

**Uniwersytet Medyczny
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

mgr Marta Gładych

**KRAB-zależna metylacja promotorów komórkowych w ludzkich
komórkach pluripotentnych**

Praca doktorska
napisana pod kierunkiem promotora
dr hab. n. med. Macieja Wiznerowicza
w Katedrze Biotechnologii Medycznej
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Poznań – 2015

Serdecznie dziękuję

*Promotorowi – **dr hab. n. med. Maciejowi Wiznerowiczowi***

za wsparcie merytoryczne przy realizacji niniejszej pracy badawczej

oraz całemu zespołowi programu Welcome

za cenne wskazówki i życzliwą atmosferę pracy.

*Serdecznie dziękuję dr Urszuli Oleksiewicz
za wsparcie merytoryczne oraz cenne wskazówki
dotyczące realizacji rozprawy doktorskiej.*

*Serdecznie dziękuję **prof. dr hab. n.med. Rafałowi Płoskiemu**
za umożliwienie wykonania sekwencjonowania RRBS
w Zakładzie Genetyki Medycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
oraz za cenne wskazówki merytoryczne.*

Praca została zrealizowana w ramach projektu WELCOME/2010-3/3
pt. „Role of KAP1 and KRAB Zinc Finger Proteins in Epigenetic Mechanisms Involved in
Reprogramming and Self-Renewal of Induced Pluripotent Stem Cells”

Słowa kluczowe: metylacja DNA, TRIM28/KAP1, KRAB-ZNF, iPS

Keywords: DNA methylation TRIM28/KAP1, KRAB-ZNFs, iPS

Spis treści

Spis treści	7
Wykaz stosowanych skrótów	10
1. Wstęp	14
1.1 Źródła komórek pluripotencyjnych	15
1.2 Techniki reprogramowania komórek somatycznych w kierunku komórek iPS	16
1.3 Reprogramowanie jako proces epigenetyczny	17
1.4 Rola kompleksu KRAB/TRIM28 w komórkach pluripotencyjnych	18
1.5 Metylacja DNA	21
1.6 Ocena cało-genomowego profilu metylacji DNA	22
2. Cel pracy	24
3. Materiały i metody	25
3.1 Generowanie ludzkich komórek iPS zawierających system reporterowy do badania KRAB-zależnej represji promotora PGK w trakcie reprogramowania	25
3.1.1 Izolacja ludzkich pierwotnych fibroblastów skóry	25
3.1.2 Produkcja wektorów lentiwirusowych	26
3.1.3 Mianowanie wektorów lentiwirusów	28
3.1.4 Wektory plazmidowe wykorzystane do produkcji wektorów lentiwirusowych	29
3.1.5 Tworzenie wektora zawierającego promotor <i>PGK</i> z/bez sekwencji tetO	30
3.1.6 Izolacja plazmidowego DNA z hodowli maxi	33
3.1.7 Transdukcja komórek PHDF wektorami pLV-PGK-GP-tetO/pLV-PGK-GP oraz pLVE-HK	33
3.1.8 Reprogramowanie komórek PHDF do komórek iPS	33
3.1.9 Barwienie immunofluorescencyjne	35
3.1.10 Ocena kariotypu otrzymanych komórek hiPS	36
3.1.11 Ocena aktywności alkalicznej fosfatazy w komórkach hiPS	36
3.2 Ocena aktywności promotora <i>PGK</i> po reprogramowaniu	37
3.2.1 Analiza poziomu fluorescencji gfp poprzez cytometrię przepływową	37
3.2.2 Izolacja DNA	37
3.2.3 Sekwencjonowanie bisulfitowe	37
3.2.4 Immunoprecypitacja chromatyny (ChIP – chromatin immunoprecipitation)	39
3.3 Rola czynników KRAB-ZFP w utrzymywaniu stanu pluripotencyjnych komórek	40
3.3.1 Transfekcja siRNA	40
3.3.2 Izolacja RNA	43

3.3.3	Odwrotna transkrypcja	43
3.3.4	Amplifikacja cDNA metodą Real-Time qPCR	44
3.4	Ocena cało-genomowego profilu metylacji DNA	45
3.4.1	Przygotowanie bibliotek DNA do analizy RRBS	45
3.4.2	Analizy bioinformatyczne	46
4.	Wyniki.....	48
4.1	Ocena statusu promotora <i>PGK</i> w komórkach somatycznych	48
4.1.1	KRAB-zależna represja transkrypcji jest zjawiskiem odwracalnym w komórkach somatycznych.....	48
4.1.2	KRAB/TRIM28 inicjuje powstanie heterochromatyny w pobliżu miejsca swojego wiązania	50
4.1.3	KRAB-zależna represja transkrypcji nie jest związana z metylacją DNA w komórkach somatycznych.....	51
4.2	Ocena statusu promotora <i>PGK</i> w ludzkich komórkach iPS	52
4.2.1	Generacja komórek iPS z ludzkich pierwotnych fibroblastów skóry (PHDF) zawierających system reporterowy do badania KRAB-zależnej represji	52
4.2.2	Otrzymane komórki hiPS zawierające system reporterowy do badania KRAB-zależnej represji transkrypcji promotora <i>PGK</i> posiadają charakter pluripotentny.	53
4.2.3	KRAB-zależna represja transkrypcji promotora <i>PGK</i> w komórkach hiPS jest związana z metylacją DNA.....	54
4.2.4	KRAB-zależna represja transkrypcji jest zjawiskiem nieodwracalnym w ludzkich indukowanych komórkach pluripotentnych.....	56
4.3	Wpływ czynników transkrypcyjnych KRAB-ZFP na utrzymanie stanu pluripotencji komórek	57
4.3.1	Poziom ekspresji czynników KRAB-ZFP w komórkach somatycznych i komórkach hiPS	57
4.3.2	Wyciszenie ekspresji poszczególnych KRAB-ZFP powoduje utratę pluripotentnego charakteru komórek	58
4.4	Ocena cało-genomowego profilu metylacji DNA komórek somatycznych i pluripotentnych metodą RRBS	61
4.4.1	Korelacja profilu metylacji DNA pomiędzy analizowanymi próbkami	61
4.4.2	Analiza regionów DMR	62
5.	Omówienie wyników i dyskusja	65
5.1	KRAB/TRIM28-zależna represja transkrypcji w komórkach somatycznych i pluripotentnych.....	65
5.2	Rola białka TRIM28 oraz endogennych czynników KRAB-ZFP w komórkach pluripotentnych.....	67

5.3	Zmiany poziomu metylacji po reprogramowaniu komórek somatycznych do komórek iPS	70
6.	Wnioski	72
7.	Streszczenie w języku polskim	73
8.	Abstract	75
9.	Literatura	77
10.	Wykaz rycin	84
11.	Wykaz tabel i wykresów	86

Wykaz stosowanych skrótów

[³H]-dTTP – 5' trifosforan deoksytymidyny znakowany trytem (ang. *Deoxythymidine 5'-Triphosphate*)

5mC – metylowana cytozyna

AP – alkaliczna fosfataza (ang. *alkaline phosphatase*)

ATP – adenozyno-5'-trifosforan (ang. *adenosine triphosphate*)

β-FGF – czynnik wzrostu fibroblastów β (ang. *fibroblast growth factor β*)

bp – para zasad (ang. *base pair*)

BSA – surowicza albumina wołowa (ang. *bovine serum albumin*)

BSPP – sekwencjonowanie bisulfitowe z wykorzystaniem sond Padlock (ang. *bisulfite padlock probes*)

c-Myc – (ang. *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*)

ChIP – immunoprecypitacja chromatyny (ang. *chromatin immunoprecipitation*)

DMEM – pożywka Eagle'a zmodyfikowana przez Dulbecco (ang. *Dulbecco's modified Eagles medium*)

DNMT – metyltransferaza DNA (ang. *DNA methyltransferase*)

DOX – doksycyklina (ang. *doxycycline*)

ERVs – endogenne sekwencje retrowirusowe (ang. *endogenous retroviruses*)

ESCs – embrionalne komórki macierzyste (ang. *embryonic stem cells*)

FBS – płodowa surowica bydlęca (ang. *fetal bovine serum*)

GFP – białko zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescent protein*)

H3K4me_{2/3} – di- lub trimetylowana lizyna czwarta na histonie trzecim

H3K9me₃ – trimetylowana lizyna dziewiąta na histonie trzecim

H3K27me₃ – trimetylowana lizyna dwudziesta siódma na histonie trzecim

H4ac – acetylacja histonu czwartego

HATs – acetylotransferazy histonów (ang. *histone acetyltransferases*)

HBS – sól fizjologiczna buforowana fosforanami (ang. *hepes buffered saline*)

HDACs – deacetylazy histonów (ang. *histone deacetylases*)

HDMs – demetylazy histonów (ang. *histone demethylases*)

HEK-293T – ludzka linia komórek z nerki płodu z wprowadzonym dużym antygenem T wirusa SV-40 (ang. *human embryonic kidney 293T*)

HMTs – metyltransferazy histonów (ang. *histone methyltransferases*)

HP1 – białko heterochromatynowe 1 (ang. *heterochromatin protein 1*)

iPSCs – indukowane pluripotentne komórki macierzyste (ang. *induced pluripotent stem cells*)

IPTG – izopropyl- β -D-1-tiogalaktopiranozyd (ang. *isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*)

KAP1 – (ang. *KRAB-associated protein 1*)

KRAB – (ang. *Krüppel-associated box*)

KRAB-ZFPs – białka zawierające palce cynkowe oraz domenę KRAB (ang. *Krüppel-associated box-zinc finger proteins*)

KRIP-1 – (ang. *KRAB-interacting protein 1*)

KLF4 – (ang. *Krüppel-like factor 4*)

KSR – (ang. *KnockOut Serum Replacement*)

LTR – (ang. *long terminal repeat*)

LV – lentiwirus (ang. *lentivirus*)

MDB – białka wiążące metylowaną cytozynę (ang. *methyl-CpG-binding domain*)

MEF – mysie embrionalne fibroblasty (ang. *mouse embryonic fibroblasts*)

MOI – wielokrotność infekcji (ang. *multiplicity of infection*)

NEAA – aminokwasy nie niezbędne, endogenne (ang. *non-essential amino acids*)

NGS – sekwencjonowanie nowej generacji (ang. *next generation sequencing*)

NT – transfer jądrowy (ang. *nuclear transfer*)

NuRD – kompleks remodelujący nukleosomy i deacetylujący histony (ang. *nucleosome remodeling deacetylase*)

OCT3/4 – (ang. *octamer-binding transcription factor 3/4*)

OSKM (*Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc*) – egzogenne czynniki transkrypcyjne inicjujące reprogramowanie komórek somatycznych do komórek iPS

PBS – sól fizjologiczna buforowana fosforanami (ang. *phosphate-buffered saline*)

PGK – kinaza fosfoglicerynowa (ang. *phosphoglycerate kinase*)

PHDF – pierwotne ludzkie fibroblasty skóry (ang. *primary human dermal fibroblast*)

PI – inhibitory proteaz (ang. *protease inhibitor*)

PMSF – fluorek fenylo-metano-sulfonylu (ang. *phenylmethanesulfonyl fluoride*)

PRC1/PRC2 – kompleks represyjny Polycomb1/2 (ang. *Polycomb Repressive Complex 1/2*)

pz – par zasad

qPCR – ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *quantitative polymerase chain reaction*)

RBCC – (ang. *RING-B box-coiled-coil*)

RNA-seq – sekwencjonowanie RNA (ang. *RNA-sequencing*)

rpm – obroty na minutę (ang. *revolutions per minute*)

RRBS – zredukowane reprezentacyjne sekwencjonowanie bisulfitowe (ang. *reduced representation bisulfite sequencing*)

SCNT – transfer jądra komórki somatycznej (ang. *somatic cell nuclear transfer*)

SIN – (ang. *self-inactivating*)

SOX2 – (ang. *sex determining region Y-box 2*)

TRIM28 – (ang. *tripartite motif-containing 28*)

TrxG – (ang. *Trichorax*)

TSA – trichostatyna A (ang. *trichostatin A*)

TSS – miejsce startu transkrypcji (ang. *transcription start site*)

WDR5 – (ang. *WD repeat domain 5*)

WGSBS – cało-genomowe sekwencjonowanie bisulfitowe (ang. *whole genome shotgun bisulfite sequencing*)

X-gal – 5-bromo-4-chloro-3-inodylo- β -D-galaktopiranozyd (ang. *5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside*)

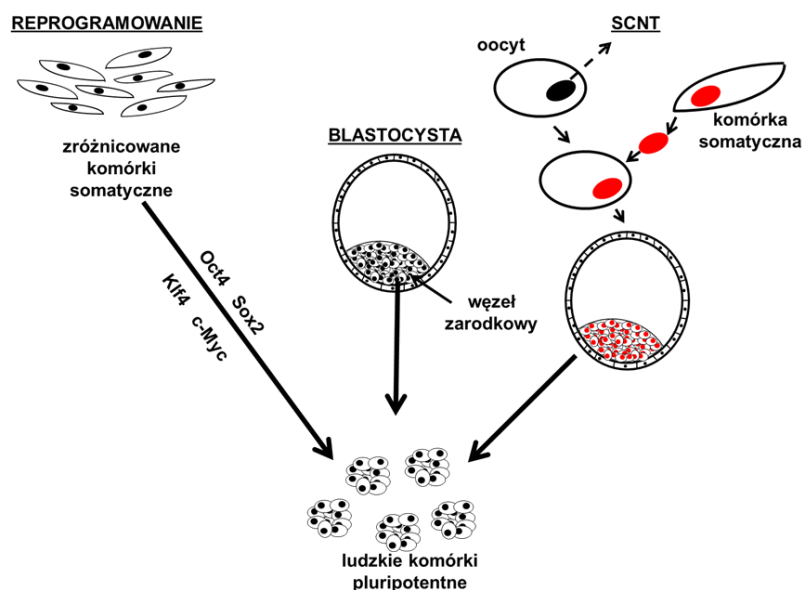
1. Wstęp

Pluripotencja to zdolność komórki do zróżnicowania się w każdy rodzaj komórek somatycznych za wyjątkiem komórek trofoblastu. Zdolność taką posiadają komórki zarodka, z których w trakcie rozwoju powstają wszystkie tkanki i narządy dorosłego osobnika. Udoskonalenie metody izolacji embrionalnych komórek macierzystych (ESCs – ang. *embryonic stem cells*) z blastocysty oraz ich hodowli *in vitro* pozwoliło na lepsze poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymywanie stanu pluripotencji oraz prześledzenie procesu rozwojowego komórek. Z racji wielu kontrowersji etycznych oraz ograniczonego źródła komórek ES, poszukiwano alternatywnego sposobu na otrzymywanie komórek o zbliżonych właściwościach. W roku 2006 opublikowane zostało doniesienie opisujące metodę umożliwiającą uzyskanie komórek o charakterze macierzystym z mysich zróżnicowanych komórek somatycznych [1]. Rok później tą samą metodę zastosowano do reprogramowania komórek ludzkich [2]. Technologia ta pozwala na uzyskanie indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych (iPSCs – ang. *induced pluripotent stem cells*) z niemalże wszystkich rodzajów komórek dorosłego organizmu. Komórki takie posiadają wszystkie cechy komórek ES, takie jak zdolność do samoodnowy czy możliwość różnicowania w dowolne komórki dorosłego organizmu [1,2]. Wynalazca metody, profesor Shinya Yamanaka został uhonorowany Nagrodą Nobla w dziedzinie Fizjologii lub Medycyny w roku 2012. Komórki pluripotencjne posiadają zdolność do samoodnowy i różnicowania się w każdy typ komórki budującej dorosły organizm. W związku z tym upatruje się w nich duże nadzieje na rozwój badań zarówno w zakresie modelowaniu chorób, testowania toksyczności leków czy też w medycynie regeneracyjnej. Dlatego niezmiernie ważne jest stworzenie efektywnej, bezpiecznej, a także powtarzalnej metody generowania komórek iPS. Toczące się obecnie badania mają również na celu dokładne zgłębienie mechanizmów odpowiedzialnych za zmiany zachodzące w komórkach w trakcie reprogramowania komórek somatycznych do komórek iPS. Wykorzystywanie metod szeroko-przepustowych, takich jak globalne sekwencjonowanie RNA (RNA-seq – ang. *RNA-sequencing*) czy analiza profilu metylacji DNA, coraz bardziej poszerzają naszą wiedzę na temat pluripotencji i różnicowania.

1.1 Źródła komórek pluripotentnych

Pierwsza linia ludzkich komórek embrjonalnych została wyizolowana z komórek wężła zarodkowego blastocysty w 1998 roku [3]. Komórki takie mogą być utrzymywane w odpowiednich warunkach w hodowli *in vitro* zachowując swój macierzysty charakter przez niemalże nieograniczoną ilość podziałów. Badania prowadzone na komórkach ES pochodzących zarówno od człowieka jak i od innych ssaków przyczyniły się do poznania molekularnego podłoża pluripotencji. Pomimo swoich licznych zalet, wykorzystywanie w badaniach ludzkich embrjonalnych komórek macierzystych budzi jednak wiele kontrowersji etycznych, a ich źródło jest ograniczone. W związku z tym poszukuje się alternatywnych rozwiązań (Ryc. 1).

Pluripotentne komórki embrjonalne można również uzyskać na drodze transferu jądrowego (NT – ang. *nuclear transfer*). Po wprowadzeniu jądra zróżnicowanej komórki do enukleowanego oocyta (SCNT – ang. *somatic-cell nuclear transfer*) dochodzi do uformowania blastocysty. Komórki embrjonalne uzyskane dzięki tej metodzie są niemalże identyczne z komórkami embrjonalnymi izolowanymi z komórek wężła zarodkowego [4,5]. Metoda ta posiada jednak liczne ograniczenia zarówno ze względu na utrudnioną dostępność materiału biologicznego jak i trudności techniczne, w związku z czym jest mało efektywna. Przełomem w badaniach wykorzystujących komórki o charakterze pluripotentnym było opracowanie w 2006 roku metody reprogramowania komórek somatycznych do indukowanych komórek pluripotentnych [1].



Ryc. 1: Metody pozyskiwania ludzkich komórek pluripotentnych.

1.2 Techniki reprogramowania komórek somatycznych w kierunku komórek iPS

Reprogramowanie komórek somatycznych w kierunku pluripotencji opiera się na wymuszeniu w zróżnicowanej komórce ekspresji genów charakterystycznych dla stanu embrionalnego, przy jednoczesnej represji genów specyficznych dla danej komórki dorosłej. Pierwsza skuteczna metoda reprogramowania mysich fibroblastów do indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych oparta była na użyciu wektorów γ -retrowirusowych [1]. Do zróżnicowanych komórek wprowadzono egzogeny kodujące cztery czynniki transkrypcyjne (OSKM): *Oct3/4* (ang. *octamer-binding transcription factor 3/4*), *Sox2* (ang. *sex determining region Y-box 2*), *Klf4* (ang. *Krüppel-like factor 4*) oraz *c-Myc* (ang. *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*). Kilkutygodniowa hodowla w obecności pożywki dla komórek pluripotentnych zaowocowała uzyskaniem kolonii komórek przypominających embrionalne komórki macierzyste, zarówno pod kątem profilu ekspresji genów, jak i zdolności do samoodnowy i różnicowania się w kierunku trzech listków zarodkowych [1]. Mimo, że metoda ta jest skutecznie stosowana do reprogramowania wielu rodzajów komórek somatycznych, jest ona nadal mało efektywna oraz posiada liczne ograniczenia. W związku z tym prowadzi się obecnie wiele badań mających na celu podwyższenie efektywności reprogramowania i stworzenia bezpiecznej oraz powtarzalnej metody generowania komórek iPS. Jedną ze stosowanych modyfikacji jest metoda oparta na wykorzystaniu wektorów lentiwirusowych, które mają zdolność integracji również do genomu komórek dzielących się. Często wykorzystywane są również kasety policistronowe, dzięki czemu zmniejszone jest ryzyko mutagenyzy insercyjnej [6,7]. Bezpieczeństwo procesu reprogramowania może być zwiększone poprzez zastosowanie systemów indukowanych. Ekspresja egzogennych czynników transkrypcyjnych może być kontrolowana w systemach opartych na doksycyklinie [8,9] lub flankowanych miejscami loxP [10,11]. Poza metodami wykorzystującymi wektory wirusowe stosowane są również metody nieintegracyjne, w których czynniki transkrypcyjne dostarczane są do komórek z wykorzystaniem m.in. plazmidów [12], cząsteczek RNA [13,14] czy białek [15]. Pomimo szybkiego rozwoju technologii reprogramowania komórek somatycznych w kierunku pluripotencji nie uzyskano jeszcze „złotego standardu”, w związku z czym prace w tym kierunku wymagają dalszych intensywnych badań.

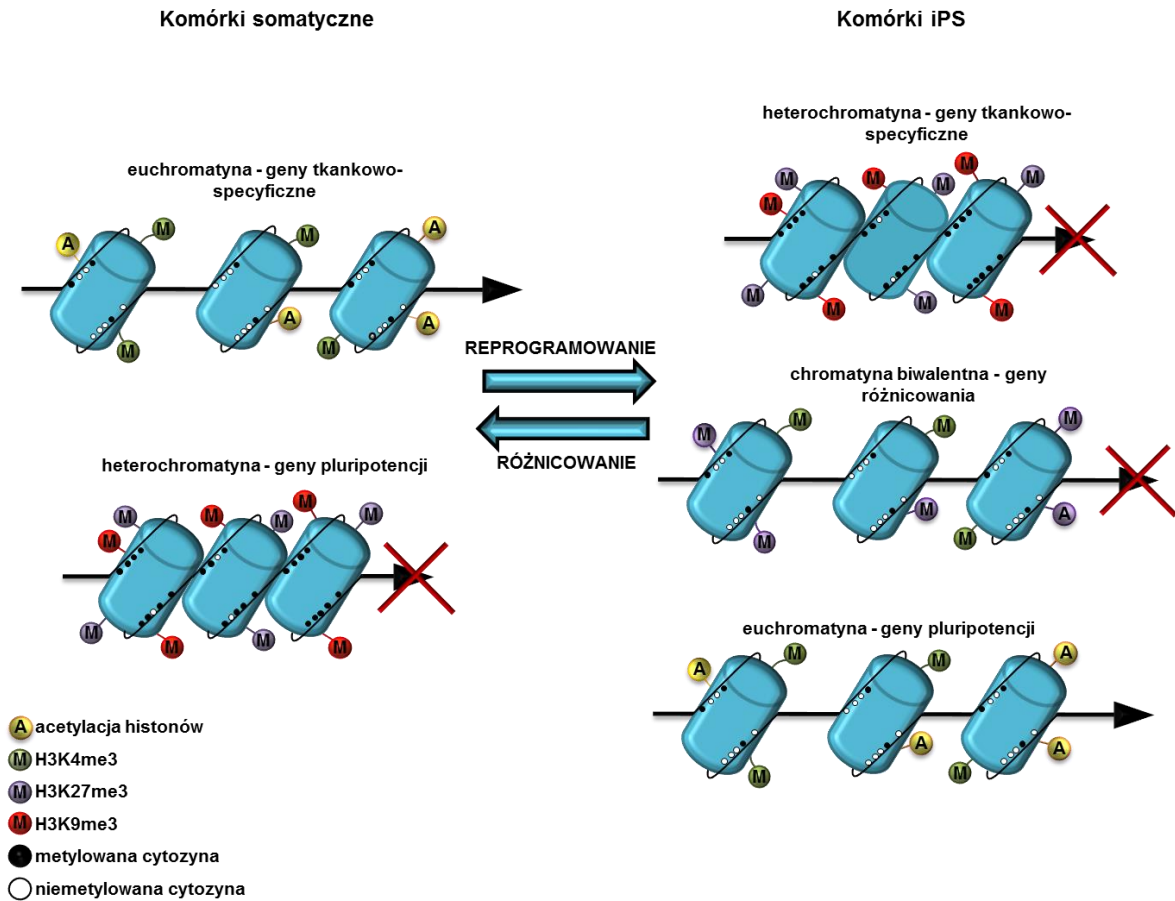
1.3 Reprogramowanie jako proces epigenetyczny

Reprogramowanie komórek somatycznych w kierunku pluripotencji jest procesem epigenetycznym. Po wprowadzeniu do komórek egzogennych czynników transkrypcyjnych dochodzi do licznych zmian epigenetycznych, takich jak metylacja DNA, modyfikacja histonów czy ATP-zależna reorganizacja chromatyny. Zmiany te prowadzą do represji genów tkankowo-specyficznych przy jednoczesnej aktywacji genów związanych z nadaniem i utrzymaniem w komórce stanu pluripotencji [16-18].

Ważnym zjawiskiem w trakcie procesu reprogramowania jest rearanżacja chromatyny w obrębie promotorów genowych. Wiąże się to m.in. z działaniem enzymów modyfikujących histony należących do kilku grup. Acetylotransferazy histonów (HATs – ang. *histone acetyltransferases*) oraz demetylazy histonów (HDMs – ang. *histone demethylases*) działają jako koaktywatory transkrypcji inicjując rozluźnienie chromatyny, ułatwiając tym samym dostęp czynników transkrypcyjnych do genów pluripotencji. Enzymy z grupy deacetylaz histonów (HDACs – ang. *histone deacetylases*) działają w przeciwny sposób – usuwając acetylację promują kondensację chromatyny i represję transkrypcji [19]. W przypadku enzymów należących do grupy metyltransferaz histonów (HMTs – ang. *histone methyltransferases*) możemy wyróżnić takie, których działanie generuje zmiany aktywne bądź represyjne.

Markerem chromatyny aktywnej jest di- oraz trimetylacja lizyny 3 na histonie 4 (H3K4me_{2/3}), katalizowana przez kompleks białkowy Trichorax (TrxG). Obecność H3K4me_{2/3} jest związana z rozluźnieniem chromatyny w obrębie regionów promotorowych i enhancerowych genów pluripotencji w komórkach o charakterze macierzystym (Ryc. 2) [20]. Geny związane z różnicowaniem komórek pluripotentnych charakteryzują się obecnością chromatyny biwalentnej. Współwystępowanie markerów chromatyny aktywnej H3K4me₃ oraz nieaktywnej H3K27me₃ (trimetylacja lizyny 27 na histonie 3) umożliwia szybkie włączenie lub wyłączenie ekspresji genu w zależności od presji czynników środowiskowych [21]. H3K27me₃ jest markerem heterochromatyny. Metylacja ta katalizowana jest przez białka kompleksu Polycomb PRC1/PRC2 (ang. *Polycomb Repressive Complex 1/2*). H3K27me₃ występuje w regionach genów nieaktywnych i jest zaangażowana w wyciszenie ekspresji genów tkankowo-specyficznych we wczesnych fazach procesu reprogramowania [22]. Markerem chromatyny nieaktywnej jest również metylacja lizyny 9 na histonie 3 (H3K9me₃). Obecność H3K9me₃ koreluje negatywnie z wydajnością procesu

reprogramowania. Zablokowanie enzymów katalizujących metylację przyczynia się do wzrostu efektywności reprogramowania poprzez zwiększenie dostępu czynników OSKM do ich sekwencji docelowych [23].



Ryc. 2: Zmiany epigenetyczne towarzyszące procesom reprogramowania i różnicowania komórek.

1.4 Rola kompleksu KRAB/TRIM28 w komórkach pluripotentnych

Czynniki transkrypcyjne KRAB-ZFP

Czynniki transkrypcyjne z domeną KRAB oraz domenami palców cynkowych (KRAB-ZFPs – ang. *Krüppel-associated box-zinc finger proteins*) są największą rodziną czynników transkrypcyjnych obecną jedynie u kręgowców czworonogich. Są zaangażowane między innymi w procesy związane z imprintingiem genowym, różnicowaniem się komórek, apoptozą czy podziałem komórkowym [24-26]. Białka z tej rodziny posiadają w swojej strukturze 4-30 palców cynkowych odpowiedzialnych za wiązanie z DNA, co czyni je wysoce

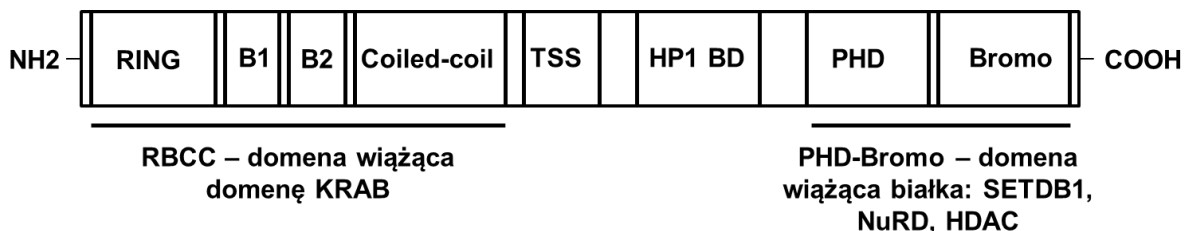
specyficznymi. Do tej pory opisano rolę tylko kilku endogennych czynników KRAB-ZFP w komórkach o charakterze pluripotentnym.

Wyciszenie ekspresji czynników Zfp809 oraz Zfp819 w mysich macierzystych komórkach embrionalnych prowadzi do wzrostu ekspresji endogennych retrowirusów, co wskazuje na ich rolę w regulacji ekspresji tychże sekwencji [27-29]. Czynnik Zfp57 jest zaangażowany w ustalenie prawidłowego wzoru metylacji miejsc imprintingowych, zarówno w ludzkich jak i w mysich komórkach macierzystych [30,31]. Mutacje w obrębie tego genu związane są z występowaniem przejściowej cukrzycy u noworodków oraz z zaburzeniami rozwoju [32,33].

Mechanizm KRAB-zależnej represji pełni również rolę w trwałym wyciszeniu ekspresji egzogennych promotorów genowych w trakcie rozwoju embrionalnego. Badając rozwój zarodkowy myszy transgenicznnych, wykazano, że jeśli przed dniem E3.5 dojdzie do KRAB-zależnej represji, sekwencja promotora ulega metylacji i pozostaje nieaktywna w późniejszym rozwoju. Z kolei w komórkach somatycznych, represja ta jest przejściowa i może zostać zniesiona [34].

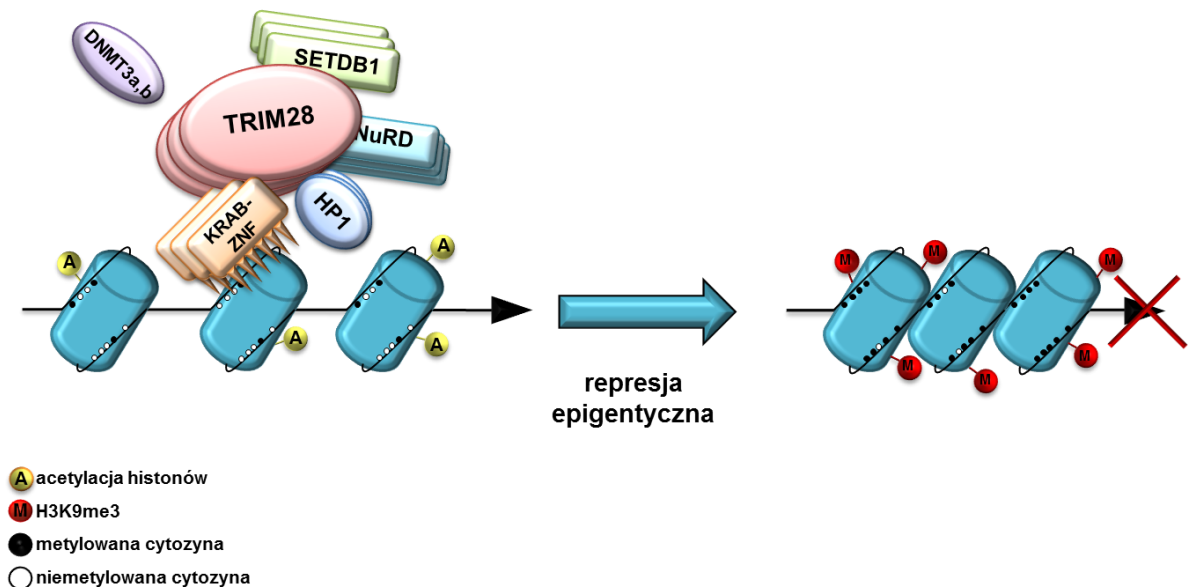
Białko TRIM28

Białko TRIM28 (ang. *tripartite motif-containing 28*), znane również jako KAP1 (ang. *KRAB-domain associated protein*), TIF1 β (ang. *transcriptional intermediary factor 1 beta*) czy KRIP1 (ang. *KRAB-interacting protein 1*), jest zaangażowane w epigenetyczną represję transkrypcji [35-37].



Ryc. 3: Schemat przedstawiający budowę białka TRIM28.

Białko TRIM28 jest rekrutowane do DNA poprzez czynniki KRAB-ZFP. Domena RBCC (ang. *RING-B box-coiled-coil*) znajdująca się na N-końcu białka TRIM28 tworzy homotrimer z domeną KRAB [38] umożliwiając przyłączenie kompleksu białkowego do specyficznych miejsc w genomie [39,40]. Z racji swojej wielodomenowej budowy (Ryc. 3), białko TRIM28 działa jak rusztowanie niezbędne do tworzenia kompleksu białkowego inicjującego represję transkrypcji. Znajdujące się na C-końcu białka domena PHD oraz bromo-domena odpowiedzialne są za połączenie z enzymami modyfikującymi histony, takimi jak metyltransferaza histonów SETDB1 oraz kompleks NuRD (ang. *nucleosome remodeling deacetylase*) odpowiedzialny za deacetylację histonów [41,42]. W skład kompleksu wchodzi również białko stabilizujące heterochromatynę – HP1 (ang. *heterochromatin protein 1*), łączące się z hydrofobową domeną HP1BD. Działanie całego kompleksu powoduje epigenetyczną represję transkrypcji genów w pobliżu miejsca wiązania do DNA (Ryc. 4). Co więcej, w ostatnich latach wykazano, że białko TRIM28 oddziałuje również z metyltransferazami DNA w komórkach pluripotencyjnych i jest odpowiedzialne za stabilizację represji transkrypcji poprzez metylację DNA [31]. Wykazano również, że poziom metylacji DNA w miejscach CpG jest odwrotnie proporcjonalny do odległości od miejsca związania kompleksu białkowego [43].



Ryc. 4: Schemat przedstawiający KRAB/TRIM28-zależną represję transkrypcji.

1.5 Metylacja DNA

Ważnym zjawiskiem zachodzącym w czasie pierwszych dni embriogenezy jest ustalenie w komórce odpowiedniego profilu metylacji DNA [44,45]. Po zapłodnieniu dochodzi do globalnej demetylacji DNA, za wyjątkiem miejsc imprintingowych. Po implantacji zarodka, enzymy z grupy metyltransferaz DNA (DNMT3A, DNMT3B – ang. *DNA methyltransferase 3A/B*) odpowiedzialne są za ustalenie wzoru metylacji *de novo*, który następnie utrzymywany jest w czasie kolejnych podziałów komórkowych przez metyltransferazę DNMT1 (ang. *DNA methyltransferase 1*) [46,47].

Metylacja DNA jest procesem biochemicznym, który polega na przyłączeniu grupy metylowej (-CH₃) do deoksynukleotydu. Najczęściej proces ten dotyczy cytozyny, a jego produktem jest 5-metylocytozyna (5mC). Metylacja cytozyny w genomie ssaków występuje zazwyczaj w miejscach CpG, czyli takich, gdzie nukleotydem sąsiadującym z cytozyną na 3' końcu jest guanina. W genomie większości ssaków miejsca CpG występują w skupiskach o wyższej niż przewidywana zawartość CpG nazwanych „wyspami CpG”. Wyspy CpG mają zazwyczaj 300-3000 par zasad długości i często występują w regionach regulatorowych genów. Metylacja DNA zaangażowana jest w regulację wielu istotnych procesów biologicznych takich jak imprinting genowy, inaktywacja chromosomu X czy regulacja ekspresji genów [48]. Metylacja występująca w regionach regulatorowych genów związana jest zazwyczaj z represją transkrypcji. Represja ta może być spowodowana zablokowaniem miejsc wiązania dla czynników transkrypcyjnych, lub przyłączeniem się białek z rodziny MDB (ang. *methyl-CpG-binding domain*), które stabilizują represję poprzez indukcję kondensacji chromatyny [45].

Metylacja DNA wydaje się być barierą epigenetyczną w pierwszych fazach reprogramowania. Wyciszenie ekspresji genu DNMT1 lub zastosowanie czynników demetylujących DNA takich jak 5-azacytydyna (5-azaC) ułatwia przejście komórek pre-iPS do komórek iPS [49]. W trakcie reprogramowania spada poziom metylacji promotorów genowych związanych z pluripotencją komórek, dochodzi również do wzrostu poziomu metylacji w obrębie sekwencji genów tkankowo-specyficznych. Genom komórek pluripotentnych, zarówno iPS jak i ES cechuje się wyższym ogólnym stopniem metylacji w porównaniu do komórek somatycznych. [50-52].

Komórki iPS otrzymywane z różnych typów komórek somatycznych czy pochodzące od różnych dawców, wykazują wiele podobieństw zarówno pod względem transkryptomu [53,54] jak i profilu metylacji DNA [55]. Są również niemalże identyczne z komórkami ES. Pomimo podobieństw na poziomie globalnym, opisano także kilka różniących je cech dotyczących ekspresji genów czy metylacji DNA [51,52,55]. Zmiany te nie umniejszają potencjału komórek iPS do samoodnowy i różnicowania, jednak aby komórki iPS mogły stanowić dobry model badawczy lub być wykorzystane w klinice, niezbędne jest poznanie przyczyn a także konsekwencji tych różnic.

1.6 Ocena cało-genomowego profilu metylacji DNA

Ocena cało-genomowego profilu metylacji DNA może mieć istotne znaczenie w zrozumieniu dlaczego specyficzne regiony genomu ulegają ekspresji tylko w określonych typach komórek, a w innych pozostają wyciszone. Rozwój metod sekwencjonowania nowej generacji (NGS – ang. *next generation sequencing*) przyczynia się do zwiększania efektywności analizy metylacji DNA na poziomie pojedynczych nukleotydów.

Dużym przełomem w rozwoju technik służących do oceny metylacji DNA było odkrycie właściwości konwersji bisulfitowej. Poddanie zdenaturowanego DNA działaniu wodorosiarczanu IV sodu (NaHSO_3) powoduje deaminację niemetylowanej cytozyny do uracylu, podczas gdy obecność grupy metylowej chroni 5mC przed usunięciem grupy aminowej [56]. Gdy DNA po konwersji bisulfitowej amplifikowany jest metodą PCR, niemetylowana cytozyna powielana jest jako tymina, natomiast cytozyna metylowana pozostaje amplifikowana jako cytozyna. Metoda ta może być skutecznie stosowana do analizowania poziomu metylacji pojedynczych, krótkich sekwencji z zastosowaniem specyficznych starterów, a także do analiz charakteryzujących wiele miejsc w genomie jak np. mikromacierze czy NGS [57] (Tab. 1).

Metodą analizy metylacji DNA o najwyższej rozdzielczości oraz stopniu pokrycia genomu jest cało-genomowe sekwencjonowanie bisulfitowe (WGSBS – ang. *whole genome shotgun bisulfite sequencing*) [58]. Pozwala ona na jednoznaczne określenie poziomu metylacji danej cytozyny w odczycie, zarówno w miejscach genomu, w których znajduje się dużo sekwencji CpG jak i w tych, które są w nie ubogie. Metoda ta jest jednak stosunkowo kosztowna. Jako alternatywę, w 2005 roku Meissner i wsp. zaproponowali zredukowaną metodę sekwencjonowania bisulfitowego – RRBS (ang. *reduced representation bisulfite sequencing*) [59]. Polega ona na sekwencjonowaniu tylko tych części genomu, które są bogate

w miejsca CpG. Frakcje takie uzyskuje się na drodze selekcji fragmentów DNA o określonej długości (100-500 pz) powstałych po trawieniu cało-genomowego DNA enzymem restrykcyjnym trawiącym w obrębie miejsca CpG niezależnie od statusu metylacji cytozyny w miejscu restrykcji. Pomimo, że metoda ta nie uwzględnia sekwencjonowania części genomu ubogich w miejsca CpG, pozostaje ona informatywna dla wielu sekwencji m.in. promotorów genowych i miejsc regulatorowych genów.

Tabela 1: Metody analizy DNA po konwersji bisulfitowej.

przygotowanie próby	metoda analizy		
konwersja bisulfitowa	krótkie sekwencje	mikromacierze	skewencjonowanie nowej generacji (NGS)
	<u>pirosekwencjonowanie</u>	<u>BiMP</u> – bisulfite methylation profiling	<u>RRBS</u> – reduced representation bisulfite sequencing (zredukowane reprezentacyjne sekwencjonowanie bisulfitowe)
	<u>Sanger BS</u> – sekwencjonowanie metodą Sangera konwertowanego DNA	<u>GoldenGate</u>	<u>BSPP</u> – bisulfite padlock probes (sekwencjonowanie bisulfitowe z wykorzystaniem sond Padlock)
	<u>Infinium</u>	<u>WGSBS</u> – whole-genome shotgun bisulfite sequencing (cało-genomowe sekwencjonowanie bisulfitowe)	

Tabela zmodyfikowana na podstawie [57].

2. Cel pracy

Reprogramowanie komórek somatycznych do komórek iPS jest procesem epigenetycznym. W celu dokładnego określenia zmian zachodzących w tym procesie należy poznać mechanizmy zaangażowane zarówno w indukcję, jak i w utrzymanie stanu pluripotentnego komórek. KRAB-zależna represja transkrypcji wydaje się być jednym z mechanizmów powodujących represję transkrypcji genów tkankowo-specyficznych w komórkach o charakterze macierzystym. Działanie czynników KRAB-ZFP jest także niezbędne do podtrzymywania zdolności do samoodnowy komórek macierzystych. Celem niniejszej pracy było:

- 1) Stworzenie egzogenego systemu do badania kinetyki KRAB-zależnej represji promotorów komórkowych w trakcie reprogramowania komórek somatycznych do komórek iPS.
 - a. Określenie mechanizmu KRAB-zależnej represji w komórkach somatycznych.
 - b. Określenie mechanizmu KRAB-zależnej represji w trakcie reprogramowania komórek somatycznych do komórek iPS.

- 2) Badanie wpływu czynników transkrypcyjnych KRAB-ZFP na utrzymanie stanu pluripotencji komórek macierzystych.
 - a. Określenie zmian ekspresji czynników KRAB-ZFP po reprogramowaniu komórek somatycznych do komórek iPS.
 - b. Analiza roli wybranych czynników KRAB-ZFP (specyficznych dla komórek macierzystych) w utrzymywaniu pluripotentnego charakteru komórek.

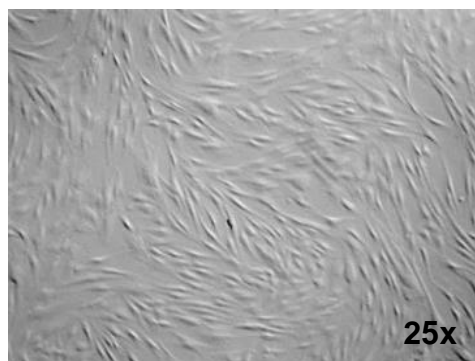
- 3) Analiza cało-genomowego profilu metylacji w komórkach somatycznych oraz komórkach o charakterze pluripotentnym metodą RRBS.
 - a. Określenie zmian globalnego profilu metylacji po reprogramowaniu komórek somatycznych do komórek iPS.
 - b. Charakterystyka regionów różnicowej metylacji (DMR – ang. *differentially methylated regions*) pomiędzy komórkami somatycznymi a komórkami o charakterze pluripotentnym.

3. Materiały i metody

3.1 Generowanie ludzkich komórek iPS zawierających system reporterowy do badania KRAB-zależnej represji promotora PGK w trakcie reprogramowania

3.1.1 Izolacja ludzkich pierwotnych fibroblastów skóry

Ludzkie pierwotne fibroblasty skóry (PHDFs – ang. *primary human dermal fibroblasts*; Ryc. 5) były izolowane ze skóry pozyskanej od pacjentów Wielkopolskiego Centrum Onkologii po uzyskaniu ich świadomej zgody. Skórę przemyto 3-krotnie buforem PBS (ang. *phosphate-buffered saline*), a następnie przy użyciu skalpela pocięto na małe fragmenty o wielkości ok 5x5 mm. Tak przygotowane fragmenty inkubowano przez noc w 37°C w medium do trawienia (DMEM, 3 mg/ml kolagenaza IV, 1% penicylina/streptomycyna). Po nocnej inkubacji przeniesiono całość na płytkę o średnicy 10 cm, dodano kompletnego medium do hodowli komórkowej (DMEM, 20% FBS, 1% penicylina/streptomycyna). Komórki inkubowano w standardowych warunkach (37°C, 5% CO₂) przez trzy dni. Następnie przepłukano płytkę kilkakrotnie buforem PBS w celu pozbycia się pozostałości tkankowych i hodowano dalej w kompletnym medium. Komórki pasażowano po raz pierwszy po uzyskaniu 90% konfluencji. Dalszą hodowlę prowadzono w medium DMEM z dodatkiem 10% FBS oraz 1% penicyliny/streptomycyny.

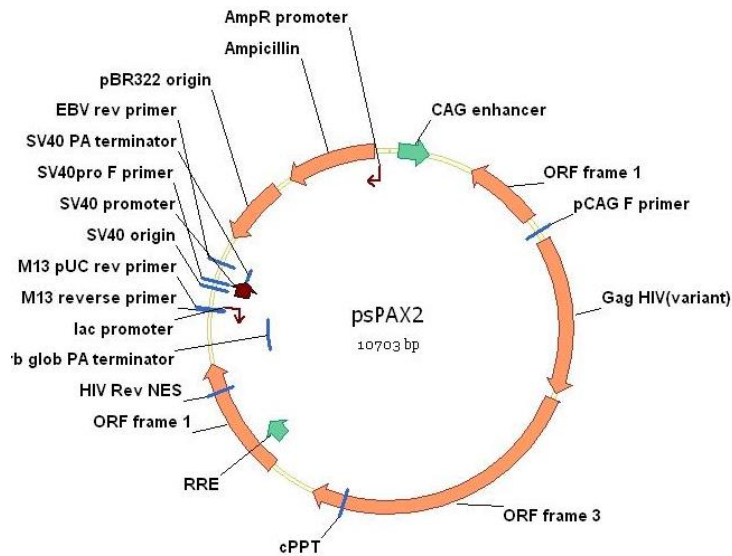


Ryc. 5: Ludzkie pierwotne fibroblasty skóry (PHDFs) – obraz mikroskopowy w świetle widzialnym w powiększeniu 25x.

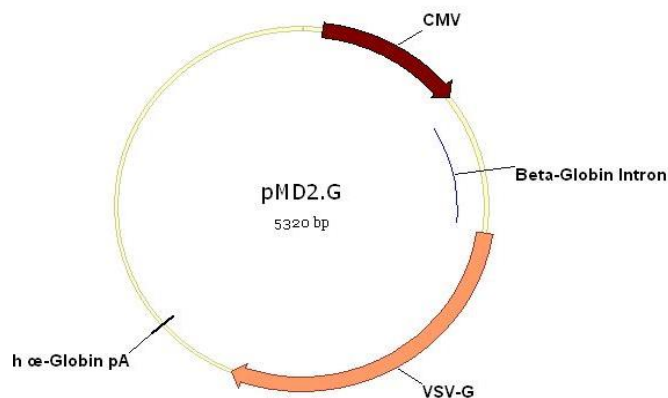
3.1.2 Produkcja wektorów lentiwirusowych

Produkcję wektorów lentiwirusowych wykonano stosując system pakujący drugiej generacji składający się z plazmidu pakującego psPAX2 kodującego gen polimerazy wirusowej (pol) oraz gen wirusowych białek kapsydu (gag) (Ryc. 6A) oraz plazmidu kodującego białka otoczki wirusowej VSV-G: pMD2.G (Ryc. 6B).

A)



B)



Ryc. 6: Mapy plazmidów pakujących wykorzystanych do produkcji wektorów lentiwirusowych (źródło: Vector NTI - Invitrogen). A) Wektor psPAX2 kodujący gen polimerazy (pol) oraz gen wirusowych białek kapsydu (gag). B) Wektor pMD2.G kodujący białka otoczki wirusowej.

Komórki HEK 293T (Ryc. 7) były transfekowane przy użyciu fosforanu wapnia $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$. Mieszaninę A (Tab. 2) dodawano kroplami do mieszaniny B (2xHBS – ang. *hepes buffered saline*, pH 7,05) (Tab. 3) stale napowietrzając.

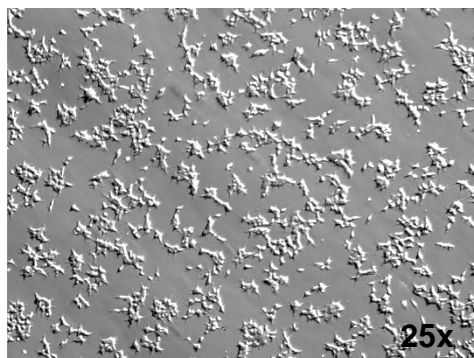
Tabela 2: Skład mieszaniny reakcyjnej A.

nazwa	ilość
wektor transferowy	20 µg
psPAX2	15 µg
pMD2.G	6 µg
CaCl ₂	0,125 nM
H ₂ O	do 500 µl

Tabela 3: Skład mieszaniny reakcyjnej B.

nazwa	stężenie końcowe
NaCl	280 nM
KCl	10 mM
Na ₂ HPO ₄	1,5 mM
Hepes	50 mM
Glukoza	12 mM
H ₂ O	do 500 µl

Po 20 minutach inkubacji wytworzony precypitat naniesiono kroplami na płytkę o średnicy 10 cm z komórkami HEK 293T o konfluencji ~30%, zawierającą 9 ml pełnego medium do hodowli (DMEM, 10% FBS, 1% pen/strep). Po 6 godzinach odciągnięto medium z mieszaniną transfekcyjną i dodano na płytkę 6 ml pełnego medium. Płytki z komórkami pozostawiono w hodowli na 48 godzin (37°C, 5% CO₂). Po tym czasie zebrano medium zawierające wirusa znad komórek, następnie przefiltrowano używając filtr strzykawkowy 0,45 µm. Wirusów używano do transdukcji w formie niezagęszczonej lub po zagęszczeniu poprzez ultrawirowanie (26000 rpm, 1,5 h, 4°C) na filtrze sacharozowym.



Ryc. 7: Komórki HEK 293T – obraz mikroskopowy w świetle widzialnym w powiększeniu 25x.

3.1.3 Mianowanie wektorów lentiwirusów

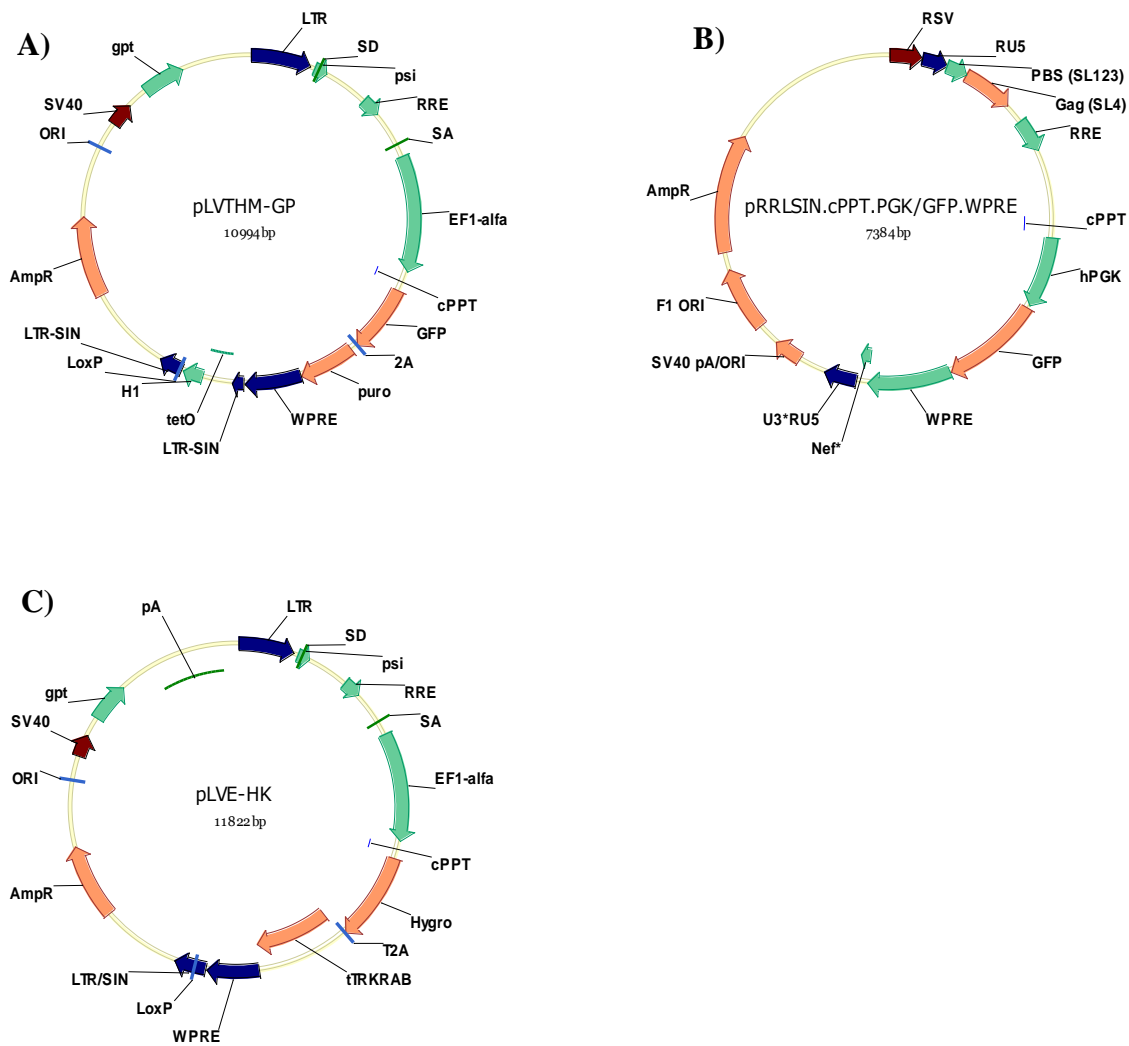
W celu określenia miana otrzymanych wektorów lentiwirusowych wykorzystano metodę RT-assay (ang. *reverse transcription assay*). Metoda ta pozwala na względne określenie ilości cząsteczek wirusa w zawiesinie na podstawie pomiaru sygnału radioaktywnego pochodzącego ze znakowanej trytem deoksytymidyny ($[^3\text{H}]$ -dTTP), która wbudowywana jest do nici cDNA syntetyzowanej przez odwrotną transkryptazę wirusa. Mieszanina reakcyjna składała się z:

- Tris-HCl – 50 mM
- KCl – 75 mM
- DTT – 2 mM
- poly(rA) – 1400 $\mu\text{g/ml}$
- oligo (dT) – 400 $\mu\text{g/ml}$
- MgCl_2 – 5 mM
- $[^3\text{H}]$ -dTTP – 84 Ci/mmol
- H_2O – do 500 μl

Przygotowano pięciokrotne rozcieńczenia badanego wirusa i dodano 10 μl wirusa do 20 μl przygotowanej mieszaniny reakcyjnej, a następnie inkubowano w 37°C przez 2 godziny. Po tym czasie dodano Igepal (0,5%) w celu zahamowania reakcji. Następnie 5 μl mieszaniny naniesiono kroplami na membranę nitrocelulozową DE81 (Whatman). Membranę przepłukano 2-krotnie w buforze SSC (2x; Sigma Aldrich) i jednokrotnie w 80% etanolu, a po wysuszeniu zanurzono w buforze scyntylacyjnym Betaplate Scint (Perkin Elmer) i dokonano pomiaru na czytniku 1450 Microbeta Counter (Perkin Elmer). Otrzymane wartości CPM (ang. *count per minute*) zostały odniesione do kontroli (2% BSA) oraz do wirusów o znanym mianie określonym innymi metodami.

3.1.4 Wektory plazmidowe wykorzystane do produkcji wektorów lentiwirusowych

Do stworzenia systemu reporterowego służącego do badania metylacji promotora *PGK* wykorzystano następujące wektory plazmidowe:



Ryc. 8: Mapy plazmidów wykorzystanych do stworzenia systemu reporterowego do badania metylacji promotora *PGK*. A) pLVTHM-GP. B) pRRLSIN.cPPT.PGK/GFP.WPRE. C) pLVE-HK. (źródło: Vector NTI - Invitrogen).

3.1.5 Tworzenie wektora zawierającego promotor *PGK* z/bez sekwencji tetO

Wektor służący do badania metylacji promotora *PGK* w trakcie różnicowania i propagacji ludzkich komórek iPS stworzono na bazie wektora pLVTHM-GP [60] (Ryc. 8A). W pierwszym etapie z wektora usunięto promotor *EFl α* (Ryc. 9A). W tym celu plazmid pLVTHM-GP poddano trawieniu restrykcyjnemu przy użyciu enzymów *SalI* i *PacI* (1:1; Thermo Scientific). Trawienie przeprowadzono używając buforów D oraz *PacI* (1:1) w 37°C przez 1 godzinę. Produkty trawienia rozdzielono elektroforetycznie na żelu agarozowym (1%). Fragment o długości 9804 pz odpowiadający sekwencji bez promotora wycięto z żelu, a następnie oczyszczono przy użyciu zestawu GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) zgodnie z protokołem zalecanym przez producenta. Sekwencję ludzkiego promotora *PGK* amplifikowano z plazmidu pRRLSIN.cPPT.PGK/GFP.WPRE (otrzymany z laboratorium prof. Didiera Trono – Addgene plasmid # 12252) (Ryc. 8B) używając specyficznych starterów wprowadzających do sekwencji dodatkowe miejsca restrykcyjne dla enzymu *SalI* na końcu 5' (5'-ATTGTCGACTCGAATTCACGGGGTTG-3') oraz *PacI* na końcu 3' (5'-TTGTAAATTAATCCTCGCCCTTGCTCACCAT-3'). Do amplifikacji użyto polimerazy Phusion®High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/ μ l; Thermo Scientific). Skład mieszaniny reakcyjnej:

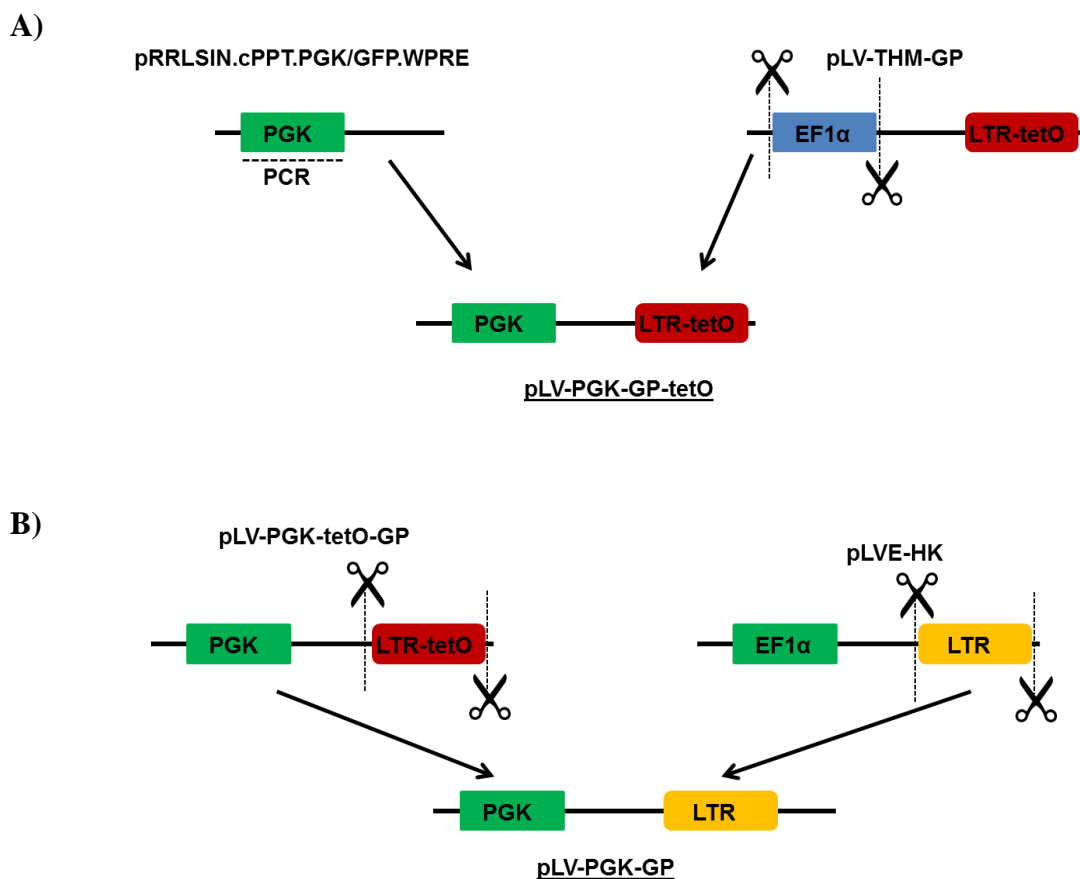
- polimeraza (2 U/ μ l) – 0,2 μ l
- bufor 5x Phusion HF Buffer – 4 μ l
- startery (5'+3'; 20 μ M) – 1 μ l
- dNTPs (20 μ M) – 0,2 μ l
- matryca DNA (100 ng/ μ l) – 1 μ l
- H₂O – do 20 μ l

Reakcję przeprowadzono w następujących warunkach:

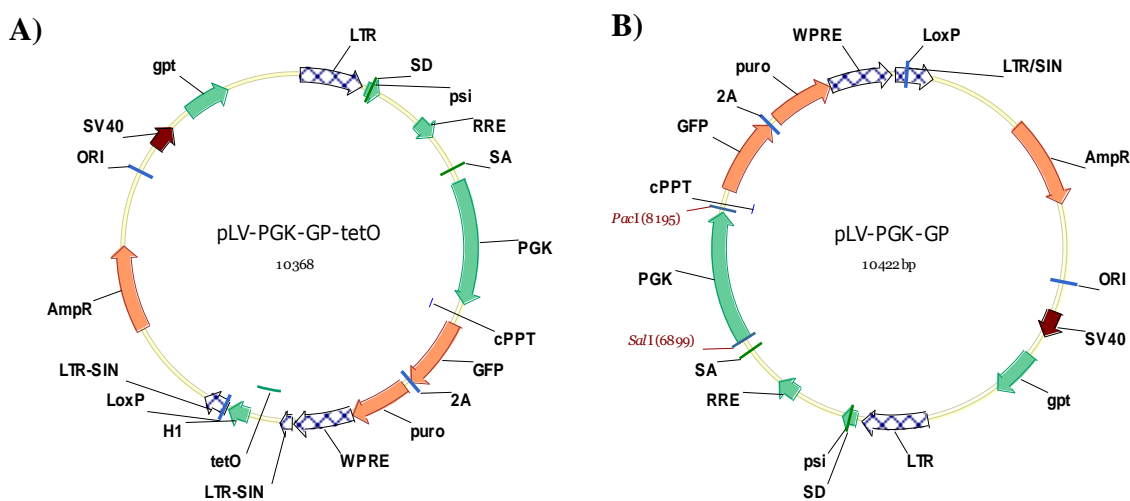
- denaturacja wstępna – 98°C; 30 s
 - denaturacja – 98°C; 30 s
 - wiązanie starterów – 63°C; 60 s
 - elongacja – 72°C; 60 s
 - elongacja końcowa – 72°C; 7 min
- } 35 cykli

Powstały produkt PCR uwidoczniono na żelu agarozowym (2%), z którego następnie został wycięty i oczyszczony zestawem GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific).

Plazmid oraz promotor poddano ligacji przy użyciu ligazy T4 DNA Ligase (New England BioLabs) w 16°C przez noc. Produkt ligacji wprowadzono do bakterii kompetentnych *E. coli* DH5α (Zymo Research) na drodze transformacji. Do 20 μl bakterii kompetentnych dodano 2 μl produktu powstałego po ligacji i pozostawiono na lodzie przez 30 minut. Następnie przeprowadzono szok cieplny (42°C, 45 s). Mieszaninę pozostawiono na lodzie przez 5 minut, następnie dodano 250 μl medium S.O.C. (AMRESCO) i wytrząsano przez jedną godzinę (37°C, 300 rpm). Następnie, bakterie posiano na szalkę Petriego pokrytą podłożem LB-agar (Sigma Aldrich) z dodatkiem penicyliny (50 μg/μl). Bakterie inkubowano przez noc w 37°C. Następnego dnia z powstałych kolonii założono płynne hodowle bakteryjne w 3 ml pożywki LB (Sigma Aldrich) z dodatkiem penicyliny (50 μg/μl), które inkubowano przez noc wytrząsając (270 rpm, 37°C). Plazmidowy DNA wyizolowano przy użyciu zestawu Zypzy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research) według protokołu zalecanego przez producenta. Otrzymane plazmidy poddano kontrolnemu trawieniu restrykcyjnemu przy użyciu enzymu PstI (Thermo Scientific; bufor H, 1 godz., 37°C), które potwierdziło poprawność ligacji. W celu ostatecznej oceny produktu klonowania próby zostały zsekwenjonowane (Genomed), potwierdzając poprawne wklonowanie promotora *PGK* do plazmidu. Otrzymany wektor pLV-PGK-GP-tetO (Ryc. 10A) poddano dalszym modyfikacjom (Ryc. 9B), w celu uzyskania wektora kontrolnego zawierającego promotor *PGK* bez sekwencji tetO – pLV-PGK-GP (Ryc. 10B). W tym celu z otrzymanego plazmidu wycięto fragment zawierający LTR z sekwencją tetO (Ryc. 9B) używając enzymów restrykcyjnych KpnI i NheI (1:1; Thermo Scientific). Trawienie przeprowadzono używając buforów KpnI oraz NheI (1:2; Thermo Scientific) przez jedną godzinę w temperaturze 37°C. Takiemu samemu trawieniu poddany został wektor pLVE-HK [60] (Ryc. 8C), zawierający LTR bez fragmentu tetO. Produkty obydwu trawień uwidoczniło na żelu agarozowym (1,5%), z którego następnie wycięto i oczyszczono produkty odpowiadające wektorowi pLV-PGK-tetO bez fragmentu tetO oraz fragmentowi LTR z wektora pLVE-HK. Produkty poddano ligacji przy użyciu ligazy T4 DNA Ligase (New England BioLabs). Produkt ligacji wprowadzono do bakterii kompetentnych *E. coli* DH5α na drodze transformacji z wykorzystaniem szoku cieplnego oraz izolowano plazmidowy DNA (jw.). Otrzymane plazmidy poddano kontrolnemu trawieniu restrykcyjnemu przy użyciu enzymów XbaI oraz SpeI (1:1; Thermo Scientific). Trawienie wykonano w buforze Tango (Thermo Scientific) przez 1 godzinę w 37°C. Produkty trawienia uwidoczniło na żelu agarozowym (1,5%) potwierdzając poprawność ligacji.



Ryc. 9: Schemat przedstawiający strategię klonowania w celu otrzymania plazmidów wykorzystanych do badania metylacji promotora *PGK*. A) Strategia otrzymania plazmidu zawierającego promotor *PGK* oraz LTR z sekwencją tetO. B) Strategia otrzymania plazmidu zawierającego promotor *PGK* oraz LTR bez sekwencji tetO.



Ryc. 10: Mapy plazmidów stworzonych w celu zbadania KRAB-zależnej represji promotora *PGK*. A) Plazmid reporterowy – pLV-PGK-GP-tetO. B) Plazmid kontrolny – pLV-PGK-GP. (źródło: Vector NTI - Invitrogen).

3.1.6 Izolacja plazmidowego DNA z hodowli maxi

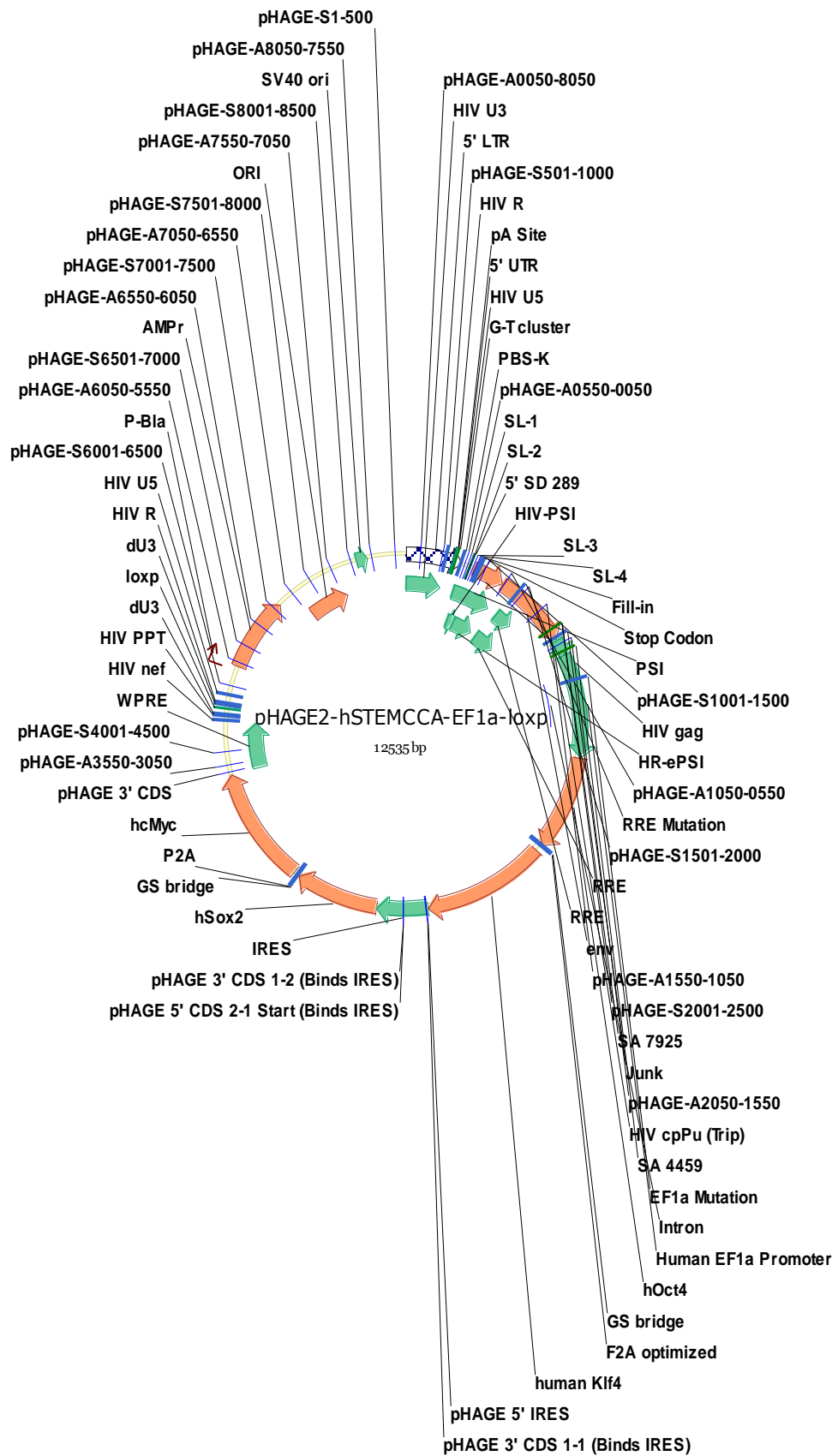
Wszystkie plazmidy niezbędne do produkcji wektorów lentiwirusowych namnożone zostały w płynnych hodowlach bakteryjnych (300 ml buforu LB, 50 µg/µl penicyliny, 270 rpm, 37°C przez noc). Plazmidy izolowano przy użyciu zestawu JETSTAR Plasmid Purification Kit (Genomed) według protokołu producenta. W pierwszym etapie komórki bakteryjne poddawane były lizie alkalicznej w celu denaturacji DNA oraz białek. Uzyskany w ten sposób lizat poddany był następnie neutralizacji, podczas której DNA plazmidowy ulega renaturacji. Po oczyszczeniu na kolumnie ze złożem jonowymiennym plazmidowy DNA został eluowany a następnie wytrącany przy użyciu 100% izopropanolu. Po przemyciu 70% etanolem oraz wysuszeniu plazmidowy DNA rozpuszczony był w wodzie i doprowadzany do stężenia 1 µg/µl.

3.1.7 Transdukcja komórek PHDF wektorami pLV-PGK-GP-tetO/pLV-PGK-GP oraz pLVE-HK

Do 10^4 komórek PHDF wprowadzono reporterowy wektor lentiwirusowy pLV-PGK-GP-tetO lub wektor kontrolny pLV-PGK-GP na drodze transdukcji. Transdukcję wykonano na dołku płytki 6-dołkowej w obecności polibrenu (5 µg/ml) w 1 ml medium hodowlanego o obniżonej zawartości surowicy (5% FBS), stosując ilość wirusa odpowiadającą $MOI = 50$. Komórki inkubowano przez 48 godzin w standardowych warunkach (5% CO_2 , 37°C). Po inkubacji zmieniono pożywkę na świeżą. Następnego dnia dodano do komórek antybiotyk selekcyjny puromycynę (0,5 µg/ml) i inkubowano komórki przez 4 dni. Drugiego dnia inkubacji przeprowadzono transdukcję wektorem lentiwirusowym pLVE-HK. Po zmianie pożywki na świeżą odczekano 24 godziny i dodano kolejny antybiotyk selekcyjny – hygromycynę (40 µg/ml). Selekcję prowadzono przez 4 dni. Tak przygotowane komórki PHDF wykorzystano do generowania komórek iPS.

3.1.8 Reprogramowanie komórek PHDF do komórek iPS

Do generowania ludzkich indukowanych komórek pluripotentnych (hiPS) wykorzystano komórki PHDF, które zostały wcześniej poddane transdukcji wektorami lentiwirusowymi pLV-PGK-GP-tetO/pLV-PGK-GP oraz pLVE-HK oraz selekcji w odpowiednich antybiotykach. Transdukcji wektorem pHAGE2-hSTEMCCA-loxp (otrzymanym od prof. Gustavo Mostoslavskiego; Ryc. 11) poddano 10^4 komórek PHDF. Transdukcję wykonano na dołku płytki 6-dołkowej w obecności polibrenu (5 µg/ml) w 1 ml medium hodowlanego, stosując ilość wirusa odpowiadającą $MOI = 50$.



Ryc. 11: Mapa plazmidu pHAGE2-hSTEMCCA-loxp zawierającego cDNA kodujące cztery czynniki transkrypcyjne niezbędne do indukcji pluripotencji: *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* oraz *c-MYC* (źródło: Vector NTI - Invitrogen).

Komórki hodowano przez noc w standardowych warunkach (5% CO₂, 37°C). Następnego dnia przepłukano płytkę buforem PBS i powtórzono transdukcję. Po nocnej inkubacji przepłukano płytkę 3-krotnie buforem PBS i dodano 3 ml pełnego medium hodowlanego. Komórki zostawiono w hodowli na 6 dni. Piątego dnia po transdukcji przygotowano płytki 6-dołkowe pokryte roztworem BD Matrigel™ (Becton Dickinson) (1:50 w DMEM-F12) oraz komórkami odżywczymi MEF (ang. *mouse embryonic fibroblasts*) (MERCK Millipore) inaktywowanymi przy użyciu mitomycyny o konfluencji 50%. Szóstego dnia komórki PHDF po transdukcji wektorem pHAGE2-hSTEMCCA-loxp przepasażowano na przygotowane płytki pokryte matrygelem i komórkami MEF. Od tej pory komórki hodowano w medium hiPS o składzie:

Tabela 4: Skład medium do hodowli komórek hiPS.

nazwa odczynnika	końcowe stężenie
DMEM-F12	
KSR	20%
penicylina/streptomycyna	0,5%
NEAA	1x
β-merkaptoetanol	0,1 mM
β-FGF	10 ng/ml

Komórki hodowano w warunkach hipoksji (37°C, 5% CO₂, 5% O₂), zmieniając medium co dwa dni. Po 7 dniach hodowli dodano nowych inaktywowanych komórek MEF. Pierwsze zmiany morfologiczne wskazujące na indukcję pluripotencji obserwowano około dnia 10-14. Po 21 dniach hodowli (liczonych od dnia transdukcji wektorem pHAGE2-hSTEMCCA-loxp) powstały w pełni ukształtowane kolonie komórek hiPS, które manualnie przenoszono na nowe płytki 24-dołkowe pokryte matrygelem i inaktywowanymi komórkami MEF w celu propagacji hodowli.

3.1.9 Barwienie immunofluorescencyjne

W celu potwierdzenia pluripotentnego charakteru otrzymanych komórek hiPS wykonano barwienia immunofluorescencyjne potwierdzające obecność wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych markerów embrionalnych. Przed wykonaniem barwienia komórki utrwalano w zimnym metanolu (20 min, -20°C; markery wewnątrzkomórkowe)

lub w 4% roztworze formaldehydu (30 min, temperatura pokojowa; markery powierzchniowe). Po utrwaleniu przepłukano komórki 3-krotnie w buforze PBS, a następnie inkubowano w roztworze 1% BSA w PBS przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Po inkubacji komórki przepłukano buforem PBS, a następnie inkubowano z przeciwciałem I-rzędowym w roztworze 1% BSA w PBS w 4°C przez noc. Wykorzystano przeciwciała:

- anty-SSEA4 – 10 µg/ml (Thermo Scientific)
- anty-TRA 1-60 – 20 µg/ml (Thermo Scientific)
- anty-TRA 1-81 – 20 µg/ml (Thermo Scientific)
- anty-NANOG – 20 µg/ml (Thermo Scientific)

Po nocnej inkubacji komórki przepłukano 3-krotnie buforem PBS a następnie inkubowano przez 1 godzinę w 37°C z roztworem odpowiedniego przeciwciała II-rzędowego skoniugowanego z fluorochromem (Jackson Immunoresearch). Po inkubacji przepłukano komórki 3-krotnie buforem PBS. Jądra komórkowe wybarwione zostały roztworem DAPI 1:10000 (Sigma Aldrich; 5 min, 37°C w ciemności). Fluorescencję obserwowano pod mikroskopem fluorescencyjnym (Leica).

3.1.10 Ocena kariotypu otrzymanych komórek hiPS

Ocenę kariotypu wykonano w Laboratorium Cytogenetyki Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie. Wykorzystano standardową procedurę barwienia skondensowanych chromosomów barwnikiem Giemsy. Podział komórek iPS został zatrzymany w metafazie poprzez użycie kolchicyny. Komórki zostały utwalone, następnie poddano je trawieniu trypsyną w celu pozbycia się białek. Wybarwione roztworem barwnika Giemsy obserwowano pod mikroskopem.

3.1.11 Ocena aktywności alkalicznej fosfatazy w komórkach hiPS

Aktywność alkalicznej fosfatazy jest wczesnym markerem wskazującym na rozwój charakteru pluripotentnego reprogramowanych komórek. Do oceny aktywności enzymu wykorzystano zestaw Alkaline Phosphatase Detection Kit (MERCK Millipore). Przed barwieniem komórki utwalono za pomocą 4% roztworu formaldehydu (2 min, temp. pokojowa). Następnie przygotowano mieszaninę reakcyjną składającą się z fosforanu naftolu, odczynnika Fast Red Violet oraz wody, w stosunku 2:1:1. Mieszaninę naniesiono na komórki, następnie inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej w ciemności. Po inkubacji analizowano ilość pozytywnych kolonii.

3.2 Ocena aktywności promotora *PGK* po reprogramowaniu

3.2.1 Analiza poziomu fluorescencji gfp poprzez cytometrię przepływową

Oceny poziomu fluorescencji gfp analizowanych komórek dokonano stosując metodę cytometrii przepływowej. Komórki w ilości co najmniej 10^4 odklejono od płytki hodowlanej przy użyciu trypsyny (0,25%), następnie przepłukano 3-krotnie w buforze PBS (1200 rpm, 5 min, temp. pokojowa). Po ostatnim wirowaniu zawieszono komórki w 500 μ l buforu PBS i analizowano na cytometrze przepływowym FACS Aria (Becton Dickinson). Wyniki analizowano korzystając z oprogramowania FlowJo (V10, FLOWJO LLC).

3.2.2 Izolacja DNA

Do izolacji DNA użyto zestawu The PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Life Technologies) według protokołu zalecanego przez producenta. Komórki odklejono od płytek hodowlanych przy użyciu trypsyny (0,25%) a następnie zawieszono w 200 μ l buforu PBS. Do prób następnie dodano 20 μ l RNAzy A (20 mg/ml) i inkubowano przez 2 minuty w temperaturze pokojowej. Następnie dodano 200 μ l PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer oraz 20 μ l Proteinazy K (20 mg/ml) i po dokładnym wymieszaniu próby na mieszadle typu vortex inkubowano przez 15 minut w temperaturze 55°C. Po inkubacji dodano 200 μ l 96% etanolu, a następnie oczyszczono DNA na kolumnach. DNA eluowano przy pomocy 50 μ l H₂O.

3.2.3 Sekwencjonowanie bisulfitowe

W celu oceny poziomu metylacji promotora *PGK* w analizowanych komórkach wyizolowany DNA poddano konwersji bisulfitowej. Metoda ta polega na chemicznej konwersji niemetylowanej cytozyny do uracylu, podczas gdy cytozyny metylowane pozostają niezmienione. Po konwersji przeprowadzana jest reakcja PCR amplifikująca specyficzny produkt, który następnie jest sekwencjonowany. Do konwersji bisulfitowej wykorzystano zestaw EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research), a procedurę przeprowadzono według protokołu zalecanego przez producenta. Do reakcji wykorzystano 1,8 μ g DNA, do którego dodano 130 μ l odczynnika do konwersji. Próby inkubowano przez 10 minut w 98°C w celu denaturacji DNA, a następnie przez 2,5 godziny w temperaturze 64°C. DNA oczyszczono na kolumnach, z uwzględnieniem etapu desulfonacji, a następnie eluowano w 30 μ l H₂O. Następnie przeprowadzono reakcję PCR w celu amplifikacji promotora *PGK*

przy użyciu specyficznych starterów: FW: 5'- AGAGAGAGATAGAGATAGATTTAT-3' oraz RV: 5'-CTATTAACCACAACCCAT-3', zastosowano polimerazę OneTaq® DNA Polymerase (New England BioLabs). Skład mieszaniny reakcyjnej:

- polimeraza (2 U/μl) – 0,125 μl
- 5X OneTaq Standard Reaction Buffer – 5 μl
- startery (5'+3'; 20 μM) – 1 μl
- dNTPs (20 μM) – 0,2 μl
- matryca DNA – 5 μl
- H₂O – do 25 μl

Reakcje przeprowadzono w warunkach:

- denaturacja wstępna – 98°C; 30 s
 - denaturacja – 98°C; 30 s
 - wiązanie starterów – 58°C; 45 s
 - elongacja – 68°C; 60 s
 - elongacja końcowa – 68°C; 7 min
- } 35 cykli

Produkt reakcji PCR wykorzystano do ligacji do wektora pGEM®-T Easy (Promega) przy użyciu ligazy T4 DNA Ligase (Promega). Skład mieszaniny reakcyjnej:

- pGEM®-T Vector (50 ng/μl) – 0,2 μl
- T4 DNA Ligase – 0,2 μl
- 2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase – 2,5 μl
- insert – 1,1 μl

Ligację prowadzono przez noc w 16°C. Produkt ligacji wprowadzono do bakterii kompetentnych *E. coli* DH5α wykorzystując metodę szoku cieplnego (42°C, 45 s) i inkubację w 250 μl medium S.O.C. (AMRESCO; 1 h, 300 rpm). Bakterie wysiano na podłoże LB-agar z dodatkiem czynników selekcyjnych IPTG (40 μl; 20 mg/ml; AMRESCO) oraz X-Gal (10 μl; 20 mg/ml; AMRESCO). Bakterie inkubowano przez noc w 37°C. Powstanie kolonii bakteryjnych o kolorze białym świadczyło o ligacji produktu do wektora, kolonie niebieskie reprezentowały bakterie zawierające pusty wektor. Z kolonii pozytywnych założono hodowle płynne w objętości 3 ml pożywki LB z dodatkiem penicyliny (50 mg/ml) i inkubowano przez noc wytrząsając (37°C, 270 rpm). Następnego dnia wyizolowano DNA

plazmidowy stosując zestaw Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research) według protokołu zalecanego przez producenta. Obecność insertu potwierdzono trawieniem restrykcyjnym z wykorzystaniem enzymu EcoRI (bufor EcoRI, 37°C, 1 h). Produkt trawienia uwidoczniło na żelu agarozowym (1,5%). Produkty ligacji zawierające insert zostały następnie wysłane do sekwencjonowania (Genomed). Otrzymane wyniki przyrównane zostały do sekwencji referencyjnej promotora *PGK* korzystając z dostępnej on-line platformy do analizy metylacji DNA – BISMA (<http://services.abc.uni-stuttgart.de/BDPC/BISMA/>).

3.2.4 Immunoprecypitacja chromatyny (ChIP – chromatin immunoprecipitation)

Metodę immunoprecypitacji chromatyny wykorzystano do określenia występowania markera chromatyny nieaktywnej H3K9me3 w pobliżu miejsca wiązania transrepresora z domeną KRAB w systemie reporterowym. Do analizy wykorzystano zestaw LowCell# ChIP kit (Diagenode). W pierwszym etapie odklejono komórki od płytek hodowlanych przy użyciu trypsyny (0,25%). Komórki (po 1 mln komórek z każdego z wariantów) zawieszono w 500 µl buforu PBS. Następnie przeprowadzono procedurę cross-link, mającą na celu utrwalenie wiązania DNA-białko. Do komórek dodano roztwór formaldehydu (37%) w stężeniu końcowym 1% i wytrząsano w temperaturze pokojowej przez 8 minut. Następnie dodano 57 µl glicyny (1,25 M) w celu zahamowania reakcji i wytrząsano przez kolejne 5 minut. Komórki wirowano (1200 rpm, 4°C, 10 min), usunięto supernatant i przemyto komórki 3-krotnie w zimnym buforze PBS z dodatkiem inhibitorów proteaz (PI – ang. *protease inhibitor*; 1x; Sigma Aldrich) oraz PMSF (0,001 M; Sigma Aldrich). Wszystkie płukania wykonano w takich samych warunkach (4°C, 1200 rpm, 10 min). Po ostatnim płukaniu odciągnięto supernatant, a komórki zawieszono w 130 µl buforu do lizy dołączonego do zestawu (buffer B) z dodatkiem inhibitorów proteaz (1x; Diagenode). Tak przygotowany lizat komórkowy poddano sonikacji w celu dzielenia chromatyny na fragmenty o wielkość 100-300 pz używając sonikatora Bioruptor (Diagenode) przy programie 55 cykli 30 s on/30 s off. Następnie, do pofragmentowanej chromatyny dodano 870 µl buforu A i rozpoczęto procedurę immunoprecypitacji. Dzień wcześniej przygotowano magnetyczne złoża opłaszczone przeciwciałem specyficznym dla H3K9me3. Do 10 µl złóż magnetycznych zawieszonych w 90 µl buforu A dodano 3 µl przeciwciała anti-H3K9me3 (1 µg/µl; Abcam) i inkubowano przez noc (4°C, 40 rpm). Następnego dnia umieszczono próby na statywie magnetycznym, po czym odciągnięto supernatant. Do tak przygotowanych złóż dodano 100 µl chromatyny po sonikacji i inkubowano przez noc (4°C, 40 rpm). Po nocnej inkubacji płukano złoża wg protokołu w buforach zawierających detergenty oraz chelatory jonów

i soli, a następnie wykonano procedurę de-cross-link w celu izolacji DNA związanego ze złożami opłaszczonymi przeciwciałem. Stężenie DNA mierzono przy użyciu odczynnika Quant-iT™ PicoGreen (Life Technologies) według protokołu producenta. DNA wykorzystano do oceny wzbogacenia frakcji chromatyny nieaktywnej w pobliżu miejsca wiązania KRAB-represora w badanych komórkach hodowanych bez obecności doksycykliny. Do tego celu wykorzystano metodę real-time qPCR stosując startery specyficzne dla fragmentu H1 znajdującego się w odległości ~100 par zasad od sekwencji tetO (FW: 5'-GTCACTAGGCGGGAACACC-3'; RV: 5'-ACTCCCCTGTCCCTCAGAG-3'). Jako kontrolę negatywną wykorzystano startery amplifikujące gen referencyjny ACTB (FW: 5'-TTTGCACTTTCTGCATGTCC-3', RV: 5'-GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA-3').

3.3 Rola czynników KRAB-ZFP w utrzymywaniu stanu pluripotencji komórek

3.3.1 Transfekcja siRNA

W celu określenia roli białka TRIM28 oraz wybranych czynników transkrypcyjnych z domeną KRAB (KRAB-ZFPs) w utrzymywaniu pluripotencji komórek wykonano eksperymenty z wyciszaniem ekspresji poszczególnych genów. Posłużono się transfekcją siRNA, której warunki zostały zoptymalizowane dla komórek pluripotentnych. Transfekcja przeprowadzana była w odstępach 72 godzin na dołkach płytki 12-dołkowej o wyjściowej konfluencji komórek ok. 30%. Zastosowano odczynnik Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent (Life Technologies). Dla każdego wariantu siRNA przygotowano dwie probówki zawierające 90 µl medium Opti-MEM (Gibco). Do pierwszej probówki dodano 1,7 µl odczynnika do transfekcji, do drugiej 100 µM koktajlu trzech siRNA specyficznych dla danego czynnika KRAB-ZFP lub 100 µM koktajl dwóch siRNA specyficznych dla TRIM28 (Tab. 5). Po 5 minutach zawartość probówki pierwszej dodano kroplami do probówki drugiej, wymieszano na mieszadle typu vortex przez 10 sekund, a następnie inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Na dołek płytki 12-dołkowej dodano 320 µl medium Opti-MEM (Gibco), a następnie naniesiono kroplami mieszaninę transfekcyjną. Komórki pozostawiona na 6 godzin w inkubatorze w warunkach hipoksji (37°C, 5% CO₂, 5% O₂). Po 6 godzinach dodano 0,5 ml pełnego medium hiPS (Tab. 4) i pozostawiono na noc. Następnego dnia zmieniono medium na świeże. Do wyciszenia ekspresji poszczególnych genów stosowano równomolarne mieszaniny trzech (KRAB-ZFP) lub dwóch (TRIM28)

siRNA. Poziom wyciszenia ekspresji poszczególnych genów oceniano metodą real-time qPCR. Istotność statystyczną wyliczono stosując test one-way ANOVA korzystając z oprogramowania GraphPad Prism6. Eksperyment przeprowadzono w trzech powtórzeniach biologicznych. Jako kontrolne siRNA wykorzystano znakowany fluorescencyjnie BLOCK-iT (Life Technologies).

Tabela 5: Wykaz sekwencji siRNA zastosowanych do wyciszenia ekspresji poszczególnych genów:

Nazwa	Sekwencja 5'
TRIM28_1_a	5'GCACUAGCUGUGAGGAUAAUU
TRIM28_1_s	5' UUAUCCUCACAGCUAGUGCUU
TRIM28_2_a	5'CGUGUACUGCUGGCCCUAAUUU
TRIM28_2_s	5'AUAGGGCCAGCAGUACACGUU
ZFP57_1_s	5' CAAAGGAGGCAGUGAGCAUUU
ZFP57_1_a	5' AUGCUCACUGCCUCCUUUGUU
ZFP57_2_s	5' GGAACAGUGGAGAGAGUUUUU
ZFP57_2_a	5' AAACUCUCUCCACUGUUCUUU
ZFP57_3_s	5' GAAGCAUGGAGGUGAUCAAUU
ZFP57_3_a	5' UUGAUCACCUCCAUGCUUCUU
ZNF114_1_s	5' UCAUUGCACUGGAGAGAAAUU
ZNF114_1_a	5' UUUCUCUCCAGUGCAAUGAUU
ZNF114_2_s	5' GAGACGUGAUGCUGGAAAUUU
ZNF114_2_a	5' UUUUCCAGCAUCACGUCUCUU
ZNF114_3_s	5' GCAGAGACUCCUUACGGAAUU
ZNF114_3_a	5' UUCCGUAAGGAGUCUCUGCUU
ZNF483_1_s	5' GAGAUCAGGAUUUGGUAAUU
ZNF483_1_a	5' UUACCCAAAUCCUGAUCUCUU
ZNF483_2_s	5' AGGAGUGCUACUGGAAAUU
ZNF483_2_a	5' UUUUCCAGUAGCACUUCUUUU
ZNF483_3_s	5' GGACUGUACUGAUACUCAUUU
ZNF483_3_a	5' UUGAGUAUCAGUACAGUCCUU
ZNF519_1_s	5' GUGUAAAGAAUGUGCUAAAUU
ZNF519_1_a	5' UUUAGCACAUUCUUUACACUU
ZNF519_2_s	5' GUGUAAGGAAUGUGGCAAUUU
ZNF519_2_a	5' UUUGCCACAUCCUUACACUU
ZNF519_3_s	5' GGAGAGAAGUCUUUCAAAUUU
ZNF519_3_a	5' AUUUGAAAGACUUCUCUCCUU
ZNF589_1_s	5' GCUGCUACCUCGUUUUGCUUUU
ZNF589_1_a	5' AAGCAAACGAGGUAGCAGCUU
ZNF589_2_s	5' ACAACAUCUUCUGAUAAAUU
ZNF589_2_a	5' UUAUCAGAAGGAUGUUGUUU
ZNF589_3_s	5' GCUACACAAUCAUCCUAUUUU
ZNF589_3_a	5' AAUAGGAUGAUUGUGUAGCUU
ZNF620_1_s	5' AGGAGACAUUUCACAGAUAAU
ZNF620_1_a	5' UAUCUGUGAAAUGUCUCCUUU
ZNF620_2_s	5' CCCUGAGGCAGUGUGUGAAUU
ZNF620_2_a	5' UUCACACACUGCCUCAGGGUU
ZNF620_3_s	5' CGAUUAAGCUCCAACACAGUU
ZNF620_3_a	5' CUGUGUUGGAGCUUAAUCGUU
ZNF695_1_s	5' GCAGGUAUUGCGAGAUUUAUU
ZNF695_1_a	5' UAAAUCUCGCAAUACCUGCUU
ZNF695_2_s	5' CUGCAAGUUUCAUUCCAAUUU
ZNF695_2_a	5' UUUGGAAUGAAACUUGCAGUU
ZNF695_3_s	5' GGUGAGGAUAGCUUCAUAUUU
ZNF695_3_a	5' UAUUGAAGCUAUCCUCACCUU
ZNF714_1_s	5' GGCAGAGAGGAAGCUUCUAUU
ZNF714_1_a	5' UAGAAGCUUCCUCUCUGCCUU
ZNF714_2_s	5' ACACCUACAUCAACAUAUUU
ZNF714_2_a	5' UUUUUGUUGAUGUAGGUGUU
ZNF714_3_s	5' UGGCAAAGCCUUCUACCAUUU
ZNF714_3_a	5' AUGGUAGAAGGCUUUGCCAUU

3.3.2 Izolacja RNA

Całkowity RNA izolowano z badanych komórek przy użyciu buforu lizującego TRI Reagent (Sigma Aldrich). Zebrane osady komórkowe zawieszano w 1 ml buforu i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Następnie dodawano 200 μ l chloroformu, mieszano przez 15 sekund na mieszadle typu vortex i inkubowano w temperaturze pokojowej przez kolejne 10 minut. Po odwirowaniu prób przez 10 minut (12000 g, 4°C), przeniesiono górną fazę do nowych probówek. Dodano 500 μ l izopropanolu w celu wytrącenia RNA i delikatnie wymieszano poprzez kilkukrotne odwracanie próbówki. Próby pozostawiono przez 30 minut na lodzie. Po tym czasie zwirowano przez 10 minut (12000 g, 4°C). Usunięto supernatant, a osad zawierający RNA przemyto 75% etanolem (14000 g, 10 min, 4°C). Po wirowaniu usunięto etanol, a osad suszono na powietrzu przez 10-15 minut. Następnie rozpuszczano RNA w wodzie w objętości 30-50 μ l, w zależności od wielkości osadu. Stężenie RNA mierzono przy użyciu NanoDrop2000c (Thermo Fisher). Przygotowany RNA przechowywano w temperaturze -80 °C.

3.3.3 Odwrotna transkrypcja

W celu oceny ekspresji genów w badanych komórkach, izolowany RNA poddawano reakcji odwrotnej transkrypcji w celu otrzymania cDNA. Użyto zestawu iScript™ cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD). Skład mieszaniny reakcyjnej:

- RNA – 1 μ g
- 5x iScript reaction mix – 4 μ l
- iScript reverse transcriptase – 1 μ l
- H₂O – do 20 μ l

Tak przygotowaną mieszaninę inkubowano:

- 25°C – 5 min
- 42°C – 40 min
- 85°C – 5 min

Przygotowany cDNA przechowywano w temp. -20 °C.

3.3.4 Amplifikacja cDNA metodą Real-Time qPCR

W metodzie qPCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time qPCR*) wykorzystano zestaw LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche). Barwnik SYBRGreen przyłącza się do dsDNA i emituje fluorescencję mierzoną przy długości fali 522 nm. Wyniki otrzymane dla badanych genów normalizowane były do poziomu ekspresji genu referencyjnego GAPDH w badanych próbach. Skład mieszaniny reakcyjnej:

- 2x LightCycler® 480 SYBR Green I Master – 5 µl
- startery 5'+3' (20 µM) – 1 µl
- cDNA – 1 µl
- H₂O – do 10 µl

Tabela 6: wykaz starterów wykorzystanych do amplifikacji cDNA badanych genów.

cDNA genu	sekwencja starterów	temp. wiązania starterów [°C]
GAPDH	FW: 5'- gggtttatggagtcctcttg-3'	60
	RV: 5'- tccaactacctgactcagc-3'	
ZFP 57	FW: 5'-gcaggaagccatgaagagag-3'	60
	RV: 5'-gccacatcctcaaagtgac-3'	
ZNF 114	FW: 5'- gagtggaccctgctggac-3'	60
	RV: 5'- ttttcatggagttgcccaat-3'	
ZNF 483	FW: 5' atagaagattgaccagatgc--3'	59
	RV: 5'- gacaaacagtgaccatttadc-3'	
ZNF 519	FW: 5'- ttggagaactacagaaacctcgt-3'	59
	RV: 5'- gctctggtaaatgccttgg-3'	
ZNF 589	FW: 5'- gcagagtggaagagactgagc-3'	59
	RV: 5'- gacttctggctttgattctgc-3'	
ZNF 620	FW: 5' gagaattatgcaaatgtggcttc--3'	60
	RV: 5'- ataggttcccaggatcagag-3'	
ZNF 695	FW: 5'- acagaaacctgatcctctg-3'	62
	RV: 5'- ttcacgttccaggctcttcc-3'	
ZNF 714	FW: 5'-gccctggaatatgaagatatg-3'	60
	RV: 5'-ttcttaactgtaattctcatgt-3'	
TRIM 28	FW: 5'- tggctaccgactccacctt -3'	60
	RV: 5'-aactcctgtggggagctgta-3'	
OCT3/4	FW: 5'-ttcgcaagcctcatttc-3'	60
	RV: 5'-ccatcacctccaccacct-3'	
NANOG	FW: 5'-agatgcctcacacggagact-3'	60
	RV: 5'-tttgcgacactcttctctgc-3'	

Reakcję PCR prowadzono w warunkach:

- denaturacja wstępna – 95°C; 10 min
 - denaturacja – 95°C; 10 s
 - wiązanie starterów – temperatura odpowiednia dla danego startera (Tab. 6); 15 s
 - elongacja – 72°C; 15 s
- } 45 cykli
- topnienie produktu i analiza krzywej topnienia – 15 sekund w 65°C a następnie stopniowy wzrost temperatury do 95°C z cyklicznym pomiarem zmniejszającej się fluorescencji co 0,2°C
 - chłodzenie prób – 40°C; 10 s

3.4 Ocena cało-genomowego profilu metylacji DNA

3.4.1 Przygotowanie bibliotek DNA do analizy RRBS

Wyizolowano DNA z linii komórek PHDF 26, hiPS 25.6 oraz hiPS 26.6 pozyskanych w naszym laboratorium a także z komórek hES (BG01V – ATCC® SCRC-2002™). Z każdej próby pobrano 2 µg DNA, a następnie poddano trawieniu enzymem restrykcyjnym NEXTflex MspI (Bioo Scientific). Enzym ten jest niewrażliwy na metylację i przecina DNA w miejscu 3'C\CGG5' generując fragmenty DNA o różnej długości zakończone nukleotydami CG na obydwu końcach. Następnie wyodrębniono frakcję zawierającą fragmenty DNA wielkości 300-500 pz stosując złoża magnetyczne Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter Genomics). W kolejnym etapie przeprowadzono wypełnianie końców nici DNA przy użyciu NEXTflex™ Bisulfite-Seq End Repair Enzyme Mix (Bioo Scientific) według protokołu producenta, a następnie oczyszczono DNA stosując złoża magnetyczne Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter Genomics). W kolejnym etapie wykonano adenylację końców stosując NEXTflex™ Bisulfite-Seq Adenylation Mix (Bioo Scientific) inkubując próby w 37°C przez 30 minut. Następnie do adenylowanego DNA dodano adaptory NEXTflex™ Bisulfite-Seq Barcode, niezbędne do późniejszego sekwencjonowania, korzystając z buforu zawierającego ligazę (NEXTflex™ Bisulfite-Seq Ligation Mix). Tak przygotowany DNA oczyszczono na złożach magnetycznych i poddano konwersji bisulfitowej przy użyciu zestawu EZ DNA Methylation-Gold (Zymo Research) według protokołu zalecanego przez producenta. W ostatnim etapie amplifikowano DNA przy użyciu NEXTflex™ Bisulfite-Seq PCR Master Mix. Tak przygotowane próby sekwencjonowane były na aparacie Illumina HiSeq1500 w Zakładzie Genetyki Medycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierownictwem prof. dr hab. n. med. Rafała Płoskiego.

3.4.2 Analizy bioinformatyczne

Do analizy cało-genomowego profilu metylacji DNA użyto analiz bioinformatycznych w określonej kolejności. Wszystkie analizy wykonane zostały przez zespół z Interdyscyplinarnego Centrum Modelowania Matematycznego i Komputerowego (ICM) z Warszawy, pod kierownictwem dr hab. Przemysława Biecka.

FastQC

Analiza jakości danych wygenerowanych po sekwencjonowaniu RRBS została przeprowadzona używając programu FastQC (Babraham Bioinformatics).

Pakiet Bismark

Bismark (Babraham Bioinformatics) jest pakietem narzędzi informatycznych pozwalających na przyrównanie plików wygenerowanych po sekwencjonowaniu RRBS do ludzkiego genomu referencyjnego oraz na określenie stopnia metylacji każdej zsekwencjonowanej cytozyny. W pierwszym etapie przygotowano ludzki genom referencyjny hg19 poddając go konwersji bisulfitowej *in silico*. Następnie przy użyciu skryptu Bowtie2 (Johns Hopkins University) wykonano przyrównanie badanej próby do sekwencji referencyjnej, stosując standardowe parametry pozwalające na przyrównanie fragmentu o długości 20 pz ($L = 20$), nie pozwalając na żadne niedopasowanie w obrębie tej sekwencji ($N = 0$). W ten sposób określono dokładną pozycję każdego nukleotydu, który został zsekwencjonowany w analizie RRBS. W kolejnym etapie określono poziom metylacji dla każdej zsekwencjonowanej cytozyny przy użyciu skryptu bismark methylation extractor (Babraham Bioinformatics). Skrypt ten pozwala na określenie poziomu metylacji cytozyny w kontekście CG, CHG oraz CHH (H – dowolny nukleotyd).

Pakiet methylKit

Do określenia różnic w poziomie metylacji DNA pomiędzy badanymi próbkami wykorzystano pakiet methylKit [61] działający w środowisku do obliczeń statystycznych i wizualizacji wyników R. W pierwszym etapie wykonano analizę pozwalającą na określenie stopnia metylacji DNA dla każdej zsekwencjonowanej cytozyny. Do analizy różnicowej wybrano cytozyny z co najmniej 10-krotnym pokryciem. Korelację profilu metylacji DNA wykonano na podstawie cytozyn, które były zsekwencjonowane z określonym pokryciem w obydwu porównywanych próbkach, stosując współczynnik korelacji Pearsona. Następnie określono regiony DMR grupując odczyty we fragmenty o długości 1000 pz. Wybrano

regiony DMR, które wykazywały różnicę poziomu metylacji pomiędzy badanymi próbkami $> 25\%$ oraz $q\text{-value} < 0,01$. Z regionów tych wyodrębniono tylko te, które znajdowały się obrębie promotorów genowych (-2000 pz od miejsca startu transkrypcji – TSS ang. *transcription start site*). Promotory podzielono na te które uległy hipo- oraz hiper-metylacji po reprogramowaniu komórek somatycznych do komórek iPS.

DAVID

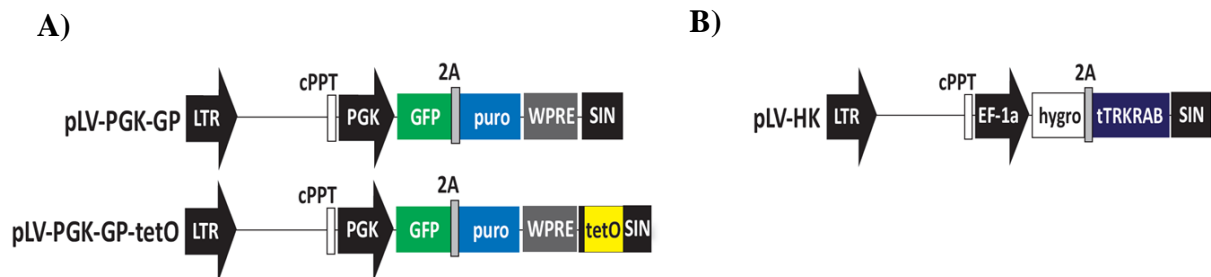
Analizę ontologii genów, które znajdowały się w obrębie promotorów genowych wykonano przy użyciu narzędzia on-line – DAVID [62,63]. Wykonano również analizę funkcjonalną, dzięki której określono, do jakich grup należą geny, których metylacja zmieniła się w czasie reprogramowania.

4. Wyniki

4.1 Ocena statusu promotora *PGK* w komórkach somatycznych

4.1.1 KRAB-zależna represja transkrypcji jest zjawiskiem odwracalnym w komórkach somatycznych

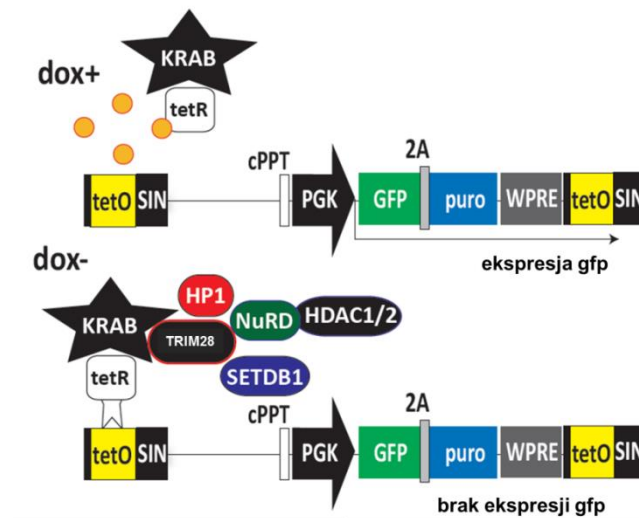
Do badania poziomu KRAB-zależnej represji promotorów komórkowych w trakcie generowania ludzkich komórek iPS z komórek somatycznych stworzono egzogenny system reporterowy. System ten składał się z dwóch wektorów lentiwirusowych (LV), których działanie zależy od obecności doksycykliny (dox) w pożywce hodowlanej. Wektor lentiwirusowy pLV-PGK-GP-tetO lub wektor kontrolny (bez sekwencji tetO) pLV-PGK-GP (Ryc. 12A) zostały wprowadzone do komórek PHDF na drodze transdukcji. Komórki poddano również transdukcji wektorem lentiwirusowym pLVE-HK (Ryc. 12B) kodującym transrepresor z domeną KRAB.



Ryc. 12: Schematy wektorów LV wykorzystanych do badania KRAB-zależnej metylacji promotora *PGK*. A) Wektor zawierający cDNA kodujący *gfp* pod promotorem *PGK*; z lub bez sekwencji tetO. B) Wektor zawierający cDNA kodujący chimeryczny transrepresor z domeną białkową KRAB (tTR-KRAB).

Gdy doksycyklina jest obecna w pożywce transrepresor nie łączy się z sekwencją tetO wektora pLV-PGK-GP-tetO, a co za tym idzie promotor *PGK* jest aktywny i dochodzi do ekspresji *gfp*. Usunięcie doksycykliny z pożywki powoduje, że tTRKRAB wiąże się do sekwencji tetO. Następnie, domena KRAB transrepresora wiąże się z białkiem TRIM28, które stanowi rusztowanie dla kompleksu białek składającego się m.in. z metyltransferazy histonów SETDB1, deacetylazy histonów kompleksu NuRD oraz białka HP1. Współdziałanie

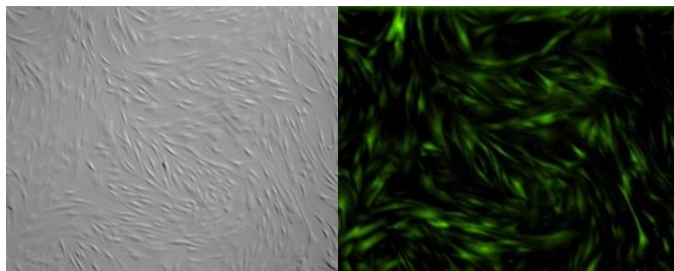
kompleksu białkowego indukuje powstanie heterochromatyny, którego następstwem jest represja transkrypcji gfp z promotora PGK (Ryc. 13).



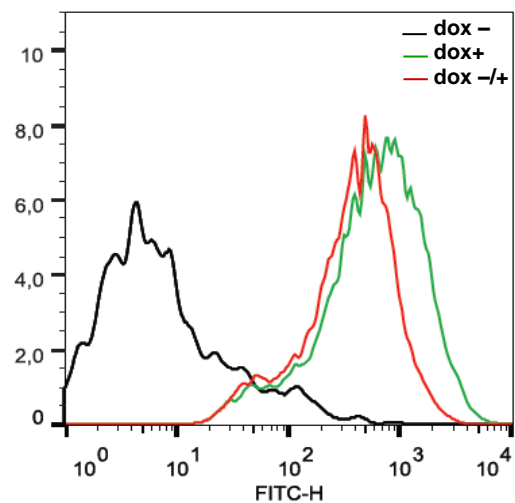
Ryc. 13: Schemat przedstawiający działanie egzogenego systemu represyjnego w obecności doksycykliny w pożywce. Gdy komórki są hodowane bez antybiotyku nie dochodzi do przyłączenia represora z domeną KRAB do sekwencji tetO znajdującej się w wektorze pLV-PGK-GP-tetO. Pod wpływem usunięcia doksycykliny z pożywki dochodzi do wiązania represora do sekwencji tetO i powstania kompleksu białkowego indukującego heterochromatyzację.

Po transdukcji fibroblastów wektorami lentiwirusowymi komórki hodowane były z lub bez doksycykliny w pożywce. Po zaobserwowaniu fluorescencji gfp pod mikroskopem fluorescencyjnym (Ryc. 14A) komórki analizowane były przy pomocy cytometrii przepływowej. Poziom fluorescencji gfp był wysoki w komórkach hodowanych w obecności doksycykliny. W przypadku braku antybiotyku poziom fluorescencji gfp był niewykrywalny, jednak po 10 dniach podawania antybiotyku obserwowano jego ponowny wzrost (Ryc. 14B)

A)



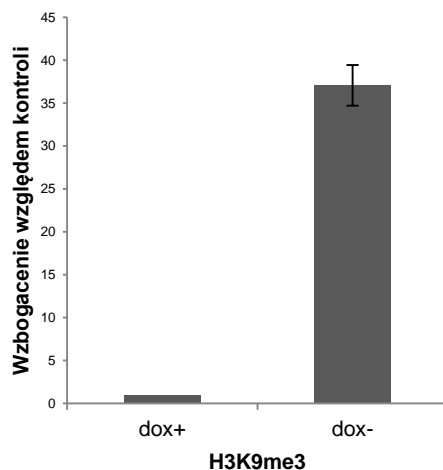
B)



Ryc. 14: Poziom fluorescencji gfp w analizowanych komórkach. A) Zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego (VIS, UV) potwierdzające ekspresję gfp w komórkach hodowanych w obecności doksycykliny w pożywce. B) Poziom fluorescencji gfp mierzony przy pomocy cytometrii przepływowej. Kolor czarny: komórki hodowane bez doksycykliny; kolor zielony: komórki hodowane w obecności doksycykliny; kolor czerwony: komórki hodowane początkowo bez doksycykliny analizowane 10 dni po dodaniu antybiotyku.

4.1.2 KRAB/TRIM28 inicjuje powstanie heterochromatyny w pobliżu miejsca swojego wiązania

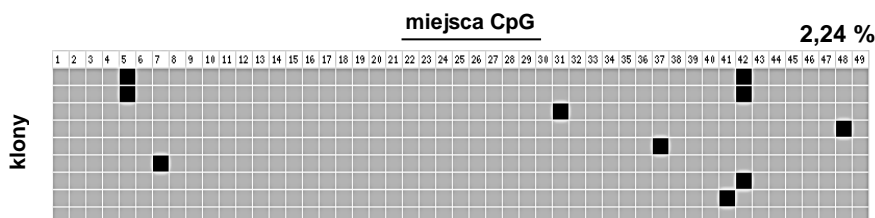
Po przyłączeniu się transrepresora zawierającego domenę KRAB do sekwencji tetO, dochodzi do rekrutacji kompleksu białkowego odpowiedzialnego za powstanie heterochromatyny. Jedno z białek kompleksu, SETDB1, jest metyltransferazą histonów, odpowiedzialną za trimetylację lizyny dziewiątej na histonie trzecim (H3K9me3), markera chromatyny nieaktywnej. Wykorzystując metodę immunoprecypitacji chromatyny połączoną z ilościowym PCR (ChIP-qPCR; ang. *chromatin immunoprecipitation-qPCR*) potwierdzono wzrost frakcji H3K9me3 w pobliżu miejsca wiązania tTRKRAB. Wykorzystano startery amplifikujące fragment znajdujący się ~100 bp od miejsca wiązania represora. W komórkach poddanych KRAB-zależnej represji (dox-) zaobserwowano ponad 37-krotny wzrost H3K9me3 w porównaniu do komórek hodowanych w obecności doksycykliny (dox+) (średnie wzbogacenie ilości H3K9me3 porównując komórki dox⁻/dox⁺ = 37,1 ± 1,5; Wykres 1).



Wykres 1: Pomiar ilości markera chromatyny nieaktywnej, H3K9me3, w pobliżu miejsca wiązania tTRKRAB za pomocą ChIP-qPCR. Eksperyment wykonano w dwóch powtórzeniach biologicznych. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe.

4.1.3 KRAB-zależna represja transkrypcji nie jest związana z metylacją DNA w komórkach somatycznych

Promotor *PGK* jest bogaty w miejsca CpG, które są najczęstszym miejscem występowania metylacji DNA. Analizowany fragment egzogenego promotora zawierał 49 miejsc CpG. Określono więc status jego metylacji wykorzystując do tego metodę sekwencjonowania bisulfitowego (Ryc. 15). Analizowano komórki somatyczne poddane KRAB-zależnej represji transkrypcji, czyli takie które hodowane były bez obecności doksycykliny w pożywce. Wykazano brak wzrostu poziomu metylacji DNA promotora (2,24% ±0,82).

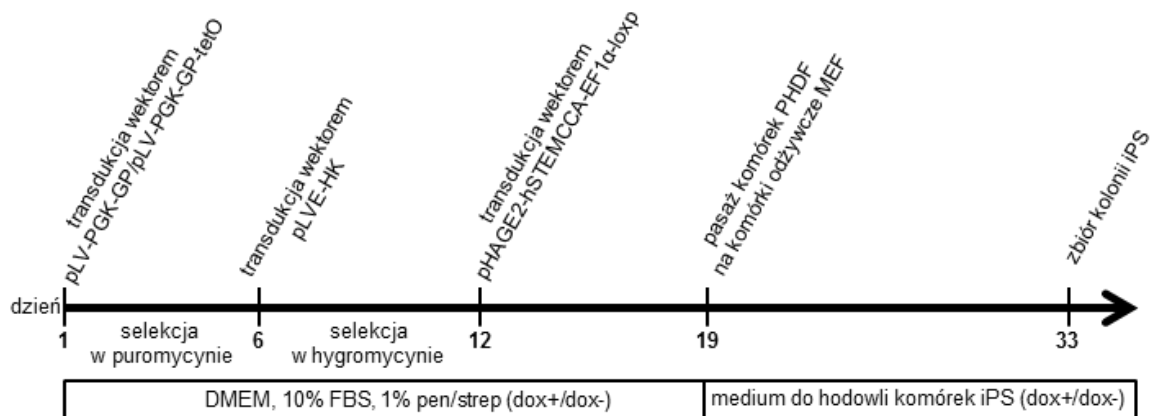


Ryc. 15: Status metylacji promotora *PGK* w komórkach somatycznych poddanych KRAB-zależnej represji określony poprzez sekwencjonowanie bisulfitowe.

4.2 Ocena statusu promotora *PGK* w ludzkich komórkach iPS

4.2.1 Generacja komórek iPS z ludzkich pierwotnych fibroblastów skóry (PHDF) zawierających system reporterowy do badania KRAB-zależnej represji

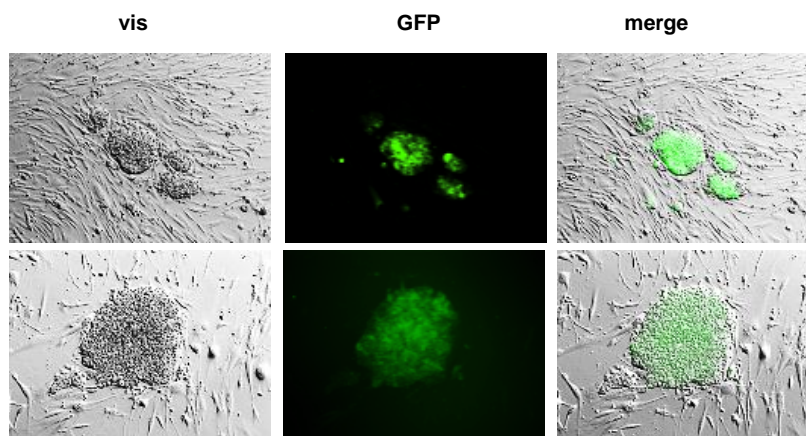
W kolejnym etapie ludzkie komórki PHDF zostały poddane reprogramowaniu w kierunku ludzkich indukowanych komórek pluripotencyjnych – hiPS (ang. *human induced pluripotent stem cells*). Do tego celu wykorzystano wektor lentiwirusowy pHAGE2-hSTEMCCA-EF1 α -loxp zawierający cDNA kodujące cztery czynniki transkrypcyjne: *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* i *c-MYC* (OSKM). Komórki hodowano zgodnie z protokołem (Ryc. 16), pasażując je po siedmiu dniach od transdukcji na komórki odżywcze MEF (ang. *mouse embryonic fibroblasts*) i zmieniając pożywkę hodowlaną na medium do hodowli komórek hiPS (Tab. 4) z dodatkiem lub bez dodatku doksycykliny (dox).



Ryc. 16: Schemat czasowy hodowli komórek hiPS. Komórki PHDF po transdukcji wektorami pLV-PGK-GP-tetO/pLV-PGK-GP i pLVE-HK oraz selekcji w odpowiednich antybiotykach, transdukiwane były wektorem pHAGE2-hSTEMCCA-EF1 α -loxp kodującym cDNA dla czterech czynników transkrypcyjnych OSKM. Po 21 dniach od indukcji pluripotencji kolonie były zbierane i analizowane.

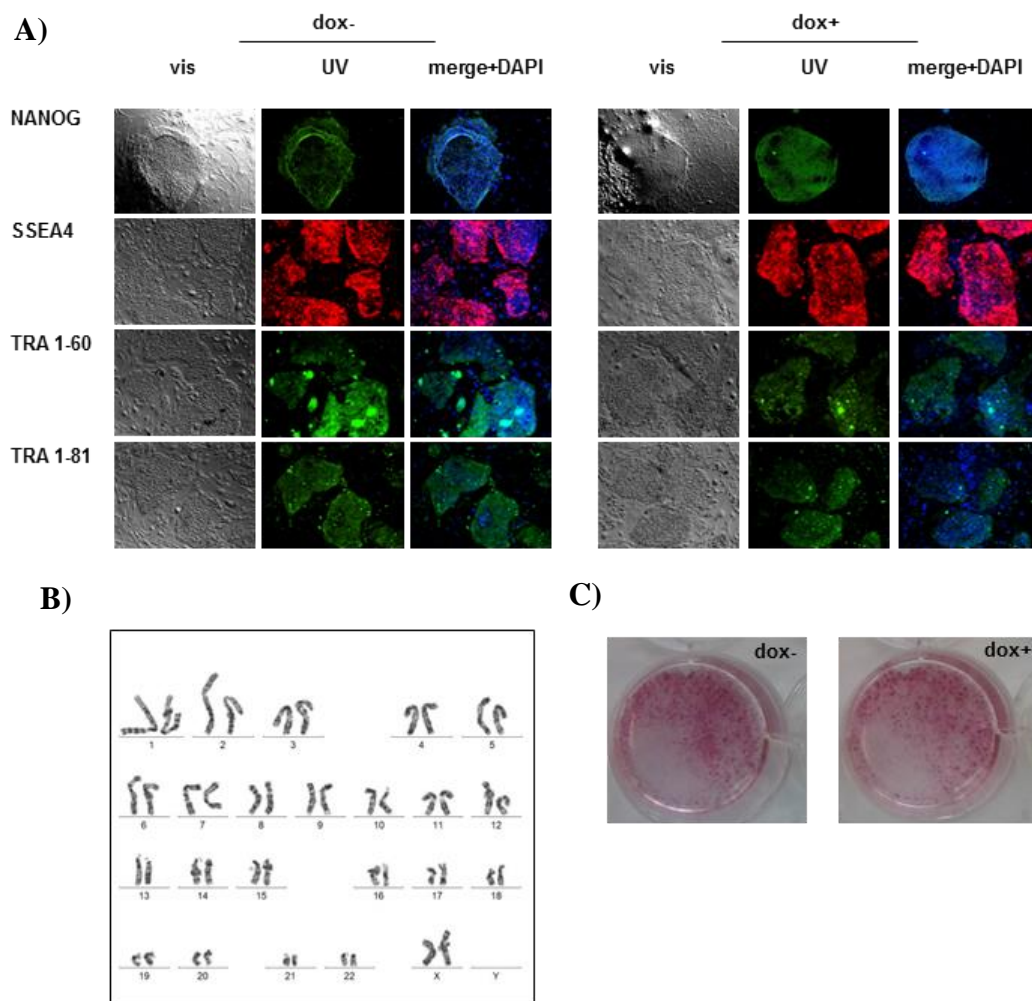
4.2.2 Otrzymane komórki hiPS zawierające system reporterowy do badania KRAB-zależnej represji transkrypcji promotora *PGK* posiadają charakter pluripotenty.

Po 21 dniach hodowli powstałe kolonie iPS przeniesiono na nowe płytki hodowlane pokryte matrygelem i komórkami MEF w celu propagacji hodowli. Potwierdzono, że komórki hodowane w obecności doksycykliny wykazują fluorescencję gfp (Ryc. 17).



Ryc. 17: Ocena fluorescencji białka gfp w komórkach iPS. Kolonie iPS wygenerowane w obecności doksycykliny w pożywce hodowlanej wykazują fluorescencję gfp obserwowaną pod mikroskopem fluorescencyjnym. Zdjęcia wykonano przy powiększeniu 50x.

Wykazano również pluripotenty charakter otrzymanych komórek hiPS. Barwienia immunofluorescencyjne potwierdziły obecność markerów specyficznych dla komórek o charakterze macierzystym takich jak wewnątrzkomórkowy NANOG czy zewnątrzkomórkowe SSEA4, TRA 1-60 czy TRA 1-81 (Ryc. 18A). Ponadto, otrzymane klony komórek hiPS wykazywały normalny kariotyp (Ryc. 18B). Kolonie hiPS wykazywały również aktywność alkalicznej fosfatazy (Ryc. 18C).

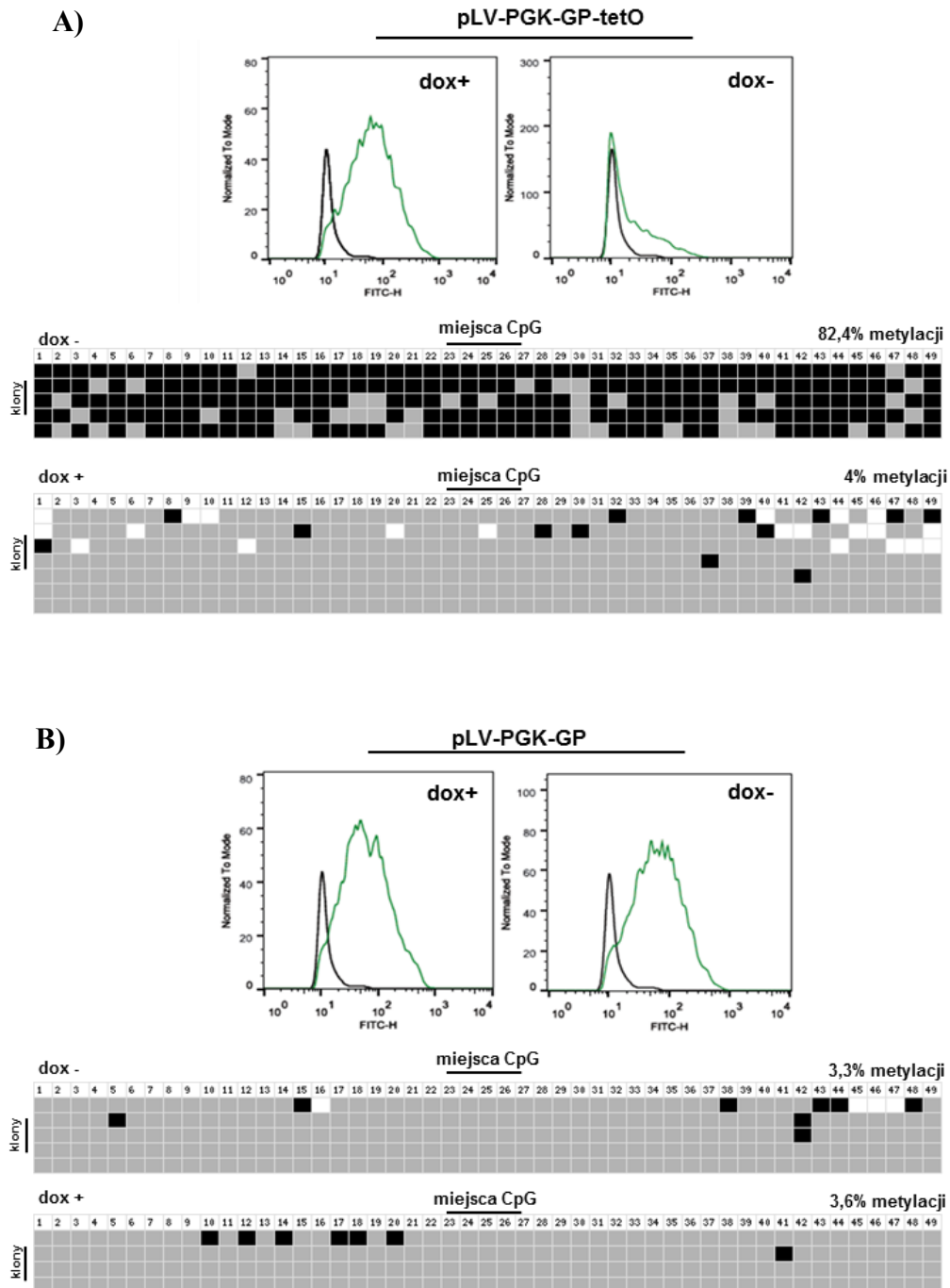


Ryc. 18: Potwierdzenie pluripotentnego charakteru otrzymanych komórek hiPS. A) Barwienie immunofluorescencyjne potwierdzające obecność markerów charakterystycznych dla komórek o charakterze macierzystym – NANOG, SSEA4, TRA1-60, TRA1-81. B) Ocena kariotypu komórek hiPS. C) Aktywność alkalicznej fosfatazy w komórkach hiPS.

4.2.3 KRAB-zależna represja transkrypcji promotora *PGK* w komórkach hiPS jest związana z metylacją DNA

W celu oceny statusu promotora *PGK* po reprogramowaniu komórek somatycznych do komórek hiPS wykonano sekwencjonowanie bisulfitowe oraz zmierzono poziom fluorescencji gfp przy użyciu cytometrii przepływowej. Tak jak w przypadku analizowanych wcześniej komórek somatycznych, poziom fluorescencji gfp był bardzo niski w komórkach poddanych KRAB-zależnej represji (dox-) (Ryc. 19A). Ocena poziomu metylacji DNA promotora *PGK* poprzez sekwencjonowanie bisulfitowe wykazała jednak, że w przeciwieństwie do komórek somatycznych, poziom ten wzrósł z $4\% \pm 2$ do $82,4\% \pm 4,4$ po reprogramowaniu (Ryc. 19A). W komórkach kontrolnych zawierających wektor

pLV-PGK-GP bez sekwencji tetO, fluorescencja gfp utrzymywała się na wysokim poziomie, a promotor wykazywał niski poziom metylacji niezależnie od obecności antybiotyku w pożywce hodowlanej (Ryc. 19B) (dox- 3,3% \pm 2,0; dox+ 3,4% \pm 2,6).

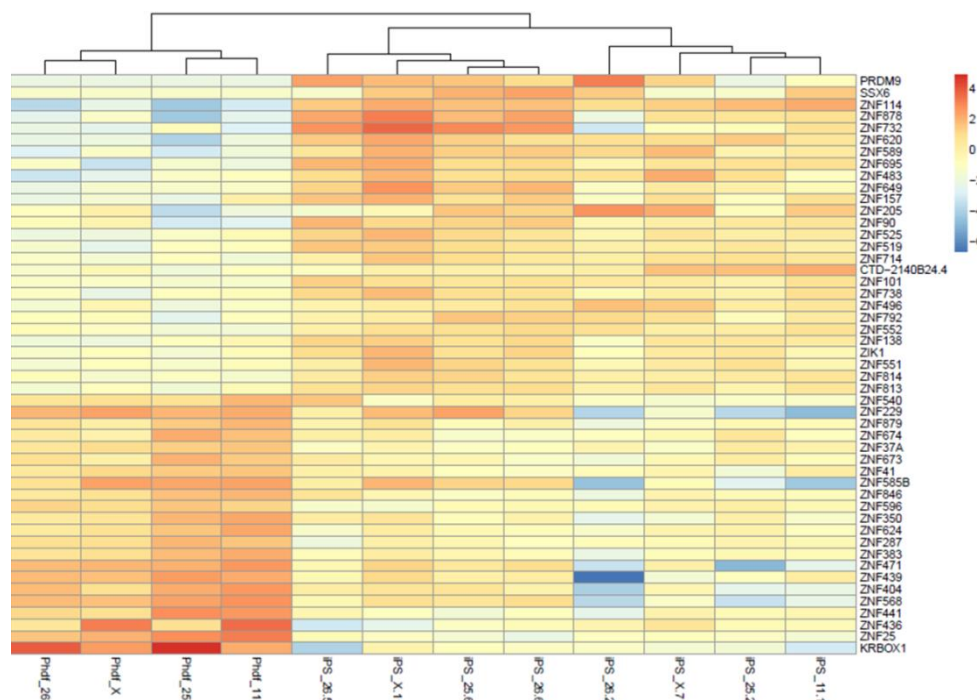


Ryc. 19: Ocena statusu promotora *PGK* po reprogramowaniu komórek somatycznych do komórek hiPS, poprzez cytometrię przepływową i sekwencjonowanie bisulfitowe. A) Komórki zawierające wektor kontrolny. B) Komórki zawierające wektor reporterowy. Linia czarna – izotyp, linia zielona – próba badana. Kwadrat czarny – 100% metylacji, kwadrat szary – 0% metylacji, kwadrat biały – brak danych.

4.3 Wpływ czynników transkrypcyjnych KRAB-ZFP na utrzymanie stanu pluripotencji komórek

4.3.1 Poziom ekspresji czynników KRAB-ZFP w komórkach somatycznych i komórkach hiPS

Wykazano, że w systemie egzogennym KRAB-zależna represja powoduje wyciszenie ekspresji promotora PGK poprzez metylację. W związku z czym, w kolejnym etapie analizowano rolę endogennych czynników KRAB-ZFP w komórkach pluripotencyjnych. Korzystając z metody sekwencjonowania RNA (RNA-seq) określono zmiany poziomu ekspresji czynników KRAB-ZFP po reprogramowaniu komórek PHDF do komórek hiPS. Sekwencjonowaniu poddane zostały cztery linie komórek PHDF wyizolowanych w naszym laboratorium: PHDFX, PHDF11, PHDF25 oraz PHDF26 a także otrzymane z nich linie ludzkich komórek iPS: iPS X.7, iPS X.11, iPS 11.1, iPS 25.2, iPS 25.6, iPS 26.2, iPS 26.5, iPS 26.6. Linie komórek hiPS poddane analizie zostały wygenerowane przez mgr Joannę Wróblewską w ramach pracy doktorskiej. Potwierdzony został również ich charakter pluripotencyjny.

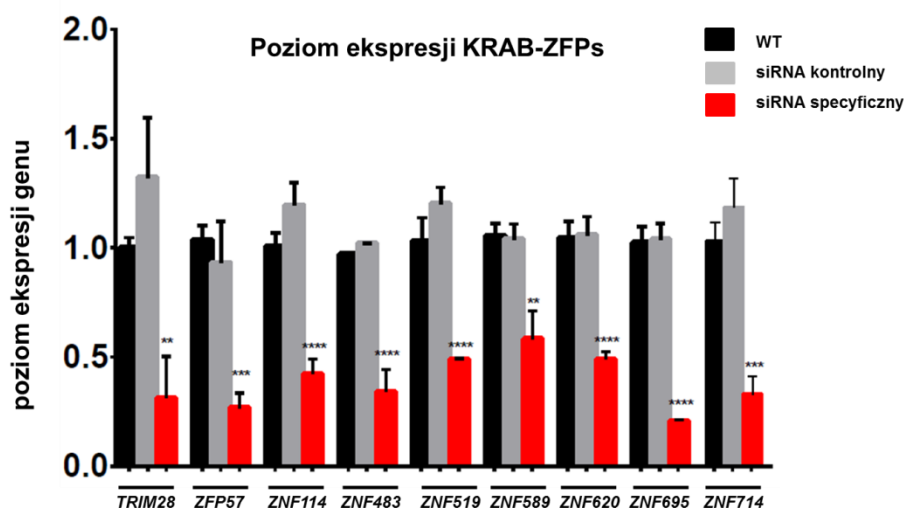


Ryc. 21: Mapa cieplna przedstawiająca zmianę ekspresji czynników transkrypcyjnych KRAB-ZFP. Sekwencjonowaniu poddane zostały cztery linie komórek PHDF oraz osiem linii komórek hiPS. Mapa przedstawia poziom ekspresji dla 49 genów zawierających palce cynkowe i domenę KRAB. Wynik ujemny wskazuje na spadek ekspresji danego genu, wynik dodatni na wzrost ekspresji. Uwzględniono istotność statystyczną ($p < 0,1$).

Na podstawie analiz statystycznych wykonanych w środowisku R określono zmiany w poziomie ekspresji czynników transkrypcyjnych KRAB-ZFP. Analizy bioinformatyczne oraz ich potwierdzenie metodą real-time PCR zostały wykonane w części projektu realizowanej przez dr Urszulę Oleksiewicz. Analizy te umożliwiły selekcję następujących genów KRAB-ZFP charakterystycznych dla komórek pluripotencyjnych: *ZFP57*, *ZNF114*, *ZNF483*, *ZNF519*, *ZNF589*, *ZNF620*, *ZNF695*, *ZNF714*. Wybrane czynniki były analizowane następnie pod kątem ich wpływu na utrzymanie pluripotencji w komórkach hES.

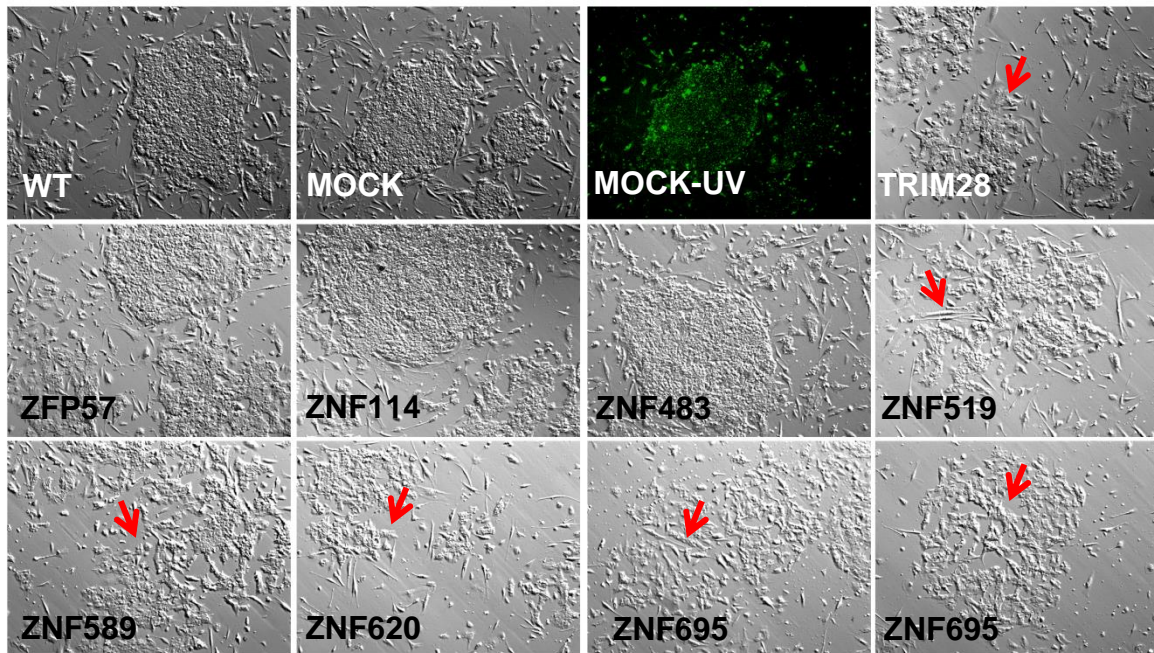
4.3.2 Wyciszenie ekspresji poszczególnych KRAB-ZFP powoduje utratę pluripotentnego charakteru komórek

Do badania wpływu czynników KRAB-ZFP na utrzymanie stanu pluripotencji komórek wybrano czynniki, których ekspresja istotnie wzrasta w komórkach pluripotencyjnych (Ryc. 21). Do wyciszenia ekspresji zastosowano metodę interferencji RNA, a jako model badawczy ludzkie embrionalne komórki macierzyste (hES). Transfekcję przeprowadzano w odstępach 72 godzin, a analizę wykonano po 6 dniach od pierwszej transfekcji.



Wykres 2: Poziom ekspresji genu TRIM28 oraz poszczególnych czynników KRAB-ZFPs po transfekcji przy pomocy siRNA. Do wyciszenia zastosowano równomiarne mieszaniny trzech różnych sekwencji siRNA dla każdego czynnika KRAB-ZFP oraz dwóch siRNA dla TRIM28. Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych. Dla każdego powtórzenia biologicznego wykonano pomiar ekspresji genu w trzech powtórzeniach technicznych. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe. Istotność statystyczna wyliczona została testem one-way ANOVA. $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***) ; $p < 0,0001$ (****).

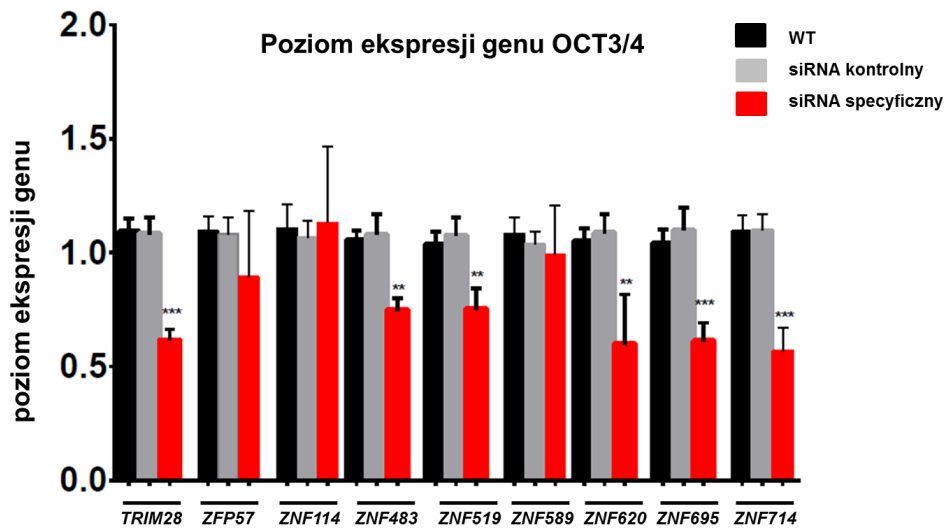
Analiza RT-qPCR potwierdziła spadek ekspresji genów kodujących poszczególne czynniki KRAB-ZFP oraz białko TRIM28 (Wykres 2). Już po 6 dniach zaobserwowano fenotypowe zmiany w morfologii komórek (Ryc. 22). Kolonie komórek hES charakteryzują się regularnym kształtem o wyraźnie zaznaczonych granicach. Po wyciszeniu ekspresji genu TRIM28 oraz niektórych KRAB-ZNF kolonie zaczęły tracić swoje właściwości, ich wyraźne granice zaczęły zanikać, a pojedyncze komórki nabierały wrzecionowatego kształtu.



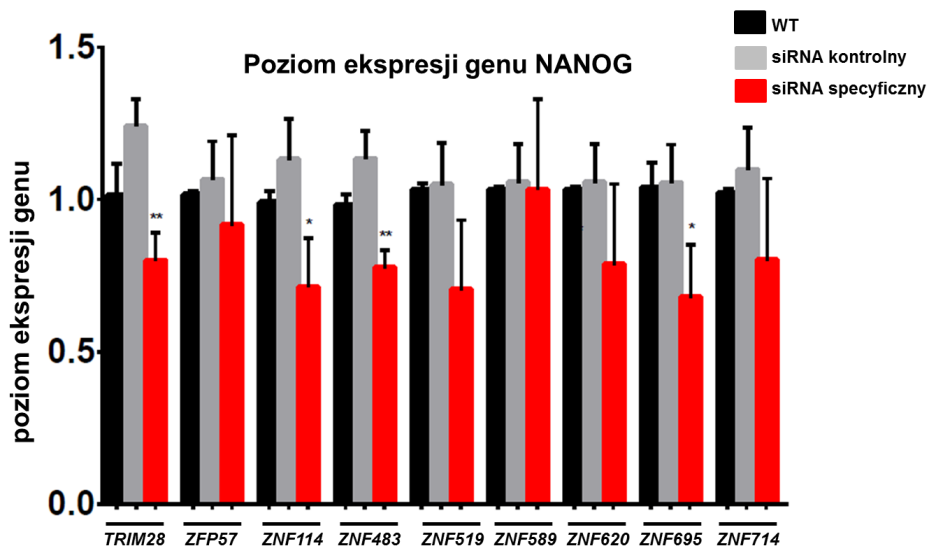
Ryc. 22: Zmiany morfologiczne komórek hES 6 dni po wyciszeniu ekspresji poszczególnych genów. Zdjęcia mikroskopowe w powiększeniu 50x (VIS, UV).

Następnie dokonano oceny poziomu ekspresji markerów stanu pluripotencji OCT3/4 (Wykres 3A) oraz NANOG (Wykres 3B). Po wyciszeniu ekspresji genu TRIM28 obserwujemy istotny statystycznie spadek ekspresji genów OCT3/4 oraz NANOG, co wiąże się z utratą pluripotentnego charakteru komórek. Spadek ekspresji genu OCT3/4 zaobserwowano również w przypadku wyciszenia ekspresji genów ZNF483, ZNF519, ZNF620, ZNF695 oraz ZNF714. Ekspresja genu NANOG istotnie malała po wyciszeniu ekspresji genów ZNF114, ZNF483, ZNF695.

A)



B)



Wykres 3: Poziom ekspresji markerów pluripotencji 6 dni po wyciszeniu ekspresji genu TRIM28 oraz poszczególnych KRAB-ZNFs mierzonych metodą RT-qPCR. A) Zmiany ekspresji genu OCT3/4. B) Zmiany ekspresji genu NANOG. Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych. Pomiar ekspresji genu wykonano w trzech replikatach technicznych. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe. Istotność statystyczna wyliczona została testem one-way ANNOVA. $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***)

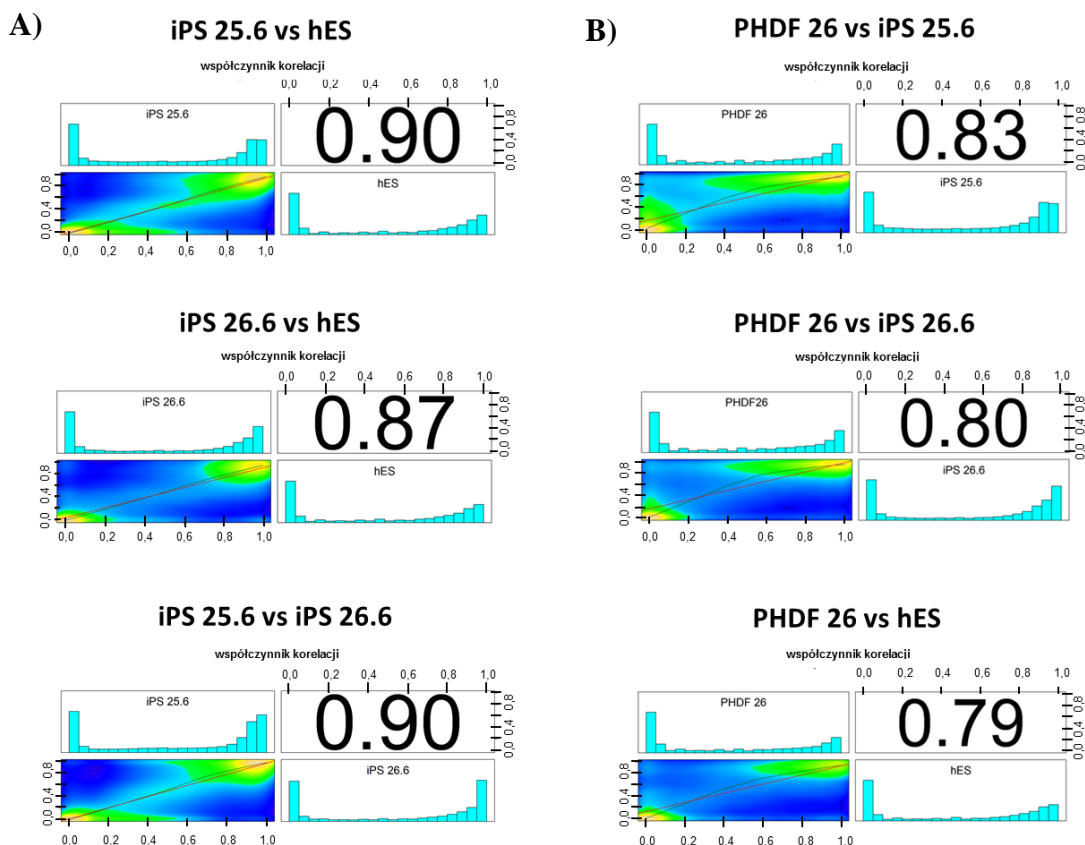
4.4 Ocena cało-genomowego profilu metylacji DNA komórek somatycznych i pluripotentnych metodą RRBS

4.4.1 Korelacja profilu metylacji DNA pomiędzy analizowanymi próbkami

Sekwencjonowaniu metodą RRBS zostały poddane 4 linie komórkowe:

- PHDF26 – ludzkie pierwotne fibroblasty skóry, linia numer 26
- iPS 25.6 – ludzkie indukowane pluripotentne komórki macierzyste, linia 25.6
- iPS 26.6 – ludzkie indukowane pluripotentne komórki macierzyste, linia 26.6
- hES – ludzkie macierzyste komórki embrionalne (linia BG01V)

W pierwszym etapie skorelowano globalny poziom metylacji DNA pomiędzy poszczególnymi liniami komórek. Porównano komórki o charakterze pluripotentnym (iPS 26.6, iPS 25.6, hES) z linią komórek somatycznych (PHDF 26) oraz linie komórek pluripotentnych pomiędzy sobą.

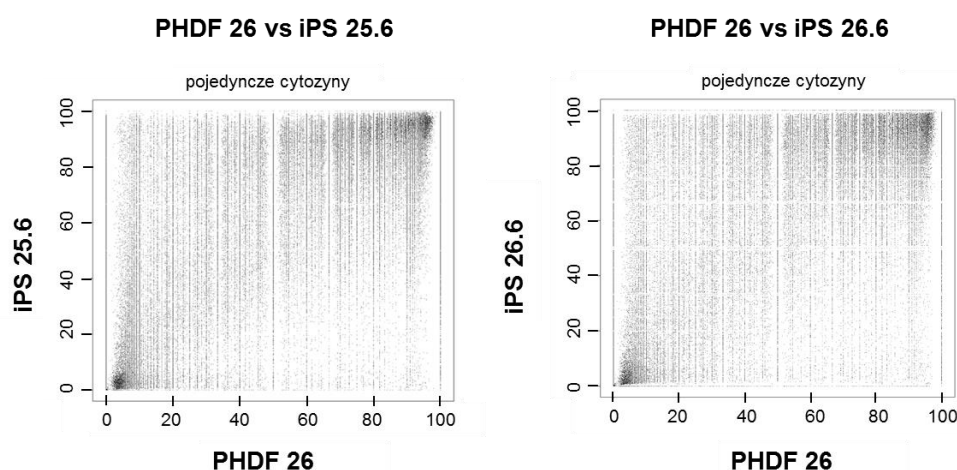


Ryc. 23: Poziom korelacji globalnego profilu metylacji DNA pomiędzy analizowanymi komórkami. A) Porównanie globalnego profilu metylacji DNA linii komórek pluripotentnych pomiędzy sobą. B) Porównanie globalnego profilu metylacji DNA poszczególnych linii komórek pluripotentnych z linią komórek PHDF 26. Współczynnik korelacji Pearsona określony został przy użyciu pakietu methylKit w środowisku R.

Komórki iPS wygenerowane od różnych dawców cechują się wysokim podobieństwem globalnego profilu metylacji (Ryc. 23A). Są również zbliżone do komórek hES, co świadczy o specyficzności profilu metylacji DNA dla różnych komórek o charakterze pluripotentnym. Co więcej komórki iPS oraz hES w znacznie mniejszym stopniu korelują z komórkami zróżnicowanym (Ryc. 23B), co wskazuje na zajście zmian epigenetycznych w trakcie procesu reprogramowania.

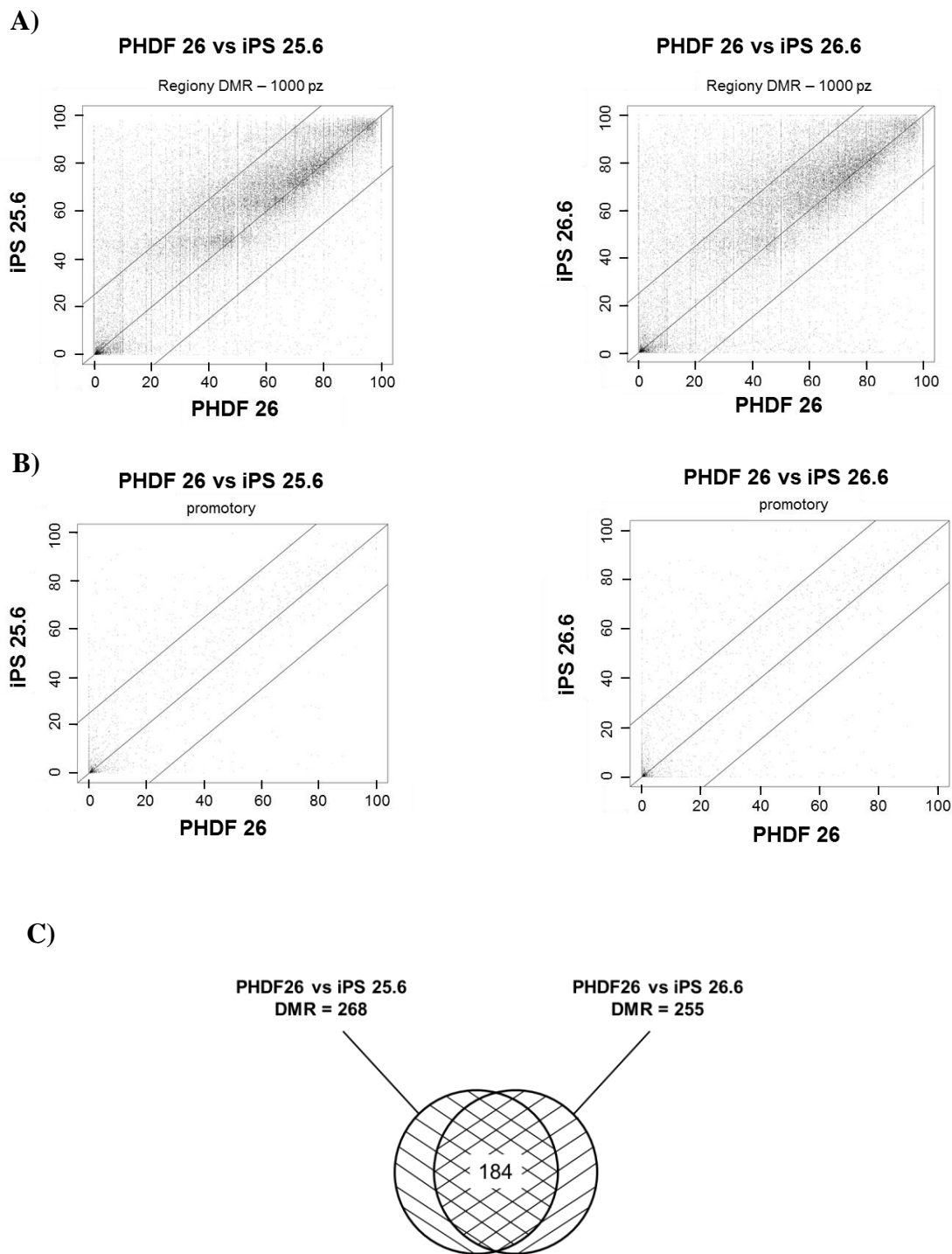
4.4.2 Analiza regionów DMR

Obserwowane zmiany w globalnym profilu metylacji DNA analizowane na podstawie zmian na poziomie pojedynczych cytozyn wskazują na wzrost poziomu metylacji w komórkach o charakterze pluripotentnym (Ryc. 24).



Ryc. 24: Poziom metylacji poszczególnych cytozyn analizowanych w sekwencjonowaniu RRBS.

W kolejnym etapie zgrupowano cytozyny w regiony DMR (ang. *differentially methylated regions*) o długości 1000 pz. Wybrano regiony różniące się poziomem metylacji pomiędzy próbami o co najmniej 25% (Ryc. 25A). Wykryto 6122 regionów DMR różniących komórki PHDF od komórek iPS 25.6 oraz 6718 regionów DMR różniących komórki PHDF od komórek iPS 26.6. Ze wszystkich regionów DMR wyodrębniono te, które znajdują się w obrębie promotorów genowych (-2000 pz od miejsca startu transkrypcji; Ryc. 25B). Znaczna część regionów promotorowych (N = 184, ~70%) była wspólna dla komórek iPS pochodzących od różnych dawców (Ryc. 25C). Wykazano, że prawie 78% (N = 143) promotorów uległo hiper-metylacji po reprogramowaniu. Korzystając z narzędzia on-line – DAVID – określono przynależność poszczególnych genów do grup funkcjonalnych (promotory hiper-metylowane – Tab. 7, promotory hipo-metylowane – Tab. 8).



Ryc. 25: Określenie regionów DMR dla badanych prób. A) Regiony DMR wykazujące ponad 25% różnicy poziomu metylacji w obrębie całego genomu. B) Regiony DMR wykazujące ponad 25% różnicy poziomu metylacji w obrębie promotorów genowych. C) Określenie części wspólnej regionów DMR w obrębie promotorów genowych.

Tabela 7 : Hiper-metylowane promotory genowe – analiza funkcjonalna






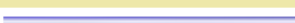

Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
cell adhesion	RT		12	1,5	4,0E-4	3,7E-2
positive regulation of transport	RT		4	0,5	8,9E-2	9,9E-1

Tabela 8: Hipo-metylowane promotory genowe – analiza funkcjonalna.

Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
developmental process	RT		6	100,0	5,6E-4	6,7E-3
multicellular organismal process	RT		6	100,0	2,6E-3	1,6E-2
locomotion	RT		3	50,0	8,8E-3	3,5E-2
biological regulation	RT		6	100,0	4,3E-2	1,2E-1
metabolic process	RT		6	100,0	4,8E-2	1,1E-1

Tabele zostały wygenerowane przy użyciu narzędzia on-line DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>)

Geny, których promotory ulegają hipermetylacji w trakcie reprogramowania należą głównie do grupy genów związanych z adhezją komórek. Metylacja DNA promotorów jest niższa wśród genów zaangażowanych w rozwój embrionalny, a także pozytywną regulację procesów metabolicznych.

5. Omówienie wyników i dyskusja

Reprogramowanie komórek zróżnicowanych do indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych jest złożonym procesem epigenetycznym. Modyfikacje histonów, rearanżacja chromatyny oraz metylacja DNA odgrywają kluczową rolę w ustaleniu macierzystego charakteru komórek. Dokładne poznanie mechanizmów zaangażowanych w te procesy jest niezwykle istotne zarówno dla optymalizacji samego procesu reprogramowania jak i ewentualnego wykorzystania komórek pluripotentnych w klinice.

W niniejszej pracy oceniono rolę epigenetycznego mechanizmu represji transkrypcji genów zależnego od kompleksu białkowego KRAB/TRIM28. Wyprowadzono linie komórkowe ludzkich pierwotnych fibroblastów (PHDF) pochodzących ze skóry pobranej od pacjentów Wielkopolskiego Centrum Onkologii. Do komórek wprowadzono na drodze transdukcji z wykorzystaniem wektorów lentiwirusowych egzogenny system reporterowy, służący do oceny zmian statusu ludzkiego promotora *PGK* w trakcie reprogramowania komórek PHDF do ludzkich indukowanych komórek pluripotentnych (hiPS). W kolejnym etapie określono wpływ endogennych czynników KRAB-ZFP na samoodnowę i pluripotencję komórek macierzystych. W tym celu oceniono zmiany ekspresji genów KRAB-ZFP towarzyszące procesowi reprogramowania. Wybrano osiem czynników transkrypcyjnych zawierających domenę KRAB, których ekspresja znacząco wzrasta w komórkach hiPS. Następnie wykorzystując metodę interferencji RNA określono rolę tych czynników w procesie samoodnowy komórek pluripotentnych. Oceniono również globalny poziom metylacji DNA analizowanych komórek i wykazano różnice pomiędzy komórkami somatycznymi a komórkami pluripotentnymi.

5.1 KRAB/TRIM28-zależna represja transkrypcji w komórkach somatycznych i pluripotentnych

Stworzony w niniejszym projekcie egzogenny system reporterowy składał się z dwóch wektorów lentiwirusowych, których współdziałanie oparte jest na obecności doksycykliny w pożywce hodowlanej (Ryc. 13). Sekwencja ludzkiego promotora *PGK* została wklonowana do wektora lentiwirusowego zawierającego sekwencję tet-operatora (tetO) pochodzącą z operatora tetracyklinowego *E. coli* oraz sekwencję kodującą białko zielonej fluorescencji gfp (Ryc. 12A dół). Drugi wektor zawierał cDNA kodujący sekwencję chimerycznego transrepresora składającego się z sekwencji tTR represora tetracyklinowego połączonego z domeną KRAB pochodzącą z białka KOX1 (Ryc. 12B). System ten pozwala na indukowaną

represję transkrypcji promotora *PGK* zależną od obecności doksycykliny w pożywce hodowlanej. W pracy wykazano, że *KRAB/TRIM28*-zależna represja promotora *PGK* jest procesem odwracalnym w komórkach somatycznych. Po dziesięciu dniach podawania doksycykliny dochodzi do ponownej aktywacji promotora *PGK* i wzrostu poziomu fluorescencji *gfp* (Ryc. 14B). Wyniki te pozostają w zgodzie z wcześniejszymi doniesieniami opisującymi działanie *KRAB*-zależnej represji transkrypcji w ustalonych liniach komórkowych HeLa, HEK293T czy MCF-7 [34,64]. Stworzony system okazał się więc efektywnym narzędziem do oceny zmian statusu promotora *PGK* w analizowanych komórkach.

W komórkach somatycznych działanie kompleksu *KRAB/TRIM28* inicjuje powstawanie heterochromatyny w obrębie miejsca wiązania [65]. Korzystając z metody immunoprecypitacji chromatyny (ChIP) oceniono status chromatyny w pobliżu miejsca wiązania *KRAB*-represora w analizowanych komórkach somatycznych zawierających system reporterowy. W komórkach hodowanych bez obecności antybiotyku wykazano ponad 37-krotne wzbogacenie frakcji markera chromatyny nieaktywnej *H3K9me3* w pobliżu miejsca wiązania kompleksu *KRAB/TRIM28* (Wykres 1). Nie zaobserwowano przy tym metylacji promotora *PGK* (Ryc. 15).

Metylacja DNA związana z działaniem kompleksu *KRAB/TRIM28* jest zmianą drugorzędową występującą jedynie w określonym kontekście biologicznym [31,34,43]. W 2007 roku Wiznerowicz i wsp. wykonali eksperymenty z wykorzystaniem myszy transgeniczných, do których wprowadzono egzogenny system do badania *KRAB*-zależnej represji promotorów komórkowych [34]. Wykazano, że tylko te promotory, które zostały poddane *KRAB*-zależnej represji w pierwszych dniach embriogenezy ulegają metylacji DNA, a ich aktywność jest trwale wyłączona w trakcie dalszego rozwoju. Jeśli do represji dojdzie po dniu E3.5 nie dochodzi do metylacji DNA, a co za tym idzie proces represji jest odwracalny tak samo jak w przypadku komórek somatycznych [34]. W kolejnych badaniach wykorzystujących system egzogenny prowadzonych przez Quenneville'a i wsp. wskazano, że w mysich embrionalnych komórkach macierzystych dochodzi do stopniowego wzrostu poziomu metylacji DNA w obrębie sekwencji promotora, znajdującego się w pobliżu miejsca wiązania kompleksu *KRAB/TRIM28* [43]. Poziom ten osiąga maksimum po trzech tygodniach hodowli. Co więcej, poziom metylacji DNA jest odwrotnie proporcjonalny do odległości od miejsca wiązania kompleksu, zarówno w mysich, jak i w ludzkich komórkach embrionalnych [43]. Co ciekawe, wydaje się, że w komórkach somatycznych występowanie

metylacji wysp CpG nie jest zależne od wiązania kompleksu KRAB/TRIM28. Zamiast tego wskazano na związek występowania wysokiego poziomu metylacji wysp CpG w komórkach somatycznych z miejscami wiązania białka TRIM28 w komórkach embrionalnych [43]. Wyniki te wskazują, że działanie kompleksu KRAB/TRIM28 powoduje trwałą represję transkrypcji, tylko jeśli dojdzie do niej na wczesnych etapach embriogenezy.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy uzupełniają powyższe obserwacje o nowy model badawczy. W celu wykazania roli kompleksu białkowego KRAB/TRIM28 w komórkach pluripotentnych reprogramowano komórki PHDF zawierające system reporterowy do komórek hiPS. Tak jak w przypadku analizowanych wcześniej komórek somatycznych, również w komórkach hiPS poddanych KRAB-zależnej represji (dox-) poziom fluorescencji gfp był niewykrywalny (Ryc. 19A). Jednak w przeciwieństwie do komórek zróżnicowanych, komórki hiPS charakteryzowały się wzrostem poziomu metylacji DNA w obrębie promotora *PGK* po reprogramowaniu (Ryc. 19A). Co więcej, poziom ten pozostał wysoki po dodaniu doksycykliny do pożywki hodowlanej (Ryc. 20B). Nie zaobserwowano również ponownego wzrostu fluorescencji gfp (Ryc. 20A). Otrzymane wyniki wskazują na specyficzność działania mechanizmu epigenetycznej represji transkrypcji zależnej od kompleksu KRAB/TRIM28 w trakcie reprogramowania. Podczas gdy mechanizm ten jest odwracalny w komórkach somatycznych, w komórkach pluripotentnych związany jest z metylacją DNA, co powoduje trwałe wyciszenie transkrypcji. Pośrednio wyniki te wskazują na podobieństwa w procesach zachodzących podczas embriogenezy i reprogramowania. Ponadto wygenerowany układ badawczy stanowi efektywny system do badania metylacji promotorów komórkowych w trakcie reprogramowania.

5.2 Rola białka TRIM28 oraz endogennych czynników KRAB-ZFP w komórkach pluripotentnych

Ekspresja genu *Trim28* utrzymuje się na wysokim poziomie w mysich komórkach embrionalnych i spada w trakcie ich różnicowania [66]. Białko *Trim28* jest niezbędne do prawidłowego rozwoju zarodkowego myszy, a jego wyciszenie powoduje obumarcie zarodków przed gastrulacją [67]. Ponadto wykazano, że wchodzi ono w interakcje z genami zaangażowanymi w utrzymywanie stanu pluripotencji komórek tj. *Nanog* czy *Klf4* [68]. Wyciszenie ekspresji genów *Oct3/4* oraz *Nanog* powoduje utratę zdolności samoodnowy komórek pluripotentnych i promuje ich różnicowanie [66]. Białko *Trim28* zostało wskazane jako jeden z korepresorów transkrypcji pełniących ważną rolę w samoodnowie komórek,

gdyż po wyciszeniu jego ekspresji komórki macierzyste tracą swoją morfologię i zaczynają się różnicować [69]. Co więcej, wyciszenie ekspresji Trim28 powoduje również spadek ekspresji markerów pluripotencji takich jak Oct3/4, Nanog i Sox2 a co za tym idzie utratę zdolności samoodnowy komórek pluripotennych [66]. W niniejszej pracy również wykazano rolę białka TRIM28 w utrzymywaniu stanu pluripotencji ludzkich komórek macierzystych. Już po sześciu dniach od wyciszenia ekspresji genu komórki straciły morfologię charakterystyczną dla komórek pluripotennych (Ryc. 22). Zaobserwowano również istotny spadek ekspresji markerów pluripotencji tj. OCT3/4 oraz NANOG (Wykres 3).

Do tej pory potwierdzono zaangażowanie tylko nielicznych białek KRAB-ZFP w konkretne procesy biologiczne zachodzące w komórkach macierzystych. Wykazano, że endogenne czynniki KRAB-ZFP, Znf809 oraz Znf819, biorą udział w represji specyficznych sekwencji mysich endogennych retrowirusów (ERVs) w komórkach macierzystych [28,29,70]. Co więcej pojawiło się kilka doniesień na temat roli białka Trim28 w tym procesie. Wyciszenie ekspresji Trim28 skutkuje podwyższoną ekspresją wielu rodzin ERV w mysich [71-73], a także ludzkich komórkach macierzystych [74]. Innym dobrze opisanym endogennym czynnikiem KRAB-ZFP jest Zfp57. Poprzez oddziaływanie z białkiem Trim28 bierze udział w ustalaniu i utrzymywaniu odpowiedniego wzoru metylacji miejsc imprintingowych zarówno w mysich jak i w ludzkich embrionalnych komórkach macierzystych [30,31,75].

Celem niniejszej pracy było określenie nowej roli endogennych czynników KRAB-ZFP w utrzymywaniu macierzystego charakteru komórek pluripotennych. Stosując technikę sekwencjonowania RNA nowej generacji (RNA-seq) określono cało-genomowy profil ekspresji genów zarówno dla komórek PHDF jak i wygenerowanych z nich komórek hiPS. Wybrano osiem genów KRAB-ZFP, których ekspresja znacząco wzrastała po reprogramowaniu (ZFP57, ZNF114, ZNF483, ZNF519, ZNF589, ZNF620, ZNF695, ZNF714) (Ryc. 21). W celu określenia roli wybranych czynników KRAB-ZFP w utrzymywaniu stanu pluripotencji komórek, wykonano eksperymenty, w których na drodze interferencji RNA wyciszono ekspresję poszczególnych genów w ludzkich macierzystych komórkach embrionalnych (hESCs) (Wykres 2). Już po 6 dniach od wyciszenia ekspresji obserwowano zmiany morfologiczne komórek (Ryc. 22). Zmiany te korelowały ze spadkiem poziomu ekspresji markera pluripotencji NANOG, w przypadku wyciszenia ekspresji genów ZNF114, ZNF483, ZNF695 (Wykres 3 – dół). Wykazano również spadek ekspresji genu

OCT3/4 w przypadku wyciszenia ekspresji genów ZNF483, ZNF519, ZNF620, ZNF695 oraz ZNF714 (Wykres 3 – góra).

Do tej pory scharakteryzowano rolę kilku czynników modyfikujących chromatynę w utrzymywaniu pluripotencji komórek. Białko kompleksu Trichorax (TrxG) – Wdr5 (WD repeat domain 5) katalizuje metylację H3K4me3, która jest związana z aktywnym stanem chromatyny [76]. Wykazano, że obecność białka Wdr5 jest niezbędna do utrzymania pluripotentnego charakteru komórek i wpływa na ich samoodnowę. Wyciszenie ekspresji genu prowadzi zarówno do zaburzenia procesu reprogramowania, jak i do różnicowania się komórek o charakterze macierzystym [76]. Kolejnym przykładem są białka należące do kompleksu PRC2 (ang. *Polycomb repressive complex 2*). Białko Ezh2 katalizuje metylację H3K27me3. Jest to zmiana represyjna, odgrywająca dużą rolę we wczesnej fazie reprogramowania. Ding i wsp. wykazali, że ekspresja Ezh2 jest wysoka w komórkach iPS. Co więcej, wywołanie nadekspresji genu zwiększa efektywność reprogramowania komórek somatycznych do komórek iPS [77]. Występowanie metylacji H3K9me3 uznawane jest za barierę w procesie reprogramowania [78]. Zablokowanie aktywności metyltransferaz histonów katalizujących tą modyfikację: Ehmt2, Setdb1 czy Suv39h 1/2, zwiększa efektywność procesu reprogramowania. Związane jest to z dekondensacją chromatyny, co ułatwia dostęp czynników indukujących pluripotencję do sekwencji docelowych.

Podane przykłady pokazują jak ważna jest regulacja procesów epigenetycznych zachodzących w trakcie reprogramowania komórek somatycznych do komórek iPS oraz w utrzymywaniu ich zdolności do samoodnowy. Do tej pory nie badano roli czynników KRAB-ZFP w tym kontekście. W niniejszej pracy zaproponowana została ich rola jako epigenetycznych regulatorów stanu pluripotencji ludzkich komórek macierzystych. Wyciszenie ekspresji poszczególnych czynników KRAB-ZFP prowadzi do utraty zdolności do samoodnowy komórek hES. Czynniki te poprzez swoją specyficzną budowę mogą przyłączać się do określonych sekwencji DNA i rekrutować kompleks białkowy związany z białkiem TRIM28, prowadzącym tym samym do heterochromatyzacji i represji epigenetycznej. Określenie sekwencji genomu, które mogą być regulowane przez konkretne czynniki KRAB-ZFP wydaje się być ciekawym aspektem dalszych badań.

5.3 Zmiany poziomu metylacji po reprogramowaniu komórek somatycznych do komórek iPS

Komórki o charakterze pluripotentnym, zarówno iPS jak i ES, cechują się wyższym ogólnym poziomem metylacji DNA niż komórki zróżnicowane [50-52]. W trakcie reprogramowania komórek somatycznych do komórek iPS musi dojść do wyciszenia ekspresji genów tkankowo-specyficznych przy jednoczesnej aktywacji genów związanych z pluripotencją. Zmiany te zachodzą na poziomie epigenetycznym i są związane z rearanżacją chromatyny oraz metylacją DNA. Komórki iPS mogą mieć ogromny potencjał zarówno w medycynie regeneracyjnej jak i tworzeniu modeli chorobowych czy też badaniach nad rozwojem embrionalnym. Ważne jest więc dokładne określenie ich podobieństwa do komórek ES pod kątem cech macierzystości oraz potencjału do różnicowania.

Weześniejsze badania umożliwiły zidentyfikowanie regionów DMR, które ulegają hip- oraz hiper-metylacji w trakcie reprogramowania ludzkich fibroblastów do komórek iPS [52]. Komórki iPS po reprogramowaniu są podobne pod kątem profilu metylacji DNA do komórek hES. Kim i wsp. wykazali jednak, że w komórkach iPS występują regiony, których metylacja pozostaje zbliżona do komórek z których zostały wygenerowane, różniąc je tym samym od komórek ES [79]. Komórki takie mogą wykazywać ograniczoną zdolność do różnicowania się w różne typy komórek somatycznych. Problem ten może zostać częściowo pokonany poprzez dodanie do komórek czynników modyfikujących chromatynę, takich jak TSA (ang. *trichostatin A*) blokującego aktywność deacetylaz histonów, czy 5-azacytydyna odpowiedzialna za demetylację DNA [79]. Bock i wsp. wykonali analizę porównawczą dla 20 różnych linii komórek hES oraz 12 linii hiPS [55]. Wykazali, że na poziomie globalnym, zarówno pod kątem profilu ekspresji genów jak i metylacji DNA, komórki te są do siebie bardzo zbliżone i wyraźnie różne od komórek zróżnicowanych. Z drugiej strony, wskazano na różnice pomiędzy każdą parą analizowanych komórek, co wiązało się również z ich ograniczonym potencjałem różnicowania [55].

W niniejszej pracy wykazano różnice poziomu metylacji pomiędzy komórkami somatycznymi a komórkami hiPS i hES, zarówno na poziomie pojedynczych cytozyn (Ryc. 24), jak i całych regionów DMR (Ryc. 25A). Wskazano regiony DMR, które znajdują się w obrębie promotorów genowych (Ryc. 25B). W analizie wykorzystano komórki hiPS pochodzące od dwóch różnych dawców. Wykazano, że w porównaniu z komórkami somatycznymi znaczna część regionów DMR jest wspólna dla obydwu linii (Ryc. 25C).

Większość promotorów uległa hiper-metylacji po reprogramowaniu. Analiza funkcjonalna wskazała, że są to geny zaangażowane głównie w procesy adhezji komórek (Tab. 7). Geny związane z rozwojem embrionalnym oraz pozytywną regulacją procesów metabolicznych cechowały się niższym stopniem poziomu metylacji w komórkach hiPS (Tab. 8). Część regionów DMR była jednak specyficzna tylko dla danej linii komórek hiPS.

Otrzymane wyniki pozostają w zgodzie z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi. W porównaniu pomiędzy 22 liniami komórek iPS z komórkami somatycznymi z których zostały wygenerowane, Nishino i wsp. określili regiony DMR specyficzne dla komórek pluripotentnych [80]. Do oceny profilu metylacji DNA zastosowali metodę mikromacierzy. Wykazali, że wśród zidentyfikowanych 220 regionów DMR ok. 80% jest hiper-metylowanych w komórkach pluripotentnych. Były to m.in. geny związane z proliferacją i różnicowanie komórek a także z procesami adhezji. Geny hipo-metylowane zaangażowane były w procesy regulacji transkrypcji czy rozwój embrionalny [80]. Zbliżone wyniki uzyskano wykorzystując ocenę poziomu metylacji DNA z użyciem specyficznych sond Padlock. Tu również wykazano, że regiony DMR ulegające hipermetylacji po reprogramowaniu są głównie związane z adhezją komórek [81]. Z racji na ograniczenie metody RRBS do sekwencjonowania tylko tych fragmentów DNA, które bogate są w miejsca CpG nie udało się wskazać profilu metylacji konkretnych genów związanych z pluripotencją. Geny takie jak *OCT3/4* czy *NANOG* posiadają niewiele miejsc CpG w regionach promotorowych i nie są uwzględniane w sekwencjonowaniu. Niemniej jednak, w niniejszej pracy potwierdzono efektywność metody RRBS do oceny cało-genomowego profilu metylacji DNA i wykazania różnic pomiędzy komórkami somatycznymi a komórkami pluripotentnymi.

Zmiany na poziomie metylacji DNA obserwowane w trakcie reprogramowania komórek somatycznych do komórek iPS muszą być ściśle regulowane przez konkretne mechanizmy biologiczne. W niniejszej pracy wykazano specyficzne działania KRAB/TRIM28-zależnej represji w komórkach pluripotentnych w systemie egzogennym. Określono również wpływ wybranych czynników KRAB-ZFP na utrzymywanie potencjału samoodnowy komórek ES. Wyniki te mogą wskazywać na potencjalne zaangażowanie kompleksu białkowego KRAB/TRIM28 w regulację procesu reprogramowania. Dokładne rozszyfrowanie tego mechanizmu wymaga jednak dalszych, intensywnych badań.

6. Wnioski

- 1) Stworzony egzogenny system jest efektywnym narzędziem do badania kinetyki KRAB-zależnej represji promotorów komórkowych w trakcie reprogramowania komórek somatycznych do komórek iPS.
 - a. KRAB-zależna represja transkrypcji w komórkach somatycznych jest procesem odwracalnym.
 - b. KRAB-zależna represja transkrypcji podczas reprogramowania komórek somatycznych do komórek iPS jest trwałym, nieodwracalnym procesem, związanym z metylacją DNA promotora.

- 2) Czynniki transkrypcyjne KRAB-ZFP są zaangażowane w utrzymanie stanu pluripotencji komórek macierzystych.
 - a. Ekspresja czynników KRAB-ZFP zmienia się istotnie po reprogramowaniu komórek somatycznych do komórek iPS.
 - b. Czynniki KRAB-ZFP: ZNF114, ZNF483, ZNF519, ZNF620, ZNF695 oraz ZNF714 są zaangażowane w utrzymywanie pluripotentnego charakteru komórek macierzystych.

- 3) RRBS jest skuteczną i efektywną metodą do analizy cało-genomowego profilu metylacji komórek somatycznych oraz komórek o charakterze pluripotentnym.
 - a. Komórki o charakterze pluripotentnym cechują się wyższym ogólnym poziomem metylacji niż komórki somatyczne.
 - b. Wykryto regiony DMR różniące komórki somatyczne i komórki iPS; regiony hiper-metylowane w komórkach hiPS związane są z adhezją komórek; regiony hipo-metylowane z rozwojem embrionalnym i regulacją procesów metabolicznych.

7. Streszczenie w języku polskim

Reprogramowanie komórek zróżnicowanych do indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych jest złożonym procesem epigenetycznym. Modyfikacje histonów, rearanżacja chromatyny oraz metylacja DNA odgrywają kluczową rolę w ustaleniu i utrzymaniu macierzystego charakteru komórek. Dokładne poznanie mechanizmów zaangażowanych w te procesy jest niezwykle istotne zarówno dla optymalizacji samego procesu reprogramowania jak i ewentualnego wykorzystania komórek pluripotentnych w klinice.

W niniejszej pracy oceniono rolę epigenetycznego mechanizmu represji transkrypcji genów zależnego od kompleksu białkowego KRAB/TRIM28. Do ludzkich pierwotnych fibroblastów skóry (PHDF) wprowadzono egzogenny system reporterowy, służący do oceny zmian statusu ludzkiego promotora *PGK* w trakcie reprogramowania komórek PHDF do ludzkich indukowanych komórek pluripotentnych (hiPS). Wykazano, że KRAB-zależna represja transkrypcji promotora *PGK* jest procesem odwracalnym w komórkach somatycznych. Natomiast podczas reprogramowania do komórek iPS, KRAB-zależna represja jest związana z metylacją promotora i jest trwale utrzymywana w trakcie kolejnych podziałów komórkowych.

W kolejnym etapie określono wpływ endogennych czynników KRAB-ZFP na samoodnowę i pluripotencję komórek macierzystych. W tym celu oceniono zmiany ekspresji genów KRAB-ZFP towarzyszące procesowi reprogramowania. Wybrano osiem czynników transkrypcyjnych zawierających domenę KRAB, których ekspresja znacząco wzrasta w komórkach hiPS. Następnie wykorzystując metodę interferencji RNA wykazano, że ekspresja czynników ZNF114, ZNF483, ZNF519, ZNF620, ZNF695 oraz ZNF714 jest niezbędna do utrzymania pluripotentnego charakteru komórek.

W ostatnim etapie określono globalny poziom metylacji DNA analizowanych komórek stosując metodę RRBS. Wykazano różnice w poziomach metylacji pomiędzy komórkami PHDF, iPS oraz hES poprzez zidentyfikowanie regionów DMR (ang. *differentially methylated regions*). Geny związane z adhezją komórek uległy hiper-metylacji po reprogramowaniu, natomiast geny związane z rozwojem embrionalnym i regulacja procesów metabolicznych zmniejszyły stopień metylacji.

W niniejszej pracy wykazano specyficzne działania KRAB/TRIM28-zależnej represji w komórkach pluripotentnych w systemie egzogennym. Określono również wpływ

konkretnych czynników KRAB-ZFP na utrzymywanie potencjału samoodnowy komórek ES. Wyniki te mogą wskazywać na potencjalne zaangażowanie kompleksu białkowego KRAB/TRIM28 w regulację procesu reprogramowania na poziomie metylacji DNA. Dokładne rozszyfrowanie tego mechanizmu wymaga jednak dalszych badań.

8. Abstract

Reprogramming differentiated cells into induced pluripotent stem cells (iPSCs) is a complex epigenetic process. Histones modifications, rearrangement of chromatin state and DNA methylation play a key role in determining and maintaining pluripotency. Detailed knowledge of the mechanisms involved in these processes is crucial to optimize reprogramming and possible use of pluripotent stem cells in the clinics.

This study evaluated the role of KRAB/TRIM28-dependent epigenetic mechanisms of transcriptional repression. Primary human dermal fibroblasts (PHDFs) were transduced with lentiviral vectors comprising exogenous reporter system. The system was used to assess changes in the status of the human exogenous *PGK* promoter during reprogramming of PHDF into iPS cells. It has been shown that KRAB-mediated transcriptional repression of the *PGK* promoter is a reversible modification in somatic cells. In contrast, KRAB-mediated repression acquired during reprogramming to iPS cells is associated with DNA methylation and is permanently maintained during subsequent cell divisions.

In the next step, I assessed the impact of endogenous KRAB-ZFPs factors on maintaining pluripotency and self-renewal potential of human pluripotent stem cells. For this purpose, changes in the expression profile of endogenous KRAB –ZFP was investigated. Eight KRAB-ZFPs overexpressed during reprogramming was selected for downstream knock-down experiments using RNA interference. The results showed that the expression of ZNF114, ZNF483, ZNF519, ZNF620, ZNF695 and ZNF714 is required to maintain pluripotency and self-renewal capacity of pluripotent stem cells.

In the last step I have defined global DNA methylation profile of analyzed cells using RRBS method. Differences in methylation levels between PHDFs, iPSCs and hESCs were shown by identifying DMR (differentially methylated regions). Hyper-methylated genes were connected with cell adhesion and hypo-methylation was observed within gene promoters responsible for embryonic development and regulation of metabolic process.

The results obtained in this study indicate a specific role of KRAB/TRIM28-mediated repression of exogenous cellular promoters in iPS cells. Moreover, involvement of specific KRAB-ZFP factors in the maintenance of pluripotency and self-renewal potential of human pluripotent stem cells was shown. These results may indicate the potential role of

KRAB/TRIM28 in the reprogramming process at the level of DNA methylation. Deciphering the mechanism requires further intensive research.

9. Literatura

1. Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. **126**, 663-676.
2. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., et al. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. **131**, 861-872.
3. Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., et al. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. **282**: 1145-1147.
4. Gurdon, J.B. (1962) The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **10**: 622–640.
5. Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Gutierrez, N.M., et al. (2013) Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*. **153**:1228-1238.
6. Rodríguez-Pizà, I., Richaud-Patin, Y., Vassena, R., González, F., et al. (2010) Reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells under xeno-free conditions. *Stem Cells*.**28**: 36-44.
7. Chin, M.H., Pellegrini, M., Plath, K., Lowry, W.E. (2010) Molecular analyses of human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. **7**: 263-269.
8. Maherali, N., Ahfeldt, T., Rigamonti, A., Utikal, J., et al. (2008) A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. **3**:340-345.
9. Staerk, J., Dawlaty, M.M., Gao, Q., Maetzel, D., et al. (2010) Reprogramming of human peripheral blood cells to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. **7**: 20-24.
10. Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., et al. (2009) Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*. **136**: 964-77.
11. Chang, C.W., Lai, Y.S., Pawlik, K.M., Liu, K., et al. (2009) Polycistronic lentiviral vector for "hit and run" reprogramming of adult skin fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. **27**: 1042-1049.
12. Montserrat, N., Garreta, E., González, F., Gutiérrez, J., et al. (2011) Simple generation of human induced pluripotent stem cells using poly-beta-amino esters as the non-viral gene delivery system. *J Biol Chem*. **286**: 12417-12428.
13. Yakubov, E., Rechavi, G., Rozenblatt, S., Givol, D. (2010) Reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells using mRNA of four transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun*. **394**: 189-93.

14. Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.H., et al. (2010) Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*. **7**:618-630.
15. Kim, D., Kim, C.H., Moon, J.I., Chung, Y.G., et al. (2009) Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*. **4**: 472-476.
16. Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, et al. (2007) In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*. **448**: 318–324.
17. Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., et al. (2007) Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*. **1**: 55–70.
18. Chin, M.H., Mason, M.J., Xie, W., Volinia, S., et al. (2009) Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell*. **5**: 111–123.
19. Gaspar-Maia, A., Alajem, A., Meshorer, E., Ramalho-Santos, M. (2011) Open chromatin in pluripotency and reprogramming. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**: 36–47.
20. Koche, R.P., Smith, Z.D., Adli, M., Gu, H., et al. (2011). Reprogramming factor expression initiates widespread targeted chromatin remodeling. *Cell Stem Cell*. **8**: 96-105.
21. Orkin, S.H., Hochedlinger K. (2011) Chromatin connections to pluripotency and cellular reprogramming. *Cell*. **145**: 835–850.
22. Onder, T.T., Kara, N., Cherry, A., Sinha, A.U., et al.(2012) Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming. *Nature*. **483**: 598-602.
23. Soufi, A., Donahue, G., Zaret, K.S. (2012) Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell*. **151**: 994-1004.
24. Urrutia, R. (2003) KRAB-containing zinc-finger repressor proteins. *Genome Biol.* **4**: 231.
25. Collins, T., Stone, J. R., Williams, A. J. (2001) All in the family: the BTB/POZ, KRAB, and SCAN domains. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 3609–3615.
26. Looman, C., Abrink, M., Mark, C., Hellman, L. (2002) KRAB zinc finger proteins: an analysis of the molecular mechanisms governing their increase in numbers and complexity during evolution. *Mol. Biol. Evol.* **19**: 2118–2130.
- Friedman, J.R., Fredericks, W.J., Jensen, D.E., Speicher, D.W., et al. (1996) KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain. *Genes Dev.* **10**: 2067-2078.

27. Wolf, D., and Goff, S.P. (2009) Embryonic stem cells use ZFP809 to silence retroviral DNAs. *Nature*. **458**: 1201–1204.
28. Wolf, G., Yang, P., Füchtbauer, A.C., Füchtbauer, E.M., et al. (2015) The KRAB zinc finger protein ZFP809 is required to initiate epigenetic silencing of endogenous retroviruses. *Genes Dev*. **29**: 538-554.
- Kim, S.S., Chen, Y.M., O'Leary, E., Witzgall, R., et al. (1996) A novel member of the RING finger family, KRIP-1, associates with the KRAB-A transcriptional repressor domain of zinc finger proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**: 15299-15304.
29. Tan, X., Xu, X., Elkenani, M., Smorag, L., et al. (2013) Zfp819, a novel KRAB-zinc finger protein, interacts with KAP1 and functions in genomic integrity maintenance of mouse embryonic stem cells. *Stem Cell Res*. **11**:1045-1059.
30. Li, X., Ito, M., Zhou, F., Youngson, N., et al. (2008) A maternal-zygotic effect gene, Zfp57, maintains both maternal and paternal imprints. *Dev. Cell* **15**: 547–557.
31. Quenneville, S., Verde, G., Corsinotti, A., Kapopoulou, et al. (2011) In embryonic stem cells, ZFP57/KAP1 recognize a methylated hexanucleotide to affect chromatin and DNA methylation of imprinting control regions. *Mol Cell*. **44**; 361-372.
32. Mackay, D.J., Callaway, J.L., Marks, S.M., White, et al. (2008) Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal diabetes is associated with mutations in ZFP57. *Nat. Genet*. **40**: 949–951.
33. Boonen, S.E., Mackay, D.J., Hahnemann, J.M., Docherty, L., et al. (2013) Transient neonatal diabetes, ZFP57, and hypomethylation of multiple imprinted loci: a detailed follow-up. *Diabetes Care*. **36**: 505-512.
34. Wiznerowicz, M., Jakobsson, J., Szulc, J., Liao, S., et al. (2007) The Kruppel-associated box repressor domain can trigger de novo promoter methylation during mouse early embryogenesis. *J Biol Chem*. **282**: 34535-34541.
35. Friedman, J.R., Fredericks, W.J., Jensen, D.E., Speicher, D.W., et al. (1996) KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain. *Genes Dev*. **10**: 2067-2078.
36. Kim, S.S., Chen, Y.M., O'Leary, E., Witzgall, R., et al. (1996) A novel member of the RING finger family, KRIP-1, associates with the KRAB-A transcriptional repressor domain of zinc finger proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**: 15299-15304.
37. Moosmann, P., Georgiev, O., Le Douarin, B., Bourquin, J.P., Schaffner, W. (1996) Transcriptional repression by RING finger protein TIF1 beta that interacts with the KRAB repressor domain of KOX1. *Nucleic Acids Res*. **24**: 4859-4867.

38. Peng, H., Begg, G.E., Schultz, D.C., Friedman, J.R., et al. (2000) Reconstitution of the KRABKAP-1 repressor complex: a model system for defining the molecular anatomy of RING-B box-coiled-coil domain mediated protein-protein interactions. *J Mol Biol.* **295**: 1139-1162.
39. Nielsen, A.L., Ortiz, J.A., You, J., Oulad-Abdelghani, M., et al. (1999) Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family. *EMBO J.* **18**: 6385-6395.
40. Sripathy, S.P., Stevens, J., Schultz, D.C. (2006) The KAP1 corepressor functions to coordinate the assembly of de novo HP1-demarcated microenvironments of heterochromatin required for KRAB zinc finger protein-mediated transcriptional repression. *Mol Cell Biol.* **26**: 8623-8638.
41. Schultz, D.C., Friedman, J.R., Rauscher, F.J. (2001) Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2alpha subunit of NuRD. *Genes Dev.***15**: 428-443.
42. Schultz, D.C., Ayyanathan, K., Negorev, D., Maul, G.G., Rauscher, F.J. (2002) SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc finger proteins. *Genes Dev.* **16**: 919-932.
43. Quenneville, S., Turelli, P., Bojkowska, K., Raclot, C., et al. (2012) The KRAB-ZFP/KAP1 system contributes to the early embryonic establishment of site-specific DNA methylation patterns maintained during development. *Cell Rep.* **2**: 766-773.
44. Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R., and Haaf, T. (2000) Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* **403**, 501–502
45. Jaenisch, R., and Bird, A. (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* **33**, S245–S254
46. Okano, M., Xie, S., Li, E. (1998) Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet.* **19**: 219-20.
47. Hsieh, C.L. (1999) In vivo activity of murine de novo methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol Cell Biol.* **19**: 8211-8218.
48. Reik, W. (2007) Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature.* **447**:425-432.

49. Mikkelsen, T.S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, et al. (2008) Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature*. **454**: 49-55.
50. Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R.H., Hawkins, R.D., et al. (2009) Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*. **462**: 315-322.
51. Lister, R., Pelizzola, M., Kida, Y.S., Hawkins, R.D., Nery, J.R., Hon, G., Antosiewicz-Bourget, J., O'Malley, R., Castanon, R., Klugman, S., Downes, M., Yu, R., Stewart, R., Ren, B., Thomson, J.A., Evans, R.M., and Ecker, J.R. (2011) Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* **471**, 68–73.
52. Doi, A., Park, I.H., Wen, B., Murakami, P., et al. (2009) Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet*. **41**:1350-1353.
53. Chin, M.H., Mason, M.J., Xie, W., Volinia, S., et al. (2009) Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell* **5**: 111–123.
54. Wang, A., Huang, K., Shen, Y., Xue, Z., et al. (2011) Functional modules distinguish human induced pluripotent stem cells from embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. **20**: 1937–1950.
55. Bock, C., Kiskinis, E., Verstappen, G., Gu, H., et al. (2011) Reference maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell*. **44**: 439–452.
56. Wang, R., Y., Gehrke, C., W., Ehrlich, M. (1980). Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nucleic Acids Res*. **8**: 4777–4790.
57. Laird, P.W. (2010) Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis. *Nat Rev Genet*. **11**: 191-203.
58. Korbel, J. O., Urban, A.E., Affourtit, J.P., Godwin, B., et al. (2007) Paired-end mapping reveals extensive structural variation in the human genome. *Science* **318**: 420–426.
59. Meissner, A., Gnirke, A., Bell, G.W., Ramsahoye, B., et al. (2005) Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res*. **33**: 5868-5877.
60. Wiznerowicz, M., Trono, D. (2003) Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol*. **77**: 8957-8961.

61. Akalin, A., Kormaksson, M., Li, S, Garrett-Bakelman, F.E. et al. (2012). methylKit: A comprehensive R package for the analysis of genome-wide DNA methylation profiles. *Genome Biology*. **13**: R87.
62. Huang, D.W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A. (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc.* **4**: 44-57.
63. Huang, D.W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A. (2009) Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* **37**: 1-13.
64. Ma, A.N., Wang, H., Guo, R., Wang, Y.X., et al. (2014) Targeted gene suppression by inducing de novo DNA methylation in the gene promoter. *Epigenetics Chromatin*. **7**: 20
65. Groner, A. C., Meylan, S., Ciuffi, A., Zangger, N., et al. (2010). KRAB-zinc finger proteins and KAP1 can mediate long-range transcriptional repression through heterochromatin spreading. *PLoS Genetics*. **6**: e1000869.
66. Hu, G., Kim, J., Xu, Q., Leng, Y., et al. (2009) A genome-wide RNAi screen identifies a new transcriptional module required for self-renewal. *Genes Dev.* **23**: 837-848.
67. Cammas, F., Mark, M., Dollé, P., Dierich, A., et al. (2000) Mice lacking the transcriptional corepressor TIF1beta are defective in early postimplantation development. *Development*. **127**: 2955-2963.
68. Wang, J., Rao, S., Chu, J., Shen, et al. (2006) A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* **444**: 364–368.
69. Fazio, T.G., Huff, J.T., Panning, B. (2008) An RNAi screen of chromatin proteins identifies Tip60-p400 as a regulator of embryonic stem cell identity. *Cell*. **134**: 162–174.
70. Wolf, G., Yang, P., Fuchtbauer, A.C., Fuchtbauer, E.M., et al. (2015) The KRAB zinc finger protein ZFP809 is required to initiate epigenetic silencing of endogenous retroviruses. *Genes Dev.* **29**: 538-554.
71. Matsui, T., Leung, D., Miyashita, H., Maksakova, I.A., et al. (2010) Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature*. **464**: 927–931.
72. Rowe, H.M., Jakobsson, J., Mesnard, D., Rougemont, J., et al. (2010) KAP1 controls endogenous retroviruses in embryonic stem cells. *Nature*. **463**: 237–240.
73. Rowe, H.M., Kapopoulou, A., Corsinotti, A., Fasching, L., et al. (2013) TRIM28 repression of retrotransposon-based enhancers is necessary to preserve transcriptional dynamics in embryonic stem cells. *Genome Res.* **23**: 452–461.

74. Turelli, P., Castro-Diaz, N., Marzetta, F., Kapopoulou, A., et al. (2014) Interplay of TRIM28 and DNA methylation in controlling human endogenous retroelements. *Genome Res.* **24**: 1260-1270.
75. Zuo, X., Sheng, J., Lau, H.T., McDonald, C.M., et al. (2011) Zinc finger protein ZFP57 requires its co-factor to recruit DNA methyltransferases and maintains DNA methylation imprint in embryonic stem cells via its transcriptional repression domain. *J Biol Chem.* **287**: 2107-2118.
76. Ang, Y.S., Tsai, Y., Lee, D.F., Monk, J., et al. (2011) Wdr5 mediates self-renewal and reprogramming via the embryonic stem cell core transcriptional network. *Cell.* **145**: 183-97.
77. Ding, X., Wang, X., Sontag, S., Qin, J., et al. (2014) The polycomb protein Ezh2 impacts on induced pluripotent stem cell generation. *Stem Cells Dev.*; **23**: 931-40.
78. Chen, J., Liu, H., Liu, J., Qi, J., et al. (2013) H3K9 methylation is a barrier during somatic cell reprogramming into iPSCs. *Nat Genet.* **45**: 34-42.
79. Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., et al. (2010) Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature.* **467**: 285-290.
80. Nishino, K., Toyoda, M., Yamazaki-Inoue, M., Fukawatase, Y., et al. (2011) DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time. *PLoS Genet.* **7**: e1002085.
81. Ruiz, S., Diep, D., Gore, A., Panopoulos, A.D., et al. (2012) Identification of a specific reprogramming-associated epigenetic signature in human induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **109**: 16196-16201.

10. Wykaz rycin

<u>Ryc. 1:</u> Metody pozyskiwania ludzkich komórek pluripotentnych.....	14
<u>Ryc. 2:</u> Zmiany epigenetyczne towarzyszące procesom reprogramowania i różnicowania komórek.....	17
<u>Ryc. 3:</u> Schemat przedstawiający budowę białka TRIM28.....	18
<u>Ryc. 4:</u> Schemat przedstawiający KRAB/TRIM28-zależną represję transkrypcji.....	19
<u>Ryc. 5:</u> Ludzkie pierwotne fibroblasty skóry (PHDFs).....	24
<u>Ryc. 6:</u> Mapy plazmidów pakujących wykorzystanych do produkcji wektorów lentiwirusowych.....	25
<u>Ryc. 7:</u> Komórki HEK 293T.....	27
<u>Ryc. 8:</u> Mapy plazmidów wykorzystanych do stworzenia systemu reporterowego do badania metylacji promotora PGK.....	28
<u>Ryc. 9:</u> Schemat przedstawiający strategię klonowania w celu otrzymania plazmidów wykorzystanych do badania metylacji promotora PGK.....	31
<u>Ryc. 10:</u> Mapy plazmidów stworzonych w celu zbadania KRAB-zależnej represji promotora PGK.....	31
<u>Ryc. 11:</u> Mapa plazmidu pHAGE2-hSTEMCCA-loxp.....	33
<u>Ryc. 12:</u> Schematy wektorów LV wykorzystanych do badania KRAB-zależnej metylacji promotora PGK.....	46
<u>Ryc. 13:</u> Schemat przedstawiający działanie egzogenego systemu represyjnego w obecności doksycykliny w pożywce.....	47
<u>Ryc. 14:</u> Poziom fluorescencji gfp w analizowanych komórkach.....	48
<u>Ryc. 15:</u> Status metylacji promotora PGK w komórkach somatycznych poddanych KRAB-zależnej represji określony poprzez sekwencjonowanie bisulfitowe.....	49
<u>Ryc. 16:</u> Schemat czasowy hodowli komórek hiPS.....	50
<u>Ryc. 17:</u> Ocena fluorescencji białka gfp w komórkach iPS.....	51
<u>Ryc. 18:</u> Potwierdzenie pluripotentnego charakteru otrzymanych komórek hiPS.....	52
<u>Ryc. 19:</u> Ocena statusu promotora PGK po reprogramowaniu komórek somatycznych do komórek hiPS, poprzez cytometrię przepływową i sekwencjonowanie bisulfitowe.....	53
<u>Ryc. 20:</u> Ocena statusu promotora PGK po reprogramowaniu komórek somatycznych do komórek hiPS.....	54
<u>Ryc. 21:</u> Mapa cieplna przedstawiająca zmianę ekspresji czynników transkrypcyjnych KRAB-ZFP.....	55

<u>Ryc. 22:</u> Zmiany morfologiczne komórek hES 6 dni po wyciszeniu ekspresji poszczególnych genów.....	57
<u>Ryc. 23:</u> Poziom korelacji globalnego profilu metylacji DNA pomiędzy analizowanymi komórkami.....	59
<u>Ryc. 24:</u> Poziom metylacji poszczególnych cytozyn analizowanych w sekwencjonowaniu RRBS.....	60
<u>Ryc. 25:</u> Określenie regionów DMR dla badanych prób.....	61

11. Wykaz tabel i wykresów

<u>Tabela 1</u> : Metody analizy DNA po konwersji bisulfitowej.....	22
<u>Tabela 2</u> : Skład mieszaniny reakcyjnej A.....	26
<u>Tabela 3</u> : Skład mieszaniny reakcyjnej B.....	26
<u>Tabela 4</u> : Skład medium do hodowli komórek hiPS.....	34
<u>Tabela 5</u> : Wykaz sekwencji siRNA zastosowanych do wyciszania ekspresji poszczególnych genów.....	40
<u>Tabela 6</u> : Wykaz starterów wykorzystanych do amplifikacji cDNA badanych genów.....	42
<u>Wykres 1</u> : Pomiar ilości markera chromatyny nieaktywnej, H3K9me3, w pobliżu miejsca wiązania tTRKRAB za pomocą ChIP-qPCR.....	49
<u>Wykres 2</u> : Poziom ekspresji poszczególnych czynników KRAB-ZFPs po transfekcji przy pomocy siRNA.....	56
<u>Wykres 3</u> : Poziom ekspresji markerów pluripotencji 6 dni po wyciszeniu ekspresji genu TRIM28 oraz poszczególnych KRAB-ZNFs	58