Murine Moloney's Leukemia Virus*, onko-retrowirus mysiej białaczki Moloney'a,  
**MOI** - ang. *Multiplicity Of Infection*, wielokrotność infekcji,  
**MSC** - ang. *Mesenchymal Stem Cells*, mezenchymalne komórki macierzyste,

**NEAA** – ang. *Non-Essential AminoAcids*, aminokwasy nie niezbędne,

**NOD/SCID** – ang. *Non-Obese Diabetic/ Severe Combined ImmunoDeficiency* – szczep myszy z upośledzonym układem odpornościowym w skutek ciężkiego złożonego niedoboru odporności,

**NPC** – ang. *Neural Progenitor Cells*, progenitory neuronalne,

**Nurr1** – ang. *NUclear Receptor Related 1 protein*, białko 1 związane z receptorem jądrowym,

**P/S** – Penicylina/Streptomycyna,

**PBS** – ang. *Phosphate Buffered Saline*, sól fizjologiczna zbuforowana buforem fosforanowym,

**PCR** – ang. *Polymerase Chain Reaction*, łańcuchowa reakcja polimerazy,

**PD** – ang. *Parkinson's Disease*, choroba Parkinsona,

**PE** – ang. *PhycoErythrin*, fikoerytryna,

**piPS** – ang. *protein induced pluripotent Stem Cells*, indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste otrzymane za pomocą białek,

**RNA** – ang. *RiboNucleic Acid*, kwas rybonukleinowy,

**ROS** – ang. *Reactive Oxygen Species*, reaktywne formy tlenu,

**RT** – ang. *Reverse Transcription*, odwrotna transkrypcja,

**SCNT** - ang. *Somatic Cell Nuclear Transfer*, transfer jądra komórki somatycznej,

**SSC** - ang. *Somatic Stem Cells*, somatyczne komórki macierzyste, zwane też dojrzałymi lub dorosłymi komórkami macierzystymi **ASC** (ang. *Adult Stem Cells*),

**SSEA** - ang. *Stage Specific Embryonic Antigen*, antygen specyficzny dla etapu embrionalnego,

**TEM** – ang. *Transmission Electron Microscopy*, transmisyjna mikroskopia elektronowa,

**TGF** - ang. *Transforming Growth Factor*, transformujący czynnik wzrostowy,

**TH** – ang. *Tyrosine Hydroxylase* – hydroksylaza tyrozyny,

**TK** – ang. *Thymidine Kinase*, kinaza tymidynowa,

**TRA** – ang. *Tumor Rejection Antigen*, antygen odrzucenia nowotworu,

**TU** – ang. *Transducing Units*, jednostki transdukcyjne,

**U** – ang. *Unit*, jednostka,

**UbC** – Ubikwityna C,

**WT** - ang. *Wild Type*, typ dziki, niemodyfikowany genetycznie,



## Użyte programy komputerowe

Programy pakietu MS Office 2010: **Word, Excel, Power Point** – odpowiednio: kreator tekstu, program do obliczeń i przygotowania wykresów, program do tworzenia slajdów - paneli wyników oraz schematów,

**Mendeley Desktop** – kreator bibliografii oraz menedżer publikacji naukowych,

**Adobe Photoshop CS5** – edytor zdjęć,

**Cylogic** – program do analizy danych z cytometru przepływowego,

**Bioedit** – program do analizy sekwencji nukleotydowej DNA oraz aminokwasowej białek,

**Lasergene** – program do tworzenia map plazmidów oraz analizy sekwencji DNA,

**FastPCR** – kreator programów PCR oraz program do analizy właściwości primerów,

**STATISTICA 10**- program do analiz statystycznych,

## Źródła internetowe

<http://stemcells.nih.gov/>,

<http://www.biotechnologyonline.gov.au>,

<http://gladstoneinstitutes.org/>,

<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>,

<http://www.wiley.com//legacy/wileychi/genmed/clinical/>,

## Streszczenie

Choroba Parkinsona to druga najczęstsza choroba neurodegeneracyjna. Jej przyczyną jest specyficzna degeneracja neuronów produkujących dopaminę – tzw. neuronów dopaminergicznych - w istocie czarnej śródmózgowia, o nieznaney w większości przypadków etiologii. Jedynie 10% zachorowań ma potwierdzone jednoznacznie, dziedziczne podłoże genetyczne. Neurodegeneracja ta prowadzi do znacznego spadku zawartości dopaminy w ośrodkowym układzie nerwowym i tym samym wystąpieniem charakterystycznych objawów klinicznych do których należą m.in. bradykineza, drżenia spoczynkowe oraz sztywność mięśniowa (tzw. triada objawów pierwotnych). Choroba jest postępująca, a objawy ulegają pogorszeniu. Dotychczasowe metody leczenia choroby Parkinsona skupiają się na farmakologicznej rekonstytucji dopaminy. Jest to jednak leczenie objawowe, a jego skuteczność spada w czasie. Dlatego stale poszukuje się nowych strategii terapeutycznych, które byłyby w stanie usunąć przyczynę choroby, a nie tylko jej objawy. Wśród najbardziej obiecujących podejść wymienia się terapię regeneracyjną z użyciem komórek macierzystych.

Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste, wynalezione w 2006 roku przez grupę Yamanaki, otworzyły zupełnie nowy rozdział w potencjalnym wykorzystaniu komórek macierzystych w medycynie regeneracyjnej. Można je uzyskać w sposób specyficzny dla danego organizmu. Jako pluripotencjalne mają zdolność do różnicowania w niemal każdy typ komórki somatycznej. Dlatego stanowią one wielką nadzieję dla terapii regeneracyjnej wielu schorzeń, w tym choroby Parkinsona.

Głównym celem niniejszej pracy było określenie przydatności indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych, oraz otrzymywanych przez ich różnicowanie *in vitro* neuronów dopaminergicznych, w terapii choroby Parkinsona na przykładzie zwierzęcego modelu tej choroby.

W pierwszej części pracy uzyskano oraz scharakteryzowano komórki iPS od zdrowych dawców oraz pacjentów cierpiących na chorobę Parkinsona. Wyizolowane komórki somatyczne skutecznie zreprogramowano za pomocą wektora wirusowego stworzonego na bazie wirusa Sendai z wydajnością rzędu 0,01%.

Równocześnie prowadzono różnicowanie zakupionych indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych w kierunku neuronów dopaminergicznych

za pomocą trzech protokołów różnicowania. Dwa z nich bazowały na indukcji różnicowania poprzez etap hodowli ciałek embrioidalnych w zawieszynie, jeden poprzez podwójną inhibicję szlaku sygnałowego SMAD. Każdy z nich doprowadził do uzyskania komórek nerwowych posiadających ekspresję specyficznych markerów oraz produkujących dopaminę. Wyniki uzyskane trzema protokołami porównano i wybrano optymalny do uzyskiwania komórek dopaminergicznych w celu wszczepień do zwierzęcych modeli. Niespodziewanie otrzymano także komórki produkujące czarny pigment – z dużym prawdopodobieństwem neuromelaninę obecną w istocie czarnej, strukturze objętej specyficzną neurodegeneracją w chorobie Parkinsona. Uzyskano tym samym bardzo ciekawy model *in vitro*, który może posłużyć do badań nad patogenezą choroby Parkinsona oraz roli w niej neuromelaniny.

W kolejnym kroku otrzymane komórki dopaminergiczne wszczepiono do szczurzego modelu choroby Parkinsona w celu określenia ich potencjału terapeutycznego. Zaobserwowano obiecującą integrację przeszczepionych komórek z tkanką mózgową zwierzęcia. Jednocześnie opracowano dogodny myszy model choroby Parkinsona cechujący się upośledzeniem odporności, który w przyszłości posłuży do kolejnych doświadczeń transplantacyjnych.

W ostatniej części pracy opracowano *genetyczne zabezpieczenie* komórek pozwalające na skuteczną eliminację wszystkich przeszczepionych komórek w razie ich nieprawidłowego funkcjonowania, takiego jak tworzenie guzów. Zwiększono tym samym bezpieczeństwo indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych, co przybliży je do zastosowania w klinice.

Podsumowując, w niniejszej pracy wykazano, że terapia regeneracyjna choroby Parkinsona z użyciem indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych jest bardzo obiecującą strategią pozwalającą na leczenie przyczyn, a nie tylko objawów choroby i w przyszłości może stanowić alternatywę dla obecnych metod terapii chorób neurodegeneracyjnych.

## Abstract

Parkinson's disease (PD) is the second most frequent neurodegenerative disorder. It is caused by a specific degeneration of dopamine-producing (dopaminergic) neurons in midbrain *substantia nigra*. The etiology of the degeneration is unknown in most cases - only 10% of them have proved genetic and hereditary background. The neurodegeneration leads to large decrease in dopamine content in central nervous system and characteristic behavioral symptoms that include resting tremor, posture disturbance and muscle rigidity. The disease is progressive and the symptoms intensify in time. Present therapeutic strategies mainly involve pharmacological reconstitution of dopamine. Unfortunately, it is only symptomatic therapy and its effectiveness decrease in time. Because of that, there is a constant search for new therapies which could not only improve the symptoms but also cure the cause of the disease. Among most promising approaches, regenerative stem cell therapy appears to be most encouraging.

Invented in 2006 by Shinya Yamanaka's group, induced pluripotent stem cells (iPS) have opened a new chapter in potential application of stem cells in regenerative medicine. They can be acquired in an organism-specific manner. As pluripotent they possess the ability to differentiate into virtually every somatic cell type. Due to these properties iPS cells hold great promise for cell therapy of many disorders, including Parkinson's disease.

The main goal of this study was to assess the usefulness of iPS and iPS-derived dopaminergic neurons in PD therapy based on results on animal model of the disease.

In the first part, iPS cells specific for healthy volunteers and Parkinson's disease patients were acquired and characterized. Isolated somatic cells were efficiently reprogrammed with Sendai virus-based vector with efficiency of 0,01%.

Simultaneously, characterized line of purchased iPS cells was differentiated into dopaminergic neurons by three differentiation protocols. Two of them based on induction of differentiation by suspension culture of embryoid bodies, one of them induced differentiation by dual inhibition of SMAD signaling pathway. Each protocol led to generation of neurons expressing specific markers and producing dopamine. Comparison of results allowed selection of optimal protocol for generation of dopaminergic neurons suitable for transplantations into animal models. Unexpectedly, we also acquired cells producing black pigment – most probably neuromelanin present

in *substantia nigra* – structure vulnerable to neurodegeneration in PD. This result suggests generation of very interesting *in vitro* model, which may be used for future research focused on pathomechanisms of Parkinson's disease and putative role of neuromelanin in the pathogenesis.

Subsequently, differentiated dopaminergic neurons were grafted into the brain of rat model of PD in order to determine their therapeutic potential. Promising integration of grafted cells with surrounding brain tissue was observed. In the same time useful murine model of PD with severe immunodeficiency was established, which will be used in future transplantations.

In the last part *genetic safeguard* allowing specific elimination of all grafted cells in case of their malfunction was developed. This approach increases safety of iPS cells and brings closer their future clinical application.

Summarizing, in this study we present that regenerative therapy of Parkinson's disease involving induced pluripotent stem cells is very promising strategy enabling treatment of causes, not only symptoms of disorders and in nearby future may become a real alternative for present therapies of neurodegenerative diseases.

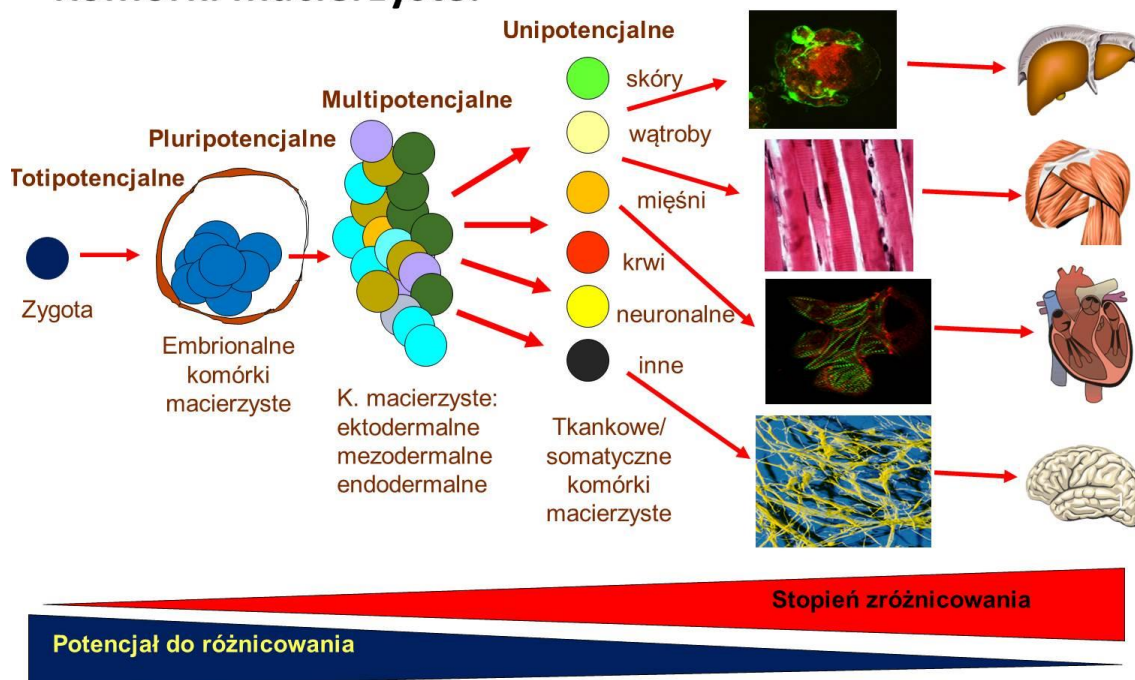
# 1. Wstęp

## 1.1 Komórki macierzyste

Kiedy na początku XX wieku rosyjski histolog Aleksander Maximow badał komórki dające początek komórkom krwi z pewnością nie zdawał sobie sprawy jak niesamowicie rozwinie się dziedzina biologii komórek macierzystych, której dał podwaliny. Termin *komórka macierzysta* (niem. *Stammzelle*) został po raz pierwszy użyty pod koniec XIX w. przez Theodor'a Boveri'ego i Valentin'a Häcker'a do nazwania komórek produkujących komórki płciowe oraz przez Artura Pappenheim'a i Aleksandra Maximow'a właśnie do opisanie komórek mogących wytworzyć krwinki [1]. Najczęściej autorstwo terminu komórki macierzystej przypisuje się temu ostatniemu. W języku polskim termin *komórka macierzysta* zastąpił dosłownie tłumaczony z języka angielskiego (*stem cell*) zwrot *komórka pnia* lub *komórka pienna*.

Komórka macierzysta to charakterystyczny typ komórki zdolny do podziałów asymetrycznych, w wyniku których powstaje komórka macierzysta odnawiająca swoją pulę oraz komórka progenitorowa, bardziej zróżnicowana, która daje początek komórkom różnego typu [2]. Komórki macierzyste są więc odpowiedzialne za wytwarzanie zróżnicowanych komórek potomnych. Ich fizjologiczna rola polega głównie na rozwoju organizmu na etapie embriogenezy oraz na regeneracji tkanek i narządów dorosłych organizmów. Ze względu na potencjał, rozumiany jako zdolność do różnicowania, wyróżnia się wiele typów komórek macierzystych, a ich klasyczną hierarchię prezentuje rycina 1.

## Komórki macierzyste:



**Rycina 1.** Klasyczna hierarchia komórek macierzystych prezentująca wzrastający stopień ich zróżnicowania wraz z rozwojem organizmu. Źródło: wykłady *Komórki macierzyste: teoria i zastosowanie kliniczne*, prof. dr hab. M. Majka, zmodyfikowano.

Pierwszą komórką macierzystą pojawiającą się w toku embriogenezy jest totipotencjalna zygota. Komórki totipotencjalne mają zdolność do różnicowania we wszystkie typy komórek, w tym łożyska. Przykładem takiej komórki jest zapłodniona komórka jajowa dająca początek całemu organizmowi.

Kolejnym typem komórek macierzystych pojawiających się w toku rozwoju organizmu są pluripotencjalne embrionalne komórki macierzyste. Pluripotencjalne komórki mogą dać początek komórkom pochodzącym ze wszystkich trzech listków zarodkowych (endodermy, mezodermy oraz ektodermy) powstających w toku embriogenezy. Mogą one więc wytworzyć wszystkie typy zróżnicowanych komórek, za wyjątkiem komórek budujących trofoblast, który następnie rozwija się w łożysko. Przykładem komórek pluripotencjalnych są embrionalne komórki macierzyste ESC znajdujące się w wewnętrznym węźle zarodkowym blastocysty [3].

Multipotencjalne komórki macierzyste to komórki, które mogą dać początek wielu typom komórek pochodzących z jednego listka zarodkowego. Wyróżniamy endo-, mezo- oraz ektodermalne komórki macierzyste. Mezenchymalne komórki macierzyste MSC to przykład mezodermalnych multipotencjalnych komórek

macierzystych [4]. Mogą one dać początek takim komórkom jak adipocyty, osteocyty czy chondrocyty, a więc różnym komórkom zaliczanym do tkanki łącznej.

Najbardziej zróżnicowanym typem komórek macierzystych są uni- lub oligopotencjalne komórki macierzyste, które rezydują w tkankach i są odpowiedzialne za ich regenerację. Mają one zdolność do wytworzenia jednego lub kilku typów komórek somatycznych. Komórki tego typu nazywane są także progenitorowymi lub prekursorowymi. Przykładem komórek unipotencjalnych są mięśniowe komórki satelitarne wytwarzające komórki mięśni poprzecznie prążkowanych [5].

Z kolei ze względu na pochodzenie komórki macierzyste dzieli się na embrionalne komórki macierzyste (ESC, ang. *Embryonic Stem Cells*) oraz somatyczne komórki macierzyste (SSC, ang. *Somatic Stem Cells*).

### **1.1.1 Somatyczne komórki macierzyste**

Somatyczne lub dorosłe komórki macierzyste rezydują w tkankach i narządach dorosłych organizmów i są odpowiedzialne za ich regenerację. Oczywiście dojrzałe narządy organizmów różnią się pomiędzy sobą zdolnościami regeneracyjnymi, a poszczególne typy somatycznych komórek macierzystych różnią się potencjałem do wytwarzania różnych typów komórek. Uważa się, że w dorosłych organizmach występują komórki multipotencjalne oraz unipotencjalne, a więc o ograniczonym potencjale proliferacyjnym. Dorosłe komórki macierzyste występują w niewielkich ilościach w takich tkankach jak: szpik kostny, trzustka, wątroba, naskórek, rogówka czy siatkówka oka. Co ciekawe niedawno wykazano ich obecność również w dorosłym mózgu [6]. Każdy typ somatycznych komórek macierzystych posiada charakterystyczny zestaw markerów powierzchniowych [7]. Zaletami użycia somatycznych komórek macierzystych w medycynie regeneracyjnej są: ich całkowita zgodność tkankowa z komórkami biorcy (układ autologiczny, w którym komórki do terapii można pobrać z organizmu pacjenta) oraz bezpieczeństwo regeneracji wywołane ograniczonym potencjałem komórek SSC do różnicowania – ich użyciu nie towarzyszy ryzyko nowotworzenia. Niestety w warunkach fizjologicznych jedynie część narządów ulega wystarczającej regeneracji po rozległym uszkodzeniu (np. wątroba), a większość z nich wymaga transplantacji w celu naprawy [8]. Ograniczona dostępność oraz niski



potencjał somatycznych komórek macierzystych do różnicowania to ich największe wady.

W ostatnich latach pojawia się coraz więcej doniesień na temat występowania w dorosłym organizmie komórek, które swoim potencjałem przekraczają ograniczenie różnicowania w komórki jednego listka zarodkowego. Wielu autorów opisuje *somatyczne pluripotencjalne komórki macierzyste* wyizolowane z różnych tkanek oraz nadaje im różne nazwy [9]. Należy zaznaczyć, że w tej dziedzinie panuje spory nieporządek związany z nomenklaturą oraz nazewnictwem potencjału uzyskanych komórek. Wyizolowane komórki są opisywane jako pluripotencjalne ze względu na ich trójlistkowy potencjał do różnicowania *in vitro* lub zestaw markerów powierzchniowych. Przykładami takich komórek są wyizolowane ze szpiku kostnego komórki *MIAMI* (ang. *Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible (MIAMI) cells*) [10], uzyskane z krwi pępowinowej komórki *USSC* (ang. *Unrestricted Somatic Stem Cells*) [11] czy bardzo małe komórki o cechach komórek embrionalnych *VSEL* (ang. *Very Small Embryonic-Like stem cells*) [12].

Ilość prac donoszących o obecności w dorosłym organizmie komórek pluripotencjalnych daje wiele do myślenia. Każde także zweryfikować klasyczną hierarchię komórek macierzystych zaprezentowaną na rycinie 1 oraz powtórnie rozpatrzeć ideę plastyczności somatycznych komórek macierzystych [13], wedle której komórki macierzyste są zdolne do wytwarzania zróżnicowanych typów komórek, które nie leżą w ich kanonicznym potencjale różnicowania. Przyszłe lata powinny przynieść bardziej rozstrzygającą odpowiedź na pytanie, czy w dorosłym organizmie istnieją komórki o potencjale wykraczającym poza barierę jednego listka zarodkowego.

Opisując somatyczne komórki macierzyste warto wspomnieć o nowotworowych komórkach macierzystych *CSC* – (ang. *Cancer Stem Cells*) [14]. Komórki te, wyizolowane dla wielu typów nowotworów, posiadają ekspresję markerów powierzchniowych charakterystycznych dla prawidłowych komórek macierzystych narządów i tkanek, z których wywodzą się nowotwory. Ponadto, będąc szczególnie odporne na radio- i chemioterapię, odpowiadają za wzrost, progresję metastatyczną oraz wznowę choroby. Dlatego nowotworowe komórki macierzyste stają się ważnym celem terapii przeciwnowotworowych.

## 1.1.2 Embrionalne komórki macierzyste

Embrionalne komórki macierzyste (ESC), w przeciwieństwie do somatycznych komórek macierzystych, to komórki występujące tylko w zarodku. Na etapie blastocysty znajdują się one w wewnętrznym węźle zarodkowym (ang. *inner cell mass*) i będąc pluripotencjalne rozwijają się we wszystkie tkanki zarodka. Posiadają one znaczną przewagę nad somatycznymi komórkami macierzystymi mogąc różnicować w komórki trzech listków zarodkowych. Fakt ten sprawił, że komórki ESC od zawsze były obiecującym kandydatem do zastosowania w medycynie regeneracyjnej.

Po raz pierwszy wyizolowano mysie embrionalne komórki macierzyste w 1981 roku [3], [15]. Natomiast prawdziwym postępowaniem okazało się wyizolowanie przez grupę Thomsona ludzkich embrionalnych komórek macierzystych [16] w 1998 roku. Ludzkie embrionalne komórki macierzyste posiadają ekspresję zestawu markerów powierzchniowych charakterystycznych dla wszystkich komórek pluripotencjalnych. Niektóre z tych markerów to antygeny powierzchniowe SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81. Badania Thomsona i współpracowników sprawiły, że realne stało się zastosowanie ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych w medycynie regeneracyjnej, a nie tylko w badaniach podstawowych. Mimo olbrzymich zalet tych komórek, takich jak nieograniczony potencjał proliferacyjny oraz zdolność do tworzenia wszystkich niemal typów komórek *in vitro*, towarzyszy im również sporo ograniczeń. Po pierwsze, embrionalne komórki macierzyste oraz uzyskane z nich zróżnicowane komórki somatyczne zawsze będą obarczone problemami związanymi ze zgodnością immunologiczną, gdyż izolowane są z zarodka i nie sposób otrzymać je w sposób specyficzny dla danego dorosłego organizmu. Po drugie, izolacji ESC zawsze towarzyszy dezintegracja zarodka. Jest to przeszkoda etyczna, dla wielu badaczy niepozwalająca na pracę z tymi komórkami. Może to jednak być także przeszkoda prawna – w wielu krajach, w tym w Polsce, dozwolone są jedynie badania na już wyprowadzonych liniach ludzkich komórek ESC. Jednak polityka prawna dotycząca pracy na embrionalnych komórkach macierzystych jest bardzo odmienna w różnych krajach. Np. w Niemczech, Włoszech i Finlandii obowiązuje podobne prawodawstwo jak w Polsce. Jednak np. we Francji, Hiszpanii czy Holandii można uzyskiwać ESC z nadmiarowych zarodków powstałych w wyniku zapłodnienia *in vitro*. Inne kraje – jak np. Szwecja, Wielka Brytania, Japonia czy Chiny - są w tej materii jeszcze bardziej liberalne i pozwalają na różne metody tworzenia embrionalnych komórek

macierzystych. Co ważne, brak jest jednoznacznych europejskich przepisów w tej materii. Z kolei w USA mamy do czynienia z różnymi normami prawnymi w różnych stanach – od zakazu pracy na zarodkach po projekty finansowane z budżetu państwa [17].

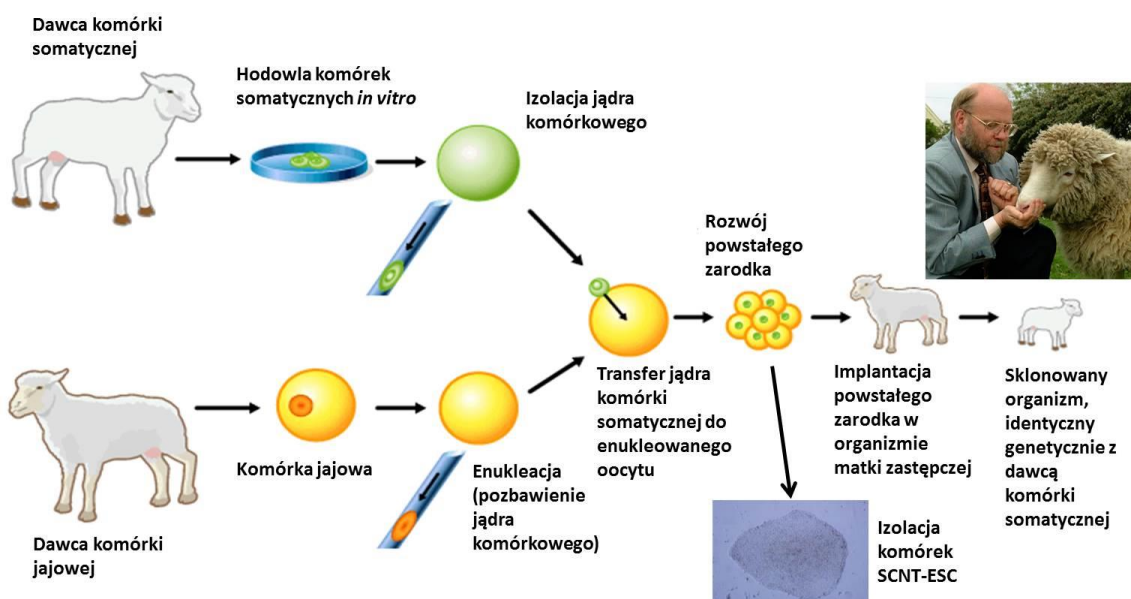
Mimo wielkich możliwości wykorzystania w terapii regeneracyjnej embrionalne komórki macierzyste obarczone są licznymi ograniczeniami takimi jak: wspomniane aspekty moralno-etyczne i prawne, ograniczona dostępność komórek oraz problemy ze zgodnością tkankową. Dlatego stale trwają badania nad znalezieniem alternatywy dla użycia ESC.

Ograniczenie związane z immunogennością komórek ESC można pokonać dzięki uzyskaniu komórek embrionalnych techniką fuzji komórek lub transferu jądra. Fuzja komórki somatycznej oraz embrionalnej komórki macierzystej pozwala uzyskać komórkę hybrydową, która będzie przypominała komórkę organizmu, z którego pochodziła użyta komórka somatyczna. Podejście to jednak nie pozwala na użycie uzyskanej komórki w klinice, gdyż będzie ona tetraploidalna, co nie jest fizjologiczne [18]. Ponadto problem dezintegracji zarodka w celu izolacji komórki embrionalnej wcale nie zostaje rozwiązany.

W 1962 sir John Gurdon po raz pierwszy pokazał, że technika transferu jądra komórki somatycznej (SCNT, ang. *Somatic Cell Nuclear Transfer*) pozwala na *reprogramowanie* komórki somatycznej i odzyskanie przez nią cech komórki embrionalnej [19]. W pracy tej pokazano, że wprowadzenie jądra komórkowego dorosłej komórki somatycznej do enukleowanego (pozbawionego jądra komórkowego) oocytu wystarcza do powstania prawidłowej zygoty, która następnie jest w stanie rozwinąć się w dorosły organizm, identyczny genetycznie z organizmem, z którego pochodziła wyjściowa komórka somatyczna. Technika transferu jądra komórki somatycznej umożliwia nie tylko klonowanie reprodukcyjne zwierząt, ale także uzyskanie embrionalnych komórek macierzystych, specyficznych dla danego, dorosłego organizmu. Sir John Gurdon w swej przełomowej pracy sklonował żabę z gatunku *Xenopus laevis*, ale przede wszystkim pokazał, że to cytoplazma komórki (a nie jądro komórkowe) decyduje o jej losach rozumianych jako nabywanie cech komórki macierzystej lub somatycznej. Dopiero wiele lat później miało okazać się, że chodzi o obecność w cytoplazmie odpowiednich czynników transkrypcyjnych regulujących ekspresję genów odpowiedzialnych za stan macierzystości komórki. Wart odnotowania

jest fakt, że w powstałej w wyniku transferu jądrowego komórce (oraz ewentualnym sklonowanym organizmie) wszystkie mitochondria (oraz inne organelle) będą pochodzić od dawcy komórki jajowej.

Technika transferu jądra komórki somatycznej, której schemat prezentuje rycina 2, na przestrzeni wielu lat pozwoliła na sklonowanie oraz uzyskanie embrionalnych komórek macierzystych wielu zwierząt. Najbardziej znanym z nich jest pierwszy sklonowany ssak - owca Dolly sklonowana w 1997 roku przez Iana Wilmuta [20]. Technika ta potencjalnie umożliwi również klonowanie wymarłych zwierząt, takich jak np. Mamut włochaty, oraz ich reintrodukcję do środowiska [21], [22].



**Rycina 2.** Schemat techniki transferu jądrowego komórki somatycznej. Po wprowadzeniu jądra komórki somatycznej do enukleowanego oocyta powstała komórka rozwija się w funkcjonalny zarodek. Po jego implantacji do matki zastępczej możliwe staje się uzyskanie organizmu identycznego genetycznie z dawcą komórki somatycznej. Technika ta umożliwia również uzyskanie embrionalnych komórek macierzystych specyficznych dla dorosłego organizmu (SCNT-ESC).

Źródło: [http://www.biotechnologyonline.gov.au/popups/img\\_scnt.html](http://www.biotechnologyonline.gov.au/popups/img_scnt.html), zmienione.

Przez wiele lat naukowcom nie udawało się uzyskać tą metodą ludzkich embrionalnych komórek macierzystych. Aż do roku 2013, kiedy pokazano, że można techniką SCNT uzyskać ludzkie embrionalne komórki macierzyste [23]. W pracy tej pokonano techniczne przeszkody uzyskując embrionalne komórki macierzyste SCNT-ESC z komórek noworodków. Rok później udało się uzyskać takie komórki z komórek

somatycznych dorosłych organizmów – fibroblastów pobranych od 35-cio oraz 75-cio letnich mężczyzn [24].

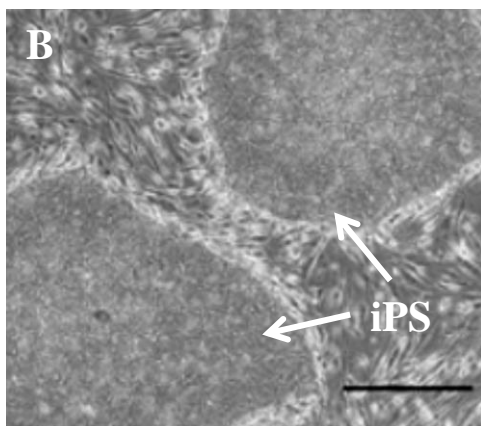
Rozwój technik związanych z transferem jądra komórki somatycznej pozwolił na uzyskanie pluripotencjalnych embrionalnych komórek macierzystych dorosłych organizmów. Odkrycie to pozwoliło ominąć wiele ograniczeń związanych z użyciem embrionalnych komórek macierzystych. Usunięty został problem zgodności tkankowej (uzyskano komórki autologiczne) oraz (przynajmniej częściowo) dezintegracji zarodka. Pozostały jednak ograniczenia związane z dostępnością materiału – problem dostępności blastocyst do izolacji ESC został zamieniony na problem dostępności oocytów do SCNT. Izolacja komórek SCNT-ESC wciąż powoduje dezintegrację zarodka, tyle że wytworzonego techniką SCNT. Niemniej jednak postęp związany z techniką SCNT z pewnością przybliżył embrionalne komórki macierzyste do zastosowania w terapii regeneracyjnej.

### **1.1.3 Uzyskanie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych**

Prawdziwy przełom w biologii komórek macierzystych dokonał się w 2006 roku, kiedy to grupa profesora Yamanaki po raz pierwszy pokazała, że możliwe jest uzyskanie mysich pluripotencjalnych komórek macierzystych z komórek somatycznych dorosłego organizmu przez egzogenne wprowadzenie czynników transkrypcyjnych [25]. Uzyskane komórki nazwano indukowanymi pluripotencjalnymi komórkami macierzystymi (ang. iPS, *induced Pluripotent Stem cells*), a proces ich uzyskiwania przyjęło się nazywać – od zmiany programu rozwoju komórki z *somatycznego* na *macierzysty* – reprogramowaniem. Koncept jaki przyświecał profesorowi Yamanace był genialny w swej prostocie. Założył on bowiem, że istnieje zestaw genów, które ulegają ekspresji w komórkach macierzystych, a które są wyciszane w toku różnicowania. Produkty tych genów miały być odpowiedzialne za potencjał i cechy komórek macierzystych. Po wprowadzeniu tych genów do komórki somatycznej miała ona odzyskiwać stan macierzystości. Zespół Yamanaki zidentyfikował 24 geny – kandydatów na czynniki reprogramujące. Po wprowadzeniu za pomocą wektorów onkoretrowirusowych wszystkich 24 transgenów rzeczywiście udało się uzyskać komórki przypominające morfologią i ekspresją markerów komórki embrionalne. W wyniku

tytanicznej pracy udało się zestaw ten zawęzić do czterech genów czynników transkrypcyjnych – Oct3/4, Sox2, Klf4 oraz c-Myc, które okazały się wystarczające do indukcji pluripotencji. Rok później ta sama grupa pokazała, że można też w ten sposób uzyskać komórki ludzkie [26]. Uzyskano więc indukowane komórki macierzyste, które pod każdym względem przypominały embrionalne komórki macierzyste. Jak pisze sam prof. Yamanaka [27] jego badania były w znacznej mierze zainspirowane wynikami prof. Gurdon'a [19] oraz prof. Tady [18] związanymi z reprogramowaniem jądra komórki somatycznej po wprowadzeniu do cytoplazmy enukleowanego oocyty lub po fuzji z komórką embrionalną. W cytoplazmie oocyty oraz komórki ESC znajdują się czynniki transkrypcyjne niezbędne do wywołania reprogramowania - uruchomienia ekspresji genów niezbędnych do tego, aby komórka somatyczna uzyskała cechy pluripotencjalnej komórki macierzystej. W doświadczeniu Yamanaki ekspresja tych czynników została wymuszona w komórce somatycznej przy użyciu wektorów wirusowych. Ukazanie się prac pokazujących uzyskanie komórek iPS przez inne grupy [30, 31] już w 2007 roku sugeruje ich zaawansowane prace nad tą technologią. Jednak to grupa Yamanaki okazała się być pierwsza.

Za swe zasługi dla biologii komórek macierzystych sir John B. Gurdon oraz Shinya Yamanaka zostali w 2012 roku uhonorowani nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologia/medycyna za „odkrycie, że dorosła komórka somatyczna może zostać reprogramowana i stać się pluripotencjalna”.



**Rycina 3.** Laureaci nagrody Nobla 2012 – profesorowie Shinya Yamanaka oraz John B. Gurdon (A) oraz mikrofotografia kolonii komórek iPS (B). Źródła: <http://gladstoneinstitutes.org/nobel/media>, [26], zmodyfikowano.

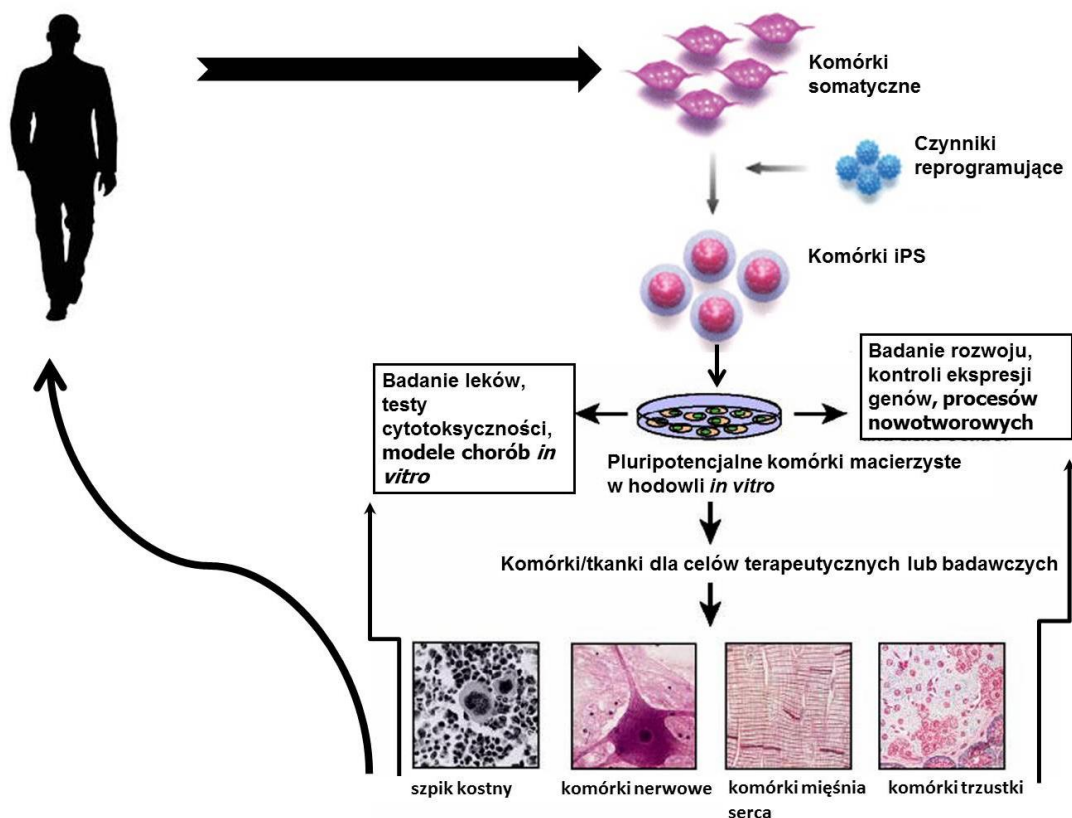
#### 1.1.4 Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste stwarzają nowe perspektywy

Wynalezienie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPS) otworzyło zupełnie nowy rozdział w badaniach nad użyciem komórek macierzystych w medycynie regeneracyjnej. Stało się to za sprawą faktu, iż komórki iPS posiadają wszystkie zalety embrionalnych komórek macierzystych ESC będąc wolnymi od ich najpoważniejszych ograniczeń. Przede wszystkim mają możliwość różnicowania w komórki wszystkich trzech listków zarodkowych. Ponieważ są uzyskiwane z dojrzałych komórek somatycznych (reprogramować można potencjalnie każdy typ komórki somatycznej), można je uzyskać w sposób autologiczny, specyficzny dla danego organizmu [30]. Pozwala to ominąć przeszkodę związaną ze zgodnością immunologiczną komórek. W toku ich uzyskiwania nie zachodzi konieczność użycia lub zniszczenia komórek zarodkowych ani gamet. W związku z tym znikają również

problemy etyczne i prawne, a także związane z dostępnością komórek. Metody uzyskiwania zróżnicowanych komórek różnych typów, które mogą okazać się konieczne do regeneracji pewnych narządów są już powszechne i dobrze opisane. Dlatego komórki iPS w praktyce są już teraz doskonałym źródłem wielu typów komórek somatycznych [31].

Wszystkie cechy indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych sprawiają, że stały się one przełomem w badaniach nad wykorzystaniem komórek macierzystych nie tylko w badaniach podstawowych, ale także mających potencjalne zastosowanie w spersonalizowanej medycynie regeneracyjnej. Perspektywy użycia klinicznego oraz potencjalne zastosowania indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych podsumowuje rycina 4.

Biologia indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych bardzo szybko stała się niezwykle dynamicznie rozwijającą się dziedziną. Od 2011 roku roczna liczba publikacji dotyczących komórek iPS regularnie przekracza 1000, w 2013 roku przekroczyła 1500. Te liczby, oraz krótki czas, jaki upłynął od odkrycia do nagrodzenia twórcy nagrodą Nobla pokazują jak wielkie nadzieje wiąże się z klinicznym zastosowaniem komórek iPS.



**Rycina 4.** Zastosowanie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych w badaniach podstawowych oraz translacyjnych. Źródła internetowe, zmodyfikowane.



### 1.1.5 Metody uzyskiwania indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych

Indukcja pluripotencji w komórkach somatycznych wymaga egzogenego dostarczenia czynników reprogramujących. Jest to krok niezbędny do uruchomienia kaskady zdarzeń prowadzących do odzyskania przez komórkę somatyczną fenotypu komórki pluripotencjalnej. W oryginalnej pracy grupa Yamanaki użyła wektorów onko-retrowirusowych (stworzonych na bazie onko-retrowirusa mysiej białaczki Moloney'a, MMLV, ang. *Murine Moloney's Leukemia Virus*) do dostarczenia genów czterech czynników transkrypcyjnych (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) wystarczających do reprogramowania komórki somatycznej [25]. Wszystkie te czynniki transkrypcyjne regulują prawidłowy rozwój embrionalny, podtrzymują stan niezróżnicowany, a ich funkcje pozwalają częściowo zrozumieć modele zwierząt, w których dokonano wyłączenia tych genów.

Czynniki transkrypcyjne Oct3/4 oraz Sox2 wydają się być we wspomnianym zestawie niezastąpione. Oct3/4 (zwany także POU5F1) to nadrzędny embrionalny czynnik transkrypcyjny posiadający konserwatywną domenę POU. Jest on obecny przede wszystkim we wczesnych embrionach, gdzie reguluje procesy różnicowania oraz podtrzymania pluripotencji. Jego wyłączenie powoduje śmierć zarodków w okresie preimplantacyjnym [32]. Z kolei czynnik Sox2 został zidentyfikowany jako białko Sox (ang. *SRY (Sex-determining Region Y)-related HMG (High Mobility Group) box*) obecne w komórkach embrionalnych. Podobnie jak Oct3/4 obecny jest we wczesnych zarodkach, ale także (odmiennie niż Oct3/4) w komórkach multipotencjalnych. Jego *knock-out* powoduje śmierć zarodków w okresie implantacyjnym [33]. Czynniki Oct3/4 oraz Sox2 tworzą ze sobą heterodimery i regulują ekspresję wielu genów odpowiedzialnych za podtrzymanie stanu macierzystości m.in. genów *FGF4*, *UTF1*, *NANOG*, *FBX15* oraz swoich własnych [34].

Klf4 należy do grupy czynników podobnych do czynnika Krüppel (ang. *Krüppel-Like Factors*), białek zawierających domenę palców-cynkowych. Gen *KLF4* posiada ekspresję zarówno w komórkach ESC jak i w zróżnicowanych komórkach epitelialnych. Jego wyłączenie powoduje śmierć nowonarodzonych myszy po ok. 15 godzinach od urodzenia w wyniku zaburzeń rozwoju, co wskazuje, na jego udział w regulacji równowagi procesów proliferacji i różnicowania. Bierze on udział również w

procesach samoodnowy komórek embrionalnych oraz w nowotworzeniu, gdzie może pełnić funkcję zarówno onkogenu jak i genu supresorowego [35].

Produkt proto-onkogeu *C-MYC* wiąże się z wieloma genami, których produkty stymulują proliferację oraz transformację nowotworową. Ma on około 25 000 miejsc wiązania w genomie, między innymi asocjuje z kompleksem acetylotrasferazy histonów. Jego rola w reprogramowaniu polega głównie na przyspieszaniu procesu, regulacji stanu epigenetycznego komórki oraz stymulacji podziałów komórkowych [25].

Wart odnotowania jest fakt, iż innym grupom badawczym udało się uzyskać komórki iPS używając innego zestawu czynników reprogramujących (*Oct3/4*, *Sox2*, *Nanog*, *Lin28*) [29]. Produkty genów *NANOG* oraz *LIN28* nie są do reprogramowania niezbędne, jednak stymulują one samoodnowę oraz zwiększają przeżywalność embrionalnych komórek macierzystych. *Oct3/4*, *Sox2* oraz *Nanog* posiadają wspólne cele w genomie komórek embrionalnych [34]. Co ważne, wszystkie wprowadzone, transgeny zostają w zreprogramowanej już komórce wyciszone [26]. Włączona zostaje natomiast endogenna ekspresja genów charakterystycznych dla komórek embrionalnych, co powoduje drastyczną zmianę fenotypu komórki somatycznej.

*Podejście wirusowe*, za pomocą którego uzyskano komórki iPS po raz pierwszy, posiada wiele zalet: wydajną i stabilną ekspresję transgenu, oraz łatwość transdukcji wielu typów komórek. Wiąże się jednak z integracją genomu wirusa do genomu komórki. Jest to podejście z punktu widzenia wykorzystania komórek iPS w klinice wysoce niebezpieczne, ze względu na ryzyko mutagenyzy insercyjnej. Użycie wektorów wirusowych integrujących transgen do genomu komórki docelowej (czy to wektorów onko-retro- czy lenti-wirusowych opartych na wirusie HIV) może spowodować przerwanie ciągłości genów - i tym samym mutację typu utraty funkcji – lub uaktywnienie onkogenów – co może prowadzić do nowotworzenia. Dlatego na przestrzeni ostatnich 7 lat powstało wiele alternatywnych metod reprogramowania komórek, dążących do zwiększenia bezpieczeństwa uzyskanych komórek w potencjalnym wykorzystaniu w klinice.

Pierwszym trendem była eliminacja potencjalnego proto-onkogeny *C-MYC* z zestawu czynników reprogramujących [36], [37] oraz stopniowa redukcja liczby transgenów wprowadzanych do komórki w wyniku bądź endogennej ekspresji niektórych czynników transkrypcyjnych w reprogramowanych komórkach [38], bądź zastępowania ich związkami chemicznymi, pełniącymi funkcję substytutów czynników

transkrypcyjnych [39], [40], [41] lub zwiększających, zwykle niską (0,02%) wydajność reprogramowania [42].

Kolejnym trendem było właśnie podnoszenie wydajności reprogramowania np. przez użycie związków chemicznych w trakcie reprogramowania. Przykładem takich związków są inhibitory deacetylaz histonów (kwas walproinowy i masłowy), które wywołują remodeling chromatyny powodując zwiększenie ekspresji genów związanych z pluripotencją [43], a tym samym ułatwiając reprogramowanie. Wśród innych czynników zwiększających wydajność reprogramowania wymienić należy hipoksję [44] oraz umieszczenie wszystkich transgenów w jednym, policistronowym wektorze [45], co zwiększa szanse na dostarczenie wszystkich czynników reprogramujących do komórki docelowej. Niedawno, pokazano, że zahamowanie kompleksu remodelingu i deacetylacji nukleosomu Mbd3/NuRD (ang. *Nucleosome Remodelling and Deacetylation*) synchronizuje, znacznie przyspiesza, oraz zwiększa wydajność reprogramowania (do wartości bliskich 100%), co wskazuje na niezwykle istotną rolę stanu epigenetycznego komórki w trakcie reprogramowania [46].

W celu uniknięcia integracji genomu wirusa do genomu reprogramowanej komórki zaczęto stosować samo-wycinające się wektory wirusowe [47] (w przypadku których dochodzi do usunięcia transgenów z genomu komórki z użyciem systemu rekombinazy *Cre*, co usuwa ryzyko niebezpiecznej reaktywacji transgenów), po których pozostaje jednak krótka sekwencja wbudowana w genom komórki. Tym samym ryzyko mutagenyzy insercyjnej wcale nie znika, a osobne dostarczenie genów koniecznych do wycięcia transgenów nastręcza dodatkowych problemów.

Innym podejściem jest użycie nieintegrujących wektorów wirusowych takich jak wektor oparty na RNA-wirusie Sendai [48], którego cały cykl życiowy odbywa się w cytoplazmie komórki, czy wektor adenowirusowy [49]. Wadą tego ostatniego jest immunogenność adenowirusów oraz bardzo niska wydajność reprogramowania za jego pośrednictwem. Użycie wektora opartego na wirusie Sendai wydaje się być obiecujące, jednak jego wadami są wysoki koszt oraz problematyczność jego usunięcia, z reprogramowanych już komórek, gdzie dochodzi do jego replikacji.

W celu eliminacji wielu wad użycia wektorów wirusowych stosuje się metody reprogramowania wolne od wirusów. I tak geny czynników reprogramujących można dostarczać w postaci plazmidów [50], episomalnych wektorów [51], małych kolistych cząsteczek DNA zwanych *minicircles*, które powstały przez usunięcie wirusowych sekwencji z plazmidów [52] lub w postaci transpozonu *piggyBAC* [53], [54]. Ceną za

zwiększenie bezpieczeństwa uzyskanych komórek jest generalnie niska wydajność reprogramowania (ok. 100x niższa w przypadku użycia plazmidów niż wektorów onkoretrowirusowych) oraz konieczność wielokrotnej transfekcji w celu zapewnienia ekspresji czynników transkrypcyjnych przez cały okres reprogramowania (zależy od metody, ok. 20 dni). Użyciu transpozonu towarzyszą dodatkowo takie same ograniczenia jak w przypadku użycia wycinających się wektorów lentiwirusowych.

Dostarczaniu DNA w celu reprogramowania zawsze towarzyszy ryzyko insercji do genomu. Aby je usunąć stosuje się reprogramowanie za pomocą syntetycznego mRNA dla czynników reprogramujących [55] lub cząsteczek mikroRNA [56]. Użycie mRNA, ze względu na jego immunogenność oraz niestabilność wymusza stworzenie syntetycznych cząsteczek (niefizjologiczne zasady w nim obecne znoszą jego immunogenność) oraz wielokrotność transfekcji. MikroRNA (miR) to małe cząsteczki RNA regulujące ekspresję genów. Niektóre z nich (miR302 i miR367) regulują między innymi ekspresję genów odpowiedzialnych za stan macierzystości komórki.

W celu reprogramowania komórek somatycznych w sposób całkowicie wolny od kwasów nukleinowych opracowano metodę wielokrotnego dostarczania gotowych czynników transkrypcyjnych w postaci białek (które wnikają do komórki dzięki obecności ciągów argininowych w sekwencji) [57], [58] oraz metodę chemicznej indukcji pluripotencji [59]. W tej ostatniej metodzie zestaw czynników transkrypcyjnych w komplecie zastąpiono koktajlem ośmiu związków chemicznych, których efekt działania zastępuje ekspresję genów czynników transkrypcyjnych wywołujących reprogramowanie. Związki te to głównie inhibitory kinaz, które wpływają na ekspresję genów związanych z różnicowaniem komórek [60].

Mimo, że uzyskiwanie komórek iPS za pomocą białek jest mało wydajne, wymaga wielokrotnego ich dostarczania oraz jest technicznie skomplikowane, a chemiczna indukcja pluripotencji jest procesem kosztownym oraz również technicznie złożonym, te dwie metody wydają się dostarczać komórki o najmniej niebezpiecznym, pod kątem użycia w klinice, charakterze.

Wszystkie metody uzyskiwania indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych dążą do uzyskania komórek, które byłyby maksymalnie bezpieczne w użyciu w medycynie regeneracyjnej, gdzie zastosowanie znaleźć mogą jedynie komórki wolne od manipulacji genetycznej obciążonej ryzykiem mutagenyzy [61]. Bez zapewnienia maksymalnego bezpieczeństwa, technologia komórek iPS nie zostanie dopuszczona do klinik.

### 1.1.6 Potencjalne kliniczne zastosowanie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych

Ze względu na cechy indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych istnieje bardzo wiele ich zastosowań w badaniach podstawowych, które zebrano na rycinie 4, a które dotyczą głównie badań nad rozwojem organizmu, różnicowaniem komórek macierzystych, rolą konkretnych genów w embriogenezie itp. Z komórkami iPS wiąże się jednak również wielkie nadzieje na zastosowanie kliniczne. Wynikają one przede wszystkim z niebywałego potencjału komórek pluripotencjalnych, który daje nadzieje na wytworzenie autologicznych, trudno regenerujących się komórek i tkanek, takich jak np. komórki nerwowe czy komórki mięśnia sercowego. Uzyskane przez różnicowanie komórek iPS komórki somatyczne nie tylko mogą posłużyć wprost w terapii regeneracyjnej u pacjentów (do czego jeszcze prawdopodobnie daleka droga), ale mogą także stanowić doskonały model choroby *in vitro*. Ponieważ komórki iPS otrzymać można z każdej komórki somatycznej dowolnego dorosłego organizmu wysoce interesującym jest otrzymywanie komórek iPS od pacjentów cierpiących na różnorodne choroby, w których zachodzi potrzeba regeneracji tkanek i narządów.

Do tej pory udało się uzyskać indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (oraz docelowe komórki somatyczne z nich wyróżnicowane) specyficzne dla pacjentów:

- cierpiących na choroby genetyczne takie jak: zespół Downa, ciężki złożony niedobór odporności w wyniku niedoboru deaminazy adenozynowej (SCID/ADA), choroba Gaucher'a, zespół Lesch-Nyhan'a, dystrofia mięśniowa Duchenne'a oraz Becker'a [62], zespół długiego QT [63], rdzeniowy zanik mięśni [64] czy zespół LEOPARD [65];
- z chorobami neurodegeneracyjnymi takimi jak: choroba Parkinsona [47], płasawica Huntingtona [62], choroba Lou Gehrig'a (stwardnienie boczne zanikowe) [66], [67],
- cierpiących na inne choroby, np. metaboliczne jak cukrzyca typu I [68].

Co ważne, somatyczne komórki (które u pacjenta ulegają degeneracji) powstałe w wyniku różnicowania komórek iPS uzyskanych od pacjentów często odtwarzają objawy/fenotyp choroby *in vitro*. Przykładem może być charakterystyczne zaburzenie kurczliwości kardiomiocytów *in vitro* powstałych po różnicowaniu komórek iPS

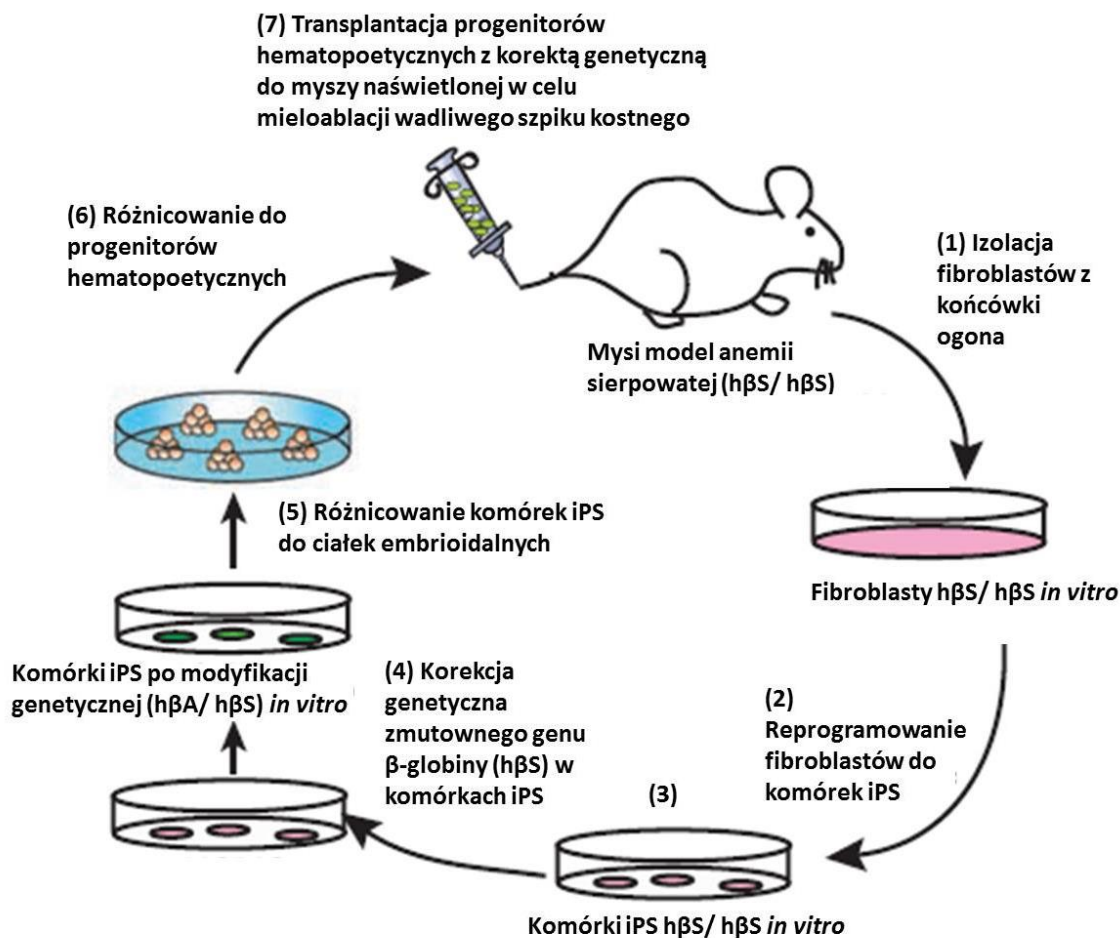
pacjentów cierpiących na zespół długiego QT [63], które występuje również u pacjenta. Inny przykład to charakterystyczna morfologia neuronów motorycznych powstałych z komórek iPS pacjenta cierpiącego na stwardnienie boczne zanikowe [67]. Somatyczne komórki, które ulegają degeneracji w wielu chorobach, a które uzyskuje się różnicując komórki iPS pacjentów stanowią znakomity model choroby *in vitro* (popularne angielskie określenie *patient-in-a-dish*). Model taki doskonale nadaje się do badań nad patogenezą chorób, a także do testowania nowych leków lub dobierania leków/dawek dla konkretnego pacjenta [67] przybliżając ideę medycyny spersonalizowanej. Innym zastosowaniem takiego modelu jest użycie zróżnicowanych komórek, jako platformy do szybkiego i taniego testowania nowych substancji będących kandydatami na leki pod kątem np. ich kardiotoxyczności [69].

Z kolei czysto kliniczne zastosowanie komórek iPS (ideowo przedstawione na rycinie 5 na przykładzie mysiego modelu anemii sierpowatej) polega na przeszczepieniu uzyskanych przez różnicowanie komórek iPS autologicznych, somatycznych komórek pacjenta, które są u niego zdegenerowane bądź zmutowane. Pierwszym etapem takiej terapii komórkowej jest uzyskanie somatycznych komórek pacjenta w możliwie najmniej inwazyjny sposób np. przez pobranie krwi czy wyrwanie włosa (rycina 5, punkt 1). Kolejnym krokiem jest ich hodowla i reprogramowanie (ryc. 5, pkt 2 i 3). Ponieważ powstałe komórki iPS mają nieograniczony potencjał proliferacyjny oraz są źródłem wielu typów zróżnicowanych komórek potomnych stały się one doskonałym celem terapii genowych. Komórki iPS można modyfikować genetycznie (ryc. 5, pkt 4), w celu wprowadzenia prawidłowej wersji genu uszkodzonego u pacjentów z chorobami genetycznymi (takimi jak te wymienione powyżej). Wyselekcjonowane komórki z prawidłową wersją genu są później różnicowane do komórek somatycznych, które są wymagane w konkretnej terapii regeneracyjnej (na rycinie 5, pkt 5 i 6 są to hematopoetyczne komórki macierzyste). Uzyskane efektorowe komórki somatyczne (po ewentualnej modyfikacji genetycznej) są przeszczepiane do ciała pacjenta (ryc. 5, pkt 7) gdzie zasiedlają się i wywołują efekt terapeutyczny. Technologia komórek iPS potencjalnie pozwala na zastosowanie spersonalizowanej terapii regeneracyjnej, która może być także połączona z terapią genową w celu leczenia chorób, w których zachodzi potrzeba nie tylko regeneracji uszkodzonych narządów, ale także naprawy defektów genetycznych. Terapia taka okazała się już skuteczna w mysim modelu anemii sierpowatej [70].

Jeśli chodzi o stan takich badań u pacjentów, to na początku tego roku, w Japonii, zakończyła się pierwsza faza pierwszej próby klinicznej wykorzystania komórek iPS w terapii zwyrodnienia plamki żółtej (ang. *Age-related Macular Degeneration*, AMD). W próbie tej przeszczepia się upigmentowany nabłonek siatkówki (ang. *Retinal Pigment Epithelium*, RPE), który stanowi warstwę ochronną komórek receptorowych w siatkówce oka, a który ulega degeneracji z wiekiem. Pierwsza faza prób klinicznych zakłada jedynie ocenę ryzyka takiej terapii. Dotychczasowe wyniki są dość obiecujące i wskazują na bezpieczeństwo terapii z zastosowaniem autologicznych komórek RPE powstałych z komórek iPS [doniesienie zjazdowe, nieopublikowane, źródło informacji:

[http://www.riken.jp/en/pr/press/2013/20130730\\_1/](http://www.riken.jp/en/pr/press/2013/20130730_1/)].

Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste stanowią wielką nadzieję i obietnicę w medycynie regeneracyjnej. I choć, mimo obiecujących wyników pierwszej próby klinicznej, do zastosowania komórek iPS w klinice może dzielić nas jeszcze daleka droga, to już dziś znajdują one zastosowanie, jako źródło zróżnicowanych komórek określonego typu *in vitro*, które służą, jako zindywidualizowany model choroby dogodny do badań nad patogenezą chorób, oraz do dobierania leku lub jego dawki dla konkretnego pacjenta. Jest wielce prawdopodobne, że w przyszłości technologia komórek iPS znajdzie zastosowanie kliniczne.



**Rycina 5.** Zastosowanie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych w komórkowej terapii regeneracyjnej połączonej z terapią genową na przykładzie mysiego modelu anemii sierpowatej. Źródło: [70], zmienione.

### 1.1.7 Ograniczenia zastosowań indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych oraz sposoby ich pokonywania

Mimo swoich olbrzymich zalet, opisanych wcześniej, indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste posiadają także liczne ograniczenia, które na razie nie pozwalają na wprowadzenie ich na szeroką skalę w terapii regeneracyjnej. Niektóre z ich wad to:

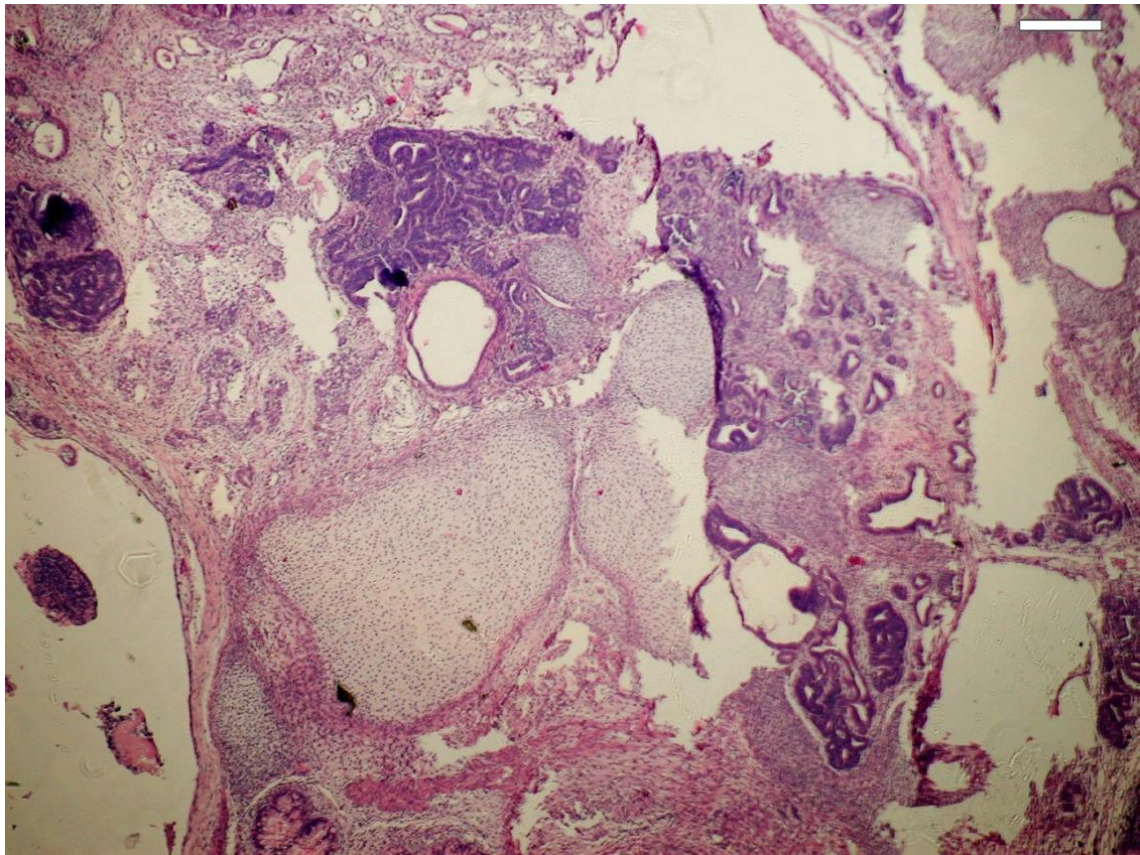
- niska wydajność reprogramowania osiągająca przy niektórych metodach kilka procent [71],
- wysokie wymagania i koszty hodowli,



- ryzyko powstawania nowotworów wskutek mutagenezy insercyjnej lub reaktywacji wprowadzonych transgenów: *C-MYC* lub *KLF4* [72],
- ryzyko komplikacji związane z zastosowaniem wektorów wirusowych, np. immunogenność w przypadku adenowirusów,
- subtelne różnice w globalnym profilu ekspresji genów sprawiające, że każda linia komórek iPS różni się od innych, co może owocować różną wydajnością ich różnicowania [73],
- obecność tzw. *pamięci epigenetycznej* polegającej na zachowaniu przez komórki iPS wzoru epigenetycznej regulacji ekspresji genów charakterystycznego dla listka zarodkowego, z którego pochodziły reprogramowane komórki. Sprawia to, iż uzyskane komórki iPS różnicują w komórki somatyczne tego listka zarodkowego z większą wydajnością niż w komórki innych listków zarodkowych [74],
- zdolność komórek iPS do tworzenia teratom, czyli potworniaków (guzów zbudowanych z komórek trzech listków zarodkowych). Jest to cecha wszystkich komórek pluripotencjalnych.

Niektóre z tych ograniczeń nie są wykluczające (np. koszty, stosunkowo niska, ale wystarczająca wydajność reprogramowania i różnicowania), a rozwiązanie innych jest dość proste (użycie bezpiecznych metod reprogramowania eliminuje ryzyko immunogenności, mutagenezy insercyjnej, oraz ryzyko związane z proto-onkogenami). Prawdziwym problemem związanym z klinicznym użyciem komórek iPS jest ich zdolność do tworzenia guzów zbudowanych z komórek pochodzących z trzech listków zarodkowych. Jest to zdolność, która wynika z ich największej zalety-pluripotencjalności.

Teratoma, inaczej potworniak, to łagodny nowotwór zbudowany z komórek trzech listków zarodkowych. Pochodzi z komórek rozrodczych i najczęściej występuje u ludzi młodych [75]. Tworzenie teratom po ksenotransplantacji komórek do myszy z upośledzoną odpornością to najsilniejszy test na pluripotencjalność ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych [71]. Typowy obraz histopatologiczny teratomy uzyskanej po ksenotransplantacji komórek iPS przedstawia rycina 6.



**Rycina 6.** Obraz histopatologiczny teratomey uzyskanej po wszczepieniu ludzkich komórek iPS do myszy NOD/SCID. Po barwieniu hematoksyliną/eozyną widoczne stają się różne typy tkanek – m.in. chrząstka, nabłonek wydzielniczy, nabłonek wielowarstwowy. Powiększenie 40x. Biały pasek reprezentuje 250 $\mu$ m. Źródło: zdjęcie własne.

Protokoły różnicowania komórek iPS do komórek efektorowych cechują się, nawet jeśli wysoką, to jednak ograniczoną wydajnością. Dlatego zawsze istnieje ryzyko przedostania się do populacji komórek zróżnicowanych pojedynczych komórek pluripotencjalnych, które po ewentualnym, przeszczepieniu wytworzyłyby teratomę. Mimo coraz wydajniejszych protokołów różnicowania oraz sortowania wyróżnicowanych komórek pod kątem specyficznych markerów, a także immunogenności autologicznych komórek pluripotencjalnych [76], powstanie teratomey z zanieczyszczenia transplantu pluripotencjalnymi komórkami macierzystymi w długim okresie czasu po transplantacji, to największe ryzyko związane z zastosowaniem komórek iPS w terapii. Dlatego stale trwają prace nad zwiększeniem bezpieczeństwa terapii komórkowych opartych na komórkach iPS.

Jednym z pomysłów na dodatkowe zabezpieczenie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych jest użycie strategii *genu samobójczego*

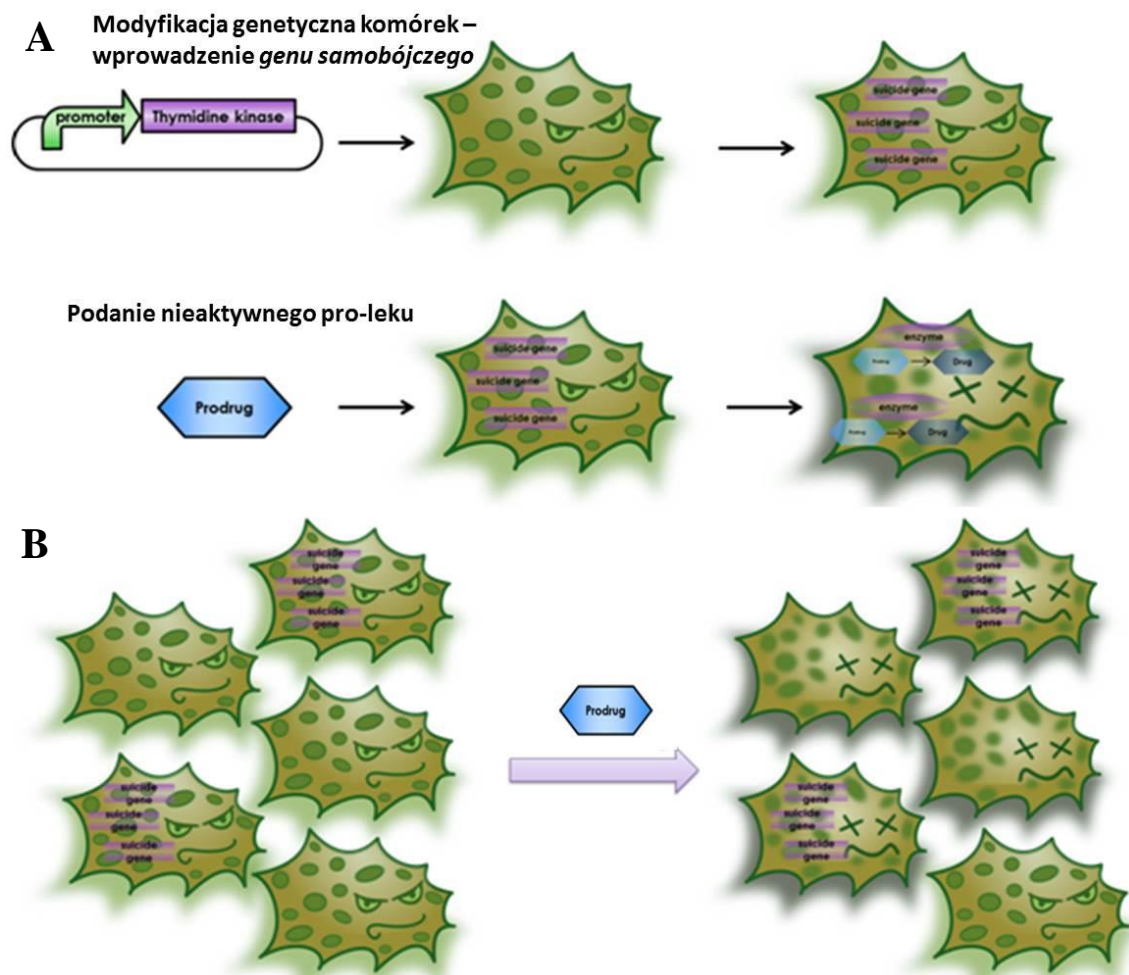
(ang. *suicide gene therapy*) do stworzenia *wentylu bezpieczeństwa* pozwalającego w razie potrzeby usunąć wszystkie wszczepione komórki.

*Samobójcza terapia genowa* polega na specyficznej eliminacji komórek posiadających ekspresję transgenu (genu samobójczego) pod wpływem nietoksycznego dla innych komórek pro-leku. Jest to strategia zwykle kojarzona z terapią genową nowotworów [77], w której subpopulację komórek nowotworowych uwrażliwia się na działanie pewnego nieaktywnego pro-leku za pomocą modyfikacji genetycznej. Modyfikacja taka wprowadza ekspresję genu enzymu metabolizującego nieaktywny pro-lek do toksycznego metabolitu. Zmodyfikowane genetycznie komórki giną, ale przekazują również toksyczny metabolit komórkom sąsiadującym za pośrednictwem złącz szczelinowych. Jest to tzw. efekt sąsiedztwa (ang. *bystander effect*), w którym na komórkę wpływa metabolizm „sąsiada” [78]. Zjawisko to zwiększa efektywność *samobójczej terapii genowej* ograniczonej wydajnością modyfikacji genetycznej komórek, powoduje jednak również ryzyko uszkodzenia sąsiadujących, zdrowych tkanek.

Przykładem takiej terapii genowej może być wykorzystanie genu kinazy tymidynowej wirusa opryszczki pospolitej (HSV-TK, ang. *Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase*) oraz pro-leku gancyklowiru. Gancyklowir to pro-lek skutecznie eliminujący jedynie komórki zainfekowane wirusem opryszczki. Jest on nietoksyczny dla zwykłych komórek, natomiast po fosforylacji przez HSV-TK staje się analogiem deoksy-guanozyno-trifosforanu (dGTP) i rywalizuje z nim o inkorporację do ulegającego replikacji DNA komórki. Zinkorporowany do DNA trifosfo-gancyklowir zatrzymuje replikację DNA prowadząc do uszkodzeń nici DNA, w tym dwuniciowych pęknięć. Tym samym wywołuje zatrzymanie cyklu komórkowego oraz śmierć komórki posiadającej ekspresję TK (w wyniku infekcji wirusowej lub modyfikacji genetycznej) na drodze apoptozy [79]. Schemat *samobójczej terapii genowej* przedstawia rycina 7.

Opisane podejście może zostać wykorzystane do genetycznego zabezpieczenia komórek iPS. Można zmodyfikować genetycznie komórki iPS tak, aby posiadały konstytutywną ekspresję *genu samobójczego* [80]. Następnie, przeprowadzić ich różnicowanie i uzyskać docelowe komórki efektorowe, które zostaną przeszczepione w celu regeneracji narządów pacjenta. W przypadku pojawienia się efektów niepożądanych terapii regeneracyjnej (np. dysfunkcja wszczepionych komórek, powstanie teratomy), wystarczy podać pro-lek (np. gancyklowir), który spowoduje specyficzne usunięcie wszczepionych komórek, usuwając tym samym zagrożenie.

Opisane podejście pozwala zwiększyć bezpieczeństwo użycia komórek iPS w terapii regeneracyjnej w skutek stworzenia *wyjścia bezpieczeństwa* pozwalającego, w razie konieczności, usunąć wszczepione komórki. Strategie tego typu przybliżają perspektywę terapeutycznego wykorzystania komórek iPS.



**Rycina 7.** Schemat *suicide gene therapy*. Komórki zmodyfikowane genetycznie tak, aby posiadały ekspresję *genu samobójczego* są specyficznym eliminowane w skutek metabolizmu nieaktywnego pro-leku do toksycznego metabolitu (**A**). Powstały toksyczny metabolit jest przekazywany do sąsiadujących niezmodyfikowanych komórek za pośrednictwem złącz szczelinowych i wywołuje ich śmierć w skutek efektu sąsiedztwa (**B**). Źródło: [http://parts.igem.org/Part:BBa\\_K404122](http://parts.igem.org/Part:BBa_K404122), zmieniono.

## 1.2 Choroba Parkinsona

Wzrastająca średnia długość życia człowieka stawia wyzwanie skutecznego leczenia chorób związanych ze starzeniem się organizmów. Choroby neurodegeneracyjne to przykład chorób pojawiających się u osób w podeszłym wieku. Choroba Parkinsona (ang. *Parkinson's Disease*, PD) to druga najczęstsza choroba neurodegeneracyjna na świecie. Jest to choroba silnie związana z wiekiem pacjenta – występuje najczęściej u osób powyżej 60. roku życia. Jej przyczyna w 90% przypadków pozostaje nieznana, a tylko 10% przypadków jest dziedziczna, skorelowana z mutacjami w określonych genach [81]. Mutacje te dotyczą głównie genów [82]:

- białek, które ulegają wadliwemu fałdowaniu i tym samym akumulują się w komórkach (np. gen  $\alpha$ -synukleiny, *PARK1*),
- których produkty zaangażowane są w system kontroli jakości białka (np. gen parkiny - ligazy ubikwityny, *PARK2*),
- kinaz biorących udział w ochronie komórki przed stresem oksydacyjnym (np. gen białka DJ-1, *PARK7*),
- zaangażowanych w mitochondrialny łańcuch transportu elektronów (np. gen *PINK1 PARK6*),
- niektórych kinaz sygnałowych (np. gen *LRRK2, PARK8*).

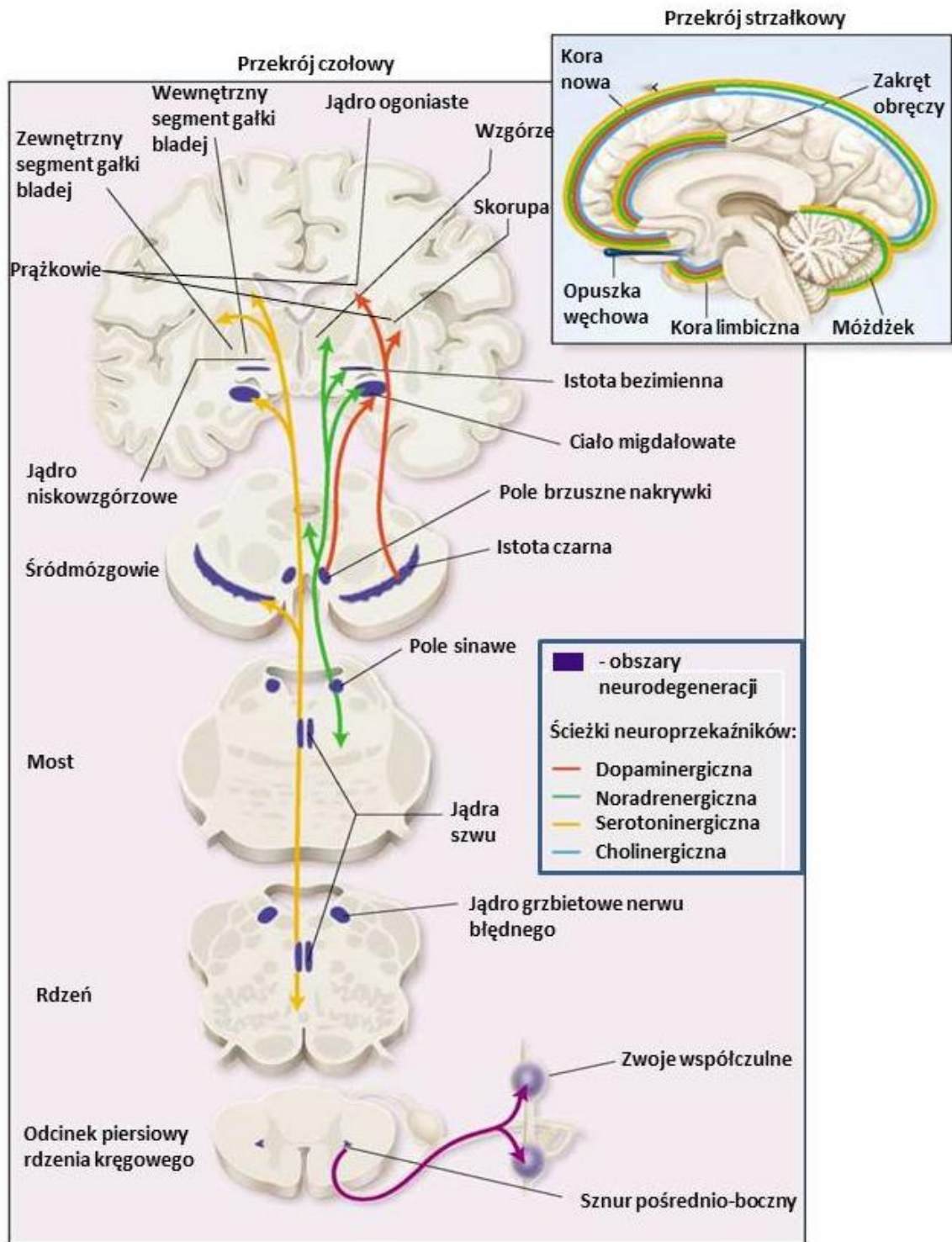
Na chorobę Parkinsona cierpi 0,3% populacji, w tym aż 2% populacji ludzi powyżej 60. roku życia. Formy dziedziczne manifestują się wcześniej, nawet przed 50. rokiem życia [81].

Sama choroba Parkinsona została po raz pierwszy opisana przez brytyjskiego lekarza i polityka Jamesa Parkinsona w 1817 roku pod nazwą *drżączka porażna*. Jest to choroba polegająca na specyficznej degeneracji neuronów produkujących neurotransmitter dopaminę. Neurony takie znajdują się w istocie czarnej (łac. *substantia nigra*) śródmózgowia, a ich projekcje sięgają aż do prążkowie (łac. *striatum*), gdzie dopamina jest uwalniana [83]. Przyczyna śmierci tych neuronów pozostaje w większości przypadków nieznana. Śmierć neuronów dopaminergicznych owocuje spadkiem zawartości dopaminy w prążkowie, gdzie pełni ona swe funkcje, nawet o 80%. Deficyt dopaminy jest bezpośrednią przyczyną zaburzeń motoryki chorego.

Przebieg choroby jest zwykle powolny, wieloletni i postępujący. Schemat obszarów objętych neurodegeneracją w chorobie Parkinsona przedstawia rycina 8. Wśród innych, typowych objawów komórkowo-molekularnych choroby Parkinsona wymienia się specyficzną akumulację  $\alpha$ -synukleiny, która jest głównym składnikiem tzw. ciałek Lewy'ego (to wewnątrzkomórkowe wtręty eozynofilowe obecne w obumierających neuronach dopaminergicznych). Obserwuje się również oksydacyjne uszkodzenia DNA i białek, a także peroksydację lipidów w tkance mózgowej [84].

Wśród typowych objawów klinicznych choroby Parkinsona wymienia się charakterystyczne drżenia spoczynkowe, obniżenie oraz spowolnienie ruchliwości, sztywność mięśni, zaburzenia postawy. Objawy często są asymetryczne. Dochodzi też do charakterystycznej zmiany charakteru pisma (mikrografia), zaburzeń mowy oraz zaburzeń węchu w wyniku degeneracji obejmującej opuszkę węchową. Zdarzają się też epizody zamrożenia, kiedy to chory nie jest w stanie wykonać ruchu. Choroba jest postępująca i w toku jej rozwoju pojawia się także depresja, a pod koniec życia demencja oraz zaburzenia kognitywne i wegetatywne [83].

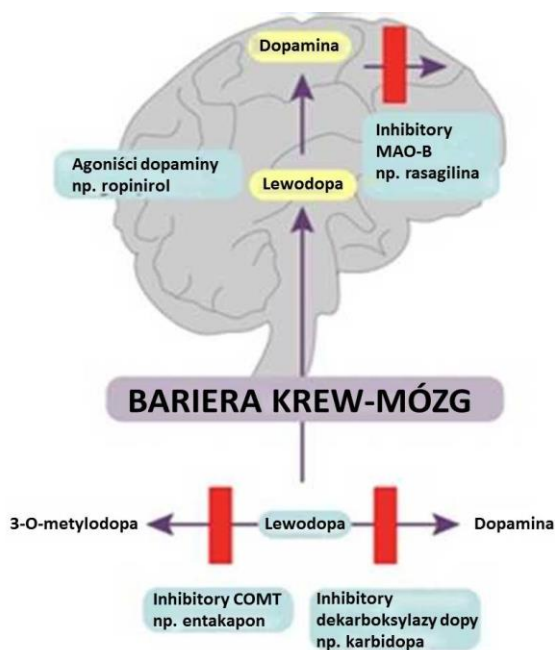
90% przypadków choroby Parkinsona to zachorowania idiopatyczne. Wśród potencjalnych przyczyn ich wystąpienia wymienia się czynniki środowiskowe, neurotoksyczne, polimorfizmy w niezidentyfikowanych do tej pory genach, a także reaktywne formy tlenu czy stres oksydacyjny [81].



**Rycina 8.** Neurodegeneracja w chorobie Parkinsona. Układ dopaminergiczny zaznaczono kolorem czerwonym. Wszystkie obszary ulegające neurodegeneracji w PD zaznaczono na granatowo. Źródło: [83], zmieniono.

## 1.2.1 Obecne strategie oraz perspektywy terapii choroby Parkinsona

Niestety nie istnieje skuteczna metoda leczenia choroby Parkinsona, a stosowana dziś terapia to leczenie objawowe polegające głównie na uzupełnianiu niedoboru dopaminy w układzie nigrostriatalnym. Obecnie główną terapię stanowi farmakologiczna suplementacja związkami prowadzącymi do wzrostu poziomu dopaminy (rycina 9). Wśród stosowanych substancji wymienia się także agonistów receptorów dopaminowych (np. ropinirol), inhibitory enzymów rozkładających dopaminę (MAO-B, monoaminooksydazy B, np. rasagilina) lub inhibitory enzymów rozkładających prekursor dopaminy - lewodopę (COMT, katecholo-o-metylotransferazy, np. entakapon). Jednak najczęściej stosowanym lekiem jest właśnie prekursor dopaminy - lewodopa (L-DOPA) [83], [85].



**Rycina 9.** Farmakologiczne strategie prowadzące do uzupełnienia niedoboru dopaminy w prążkowiu w przebiegu choroby Parkinsona. Źródło: <http://www.parkinsonsdiseasecme.com/cme-modules/redefining-treatment-success/pd-treatment-strategy.html>, zmieniono.

Terapia ta nie daje jednak szans na wyzdrowienie, a jedynie doraźną poprawę objawów, co gorsza jej efektywność spada w toku leczenia, a obraz chorego sukcesywnie się pogarsza. Konieczne staje się zwiększanie dawki L-DOPY, pojawiają się też objawy niepożądane jej stosowania. W toku rozwoju choroby pojawiają się coraz silniejsze zaburzenia układu ruchu, jak drżenia, syndrom *on-off*, w którym chory naprzemiennie nie jest w stanie wykonać żadnego ruchu oraz doświadcza dyskinezji [86]. Fakt, że jest to najlepsza do tej pory terapia PD pokazuje jak bardzo konieczne jest poszukiwanie nowych strategii leczniczych.



Innymi, rzadziej stosowanymi podejściami terapeutycznymi są leki antycholinergiczne czy ryzykowne podejście chirurgiczne polegające na głębokiej stymulacji mózgu (głównie obszarów jądra niskowzgórzowego) [87]. Terapie te powodują jednak jedynie chwilową poprawę objawów, w żaden sposób nie leczą przyczyny choroby. Dlatego od dawna myślano o terapii przywracającej funkcję obszaru objętego neurodegeneracją.

W latach 80-tych i 90-tych próbowano wykorzystać transplantacje płodowych tkanek dopaminergicznych [88], [89]. Ich wszczepianie chorym na PD powodowało czasową poprawę objawów, choć przeszczepione komórki przeżywały dość długo. Jednak problemy z powtarzalnością tych wyników w innych jednostkach, dyskinezje spowodowane zabiegami chirurgicznymi, problemy z dostępnością tkanek płodowych do przeszczepów oraz względy etyczne sprawiły, że metoda ta nie była dalej rozwijana [90], [91], nawet pomimo obiecujących i długotrwałych efektów terapeutycznych [92].

Wciąż trwają poszukiwania strategii terapeutycznej, która pozwoliłaby na trwałe zahamowanie postępów choroby i zatrzymałaby proces obumierania neuronów dopaminergicznych w mózgu oraz pozwoliłaby na regenerację obecnych już uszkodzeń. Wśród podejść farmakologicznych potencjalnymi składnikami terapii przyszłości są m.in.: aktywatory proteasomalnego systemu degradacji białek, związki chaperonowe, substancję będące w stanie rozbijać agregaty białkowe, związki neuroprotektyjne i przeciwzapalne, inhibitory niektórych kinaz sygnałowych, związki chroniące przed stresem oksydacyjnym komórki i zmiatające wolne rodniki oraz substancje wpływające na potencjał mitochondrialny [93].

Od pewnego czasu coraz większe nadzieje na skuteczną terapię regeneracyjną budzą komórki macierzyste. Możliwość wyróżnicowania z nich prawidłowo działających neuronów i przejęcie przez nie funkcji uszkodzonej istoty czarnej śródmózgowia powinno przynieść istotną poprawę stanu klinicznego pacjentów cierpiących na PD. Rozważa się użycie somatycznych komórek macierzystych [94], jednak w centrum zainteresowania znajdują się pluripotencjalne komórki macierzyste [91], zarówno ESC jak i iPS. Ich zalety oraz zasadę zastosowania przedstawiono we wcześniejszych rozdziałach. Do tej pory wielu autorów pokazało możliwość uzyskania neuronów dopaminergicznych za pomocą różnych protokołów różnicowania komórek iPS (zebrane w [91]), a także ich wpływ na poprawę objawów w zwierzęcym modelu choroby Parkinsona [95], [96], [97]. Wyniki te oraz olbrzymi potencjał terapeutyczny

komórek iPS sprawiają, że są one ogromną nadzieją na skuteczną terapię regeneracyjną w chorobie Parkinsona.

## 1.2.2 Modele choroby Parkinsona

W celu określenia skuteczności nowych terapii konieczne jest zastosowanie odpowiedniego modelu choroby. Modele chorób służą testowaniu nowych strategii terapeutycznych czy sprawdzaniu skuteczności nowych leków.

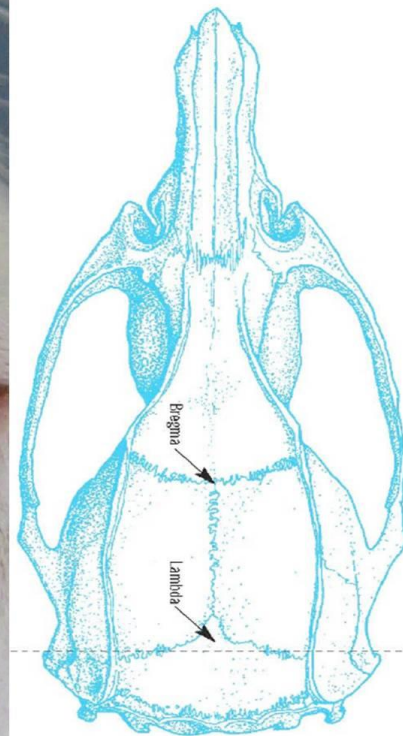
W przypadku choroby Parkinsona stosuje się komórkowe modele *in vitro* oraz zwierzęce modele *in vivo*. Wśród modeli *in vitro* bardzo obiecujące są hodowle komórek ulegających neurodegeneracji – neuronów dopaminergicznych. Często używa się hodowli komórek powstałych przez różnicowanie komórek macierzystych – np. embrionalnych komórek macierzystych [98]. Neurony dopaminergiczne można uzyskać przez różnicowanie komórek iPS powstałych z dorosłych komórek pacjentów cierpiących na PD [47]. Stanowią one doskonały model do testów np. nowych leków neuroprotektynnych. Co więcej komórki takie pochodzące od pacjentów o określonym tle genetycznym powtarzają obraz choroby *in vitro* (m.in. zaburzenia morfologii i liczby neurytów, akumulacja pęcherzyków wewnątrzkomórkowych) [99]. Komórki takie stanowią doskonały model do badań nad patomechanizmami choroby Parkinsona, zwłaszcza przypadków idiopatycznych, ponieważ umożliwiają porównanie takich komórek uzyskanych od pacjentów o różnym tle genetycznym pod bardzo wieloma kątami i na wielu poziomach (od objawów choroby do różnic na poziomie molekularnym). Ponadto, neurony dopaminergiczne uzyskane z komórek iPS już teraz pozwalają *leczyć* zwierzęce modele choroby Parkinsona. Po ich wszczepieniu do mózgow sznurów z wyindukowanymi objawami choroby Parkinsona, stan zwierząt poprawia się [95], [96], [97]. Modele choroby Parkinsona *in vitro* są doskonałym narzędziem do testów nowych substancji leczniczych, badań nad patogenezą choroby, a także źródłem komórek do potencjalnych zastosowań terapeutycznych.

W celu określenia skuteczności terapii komórkowej, najczęściej używa się sznurzych lub mysich modeli choroby Parkinsona (rzadziej są one indukowane u naczelnych). U zwierząt tych w sposób mniej lub bardziej specyficzny uszkadza się

system dopaminergiczny. Stosuje się w tym celu toksyny, które ze względu na swój charakter należy podawać bądź do miejsca, które chcemy uszkodzić bądź systemowo.

Przykładem toksyny, która ze względu na słabą penetrację bariery krew-mózg, wymaga miejscowego podania jest pochodna dopaminy - 6-hydroksydopamina (6-OHDA). Neurotoksyna ta wywołuje śmierć komórek katecholaminowych na drodze silnego stresu oksydacyjnego [100]. Podaje się ją zwykle do struktury mózgu, którą planuje się uszkodzić. W przypadku indukcji modelu choroby Parkinsona jest to istota czarna bądź przebieg neuronów dopaminergicznych. Podanie takie wymaga operacji chirurgicznej. Podania toksyny dokonuje się przez cienką kaniulę do mózgu uśpionego zwierzęcia (Rycina 10). Aby zwiększyć specyficzność toksyczności 6-OHDA dla neuronów dopaminergicznych, często śródoperacyjnie podaje się substancje mające na celu ochronę innych neuronów (np. dezipraminę). Zwykle operacje tego typu są jednostronne - toksyna podawana jest do jednej półkuli mózgu, druga służy za kontrolę. Po jednostronnym uszkodzeniu szlaku dopaminowego zwierzę zaczyna kręcić się w koło - w stronę uszkodzenia – ipsilateralnie. Kierunek obserwowanych obrotów jest zawsze w stronę przeciwną do strony przeważającej transmisji dopaminergicznej. Dlatego też po stymulacji dopaminomimetykiem - amfetaminą - szczury kręcą się w stronę uszkodzenia (amfetamina uwalnia dopaminę po stronie nieuszkodzonej). Natomiast agonista receptorów dopaminergicznych – apomorfiną - w tym modelu wywołuje rotacje kontralateralne (w stronę przeciwną do uszkodzenia), gdyż po stronie uszkodzenia wytwarza się nadwrażliwość postsynaptycznych receptorów dopaminergicznych. Rotacje po apomorfinie występują tylko wtedy, gdy uszkodzenie obejmuje ok. 80-90% neuronów. Ilość obrotów w jednostce czasu koreluje ze stopniem uszkodzenia układu dopaminergicznego. Jest to model najczęściej używany do badania przywrócenia funkcji motorycznych po przeszczepach komórek. Model ten jest stosunkowo łatwy w indukcji oraz pozwala na łatwą kwantyfikację.

Innym sposobem indukcji choroby Parkinsona jest systemowe podawanie rotenonu – substancji uważanej za pestycyd, która wywołuje inhibicję kompleksu I transportu elektronów w mitochondrium. Podaje się go zwierzętom w postaci gęstej zawiesiny doustnie za pomocą specjalnej sondy dożołądkowej. Wyindukowane objawy są dwustronne, a skuteczność indukcji objawów jest potwierdzana testem sprawności i koordynacji ruchowej zwierzęcia. Przeprowadza się je za pomocą testu rotującego pręta, a pomiar dotyczy czasu utrzymywania się zwierzęcia na przyspieszającym pręcie [91].



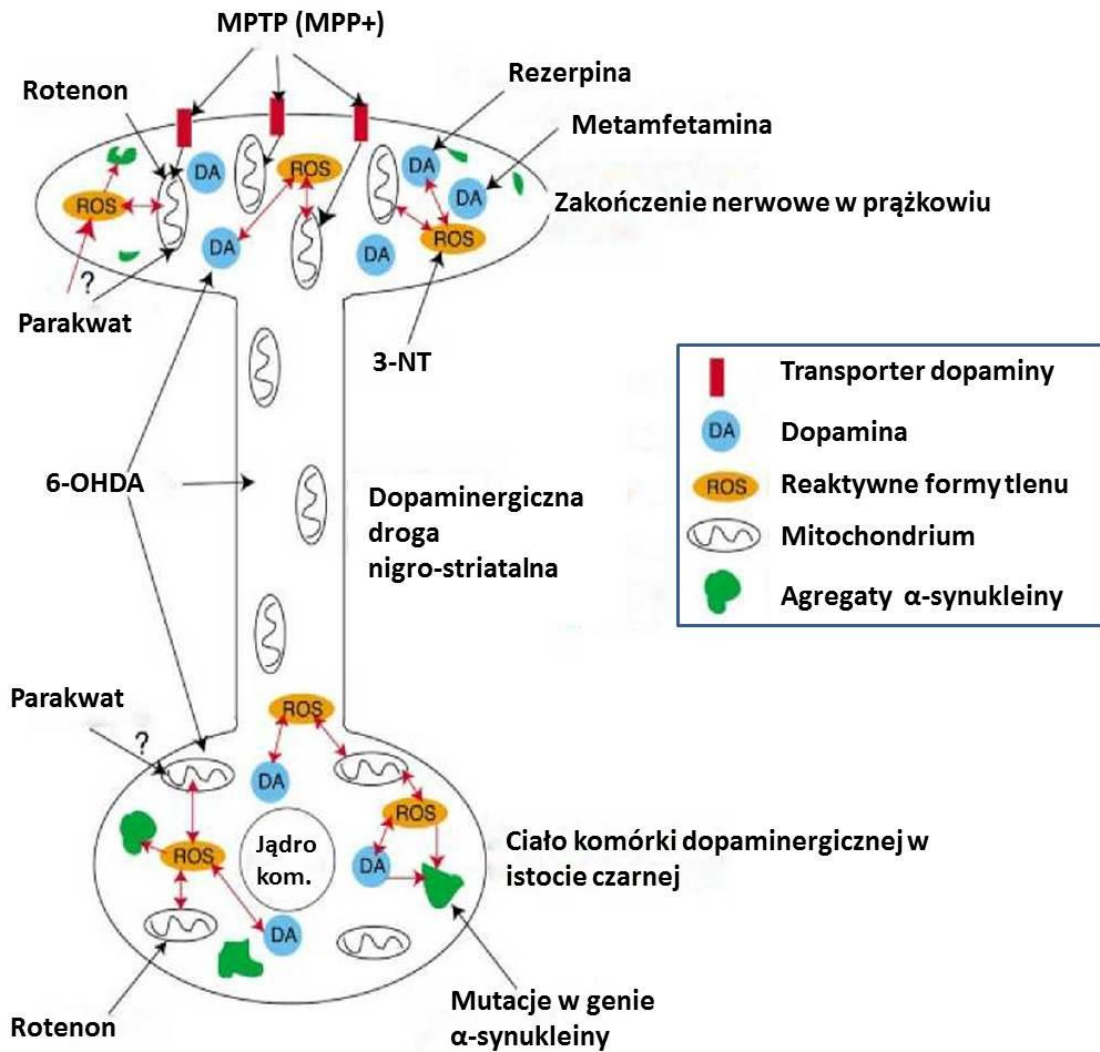
**Rycina 10.** Operacja stereotaktyczna na mózgu szczura mająca doprowadzić do indukcji objawów choroby Parkinsona (A). Miejsce podania toksyny oraz komórek ustala się na podstawie atlasu anatomicznego mózgu, a koordynaty ustala się względem przecięcia szwów czaszki (B) Źródło: zdjęcie własne, atlas *The Rat Brain* G. Paxinos, C. Watson, [101].

Inne metody uzyskiwania modeli choroby Parkinsona to wywołanie chronicznego stanu zapalnego lub systemowe podanie niezwykle silnej neurotoksyny

MPTP (1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyna). Jej aktywny metabolit, MPP<sup>+</sup>, jest transportowany do komórek przez transporter dopaminy, gdzie hamuje I kompleks mitochondrialny. Toksyna ta wywołuje objawy choroby Parkinsona u ludzi już po jednorazowym podaniu. Co ciekawe, szczury są na nią odporne. Najczęściej używana jest ona do indukcji modeli u naczelnych, rzadziej u myszy [102]. Wśród innych związków używanych do indukcji objawów choroby Parkinsona wymienić należy związki obniżające zawartość dopaminy w prążkowie (np. rezerpina czy metamfetamina) oraz wpływające na kompleks I łańcucha transportu elektronów w mitochondrium (np. parakwat) Miejsca działania poszczególnych toksyn prezentuje rycina 11.

Istnieją też genetyczne modele PD. Są to zwierzęta z wyłączonymi, zmutowanymi punktowo lub zwielokrotnionymi liczbowo genami, które są także zmienione u chorych cierpiących na chorobę Parkinsona [103].

Wybór odpowiedniego modelu choroby Parkinsona zależy od typu badań, jakie mają być na tym modelu prowadzone, wszystkie one pozwalają jednak uzyskać odpowiednie narzędzie do wielu badań, zarówno nad mechanizmami powstawania jak i metodami leczenia tej choroby.



**Rycina 11.** Schemat działania poszczególnych toksyn w indukcji zwierzęcych modeli choroby Parkinsona. Źródło: [100], zmodyfikowano.

## 2. Cel pracy

Głównym celem niniejszej pracy była ocena możliwości zastosowania indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych w regeneracyjnej terapii chorób neurodegeneracyjnych na przykładzie choroby Parkinsona.

Najważniejszym środkiem do osiągnięcia powyższego celu było opracowanie metody różnicowania ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPS) do neuronów dopaminergicznych, które narażone są na degenerację w chorobie Parkinsona. Uzyskane komórki produkujące dopaminę posłużyły do opracowania modelu tego schorzenia *in vitro*, a także do próby poprawy obrazu behawioralnego zwierzęcego modelu choroby Parkinsona.

Dodatkowymi celami pracy były: uzyskanie mysiego oraz szczurzego modelu choroby Parkinsona oraz stworzenie *genetycznego zabezpieczenia* indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych pozwalającego na ewentualną eliminację niepożądanych komórek z nich powstałych. W ostatnim zadaniu użyto strategii *genu samobójczego* (ang. *suicide gene*) pozwalającej na specyficzną eliminację komórek zmodyfikowanych genetycznie.

### 3. Materiały i metody

#### 3.1 Materiały i odczynniki

Najważniejsze materiały i odczynniki użyte w tej pracy zbiera poniższa tabela.

Odczynnik	Firma	Uwagi
$\beta$ -merkaptoetanol	Fluka (Szwajcaria)	
6-OHDA	Sigma-Aldrich, (Niemcy)	
Acetonitryl	Sigma-Aldrich (Niemcy)	
Agarozą	Serva (Niemcy)	
Akutaza	Lonza (Belgia)	
Albumina z surowicy wołowej (BSA)	Sigma-Aldrich (Niemcy)	
Antybiotyk/antymykotyk (roztwór 100x)	Life Technologies (USA)	10 000 U/ml penicylina, 10 000 $\mu$ g/ml streptomycyna, 25 $\mu$ g/mL of Fungizone®
BDNF	Peprtech (UK)	
BES	Sigma-Aldrich (Niemcy)	
bFGF	Life Technologies (USA)	zasadowy (ang. <i>b-basic</i> ) FGF, FGF2
Blastocydyna	Life Technologies (USA)	
Bromek etydyny	Sigma-Aldrich (Niemcy)	
Bromek etydyny	Sigma-Aldrich (Niemcy)	
Chlorek wapnia	POCH (Polska)	bezwodny
Chlorochina	Sigma-Aldrich (Niemcy)	
dibutyrylo-cAMP	Sigma-Aldrich (Niemcy)	
DiI (1,1-dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindocarbocyanine perchlorate)	Life Technologies (USA)	
DMSO	Merck (Niemcy)	



DNaza DNase I Amplification Grade	Sigma-Aldrich (Niemcy)	zestaw
EDGS	Life Technologies (USA)	100x
EDTA	Sigma-Aldrich (Niemcy)	
Enzymy restrykcyjne: EcoRI, EcoRV	Eurx (Polska)	
Epilife	Life Technologies (USA)	
Ester acetoksymetylowy (AM) kalceiny	Life Technologies (USA)	
FBS	Eurx (Polska)	
FGF8a	Peptotech (UK)	
Fibronektyna	Life Technologies (USA)	
Filtry strzykawkowe o średnicy porów 0,2 oraz 0,45 µm	Sarstedt (Niemcy)	
Gancyklowir	Sigma-Aldrich (Niemcy)	
GNDF	Peptotech (UK)	
Gentamycyna	Lonza (USA)	
Glukoza	POCH (Polska)	
HBSS	Life Technologies (USA)	
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich (Niemcy)	
Karboksymetyloceluloza	Sigma-Aldrich (Niemcy)	
Ketamina	Biowet (Polska)	
KSR	Life Technologies (USA)	
Ksylazyna	Biowet (Polska)	
Kwas askorbinowy	Sigma-Aldrich (Niemcy)	
Kwas nadchlorowy	Sigma-Aldrich (Niemcy)	
Laminina	Life Technologies (USA)	
L-Glutamina	Lonza (Belgia)	
Marker mas cząsteczkowych do żeli agarożowych Perfect 1 kB DNA Ladder	Eurx (Polska)	
Maślan sodu	Sigma-Aldrich (Niemcy)	
Matrizel	BD (USA)	
Medium hodowlane DMEM	Lonza (Belgia)	glukoza 4,5g/l

Medium hodowlane DMEM/F12 (1:1)	Life Technologies (USA)	2mM glutamax 1mM pirogronian
Metanol	CHEMPUR (Polska)	
Mitomycyna C	Sigma-Aldrich (Niemcy)	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	POCH (Polska)	
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich (Niemcy)	
NaCl	POCH (Polska)	
Naczynia hodowlane oraz plastikowe próbówki	Sarstedt (Niemcy)	
Noggin	Sigma-Aldrich (Niemcy)	Inhibitor BMP
Non-Essential Amino Acids (NEAA)	Life Technologies (USA)	
Odwrotna transkryptaza MMLV	Promega (USA)	zestaw
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich (Niemcy)	
PBS	Lonza (Belgia)	
Penicylina/Streptomycyna	Life Technologies (USA)	
Polibren	Sigma-Aldrich (Niemcy)	Bromek heksadimetryny
Polimeraza DNA Hybrid	Eurx (Polska)	
Polimeraza DNA Taq	Eurx (Polska)	
Poli-ornityna	Life Technologies (USA)	
Purmorphamine	Sigma-Aldrich (Niemcy)	Aktywator szlaku Sonic Hedgehog
Random hexamers	Promega (USA)	Losowe sześcionukleotydowe startery
RNasin	Promega (USA)	Inhibitor RNaz
Rotenon	Sigma-Aldrich (Niemcy)	
Sacharoza	POCH (Polska)	
SB431542	Sigma-Aldrich (Niemcy)	Inhibitor SMAD
Sonic Hedgehog	Peptidech (UK)	
Suplement N2	Life Technologies (USA)	
TGFβ3	Peptidech (UK)	

Tris	Sigma-Aldrich (Niemcy)	
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Niemcy)	
TrypLE Express	Life Technologies (USA)	substytut trypsyny
Trypsyna/EDTA	Lonza (USA)	
Tween 20	Bio-rad (USA)	
Y-27632	Sigma-Aldrich (Niemcy)	inhibitor kinazy ROCK
Zestaw do izolacji plazmidowego DNA –maxi-prep – QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen (USA)	
Zestaw do izolacji plazmidowego DNA –mini-prep – GeneMATRIX Basic DNA Purification Kit	Eurx (Polska)	
Zestaw do izolacji RNA GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit	Eurx (Polska)	
Zestaw do produkcji lentiwirusów Vira Power	Life Technologies (USA)	
Zestaw do przygotowania plazmidów lentiwirusowych Gateway	Life Technologies (USA)	
Zestaw do przyżyciowego oznaczania aktywności alkalicznej fosfatazy Alkaline Phosphatase Live Stain	Life Technologies (USA)	
Zestaw do reprogramowania oparty na wirusie Sendai Cytotune2.0	Life Technologies (USA)	
Zestaw do sekwencjonowania DNA BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (USA)	
Żelatyna	POCH (Polska)	

**Tabela 1.** Użyte odczynniki oraz ich producenci.

Ludzkie włosy użyte do izolacji keratynocytów zostały pobrane od zdrowych dawców – doktorantów Zakładu Transplantologii CM UJ, za ich dobrowolną zgodą - zgodnie z uchwałą Komisji Bioetycznej nr KBET/173/B/2012.

Mysie embrionalne fibroblasty zostały wyizolowane z zarodków mysich szczepu CD1 hodowanych w zwierzętarni CM UJ – za zgodą I Lokalnej Komisji Bioetycznej zgodnie z uchwałą nr 21/2012.

W doświadczeniach z użyciem szczurów użyto samców Wistar Han (Charles River, Niemcy). Przechowywane były one w cyklu 12 godzinnym (światło/ciemność – światło 7.00-19.00) z wolnym dostępem do wody i pokarmu.

Eksperymenty wykonano zgodnie z Ustawą o Doświadczeniach na Zwierzętach z dnia 21 stycznia 2005 (Dziennik Ustaw nr 33/2005, poz. 289), oraz Dyrektywą Komisji Europejskiej 86/609/EEC. Dołożono wszelkich starań, aby zmniejszyć liczbę zwierząt i zminimalizować ich cierpienie.

Wszystkie doświadczenia na zwierzętach były przeprowadzane za zgodą odpowiednich komisji bioetycznych (doświadczenia na myszach – zgoda I Lokalnej Komisji Bioetycznej nr 21/2012, doświadczenia na szczurach – zgoda II Lokalnej Komisji Bioetycznej nr 888/2012).

Użyte przeciwciała zakupiono w firmie Milipore (USA), Vector (USA) BD (USA) oraz Life Technologies (USA). Wszystkie startery zakupiono w firmie Genomed (Polska). Plazmidy pLOX-GFP-iresTK, FUW-OSKM oraz pCMV-dR8.2dvpr uzyskano z repozytorium Addgene (USA).

Komórki PD-iPS (ang. *Parkinson's Disease-induced pluripotent Stem Cells*) uzyskano wcześniej w Zakładzie Transplantologii poprzez reprogramowanie z użyciem wirusa Sendai jednojądrzastych komórek krwi obwodowej pacjenta cierpiącego na chorobę Parkinsona.

Komórki piPS (ang. *protein induced pluripotent Stem Cells*, indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste otrzymane za pomocą białek) zakupiono w firmie System Biosciences (USA).

Pochodzenie niewymienionych powyżej odczynników oraz urządzeń podano w opisach poszczególnych metod.

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Hodowle komórkowe

W trakcie realizacji pracy doktorskiej hodowane były linie komórkowe oraz komórki prawidłowe. Poniższa tabela zbiera hodowane komórki oraz ich media hodowlane.

<b>Linia komórkowa/ typ komórek prawidłowych</b>	<b>Zastosowanie</b>	<b>Podstawowe medium hodowlane</b>	<b>Suplementy</b>
293 T	Wyselekcjonowana linia embrionalnych komórek ludzkiej nerki produkujących wektory lentiwirusowe	DMEM	10% FBS, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml / 100 µg/ml P/S
HT1080	Linia komórkowa włókniamięsa używana do mianowania wektorów wirusowych	DMEM	10% FBS, 2mM L-glutamina, 100 U/ml / 100 µg/ml P/S
Rh30	Linia komórkowa mięsaka prątkowanokomórkowego służąca jako modelowa linia nowotworowa	DMEM	10% FBS, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml / 100 µg/ml P/S
Ludzkie keratynocyty	Prawidłowe komórki somatyczne wyizolowane z wyrwanych włosów używane do reprogramowania	Epilife	1% EDGS, 60 µM CaCl <sub>2</sub> , 50 µg/ml gentamycyna

Mysie embrionalne fibroblasty (MEF)	Komórki służące do przygotowania warstwy odżywczej do hodowli komórek iPS	DMEM	10% FBS, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml / 100 µg/ml P/S
iPS	Ludzkie indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste, różnicowane do neuronów dopaminergicznych	DMEM/F12	20% KSR, 100 µM β-merkaptoetanol, 100 µM Non-Essential Amino Acids, 100 U/ml / 100 µg/ml P/S, 10 ng/ml bFGF

**Tabela 2.** Hodowane komórki oraz ich media hodowlane.

Hodowane komórki były rutynowo obserwowane oraz fotografowane pod odwróconym mikroskopem optycznym Olympus IX70 z obiektywem kontrastowo-fazowym oraz aparatem fotograficznym firmy Canon. Linie komórkowe hodowano w odpowiednich mediach w 37°C w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> i 95% wilgotności oraz pasażowano 2 razy w tygodniu przy użyciu 0,05% trypsyny. Do przygotowania roztworów oraz zawiesin komórek używano plastikowych probówek (Sarstedt), a wszystkie wirowania komórek wykonywano przy prędkości 1000 obrotów/minutę przez 5 minut. Linie komórkowe mrożono zapewniając wolny spadek temperatury (do -80°C), w gęstości 1 milion komórek/ml, w medium mrozeniowym zawierającym 80% medium hodowlanego, 10% FBS oraz 10% DMSO, a dzień po zamrożeniu umieszczano w parach ciekłego azotu.

### **3.2.2 Izolacja ludzkich keratynocytów z wyrwanego włosa**

Metodę tę opracowano na podstawie literatury [104]. Około 20 włosów wrywano wraz zewnętrznym płaszczem i cebulką z potylicznej części głowy za pomocą pęsety i natychmiast umieszczano w roztworze antymykotyku i antybiotyku. Następnie włosy przycinano skalpelem, a część włosa zawierającą płaszcz umieszczano na szalce hodowlanej opłaszczonej 0,1% roztworem żelatyny w małej objętości medium hodowlanego dla komórek iPS pre-kondycjonowanego przez 24 godziny przez mysie embrionalne fibroblasty. Ilość medium dobierano tak, aby włos przywierał do dna szalki w ciągu pierwszej doby izolacji oraz aby nie wysechł (450  $\mu$ l). Każdego następnego dnia dodawano medium hodowlane, aż zaobserwowano duże kolonie keratynocytów. Na tym etapie medium zmieniano na medium dla keratynocytów, a po zajęciu przez komórki ponad 70% szalki hodowlanej komórki były pasażowane z użyciem roztworu TrypLE i wysiewane na szalkę hodowlaną opłaszczoną żelatyną oraz infekowane po osiągnięciu 60-70% konfluencji.

### **3.2.3 Izolacja i inaktywacja mitotyczna mysich embrionalnych fibroblastów (MEF)**

Mysie embrionalne fibroblasty izolowano z czternastodniowych zarodków mysich szczepu CD1. Ciężarne samice uśmiercano przez zerwanie rdzenia kręgowego, izolowano macice i umieszczano je na szalce w sterylnym PBS. Izolowano poszczególne zarodki oraz przenoszono je na świeżą szalkę z PBS. Następnie przecinano owodnię i dokonywano dekapitacji każdego z embrionów. Usuwano wnętrzności w celu pozbycia się tkanek niezbudowanych z fibroblastów. Pozostałe tkanki umieszczano na świeżej szalce hodowlanej. Dodawano roztworu trypsyny i homogenizowano tkanki mechanicznie przy pomocy skalpela. Szalkę ze zhomogenizowanymi tkankami umieszczano w inkubatorze na 5 minut, a następnie pipetowano przez 1-2 minuty w celu rozbicia tkanki. W kolejnym kroku dodawano 5ml medium do komórek MEF i pipetowano ok. 20x w celu rozdrobnienia zawiesiny komórek. Zawiesinę komórek wirowano. Medium nad komórkami odciągano, a pelet komórek zawieszano w ok. 10 ml świeżego medium hodowlanego (1,5 embriona na 1

ml medium). Komórki wysiewano na szalki hodowlane o średnicy 10 cm (w gęstości 1,5 embriona na szalkę) i umieszczano w inkubatorze. Dwa dni po izolacji komórki pasażowano używając trypsyny. Komórki po pasażu rozdzielano w rozcieńczeniu 1:4. Po pierwszym pasażu i osiągnięciu konfluencji komórki mrożono w gęstości 1 milion komórek/ml w medium mrożeniowym złożonym z 90% FBS i 10% DMSO.

Mitotycznie inaktywowano komórki MEF z niskiego pasażu (do 3.). Komórki hodowano aż do osiągnięcia 90-95% konfluencji, a następnie zmieniono medium na zawierające mitomycynę C w stężeniu 10 µg/ml. Komórki inkubowano przez 3 godziny w inkubatorze, po czym przepłukano je 3 razy PBS. Inaktywowane komórki trypsynizowano, wirowano oraz zawieszano w świeżym medium hodowlanym, po czym określono ich ilość. Komórki wysiewano na płytki pokryte żelatyną w gęstości 15-20 tys./cm<sup>2</sup> lub mrożono w stężeniu 1,5 miliona/ml w medium mrożeniowym (90% FBS + 10% DMSO). Ze względu na umiarkowaną śmiertelność inaktywowane komórki po rozmrożeniu wysiewano w gęstości ok. 1,5x wyższej niż świeżo po inaktywacji. Komórki iPS wysiewano na tak przygotowaną warstwę odżywczą z inaktywowanych mitotycznie mysich embrionalnych fibroblastów (iMEF) między 1, a 5 dni po inaktywacji.

### **3.2.4 Przygotowanie szalek opłaszczonych żelatyną, matriżelem oraz poliornityną/lamininą**

Na naczynia hodowlane wylewano żelatynę w stężeniu 0,1% w wodzie destylowanej, w takiej objętości, aby całkowicie pokryć opłaszczaną powierzchnię (zwykle ok. połowy objętości nominalnej pożywki). Naczynia inkubowano przez 3 godziny w temperaturze pokojowej, 1 godzinę w 37°C lub przez całą noc w 4°C. Po inkubacji żelatynę odciągano i wysiewano komórki. Przed użyciem roztwór żelatyny filtrowano przez filtry o średnicy porów 0,2 µm (Sarstedt). Zaparafilmowane naczynia z żelatyną przechowywano w 4°C.

Naczynia hodowlane opłaszczano matriżelem zgodnie z instrukcjami producenta - firmy BD (USA). Przed użyciem przechowywano je w 4°C nie dłużej niż 2 tygodnie.



Naczynia hodowlane opłaszczano sterylnym roztworem poli-ornityny w stężeniu 20 µg/ml w wodzie destylowanej (zwykle ok. połowy objętości nominalnej pożywki) inkubując szalki przez 1 godzinę w 37°C. Następnie szalki przepłukiwano wodą destylowaną oraz zalewano roztworem lamininy w stężeniu 5 µg/ml w wodzie destylowanej i inkubowano przez 1 godzinę w 37°C. Tak przygotowane szalki przechowywano w 4°C przez okres nie dłuższy niż 3 tygodnie. Tuż przed użyciem szalki opłaszczane poli-ornityną i lamininą ogrzewano do temperatury pokojowej, odciągano roztwór lamininy, przepłukiwano PBS oraz wysiewano komórki.

### 3.2.5 Reprogramowanie ludzkich keratynocytów z użyciem wektora na bazie wirusa Sendai

Wyizolowane z wyrwanego włosa keratynocyty infekowano wektorami stworzonymi na bazie wirusa Sendai wg protokołu do infekcji fibroblastów zalecanego przez producenta - firmę Life Technologies. Komórki o konfluencji 60-70% ( $3 \times 10^5$  keratynocytów na szalce hodowlanej o średnicy 35mm) infekowano zestawem trzech wektorów. Pierwszy z nich przenosił zestaw genów *KLF4*, *OCT3/4*, *SOX2*, drugi z nich dostarczał gen *C-MYC*, a kolejny dodatkową dawkę genu *KLF4*. Wektorów użyto w takiej ilości, aby stosunek liczby cząstek infekcyjnych do liczby komórek (MOI, ang. *Multiplicity of Infection*) wyniósł odpowiednio 5,5,3. Kolejne czynności w toku reprogramowania keratynocytów zbiera poniższa tabela.

Dzień	Czynność
0	Infekcja komórek
1-6	Usunięcie martwych komórek i zmiana medium na świeże co drugi dzień
7	Przesianie komórek na warstwę odżywczą z iMEF na szalce o średnicy 100 mm w medium do komórek iPS zawierającym maślan sodu w stężeniu 1 mM, umieszczenie reprogramowanych komórek w atmosferze 5% CO <sub>2</sub> oraz 5% O <sub>2</sub>

8-14	Codzienna zmiana medium na świeże medium do komórek iPS zawierające maślan sodu
11	Pojawienie się pierwszych kolonii przypominających kolonie komórek iPS
15	Usunięcie z hodowli maślanu sodu, dodanie połowy nominalnej ilości komórek iMEF tworzących warstwę odżywczą.
15-35	Codzienna zmiana medium na świeże medium do komórek iPS
18	Przeniesienie pierwszych kolonii na świeżą warstwę odżywczą
18-22	Pojawienie się kolejnych kolonii komórek iPS
28-35	Przeniesienie kolejnych kolonii na świeżą warstwę odżywczą

W trakcie całego procesu reprogramowania komórki hodowano w warunkach hipoksji (5% O<sub>2</sub>). Kolonie o morfologii przypominającej kolonie komórek iPS dzielono na drobne fragmenty oraz zdrapywano pod mikroskopem stereoskopowym firmy Delta Optical za pomocą igły iniekcyjnej i umieszczano w dołku okrągłodennej płytki 96-dołkowej (Sartstedt). Po kilkukrotnym przepipetowaniu w celu rozdrobnienia kolonii na małe fragmenty przenoszono zawiesinę komórek do dołka płytki 12-dołkowej z przygotowaną uprzednio warstwą odżywczą z komórek iMEF w medium do komórek iPS zawierającym inhibitor kinazy ROCK – Y-27632 – w stężeniu 10 μM. Inhibitor ten jest konieczny, aby uchronić komórki iPS przed śmiercią wywołaną rozbięciem kolonii na pojedyncze komórki w zawieszynie [105]. W sumie przeniesiono w ten sposób 18 kolonii komórek kiPS (ang. *keratinocytes iPS*). Hodowano je na szalkach 12-dołkowych zmieniając codziennie medium na świeże, aż do momentu gdy kolonie były dostatecznie duże (ok. 0,5 mm średnicy) do pasażu. Gdy przeniesione kolonie komórek iPS osiągnęły rozmiary przekraczające 0,5 mm wykonywano ich pierwszy pasaż, w którym przenoszono wszystkie komórki z jednego dołka płytki 12-dołkowej na jeden dołek płytki 6-cio dołkowej z przygotowaną uprzednio warstwą odżywczą komórek iMEF.

### 3.2.6 Hodowla, pasaż, mrożenie oraz rozmrażanie komórek iPS

Komórki iPS hodowano w odpowiednim dla nich medium na warstwie odżywczej z inaktywowanych komórek MEF aż do osiągnięcia 80-90% konfluencji lub do momentu, gdy sąsiednie kolonie zaczęły się zrastać lub gdy w centrum dużej kolonii dochodziło do ich różnicowania – wypiętrzania i wzrostu wielowarstwowego. Medium zmieniano na świeże każdego dnia. Przed pasażem zróżnicowane rejony wydrapywano igłą iniekcyjną pod mikroskopem stereoskopowym. Kolonie komórek iPS przepłukiwano dwukrotnie HBSS, po czym zalewano objętością akutazy niezbędną do przykrycia całej powierzchni hodowlanej (0,5 ml dla dołka płytki 12-dołkowej). Komórki inkubowano z akutazą w 37°C do momentu rozpoczęcia odrywania się komórek od powierzchni płytki (ok. 5 minut). Następnie dodawano 4-krotnej objętości HBSS i kilkakrotnie delikatnie pipetowano celem oderwania wszystkich komórek od podłoża. Zawiesinę komórek wirowano oraz zawieszano w świeżym medium hodowlanym. Komórki iPS wysiewano na przygotowaną uprzednio świeżą warstwę odżywczą w medium zawierającym Y-27632. Komórki iPS pasażowano, w zależności od wyjściowej gęstości w stosunku od 1:4 do 1:12. Za każdym razem, gdy kolonie komórek iPS rozbijano na pojedyncze komórki, do medium, w którym je wysiewano dodawano Y-27632.

Przed zamrożeniem komórek iPS pre-inkubowano je na szalce, na której rosły z 10  $\mu$ M Y-27632 przez 1 godzinę w 37 °C. Po zebraniu, zwirowaniu i policzeniu komórek iPS zawieszano je na lodzie w zimnym medium mrozeniowym o składzie: 90% FBS, 10% DMSO, 10  $\mu$ M Y-27632 w gęstości 1,5 miliona komórek/ml oraz przenoszono do probówek mrozeniowych, które umieszczano w -80°C zapewniając wolny spadek temperatury, a dzień po zamrożeniu umieszczano w parach ciekłego azotu.

Komórki iPS rozmrażano szybko, w 37°C. Po rozmrożeniu zawiesinę komórek rozcieńczano 5-krotnie PBS oraz wirowano. Pelet komórek zawieszano w świeżym medium do komórek iPS zawierającym 10  $\mu$ M Y-27632 oraz wysiewano na przygotowaną wcześniej warstwę odżywczą.

W opisany powyżej sposób postępowano zarówno z uzyskanymi komórkami kiPS, jak i zakupionymi komórkami piPS.

### **3.2.7 Różnicowanie komórek piPS do kardiomiocytów**

Aby potwierdzić potencjał zakupionych komórek piPS przeprowadzono ich różnicowanie do kardiomiocytów. Komórki piPS hodowano w odpowiednim dla nich medium na warstwie odżywczej z inaktywowanych komórek MEF aż do osiągnięcia 80-90% konfluencji. Następnie komórki zebrano akutazą oraz wysiano na szalkę do hodowli bakteryjnych (Sarstedt) uniemożliwiającą adhezję komórek, w medium do komórek iPS bez bFGF, w gęstości 1/2 szalki komórek piPS na 1 szalkę nieadherentną. Następnie komórki piPS hodowano w zawiesinie przez 6 dni, aż do wytworzenia ciałek embrioidalnych EB. W kolejnym kroku ciała embrioidalne zebrano, zwirowano (300 obrotów/minutę, 5 minut) oraz wysiano na szalkę adherentną o takiej samej powierzchni, jak używana wcześniej szalka nieadherentna. Przez kolejne dni komórki hodowano w medium różnicującym do kardiomiocytów (DMEM + 20% FBS, 2 mM L-glutamina, 0,1 mM  $\beta$ -merkaptoetanol, 100  $\mu$ M NEAA, 100 U/ml / 100  $\mu$ g/ml P/S, 100  $\mu$ M kwas askorbinowy), aż do pojawienia się kurczących się spontanicznie kardiomiocytów. Protokół opracowano na podstawie literatury [106].

### **3.2.8 Ocena ekspresji alkalicznej fosfatazy**

Ekspresję alkalicznej fosfatazy określono fluorescencyjnie, przyżyciowo za pomocą zestawu Alkaline Phosphatase Live Stain firmy Life Technologies wg zaleceń producenta. W zastosowanej reakcji katalizowanej przez alkaliczną fosfatazę powstaje nierozpuszczalny produkt wykazujący zieloną fluorescencję.

### **3.2.9 RT-PCR**

Do analizy ekspresji genów na poziomie RNA użyto techniki RT-PCR. RNA izolowano z komórek za pomocą zestawu GeneMATRIX Universal RNA firmy Eurx zgodnie z zaleceniami producenta. Po izolacji oraz pomiarze stężenia wyizolowanego RNA przy pomocy spektrofotometru Quawell Q5000 przeprowadzono trawienie DNazą zgodnie z zaleceniami producenta – firmy Sigma-Aldrich - w celu usunięcia ewentualnego zanieczyszczenia genomowym DNA. Reakcję odwrotnej transkrypcji

proszono przez 1 godzinę w 37°C przy użyciu polimerazy MMLV (Promega) zgodnie z instrukcją producenta. Skład mieszaniny reakcyjnej o objętości 20 µl prezentuje poniższa tabela.

<b>Składnik</b>	<b>Stężenie końcowe</b>
RNA	50 ng/µl (1 µg/reakcję)
Losowe heksamery	2,5 ng/µl
dNTPs	500 µM
Bufor reakcyjny	1x
RNasin	40 U/µl
Odwrotna transkryptaza MMLV	100 U/reakcję
Woda	do 20 µl

W kolejnym kroku wykonano reakcję PCR na uzyskanych matrycach cDNA. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawia poniższa tabela.

<b>Składnik</b>	<b>Stężenie końcowe</b>
cDNA	50 ng/µl (100 ng/reakcję)
Starter <i>forward</i>	0,5 µM
Starter <i>reversed</i>	0,5 µM
Taq Master mix (Eurx) 2x	1x
Woda	do 20 µl

W reakcja kontrolnych zamiast matrycy cDNA użyto wody (kontrola negatywna). Tam gdzie było to możliwe, jako kontroli pozytywnej zamiast cDNA użyto plazmidu FUW-OSKM.

Program reakcji PCR prezentuje poniższa tabela.

<b>Temperatura</b>	<b>Czas</b>	<b>Ilość cykli</b>
95°C	1 min	1
95°C	1 min	35
55°C	1 min	
72°C	30 s	
72°C	7 min	1

Wszystkie startery zaprojektowano tak, aby ich temperatura topnienia była podobna, temperatura przyłączania ich par w reakcji PCR wynosiła 55°C, a długość powstałego ampliconu wynosiła między 200 a 400 par zasad. Ich sekwencje prezentuje poniższa tabela.

<b>Nazwa startera</b>	<b>Sekwencja 5'-3'</b>
<b>hOCT3 for</b>	ATGGCGGGACACCTGGCTT
<b>hOCT3 rev</b>	GGGAGAGCCCAGAGTGGTGACG
<b>hc-Myc for</b>	ATGCCCTCAACGTTAGCT
<b>hc-Myc rev</b>	TTACGCACAAGAGTTCCG
<b>hNANOG for</b>	TGAACCTCAGCTACAAACAG
<b>hNANOG rev</b>	TGGTGGTAGGAAGAGTAAAG
<b>hTERT for</b>	TGTGCACCAACATCTACAAG
<b>hTERT rev</b>	GCGTTCTTGGCTTTCAGGAT

<b>hGAPDH for</b>	CAAAGTTGTCATGGATGACC
<b>hGAPDH rev</b>	CCATGGAGAAGGCTGGGG
<b>DAT for</b>	ACAGAGGGGAGGTGCGCCAG
<b>DAT rev</b>	ACGGGGTGGACCTCGCTGCA
<b>Tuj-1 for</b>	TGGATTCGGTCCTGGATGTG
<b>Tuj-1 rev</b>	ACCTTGCTGATGAGCAACG
<b>TH for</b>	GAGTACACCGCCGAGGAGATTG
<b>TH rev</b>	GCGGATATACTGGGTGCACTGG
<b>Nurr1 for</b>	CCCAGTGGAGGGTAAACTCA
<b>Nurr1 rev</b>	AATGCAGGAGAAGGCAGAAA
<b>Tyr for</b>	GAATGCTCCTGGCTGTTTTG
<b>Tyr rev</b>	AGTCGTCTCTCTGTGCAGT
<b>hNestin for</b>	CTCTGACCTGTCAGAAGAAT
<b>hNestin rev</b>	ACTTTCTTCCTCATCTGCAA
<b>c-Kit for</b>	GTTCTGCTCCTACTGCTTCGC
<b>c-Kit rev</b>	TAACAGCCTAATCTCGTCGCC
<b>MITF for</b>	TGCCCAGGCATGAACACAC
<b>MITF rev</b>	TGGGAAAAATACACGCTGTGAG
<b>MITF-M for</b>	ACCTTCTCTTTGCCAGTCCATCT
<b>MITF-M rev</b>	GGACATGCAAGCTCAGGACT
<b>PAX3 for</b>	AGCCGCATCCTGAGAAGTAA
<b>PAX3 rev</b>	CTTCATCTGATTGGGGTGCT
<b>TYRP1 for</b>	TGTAACAGCACCGAGGATGG
<b>TYRP1 rev</b>	TGTCCAATAGGGGCATTTTCCA
<b>SOX10 for</b>	TCTGGAGGCTGCTGAACGAAAG
<b>SOX10 rev</b>	TGTCTTCGGGGTGGTTGGA

Po amplifikacji produkty reakcji PCR rozdzielono w 2% żelu agarozowym z bromkiem etydydy o stężeniu 0,5 µg/ml przy napięciu 90V przez 25 minut. Żele sfotografowano za pomocą urządzenia Gel Logic 1500 Imaging System (USA) po wzbudzeniu światłem UV.

### **3.2.10 Barwienie immunocytofluorescencyjne**

Do określenia ekspresji markerów poszczególnych typów komórek na poziomie białka użyto metody barwienia immunocytofluorescencyjnego. Komórki do barwienia wysiewano na płytki 24-dołkowe. Kiedy komórki były gotowe do wybarwienia (odpowiedni etap różnicowania, konfluencja) medium hodowlane odciągano, a komórki płukano delikatnie 2 razy HBSS oraz utrwalano za pomocą 4% roztworu paraformaldehydu w HBSS przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Następnie roztwór ten odpłukiwano (trzykrotne płukanie HBSS). Kolejnym krokiem była permeabilizacja błon komórkowych z użyciem 0,1% roztworu Tritonu X-100 w PBS (5 minut w temperaturze pokojowej). Po trzykrotnym przepłukaniu komórek PBS zablokowano miejsca niespecyficznego wiązania się przeciwciał, przy użyciu 3% roztworu BSA (w PBS) przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie komórki inkubowano przez noc w 4°C na kołyszce z odpowiednim pierwszorzędowym przeciwciałem rozcieńczonym w 3% BSA. Kontrolę negatywną stanowił 3% roztwór BSA. Następnego dnia komórki przepłukiwano 3-krotnie PBS oraz inkubowano w temperaturze pokojowej, w ciemności, przez 1 godzinę z odpowiednim drugorzędowym przeciwciałem rozcieńczonym w 3% BSA w stosunku 1:200 oraz z barwnikiem Hoechst 33342 (wiążącym kwasy nukleinowe) w stężeniu 1 µg/ml. Następnie trzykrotnie odpłukiwano niezwiązane przeciwciało za pomocą PBS. Szalki zalewano PBS, parafilmowano oraz analizowano przy użyciu odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego Olympus IX70 z obiektywem kontrastowo-fazowym oraz aparatem fotograficznym firmy Canon. Wybarwione komórki porównywano z kontrolą negatywną lub izotypową w celu potwierdzenia specyficzności barwienia oraz odróżnienia barwienia od autofluorescencji komórek. Użyte przeciwciała zbiera poniższa tabela. W przypadku zastosowania przeciwciał pierwszorzędowych sprzężonych z fluoroforami nie używano przeciwciał drugorzędowych.



<b>Przeciwciało przeciwno/antygen</b>	<b>Rodzaj przeciwciała</b>	<b>Gatunek/pochodzenie przeciwciała</b>	<b>Użyte rozcieńczenie</b>	<b>Firma</b>
Transporter dopaminy (DAT)	pierwszorzędowe	szczurze	1:5000	Milipore
Tubulina βIII (TUI-1)	pierwszorzędowe	mysie	1:100	Milipore
Hydroksylaza tyrozyny (TH)	pierwszorzędowe	królicze	1:1000	Milipore
Dopamina (DA)	pierwszorzędowe	królicze	1:500	Milipore
GFAP	pierwszorzędowe,	mysie	1:1000	Milipore
MITF	pierwszorzędowe,	królicze	1:200	Milipore
Anty-SSEA-3 sprzężone z PE	pierwszorzędowe,	szczurze	1:10	BD
Anty-TRA-1-81 sprzężone z FITC	pierwszorzędowe,	mysie	1:10	BD
Anty-TRA-1-60 sprzężone z PE	pierwszorzędowe,	mysie	1:10	BD

Anty-SSEA-4 sprzężone z FITC	pierwszorzędowe,	mysie	1:10	BD
Anty-mysie sprzężone z Alexa Fluor 488	drugorzędowe	kozie	1:200	Life Technologies
Anty-szczurze sprzężone z Alexa Fluor 488	drugorzędowe	kozie	1:200	Life Technologies
Anty-królicze sprzężone z Alexa Fluor 555	drugorzędowe	kozie	1:200	Life Technologies

### 3.2.11 Barwienie i analiza cytofluorymetryczna komórek

Ekspresję markerów powierzchniowych komórek iPS sprawdzono cytofluorymetrycznie. Komórki iPS zebrano akutazą, zwirowano oraz policzono. Zawieszono 500 tys. komórek w 90  $\mu$ l PBS z 2% FBS. Do zawiesiny dodano 10  $\mu$ l odpowiedniego przeciwciała (lub niespecyficznego przeciwciała tego samego izotypu w izotypowej kontroli negatywnej). Komórki inkubowano przez 30 minut w 4°C, w ciemności, na kołysce po czym komórki dwukrotnie odpłukano w PBS i zwirowano. Wybarwione komórki zawieszono w 200  $\mu$ l PBS oraz zbierano za pomocą cytometru przepływowego FACS Canto (ang. *Fluorescence Activated Cell Sorter*, BD). Uzyskane dane analizowano przy użyciu oprogramowania FACS Diva (BD) oraz Cyflogic w odniesieniu do kontroli izotypowych. Użyte przeciwciała zbiera poniższa tabela.

<b>Przeciwciało przeciwko/ antygen</b>	<b>Gatunek/ pochodzenie przeciwciała</b>	<b>Firma</b>
Anty-SSEA-3 sprzężone z PE	szczurze	BD
Anty-TRA-1-81 sprzężone z FITC	mysie	BD
Anty-TRA-1-60 sprzężone z PE	mysie	BD
Anty-SSEA-4 sprzężone z FITC	mysie	BD

Cytofluorymetrycznie analizowano również komórki zmodyfikowane genetycznie posiadające ekspresję GFP, zarówno przy wyprowadzaniu linii jak i przy mianowaniu wirusa na komórkach HT1080. Komórki zbierano, wirowano, zawieszano w PBS oraz zbierano za pomocą cytometru przepływowego FACS Canto. Uzyskane dane dotyczące odsetka komórek wykazujących zieloną fluorescencję GFP analizowano przy użyciu oprogramowania FACS Diva (BD) oraz Cyflogic.

### **3.2.12 Różnicowanie komórek iPS do neuronów dopaminergicznych**

Ponieważ proces reprogramowania komórek somatycznych oraz wyprowadzania i charakterystyki uzyskanych samodzielnie komórek kiPS jest niezwykle długotrwały wszystkie doświadczenia związane z uzyskiwaniem zróżnicowanych komórek somatycznych z komórek iPS przeprowadzono na zakupionej i scharakteryzowanej linii komórek iPS uzyskanej metodą wprowadzenia białek czynników transkrypcyjnych – komórkach piPS (System Biosciences).

Ze względu na ograniczenie czasowe niniejszego projektu doświadczenia związane z reprogramowaniem komórek somatycznych oraz różnicowaniem komórek

iPS prowadzone były równolegle. Byłoby to niemożliwe przy braku scharakteryzowanych komórek piPS, które posłużyły nie tylko jako źródło komórek iPS do różnicowania, ale także jako kontrola pozytywna w wielu doświadczeniach oraz zostały użyte w celu opracowania wielu opisanych w tym rozdziale metod.

Różnicowanie komórek piPS do neuronów dopaminergicznych przeprowadzono za pomocą trzech różnych protokołów, opracowanych na podstawie danych literaturowych.

### 3.2.12.1 Protokół I

Jest to wieloetapowy protokół, który powstał na bazie danych literaturowych [98]. W pierwszym etapie konfluentne komórki iPS hodowane na warstwie odżywczej z komórek iMEF zbierano akutazą oraz wysiewano w postaci zawiesiny pojedynczych komórek na szalkę uniemożliwiającą adhezję komórek, w medium do komórek iPS bez bFGF, w gęstości  $2-2,5 \times 10^4/\text{cm}^2$ . Następnie komórki piPS hodowano w zawiesinie przez 4 dni, aż do wytworzenia ciałek embrioidalnych EB. W kolejnym kroku ciała embrioidalne zebrano, zwirowano (300 rpm, 5 minut) oraz wysiano na szalkę adherentną o takiej samej powierzchni jak użyta szalka nieadherentna w medium do komórek MEF. Po ok. 18 godzinach rozpoczęto selekcję progenitorów neuronalnych (NPC) zmieniając medium na **medium N1** o składzie:

Składnik	Stężenie
Suplement N2	1x
Fibronektyna	250 ng/ml
P/S	100 U/ml / 100 µg/ml
DMEM/F12	

Selekcję w bezsurowiczym medium N1 prowadzono przez 10 dni co drugi dzień usuwając martwe komórki oraz podając świeże medium N1. Suplement N2 firmy Life Technologies zawiera ludzkie: insulinę (0,1 mg/ml), holotransferynę (5 µg/ml), progesteron (20 µM), putrescynę (0,1 mM), selenian sodu (30nM) (stężenia końcowe,

po rozcieńczeniu w medium). W kolejnym kroku prowadzono ekspansję wyselekcjonowanych progenitorów neuronalnych. Komórki NPC rozdysocjowano trypsyną na pojedyncze komórki oraz wysiano w gęstości  $0,5 - 2 \times 10^5/cm^2$  na szalki pokryte lamininą i poli-ornityną. Ekspansję komórek NPC prowadzono przez 7 dni w **medium N2** o składzie:

<b>Składnik</b>	<b>Stężenie</b>
<b>Suplement N2</b>	1x
<b>Laminina</b>	1 mg/ml
<b>bFGF</b>	20 µg/ml
<b>FGF8</b>	100 ng/ml
<b>P/S</b>	100 U/ml / 100 µg/ml
<b>DMEM/F12</b>	

NPC mrożono w medium N2 z 10% DMSO w gęstości 2 miliony komórek/ml. Po zakończonej ekspansji przez 7-16 dni prowadzono terminalne różnicowanie komórek zmieniając medium z N2 na **medium N3**. Jego skład prezentuje poniższa tabela.

<b>Składnik</b>	<b>Stężenie</b>
<b>Suplement N2</b>	1x
<b>Laminina</b>	1 mg/ml
<b>Dibutyrylo-cAMP</b>	0,5 mM
<b>Kwas askorbinowy</b>	200 µM
<b>P/S</b>	100 U/ml / 100 µg/ml
<b>DMEM/F12</b>	

### 3.2.12.2 Protokół II

Protokół II różni się od protokołu I składem mediów różnicujących. Zawierają one substancje zwiększające wydajność różnicowania. Poniższe tabele prezentują ich skład.

**medium N1+:**

<b>Składnik</b>	<b>Stężenie</b>
<b>Suplement N2</b>	1x
<b>Fibronektyna</b>	250 ng/ml
<b>SB431542</b>	10 $\mu$ M
<b>P/S</b>	100 U/ml / 100 $\mu$ g/ml
<b>DMEM/F12</b>	

**medium N2+:**

<b>Składnik</b>	<b>Stężenie</b>
<b>Suplement N2</b>	1x
<b>Laminina</b>	1 mg/ml
<b>bFGF</b>	20 $\mu$ g/ml
<b>FGF8</b>	100 ng/ml
<b>Purmorfamina</b>	1,5 $\mu$ M
<b>SB431542</b>	10 $\mu$ M
<b>P/S</b>	100 U/ml / 100 $\mu$ g/ml
<b>DMEM/F12</b>	

**medium N3+:**

<b>Składnik</b>	<b>Stężenie</b>
<b>Suplement N2</b>	1x
<b>Laminina</b>	1 mg/ml
<b>Dibutyrylo-cAMP</b>	0,5 mM
<b>Kwas askorbinowy</b>	200 $\mu$ M
<b>Purmorfamina</b>	1,5 $\mu$ M
<b>BDNF</b>	20 ng/ml
<b>GDNF</b>	10 ng/ml
<b>TGF<math>\beta</math>-3</b>	1 ng/ml
<b>Noggin</b>	300 ng/ml
<b>P/S</b>	100 U/ml / 100 $\mu$ g/ml
<b>DMEM/F12</b>	

### 3.2.12.3 Protokół III

Protokół różnicowania oparty o podwójną inhibicję ścieżki sygnałowej SMAD wykonano w oparciu o literaturę [107].

W pierwszym etapie konfluentne komórki iPS hodowane na warstwie odżywczej z komórek iMEF zbierano akutazą oraz wysiewano w postaci pojedynczych komórek na szalkę opłaszczoną matryzelem w gęstości 18 tys. komórek/cm<sup>2</sup> w medium do komórek iPS pre-kondycjonowanym przez 24 godziny przez mysie embrionalne fibroblasty zawierającym 10 μM Y-27632. Następnego dnia po wysianiu komórek podano takie samo, świeże medium. Po 48 godzinach od wysiania – w 1. dniu różnicowania - medium zmieniono na **medium różnicujące KSR**. Jego skład prezentuje poniższa tabela.

<b>Składnik</b>	<b>Stężenie</b>
<b>KSR</b>	15%
<b>β-merkaptoetanol</b>	55 μM
<b>Non-Essential Amino Acids</b>	100 μM
<b>L-Glutamina</b>	2 mM
<b>Noggin</b>	200 ng/ml
<b>SB431542</b>	10 μM
<b>P/S</b>	100 U/ml / 100 μg/ml
<b>DMEM</b>	

Pierwszy etap różnicowania prowadzono przez 4 kolejne dni, co drugi dzień zmieniając medium różnicujące KSR na świeże. W 4. dniu różnicowania medium zmieniono na mieszaninę 3:1 medium różnicujące KSR: medium różnicujące N2. Skład **medium różnicującego N2** przedstawia poniższa tabela.

<b>Składnik</b>	<b>Stężenie</b>
<b>Suplement N2</b>	1x
<b>Noggin</b>	200 ng/ml
<b>SB431542</b>	10 $\mu$ M
<b>P/S</b>	100 U/ml / 100 $\mu$ g/ml
<b>DMEM/F12</b>	

W 6. dniu różnicowania medium zmieniono na mieszaninę 1:1 medium różnicujące KSR: medium różnicujące N2. W 8. dniu różnicowania medium zmieniono na mieszaninę 1:3 medium różnicujące KSR: medium różnicujące N2. 10. dnia różnicowania komórki zostały spasażowane akutazą, zwirowane, policzone oraz wysiane w kroplach na wysuszone szalki opłaszczone matryzelem. Na jeden dołek płytki 24-dołkowej wysiano 600 tys. komórek w 6 kroplach po 20  $\mu$ l. Gęstość zawiesiny komórkowej wynosiła  $5 \times 10^6$  komórek/ml. Po 20 minutach od wysiania kropel dodano 400  $\mu$ l **medium do terminalnego różnicowania 1**. Jego skład przedstawia poniższa tabela.

<b>Składnik</b>	<b>Stężenie</b>
<b>Suplement N2</b>	1x
<b>Noggin</b>	200 ng/ml
<b>SB431542</b>	10 $\mu$ M
<b>BDNF</b>	20 ng/ml
<b>FGF8</b>	100 ng/ml
<b>Purmorfamina</b>	1,5 $\mu$ M
<b>P/S</b>	100 U/ml / 100 $\mu$ g/ml
<b>DMEM/F12</b>	

Różnicowanie w tym medium prowadzono przez 1 tydzień, zmieniając medium co drugi dzień na świeże. Następnie medium zmieniono na **medium do terminalnego różnicowania 2**. Jego skład przedstawia poniższa tabela.



<b>Składnik</b>	<b>Stężenie</b>
<b>Suplement N2</b>	1x
<b>Dibutyrylo-cAMP</b>	0,5 mM
<b>Kwas askorbinowy</b>	200 $\mu$ M
<b>BDNF</b>	20 ng/ml
<b>GDNF</b>	20 ng/ml
<b>TGF<math>\beta</math>-3</b>	1 ng/ml
<b>P/S</b>	100 U/ml / 100 $\mu$ g/ml
<b>DMEM/F12</b>	

Różnicowanie w tym medium prowadzono przez 2 kolejne tygodnie.

### **3.2.13 Identyfikacja dopaminy w medium hodowlanym metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektroskopią masową (HPLC-MS)**

Identyfikacji dopaminy w medium hodowlanym dokonano za pośrednictwem dwu niezależnych chromatografów.

Identyfikacji dopaminy w medium hodowlanym metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) dokonano w Zakładzie Neuro-psychofarmakologii Instytutu Farmakologii PAN dzięki uprzejmości i pomocy pani dr Katarzyny Kuter.

Medium z nad komórek produkujących dopaminę wyróżnionych protokołem I zostało zwirowane w celu oddzielenia od komórek, szybko zamrożone w ciekłym azocie i przechowywane w  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu analiz. Po rozmrożeniu do mediów (400  $\mu$ l) został dodany 8x stężony (50  $\mu$ l) bufor o składzie (1x): 0,1 M kwas nadchlorowy i 0,05 mM kwas askorbinowy. Następnie, celem eliminacji białek, próbki zostały zamrożone w  $-80^{\circ}\text{C}$  na 20 minut, rozmrożone, zwirowane (10000 g, 15 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) oraz przefiltrowane przez filtr nitrocelulozowy o średnicy a 0,2 mm (Sartstedt, Niemcy). Analogicznie przygotowane zostały standardy czystych neuroprzekazników o stężeniu 1  $\mu$ g/ml: dopaminy oraz jej metabolitów: kwasu 3,4-dihydroksyfenylooctowego (DOPAC), 3-metoksytyraminy (3-MT) oraz kwasu homowanilinowego (HVA)

(wszystkie Sigma-Aldrich, Niemcy). Jako kontroli negatywnej użyto medium niekondycjonowanego przez komórki.

Tak przygotowane próbki były rozdzielane przy pomocy chromatografu, który składał się z następujących elementów: chłodzonego do 4°C autosamplera ASI-100 (ASI, USA), pompy izokratycznej P680 z degazerem (Dionex, Niemcy), kolumny Hypersil C18 o wymiarach 100 mm x 3 mm, i średnicy złoża 3 µm (Thermo Scientific, UK) w termostатовanej celi (28°C, Dionex, Niemcy) oraz detektora elektrochemicznego Coulochem III (ESA, USA). Faza ruchoma składała się z 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 40 mM kwasu cytrynowego, 0,25 mM soli sodowej kwasu 1-oktanosulfonowego, 0,25 mM EDTA, 1,3% acetonitrylu, 2,4% metanolu (wszystkie Sigma-Aldrich, Niemcy). Zastosowany potencjał na detektorach wynosił E1 = 350 mV i E2 = -220 mV. Szybkość przepływu wynosiła 0,7 ml/min, a objętość nastrzyku 10 µl. Dane były analizowane przy użyciu oprogramowania Chromeleon (Dionex, Niemcy). Dopamina i jej metabolity były identyfikowane ze względu na czas retencji, a ich zawartość określana na podstawie pola powierzchni piku.

Identyfikację dopaminy w medium hodowlanym metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektroskopią masową (HPLC-MS) wykonano w Zakładzie Chemii Leków Instytutu Farmakologii PAN dzięki uprzejmości i pomocy pana mgr Jakuba Staronia.

Próbki i standardy przygotowano tak jak w poprzednim punkcie. Analizę HPLC-MS wykonano na aparacie TQD Waters (USA) sprzężonym z chromatografem cieczowym UHPLC klasy H i detektorem UV/VIS. Rozdział analizowanych związków przeprowadzono na kolumnie ACQUITY UPLC BEH C18 o wymiarach, 50 mm x 2,1 mm i średnicy złoża 1,7 µm. Jako eluent stosowano gradient acetonitryl-woda 5% - 95% do 100% acetonitryl przez 3 min przy przepływie 0,3 ml/min., a następnie 100% acetonitryl przez 0,5 min. Jonizacja następowała metodą *electrospray* w układzie dodatnim. Dopamina była identyfikowana ze względu na czas retencji i widmo masowe.

### **3.2.14 Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM) komórek produkujących melaninę**

Technikę tę wykonano w Pracowni Mikroskopii Elektronowej Zakładu Patomorfologii Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie-Prokocimiu dzięki uprzejmości i pomocy pani dr Barbary Urbanowicz.

Zróżnicowane komórki produkujące melaninę wyróżnicowane protokołem I zebrano trypsyną oraz zwirowano. Pelet komórek został utrwalony w 2% aldehydzie glutarowym w PBS o pH 7,3 przez 15 minut w temperaturze pokojowej, a następnie w 1% czterotlenku osmu. W kolejnych krokach komórki zostały przepłukane, odwodnione w szeregu alkoholowym (50%, 70%, 90%, 95%, 100%) oraz zatopione w żywicy epoksydowej. Następnie preparat został skrojony na skrawki, wybarwiony 2% roztworem octanu uranu i cytrynianu ołowiu oraz zanalizowany pod transmisyjnym mikroskopem elektronowym Philips EM 300 przy 80 kV.

### **3.2.15 Identyfikacja melaniny metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR)**

Technikę tę wykonano w Zakładzie Biofizyki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ dzięki uprzejmości i pomocy pana dr hab. Przemysława Płonki.

Komórki piPS zróżnicowano do komórek produkujących melaninę za pomocą protokołu I. Komórki zebrano trypsyną, zwirowano oraz przepłukano PBS. Pelet komórkowy został zamrożony w  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu analiz. Po rozmrożeniu pelet został zawieszony w PBS i zmierzony w pipiecie Pasteurowskiej umieszczonej w kwarcowym dewarze palcowym, w temperaturze pokojowej. Próbkę analizowano w spektrometrze Varian E3 (Varian, USA) wyposażonym w prostokątną wnękę rezonansową TE 102. Oprócz widma komórek produkujących melaninę analizowano także widma EPR syntetycznej melaniny oraz prekursorów neuronalnych nieprodukujących melaniny o podobnej gęstości i liczbie. Użyto następujących parametrów pomiarów: częstotliwość mikrofal (pasmo X): 9,2 GHz, moc mikrofal 2,3 mW, zakres przemieszczania pola 3230-3330 Gs, amplituda modulacji 10 Gs, czas skanu 200 s, stała czasowa 0,1 s,

wzmocnienie sygnału  $5 \times 10^5$ . Każde widmo EPR zostało uśrednione z 3 skanów oraz przedstawione jako pierwsza pochodna widma absorpcji.

### **3.2.16 Barwienie Fontany-Masson'a**

Technikę tę wykonano w Zakładzie Biofizyki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ dzięki uprzejmości i pomocy pani mgr Dominiki Michalczyk-Wetuli oraz pana dr hab. Przemysława Płonki.

Komórki piPS zróżnicowano do komórek produkujących melaninę za pomocą protokołu I na szalkach sześćo-dołkowych. Usunięto pożywkę hodowlaną, a komórki dwukrotnie delikatnie przepłukano PBS. Szalki umieszczono na lodzie i komórki utrwalano przez 5 minut lodowatym metanolem w objętości 1,5ml/dołek. Następnie szalki dwukrotnie przepłukano PBS oraz zalano ciepłym (56°C) amoniakalnym roztworem srebra(I) (przygotowanym na świeżo) i umieszczono w łaźni wodnej o temperaturze 56°C na 30 minut osłaniając je przed światłem folią aluminiową. Komórki kontrolne w tym czasie inkubowano z PBS. Następnie szalki czterokrotnie przepłukano wodą destylowaną i zalano 1% roztworem  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (Sigma-Aldrich) na 1 minutę. Szalki dwukrotnie przepłukiwano wodą bieżącą przez 2 min i zalano 0,5% roztworem czerwieni obojętnej na 10 minut. Komórki ponownie dwukrotnie przepłukiwano wodą bieżącą przez 2 minuty i odwodniono kolejno umieszczając je w 70, 96 i 100% etanolu (w każdym roztworze umieszczając je dwukrotnie). Komórki wysuszono oraz zanalizowano i sfotografowano pod mikroskopem świetlnym.

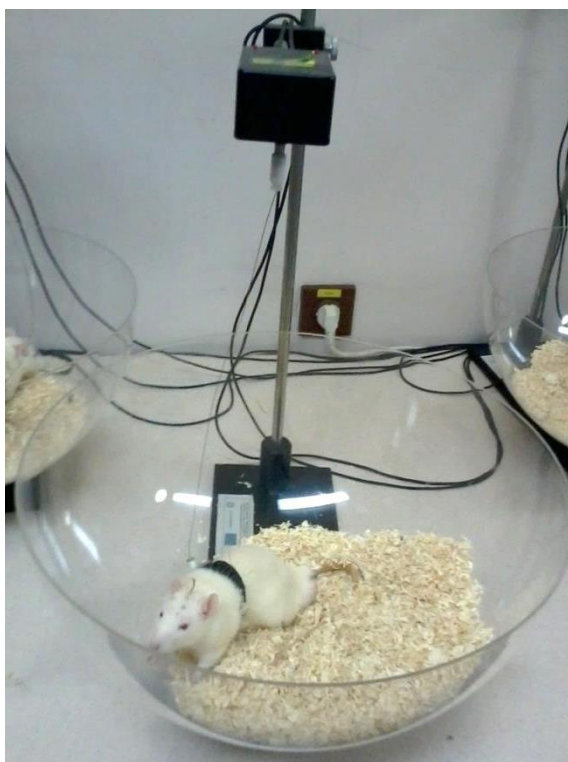
### **3.2.17 Indukcja i weryfikacja szczurzego modelu choroby Parkinsona oraz przeszczepienie wyróżnicowanych komórek**

Metody te zostały wykonane w Zakładzie Neuro-psychofarmakologii Instytutu Farmakologii PAN dzięki uprzejmości i pomocy pani mgr Klemencji Berghausen-Maciejewskiej oraz pani mgr Urszuli Głowackiej.

Do indukcji szczurzego modelu choroby Parkinsona użyto 6-hydroksydopaminy 6-OHDA (Sigma-Aldrich) podanej jednostronnie w trakcie operacji stereotaktycznej do pęczka przyśrodkowego przodomózgowia (MFB). Szczury o wadze ok. 280-300 g zostały uśpione poprzez domięśniowe podanie ketaminy (65 mg/kg masy ciała) i ksylazyny (5 mg/kg). Na 30 minut przed podaniem toksyny dootrzewnowo podana została dezypramina (30 mg/ml/kg, Sigma-Aldrich) w celu ocalenia układu noradrenergicznego. Uśpiony szczur umieszczony został na stoliku stereotaktycznym (Stoelting, USA). Po przystrzyżeniu włosów oraz przecięciu skóry głowy mięśnie zostały odsunięte, aby uwidocznić szwy czaszki. Powierzchnia czaszki została zakropiona perhydrolem w celu zastopowania krwawień, dezynfekcji oraz uwidocznienia szwów czaszki (lambdy i bregmy), które stanowią punkty odniesienia dla pomiarów stereotaktycznych. Przy użyciu śruby mikrometrycznej zostało wyznaczone miejsce wykonania otworu dla kaniuli podającej. Pozycja kaniuli prowadzącej została „wyzerowana” poprzez odczytanie pozycji xyz na stoliku stereotaktycznym w punkcie bregmy, a następnie zaznaczone zostało miejsce wejścia kaniuli do MFB (koordynaty względem bregmy: anteroposterior -1,6 mm, lateral +1,6 mm, vertical -8,4 mm). Miejsca podań toksyny oraz komórek wybrano na podstawie atlasu [101]. W czaszce wywiercony został otwór, przez który do pęczka przyśrodkowego przodomózgowia (MFB) wprowadzona została kaniula prowadząca wraz z podającą. Przez kaniulę za pomocą strzykawki Hamiltona podana została neurotoksyna 6-OHDA HBr (8 µg (wolnej zasady) w 4µl 0,2% kwasu askorbinowego). Zwierzętom kontrolnym (*sham-operated*) zamiast 6-OHDA w ten sam sposób podano sam rozpuszczalnik. Toksynę podawano powoli, ok. 1 µl/min, a po zakończeniu podania kaniula pozostała na miejscu przez kolejne 4 minuty, aby płyn został całkowicie wchłonięty. Po wyjęciu kaniuli otwór w czaszce zacementowano cementem dentyścycznym (Palavit), czaszkę zasypiano ampicyliną, a rozciętą skórę zeszyto nićmi jedwabnymi.

Dwa tygodnie po operacji wykonany został pomiar zachowania asymetrycznego zwierząt przy użyciu rotametrów w celu określenia stopnia jednostronnego uszkodzenia nigrostriatalnego układu dopaminowego. Rotametry (PanLab) to zautomatyzowane liczniki obrotów zwierząt wokół własnej osi (zilustrowane na rycinie 13). Oprogramowanie komputerowe zlicza ilość pełnych obrotów (360°) szczura w jednostce czasu. W celu przeprowadzenia pomiaru zachowania asymetrycznego

szczurom podskórnie podawano apomorfine (0,25 mg/ml/kg masy ciała) lub amfetaminę (2,5 mg/ml/kg masy ciała) (obie Sigma-Aldrich) bezpośrednio przed umieszczeniem w rotametrach. Po 10 minutach adaptacji prowadzono rejestrację ilości pełnych obrotów szczura w ciągu 1 (po apomorfynie) lub 1,5 godziny (po amfetaminie). Według literatury 6 pełnych obrotów/min po apomorfine wskazuje na uszkodzenie 90% neuronów dopaminowych w istocie czarnej.



**Rycina 12.** Pomiar zachowania asymetrycznego szczurów przy użyciu rotametrów. Źródło: zdjęcie własne.

Miesiąc po operacjach zwierzęta otrzymały przeszczepy komórek produkujących dopaminę uzyskanych protokołem I do dwóch miejsc w prażkowiu (koordynaty względem bregmy: anteroposterior +1,0 mm, lateral +2,5 mm, vertical -5,0 mm oraz anteroposterior +0,2 mm, lateral +2,7 mm, vertical -5,0 mm) po leżonowanej stronie. Operacje przeprowadzono tak jak opisano powyżej. Komórki zebrane trypsyną zawieszono w PBS i wszczepiano w postaci dwu depozytów po 100 000 komórek produkujących dopaminę w 4  $\mu$ l PBS. Zawiesina komórek była podawana przez ok. 1 minutę, za pomocą strzykawkki Hamiltona. Po zakończeniu iniekcji kaniula pozostawała w miejscu przez kolejne 4 minuty. W grupach kontrolnych zamiast zawiesiny komórek zwierzęta otrzymały sam PBS. W celu usunięcia ryzyka odrzucenia ksenoprzeszczepów zwierzęta otrzymywały codziennie dootrzewnowe zastrzyki z cyklosporyny A (Sigma-

Aldrich) w 5% DMSO w dawce 15 mg/kg, a dzień przed wszczepieniem otrzymały 30 mg/kg cyklosporyny A.

Cztery tygodnie po wszczepieniu komórek szczury były zabijane przez dekapitację w celu pobrania mózgów do badań immunohistochemicznych. Po dekapitacji mózgi wyjmowano z czaszki, utrwalano przez tydzień w 4% paraformaldehydzie, a następnie 20% sacharozie oraz krojono na skrawki o grubości 20  $\mu\text{m}$  z pomocą kriostatu Cryotome 650 (Anglia Scientific). Skrawki przechowywano w -20°C w jałowym buforze krioprotekcyjnym zawierającym 30% sacharozy oraz 30% glikolu etylenowego w PBS do czasu barwienia immunohistochemicznego.

### **3.2.18 Barwienie immunohistochemiczne skrawków mózgów szczurzych**

Technikę tę wykonano w Zakładzie Neuro-psychofarmakologii Instytutu Farmakologii PAN dzięki uprzejmości i pomocy pani mgr Klemencji Berghauzen-Maciejewskiej.

Skrawki mózgów szczurzych odpowiadających miejscu podania komórek wybarwiono na obecność hydroksylazy tyrozynowej (TH). Barwienie wykonywano na szalkach 24-dołkowych. Skrawki zalano 1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  na 10 minut w celu usunięcia endogennych peroksydaz, po czym wypłukano trzykrotnie PBS. Następnie niespecyficzne miejsca wiązania wyblokowano 2% surowicą końską (Vector Laboratories) przez 30 minut. W kolejnym kroku do skrawków dodano przeciwciało pierwszorzędowe przeciwko TH (rozcieńczenie 1:3000, Milipore) w 2% surowicy końskiej w PBS z dodatkiem 0,2% Tritonu X-100. Skrawki inkubowano przez 2 dni w 4°C. Niezwiązane przeciwciała odpłukano trzykrotnie PBS, a skrawki zalano 0,1% BSA w PBS na 10 minut. Następnie skrawki przepłukano PBS oraz ponownie zalano 2% surowicą końską na 30 minut. W kolejnym kroku dodano roztwór biotynylowanych, drugorzędowych, końskich przeciwciał anty-mysich (rozcieńczenie 1:200, Vector Laboratories) w 2% surowicy końskiej w PBS z dodatkiem 0,2% Tritonu X-100 na 30 minut. Niezwiązane przeciwciała odpłukano PBS. W kolejnym kroku skrawki inkubowano w roztworze Vectastain przez 60 minut (Vector Laboratories) zgodnie z

instrukcją producenta. Roztwór ten zawiera awidynę skoniugowaną z peroksydazą chrzanową. Skrawki odplukano w PBS oraz 50 mM Tris o pH 7,4. W kolejnym kroku skrawki inkubowano z substratem peroksydazy chrzanowej, który w wyniku reakcji tworzył brązowy, nierozpuszczalny produkt. Użyto zestawu DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit firmy Vector Laboratories oraz postępowano zgodnie z instrukcją producenta. Po pojawieniu się brązowego zabarwienia reakcję zatrzymano płucząc skrawki dwukrotnie w 50 mM Tris o pH 7,4. Skrawki naciągnięto na szkiełka podstawowe oraz odstawiono do wyschnięcia. Preparaty odwodniono we wzrastających stężeniach etanolu (70%, 90%, 96%, 100%), a następnie przepłukano ksylenem, pokryto medium Permount oraz zamknięto szkiełkami nakrywkowymi. Preparaty analizowano oraz fotografowano pod mikroskopem optycznym Olympus IX70.

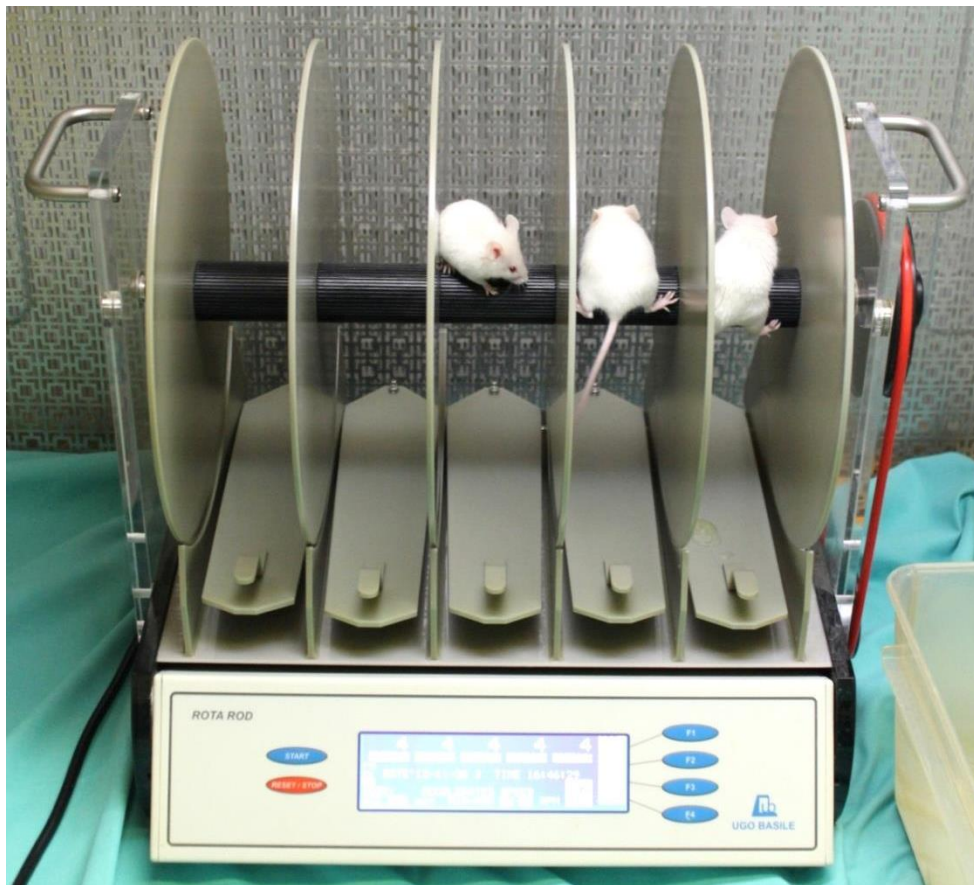
### **3.2.19 Indukcja oraz ocena mysiego modelu choroby Parkinsona**

Mysi model choroby Parkinsona wyindukowano poprzez codzienne dożołądkowe podania rotenonu myszom szczepu NOD/SCID. Myszy były hodowane w Zwierzętarńi CMUJ w standardowych warunkach dwunastogodzinnego cyklu dnia i nocy. Rotenon był podawany myszom raz dziennie przez sondę dożołądkową ze stali nierdzewnej (Animalab) w stężeniu 30 mg/kg masy ciała, w objętości 5ml/kg masy ciała codziennie przez 56 dni. Rotenon rozpuszczano na świeżo w 0,5% roztworze karboksymetylocelulozy z kroplą Tweenu 20 na każdą porcję. Grupy kontrolne otrzymywały sam rozpuszczalnik (0,5% roztwór karboksymetylocelulozy) lub w ogóle nie były poddawane zabiegom karmienia.

Skuteczność indukcji modelu choroby Parkinsona u myszy NOD/SCID określano za pomocą behawioralnego testu koordynacji ruchowej z użyciem urządzenia Rota-rod 7750 (Ugo Basile, Włochy). Rota-rod to zautomatyzowane urządzenie do pomiaru zachowania pięciu myszy równocześnie. Przedstawia je rycina nr 12. Test koordynacji ruchowej polega na pomiarze czasu utrzymywania się myszy na rotującym i przyspieszającym pręcie. Test taki wykonano na początku, w połowie i na końcu okresu podawania rotenonu. Dzień przed wykonaniem testu wykonano pięćminutowy pre-test adaptacyjny, w którym pręt rotował ze stałą prędkością 5 obrotów na minutę. W dniu właściwego testu wykonano pre-test ze stałą prędkością (5 obrotów na



minutę), po którym następował właściwy pomiar. W czasie testu pręt przyspieszał w zakresie 5-60 obrotów na minutę w czasie 5 minut. Dla każdej myszy rejestrowano czas od umieszczenia na rotującym pręcie do spadku.



**Rycina 13.** Test koordynacji ruchowej myszy z użyciem urządzenia Rota-rod. Źródło: zdjęcie własne.

Po zakończeniu okresu podawania rotenonu myszy zostały uśmiercone, ich mózgi zostały wyizolowane, utrwalone w formalinie (40% roztwór paraformaldehydu), a następnie 20% sacharozie oraz pokrojone na kriostacie Cryotome 650 (Anglia Scientific) na skrawki o grubości 20  $\mu\text{m}$ . Skrawki zostały wybarwione hematoksyliną/eozyną oraz poddane analizie histopatologicznej pod kątem zmian patologicznych w istocie czarnej. W celu lokalizacji istoty czarnej na uzyskanych skrawkach posłużono się atlasem [108].

Mózgi myszy zostały skrojone w Zakładzie Neuro-psychofarmakologii Instytutu Farmakologii PAN dzięki uprzejmości i pomocy pani mgr Urszuli Głowackiej.

Barwienie hematoksyliną/eozyną oraz analiza histopatologiczna zostały wykonane w Zakładzie Patomorfologii Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie-Prokocimiu dzięki uprzejmości i pomocy pani mgr Elżbiety Trześniowskiej-Popiel, pani dr Grażyny Drabik oraz prof. dr hab. med. Dariusza Adamka.

### 3.2.20 Konstrukcja plazmidów

Wykorzystując techniki klonowania DNA oraz postępując zgodnie z instrukcjami producenta zestawu Gateway (Life Technologies) skonstruowano plazmidy lentiwirusowe eGFP@pLenti6/Ubc oraz eGFP@pLenti6. Wzmocniona (e, ang. *enhanced*) wersja białka GFP została wyklonowana z plazmidu eGFP-RB1@pUC przy pomocy pary starterów o sekwencjach:

#### **eGFPattB1 for**

5' - GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGAAGGAGATAGAACCA  
TGGTGAGCAAGGGCGA

#### **eGFPattB2 rev**

5' – GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTACTTGTACAGCTCGT  
CCATG

Startery te wprowadzały nawisy na początku i końcu sekwencji GFP, które następnie pozwoliły na wprowadzenie zamplifikowanej sekwencji do plazmidów docelowych na zasadzie homologicznej rekombinacji. Przy klonowaniu tej sekwencji użyto polimerazy Hybrid firmy Eurx, która posiada aktywność egzonukleazy 3'-5', co zminimalizowało ryzyko wystąpienia mutacji w czasie amplifikacji. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz program PCR dobrano zgodnie ze wskazówkami producenta polimerazy. Uzyskane lentiwirusowe plazmidy docelowe przenosiły gen *egfp* pod kontrolą słabego, lecz konstytutywnego promotora ubkwityny C (eGFP@pLenti6/Ubc) oraz silnego, ale wyciszanego promotora wirusa cytomegalii CMV (eGFP@pLenti6).

Uzyskanymi plazmidami transformowane zostały bakterie *Escherichia coli* szczep Stbl3, w których plazmidy zostały namnożone. Plazmidowe DNA zostało wyizolowane z bakterii przy użyciu zestawu GeneMATRIX Basic DNA Purification Kit firmy Eurx. Po pomiarze stężenia wyizolowanego plazmidowego DNA przy pomocy spektrofotometru Quawell Q5000 poddano je analizie restrykcyjnej enzymami EcoRI i EcoRV. Po pozytywnym wyniku analizy restrykcyjnej zsekwencjonowano plazmidy eGFP@pLenti6/Ubc, eGFP@pLenti6 oraz pLOX-GFP-iresTK (uzyskany z repozytorium Addgene) używając zestawu BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit. Sekwencyjną reakcję PCR prowadzono zgodnie z zaleceniami producenta. Wykorzystano startery komplementarne do sekwencji wirusowych flankujących przenoszony transgen. Produkty sekwencyjnej reakcji PCR oczyszczono oraz rozdzielono przy pomocy sekwenatora ABI Prism 310 PE (Applied Biosystems, USA). Uzyskane dane zanalizowano za pomocą oprogramowania Lasergene. Po potwierdzeniu prawidłowości sekwencji wszystkie używane plazmidy namnożono na dużą skalę w bakteriach *E. coli* (w 100 ml płynnej pożywki) oraz wyizolowano zestawem QIAfilter Plasmid Maxi Kit. Zmierzone stężenie oraz czystość wyizolowanych plazmidów przy pomocy spektrofotometru Quawell Q5000.

Skonstruowane plazmidy eGFP@pLenti6/Ubc oraz eGFP@pLenti6 przenosiły gen białka zielonej fluorescencji pod kontrolą dwu różnych promotów oraz gen oporności na blastycydynę. Plazmid pLOX-GFP-iresTK przenosił gen białka zielonej fluorescencji oraz gen kinazy tymidynowej HSV-TK oddzielone sekwencją wewnętrznego wejścia rybosomu IRES pod kontrolą promotora CMV.

### **3.2.21 Produkcja i mianowanie wektorów lentiwirusowych**

Wektory oparte na lentiwirusie HIV-1 wyprodukowano zgodnie z instrukcją producenta zestawu Vira Power – firmy Life Technologies. Komórki wysoce permissywnej linii embrionalnej ludzkiej nerki 293 T posiadające stabilną ekspresję wielkiego antygeny T wysiano w gęstości  $9,5 \times 10^6$  komórek na butelkę o powierzchni  $75 \text{ cm}^2$ . Po 4 godzinach od wysiania transfekowano komórki za pomocą fosforanu wapnia. Przygotowano mieszaninę transfekcyjną o następującym składzie:

<b>Składnik</b>	<b>Ilość</b>
<b>Plazmidowe DNA</b>	26-39 µg
<b>H<sub>2</sub>O</b>	585 µl
<b>2,5 M CaCl<sub>2</sub></b>	65 µl
<b>2x BBS</b>	650 µl

Bufor 2x BBS (zbuforowany buforem BES roztwór soli fizjologicznej o pH 7,2) przygotowano, przefiltrowano i rozporcjowano wcześniej rozpuszczając 4,28 g buforu BES, 6,4 g NaCl i 0,108 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> w 400 ml wody destylowanej.

Mieszaninę transfekcyjną inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej. W tym czasie formowały się kompleksy DNA-fosforan wapnia. Następnie ostrożnie wkroplono mieszaninę do komórek, którym wcześniej zmieniono medium na świeże, zawierające 25 µM chlorochinę, która zwiększa wydajność transfekcji. Następnego dnia ostrożnie zmieniono medium na świeże. Po 48 oraz 72 godzinach od transfekcji zbierano medium z nad komórek produkujących wirusa. Medium zawierające wektory lentiwirusowe wirowano przy 3000 obrotów na minutę przez 10 minut w 4°C oraz filtrowano przez filtry strzykawkowe o średnicy porów 0,45 µm aby oddzielić nadsącz wirusowy od *debris* komórkowego. Medium zawierające wektory wirusowe porcjowano oraz mrożono w -80 °C.

Aby wyprodukować konkretne wektory wirusowe używano następujących zestawów plazmidów:

Plazmid	Ilość
Plazmid ekspresyjny eGFP@pLenti6 lub eGFP@pLenti6/Ubc	1,5x10 <sup>12</sup> kopii czyli 12 µg
pLP1	7 µg
pLP2	7 µg
pVSVG	4 µg

Plazmid	Ilość
Plazmid ekspresyjny pLOX-GFP-iresTK	1,5x10 <sup>12</sup> kopii czyli 20 µg
pCMV-dR8.2dvpr	15 µg
pVSVG	4 µg

Ze względu na fakt, iż każdy plazmid ekspresyjny cechuje się różnym rozmiarem używano zawsze stałej ilości ich kopii. Ilość kopii plazmidów przeliczono na ich masę za pomocą kalkulatora mas DNA <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>. Plazmidy pLP1, pLP2, pVSVG oraz pCMV-dR8.2dvpr przenoszą wszystkie geny niezbędne do produkcji funkcjonalnych cząstek wirusowych w komórkach produkujących wirusa. Plazmidy pLP1 oraz pLP2 (używane z wektorami ekspresyjnymi pLenti6), niezbędne są do produkcji wektorów lentiwirusowych III generacji, natomiast plazmid pCMV-dR8.2dvpr (używany z plazmidem pLOX-GFP-iresTK) jest konieczny do produkcji wektorów lentiwirusowych II generacji.

W celu określenia miana wyprodukowanych wektorów wirusowych infekowano komórki linii HT1080. Komórki wysiewano na płytki 24-dołkowe w gęstości  $5 \times 10^4$  komórek na dołek. Po 4h do komórek dodawano określone ilości wirusa (od 100 do 0,1  $\mu$ l) wraz z polibrenem w stężeniu 6  $\mu$ g/ml (który zwiększa wydajność transdukcji). Następnego dnia medium zmieniano na świeże. Po 48h od transdukcji komórki zbierano trypsyną, wirowano oraz zawieszano w PBS. Następnie analizowano odsetek komórek wykazujących zieloną fluorescencję za pomocą cytometru przepływowego FACS Canto. Znając ilość wszystkich komórek w momencie infekcji, objętość dodanego wirusa oraz odsetek transdukowanych komórek obliczano ilość cząstek infekcyjnych wirusa TU (ang. *Transducing Units*) w 1ml użytej zawiesiny wirusa. Przy czym założono, że jedna cząstka wirusa transdukuje jedną komórkę.

### 3.2.22 Modyfikacja genetyczna komórek

Komórki linii Rh30 transdukowano wyprodukowanymi wektorami lentiwirusowymi. Użyto wektorów przenoszących geny *egfp* oraz *tk-hsv* lub jedynie *egfp* (linia kontrolna) pod kontrolą promotora CMV. Komórki Rh30 wysiano na szalki 6-dołkowe, a następnego dnia dodano do nich zawiesiny lentiwirusów w takiej ilości, aby stosunek ilości cząstek infekcyjnych do liczby komórek (MOI, ang. *Multiplicity of Infection*) wyniósł 5. Do zawiesiny wirusów dodano polibrenu w stężeniu 6  $\mu$ g/ml. Następnego dnia po infekcji medium zmieniono na świeże. Transdukowane komórki hodowano przez kolejne 2 dni, po czym zanalizowano ich fluorescencję pod mikroskopem fluorescencyjnym oraz przy użyciu cytometru przepływowego. Po 72h od infekcji rozpoczęto selekcję antybiotykową linii komórek Rh30GFP. Komórki selekcionowano przez 2 tygodnie w blastycydynie w stężeniu 5  $\mu$ g/ml. Ponieważ linia komórek Rh30TK (posiadająca ekspresję zarówno GFP jak i TK) nie nabyła genu oporności na blastycydynę (wektor jej nie przenosił) została ona wysortowana pod kątem ekspresji białka zielonej fluorescencji przy użyciu sortera komórkowego FACS Aria II (BD, USA). Obie wyprowadzone linie komórkowe – Rh30GFP po selekcji antybiotykowej oraz Rh30TK po wysortowaniu – zostały zanalizowane pod kątem odsetka komórek GFP-pozytywnych względem komórek wyjściowych Rh30WT przy użyciu cytometru przepływowego FACS Canto przed użyciem ich w eksperymentach.

Podobnie postąpiono w przypadku modyfikacji genetycznej komórek piPS. Aby zwiększyć wydajność ich transdukcji oraz uchronić je przed zróżnicowaniem w trakcie transdukcji komórki piPS wysiano na szalki opłaszczone matryzelem w medium kondycjonowanym przez komórki MEF. W celu eliminacji komórek MEF, które są łatwiejsze w transdukcji niż komórki iPS, wykonano 2 pasażę komórek iPS w warunkach hodowli bez warstwy odżywczej (w stosunku 1:6) przed infekcją. Media zawierające wektory wirusowe (oraz FBS mogący powodować różnicowanie komórek iPS) zwirowano przy 25 000 g przez 2h w 4°C w celu oddzielenia wektorów wirusowych od medium. Następnie pelety wirusowe zawieszono w medium do komórek iPS kondycjonowanym przez komórki MEF oraz zainfekowano nimi komórki iPS rosnące na matryzeli przy MOI równym 20 (bez polibrenu). Ilość wirusa, jaką należało zainfekować komórki piPS obliczono mianując zagęszczony nadsącz zawierający wirusa. Użyto wszystkich 3 przygotowanych wektorów wirusowych wyprowadzając 3 linie komórek piPS. Po ich selekcji antybiotykowej (2 tygodnie w blastycydynie w stężeniu 5 µg/ml) lub wysortowaniu oznaczono odsetek transdukowanych komórek oraz wysiano je ponownie na warstwę odżywczą z komórek iMEF.

Ludzkie keratynocyty infekowano przez jedną noc lentiwirusem przenoszącym gen GFP pod kontrolą promotora UbC po zwirowaniu i zawieszeniu wirusa w medium do keratynocytów bez polibrenu przy MOI wynoszącym 5 i przy konfluencji komórek równej 70%.

### **3.2.23 Test proliferacji komórek**

W celu określenia tempa wzrostu 3 linii komórek Rh30 (typu dzikiego, ze stabilną ekspresją GFP oraz ze stabilną ekspresją GFP i TK) komórki wysiewano na płytki 24-dołkowe w liczbie 25 tys. komórek na dołek, w tryplikatach. 4h po wysianiu w połowie dołków zmieniono medium na zawierające gancyklowir w stężeniu 0,1 µg/ml. Druga połowa dołków służyła za negatywną kontrolę. Codziennie przez następnych 5 dni komórki w odpowiednich dołkach trypsynizowano i liczono za pomocą komory hemocytometrycznej Bürker'a.

### 3.2.24 Test komunikacji międzykomórkowej za pośrednictwem złączy szczelinowych (GJIC) oraz test efektu sąsiedztwa

Aby określić intensywność komunikacji międzykomórkowej za pośrednictwem złączy szczelinowych użyto metody opartej na międzykomórkowym transferze kalceiny – zielonego barwnika fluorescencyjnego zdolnego do dyfuzji przez złącza szczelinowe. W celu identyfikacji komórek donorowych wyznakowano je DiI - czerwonym barwnikiem fluorescencyjnym wiążącym się do błon komórkowych, niezdolnym do dyfuzji przez złącza szczelinowe.

Komórki akceptorowe wysiewano 2 dni przed eksperymentem do szalek o powierzchni  $9,6 \text{ cm}^2$  i hodowano do uzyskania ok. 80 - 90% konfluencji. W dniu eksperymentu komórki donorowe trypsynizowano, wirowano oraz zawieszano w 0,5 ml roztworu glukozy (1 mg/ml) zawierającego barwniki fluorescencyjne: kalceinę ( $5 \mu\text{M}$ ) i DiI ( $9 \mu\text{M}$ ). Komórki inkubowano przez 30 min w ciemności w  $37^\circ\text{C}$ , wstrząsając co pewien czas w celu zapobiegnięcia sedymentacji komórek. Kolejnym krokiem było trzykrotne płukanie komórek w celu usunięcia nadmiaru barwników z użyciem PBS (w objętości 5ml). Następnie wybarwione komórki zawieszano w 0,5 ml medium hodowlanego, liczone i wysiewano w gęstości 20 tys. na szalkę z wcześniej wyhodowaną monowarstwą komórek akceptorowych. Po godzinnej inkubacji w warunkach hodowlanych obserwowano oraz fotografowano międzykomórkowy transfer barwnika fluorescencyjnego pod odwróconym mikroskopem fluorescencyjnym Olympus IX70 z aparatem fotograficznym firmy Canon.

Efekt sąsiedztwa rozumiany jako transfer toksycznego metabolitu gancyklowiru poprzez złącza szczelinowe sąsiadujących komórek analizowano prowadząc kohodowle komórek Rh30 z nadekspresją genu HSV-TK oraz typu dzikiego. Przygotowano mieszaniny komórek zawierające od 0 do 78% (czystość populacji komórek zmodyfikowanych genetycznie) komórek posiadających ekspresję genu *samobójczego*. Kohodowle prowadzono w duplikatach. 24 godziny po wysianiu komórek połowie kohodowli podano gancyklowir w stężeniu  $1 \mu\text{g/ml}$ . Druga połowa stanowiła kontrolę. Przez 8 kolejnych dni prowadzono obserwację ko-hodowli oraz wykonywano ich mikrografie.



### **3.2.25 Test tworzenia teratom oraz guzów nowotworowych po ksenotransplantacji komórek ludzkich do myszy z upośledzoną odpornością. Strategia terapii samobójczej *in vivo***

Test tworzenia teratom posłużył do potwierdzenia pluripotencjalności komórek. 5 milionów komórek iPS w 200  $\mu$ l PBS zostało podskórnie wszczepionych do myszy NOD/SCID. Wzrost guzów był stale monitorowany przez pomiary ich rozmiarów 2 razy w tygodniu. Gdy guzy osiągnęły rozmiary przekraczające 10 mm x 10 mm (około 3,5 miesiąca po zaszczepieniu) myszy uśmiercono, a guzy wyizolowano, zważono i utrwalono w 40% roztworze paraformaldehydu. Utrwalone guzy zostały pokrojone na skrawki, wybarwione hematoksyliną/eozyną oraz poddane analizie histopatologicznej pod kątem obecności w guzie tkanek pochodzących z trzech listków zarodkowych.

Komórki linii Rh30 (typu dzikiego oraz zmodyfikowane genetycznie) zostały wszczepione podskórnie do myszy szczepu NOD/SCID w ilości 5 milionów/200  $\mu$ l /mysz. Wzrost guzów był stale monitorowany przez pomiary ich rozmiarów 2 razy w tygodniu. Gdy guzy osiągnęły mierzalne rozmiary myszy podzielono na 2 grupy: otrzymującą codziennie dootrzewnowo przez 14 dni 1 mg gancyklowiru w 0,5 ml PBS (50mg/kg masy ciała) oraz otrzymującą 0,5 ml PBS. Po upływie 14 dni wszystkie myszy uśmiercono, a guzy wyizolowano, zważono i utrwalono w 40% roztworze paraformaldehydu. Utrwalone guzy zostały pokrojone na skrawki, wybarwione hematoksyliną/eozyną oraz poddane analizie histopatologicznej. Z myszy otrzymujących gancyklowir wyizolowano również wątroby, nerki, śledziony, płuca, mózgi oraz serca, aby po ich utrwaleniu, skrojeniu oraz wybarwieniu ocenić ewentualną toksyczność narządową gancyklowiru. Objętość guzów ( $v$ ) obliczono stosując wzór

$$v = \frac{ab^2}{2} \text{ gdzie } a \text{ i } b \text{ to wymiary guzów.}$$

Barwienie hematoksyliną/eozyną oraz analiza histopatologiczna zostały wykonane w Zakładzie Patomorfologii Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie-Prokocimiu dzięki uprzejmości i pomocy pani mgr Elżbiety Trześniowskiej-Popiel oraz pani dr Grażyny Drabik.

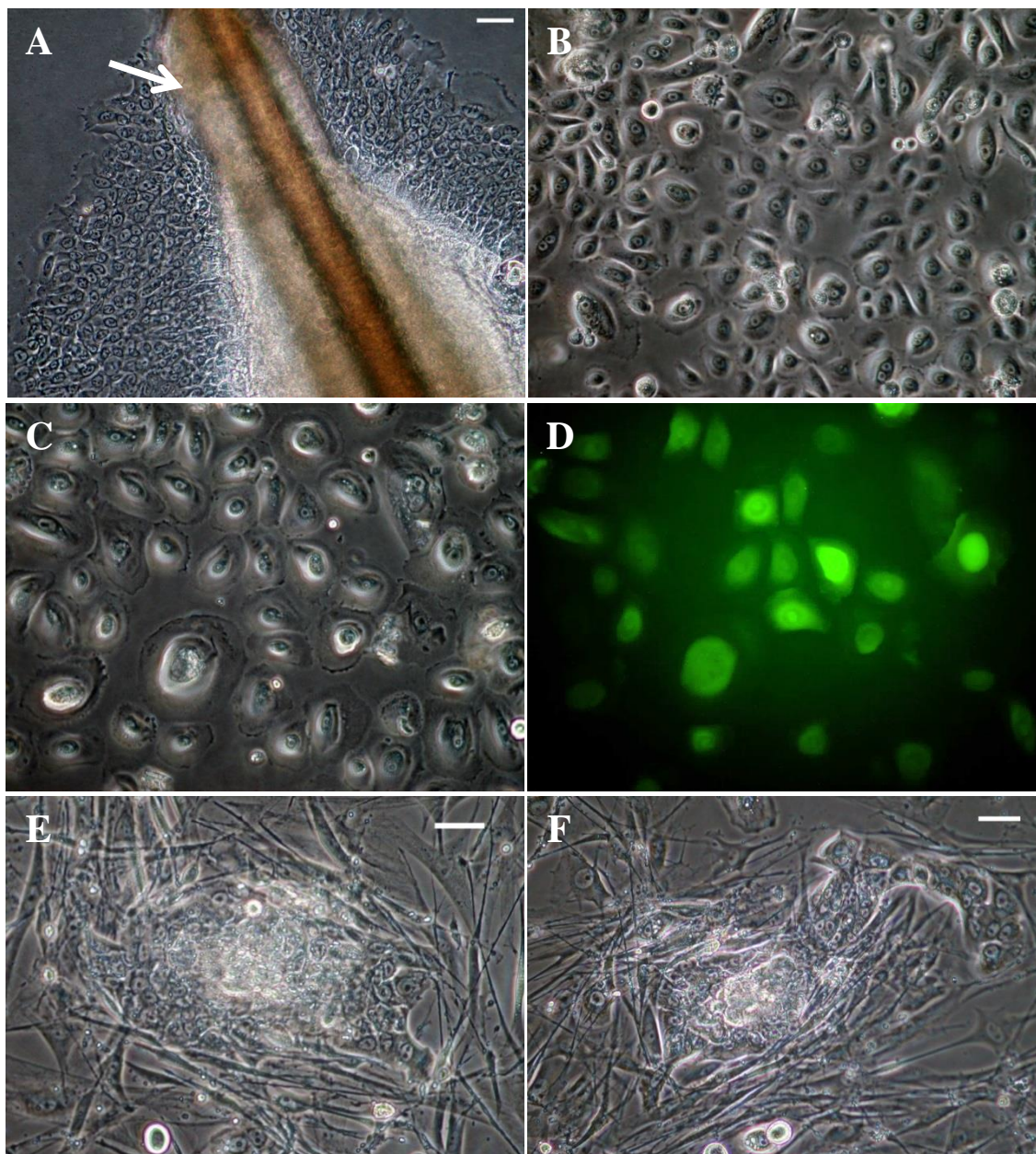
### **3.2.26 Analiza statystyczna**

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy użyciu programu STATISTICA 10.0. Stosowano analizę wariancji w klasyfikacji prostej (ang. *One-way ANOVA*) wraz z testem post-hoc Tukey'a pozwalającą ustalić, czy pomiędzy wieloma grupami istnieją różnice istotne statystycznie oraz testu t-Studenta. Wartości przedstawiono jako średnią arytmetyczną z powtórzeń  $\pm$  odchylenie standardowe. Za granicę istotności statystycznej przyjmowano wartość  $p < 0,05$ . Różnice istotne statystycznie oznaczano \*.

## 4. Wyniki

### 4.1 Izolacja i modyfikacja genetyczna ludzkich keratynocytów

Ludzkie keratynocyty zostały wyizolowane z zewnętrznego płaszczka włosa (ang. ORS, *Outer Root Sheath*) wyrwanego z potylicznej części głowy. Zewnętrzny płaszcz włosa to pochwka włosa znajdująca się w skórze głowy, powyżej cebulki włosa. Znajdują się w nim keratynocyty odkładające keratynę do wnętrza włosa. Tym samym są one odpowiedzialne za wzrost włosa na długość. Dwadzieścia wyrwanych włosów umieszczonych na szalce hodowlanej o średnicy 35 mm opłaszczonej żelatyną wystarczyło do uzyskania około  $5 \times 10^4$  komórek po dwóch tygodniach od izolacji włosa. Keratynocyty, które wymigrowały z ORS (zaznaczonego na rycinie 14A strzałką) zostały przesiane na świeżą szalkę hodowlaną o średnicy 35 mm opłaszczoną żelatyną oraz hodowane aż do osiągnięcia konfluencji wynoszącej ok. 70%, kiedy to zostały zainfekowane wektorami lentiwirusowymi przenoszącymi gen białka zielonej fluorescencji pod kontrolą promotora CMV w celu określenia odpowiedniego MOI dla infekcji wirusowej. Keratynocyty infekowano przy MOI od 1 do 5 dodając medium hodowlane zawierające wektory wirusowe na jedną noc. Największą wydajność transdukcji komórek otrzymano przy MOI=5. Otrzymane wyniki przedstawia rycina 14. Po zoptymalizowaniu metody izolacji oraz transdukcji ludzkich keratynocytów z wyrwanego włosa podjęto próbę ich reprogramowania do indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych za pomocą wektorów lentiwirusowych przygotowanych na bazie wirusa HIV-1 oraz wektorów onko-retrowirusowych przygotowanych na bazie wirusa MMLV przenoszących zestaw 4 czynników transkrypcyjnych użytych przez grupę Yamanaki. Niestety, uzyskano jedynie komórki częściowo reprogramowane tworzące pojedyncze, nierosnące kolonie, które szybko obumierały (ryciny 14E i F). Ponieważ kilkukrotne próby reprogramowania ludzkich keratynocytów z wyrwanego włosa za pomocą samodzielnie wyprodukowanych wektorów wirusowych nie powiodły się, w kolejnym podejściu użyto zestawu wektorów wirusowych opartych na wirusie Sendai zakupionego w firmie Life Technologies.



**Rycina 14.** **A** Izolacja ludzkich keratynocytów migrujących z zewnętrznego płaszczka włosa (ang. ORS, *Outer Root Sheath*) zaznaczonego strzałką. **B** Morfologia keratynocytów po ich przesianiu oraz ekspansji. **C i D** Keratynocyty po modyfikacji genetycznej (przy MOI=5) wykazujące ekspresję GFP. **E i F** Częściowo reprogramowane za pomocą wektorów onko-retrowirusowych keratynocyty tworzące na warstwie odżywczej szybko obumierające kolonie. **A, B, C, D, E, F** powiększenie 200x, białe paski odpowiadają 50  $\mu\text{m}$ .

## 4.2 Reprogramowanie ludzkich keratynocytów z wyrwanego włosa do komórek iPS oraz ich charakterystyka

Wyizolowane keratynocyty zainfekowano wektorami wirusowymi przygotowanymi na bazie wirusa Sendai zgodnie z instrukcjami producenta. Reprogramowanie przy użyciu tego wirusa nie wiąże się z integracją materiału genetycznego do genomu komórki. W ciągu tygodnia po infekcji obserwowano umiarkowaną śmiertelność komórek, która sygnalizuje wydajną infekcję, oraz jest zgodna z oczekiwaniami opisanymi w instrukcji producenta. W tym czasie zaobserwowano również wyraźną zmianę w morfologii keratynocytów (rycina 15B), które zaczęły silniej do siebie przywierać, i przyjęły fenotyp epitelialny, charakterystyczny dla reprogramowanych komórek. Tydzień po infekcji reprogramowane keratynocyty przesiano na szalkę hodowlaną o średnicy 100 mm zawierającą przygotowaną uprzednio warstwę odżywczą z komórek iMEF. Pierwsze kolonie o morfologii podobnej do kolonii iPS pojawiły się w 11. dniu po infekcji. Były to kolonie zbudowane z 6-8 komórek. Ich wzrost stale monitorowano. Pierwszych 6 kolonii przeniesiono na świeżą warstwę odżywczą przygotowaną na dołkach płytki 12-dółkowej w 18. dniu po infekcji. W tym czasie część kolonii obecnych na szalce 100 mm zaczęła degenerować oraz rozpadać się. Obserwacje te były podobne jak w przypadku pojedynczych kolonii pojawiających się w wyniku reprogramowania z użyciem samodzielnie wyprodukowanych wektorów onko-retrowirusowych.

Jednak między 18., a 22. dniem zaczęły pojawiać się kolejne kolonie o morfologii charakterystycznej dla komórek iPS (widocznej na rycinie 15D). Kolonie te cechowały się wyraźnymi granicami, a komórki w obrębie kolonii były ciasno upakowane, miały małe rozmiary, a sporą ich objętość zajmowało jądro komórkowe.

Żadna z pierwszych 6 przeniesionych kolonii nie dała początku linii komórek kiPS (ang. *keratinocytes iPS*). Ten fakt, oraz obserwacja degenerujących kolonii sugeruje, że pierwsze pojawiające się kolonie to nie w pełni reprogramowane komórki, które nie nabrały wszystkich cech komórek iPS. Takie samo zjawisko obserwowano w przypadku użycia samodzielnie przygotowanych wektorów wirusowych.

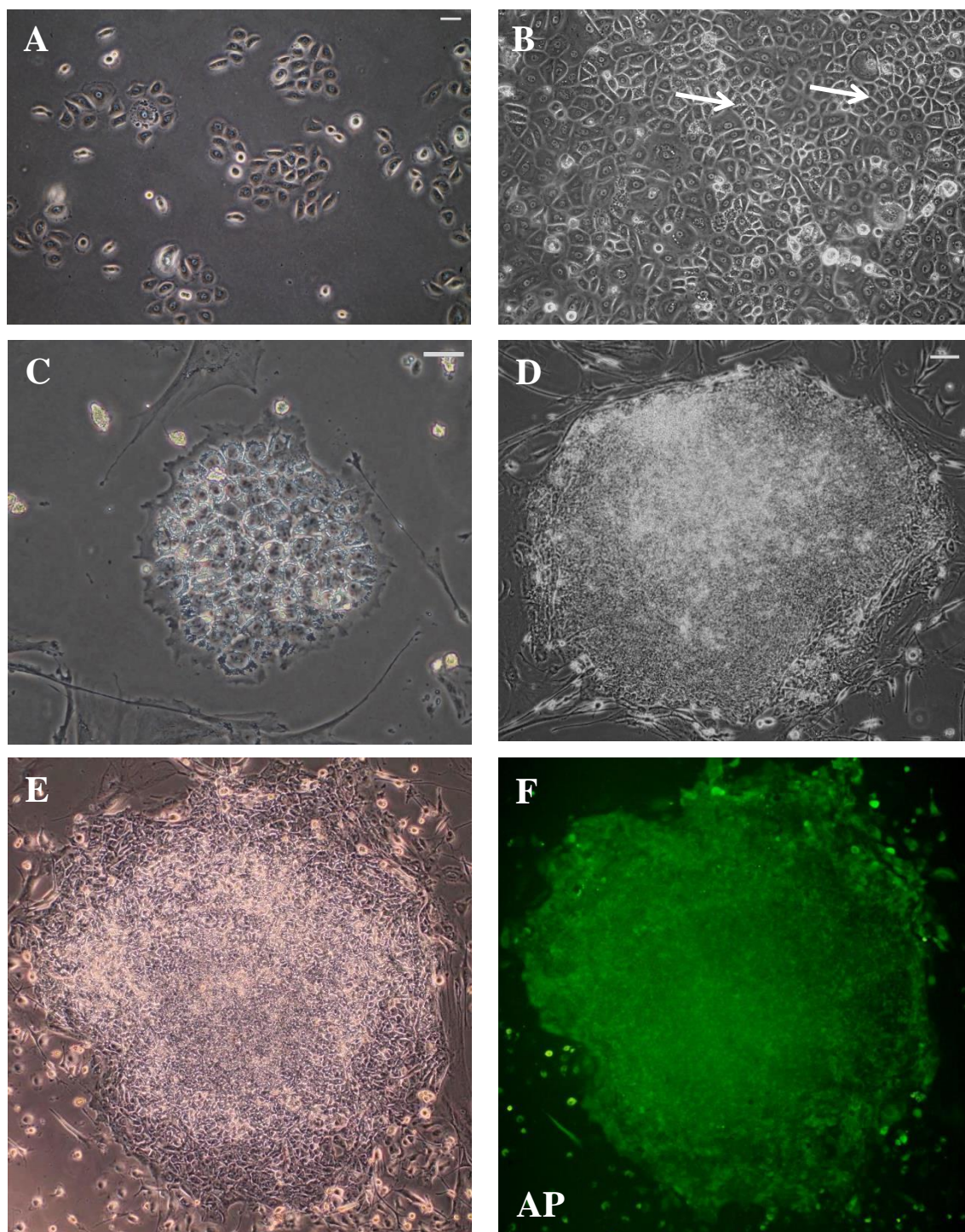
Jednak po 18. dniu reprogramowania z użyciem wirusa Sendai pojawiło się wiele kolonii kiPS, które cechowały się charakterystyczną morfologią. Dlatego między 28., a 35. dniem reprogramowania mechanicznie przeniesiono 12 kolejnych, najbardziej obiecujących kolonii kiPS na świeżą warstwę odżywczą.. Przesiane komórki posiadały

ekspresję alkalicznej fosfatazy (rycina 15F) oraz dały początek liniom komórek kiPS. Po 1. pasażu z użyciem akutazy odrzucono 2 z nich, pozostałe pasażując 2 razy w tygodniu (do 10. pasażu) oraz mroząc co drugi pasaż. Wyprowadzono w ten sposób 10 linii komórek kiPS, które w dalszych badaniach scharakteryzowano.

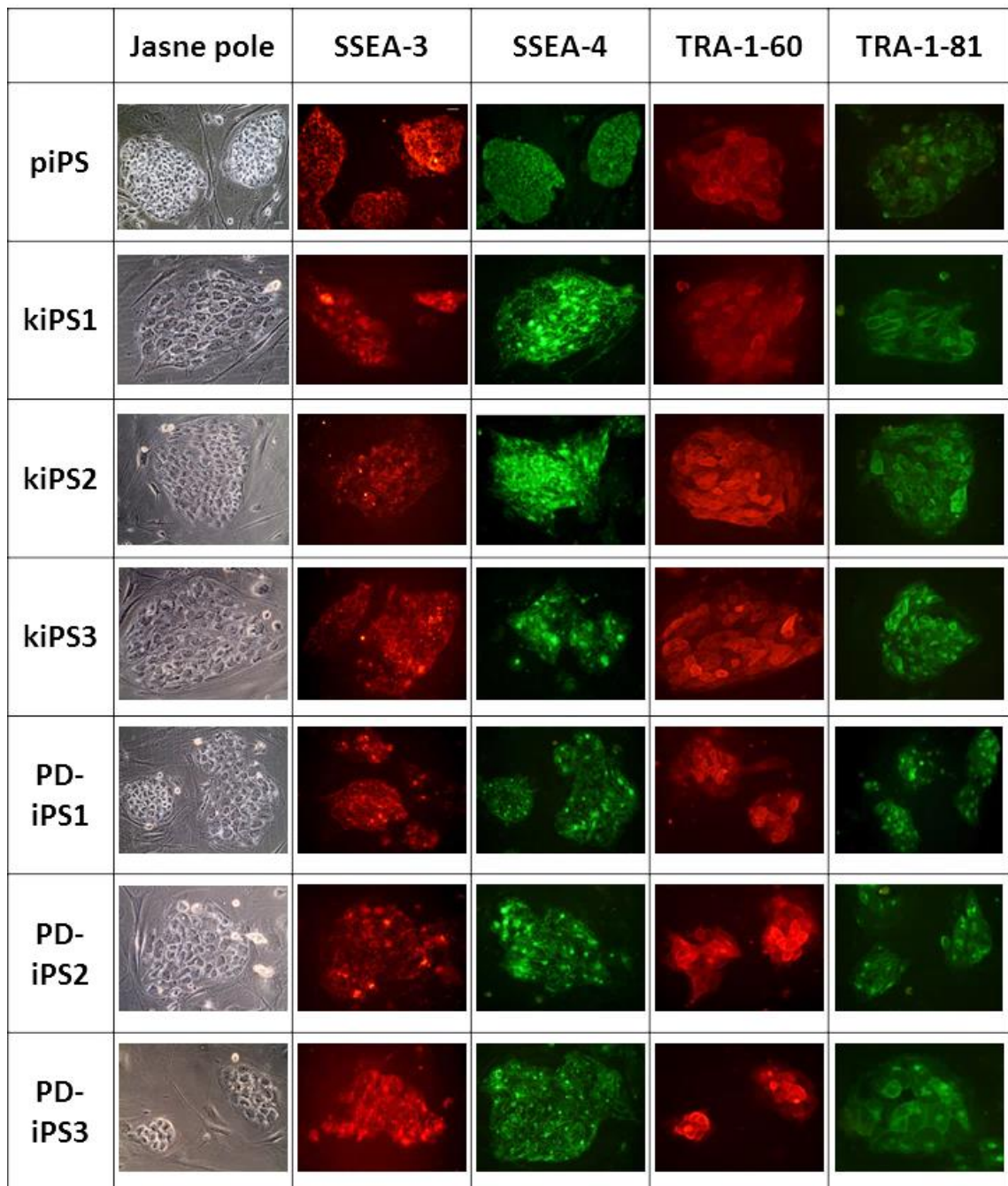
W trakcie całego reprogramowania keratynocytów pojawiło się 66 kolonii o obiecującej morfologii. Ponieważ do reprogramowania użyto  $3 \times 10^5$  keratynocytów obliczona wydajność reprogramowania wyniosła 0,022%. Jednak biorąc pod uwagę opisane wcześniej pojawienie się nie w pełni reprogramowanych komórek wydajność reprogramowania keratynocytów szacuje się na ok. 0,01%.

W ten sam sposób postępowano z 11 wyprowadzonymi wcześniej liniami PD-iPS (ang. *Parkinson's Disease-iPS*), które uzyskano poprzez analogiczne reprogramowanie jednojądrzastych komórek krwi obwodowej pacjenta cierpiącego na chorobę Parkinsona.

Trzy najbardziej obiecujące linie komórkowe kiPS oraz PD-iPS zostały scharakteryzowane pod kątem ekspresji powierzchniowych markerów charakterystycznych dla komórek pluripotencjalnych: SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 oraz TRA-1-81 na poziomie białka za pomocą barwienia immunocytochemicznego.. Wszystkie analizowane linie komórek iPS charakteryzowały się zbliżoną, wysoką ekspresją badanych markerów (rycina 16). Jako pozytywnej kontroli użyto zakupionej linii komórek piPS. Wszystkie preparaty porównano do kontroli izotypowej w celu wykluczenia niespecyficznego barwienia oraz silnej autofluorescencji.



**Rycina 15.** Reprogramowanie keratynocytów. Morfologia keratynocytów dzień przed infekcją (A) oraz 7 dni po infekcji (B). Strzałkami oznaczono rejony o zmienionej, epitelialnej morfologii. C Wygląd pierwszych pojawiających się kolonii (dzień 14). D Morfologia typowej kolonii, którą przeniesiono w celu ekspansji. Przeniesione kolonie posiadały ekspresję alkalicznej fosfatazy (AP, zielona fluorescencja) (E, F). A, B, C, E, F powiększenie 200x, biały pasek odpowiada 50  $\mu\text{m}$ , D powiększenie 100x, biały pasek odpowiada 100  $\mu\text{m}$ .



**Rycina 16.** Charakterystyka wyprowadzonych linii komórek iPS. Wszystkie linie posiadały charakterystyczną morfologię oraz ekspresję antygenów powierzchniowych SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 charakterystycznych dla komórek pluripotencjalnych. Została ona potwierdzona za pomocą barwienia immunofluorescencyjnego. piPS – zakupiona linia komórek iPS służąca jako pozytywna kontrola. kiPS – ang. *keratinocytes-iPS*, PD-iPS - ang. *Parkinson's Disease-iPS*. Wszystkie zdjęcia – powiększenie 400x, biały pasek odpowiada 50  $\mu$ m.

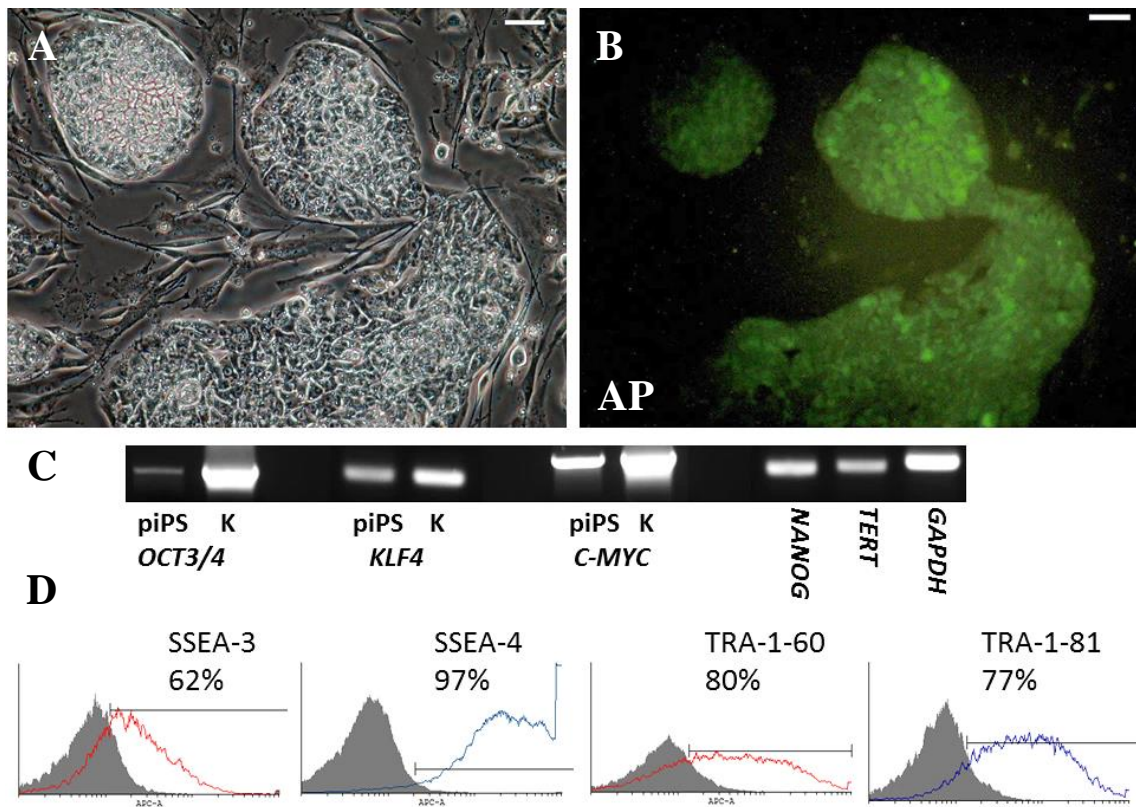


### 4.3 Charakterystyka komórek piPS

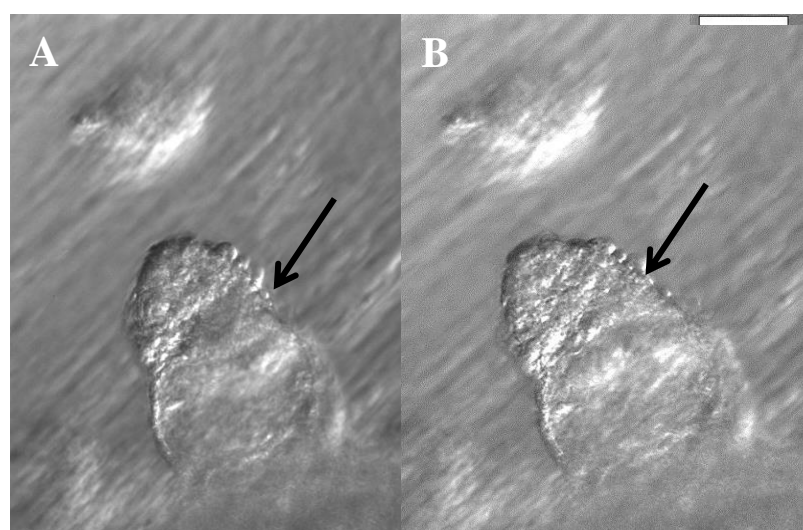
W celu optymalizacji metod charakterystyki samodzielnie wyprowadzonych komórek iPS oraz równoczesnego różnicowania komórek iPS oraz reprogramowania komórek somatycznych zakupiono linię komórek iPS uzyskaną poprzez wprowadzenie do komórek białek czynników transkrypcyjnych – linię komórek piPS.

Zakupione komórki cechowały się charakterystyczną morfologią (rycina 17A) oraz ekspresją alkalicznej fosfatazy (rycina 17B). Posiadały również ekspresję markerów charakterystycznych dla komórek pluripotencjalnych zarówno na poziomie RNA (*OCT3/4*, *KLF4*, *C-MYC*, *NANOG*, Telomeraza (*TERT*), rycina 17C) jak i białka (SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, rycina 17D) co zostało potwierdzone, odpowiednio za pomocą RT-PCR oraz barwieniem immunofluorescencyjnym z analizą cytometryczną. Nie wszystkie odsetki komórek pozytywne dla poszczególnych antygenów na rycinie 17D zbliżają się do 100%, co było spodziewanym wynikiem. Fakt ten może być spowodowany obecnością komórek MEF (mimo prób ich wykluczenia poprzez odpowiednie bramkowanie komórek w trakcie analizy cytometrycznej) oraz obecnością częściowo zróżnicowanych komórek piPS w zawieszynie barwionych komórek.

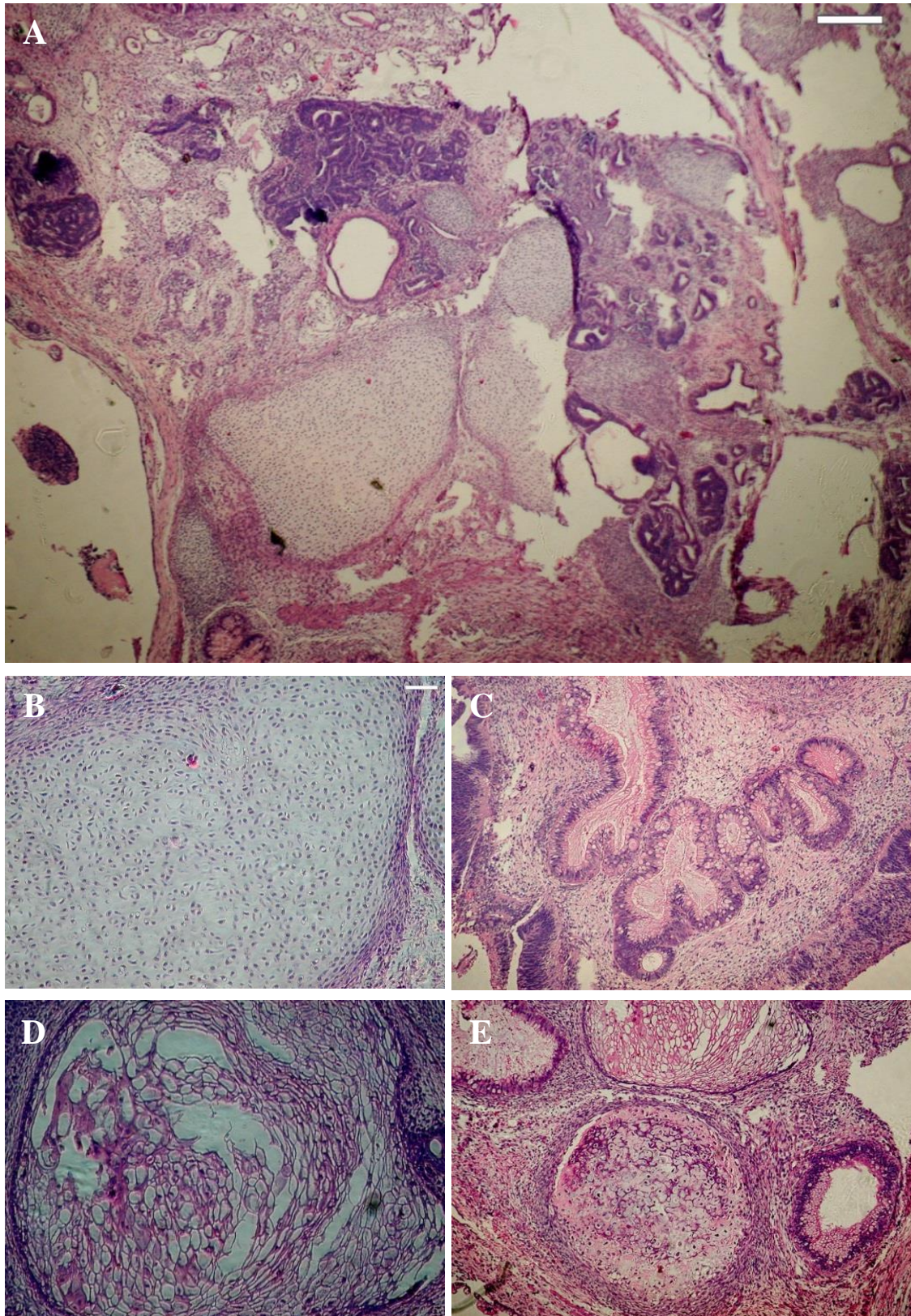
W celu potwierdzenia zdolności do różnicowania komórek piPS zróżnicowano je do funkcjonalnych kardiomiocytów, bijących spontanicznie *in vitro* (rycina 18). Jako komórki docelowe wybrano kardiomiocyty ze względu na łatwość w potwierdzeniu ich tożsamości. Z kolei w celu jednoznacznej weryfikacji pluripotencjalności komórek piPS wykonano test tworzenia teratom. Po wszczepieniu do myszy z upośledzoną odpornością komórki piPS wytworzyły teratomy o charakterystycznym obrazie mikroskopowym, które zawierały komórki pochodzące z trzech listków zarodkowych (rycina 19). Test tworzenia teratom *in vivo* to najsilniejszy test potwierdzający pluripotencjalność komórek ludzkich.



**Rycina 17.** Charakterystyka komórek piPS. Komórki piPS posiadały charakterystyczną morfologię (A), ekspresję alkalicznej fosfatazy (B) oraz ekspresję genów markerów embrionalnych (*OCT3/4*, *KLF4*, *C-MYC*, *NANOG*, Telomeraza (*TERT*)) na poziomie RNA (C). Gen konstytutywny *GAPDH* posłużył jako kontrola pozytywna reakcji PCR. piPS – RNA wyizolowane z komórek piPS, K – amplifikacja kontrolna z DNA plazmidowym jako matrycą. Ekspresja antygenów powierzchniowych SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 została potwierdzona za pomocą analizy cytometrycznej (D). Liczby nad histogramami odpowiadają odsetkom pozytywnych komórek względem kontroli izotypowej. A i B powiększenie 200x, biały pasek odpowiada 50  $\mu\text{m}$ .



**Rycina 18.** Funkcjonalne kardiomiocyty uzyskane przez różnicowanie komórek piPS w fazie skurczu (A) oraz rozkurczu (B). Strzałki wskazują kurczący się obszar. Powiększenie 400x, biały pasek odpowiada 25  $\mu\text{m}$ .



**Rycina 19.** Po wszczepieniu do myszy NOD/SCID komórki piPS tworzą teratomy o charakterystycznej budowie (A). W ich obrębie wyróżnić można tkankę chrzęstną (B), nabłonek wydzielniczy (C), nabłonek wielowarstwowy (D) oraz zwapniałe struktury przypominające kość (E). A powiększenie 40x, biały pasek odpowiada 100  $\mu\text{m}$ , B, C, D powiększenie 100x, biały pasek odpowiada 50  $\mu\text{m}$ .

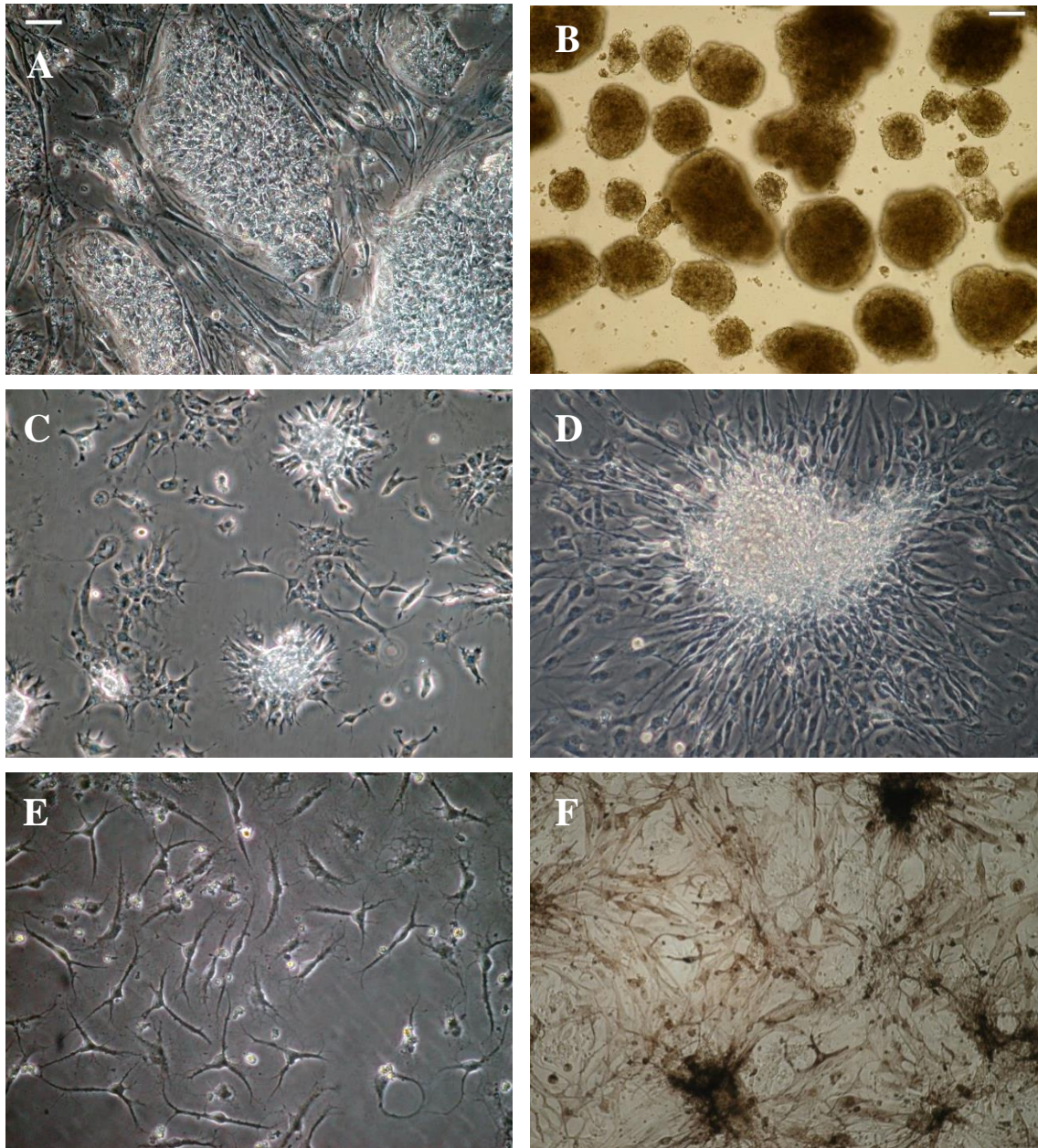
## 4.4 Różnicowanie komórek piPS do neuronów dopaminergicznych

Zasadniczym celem niniejszej pracy było uzyskanie neuronów dopaminergicznych poprzez różnicowanie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych w celu weryfikacji ich przydatności w regeneracyjnej terapii chorób neurodegeneracyjnych na przykładzie zwierzęcych modeli chorób. Ze względu na ograniczenia czasowe projektu do różnicowania użyto zakupionych komórek piPS. Różnicowanie komórek piPS do neuronów dopaminergicznych wykonano z użyciem trzech protokołów, szczegółowo opisanych w rozdziale 3.

### 4.4.1 Protokół I

Protokół I do różnicowania komórek iPS do neuronów produkujących dopaminę opracowano na podstawie literatury. Ze względu na prostotę oraz względnie niskie wymagania co do materiałów wybrano protokół oparty na indukcji różnicowania komórek iPS poprzez etap tworzenia ciałek embrioidalnych EB. Komórki uzyskane na kolejnych etapach różnicowania przedstawia rycina 20.

Komórki piPS rosnące na warstwie odżywczej z komórek iMEF (rycina 20A) przesiano do zawiesiny w celu sformowania ciałek embrioidalnych (rycina 20B). Po 4 dniach ciałaka embrioidalne zostały przesiane na szalkę adherentną w celu selekcji progenitorów neuronalnych NPC w bezsurowiczym medium N1. Po 10 dniach wyselekcjonowane komórki NPC (rycina 20C) zostały przesiane na szalkę opłaszczoną poli-ornityną oraz laminią w celu ekspansji (rycina 20D) w medium N2 zawierającym bFGF oraz FGF8, które stymulują podziały komórkowe. Terminalne różnicowanie było prowadzone w medium N3. Etap ten okazał się być bardzo wrażliwy na gęstość wysiania komórek. W niskiej ( $0,5 \times 10^5$  komórek/cm<sup>2</sup>) gęstości komórki przyjmowały fenotyp komórek neuronalnych (rycina 20E). Niespodziewanie, w wysokiej gęstości ( $2 \times 10^5$  komórek/cm<sup>2</sup> i wyższej aż do konfluencji 90%) komórki przyjmowały czarne zabarwienie po 5 dniach terminalnego różnicowania (rycina 20F). Zjawisko to okazało się powtarzalne oraz na tyle niespodziewane, że postanowiono dokładniej je zanalizować w dalszych badaniach.



**Rycina 20.** Kolejne etapy różnicowania komórek piPS do neuronów dopaminergicznych z użyciem protokołu I. **A** Komórki piPS rosnące na warstwie odżywczej. **B** Wielokomórkowe ciała embrioidalne EB w zawieszynie. **C** Wyselekcjonowane komórki NPC zostały poddane ekspansji (**D**). W niskiej gęstości komórki terminalnie różnicowane przyjmowały fenotyp komórek neuronalnych (**E**). W wysokiej gęstości komórki przyjmowały czarne zabarwienie (**F**). **A, C, D, E, F** powiększenie 200x, biały pasek odpowiada 50  $\mu\text{m}$ , **B** powiększenie 40x, biały pasek odpowiada 250  $\mu\text{m}$ .

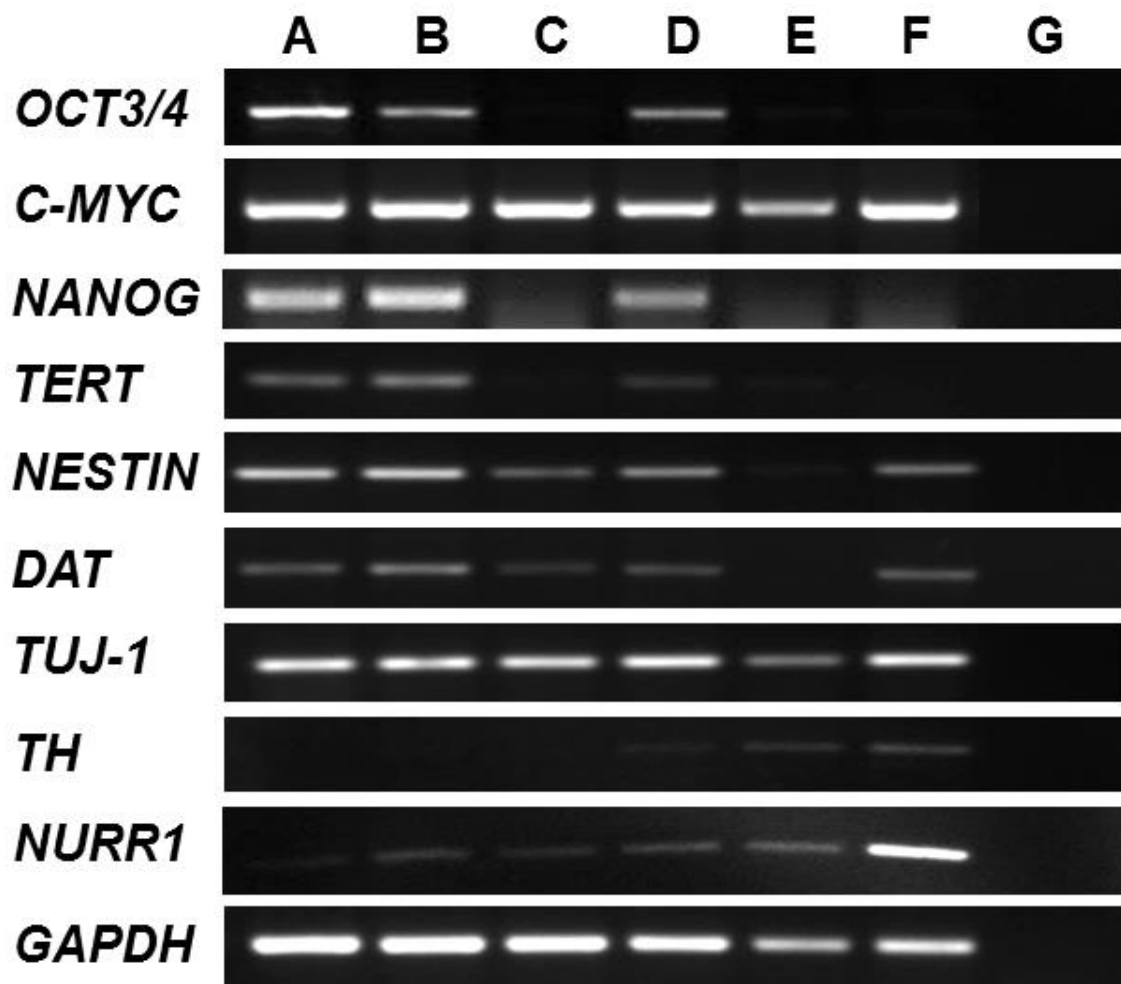
Otrzymane na kolejnych etapach komórki zanalizowano pod kątem ekspresji genów markerów komórek neuronalnych oraz embrionalnych na poziomie RNA metodą RT-PCR (rycina 21). Kolejne etapy różnicowania oznaczone są na rycinie 21 takimi

samymi literami jak na rycinie 20. Kolumna G to kontrola negatywna – amplifikacja bez matrycy cDNA. Zastosowana metoda RT-PCR jest pół-ilościowa, pozwala jedynie na względne porównanie poziomu ekspresji genów pomiędzy próbkami. W trakcie różnicowania dochodziło do znacznej zmiany w profilu ekspresji genów - spadku lub zaniku ekspresji genów charakterystycznych dla komórek pluripotencjalnych (*OCT3/4*, *NANOG*, *TERT*) oraz pojawienia się lub wzrostu ekspresji genów markerów neuronalnych, w tym także neuronów dopaminergicznych (hydroksylazy tyrozyny *TH* oraz *NURR1*). Fakt, że niektóre z analizowanych genów posiadają ekspresję na każdym etapie różnicowania (*C-MYC*, *TUJ-1*) tłumaczy się niską wydajnością różnicowania (obecnością komórek niezróżnicowanych w heterogennej populacji komórek po różnicowaniu) oraz niezwykle otwartym transkrypcyjnie stanem epigenetycznym komórek pluripotencjalnych, w których może dochodzić do ekspresji wielu genów na poziomie RNA. Uzyskane terminalnie zróżnicowane komórki posiadają ekspresję genów charakterystycznych dla neuronów dopaminergicznych na poziomie RNA – genów nestyny, transportera dopaminy, tubuliny  $\beta$  III charakterystycznej dla neuronów (*TUJ-1*), hydroksylazy tyrozyny oraz białka związanego z receptorem jądrowym Nurr1.

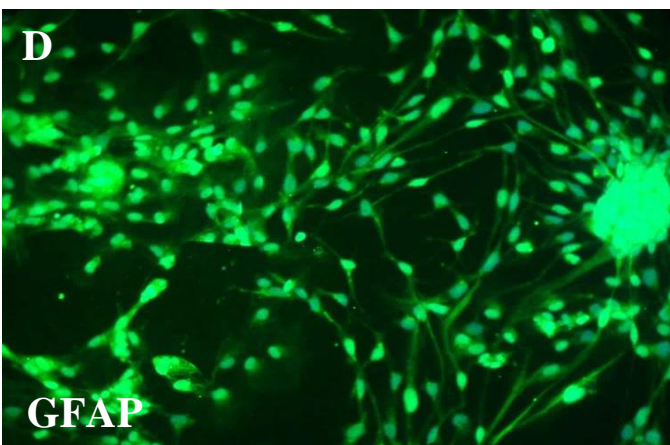
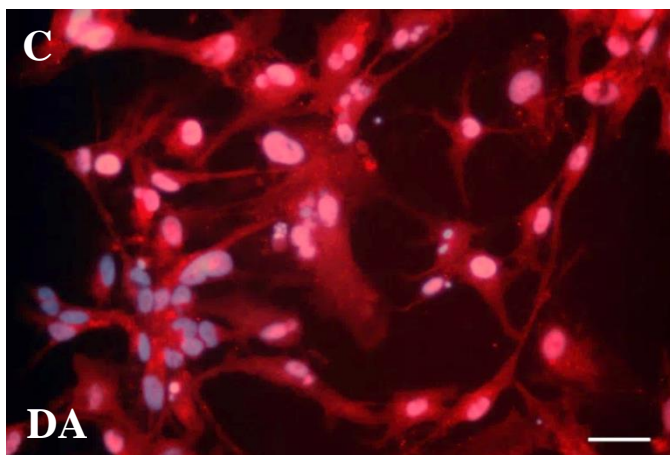
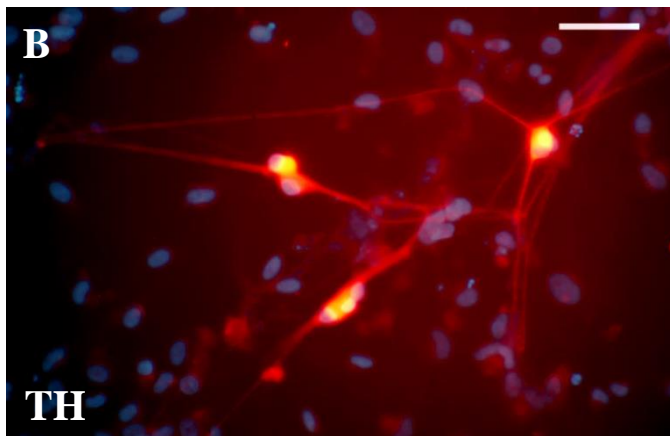
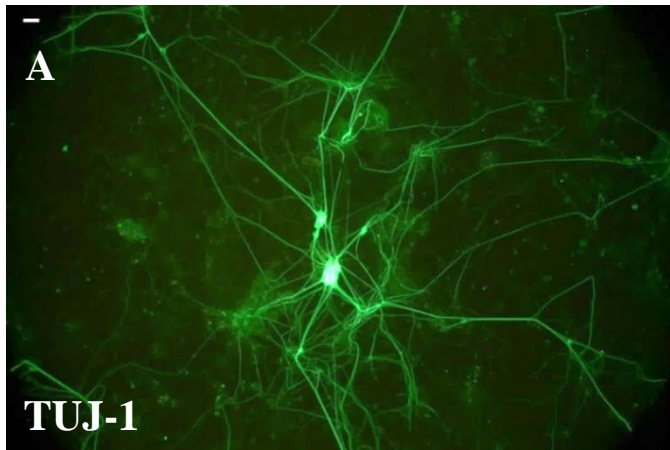
Aby potwierdzić skuteczność różnicowania komórek piPS do neuronów dopaminergicznych sprawdzono ekspresję markerów neuronalnych w komórkach terminalnie zróżnicowanych o czarnym zabarwieniu na poziomie białka za pomocą barwienia immunofluorescencyjnego. Rycina 22 prezentuje ekspresję tubuliny  $\beta$  III charakterystycznej dla neuronów (*TUJ-1*), hydroksylazy tyrozyny (*TH*) oraz białka filamentów pośrednich występującego w komórkach glejowych (*GFAP*) na poziomie białka w analizowanych komórkach. Zróżnicowane komórki produkują także dopaminę (*DA*). Wszystkie preparaty porównano do negatywnej kontroli w celu wykluczenia niespecyficznego barwienia oraz silnej autofluorescencji komórek. Co ciekawe, komórki o czarnym zabarwieniu okazały się być *TH*-, *GFAP*- oraz *TUJ-1*-negatywne, wybarwiły się jednak pozytywnie na obecność dopaminy. Sugeruje to ich inną niż neuronalną tożsamość.

Uzyskane wyniki sugerują, że w wyniku różnicowania uzyskano wysoce heterogenną populację komórek, w której obecne są komórki neuronalne (*TUJ-1*-pozytywne), wśród których jedynie niewielki odsetek stanowią komórki dopaminergiczne (*TH*-pozytywne). Produkują one jednak dopaminę na wykrywalnym za pomocą barwienia immunocytofluorescencyjnego poziomie, która obecna jest we

wszystkich komórkach obecnych w hodowli. Naturę pozostałych komórek obecnych w uzyskanej heterogennej populacji, wśród których obecne są komórki GFAP-pozytywne oraz komórki posiadające czarny pigment zbadano w dalszych doświadczeniach.



**Rycina 21.** Ekspresja markerów embrionalnych oraz neuronalnych na poziomie RNA w kolejnych etapach różnicowania komórek protokołem I. Oznaczenia literowe odpowiadają tym na rycinie 20. **A** Komórki piPS, **B** ciała embrioidalne EB. **C** komórki NPC, **D** komórki NPC po ekspansji. **E** komórki terminalnie różnicowane w niskiej gęstości, **F** komórki terminalnie różnicowane w wysokiej gęstości o czarnym zabarwieniu. **G** kontrola negatywna reakcji PCR, w której zamiast matrycy cDNA użyto wody. *TERT* - telomeraza, *NESTIN* – nestyna, *DAT* – transporter dopaminy *TUJ-1*-tubulina  $\beta$  III charakterystyczna dla neuronów, *TH* - hydroksylaza tyrozyny *NURR1* – białko związane z receptorem jądrowym, Gen konstytutywny *GAPDH* posłużył jako kontrola pozytywna reakcji PCR.

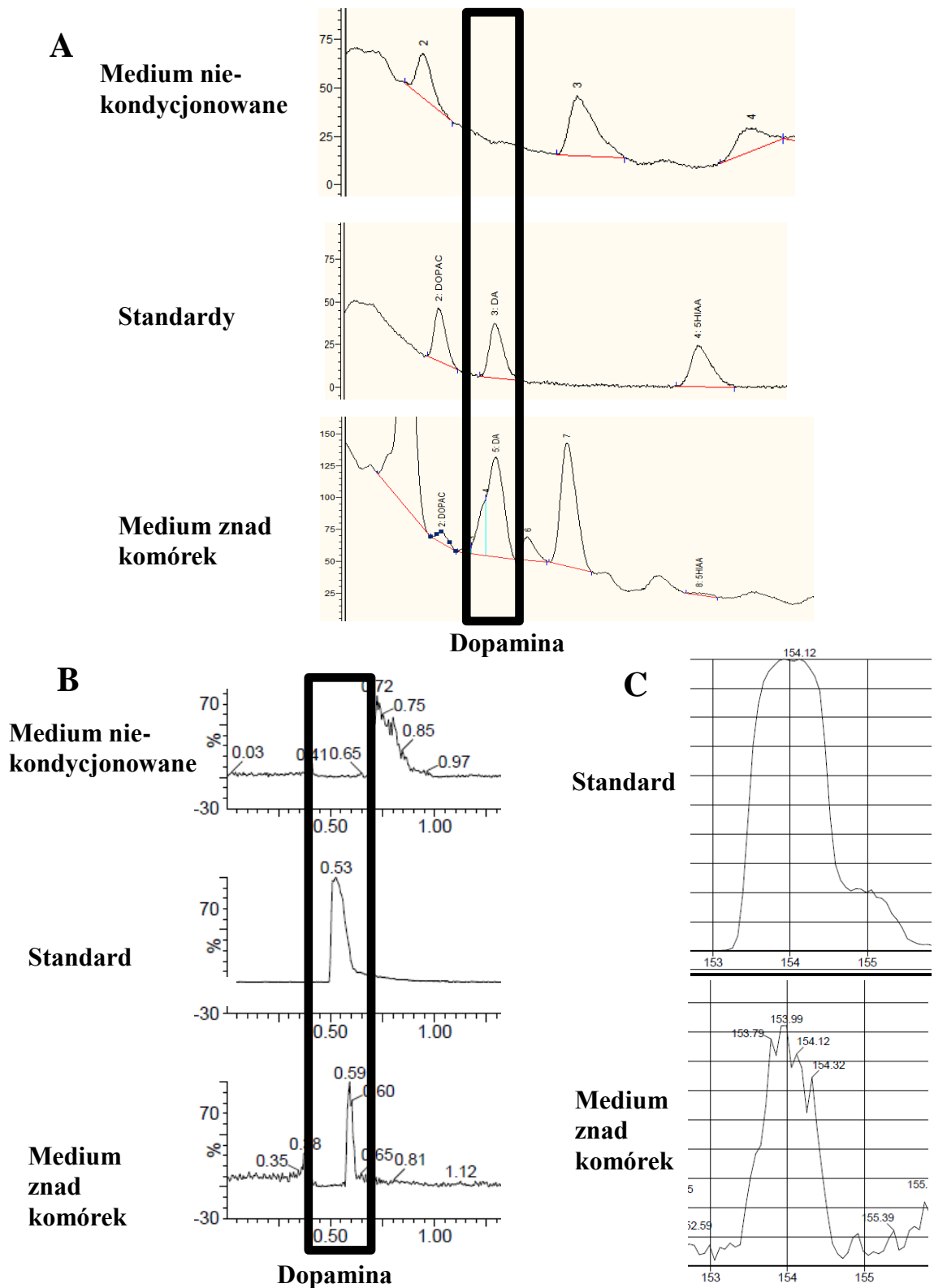


**Rycina 22.** Ekspresja markerów neuronalnych na poziomie białka w komórkach terminalnie zróżnicowanych za pomocą protokołu I. **A** TUJ-1 – tubulina klasy  $\beta$  III charakterystyczna dla neuronów, **B** TH – hydroksylaza tyrozyny, **D** GFAP – kwaśne białko włóknikowe występujące w komórkach glejowych. Wyróżnicowane komórki produkują dopaminę (DA, **C**). Na niebiesko wybarwiono jądra komórkowe. **A**, **D** powiększenie 100x, biały pasek odpowiada 100  $\mu\text{m}$ , **C**, **D** powiększenie 400x, biały pasek odpowiada 50  $\mu\text{m}$ .



Aby jednoznacznie potwierdzić produkcję dopaminy przez terminalnie zróżnicowane komórki w medium kondycjonowanym przez nie przez 24h identyfikowano dopaminę za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Technika ta pozwala na rozdział mieszaniny substancji na pojedyncze frakcje oraz ich identyfikację dzięki odpowiedniemu detektorowi. Czas retencji badanej substancji z kolumny jest porównywany z czasem retencji czystej substancji. Po odfiltrowaniu i oczyszczeniu medium z nad komórek zostało rozdzielone na kolumnie chromatograficznej.

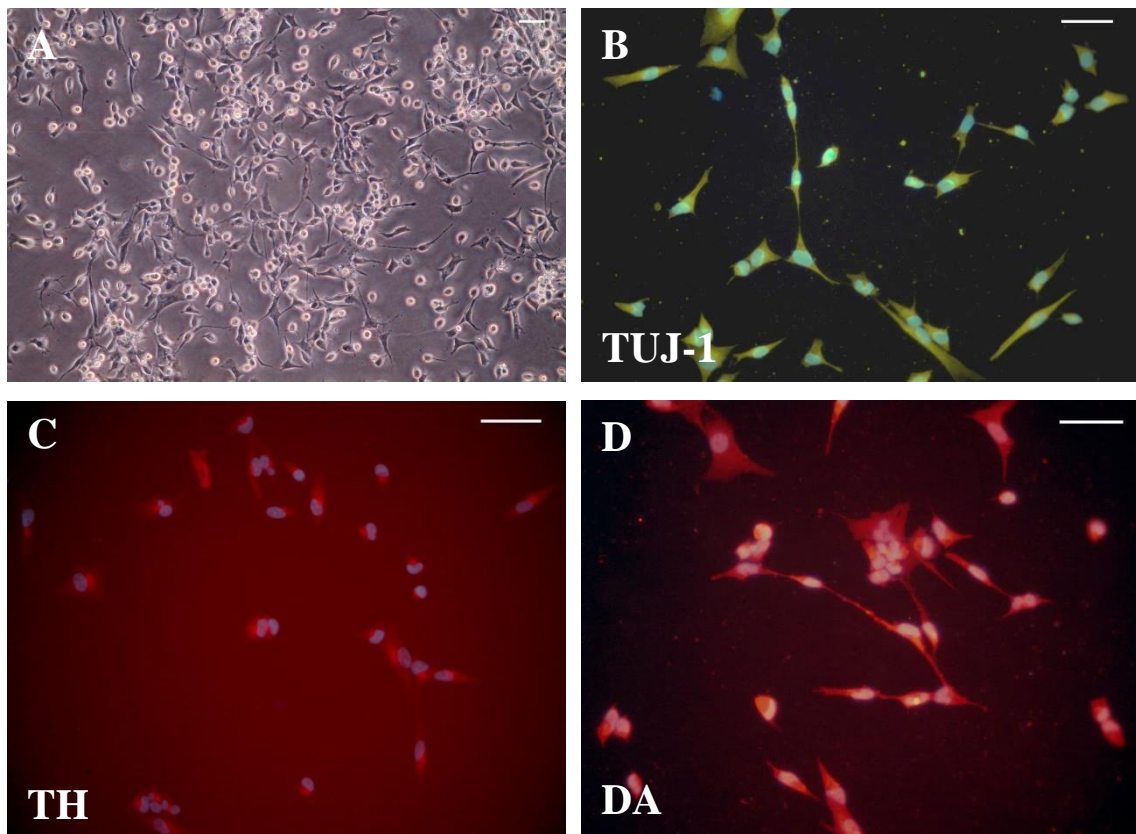
Pik odpowiadający dopaminie obecnej w medium z nad komórek zidentyfikowano na podstawie czasu retencji względem standardu (czystej dopaminy). Analizę przeprowadzono na dwóch niezależnych chromatografach celem wykluczenia ryzyka wystąpienia artefaktu pomiarowego. Drugi użyty chromatograf wyposażony był w spektroskop masowy, który dostarcza dodatkowej informacji o masie substancji w analizowanej frakcji. Pozwoliło to jednoznacznie zidentyfikować dopaminę po jej widmie masowym porównanym z widmem standardu. W doświadczeniach tych jako kontroli negatywnej użyto medium niekondycjonowanego przez komórki. Produkcji dopaminy przez wyróżnicowane komórki dowodzi rycina 23, na której zebrano chromatogramy standardów, medium z nad komórek oraz medium niekondycjonowanego przez komórki uzyskane na obu chromatografach (rycina 23A i B). Pik odpowiadający dopaminie zaznaczono na chromatogramach czarnym prostokątem. Zamieszczono także widmo masowe czystej dopaminy oraz oczyszczonej frakcji uważanej za dopaminę obecną w medium z nad komórek (rycina 23C). Są one zgodne i odpowiadają masie 154 g/mol, co zgadza się ze zjonizowaną (+1) masą dopaminy. Przedstawione wyniki dowodzą, że uzyskane poprzez różnicowanie protokołem I komórki produkują dopaminę oraz wydzielają ją do medium hodowlanego.



**Rycina 23.** Komórki terminalnie różnicowane protokołem I produkują dopaminę. Dopaminę w medium znad wyróżnicowanych komórek zidentyfikowano za pomocą HPLC na podstawie czasu retencji względem standardu na dwóch niezależnych chromatografach (A i B). Piki odpowiadające dopaminie zaznaczono prostokątem. C Widma masowe pików dopaminy na chromatogramach B odpowiadają zjonizowanej masie dopaminy (154 g/mol).

#### 4.4.2 Protokół II

Protokół II różni się od protokołu I składem mediów różnicujących – głównie obecnością czynników wzrostowych GDNF, BDNF, TGF $\beta$  oraz inhibitorów SMAD – zwiększających wydajność różnicowania. Komórki na poszczególnych etapach różnicowania cechowały się podobną morfologią jak w przypadku użycia protokołu I. Jedynie ostatni etap różnicowania dostarczał komórek o innej, wrzecionowatej morfologii (rycina 24A). W trakcie ostatniego etapu różnicowania obserwowano także dużą śmiertelność komórek. Na tym etapie komórki utrwalono oraz wybarwiono immunofluorescencyjnie pod kątem ekspresji markerów neuronalnych. Wszystkie preparaty porównano do negatywnej kontroli w celu wykluczenia niespecyficznego barwienia oraz silnej autofluorescencji. Wyróżnicowane protokołem II komórki posiadają ekspresję tubuliny klasy  $\beta$  III charakterystycznej dla neuronów, hydroksylazy tyrozyny na poziomie białka, a także produkują dopaminę. Otrzymane wyniki (które prezentuje rycina 24) sugerują, że protokół II dostarcza komórek TUJ-1- oraz TH-pozytywnych z większą wydajnością niż protokół I. Ponadto dostarcza on komórek bardziej homogennych oraz nie prowadzi do powstania komórek zawierających czarny pigment.



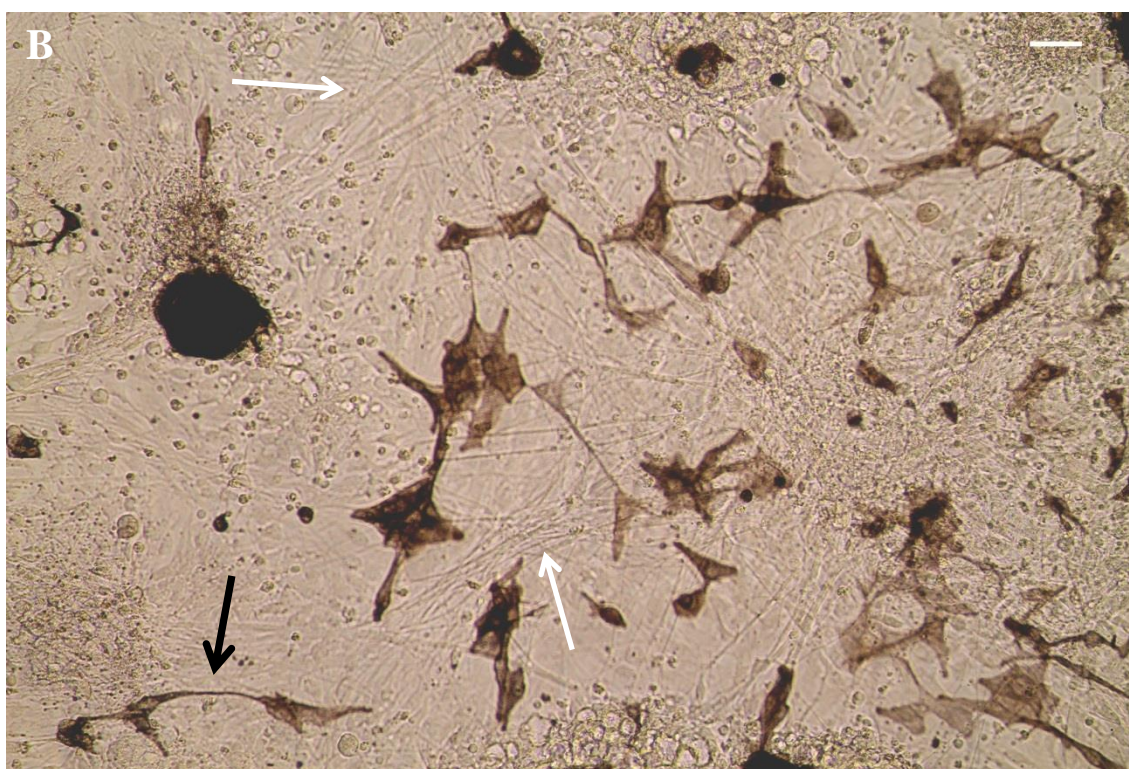
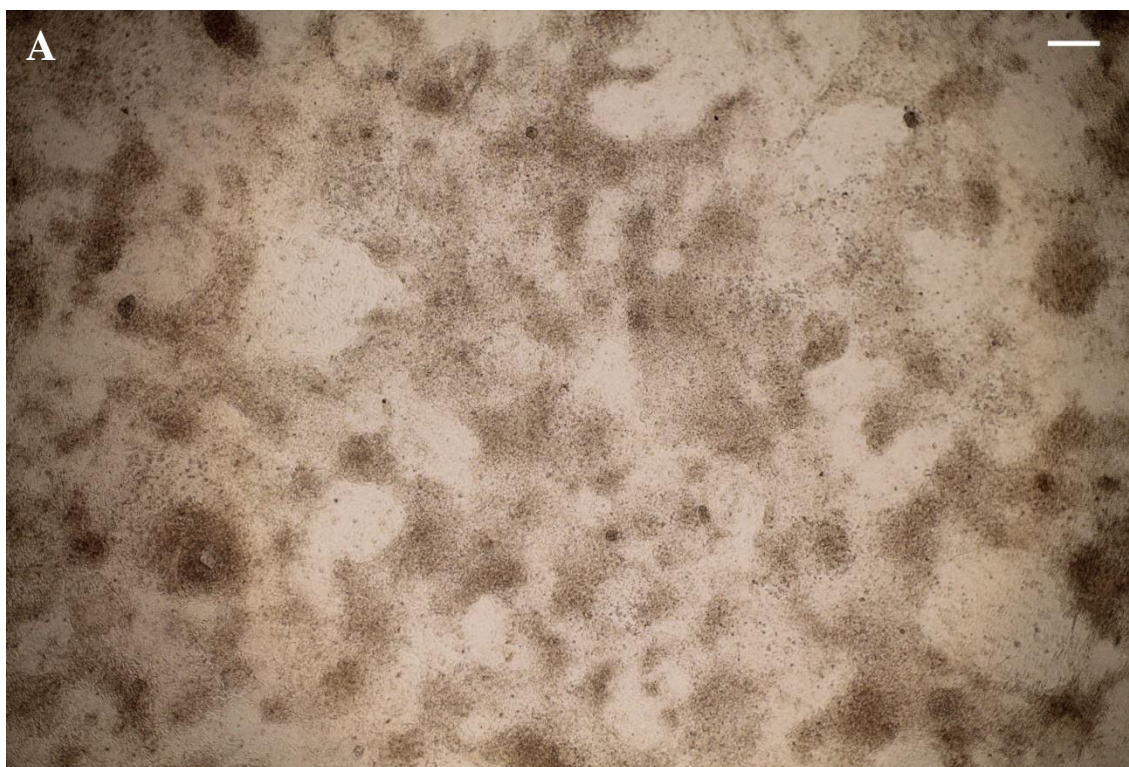
**Rycina 24.** Komórki powstałe w wyniku różnicowania protokołem II **A** Wrzecionowata morfologia komórek w trakcie ostatniego etapu różnicowania. Uzyskane komórki posiadają ekspresję markerów neuronalnych na poziomie białka: tubuliny klasy  $\beta$  III charakterystycznej dla neuronów (TUJ-1, **B**) oraz hydroksylazy tyrozyny (TH, **C**). Wyróżnicowane komórki produkują dopaminę (DA, **D**). Na niebiesko wybarwiono jądra komórkowe. **A**, powiększenie 200x, biały pasek odpowiada 50  $\mu$ m, **B**, **C**, **D** powiększenie 400x, biały pasek odpowiada 50  $\mu$ m.

#### 4.4.3 Protokół III

Protokół ten, opracowany na podstawie literatury, bazuje na długotrwałej, podwójnej inhibicji szlaku sygnałowego SMAD. W pierwszym kroku indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste hodowane na warstwie odżywczej z komórek iMEF wysiano na szalki opłaszczony matryzelem w medium kondycjonowanym przez komórki MEF z 10  $\mu$ M Y-27632. Po 48h inkubacji komórek piPS z 10  $\mu$ M Y-27632 komórki różnicowano za pomocą mediów o wzrastającej zawartości medium opartego na suplemencie N2 (o 0 do 100% w ciągu 10 dni). Na koniec tego etapu różnicowania uzyskano w hodowli grubą warstwę komórek ektodermalnych (ang. *thickened*

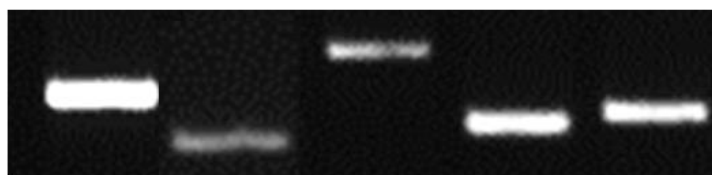
*ectoderm*) widoczną na rycinie 25A. W kolejnym etapie komórki te przesiano na świeżą szalkę opłaszczoną matryzelem oraz różnicowano za pomocą kolejnych mediów różnicujących. Morfologię komórek otrzymanych na ostatnim etapie różnicowania przedstawia rycina 25B. Otrzymane komórki scharakteryzowano pod kątem ekspresji genów markerów neuronalnych na poziomie RNA (rycina 26) oraz białka (rycina 27) za pomocą odpowiednio RT-PCR oraz barwienia immunocytofluorescencyjnego na dwu etapach różnicowania – ektodermy oraz terminalnie zróżnicowanych komórek neuronalnych.

Co ciekawe, w ostatnim etapie różnicowania oprócz licznych komórek o charakterystycznej morfologii neuronalnej (zaznaczonych na rycinie 25B białymi strzałkami) z bardzo długimi i cienkimi wypustkami ponownie otrzymano komórki o czarnym zabarwieniu (zaznaczone na rycinie 25B czarną strzałką). Ponownie było to zjawisko bardzo niespodziewane oraz powtarzalne..

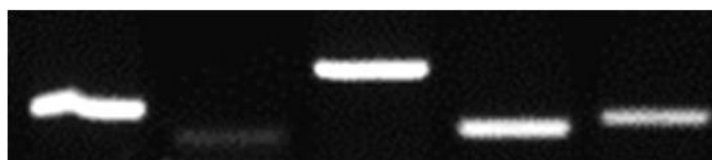


**Rycina 25.** Komórki powstałe w wyniku różnicowania protokołem III. **A** Komórki na etapie *thickened ectoderm*. **B** Komórki w trakcie terminalnego różnicowania. Białe strzałki wskazują komórki o morfologii neuronalnej. Czarna strzałka wskazuje komórki wypełnione czarnym pigmentem. **A**, powiększenie 40x, biały pasek odpowiada 250  $\mu\text{m}$ , **B** powiększenie 400x, biały pasek odpowiada 50  $\mu\text{m}$ .

Komórki na etapie  
ektodermy



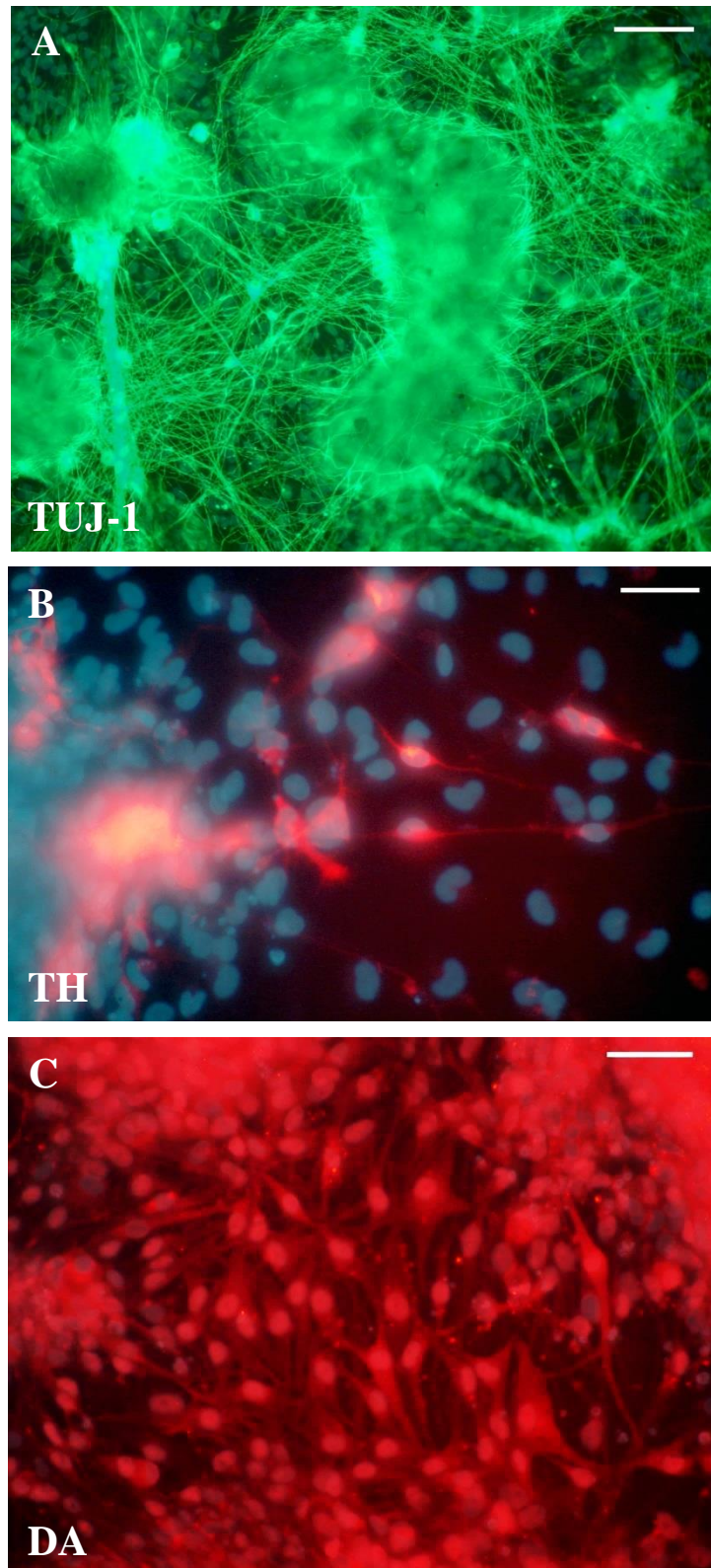
Komórki terminalnie  
różnicowane



*GAPDH*   *DAT*   *TH*   *NURR1*   *NESTIN*

**Rycina 26.** Ekspresja genów markerów neuronalnych na poziomie RNA w dwu kolejnych etapach różnicowania protokołu III. *DAT* - transporter dopaminy, *TH* – hydroksylaza tyrozyny, *NURR1* – białko związane z receptorem jądrowym *NESTIN* – nestyna, Gen konstytutywny *GAPDH* posłużył jako kontrola pozytywna reakcji PCR.

Wyróżnicowane komórki już na etapie ektodermy posiadają na poziomie RNA ekspresję genów markerów neuronalnych: transportera dopaminy (*DAT*), hydroksylazy tyrozyny (*TH*), białka związanego z receptorem jądrowym Nurr1 oraz nestyny. Warto podkreślić, iż mimo że zastosowana metoda RT-PCR jest pół-ilościowa, widać że poziom ekspresji hydroksylazy tyrozyny rośnie w trakcie ostatniego etapu różnicowania. Z kolei poziom *DAT* wydaje się nieznacznie spadać. Może to być spowodowane powstaniem dużej ilości komórek *DAT*-negatywnych, a tym samym rozcieńczeniem matrycy. Uzyskane wyniki porównano z negatywną kontrolą, w której zamiast matrycy cDNA użyto wody, w celu eliminacji ryzyka wystąpienia niespecyficznego amplifikacji.



**Rycina 27.** **A, B** - ekspresja markerów neuronalnych na poziomie białka w terminalnie zróżnicowanych za pomocą protokołu III komórkach. TUJ-1 – tubulina klasy  $\beta$  III charakterystyczna dla neuronów, TH - hydroksylaza tyrozyny. Wyróżnicowane komórki produkują dopaminę (DA, **C**). Na niebiesko wybarwiono jądra komórkowe. **A**, powiększenie 200x, biały pasek odpowiada 50  $\mu$ m, **B, C** powiększenie 400x, biały pasek odpowiada 100  $\mu$ m.



W celu potwierdzenia skuteczności różnicowania komórek piPS do neuronów dopaminergicznych protokołem III zanalizowano ekspresję markerów neuronalnych w komórkach terminalnie zróżnicowanych na poziomie białka za pomocą barwienia immunocytofluorescencyjnego. Rycina 27 prezentuje ekspresję tubuliny  $\beta$  III charakterystycznej dla neuronów (TUI-1) oraz hydroksylazy tyrozyny (TH) na poziomie białka w analizowanych komórkach. Uzyskane komórki produkują również dopaminę (DA) w ilościach wykrywalnych immunofluorescencyjnie. Wszystkie preparaty porównano do negatywnej kontroli w celu wykluczenia niespecyficznego barwienia oraz silnej autofluorescencji komórek. Co ciekawe, komórki o czarnym zabarwieniu ponownie okazały się być TH- oraz TUI-1-negatywne, wybarwiły się jednak pozytywnie na obecność dopaminy.

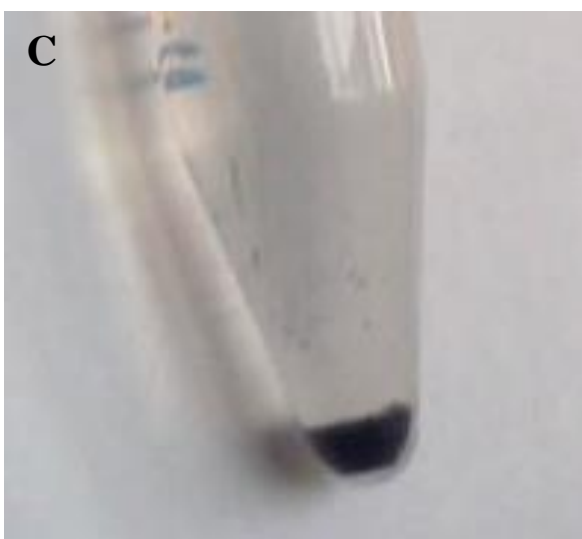
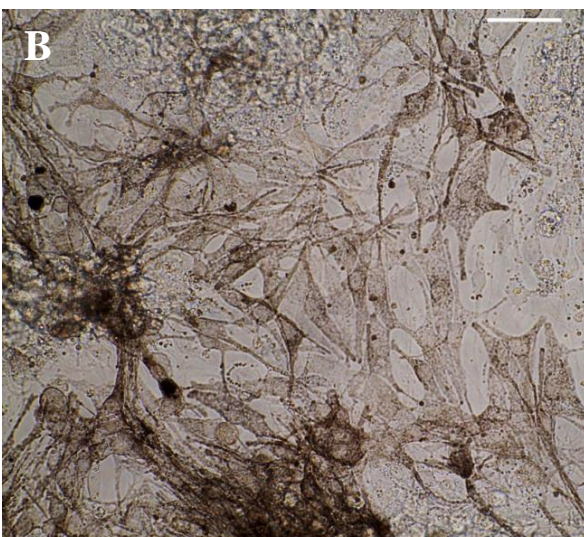
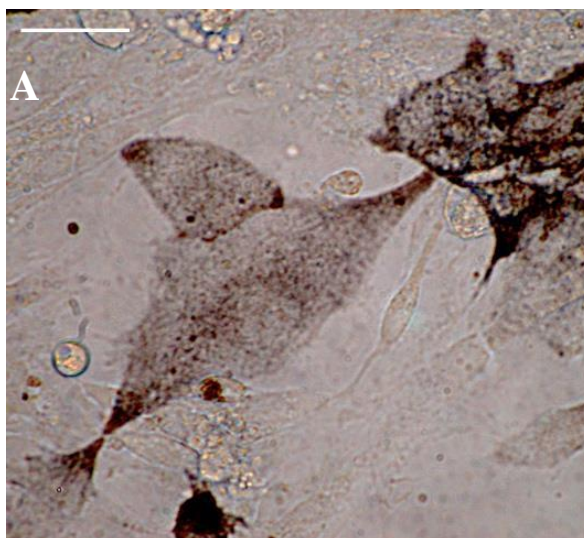
Protokół różnicowania III, podobnie jak protokół I powoduje powstanie heterogennej populacji komórek – komórek wypełnionych czarnym pigmentem oraz komórek o typowej morfologii neuronalnej. Te ostatnie cechują się obecnością niezwykle długich (często niemieszczących się w jednym polu widzenia) oraz cienkich (często niewidocznych pod mikroskopem jasnego pola) wypustek. Komórki o takiej morfologii posiadały ekspresję zarówno tubuliny  $\beta$  III jak i hydroksylazy tyrozyny, co sugeruje, że są to neurony dopaminergiczne. Niestety komórki te obecne były w hodowlach w bardzo niewielkim odsetku (sięgającym kilku procent wszystkich komórek). Nie jest to jednak zaskakujące gdy porównać wydajność różnicowania z danymi literaturowymi, gdzie obecność 10% komórek TH-pozytywnych uznawana jest za zadowalającą. Wszystkie uzyskane w toku różnicowania komórki wybarwiły się pozytywnie na obecność dopaminy, co sugeruje, że jest ona obecna we wszystkich komórkach w ko-hodowli, nawet jeśli jest produkowana tylko przez niewielki odsetek komórek.

Podsumowując ten rozdział, zaobserwowano, iż protokół III dostarcza neuronów dopaminergicznych z największą wydajnością oraz licznością (względem wyjściowej ilości komórek piPS poddanych różnicowaniu). Jest on jednak najtrudniejszy manualnie oraz najbardziej wymagający technicznie, mimo jedynie dwukrotnej konieczności przesiewania komórek. Największej trudności dostarcza drugie wysiewanie komórek na matryzel, kiedy to komórki muszą być wysiewane w kroplach. Jest to również protokół najkrótszy czasowo (26 dni od pierwszego wysiania


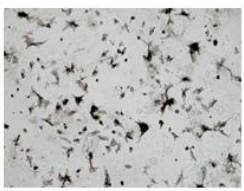
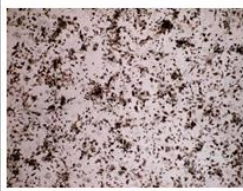
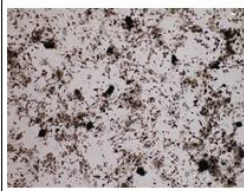


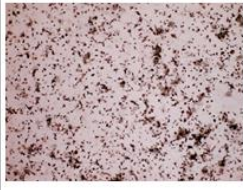



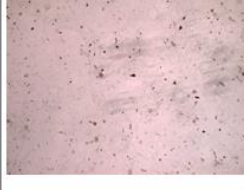

komórek piPS do końca terminalnego różnicowania). Pod względem kosztowności lokuje się on na drugim miejscu za protokołem I, który jest najmniej kosztowny, gdyż powstał w skutek ograniczenia składników mediów różnicujących używanych w protokole II. Protokół I, mimo dużej ilości kolejnych etapów różnicowania wiążących się z przesiewaniem komórek na opłaszczane wcześniej szalki oraz długiego czasu od wysiania komórek piPS do uzyskania terminalnie zróżnicowanych komórek (co najmniej 30 dni) wydaje się być najprostszy technicznie. Pozwala on także, na zamrożenie komórek w trakcie trwania różnicowania (na etapie progenitorów neuronalnych NPC), na co nie pozwala wydajny protokół III. Protokół II jest również długotrwały co protokół I, najkosztowniejszy oraz dostarcza komórek o morfologii nietypowej dla komórek neuronalnych, które cechują się dużą śmiertelnością w trakcie ostatniego etapu różnicowania. Wreszcie, protokoły I oraz III w toku różnicowania powodują powstanie komórek wypełnionych czarnym pigmentem, które to zjawisko zbadano dokładniej.

#### **4.5 Analiza komórek produkujących czarny pigment**

Różnicowanie komórek piPS do neuronów dopaminergicznych za pomocą protokołów I oraz III niespodziewanie dostarczyło komórek o czarnym zabarwieniu. Po około tygodniu terminalnego różnicowania w odpowiednich mediach zaczęły się pojawiać komórki o wyraźnym czarnym zabarwieniu. Powstający pigment był zlokalizowany wewnątrzkomórkowo, w charakterystycznych ziarnach wyraźnie widocznych na rycinie 28A. Po zebraniu trypsyną i zwirowaniu komórki tworzyły bardzo ciemny pelet (rycina 28C). Zjawisko produkcji czarnego pigmentu było powtarzalne oraz silnie zależne od początkowej gęstości komórek wysianych do terminalnego różnicowania. Najwięcej (najwyższy odsetek) czarnych komórek uzyskiwano gdy komórki, do terminalnego różnicowania protokołem I wysiewano w gęstości 200 tys./cm<sup>2</sup>. Ponadto, komórek o czarnym zabarwieniu przybywało w trakcie hodowli, co prezentuje rycina 29. Po około 3 tygodniach terminalnego różnicowania komórki zaczynały obumierać. W takich właśnie warunkach (protokół I, gęstość 200 tys. komórek/cm<sup>2</sup>, ok. 12 dni różnicowania) przygotowywano komórki do dalszych doświadczeń związanych z identyfikacją i analizą czarnego pigmentu.



**Rycina 28.** Komórki terminalnie różnicowane protokołami I (**A**) oraz III (**B**) produkują czarny pigment zlokalizowany w wewnątrzkomórkowych strątach. **C** – Pelet komórek powstałych w wyniku różnicowania protokołem I. **A, B** powiększenie 600x, biały pasek odpowiada 50  $\mu\text{m}$ .

Początkowa gęstość komórek	Dzień 6	Dzień 10	Dzień 12	Dzień 16
200 tys. /cm <sup>2</sup>				
100 tys. /cm <sup>2</sup>				
50 tys. /cm <sup>2</sup>				

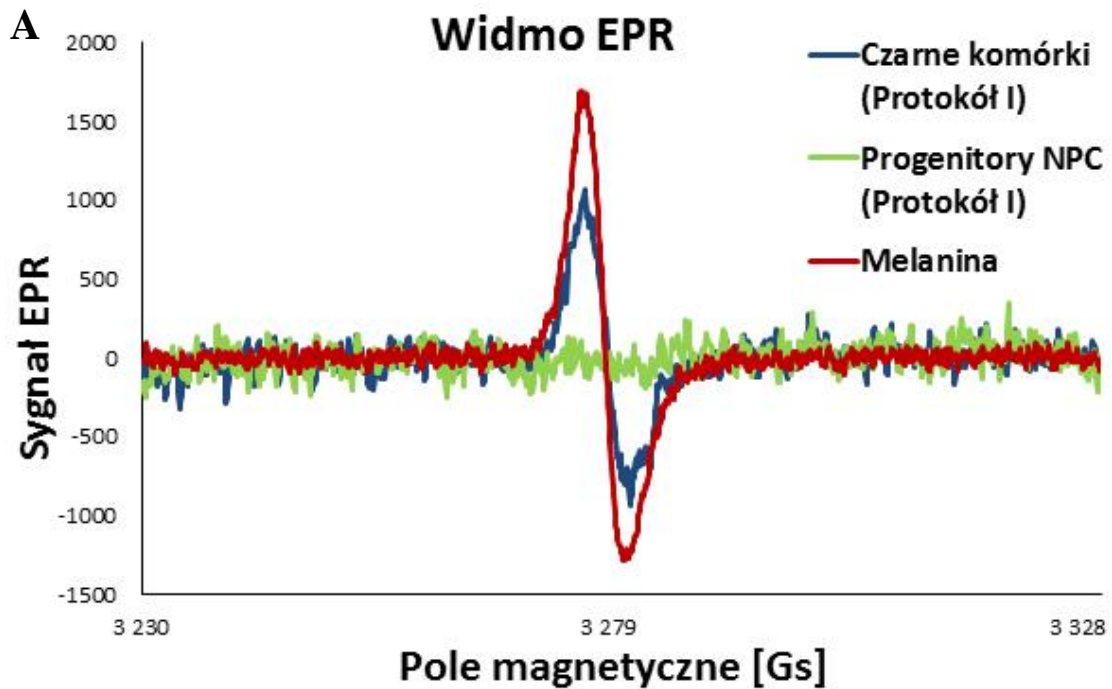
**Rycina 29.** Komórki terminalnie różnicowane protokołem I systematycznie zyskują czarne zabarwienie. Komórek produkujących pigment przybywa od 6 do 16 dnia terminalnego różnicowania. Po 20. dniu komórki zaczynają obumierać. Ilość czarnych komórek silnie zależy od początkowej gęstości wysiania komórek. Wszystkie zdjęcia - powiększenie 40x, biały pasek odpowiada 100  $\mu\text{m}$ .

Najpowszechniejszym czarnym pigmentem w przyrodzie jest melanina, obecna nie tylko w skórze, ale również w ośrodkowym układzie nerwowym. To obecności neuromelaniny (melaniny w układzie nerwowym), barwę oraz nazwę zawdzięcza istota czarna śródmózgowia, rejon ulegający neurodegeneracji w chorobie Parkinsona. Podążając tym tropem zanalizowano powstałe czarne komórki pod kątem produkcji neuromelaniny. Niestety, odróżnienie melaniny skórnej (eumelaniny) od melaniny neuronalnej (neuromelaniny) stanowi duże wyzwanie, dlatego w dalszych badaniach postanowiono potwierdzić, iż czarny pigment produkowany przez zróżnicowane komórki jest rzeczywiście melaniną. Melanina jest paramagnetykiem, dlatego najwygodniejszą techniką do jej identyfikacji jest elektronowy rezonans paramagnetyczny (EPR). Porównanie widm EPR zawiesiny czarnych komórek uzyskanych za pomocą protokołu I oraz komórek progenitorowych (NPC) uzyskanych tym samym protokołem z widmem syntetycznej melaniny uzyskanej przez

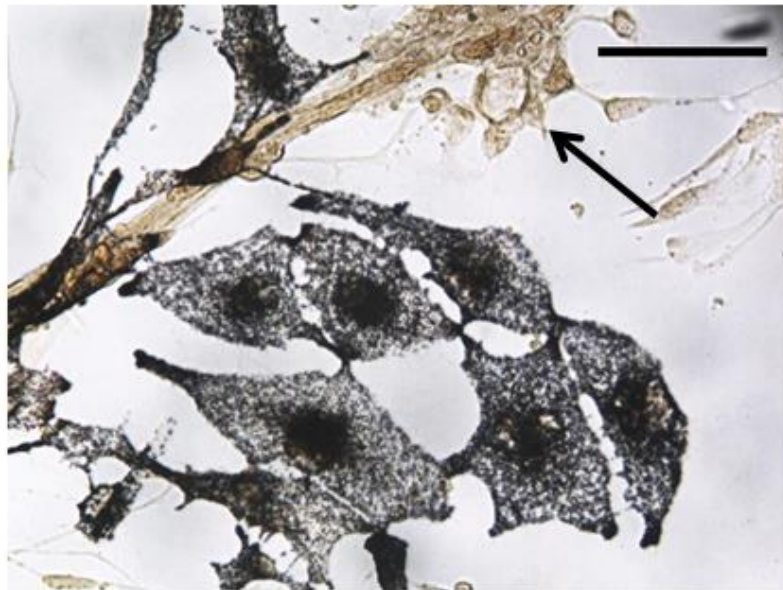
autooksydację dopaminy (kontrola pozytywna) zidentyfikowało czarny pigment obecny w uzyskanych czarnych komórkach jako melaninę. Co istotne, komórki NPC (kontrola negatywna, nie zawierająca pigmentu) nie posiadają charakterystycznego dla melaniny sygnału EPR (rycina 30A). W celu dodatkowej identyfikacji, komórki o słabym czarnym zabarwieniu (7 dzień różnicowania) wybarwiono metodą Fontany-Masson'a na obecność melaniny (rycina 30B). Technika ta pozwala na argéntofilne barwienie melaniny na czarno. Aby jednoznacznie potwierdzić specyficzność barwienia użyto komórek o słabym (brązowym) zabarwieniu oraz porównano je z kontrolami negatywnymi (barwienie bez jonów srebra komórek produkujących melaninę oraz pełne barwienie progenitorów neuronalnych). Czarna strzałka na rycinie 30 wskazuje wygląd komórek nieprodukujących melaniny oraz wygląd obu negatywnych kontroli.

Wyniki przedstawione na rycinie 30 jednoznacznie identyfikują czarny pigment produkowany przez zróżnicowane komórki jako melaninę.

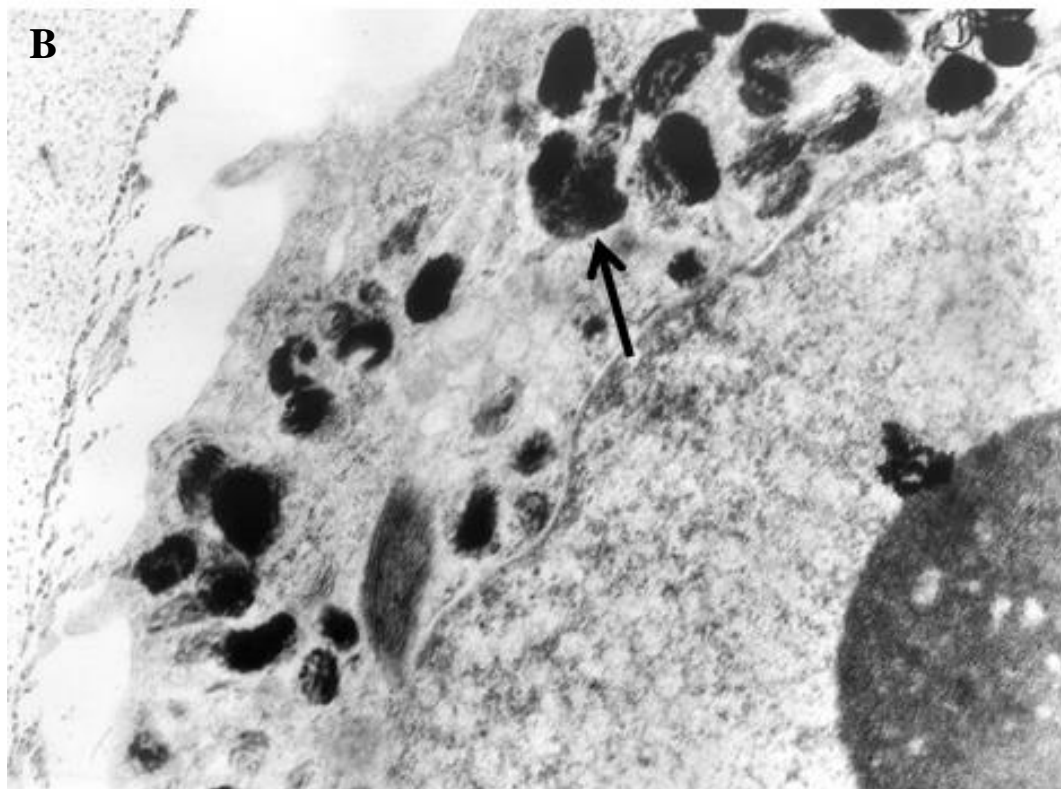
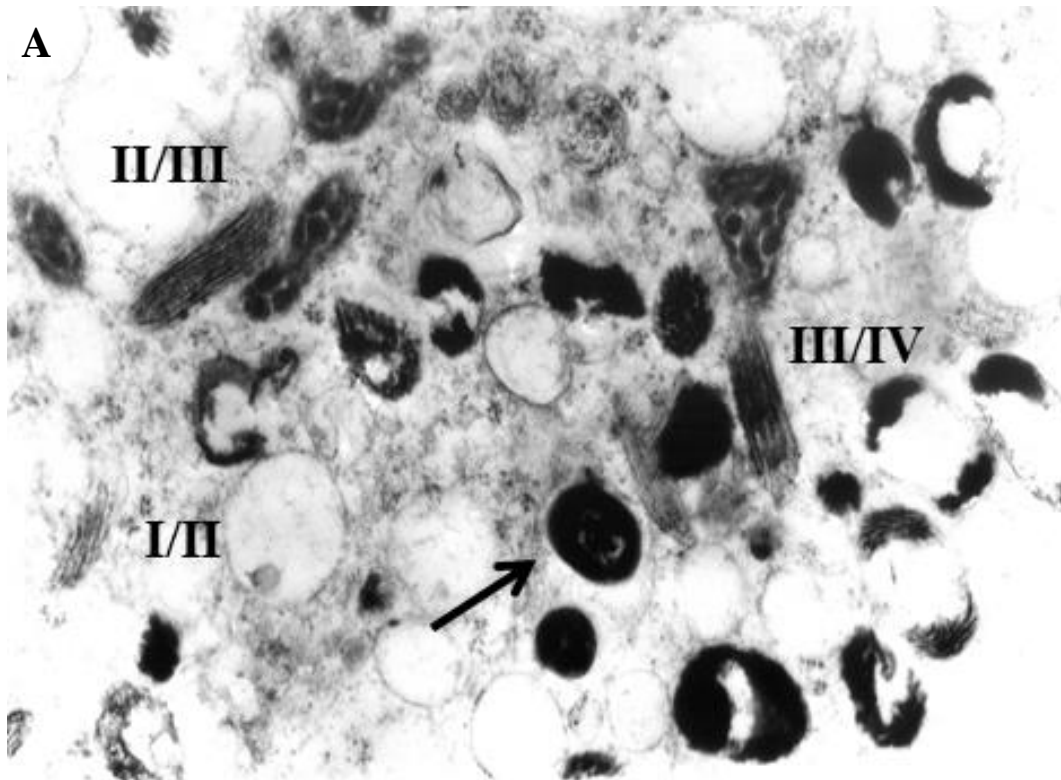
Aby zbadać sub-komórkową organizację melaniny w komórkach terminalnie zróżnicowanych protokółem I wykonano analizę tych komórek za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM). Uzyskane wyniki (rycina 31) sugerują, że melanina w uzyskanych komórkach lokalizuje się w organellach. Niektóre z nich przypominają typowe eumelanosomy, na kolejnych stadiach rozwojowych (oznaczonych na rycinie 31A cyframi rzymskimi). Inne z kolei (wskazane strzałkami na rycinie 31A oraz B) nie mają typowej budowy melanosomów i przypominają ziarna pełne melaniny, obecne w komórkach substancji czarnej. Niestety, uzyskane wyniki nie pozwalają jednoznacznie rozstrzygnąć czy melanina produkowana przez zróżnicowane komórki jest neuromelaniną. Jednak pojawienie się czarnego pigmentu przy użyciu dwu niezależnych protokołów neuronalnego różnicowania pozwala wysnuwać takie przypuszczenie, zwłaszcza, że analizowane komórki produkują także dopaminę, która może być autooksydowana do neuromelaniny.



**B**



**Rycina 30.** Komórki terminalnie zróżnicowane protokołem I produkują melanicę. **A** Widma EPR dla uzyskanych czarnych komórek, progenitorów NPC oraz syntetycznej melaniny. **B** Barwienie argentofilne uzyskanych czarnych komórek metodą Fontany-Masson'a. Melanina wybarwiona jest na czarno. Czarna strzałka wskazuje wygląd komórek nieprodukcujących neuromelaniny. **B** - powiększenie 400x, czarny pasek odpowiada 50  $\mu\text{m}$ .



**Rycina 31. A i B** Sub-komórkowa organizacja melaniny w komórkach zróżnicowanych terminalnie protokołem I. Organelle przypominające eumelanosomy, na kolejnych stadiach rozwojowych oznaczono odpowiednimi cyframi rzymskimi. Struktury przypominające ziarna neuromelaniny oznaczono strzałkami. Mikrofotografie wykonano przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego, **A** - powiększenie 64 000x, **B** - powiększenie 51 200x.

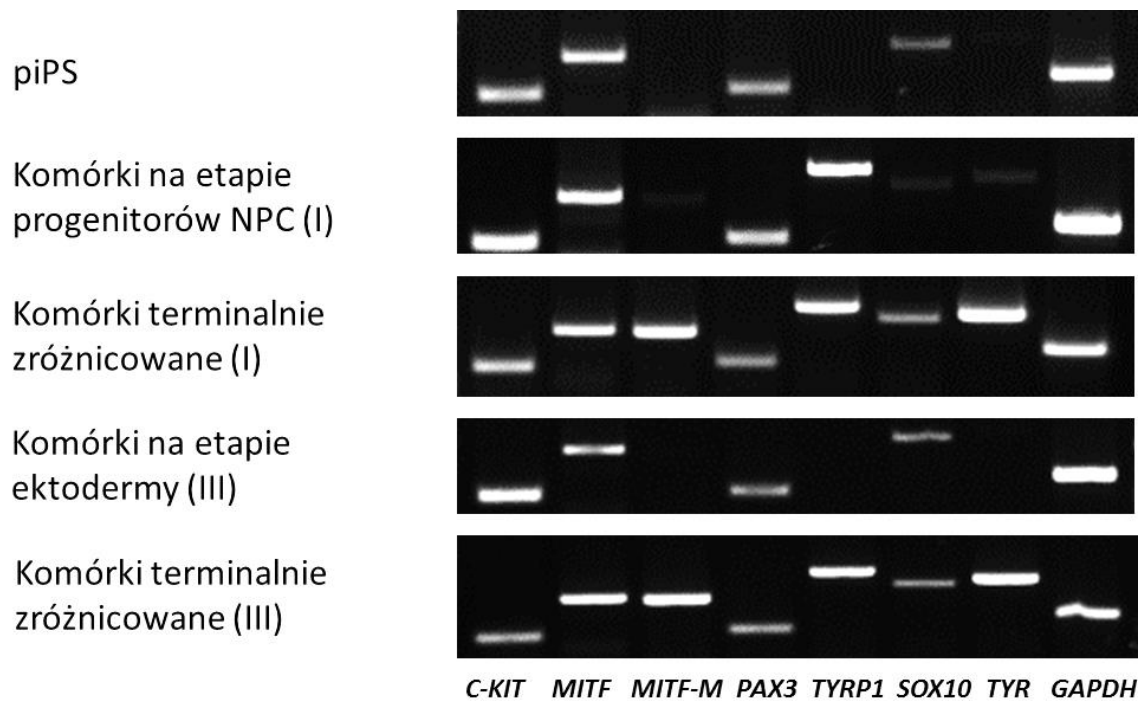
W celu jednoznacznej identyfikacji komórek produkujących melanicę, w kolejnym kroku zanalizowano ekspresję genów związanych z melanogenezą oraz charakterystycznych dla melanocytów w komórkach uzyskanych z komórek piPS przy użyciu protokołów I oraz III na poziomie RNA oraz białka odpowiednio za pomocą RT-PCR oraz barwienia immunocytofluorescencyjnego. Zanalizowano geny, których ekspresja ma miejsce w melanocytach – komórkach produkujących melanicę, gdyż podejrzewano, iż mogą one być obecne w uzyskanych ko-hodowlach.

Rycina 32 prezentuje analizę ekspresji genów związanych z melanogenezą na poziomie RNA w komórkach piPS, komórkach terminalnie zróżnicowanych protokołami I oraz III, a także w komórkach stanowiących etapy przejściowe w różnicowaniu oboma protokołami. Każdorazowo, uzyskane wyniki porównywano z kontrolą negatywną (amplifikacja bez matrycy) w celu potwierdzenia specyficzności amplifikacji. Pozytywną kontrolę amplifikacji stanowił gen *GAPDH*. Uzyskane wyniki pokazują, iż na każdym etapie różnicowania (z użyciem obu protokołów) komórki posiadają ekspresję genu *C-KIT* kodującego receptor cytokiny SCF (ang. *Stem Cell Factor*) genu *MITF* kodującego czynnik transkrypcyjny związany z mikroftalmią oraz genu czynnika transkrypcyjnego *PAX3*. Gen czynnika transkrypcyjnego *SOX10* posiada ekspresję we wszystkich analizowanych komórkach, po za progenitorami uzyskanymi protokołem I. Ekspresja genów: *TYR* kodującego tyrozynazę – enzym zaangażowany w syntezę melaniny - oraz *TYRPI* kodującego białko 1 związane z tyrozynazą (ang. *TYRosinase-related Protein 1*) pojawia się dopiero po terminalnym różnicowaniu komórek oboma protokołami. Podobnie jak ekspresja genu *MITF-M* – czynnika transkrypcyjnego *MITF* charakterystycznego dla melanocytów. Może to sugerować obecność melanocytów w uzyskanych w ko-hodowlach. Warto odnotowania jest fakt, iż wzór ekspresji analizowanych genów jest identyczny dla komórek produkujących melanicę uzyskanych za pomocą obu protokołów różnicowania.

Aby potwierdzić tezę o obecności melanocytów w uzyskanych hodowlach wykonano barwienie immunofluorescencyjne komórek terminalnie zróżnicowanych za pomocą protokołów I oraz III pod kątem ekspresji *MITF-M* na poziomie białka. Uzyskane wyniki prezentuje rycina 33, która pokazuje obecność *MITF-M* w uzyskanych oboma protokołami komórkach. Co ciekawe, najniższym poziomem (lub wręcz brakiem) czynnika transkrypcyjnego *MITF-M* charakterystycznego dla melanocytów charakteryzują się komórki wypełnione melanicą wskazane na rycinie 32

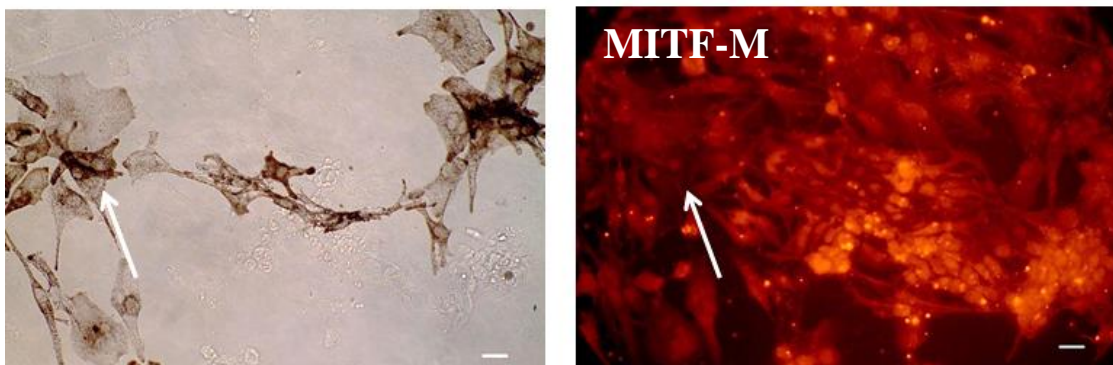


strzałkami. Sugerować to może, iż komórki te nie są melanocytami, a melanina w nich obecna może być neuromelaniną powstałą z dopaminy obecnej w medium hodowlanym.

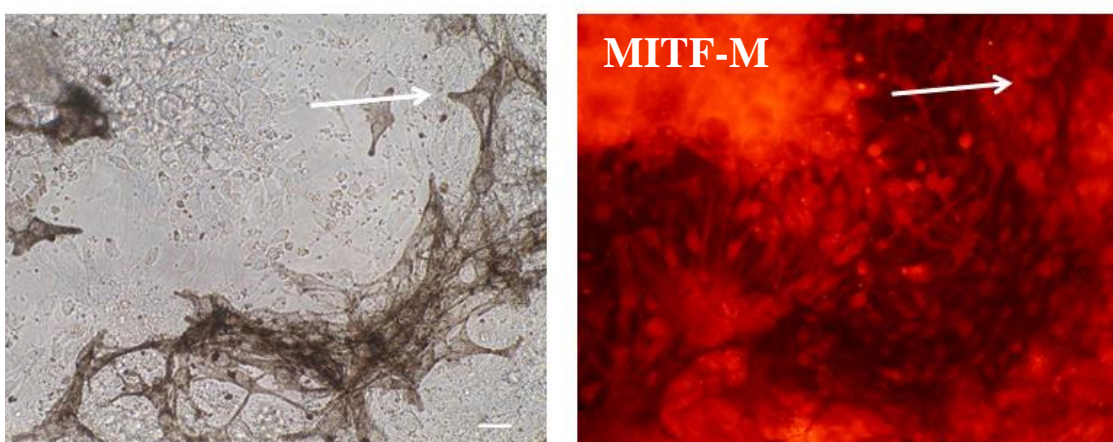


**Rycina 32.** Ekspresja genów zaangażowanych w melanogenezę oraz charakterystycznych dla melanocytów na poziomie RNA w kolejnych etapach różnicowania komórek protokołami I oraz III. *C-KIT*- receptor cytokiny SCF, *MITF* - czynnik transkrypcyjny związany z mikroftalmią, *MITF-M* - *MITF* charakterystyczny dla melanocytów, *TYR* – tyrozylnaza, *TYRP1*- białko 1 związane z tyrozylnazą. Gen konstytutywny *GAPDH* posłużył jako kontrola pozytywna reakcji PCR.

### Komórki terminalnie zróżnicowane protokołem I



### Komórki terminalnie zróżnicowane protokołem III



**Rycina 33.** Ekspresja markera MIT-M (czynnik transkrypcyjny związany z mikroftalmią) charakterystycznego dla melanocytów w komórkach terminalnie zróżnicowanych protokołami I oraz III na poziomie białka. Białe strzałki wskazują komórki wypełnione melanim, które okazały się być MITF-M-negatywne. Powiększenie 400x, biały pasek odpowiada 50  $\mu\text{m}$ .

Uzyskane wyniki sugerują, iż w wyniku terminalnego różnicowania komórek piPS za pomocą opisanych protokołów I oraz III uzyskano wysoce heterogenne populację komórek w skład, których wchodzi komórki produkujące melanim. Uzyskano tym samym niezwykle złożony oraz ciekawy model do dalszych badań, w tym nad rolę melanogenezy w rozwoju choroby Parkinsona. Temat ten został podjęty w rozdziale 5.

## **4.6 Opracowanie zwierzęcego modelu choroby Parkinsona oraz transplantacja uzyskanych zróżnicowanych komórek**

W celu weryfikacji przydatności uzyskanych poprzez różnicowanie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych komórek produkujących dopaminę w terapii chorób neurodegeneracyjnych opracowano szczurzy oraz myszy model choroby Parkinsona oraz wykonano pierwsze transplantacje komórek do modelu szczurzego.

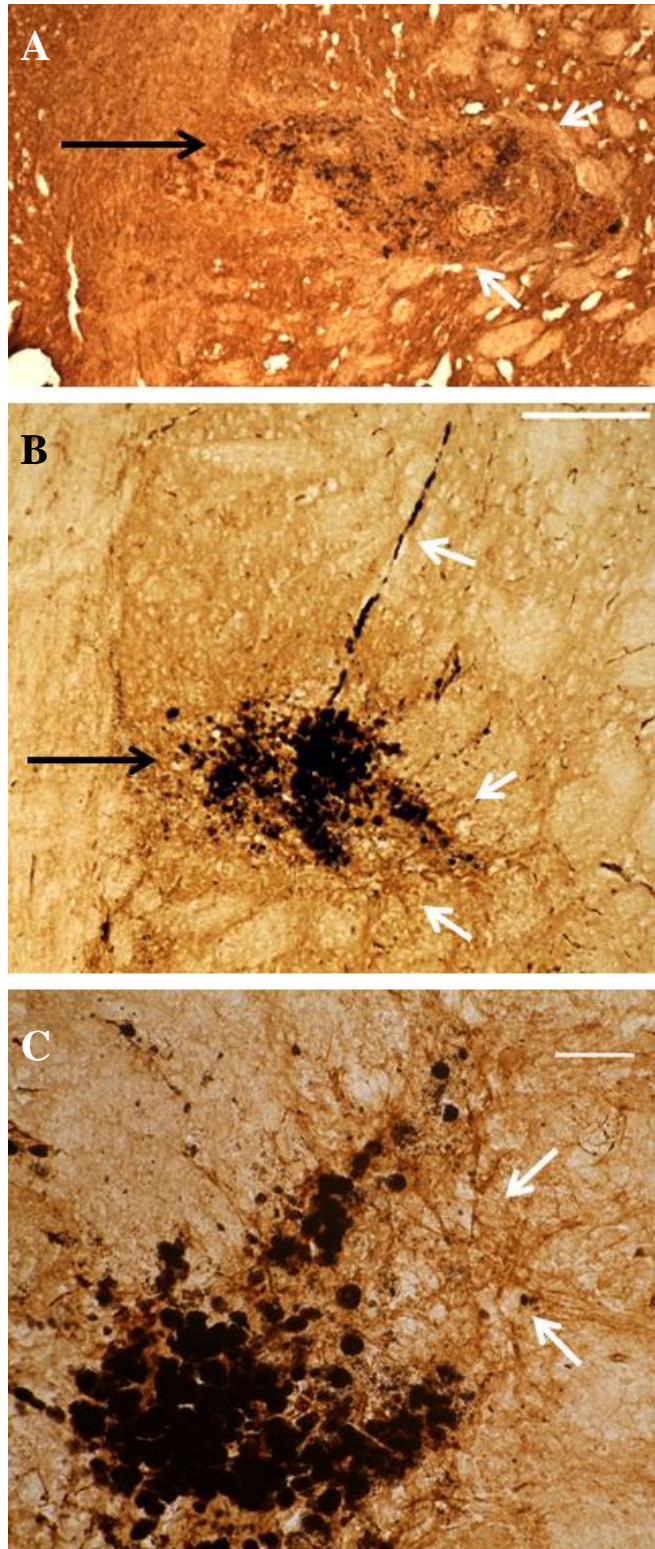
W podejściu wykorzystującym szczurzy model przeprowadzono jednostronne operacje stereotaktyczne mające na celu uszkodzenie pęczka przyśrodkowego przodomózgowia stanowiącego projekcję neuronów dopaminergicznych z istoty czarnej do prążkowie. Spośród 38 operowanych w 2 turach szczurów jedynie 3 nie przeżyły operacji. 6 szczurów posłużyło do określenia poprawnych koordynatów operacyjnych – zaraz po operacji zostały uśmiercone, a ich mózgi użyte do weryfikacji trafienia w pożądaną strukturę.

Niestety w teście rotacyjnym z użyciem rotametrów żaden z operowanych szczurów nie wykazywał znacznej lezji układu dopaminergicznego ani w teście apomorfynowym ani amfetaminowym. W teście apomorfynowym rotacje występują gdy dochodzi do 85% uszkodzenia układu dopaminowego. Z kolei test amfetaminowy jest bardziej czuły i obroty szczurów pojawiają się już przy 50% lezji. W teście amfetaminowym obserwowano zachowanie asymetryczne niektórych szczurów. Sugeruje to indukcję lezji na poziomie 50% uszkodzenia układu dopaminowego. Komórki podano tym szczurom, u których stwierdzono asymetrię założywszy, iż posiadają one niewielkie lezje układu dopaminowego. Po miesiącu od operacji wszczepiono w dwa miejsca do prążkowie po uszkodzonej stronie wyróżnicowane protokołem I komórki. W pierwszej turze doświadczeń zwierzętom wszczepiono jedynie komórki terminalnie zróżnicowane, w drugiej także progenitory neuronalne NPC. W pierwszej turze przeszczepień szczurów nie poddawano immunosupresji, w drugiej turze eksperymentów szczurom codziennie podawano cyklosporynę A w celu wywołania immunosupresji. Miesiąc po wszczepieniu komórek szczury uśmiercono oraz wyizolowano ich mózgi, które następnie skrojono i wybarwiono immunohistochemicznie na obecność komórek TH-pozytywnych. Wybarwione

preparaty porównano z kontrolami negatywnymi w celu jednoznacznej identyfikacji miejsce podania komórek. Niestety, ze względu na silne barwienie niespecyficzne nie sposób było odnaleźć miejsce podania progenitorów neuronalnych. Najlepiej widoczne oraz zidentyfikowane jednoznacznie były miejsca podania komórek terminalnie zróżnicowanych, ze względu na obecność komórek produkujących melanię. Uzyskane wyniki prezentuje rycina 34.

Ponieważ w pierwszej turze doświadczeń szczury nie zostały poddane immunosupresji przeszczepione komórki prawdopodobnie zostały odrzucone przez układ immunologiczny i nie zintegrowały się z tkanką. Widoczne jest to na rycinie 34A w postaci silnie odgraniczzonego miejsca podania komórek (zaznaczonego czarną strzałką), które otoczone jest wyraźną blizną (zaznaczoną białymi strzałkami). Nie widać komórek integrujących się z tkanką.

Jednak kiedy szczury poddawano immunosupresji – w drugiej turze doświadczeń – przeszczepione komórki wydawały się integrować z otaczającą tkanką. Na rycinie 34B oraz 34C (przy większym powiększeniu) białe strzałki wskazują komórki niejako wyrastające z miejsca podania komórek (zaznaczonego czarną strzałką) i wrastające w tkankę mózgową szczura. Wart odnotowania jest fakt, iż zarówno komórki produkujące melanię, jak i komórki o fenotypie neuronalnym i silnym brązowym zabarwieniu sugerującym obecność TH wydają się wrastać w tkankę mózgową. Sugeruje to, iż przeszczepione komórki (lub przynajmniej ich część) zintegrowały się z tkanką. Jest to obiecujący wynik pozwalający sądzić, iż uzyskane poprzez różnicowanie protokołem I komórki produkujące dopaminę mają potencjał do wywołania efektu terapeutycznego *in vivo*. Aby potwierdzić tę tezę konieczne są dalsze eksperymenty na modelach zwierzęcych.

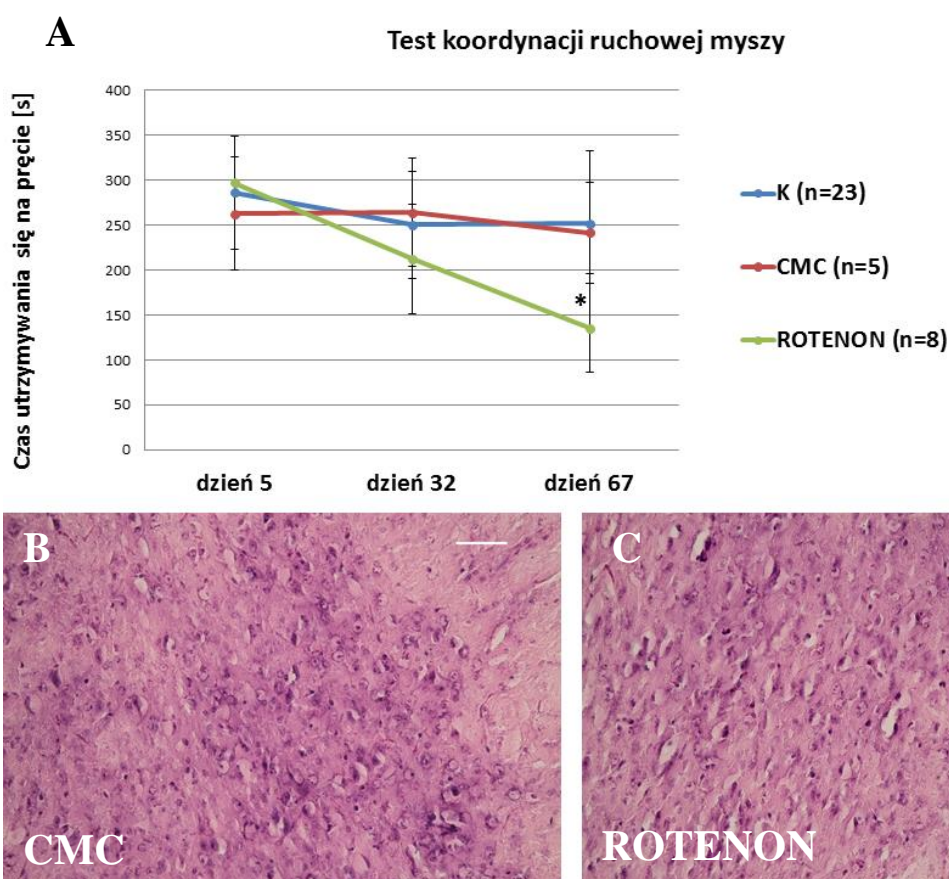


**Rycina 34.** Barwienie immunohistochemiczne skrawków mózgow szczurzych na obecność przeszczepionych komórek TH-pozytywnych (wybarwionych na brązowo). Czarne strzałki wskazują miejsce podania komórek. Białe strzałki na rycinie **A** (szczur bez immunosupresji) wskazują powstałą bliznę, na rycinie **B** i **C** (szczur z immunosupresją) wskazują przeszczepione komórki integrujące się z tkanką. **A** i **B** powiększenie 40x, biały pasek odpowiada 500  $\mu\text{m}$  **C** powiększenie 400x, biały pasek odpowiada 50  $\mu\text{m}$ .

Ponieważ codzienne podawanie cyklosporyny A w celu immunosupresji jest uciążliwe dla zwierząt, które w dodatku nie najlepiej znoszą tę procedurę opracowano myszy model choroby Parkinsona wykorzystując myszy szczepu NOD/SCID. Myszy tego szczepu posiadają upośledzony układ immunologiczny – są więc idealnym modelem do ksenotransplantacji komórek. Myszom NOD/SCID codziennie przez 56 dni doustnie podawano rotenon w dawce 30 mg/kg w celu indukcji modelu choroby Parkinsona. Pojawianie się zaburzeń ruchowych monitorowano za pomocą testu koordynacji ruchowej z użyciem rota-rodu. Rejestrowano czas utrzymywania się myszy na rotującym i przyspieszającym pręcie na początku, w połowie oraz na końcu doświadczenia. Po zakończeniu doświadczenia myszy zabito, a ich mózgi wyizolowano i skrojono w celu określenia zmian patologicznych w istocie czarnej. Uzyskane wyniki prezentuje rycina 35. Czas utrzymywania się na pręcie myszy otrzymujących rotenon w trakcie doświadczenia wyraźnie spadał w stosunku do grupy kontrolnej otrzymującej sam rozpuszczalnik - karboksymetylocelulozę (CMC) - oraz do grupy kontrolnej w ogóle niepodlegającej procedurom karmienia (grupa ta posłużyła eliminacji wpływu codziennego kontaktu z eksperymentatorem oraz procedur karmienia na koordynację ruchową myszy). Na koniec okresu podawania rotenonu różnica w czasie utrzymywania się myszy na rotującym pręcie między grupą otrzymującą rotenon, a grupami kontrolnymi okazała się być istotna statystycznie, sugerując skuteczną indukcję objawów ruchowych choroby Parkinsona w mysim modelu. Duże wartości odchylenia standardowego spowodowane są znacznymi różnicami w zachowaniu myszy w obrębie grup.

W istocie czarnej myszy otrzymującej rotenon pojawiły się patologiczne zmiany widoczne na rycinie 35C. Analiza patomorfologiczna sugeruje, iż w istocie czarnej myszy grupy eksperymentalnej obecnych było mniej komórek niż w grupie otrzymującej sam rozpuszczalnik (jaśniejsze zabarwienie preparatu). Wydaje się, że gęstość neuronów w istocie czarnej myszy otrzymującej rotenon była nieco niższa niż w grupie kontrolnej. W istocie czarnej myszy z grupy eksperymentalnej odnaleziono również zdegenerowane komórki wyglądające na apoptotyczne (wyników nie pokazano – opinia konsultującego preparaty). W analogicznych strukturach myszy z grupy kontrolnej nie odnotowano takiej obserwacji. Obserwacje te są spójne z wynikami testów koordynacji ruchowej.

Uzyskane dane pokazują, iż opracowano dogodny zwierzęcy model do przeszczepienia ludzkich komórek uzyskanych poprzez różnicowanie komórek iPS. Model ten nie tylko posiada symptomy choroby Parkinsona, ale także cechuje się upośledzonym układem odpornościowym, co pozwala na ksenotransplantację komórek bez ryzyka ich odrzucenia.



**Rycina 35.** Opracowanie mysiego modelu choroby Parkinsona. **A** Czas utrzymywania się myszy NOD/SCID na rotującym pręcie spada w trakcie podawania rotenonu w stosunku do grup kontrolnych, co sugeruje spadek koordynacji ruchowej – pojawienie się objawów choroby Parkinsona. Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe. \* oznacza różnice istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ) w stosunku do odpowiedniej kontroli. **B** i **C**. Barwienie eozyną/hematoksyliną skrawków mózgow mysich odpowiadających istocie czarnej. W istocie czarnej myszy otrzymujących rotenon obecnych było mniej neuronów niż grupie kontrolnej. **K** - grupa kontrolna nie poddawana zabiegom karmienia, **CMC** - grupa kontrolna otrzymująca sam rozpuszczalnik, **ROTENON** – grupa badawcza otrzymująca codziennie rotenon. **B** i **C** powiększenie 400x, biały pasek odpowiada 50  $\mu\text{m}$ .

## **4.7 Opracowanie *genetycznego zabezpieczenia* indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych opartego na *genie samobójczym***

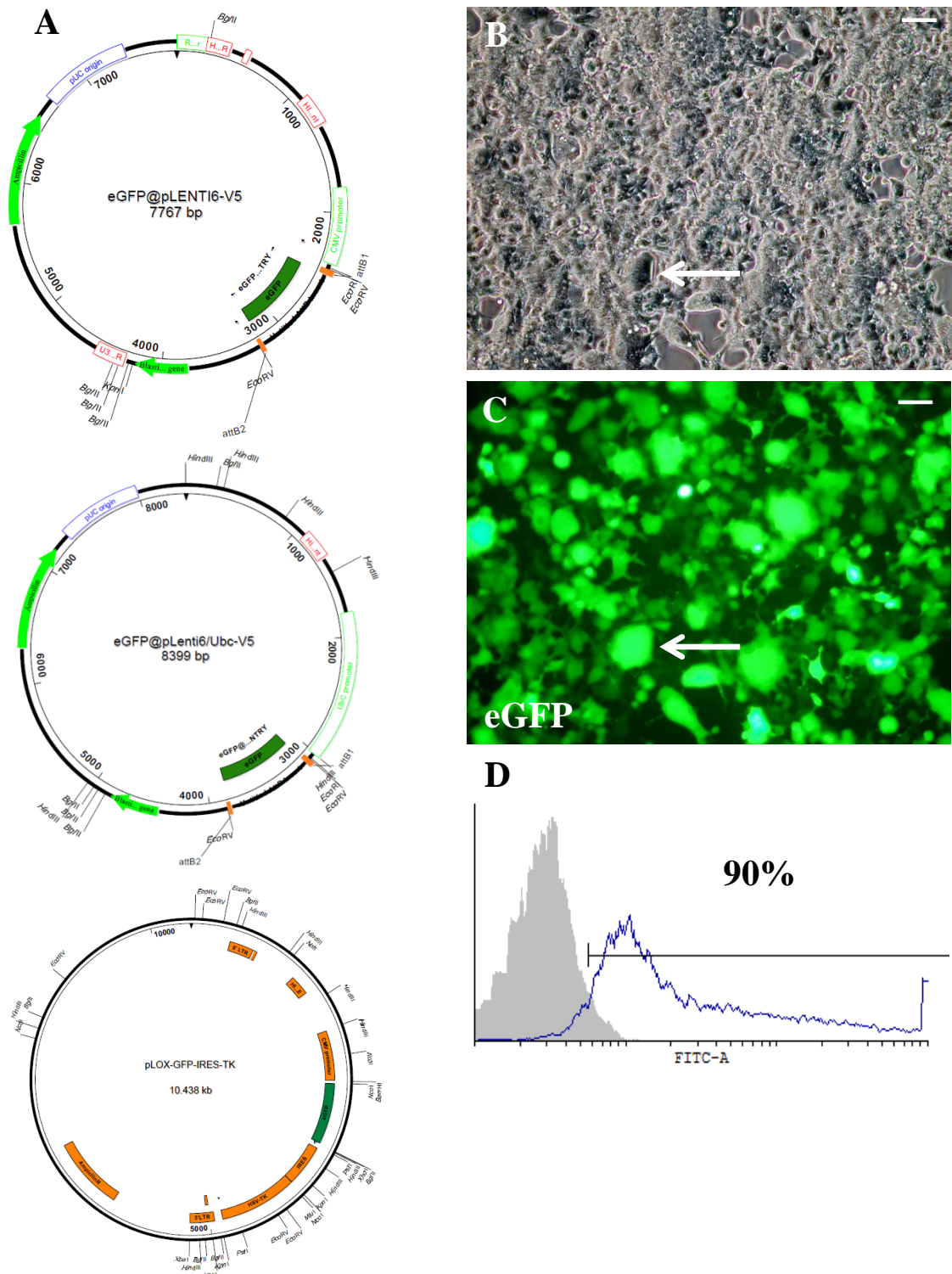
W celu zwiększenia bezpieczeństwa, a tym samym przydatności w komórkowej terapii regeneracyjnej, indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych opracowano metodę genetycznego zabezpieczenia komórek umożliwiającego selektywną eliminację komórek zmodyfikowanych genetycznie. W podejściu tym wykorzystano *samobójczy gen* kinazy tymidynowej (TK) oraz metabolizowany przez jego produkt nieaktywny pro-lek gancyklowir.

Ponieważ modyfikacja genetyczna komórek iPS jest trudna, a ich hodowla wymagająca oraz kosztowna pierwsze doświadczenia nad terapią opartą o *gen samobójczy* wykonano na modelowej linii komórek mięsaka prądkowankomórkowego Rh30. Linia ta jest dobrze scharakteryzowana (również pod kątem tworzenia guzów *in vivo*) oraz łatwa w hodowli i modyfikacji genetycznej. Wyniki doświadczeń uzyskane na linii komórek Rh30 posłużyły do optymalizacji metod, które docelowo zostaną zastosowane do przygotowania genetycznego *wentylu bezpieczeństwa* dla indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych.

### **4.7.1 Przygotowanie oraz produkcja wektorów wirusowych**

Stosując techniki klonowania DNA przygotowano oczyszczone lentiwirusowe plazmidy przenoszące geny białka GFP (pod kontrolą promotorów CMV oraz UbC) oraz zestaw GFP-IRES-TK (pod kontrolą promotora CMV), których mapy prezentuje rycina 36A. Ich większe wersje zamieszczono w załączniku 1 na końcu pracy. Używając uzyskanych plazmidów oraz plazmidów akcesoryjnych wyprodukowano wektory lentiwirusowe przygotowane na bazie wirusa HIV-1. Jako komórek produkujących wektory użyto komórek linii 293T, które transfekowano metodą chemiczną z użyciem fosforanu wapnia. Uzyskiwano wysoką wydajność transfekcji sięgającą 90% (rycina 36D). Wydajność tę określano cytometrycznie. W trakcie produkcji wektorów wirusowych komórki 293T charakteryzowały się bardzo wysoką ekspresją GFP oraz zlewały się w charakterystyczne syncytia wskazane na rycinie 36B i C strzałkami. Jest to oznaka wydajnej produkcji wirusowej.



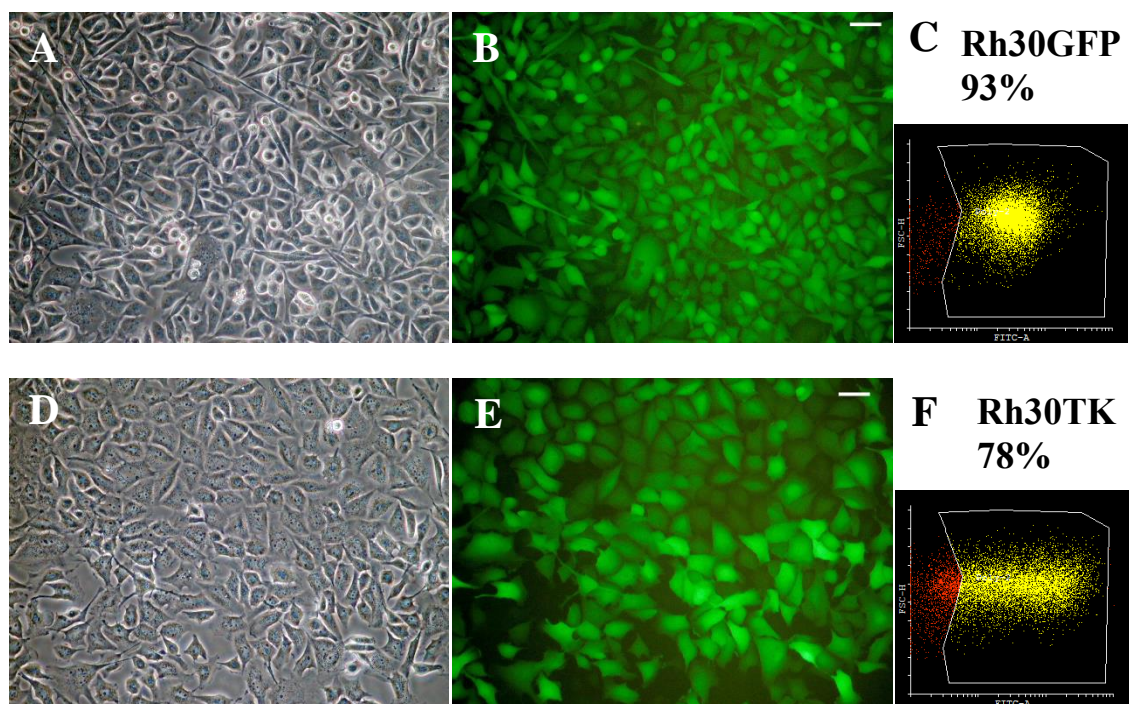


**Rycina 36.** Przygotowanie plazmidów oraz produkcja wektorów wirusowych. **A** Mapy przygotowanych plazmidów lentiwirusowych. Ich większe wersje zamieszczono w załączniku 1 na końcu tej pracy. W trakcie produkcji wektorów wirusowych komórki 293T charakteryzowały się bardzo wysoką ekspresją GFP oraz zlewały się w charakterystyczne syncytia wskazane białymi strzałkami na rycinie **B** i **C**. **D** Analiza cytometryczna transfekowanych komórek 293T wskazuje na wysoką wydajność transfekcji. **B** i **C** powiększenie 200x, biały pasek odpowiada 50  $\mu$ m.

W trakcie niniejszej pracy doktorskiej dokonano optymalizacji metody transfekcji komórek oraz produkcji wektorów lentiwirusowych. Protokół opisany w rozdziale materiały i metody to wynik optymalizacji tej metody. Prowadzi ona do uzyskania wektorów wirusowych o mianie rzędu  $5 \times 10^5$  jednostek transdukcyjnych /ml. Wyprodukowane wektory mianowano używając linii HT1080. Zebrane wektory wirusowe przechowywano zamrożone do czasu transdukcji komórek.

#### **4.7.2 Wyprowadzenie zmodyfikowanych genetycznie linii komórek Rh30**

Komórki mięsaka prążkowanokomórkowego Rh30 zainfekowano wyprodukowanymi wektorami wirusowymi przy MOI=5. Po 2 dniach od infekcji rozpoczęto selekcję antybiotykową komórek zainfekowanych wirusem przenoszącym gen białka GFP pod kontrolą promotora CMV. Po 2 tygodniach selekcji uzyskano linię komórek Rh30GFP. Komórki zainfekowane wirusem przenoszącym konstrukt GFP-IRES-TK wysortowano pod kątem ekspresji GFP tydzień po infekcji. Wyprowadzono w ten sposób linię komórek Rh30TK. Czystość obu wyprowadzonych linii komórkowych oznaczono za pomocą analizy cytometrycznej (rycina 37). Wyznaczono odsetek komórek wykazujących zieloną fluorescencję względem komórek typu dzikiego (RhWT). Wyprowadzono linie komórkowe o zadowalającej czystości. 93% komórek Rh30GFP okazało się GFP-dodatnich, w przypadku linii Rh30TK czystość sortu wyniosła 78%. Tak wyprowadzonych linii komórkowych użyto do dalszych doświadczeń.

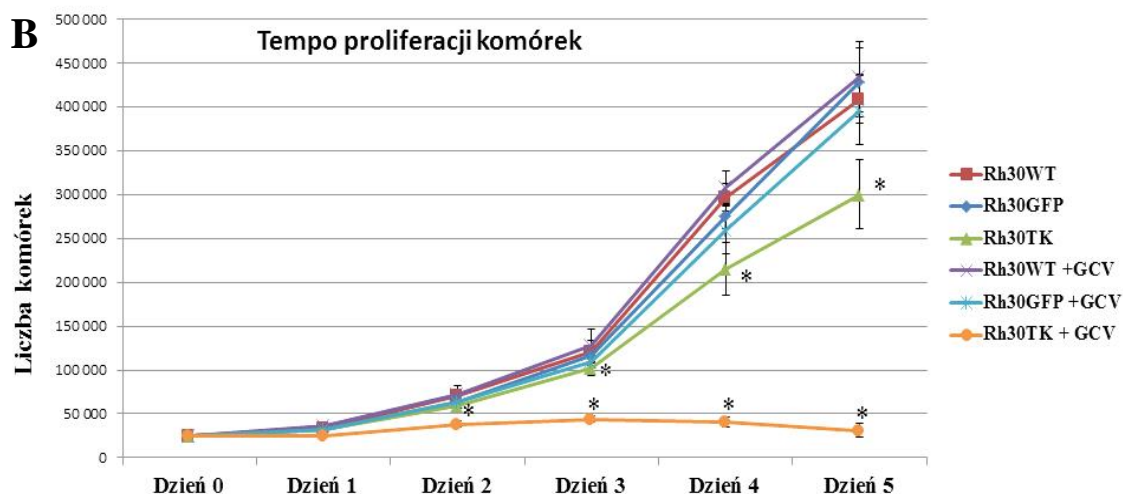
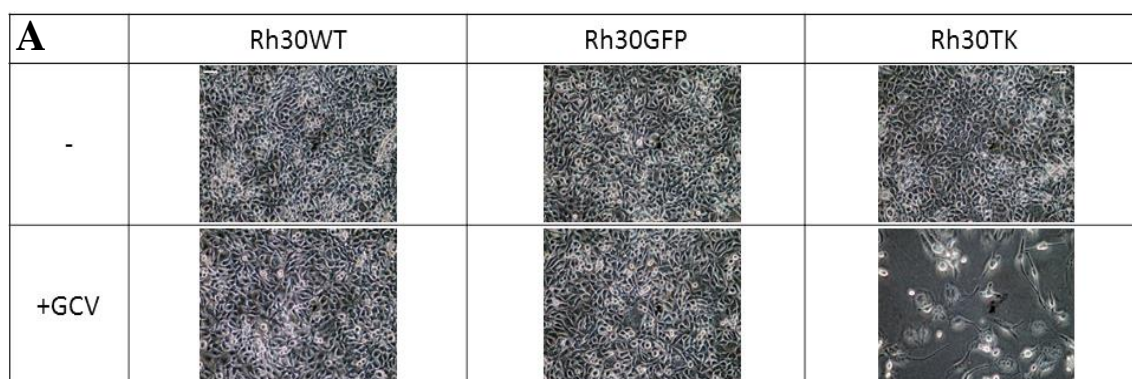


**Rycina 37.** Wyprowadzone linie komórkowe Rh30GFP (**A i B**) oraz Rh30TK (**D i E**). Analiza cytometryczna transdukowanych komórek względem komórek typu dzikiego (**C i F**) pokazała zadowalającą czystość – odpowiednio 93% i 78%. **A, B, D, E** powiększenie 200x, biały pasek odpowiada 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4.7.3 Test skuteczności strategii opartej o *gen samobójczy in vitro*

W kolejnym kroku sprawdzono wrażliwość wyprowadzonych linii komórkowych na gancyklowir *in vitro*. Wszystkie linie inkubowano przez 6 dni z gancyklowirem w stężeniu 0,1  $\mu\text{g/ml}$ . W warunkach kontrolnych komórki hodowane były w zwykłym medium hodowlanym. Codziennie określano liczbę komórek przy użyciu komory Bürker'a, a w ostatnim, 6. dniu wykonano mikrofotografie komórek. Uzyskane wyniki prezentuje rycina 38. Gancyklowir (GCV) w użytym stężeniu jest wyraźnie toksyczny dla komórek linii Rh30TK, jednocześnie będąc obojętnym dla komórek kontrolnych (Rh30WT i Rh30GFP). Niemal wszystkie komórki Rh30TK zostały wyeliminowane z hodowli po 6-cio dniowym traktowaniu gancyklowirem (rycina 38A). Ponadto jak prezentuje rycina 38B linia komórek Rh30TK cechuje się wolniejszym tempem wzrostu od pozostałym użytym liniom. Może to być spowodowane wprowadzeniem do komórek egzogennej kinazy, która może niespecyficznie

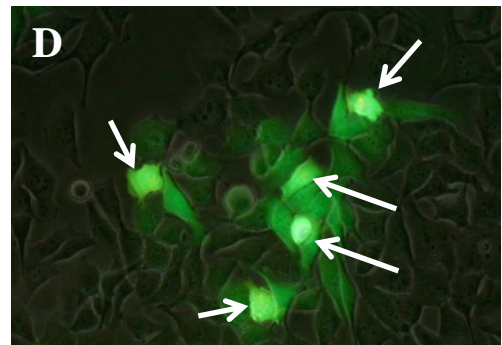
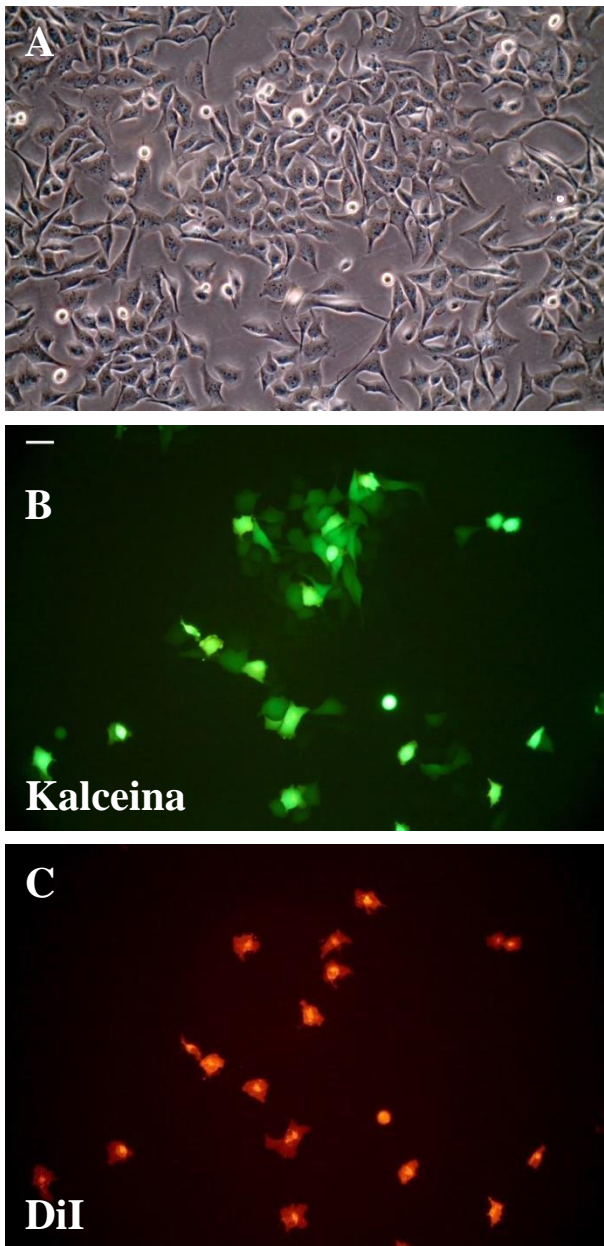
fosforylować substraty komórkowe wpływając tym samym na szlaki przekazywania i cykl komórkowy zmieniając tym samym tempo wzrostu komórek.



**Rycina 38.** Gancyklowir skutecznie eliminuje komórki posiadające ekspresję kinazy tymidynowej TK. **A** Po 6 dniach inkubacji komórek z gancyklowirem w stężeniu 0,1 µg/ml (oznaczenie +GCV) niemal wszystkie komórki Rh30TK zostają wyeliminowane. **B** Wykres prezentujący tempo wzrostu wyprowadzonych linii komórkowych w obecności (oznaczenie +GCV) i przy braku gancyklowiru. Gancyklowir jest nietoksyczny dla komórek Rh30WT i Rh30GFP. Wyniki przedstawiono jako średnia ± odchylenie standardowe. \* oznacza różnice istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ) w stosunku do odpowiedniej kontroli. Mikrofotografie w wykonano przy powiększeniu 200x, biały pasek odpowiada 50 µm.

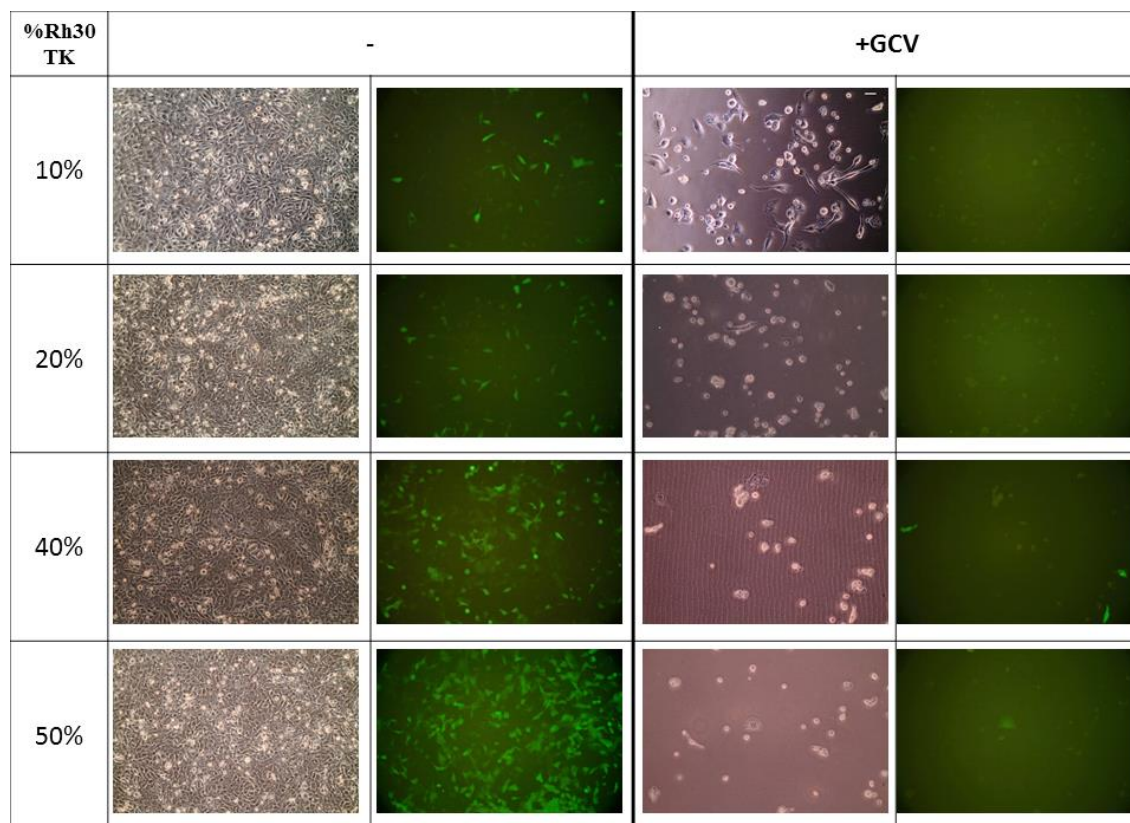
Komórki posiadające ekspresję kinazy tymidynowej są efektywnie eliminowane przez gancyklowir przy uzyskanej czystości wynoszącej 78% komórek pozytywnych. Jednak w przypadku komórek macierzystych, zwłaszcza w strategii modyfikacji genetycznej *in vivo*, uzyskanie komórek o takiej czystości może okazać się dużym wyzwaniem. Jednakże toksyczny metabolit gancyklowiru jest transportowany przez złącza szczelinowe sąsiadujących komórek. Może on więc wywoływać toksyczny efekt

również w komórkach typu dzikiego sąsiadujących z komórkami posiadającymi ekspresję genu *samobójczego* (tzw. efekt sąsiedztwa). Aby określić na ile ten transfer przekłada się na efektywną eliminację komórek sąsiadujących z komórkami posiadającymi ekspresję TK postanowiono przygotować ko-hodowle zawierające różne odsetki komórek Rh30TK. Niezbędna do zajścia efektu sąsiedztwa komunikacja międzykomórkowa za pośrednictwem złącz szczelinowych w linii Rh30 jest wydajna, co reprezentuje transfer zielonego barwnika fluorescencyjnego kalceiny widoczny na rycinie 39.



**Rycina 39.** Komunikacja międzykomórkowa za pośrednictwem złącz szczelinowych w linii Rh30. **B** Zielony barwnik fluorescencyjny kalceina przenika przez złącza szczelinowe sąsiadujących komórek od komórek donorowych (wybarwionych dla identyfikacji czerwonym barwnikiem fluorescencyjnym barwiącym błony komórkowe DiI (**C**)) do komórek akceptorowych. Komórki donorowe zaznaczono na rycinie **D** białymi strzałkami. **A**, **B**, **C**, **D** powiększenie 200x, biały pasek odpowiada 50  $\mu\text{m}$ .

W celu określenia wydajności efektu sąsiedztwa przygotowano mieszaniny komórek Rh30TK z komórkami Rh30WT zawierające od 0 do 78% komórek Rh30TK. Ko-hodowle prowadzono przez 8 dni w obecności 1  $\mu\text{g/ml}$  gancyklowiru. Komórki kontrolne hodowane były w zwykłym medium hodowlanym. Uzyskane wyniki prezentuje rycina 40.



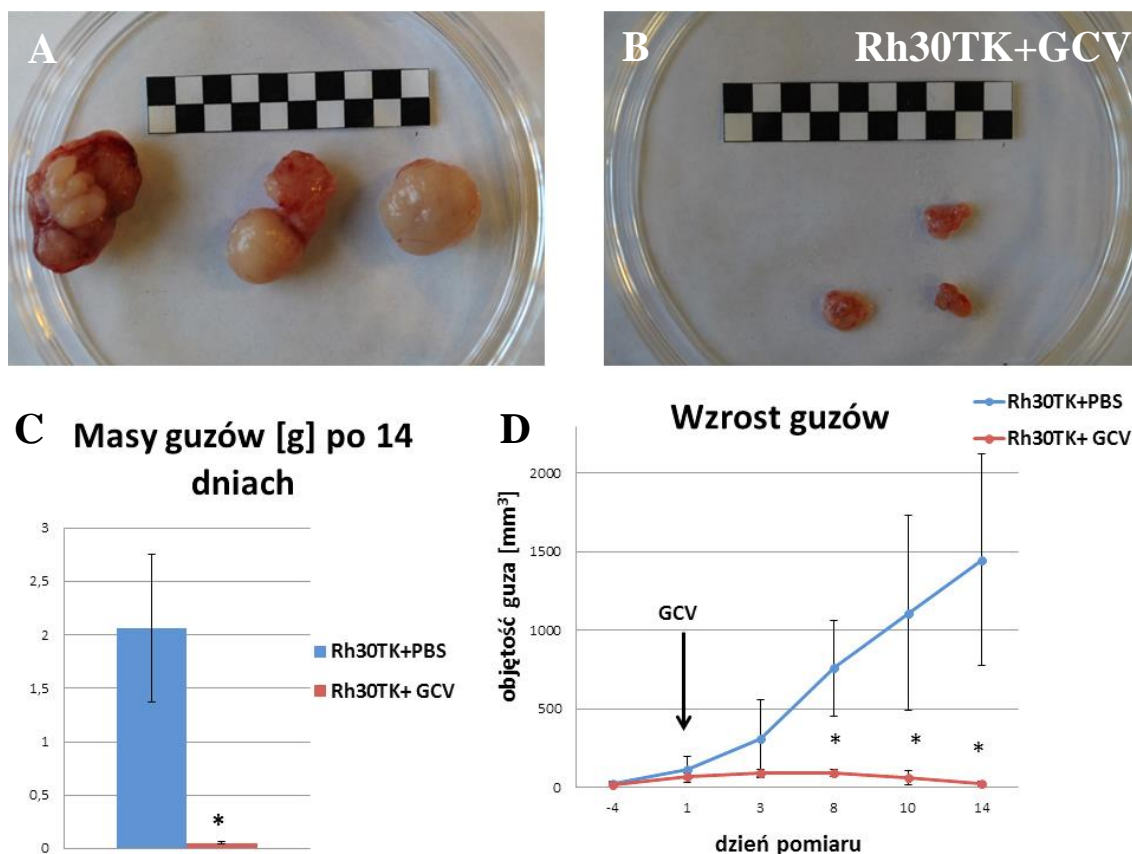
**Rycina 40.** Efekt sąsiedztwa w linii komórek Rh30. Już 20% komórek Rh30TK obecnych w ko-hodowli z komórkami Rh30WT wystarcza do całkowitej eliminacji wszystkich komórek w trakcie 8 dniowej inkubacji z gancyklowirem w stężeniu 1  $\mu\text{g/ml}$  (+GCV). Pod nieobecność gancyklowiru komórki rosną normalnie. Procenty oznaczają odsetki komórek Rh30TK w ko-hodowli. Wszystkie zdjęcia - powiększenie 200x, biały pasek odpowiada 50  $\mu\text{m}$ .

W ciągu 8 dniowej inkubacji z gancyklowirem w stężeniu 1  $\mu\text{g/ml}$  wszystkie komórki zostały wyeliminowane gdy komórki posiadające ekspresję kinazy tymidynowej (Rh30TK) stanowiły zaledwie 20%. Dowodzi to silnego, toksycznego efektu sąsiedztwa zachodzącego w trakcie ko-hodowli komórek Rh30WT oraz Rh30TK w obecności gancyklowiru.

Uzyskane wyniki sugerują, że opracowana strategia *genu samobójczego* oparta na specyficznej eliminacji komórek mięsaka prążkowanokomórkowego posiadających ekspresję kinazy tymidynowej pod wpływem gancyklowiru jest niezwykle skuteczna w warunkach *in vitro*. W kolejnym kroku sprawdzono jej skuteczność w warunkach *in vivo*.

#### **4.7.4 Test skuteczności strategii opartej o *gen samobójczy in vivo***

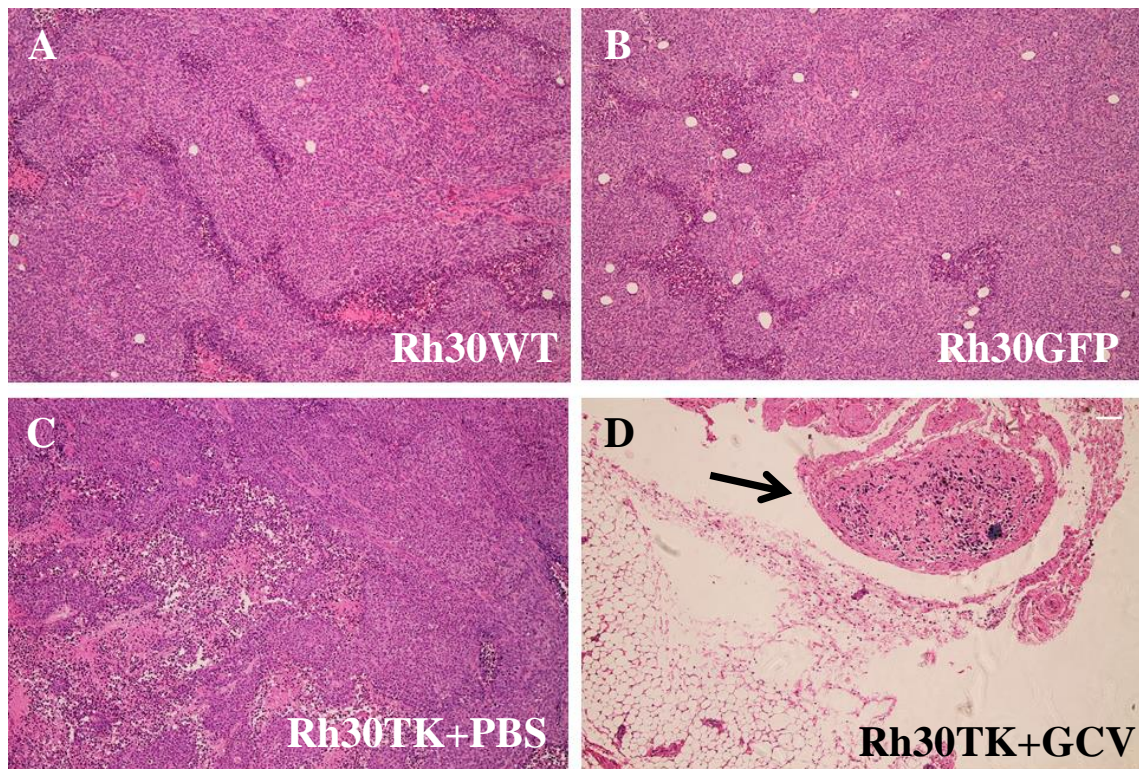
Wyrowadzone komórki linii Rh30TK oraz Rh30GFP wszczepiono podskórnice do myszy z upośledzoną odpornością. Kiedy komórki sformowały guzy o mierzalnych rozmiarach myszom zaczęto dootrzewnowo podawać codziennie roztwór gancyklowiru w stężeniu 50 mg/kg masy ciała (1 mg w 0,5 ml/mysz) przez 14 dni. Myszom należącym do grupy kontrolnej podawano w tym czasie sam rozpuszczalnik- PBS. Rozmiary guzów sprawdzano 2 razy w tygodniu. Uzyskane wyniki prezentuje rycina 41.



**Rycina 41.** Terapia samobójcza *in vivo*. Guzy sformowane przez komórki Rh30TK (A i B) zostały niemal całkowicie wyeliminowane w trakcie 2 tygodniowego dootrzewnowego podawania gancyklowiru (GCV) w dawce 50mg/kg (B). W grupie kontrolnej, gdzie podawany był sam PBS, guzy osiągnęły znaczne rozmiary (A) Wykresy C i D przedstawiają odpowiednio masy wyizolowanych guzów oraz tempo wzrostu guzów w trakcie pomiarów. Czarna strzałka wskazuje początek podawania gancyklowiru. Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe. \* oznacza różnice istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ) w stosunku do kontroli. Białe i czarne kwadraty na rycinach A i B odpowiadają 0,5 cm.

Guzy powstałe z komórek Rh30TK niemal całkowicie zanikły w trakcie 2 tygodniowego podawania gancyklowiru. Guzy powstałe z tych komórek u myszy otrzymujących PBS osiągnęły w tym czasie znaczne rozmiary (rycina 41A). Powstałe guzy wyizolowano, zważono oraz poddano analizie histopatologicznej, którą przedstawia rycina 42. W obecności gancyklowiru guzy sformowane przez komórki Rh30TK zostały niemal całkowicie wyeliminowane. Tkanka wyizolowana z miejsca podania tych komórek (wskazana na rycinie 42D białą strzałką) okazała się być węzłem chłonnym, w którym odnaleziono jedynie pojedyncze, martwe komórki nowotworowe. Co niezwykle istotne, nie stwierdzono toksyczności narządowej u żadnej z myszy. Wykazywały one normalne zachowanie w trakcie przeprowadzania eksperymentu.



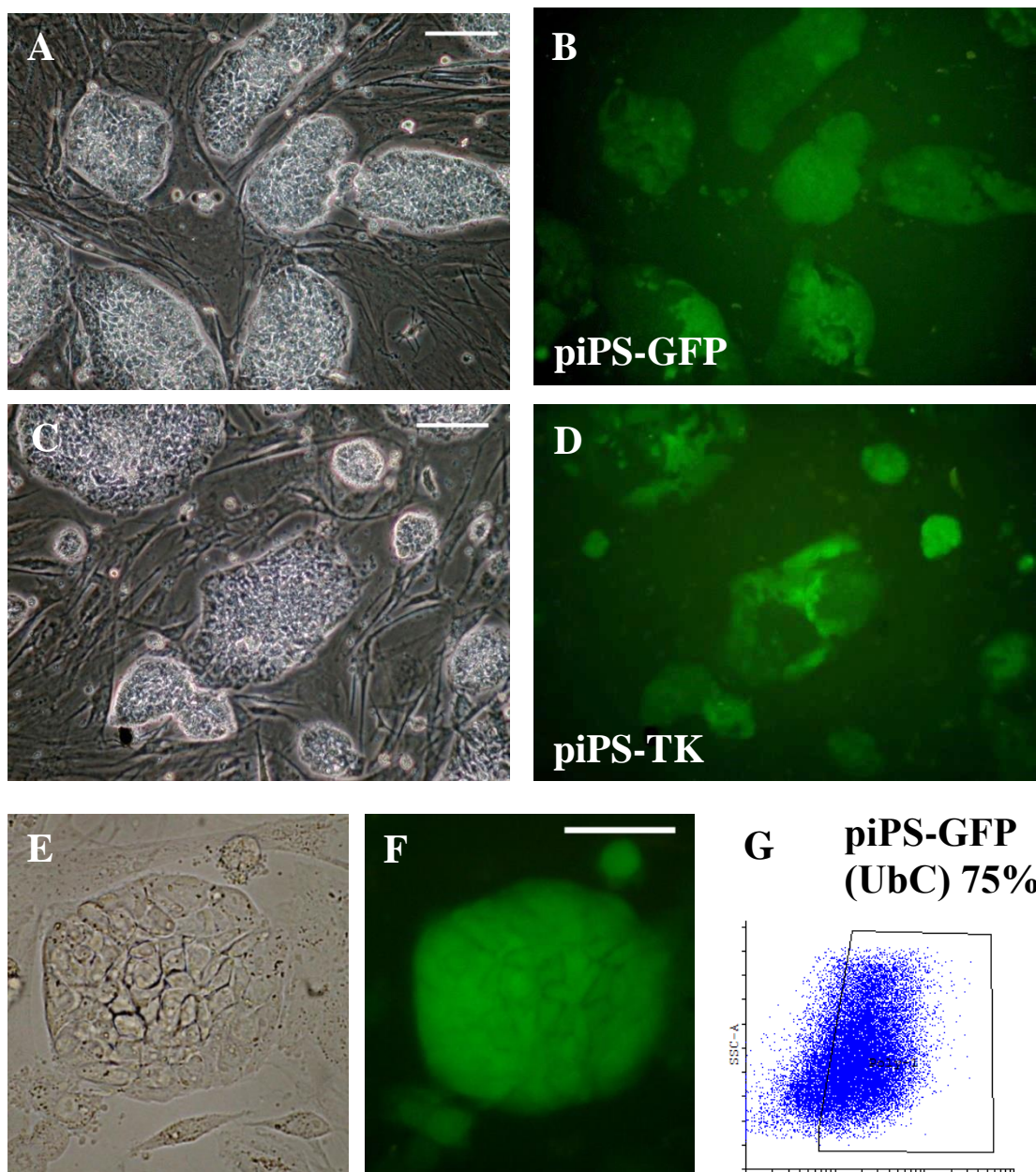


**Rycina 42.** Analiza histopatologiczna wyizolowanych guzów. Skrawki zostały wybarwione hematoksyliną/eozyną. Guzy sformowane przez komórki Rh30WT (**A**), Rh30GFP (**B**) oraz Rh30TK (**C**) nie różniły się budową ani morfologią komórek. Tkanka wyizolowana z miejsca podania komórek Rh30TK w grupie otrzymującej gancyklowir (wskazana na rycinie **D** białą strzałką) okazała się być węzłem chłonny, w którym odnaleziono jedynie pojedyncze, martwe komórki nowotworowe. Wszystkie zdjęcia - powiększenie 100x, biały pasek odpowiada 100  $\mu$ m.

Uzyskane wyniki sugerują, że zastosowana *terapia samobójcza* jest skuteczna w eliminacji komórek nowotworowych *in vivo*. Pozwala to mieć nadzieję na jej przyszłe wykorzystanie w terapii genowej nowotworów, a także na wykorzystanie jej jako genetycznego *wentylu bezpieczeństwa* pozwalającego w razie konieczności selektywnie wyeliminować wszystkie przeszczepione komórki powstałe przez różnicowanie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych.

#### 4.7.5 Wyprowadzenie zmodyfikowanych genetycznie linii komórek piPS

Docelowymi komórkami, których wrażliwość na gancyklowir po modyfikacji genetycznej wprowadzającej *gen samobójczy* postanowiono sprawdzić w tej pracy była linia indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych piPS. Modyfikacja genetyczna tych komórek okazała się być jednak skomplikowana technicznie. Przy pierwszym podejściu, przy próbie transdukcji w warunkach hodowlanych komórek iPS zmodyfikowano genetycznie jedynie mysie embrionalne fibroblasty (MEF) warstwy odżywczej, ponieważ te komórki są znacznie bardziej permissywne dla infekcji wirusowej. Opracowano, więc protokół, w którym komórki piPS hodowano w warunkach bez warstwy odżywczej – szalkach opłaszczonych matriżelem i w medium kondycjonowanym przez komórki MEF. W warunkach takich używając zagęszczonych i rozpuszczonych w kondycjonowanym medium do komórek iPS wektarów wirusowych udało się zmodyfikować genetycznie komórki piPS przy MOI=20. Po 2 tygodniowej selekcji w warunkach bez warstwy odżywczej udało się wyprowadzić linię komórek piPS-GFP (rycina 43A i B), a po wysortowaniu linię komórek piPS-TK (rycina 43C i D). Linie te wysiano ponownie na warstwę odżywczą z komórek iMEF. Jednak w przeciągu następnych 2 tygodni wyprowadzone linie straciły ekspresję transgenów co obserwowano jako spadek ekspresji zielonej fluorescencji białka GFP. Winę za ten stan rzeczy ponosi wirusowy promotor CMV, pod kontrolą, którego znajdowały się wprowadzane transgeny, a który jest wyciszany w komórkach z czasem. W komórkach macierzystych piPS okazał się być wyciszany bardzo szybko. Wyprowadzone linie bardzo szybko utraciły ekspresję transgenów. Dlatego w kolejnym podejściu wyprowadzono w opisany już sposób linie komórek piPS-GFP(UbC) (rycina 43E i F), która posiadała ekspresję białka GFP pod kontrolą konstytutywnego promotora ubikwityny C (UbC). Promotor ten nie jest wyciszany i zdecydowanie bardziej nadaje się do długotrwałego, genetycznego zabezpieczenia komórek. Czystość komórek tej linii określono cytofluorymetrycznie na 75% komórek GFP-pozytywnych (rycina 43G). Komórki tej linii posiadały stabilną ekspresję białka GFP. Aby wyprowadzić stabilną linię komórek piPS-TK(UbC) konieczne jest przeklonowanie transgenu GFP-IRES-TK pod kontrolę promotora UbC. Prace nad tym zabiegiem trwają.



**Rycina 43.** Wyprowadzone linie komórkowe piPS-GFP (A i B) i piPS-TK (C i D) straciły ekspresję transgenów w wyniku wyciszenia promotora CMV. Wyprowadzona linia komórek piPS-GFP(UbC) (E i F) cechowała się stabilną ekspresją GFP. Jej analiza cytometryczna (G) wykazała zadowalającą czystość wynoszącą 75%. A, B, C, D, powiększenie 200x, biały pasek odpowiada 100  $\mu\text{m}$ , E, F powiększenie 400x, biały pasek odpowiada 50  $\mu\text{m}$ .

Uzyskane wyniki sugerują, że użycie *geny samobójczego* kinazy tymidynowej do zabezpieczenia indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych to podejście niezwykle obiecujące, mogące w przyszłości znacznie zwiększyć bezpieczeństwo komórkowej terapii regeneracyjnej.

## 5. Dyskusja

### 5.1 Izolacja komórek somatycznych do reprogramowania

Pierwszym krokiem w otrzymywaniu indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych jest uzyskanie somatycznych komórek dorosłego organizmu, które zostaną reprogramowane. Ludzkie indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste potencjalnie uzyskać można z każdej diploidalnej komórki somatycznej [109]. Pomimo iż po raz pierwszy uzyskano je z fibroblastów [26] to pokazano, że do pluripotencji można reprogramować m.in. limfocyty B [110], komórki CD34+ [111], progenitory neuronalne [112], astrocyty [113] czy keratynocyty [114].

Z perspektywy dostępności oraz minimalizacji inwazyjności procedury izolacji jednojądrzaste komórki wyizolowane z krwi obwodowej stanowią optymalną populację komórek somatycznych do reprogramowania. To właśnie komórki krwi obwodowej pacjenta cierpiącego na chorobę Parkinsona zostały reprogramowane dostarczając linii komórek PD-iPS scharakteryzowanych w tej pracy. Fibroblasty, których hodowla *in vitro* jest nieskomplikowana, a reprogramowanie popularne, uzyskuje się poprzez biopsję skóry – procedurę dość krwawą i inwazyjną. Dobrym substytutem komórek krwi są keratynocyty izolowane z włosa. W sytuacjach, gdy niedostępna jest krew pacjenta (lęk pacjenta, brak wykwalifikowanego personelu) pobranie włosów stanowi bardzo komfortową alternatywę o podobnym stopniu inwazyjności. Ponadto, sama hodowla keratynocytów dostarcza dużej ilości komórek oraz jest prosta technicznie w porównaniu z hodowlą i ekspansją komórek jednojądrzastych krwi. Dodatkowo, keratynocyty uważa się za komórki łatwe do reprogramowania, ze względu na wysoką, endogenną ekspresję genów *C-MYC* i *KLF4* [114]. Inne ludzkie komórki somatyczne są trudniej dostępne, lub ich pozyskiwanie wiąże się z większym stopniem inwazyjności. Protokół izolacji ludzkich keratynocytów z wyrwanego włosa opracowano na podstawie literatury [104]. Zoptymalizowano go jednak pod kątem redukcji kosztów m.in. zastępując matryżel żelatyną. Wiele kroków opisanej procedury wymagało praktycznego sprawdzenia oraz technicznej optymalizacji. Opisana w rozdziale 3 metoda w sposób powtarzalny dostarcza ludzkich komórek somatycznych gotowych do reprogramowania z zadowalającą wydajnością w przeciągu ok. miesiąca od izolacji. Do uzyskania niezbędnej ilości keratynocytów konieczne są 2 szalki hodowlane o powierzchni 35

mm, każda z około 10 wyrwanymi włosami. Liczba 20 wyrwanych włosów sprawia dawcy jedynie niewielki dyskomfort, porównywalny ze stresem związanym z pobraniem krwi.

Metoda jest również skuteczna w przypadku izolacji keratynocytów z włosów siwych (doświadczenia własne), a w przypadku, gdy dawca komórek nie posiada włosów na głowie, istnieje możliwość izolacji keratynocytów z włosów wyrwanych z dowolnej części ciała [104] lub użycia komórek krwi.

## **5.2 Reprogramowanie ludzkich keratynocytów do komórek iPS**

Wyizolowane ludzkie keratynocyty zostały skutecznie zmodyfikowane genetycznie za pomocą wektorów lentiwirusowych stworzonych na bazie wirusa HIV-1 wprowadzających ekspresję białka zielonej fluorescencji GFP. Do transdukcji keratynocytów niezbędne okazało się zagęszczenie oraz przeniesienie do odpowiedniego medium wyprodukowanych wektorów wirusowych. Spowodowane było to terminalnym różnicowaniem keratynocytów pod wpływem surowicy oraz jonów wapnia w wysokim stężeniu obecnych w medium, w którym wyprodukowano wektory wirusowe. Keratynocyty terminalnie zróżnicowane przestawały proliferować oraz szybko obumierały. Transdukcję wprowadzającą ekspresję GFP wykonano, aby określić odpowiedni stosunek wektorów wirusowych do komórek (MOI), przy którym modyfikacja genetyczna jest skuteczna i nietoksyczna. Najlepsze wyniki uzyskano dla MOI=5. Przy takiej wielokrotności infekcji transdukowano keratynocyty wektorami lenti- oraz onko-retrowirusowymi przenoszącymi zestaw genów czynników transkrypcyjnych użytych przez grupę Yamanaki [26] do reprogramowania komórek. Niestety, mimo kilkukrotnych prób metodami tymi nie udało się uzyskać linii komórek kiPS. Uzyskano jedynie częściowo reprogramowane komórki tworzące kolonie, które szybko przestawały rosnąć oraz degenerowały. Co istotne, zjawisko takie obserwowano także w przypadku reprogramowania z użyciem wirusa Sendai. W tym wypadku jednak w następnych dniach pojawiły się w pełni reprogramowane komórki kiPS. Obserwacje te sugerują, iż pierwsze pojawiające się w toku reprogramowania kolonie, nie są koloniami w pełni reprogramowanych komórek iPS, a jedynie częściowo reprogramowanymi, przejściowo namnażającymi się komórkami. W przypadku

reprogramowania za pomocą samodzielnie wyprodukowanych wektorów wirusowych pojawiły się jedynie pojedyncze kolonie nie w pełni reprogramowanych komórek. Prawdopodobną przyczyną nieskuteczności tego podejścia jest użycie zbyt niskiego MOI. Wektory wirusowe przenoszące zestaw genów czynników transkrypcyjnych prawdopodobnie posiadały niższe miano niż wektory przenoszące gen białka GFP. Transgen w plazmidzie użytym do produkcji wektorów reprogramujących jest wielokrotnie większy niż transgen *gfp*. Powoduje to znacznie niższą wydajność produkcji wektorów wirusowych, która silnie zależy od rozmiaru insertu w użytym plazmidzie [115]. Ponieważ mianowano tylko wektory wirusowe przenoszące gen *gfp* na podstawie ekspresji GFP w transdukowanych komórkach, przeszacowano miano wektorów przenoszących geny reprogramujące. Nie pozwoliło to uzyskać odpowiedniej liczby transdukowanych keratynocytów, a tym samym w pełni reprogramowanych komórek tworzących charakterystyczne kolonie. Niemniej jednak, pojawienie się częściowo reprogramowanych komórek sugeruje teoretyczną zdolność wyprodukowanych wektorów wirusowych do reprogramowania ludzkich keratynocytów. Metoda reprogramowania ludzkich keratynocytów wykorzystująca samodzielnie wyprodukowane wektory letni- oraz onko-retrowirusowe do skutecznego dostarczania komórek iPS wymaga jedynie optymalizacji etapu infekcji komórek.

Reprogramowanie ludzkich keratynocytów za pomocą wektorów wirusowych opartych o wirusa Sendai okazało się w pełni skuteczne. Przy użyciu zakupionego zestawu wektorów wirusowych uzyskano 10 linii komórek kiPS. Infekcji wirusowej towarzyszyła umiarkowana toksyczność, która była spodziewana oraz, wg instrukcji producenta, oznaczała wysoką wydajność infekcji. Na pierwszych etapach reprogramowania doszło do charakterystycznej zmiany morfologii keratynocytów. Komórki zaczęły znacznie ściślej do siebie przylegać i zyskiwać fenotyp epitelialny. Zjawisko to zostało już wcześniej opisane [116]. Pokazano, że w trakcie reprogramowania komórek somatycznych do komórek iPS zachodzi przejście mezenchymalno-epitelialne (ang. *mesenchymal-to-epithelial transition*, MET), w którym dochodzi do aktywacji *programu epitelialnego* w komórce. Charakterystyczna zmiana morfologii jest znacznie bardziej widoczna w przypadku reprogramowania fibroblastów – komórek o fenotypie mezenchymalnym. Na poziomie transkrypcyjnym czynniki Sox2 i Oct3/4 hamują mediator odwrotnego przejścia - epitelialno-mezenchymalnego (ang. *epithelial-to-mesenchymal transition*, EMT) - Snail. Z kolei c-

Myc obniża ekspresję receptorów TGF- $\beta$ 1 i TGF- $\beta$ 2, a Klf4 indukuje ekspresję genów epitelialnych, takich jak gen E-kadheryny. Pokazano także, że zablokowanie przejścia MET hamuje reprogramowanie fibroblastów, a zablokowanie procesu przeciwnego – EMT – umożliwia reprogramowanie bez udziału Klf4 i c-Myc [116]. Poczynione obserwacje są więc zgodne z procesami opisanymi w literaturze.

W trakcie reprogramowania pojawiły się także nie w pełni reprogramowane komórki, które dość szybko degenerowały. Komórki takie pojawiły się także w przypadku nieudanego reprogramowania z użyciem samodzielnie wyprodukowanych wektorów wirusowych. Wysoce prawdopodobne jest, iż były to tzw. komórki pre-iPS [117], które mimo morfologii podobnej do komórek iPS nie posiadają niektórych ich cech – m.in. stabilnej, endogennej ekspresji genów czynników Oct3/4 i Nanog, epigenetycznej reaktywacji chromosomu X ani zdolności do tworzenia chimer. Nie są więc w pełni komórkami pluripotencjalnymi. Do osiągnięcia pełni pluripotencji (z ang. tzw. *ground-state pluripotency*) charakterystycznej dla komórek embrionalnych potrzebne jest pełne reprogramowanie i przejście komórek ze stanu pre-iPS do iPS. Niektóre związki - takie jak witamina C [118], drobnocząsteczkowe inhibitory kinazy aktywowanej mitogenami [117] czy użyty w tej pracy maślan sodu będący inhibitorem deacetylaz histonów [42] – zwiększają wydajność reprogramowania sprzyjając przejściu komórek pre-iPS do stanu iPS. Dlatego brak maślanu, oprócz zbyt niskiego MOI przy infekcji, mógł być drugim powodem nieskuteczności reprogramowania z użyciem samodzielnie wyprodukowanych wektorów wirusowych. Pojawienie się nie w pełni reprogramowanych komórek jest spójne z doniesieniami literaturowymi [116], [117], [118].

Do uzyskania linii komórek kiPS użyto wektorów stworzonych na bazie wirusa Sendai. Wirus ten nie integruje swojego genomu do komórki gospodarza [119], co jest jego znaczną przewagą na innymi, wirusowymi metodami reprogramowania. Ponadto, jego użycie pozwala na uzyskanie komórek iPS całkowicie wolnych od wirusów gdyż, mimo iż wirus Sendai replikuje się w zainfekowanych komórkach, można go z nich skutecznie wyeliminować poprzez seryjne pasażę komórek i/lub inaktywację cieplną - hodując reprogramowane komórki przez 5 dni w temperaturze 38 lub 39°C [instrukcja firmy Lifetechnologies]. Ponadto, wirus Sendai jest niepatogenny, co także jest nie bez znaczenia w kontekście potencjalnego użycia uzyskanych komórek w terapii regeneracyjnej. Wśród wszystkich metod reprogramowania komórek, które nie

pozostawiają w komórce śladu integracji użycie wirusa Sendai wydaje się być najbardziej ekonomiczne oraz najprostsze technicznie [61]. Kolejną zaletą użytego podejścia jest wysoka wydajność reprogramowania z użyciem wirusa Sendai. Dane literaturowe donoszą o wydajności sięgającej 1% w przypadku reprogramowania fibroblastów [48]. Co ciekawe, taką samą wydajność uzyskano dla reprogramowania keratynocytów za pomocą wektorów onko-retrowirusowych [114]. Są to wartości 100-krotnie wyższe od początkowo opisywanych wydajności reprogramowania. W niniejszej pracy uzyskano komórki iPS reprogramując keratynocyty za pomocą wirusa Sendai, w obecności maślanu sodu z wydajnością wynoszącą ok. 0,01%. Jest to wartość ok. 100-krotnie niższa od oczekiwanej na podstawie doniesień literaturowych. Niemniej jednak brak konkretnych protokołów dotyczących infekcji keratynocytów wirusem Sendai mógł spowodować użycie nieoptymalnego schematu reprogramowania oraz zawyżenie oczekiwanej wydajności. Ponadto, użyte zostały keratynocyty po 2. pasażu od izolacji. Mogło to spowodować ich częściowe zróżnicowanie i tym samym utrudnić ich reprogramowanie. Wreszcie, w niniejszej pracy jako warstwy odżywczej użyto komórek MEF wyizolowanych z myszy szczepu CD1. Komórki te mogą nie być w stanie zapewnić optymalnych warunków reprogramowania. W większości prac dotyczących reprogramowania komórek autorzy używają komórek MEF wyizolowanych z myszy szczepu CF1, które lepiej stymulują reprogramowanie (informacje od dr Danuty Jarochoy, komunikacja ustna) ze względu na wyższą produkcję aktywiny A, która podtrzymuje niezróżnicowany stan komórek macierzystych poprzez wzrost ekspresji genów *OCT3/4*, *SOX 2* i *NANOG* [120], [121]. Wszystkie wymienione czynniki mogły mieć wpływ na wydajność reprogramowania niższą od oczekiwanej na podstawie analizy literatury.

Mimo wszystko, uzyskano linie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych uzyskanych przez reprogramowanie z użyciem wirusa Sendai ludzkich keratynocytów wyizolowanych z wyrwanego włosa z wystarczającą wydajnością. Uzyskane komórki posiadały bardzo charakterystyczną morfologię, którą porównano z wieloma pozycjami literaturowymi opisującymi uzyskiwanie komórek iPS. Posiadały również ekspresję alkalicznej fosfatazy oraz antygenów powierzchniowych charakterystycznych dla komórek pluripotencjalnych (SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81) na poziomie białka. Wszystkie analizowane linie posiadały zbliżoną, wysoką ekspresję wymienionych antygenów, a w obrębie linii praktycznie wszystkie



komórki okazały się być pozytywne pod względem badanych antygenów. Uzyskane dane są zgodne ze wszystkimi analizowanymi doniesieniami literaturowymi na temat charakterystyki komórek iPS.

### **5.3 Charakterystyka komórek piPS**

Głównym celem niniejszej pracy było określenie przydatności neuronów dopaminergicznych otrzymanych przez różnicowanie *in vitro* indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych. Jak pokazano w poprzednim podrozdziale uzyskiwanie komórek iPS z komórek somatycznych to proces niezwykle złożony, długotrwały oraz wrażliwy na warunki wielu etapów przejściowych. W toku wykonywania niniejszej pracy udało się zoptymalizować większość z nich – od wydajnego uzyskiwania komórek somatycznych w sposób minimalnie inwazyjny od zdrowych dawców i pacjentów, przez produkcję wektorów wirusowych i infekcję komórek docelowych do hodowli i wyprowadzania linii komórek iPS. Jednak ze względu na ograniczenia czasowe projektu koniecznym było jednoczesne opracowanie wielu metod związanych z hodowlą, charakterystyką oraz różnicowaniem indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych. W tym celu zakupiono linię komórek piPS uzyskaną za pomocą wprowadzania białek czynników transkrypcyjnych bezpośrednio do reprogramowanej komórki [System Biosciences], [58]. Komórki piPS posłużyły nie tylko do optymalizacji wielu metod oraz jako pozytywna kontrola w doświadczeniach charakteryzujących otrzymane komórki kiPS oraz PD-iPS, ale także to komórki piPS różnicowano za pomocą opisanych protokołów do neuronów dopaminergicznych.

Choć linia komórek piPS została już jednoznacznie scharakteryzowana przez producenta (firmę System Biosciences) oraz jej twórców [58] to przeprowadzono na niej szereg doświadczeń, nie tyle w celu potwierdzenia jej potencjału, ile w celu optymalizacji metod do tego służących. Do tych zadań wybrano właśnie linię piPS ponieważ wolna jest ona od integracji wirusowej, co gwarantuje jej stabilność genetyczną. Ponadto zastosowana białkowa metoda reprogramowania sprawia, że uzyskane nią komórki iPS są najbezpieczniejsze pod kątem potencjalnego zastosowania klinicznego.

Oprócz charakterystycznej morfologii (zgodnej z wyglądem komórek w pracy źródłowej) komórki piPS charakteryzowały się ekspresją markerów charakterystycznych dla komórek pluripotencjalnych – genów *OCT3/4*, *KLF4*, *C-MYC*, *NANOG* oraz genu telomerazy - na poziomie RNA oraz obecnością antygenów powierzchniowych SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 na poziomie białka. W przypadku niektórych z tych antygenów, odsetki komórek pozytywnych są dość dalekie od 100%. Fakt ten najprawdopodobniej spowodowany jest obecnością w populacji komórek analizowanych komórek warstwy odżywczej (pomimo prób ich wykluczenia przy bramkowaniu komórek w trakcie analizy cytometrycznej). Ponadto poszczególne linie komórek iPS mogą się między sobą różnić poziomem ekspresji niektórych genów [73]. Komórki piPS posiadały także ekspresję funkcjonalnej alkalicznej fosfatazy. Wszystkie te cechy potwierdzają tożsamość komórek piPS jako pluripotencjalnych. Wykonane na komórkach piPS doświadczenia pozwoliły zoptymalizować warunki hodowli, pasażu, mrożenia i rozmrażania komórek iPS, ale także metody określania ekspresji alkalicznej fosfatazy, RT-PCR, barwienia immunofluorescencyjnego oraz analizy cytometrycznej.

Na komórkach piPS podjęto także pierwsze próby różnicowania. Jako pierwszy typ komórek docelowych do różnicowania wybrano kardiomiocyty. Wybór ten podyktowany był prostotą ich identyfikacji polegającej na obserwacji spontanicznych skurczów *in vitro*. W wyniku różnicowania komórek piPS uzyskano funkcjonalne kardiomiocyty, choć z niską wydajnością. Tę ostatnią tłumaczy się faktem użycia w medium różnicującym surowicy, która nie była testowana pod kątem różnicowania w kierunku komórek serca, a która jest zalecana w źródłowych protokołach różnicowania [106].

W celu opracowania najsilniejszej metody potwierdzającej pluripotencjalność ludzkich komórek – testu tworzenia teratom [71] - która jest niezbędna w celu jednoznacznego potwierdzenia pełnego reprogramowania komórki somatycznej - komórki piPS wszczepiono podskórnym myszom z upośledzoną odpornością. Wyizolowane po ok. 3 miesiącach teratomy posiadały bardzo charakterystyczną budowę zawierającą komórki różnych typów. Był to potworniak, który służył jako modelowy obraz przy kolejnych analizach pluripotencjalności komórek.

Zakupione komórki piPS posłużyły do optymalizacji wielu niezbędnych w dalszych etapach pracy metod (związanych z hodowlą oraz charakterystyką komórek

iPS). Zostały także użyte do opracowania protokołów różnicowania indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych do neuronów dopaminergicznych.

#### **5.4 Różnicowanie komórek piPS do neuronów dopaminergicznych**

Kolejnym krokiem w opracowywaniu potencjalnej komórkowej terapii chorób neurodegeneracyjnych, po uzyskaniu specyficznych dla danego pacjenta komórek iPS, jest ich różnicowanie do efektorowych komórek somatycznych, które zostaną użyte w celu regeneracji. W przypadku choroby Parkinsona komórkami takimi są neurony dopaminergiczne ulegające degeneracji w toku rozwoju choroby. W literaturze dotyczącej różnicowania komórek pluripotencjalnych do neuronów produkujących dopaminę wyróżnia się dwa główne trendy dotyczące indukcji różnicowania komórek iPS: poprzez hodowlę komórek iPS na warstwie odżywczej z komórek podścieliska (np. linii PA6 lub MS5) [122] oraz poprzez etap ciałek embrioidalnych EB hodowanych w zawieszynie [98].

Warto nadmienić, że większość z dostępnych w literaturze protokołów różnicowania jest wspólna dla komórek ESC oraz iPS, jako że dzielą one wiele cech. Opisane typy protokołów po raz pierwszy zostały użyte do różnicowania mysich embrionalnych komórek macierzystych, a na przestrzeni lat były rozwijane i modyfikowane przez wielu badaczy. Wydajność różnicowania jest zależna od użytego protokołu i zwykle niewielka.

Wśród metod zwiększających wydajność różnicowania komórek do neuronów dopaminergicznych wymienia się modyfikacje genetyczne komórek pluripotencjalnych (np. wprowadzające ekspresję genu *NURR1* [123]) bądź inhibicję niektórych szlaków sygnałowych. Modyfikacja genetyczna komórek przeznaczonych do różnicowania wydaje się być mało atrakcyjną propozycją ponieważ: 1) tylko nieznacznie podnosi wydajność różnicowania, 2) jest skrajnie нефизjologiczna, 3) ingeruje w genom komórki wprowadzając przeszkodę w ich zastosowaniu klinicznym, którą próbuje się obejść stosując nowoczesne, bezpieczne techniki reprogramowania komórek somatycznych. Znacznie lepszą opcją zwiększającą czystość uzyskanych komórek jest wysortowanie zróżnicowanych komórek pod kątem ekspresji markera docelowych komórek somatycznych [95] (np. sort komórek TH-pozytywnych w przypadku neuronów dopaminergicznych) lub przejściowa inhibicja szlaków sygnałowych.

Przykładem tego drugiego podejścia może być zahamowanie szlaku sygnałowego BMP (ang. *Bone Morphogenetic Protein*) z użyciem inhibitora Noggin oraz szlaku sygnałowego TGF $\beta$  z użyciem inhibitora SB43154 [107] użyte w protokole III.

Ze względu na prostotę oraz brak dostępu do linii komórek podścieliska w pracy tej skupiono się na protokołach polegających na indukcji różnicowania komórek iPS poprzez etap ciałek embrioidalnych rosnących w zawiesinie (protokoły I i II) lub poprzez podwójną inhibicję szlaku SMAD (protokół III), zgodnie z protokołem opisanym w literaturze [107].

### 5.4.1 Protokół I

Najprostszy technicznie oraz najmniej kosztowny okazał się protokół różnicowania I. Opracowano go na podstawie danych literaturowych [98], gdzie został użyty do różnicowania embrionalnych komórek macierzystych do neuronów brzuszego śródmózgowia – neuronów dopaminergicznych oraz serotonergicznych. Kolejne kroki różnicowania komórek odtworzono uzyskując komórki o morfologii charakterystycznej dla danego etapu. Niestety, autorzy cytowanej pracy nie zamieścili mikrofotografii komórek uzyskanych na poszczególnych etapach różnicowania, dlatego morfologię uzyskanych komórek porównano z fotografiami obecnymi w innej pracy, w której użyto modyfikacji opisanego protokołu [97]. Wygląd uzyskanych komórek na poszczególnych etapach różnicowania był bardzo zbliżony do danych obecnych w tej pracy. Najbardziej charakterystyczna oraz podobna okazała się morfologia wyselekcjonowanych w bezsurowiczym medium progenitorów neuronalnych przed oraz po ekspansji. Dużym zaskoczeniem okazała się produkcja melaniny przez różnicowane w wysokiej gęstości komórki, dyskutowana w dalszej części tego rozdziału.

Uzyskane na poszczególnych etapach różnicowania komórki różnią się ekspresją konkretnych markerów na poziomie RNA. W toku różnicowania pojawia się lub wzrasta ekspresja genów markerów neuronalnych – białka Nurr1 oraz hydroksylazy tyrozyny (TH). Wyróżnicowane komórki posiadają także ekspresję innych markerów neuronalnych – tubuliny  $\beta$  III charakterystycznej dla neuronów (TUB-1), transportera dopaminy DAT oraz białka filamentów pośrednich charakterystycznych dla neuronów i neuronalnych komórek macierzystych – nestyny [124]. Ekspresję tych markerów na

wcześniejszych etapach różnicowania, w tym w komórkach piPS, tłumaczy się otwartością transkrypcyjną niezróżnicowanych komórek, w których dochodzić może do ekspresji wielu genów na poziomie RNA. Obserwacja taka jest obecna również w literaturze – autorzy pokazują ekspresję nestyny w komórkach ESC [98], hydroksylazy tyrozynowej oraz Nurr1 w prekursorach neuronalnych [125] lub wcale nie analizują ekspresji genów charakterystycznych dla neuronów na poziomie RNA na początkowych etapach różnicowania [126].

Ekspresja genów charakterystycznych dla komórek pluripotencjalnych – *OCT3/4*, *NANOG*, telomerazy, wyraźnie spada w trakcie różnicowania. Jedynie ekspresja genu *C-MYC* jest obecna w czasie całego procesu różnicowania. Nie jest to jednak zaskoczenie, gdyż jest on odpowiedzialny za proliferację komórek, a wielu autorów donosi o trudnościach w jego wyciszeniu w trakcie różnicowania. Co ciekawe, na etapie ekspansji wyselekcjonowanych progenitorów neuronalnych dochodzi do re-ekspresji genów *OCT3/4*, *NANOG* oraz genu telomerazy. Fakt ten tłumaczy się stymulacją komórek na tym etapie różnicowania za pomocą silnych mitogenów – FGF8 oraz bFGF, wpływających m.in. na ekspresję genów odpowiedzialnych za pluripotencjalność komórek, w tym *OCT3/4* [127].

Również na poziomie białka wyróżnicowane komórki posiadają ekspresję charakterystycznych markerów neuronalnych - tubuliny  $\beta$  III charakterystycznej dla neuronów oraz hydroksylazy tyrozyny . Ekspresja TUJ-1, TH oraz transportera dopaminy DAT na poziomie RNA to najważniejsze obserwacje związane z analizą ekspresji genów zróżnicowanych komórek, gdyż dowodzą one skuteczności różnicowania, a tym samym obecności neuronów dopaminergicznych wśród uzyskanych komórek.

Wyróżnicowane komórki produkują także dopaminę, co zostało jednoznacznie potwierdzone trzema niezależnymi metodami – barwieniem immunocytochemicznym, analizą chromatograficzną (na 2 niezależnych chromatografach) oraz spektroskopią masową. Jest to niezwykle ważna obserwacja, gdyż produkcja dopaminy przez uzyskane komórki jednoznacznie dowodzi ich dopaminergicznej tożsamości, zwłaszcza, że dopamina obecna była w kondycjonowanym medium na poziomie podobnym do opisanego w pracy źródłowej [98] – w stężeniu rzędu  $10^2$  pg/ml. Pojawiała się w podobnym do opisanego czasie – ok. 6 dnia terminalnego różnicowania. Ponadto, w medium znad komórek w kolejnych dniach różnicowania zidentyfikowano również

DOPAC (wyników nie zamieszczono) – metabolit dopaminy powstały jako produkt reakcji MAO obecnej w neuronach dopaminergicznych i/lub astrocytach. W kondycjonowanym medium nie zidentyfikowano noradrenaliny, ani serotoniny, co świadczy o braku neuronów noradrenergicznych oraz serotonergicznych wśród wyróżniczanych komórek.

W uzyskanej heterogennej populacji zróżnicowanych komórek obecne są także GFAP-pozytywne astrocyty, co sprawia, że obecność w kondycjonowanym medium metabolitu dopaminy DOPAC jest uzasadniona. Powstawanie astrocytów w trakcie różnicowania komórek pluripotencjalnych do neuronów dopaminergicznych zostało opisane [126]. Zagadnienie heterogenności uzyskanej populacji komórek podjęto w dalszej części dyskusji.

W źródłowej pracy [98] autorzy otrzymali ok. 70% komórek TUJ-1-pozytywnych (komórek neuronalnych), z których ok. 7% było TH-pozytywnych (neurony dopaminergiczne). Daje to czystość różnicowania na poziomie ok. 5% wszystkich komórek. W niniejszej pracy używając protokołu I uzyskano komórki dopaminergiczne z niższą wydajnością, szacowaną na ok. 1%. Powodem niższej niż opisana w literaturze wydajności jest nieznacznie odmienny skład mediów różnicujących. Autorzy cytowanej pracy pokazali, że stymulacja różnicujących komórek na etapie ekspansji progenitorów neuronalnych za pomocą czynnika *Sonic hedgehog* (SHH) oraz czynnika wzrostowego FGF8 zwiększa wydajność różnicowania komórek do neuronów dopaminergicznych ponad dwukrotnie. Użycie tylko jednego z tych czynników powodował znaczący spadek wydajności różnicowania, sugerując ich synergistyczny efekt. Sygnały te stymulują fizjologiczne różnicowanie komórek do neuronów dopaminergicznych w toku rozwoju organizmu [128], [129]. Ze względu na wysoki koszt *Sonic hedgehog* został pominięty w protokole I. Druga różnica w stosunku do protokołu źródłowego to użycie komórek iPS zamiast ESC, które choć niezwykle podobne, mogą różnić się w podatności na różnicowanie [130]. Pozostałe czynniki wywołujące terminalne różnicowanie komórek do neuronów dopaminergicznych, a więc wycofanie czynników wzrostowych bFGF i FGF8, obecność dibutyrylo-cAMP [131], kwasu askorbinowego [132] oraz opłaszczenie szalki lamiminią i poliornityną [133] zostały uwzględnione w terminalnym różnicowaniu. Opisane zamiany w

zastosowanym protokole mogły mieć wpływ na obniżenie wydajności różnicowania komórek do neuronów dopaminergicznych w stosunku do danych literaturowych.

Podsumowując, stosując protokół I uzyskano neurony dopaminergiczne z wydajnością niższą od opisaną w literaturze. Produkowały one dopaminę w stężeniu podobnym do opisanego, oznaczalnym zarówno immunocytochemicznie jak i za pomocą HPLC. Jednak wydajność różnicowania przy zastosowaniu opisanego protokołu wydaje się być dość niska, zwłaszcza gdy zachodzi konieczność uzyskania dużych ilości komórek zróżnicowanych w celu ich wysortowania i transplantacji. W literaturze istnieje wiele protokołów opisujących uzyskiwanie komórek dopaminergicznych ze znacznie wyższą wydajnością – sięgającą nawet kilkudziesięciu procent [91]. Część z nich zakłada indukcję różnicowania na komórkach podścieliska [125], modyfikację genetyczną komórek wyjściowych [134], użycie zmodyfikowanych genetycznie w celu nad-ekspresji czynników stymulujących różnicowanie (np. SHH) komórek podścieliska [135] lub uwzględnienie w medium pewnych drobnocząsteczkowych związków zwiększających wydajność różnicowania [95], [136]. W kolejnym kroku podjęto próbę zwiększenia wydajności różnicowania, właśnie poprzez modyfikację składu mediów różnicujących.

### 5.4.2 Protokół II

Protokół II powstał jako wzbogacona wersja protokołu I. Kolejne etapy różnicowania oraz związane z nimi procedury są wspólne. Komórki uzyskane na wszystkich (z wyjątkiem terminalnego) etapach różnicowania z użyciem protokołu II przypominały morfologią odpowiednie komórki uzyskane za pomocą protokołu I. W protokole II zastosowano media różnicujące wzbogacone o substancje, o których wiadomo, iż stymulują różnicowanie do neuronów dopaminergicznych. Ich użycie sugerowały liczne doniesienia literaturowe, w których autorzy używali rozmaitych protokołów różnicowania uwzględniających niżej wymienione substancje.

Na etapie selekcji oraz ekspansji progenitorów neuronalnych komórki poddano inhibicji szlaku sygnałowego TGF $\beta$  z użyciem inhibitora SB43154, który powoduje obniżenie ekspresji *OCT3/4*, oraz stymuluje ekspresję nestyny oraz innych markerów neuroektodermy, tym samym inicjując różnicowanie komórek macierzystych [137]. W

kolejnych etapach – ekspansji progenitorów oraz terminalnego różnicowania zastosowano purmorfaminę - agonistę szlaku SHH, który jest używany jako znacznie tańszy substytut *Sonic hedgehog*. Szlak SHH odpowiada za prawidłowy rozwój przestrzenny układu nerwowego [138]. Na etapie ekspansji progenitorów zastosowano zarówno FGF8 jak i agonistę szlaku SHH, co zwiększa wydajność formowania neuronów dopaminergicznych.

Na etapie terminalnego różnicowania medium użyte w protokole I wzbogacono o substancje neurotroficzne, które zwiększają wydajność różnicowania w neurony dopaminergiczne: BDNF, GDNF i TGF $\beta$ 3 [125], a także o inhibitor Noggin hamujący szlak sygnałowy BMP, którego pobudzenie prowadzi do powstawania komórek trofoektodermy [107].

W wyniku terminalnego różnicowania otrzymano homogeną populację komórek o morfologii dość nietypowej dla neuronów – o dość krótkich wypustkach, które ponadto szybko obumierały w hodowli. Posiadały one jednak ekspresję markerów neuronów dopaminergicznych – Tuj-1 oraz TH - na poziomie białka, produkowały również dopaminę. Ze względu na niewielką ilość uzyskanych komórek, nie zanalizowano ich ekspresji genów na poziomie RNA (niewystarczająca ilość materiału do izolacji RNA).

Wydaje się, że protokół II prowadzi do uzyskania czystszej, oraz bardziej homogennej populacji komórek dopaminergicznych niż protokół I. Ciężko ocenić wydajność różnicowania za pomocą protokołu II, gdyż dostarcza on komórek szybko obumierających w czasie hodowli *in vitro*. Prawdopodobną przyczyną takiego stanu rzeczy była mało wydajna indukcja różnicowania w kierunku neuronalnym, gdyż zastosowano podejście z użyciem etapu ciałek embrioidalnych, a nie na warstwie odżywczej z komórek podścieliska, jak w pracy źródłowej, z której zaczerpnięto skład medium do terminalnego różnicowania [125]. Ponadto, ze względu na ograniczenia finansowe projektu, nie zastosowano podwójnej inhibicji szlaku sygnałowego SMAD (sygnałowania od receptora TGF $\beta$  za pomocą inhibitora SB43154 oraz od szlaku sygnałowego BMP z użyciem inhibitora Noggin), a jedynie pojedynczą, co mogło wpływać na wydajność inicjacji różnicowania. W efekcie powstała niewielka ilość komórek, która przeżyła etap terminalnego różnicowania.



Podsumowując, protokół II dostarcza homogennych zróżnicowanych komórek z wysoką czystością, jednak w małych ilościach i o niskiej żywotności. Jest ponadto kosztowny. Powoduje to, że uzyskane komórki raczej nie nadają się do eksperymentów związanych z transplantacjami komórek do zwierzęcych modeli chorób. Dlatego w dalszych doświadczeniach nie badano komórek uzyskanych za pomocą protokołu II, skupiając się na protokołach I i III.

### 5.4.3 Protokół III

Protokół III bazuje na strategii podwójnej inhibicji szlaku sygnałowego SMAD. Szlak BMP zablokowano inhibitorem Noggin, szlak sygnałowania od receptora TGF $\beta$  za pomocą inhibitora SB43154. Obie te ścieżki prowadzą do aktywacji ścieżki SMAD, która bierze udział w podtrzymaniu nie zróżnicowanego stanu komórek macierzystych. Sygnał od receptora TGF $\beta$  podtrzymuje ekspresję genów *NANOG*, *OCT3/4* i *SOX2* [139]. Z kolei sygnał od BMP powoduje różnicowanie komórek w kierunku trofoblastu, endo- oraz mezodermy [140]. Stąd generalnie, inhibicja szlaku SMAD zwiększa wydajność indukcji neuronalnej [137], [141]. Użycie obu inhibitorów SMAD jest konieczne do indukcji neuronalnej *in vitro* w warunkach adherentnych.

Użyty protokół został zaczerpnięty z literatury [107]. Jego zaletą jest praca w warunkach w pełni zdefiniowanych – bez warstwy odżywczej czy heterogennej populacji komórek obecnych w ciałkach embrioidalnych, a także krótki czas potrzebny do wyróżnicowania komórek.

Po etapie indukcji neuronalnej w warunkach adherentnych otrzymane komórki ektodermy przesiano na szalki opłaszczone matryzelem w celu ich terminalnego różnicowania do neuronów dopaminergicznych w mediach zawierających FGF8, purmorfaminę oraz znane czynniki indukujące powstawanie neuronów dopaminergicznych – BDNF, GDNF, TGF $\beta$ 3, dibutyrylo-cAMP i kwas askorbinowy.

Uzyskane wyniki są zgodne z opisanymi w literaturze źródłowej [107]. Etap indukcji neuronalnej doprowadził do charakterystycznego obrazu pogrubionej ektodermy. Komórki uzyskane na tym etapie charakteryzowały się ekspresją markerów neuronalnych na poziomie RNA – nestyny oraz białka Nurr1, ale także markerów

neuronów dopaminergicznych – TH oraz DAT. Obserwacja ta dowodzi wydajnej indukcji neuronalnej. Ekspresja TH oraz DAT na poziomie RNA sugeruje, że w otrzymanej warstwie ektodermy rozpoczyna się różnicowanie komórek w kierunku neuronów dopaminergicznych. Obserwacja ta jest zgodna z danymi literaturowymi, gdzie autorzy pokazywali ekspresję markerów neuronów dopaminergicznych na poziomie białka przed rozpoczęciem terminalnego różnicowania.

W wyniku terminalnego różnicowania uzyskano heterogenną populację komórek, w której obecne były komórki o charakterystycznej morfologii neuronalnej (komórki o niezwykle długich wypustkach), ale także komórki wypełnione czarnym pigmentem. Na poziomie RNA uzyskane komórki posiadały ekspresję wszystkich wyżej wymienionych markerów, ale co ważniejsze uzyskano bardzo wysoki odsetek komórek wykazujących ekspresję Tuj-1 na poziomie białka, co sugeruje skuteczne różnicowanie neuronalne. Pomimo tego, jedynie niewielki odsetek komórek Tuj-1-pozytywnych okazał się komórkami TH-pozytywnymi. Jest to obserwacja zgodna z doniesieniami literaturowymi, gdzie również niewielka część wszystkich uzyskanych neuronów okazała się być neuronami dopaminergicznymi (autorzy nie prezentują wydajności różnicowania). Co jednak istotne, uzyskane komórki produkowały dopaminę w stężeniu wykrywalnym za pomocą barwienia immunocytochemicznego. Jest to bardzo ważna obserwacja potwierdzająca uzyskanie neuronów dopaminergicznych przy użyciu protokołu III. Dopamina, podobnie, jak w przypadku zastosowania pozostałych protokołów różnicowania, obecna była we wszystkich powstałych komórkach, co sugeruje, że produkujące dopaminę (TH-pozytywne) komórki wydzielają ją do medium, skąd następnie jest importowana do komórek innego typu.

Uzyskane przy zastosowaniu protokołu III wyniki są zgodne z danymi dostępnymi w literaturze źródłowej. Jediną modyfikacją było zastąpienie SHH jego tańszym substytem – purmorfaminą. Substytucja ta nie powinna mieć wpływu na uzyskane wyniki, gdyż stężenie substytutu dobrano zgodnie z literaturą sugerującą taką substytucję [138].

Ciekawą obserwacją było uzyskanie komórek produkujących czarny pigment w wyniku terminalnego różnicowania. Wyniki te przedyskutowano w kolejnym podrozdziale.

Podsumowując, protokół III jest wydajną, prostą i szybką metodą otrzymywania neuronów dopaminergicznych poprzez różnicowanie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych *in vitro*. Dostarcza on neuronów dopaminergicznych w dużych ilościach (w stosunku do ilości użytych do różnicowania komórek iPS), co sprawia, że może on być przydatny w uzyskiwaniu komórek dopaminergicznych do eksperymentów związanych z ksenotransplantacjami w celu wywołania efektu terapeutycznego w zwierzęcym modelu choroby Parkinsona. Mimo swoich zalet jest on jednak stosunkowo kosztowny oraz dość skomplikowany technicznie. Dlatego w tej pracy, w eksperymentach transplantacyjnych użyto komórek uzyskanych protokołem I, który dostarcza komórek dopaminergicznych, z nieco niższą wydajnością, jednak znacznie niższym kosztem.

#### **5.4.4 Alternatywa dla różnicowania komórek iPS *in vitro***

Ciekawą alternatywą dla uzyskiwania neuronów dopaminergicznych przez różnicowanie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych *in vitro* jest bezpośrednia konwersja komórek somatycznych do pożądanых komórek efektorowych *in vivo*. Procedura ta oparta jest na metodzie konwersji jednego typu komórki somatycznej w inny pod wpływem wprowadzenia egzogennych czynników. Po raz pierwszy tego typu doświadczenia opisano już w 1987 roku, kiedy to przeprowadzono konwersję fibroblastów do komórek mięśniowych *in vitro* wprowadzając jedynie jeden transgen – gen czynnika transkrypcyjnego MyoD [142]. Strategię taką można z powodzeniem zastosować również *in vivo* bezpośrednio reprogramując np. miofibroblasty serca do funkcjonalnych kardiomiocytów [143], które są w stanie wyleczyć bliznę pozawałową. Z kolei bezpośrednia konwersja astocytów do neuronów dopaminergicznych dostarcza tych ostatnich bezpośrednio w uszkodzonym mózgu [144]. Wielką zaletą takiego podejścia jest uzyskiwanie reprogramowanych komórek *in situ* – bezpośrednio w miejscu, gdzie dokonać mają one regeneracji. Taka konwersja może okazać się bardzo wydajna oraz może dostarczać komórek niezwykle zbliżonych fizjologicznie do komórek prawidłowych, ponieważ powstają one w niszy docelowych komórek somatycznych, która może zapewniać czynniki faworyzujące powstawanie

fizjologicznych komórek. Ponadto, *bezpośrednia konwersja* nie wymaga etapu różnicowania komórek pluripotencjalnych. Eliminuje to ryzyko nowotworzenia w wyniku przeszczepienia komórek zanieczyszczonych niezróżnicowanymi komórkami pluripotencjalnymi. Z kolei dużym ograniczeniem opisanego podejścia jest zastosowanie wektorów wirusowych w celu modyfikacji genetycznej komórek i tym samym ich konwersji. Oprócz złożoności technicznej (np. w przypadku konwersji astrocytów do neuronów konieczne jest dostarczenie 11 genów *in vivo* [144]) i ograniczonej wydajności transdukcji *in vivo*, podejście takie obciążone jest ryzykiem mutagenyzy insercyjnej lub problemami z immunogennością (w przypadku użycia adenowirusów). Niemniej jednak *bezpośrednia konwersja* komórek *in vivo* stanowi interesującą alternatywę dla przeszczepiania komórek docelowych uzyskanych poprzez różnicowanie indukowanych pluripotencjalnych *in vitro*.

## **5.5 Analiza komórek produkujących czarny pigment**

W wyniku różnicowania komórek piPS do neuronów dopaminergicznych za pomocą protokołów I i III uzyskano heterogenne populacje komórek, w których oprócz neuronów dopaminergicznych obecne były m.in. komórki produkujące czarny pigment.

Szereg autorów protokołów neuronalnego różnicowania komórek iPS opisuje, uzyskanie niewielkiego odsetka pożądanych komórek docelowych, nie rozwodząc się nad zagadnieniem tożsamości pozostałych, powstałych w wyniku różnicowania komórek. W tej pracy, w wyniku zastosowania dwu niezależnych protokołów do otrzymywania neuronów dopaminergicznych, oprócz komórek docelowych niespodziewanie uzyskano także komórki produkujące czarny pigment – melaninę. Zjawisko to okazało się być powtarzalne oraz na tyle intrygujące, że zanalizowano je dokładniej i spróbowano odpowiedzieć na pytanie: czym są pozostałe komórki, niebędące neuronami dopaminergicznymi, a powstające w wyniku różnicowania komórek iPS za pomocą opisanych powyżej protokołów.

Czarny pigment obecny w wyróżnicowanych za pomocą protokołu I komórkach został jednoznacznie zidentyfikowany jako melanina za pomocą elektronowego rezonansu paramagnetycznego oraz barwienia Fontany-Masona. Komórek

produkcją melaniny przybywało w czasie terminalnego różnicowania oraz, co ważniejsze, uzyskiwano ich znacznie więcej gdy początkowa gęstość wysiania komórek była wysoka (200 tys. komórek/cm<sup>2</sup>). Transmisyjna mikroskopia elektronowa komórek produkujących melaninę dostarczyła informacji na temat jej sub-komórkowej lokalizacji. Melanina w uzyskanych komórkach zlokalizowana była w organellach o morfologii przypominających typowe melanosomy na kolejnych stadiach rozwoju (I-IV) [145] ale także w postaci granul melaniny. Niezwykle interesujący jest fakt, iż autorzy pracy źródłowej, z której zaczerpnięto protokół I [98] nie opisują pojawienia się upigmentowanych komórek. Być może wynika to z wprowadzonych zmian w stosunku do protokołu wyjściowego.

Z kolei autorzy pracy, z której zaczerpnięto protokół III [107] donoszą o powstaniu pewnego odsetka komórek upigmentowanych, zaznaczają jednak że są to komórki nie posiadające ekspresji genu *SOX10* będącego markerem komórek grzebienia nerwowego i sugerują, iż prawdopodobnie jest to upigmentowany nabłonek siatkówki (RPE), który jest częstym *zanieczyszczeniem* uzyskiwanym przy różnicowaniu komórek macierzystych do neuronów dopaminergicznych [146]. Upigmentowane komórki uzyskane w tej pracy, zarówno przy pomocy protokołu I jak i III, posiadają kompletnie odmienną morfologię niż komórki tworzące RPE. Z pewnością nie posiadają cech epitelium, ich morfologia jest raczej mezenchymalna. Dlatego hipotezę o uzyskaniu komórek upigmentowanego nabłonka siatkówki zdecydowanie odrzucono.

Najbardziej oczywistym skojarzeniem z komórkami produkującymi melaninę są melanocyty. Komórki pochodzące z grzebienia nerwowego ektodermy, które odpowiedzialne są za syntezę melaniny i przekazywanie jej do komórek innych typów. Posiadają one jednak odmienną morfologię od uzyskanych w tej pracy komórek – cechują się bardzo licznymi, cienkimi i długimi wypustkami, za pomocą których przekazują melaninę [147]. Ponadto, opisano protokoły uzyskiwania melanocytów z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych oraz embrionalnych komórek macierzystych [147]–[149]. Znacznie różnią się one od zastosowanych protokołów neuronalnego różnicowania. W pracach tych ciała embrioidalne po 3 tygodniach hodowli wysiewano na szalki opłaszczone fibronektyną. Również skład medium różnicującego był odmienny. Medium różnicujące prowadzące do

otrzymywania melanoctyów zawiera między innymi: Wnt3a, cytokinę SCF (ang. *Stem Cell Factor*), endotelinę 3, toksynę cholery, ester forbolu i deksametazon. Pokazuje to, iż do różnicowania komórek iPS do melanoctyów konieczna jest zupełnie inna stymulacja niż zastosowana w użytych protokołach do różnicowania neuronalnego. Ponieważ jednak melanocyty mają pochodzenie znacznie bliższe komórkom układu nerwowego niż mogłoby się to wydawać (wywodzą się z grzebienia nerwowego) sprawdzono ekspresję genów charakterystycznych dla melanoctyów, a zaangażowanych w melanogenezę. Niespodziewanie, komórki produkujące pigment, uzyskane zarówno protokołem I jak i III, posiadają ekspresję wszystkich analizowanych genów na poziomie RNA. Ciekawa jest obserwacja, iż komórki prekursorowe uzyskane na etapach pośrednich w różnicowaniu za pośrednictwem obu protokołów (komórki NPC w przypadku protokołu I oraz komórki ektodermy w przypadku protokołu III) posiadają niemal identyczny profil ekspresji analizowanych genów na poziomie RNA. To samo dotyczy się komórek terminalnie zróżnicowanych. Sugeruje to ich zbliżoną tożsamość. Jednak analizowane geny nie są uważane za jednoznaczne markery melanoctyów, a raczej komórek produkujących melaninę [145]. Wszystkie analizowane czynniki transkrypcyjne (MITF, SOX10, PAX3) regulują ekspresję genów, których produkty zaangażowane są w melanogenezę (są to np. enzymy biorące udział w syntezie melaniny – tyrozynaza oraz związane z nią białko TRP1). Receptor c-kit obecny jest na różnych typach komórek macierzystych [150]. Może więc być on obecny na powstałych komórkach prekursorowych. Dlatego uzyskane wyniki nie potwierdzają jednoznacznie obecności melanocytów wśród wyróżnicowanych komórek. Również immunocytochemiczne wybarwienie MITF-M (czynnika transkrypcyjnego MITF charakterystycznego dla melanocytów) nie jest jednoznaczne. Mimo niespodziewanego i silnego barwienia komórek nieprodukujących melaniny, komórki wyładowane tym pigmentem wybarwiły się najsłabiej lub wcale. Oczywiście nie sposób wykluczyć interferencji obecności melaniny z wiązaniem przeciwciał (dotyczy to wszystkich analizowanych antygenów), jednak uzyskane wyniki nie rozwiewają wątpliwości, co do obecności melanoctyów w uzyskanych ko-hodowlach. Wiele faktów sprawia, iż jest ona mało prawdopodobna. Po pierwsze, morfologia uzyskanych komórek jest zdecydowanie odmienna od typowej morfologii melanoctyów. Po drugie, uzyskiwanie melanoctyów *in vitro* wymaga zastosowania kompletnie odmiennych substancji stymulujących różnicowanie. Wreszcie melanocyty wywodzą się z grzebienia nerwowego, a oba użyte

protokoły różnicowania zostały zoptymalizowane pod kątem dostarczania w przewodzie komórek ośrodkowego układu nerwowego oraz minimalizacji ilości powstających komórek grzebienia nerwowego. Z drugiej jednak strony, analiza ekspresji genów w uzyskanych komórkach zdaje się sugerować obecność melanocytów (lub ich nieprodukujących jeszcze melaniny prekursorów.) Dlatego obecność wśród uzyskanych wyróżniczanych komórek melanocytów, choć mało prawdopodobna, nie może zostać jednoznacznie wykluczona.

Jednak znacznie bardziej spójna oraz logiczna jest koncepcja produkcji przez otrzymane komórki neuromelaniny. Neuromelanina - melanina obecna w ośrodkowym układzie nerwowym, jest najslabiej poznaną wśród wszystkich melanin. Występuje ona w substancji czarnej (która zawdzięcza jej swą nazwę) oraz polu sinawym ludzi oraz naczelnych. Jej zawartość rośnie od 3 roku życia z wiekiem organizmu. Co istotne, jest nieobecna u innych zwierząt, w tym u popularnych zwierząt laboratoryjnych – myszy i szczurów. W przeciwieństwie do eumelaniny jest odkładana w komórkach, w których powstaje [151]. Bardzo niewiele wiadomo na temat sposobu syntezy, katabolizmu, struktury oraz funkcji neuromelaniny [152]. Spowodowane jest to trudną dostępnością materiału do badań, jak to zwykle bywa w przypadku badań histologicznych układu nerwowego. Strukturalnie neuromelanina jest heteropolimerem. Jedną z koncepcji wyjaśniających jej pochodzenie jest akumulacja i polimeryzacja katecholamin [153]. Według teorii tej katecholaminy wyprodukowane w neuronach substancji czarnej (głównie dopamina, ale również serotonina) są wewnątrz komórek utleniane do pochodnych chinonowych i semi-chinonowych. Reakcja ta jest katalizowana przez jony żelaza(III). Utlenione pochodne dopaminy spontanicznie polimeryzują tworząc charakterystyczne ziarna neuromelaniny. Przez długi czas, ze względu na spontaniczne powstawanie neuromelaniny, uważano ją za zbędny produkt metabolizmu dopaminy niepełniący żadnej funkcji. Dziś ten pogląd się zmienia.

Spontaniczne odkładanie neuromelaniny może mieć miejsce w uzyskanych za pomocą protokołów I oraz III heterogennych populacjach komórek. Pokazano, że dopamina obecna jest w medium hodowlanym kondycjonowanym przez komórki, ale również we wszystkich komórkach w ko-hodowli. Ponieważ komórki te posiadają ekspresję transportera dopaminy DAT całkiem prawdopodobny jest jej import do wnętrza komórek. Tam wyprodukowana dopamina może ulegać spontanicznemu

utlenianiu oraz odkładaniu w postaci charakterystycznych ziaren neuromelaniny obecnych na mikrofotografiach wykonanych przy pomocy transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Ziarna te przypominają granule neuromelaniny obecne w ludzkiej istocie czarnej prezentowane w literaturze [151], [153]. Ponadto, również inne komórki obecne w ko-hodowli (np. komórki GFAP-pozytywne) mogą być zdolne do odkładania neuromelaniny. Neuromelanina była już opisywana w komórkach glejowych [154], [155]. Również pojawienie się neuromelaniny w warunkach gęstej hodowli komórek zdaje się potwierdzać tę teorię. Większa gęstość oznacza więcej komórek produkujących dopaminę, a tym samym większą jej zawartość w medium. Wysokie stężenie dopaminy może owocować wydajną produkcją neuromelaniny.

W syntezie neuromelaniny postuluje się również rolę tyrozynazy – głównego enzymu zaangażowanego w syntezę eumelaniny z tyrozyny [145], [156]. W świetle tej informacji ekspresja tyrozynazy (a także enzymów z nią związanych –np. TRP1) i czynników transkrypcyjnych kontrolujących jej ekspresję (SOX10, MITF, PAX3) w uzyskanych komórkach produkujących melaninę jest logiczna i spójna.

Niezwykle ciężko jest jednoznacznie ustalić tożsamość uzyskanych w ko-hodowlach komórek produkujących lub odkładających melaninę. Okazały się one być negatywne pod kątem ekspresji wszystkich badanych markerów na poziomie białka. Może to sugerować interferencję melaniny z wiązaniem przeciwciał. Co ciekawe, w literaturze brak doniesień na temat czarnego pigmentu obecnego w uzyskiwanych *in vitro* neuronach dopaminergicznych. Produkcję neuromelaniny w takich komórkach obserwuje się dopiero pod wpływem progeryny – fragmentu laminy A wywołującej przedwczesne starzenie [157]. Nie jest więc wykluczone, iż uzyskane komórki produkujące pigment stanowią przedwcześnie dojrzałe (*stare*) komórki dopaminergicznie odkładające neuromelaninę, a brak wybarwienia antygenów neuronalnych może być spowodowany interferencją neuromelaniny.

Modyfikacja (pominięcie SHH, użycie komórek iPS zamiast ESC) w protokole źródłowym mogła sprawić, iż zastosowany protokół I dostarczał heterogennej populacji komórek, wśród których część była w stanie odkładać neuromelaninę. Wyjaśniałoby to fakt, iż autorzy pracy źródłowej nie donoszą o pojawieniu się upigmentowanych komórek. W protokole II, gdzie czystość uzyskanych neuronów dopaminergicznych była wyższa, a tym samym zawartość komórek innego typu niższa, nie zaobserwowano powstawania melaniny. Z kolei autorzy pracy, na której oparto protokół III donoszą o



pojawieniu się upigmentowanych komórek, jednak nie rozwijają szczegółowo tego tematu i sugerują, że są to raczej komórki RPE.

Uzyskane wyniki wydają się być spójne i sugerują otrzymanie niezwykle ciekawego modelu *in vitro*, który pozwalałby na badania nad rolą neuromelaniny w procesach nie tylko fizjologicznych, ale także patologicznych – takich jak patogenezie choroby Parkinsona. To właśnie komórki produkujące neuromelaninę obumierają w toku choroby Parkinsona, dlatego samej neuromelaninie przypisuje się rolę w rozwoju tego schorzenia.

Neuromelanina zwykle uważana jest za substancję neuroprotekcijną. Bierze udział w gospodarce wolnymi rodnikami. Jako polimer jest w stanie wiązać metale ciężkie oraz działać jako zmiatacz wolnych rodników [151]. Pełni funkcje ochronne sekwestrując potencjalnie toksyczne substancje [152]. Jednak w przypadku jej dysfunkcji, np. w przypadku patologicznej akumulacji, może dochodzić do produkcji wolnych rodników, stresu oksydacyjnego i tym samym śmierci komórki. Neuromelania może też wiązać neurotoksyny (w tym takie jak MPTP czy parakwat) [158]. Ponadto pochodne chinonowe, z których powstaje neuromelanina mogą być toksyczne [153]. Wreszcie, pokazano, iż sama neuromelanina jest toksyczna dla neuronów dopaminergicznych *in vitro* [159], ponadto może ona powodować ich śmierć poprzez aktywację komórek mikrogleju [160]. Co ciekawe, u pacjentów cierpiących na chorobę Parkinsona nie odnotowano zmian w zawartości neuromelaniny. Pokazano jednak, że może ona wiązać  $\alpha$ -synukleinę, białko, którego złogi są charakterystycznym obrazem patologicznym choroby Parkinsona [161]. Ponadto, neuromelanina zaburza funkcjonowanie systemu rozkładu białek ubikwityna-proteasom [162]. Obserwacje te sugerują rolę neuromelaniny w patomechanizmie choroby Parkinsona.

Z pewnością w toku ewolucji neuromelanina nie powstała przypadkiem. Z jednej strony jest substancją, która wydaje się fizjologicznie służyć celom ochronnym neuronów (jest obecna w istocie czarnej wszystkich dorosłych ludzi) poprzez sekwestrację toksycznych substancji. Jednak w przypadku jej dysfunkcji może prowadzić do śmierci komórek, w których występuje (głównie neuronów dopaminergicznych), a tym samym brać udział w patogenezie choroby Parkinsona.

Podsumowując, używając opisanych protokołów uzyskano heterogenne populacje komórek, które mogą stanowić niezwykle ciekawy model do badań nad

patogenezą choroby Parkinsona oraz roli w niej neuromelaniny. Uzyskane wyniki są jednak niepełne, a ich interpretacja jest trudna ze względu na wciąż względnie niewielki stan wiedzy na temat syntezy oraz funkcji neuromelaniny. Aby dokładnie scharakteryzować oraz jednoznacznie potwierdzić cechy uzyskanego modelu konieczne są dalsze badania, uwzględniające uzyskanie analogicznych komórek z innych linii komórek iPS (aby wykluczyć wpływ charakterystyki konkretnej użytej linii piPS na proces ich różnicowania), w tym z komórek iPS uzyskanych od pacjentów cierpiących na chorobę Parkinsona. Linie takich komórek (PD-iPS) wyprowadzono już w trakcie niniejszego projektu. Porównanie zachowania takich komórek z komórkami kontrolnymi w trakcie różnicowania za pomocą opisanych protokołów może dostarczyć niezwykle ciekawych wniosków na temat roli neuromelaniny w patogenezie choroby Parkinsona.

## **5.6 Opracowanie zwierzęcego modelu choroby Parkinsona oraz transplantacja uzyskanych komórek**

W celu weryfikacji przydatności w terapii chorób neurodegeneracyjnych uzyskane poprzez różnicowanie komórek piPS za pomocą protokołu I neurony dopaminergiczne wszczepiono szczurom z wyindukowanymi objawami choroby Parkinsona. Wykorzystano komórki otrzymane za pomocą protokołu I ponieważ dostarczał on największej ilości komórek względnie niskim kosztem.

W celu opracowania szczurzego modelu choroby Parkinsona użyto toksyny 6-OHDA do uszkodzenia układu dopaminowego. Jednak uzyskane wyniki testów rotacyjnych mających na celu weryfikację rozmiaru wyindukowanej lezji sugerowały niewielkie uszkodzenia układu dopaminowego (na poziomie 50% uszkodzonych komórek dopaminergicznych). Niemniej jednak opisywano już zróżnicowany wpływ toksyny 6-OHDA na różne osobniki. Po podaniu jednakowej dawki 6-OHDA rozmiar lezji u różnych szczurów może być odmienny. Zdarzały się również sytuacje, gdy zwierzęta nie przejawiały zachowań rotacyjnych mimo znacznych rozmiarów lezji układu dopaminergicznego [163]. Do eksperymentów transplantacyjnych wybrano zwierzęta cechujące się największą tendencją do zachowań asymetrycznych.

Uzyskane wyniki przeszczepień wskazują, na obiecującą zdolność uzyskanych komórek do integracji z tkanką mózgową zwierzęcia. W trakcie trwania eksperymentu nie odnotowano formowania guzów przez przeszczepione komórki. Miejsca podania komórek w prążkowi jednoznacznie zidentyfikowano niestety jedynie w przypadku wszczepienia komórek terminalnie zróżnicowanych protokołem I. Umożliwiła to melanina obecna w tych komórkach. Na zdjęciach skrawków wybarwionych pod kątem obecności hydroksylazy tyrozynowej wyraźnie widać TH-pozytywne komórki *wrastające* w tkankę mózgową zwierzęcia. Sugeruje to zdolność komórek TH-pozytywnych do integracji z tkanką biorcy. Ośrodkowy układ nerwowy, mimo, iż uprzywilejowany immunologicznie jest w stanie skutecznie odrzucać przeszczepy. Dowodzi tego wynik uzyskany na zwierzętach niepoddawanych immunosupresji. Miejsce podania komórek u tych zwierząt zostały wyraźnie zabliźnione. Nie zaobserwowano żadnych komórek migrujących z miejsca wszczepienia. Immunosupresja jest więc niezbędna w celu integracji wszczepionych komórek z otaczającą tkanką. Niestety, ze względu na silne barwienie niespecyficzne oraz niewielki stopień uszkodzenia układu dopaminowego nie sposób zweryfikować efektu wszczepienia progenitorów neuronalnych do zastosowanego szczurzego modelu. Wynik ten mógłby odpowiedzieć na pytanie czy lepszą strategią jest wszczepianie terminalnie zróżnicowanych komórek, czy też progenitorów neuronalnych, które mogłyby zostać wydajnie zróżnicowane w miejscu podania poprzez sygnały zapewnianie przez niszę, z którą mają się zintegrować, oraz w której mają wywołać efekt terapeutyczny. Mogłoby okazać się, iż druga strategia prowadzi do bardziej wydajnego oraz fizjologicznego różnicowania komórek. Niektóre doniesienia literaturowe sugerują nawet prawidłowe różnicowanie embrionalnych komórek macierzystych wszczepionych do prążkowi szczurów [164]. Powstające *in vivo* neurony poprawiają zachowania motoryczne zwierząt modelowych. Do określenia zachowania wszczepionych progenitorów konieczne jest użycie bardziej specyficznego barwienia (np. przeciwciała rozpoznającego jedynie ludzkie antygeny) lub indukcja lezji o większym rozmiarze.

Ze względu na niewielki rozmiar wywołanych lezji układu dopaminowego nie sposób było określić efektu terapeutycznego wszczepionych komórek na zachowanie zwierząt. Już przed transplantacjami wykazywały one słabe zachowanie asymetryczne, którego zmiana po wszczepieniu komórek nie była zauważalna.

Uzyskane wyniki są zgodne z doniesieniami literaturowymi. Wielu autorów opisuje integrację z tkanką mózgową zwierzęcia wszczepionych komórek dopaminergicznych uzyskanych poprzez różnicowanie *in vitro* komórek ESC [165], [166], [167] oraz iPS [95]–[97]. Opublikowane przez nich zdjęcia miejsc wszczepienia przypominają obraz uzyskany w tej pracy. Ponadto, autorzy Ci donoszą o terapeutycznym wpływie wszczepionych komórek na zachowanie zwierząt. Zachowania asymetryczne szczurów wyindukowane za pomocą 6-OHDA mierzone ilością obrotów po amfetaminie i apomorfynie znacznie się poprawiają po wszczepieniu komórek dopaminergicznych uzyskanych przez różnicowanie komórek iPS. U niektórych z analizowanych zwierząt ilość obrotów po przeszczepieniu komórek spadała nawet o 80% [95]. Z kolei ilość zintegrowanych komórek neurowych liczona jest w dziesiątkach tysięcy [97]. Co istotne, przeszczepione komórki są funkcjonalne *in vivo*, co potwierdzają badania elektrofizjologiczne [96]. Szacunkowa ilość komórek dopaminergicznych, która po wszczepieniu wywołuje efekt terapeutyczny wynosi około 200 tys. [168] (takiej ilości komórek użyto w niniejszej pracy). Sugeruje to sporą śmiertelność przeszczepionych komórek, która może być zmniejszona przez preinkubację przeszczepianych komórek z czynnikami neurotroficznymi (takimi jak GDNF czy BDNF) [169]. Co istotne, pokazano, iż poprawę stanu zwierzęcego modelu choroby Parkinsona wywołać mogą neurony dopaminergiczne uzyskane przez różnicowanie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych otrzymanych z komórek pacjentów cierpiących na chorobę Parkinsona [95]. Jest to niezwykle istotna obserwacja, ponieważ pokazuje możliwość zastosowania opisanej strategii terapeutycznej w układzie autologicznym – używając własnych komórek pacjenta do terapii regeneracyjnej. Obiecujący, jest również fakt, iż wszczepione komórki dopaminergiczne poprawiają obraz nie tylko szczurzego i mysiego modelu choroby Parkinsona, ale wywołują także efekt terapeutyczny u naczelnych [170], co sugeruje możliwość translacji opisanej strategii terapeutycznej na inne gatunki – w tym człowieka.

Podsumowując, uzyskane wyniki pierwszych transplantacji są dość obiecujące. Uzyskane komórki dopaminergiczne wydają się integrować z tkanką zwierzęcia. Ponadto pierwsze przeszczepy uzyskanych komórek pozwoliły technicznie zoptymalizować metody ksenotransplantacji komórek do mózgów szczurów oraz ich

immunosupresji. Kolejne doświadczenia tego typu pozwolą odpowiedzieć na pytanie o zdolność uzyskanych komórek do wywoływania efektu terapeutycznego w zwierzęcym modelu choroby Parkinsona. Jednak pierwsze wyniki oraz liczne doniesienia literaturowe sugerują, iż potencjalne przyszłościowe zastosowanie autologicznych neuronów dopaminergicznych uzyskanych przez różnicowanie komórek iPS może być bardzo obiecującą alternatywą w terapii chorób neurodegeneracyjnych.

W celu indukcji zwierzęcego modelu choroby Parkinsona dogodnego do ksenotransplantacji ludzkich komórek opracowano myszy model oparty o codzienne podawanie myszom szczepu NOD/SCID rotenonu – związku wywołującego zaburzenia motoryczne zwierząt będące emanacją objawów choroby Parkinsona. Podejście takie zapewnia utrzymanie zwierząt, które nie będą musiały być poddawane immunosupresji gdyż posiadają upośledzony układ odpornościowy.

W trakcie 56-dniowego podawania myszom rotenonu ich sprawność motoryczna, mierzona jako czas utrzymywania się na rotującym i przyspieszającym pręcie, wyraźnie spadała. W 32. dniu testu średni czas, po którym myszy otrzymujące rotenon spadały z prętu skrócił się o 1/3. Z kolei po zakończeniu eksperymentu wynosił 50% wartości początkowej i był istotnie statystycznie różny od wartości uzyskanych dla grup kontrolnych. Testy koordynacji ruchowej wykonywano w dniach, w których dostępny był rota-rod i nie odpowiadały one dokładnie dniom połowy i końca testu, nie miało to jednak wpływu na uzyskane wyniki. Warto podkreślić, iż w trakcie testu w obu grupach kontrolnych – otrzymującej sam rozpuszczalnik oraz niepoddawanej zabiegom karmienia – średni czas utrzymywania się zwierząt na pręcie pozostawał zbliżony do wartości początkowych. Sugeruje to, iż sam rozpuszczalnik nie indukował zaburzeń motorycznych zwierząt, ale także, iż rosnący wiek myszy, ani codzienne zabiegi karmienia myszy nie zaburzały wyników pomiarów.

Uzyskane wyniki analizy histopatologicznej istoty czarnej myszy otrzymujących rotenon zdają się sugerować spadek liczby neuronów w porównaniu do kontroli. W preparatach tych zaobserwowano także obecność zdegenerowanych komórek o obrzękniętych jądrach komórkowych, które wyglądały na komórki apoptotyczne. Wnioski takie wysnuto na podstawie analizy preparatów wybarwionych hematoksyliną/eozyną oraz konsultacji z prof. Dariuszem Adamkiem – Kierownikiem Zakładu Patomorfologii Klinicznej i Doświadczalnej CMUJ. Uzyskane wyniki nie są

jednak jednoznaczne. Aby potwierdzić oraz skwantyfikować spadek ilości neuronów dopaminergicznych w istocie czarnej myszy otrzymujących rotenon konieczne jest zastosowanie nieco odmiennej metodyki. Należałoby przeprowadzić barwienie immunohistochemiczne skrawków parafinowych (w pracy użyto skrawków mrożeniowych) na obecność komórek pozytywnych pod kątem hydroksylazy tyrozynowej w istocie czarnej zwierząt doświadczalnych. Porównanie wybarwionych preparatów dla zwierząt doświadczalnych i kontrolnych pozwoliłoby jednoznacznie zauważyć różnicę w ilości oraz morfologii komórek dopaminergicznych - TH-pozytywnych. Kolejnym krokiem w analizie histopatologicznej byłoby wybarwienie skrawków pod kątem obecności  $\alpha$ -synukleiny w celu wizualizacji powstających ciałek Lewy'ego – charakterystycznego objawu choroby Parkinsona. Barwienie eozyną/hematoksyliną nie jest wystarczające do wizualizacji takich cech patomorfologicznych mózgow badanych zwierząt.

Niemniej jednak uzyskane wyniki wydają się być zgodne z analizowanymi doniesieniami literaturowymi. W pracy, z której korzystano przy opracowywaniu mysiego modelu choroby Parkinsona autorzy również donoszą o 50% spadku czasu utrzymywania się zwierząt na rotującym pręcie [171]. W publikacji tej jednak czas ten spada z ok. 200 s do 100 s (w tej pracy z około 300 s do ok. 150 s). Różnica ta może być spowodowana użyciem w niniejszym doświadczeniu młodszych niż w cytowanej pracy zwierząt oraz samic zamiast samców.

Chroniczne podania rotenonu wywołujące u myszy znaczny spadek koordynacji ruchowej, mierzony ok. 50% spadkiem czasu utrzymywania się na rotującym pręcie, powodują także ok. 50% spadek w ilości neuronów dopaminergicznych w istocie czarnej tych zwierząt [171]–[173]. Opisanym objawom towarzyszy także pojawienie się  $\alpha$ -synukleiny i Ciałek Lewy'ego w tej strukturze. Niestety zjawisk tych nie zaobserwowano w niniejszej pracy w wyniku zastosowania odmiennej analizy histopatologicznej. Jednak uzyskane wyniki pomiarów koordynacji ruchowej zwierząt doświadczalnych sugerują skuteczną indukcję mysiego modelu choroby Parkinsona. Znaczącemu spadkowi czasu utrzymywania się myszy na rotującym pręcie zdaje się także towarzyszyć spadek w ilości neuronów dopaminergicznych w istocie czarnej badanych zwierząt.

Podsumowując, opracowano bardzo dogodny model choroby Parkinsona, który wiernie odtwarza objawy tej choroby obecne u ludzi. U zwierząt chronicznie otrzymujących wysokie dawki rotenonu dochodzi do akumulacji i agregacji endogennej  $\alpha$ -synukleiny, pojawienia się ciałek Lewy'ego, aktywacji mikrogleju, dysfunkcji systemu ubikwityna-proteasom, ale także zaburzeń motorycznych, snu czy pracy układu pokarmowego [174]. Warto wspomnieć, iż rotenon jest pestycydem. Opisany model dostarcza więc informacji o wpływie substancji obecnych w środowisku na rozwój choroby Parkinsona.

Opracowany myszy model choroby Parkinsona jest niezwykle atrakcyjny nie tylko ze względu na wiernie odtwarzanie objawów choroby. Wykorzystanie zwierząt z upośledzeniem odporności sprawia, iż jest on idealny do ksenotransplantacji komórek w celu określenia ich przydatności w terapii regeneracyjnej chorób.

### **5.7 Opracowanie *genetycznego zabezpieczenia* indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych opartego na *genie samobójczym***

Zastosowanie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych oraz komórek z nich uzyskanych w medycynie regeneracyjnej wielu, nie tylko neurodegeneracyjnych chorób, jest niezwykle obiecującą perspektywą. Możliwość uzyskania komórek i tkanek pożądanego typu specyficznych dla potrzebującego ich pacjenta jest bardzo atrakcyjnym aspektem komórkowej terapii regeneracyjnej przyszłości.

Jednak przed przeniesieniem wyników uzyskanych na modelach zwierzęcych do klinik konieczne jest opracowanie strategii zapewniających maksimum bezpieczeństwa użytej terapii. Jest wiele ograniczeń, które należy pokonać w celu uzyskania komórek przydatnych w terapii komórkowej ludzi [175]. Wśród nich wymienić należy: uzyskanie komórek iPS za pomocą zdefiniowanych i bezpiecznych metod (preferencyjnie wolnych od ingerencji genomowej), usunięcie z metod hodowlanych komórek iPS składników pochodzenia zwierzęcego i praca w warunkach w pełni zdefiniowanych i *xeno-free*, optymalizację protokołów różnicowania w celu uzyskania czystych populacji komórek docelowych (np. poprzez wysortowanie uzyskanych

populacji komórek), a także stworzenie dodatkowego zabezpieczenia pozwalającego w razie konieczności usunąć wszystkie przeszczepione komórki. Temu ostatniemu zagadnieniu poświęcono ostatnią część niniejszej pracy.

Przeszczepione do dorosłego organizmu indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (obecne np. w postaci zanieczyszczenia zróżnicowanych komórek) mogą powodować powstawanie teratom [176] w relatywnie krótkim czasie trwania eksperymentu, nie wspominając już o długim czasie w jakim funkcjonować będzie pacjent otrzymujący przeszczepiane komórki. Dlatego właśnie jednym z pomysłów na zwiększenie bezpieczeństwa regeneracyjnej terapii opartej o komórki iPS jest stworzenie *wyjścia bezpieczeństwa* opartego o *terapię samobójczą*, która w razie potrzeby pozwoliłaby na wyeliminowanie wszystkich przeszczepionych komórek, w tym tworzących ewentualne guzy. Terapia genowa *oparta o gen samobójczy* jest piątą najczęstszą stosowaną obecnie w badaniach klinicznych terapią genową [źródło: <http://www.wiley.com>].

W niniejszej pracy zoptymalizowano metodę *terapii samobójczej* opartej o gen kinazy tymidynowej TK oraz jej nieaktywnego substratu gancyklowiru. Jako modelowych komórek użyto linii mięsaka prążkowanego komórkowego Rh30. W pierwszych krokach przygotowano konieczne plazmidy posługując się metodami klonowania DNA. Uzyskane plazmidy lentiwirusowe posłużyły do wyprodukowania wektorów lentiwirusowych opartych o wirusa HIV-1. Wartością dodaną niniejszego doktoratu jest optymalizacja ekonomicznej metody transfekcji komórek produkujących wektory wirusowe (uzyskano wysoką, sięgającą 90% wydajność transfekcji) oraz wydajnej produkcji wektorów wirusowych w oparciu o dane literaturowe [177], [178] i wielokrotne doświadczenia. Wyprodukowane wektory wirusowe posiadały zadowalające miano (rzędu  $5 \times 10^5$  TU/ml) oraz pozwoliły na wyprowadzenie zmodyfikowanych genetycznie linii komórkowych, których czystość po selekcji antybiotykowej lub wysortowaniu była wystarczająca do przeprowadzenia eksperymentów określających skuteczność *terapii samobójczej*.

Zmodyfikowane genetycznie komórki posiadające ekspresję *genu samobójczego* HSV-TK były niezwykle wydajnie eliminowane poprzez traktowanie gancyklowirem *in vitro*. Po 6 dniach inkubacji praktycznie wszystkie komórki zostały skutecznie usunięte. Jest to obserwacja zgodna z doniesieniami literaturowymi, z których korzystano dobierając stężenia gancyklowiru użyte w tej pracy [77], [179]–[181]. W pracach tych



także obserwowano eliminację wszystkich zmodyfikowanych genetycznie komórek *in vitro* w ciągu tygodnia inkubacji z gancyklowirem. Użyte ostatecznie stężenia opracowano na podstawie doświadczeń wstępnych, w których użyto szerokiego zakresu stężeń (0,1-10 $\mu$ g/ml). Wybrano takie stężenie, przy którym nie obserwowano toksycznego efektu GCV dla komórek kontrolnych, a które było w stanie wydajnie usunąć wszystkie komórki posiadające ekspresję TK w ciągu tygodnia. Ciekawą obserwacją było obniżenie tempa proliferacji komórek po wprowadzeniu ekspresji TK. Zjawisko to tłumaczy się niespecyficzną fosforylacją substratów komórkowych przez TK, która mogła wpłynąć na tempo podziałów komórkowych.

W kolejnym kroku zbadano komunikację międzykomórkową za pośrednictwem złącz szczelinowych w linii Rh30 w celu określenia zdolności tych komórek do przekazywania drobnocząsteczkowych związków. Zjawisko to ustalono empirycznie, gdyż nie znaleziono doniesień literaturowych na ten temat. Komunikacja międzykomórkowa za pośrednictwem złącz szczelinowych w linii Rh30 okazała się być bardzo wydajna, czego dowodzi nie tylko silny transfer kalceiny pomiędzy sąsiadującymi komórkami, ale także skuteczna eliminacja komórek niezmodyfikowanych genetycznie w ko-hodowli. Wszystkie komórki obecne w mieszaninie były skutecznie eliminowane, gdy komórki posiadające ekspresję *genu samobójczego* stanowiły jedynie 20%. Dowodzi to wydajnego przekazywania toksycznego metabolitu gancyklowiru od komórek zmodyfikowanych genetycznie do sąsiadujących komórek typu dzikiego, a tym samym silnego, toksycznego efektu sąsiedztwa występującego w linii komórek Rh30. Zjawisko to może okazać się bardzo korzystne przy stosowaniu opisanej terapii genowej *in situ* – przy modyfikacji genetycznej komórek bezpośrednio w guzie. Transdukcja taka może okazać się bardzo mało wydajna. Niemniej jednak, cała terapia może być skuteczna, gdyż toksyczny metabolit wytworzony w nielicznych komórkach zmodyfikowanych genetycznie będzie przekazywany komórkom sąsiadującym. Jednocześnie występuje ryzyko uszkodzenia sąsiadujących tkanek prawidłowych. Jednak jest ono stosunkowo niskie w związku z koniecznością ekspresji kompatybilnych koneksyn budujących złącza szczelinowe sąsiadujących i komunikujących się komórek [182] w celu zajęcia transferu drobnocząsteczkowych substancji. I choć komórki nowotworowe często są w stanie komunikować się z komórkami swojej niszy za pośrednictwem złącz szczelinowych [183], to efekt sąsiedztwa w obrębie guza może okazać się na tyle wydajny, iż

doprowadzi do szybkiego i wydajnego usunięcia komórek nowotworowych przed efektem toksycznym obserwowanym w prawidłowych komórkach.

Zastosowana strategia eliminacji zmodyfikowanych genetycznie komórek nowotworowych jest również skuteczna *in vivo*. Uzyskane wyniki okazały się przekraczać spodziewany efekt. Guzy powstałe u myszy, które otrzymywały codziennie gancyklowir zostały niemal całkowicie usunięte w przeciągu 14 dni terapii. Co ważne, nie obserwowano przy tym toksyczności narządowej. Otrzymane wyniki są zgodne z danymi obecnymi w literaturze [184], [78], której użyto do dobrania dawek gancyklowiru do eksperymentów *in vivo*. W pracach tych guzy pod wpływem podawania gancyklowiru zmalały nawet 10-cio krotnie. Przedłużone podawanie gancyklowiru mogłoby doprowadzić do usunięcia wszystkich komórek nowotworowych, co istotne, także takich, które już dokonały przerzutu i zagnieździły się po za guzem pierwotnym. Wysokie wartości odchyień standardowych wynikają z odmiennego wzrostu guzów u myszy w obrębie jednej grupy badawczej. Mimo, iż wyniki uzyskano na małej grupie doświadczalnej (n=3) to są one dość spektakularne (istotność statystyczna) i pokazują skuteczność terapii opartej o gen samobójczy *in vivo*. Opisane podejście terapeutyczne jest na tyle obiecujące, iż trwają liczne badania kliniczne nad jego wykorzystaniem w terapii nowotworów u ludzi [185].

Komórek mięsaka prążkowanokomórkowego Rh30 użyto do opracowania metodologii terapii opartej o *gen samobójczy* ze względu na łatwość ich hodowli, modyfikacji genetycznej oraz tworzenia guzów po przeszczepieniu do myszy z upośledzeniem odporności. Uzyskane wyniki okazały się na tyle obiecujące, że postanowiono wykonać dodatkowe, opisane powyżej, eksperymenty. Docelowymi komórkami, które planowano zabezpieczyć opisanym *wentylem bezpieczeństwa* były indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste. Takie podejście zastosowano już w przypadku ludzkich komórek ESC [186] oraz komórek iPS naczelnych [80]. Pokazano, iż oba te typy komórek, po wprowadzeniu ekspresji *genu samobójczego* można wydajnie eliminować za pomocą gancyklowiru zarówno *in vitro* jak i *in vivo*.

W niniejszej pracy ludzkie komórki iPS okazały się bardzo odporne na modyfikację genetyczną, która jednak po zastosowaniu hodowli w warunkach bez warstwy odżywczej [187] okazała się być skuteczna i wydajna. Niestety w pierwszym podejściu zastosowano wektory wirusowe przenoszące *gen samobójczy* TK pod

kontrolą wirusowego promotora CMV. Jest on w komórkach dość szybko wyciszany poprzez metylację [188]–[190] co powoduje utratę ekspresji transgenu. Z własnych obserwacji wynika, iż tempo wyciszania promotora CMV jest w komórkach iPS niezwykle wysokie i objawia się całkowitym zanikiem ekspresji transgenu w ciągu dwóch tygodni. W celu *genetycznego zabezpieczenia* komórek iPS konieczna jest stała (nawet wieloletnia) ekspresja *genu samobójczego*. Z tego względu koniecznym było wyprowadzenie linii komórek iPS, które posiadają ekspresję transgenów pod kontrolą konstytutywnego promotora, takiego jak promotor ubikwityny C (UbC). W przypadku kontrolnych komórek posiadających ekspresję genu reporterowego *gfp* udało się to z dobrym skutkiem. Uzyskano komórki wykazujące zieloną fluorescencję o czystości 75%, co dowodzi technicznej możliwości wprowadzenia transgenu do komórek iPS. Z jednej strony wprowadza to ryzyko mutagenyzy insercyjnej, której stara się uniknąć stosując bezpieczne metody reprogramowania i różnicowania komórek. Z drugiej strony otwiera możliwość modyfikacji genetycznej komórek iPS, pozwalając myśleć o połączeniu terapii komórkowej z terapią genową w medycynie regeneracyjnej przyszłości.

Niestety nie dysponowano plazmidem przenoszącym gen TK pod kontrolą promotora UbC. Prace nad jego uzyskaniem oraz wyprowadzeniem linii komórek iPS posiadających stabilną ekspresję *genu samobójczego* trwają.

Uzyskane na linii komórek Rh30 wyniki, oraz doniesienia literaturowe sugerują, iż wykorzystanie *genu samobójczego* w celu stworzenia *genetycznego zabezpieczenia* komórek iPS jest podejściem bardzo obiecującym i w przyszłości może zwiększyć bezpieczeństwo komórkowej terapii regeneracyjnej wykorzystującej indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste.

## 5.8 Dalsze plany badawcze

Mnogość tematów poruszanych w toku wykonywania niniejszej pracy sprawiło, iż nie wszystkie zagadnienia zostały w pełni zakończone. Dlatego wśród dalszych planów badawczych mających zamknąć tematykę poruszaną w niniejszej pracy znajdują się:

- 1) Pełna charakterystyka uzyskanych linii komórkowych kiPS i PD-iPS, w tym test tworzenia teratom mający na celu potwierdzenie ich pluripotencjalności,
- 2) Zróżnicowanie opisanymi protokołami komórek iPS innych niż piPS, w tym komórek PD-iPS w celu określenia ich zdolności do różnicowania do neuronów dopaminergicznych, a także analizy i porównania cech uzyskanych komórek specyficznych dla pacjenta cierpiącego na chorobę Parkinsona z komórkami kontrolnymi,
- 3) Szeroka analiza heterogennych komórek uzyskanych protokołem III, analogiczna do tej wykonanej dla komórek uzyskanych protokołem I; w tym pod kątem poziomu produkcji dopaminy (metodą HPLC) i obecności melaniny (metodą EPR i TEM),
- 4) Dokładna analiza otrzymanych komórek dopaminergicznych, w tym określenie ekspresji większej ilości markerów neuronalnych oraz dokładnej wydajności różnicowania,
- 5) Zwiększenie czystości uzyskanych neuronów poprzez zwiększenie wydajności różnicowania lub sortowanie komórek,
- 6) Jednoznaczna identyfikacja komórek produkujących czarny pigment- melaninę – na podstawie analizy obecności dodatkowych markerów lub eksperymentów wykorzystujących EPR (np. w celu określenia zdolności do wiązania jonów żelaza),

- 7) Dalsze ksenotransplantacje uzyskanych komórek do opracowanych modeli zwierzęcych (szczurzego i/lub mysiego) mające na celu weryfikację ich zdolności do wywołania efektu terapeutycznego w modelach choroby Parkinsona,
- 8) Jednoznaczne określenie zmian histopatologicznych w istocie czarnej myszy otrzymujących rotenon (wybarwienie komórek TH-pozytywnych,  $\alpha$ -synukleiny),
- 9) Otrzymanie linii komórek iPS ze stabilną ekspresją *genu samobójczego* oraz potwierdzenie przydatności opisanej *terapii samobójczej* w zwiększeniu bezpieczeństwa komórek iPS za pomocą metod zastosowanych w przypadku komórek Rh30.

## 6. Wnioski

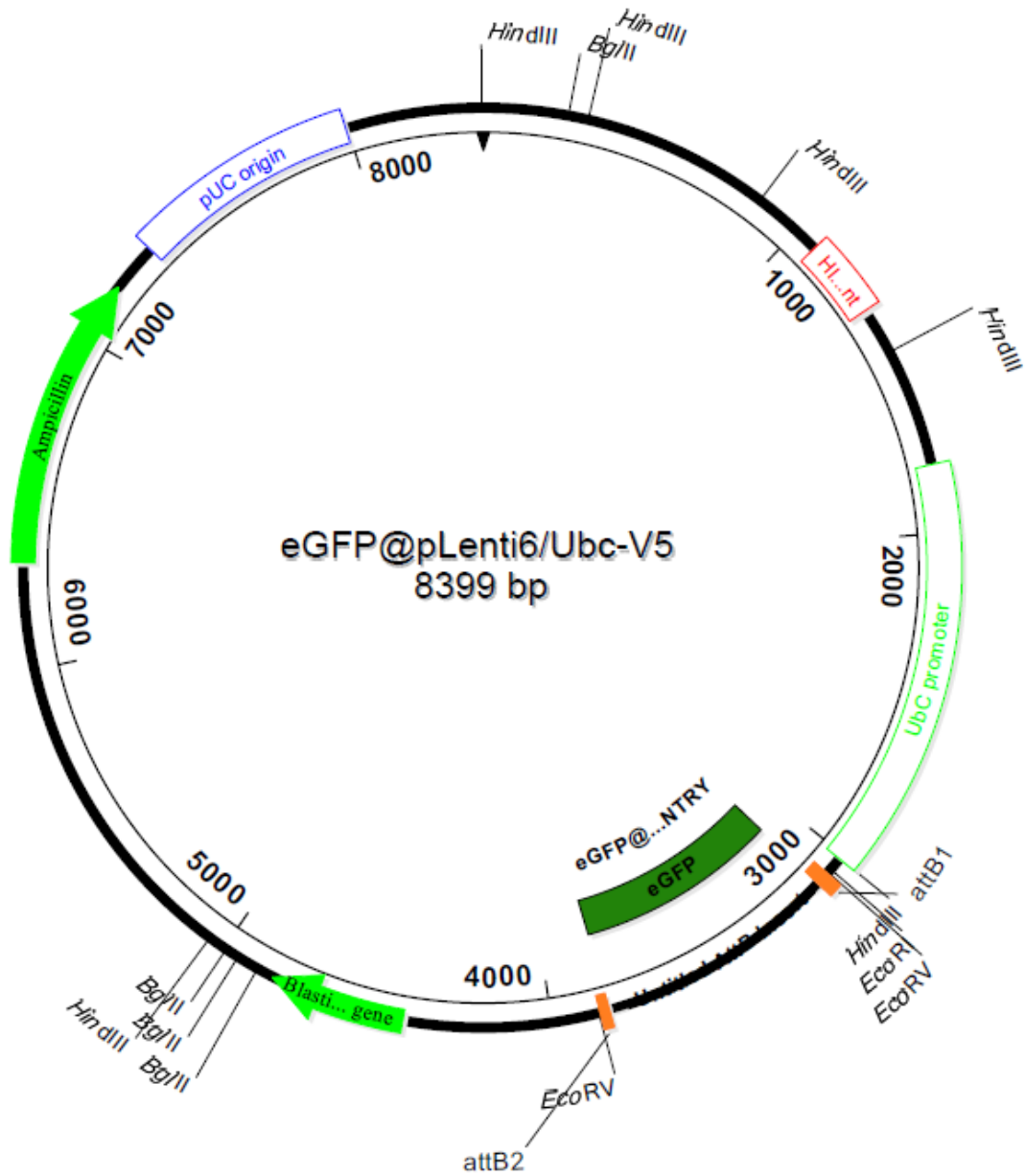
Doświadczenia wykonane w niniejszej pracy pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków:

- 1) Zewnętrzny płaszcz wyrwanego ludzkiego włosa jest dogodnym źródłem komórek somatycznych - keratynocytów, które nadają się do reprogramowania, oraz, które można wyizolować w sposób bezinwazyjny,
- 2) Wektor wirusowy opracowany na bazie wirusa Sendai pozwala na wydajne reprogramowanie ludzkich komórek somatycznych (keratynocytów i komórek jednojądrzastych krwi obwodowej) do pluripotencjalnych komórek macierzystych,
- 3) Uzyskane linie komórek kiPS oraz PD-iPS posiadają podstawowe cechy komórek pluripotencjalnych,
- 4) Zastosowane protokoły neuronalnego różnicowania dostarczają neuronów dopaminergicznych produkujących dopaminę oraz posiadających ekspresję charakterystycznych dla nich markerów,
- 5) Użyte protokoły różnią się wydajnością, prostotą oraz kosztem. Najwydajniejszy wydaje się być protokół III, najekonomiczniejszy protokół I. Te dwa protokoły dostarczają heterogennej populacji komórek, w której jedynie część stanowią komórki produkujące dopaminę,
- 6) W uzyskanych heterogennych populacjach obecne są komórki produkujące melaninę. Ich tożsamość jest niejednoznaczna, jednak badania sugerują, iż są to komórki zdolne do odkładania neuromelaniny poprzez autooksydację dopaminy,
- 7) Uzyskane neurony dopaminergiczne są zdolne do integracji z tkanką mózgową zwierzęcego modelu choroby Parkinsona,

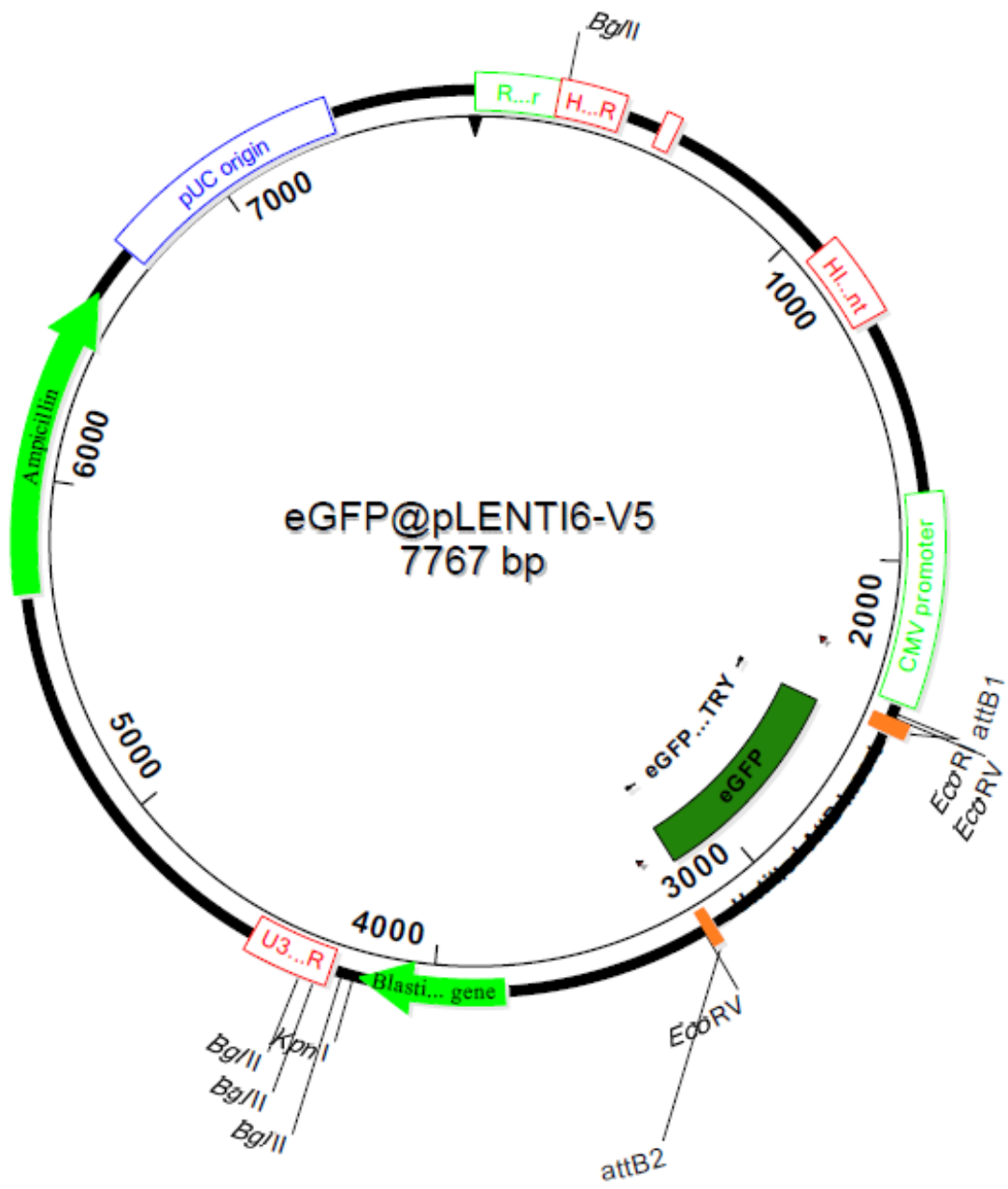
- 8) Wyindukowany za pomocą rotenonu myszy model choroby Parkinsona jest bardzo dogodny do eksperymentów związanych z ksenotransplantacjami ludzkich komórek produkujących dopaminę,
- 9) Terapia genowa oparta o *gen samobójczy* jest skuteczną strategią specyficznej eliminacji zmodyfikowanych genetycznie komórek zarówno *in vitro* jak i *in vivo* oraz może posłużyć do zwiększenia bezpieczeństwa, a tym samym przydatności, indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych w zastosowaniu klinicznym,
- 10) Zastosowanie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych w regeneracyjnej terapii chorób neurodegeneracyjnych jest bardzo obiecującą perspektywą i w przyszłości może stanowić alternatywę dla obecnej terapii choroby Parkinsona.

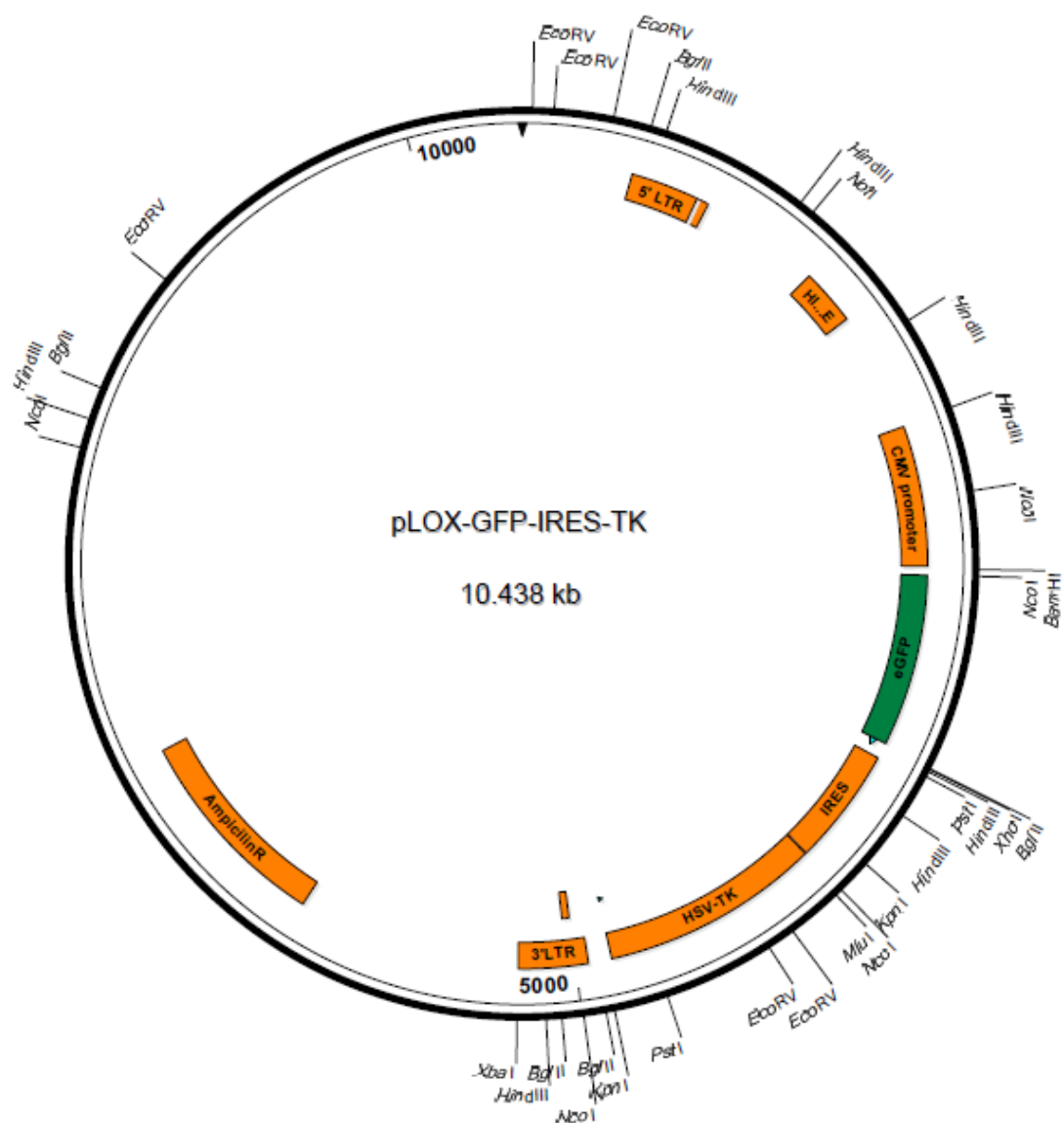
# Załącznik 1

Mapy użytych plazmidów.









## Bibliografia

- [1] M. Ramalho-Santos and H. Willenbring, "On the origin of the term 'stem cell,'" *Cell Stem Cell*, vol. 1, no. 1, 2007.
- [2] I. L. Weissman, "Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution.," *Cell*, vol. 100, no. 1, 2000.
- [3] M. J. Evans and M. H. Kaufman, "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos," *Nature*, vol. 292, no. 5819, 1981.
- [4] M. F. Pittenger, "Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells," *Science (80-. )*, vol. 284, no. 5411, 1999.
- [5] X. Shi and D. J. Garry, "Muscle stem cells in development, regeneration, and disease.," *Genes Dev.*, vol. 20, no. 13, 2006.
- [6] P. Peretto and L. Bonfanti, "Major unsolved points in adult neurogenesis: doors open on a translational future?," *Front. Neurosci.*, vol. 8, 2014.
- [7] H. E. Young and A. C. Black, "Adult stem cells.," *Anat. Rec. Part A*, vol. 276, no. 1, 2004.
- [8] K. Przybycień, Z. Kornacewicz–Jach, and B. Machaliński, "Komórki macierzyste w klinicznych badaniach kardiologicznych," *Kardiol. Pol.*, vol. 69, no. 6, 2011.
- [9] A. Sohni and C. M. Verfaillie, "Multipotent adult progenitor cells," *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, vol. 24, no. 1, 2011.
- [10] G. D. Ippolito, S. Diabira, G. A. Howard, P. Menei, B. A. Roos, and P. C. Schiller, "Marrow-isolated adult multilineage inducible ( MIAMI ) cells , a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential," *J. Sci.*, vol. 117, 2004.
- [11] G. Kögler, S. Sensken, J. a Airey, T. Trapp, M. Müschen, N. Feldhahn, S. Liedtke, R. V Sorg, J. Fischer, C. Rosenbaum, S. Greschat, A. Knipper, J. Bender, O. Degistirici, J. Gao, A. I. Caplan, E. J. Colletti, G. Almeida-Porada, H. W. Müller, E. Zanjani, and P. Wernet, "A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential.," *J. Exp. Med.*, vol. 200, no. 2, 2004.
- [12] M. Kucia, R. Reza, F. R. Campbell, E. Zuba-Surma, M. Majka, J. Ratajczak, and M. Z. Ratajczak, "A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)SSEA-1(+)Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow.," *Leukemia*, vol. 20, no. 5, 2006.
- [13] A. J. Wagers and I. L. Weissman, "Plasticity of adult stem cells.," *Cell*, vol. 116, no. 5, 2004.

- [14] M. Z. Ratajczak, "Cancer stem cells--normal stem cells 'Jedi' that went over to the 'dark side'.,", *Folia Histochem. Cytobiol.*, vol. 43, no. 4, 2005.
- [15] G. R. Martin, "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells," *Dev. Biol.*, vol. 78, no. 12, 1981.
- [16] J. a. Thomson, "Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts," *Science (80-. )*, vol. 282, no. 5391, 1998.
- [17] D. Dhar and J. Hsi-En Ho, "Stem cell research policies around the world.," *Yale J. Biol. Med.*, vol. 82, no. 3, 2009.
- [18] M. Tada, Y. Takahama, K. Abe, N. Nakatsuji, and T. Tada, "Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells," *Curr. Biol.*, vol. 11, no. 19, 2001.
- [19] J. B. Gurdon, "The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles.," *J. Embryol. Exp. Morphol.*, vol. 10, 1962.
- [20] I. Wilmut, A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind, and K. H. Campbell, "Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells.," *Nature*, vol. 385, no. 6619, 1997.
- [21] H. Nicholls, "Let's make a mammoth," *Nature*, vol. 456, 2009.
- [22] S. Wakayama, H. Ohta, T. Hikichi, E. Mizutani, T. Iwaki, O. Kanagawa, and T. Wakayama, "Production of healthy cloned mice from bodies frozen at -20 degrees C for 16 years.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 45, 2008.
- [23] M. Tachibana, P. Amato, M. Sparman, N. M. Gutierrez, R. Tippner-hedges, H. Ma, E. Kang, A. Fulati, H. Lee, H. Sritanandomchai, K. Masterson, J. Larson, D. Eaton, K. Sadler-fredd, D. Battaglia, D. Lee, D. Wu, J. Jensen, P. Patton, S. Gokhale, R. L. Stouffer, D. Wolf, and S. Mitalipov, "Human Embryonic Stem Cells Derived by Somatic Cell Nuclear Transfer," *Cell*, vol. 153, 2013.
- [24] Y. G. Chung, J. H. Eum, J. E. Lee, S. H. Shim, V. Sepilian, S. W. Hong, Y. Lee, N. R. Treff, Y. H. Choi, E. a Kimbrel, R. E. Dittman, R. Lanza, and D. R. Lee, "Human Somatic Cell Nuclear Transfer Using Adult Cells.," *Cell Stem Cell*, 2014.
- [25] K. Takahashi and S. Yamanaka, "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.," *Cell*, vol. 126, no. 4, 2006.
- [26] K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, and S. Yamanaka, "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors.," *Cell*, vol. 131, no. 5, 2007.

- [27] S. Yamanaka, "The winding road to pluripotency (Nobel Lecture).," *Angew. Nobel Lect.*, vol. 52, no. 52, 2013.
- [28] A. Meissner, M. Wernig, and R. Jaenisch, "Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells.," *Nat. Biotechnol.*, vol. 25, no. 10, 2007.
- [29] J. Yu, M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane, S. Tian, J. Nie, G. A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, I. I. Slukvin, and J. A. Thomson, "Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells.," *Science (80-. )*, vol. 318, no. 5858, 2007.
- [30] T. J. Nelson, A. Martinez-fernandez, S. Yamada, Y. Ikeda, C. Perez-terzic, and A. Terzic, "Induced pluripotent stem cells : advances to applications," *Stem Cells*, vol. 3, 2010.
- [31] S. Yamanaka, "A fresh look at iPS cells.," *Cell*, vol. 137, no. 1, 2009.
- [32] H. Niwa, J. Miyazaki, and A. G. Smith, "Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells.," *Nat. Genet.*, vol. 24, no. 4, 2000.
- [33] A. A. Avilion, S. K. Nicolis, L. H. Pevny, L. Perez, N. Vivian, and R. Lovell-Badge, "Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function.," *Genes Dev.*, vol. 17, no. 1, 2003.
- [34] S. Yamanaka, "Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells.," *Cell Stem Cell*, vol. 1, no. 1, 2007.
- [35] Y. Li, J. McClintick, L. Zhong, H. J. Edenberg, M. C. Yoder, and R. J. Chan, "Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4.," *Blood*, vol. 105, no. 2, 2005.
- [36] M. Wernig, A. Meissner, J. P. Cassady, and R. Jaenisch, "c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts.," *Cell Stem Cell*, vol. 2, no. 1, 2008.
- [37] M. Nakagawa, M. Koyanagi, K. Tanabe, K. Takahashi, T. Ichisaka, T. Aoi, K. Okita, Y. Mochiduki, N. Takizawa, and S. Yamanaka, "Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts.," *Nat. Biotechnol.*, vol. 26, no. 1, 2008.
- [38] J. B. Kim, H. Zaehres, G. Wu, L. Gentile, K. Ko, V. Sebastiano, M. J. Araúzo-Bravo, D. Ruau, D. W. Han, M. Zenke, and others, "Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors," *Nature*, vol. 454, no. 7204, 2008.
- [39] D. Huangfu, K. Osafune, R. Maehr, W. Guo, A. Eijkelenboom, S. Chen, W. Muhlestein, and D. A. Melton, "Induction of pluripotent stem cells from primary

- human fibroblasts with only Oct4 and Sox2,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 26, no. 11, 2008.
- [40] Y. Shi, C. Desponts, J. T. Do, H. S. Hahm, H. R. Schöler, and S. Ding, “Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds.,” *Cell Stem Cell*, vol. 3, no. 5, 2008.
- [41] S. Zhu, W. Li, H. Zhou, W. Wei, R. Ambasudhan, T. Lin, J. Kim, K. Zhang, and S. Ding, “Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds.,” *Cell Stem Cell*, vol. 7, no. 6, 2010.
- [42] P. Mali, B.-K. Chou, J. Yen, Z. Ye, J. Zou, S. Dowey, R. a Brodsky, J. E. Ohm, W. Yu, S. B. Baylin, K. Yusa, A. Bradley, D. J. Meyers, C. Mukherjee, P. a Cole, and L. Cheng, “Butyrate greatly enhances derivation of human induced pluripotent stem cells by promoting epigenetic remodeling and the expression of pluripotency-associated genes.,” *Stem Cells*, vol. 28, no. 4, 2010.
- [43] R. Trokovic, J. Weltner, T. Manninen, M. Mikkola, K. Lundin, R. Hämäläinen, A. Suomalainen, and T. Otonkoski, “Small Molecule Inhibitors Promote Efficient Generation of Induced Pluripotent Stem Cells From Human Skeletal Myoblasts.,” *Stem Cells Dev.*, vol. 22, no. 1, 2012.
- [44] Y. Yoshida, K. Takahashi, K. Okita, T. Ichisaka, and S. Yamanaka, “Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells.,” *Cell Stem Cell*, vol. 5, no. 3, 2009.
- [45] C.-W. Chang, Y.-S. Lai, K. M. Pawlik, K. Liu, C.-W. Sun, C. Li, T. R. Schoeb, and T. M. Townes, “Polycistronic Lentiviral Vector for ““ Hit and Run ”” Reprogramming of Adult Skin Fibroblasts to Induced Pluripotent Stem Cells,” *Stem Cells*, vol. 27, 2009.
- [46] Y. Rais, A. Zviran, S. Geula, O. Gafni, E. Chomsky, S. Viukov, A. A. Mansour, I. Caspi, V. Krupalnik, M. Zerbib, I. Maza, N. Mor, D. Baran, L. Weinberger, D. A. Jaitin, D. Lara-Astiaso, R. Blecher-Gonen, Z. Shipony, Z. Mukamel, T. Hagai, S. Gilad, D. Amann-Zalcenstein, A. Tanay, I. Amit, N. Novershtern, and J. H. Hanna, “Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency.,” *Nature*, vol. 502, no. 7469, 2013.
- [47] F. Soldner, D. Hockemeyer, C. Beard, Q. Gao, G. W. Bell, E. G. Cook, G. Hargus, A. Blak, O. Cooper, M. Mitalipova, O. Isacson, and R. Jaenisch, “Parkinson’s disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors.,” *Cell*, vol. 136, no. 5, 2009.
- [48] N. Fusaki, H. Ban, A. Nishiyama, K. Saeki, and M. Hasegawa, “Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome,” *Proc. Japan Acad. Ser. B*, vol. 85, no. 8, 2009.

- [49] M. Stadtfeld, M. Nagaya, J. Utikal, G. Weir, and K. Hochedlinger, "Induced pluripotent stem cells generated without viral integration," *Science* (80-. ), vol. 322, no. 5903, 2008.
- [50] F. Gonzalez, M. Barragan Monasterio, G. Tiscornia, N. Montserrat Pulido, R. Vassena, L. Batlle Morera, I. Rodriguez Piza, and J. C. Izpisua Belmonte, "Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 22, 2009.
- [51] J. Yu, K. Hu, K. Smuga-Otto, S. Tian, R. Stewart, I. I. Slukvin, and J. Thomson, "Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences.," *Science* (80-. ), vol. 324, no. 5928, 2009.
- [52] F. Jia, K. D. Wilson, N. Sun, D. M. Gupta, M. Huang, Z. Li, N. J. Panetta, Z. Y. Chen, R. C. Robbins, M. A. Kay, M. T. Longaker, and J. C. Wu, "A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells.," *Nat. Methods*, vol. 7, no. 3, 2010.
- [53] K. Woltjen, I. P. Michael, P. Mohseni, R. Desai, M. Mileikovsky, R. Hämläinen, R. Cowling, W. Wang, P. Liu, M. Gertsenstein, and others, "piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells," *Nature*, vol. 458, no. 7239, 2009.
- [54] K. Yusa, R. Rad, J. Takeda, and A. Bradley, "Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon," *Nature*, vol. 6, no. 5, 2009.
- [55] L. Warren, P. D. Manos, T. Ahfeldt, Y.-H. Loh, H. Li, F. Lau, W. Ebina, P. K. Mandal, Z. D. Smith, A. Meissner, G. Q. Daley, A. S. Brack, J. J. Collins, C. Cowan, T. M. Schlaeger, and D. J. Rossi, "Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA.," *Cell Stem Cell*, vol. 7, no. 5, 2010.
- [56] F. Anokye-Danso, C. M. Trivedi, D. Jühr, M. Gupta, Z. Cui, Y. Tian, Y. Zhang, W. Yang, P. J. Gruber, J. Epstein, and E. E. Morrisey, "Highly Efficient miRNA-Mediated Reprogramming of Mouse and Human Somatic Cells to Pluripotency.," *Cell Stem Cell*, vol. 8, no. 4, 2011.
- [57] H. Zhou, S. Wu, J. Y. Joo, S. Zhu, D. W. Han, T. Lin, S. Trauger, G. Bien, S. Yao, Y. Zhu, G. Siuzdak, H. R. Schöler, L. Duan, and S. Ding, "Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins.," *Cell Stem Cell*, vol. 4, no. 5, 2009.
- [58] D. Kim, C. Kim, J. Moon, Y. Chung, M. Chang, B. Han, S. Ko, E. Yang, K. Y. Cha, R. Lanza, and K. Kim, "Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Direct Delivery of Reprogramming Proteins," *Cell Stem Cell*, vol. 4, no. 6, 2009.

- [59] P. Hou, Y. Li, X. Zhang, C. Liu, J. Guan, H. Li, T. Zhao, J. Ye, W. Yang, K. Liu, J. Ge, J. Xu, Q. Zhang, Y. Zhao, and H. Deng, "Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds.," *Science*, vol. 341, no. 6146, 2013.
- [60] S. Masuda, J. Wu, T. Hishida, G. N. Pandian, H. Sugiyama, and J. C. Izpisua Belmonte, "Chemically induced pluripotent stem cells (CiPSCs): a transgene-free approach.," *J. Mol. Cell Biol.*, vol. 5, no. 5, 2013.
- [61] M. Li and J. C. I. Belmonte, "No factor left behind: generation of transgene-free induced pluripotent stem cells," *Am. J. Stem Cells*, vol. 1, no. 1, 2012.
- [62] I.-H. Park, N. Arora, H. Huo, N. Maherali, T. Ahfeldt, A. Shimamura, M. W. Lensch, C. Cowan, K. Hochedlinger, and G. Q. Daley, "Disease-specific induced pluripotent stem cells.," *Cell*, vol. 134, no. 5, 2008.
- [63] A. Fatima, S. Kaifeng, S. Dittmann, G. Xu, M. K. Gupta, M. Linke, U. Zechner, F. Nguemo, H. Milting, M. Farr, J. Hescheler, and T. Sarić, "The Disease-Specific Phenotype in Cardiomyocytes Derived from Induced Pluripotent Stem Cells of Two Long QT Syndrome Type 3 Patients.," *PLoS One*, vol. 8, no. 12, 2013.
- [64] A. D. Ebert, J. Yu, F. F. Rose, V. B. Mattis, C. L. Lorson, J. Thomson, and C. N. Svendsen, "Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient.," *Nature*, vol. 457, no. 7227, 2009.
- [65] X. Carvajal-Vergara, A. Sevilla, S. L. D'Souza, Y.-S. Ang, C. Schaniel, D.-F. Lee, L. Yang, A. D. Kaplan, E. D. Adler, R. Rozov, Y. Ge, N. Cohen, L. J. Edelmann, B. Chang, A. Waghray, J. Su, S. Pardo, K. D. Lichtenbelt, M. Tartaglia, B. D. Gelb, and I. R. Lemischka, "Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome.," *Nature*, vol. 465, no. 7299, 2010.
- [66] J. T. Dimos, K. T. Rodolfa, K. K. Niakan, L. M. Weisenthal, H. Mitsumoto, W. Chung, G. F. Croft, G. Saphier, R. Leibel, R. Goland, H. Wichterle, C. E. Henderson, and K. Eggan, "Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons.," *Science*, vol. 321, no. 5893, 2008.
- [67] N. Egawa, S. Kitaoka, K. Tsukita, M. Naitoh, K. Takahashi, T. Yamamoto, F. Adachi, T. Kondo, K. Okita, I. Asaka, T. Aoi, A. Watanabe, Y. Yamada, A. Morizane, J. Takahashi, T. Ayaki, H. Ito, K. Yoshikawa, S. Yamawaki, S. Suzuki, D. Watanabe, H. Hioki, T. Kaneko, K. Makioka, K. Okamoto, H. Takuma, A. Tamaoka, K. Hasegawa, T. Nonaka, M. Hasegawa, A. Kawata, M. Yoshida, T. Nakahata, R. Takahashi, M. C. N. Marchetto, F. H. Gage, S. Yamanaka, and H. Inoue, "Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells.," *Sci. Transl. Med.*, vol. 4, no. 145, 2012.



- [68] R. Maehr, S. Chen, M. Snitow, T. Ludwig, L. Yagasaki, R. Goland, R. L. Leibel, and D. a Melton, "Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 37, 2009.
- [69] O. Sirenko, E. F. Cromwell, C. Crittenden, J. a Wignall, F. a Wright, and I. Rusyn, "Assessment of beating parameters in human induced pluripotent stem cells enables quantitative in vitro screening for cardiotoxicity.," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 273, no. 3, 2013.
- [70] J. Hanna, M. Wernig, S. Markoulaki, C.-W. Sun, A. Meissner, J. P. Cassady, C. Beard, T. Brambrink, L.-C. Wu, T. M. Townes, and R. Jaenisch, "Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin.," *Science (80-. )*, vol. 318, no. 5858, 2007.
- [71] N. Maherali and K. Hochedlinger, "Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells," *Cell Stem Cell*, vol. 3, no. 6, 2008.
- [72] K. Okita, T. Ichisaka, and S. Yamanaka, "Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells.," *Nature*, vol. 448, no. 7151, 2007.
- [73] A. M. Newman and J. B. Cooper, "Lab-specific gene expression signatures in pluripotent stem cells.," *Cell Stem Cell*, vol. 7, no. 2, 2010.
- [74] K. Kim, A. Doi, B. Wen, K. Ng, R. Zhao, P. Cahan, J. Kim, M. J. Aryee, H. Ji, L. I. R. Ehrlich, A. Yabuuchi, A. Takeuchi, K. C. Cunniff, H. Hongguang, S. McKinney-Freeman, O. Naveiras, T. J. Yoon, R. A. Irizarry, N. Jung, J. Seita, J. Hanna, P. Murakami, R. Jaenisch, R. Weissleder, S. H. Orkin, I. L. Weissman, A. P. Feinberg, and G. Q. Daley, "Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells.," *Nature*, vol. 467, no. 7313, 2010.
- [75] P. Rogoziński, A. Wiencek-Weiss, T. Kaczor, K. Bruliński, P. Wandzel, and M. Kucharzewski, "Large teratoma in anterior mediastinum – complication of invasive diagnostic procedure," *Polish J. Cardio-Thoracic Surg.*, vol. 3, no. 3, 2012.
- [76] T. Zhao, Z. Zhang, Z. Rong, and Y. Xu, "Immunogenicity of induced pluripotent stem cells," *Cell*, vol. 474, 2011.
- [77] M. R. Veldwijk, S. Berlinghoff, S. Laufs, U. R. Hengge, W. J. Zeller, F. Wenz, and S. Fruehauf, "Suicide gene therapy of sarcoma cell lines using recombinant adeno-associated virus 2 vectors.," *Cancer Gene Ther.*, vol. 11, no. 8, 2004.
- [78] A. Neschadim, J. C. M. Wang, A. Lavie, and J. a Medin, "Bystander killing of malignant cells via the delivery of engineered thymidine-active deoxycytidine kinase for suicide gene therapy of cancer.," *Cancer Gene Ther.*, vol. 19, no. 5, 2012.
- [79] M. T. Tomicic, R. Thust, and B. Kaina, "Ganciclovir-induced apoptosis in HSV-1 thymidine kinase expressing cells : critical role of DNA breaks , Bcl-2 decline and caspase-9 activation," *Oncogene*, vol. 21, 2002.

- [80] B. Zhong, K. L. Watts, J. L. Gori, M. E. Wohlfahrt, J. Enssle, J. E. Adair, and H.-P. Kiem, "Safeguarding nonhuman primate iPS cells with suicide genes.," *Mol. Ther.*, vol. 19, no. 9, 2011.
- [81] M. I. L. De Lau and M. B. M. Breteler, "Epidemiology of Parkinson's disease," *Lancet Neurol.*, vol. 75, no. 15, 2010.
- [82] T. Gasser, "Update on the genetics of Parkinson's disease.," *Mov. Disord.*, vol. 22, 2007.
- [83] A. E. Lang and A. M. Lozano, "Parkinson's Disease," *N. Engl. J. Med.*, vol. 339, no. 15, 1998.
- [84] D. J. Gelb, E. Oliver, and S. Gilman, "Diagnostic criteria for Parkinson disease.," *Arch. Neurol.*, vol. 56, no. 1, 1999.
- [85] K. Ossowska, "Farmakologia choroby Parkinsona i stwardnienia zanikowego bocznego," *Farm. Pol.*, vol. LXI, no. 11, 2005.
- [86] C. Waters, "Treatment of advanced stage patients with Parkinson's disease," *Parkinsonism Relat. Disord.*, vol. 9, no. 1, 2002.
- [87] S. Varanese, Z. Birnbaum, R. Rossi, and A. Di Rocco, "Treatment of advanced Parkinson's disease.," *Parkinsons. Dis.*, vol. 2010, 2010.
- [88] P. Brundin, R. E. Strecker, O. Lindvall, O. Isacson, O. G. Nilsson, G. BARBIN, A. Prochiantz, C. Forni, A. Nieoullon, H. Widner, F. H. Gage, and A. Bjorklund, "Intracerebral Grafting of Dopamine Neurons.," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 495, 1987.
- [89] C. Freed, R. E. Breeze, N. L. Rosenberg, and S. . Schneck, "Survival of implanted fetal dopamine cells and neurologic improvement 12 to 46 months after transplantation for Parkinson's disease," *N. Engl. J. Med.*, vol. 327, no. 22, 1992.
- [90] C. Freed and P. Greene, "Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease," *N. Engl. J. Med.*, vol. 344, no. 10, 2001.
- [91] D.-Y. Hwang, D.-S. Kim, and D.-W. Kim, "Human ES and iPS cells as cell sources for the treatment of Parkinson's disease: current state and problems.," *J. Cell. Biochem.*, vol. 109, no. 2, 2010.
- [92] Z. Kefalopoulou, M. Politis, P. Piccini, N. Mencacci, K. Bhatia, M. Jahanshahi, H. Widner, S. Rehncrona, P. Brundin, A. Björklund, O. Lindvall, P. Limousin, N. Quinn, and T. Foltynie, "Long-term clinical outcome of fetal cell transplantation for Parkinson disease: two case reports.," *JAMA Neurol.*, vol. 71, no. 1, 2014.
- [93] J. B. Schulz, "Update on the pathogenesis of Parkinson's disease.," *J. Neurol.*, vol. 255, 2008.

- [94] B. Machaliński, “Nieembrionalne komórki macierzyste a regeneracja układu nerwowego,” *Pol. Przegląd Neurol.*, vol. 4, no. 1, 2008.
- [95] G. Hargus, O. Cooper, M. Deleidi, A. Levy, K. Lee, E. Marlow, A. Yow, F. Soldner, D. Hockemeyer, P. J. Hallett, T. Osborn, R. Jaenisch, and O. Isacson, “Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats,” *PNAS*, vol. 107, no. 36, 2010.
- [96] M. Wernig, J.-P. Zhao, J. Pruszak, E. Hedlund, D. Fu, F. Soldner, V. Broccoli, M. Constantine-Paton, O. Isacson, and R. Jaenisch, “Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson’s disease,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 15, 2008.
- [97] Y. Rhee, J. Ko, M. Chang, S. Yi, D. Kim, C. Kim, J. Shim, A. Jo, B. Kim, H. Lee, S. Lee, W. Suh, C. Park, H. Koh, Y. Lee, R. Lanza, K. Kim, and S. Lee, “Protein-based human iPS cells efficiently generate functional dopamine neurons and can treat a rat model of Parkinson disease,” *Regen. Med.*, vol. 121, no. 6, 2011.
- [98] S. H. Lee, N. Lumelsky, L. Studer, J. M. Auerbach, R. D. McKay, and others, “Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 18, no. 6, 2000.
- [99] A. Sánchez-Danés, Y. Richaud-Patin, I. Carballo-Carbajal, S. Jiménez-Delgado, C. Caig, S. Mora, C. Di Guglielmo, M. Ezquerro, B. Patel, A. Giralt, J. M. Canals, M. Memo, J. Alberch, J. López-Barneo, M. Vila, A. M. Cuervo, E. Tolosa, A. Consiglio, and A. Raya, “Disease-specific phenotypes in dopamine neurons from human iPS-based models of genetic and sporadic Parkinson’s disease,” *EMBO Mol. Med.*, vol. 4, no. 5, 2012.
- [100] R. Betarbet, T. B. Sherer, and J. T. Greenamyre, “Animal models of Parkinson’s disease,” *BioEssays*, vol. 24, no. 4, 2002.
- [101] G. Paxinos and C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Sixth Edit., vol. Sixth edition. Elsevier, 2007.
- [102] V. Jackson-Lewis and S. Przedborski, “Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson’s disease,” *Nat. Protoc.*, vol. 2, no. 1, 2007.
- [103] T. M. Dawson, H. S. Ko, and V. L. Dawson, “Genetic animal models of Parkinson’s disease,” *Neuron*, vol. 66, no. 5, 2010.
- [104] T. Aasen and J. C. I. Belmonte, “Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells,” *Nat. Protoc.*, vol. 5, no. 2, 2010.
- [105] K. Watanabe, M. Ueno, D. Kamiya, A. Nishiyama, M. Matsumura, T. Wataya, J. B. Takahashi, S. Nishikawa, S. Nishikawa, K. Muguruma, and Y. Sasai, “A

- ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells.," *Nat. Biotechnol.*, vol. 25, no. 6, 2007.
- [106] J. Zhang, G. F. Wilson, A. G. Soerens, C. H. Koonce, J. Yu, S. P. Palecek, J. a Thomson, and T. J. Kamp, "Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells.," *Circ. Res.*, vol. 104, no. 4, 2009.
- [107] S. M. Chambers, C. a Fasano, E. P. Papapetrou, M. Tomishima, M. Sadelain, and L. Studer, "Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling.," *Nat. Biotechnol.*, vol. 27, no. 3, 2009.
- [108] G. Paxinos and K. B. J. Franklin, *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Second edition. Academic Press, 2001.
- [109] M. I. Lai, W. Y. Wendy-Yeo, R. Ramasamy, N. Nordin, R. Rosli, A. Veerakumarasivam, and S. Abdullah, "Advancements in reprogramming strategies for the generation of induced pluripotent stem cells.," *J. Assist. Reprod. Genet.*, vol. 28, no. 4, 2011.
- [110] J. Hanna, S. Markoulaki, P. Schorderet, B. W. Carey, C. Beard, M. Wernig, M. P. Creighton, E. J. Steine, J. P. Cassady, R. Foreman, C. J. Lengner, J. a Dausman, and R. Jaenisch, "Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency.," *Cell*, vol. 133, no. 2, 2008.
- [111] X. Meng, A. Neises, R.-J. Su, K. J. Payne, L. Ritter, D. S. Gridley, J. Wang, M. Sheng, K.-H. W. Lau, D. J. Baylink, and X.-B. Zhang, "Efficient reprogramming of human cord blood CD34+ cells into induced pluripotent stem cells with OCT4 and SOX2 alone.," *Mol. Ther.*, vol. 20, no. 2, 2012.
- [112] J. B. Kim, B. Greber, M. J. Araúzo-Bravo, J. Meyer, K. I. Park, H. Zaehres, and H. R. Schöler, "Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4.," *Nature*, vol. 461, no. 7264, 2009.
- [113] S. Ruiz, K. Brennand, A. D. Panopoulos, A. Herreras, F. H. Gage, and J. C. Izpisua-Belmonte, "High-efficient generation of induced pluripotent stem cells from human astrocytes.," *PLoS One*, vol. 5, no. 12, 2010.
- [114] T. Aasen, A. Raya, M. J. Barrero, E. Garreta, A. Consiglio, F. Gonzalez, R. Vassena, J. Bilić, V. Pekarik, G. Tiscornia, M. Edel, S. Boué, and J. C. Izpisua Belmonte, "Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes.," *Nat. Biotechnol.*, vol. 26, no. 11, 2008.
- [115] N. Yacoub, M. Romanowska, N. Haritonova, and J. Foerster, "Optimized production and concentration of lentiviral vectors containing large inserts," *J. Gene Med.*, vol. 9, 2007.
- [116] R. Li, J. Liang, S. Ni, T. Zhou, X. Qing, H. Li, W. He, J. Chen, F. Li, Q. Zhuang, B. Qin, J. Xu, W. Li, J. Yang, Y. Gan, D. Qin, S. Feng, H. Song, D. Yang, B. Zhang, L. Zeng, L. Lai, M. A. Esteban, and D. Pei, "A mesenchymal-to-epithelial

- transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts.,” *Cell Stem Cell*, vol. 7, no. 1, 2010.
- [117] J. Silva, O. Barrandon, J. Nichols, J. Kawaguchi, T. W. Theunissen, and A. Smith, “Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition.,” *PLoS Biol.*, vol. 6, no. 10, 2008.
- [118] M. A. Esteban, T. Wang, B. Qin, J. Yang, D. Qin, J. Cai, W. Li, Z. Weng, J. Chen, S. Ni, K. Chen, Y. Li, X. Liu, J. Xu, S. Zhang, F. Li, W. He, K. Labuda, Y. Song, A. Peterbauer, S. Wolbank, H. Redl, M. Zhong, D. Cai, L. Zeng, and D. Pei, “Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells.,” *Cell Stem Cell*, vol. 6, no. 1, 2010.
- [119] K. Nishimura, M. Sano, M. Ohtaka, B. Furuta, Y. Umemura, Y. Nakajima, Y. Ikehara, T. Kobayashi, H. Segawa, S. Takayasu, H. Sato, K. Motomura, E. Uchida, T. Kanayasu-Toyoda, M. Asashima, H. Nakauchi, T. Yamaguchi, and M. Nakanishi, “Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 6, 2011.
- [120] J. Jozefczuk, K. Drews, and J. Adjaye, “Preparation of mouse embryonic fibroblast cells suitable for culturing human embryonic and induced pluripotent stem cells.,” *J. Vis. Exp.*, no. 64, 2012.
- [121] G. M. Beattie, A. D. Lopez, N. Bucay, A. Hinton, M. T. Firpo, C. C. King, and A. Hayek, “Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers.,” *Stem Cells*, vol. 23, no. 4, 2005.
- [122] H. Kawasaki, K. Mizuseki, S. Nishikawa, S. Kaneko, Y. Kuwana, S. Nakanishi, S. I. Nishikawa, and Y. Sasai, “Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell–derived inducing activity,” *Neuron*, vol. 28, no. 1, 2000.
- [123] C. Martinat, J.-J. Bacci, T. Leete, J. Kim, W. B. Vanti, A. H. Newman, J. H. Cha, U. Gether, H. Wang, and A. Abeliovich, “Cooperative transcription activation by Nurr1 and Pitx3 induces embryonic stem cell maturation to the midbrain dopamine neuron phenotype.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 8, 2006.
- [124] U. Lendahl, L. B. Zimmerman, and R. D. G. McKay, “CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein,” *Cell*, vol. 60, no. 4, 1990.
- [125] A. L. Perrier, V. Tabar, T. Barberi, M. E. Rubio, J. Bruses, N. Topf, N. L. Harrison, and L. Studer, “Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 34, 2004.
- [126] J.-Y. Ko, C.-H. Park, H.-C. Koh, Y.-H. Cho, J.-H. Kyhm, Y.-S. Kim, I. Lee, Y.-S. Lee, and S.-H. Lee, “Human embryonic stem cell-derived neural precursors as a continuous, stable, and on-demand source for human dopamine neurons.,” *J. Neurochem.*, vol. 103, no. 4, 2007.

- [127] S. Diecke, A. Quiroga-Negreira, T. Redmer, and D. Besser, “FGF2 signaling in mouse embryonic fibroblasts is crucial for self-renewal of embryonic stem cells.,” *Cells. Tissues. Organs*, vol. 188, no. 1–2, 2008.
- [128] W. Ye, K. Shimamura, J. L. Rubenstein, M. a Hynes, and A. Rosenthal, “FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate.,” *Cell*, vol. 93, no. 5, 1998.
- [129] E. Gale and M. Li, “Midbrain dopaminergic neuron fate specification: Of mice and embryonic stem cells.,” *Mol. Brain*, vol. 1, 2008.
- [130] J. Bilic and J. C. Izpisua Belmonte, “Concise review: Induced pluripotent stem cells versus embryonic stem cells: close enough or yet too far apart?,” *Stem Cells*, vol. 30, no. 1, 2012.
- [131] R. L. Branton, R. M. Love, and D. J. Clarke, “cAMP included during cell suspension preparation improves survival of dopaminergic neurons in vitro.,” *Neuroreport*, vol. 9, no. 14, 1998.
- [132] H. H. Kalir and C. Mytilineou, “Ascorbic Acid in Mesencephalic Cultures: Effects on Dopaminergic Neuron Development,” *J. Neurochem.*, vol. 57, no. 2, 1991.
- [133] K. A. Goetz, B. Scheffler, H.-X. Chen, S. Wang, O. Suslov, H. Xiang, O. Brüstle, S. N. Roper, and D. a Steindler, “Temporally restricted substrate interactions direct fate and specification of neural precursors derived from embryonic stem cells.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 29, 2006.
- [134] J. H. Kim, J. M. Auerbach, J. A. Rodriguez-Gómez, I. Velasco, D. Gavin, N. Lumelsky, S. H. Lee, J. Nguyen, R. Sánchez-Pernaute, K. Bankiewicz, and others, “Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson’s disease,” *Nature*, vol. 418, no. 6893, 2002.
- [135] C.-H. Park, Y.-K. Minn, J.-Y. Lee, D. H. Choi, M.-Y. Chang, J.-W. Shim, J.-Y. Ko, H.-C. Koh, M. J. Kang, J. S. Kang, D.-J. Rhie, Y.-S. Lee, H. Son, S. Y. Moon, K.-S. Kim, and S.-H. Lee, “In vitro and in vivo analyses of human embryonic stem cell-derived dopamine neurons.,” *J. Neurochem.*, vol. 92, no. 5, 2005.
- [136] O. Cooper, G. Hargus, M. Deleidi, A. Blak, T. Osborn, K. Lee, A. Levy, E. Perez-torres, A. Yow, and O. Isacson, “Differentiation of human ES and Parkinson’s disease iPS cells into ventral midbrain dopaminergic neurons requires a high activity form of SHH, FGF8a and specific regionalization by retinoic acid,” *Mol. Cell*, vol. 45, no. 3, 2011.
- [137] J. R. Smith, L. Vallier, G. Lupo, M. Alexander, W. a Harris, and R. a Pedersen, “Inhibition of Activin/Nodal signaling promotes specification of human embryonic stem cells into neuroectoderm.,” *Dev. Biol.*, vol. 313, no. 1, 2008.

- [138] Y. Liu, H. Liu, C. Sauvey, L. Yao, E. D. Zarnowska, and S.-C. Zhang, “Directed differentiation of forebrain GABA interneurons from human pluripotent stem cells.,” *Nat. Protoc.*, vol. 8, no. 9, 2013.
- [139] R. Xu, T. L. Barron, F. Gu, S. Root, R. M. Peck, J. Yu, J. Antosiewicz-bourget, S. Tian, R. Stewart, and J. A. Thomson, “NANOG is a Direct Target of TGF $\beta$ /Activin Mediated SMAD Signaling in Human ES Cells,” *Cell Stem Cell*, vol. 3, no. 2, 2008.
- [140] I. Muñoz-Sanjuán and A. H. Brivanlou, “Neural induction, the default model and embryonic stem cells.,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 3, no. 4, 2002.
- [141] D. M. Valenzuela, M. Lamb, L. Nuiñez, N. Y. Ip, R. Espinosa, D. J. Gilbert, N. G. Copeland, M. Le Beau, M. Harland, and D. Yancopoulos, “Identification of Mammalian Nervous System Noggin and Its Expression in the Adult Nervous System,” *J. Neurosci.*, vol. 15, no. 9, 1995.
- [142] R. L. Davis, H. Weintraub, and A. B. Lassar, “Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts,” *Cell*, vol. 51, no. 6, 1987.
- [143] L. Qian, Y. Huang, C. I. Spencer, A. Foley, A. Vedantham, L. Liu, S. J. Conway, J. Fu, and D. Srivastava, “In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes,” *Nature*, vol. 485, no. 7400, 2012.
- [144] O. Torper, U. Pfisterer, D. a Wolf, M. Pereira, S. Lau, J. Jakobsson, A. Björklund, S. Grealish, and M. Parmar, “Generation of induced neurons via direct conversion in vivo.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 17, 2013.
- [145] A. Slominski, D. J. Tobin, S. Shibahara, and J. Wortsman, “Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation.,” *Physiol. Rev.*, vol. 84, no. 4, 2004.
- [146] H. Kawasaki, H. Suemori, K. Mizuseki, K. Watanabe, F. Urano, H. Ichinose, M. Haruta, M. Takahashi, K. Yoshikawa, S.-I. Nishikawa, N. Nakatsuji, and Y. Sasai, “Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 3, 2002.
- [147] S. Ohta, Y. Imaizumi, Y. Okada, W. Akamatsu, R. Kuwahara, M. Ohyama, M. Amagai, Y. Matsuzaki, S. Yamanaka, H. Okano, and Y. Kawakami, “Generation of human melanocytes from induced pluripotent stem cells.,” *PLoS One*, vol. 6, no. 1, 2011.
- [148] R. Yang, M. Jiang, S. M. Kumar, T. Xu, F. Wang, L. Xiang, and X. Xu, “Generation of melanocytes from induced pluripotent stem cells.,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 131, no. 12, 2011.
- [149] J. C. Jones, K. Sabatini, X. Liao, H. T. Tran, C. L. Lynch, R. E. Morey, V. Glenn-Pratola, F. S. Boscolo, Q. Yang, M. M. Parast, Y. Liu, S. E. Peterson, L. C. Laurent, J. F. Loring, and Y.-C. Wang, “Melanocytes derived from transgene-

- free human induced pluripotent stem cells,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 133, no. 8, 2013.
- [150] J. Lin, I. Fernandez, and K. Roy, “Development of Feeder-Free Culture Systems for Generation of ckit+scal1+ Progenitors from Mouse iPS Cells Jian,” *Stem C*, vol. 7, no. 3, 2011.
- [151] H. Fedorow, F. Tribl, G. Halliday, M. Gerlach, P. Riederer, and K. L. Double, “Neuromelanin in human dopamine neurons: comparison with peripheral melanins and relevance to Parkinson’s disease,” *Prog. Neurobiol.*, vol. 75, no. 2, 2005.
- [152] K. L. Double, D. Ben-Shachar, M. B. H. Youdim, L. Zecca, P. Riederer, and M. Gerlach, “Influence of neuromelanin on oxidative pathways within the human substantia nigra,” *Neurotoxicol. Teratol.*, vol. 24, no. 5, 2002.
- [153] D. Sulzer, J. Bogulavsky, K. E. Larsen, G. Behr, E. Karatekin, M. H. Kleinman, N. Turro, D. Krantz, R. H. Edwards, L. a Greene, and L. Zecca, “Neuromelanin biosynthesis is driven by excess cytosolic catecholamines not accumulated by synaptic vesicles,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 22, 2000.
- [154] J. W. Langston, L. S. Forno, J. Tetrad, A. G. Reeves, J. A. Kaplan, and D. Karluk, “Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure,” *Ann. Neurol.*, vol. 46, no. 4, 1999.
- [155] L. S. Forno, “Neuropathology of Parkinson’s disease,” *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 55, no. 3, 1996.
- [156] K. Ikemoto, I. Nagatsu, S. Ito, and R. A. King, “Does tyrosinase exist in neuromelanin-pigmented neurons in the human substantia nigra ?,” *Neurosci. Lett.*, vol. 253, 1998.
- [157] J. D. Miller, Y. M. Ganat, S. Kishinevsky, R. L. Bowman, B. Liu, E. Y. Tu, P. K. Mandal, E. Vera, J. Shim, S. Kriks, T. Taldone, N. Fusaki, M. J. Tomishima, D. Krainc, T. A. Milner, D. J. Rossi, and L. Studer, “Human iPSC-Based Modeling of Late-Onset Disease via Progerin-Induced Aging,” *Stem Cell*, vol. 13, no. 6, 2013.
- [158] K. Wakamatsu, T. Murase, F. a Zucca, L. Zecca, and S. Ito, “Biosynthetic pathway to neuromelanin and its aging process,” *Pigment Cell Melanoma Res.*, vol. 25, no. 6, 2012.
- [159] A. Nguyen, G. Gille, R. Moldzio, S.-T. Hung, and W.-D. Rausch, “Synthetic neuromelanin is toxic to dopaminergic cell cultures,” *J. Neural Transm.*, vol. 109, 2002.
- [160] W. Zhang, L. Zecca, B. Wilson, R. Ren, Y. Wang, X. Wang, and Nj.-S. Hong, “Human neuromelanin: an endogenous microglial activator for dopaminergic neuron death,” *Front Biosci*, vol. 5, 2013.



- [161] M. Fasano, S. Giraud, S. Cocha, B. Bergamasco, and L. Lopiano, "Residual substantia nigra neuromelanin in Parkinson's disease is cross-linked to alpha-synuclein.," *Neurochem. Int.*, vol. 42, no. 7, 2003.
- [162] M. Shamoto-Nagai, W. Maruyama, Y. Akao, T. Osawa, F. Tribl, M. Gerlach, F. a Zucca, L. Zecca, P. Riederer, and M. Naoi, "Neuromelanin inhibits enzymatic activity of 26S proteasome in human dopaminergic SH-SY5Y cells.," *J. Neural Transm.*, vol. 111, 2004.
- [163] R. K. Schwarting and J. P. Huston, "The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments.," *Prog. Neurobiol.*, vol. 50, no. 2–3, 1996.
- [164] L. M. Bjorklund, R. Sánchez-Pernaute, S. Chung, T. Andersson, I. Y. C. Chen, K. S. P. McNaught, A.-L. Brownell, B. G. Jenkins, C. Wahlestedt, K.-S. Kim, and O. Isacson, "Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 4, 2002.
- [165] D. Yang, Z.-J. Zhang, M. Oldenburg, M. Ayala, and S.-C. Zhang, "Human embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons reverse functional deficit in parkinsonian rats.," *Stem Cells*, vol. 26, no. 1, 2008.
- [166] J.-H. Kim, J. M. Auerbach, J. a Rodríguez-Gómez, I. Velasco, D. Gavin, N. Lumelsky, S.-H. Lee, J. Nguyen, R. Sánchez-Pernaute, K. Bankiewicz, and R. McKay, "Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease.," *Nature*, vol. 418, no. 6893, 2002.
- [167] M. Wernig, F. Benninger, T. Schmandt, M. Rade, K. L. Tucker, H. Büssov, H. Beck, and O. Brüstle, "Functional integration of embryonic stem cell-derived neurons in vivo.," *J. Neurosci.*, vol. 24, no. 22, 2004.
- [168] P. Hagell and P. Brundin, "Cell survival and clinical outcome following intrastriatal transplantation in Parkinson disease.," *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 60, no. 8, 2001.
- [169] C. Apostolides, E. Sanford, M. Hong, and I. Mendez, "Glial cell line-derived neurotrophic factor improves intrastriatal graft survival of stored dopaminergic cells," *Neuroscience*, vol. 83, no. 2, 1998.
- [170] Y. Takagi, J. Takahashi, H. Saiki, A. Morizane, T. Hayashi, Y. Kishi, H. Fukuda, Y. Okamoto, M. Koyanagi, M. Ideguchi, H. Hayashi, T. Imazato, H. Kawasaki, H. Suemori, S. Omachi, H. Iida, N. Itoh, N. Nakatsuji, Y. Sasai, and N. Hashimoto, "Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model," *J. Clin. Invest.*, vol. 115, no. 1, 2005.
- [171] M. Inden, K. Takata, K. Nishimura, Y. Kitamura, E. Ashihara, K. Yoshimoto, H. Ariga, and O. Honmou, "Therapeutic Effects of Human Mesenchymal and

Hematopoietic Stem Cells on Rotenone-Treated Parkinsonian Mice,” *J. Neurosci. Res.*, vol. 91, 2013.

- [172] M. Inden, Y. Kitamura, M. Abe, A. Tamaki, K. Takata, and T. Taniguchi, “Parkinsonian rotenone mouse model: reevaluation of long-term administration of rotenone in C57BL/6 mice.,” *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 34, no. 1, 2011.
- [173] M. Inden, Y. Kitamura, H. Takeuchi, T. Yanagida, K. Takata, Y. Kobayashi, T. Taniguchi, K. Yoshimoto, M. Kaneko, Y. Okuma, T. Taira, H. Ariga, and S. Shimohama, “Neurodegeneration of mouse nigrostriatal dopaminergic system induced by repeated oral administration of rotenone is prevented by 4-phenylbutyrate, a chemical chaperone.,” *J. Neurochem.*, vol. 101, no. 6, 2007.
- [174] J. T. Greenamyre, J. R. Cannon, R. Drolet, and P. Mastroberardino, “Lessons from the rotenone model of Parkinson’s disease,” *Trends Pharmacol Sci.*, vol. 31, no. 4, 2011.
- [175] N. Sun, “Human iPS cell-based therapy,” *Cell Cycle*, 2010.
- [176] H. Kawai, T. Yamashita, Y. Ohta, K. Deguchi, S. Nagotani, X. Zhang, Y. Ikeda, T. Matsuura, and K. Abe, “Tridermal tumorigenesis of induced pluripotent stem cells transplanted in ischemic brain.,” *J. Cereb. blood flow Metab.*, vol. 30, no. 8, 2010.
- [177] G. Tiscornia, O. Singer, and I. M. Verma, “Production and purification of lentiviral vectors.,” *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 1, 2006.
- [178] A. C. Logan, S. J. Nightingale, D. L. Haas, G. J. Cho, K. a Pepper, and D. B. Kohn, “Factors influencing the titer and infectivity of lentiviral vectors.,” *Hum. Gene Ther.*, vol. 15, no. 10, 2004.
- [179] O. Wildner, J. C. Morris, N. N. Vahanian, H. Ford, W. J. Ramsey, and R. M. Blaese, “Adenoviral vectors capable of replication improve the efficacy of HSVtk/GCV suicide gene therapy of cancer.,” *Gene Ther.*, vol. 6, no. 1, 1999.
- [180] D. Shao, Q. Zeng, Z. Fan, J. Li, M. Zhang, Y. Zhang, O. Li, L. Chen, X. Kong, and H. Zhang, “Monitoring HSV-TK/ganciclovir cancer suicide gene therapy using CdTe/CdS core/shell quantum dots.,” *Biomaterials*, vol. 33, no. 17, 2012.
- [181] C. Beck, S. Cayeux, S. D. Lupton, B. Dorken, and T. Blankenstees, “The Thymidine Kinase/Ganciclovir-Mediated ‘Suicide’ Effect Is Variable in Different Tumor Cells,” *Hum. Gene Ther.*, vol. 6, 1995.
- [182] J.-C. Hervé, P. Phelan, R. Bruzzone, and T. W. White, “Connexins, innexins and pannexins: bridging the communication gap.,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1719, no. 1–2, 2005.
- [183] J. Czyz, “The stage-specific function of gap junctions during tumourigenesis.,” *Cell. Mol. Biol. Lett.*, vol. 13, no. 1, 2008.

- [184] M. Caruso, Y. Panis, S. Gagandeep, D. Houssin, J. L. Salzmman, and D. Klatzmann, "Regression of established macroscopic liver metastases after in situ transduction of a suicide gene.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 90, no. 15, 1993.
- [185] R. D. Alvarez, J. Gomez-Navarro, M. Wang, M. N. Barnes, T. V Strong, R. B. Arani, W. Arafat, J. V Hughes, G. P. Siegal, and D. T. Curiel, "Adenoviral-mediated suicide gene therapy for ovarian cancer.," *Mol. Ther.*, vol. 2, no. 5, 2000.
- [186] M. Schuldner, J. Itskovitz-Eldor, and N. Benvenisty, "Selective Ablation of Human Embryonic Stem Cells Expressing a 'Suicide' Gene," *Stem Cells*, vol. 21, 2003.
- [187] K. Wagner and D. Welch, "Feeder-free adaptation, culture and passaging of human IPS cells using complete Knockout Serum Replacement feeder-free medium.," *J. Vis. Exp.*, vol. 76, no. 41, 2010.
- [188] A. R. Brooks, R. N. Harkins, P. Wang, H. S. Qian, P. Liu, and G. M. Rubanyi, "Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle.," *J. Gene Med.*, vol. 6, no. 4, 2004.
- [189] J. Y. Qin, L. Zhang, K. L. Clift, I. Hular, A. P. Xiang, B.-Z. Ren, and B. T. Lahn, "Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter.," *PLoS One*, vol. 5, no. 5, 2010.
- [190] C. Teschendorf, K. H. Warrington, D. W. Siemann, and N. Muzyczka, "Comparison of the EF-1 alpha and the CMV promoter for engineering stable tumor cell lines using recombinant adeno-associated virus.," *Anticancer Res.*, vol. 22, no. 6A, 2002.