

mgr Joanna Wróblewska

**Opracowanie nowej metody generowania
ludzkich indukowanych komórek
pluripotencjalnych (iPS) i wykazanie roli
białka KAP1 w epigenetycznej regulacji
procesu samoodnowy**

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych

Promotor: dr hab. n. med. Maciej Wiznerowicz

Katedra Biotechnologii Medycznej
Zakład Immunologii Nowotworów
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Poznań 2015

Słowa kluczowe:

komórki macierzyste, proces samoodnowy, regulacja epigenetyczna, białko TRIM28

Keywords:

stem cells, self-renewal, epigenetic regulation, TRIM28 protein

Praca naukowa finansowana przez
Fundację na Rzecz Nauki Polskiej, grant: WELCOME 2010-3/3

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	7
1. WSTĘP	9
1.1. Komórki macierzyste	9
1.1.1. Typy komórek macierzystych	9
1.1.2. Cechy charakterystyczne komórek macierzystych	10
1.1.3. Zalety i ograniczenia wynikające z zastosowania komórek macierzystych	10
1.2. Reprogramowanie komórek somatycznych	11
1.3. Indukowane komórki pluripotenne	12
1.4. Otrzymywanie komórek iPS	13
1.4.1. Czynniki transkrypcyjne	13
1.4.2. Metody wprowadzania czynników reprogramujących do komórek	14
1.5. Charakterystyka komórek iPS	16
1.5.1. Morfologiczne i molekularne cechy charakterystyczne komórek macierzystych	16
1.6. Epigenetyczna charakterystyka komórek macierzystych	17
1.7. Czynniki transkrypcyjne z domeną KRAB	19
1.8. Białko TRIM28 i jego rola w regulacji procesu transkrypcji	20
1.8.1. Budowa białka TRIM28	20
1.8.2. Regulacja transkrypcji przez TRIM28	21
1.8.3. Rola białka TRIM28 w utrzymywaniu stanu pluripotencji	22
2. CEL PRACY	23
3. MATERIAŁY I METODY	24
3.1. Komercyjne linie komórkowe	24
3.2. Hodowla komórkowa	25
3.2.1. Ustalenie linii pierwotnych ludzkich fibroblastów	25
3.3. Metody wykorzystane w trakcie generacji i analizy ludzkich indukowanych komórek pluripotentnych	26
3.3.1. Przygotowanie wektorów lentiwirusowych	26
3.3.3. Reprogramowanie komórek fibroblastów w kierunku komórek iPS	30
3.3.4. Analiza kariotypu komórek iPS	31
3.3.5. Barwienia immunofluorescencyjne	32
3.3.6. Izolacja RNA komórkowego	33
3.3.7. Analiza jakości całkowitego RNA komórkowego	34
3.3.8. Przygotowanie cDNA i analiza RT-PCR	34

3.3.9	Globalne sekwencjonowanie transkryptomowe (RNA-seq) i analiza statystyczna otrzymanych wyników	35
3.3.10	Ilościowa reakcja RT-PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR).....	36
3.3.11	Analiza potencjału różnicowania komórek <i>in vitro</i>	37
3.3.12	Analiza potencjału różnicowanie komórek <i>in vivo</i>	37
3.4	Analiza roli TRIM28 w podtrzymaniu procesu samoodnowy ludzkich komórek macierzystych.....	38
3.4.1	Wybór modelu badawczego	38
3.4.2	Reagenty interferencji RNA.....	38
3.4.3	Optymalizacja warunków transfekcji reagentami interferencji RNA.....	39
3.4.4	Wyciszenie ekspresji <i>TRIM28</i> w liniach komórek iPS.....	39
3.4.5	Analiza cyklu komórkowego oraz procesu apoptozy	40
3.4.6	Analiza cytometryczna (FACS) poziomu ekspresji markerów pluripotencji.....	41
3.5	Analizy statystyczne otrzymanych wyników	42
4.	WYNIKI	43
4.1	Reprogramowanie ludzkich fibroblastów w kierunku komórek iPS z wykorzystaniem systemu regulowanej ekspresji wektora lentiwirusowego.....	43
4.1.1	Konstrukcja wektora lentiwirusowego pStemcca-tetO	43
4.1.2	Ocena szczelności systemu regulowanej ekspresji	44
4.1.3	Wyprowadzenie linii ludzkich pierwotnych fibroblastów	45
4.1.4	Reprogramowanie ludzkich pierwotnych fibroblastów w kierunku komórek iPS ...	46
4.1.5	Analiza kariotypu otrzymanych komórek iPS.....	50
4.1.6	Charakterystyka otrzymanych ludzkich komórek iPS.....	50
4.2	Analiza roli TRIM28 w samoodnowie komórek iPS.....	60
4.2.1	Plan eksperymentu	60
4.2.2	Walidacja reagentów interferencji RNA.....	60
4.2.3	Analiza poziomu ekspresji TRIM28 na poziomie transkryptu i białka.....	61
4.2.4	Ocena wpływu wyciszenia ekspresji TRIM28 w badanych komórkach na cykl komórkowy i indukcję apoptozy	63
4.2.5	Ocena morfologii komórek iPS.....	64
4.2.6	Analiza ekspresji zewnątrzkomórkowych markerów pluripotencji	65
4.2.7	Analiza ekspresji wewnątrzkomórkowych markerów pluripotencji	66
4.2.8	Analiza ekspresji markerów różnicowania komórkowego.....	68
5.	DYSKUSJA	71
6.	WNIOSKI	83

8.	STRESZCZENIE.....	84
9.	ABSTRACT.....	85
10.	BIBLIOGRAFIA.....	86
	SPIS TABEL I RYCIN	93
	TABELE.....	93
	RYCINY.....	93

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- ATCC** (*American Type Culture Collection*) – amerykańskie repozytorium i centrum dystrybucji kultur mikroorganizmów, linii komórkowych czy wirusów
- BMP** (*Bone Morphogenetic Proteins*) – szlak sygnalizacyjny białka morfogenetycznego kości
- BROMO** (*Bromodomain*) – domena białkowa rozpoznająca mono-acetylowane lizyny białek histonowych
- BSA** (*Bovine Serum Albumin*) – albumina surowicy wołowej
- CC** (*Coiled Coil*) – motyw skróconej helisy
- CT** (*control*) – komórki traktowane kontrolnym siRNA (bez sekwencji docelowej)
- DMEM** (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) – pożywka Eagle'a zmodyfikowana przez Dulbecco
- DNMT3B** (*DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta*) – metylotransferaza DNA, biorąca udział w metylacji *de novo* CpG
- DMSO** (*Dimethyl sulfoxide*) – dimetylosulfotlenek
- ES** (*Embryonic Stem Cells*) – embrionalne komórki macierzyste
- FACS** (*Fluorescence-activated cell sorting*) – cytometria przepływowa
- FBS** (*Fetal Bovine Serum*) – bydlęca surowica płodowa
- GAPDH** (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) - dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, enzym z klasy oksoreduktaz
- H3** – histon H3
- H3K9me3** – potrójna metylacja histonu H3 w pozycji lizyny 9 (K9)
- hES** (*human Embryonic Stem Cells*) – linia ustalona ludzkich komórek macierzystych
- HP1** (*Heterochromatin Protein 1*) – rodzina wysoce konserwatywnych białek stabilizujących heterochromatynę
- iPS** (*induced pluripotent stem cells*) – indukowane komórki pluripotenne
- IRES** (*Internal Ribosome Entry Site*) – wewnętrzne miejsce wiązania rybosomu w sekwencji wektorów plazmidowych
- KAP1** (*KRAB- Associated Protein 1*) – ko-represor transkrypcyjny, wiążący się do białek KRAB-ZFP; inne nazwy: TIF1β, TRIM28
- Klf4** (*Kruppel-like factor 4*) – czynnik transkrypcyjny kodowany przez gen *KLF4*
- KRAB** (*Krüppel-Associated Box*) – domena białkowa o właściwościach represora transkrypcji
- KRAB-ZFP** (*Krüppel-Associated Box Zinc Finger Proteins*) – czynniki transkrypcyjne z domeną placu cynkowego posiadające w swojej budowie domenę KRAB
- KSR** (*Knockout Serum Replacement*) – suplement medium hodowlanego komórek macierzystych
- mES** (*mouse Embryonic Stem Cells*) – mysie embrionalne komórki macierzyste
- NEAA** (*Non Essential Amino Acids*) – mieszanina aminokwasów, suplement medium hodowlanego komórek macierzystych
- NOD/SCID** (*Nonobese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency*) – szczep myszy z obniżoną odpornością
- NuRD** (*Nucleosome Remodeling Complex*) – kompleks remodelujący nukleosom
- Oct3/4** (*octamer-binding transcription factor 3/4*) – czynnik transkrypcyjny Oct3/4, kodowany przez gen *POU5F1*
- p53** – czynnik transkrypcyjny, supresor nowotworowy kodowany przez gen *TP53*
- PCR** (*polymerase chain reaction*) – reakcja łańcuchowa polimerazy
- PBS** (*Phosphate Buffered Saline*) – fizjologiczny roztwór soli buforowany fosforanami

PCA (*Principal Component Assay*) – analiza głównych składowych

PHD (*Plant Homeodomain*) – domena białkowa o strukturze palca cynkowego, obecna w budowie białek regulujących ekspresję genów poprzez zmiany w kondensacji chromatyny

PIKK (*Phosphatidylinositol 3-Kinase-Related Kinases*) – rodzina kinaz spokrewnionych z kinazą fosfatydyloinozytolu

PRC1 (*Polycomb Repressive Complexes 1*) – kompleks represyjny *polycomb 1*

RBCC (*RING-B-box-Coiled Coil*) – domena białkowa utworzona z mniejszych struktur: RING, B-box oraz motywu CC

Rex1 (*Reduce Expression Protein 1*) – czynnik transkrypcyjny Rex1, marker pluripotencji

RIN (*RNA Integrity Number*) – jednostka integralności RNA

RING (*Really Interesting New Gene*) – domena o strukturze palca cynkowego, zawierająca jon Zn^{+2}

SETDB1 (*SET Domain, Bifurcated 1*) – metylotransferaza N-lizyny w łańcuchu peptydowym białek histonowych

Sox2 (*SRY (sex determining region Y)-box 2*) – czynnik transkrypcyjny Sox2, marker pluripotencji

STAT (*signal transducers and activators of transcription*) – białka przekazujące sygnał i aktywujące transkrypcję

TERT (*telomerase reverse transcriptase*) – gen kodujący odwrotną transkryptazę telomerazy

TIF1 β (*Transcription Intermediary Factor 1 β*) – ko-represor transkrypcyjny, wiążący się do białek KRAB-ZFP; inne nazwy: KAP1, TRIM28

TRIM (*Tripartite Motif-Containing Protein Family*) – rodzina białek TRIM, posiadająca na N-końcu polipeptydu tzw. „motyw trzyczęściowy”, znany również jako domena RBCC

TRIM28 (*Tripartite Motif-Containing Protein 28*) – ko-represor transkrypcyjny, wiążący się do białek KRAB-ZFP; inne nazwy: KAP1, TIF1 β

WT (*wild type*) – “typ dziki”

ZF (*Zinc finger*) – domena palca cynkowego

1. WSTĘP

1.1. Komórki macierzyste

Komórki macierzyste to pierwotne, niewyspecjalizowane komórki, posiadające szereg charakterystycznych cech, między innymi zdolność do różnicowania się w wyspecjalizowane komórki tworząc tkanki. Pierwsze obserwacje tego typu komórek dotyczyły potworniaków (teratom) – guzów powstających w jądrach lub jajnikach myszy. Już na początku lat 40 XX wieku stwierdzono, że występują w nich komórki, które mogą różnicować się we wszystkie tkanki budujące organizm. Kolejne badania potwierdziły te obserwacje, co więcej, udowodniono, że guzy tego typu powstają z komórek rozrodczych [1]. Eksperymenty te zainicjowały cały szereg prac, które doprowadziły do uzyskania w 1981 roku pierwszej mysiej linii zarodkowych komórek macierzystych (ang. *embryonic stem cells*, ES). Dokonali tego niezależnie od siebie Gail Martin [2] oraz Martin Evans (uhonorowany Nagrodą Nobla w 2007 roku) i Matthew Kaufman [3]. Kolejne badania pozwoliły na uzyskanie pierwszych ludzkich komórek macierzystych w 1998 roku [4]. Ich właściwości wzbudziły ogromne nadzieje w kontekście wykorzystania ich potencjału w medycynie regeneracyjnej – odpowiednio stymulowane, potrafiły różnicować się w dowolny typ komórek, zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Jednakże, ze względu na fakt, iż są one pozyskiwane z wężła zarodkowego blastocysty, co wiąże się z jej nieodwracalnym zniszczeniem, ich wykorzystanie w celach terapeutycznych wzbudza wiele kontrowersji etycznych i moralnych.

1.1.1. Typy komórek macierzystych

Rozwój badań nad komórkami macierzystymi umożliwił wyodrębnienie i pozyskanie różnych ich typów. Ze względu na sposób ich pozyskania wyróżnia się:

- embrionalne komórki macierzyste, pochodzące z wężła zarodkowego blastocysty [4],
- somatyczne dorosłe komórki macierzyste, izolowane z tkanek dorosłego organizmu (jak np. komórki hematopoetyczne, neuronalne komórki macierzyste lub mięśniowe komórki satelitarne) [5],
- indukowalne komórki pluripotentne – typ pluripotentnych komórek macierzystych, uzyskany na drodze reprogramowania komórek somatycznych [6]

1.1.2. Cechy charakterystyczne komórek macierzystych

Niezależnie od pochodzenia, komórki macierzyste posiadają kilka cech wspólnych, definiujących ich macierzysty charakter. Należą do nich potencjał do różnicowania się w określone typy komórek oraz zdolność do samoodnowy. Komórki macierzyste charakteryzuje zdolność do różnicowania się w określony typy komórek somatycznych [7]. Ze względu na zdolność do różnicowania komórki macierzyste dzieli się na:

- totipotentne – mające potencjał do różnicowania się do każdego typu komórek, także łożyska (zygota)
- pluripotentne – mające potencjał do różnicowania się w komórki wywodzące się z trzech listków zarodkowych: mezo, ekto i endodermy, na przykład: embrionalne komórki macierzyste, indukowane komórki pluripotentne, nie posiadające potencjału do tworzenia łożyska
- multipotentne – mogące zróżnicować się w komórki o podobnych właściwościach i pochodzeniu embrionalnym, inaczej nazywane komórkami progenitorowymi, na przykład: hematopoetyczne komórki macierzyste, neuronalne komórki macierzyste
- unipotentne – komórki prekursorowe, mogące różnicować się tylko do jednego typu komórek, na przykład mięśniowe komórki satelitarne

Samoodnowa to zdolność komórek do przejścia nieograniczonej liczby podziałów komórkowych, bez utraty zdolności do różnicowania. Mechanizmy leżące u podstaw procesu gwarantujące zachowanie puli komórek macierzystych to:

- asymetryczna replikacja: komórka macierzysta dzieli się na dwie potomne komórki: jedną identyczną z komórką wyjściową oraz drugą, ukierunkowaną na różnicowanie [8]
- różnicowanie stochastyczne: jedna komórka macierzysta ulega podziałowi na dwie komórki potomne ukierunkowane na różnicowanie, inna ulega mitozie i produkuje dwie komórki macierzyste identyczne z komórką wyjściową [9]

1.1.3. Zalety i ograniczenia wynikające z zastosowania komórek macierzystych

Charakterystyczne cechy komórek macierzystych umożliwiają ich szerokie zastosowanie w badaniach podstawowych dotyczących różnicowania, rozwoju embrionalnego czy chorób genetycznych o nieznannej etiologii; w badaniach toksykologicznych oraz medycynie regeneracyjnej.

Kardiomiocyty otrzymane z komórek pluripotentnych mogą służyć jako model badawczy czynności skurczowej komórek, czasu potencjału czynnościowego mięśnia komór, przepływu jonów wapnia czy też biochemicznych analiz specyficznych kanałów jonowych [10]. Kolejną możliwością zastosowania komórek iPS są badania mechanizmów molekularnych chorób o podłożu genetycznym, dla których stworzenie komórkowego modelu *in vitro* nie jest możliwe bez wykorzystania technologii iPS. Są to choroby degeneracyjne i/lub wielogenowe. W pierwszym przypadku nie jest możliwe pobranie i hodowla *in vitro* komórek dotkniętych patologią ze względu na przedwczesną śmierć komórki. W drugim przypadku trudno jest odtworzyć faktyczny genotyp i fenotyp choroby, zwłaszcza, gdy nie wszystkie geny zaangażowane w procesy chorobotwórcze zostały zidentyfikowane [11]. Dotychczas uzyskano wiele różnych typów komórek z fibroblastów pobranych od pacjentów chorujących na: dystrofię mięśniową Beckera i Duchenne'a, zespół Downa, chorobę Huntingtona, Parkinsona czy też cukrzycę typu pierwszego [12]. Zastosowanie komórek iPS daje możliwość spersonalizowanego badania rozwoju choroby i opracowania optymalnej metody leczenia.

Ogromne nadzieje budzi możliwość wykorzystania komórek iPS w medycynie regeneracyjnej (np. w przypadku urazów rdzenia kręgowego, zawału mięśnia sercowego). Do tej pory uzyskano komórki β trzustki syntetyzujące insulinę [13], kardiomiocyty [14], komórki śródbłonna [15], neurony [16] oraz wiele innych. Komórki iPS, otrzymane z komórek chorego, można modyfikować genetycznie, co daje możliwość naprawy defektu genetycznego komórek, dalszego ich różnicowania, a w końcu przeszczepienia dawcy. Należy podkreślić, że transplantacja autologiczna zmniejsza zagrożenie immunologicznego odrzucenia przeszczepu [17]. Metody te z powodzeniem są stosowane w modelach zwierzęcych. Terapię genową na bazie komórek iPS udało się przeprowadzić u myszy chorujących na anemię sierpowatą [18] czy hemofilię typu A [19].

Największą przeszkodą w zastosowaniu komórek macierzystych jest sposób ich pozyskiwania. Konieczność niszczenia ludzkich zarodków w celu izolacji komórek embrionalnych uniemożliwia pozyskiwanie ich na skalę niezbędną do wdrożenia powyższych zastosowań. Ogromną nadzieję budzą indukowane komórki macierzyste, uzyskane na drodze reprogramowania komórek somatycznych.

1.2. Reprogramowanie komórek somatycznych

Badania nad ideą procesu reprogramowania komórek rozpoczęły się około roku 1952 kiedy to dwóch badaczy, Briggs i King przeszczepili jądro komórki pochodzącej

z blastuli żaby do oocytu pozbawionego własnego materiału genetycznego [20]. Otrzymali w ten sposób zarodek prawidłowo rozwijający się aż do stadium kijanki. Wydajność tego procesu była jednak bardzo niska, jednakże znacząco wyższa niż w przypadku wykorzystania jąder komórek somatycznych. Uczeni doszli do wniosku, że różnicowanie się komórek w trakcie rozwoju embrionalnego jest zjawiskiem zmieniającym profil ekspresji genów w sposób nieodwracalny [21]. W latach 60 XX wieku eksperymenty te zostały powtórzone i rozszerzone przez Marie Di Berardino [22-24], a także przez Johna Gourдона [25-27]. Udowodnione zostało, że transplantacja jądra nawet wysoce zróżnicowanych komórek somatycznych takich jak naskórek czy limfocyt do pozbawionego własnego jądra oocytu płaza, prowadzi do skutecznego rozwoju embrionalnego. Po raz pierwszy wykazano więc, że nie tylko komórki zarodkowe, ale także komórki dorosłego organizmu posiadają informację genetyczną niezbędną do zainicjowania rozwoju embrionalnego. Również polski zespół Andrzeja Tarkowskiego z Zakładu Embriologii Uniwersytetu Warszawskiego podjął temat reprogramowania komórek. W latach 80 XX wieku prowadził badania polegające na zastąpieniu materiału genetycznego oocytu myszy jądrem z komórki somatycznej [28-30]. Chociaż badania te nie zakończyły się uzyskaniem klonu myszy, wniosły ogromny wkład wiedzy w zakresie remodelowaniu chromatyny w jądrach wprowadzanych do oocytu. Próby sklonowania ssaków podejmowano jeszcze kilkakrotnie, jednakże dopiero w roku 1996 nastąpił przełom w tej dziedzinie. Zespół Iana Wilmuta i Keitha Campbella wprowadził jądro komórki nabłonkowej gruczołu mlecznego owcy do oocytu pozbawionego jądra komórkowego. Rozwijający się zarodek wszczepiono matce zastępczej. Skutkiem tego eksperymentu było pierwsze w historii udane klonowanie ssaka – na świat przyszła owca o imieniu Dolly [31]. Kilka lat później w analogiczny sposób uzyskano pierwsze sklonowane myszy [32]. Badania te obaliły tezę o nieodwracalności losów komórki somatycznej i ostateczności zmian zachodzących w jądrze komórkowym w trakcie rozwoju embrionalnego.

1.3. Indukowane komórki pluripotencjne

Przełomem w temacie pozyskiwania komórek macierzystych były prace Kazutoshi Takahashi oraz Shinya Yamanaka, W 2006 roku opublikowali pracę wskazującą na możliwość uzyskania komórek o charakterze pluripotencjnym z mysich fibroblastów poprzez nadekspresję czterech czynników transkrypcyjnych [33]. Z wstępnie wyselekcjonowanych 24 czynników indukujących pluripotencję w komórkach

somatycznych wybrano cztery: Oct3/4, Sox2, Klf4 oraz c-Myc (OSKM). Otrzymane komórki posiadały morfologię oraz profil ekspresji genów podobny do komórek embrionalnych i zostały nazwane indukowanymi pluripotentnymi komórkami macierzystymi (ang. *induced pluripotent stem cells*, iPS). Rok później analogiczne komórki otrzymali z ludzkich fibroblastów [34]. Zastosowanie komórek iPS pozwala zmarginalizować dwie kluczowe kwestie związane z komórkami ES: odrzucanie przeszczepów allogenicznych oraz kontrowersje etyczne związane z niszczeniem embrionów w trakcie pozyskiwania komórek macierzystych.

1.4. Otrzymywanie komórek iPS

1.4.1. Czynniki reprogramujące

Z czterech czynników reprogramujących, nazywanych „czynnikami Yamanaki” tylko *OCT3/4* i *SOX2* są niezbędne do zainicjowania reprogramowania i generacji komórek iPS. Ich rola polega na wzajemnej regulacji ekspresji oraz aktywacji genów pluripotencji (np. *Nanog*). *KLF4* i *cMYC* są czynnikami zwiększającymi wydajność i przyspieszającymi proces reprogramowania [35].

C-Myc bierze udział w aktywacji genów wpływających na zwiększoną proliferację. Dodatkowo, indywidualnie lub w połączeniu z innymi czynnikami, jest główną siłą sprawczą w początkowej fazie procesu reprogramowania. Aktywuje on markery komórek pluripotencjalnych już kilka dni po wprowadzeniu OSKM do komórek docelowych [36]. Wykazano, że c-Myc łączy się z kompleksami acetylaz histonowych indukując globalną acetylację histonów, a zarazem umożliwiając wiązanie Oct3/4 i Sox2 do DNA [37].

W przypadku Klf4 wykazano, że może on wpływać na aktywację *Nanog* i innych genów charakterystycznych dla komórek macierzystych. Poziom genów regulowanych przez Klf4 ulega zmianom w początkowej i końcowej fazie procesu reprogramowania. Podtrzymuje to prawdopodobną podwójną rolę czynnika Klf4: funkcję represyjną genów charakterystycznych dla komórek zróżnicowanych w początkowym etapie i funkcję aktywacyjną genów pluripotencji w końcowym etapie reprogramowania [36].

Istotny także okazał się stosunek stechiometryczny dostarczanych czynników indukujących pluripotencję. Wysoki poziom czynników Oct3/4, Klf4 i cMyc oraz niski poziom ekspresji Sox2 umożliwił najwyższą wydajność procesu reprogramowania [38].

1.4.2. Metody wprowadzania czynników reprogramujących do komórek

Proces reprogramowania wymaga wydajnego dostarczenia i nadekspresji czynników transkrypcyjnych, niezbędnych do indukcji pluripotencji w komórkach macierzystych. Metody dostarczania czynników reprogramujących można podzielić na nieintegrujące oraz integrujące z genomem komórki.

Do metod nieintegrujących zaliczamy wykorzystanie wektorów adenowirusowych, plazmidów, wektorów episomalnych, wirusa Sendai oraz metody bezpośrednie, polegające na aktywnym pobieraniu przez komórki rekombinowanych białek lub mRNA. Wektory adenowirusowe cechuje niska wydajność reprogramowania komórek oraz ograniczona możliwość kontroli poziomu ekspresji transgenu [39]. Również wektory episomalne oriP/EBNA oparte na wirusie Epstein-Baara cechują się bardzo niską wydajnością reprogramowania [40]. Wirus Sendai, pomimo relatywnie wysokiej wydajności reprogramowania, stwarza problem w postaci usunięcia go z otrzymanych komórek iPS [41]. Wektory plazmidowe ze względu na brak możliwości replikacji w komórce wymagają kilkukrotnej transfekcji w trakcie procesu odróżnicowania [42].

Wykorzystanie rekombinowanych białek pozwala na otrzymanie komórek iPS bez konieczności wprowadzania egzogenego materiału genetycznego do komórki. Jednakże białka mają ograniczoną zdolność przejścia przez błonę komórkową. W celu dostarczenia czynników reprogramujących do wnętrza komórki, białka połączono z ułatwiających penetrację błony komórkowej. Domeny poliargininowe, zwane peptydem penetrującym komórkę (ang. *cell penetrating peptide*, CPP) i białko transaktywujące ludzkiego wirusa niedoboru odporności (ang. *Human Immunodeficiency Virus – Transactivator Protein*, HIV-TAT), zwane domeną transdukcji białka (ang. *Protein Transduction Domain*, PTD) są powszechnie stosowane do znakowania czynników reprogramujących. System ten wymaga kilkukrotnej inkubacji reprogramowanych komórek z koktajlem białkowym a także chemicznych modyfikatorów zawartych w medium hodowlanym, takich jak kwas walproinowy [43, 44].

Kolejną metodą otrzymywania komórek iPS jest wykorzystanie rekombinowanych mRNA. Ten typ reprogramowania cechuje się relatywnie wysoką wydajnością, jednakże wymaga kilku inkubacji z koktajlem mRNA. Istotną przeszkodą w wykorzystaniu tego protokołu na szerszą skalę jest fakt, że wprowadzenie obcego RNA indukuje w komórce systemy odpowiedzi przeciwwirusowej, oparte na interferonie, co jest przyczyną wysokiej cytotoksyczności metody [45].

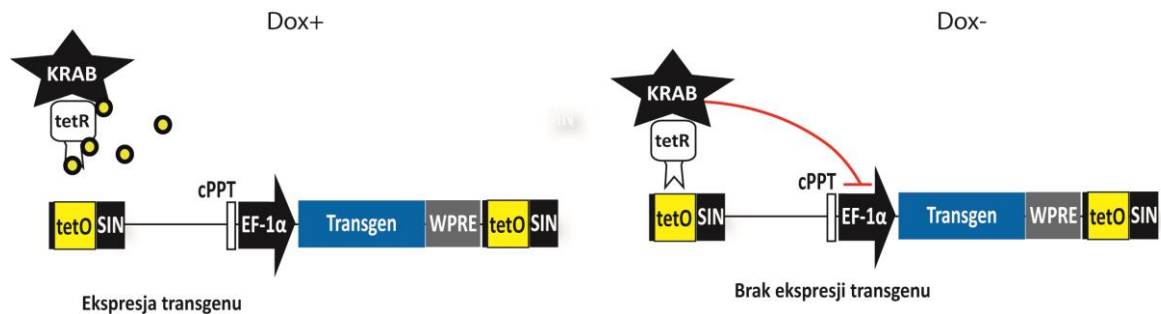
Opisane metody nieintegrujące cechują się niską wydajnością procesu reprogramowania. Wektory integrujące, takie jak gamma renowirusowe, transpozony czy wektory lentiwirusowe, gwarantują wydajne reprogramowanie komórek somatycznych. Jednakże pozostawiają one zintegrowany z genomem komórki transgen, co może być przyczyną niestabilności genetycznej komórki oraz transformacji nowotworowej. Zaletą wektorów renowirusowych jest samoistne wyciszenie ekspresji transgeny, jednakże istnieje możliwość jego reekspresji w trakcie różnicowania komórek [6]. Konieczność opracowania metody pozyskiwania bezpiecznych, pozbawionych ekspresji transgeny komórek iPS doprowadziły do powstania systemów opartych na wycięciu zintegrowanego transgeny, lub kontrolowaniu jego ekspresji.

Opracowano kilka metod wycięcia zintegrowanego z genomem komórki transgeny. Jedną z nich opiera się na wykorzystaniu naturalnie występujących transpозonów, które mają możliwość przemieszczania się w obrębie genomu w procesie zwanym transpozycją. Obecnie wykorzystuje się dwie metody oparte na transpozonach *piggyBAC* oraz *sleeping beauty*, obydwie o udowodnionej skuteczności w reprogramowaniu komórek somatycznych [46, 47]. Usunięcie ich z genomu jest możliwe przez zastosowanie enzymu transpozazy. Drugim systemem opartym na wycięciu zintegrowanego transgeny jest system Cre-loxP, w którym miejsce loxP umieszczone jest w regionie 3'LTR wektora. W trakcie integracji jest ono duplikowane do regionu 5'LTR, co skutkuje integracją transgeny otoczonego dwoma miejscami loxP. Umożliwia to jego późniejsze wycięcie przy pomocy rekombinazy Cre [48].

System regulowanej ekspresji transgeny oparty jest na zastosowaniu promotorów, umożliwiających kontrolowanie ich aktywności na drodze farmakologicznej, na przykład promotory indukowane tetracykliną. Wykorzystanie tego systemu w wektorach np. lentiwirusowych umożliwia włączanie i wyłączanie ekspresji transgeny poprzez suplementację medium hodowlanego doksycykliną. Dwa najczęściej stosowane systemy indukowanej ekspresji w komórkach eukariotycznych to Tet-Off i Tet-ON.

System Tet-ON wykorzystuje transaktywator tetracyklinowy (ang. *tetracycline transactivator*, tTA), białko fuzyjne zbudowane z represora tetracyklinowego TetR z domeną białka VP16 wirusa Herpes Simplex. Białko tTA ma zdolność wiązania sekwencji operatora tet (tetO), zlokalizowanej w okolicy promotora, tworząc w ten sposób element odpowiedzi na tetracyklinę (ang. *tetracycline response element*, TRE) [49]. Dodatek tetracykliny lub jej pochodnych pozwala na wiązanie tTA do sekwencji tetO i ekspresję genów kontrolowanych przez TRE. System Tet-OFF działa w oparciu

o podobne elementy, jednakże wiązanie tTA do sekwencji tetO jest możliwe tylko w nieobecności doksycykliny [49, 50]. Modyfikacje tego systemu, oparte na epigenetycznej regulacji ekspresji zostały zastosowane w regulacji wyciszenie ekspresji genów przy użyciu reagentów interferencji RNA[51] (Ryc. 1)



Ryc. 1 Schemat działanie systemu ekspresji regulowanej doksycykliną.
Źródło: Opracowano na podstawie referencji [51]

1.5. Charakterystyka komórek iPS

1.5.1. Morfologiczne i molekularne cechy charakterystyczne komórek macierzystych

Jedną z cech charakterystycznych komórek macierzystych jest ich morfologia. Ludzkie komórki macierzyste tworzą płaskie, 2-4 warstwowe kolonie o wyraźnych krawędziach. Charakteryzuje je wysoki stosunek objętościowy jądra do cytoplazmy oraz obecność wyraźnych jąder. Komórki ES posiadają wysoką aktywność alkalicznej fosfatazy oraz posiadają nieograniczony potencjał proliferacyjny, jeden cykl komórkowy trwa około 35 godzin [52].

Komórki o charakterze macierzystym cechuje określony profil ekspresji genów, ściśle związanych z podtrzymaniem samoodnowy i stanu niezróżnicowania komórek. Do tych specyficznych genów należą markery powierzchniowe SSEA3 i SSEA4, glikoproteiny TRA 1-60 i TRA 1-81. Charakterystyczny dla mysich komórek embrionalnych antygen SSEA1 występuje w ludzkich komórkach ES, gdy te tracą charakter macierzysty i ulegają różnicowaniu [53].

Oct3/4, Sox2 i Nanog są głównymi czynnikami transkrypcyjnymi odpowiedzialnymi za podtrzymanie pluripotencji w komórkach macierzystych. W trakcie rozwoju embrionalnego ich ekspresja pojawia się na etapie brzdękowania, a następnie ogranicza się do komórek węzła zarodkowego blastocysty. Oct3/4 i Sox2 wiążą się do promotorów genów regulując ekspresję markerów pluripotencji, takich jak: *OCT3/4*, *SOX2*

(autoregulacja), *NANOG*, *Lefty1*, *REX1*, *UTF1* oraz transkryptazy *TERT* [36]. Ekspresja Oct3/4 i Sox2 jest zwrotnie regulowana przez Nanog [54]. Reguluje on także inne cząsteczki odpowiedzialne za podtrzymanie pluripotencji komórek, takie jak: *Foxd3*, *Setdb1* czy *Esrrb1* [55]. Jest on jednym z głównych czynników odpowiedzialnych za utrzymanie samoodnowy komórek. Komórki macierzyste pozbawione ekspresji Nanog niezdolne są do podtrzymania stanu pluripotencji [56].

1.6. Epigenetyczna charakterystyka komórek macierzystych

Globalny profil metylacji macierzystych komórek embrionalnych i komórek iPS jest bardzo zbliżony i zdecydowanie różny od profilu komórek somatycznych. Promotory genów aktywnych transkrypcyjnie cechują się niskim stopniem metylacji wysp CpG i obecnością markera chromatyny aktywnej H3K4me3. Niezależnie od rodzaju komórek wyjściowych, reprogramowanie wiąże się ze zwiększeniem globalnego stopnia metylacji CpG, a co za tym idzie, represją transkrypcji większości genów związanych z utrzymaniem zróżnicowanego stanu komórki. Jednocześnie promotory genów zaangażowanych w generację i utrzymanie stanu pluripotencji ulegają hipometylacji [57]

Istotną cechą określającą stan pluripotencji jest reaktywacja nieaktywnego chromosomu X w komórkach żeńskich. Zjawisko to zachodzi stosunkowo późno w procesie reprogramowania, odzwierciedlając kinetykę aktywacji endogennych czynników pluripotencji (Nanog i Oct3/4) [58, 59]. Za inaktywację odpowiedzialna jest duża, niekodująca cząsteczka RNA, Xist, która jest czynnikiem cis-regulującym represję. Proces ten wiąże się z akumulacją znaczników nieaktywnej chromatyny w obrębie chromosomu X (H3K27me3). W mysich komórkach iPS reaktywacja ta jest pełna i podobnie jak w mysich macierzystych komórkach embrionalnych oba chromosomy są aktywne. Jednym z proponowanych modeli reaktywacji jest wiązanie się czynników Oct3/4, Sox2 i Nanog do regionu kodującego Xist i zablokowanie jego ekspresji [60]. W komórkach ludzkich proces ten jest jednak bardziej skomplikowany. Ludzkie żeńskie komórki hES cechują się dużą różnorodnością statusu epigenetycznego chromosomu X. Takie samo zjawisko zaobserwowano w trakcie procesu reprogramowania żeńskich komórek somatycznych. Obecnie istnieją sprzeczne doniesienia na temat pełnej reaktywacji chromosomu X w żeńskich komórkach iPS, toteż proces ten wymaga dalszych badań [61].

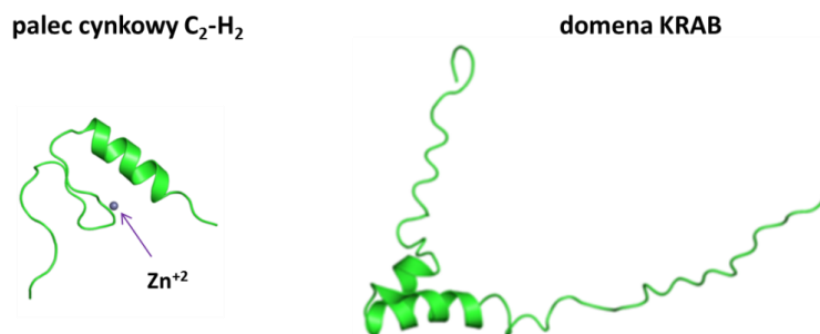
Modyfikacje chromatyny zachodzą o wiele szybciej niż zmiany w profilu metylacji DNA, dlatego też ekspresja genów w komórkach ES jest w dużym stopniu kontrolowana

przez mechanizmy zależne od jej struktury [62] Wymaga ono globalnej, wieloetapowej reorganizacji chromatyny z represywnej na otwartą, inaktywacji czynników epigenetycznych odpowiedzialnych za zróżnicowany status komórki, a także aktywacji czynników zaangażowanych w podtrzymanie pluripotencji i samoodnowy [63, 64]. Czynniki remodelujące chromatynę poprzez zmiany poszczególnych wariantów histonowych oraz pozycji nukleosomu na nici DNA to wieloskładnikowe kompleksy białkowe zależne od ATP. Wpływają one na interakcje między DNA a histonami, regulując tym samym dostęp czynników transkrypcyjnych do DNA. W utrzymaniu pluripotencji i samoodnowy komórek macierzystych istotną rolę odgrywają takie kompleksy remodelujące, jak: Swi/Snf, Mi2/Nurd, Chd, Tip60-p400 oraz Iswi. System regulacji ekspresji genów poprzez modyfikacje histonów jest bardzo złożony. Opiera się on na wielu różnorodnych kompleksach białkowych katalizujących przyłączenie lub usuwanie danej grupy funkcyjnej (np. metylowej, acetylowej, fosforylowej, etc.) oraz na czynnikach, które ją rozpoznają, by zrealizować konkretny program regulatorowy. Acetylacja lizyn histonowych neutralizuje ich pozytywny ładunek prowadząc do rozluźnienia interakcji między chromatyną a DNA i do dekondensacji chromatyny. Natomiast grupy metylowe przyłączone do lizyn histonów funkcjonują jako domeny dokujące dla białek efektorowych: czynników transkrypcyjnych, represorów lub białek remodelujących chromatynę. Komórki pluripotencjne różnią się od komórek zróżnicowanych zwiększoną zawartością modyfikacji aktywnych, zmniejszoną – nieaktywnych oraz obecnością domen biwalentnych. Chromatyna biwalentna charakteryzuje się obecnością zarówno H3K4me3 (znacznik chromatyny aktywnej), jak i H3K27me3 (znacznik chromatyny nieaktywnej) i obejmuje rejony genów tkankowo – specyficznych. Geny wyznakowane w ten sposób są hipometylowane i nie ulegają ekspresji. Badania nad poszczególnymi podjednostkami kompleksów modyfikujących histony wykazały, że wiele z nich ma istotny wpływ na zachowanie pluripotencji i/lub samoodnowy komórek macierzystych [64, 65]. Do aktywnych modyfikacji histonów zalicza się między innymi acetylację lizyn histonów H4 i H3, a także tri- i dimetylacje lizyn histonu 3: H3K4me3/2, H3K36me3/2 oraz H3K79me3/2. Acetylotransferaza histonowa Mof przyczynia się do utrzymania pluripotencji i samoodnowy komórek macierzystych, między innymi poprzez regulację ekspresji genu Nanog. Ponadto, Mof oddziałuje z białkiem łącznikowym Wdr5, które wchodzi w skład kompleksów białkowych grupy Trithorax odpowiedzialnych za metylację H3K4 [62]. Wiele białek z grupy Trithorax zaangażowanych jest w podtrzymanie macierzystości komórek embrionalnych

(np. Kdm1a, Kdm5b, Wdr5). Modyfikacja H3K27me3 katalizowana jest przez białka grupy Polycomb [65]. H3K27me3 oraz H3K9me3 wchodzą w skład domen chromatyny nieaktywnej. Modyfikacja H3K9me3 rozpoznawana jest jako sygnał formowania heterochromatyny oraz rekrutacji metylotransferaz DNA. Występuje częściej w komórkach zróżnicowanych, w których indukuje wyciszenie genów pluripotencji – Oct3/4 i Nanog [64]. W komórkach macierzystych H3K9me3 bierze udział w wyciszaniu genów odpowiedzialnych za rozwój trofektodermy, [65, 66]. Jedną z najlepiej scharakteryzowanych modyfikacji DNA jest metylacja cytozyny w pozycji 5 (5mC). Katalizowana jest *de novo* przez metylotransferazy Dnmt3a i Dnmt3b i utrzymywana podczas replikacji komórki przez Dnmt1. Aktywność metylotransferaz DNA jest nieodzowna podczas rozwoju zarodkowego i różnicowania komórek [65].

1.7. Czynniki transkrypcyjne z domeną KRAB

Białka regulatorowe KRAB-ZFP (ang. *Krüppel-Associated Box Zinc Finger Proteins*, KRAB-ZFP) odgrywają znaczącą rolę epigenetycznej regulacji transkrypcji. Posiadają one w swojej strukturze motyw palca cynkowego C₂-H₂ (ang. *Zinc Finger*, ZF), odpowiedzialny za wiązanie DNA oraz domenę KRAB (ang. *Krüppel-Associated Box*) pośredniczącą w regulacji ekspresji poprzez rekrutację innych korepresorów w miejscu wiązania z DNA [67, 68].



Ryc. 2 Struktura domeny palca cynkowego typu C₂-H₂ oraz domena KRAB.

Źródło: Protein Data Bank in Europe, <http://www.ebi.ac.uk>

Domena KRAB (ang. *Krüppel-Associated Box*) składa się z około 45-75 reszt aminokwasowych i zwykle zlokalizowana jest na N-końcu białka. Przewiduje się, że posiada zdolność do interakcji białko-białko za pośrednictwem dwóch amfipatycznych helis (Ryc. 2). Jest jednym z najsilniejszych represorów transkrypcji w ludzkim genomie [69]. Epigenetyczny mechanizm represji przez domenę KRAB polega na kondensacji

chromatyny w ściśle określonym regionie w wyniku rekrutacji szeregu białek pomocniczych i regulatorowych, co prowadzi do utworzenia nieaktywnej transkrypcyjnie heterochromatyny [70].

Motyw palca cynkowego C₂-H₂ jest niewielkim motywem strukturalnym, w którym jon cynkowy otoczony jest przez dwie reszty cysteinowe β-kartki i dwie reszty histydynowe α-helisy. Ten typ palców cynkowych posiada wysoce konserwatywną strukturę. Konsensusowa sekwencja aminokwasowa pojedynczej domeny zbudowana jest z około 30 reszt aminokwasowych: Cys-X2-4-Cys-X3-Phe-X5-Leu-X2-His-X3-His, tworzących strukturę typu ββα stabilizowaną przez jon cynku. Na C-końcu domeny zlokalizowana jest α-helisa, β-kartka na N-końcu [71, 72].

Ekspresja KRAB-ZFP ograniczona jest do genomu czworonożnych kręgowców (tetrapodów). Z około 400 genów, w wyniku obróbki posttranskrypcyjnej powstaje blisko 750 białek, co stanowi największą rodzinę czynników transkrypcyjnych z domeną palca cynkowego C₂-H₂ [70, 73]. Wykazano udział białek KRAB-ZFP w szeregu procesów komórkowych takich jak regulacja transkrypcji w rozwoju embrionalnym, proces różnicowania komórek macierzystych, proliferacji, apoptoza, transformacja nowotworowa i regulacja cyklu komórkowego [67, 73].

1.8. Białko TRIM28 i jego rola w regulacji procesu transkrypcji

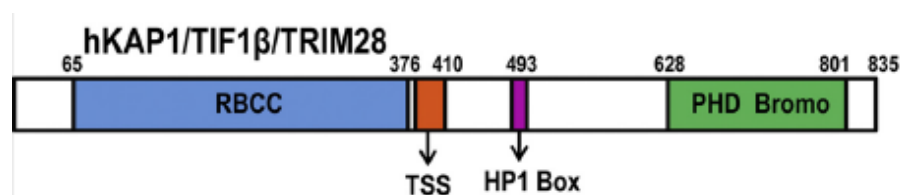
1.8.1. Budowa białka TRIM28

Białko TRIM28 (ang. *Tripartite Motif-Containing Protein 28*) uczestniczy w epigenetycznej regulacji transkrypcji na drodze interakcji z czynnikami regulatorowymi KRAB-ZFP (ang. *Krüppel-Associated Box Zinc Finger Proteins*, KRAB-ZFP). Gen TRIM28 w genomie człowieka jest zlokalizowany na ramieniu długim chromosomu 19 (19q13.4) i koduje wielodomenowe białko o masie 89 kDa [74, 75]

TRIM28 jest białkiem wielodomenowym. Na N-końcu łańcucha polipeptydowego posiada specyficzną strukturę, tzw. „motyw trzyczęściowy” (ang. *Tripartite Motif*), odpowiedzialny za interakcje białko-białko oraz umożliwiającym trimeryzację białka TRIM28 [76-78]. Motyw ten, znany również jako domena RBCC (ang. *RING-B-box-Coiled coil*), utworzony jest z kilku elementów: domeny RING (ang. *Really Interesting New Gene*), dwóch palców cynkowych o strukturze *B-box* (B1 i B2) oraz motywu skręconej helisy (ang. *Coiled Coil*). Domena RBCC odpowiada za możliwość wiązania do domeny KRAB czynników transkrypcyjnych z domeną palca cynkowego KRAB-ZFP.

W środkowej części łańcucha białkowego zlokalizowana jest sekwencja TSS (ang. *TIF1 Signature Sequence*), specyficzna dla rodziny białek TIF1. Zbudowana jest z około 25 aminokwasów, wśród których większość stanowią aminokwasy zawierające grupę aromatyczną, m.in. tryptofan i fenyloalanina. Białko TRIM28 posiada także domenę HP1BD (ang. *HP1-binding domain*) obejmującą pentapeptyd PxVxL, będącą miejscem interakcji z białkami HP1 (ang. *heterochromatin protein 1*) [76, 77].

Na karboksylowym końcu białka TRIM28 znajdują się: domena PHD (ang. *Plant Homeodomain*) oraz BROMO (ang. *Bromodomain*). Domeny te odpowiedzialne są za interakcje z modyfikatorami chromatyny: białkiem Mi-2 α (CDH3), jednym z białek wchodzących w skład kompleksu NuRD (ang. *Nucleosome Remodeling Complex*), oraz metylotransferazą histonu 3, SETDB1 (ang. *SET domain, bifurcated 1*) [78] (Ryc.3).



Ryc. 3 Schemat struktury pierwszorzędowej białka TRIM28

Źródło: Opracowane na podstawie referencji [76]

1.8.2. Regulacja transkrypcji przez TRIM28

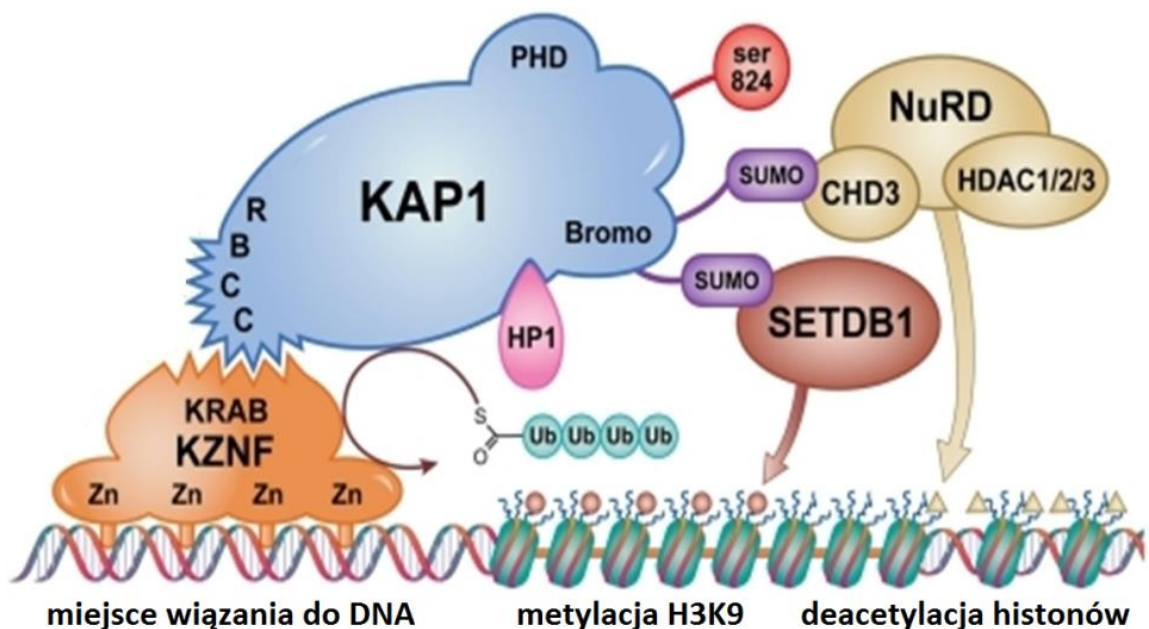
Białko TRIM28 poprzez domenę RBCC ulega trimeryzacji oraz wiązaniu do domeny KRAB czynników transkrypcyjnych KRAB-ZFP. Domena PHD, posiadająca aktywność ligazy E3 warunkuje sumoilację domeny BROMO. Następstwem tego jest wiązanie jednostki Mi-2 α kompleksu NuRD oraz enzymu SETDB1, jest niezbędnych do represji genów docelowych. Rekrutacja kompleksu NuRD do chromatyny prowadzi do deacetylacji histonów przez deacetylazy histonów HDAC. Aktywność enzymu SETDB1 prowadzi do potrójnej metylacji lizyny w pozycji 9 histonu 3 (H3K9me3). Dodatkowo rekrutacja białek HP1 stabilizuje powstawanie heterochromatyny, co prowadzi do zahamowania aktywności transkrypcyjnej genów kodowanych w danym regionie chromatyny [77, 78] (Ryc. 4).

Modyfikacje stanu chromatyny przez TRIM28 i rekrutowane przez niego białka, podlega regulacji w sposób zależny od jego fosforylacji. Wykazano, że fosforylacja seryny 473 (S473) oraz tyrozyn 449, 458 i 517 prowadzi do rozluźnienia struktury chromatyny, na skutek zaburzenia wiązania TRIM28 i białka HP1 [79, 80]. Dodanie reszty fosforanowej

do seryny 824 (S824) prowadzi do obniżenia stopnia SUMOilacji białka KAP1, prowadząc do osłabienia interakcji z białkami kompleksu NuRD czy metylotransferazą SETDB1 [81].

1.8.3. Rola białka TRIM28 w utrzymaniu stanu pluripotencji

Białko TRIM28 reguluje ekspresję genów odpowiedzialnych za podtrzymanie procesu samoodnowy w mysich komórkach embrionalnych mES, w sposób zależny od fosforylacji. Wykazano, że ufosforylowane w pozycji seryny 824 (S824) białko TRIM28 tworzy kompleks z czynnikiem transkrypcyjnym Oct3/4 oraz czynnikami remodelującymi chromatynę, prowadząc do indukcji ekspresji genów zależnych takich jak Nanog czy Sox2 [81]. Białko TRIM28, wraz z kompleksem PRC1 (ang. *Polycomb Repressive Complexes 1*) jest odpowiedzialne za represję genów tkankowo-specyficznych w embrionalnych komórkach macierzystych. Wyciszenie jego ekspresji w mysich komórkach embrionalnych skutkuje natychmiastowym zróżnicowaniem komórek i utratą fenotypu macierzystego, co wiąże się z obniżeniem ekspresji genów związanych ze stanem pluripotencji [82]. Knock-out białka TRIM28 w mysich zarodkach jest letalny na wczesnym etapie rozwoju embrionalnego, co sugeruje jego istotną rolę w podtrzymaniu i regulacji stanu pluripotencji komórek macierzystych [83, 84].



Ryc. 4 Rola białka KAP1 w procesie negatywnej regulacji transkrypcji

Źródło: Opracowane na podstawie referencji [85]

2. CEL PRACY

Głównym celem niniejszej rozprawy była analiza roli białka TRIM28 w procesie samoodnowy ludzkich indukowanych komórek pluripotencyjnych.

Cele szczegółowe obejmowały:

1. Opracowanie innowacyjnego systemu reprogramowania ludzkich pierwotnych fibroblastów, z wykorzystaniem regulowanej ekspresji transgenów.
 - 1.1 Ocena fenotypowa otrzymanych komórek iPS.
 - 1.2 Ocena funkcjonalna otrzymanych komórek iPS.
2. Analiza roli białka TRIM28 w procesie samoodnowy ludzkich komórek iPS.
 - 2.1 Ocena wpływu wyciszenia *TRIM28* na ekspresję zewnątrzkomórkowych i wewnątrzkomórkowych markerów pluripotencji.
 - 2.2 Ocena wpływu wyciszenia *TRIM28* na ekspresję markerów różnicowania komórkowego.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1 Komercyjne linie komórkowe

Linia Hek293T

Linia komórkowa Hek293T (ATCC® CRL-3216™) to linia komórek pochodzących z nerki płodu ludzkiego (ang. *human embryonic kidney*). Komórki Hek293T hodowano na płytkach o średnicy 100 mm w warunkach hodowlanych: 37°C, 5% CO₂, 100% wilgotności, 21% O₂, w inkubatorze ThermoScientific Heracell CO₂. Komórki Hek293T pełniły funkcję linii pakującej wektorów lentiwirusowych.

Linia mysich embrionalnych fibroblastów (MEF)

Linia komórkowa pierwotnych mysich embrionalnych fibroblastów, służących jako komórki odżywcze w hodowli komórek macierzystych została zakupiona w firmie MerckMillipore (MerckMillipore, nr katalogowy:PMEF-CF). Linia ta pochodzi z 13 dniowych embrionów myszy szczepu C1. Aby wykorzystać komórki MEF jako komórki odżywcze ich podziały komórkowe zahamowano Mitomycyną C na pasażu trzecim. Komórki tej linii wysiewano na naczynia hodowlane opłaszczone roztworem Matrigelu (BD Bioscience, Growth Factor Reduced Matrigel™ Matrix), w rozcieńczeniu 1:50, w czystej pożywce EmbryoMax® DMEM/F12 (MerckMillipore) i hodowano w standardowych warunkach w inkubatorze ThermoScientific Heracell CO₂.

Linia hES BG01V

Linie ludzkich embrionalnych komórek macierzystych hES BG01V pozyskano z ATCC (ATCC® SCRC-2002™). BG01V to linia ludzkich embrionalnych komórek macierzystych z nieprawidłowym kariotypem 49, XXY, +12, +17, pochodzących z wewnętrznej masy komórkowej blastocysty. Komórki utrzymywano w hodowli w warunkach hipoksji: 5% O₂, 5% CO₂, 100% nasycenia parą wodną oraz w temperaturze 37°C, w medium hodowlanym opartym na pożywce DMEM:F12 suplementowanej 20% KSR (Gibco), 10 ng/ml βFGF (Gibco), 1% aminokwasami (MerckMillipore), 0.1 mM β-merkaptotanołem (MerckMillipore) oraz 50 U/ml penicyliny and 50 μg/ml streptomycyny (Sigma Aldrich). Linia komórkowa hES BG01V pełniła funkcję fenotypowej kontroli pozytywnej w przeprowadzonych badaniach.

3.2 Hodowla komórkowa

Wykorzystane w doświadczeniach linie komórkowe utrzymywane były w warunkach standardowych: w temperaturze 37°C, w atmosferze wzbogaconej 5% CO₂ i wilgotności około 100% w warunkach normoksji (21% O₂) w inkubatorze ThermoScientific Heracell CO₂ oraz w warunkach hipoksji (5% O₂) w inkubatorze Binder CB210 CO₂ (Binder). Podstawowe medium hodowlane stanowiła pożywka DMEM (ang. Dulbecco's Modified Eagle's Medium) z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej FBS (ang. *fetal bovine serum*) i antybiotyków – penicyliny o stężeniu końcowym 100 U/ml i streptomycyny o stężeniu końcowym 100 µg/ml (wszystkie odczynniki: SigmaAldrich).

Komórki pasażowano po osiągnięciu około 90% konfluencji poprzez odtrawienie 1% roztworem trypsyny (SigmaAldrich) po uprzednim zebraniu medium i odpłukaniu pozostałości pożywki buforem PBS (SigmaAldrich). Komórki macierzyste pasażowano po osiągnięciu około 80% konfluencji, 1% roztworem kolagenazy IV (Gibco).

3.2.1 Ustalenie linii pierwotnych ludzkich fibroblastów

Pierwotne ludzkie fibroblasty (ang. *Primary Human Dermal Fibroblasts*, PHDF) izolowano ze skóry od chorych po zabiegu mastektomii przeprowadzonym w Wielkopolskim Centrum Onkologii w Poznaniu. Każdorazowo uzyskano świadomą zgodę na wykorzystanie materiału biologicznego do badań naukowych.. Fragment skóry rozdrobiono przy użyciu skalpela i przeniesiono do 1 ml medium do izolacji (DMEM, 3 mg/ml kolagenazy IV, 1% penicyliny/streptomycyny) i inkubowano przez noc w temperaturze 37°C. Po inkubacji enzym inaktywowano poprzez dodanie 9 ml kompletnej pożywki hodowlanej (DMEM, 20% FBS, 1% penicyliny / streptomycyny) i przeniesiono na płytki Ø100 mm. Płytki inkubowano w standardowych warunkach hodowlanych (37°C, 5% CO₂) przez 72 godziny. Po inkubacji komórki przemyto roztworem PBS w celu usunięcia resztek tkanki i hodowano w standardowych warunkach, w pożywce z dodatkiem 20% FBS do osiągnięcia około 90% konfluencji. Po pierwszym pasażu komórki hodowano w pożywce suplementowanej 10% FBS i 1% roztworu penicyliny/streptomycyny. Wszystkie odczynniki wykorzystane w izolacji i hodowli pierwotnych fibroblastów pochodziły z firmy SigmaAldrich. Przeprowadzono izolację i mrożenie 30 linii fibroblastów, oznaczonych numerami 1-29 oraz X. Powyższy protokół jest rutynowo wykorzystywany w analizach prowadzonych w Zakładzie Immunologii Nowotworów

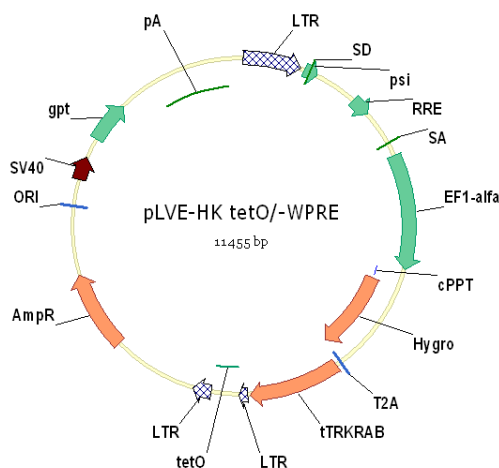
3.3 Metody wykorzystane w trakcie generacji i analizy ludzkich indukowanych komórek pluripotentnych

3.3.1 Przygotowanie wektorów lentiwirusowych

W celu przeprowadzenia procesu reprogramowania ludzkich pierwotnych fibroblastów PHDF w kierunku komórek iPS, przygotowano wektor lentiwirusowy Stemcca-tetO, umożliwiający stałą ekspresję czynników reprogramujących Oct3/4, Klf4, Sox2 i cMyc. W celu epigenetycznego wyciszenia ekspresji tych czynników po zakończonym procesie reprogramowania, przygotowano wektor lentiwirusowy LVE-HK, kodujący element tTRKRAB.

3.3.2 Plazmidy wykorzystywane do produkcji wektorów lentiwirusowych pLVE-HK

Wektor pLVE-HK jest wektorem wykorzystanym do epigenetycznej regulacji ekspresji transgenu z wektora Stemcca-tetO. Koduje element tTRKRAB oraz gen oporności na hygromycynę pod promotorem EF1 α , połączone sekwencją 2A, ulegającą samoistnemu cięciu (Ryc. 5). W celu uzyskania obniżonego poziomu ekspresji chimerycznego tTRKRAB, element WPRE wycięto z pLVE-HK plazmidu przy użyciu enzymów *SnaBI* / *SmaI*.

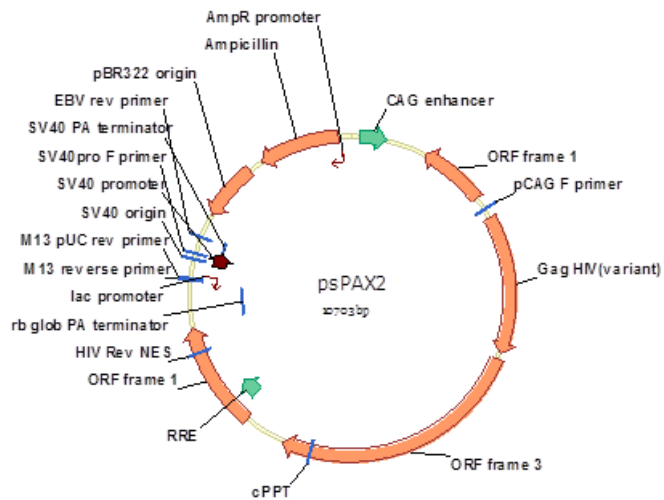


Ryc. 5 Mapa wektora plazmidowego pLVE-HK

Źródło: Vector NTI Advance® (Invitrogen)

psPAX2

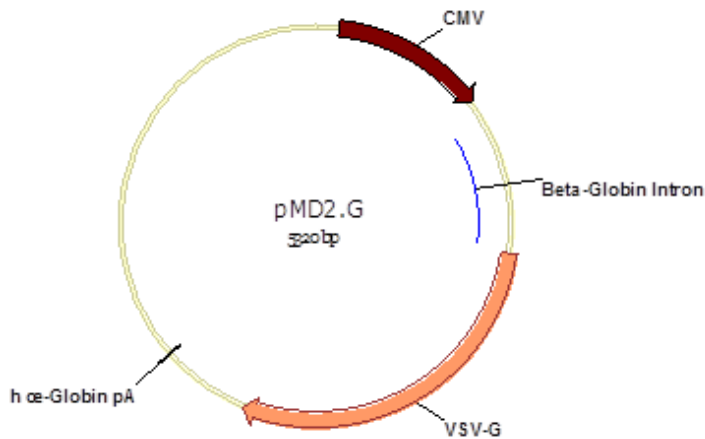
Wektor psPAX2 jest plazmidem pakującym kodującym gen polimerazy (*pol*) oraz gen wirusowych białek rdzenia (*gag*). Jako plazmid pakujący drugiej generacji, został pozbawiony wirusowych genów regulatorowych: *vpr*, *vif*, *vpu*, *nef* (Ryc. 6).



Ryc. 6 Mapa wektora plazmidowego psPAX2
Źródło: Vector NTI Advance® (Invitrogen)

pMD2.G

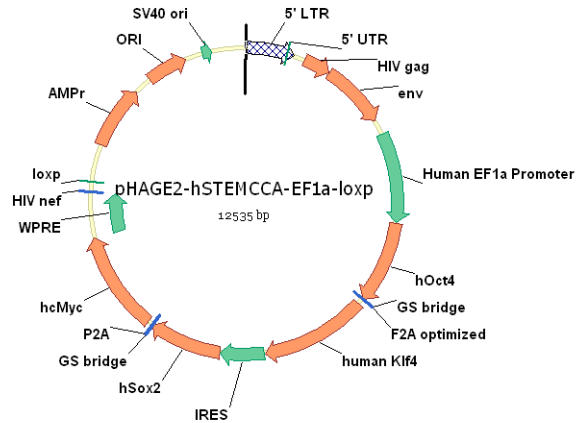
Wektor pMD2.G jest plazmidem kodującym geny otoczki lentiwirusa (Ryc. 7).



Ryc. 7 Mapa wektora plazmidowego pMD2.G
Źródło: Vector NTI Advance® (Invitrogen)

pHAGE2-hSTEMCCA-EF1α-loxp

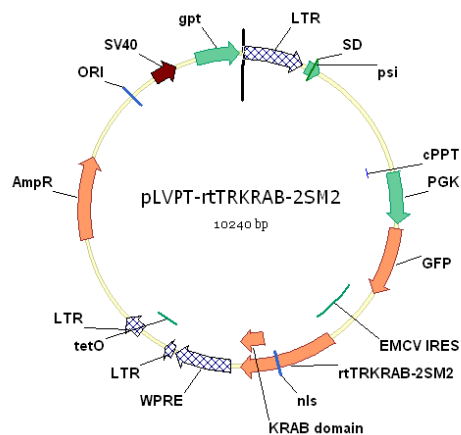
Wektor plazmidowy pHAGE2-hSTEMCCA-EF1α-loxp uzyskano dzięki uprzejmości profesora Gustavo Mostoslavsky'ego z Wydziału Medycyny Uniwersytetu w Bostonie (Boston University School of Medicine, Boston, USA). Plazmid pHAGE2-hSTEMCCA-EF1α-loxp zawiera cDNA kodujący cztery czynniki transkrypcyjne: Oct3/4, Sox2, Klf4 i c-Myc, pod kontrolą promotora ludzkiego EF-1α. Wektor ten został wykorzystany jako szkielet w konstrukcji wektora pStemcca-tetO (Ryc. 8).



Ryc. 8 Mapa wektora plazmidowego pHAGE2-hSTEMCCA-EF1 α -loxP
Źródło: Vector NTI Advance® (Invitrogen)

pLVPT-rtTRKRAB-2SM2

Plazmid pLVPT-rtTRKRAB-2SM2 wykorzystano jako źródło sekwencji WPRE i tetO w trakcie klonowania wektora pStemcca-tetO (Ryc. 9).



Ryc. 9 Mapa wektora plazmidowego pLVPT-rtTRKRAB-2SM2
Źródło: Vector NTI Advance® (Invitrogen)

pStemcca-tetO

Wektor plazmidowy pStemcca-tetO skonstruowano w celu produkcji wektora lentiwirusowego, umożliwiającego reprogramowanie komórek somatycznych w kierunku komórek iPS. Wektor ten zawiera 4 czynniki transkrypcyjne: Oct3/4, Klf4, Sox2 i c-Myc, pod kontrolą konstytutywnego promotora ludzkiego EF-1 α , ulegający ekspresji jako jeden multicystronowy transkrypt. Czynniki transkrypcyjne Oct3/4 i Klf4 rozdzielone są sekwencją F2A, natomiast Sox2 i c-Myc sekwencją E2A, które ulegają samoistnemu

przecięciu. Cistrony Oct3/4/Klf4 i Sox2/c-Myc łączy sekwencja IRES, która jest wewnętrznym miejscem wiązania rybosomu w trakcie translacji.

3.3.2.1 Konstrukcja wektora pStemcca-tetO

Wektor plazmidowy pStemcca-tetO przygotowano przez wklonowanie operatora tet (tetO) do wektora pHAGE2-hSTEMCCA-loxP. Wyjściowy plazmid pHAGE2-hSTEMCCA-loxP poddano trawieniu restrykcyjnym enzymami BsaBI i SspI, w celu przygotowania wektora do klonowania wstawki. Wstawka zawierająca fragment tetO i sekwencję wzmacniającą WPRE przygotowano przez trawienie wektora pLVPT-rtTRKRAB-2SM2 enzymami restrykcyjnymi *NruI* i *SspI*. Wstawkę wklonowano do wektora pHAGE2-hSTEMCCA-loxP. Tak przygotowanym wektorem pStemcca-tetO transformowano kompetentne komórki *E. coli* szczepu DH5 α (SigmaAldrich), w celu namnażania plazmidu. Szczegółowy opis metody oraz otrzymanych wyników został ujęty w pracy magisterskiej mgr Krzysztofa Wróblewskiego pt.: realizowanej w ramach programu WELCOME 2010-3/3.

3.3.2.2 Przygotowanie wektorów plazmidowych do produkcji wektorów lentiwirusowych

Plazmidy do produkcji wektorów lentiwirusowych namnożono w skali maxi, w 300 ml płynnej pożywki Luria Broth (LB) suplementowanej 50 ng/ml ampicyliny, przez noc, w temperaturze 37°C, z wytrząsaniem. Plazmidowe DNA wyizolowano komercyjnym zestawem odczynników JetStar 2.0 Plasmid Purification Kit (Genomed GmbH, Niemcy) według zaleceń producenta. Metoda izolacji oparta jest w początkowym etapie na lizie alkalicznej. Komórki poddawane są lizie w buforze zasadowym, następnie zawiesina jest neutralizowana i przenoszona na kolumny grawitacyjne ze złożem anionowymiennym, które wiąże plazmidowe DNA. W trakcie płukania złoża pozostałości RNA i inne zanieczyszczenia są wypłukiwane. Następnie oczyszczone DNA jest eluowane ze złoża i wytracane 100% izopropanolem. Po rozpuszczeniu strąconego plazmidowego DNA w sterylnej wodzie, dokonano pomiaru stężenia przy użyciu aparatu NanoDrop2000 (Thermo Scientific), przy długości fali 260 nm. Powyższy protokół jest rutynowo wykorzystywany w analizach prowadzonych w Zakładzie Immunologii Nowotworów

3.3.2.3 Produkcja wektorów lentiwirusowych

Wektory lentiwirusowe wyprodukowano przez przejściową transfekcję komórek Hek293T przy użyciu systemu pakującego drugiej generacji. 20 μ g plazmidu

transferowego (z kasetą ekspresyjną wektora lentiwirusowego pStemcca-tetO lub pLVE-HK), 15 µg plazmidu pakującego psPAX2 i 6 µg plazmidu kodującego białka otoczki wirusów pMD2.G wymieszano z 50 µl 2,5 M CaCl₂ (SigmaAldrich) i H₂O (do 500 µl objętości). Następnie mieszaninę podawano kroplami do 500 µl buforu 2x HBS (SigmaAldrich), jednocześnie napowietrzając przy użyciu pipety Pasteura. Mieszaninę transfekcyjną w objętości 1 ml inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej i nakropiono na 2,5 mln komórek Hek293T, wysianych na płytce 100 mm w kompletnej pożywce hodowlanej (DMEM, 10% FBS, 1% penicyliny/streptomycyny). Komórki inkubowano przez 6 godzin w standardowych warunkach hodowlanych. Po inkubacji wymieniono pożywkę na 6 ml świeżej, standardowej pożywki hodowlanej. Supernatant z nad komórek, zawierający cząsteczki wirusa, zebrano 48 godzin po transfekcji. Wektory lentiwirusowe zagęszczono poprzez ultrawierowanie z prędkością 26000 obrotów/minutę przez 1,5 godziny w temperaturze 4°C na warstwie 20% roztworu sacharozy. Warstwa sacharozy umożliwiła oczyszczenie zagęszczanych wektorów lentiwirusowych. Supernatant zlano a osad zawieszono w buforze PBS z 2% BSA (SigmaAldrich) i zamrożono w -80°C. Powyższy protokół jest rutynowo wykorzystywany w analizach prowadzonych w Zakładzie Immunologii Nowotworów

3.3.2.4 Oznaczanie miana wektorów lentiwirusowych

Miano otrzymanego wektora zostało obliczone w oparciu o analizę aktywności wirusowej odwrotnej transkryptazy (RT-Assay) w reakcji odwrotnej transkrypcji *in vitro*, wykorzystującej jako matrycę krótki fragment poliadeninowy. Szczegółowy protokół opisano w publikacji Sears et al. [86]. Średnie miano otrzymanych wektorów lentiwirusowych osiągało średnio 1×10^8 jednostek infekcyjnych/ml.

3.3.3 Reprogramowanie komórek fibroblastów w kierunku komórek iPS

10 tysięcy komórek PHDF na wczesnym pasażu (2-3) wysiano na dołek płytki 6-dołkowej w kompletnym medium hodowlanym. Po 24 godzinach na komórki został podany wektor lentiwirusowy Stemcca-tetO, w stężeniu 50 jednostek infekcyjnych/ml (ang. *Multiplicity of Infection*, MOI). Transdukcję prowadzono w 1ml pożywki hodowlanej, w obecności 5 µg/ml polibrenu (SigmaAldrich), przez noc, w standardowych warunkach hodowlanych. Po inkubacji komórki przemyto roztworem PBS i powtórzono transdukcję według schematu z dnia poprzedniego. Następnego dnia komórki przemyto trzy razy roztworem PBS i hodowano w 3 ml kompletnej pożywki hodowlanej przez sześć

dni, aż do osiągnięcia około 90% konfluencji. W tym czasie przygotowano płytki 6-dołkowe opłaszczone roztworem Matrigel w stężeniu 1:50 (Matrigel:DMEM F-12) oraz inaktywowanymi komórkami MEF, w konfluencji około 50%. 7 dnia po transdukcji wektorem reprogramującym, komórki PHDF zostały przesiane na przygotowane uprzednio płytki 6-dołkowe, w liczbie około 20-30 tysięcy na płytkę. Komórki hodowano w pożywce do komórek iPS (DMEM F-12, 20% Knockout Serum Replacement, 1x NEAA, 1x β -merkaptopetanol, 0,5% penicyliny/streptomycyny i 10 ng/ml FGF) w warunkach hipoksji (37°C, 5% CO₂, 5% O₂). Pożywkę wymieniano co drugi dzień. Morfologię komórek obserwowano codziennie metodami mikroskopowymi. 21 dni po transdukcji, skupiska komórek o morfologii zbliżonej do komórek macierzystych zostały manualnie przeniesione przy pomocy sterylnej końcówki i pipety P200, na świeżo przygotowane dołki płytek 6-dołkowych opłaszczone roztworem Matrigelu i komórek odżywczych o konfluencji 100%. Od tego momentu hodowli pożywkę do komórek iPS zmieniano codziennie. Gdy osiągnęły 70% konfluencji komórki pasażowano. W tym celu usunięto pożywkę, komórki przemyto buforem PBS i podano 1ml/dołek roztworu kolagenazy IV (0,1% w DMEM F-12) i inkubowano przez 2-5 minut w temperaturze 37°C. Następnie roztwór enzymu usunięto, komórki delikatnie przemyto buforem PBS i podano 2 ml pożywki iPS na dołek. Kolonie komórek iPS zdrapano z powierzchni hodowlanej przy pomocy sterylnej pipety Pasteura i przeniesiono na nową płytkę hodowlaną. Po około 2 pasażach, komórki iPS poddano transdukcji wektorem lentiwirusowym LVE-HK, w stężeniu 10 jednostek infekcyjnych/ml w celu wyciszenia ekspresji egzogennych czynników reprogramujących. Komórki transdukowano w zawieszynie, w obecności 5 μ g/ml polibrenu przez 1 godzinę w temperaturze 37°C, a następnie wysiano na płytki pokryte roztworem Matrigelu i inaktywowanych komórek MEF. Po 5 dniach komórki poddano selekcji w pożywce iPS z dodatkiem 10 μ g/ml hygromycyny B przez kolejne 5 dni. Reprezentatywne linie (po 2 od 4 dawców fibroblastów) zostały poddane charakterystyce molekularnej, fenotypowej i funkcjonalnej.

3.3.4 Analiza kariotypu komórek iPS

Analiza kariotypu otrzymanych linii iPS zostały wykonane w Pracowni Cytogenetyki Centrum Onkologii im. Marii Skłodowskiej – Curie w Warszawie. Komórki iPS inkubowano w roztworze kolchicyny, w celu zatrzymania podziałów komórkowych na etapie metafazy. Następnie komórki inkubowano w roztworze hipotonicznym, umożliwiającym spęcznienie komórek i utrwalono w mieszaninie metanolu, i kwasu

octowego (3:1). Chromosomy metafazalne wytrawiono częściowo trypsyną, w celu usunięcia białek histonowych i zabarwiono odczynnikiem Giemsa, w celu uzyskania wzoru prążków G. Tak uzyskane preparaty poddano analizie mikroskopowej. Z każdej analizowanej linii oceniono minimum 20 metafaz, pod kątem liczby i morfologii chromosomów.

3.3.5 Barwienia immunofluorescencyjne

Tab. 1 Przeciwciała pierwszo- i drugorzędowe wykorzystywane w analizach opartych na barwieniach immunofluorescencyjnych

MARKERY PLURIPOTENCJI				
Nazwa	Gospodarz	Stężenie	Producent	Numer katalogowy
OCT3/4	królik	1:100	MerckMillipore	AB3209
NANOG	królik	1:100	Cell Signalling	#4903
TRA 1-60	mysz	1:100	MerckMillipore	MAB4360
TRA 1-81	mysz	1:100	ThermoScientific	MA1-16910
SSEA4	mysz	1:100	MerckMillipore	CS204438
MARKERY KOMÓREK ZRÓŻNICOWANYCH				
Nazwa	Gospodarz	Stężenie	Producent	Numer katalogowy
SSEA1	mysz	1:100	R&D	MAB2155
α-Smooth Muscle Actin	mysz	1:100	MerckMillipore	MAB1522
FOXA2	królik	1:100	MerckMillipore	AB4125
PAX6	królik	1:1000	Abcam	ab5790
INNE				
TRIM28	mysz	1:1000	CellSignalling	#5868
H3K9me3	mysz	1:1000	CellSignalling	#5327
PRZECIWCIAŁA II-GO RZĘDOWE				
Nazwa	Gospodarz	Stężenie	Producent	Numer katalogowy
Anty-mysie skoniugowane z Alexa Fluor 488	osioł	1:500	Jackson Immunoresearch	715-546-150
Anty-mysie skoniugowane z Alexa Fluor 594	osioł	1:500	Jackson Immunoresearch	715-546-151
Anty-królicze skoniugowane z Alexa Fluor r 488	osioł	1:500	Jackson Immunoresearch	711-546-152
Anty-królicze skoniugowane z Alexa Fluor 594	osioł	1:500	Jackson Immunoresearch	711-586-152

W celu wykonania barwień immunofluorescencyjnych komórki przemyto buforem PBS a następnie utrwalane przy użyciu 100% metanolu przez 20 minut w temperaturze -20°C (dla markerów wewnątrzkomórkowych) lub 4% roztworem formaliny, przez 20 minut, w temperaturze pokojowej (dla markerów zewnątrzkomórkowych). Po utrwaleniu komórki przemyto 3-krotnie buforem PBS i inkubowano przez 1 godzinę w buforze PBS z 1% BSA w temperaturze pokojowej, w celu zablokowania możliwości niespecyficznego wiązania przeciwciał. Po inkubacji powtórzono płukanie buforem PBS i inkubowano komórki przez noc w 4°C w roztworze przeciwciała I-rzędowego w PBS z 1% BSA. Po inkubacji powtórzono 3-krotne płukanie buforem PBS i inkubowano komórki przez 1 godzinę w 37°C w roztworze odpowiedniego przeciwciała II-rzędowego sprzężonego z barwnikiem fluorescencyjnym w PBS z 1% BSA. Następnie komórki przepłukano 3-krotnie buforem PBS. W celu wybarwienia jąder komórkowych, komórki inkubowano przez 5 minut w ciemności w 0,00001% roztworze DAPI w H₂O (SigmaAldrich). Po odpłukaniu roztworu DAPI wynik barwień oceniano pod mikroskopem fluorescencyjnym (Leica). Przeciwciała wykorzystane w analizie immunofluorescencyjnej przedstawiono w tabeli (Tab.1). Powyższy protokół jest rutynowo wykorzystywany w analizach prowadzonych w Zakładzie Immunologii Nowotworów

3.3.6 Izolacja RNA komórkowego

Izolację całkowitego RNA komórkowego przeprowadzono przy użyciu odczynnika TRI Reagent (SigmaAldrich), według protokołu producenta. Izolacja całkowitego RNA opiera się na zmodyfikowanej metodzie Chomczyńskiego i Sacchi [87]. Analizowane komórki poddano lizie 1 ml odczynnika TRI Reagent. Następnie dodano 200 µl chloroformu. Próby intensywnie mieszano i inkubowano 10 minut do rozdzielenia faz. Po inkubacji próby wirowano 15 minut, 4°C, 12000×g. Do dalszej izolacji fazę wodną zawierającą RNA przeniesiono do nowych probówek. RNA wytrącono poprzez dodanie izopropanolu według proporcji 1:1+50 µl. Próby wymieszano i inkubowano w temperaturze 4°C przez godzinę. Wytrącone RNA wirowano przez 15 minut w temperaturze 4°C przy 12000 obrotów/minutę. Supernatant usunięto a osad przemyto 1 ml zimnego 75% etanolu i wirowano w temperaturze 4°C przez 10 minut przy prędkości 7000 obrotów/minutę. Osad RNA wysuszono a następnie rozpuszczono w odpowiedniej objętości H₂O_{DEPC} i dokonano pomiaru jego stężenia na spektrofotometrze NanoDrop2000 (Thermo Scientific), przy długości fali 260 nm. Powyższy protokół jest rutynowo wykorzystywany w analizach prowadzonych w Zakładzie Immunologii Nowotworów

3.3.7 Analiza jakości całkowitego RNA komórkowego.

Analizę jakości wyizolowanego RNA przeprowadzono za pomocą aparatu BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies, Inc.) oraz zestawu Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Inc.) zgodnie z zaleceniami producenta. Metoda wykorzystuje rozdział elektroforetyczny RNA na mikrochipie, w trakcie którego następuje detekcja fluorescencji wzbudzonej laserowo. Oprogramowanie umożliwia obserwację próby RNA w postaci elektroforegramu oraz standardowego obrazu rozdziału elektroforetycznego na żelu. Jakość wyizolowanego RNA oceniono za pomocą parametru RIN (ang. *RNA Integrity Number*), który klasyfikuje próby w skali od 1 (RNA zdegradowane) do 10 (brak degradacji i zanieczyszczeń RNA).

3.3.8 Przygotowanie cDNA i analiza RT-PCR

Tab. 2 Sekwencje starterów wykorzystanych w analizie RT-PCR

Gen	Starter forward (5'-3')	Starter reverse (5'-3')	Wielkość produktu
OCT3/4 (POU5F1)	GACAGGGGGAGGGGAGGAG CTAGG	CTTCCCTCCAACCAGTTGCC CCAAAC	144 pz
NANOG	CAGCCCCGATTCTTCCACCA GTCCC	CGGAAGATTCCCAGTCGGGT TCACC	391 pz
ZFP42 (REX1)	CAGATCCTAACAGCTCGCA GAAT	GCGTACGCAAATTAAGTCC AGA	306 pz
DNMT3B	TGCTGCTCACAGGGCCCGAT ACTTC	TCCTTTCGAGCTCAGTGCAC CACAAAAC	242 pz
GABRB3	CCTTGCCCAAATCCCCTAT GTCAAAGC	GTATCGCCAATGCCGCTGA GACCTC	277 pz
NODAL	GGGCAAGAGGCACCGTCGA CATCA	GGGACTCGGTGGGGCTGGT AACGTTTC	234 pz
GAPDH	AGCCACATCGCTCAGACAC	GCCCAATACGACCAAATCC	90 pz
Transgen	TGGGAGCCCTCACTTAC	AACGCGAACGTGGAGAAAG	250 pz

Całkowity RNA przepisywano na komplementarny DNA (cDNA) w reakcji odwrotnej transkrypcji przy pomocy zestawu iScript™ cDNA Synthesis Kit (BioRad), według protokołu producenta. Reakcja zależna jest od zmodyfikowanej odwrotnej transkryptazy wirusa mysiej białaczki Maloneya (MMLV, *Maloney Murine Leukemia Virus*). Do reakcji użyto 1 µg całkowitego RNA komórkowego, który wymieszano z 4 µl 5x stężonego buforu iScript™ Reaction Mix (BioRad), zawierającym zoptymalizowane stężenie heksametrów oraz oligo(dt) a także inhibitor RNazy. Do mieszaniny dodano

następnie 1 μ l odwrotnej transkryptazy oraz wodę do objętości 20 μ l. Próby inkubowano według następującego profilu temperaturowego:

- 5 minut, 25°C – przyłączanie heksametrów i oligo(dt)
- 30 minut, 42°C – synteza cDNA
- 5 minut, 85°C – inaktywacja odwrotnej transkryptazy

Otrzymane cDNA rozcieńczano 10-krotnie. Reakcje PCR przeprowadzono przy użyciu zestawu ReadyMix™ Taq PCR Reaction Mix (SigmaAldrich) według zaleceń producenta. Do reakcji wykorzystano 2 μ l matrycy cDNA oraz 0,5 μ M mieszaninę starterów specyficznych dla analizowanych genów. Sekwencje starterów dla analizowanych genów związanych z pluripotencją komórek, genu referencyjnego *GAPDH* oraz starterów wykrywających ekspresję zintegrowanego transgenu przedstawiono w tabeli (Tab. 2). Powyższy protokół jest rutynowo wykorzystywany w analizach prowadzonych w Zakładzie Immunologii Nowotworów

3.3.9 Globalne sekwencjonowanie transkryptomowe (RNA-seq) i analiza statystyczna otrzymanych wyników

Próby RNA z 8 linii ludzkich komórek iPS, linii hES i 4 linii fibroblastów, które spełniały kryteria jakości ($RIN \geq 9$ w 10-cio stopniowej skali) zostały poddane globalnemu sekwencjonowaniu transkryptomowemu w *Institute for Applied Cancer Science, UT MD Anderson Cancer Center*, Houston, USA. Sekwencjonowanie RNA przeprowadzono według standardowego protokołu dla platformy Illumina. Do konstrukcji biblioteki wykorzystano 1 μ g mRNA. Analizę jakości otrzymanych odczytów przeprowadzono przy użyciu pakietów FASTQC i RNA Se-QC. Otrzymane surowe dane (ang. *raw counts*) zostały przyrównane do genomu referencyjnego Human Genom GRCh37, przy użyciu programu Bowtie2. Surowe wartości ekspresji (ang. *raw expression counts*) wygenerowano z wykorzystaniem pakietu easyRNA-Seq programu Bioconductor i anotacji ENSEMBL, a otrzymane wyniki poddano normalizacji. Analiza różnicowa ekspresji (ang. *Differential Expression*,) została przeprowadzona przy użyciu pakietu edgeR programu Bioconductor. Próby mające to samo pochodzenie (linie komórek iPS, hES *versus* fibroblasty) zostały pogrupowane w trakcie analiz statystycznych. Geny, których krotność zmiany (ang. *fold change*) poziomu ekspresji pomiędzy dwoma grupami linii komórkowych wynosiła co najmniej 1,3 a współczynnik FDR (ang. *False Discovery Rate*) był poniżej 1% ($FDR < 1\%$) zostały uznane za ulegające istotnej różnicowej ekspresji.

3.3.10 Ilościowa reakcja RT-PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR)

Tab. 3 Startery i pasujące sondy UPL wykorzystane w analizie ilościowego RT-PCR w czasie rzeczywistym. Pz – pary zasad.

Nazwa	Sonda UPL	Wielkość amplikonu	Sekwencja (5' → 3')
Transgen	#32	250 pz	F: TGGGAGCCCTCACTTCAC
			R: AACGCGAACGTGGAGAAAG
TRIM28	#7	74 pz	F: CAGCTGGCTACCGACTCC
			R: GCACGGATCAGGGTCAGA
OCT3/4	#60	114 pz	F: TTCGCAAGCCCTCATTTTC
			R: CCATCACCTCCACCACCT
SOX2	#35	75 pz	F: GCTGCCTCTTTAAGACTAGGAC
			R: CCTGGGGCTCAAACCTTCTCT
NANOG	#85	127 pz	F: AGATGCCTCACACGGAGACT
			R: TTTGCGACACTCTTCTCTGC
MSX1	#7	128 pz	F: CTCGTCAAAGCCGAGAGC
			R: CGGTTTCGTCTTGTGTTTGC
SOX1	#37	67 pz	F: ACCAGGCCATGGATGAAG
			R: CTTAATTGCTGGGGAATTGG
FSP1	#56	126 pz	F: TCAGAACTAAAGGAGCTGCTGA
			R: TTGGAAGTCCACCTCGTTGT
CDX2	#6	76 pz	F: CCCACAGCCATAGACCTACAG
			R: CCCCAAATCCCACTTGTCT
PAX6	#31	61 pz	F: TGCTCCGGCATGAAATATACTA
			R: GTCTCCAAATGTGCAGCAAC
GAPDH	#60	115 pz	F: GCTCTCTGCTCCTCCTGTTC
			R: ACGACCAAATCCGTTGACTC

Do reakcji RT-qPCR w czasie rzeczywistym wykorzystano 2 µl matrycy cDNA otrzymanej w reakcji odwrotnej transkrypcji. Reakcję przeprowadzono na płytkach 96-dołkowych w aparacie LightCycler®480 (Roche) z użyciem zestawu LightCycler®480 Probes Master set (Roche), sondy UPL (Universal Probe Library, Roche) oraz pary specyficznych dla badanego genu starterów dopasowanych do sekwencji użytej sondy. Użycie sond hydrolizujących, znakowanych na końcach fluorescencyjnie, umiejscowionych pomiędzy parą starterów, umożliwia wysoce specyficzną detekcję ilości powstającego produktu. Na końcu 5' sondy znajduje się barwnik reporterowy, a na końcu 3' cząsteczka wygaszająca fluorescencję. Kiedy sonda jest nienaruszona, wygaszacz znajdujący się blisko reportera, wygasza jego fluorescencję. Podczas reakcji PCR sonda zostaje zdegradowana dzięki aktywności 5' nukleazowej polimerazy. Rozdział obu fluorochromów umożliwia emisję fluorescencji przez reporter. Wzrost fluorescencji

monitorowany jest po każdym zakończonym cyklu elongacyjnym. Poziom fluorescencji jest wprost proporcjonalny do ilości powstającego produktu. Wykorzystane pary starterów i sond zebrano w tabeli (Tab.3). Powyższy protokół jest rutynowo wykorzystywany w analizach prowadzonych w Zakładzie Immunologii Nowotworów

3.3.11 Analiza potencjału różnicowania komórek *in vitro*

3.3.11.1 Test formowania ciał embrionalnych

Analizowane komórki iPS odklejono przy pomocy odczynnika Accumax (MerckMillipore) i rozbito do pojedynczych komórek poprzez pipetowanie. Komórki wirowano przez 5 minut z prędkością 1000 obrotów/minutę a następnie zawieszono w medium do hodowli iPS bez suplementacji β FGF. Komórki w ilości jednego tysiąca komórek na dołek wysiano na płytki hodowlane 96-dołkowe, okrągło-denne, przeznaczone do hodowli zawiesinowych. Medium hodowlane zmieniano co dwa dni, do czasu zaobserwowania agregacji komórek iPS. 9 dnia przeniesiono agregaty komórek z hodowli zawiesinowej na płytki hodowlane 48-dołkowe, opłaszczone roztworem Matrigelu w proporcjach 1:50 (Matrigel:DMEM F-12). Hodowlę prowadzono przez kolejnych 7 dni. Następnie, komórki poddano analizie opartej na barwieniach immunofluorescencyjnych zgodnie z opisanym wcześniej protokołem. Powyższy protokół jest rutynowo wykorzystywany w analizach prowadzonych w Zakładzie Immunologii Nowotworów

3.3.12 Analiza potencjału różnicowanie komórek *in vivo*

3.3.12.1 Zwierzęta laboratoryjne

W badaniach *in vivo* wykorzystywano 10 tygodniowe samice atymicznych myszy nagich typu *nude* (szcep Crl:NU(NCr)-Foxn1^{nu}; AnimaLab, Polska). Szcep ten charakteryzuje się dysfunkcją układu immunologicznego wynikającą z braku grasicy, co skutkuje brakiem dojrzałych limfocytów T. Zwierzęta utrzymywano w pomieszczeniach zwierzętarni Instytutu Genetyki Człowieka, Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu w klatkach wyposażonych w filtry HEPA oraz wewnętrzny obieg powietrza. Myszom zapewniono 12-godzinny cykl dzień/noc oraz nieograniczony dostęp do wody i pożywienia. Temperatura w pomieszczeniach hodowlanych była automatycznie regulowana. Wszystkie doświadczenia przeprowadzono zgodnie z wytycznymi i za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego im. A. Ciszkowskiego w Poznaniu.

3.3.12.2 Test formowania potworniaków

Dwa miliony komórek iPS odtrawionych 0,1% roztworem kolagenazy IV, przemyto roztworem PBS, wirowano 5 minut z prędkością 1000 obrotów/minutę i zawieszono w 50 µl kompletnej pożywki hodowlanej do komórek iPS. Do zawiesiny komórkowej na lodzie dodano 50 µl stężonego Matrigelu a następnie całość podano podskórnie, w okolicy pachwiny, atymicznym myszom *nude*. Po 7-9 tygodniach myszy poddano eutanazji poprzez dyslokację kręgów szyjnych, a guzy pobrano do analiz. Z guzów izolowano RNA oraz poddano je ocenie histopatologicznej. Fragment guza przeznaczony na izolację RNA zamrożono w ciekłym azocie, a następnie rozdrobniono w sterylnym moździerzu i zalano 1 ml odczynnika TRI Reagent (SigmaAldrich). Dalszą izolację przeprowadzono według standardowego protokołu. Pozostałą część guza utrwalono w 4% roztworze formaliny. Analiza histopatologiczna przeprowadzona została w Zakładzie Patomorfologii Nowotworów Wielkopolskiego Centrum Onkologii w Poznaniu. Utrwalone w roztworze formaliny fragmenty guza zostały zatopione w parafinie, a następnie pocięte na skrawki o grubości 8-10 µm. Otrzymane preparaty zostały poddane barwieniom z użyciem hematoksyliny i eozyny oraz barwieniom immunohistochemicznym z użyciem przeciwciał specyficznym wykrywających trzy listki zarodkowe: ektoderme (GFAP), mezoderme (desmina) i endoderme (cytokeratyna). Powyższy protokół jest rutynowo wykorzystywany w analizach prowadzonych w Zakładzie Immunologii Nowotworów

3.4 Analiza roli TRIM28 w podtrzymaniu procesu samoodnowy ludzkich komórek macierzystych

3.4.1 Wybór modelu badawczego

Jako model badawczy do analizy roli TRIM28 w procesie samoodnowy komórek macierzystych wybrano linie komórek iPS, otrzymanych w pierwszym etapie badań. Analizy przeprowadzono także w linii kontrolnej hES BG01V. Eksperymenty przeprowadzono ogółem w 5 liniach komórek iPS, pochodzących od różnych dawców fibroblastów oraz linii hES BG01V, w dwukrotnym powtórzeniu. Wyniki zebrane w niniejszej rozprawie są wynikami reprezentatywnymi z linii iPS 26.6 oraz hES BG01V.

3.4.2 Reagenty interferencji RNA

Jako metodę wyciszania ekspresji *TRIM28* w wybranych liniach komórkowych wybrano metodę interferencji RNA opartą na cząsteczkach krótkich interferujących RNA

(ang. *short interfering RNA*, siRNA). W celu zapewnienia jak najwyższego poziomu wyciszenia analizowanego genu, zdecydowano się wykorzystać dwie cząsteczki siRNA, których regiony docelowe zlokalizowane są w różnych częściach mRNA *TRIM28*. W tym celu zaprojektowano cząsteczkę siRNA, opartą na sekwencji przetestowanej w pracowni spinki shRNA (ang. *short hairpin RNA*), której region docelowy zlokalizowany jest w egzonie 3 *TRIM28* (dalej określana jako siRNA_TRIM28). Drugą wybraną cząsteczką siRNA było komercyjne siRNA o zwalidowanej skuteczności wyciszenia, z firmy SigmaAldrich (dalej określana jako siRNA_validated), której region docelowy zlokalizowany jest w egzonie 15 genu *TRIM28*. Sekwencję obu wykorzystanych reagentów interferencji RNA przedstawia w tabeli (Tab.3).

Jako kontrolę lipofekcji wykorzystano w badaniach nie posiadające sekwencji docelowej w ludzkim transkryptomie siRNA BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo (Invitrogen).

Tab. 4 Sekwencje siRNA swoistego dla genu TRIM28, wykorzystanych w przeprowadzonych badaniach

siRNA	Sekwencja nici sensownej	Sekwencja nici antysensownej
siRNA_TRIM28	CGACUAGCUGUGAGGAUAATT	UUAUCCUCACAGCUAGUGCTT
siRNA_validated	CGUGUACUGCUGGCCCUAUTT	AUAGGGCCAGCAGUACACGTT

3.4.3 Optymalizacja warunków transfekcji reagentami interferencji RNA

Jako metodę wprowadzania reagentów interferencji RNA do linii ludzkich komórek iPS, wykorzystano lipofekcję odczynnikami Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen). W celu uzyskania wysokiego poziomu wyciszenia genu *TRIM28* w badanych komórkach przeprowadzono optymalizację stężenia używanych reagentów interferencji RNA. Mieszaninę opisanych powyżej siRNA_TRIM28 oraz siRNA_validated podano na komórki iPS w dwóch równomolowych stężeniach: 20 nM i 50 nM. Poziom wyciszenia ekspresji *TRIM28* analizowano po 24, 48 i 72 godzinach po transfekcji, na poziomie transkryptu metodą ilościowego RT-PCR w czasie rzeczywistym. Wyniki normalizowano do poziomu ekspresji genu referencyjnego *GAPDH*.

3.4.4 Wyciszenie ekspresji TRIM28 w liniach komórek iPS

W celu wyciszenia ekspresji *TRIM28* zastosowano przejściową transfekcję reagentami interferencji RNA. Zastosowano równomolową (50nM) mieszaninę dwóch siRNA, która umożliwiała uzyskanie wyciszenia docelowego genu przez 72 godziny, na poziomie 80-90%. Przeprowadzono lipofekcję komórek linii iPS i hES, według

zoptymalizowanego wcześniej protokołu. Mieszaniny transfekcyjną A i B przygotowano w medium Opti-MEM® Reduced Serum Medium (Gibco). Następnie kroplami przeniesiono mieszaninę A do B, delikatnie wymieszano i inkubowano 20 minut w temperaturze pokojowej. Po inkubacji nakropiono mieszaninę transfekcyjną na naczynia hodowlane z komórkami iPS, w kompletnym medium hodowlanym i pozostawiono przez 24 godziny, do czasu następnej zmiany medium. Transfekcję linii iPS i hES przeprowadzano co 72 godziny, przez 21 dni. Analizy poziomu ekspresji TRIM28 w badanych komórkach prowadzono w trzech punktach czasowych, co 7 dni, metodą ilościowego RT-PCR oraz barwień immunofluorescencyjnych. Ilościowy skład mieszaniny transfekcyjnej dla poszczególnych wielkości naczyń hodowlanych przedstawiono w tabeli (Tab.4).

Tab. 5 Ilościowy skład mieszaniny transfekcyjnej w zależności od rodzaju naczynia hodowlanego

	Płytki 48-dolkowa	Płytki 6-dolkowa	Płytki 60mm	Płytki 100mm
Objętość medium hodowlanego	200 µl	2 ml	3 ml	6ml
Mieszanina A	50 nM siRNA w 25 µl medium OPTIMEM	50 nM siRNA w 170 µl medium OPTIMEM	50 nM siRNA w 250 µl medium OPTIMEM	50 nM siRNA w 500 µl medium OPTIMEM
Mieszanina B	0,9 µl RNAimax w 25 µl medium OPTIMEM	3,4 µl RNAimax w 170 µl medium OPTIMEM	8 µl RNAimax w 250 µl medium OPTIMEM	16 µl RNAimax w 500 µl medium OPTIMEM

3.4.5 Analiza cyklu komórkowego oraz procesu apoptozy

Komórki przeznaczone do analizy peletowano przez wirowanie 10 minut z prędkością 1000 obrotów na minutę, w temperaturze pokojowej. Supernatant usuwano, a komórki zawieszano w 1 ml roztworu PBS. Zawiesinę komórek przenoszono do probówek typu Eppendorf i wirowano 10 minut z prędkością 3000 obrotów na minutę w temperaturze pokojowej. Supernatant ponownie usuwano. Do osadu komórek dodawano kroplami 70% roztwór etanolu i jednocześnie mieszano próbkę na mieszadle typu Vortex. Przed przystąpieniem do właściwej oceny cytometrycznej próby wirowano 10 minut z prędkością 3000 obrotów na minutę, w temperaturze pokojowej. Następnie supernatant usuwano, a do osadu komórek dodawano 1 ml roztworu PBS i ponownie wirowano w takich samych warunkach. Następnie do osadu komórek dodawano po 200 µl mieszaniny, w skład której wchodziło: 40 µl jodku propidyny o stężeniu 250 µg/ml użytego jako fluorochromu interkalującego w strukturę DNA, 20 µl enzymu RNAzy

o stężeniu 500 µg/ml (w celu eliminacji sygnału emitowanego przez RNA) oraz 140 µl roztworu PBS. Następnie próbki mieszano na mieszadle typu Vortex, po czym inkubowano próby w 37°C przez 30 minut chroniąc przed światłem. Po inkubacji, zawiesiny komórek przenoszono do probówek cytometrycznych. Pomiaru fluorescencji dokonywano przy długości fali 611 nm przy użyciu aparatu BD Biosciences FACS Aria™.

Proces apoptozy w komórkach iPS i hES analizowano wykorzystując komercyjny zestaw Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Pharmingen), według zaleceń producenta. Analizy cytometryczne przeprowadzono na cytometrze przepływowym firmy Becton Dickinson (BD Biosciences FACS Aria™). Powyższy protokół jest rutynowo wykorzystywany w analizach prowadzonych w Zakładzie Immunologii Nowotworów

3.4.6 Analiza cytometryczne (FACS) poziomu ekspresji markerów pluripotencji

Tab. 6 Przeciwciała pierwszo- i drugorzędowe wykorzystywane w analizie opartej na technice cytometrii przepływowej.

PRZECIWCIAŁA I-RZĘDOWE				
Nazwa	Gospodarz	Stężenie	Producent	Numer katalogowy
TRA 1-60	Mysz IgM	1:100	eBioscience	14-8863-82
TRA 1-81	Mysz IgM	1:100	eBioscience	14-8883-82
SSEA4	Mysz IgG	1:100	eBioscience	14-8843-80
PRZECIWCIAŁA II-GO RZĘDOWE				
Nazwa	Gospodarz	Stężenie	Producent	Numer katalogowy
Anty-mysie IgG skoniugowane z biotyną	szczur	1:200	eBioscience	715-546-150
Anty-mysie IgM skoniugowane z biotyną	szczur	1:200	eBioscience	715-546-151
Sterptawidyna skoniugowana z APC	nie dotyczy	1:500	eBioscience	17-4317-82

W celu oceny fenotypu komórek iPS wykonano analizę opartą na wieloparametrycznej cytometrii przepływowej. Aby ocenić poziom ekspresji zewnątrzkomórkowych markerów związanych z pluripotencją komórki iPS pasażowano za pomocą odczynnika Accumax, wirowano i zawieszano w buforze PBS zawierającym 1% BSA. 100 µl zawiesiny komórkowej inkubowano przez pół godziny, w temperaturze 4°C z odpowiednim przeciwciałem pierwszorzędowym, skierowanym przeciw ludzkim antygenom powierzchniowym komórek pluripotentnych. Po inkubacji komórki

przeplukano dwukrotnie buforem PBS, za każdym razem wirując przez 5 minut przy prędkości 1200 obrotów/minutę, a następnie zawieszono w 100 µl roztworu przeciwciała II-rzędowego sprzężonego z biotyną, skierowanego przeciw wykorzystanym przeciwciałom pierwszorzędowym w PBS + 1% BSA i inkubowano przez pół godziny w temperaturze pokojowej. Po inkubacji komórki przeplukano dwukrotnie buforem PBS, za każdym razem wirując przez 5 minut przy prędkości 1200 obrotów/minutę, a następnie zawieszono w 100 µl roztworu streptawidyny sprzężonej z barwnikiem APC (ang. *Allophycocyanin*), w PBS + 1% BSA i inkubowano przez 15 minut, w ciemności, w temperaturze pokojowej. Po inkubacji komórki przeplukano ponownie buforem PBS, wirowano a następnie zawieszono w 250 µl 1x stężonego buforu utrwalającego CellFix (BD Biosciences). Analizy cytometryczne przeprowadzono na cytometrze przepływowym firmy Becton Dickinson (BD Biosciences FACS Aria™). Fluorescencję barwnika APC wzbudzano światłem laserowym o długości fali 650 nm, a detekcję prowadzono w zakresie dalekiej czerwieni (660 nm). Ekspresję antygenów powierzchniowych przedstawiono jako średnią wartość fluorescencji (ang. *Median Fluorescence Intensity*, MFI). Wyniki analizowano z wykorzystaniem oprogramowania FlowJo_V10 (FLOWJO, LLC Data Analysis Software). Przeciwciała wykorzystane w analizie przedstawiono w tabeli (Tab.5). Powyższy protokół jest rutynowo wykorzystywany w analizach prowadzonych w Zakładzie Immunologii Nowotworów.

3.5 Analizy statystyczne otrzymanych wyników

Analizy statystyczne otrzymanych wyników prowadzone były przy pomocy programu GraphPad Prism6 z zastosowaniem odpowiednich testów. Różnice pomiędzy dwoma grupami porównywano testem t-Studenta, przy założeniu normalności rozkładu prób. W celu zbadania zależności pomiędzy wieloma grupami badanymi przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA. Poziom istotności p przyjęto jako mniejszy lub równy 0,05, przy czym:

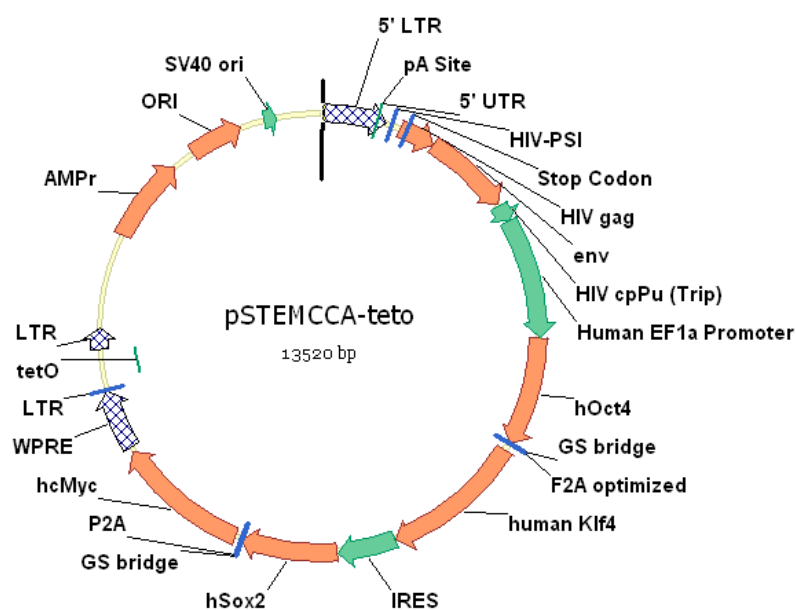
Wartość p	Istotność statystyczna
< 0.0001	****
0.0001 do 0.001	***
0.001 do 0.01	**
0.01 do 0.05	*
≥ 0.05	Nieistotne statystycznie

4. WYNIKI

4.1 Reprogramowanie ludzkich fibroblastów w kierunku komórek iPS z wykorzystaniem systemu regulowanej ekspresji wektora lentiwirusowego

4.1.1 Konstrukcja wektora lentiwirusowego pStemcca-tetO

W celu stworzenia innowacyjnego systemu otrzymywania ludzkich komórek iPS opartego na wektorze lentiwirusowym, podlegającemu epigenetycznej regulacji ekspresji transgenu, skonstruowano wektor pStemcca-tetO (Ryc. 10). Wektor ten, obok kasyety kodującej czynniki transkrypcyjne, niezbędne w procesie reprogramowania, posiada także sekwencję tet operatora (tetO), który umożliwia regulację ekspresji transgenu.

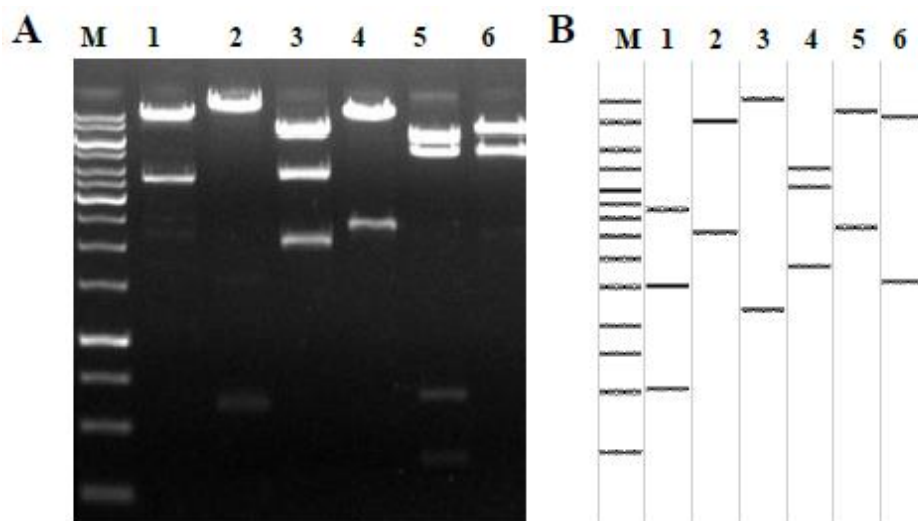


Ryc. 10 Mapa wektora plazmidowego pStemcca-tetO

Źródło: Vector NTI Advance® (Invitrogen)

Wektor pStemcca-tetO skonstruowano poprzez wklonowanie fragmentu WPRE oraz elementu regulatorowego tet operatora (tetO) do wektora pHAGE2-hSTEMCCA-EF1 α -loxp. Sekwencję tę pozyskano z wektora pLVPT-rtTRKRAB-2SM2 w wyniku trawienia restrykcyjnego. Tak przygotowany insert wklonowano do przygotowanego poprzez trawienie restrykcyjne i defosforylację wektora pHAGE2-hSTEMCCA-EF1 α -

loxp. Po namnożeniu wektora w komórkach kompetentnych *E. coli* DH5 α , przeprowadzono kontrolne trawienia restrykcyjne oraz sekwencjonowanie kasyety ekspresyjnej plazmidu.



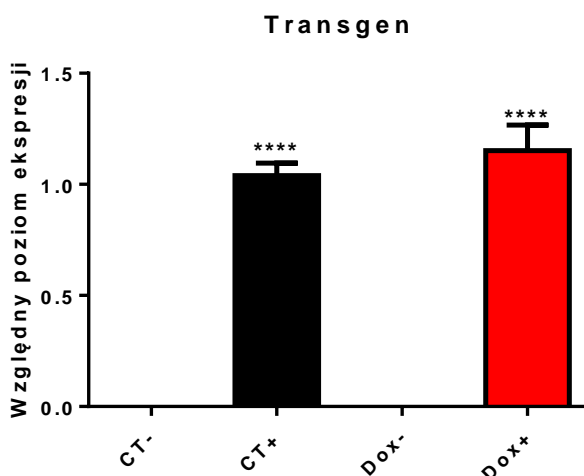
Ryc. 11 Analiza restrykcyjna otrzymanego w wyniku klonowania wektora pStemcca-tetO. A. Obraz rozdziału elektroforetycznego produktów analizy restrykcyjnej. B. Obraz wirtualnego wyniku trawienia wektora pStemcca-tetO wygenerowany w programie Vector NTI Advance® (Invitrogen). Wektor poddano analizie restrykcyjnej z następującymi enzymami: 1. BamHI, SnaBI 2. SnaBI, XbaI 3. NcoI 4. NdeI 5. XhoI 6. SalI, NruI. M – Marker wielkości, 1kb. Źródło: Praca magisterska, Wróblewski Krzysztof, 2012

Zarówno analiza restrykcyjna, jak i przeprowadzone sekwencjonowanie kasyety ekspresyjnej skonstruowanego plazmidu, potwierdziło poprawność przeprowadzonego klonowania oraz poprawność uzyskanej w jego wyniku sekwencji (Ryc. 11). Szczegółowy opis przebiegu klonowania wektora pStemcca-tetO, został ujęty w pracy magisterskiej wykonanej przez mgr. Krzysztofa Wróblewskiego, pod tytułem: *”Zastosowanie kontrolowanego systemu do otrzymywania ludzkich indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych (hiPSCs)”*, z Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, realizowanej w ramach programu WELCOME 2010-3/3.

4.1.2 Ocena szczelności systemu regulowanej ekspresji

W celu zbadania szczelności opracowanego systemu regulowanej ekspresji komórki linii MCF-7 transdukowano wektorem LVE-HK. Po przeprowadzeniu selekcji w pożywce z hygromycyną uzyskano jednorodną populację komórek wykazujących stabilną ekspresję tTRKRAB. Uzyskane komórki MCF-7/HK transdukowano wektorem

Stemcca-tetO. Prowadzono dalszą hodowlę przez 7 dni, w pożywce hodowlanej suplementowanej doksycykliną oraz w standardowej pożywce.



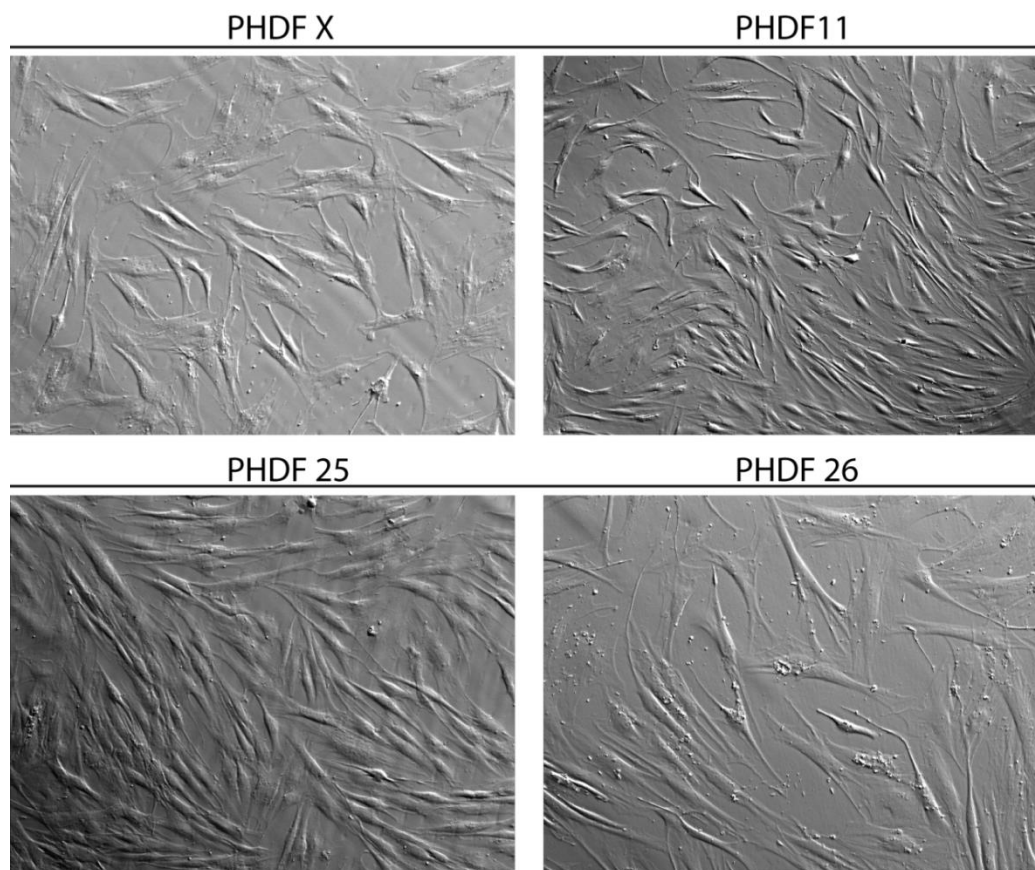
Ryc. 12 Analiza RT-qPCR w czasie rzeczywistym poziomu ekspresji transgenu z wektora Stemcca-tetO w komórkach MCF7/HK/Stemcca-tetO. Komórki hodowano bez (Dox-) lub z dodatkiem doksycykliny (Dox+). Jako kontrolę pozytywną wykorzystano komórki po transdukcji wektorem Stemcca-tetO (CT+). Kontrolę negatywną stanowiły komórki MCF7/HK (CT-). Wyniki normalizowano do poziomu ekspresji genu referencyjnego *GAPDH*.

Przeprowadzona analiza RT-qPCR w czasie rzeczywistym wykazała brak ekspresji transgenu w komórkach MCF7/HK/Stemcca-tetO hodowanych bez suplementacji doksycykliną. W obecności doksycykliny w komórkach MCF7/HK/Stemcca-tetO wykazano ekspresję transgenu na poziomie podobnym do ekspresji w komórkach kontrolnych (+) (Ryc. 12).

4.1.3 Wyprowadzenie linii ludzkich pierwotnych fibroblastów

W celu przeprowadzenia procesu reprogramowania komórek fibroblastów w kierunku ludzkich komórek iPS, przeprowadzono izolację pierwotnych komórek fibroblastów od 30 niezależnych dawców.

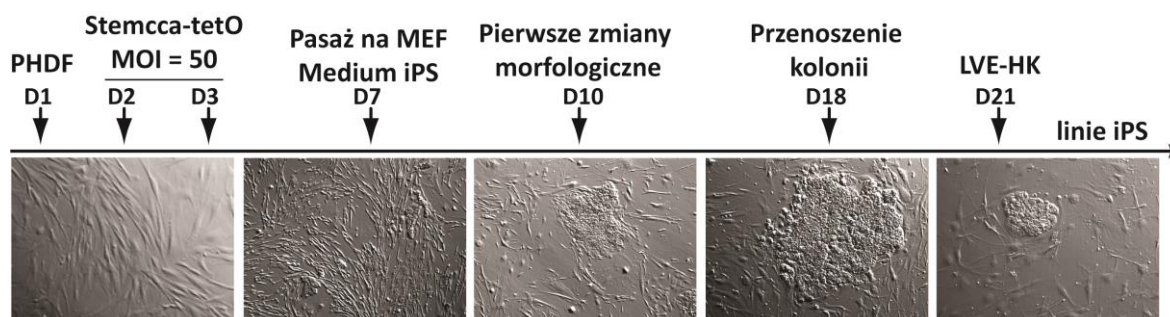
Wyprowadzono 30 pierwotnych linii ludzkich fibroblastów ze skóry (PHDF). Poszczególne linie komórkowe zostały sprawdzone pod kątem czystości mikrobiologicznej, rozchodowane na większą skalę, a następnie zamrożone, w celu utworzenia banku linii komórkowych na potrzeby dalszych etapów badań (Ryc. 13).



Ryc. 13 . Zdjęcia mikroskopowe, przedstawiające morfologię czterech linii ludzkich pierwotnych fibroblastów (PHDF X, 11, 25, 26) wybranych do dalszych etapów badań

4.1.4 Reprogramowanie ludzkich pierwotnych fibroblastów w kierunku komórek iPS

W celu otrzymania ludzkich indukowanych komórek pluripotentnych iPS z przygotowanych pierwotnych linii fibroblastów przeprowadzono proces reprogramowania komórkowego.

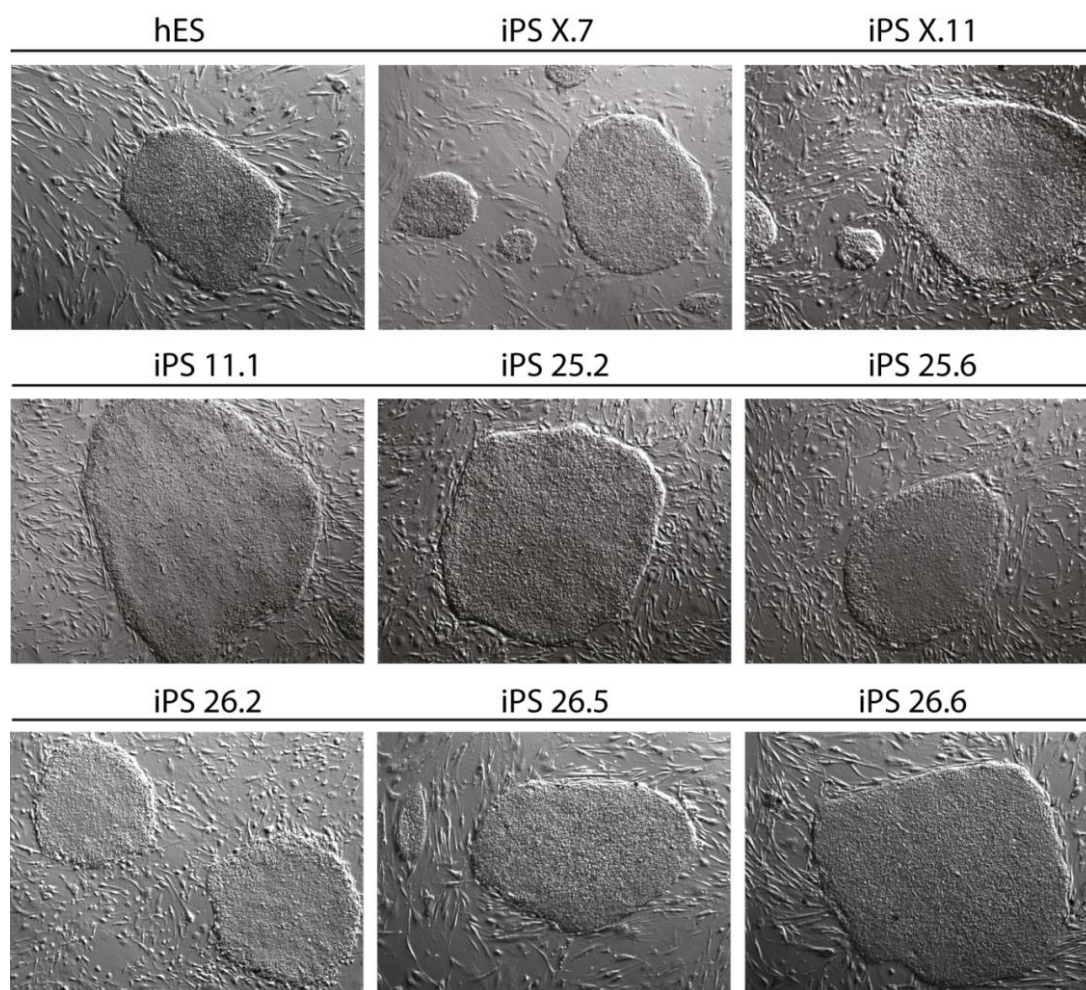


Ryc. 14 Schemat obrazujący zmiany w morfologii ludzkich fibroblastów w trakcie procesu reprogramowania w kierunku komórek iPS

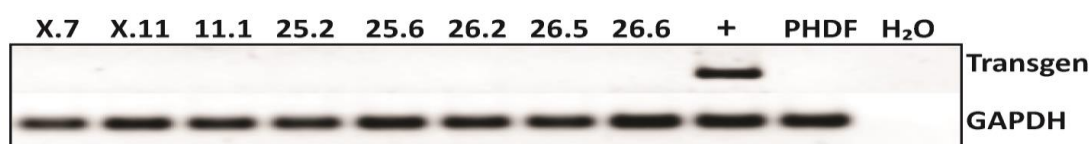
W tym celu komórki fibroblastów poddano dwukrotnej transdukcji lentiwirusowym wektorem reprogramującym Stemcca-tetO. 7 dnia po pierwszej transdukcji komórki przesiano na warstwę komórek odżywczych MEF i hodowano w medium hodowlanym do komórek iPS. Pierwsze zmiany morfologiczne obserwowano około 7 – 10 dnia reprogramowania. Analizowane komórki traciły wrzecionowaty, typowy dla fibroblastów, kształt, stając się bardziej okrągłe i wykazując tendencję do grupowania. W ciągu kilku kolejnych dni grupujące się komórki zaczęły tworzyć pierwsze kolonie komórek o morfologii zbliżonej do komórek o charakterze macierzystym, małych, o dużym jądrze komórkowym i niewielkiej ilości cytoplazmy. Około 21 dnia po transdukcji wektorem Stemcca-tetO kolonie komórek iPS osiągnęły wielkość umożliwiającą ich manualne pobranie z płytki hodowlanej w celu ustalenia klonalnych linii komórek iPS. Następnie komórki iPS zostały poddane transdukcji wektorem lentiwirusowym LVE-HK celem wyciszenia ekspresji czynników reprogramujących ze zintegrowanego wektora Stemcca-tetO (Ryc. 14). Aby uzyskać jednorodną populację komórek iPS w obrębie danej linii, przeprowadzono selekcję przy użyciu 10 ug/ml hygromycyny B.

Do dalszych analiz wybrano po dwie linie komórek iPS otrzymanych z fibroblastów PHDF X (iPS X.7 i X.11) i PHDF 25 (iPS 25.5 i 25.6), trzy linie pochodzące z komórek PHDF 26 (iPS 26.2, 26.5 i 26.6) oraz jedną linię z komórek PHDF 11 (iPS 11.1). Komórki te utworzyły stabilne linie komórkowe, o morfologii charakterystycznej dla komórek o charakterze macierzystym. Analizowane linie utworzyły płaskie, zwarte kolonie, wyraźnie odgraniczone od warstwy komórek odżywczych MEF, charakteryzujące się je wysokim stosunkiem objętościowym jądra do cytoplazmy oraz widocznymi wyraźnymi jąderkami (Ryc. 15).

Uzyskane w procesie reprogramowania komórkowego linie ludzkich komórek iPS, poddane transdukcji wektorem LVE-HK, poddano analizie RT-PCR ze starterami specyficznymi dla genów ulegających ekspresji wyłącznie ze zintegrowanego wektora reprogramującego. Przeanalizowano 8 linii komórek iPS, pochodzących od 4 różnych dawców fibroblastów. Wynik analizy potwierdził brak ekspresji egzogenów w badanych liniach komórek iPS.



Ryc. 15 Morfologia kolonii wybranych linii komórek iPS otrzymanych w wyniku reprogramowania ludzkich fibroblastów w porównaniu do kontrolnej linii hES



Ryc. 16 Analiza ekspresji egzogennych czynników reprogramujących ulegających ekspresji z wektora Stemcca-tetO

W zależności od wyjściowej linii komórek PHDF poddanych procesowi reprogramowania w kierunku komórek iPS, pobrano od 8 do 25 kolonii. Wydajność procesu reprogramowania obliczono na podstawie liczby komórek PHDF poddanych transdukcji wektorem Stemcca-tetO oraz liczby utworzonych kolonii iPS. W zależności od linii komórkowej wydajność wahała się od 0,2 – 1%, przy czym minimum 50% pobranych kolonii utworzyło stabilne linie komórek iPS (Tab.7).

Tab. 7 Wydajność reprogramowania ludzkich fibroblastów w kierunku komórek iPS

Liczba fibroblastów	Liczba powstających kolonii iPS	Liczba przeniesionych kolonii iPS	Liczba ustalonych linii iPS
10 tysięcy	10-50 (0,2 – 1%)	Od 8 do 25 z danej linii PHDF	Średnio 6 z danej linii PHDF



Ryc. 17 Analiza kariotypu linii komórkowych ludzkich fibroblastów oraz pochodzących od nich linii komórek iPS

4.1.5 Analiza kariotypu otrzymanych komórek iPS

Ze względu na doniesienia literaturowe sugerujące, że wykorzystany do reprogramowania komórek system oparty na wektorach lentiwirusowych może indukować powstawanie aberracji chromosomowych w komórkach, otrzymane linie komórek iPS poddano ocenie kariotypu.

Badane linie komórek iPS wraz z wyjściowymi liniami komórek PHDF zostały poddane analizie cytogenetycznej. Przeanalizowano 4 linie fibroblastów i 8 linii komórek iPS. Wyniki analizy wykazały prawidłowy kariotyp żeński zarówno w wyjściowych liniach PHDF, jak i w wywodzących się z nich liniach komórek iPS (Ryc. 17).

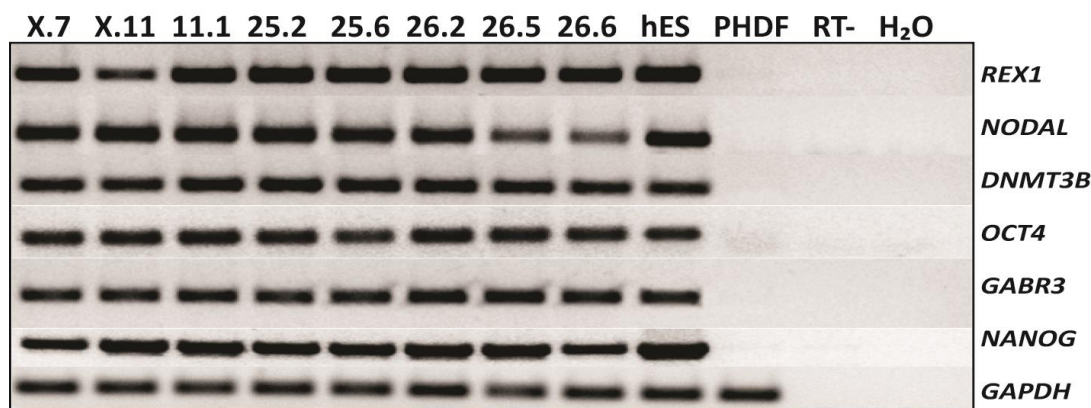
4.1.6 Charakterystyka otrzymanych ludzkich komórek iPS

4.1.6.1 Ocena fenotypowa

Uzyskane na drodze reprogramowania linie komórek iPS zostały poddane ocenie fenotypowej z wykorzystaniem metody RT-PCR oraz barwień immunofluorescencyjnych.

4.1.6.1.1 Analiza RT-PCR ekspresji markerów pluripotencji

W celu potwierdzenia macierzystego charakteru otrzymanych linii komórkowych iPS przeprowadzono analizę ekspresji klasycznych markerów pluripotencji, opartą na metodzie RT-PCR.

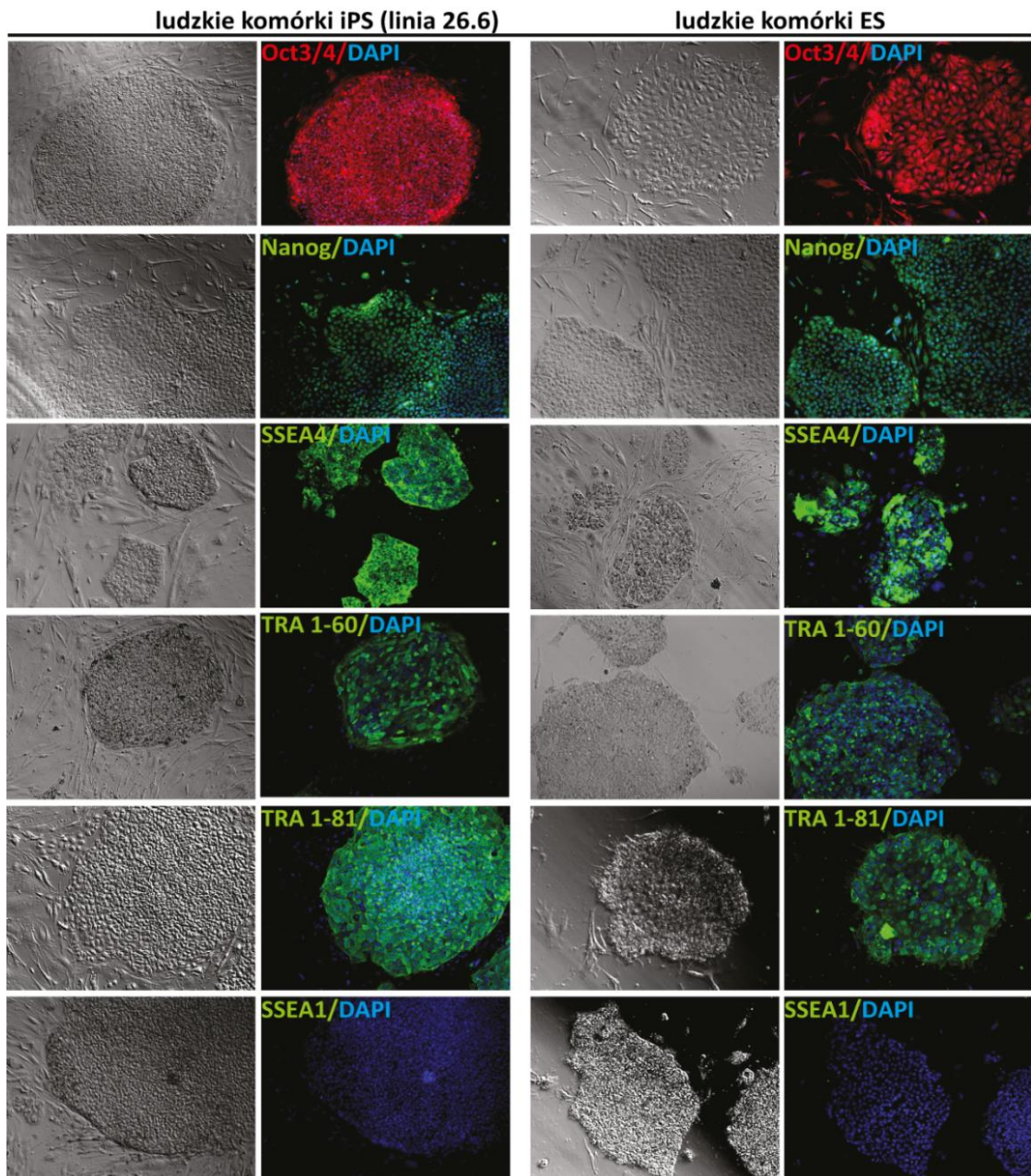


Ryc. 18 Analiza ekspresji markerów pluripotencji, oparta na reakcji RT-PCR w 8 analizowanych liniach komórek iPS oraz linii kontrolnej komórek hES BG01V. CDNA komórek PHDF oraz RNA z komórek hES BG01V nie przepisane na cDNA (RT-) zostały użyte jako kontrole negatywne, natomiast cDNA linii hES BG01V wykorzystano jako kontrolę pozytywną.

Zaobserwowano ekspresję genów *REX1*, *NODAL*, *DNMT3B*, *OCT3/4*, *GABR3*, *NANOG* w analizowanych liniach komórek iPS oraz w linii kontrolnej hES BG01V.

Ekspresja badanych genów nie występowała w wyjściowych komórkach fibroblastów PHDF. Wyniki odniesiono do genu referencyjnego *GAPDH*, jednego z genów ulegających konstytutywnej ekspresji w komórkach ludzkich (Ryc. 18).

4.1.6.1.2 Barwienia immunofluorescencyjne



Ryc. 19 Analiza ekspresji markerów pluripotencji oparta na barwieniach immunofluorescencyjnych w reprezentatywnej linii komórek iPS oraz linii komórek hES.

W celu oceny fenotypu wybranych linii komórek iPS wykonano analizę ekspresji markerów pluripotencji Oct3/4, Nanog, SSEA4, TRA 1-60 oraz TRA 1-81 opartą na metodzie barwień immunofluorescencyjnych. Wykonane zostało także barwienie z użyciem przeciwciała specyficznego dla białka SSEA1 będącego markerem komórek nieposiadających cech komórek pluripotentnych.

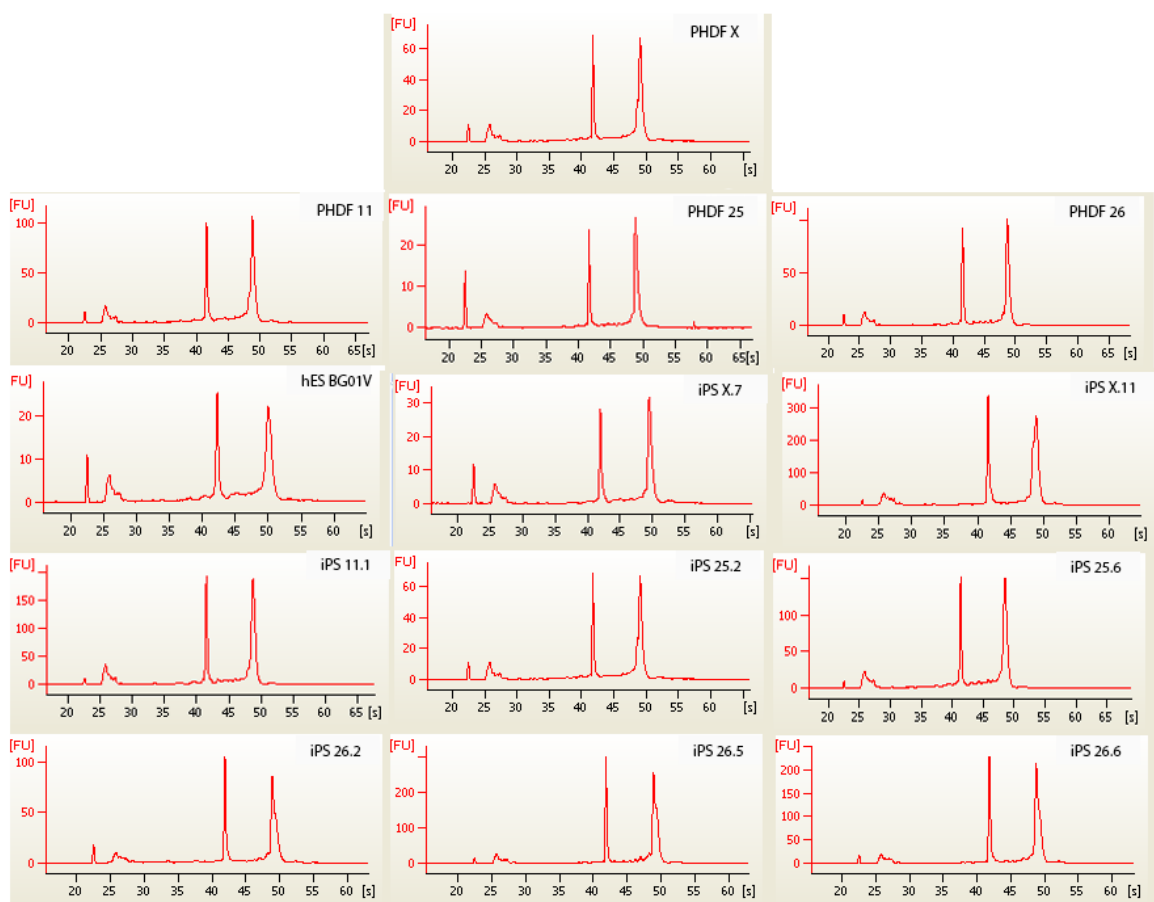
W wyniku przeprowadzonej analizy zaobserwowano ekspresję markerów pluripotencji charakterystycznych dla komórek o charakterze macierzystym we wszystkich analizowanych liniach ludzkich komórek iPS, oraz linii kontrolnej ludzkich komórek hES. Oba analizowane typy linii komórkowych, iPS i hES dały negatywny wynik barwienia pod kątem ekspresji markera SSEA1, typowego dla ludzkich komórek pozbawionych charakteru pluripotentnego (Ryc. 19).

4.1.6.1.3 Globalne sekwencjonowanie transkryptomowe (RNA-Seq)

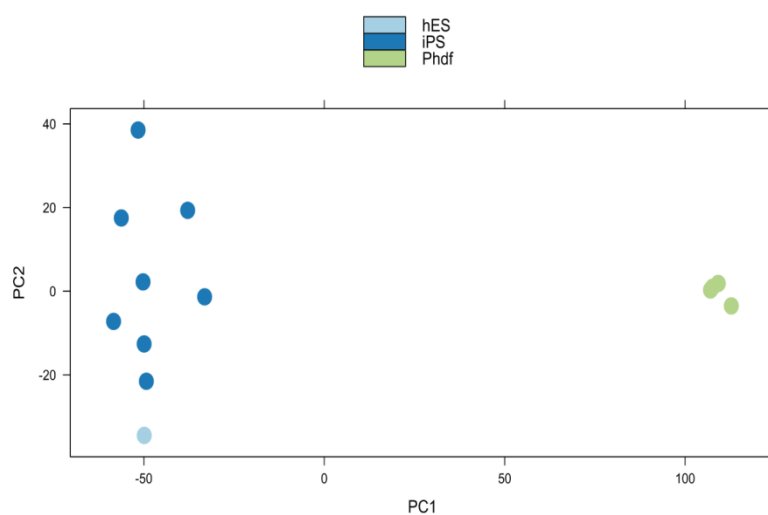
Z uzyskanych linii komórek iPS, linii kontrolnej hES BG01V oraz wyjściowych linii PHDF wyizolowano całkowite RNA, które następnie poddano ocenie jakościowej z wykorzystaniem aparatu BioAnalyzer2000 (Ryc. 20).

Próby spełniające kryterium jakości $RIN \geq 9$, świadczącym o wysokiej integralności mRNA zostały wysłane do Instytutu Nauk Stosowanych o Nowotworach (*Institute for Applied Cancer Science, MD Anderson Cancer Center, Houston, USA*), gdzie przeprowadzono globalne sekwencjonowanie transkryptomowe (analiza RNA-Seq). Analiza ta pozwoliła na określenie globalnego profilu ekspresji w analizowanych liniach komórkowych oraz potwierdzenia wysokiej homogenności linii komórek iPS. Uzyskane profile ekspresji poddano ocenie z użyciem analiz głównych składowych (ang. *Principal Component Assay, PCA*), korelacji (ang. *Correlation Plot*) oraz analizy różnicowej (ang. *Differential Expression*).

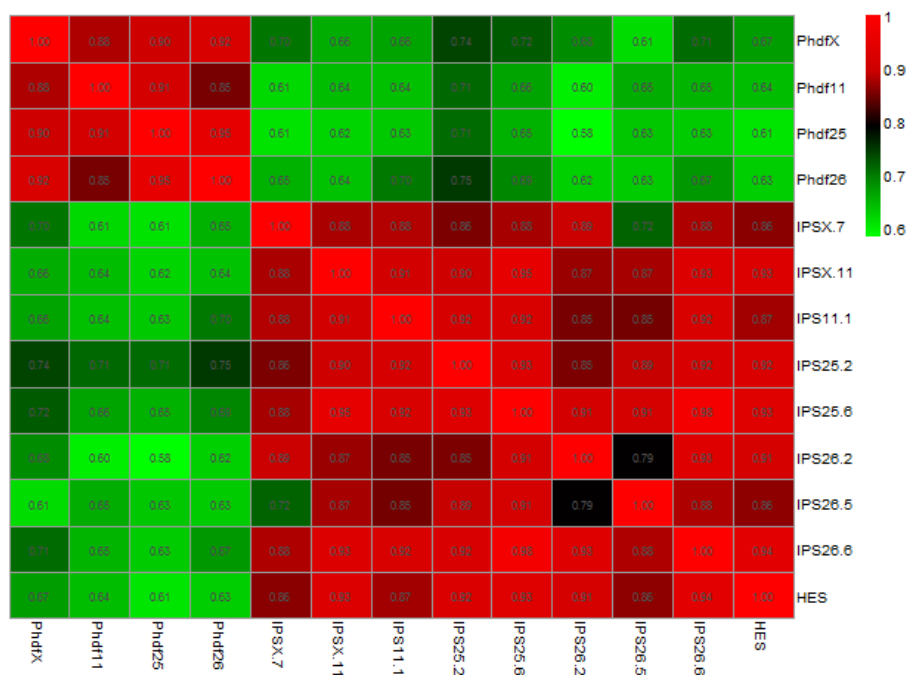
Analiza głównych składowych (PCA) wykazała zbliżony profil ekspresji w materiale pochodzącym z linii komórek iPS oraz linii komórek hES BG01V. Wykazano osobne grupowanie się profili ekspresji fibroblastów i linii komórek pluripotentnych. Wykazano także, że profile ekspresji linii komórek iPS oraz hES BG01V grupują się wspólnie, podobnie jak linie fibroblastów (Ryc. 21).



Ryc. 20 Obraz elektroforegramów prób RNA wyizolowanych z analizowanych linii komórek iPS, PHDF oraz hES BG01V.



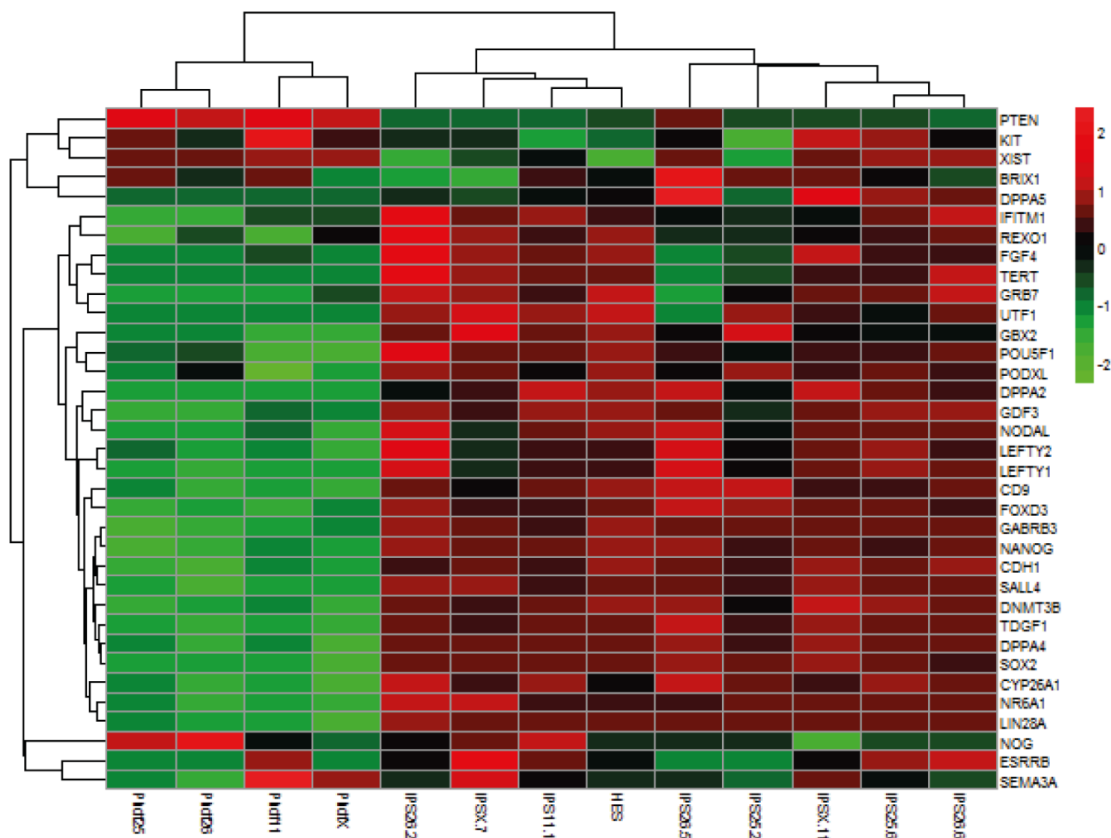
Ryc. 21 Analiza głównych składowych linii komórkowej hES BG01V, 4 linii fibroblastów oraz 8 linii wywodzących się z nich linii komórkowych iPS.



Ryc. 22 Analiza poziomu korelacji (ang. *Correlation plot*) pomiędzy linią komórkową hES BG01V, 4 liniami fibroblastów oraz 8 liniami wywodzącymi się z nich linii komórkowych iPS. Wartość równa 1 świadczy o najwyższej korelacji, natomiast wartość równa 0 o braku korelacji między analizowanymi próbkami.

Na podstawie wyników otrzymanych z sekwencjonowania transkryptomowego przeprowadzono analizę korelacji badanych linii komórkowych. Wykazano wysoki poziom korelacji pomiędzy poszczególnymi liniami komórek iPS, pomiędzy liniami iPS i linią hES BG01V oraz pomiędzy analizowanymi liniami fibroblastów. Wykazano także niski poziom korelacji pomiędzy liniami fibroblastów oraz pochodzącymi od nich liniami komórek iPS (Ryc. 22).

Otrzymany w wyniku sekwencjonowania transkryptomowego poziom ekspresji poszczególnych genów pozwolił na przeanalizowanie badanych linii iPS oraz PHDF pod kątem ekspresji różnicowej. Analizie poddano pulę 36 genów związanych ze stanem pluripotencji. Wykazano zbliżony profil ekspresji w poszczególnych liniach komórek iPS oraz pomiędzy liniami iPS i linią hES BG01V. Wykazano także istotne różnice w profilu ekspresji pomiędzy liniami fibroblastów oraz pochodzącymi od nich liniami komórek iPS. Na podstawie przeprowadzonej analizy różnicowej wykazano, że linie komórek iPS oraz hES cechują się wysokim poziomem ekspresji genów związanych z macierzystością komórek w przeciwieństwie do linii fibroblastów (Ryc. 23).



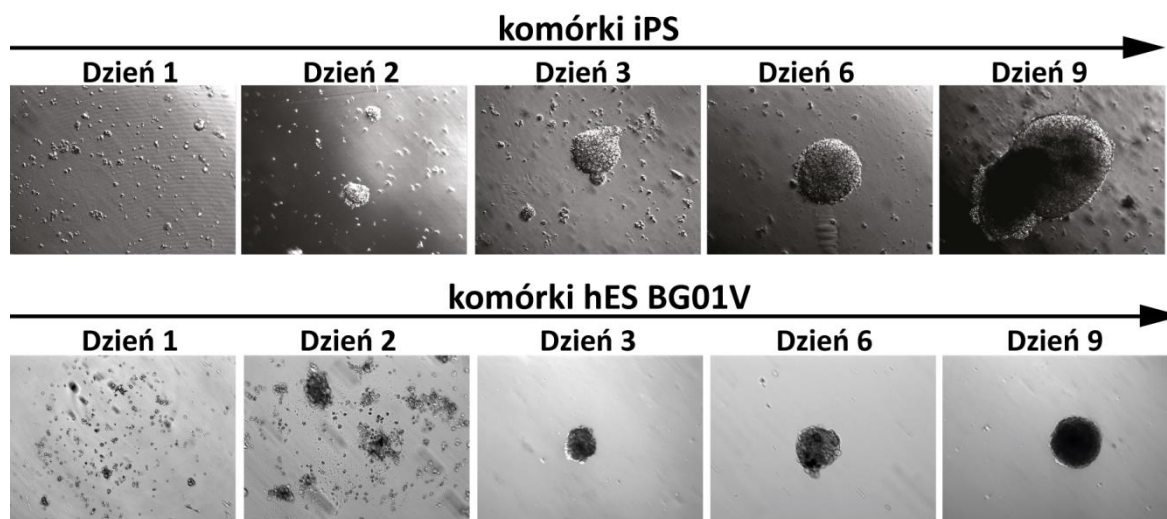
Ryc. 23 Profil ekspresji przedstawiony jako heat-mapa ekspresji różnicowej w linii komórkowej hES BG01V 4 liniach fibroblastów oraz 8 liniach wywodzących się z nich linii komórkowych iPS. Analiza została przeprowadzona dla określonej puli 36 genów związanych z pluripotencją komórek. Wartość bliska -2 wskazuje na obniżenie ekspresji danego genu, natomiast bliska 2 wskazuje na wzrost ekspresji danego genu.

4.1.6.2 Ocena funkcjonalna linii komórek iPS

Analizowane linie komórek iPS oraz linia kontrolna hES BG01V poddano ocenie funkcjonalnej z wykorzystaniem dwóch standardowych testów pozwalających ocenić ich pluripotencyjny charakter. Przeprowadzono test formowania ciał embrjonalnych *in vitro* oraz *in vivo* z zastosowaniem testu formowania guzów typu potworniaki.

4.1.6.2.1 Spontaniczne różnicowania *in vitro* – test formowania ciał embrjonalnych

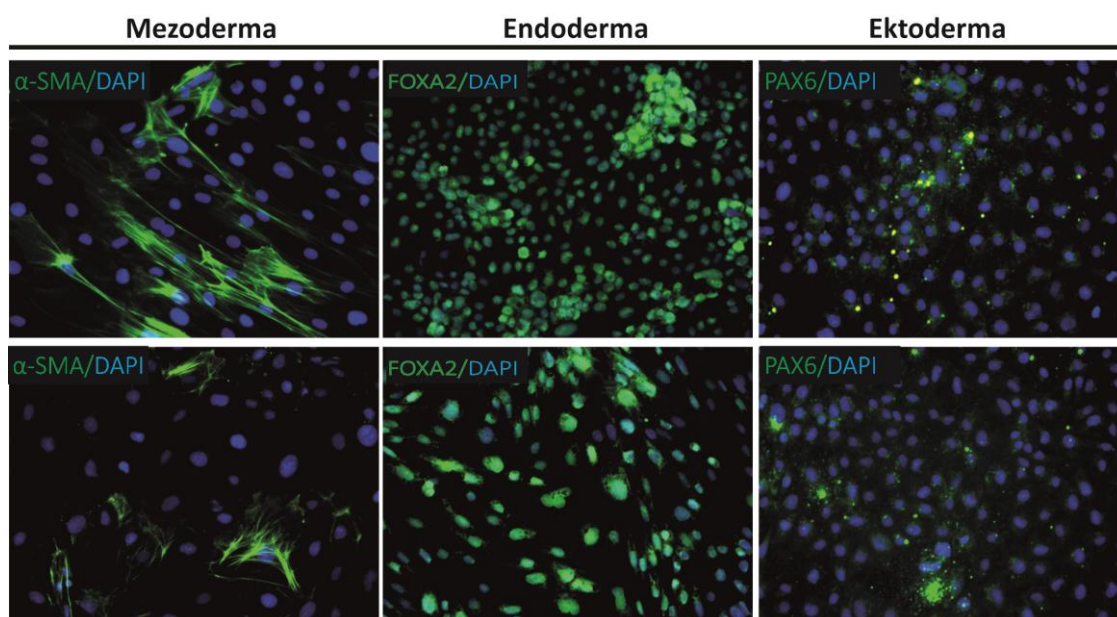
W celu oceny potencjału otrzymanych w wyniku reprogramowania komórek iPS do różnicowania się w komórki wywodzące się z trzech listków zarodkowych przeprowadzono test formowania ciał embrjonalnych w hodowli zawieszinowej.



Ryc. 24 Morfologia ciał embrjonalnych agregujących w hodowli zawieszinowej.

Komórki iPS hodowane przez 12 dni w warunkach hodowli zawieszinowej i bez suplementacji bFGF agregowały w sferyczne struktury - ciała embrjonalne (Ryc. 24).

Po 12 dniach hodowli w warunkach hodowli zawieszinowej, otrzymane ciała embrjonalne przeniesiono do hodowli adherentnej. Po 5 dniach hodowli zaobserwowano migrację komórek o zróżnicowanej morfologii z ciał embrjonalnych uzyskanych z komórek pluripotentnych. W celu oceny fenotypu komórek przeprowadzono analizę opartą o barwienia immunofluorescencyjne. Analizowane komórki wykazały ekspresję α -SMA, Foxa2 oraz Pax6, będących markerami komórek wywodzących się odpowiednio z mezo-, endo- i ektodermy (Ryc. 25).

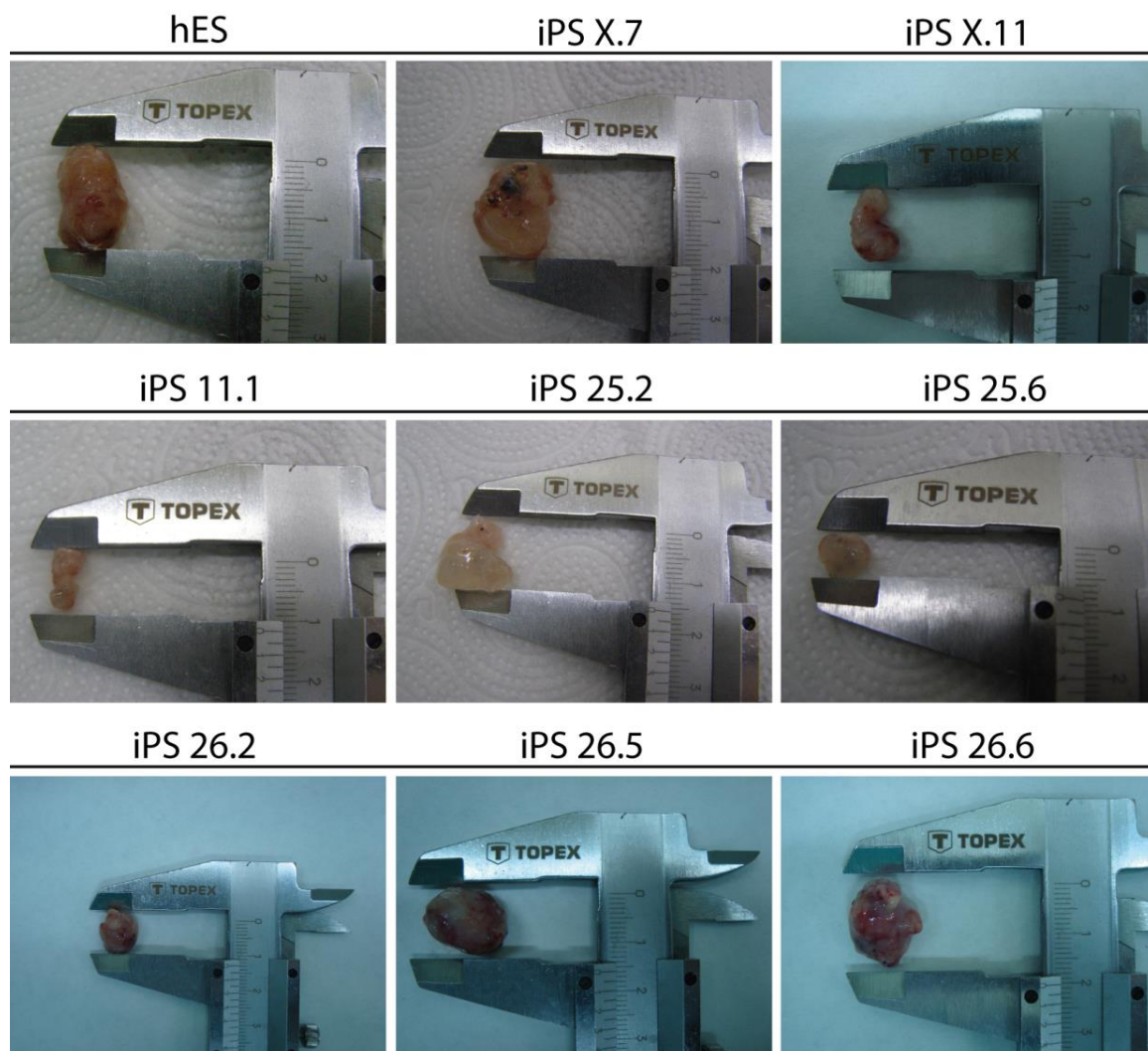


Ryc. 25 Analiza ekspresji markerów komórek wywodzących się z ekto-, mezo- i endodermy w ciałach embrjonalnych otrzymanych z komórek iPS oraz hES BG01V.

4.1.6.2 Spontaniczne różnicowanie *in vivo* – test tworzenia potworniaków

W celu potwierdzenia zdolności badanych komórek iPS do różnicowania się w komórki wywodzące się z trzech listków zarodkowych jako ostateczne potwierdzenie ich pluripotentnego charakteru wykonano test formowania potworniaków.

Każdą z analizowanych linii komórkowych iPS oraz hES wszczepiono podskórnice 4 atymicznym myszom *nude*. Wszystkie zaszczepione linie komórek iPS utworzyły guzy, które zostały wycięte po 8 tygodniach. Guzy wykazywały zróżnicowanie pod względem wielkości oraz morfologii (Ryc. 26).

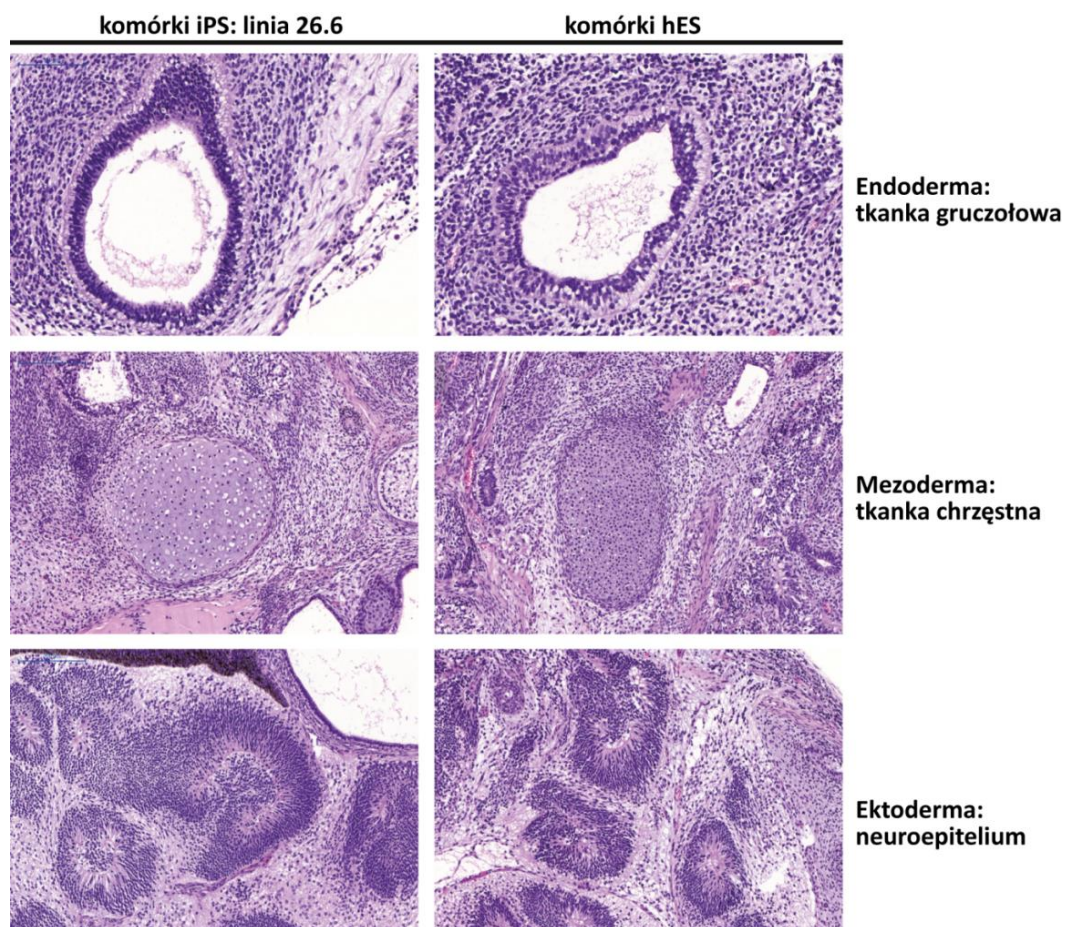


Ryc. 26 Reprezentatywne guzy typu potworniaki, wywodzące się z analizowanych linii komórek iPS oraz linii hES BG01V.

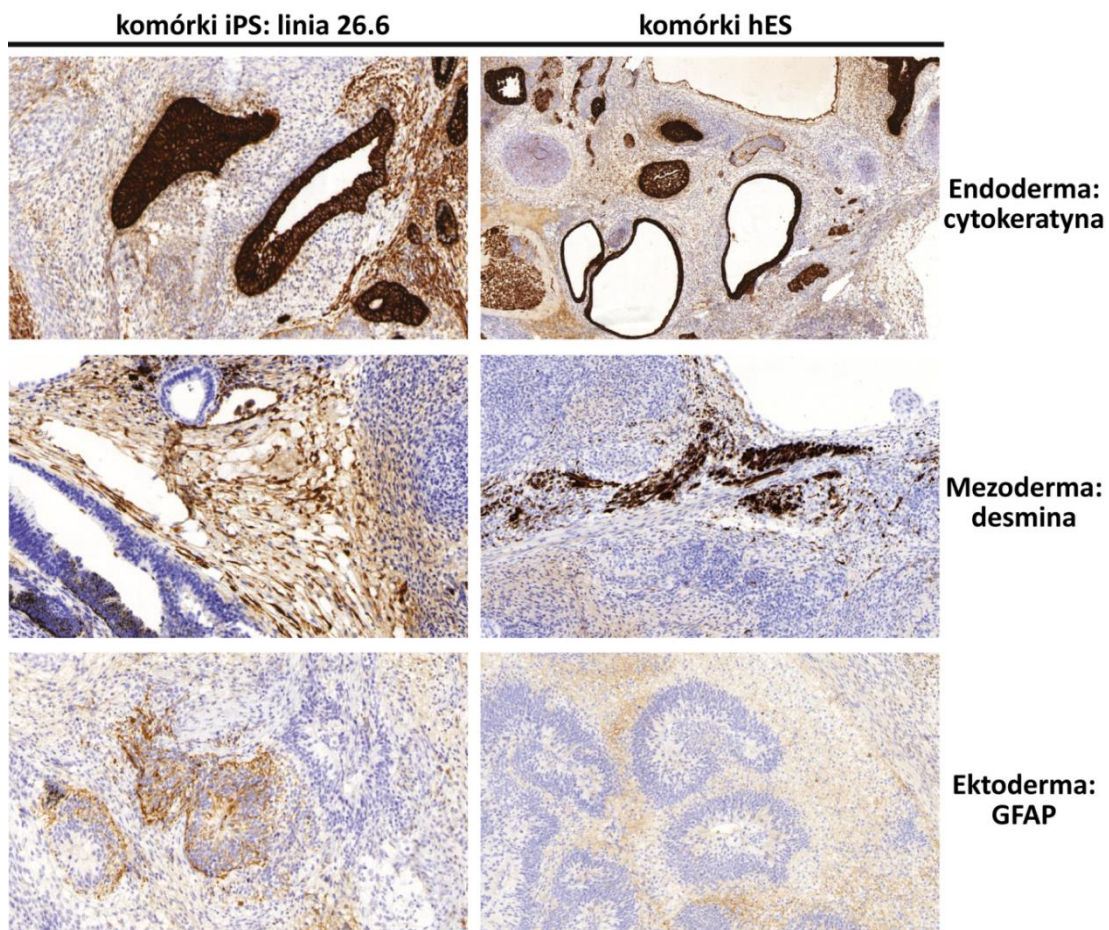
Otrzymane guzy utrwalono i przygotowano z nich preparaty mikroskopowe, które po wybarwieniu poddano ocenie histologicznej oraz analizie immunohistochemicznej z przeciwciałami specyficznymi dla markerów tkanek wywodzących się z trzech listków zarodkowych mezo-, ekto- i endodermy.

We wszystkich analizowanych guzach zaobserwowano obecność struktur charakterystycznych dla mezodermy (chrząstka), endodermy (tkanka gruczołowa) oraz ektodermy (neuroepitelium) (Ryc. 27).

Wykonano także analizy immunohistochemiczne, które potwierdziły w badanych guzach obecność markerów molekularnych charakterystycznych dla komórek wywodzących się z trzech listków zarodkowych. Wykryto ekspresję cytokeratyny jako markera tkanek endodermalnych, desminy jako markera tkanek mezodermalnych oraz GFAP jako markera tkanek ektodermalnych (Ryc. 28).



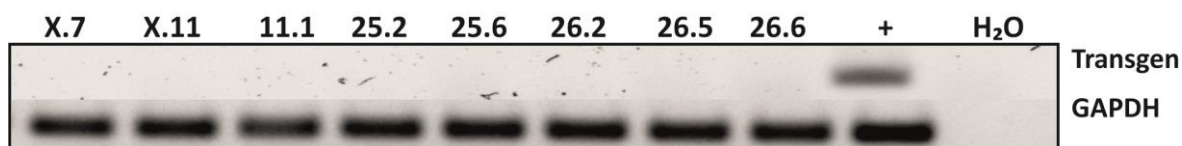
Ryc. 27 Analiza histologiczna reprezentatywnych guzów typu potworniaki, wywodzących się z badanych komórek iPS oraz linii kontrolnej komórek hES.



Ryc. 28 Analiza immunocytochemiczna reprezentatywnych guzów typu potworniaki, wywodzących się z badanych komórek iPS oraz linii kontrolnej komórek hES.

4.1.6.2.3 Analiza ekspresji zintegrowanego transgenu w trakcie różnicowania *in vivo*

W celu oceny szczelności stosowanego systemu wyciszenia ekspresji transgenu, przeprowadzono analizę RT-PCR materiału wyizolowanego z guzów wywodzących się z badanych linii komórek iPS, ze starterami specyficznymi dla transgenu ulegającego ekspresji wyłącznie ze zintegrowanego wektora Stemcca-tetO.



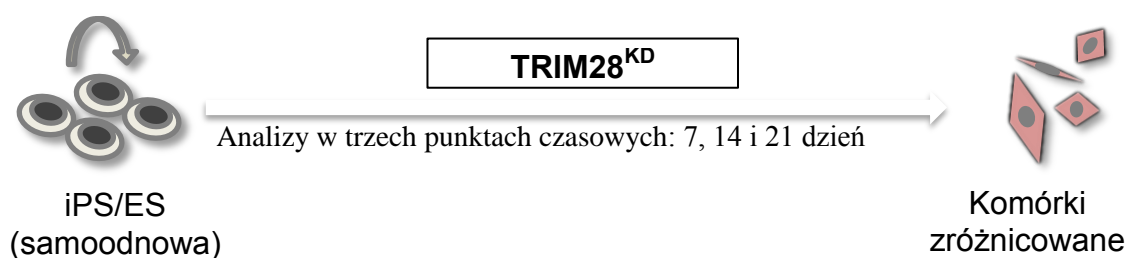
Ryc. 29 Analiza ekspresji egzogennych czynników reprogramujących ze zintegrowanego wektora Stemcca-tetO.

Analiza wykazała brak ekspresji egzogennych czynników transkrypcyjnych we wszystkich guzach wywodzących się z badanych linii komórek iPS. Jako kontrolę pozytywną użyto cDNA z komórek PHDF po transdukcji wektorem Stemcca-tetO. Wyniki odniesiono do ekspresji genu referencyjnego *GAPDH* (Ryc. 29).

4.2 Analiza roli TRIM28 w samoodnowie komórek iPS

4.2.1 Plan eksperymentu

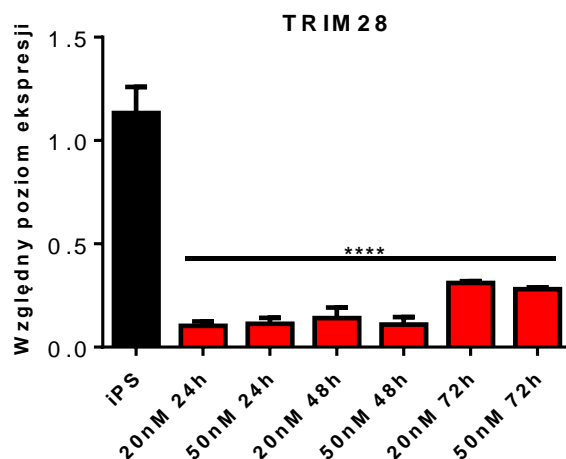
W celu przeanalizowania roli białka TRIM28 w procesie samoodnowy komórek o charakterze komórek macierzystych zaprojektowano eksperyment, w którym co 72 godziny prowadzono transfekcję linii komórkowych iPS i hES siRNA, specyficznym dla ludzkiego transkryptu *TRIM28*. Uzyskano w ten sposób komórki pluripotencjne pozbawione ekspresji *TRIM28* (*TRIM28^{KD}*). Jako kontrolę wpływu stosowanych reagentów interferencji RNA, prowadzono transfekcję kontrolnym siRNA, pozbawionym sekwencji docelowej w ludzkim transkryptomie (CT) według identycznego schematu. Dodatkowo, jako kontrolę fenotypową hodowano wariant komórek pozbawionych suplementacji bFGF ulegających spontanicznemu różnicowaniu (-FGF). Czwartym wariantem komórkowym wykorzystanym w eksperymencie były komórki nietraktowane siRNA, typu dzikiego (WT). Eksperyment prowadzono przez 21 dni. Warianty komórkowe analizowano co 7 dni, w trzech punktach czasowych, prowadząc ocenę zmian morfologii komórek i profilu ekspresji genów markerowych pluripotencji oraz różnicowania komórkowego (Ryc. 30).



Ryc. 30 Schemat eksperymentu mającego na celu wykazać rolę TRIM28 w procesie samoodnowy komórek pluripotencyjnych.

4.2.2 Walidacja reagentów interferencji RNA

W celu uzyskania możliwie wysokiego poziomu wyciszenia ekspresji TRIM28 przy użyciu reagentów interferencji RNA przy możliwie niskiej cytotoksyczności przeprowadzono optymalizację metody lipofekcji.



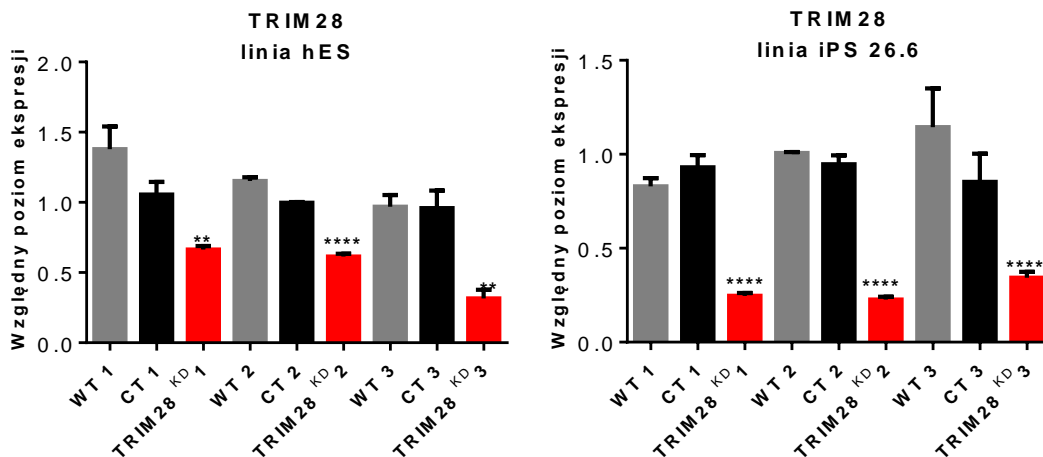
Ryc. 31 Analiza poziomu ekspresji TRIM28 w komórkach iPS. Komórki traktowano różnym stężeniem reagentów interferencji RNA (20nM i 50nM) w trzech punktach czasowych: 24, 48 i 72 godziny po transfekcji.

Przetestowano dwa stężenia równomolowych mieszanin dwóch siRNA: 20nM i 50 nM. Poziom wyciszenia ekspresji *TRIM28* mierzono metodą RT-PCR w czasie rzeczywistym po 24, 48 i 72 godzinach po transfekcji. Wyniki normalizowano do poziomu ekspresji genu *GAPDH*. Analiza wykazała 90% spadek poziomu ekspresji *TRIM28* po 24 godzinach przy obu stężeniach siRNA, po 48 godzinach: 86% i 90% przy odpowiednio 20 nM i 50 nM siRNA, oraz po 72 godzinach: 69% i 72% przy odpowiednio 20 nM i 50 nM (Ryc. 31).

4.2.3 Analiza poziomu ekspresji TRIM28 na poziomie transkryptu i białka

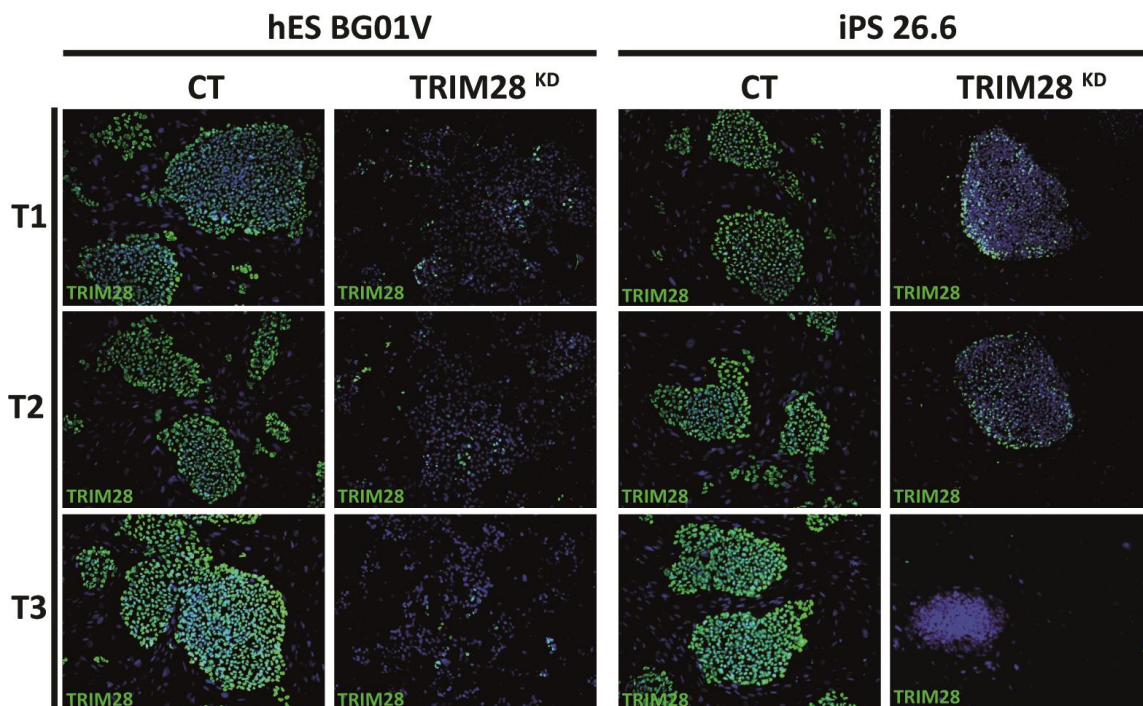
Aby ocenić poziom wyciszenia *TRIM28* w trakcie trwania eksperymentu, przeprowadzono analizy ilościowego RT-PCR, w trzech punktach czasowych: 7-go, 14-go i 21-go dnia.

Analiza wykazała istotny statystycznie spadek ekspresji *TRIM28* w komórkach traktowanych siRNA specyficznego dla tego genu. Uzyskano wyciszenie ekspresji do poziomu około 30% w komórkach iPS w trzech analizowanych punktach czasowych. W komórkach hES BG01V uzyskano wyciszenie do poziomu około 60% w pierwszych dwóch punktach czasowych oraz do poziomu 30% w trzecim punkcie czasowym. Nie zaobserwowano statystycznie istotnego wpływu kontrolnego siRNA na poziom endogennego *TRIM28* w analizowanych liniach komórkowych (Ryc. 32).



Ryc. 32 Analiza ilościowa RT-PCR względnego poziomu ekspresji TRIM28 w ludzkich komórkach iPS. Komórki analizowano w trzech punktach czasowych eksperymentu – dzień 7, 14 i 21. Wyniki normalizowano do poziomu ekspresji *GAPDH*.

W celu zbadania wyciszenia endogennego TRIM28 na poziomie białka w trakcie trwania eksperymentu, przeprowadzono barwienia immunofluorescencyjne z przeciwciałem specyficznymi dla TRIM28.



Ryc. 33 Ekspresji białka TRIM28 w komórkach iPS i hES. Analizowano dwa warianty komórkowe (CT i TRIM28^{KD}), w trzech punktach czasowych T1, T2 i T3.

Analiza wykazała spadek poziomu ekspresji białka TRIM28 w wariantcie komórkowym TRIM28^{KD}, we wszystkich trzech analizowanych punktach czasowych. Nie

zaobserwowano zmian poziomu ekspresji analizowanego białka w komórkach kontrolnych CT (Ryc. 33).

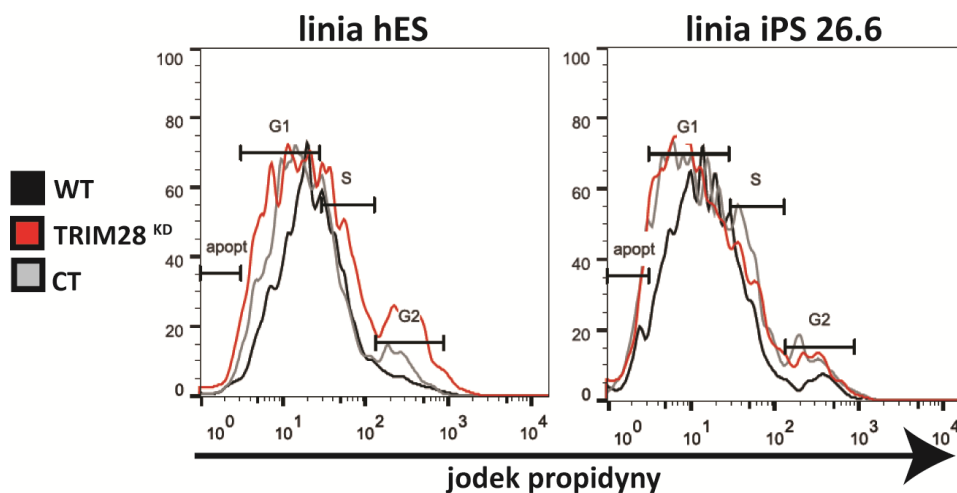
4.2.4 Ocena wpływu wyciszenia ekspresji TRIM28 w badanych komórkach na cykl komórkowy i indukcję apoptozy

Aby ocenić wpływ używanych reagentów interferencji RNA na przebieg cyklu komórkowego, przeprowadzono analizę cytometryczną komórek typu dzikiego oraz traktowanych siRNA kontrolnym oraz specyficznym dla genu *TRIM28*.

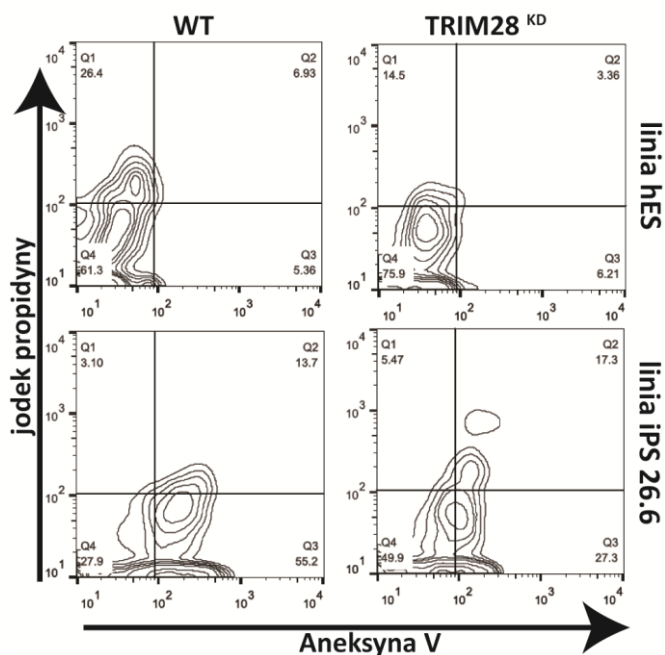
Komórki linii iPS 26.6 oraz hES BG01V poddano barwieniu jodkiem propidyny a następnie analizie cytometrycznej. Nie zaobserwowano istotnych zmian w przebiegu poszczególnych faz cyklu komórkowego w badanych wariantach komórkowych (Ryc. 34).

W celu oceny wpływu zastosowaniu reagentów interferencji RNA na indukcję apoptozy, przeprowadzono analizę cytometryczną komórek typu dzikiego oraz traktowanych siRNA kontrolnym i specyficznym dla genu *TRIM28* linii iPS 26.6 i hES BG01V. Komórki poddano barwieniu jodkiem propidyny oraz przeciwciałem specyficznym dla aneksyny V (Ryc. 35).

Analiza nie wykazała istotnych statystycznie zmian w poziomie ekspresji aneksyny V oraz poziomu wybarwienia jodkiem propidyny w badanych komórkach.



Ryc. 34 Analiza cytometryczna cyklu komórkowego w komórkach traktowanych siRNA kontrolnym (CT) oraz specyficznym dla genu *TRIM28* (*TRIM28KD*) w odniesieniu do komórek typu dzikiego (WT).

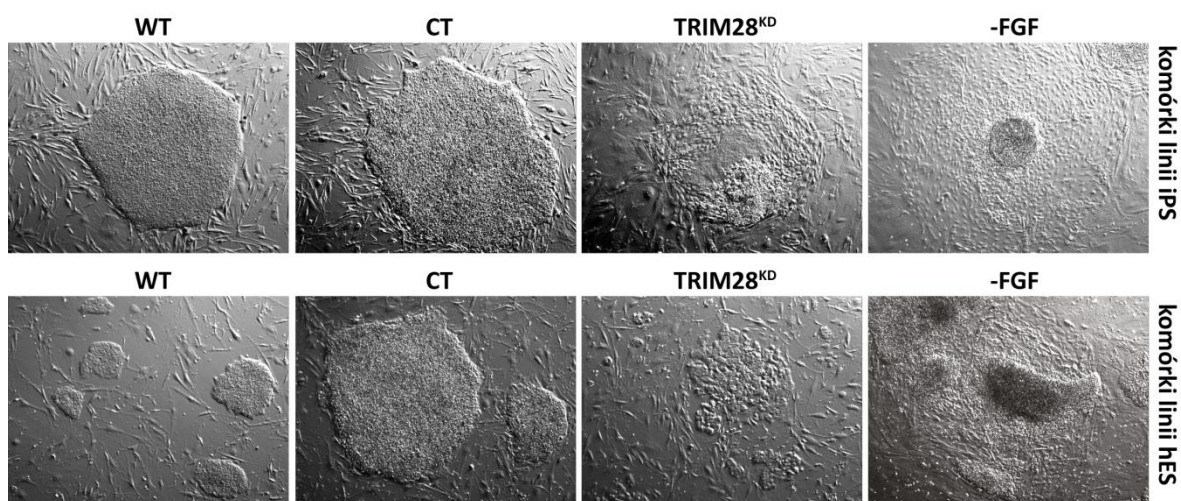


Ryc. 35 Analiza cytometryczna procesu apoptozy w komórkach traktowanych siRNA specyficznym dla genu *TRIM28* (*TRIM28KD*) w odniesieniu do komórek typu dzikiego (WT).

Analiza nie wykazała istotnych statystycznie zmian w poziomie ekspresji aneksyny V oraz poziomu wybarwienia jodkiem propidyny w badanych komórkach.

4.2.5 Ocena morfologii komórek iPS

W celu oceny wpływu wyciszenia ekspresji *TRIM28* na podtrzymanie stanu pluripotencji w liniach iPS 26.6 i hES BG01V prowadzono obserwację mikroskopową czterech wariantów komórkowych analizowanych linii.

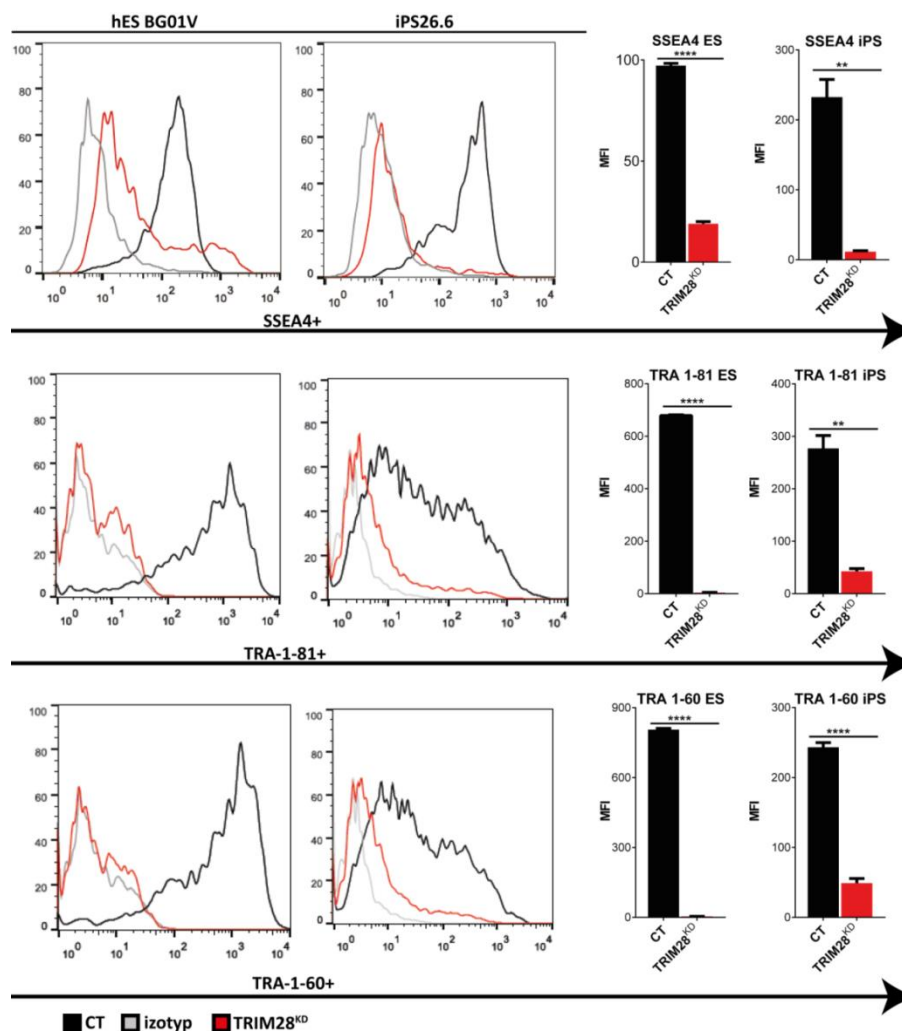


Ryc. 36 Obraz mikroskopowy czterech wariantów komórkowych linii komórek iPS i hES, po 21 dniach hodowli.

Zaobserwowano, że po 21 hodowli komórki z wyciszoną ekspresją *TRIM28* (*TRIM28^{KD}*) utraciły morfologię typową dla komórek pluripotencyjnych, podobnie jak komórki hodowane w medium bez suplementacji bFGF (-FGF). Morfologia komórek nietraktowanych (WT) oraz komórek transfekowanych kontrolnym siRNA (CT) pozostała niezmienną. Obie analizowane linie komórkowe wykazały analogiczne zmiany morfologiczne (Ryc. 36).

4.2.6 Analiza ekspresji zewnątrzkomórkowych markerów pluripotencji

Ocenę fenotypu komórek hES i iPS przeprowadzono analizując poziom ekspresji zewnątrzkomórkowych markerów pluripotencji SSEA4, Tra 1-60 oraz Tra 1-81 metodą cytometrii przepływowej.

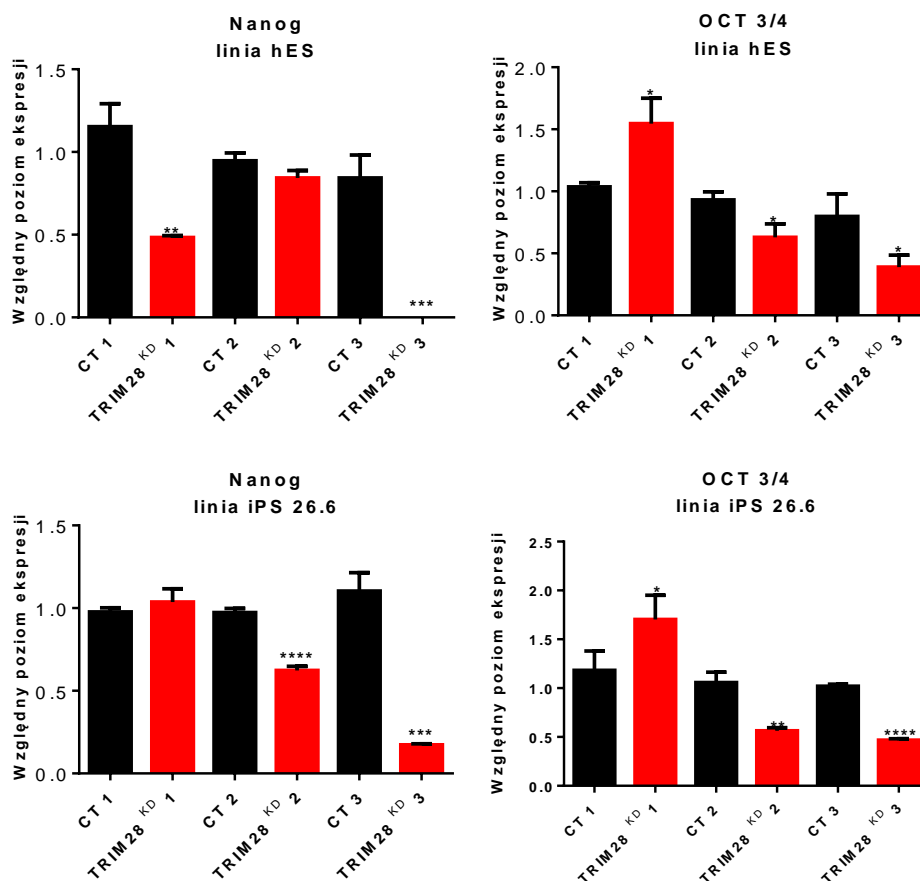


Ryc. 37 Reprezentatywny wynik analizy cytometrycznej ekspresji zewnątrzkomórkowych markerów pluripotencji w komórkach kontrolnych oraz w komórkach z wyciszoną ekspresją *TRIM28* linii komórkowych hES i iPS 26.6, po 21 dniach hodowli.

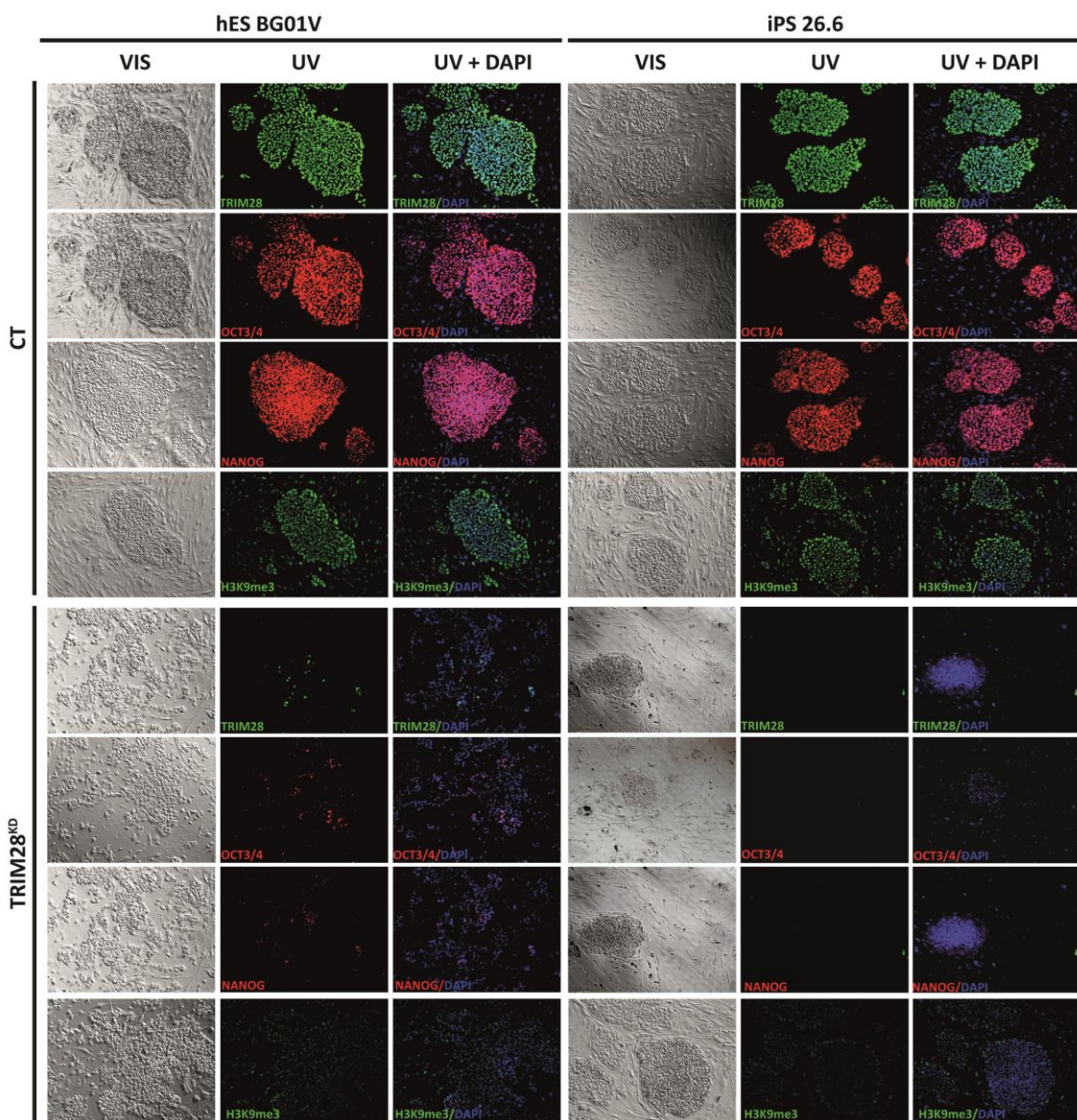
Po 21 dniach hodowli w obu analizowanych liniach, zaobserwowano znaczący spadek ekspresji badanych markerów w komórkach z wyciszoną ekspresją *TRIM28* (*TRIM28^{KD}*). Komórki nietraktowane (WT) zachowały wysoki poziom ekspresji analizowanych markerów pluripotencji. Wyniki analizy przedstawiono jako histogram (lewy panel) oraz odpowiadający mu wykres (prawy panel) średniej intensywności fluorescencji (MFI) (Ryc. 37).

4.2.7 Analiza ekspresji wewnątrzkomórkowych markerów pluripotencji

W celu oceny ekspresji markerów pluripotencji OCT3/4 i NANOG w ludzkich komórkach hES BG01V i iPS 26.6 z wyciszoną ekspresją *TRIM28* przeprowadzono ilościową analizę RT-PCR w czasie rzeczywistym. Przeanalizowano 4 warianty komórkowe: komórki nietraktowane (WT), traktowane kontrolnym siRNA (CT), komórki z wyciszoną ekspresją *TRIM28* (*TRIM28^{KD}*). Analizę prowadzono w trzech punktach czasowych.



Ryc. 38 Ilościowa analiza RT-PCR w czasie rzeczywistym względnego poziomu ekspresji markerów pluripotencji OCT3/4 i NANOG, w komórkach iPS i hES. Komórki analizowano w trzech punktach czasowych eksperymentu. Wyniki normalizowano do poziomu ekspresji genu *GAPDH*.



Ryc. 39 Analiza immunofluorescencyjna ekspresji wewnątrzkomórkowych markerów pluripotencji Oct3/4 i Nanog, białka TRIM28 oraz H3K9me3 w komórkach hES i iPS.

Zaobserwowano istotny statystycznie spadek ekspresji genu *NANOG* w wariantach komórkowych TRIM28^{KD}, w drugim i trzecim z analizowanych punktach czasowych, do poziomu około 10%. Analogiczny wynik zaobserwowano analizując poziom ekspresji *OCT3/4*. Ekspresja tego markera pluripotencji uległa statystycznie istotnemu obniżeniu w komórkach TRIM28^{KD}, w drugim i trzecim punkcie czasowym do poziomu odpowiednio 50% i 30%. W przypadku wariantu komórkowego CT nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w ekspresji zarówno genu *NANOG* jak i *OCT3/4* (Ryc. 38).

Aby potwierdzić zaobserwowany na poziomie transkryptu spadek ekspresji markerów pluripotencji w komórkach wyciszoną ekspresją TRIM28, analizowane linie komórkowe poddano barwieniom immunofluorescencyjnym, z przeciwciałami specyficznymi dla markerów pluripotencji Oct3/4 i Nanog oraz dla analizowanego czynnika TRIM28 i zależnej od niego metylacji histonu H3K9me3.

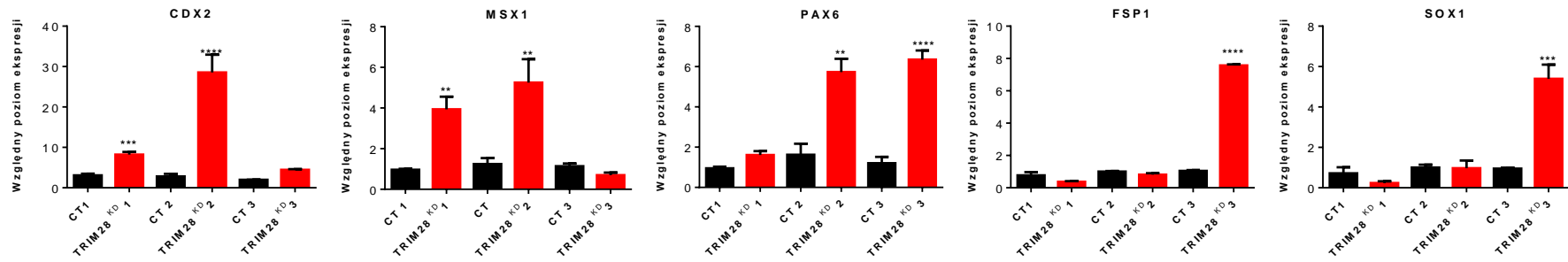
Przeprowadzona analiza wykazała zanik ekspresji genu *TRIM28* oraz markerów komórek pluripotentnych Oct3/4 i Nanog w wariantach komórkowym TRIM28^{KD} linii komórkowych iPS 26.6 oraz hES BG01V. Zaobserwowano także spadek zależnego od TRIM28 poziomu metylacji H3K9me3. Nie zaobserwowano spadku ekspresji analizowanych markerów w komórkach kontrolnych (Ryc. 39).

4.2.8 Analiza ekspresji markerów różnicowania komórkowego

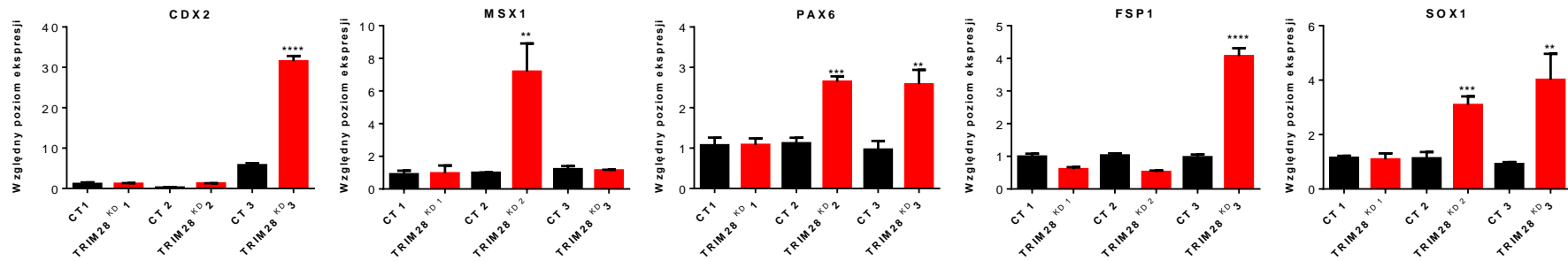
W celu oceny fenotypu ludzkich komórek iPS 26.6 oraz hES BG01V z wyciszoną ekspresją genu *TRIM28* przeprowadzono ilościową analizę RT-PCR w czasie rzeczywistym. Analizowano 3 warianty komórkowe, w trzech punktach czasowych. Zbadano poziom ekspresji genów związanych z różnicowaniem się komórek: *CDX2* (marker komórek endodermalnych), *FSP1* (marker komórek mezodermalnych), *PAX6*, *SOX1* i *MSX1*, (markery komórek ektodermalnych). Wyniki normalizowano względem poziomu ekspresji *GAPDH*. Krotność wzrostu ekspresji poszczególnych markerów odnoszono do ekspresji oznaczonej w komórkach traktowanych kontrolnym siRNA .

W pierwszym punkcie czasowym zaobserwowano około 10-krotny wzrost ekspresji genu *CDX2* oraz 4-krotny wzrost ekspresji *MSX1* w komórkach iPS TRIM28^{KD}. W drugim punkcie czasowym zaobserwowano 30-krotny wzrost ekspresji *CDX2*, a także 5-krotny wzrost ekspresji *MSX1* w komórkach linii iPS TRIM28^{KD}. Ponadto zaobserwowano także 5-krotny wzrost ekspresji genu *PAX6* w komórkach z wyciszoną ekspresją *TRIM28* linii iPS. W trzecim punkcie czasowym przeprowadzona analiza komórek iPS TRIM28^{KD} wykazała 8-krotny wzrost ekspresji *FSP1*, 6-krotny wzrost ekspresji *PAX6*, około 6-krotny wzrost ekspresji *SOX1*. W komórkach kontrolnych nie zaobserwowano statystycznie istotnego wzrostu ekspresji analizowanych genów w żadnym punkcie czasowym.

Linia iPS 26.6



Linia hES BG01V



Ryc. 40 Analiza ilościowa RT-PCR w czasie rzeczywistym względnego poziomu ekspresji markerów różnicowania komórkowego. Komórki iPS i hES analizowano w trzech punktach czasowych, po 7, 14 i 21 dniach. Wyniki normalizowano do poziomu ekspresji genu *GAPDH*.

W komórkach hES TRIM28^{KD} w pierwszym punkcie czasowym nie zaobserwowano wzrostu ekspresji genów *MSX1* i *CDX2*. W drugim analizowanym punkcie czasowym, wykazano około 8-krotny wzrost ekspresji *MSX1* w komórkach hES TRIM28^{KD} oraz 3-krotny wzrost ekspresji *SOX1* i *PAX6*. W komórkach TRIM28^{KD} linii hES, w trzecim punkcie czasowym Ponadto komórki linii hES z wyciszoną ekspresją *TRIM28* wykazały 4-krotny wzrost ekspresji *SOX1*, 3-krotny wzrost *PAX6*, 4-krotny wzrost *FSP1* oraz około 30-krotny wzrost ekspresji *CDX2*. W komórkach kontrolnych nie zaobserwowano statystycznie istotnego wzrostu ekspresji analizowanych genów w żadnym punkcie czasowym (Ryc. 40).

5. DYSKUSJA

Głównym celem niniejszej rozprawy było określenie roli białka TRIM28 w procesie samoodnowy ludzkich komórek pluripotencyjnych. W pierwszej części badań opracowano innowacyjny system reprogramowania ludzkich komórek somatycznych w kierunku komórek iPS wykorzystujący system epigenetycznej regulacji ekspresji transgenów wprowadzanych do komórek przy użyciu wektorów lentiwirusowych. Wyjściowymi liniami komórkowymi wykorzystanymi w badaniach były pierwotne linie fibroblastów. Otrzymane w wyniku reprogramowania fibroblastów stabilne linie komórek iPS, pozbawione ekspresji egzogennych czynników reprogramujących, poddano ocenie fenotypowej, molekularnej i funkcjonalnej w celu potwierdzenia ich pluripotencyjnego charakteru. W toku dalszych badań wykorzystano linie komórek iPS jako model eksperymentalny służący ocenie roli czynnika TRIM28 w procesie samoodnowy komórek o charakterze macierzystym. Wykazano, że komórki pluripotencyjne pozbawione ekspresji TRIM28 tracą fenotyp typowy dla komórek macierzystych. Sugeruje to, że ekspresja TRIM28 jest niezbędna w procesie samoodnowy komórek pluripotencyjnych.

Od czasu odkrycia możliwości uzyskania komórek o charakterze komórek macierzystych poprzez nadekspresję czynników transkrypcyjnych o wysokim poziomie ekspresji w komórkach embrionalnych, rozpoczęto intensywne badania mające na celu zwiększenie efektywności procesu reprogramowania. Wraz z włączaniem do badań szerszego spektrum komórek zwrócono uwagę na metody dostarczania genów do komórek jako czynnik mający istotny wpływ na wydajność i bezpieczeństwo reprogramowania. Pierwotnie wykorzystywane wektory retrowirusowe, pomimo relatywnie wysokiej wydajności, mają zdolność do infekowania tylko komórek aktywnie proliferujących, co może ograniczyć ich zastosowanie [6]. Problem ten rozwiązało zastosowanie wektorów lentiwirusowych, które dodatkowo umożliwiają stworzenie systemów regulowanej ekspresji transgenów [88, 89]. Zarówno wektory lenti jak i retrowirusowe integrują z genomem transdukowanej komórki, co może niekorzystnie wpływać na jego stabilność oraz stwarzać zagrożenie w przypadku zastosowań klinicznych komórek iPS otrzymanych z ich użyciem. Kolejnym systemem dostarczania genów do komórek są wektory adenowirusowe. Ich zaletą jest brak integracji z genomem, ale wadą jest niska wydajność reprogramowania komórek oraz ograniczona możliwość kontroli poziomu ekspresji transgenów [90]. Nieznacznie wyższą wydajnością charakteryzują się wektory plazmidowe.

Ze względu na brak możliwości ich replikacji w komórce, aby utrzymać stały poziom nadekspresji czynników transkrypcyjnych, komórki wymagają kilkukrotnej transfekcji tymi wektorami w trakcie procesu reprogramowania [42]. Wektory episomalne oriP/EBNA oparte na wirusie Epstein-Baara mają zdolność do samoreplikacji, jednakże wydajność reprogramowania z ich użyciem jest bardzo niska, na poziomie 0,003% [40]. Opracowane także zostały systemy dostarczania genów nie oparte na DNA, polegające na bezpośrednim dostarczaniu mRNA czynników transkrypcyjnych lub koktajlu rekombinowanych białek zmodyfikowanych w taki sposób, aby były aktywnie pobierane przez komórki [44, 45].

Wektory integrujące charakteryzują się wyższą wydajnością, możliwe jest także jego wycięcie z miejsca integracji oraz regulowanie ekspresji transgenu. W tym celu stosuje się system Cre-loxP lub system oparty na transpozonach *piggyBAC* oraz *sleeping beauty*, który po integracji ulega wycięciu przez naturalnie występujący enzym transpozazę [91]. System reprogramowania ludzkich fibroblastów opisany w niniejszej rozprawie oparto na wektorach lentiwirusowych ze względu na ich udowodnioną, relatywnie wysoką efektywność reprogramowania. Dane literaturowe opisują kilka protokołów otrzymywania komórek iPS z wykorzystaniem tych wektorów, w tym multicistronowego wektora umożliwiającego konstytutywną ekspresję czynników reprogramujących w odpowiednim stosunku stechiometrycznym [48, 89]. Wektor ten jest wycinany z genomu reprogramowanych komórek przy użyciu systemu Cre-loxP. W celu opracowania innowacyjnego systemu reprogramowania, opartego na epigenetycznej regulacji ekspresji transgenu, konieczne było skonstruowanie nowego lentiwirusowego wektora ekspresyjnego, nazwanego Stemcca-tetO. W tym celu do plazmidu multicistronowego pHAGE2-hSTEMCCA-EF1 α -loxp wklonowano sekwencję wzmacniającą WPRE oraz tet operator (tetO). Wektor pHAGE2-hSTEMCCA-EF1 α -loxp posiada kasetę ekspresyjną pod promotorem EF1 α składającą się z sekwencji Oct3/4/Klf4 i Sox2/c-Myc, rozdzielonych elementem IRES. W wyniku rozdzielenia sekwencji czynników reprogramujących sekwencją IRES uzyskano odpowiedni stosunek stechiometryczny ekspresji poszczególnych białek: wysoki poziom Oct3/4 i Klf4 i niższy poziom Sox2 oraz c-Myc [92]. Sekwencje Oct3/4/Klf4 i Sox2/c-Myc połączone są samoistnie tnącymi się sekwencjami, odpowiednio E2A i F2A. W opracowanym systemie wklonowanie do powyższego wektora elementu regulatorowego tetO umożliwia sterowanie ekspresją transgenu w docelowych komórkach iPS. W tym celu niezbędna jest transdukcja komórek iPS wektorem LVE-HK, z którego ekspresji ulega białko chimeryczne tTRKRAB. Białko to jest produktem fuzji transrepressora tetracyklinowego

(tTR) z *E.coli* TN10 i domeny KRAB (ang. *Krüppel-associated box*, KRAB) ludzkiego genu *KOX1*, który wiąże się z elementem tetO. TTRKRAB pozwala na zależną od doksycykliny regulację ekspresji z promotorów leżących w pewnej odległości od elementu tetO. Dane literaturowe pokazują, że domena KRAB, znajdująca się w wielu białkach posiadających motyw „palca cynkowego” (ang. *zinc-finger protein*), wydajnie reguluje promotory zależne od polimerazy RNA II i III [93-95] poprzez rekrutację białek modyfikujących chromatynę i tworzenie nieaktywnej transkrypcyjnie heterochromatyny. Wydajność regulacji jest najwyższa w odległości około 15 tysięcy par zasad od miejsca wiązania, ale dane literaturowe sugerują, że może być również wydajna dla promotorów zlokalizowanych nawet w odległości kilkudziesięciu tysięcy par zasad [96].

W systemie opisanym w niniejszej pracy tTRKRAB ulegający ekspresji z wektora regulatorowego LVE-HK wiąże element tetO zlokalizowany w wektorze reprogramującym Stemcca-tetO, co pozwala na epigenetyczną represję ekspresji czynników reprogramujących. Umożliwia to uzyskanie stabilnych linii komórek iPS, pozbawionych stałej ekspresji czynników reprogramujących. Jest to niezwykle istotne przy wykorzystaniu uzyskanych linii iPS w dalszych badaniach mających wykazać rolę białka TRIM28 w procesie samoodnowy. Konstytutywna ekspresja egzogennych czynników transkrypcyjnych mogłaby zafałszować wyniki przeprowadzanych badań.

W celu potwierdzenia funkcjonalności i szczelności systemu, przetestowano go na komórkach linii MCF-7/HK, wykazujących stabilną ekspresję białka tTRKRAB. Komórki te transdukowano wektorem lentiwirusowym Stemcca-tetO, a następnie hodowano w dwóch wariantach: bez i z dodatkiem doksycykliny. W hodowli komórkowej bez dodatku doksycykliny zaobserwowano brak ekspresji transgeny pochodzącego z wektora Stemcca-tetO. Fakt ten potwierdził funkcjonalność opracowanego systemu regulacji. W komórkach hodowanych w obecności doksycykliny zaobserwowano stałą ekspresję transgeny. Wiązanie doksycykliny z białkiem tTRKRAB uniemożliwia przyłączenie elementu tetO, w wyniku czego ekspresja transgeny jest zachowana. Otrzymane wyniki potwierdzają, że opracowany system regulowanej ekspresji jest w pełni funkcjonalny.

Postęp badań nad metodami wydajnego dostarczania czynników reprogramujących do komórek pozwolił na otrzymanie komórek iPS z wielu rodzajów komórek somatycznych. Do tej pory z powodzeniem reprogramowano komórki takie jak keratynocyty [97], amniocyty [98], limfocyty B, komórki macierzyste i endotelialne krwi pępowinowej [99], melanocyty [100], mezenchymalne komórki macierzyste szpiku i innych typów komórek [101]. W przypadku wykorzystania ludzkich komórek, które

wykazywały endogenną ekspresję przynajmniej jednego czynnika reprogramującego, możliwe było zredukowanie liczby wprowadzanych egzogenów. Odróżnicowano ludzkie neuronalne komórki macierzyste wykorzystując jedynie nadekspresję Oct3/4, ze względu na wysoki poziom ekspresji endogennego Sox2 [102]. Komórki pochodzące z owodni, charakteryzujące się wysokim poziomem ekspresji endogennego c-Myc, reprogramowano jedynie przy użyciu genów Oct3/4, Sox2 i Nanog [103]. Natomiast CD133-pozytywne komórki macierzyste z krwi pępowinowej, o wysokim poziomie ekspresji endogennego Klf4 wymagały nadekspresji jedynie czynników Oct3/4 i Sox2 [104]. W niniejszej pracy, jako komórki wyjściowe w procesie reprogramowania wybrano pierwotne ludzkie fibroblasty. Ten typ komórek umożliwia przeprowadzenie relatywnie efektywnego procesu reprogramowania, na poziomie 0,001-1% [41]. Dostępność materiału umożliwiła opracowanie protokołu wydajnej izolacji pierwotnych fibroblastów z fragmentów skóry. Materiał pozyskano jako odpad medyczny od chorych Wielkopolskiego Centrum Onkologii, po wyrażeniu świadomej zgody na wykorzystanie materiału biologicznego w celach naukowych. Wyprowadzono ponad 30 linii PHDF od różnych dawców, które, po szczegółowej kontroli czystości mikrobiologicznej, zdeponowano w banku komórek należącym do Katedry Biotechnologii Medycznej.

Wyprowadzone linie pierwotnych fibroblastów poddano następnie transdukcji wektorem lentiwirusowym Stemcca-tetO w celu reprogramowania ich do komórek iPS. Pierwsze zmiany morfologiczne obserwowano około dnia 10 po transdukcji, natomiast około dnia 14 widoczne były już uformowane kolonie komórek przypominające morfologicznie komórki o charakterze macierzystym. Pomiędzy dniem 18 a 21 po transdukcji kolonie komórek iPS zostały przeniesione na nowe płytki w celu wyprowadzenia stabilnych linii. Następnie uzyskane w ten sposób komórki iPS poddano transdukcji wektorem lentiwirusowym LVE-HK, umożliwiającym wyciszenie ekspresji czynników reprogramujących. Wykonana analiza RT-PCR potwierdziła brak ekspresji zintegrowanego transgenu Stemcca-tetO w otrzymanych komórkach iPS. Brak ciągłej ekspresji czynników reprogramujących umożliwia wykorzystanie tych komórek w badaniach mających na celu zbadanie procesu samoodnowy. Ciągła ekspresja cMyc, Klf4, Oct3/4 i Sox2 mogłaby zafałszować wyniki badań mających na celu wykazanie regulatorowej roli białka TRIM28 w badanym procesie. Ponadto, w przypadku potencjalnego wykorzystania komórek iPS w zastosowaniach klinicznych, wyciszenie ekspresji transgenu jest konieczne ze względu na bezpieczeństwo ich stosowania. Zachowanie ekspresji genów związanych z fenotypem macierzystym mogłoby utrudnić

różnicowanie komórek, przez co uniemożliwić ich stosowanie w medycynie regeneracyjnej. Ponadto, utrzymanie stałej ekspresji czynników Klf4 oraz cMyc, oraz zwiększa ryzyko transformacji nowotworowej. Otrzymane wyniki pozwalają stwierdzić, że opracowany system otrzymywania komórek iPS jest nie tylko skuteczny i wydajny, ale także bezpieczny. Komórki otrzymane w wyniku reprogramowania, pozbawione ciągłej ekspresji czynników reprogramujących, mogą służyć zarówno jako model eksperymentalny w badaniach podstawowych, jak i potencjalne źródło komórek macierzystych do zastosowań klinicznych.

W opracowanym systemie proces reprogramowania trwa około 21 dni, co jest zgodne z danymi literaturowymi dotyczącymi reprogramowania fibroblastów [6, 48]. Ponadto, zastosowany protokół pozwala na szybsze uzyskanie kolonii komórek iPS, niż opisywany przez Maherali i wsp. system oparty na wektorze o ekspresji czynników transkrypcyjnych regulowanej doksycykliną [88]. Uzyskane wyniki potwierdzają, że opracowana metodyka otrzymywania komórek iPS jest wydajna, a system regulacji ekspresji transgenu oparty na białku tTRKRAB jest szczelny i umożliwia uzyskanie komórek iPS pozbawionych ekspresji czynników reprogramujących.

Ludzkie komórki iPS wykazują szereg cech morfologicznych charakterystycznych dla embrionalnych komórek macierzystych. Zarówno komórki ES pochodzące z wewnętrznej masy komórkowej blastocysty, jak i uzyskane na drodze reprogramowania komórki iPS tworzą płaskie kolonie, o wyraźnych brzegach. Komórki tworzące kolonie są małe, o dużym jądrze komórkowym i stosunkowo niewielkiej ilości cytoplazmy [6, 79]. Komórki iPS opisywane w pracy spełniają te kryteria morfologiczne, co sugeruje ich pełne odróżnicowanie i uzyskanie cech komórek pluripotentnych. Wybrane linie komórek iPS od różnych dawców fibroblastów poddano dalszym analizom w celu potwierdzenia ich macierzystego charakteru.

Proces reprogramowania może powodować powstawanie aberracji chromosomowych w komórkach iPS, takich jak translokacje, amplifikacje i zmiana liczby chromosomów. Dane literaturowe wskazują na szczególnie wysoką częstość występowania trisomii chromosomów 1, 8, 12 i 17 [105-107]. W celu sprawdzenia, czy wykorzystany system otrzymywania komórek iPS nie wywołał aberracji chromosomowych przeanalizowano kariotyp ustalonych linii komórek pluripotentnych. Wszystkie analizowane linie posiadały prawidłowy kariotyp, zgodny z kariotypem wyjściowych linii fibroblastów. Zatem opracowany system reprogramowania komórek somatycznych w kierunku komórek iPS pozostaje bez wpływu na ich integralność chromosomową.

Niezależnie od metody reprogramowania, każda linia komórek iPS musi zostać scharakteryzowana pod względem molekularnym i funkcjonalnym, aby potwierdzić jej pluripotentny charakter. Najbardziej podstawowym testem molekularnym jest oznaczenie aktywności alkalicznej fosfatazy – jest to najwcześniej pojawiający się marker pluripotencji, jednakże jest on wysoce niespecyficzny [4], dlatego nie został przeprowadzony w trakcie badań do niniejszej rozprawy. Komórki iPS wykazują podobieństwo do komórek ES w kwestii morfologii, warunków hodowlanych oraz profilu ekspresji powierzchniowych i zewnątrzkomórkowych markerów pluripotencji. W pełni odróżniane komórki wykazują charakterystyczny dla komórek ES profil ekspresji markerów pluripotencji, tracąc jednocześnie ekspresję markerów typowych dla komórek wyjściowych w procesie reprogramowania [108]. Wykonane analizy RT-PCR wykazały, że badane linie komórek iPS wykazują ekspresję genów markerowych pluripotencji, podobnie jak linia kontrolna hES BG01V. Również barwienia immunofluorescencyjne potwierdziły, że otrzymane komórki wykazują ekspresję zarówno wewnątrzkomórkowych (Oct3/4, Nanog), jak i zewnątrzkomórkowych (TRA 1-60, TRA 1-81, SSEA1) białek determinujących pluripotencję komórek.

Proces reprogramowania komórkowego jest procesem złożonym, angażującym wiele szlaków sygnałowych i całkowicie zmieniającym profil ekspresji genów w komórkach. Istnieje wiele teorii odnośnie jego przebiegu. Początkowo uważano, że jest to proces hierarchiczny, ze ściśle określoną sekwencją zmian molekularnych prowadzących do powstania komórek iPS [109]. Obecnie uważa się, że proces ten jest bardziej zróżnicowany i składa się zarówno z fazy hierarchicznej, jak i drugiej – stochastycznej (losowej) [36, 110]. W fibroblastach czynniki reprogramujące uruchamiają losową kaskadę zdarzeń, prowadząc do powstania małej frakcji komórek pre-iPS, z których tylko niewielka część staje się w pełni funkcjonalnymi komórkami macierzystymi. Wyniki globalnych analiz ekspresji genów w trakcie procesu reprogramowania potwierdzają, że zmiany molekularne w komórkach zachodzą stopniowo [111]. Ponadto, globalne analizy ekspresji, oparte na mikro-macierzach lub globalnym sekwencjonowaniu są bezcennym narzędziem badania komórek iPS. Pomimo oczywistych podobieństw pomiędzy komórkami iPS oraz ES, doniesienia literaturowe sugerują istnienie istotnych różnic pomiędzy tymi liniami. Wykazano różnice w profilu ekspresji mRNA oraz mikroRNA [112-114]. Ponadto sugeruje się, że istnieją znaczące różnice pomiędzy komórkami iPS pochodzącymi od różnych dawców lub otrzymanymi różnymi metodami [115, 116]. Przyczyną tego stanu rzeczy może być zjawisko pamięci epigenetycznej,

rozumianej jako obecność epigenetycznych markerów specyficznych dla komórek somatycznych z których wyprowadzono komórki iPS. Markery te mają wpływ na profil ekspresji komórek pluripotentnych [117]. Wykazano różnice w ekspresji genów, wynikające z zachowanej pamięci genetycznej w komórkach iPS otrzymanych z fibroblastów, adipocytów oraz keratynocytów [118]. Jednakże istnieją także doniesienia sugerujące, że komórki iPS i hES cechują się bardzo zbliżonym globalnym profilem ekspresji genów [119].

Sekwencjonowanie transkryptomu z zastosowaniem aparatu Illumina Hi-Seq umożliwiło globalną analizę zmian profilu ekspresji genów linii wyjściowych – fibroblastów i wyprowadzonych z nich linii komórek iPS. Analizy statystyczne wyników uzyskanych w trakcie sekwencjonowania i obróbki bioinformatycznej udowodniły wysoką homogenność badanych linii iPS. Wykazano, że linie iPS otrzymane w wyniku reprogramowania, cechują się podobnym profilem ekspresji genów związanych z pluripotencją komórek. Ponadto, profil ekspresji linii iPS oraz hES jest podobny, natomiast różni się od profilu wyjściowych linii fibroblastów. Analiza głównych składowych oraz analiza korelacji wykazały, że w ujęciu globalnej ekspresji genów, linie iPS oraz hES otrzymane w procesie reprogramowania w opracowanym systemie są wysoce homogenne. Wynik ten sugeruje, że opracowany system może w przyszłości posłużyć do stworzenia w celach klinicznych banku homogennych komórek iPS. Dane literaturowe sugerują, że bank kilkudziesięciu komórek iPS, scharakteryzowanych pod kątem ekspresji genów MHC (ang. *Major Histocompatibility Complex*, MHC), mógłby posłużyć jako źródło komórek w medycynie regeneracyjnej, zgodnych tkankowo z większością populacji danego kraju [120].

Ostateczną metodą weryfikacji pluripotencji komórek iPS są analizy funkcjonalne polegające na przetestowaniu ich potencjału do różnicowania się *in vitro* oraz *in vivo*. Najważniejsze z nich, stosowane w przypadku komórek zwierzęcych, najczęściej mysich, to uzyskiwanie zwierząt chimerycznych oraz test tetraploidalnej komplementacji. Pierwsza z nich polega na wszczepieniu analizowanych komórek do blastocyst, w obrębie wężła zarodkowego. W pełni pluripotentne komórki będą zdolne do zasiedlenia wężła zarodkowego i brania udziału w rozwoju wszystkich tkanek organizmu myszy [33]. Modyfikacją tej metody jest technika tetraploidalnej komplementacji, dzięki której z zarodka rozwija się mysz w całości wywodząca się z testowanych komórek. W odróżnieniu od tworzenia myszy chimerycznych, komórki iPS wszczepiane są do tetraploidalnej blastocysty, która bez ich udziału nie jest w stanie wytworzyć żadnej tkanki,

poza błonami płodowymi. Wynikiem tego testu potwierdzającym embrionalny charakter jest urodzenie się żywej i płodnej myszy [121, 122]. Wykorzystanie opisanego testu w przypadku komórek ludzkich jest niewykonalne z etycznych i technicznych względów. Potencjał ludzkich komórek można przetestować wszczepiając je podskórnice, domięśniowo lub do jąder myszom z obniżoną odpornością (typu Nude, NOD/SCID lub SCID). Środowisko w jakim się znajdują, umożliwia komórkom o charakterze embrionalnym spontaniczne różnicowanie się i uformowanie potworniaków, czyli guzów zbudowanych z tkanek wywodzących się z trzech listków zarodkowych mezo-, ekto- i endodermy [123]. Analizy *in vitro* obejmują tworzenie embrionalnych – sferycznych struktur, przypominających zarodek w trakcie gastrulacji, mających potencjał do różnicowania się w komórki wywodzące się z trzech listków zarodkowych [124].

Linie komórek iPS badane w ramach niniejszej rozprawy zostały poddane zarówno różnicowaniom *in vitro* jak i *in vivo*. Zarówno test formowania ciał embrionalnych, jak i test formowania potworniaków potwierdziły pluripotentny charakter badanych linii iPS. Obydwa testy udowodniły potencjał komórek iPS do różnicowania się w komórki wywodzące się z trzech listków zarodkowych. Ponadto, analiza RT-PCR ekspresji transgenu w uformowanych z komórek iPS potworniakach, wykazała, że opracowany system regulacji ekspresji transgenu jest w pełni funkcjonalny. Wyciszenie ekspresji zintegrowanego transgenu wektora Stemcca-tetO jest trwałe, nie tylko w przypadku przedłużonej hodowli *in vitro*, ale także w trakcie spontanicznego różnicowania komórek *in vivo*. Ze względu na ograniczenia techniczne w analizowaniu ludzkich komórek macierzystych (brak możliwości przeprowadzenia testu tetraploidalnej komplementacji oraz uzyskania organizmu chimerycznego) test formowania potworniaków uważany jest za „złoty standard” potwierdzający pluripotentny charakter komórek iPS. Wyniki analiz linii iPS pozwalają jednoznacznie stwierdzić, że otrzymane komórki posiadają wszystkie cechy pluripotentnych komórek macierzystych.

Jedną z cech charakterystycznych komórek pluripotentnych jest zdolność do samoodnowy, rozumiana jako zdolność do przejścia nieograniczonej liczby podziałów komórkowych, bez utraty potencjału do różnicowania w komórki wywodzące się z trzech listków zarodkowych. Regulacja procesu samoodnowy jest złożona, zależna od wzajemnych oddziaływań czynników transkrypcyjnych powiązanych z pluripotentnością: Oct3/4, Nanog i Sox2[125]. W toku badań nad komórkami macierzystymi wykazano, że regulacja procesu samoodnowy jest zależna od wielu szlaków sygnałowych, takich jak szlak Wnt [126], STAT3 [127, 128], BMP [129] czy LIF [130]. Doniesienia literaturowe

wskazują także na prawdopodobną istotną rolę białka TRIM28 w procesie samoodnowy. TRIM28 został zidentyfikowany przez Hu i wsp. jako jeden z 148 czynników niezbędnych do podtrzymania stanu pluripotencji w mysich komórkach ES [131]. W przypadku mysich komórek embrionalnych wykazano, że w trakcie spontanicznego różnicowania się tracą one ekspresję TRIM28 [132]. Ponadto, udowodniono, że delecja TRIM28 w trakcie rozwoju embrionalnego jest letalna dla zarodka [83, 84]. Seki i wsp. wykazali w swoich badaniach, że TRIM28 reguluje samoodnowę mysich komórek ES w sposób zależny od fosforylacji. Ufosforylowane na serynie 824 białko TRIM28 tworzy kompleks z czynnikiem transkrypcyjnym Oct3/4 oraz białkami remodelującymi chromatynę Smarcd1, Brg-1 i BAF155. Kompleks ten indukuje ekspresję innych genów związanych ze stanem pluripotencji i pozwala na podtrzymanie macierzystego fenotypu komórek. Zniesienie tej fosforylacji skutkuje więc spadkiem ekspresji genów markerowych pluripotencji i spontanicznym różnicowaniem się komórek [81]. Wykazano także, że białko TRIM28, wraz z kompleksem PRC1 (ang. *Polycomb Repressive Complexes 1*) jest odpowiedzialne za represję genów tkankowo-specyficzných w embrionalnych komórkach macierzystych. Wyciszenie ekspresji TRIM28 w mysich komórkach macierzystych skutkuje utratą ich pluripotentnego charakteru, spadkiem ekspresji genów związanych ze stanem pluripotencji i aktywacją ekspresji genów tkankowo-specyficzných [82]. Dodatkowo, wykazano także udział białka TRIM28 w różnicowaniu się mysich mioblastów, będących prekursorami mięśni szkieletowych, na drodze regulacji wiązania czynnika MyoD do promotorów tkankowo-specyficzných genów. W komórkach mioblastów TRIM28 wiąże się z czynnikami MyoD oraz Mef2, rekrutując dodatkowe białka remodelujące chromatynę, np. HDAC. Skutkuje to zahamowaniem transkrypcji okolicznych promotorów i utrzymaniem mioblastów w stanie niezróżnicowanym [133]. Ponadto udowodniono, że knock-out białka TRIM28 w mysich zarodkach jest letalny na wczesnym etapie rozwoju embrionalnego, co sugeruje jego istotną rolę w podtrzymaniu i regulacji stanu pluripotencji komórek macierzystych [83, 84]. Opisane powyżej dane literaturowe wskazują na istotną rolę białka TRIM28 w regulowaniu procesów mających na celu podtrzymanie charakteru macierzystego komórek, a także jego udział na wczesnym etapie rozwoju embrionalnego. Sugerując się powyższymi danymi literaturowymi, poddano analizie rolę białka TRIM28 w regulacji procesu samoodnowy ludzkich komórek iPS. Jako model badawczy wykorzystano komórki iPS otrzymane w pierwszym etapie badań.

W celu zbadania roli białka TRIM28 w procesie samoodnowy ludzkich komórek iPS wykorzystano reagenty interferencji RNA. Ekspresję badanego białka wyciszono

mieszaniną dwóch siRNA. W celu wybrania najbardziej optymalnych warunków transfekcji przetestowano zestaw pięciu różnych siRNA specyficznych dla genu *TRIM28*. Analizie poddano różne warunki transfekcji oraz stężenie cząsteczek siRNA. Umożliwiło to wybranie mieszaniny dwóch siRNA najwydajniej wyciszających ekspresję *TRIM28*, przy najniższej cytotoksyczności komórek. Ze względu na fakt, że wyciszenie uzyskane tą metodą jest przejściowe, komórki transfekowano co 72 godziny. Przeprowadzone analizy wykazały uzyskanie stałego wyciszenia ekspresji *TRIM28* na poziomie transkryptu i białka przez cały czas trwania eksperymentu. Różnice w uzyskanym poziomie wyciszenia pomiędzy liniami iPS a linią hES, pomimo identycznych warunków transfekcji, mogą wynikać z większej plastyczności komórek iPS. Zaobserwowano, że linia hES, będąca linią ustaloną, jest znacznie mniej wrażliwa na modyfikacje warunków hodowli oraz manipulacje genetyczne, niż linie iPS.

TRIM28 jest jednym z białek należących do rodziny KRAB-ZFP. Jest to największa rodzina czynników transkrypcyjnych z domeną palca cynkowego, zaangażowana w wiele procesów komórkowych, między innymi w regulację procesu apoptozy i cyklu komórkowego [67, 70, 73]. W związku z tym, przeanalizowano linie komórek iPS i hES po wyciszeniu ekspresji *TRIM28* pod kątem zmian w cyklu komórkowym oraz aktywacji procesu apoptozy. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w przebiegu cyklu komórkowego w komórkach *TRIM28*^{KD} w odniesieniu do komórek typu dzikiego oraz do komórek traktowanym kontrolnym siRNA. Podobnie, nie zaobserwowano wpływu wyciszenia *TRIM28* w komórkach pluripotencyjnych na aktywację procesu apoptozy.

Jednym z białek będących, podobnie jak *TRIM28*, epigenetycznym regulatorem ekspresji genów jest *Wdr5*. Ang i współpracownicy wykazali, że wyciszenie białka *Wdr5* obniża globalną zawartość H3K4me3 prowadząc do zaburzeń ekspresji genów pluripotencji, spadku potencjału samoodnowy komórek ES oraz różnicowania w kierunku ektodermy i trofektodermy. Białko *Wdr5* jest częścią kompleksu *Trithorax* odpowiedzialnego za potrójną metylację histonu 3 na lizynie 4 (H3K4me3), będącą markerem aktywnej transkrypcyjnie chromatyny. Wykazano, że *Wdr5* może bezpośrednio regulować ekspresję białek *Oct3/4*, *Sox2* i *Nanog*. Ponadto, wyciszenie ekspresji białka *Wdr5* w komórkach pluripotencyjnych, prowadzi do ich spontanicznego różnicowania się i utraty wszelkich cech komórek macierzystych. Zaobserwowano spadek metylacji H3K4me3 w komórkach pluripotencyjnych z wyciszoną ekspresją *Wdr5*, który poprzedzał obniżenie poziomu ekspresji genów markerowych pluripotencji *Oct3/4* i *Nanog*.

Obserwacje te wskazują na potencjalny mechanizm regulowania procesu samoodnowy przez białko Wdr5 [134].

Innym białkiem regulującym ekspresję genów na drodze epigenetycznych zmian struktury chromatyny jest demetylaza histonowa KDM5B. Białko to katalizuje demetylację lizyny 5 histonu 3 (H3K4me3), będącą znacznikiem aktywnej transkrypcyjnie chromatyny. Wykazano wysoki poziom jego ekspresji w komórkach embrionalnych a także w komórkach progenitorowych neuronów oraz hematopoetycznych komórkach macierzystych. Delecja pojedynczego egzonu (egzon 1) KDM5B na etapie rozwoju embrionalnego jest letalna, natomiast delecja egzonu 6 skutkuje wieloma wadami rozwojowymi płodu. Kidder i wsp. wykazali, że wyciszenie ekspresji KDM5B w komórkach macierzystych prowadzi do deregulacji procesu samoodnowy i utraty charakteru pluripotentnego [135].

Badania uwzględniające udział białek WDR5 i KDM5b w regulacji procesu samoodnowy wykazały, że mechanizmy epigenetyczne mają istotne znaczenie dla utrzymania macierzystego fenotypu komórek. Zniesienie formy aktywnej chromatyny, poprzez obniżenie H3K4me3, powoduje spontaniczne różnicowanie. Można zatem przypuszczać, że zmniejszenie formy represywnej chromatyny, poprzez obniżenie H3K9me3, może wywołać analogiczny efekt.

TRIM28 jest białkiem regulatorowym uczestniczącym w represji transkrypcji poprzez przyłączanie kompleksu białek odpowiedzialnych za metylację histonu 3 na lizynie 9 i 27 (H3K9me3 oraz H3K27me3) i formowaniu nieaktywnej transkrypcyjnie heterochromatyny. Zaobserwowano, że wyciszenie ekspresji TRIM28 w komórkach pluripotentnych powoduje zaburzenie procesu samoodnowy i utratę przez komórki ich macierzystego fenotypu. Po 21 dniach wyciszenia ekspresji TRIM28 komórki utraciły morfologię typową dla komórek macierzystych, podczas gdy komórki traktowane kontrolnym siRNA nie wykazywały oznak różnicowania. Zmianom morfologicznym towarzyszył także zanik ekspresji zewnątrzkomórkowych markerów pluripotencji takich jak SSEA4, TRA 1-60 i TRA 1-81. Ponadto, zarówno w linii hES jak i w liniach iPS zaobserwowano spadek ekspresji markerów pluripotencji Oct3/4 i Nanog, zarówno na poziomie transkryptu jak i białka. Poziom metylacji H3K9 również uległ obniżeniu w komórkach pozbawionych ekspresji TRIM28. Jednakże, aby w pełni odpowiedzieć na pytanie o mechanizm działania TRIM28 w regulacji procesu samoodnowy, niezbędne jest wykonanie globalnych analiz ekspresji i metylacji genów oraz analiz proteomicznych. Umożliwi to poznanie dokładnego mechanizmu działania TRIM28 oraz pozwoli na

określenie kierunku różnicowania się komórek. Proces różnicowania się komórek iPS charakteryzuje się pewną nieprzewidywalnością. Komórki pluripotenne ulegające spontanicznemu różnicowaniu tworzą komórki wywodzące się z trzech listków zarodkowych, natomiast komórki pluripotenne różnicujące się w wyniku utraty ekspresji TRIM28 ukierunkowują się w konkretny typ komórek. Analizy RT-PCR wykazały, że linie iPS różnicują się w kierunku komórek ektodermalnych, wykazujących ekspresję PAX6 i SOX1, a także komórek mezodermalnych, wykazujących wysoki poziom ekspresji FSP1. Ekspresja FSP1, będącego markerem specyficznym dla fibroblastów, sugeruje, że wyciszenie TRIM28 mogło spowodować cofnięcie się komórek iPS do stanu wyjściowego, czyli do fibroblastów. Aby uzyskać odpowiedź na to pytanie, niezbędne jest wykonanie wspomnianych wcześniej analiz szerokoprzepustowych, które umożliwią bardziej globalne spojrzenie na procesy zachodzące w komórkach macierzystych tracących charakter pluripotenty.

Podsumowując, wyniki uzyskane w ramach realizacji tematu niniejszej rozprawy, sugerują istotną rolę białka TRIM28 w podtrzymaniu procesu samoodnowy ludzkich komórek iPS. Wyciszenie ekspresji badanego białka powoduje szereg zmian w profilu ekspresji i metylacji komórek pluripotencyjnych, prowadząc w ostateczności do ich samoistnego różnicowania się i utraty cech komórek macierzystych. Białko TRIM28, będące ko-represorem transkrypcji, ma istotny wpływ na regulację procesu samoodnowy ludzkich komórek macierzystych. Zachowanie ekspresji TRIM28 jest niezbędne do podtrzymania procesu samoodnowy komórek iPS oraz hES.

6. WNIOSKI

1. Opracowano wydajny system generacji komórek iPS, który zapewnia epigenetyczną regulację ekspresji transgenów.
 - 1.1 Otrzymane w powyższym systemie linie komórek iPS wykazują cechy komórek macierzystych i są homogenne względem siebie oraz względem linii hES.
 - 1.2 Komórki iPS poddane zdolne są do różnicowania się w komórki wywodzące się z trzech listków zarodkowych
2. TRIM28 jest zaangażowany w regulację procesu samoodnowy ludzkich komórek iPS i hES
 - 2.1 Wyciszenie ekspresji TRIM28 skutkuje obniżeniem ekspresji zewnętrznych i wewnętrznych markerów pluripotencji oraz obniżeniem zależnej od TRIM28 metylacji histonu H3K9me3
7. Wyciszenie TRIM28 powoduje wzrost ekspresji markerów różnicowania komórek iPS oraz hES

8. STRESZCZENIE

Celem niniejszej pracy było opracowanie unowocześnionej metody generowania ludzkich indukowalnych komórek pluripotencjalnych (iPS). Innowacyjność metody polega na zastosowaniu epigenetycznej regulacji ekspresji genów, dzięki czemu otrzymane linie iPS, były pozbawione ekspresji czynników reprogramujących. Dalsza część badań poświęcona była ewaluacji roli czynnika TRIM28 (KAP1) w podtrzymaniu procesu samoodnowy ludzkich komórek pluripotencjalnych. TRIM28 pełni rolę epigenetycznego represora ekspresji genów, wpływając na proces tworzenia się heterochromatyny. W celu otrzymania ludzkich komórek iPS, fibroblasty poddano podwójnej transdukcji wektorem lentiwirusowym niosącym 4 czynniki reprogramujące: Oct3/4, Sox2, cMyc i Klf4, a następnie hodowano w specjalnych warunkach przez około 21 dni. Kolonie komórek, w których doszło do procesu reprogramowania zostały rozchodowane do stabilnych linii komórkowych, które następnie poddano transdukcji wektorem niosącym czynniki wyciszający ekspresję egzogennych czynników reprogramujących. W celu walidacji komórek oceniona została ekspresja wewnętrznych i zewnętrznych markerów pluripotencji za pomocą metody RT-PCR oraz barwień immunofluorescencyjnych. Przeprowadzono także analizę kariotypu komórek metodą barwienia GTG. W celu oceny funkcjonalnej pluripotentnego fenotypu otrzymanych komórek przeprowadzono test formowania ciał embrionalnych, guzów typu teratoma oraz ukierunkowane różnicowanie. Wyciszenie ekspresji czynników reprogramujących potwierdzono na każdym etapie badań metodą RT-PCR. Aby ocenić rolę TRIM28 w procesie samoodnowy komórek iPS, wyciszono jego ekspresję przy użyciu specyficznego siRNA. Komórki analizowano po 7, 14 i 21 dniach ciągłego wyciszenia, sprawdzając poziom ekspresji TRIM28, zewnętrznych i wewnętrznych markerów pluripotencji przy pomocy analizy RT-qPCR, FACS oraz barwień immunofluorescencyjnych. Opracowano wydajny protokół otrzymywania stabilnych linii komórek iPS, oparty na epigenetycznej regulacji ekspresji transgenów. Otrzymane linie komórek iPS utrzymywały swój pluripotentny fenotyp podczas przedłużonej hodowli *in vitro* oraz wykazywały zdolność do różnicowania się w linie komórkowe wywodzące się z trzech listków zarodkowych, zarówno *in vitro*. Wykazano, że białko TRIM28 jest kluczowe w podtrzymaniu procesu samoodnowy ludzkich komórek iPS, wyciszenie jego ekspresji prowadzi do utraty ich pluripotentnego fenotypu.

9. ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the role of TRIM28 factor (KAP1) in regulation of the self-renewal process in human pluripotent stem cells. TRIM28 epigenetic acts as a repressor of gene expression, affecting the formation of heterochromatin. We designed a novel method for generation of human induced pluripotent stem cells. Innovation of our method involves the use of epigenetic regulation of gene expression, so that iPS lines obtained were devoid of the reprogramming factors expression. In order to obtain human iPS cells, fibroblasts was double transduced with lentiviral vector carrying four reprogramming factors: Oct3/4, Sox2, c-Myc, and Klf4, and then cultured under special conditions for about 21 days. Colonies of reprogrammed cells were cultured to establish stable cell lines, which were then transduced with a vector carrying regulatory element for silencing the expression of the exogenous reprogramming factors. In order to validate the pluripotency of obtained cells we assessed expression of internal and external pluripotency markers by RT-PCR and immunofluorescence staining. Karyotype analysis were also performed by GTG staining. In order to evaluate the functional phenotype of the obtained cells embryonic bodies formation was tested *in vitro* and teratoma formation *in vivo*. We confirmed silencing of reprogramming factors expression at each stage of research by RT-PCR. To assess the role of TRIM28 in the process of self-renewal in iPS cells, we silenced its expression using a specific siRNA. Cells were analyzed after 7, 14 and 21 days of continuous TRIM28 knock-down. We tested the expression levels of TRIM28 and internal, and external pluripotency markers using RT-qPCR, FACS and immunofluorescence staining. We designed efficient protocol for generation stable iPS cell lines, based on epigenetic regulation of transgene expression. Obtained iPS cells maintain their pluripotent phenotype during prolonged culture, and were able to differentiate into cell lines derived from the three germ layers both *in vitro* and *in vivo*. It has been proven that TRIM28 protein is essential to maintain the self-renewal process of human iPS cells, and silencing its expression leads to a loss of pluripotent phenotype.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Jackson, E.B. and A.M. Brues, *Studies on a Transplantable Embryoma of the Mouse*. Cancer Research, 1941. 1(6): p. 494-498.
2. Martin, G.R., *Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. 78(12): p. 7634-8.
3. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. Nature, 1981. 292(5819): p. 154-6.
4. Thomson, J.A., et al., *Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts*. Science, 1998. 282(5391): p. 1145-1147.
5. Abou-Khalil, R., et al., *Role of muscle stem cells during skeletal regeneration*. Stem Cells, 2015.
6. Takahashi, K., et al., *Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors*. Cell, 2007. 131(5): p. 861-872.
7. Mitalipov, S. and D. Wolf, *Totipotency, Pluripotency and Nuclear Reprogramming*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2009. 114: p. 185-99.
8. Morrison, S.J. and J. Kimble, *Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer*. Nature, 2006. 441(7097): p. 1068-1074.
9. Wu, Z., et al., *Capacity for stochastic self-renewal and differentiation in mammalian spermatogonial stem cells*. J Cell Biol, 2009. 187(4): p. 513-24.
10. Cantz, T. and U. Martin, *Induced pluripotent stem cells: characteristics and perspectives*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2010. 123: p. 107-26.
11. Chen, C. and S.F. Xiao, *Induced pluripotent stem cells and neurodegenerative diseases*. Neurosci Bull, 2011. 27(2): p. 107-14.
12. Lengerke, C. and G.Q. Daley, *Disease models from pluripotent stem cells*. Ann N Y Acad Sci, 2009. 1176: p. 191-6.
13. Zhang, D., et al., *Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells*. Cell Res, 2009. 19(4): p. 429-38.
14. Lim, S.Y., et al., *Trichostatin A Enhances Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells to Cardiogenic Cells for Cardiac Tissue Engineering*. Stem Cells Transl Med, 2013. 2(9): p. 715-25.
15. Hoxha, E. and R. Kishore, *Induced pluripotent cells in cardiovascular biology: epigenetics, promises, and challenges*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2012. 111: p. 27-49.
16. Matsui, T., et al., *Regeneration of the damaged central nervous system through reprogramming technology: Basic concepts and potential application for cell replacement therapy*. Exp Neurol, 2012. pii: S0014-4886(12)00378-0.
17. Cherry, A.B.C. and G.Q. Daley, *Reprogrammed Cells for Disease Modeling and Regenerative Medicine*. Annual Review of Medicine, 2013. 64(1): p. 277-290.
18. Hanna, J., et al., *Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin*. Science, 2007. 318(5858): p. 1920-3.
19. Xu, D., et al., *Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(3): p. 808-13.
20. Briggs, R. and T.J. King, *Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1952. 38(5): p. 455-63.
21. King, T.J. and R. Briggs, *Serial transplantation of embryonic nuclei*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1956. 21: p. 271-90.

22. Di Berardino, M.A. and N.H. Orr, *Genomic potential of erythroid and leukocytic cells of Rana pipiens analyzed by nuclear transfer into diplotene and maturing oocytes*. Differentiation, 1992. 50(1): p. 1-13.
23. DiBerardino, M.A. and N.J. Hoffner, *Gene reactivation in erythrocytes: nuclear transplantation in oocytes and eggs of Rana*. Science, 1983. 219(4586): p. 862-4.
24. DiBerardino, M.A., et al., *Frog larvae cloned from nuclei of pronephric adenocarcinoma*. Differentiation, 1983. 23(3): p. 213-7.
25. Gurdon, J.B., *Multiple genetically identical frogs*. J Hered, 1962. 53: p. 5-9.
26. Gurdon, J.B., *The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles*. J Embryol Exp Morphol, 1962. 10: p. 622-40.
27. Gurdon, J.B., *Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells*. Dev Biol, 1962. 4: p. 256-73.
28. Tarkowski, A.K., *Nucleo-cytoplasmic interactions in oogenesis and early embryogenesis in the mouse*. Prog Clin Biol Res, 1982. 85 Pt A: p. 407-16.
29. Tarkowski, A.K. and H. Balakier, *Nucleo-cytoplasmic interactions in cell hybrids between mouse oocytes, blastomeres and somatic cells*. J Embryol Exp Morphol, 1980. 55: p. 319-30.
30. Czolowska, R., et al., *Chromosome condensation activity in ovulated metaphase II mouse oocytes assayed by fusion with interphase blastomeres*. J Cell Sci, 1986. 84: p. 129-38.
31. Wilmut, I., et al., *Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells*. Nature, 1997. 385(6619): p. 810-3.
32. Wakayama, T., et al., *Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei*. Nature, 1998. 394(6691): p. 369-74.
33. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors*. Cell, 2006. 126(4): p. 663-676.
34. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. 131(5): p. 861-72.
35. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. 126(4): p. 663-76.
36. Polo, Jose M., et al., *A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells*. Cell, 2012. 151(7): p. 1617-1632.
37. Soufi, A., G. Donahue, and K.S. Zaret, *Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome*. Cell, 2012. 151(5): p. 994-1004.
38. Nagamatsu, G., et al., *Optimal ratio of transcription factors for somatic cell reprogramming*. J Biol Chem, 2012. 287(43): p. 36273-82.
39. Zhou, W. and C.R. Freed, *Adenoviral Gene Delivery Can Reprogram Human Fibroblasts to Induced Pluripotent Stem Cells*. STEM CELLS, 2009. 27(11): p. 2667-2674.
40. Su, R., A. Neises, and X.-B. Zhang, *Generation of iPS Cells from Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Using Episomal Vectors*. 2014, Humana Press. p. 1-13.
41. Nishimura, K., et al., *Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming*. J Biol Chem, 2011. 286(6): p. 4760-71.
42. Okita, K., et al., *Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors*. Nat. Protocols, 2010. 5(3): p. 418-428.
43. Kim, D., et al., *Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins*. Cell Stem Cell, 2009. 4(6): p. 472-6.
44. Zhou, H., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins*. Cell Stem Cell, 2009. 4(5): p. 381-4.

45. Warren, L., et al., *Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA*. Cell Stem Cell, 2010. 7(5): p. 618-30.
46. Kaji, K., et al., *Virus free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors*. Nature, 2009. 458(7239): p. 771-5.
47. Woltjen, K., et al., *piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells*. Nature, 2009. 458(7239): p. 766-70.
48. Sommer, C.A., et al., *Excision of Reprogramming Transgenes Improves the Differentiation Potential of iPS Cells Generated with a Single Excisable Vector*. STEM CELLS, 2010. 28(1): p. 64-74.
49. Gossen, M. and H. Bujard, *Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(12): p. 5547-51.
50. Zhou, X., et al., *Optimization of the Tet-On system for regulated gene expression through viral evolution*. Gene Ther, 2006. 13(19): p. 1382-1390.
51. Wiznerowicz, M. and D. Trono, *Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference*. J Virol, 2003. 77(16): p. 8957-61.
52. Amit, M., et al., *Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture*. Dev Biol, 2000. 227(2): p. 271-8.
53. Carpenter, M.K., E. Rosler, and M.S. Rao, *Characterization and differentiation of human embryonic stem cells*. Cloning Stem Cells, 2003. 5(1): p. 79-88.
54. Rodda, D.J., et al., *Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2*. J Biol Chem, 2005. 280(26): p. 24731-7.
55. Brandenberger, R., et al., *Transcriptome characterization elucidates signaling networks that control human ES cell growth and differentiation*. Nat Biotechnol, 2004. 22(6): p. 707-16.
56. Loh, Y.H., et al., *The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells*. Nat Genet, 2006. 38(4): p. 431-40.
57. Mikkelsen, T.S., et al., *Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis*. Nature, 2008. 454(7200): p. 49-55.
58. Hong, S.G., C.E. Dunbar, and T. Winkler, *Assessing the risks of genotoxicity in the therapeutic development of induced pluripotent stem cells*. Mol Ther, 2013. 21(2): p. 272-81.
59. Stadtfeld, M., et al., *Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse*. Cell Stem Cell, 2008. 2(3): p. 230-40.
60. Navarro, P. and P. Avner, *When X-inactivation meets pluripotency: an intimate rendezvous*. FEBS Lett, 2009. 583(11): p. 1721-7.
61. Orkin, S.H. and K. Hochedlinger, *Chromatin connections to pluripotency and cellular reprogramming*. Cell, 2011. 145(6): p. 835-50.
62. Li, M., G.H. Liu, and J.C. Izpisua Belmonte, *Navigating the epigenetic landscape of pluripotent stem cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. 13(8): p. 524-35.
63. Ang, Y.S., et al., *Stem cells and reprogramming: breaking the epigenetic barrier?* Trends Pharmacol Sci, 2011. 32(7): p. 394-401.
64. Gaspar-Maia, A., et al., *Open chromatin in pluripotency and reprogramming*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. 12(1): p. 36-47.
65. Liang, G. and Y. Zhang, *Embryonic stem cell and induced pluripotent stem cell: an epigenetic perspective*. Cell Res, 2013. 23(1): p. 49-69.
66. Karimi, M.M., et al., *DNA methylation and SETDB1/H3K9me3 regulate predominantly distinct sets of genes, retroelements, and chimeric transcripts in mESCs*. Cell Stem Cell, 2011. 8(6): p. 676-87.

67. Looman, C., et al., *KRAB zinc finger proteins: an analysis of the molecular mechanisms governing their increase in numbers and complexity during evolution*. *Mol Biol Evol*, 2002. 19(12): p. 2118-30.
68. Witzgall, R., et al., *The Krüppel-associated box-A (KRAB-A) domain of zinc finger proteins mediates transcriptional repression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(10): p. 4514-8.
69. Margolin, J.F., et al., *Krüppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(10): p. 4509-13.
70. Huntley, S., et al., *A comprehensive catalog of human KRAB-associated zinc finger genes: insights into the evolutionary history of a large family of transcriptional repressors*. *Genome Res*, 2006. 16(5): p. 669-77.
71. Laity, J.H., B.M. Lee, and P.E. Wright, *Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity*. *Current Opinion in Structural Biology*, 2001. 11(1): p. 39-46.
72. Klug, A. and D. Rhodes, *Zinc fingers: a novel protein fold for nucleic acid recognition*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1987. 52: p. 473-82.
73. Bellefroid, E.J., et al., *The evolutionarily conserved Kruppel-associated box domain defines a subfamily of eukaryotic multifingered proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(9): p. 3608-12.
74. Ryan, R.F., et al., *KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatic and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Kruppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing*. *Mol Cell Biol*, 1999. 19(6): p. 4366-78.
75. Friedman, J.R., et al., *KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain*. *Genes Dev*, 1996. 10(16): p. 2067-78.
76. Iyengar, S. and P.J. Farnham, *KAP1 protein: an enigmatic master regulator of the genome*. *J Biol Chem*, 2011. 286(30): p. 26267-76.
77. Iyengar, S., et al., *Functional analysis of KAP1 genomic recruitment*. *Mol Cell Biol*, 2011. 31(9): p. 1833-47.
78. Ivanov, A.V., et al., *PHD domain-mediated E3 ligase activity directs intramolecular sumoylation of an adjacent bromodomain required for gene silencing*. *Mol Cell*, 2007. 28(5): p. 823-37.
79. Kondo, T., et al., *Modeling Alzheimer s Disease with iPSCs Reveals Stress Phenotypes Associated with Intracellular A² and Differential Drug Responsiveness*. *Cell stem cell*, 2013. 12(4): p. 487-496.
80. Kubota, S., et al., *Phosphorylation of KRAB-associated Protein 1 (KAP1) at Tyr-449, Tyr-458, and Tyr-517 by Nuclear Tyrosine Kinases Inhibits the Association of KAP1 and Heterochromatin Protein 1 α (HP1 α) with Heterochromatin*. *J Biol Chem*, 2013. 288(24): p. 17871-83.
81. Seki, Y., et al., *TIF1beta regulates the pluripotency of embryonic stem cells in a phosphorylation-dependent manner*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(24): p. 10926-31.
82. Cheng, B., X. Ren, and T.K. Kerppola, *KAP1 represses differentiation-inducible genes in embryonic stem cells through cooperative binding with PRC1 and derepresses pluripotency-associated genes*. *Mol Cell Biol*, 2014. 34(11): p. 2075-91.
83. Cammas, F., et al., *Mice lacking the transcriptional corepressor TIF1beta are defective in early postimplantation development*. *Development*, 2000. 127(13): p. 2955-63.
84. Wiznerowicz, M., et al., *The Kruppel-associated box repressor domain can trigger de novo promoter methylation during mouse early embryogenesis*. *J Biol Chem*, 2007. 282(47): p. 34535-41.
85. Xiao, T.Z., et al., *MAGE I transcription factors regulate KAP1 and KRAB domain zinc finger transcription factor mediated gene repression*. *PLoS One*, 2011. 6(8): p. e23747.
86. Sears, J.F., R. Repaske, and A.S. Khan, *Improved Mg²⁺-based reverse transcriptase assay for detection of primate retroviruses*. *J Clin Microbiol*, 1999. 37(6): p. 1704-8.

87. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Anal Biochem*, 1987. 162(1): p. 156-9.
88. Maherali, N., et al., *A High-Efficiency System for the Generation and Study of Human Induced Pluripotent Stem Cells*. *Cell stem cell*, 2008. 3(3): p. 340-345.
89. Sommer, C.A., et al., *Induced Pluripotent Stem Cell Generation Using a Single Lentiviral Stem Cell Cassette*. *STEM CELLS*, 2009. 27(3): p. 543-549.
90. Stadtfeld, M., et al., *Induced pluripotent stem cells generated without viral integration*. *Science*, 2008. 322(5903): p. 945-9.
91. Woltjen, K., et al., *Transgene-Free Production of Pluripotent Stem Cells Using piggyBac Transposons*, in *Human Pluripotent Stem Cells*, P.H. Schwartz and R.L. Wesselschmidt, Editors. 2011, Humana Press. p. 87-103.
92. Carey, B.W., et al., *Reprogramming factor stoichiometry influences the epigenetic state and biological properties of induced pluripotent stem cells*. *Cell Stem Cell*, 2011. 9(6): p. 588-98.
93. Bulliard, Y., et al., *KRAB can repress lentivirus proviral transcription independently of integration site*. *J Biol Chem*, 2006. 281(47): p. 35742-6.
94. Deuschle, U., W.K. Meyer, and H.J. Thiesen, *Tetracycline-reversible silencing of eukaryotic promoters*. *Mol Cell Biol*, 1995. 15(4): p. 1907-14.
95. Rubinson, D.A., et al., *A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference*. *Nat Genet*, 2003. 33(3): p. 401-6.
96. Groner, A.C., et al., *KRAB-zinc finger proteins and KAP1 can mediate long-range transcriptional repression through heterochromatin spreading*. *PLoS Genet*, 2010. 6(3): p. e1000869.
97. Aasen, T., et al., *Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes*. *Nat Biotech*, 2008. 26(11): p. 1276-1284.
98. Anchan, R.M., et al., *Amniocytes can serve a dual function as a source of iPS cells and feeder layers*. *Human Molecular Genetics*, 2011. 20(5): p. 962-974.
99. Okita, K., et al., *An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells*. *Stem Cells*, 2013. 31(3): p. 458-66.
100. Utikal, J., et al., *Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells*. *Journal of Cell Science*, 2009. 122(19): p. 3502-3510.
101. Bayart, E. and O. Cohen-Haguenaer, *Technological overview of iPS induction from human adult somatic cells*. *Curr Gene Ther*, 2013. 13(2): p. 73-92.
102. Kim, J.B., et al., *Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4*. *Nature*, 2009. 461(7264): p. 649-3.
103. Zhao, H.X., et al., *Rapid and efficient reprogramming of human amnion-derived cells into pluripotency by three factors OCT4/SOX2/NANOG*. *Differentiation*, 2010. 80(2-3): p. 123-9.
104. Ho, P.J., et al., *Endogenous KLF4 expression in human fetal endothelial cells allows for reprogramming to pluripotency with just OCT3/4 and SOX2--brief report*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. 30(10): p. 1905-7.
105. Lund, R.J., E. Narva, and R. Lahesmaa, *Genetic and epigenetic stability of human pluripotent stem cells*. *Nat Rev Genet*, 2012. 13(10): p. 732-44.
106. Taapken, S.M., et al., *Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells*. *Nat Biotechnol*, 2011. 29(4): p. 313-4.
107. Mayshar, Y., et al., *Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells*. *Cell Stem Cell*, 2010. 7(4): p. 521-31.
108. Yu, J., et al., *Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells*. *Science*, 2007. 318(5858): p. 1917-1920.

109. Smith, Z.D., et al., *Dynamic single-cell imaging of direct reprogramming reveals an early specifying event*. Nat Biotech, 2010. 28(5): p. 521-526.
110. Buganim, Y., et al., *Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchic phase*. Cell, 2012. 150(6): p. 1209-1222.
111. Mah, N., et al., *Molecular insights into reprogramming-initiation events mediated by the OSKM gene regulatory network*. PLoS One, 2011. 6(8): p. e24351.
112. Wilson, K.D., et al., *MicroRNA Profiling of Human-Induced Pluripotent Stem Cells*. Stem Cells and Development, 2009. 18(5): p. 749-757.
113. Chin, M.H., et al., *Induced Pluripotent Stem Cells and Embryonic Stem Cells Are Distinguished by Gene Expression Signatures*. Cell Stem Cell. 5(1): p. 111-123.
114. Wang, L., et al., *Gene and MicroRNA Profiling of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Endothelial Cells*. Stem Cell Reviews and Reports, 2015: p. 1-9.
115. Lister, R., et al., *Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells*. Nature, 2011. 471(7336): p. 68-73.
116. Newman, A.M. and J.B. Cooper, *Lab-Specific Gene Expression Signatures in Pluripotent Stem Cells*. Cell Stem Cell. 7(2): p. 258-262.
117. Marchetto, M.C.N., et al., *Transcriptional Signature and Memory Retention of Human-Induced Pluripotent Stem Cells*. PLoS ONE, 2009. 4(9): p. e7076.
118. Ghosh, Z., et al., *Persistent Donor Cell Gene Expression among Human Induced Pluripotent Stem Cells Contributes to Differences with Human Embryonic Stem Cells*. PLoS ONE, 2010. 5(2): p. e8975.
119. Guenther, M.G., et al., *Chromatin Structure and Gene Expression Programs of Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells*. Cell Stem Cell. 7(2): p. 249-257.
120. Taylor, C.J., et al., *Generating an iPSC bank for HLA-matched tissue transplantation based on known donor and recipient HLA types*. Cell Stem Cell, 2012. 11(2): p. 147-52.
121. Masip, M., et al., *Reprogramming with defined factors: from induced pluripotency to induced transdifferentiation*. Molecular Human Reproduction, 2010. 16(11): p. 856-868.
122. Zhao, X.-y., et al., *iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation*. Nature, 2009. 461(7260): p. 86-90.
123. Wesselschmidt, R.L., *The teratoma assay: an in vivo assessment of pluripotency*. Methods Mol Biol, 2011. 767: p. 231-41.
124. Kurosawa, H., *Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2007. 103(5): p. 389-398.
125. Wang, J., et al., *A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells*. Nature, 2006. 444(7117): p. 364-8.
126. Sato, N., et al., *Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor*. Nat Med, 2004. 10(1): p. 55-63.
127. Niwa, H., et al., *Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3*. Genes Dev, 1998. 12(13): p. 2048-60.
128. Tai, C.I., E.N. Schulze, and Q.L. Ying, *Stat3 signaling regulates embryonic stem cell fate in a dose-dependent manner*. Biol Open, 2014. 3(10): p. 958-65.
129. Ying, Q.L., et al., *The ground state of embryonic stem cell self-renewal*. Nature, 2008. 453(7194): p. 519-23.
130. Tai, C.I. and Q.L. Ying, *Gbx2, a LIF/Stat3 target, promotes reprogramming to and retention of the pluripotent ground state*. J Cell Sci, 2013. 126(Pt 5): p. 1093-8.
131. Hu, G., et al., *A genome-wide RNAi screen identifies a new transcriptional module required for self-renewal*. Genes Dev, 2009. 23(7): p. 837-48.
132. Kurisaki, A., et al., *Chromatin-related proteins in pluripotent mouse embryonic stem cells are downregulated after removal of leukemia inhibitory factor*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. 335(3): p. 667-75.

133. Singh, K., et al., *A KAP1 phosphorylation switch controls MyoD function during skeletal muscle differentiation*. *Genes Dev*, 2015. 29(5): p. 513-25.
134. Ang, Y.S., et al., *Wdr5 mediates self-renewal and reprogramming via the embryonic stem cell core transcriptional network*. *Cell*, 2011. 145(2): p. 183-97.
135. Kidder, B.L., et al., *Extended self-renewal and accelerated reprogramming in the absence of Kdm5b*. *Mol Cell Biol*, 2013. 33(24): p. 4793-810.

SPIS TABEL I RYCIN

TABELE

Tab. 1 Przeciwciała pierwszo- i drugorzędowe wykorzystywane w analizach opartych na barwieniach immunofluorescencyjnych.....	32
Tab. 2 Sekwencje starterów wykorzystanych w analizie RT-PCR	34
Tab. 3 Startery i pasujące sondy UPL wykorzystane w analizie ilościowego RT-PCR w czasie rzeczywistym. Pz – pary zasad.....	36
Tab. 4 Sekwencje siRNA swoistego dla genu TRIM28, wykorzystanych w przeprowadzonych badaniach.....	39
Tab. 5 Ilościowy skład mieszaniny transfekcyjnej w zależności od rodzaju naczynia hodowlanego	40
Tab. 6 Przeciwciała pierwszo- i drugorzędowe wykorzystywane w analizie opartej na technice cytometrii przepływowej.....	41
Tab. 7 Wydajność reprogramowania ludzkich fibroblastów w kierunku komórek iPS.....	49

RYCINY

Ryc. 1 Schemat działanie systemu ekspresji regulowanej doksycykliną	16
Ryc. 2 Struktura domeny palca cynkowego typu C2-H2 oraz domena KRAB.	19
Ryc. 3 Schemat struktury pierwszorzędowej białka TRIM28	21
Ryc. 4 Rola białka KAP1 w procesie negatywnej regulacji transkrypcji.....	22
Ryc. 5 Mapa wektora plazmidowego pLVE-HK.....	26
Ryc. 6 Mapa wektora plazmidowego psPAX2	27
Ryc. 7 Mapa wektora plazmidowego pMD2.G.....	27
Ryc. 8 Mapa wektora plazmidowego pHAGE2-hSTEMCCA-EF1 α -loxP	28
Ryc. 9 Mapa wektora plazmidowego pLVPT-rtTRKRAB-2SM2	28
Ryc. 10 Mapa wektora plazmidowego pStemcca-tetO	43
Ryc. 11 Analiza restrykcyjna otrzymanego w wyniku klonowania wektora pStemcca-tetO.	44
Ryc. 12 Analiza RT-qPCR w czasie rzeczywistym poziomu ekspresji transgeny z wektora Stemcca-tetO w komórkach MCF7/HK/Stemcca-tetO.	45
Ryc. 13 . Zdjęcia mikroskopowe, przedstawiające morfologię czterech linii ludzkich pierwotnych fibroblastów (PHDF X, 11, 25, 26) wybranych do dalszych etapów badań	46
Ryc. 14 Schemat obrazujący zmiany w morfologii ludzkich fibroblastów w trakcie procesu reprogramowania w kierunku komórek iPS	46
Ryc. 15 Morfologia kolonii wybranych linii komórek iPS otrzymanych w wyniku reprogramowania ludzkich fibroblastów w porównaniu do kontrolnej linii hES	48
.....Ryc. 16 Analiza ekspresji egzogennych czynników reprogramujących ulegających ekspresji z wektora Stemcca-tetO	48
Ryc. 17 Analiza kariotypu linii komórkowych ludzkich fibroblastów oraz pochodzących od nich linii komórek iPS.....	49
Ryc. 18 Analiza ekspresji markerów pluripotencji, oparta na reakcji RT-PCR w 8 analizowanych liniach komórek iPS oraz linii kontrolnej komórek hES BG01V.	50

Ryc. 19 Analiza ekspresji markerów pluripotencji oparta na barwieniach immunofluorescencyjnych w reprezentatywnej linii komórek iPS oraz linii komórek hES.	51
Ryc. 20 Obraz elektroforegramów prób RNA wyizolowanych z analizowanych linii komórek iPS, PHDF oraz hES BG01V.....	53
Ryc. 21 Analiza głównych składowych linii komórkowej hES BG01V, 4 linii fibroblastów oraz 8 linii wywodzących się z nich linii komórkowych iPS.	53
Ryc. 22 Analiza poziomu korelacji (ang. <i>Correlation plot</i>) pomiędzy linią komórkową hES BG01V, 4 liniami fibroblastów oraz 8 liniami wywodzących się z nich linii komórkowych iPS.	54
Ryc. 23 Profil ekspresji przedstawiony jako heat-mapa ekspresji różnicowej w linii komórkowej hES BG01V 4 linii fibroblastów oraz 8 linii wywodzących się z nich linii komórkowych iPS.	55
Ryc. 24 Morfologia ciał embrionalnych agregujących w hodowli zawieszinowej.....	56
Ryc. 25 Analiza ekspresji markerów komórek wywodzących się z ekto-, mezo- i endodermy w ciałach embrionalnych otrzymanych z komórek iPS oraz hES BG01V.....	56
Ryc. 26 Reprezentatywne guzy typu potworniaki, wywodzące się z analizowanych linii komórek iPS oraz linii hES BG01V.....	57
Ryc. 27 Analiza histologiczna reprezentatywnych guzów typu potworniaki, wywodzących się z badanych komórek iPS oraz linii kontrolnej komórek hES.	58
Ryc. 28 Analiza immunocytochemiczna reprezentatywnych guzów typu potworniaki, wywodzących się z badanych komórek iPS oraz linii kontrolnej komórek hES.	59
Ryc. 29 Analiza ekspresji egzogennych czynników reprogramujących ze zintegrowanego wektora Stemcca-tetO.....	59
Ryc. 30 Schemat eksperymentu mającego na celu wykazać rolę TRIM28 w procesie samoodnowy komórek pluripotencyjnych.	60
Ryc. 31 Analiza poziomu ekspresji TRIM28 w komórkach iPS. Komórki traktowano różnym stężeniem reagentów interferencji RNA (20nM i 50nM) w trzech punktach czasowych: 24, 48 i 72 godziny po transfekcji.	61
Ryc. 32 Analiza ilościowa RT-PCR względnego poziomu ekspresji TRIM28 w ludzkich komórkach iPS. Komórki analizowano w trzech punktach czasowych eksperymentu – dzień 7, 14 i 21.....	62
Ryc. 33 Ekspresji białka TRIM28 w komórkach iPS i hES.....	62
Ryc. 34 Analiza cytometryczna cyklu komórkowego w komórkach traktowanych siRNA kontrolnym (CT) oraz specyficznym dla genu TRIM28 (TRIM28KD) w odniesieniu do komórek typu dzikiego (WT).	63
Ryc. 35 Analiza cytometryczna procesu apoptozy w komórkach traktowanych siRNA specyficznym dla genu TRIM28 (TRIM28KD) w odniesieniu do komórek typu dzikiego (WT)...	64
Ryc. 36 Obraz mikroskopowy czterech wariantów komórkowych linii komórek iPS i hES, po 21 dniach hodowli.	64
Ryc. 37 Reprezentatywny wynik analizy cytometrycznej ekspresji zewnątrzkomórkowych markerów pluripotencji w komórkach kontrolnych oraz w komórkach z wyciszoną ekspresją TRIM28 linii komórkowych hES i iPS 26.6, po 21 dniach hodowli.	65
Ryc. 38 Ilościowa analiza RT-PCR w czasie rzeczywistym względnego poziomu ekspresji markerów pluripotencji OCT3/4 i NANOG, w komórkach iPS i hES.....	66
Ryc. 39 Analiza immunofluorescencyjna ekspresji wewnątrzkomórkowych markerów pluripotencji Oct3/4 i Nanog, białka TRIM28 oraz H3K9me3 w komórkach hES i iPS.....	67
Ryc. 40 Analiza ilościowa RT-PCR w czasie rzeczywistym względnego poziomu ekspresji markerów różnicowania komórkowego.....	69