

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Wydział Biologii



Rola czynnika transkrypcyjnego ETV1 w adhezji ludzkich
pluripotencjalnych komórek macierzystych i rozwoju *in vitro*
ludzkiej endokrynej trzustki

Natalia Maria Ziojła

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Ekspresji Genów

Promotor: prof. UAM dr hab. Małgorzata Borowiak

Poznań, 2022

Dziękuję wszystkim, którzy przyczynili się do powstania niniejszej pracy.

Składam serdeczne podziękowania mojej promotorce

prof. UAM dr hab. Małgorzacie Borowiak

za opiekę naukową, cenne wskazówki merytoryczne oraz wszelką pomoc i wsparcie udzielone podczas przygotowania rozprawy doktorskiej.

A także:

dr Katarzynie Błaszczyk

dr. Wojciechowi Szlachcicowi

dr. Arturowi Jankowskiemu

za owocne dyskusje naukowe, wsparcie, wszelką pomoc i życzliwość.

Współpracownikom z Laboratorium Komórek Macierzystych dziękuję za inspirację do rozwoju i miłą atmosferę pracy.

Rodzinie i przyjaciołom dziękuję za nieustające wsparcie.

Dla Davida i Bianki

W trakcie realizacji pracy doktorskiej byłam współautorką następujących publikacji i doniesień konferencyjnych

Artykuły związane z tematyką rozprawy:

- 1) Wojciech J. Szlachcic, **Natalia Ziojła**, Dorota K. Kizewska, Marcelina Kempa and Małgorzata Borowiak, “*Endocrine pancreas development and dysfunction through the lens of single-cell RNA-sequencing*”, *Frontiers in Cell and Developmental Biology, Stem Cell Research*, 04.2021, DOI: 10.3389/fcell.2021.629212
- 2) Anna P. Jędrzejak, Edyta Urbaniak, Jadwiga Waśko, **Natalia Ziojła**, Małgorzata Borowiak, “*Diabetes and SARS-CoV-2 – is there a mutual connection?*”, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 06.2022, DOI: 10.3389/fcell.2022.913305
- 3) Wojciech J. Szlachcic, Agnieszka Dąbrowska, Aleksandra Milewska, **Natalia Ziojła**, Katarzyna Błaszczuk, Emilia Barreto-Duran, Marek Sanak, Marcin Surmiak, Katarzyna Owczarek, Dariusz Grzanka, Julia Durzyńska, Krzysztof Pyrc, Małgorzata Borowiak, “*SARS-CoV-2 infects an in vitro model of the human developing pancreas through endocytosis*”, *iScience*, 06.2022, DOI: 10.1016/j.isci.2022.104594

Artykuły związane z tematyką inną niż rozprawa:

- 1) Ewa Szczuka, Sylwia Krzywińska, **Natalia Bogucka**, Adam Kaznowski, „*Multifactorial mechanisms of the pathogenesis of methicillin-resistant Staphylococcus hominis isolated from bloodstream infections*”, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 01.2018, DOI: 10.1007/s10482-017-1007-3

Doniesienia konferencyjne:

- 1) **Natalia Bogucka**, Małgorzata Borowiak, poster pt. „*In vitro modeling of brittle diabetes using human iPSCs*”, międzynarodowa konferencja w dniach 6–8 kwietnia 2017 r. „Międzynarodowa konferencja Naukowo-Dydaktyczna – Wyzwania współczesnej biologii, biotechnologii, bioinformatyki i ochrony środowiska” Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań
- 2) **Natalia Ziojła**, referat ustny pt. „*The role of Nuclear factor I/A in the pancreatic cell fate determination*”, międzynarodowa konferencja w dniach 8–13 kwietnia 2019 r. „Międzynarodowa Konferencja Naukowo-Dydaktyczna – Wyzwania współczesnych nauk o życiu” Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań
- 3) **Natalia Ziojła**, Małgorzata Borowiak, poster pt. „*Exploring the role of the ETV1 transcription factor in human pancreatic development*”, konferencja w dniach 22–24 września 2020 r. „BioLOGIES: Bioinspiration, Inventions and Breakthrough technologies”, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań
- 4) **Natalia Ziojła**, referat ustny pt. „*Exploring ETV1 role in attachment of human pluripotent stem cells to the matrix*”, konferencja w dniach 22–24 września 2021 r. “COMPASS: the future of interdisciplinary science”, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów	7
Streszczenie.....	13
Abstract.....	16
1. Wstęp.....	18
1.1. Pluripotencjalne komórki macierzyste	18
1.2. Spektrum pluripotencji.....	21
1.3. Mechanizmy regulujące pluripotencję <i>in vitro</i>	25
1.3.1. Regulacja genetyczna.....	25
1.3.2. Ścieżki sygnalizacyjne	27
1.3.2.1. Sygnalizacja TGFβ i BMP.....	27
1.3.2.2. Sygnalizacja FGF.....	30
1.3.2.3. Sygnalizacja LIF/JAK/STAT3	32
1.3.2.4. Sygnalizacja WNT.....	34
1.3.2.5. Sygnalizacja PI3K/AKT	36
1.4. Nisza ludzkich komórek PSC <i>in vitro</i>	38
1.5. Zastosowanie komórek macierzystych w terapii w medycynie regeneracyjnej.....	41
1.6. Budowa i funkcja trzustki.....	45
1.7. Cukrzyca jako cel medycyny regeneracyjnej	47
1.8. Rozwój komórek endokrynych trzustki na tle embriogenezy trzustki	49
1.9. Różnicowanie <i>in vitro</i> ludzkich PSC do komórek β produkujących insulinę.....	51
1.10. Czynniki transkrypcyjny ETV1.....	55
2. Cel pracy	60
3. Wyniki.....	61
3.1. Selekcja ETV1 z danych scRNA-Seq z embrionalnej mysiej trzustki	62
3.2. Potwierdzenie ekspresji <i>ETV1</i> w ogólnodostępnych bazach danych z eksperymentów scRNA-Seq.....	63
3.2.1. Ekspresja <i>ETV1</i> na etapie pluripotencji w ludzkich komórkach PSC	63
3.2.2. Ekspresja <i>ETV1</i> w rozwijającej się trzustce podczas różnicowania <i>in vitro</i> z ludzkich komórek PSC.....	65
3.2.3. Ekspresja <i>ETV1</i> w rozwijającej się ludzkiej trzustce	67
3.2.4. Ekspresja <i>ETV1</i> w dojrzałej ludzkiej trzustce	69
3.2.5. Ekspresja <i>Etv1</i> w rozwijającej się mysiej trzustce	71
3.3. Obecność białka ETV1 w modelach mysim i ludzkim	75
3.3.1. Embrionalna i rozwinięta mysia trzustka	75
3.3.2. Ludzkie komórki PSC	76
3.3.3. Różnicowanie <i>in vitro</i> ludzkich PSC w kierunku komórek β trzustki	78

3.4.	Wyłączenie ekspresji <i>ETV1</i> w ludzkich komórkach PSC za pomocą metody CRISPR/Cas9	80
3.4.1.	Ustalenie stężenia sgRNA	82
3.4.2.	Identyfikacja linii klonalnych z wyłączoną ekspresją <i>ETV1</i>	88
3.5.	Charakterystyka fenotypu ludzkich komórek PSC z wyłączoną ekspresją <i>ETV1</i>	92
3.5.1.	Wpływ wyłączenia ekspresji <i>ETV1</i> na homeostazę ludzkich komórek PSC.....	92
3.5.2.	Określenie różnic na poziomie transkryptomu z użyciem metody RNA-Seq	100
3.5.3.	Poziom białek adhezyjnych w ludzkich komórkach PSC typu dzikiego i ETV1-KO.....	120
3.5.4.	Podwyższona ekspresja ETV1 w ludzkich komórkach PSC	122
3.5.5.	Modulacja ścieżki sygnalizacyjnej PI3K/AKT w ludzkich komórkach PSC typu dzikiego i ETV1-KO	125
3.5.6.	Badanie pluripotencji w ludzkich komórkach PSC typu dzikiego i ETV1-KO	132
3.5.7.	Modulacja ścieżki sygnalizacyjnej WNT podczas różnicowania w kierunku endodermy komórek PSC typu dzikiego i ETV1-KO	134
3.5.8.	Identyfikacja genów bezpośrednio regulowanych przez ETV1 w ludzkich komórkach PSC z użyciem metody ChIP-Seq i CUT&RUN	137
3.6.	Wpływ wyłączenia ekspresji <i>ETV1</i> na różnicowanie ludzkich komórek PSC.....	141
3.6.1.	Różnicowanie <i>in vitro</i> spontaniczne.....	141
3.6.2.	Różnicowanie <i>in vitro</i> w kierunku komórek β trzustki	147
3.6.2.1.	Określenie różnic w morfologii i syntezie białek markerowych dla poszczególnych etapów różnicowania <i>in vitro</i> do komórek β trzustki.....	147
3.6.2.2.	Określenie różnic na poziomie transkryptomu w komórkach PP zróżnicowanych z komórek PSC typu dzikiego i ETV1-KO	152
4.	Dyskusja i perspektywy na przyszłe badania.....	184
5.	Podsumowanie.....	192
6.	Materiały i metody	195
6.1.	Hodowla <i>in vitro</i> ludzkich komórek PSC.....	195
6.2.	Wyprowadzenie linii klonalnych ludzkich komórek PSC z wyłączoną ekspresją genu <i>ETV1</i>	197
6.3.	Analiza poziomu ekspresji genów metodą qPCR	200
6.4.	Analiza transkryptomu	203
6.5.	Analiza adhezji.....	205
6.6.	Analiza w IncuCyte	207
6.7.	Podwyższona ekspresja <i>ETV1</i>	207
6.8.	Analiza białek.....	210
6.9.	Różnicowanie <i>in vitro</i> ludzkich komórek PSC	213
6.10.	Spis materiałów	216
7.	Spis literaturowy	222

Wykaz stosowanych skrótów

-	-	
log ₁₀ (adj.pval)	-	ujemny logarytm ₁₀ ze skorygowanej wartości p
804-G	-	linia komórkowa wyizolowana ze szczurzego nowotworu pęcherza moczowego (ang. <i>bladder carcinoma cells variant 804-G</i>)
ADAMTS16	-	metalopeptydaza ADAM z motywem trombospondyny typu 1/16 (ang. <i>ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 16</i>)
ADAMTS5	-	dezintegrina i metaloproteinaza z motywami trombospondyny 5 (ang. <i>disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5</i>)
AKT (PKB)	-	kinazy białkowej AKT, inaczej kinaza białkowa B (ang. <i>AKT/protein kinase B</i>)
APC	-	białko gruczolakowatej polipowatości okrężnicy (ang. <i>adenomatous polyposis coli protein</i>)
APC2	-	regulator APC ścieżki sygnalizacyjnej WNT (ang. <i>adenomatous polyposis coli protein 2</i>)
AURKB	-	kinaza aurora B (ang. <i>aurora kinase B</i>)
bFGF	-	podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. <i>basic fibroblast growth factor</i>)
Blc3	-	współaktywator transkrypcji Blc3 (ang. <i>Blc3 transcription coactivator</i>)
BMP	-	białka morfogenetyczne kości (ang. <i>bone morphogenetic proteins</i>)
BP	-	analizy procesów biologicznych (ang. <i>biological processes</i>)
Cas9	-	białko 9 związane z CRISPR (ang. <i>CRISPR associated protein 9</i>)
CC	-	analizy lokalizacji białek w komórce (ang. <i>cellular component</i>)
CDH1	-	e-kadheryna (ang. <i>e-cadherin</i>)
CHGA	-	chromogranina A (ang. <i>chromogranin A</i>)
ChIP	-	immunoprecypitacja chromatyny (ang. <i>chromatin immunoprecipitation</i>)
CK1	-	binazę kazeinowa 1 (ang. <i>casein kinase 1</i>)
COL3A1	-	kolagen typu III α1 (ang. <i>collagen type III α1</i>)
COL4A6	-	kolagen typu IV α6 (ang. <i>collagen type IV α6</i>)
C-PEP	-	peptyd C (ang. <i>c-peptide</i>)
CUT&RUN	-	technologia CUT&RUN (ang. <i>cleavage under targets & release using nuclease</i>)
CRISPR	-	zgrupowane, regularnie rozproszone, krótkie, powtarzające się sekwencje palindromiczne (ang. <i>clustered regularly-interspaced short palindromic repeats</i>)
DE	-	stadium komórek endodermy (ang. <i>definitive endoderm</i>)

DPPA5	– gen powiązany z pluripotencją rozwojową 5	(ang. <i>developmental pluripotency associated 5</i>)
DUSP6	– fosfataza 6 o podwójnej swoistości	(ang. <i>dual specificity phosphatase 6</i>)
DVL	– białko DVL	(ang. <i>dishevelled</i>)
e	– oznaczenie dnia embriogenezy u myszy	(ang. <i>embryonic day</i>)
ECM	– macierz zewnątrzkomórkowa	(ang. <i>extracellular matrix</i>)
EGF	– embrionalny czynnik wzrostu	(ang. <i>embryonic growth factor</i>)
EHS	– mysi nowotwór Engelbreth-Holm-Swarm	(ang. <i>Engelbreth-Holm-Swarm sarcoma</i>)
EMT	– przejście epithelialno-mezenchymalne	(ang. <i>epithelial to mesenchymal transition</i>)
EP	– komórki prekursorowe endokrynnej trzustki	(ang. <i>endocrine progenitors</i>)
ERK	– kinaza regulowana sygnałem pozakomórkowym	(ang. <i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
ERM	– cząsteczka związana z ETS	(ang. <i>ETS-related molecule</i>)
ESC	– embrionalne pluripotencjalne komórki macierzyste	(ang. <i>embryonic stem cells</i>)
ETS	– rodzina czynników transkrypcyjnych E-dwadzieścia sześć	(ang. <i>E-twenty-six transcription factors</i>)
ETV1	– czynnik transkrypcyjny ETV1, inaczej ER81	(ang. <i>ETS variant transcription factor 1</i>)
ETV1-KO	– linia komórkowa PSC klonu H3 z wyłączoną ekspresją <i>ETV1</i>	(ang. <i>ETV1 knock-out</i>)
EWS	– białko mięsaka Ewinga	(ang. <i>Ewing's sarcoma protein</i>)
FAK	– kinaza ogniskowej adhezji	(ang. <i>focal adhesion kinase</i>)
FC	– współczynnik zmiany między próbkami	(anh. <i>fold change</i>)
FCS	– cieleńca surowica płodowa	(ang. <i>fetal calf serum</i>)
FDR	– współczynnik fałszywych odkryć	(ang. <i>false discovery rate</i>)
FGF	– czynnik wzrostu fibroblastów	(ang. <i>fibroblast growth factor</i>)
FGF4	– czynnik wzrostu fibroblastów 4	(ang. <i>fibroblast growth factor 4</i>)
FGF5	– czynnik wzrostu fibroblastów 5	(ang. <i>fibroblast growth factor 5</i>)
FGF6	– czynnik wzrostu fibroblastów 6	(ang. <i>fibroblast growth factor 6</i>)
FGF9	– czynnik wzrostu fibroblastów 9	(ang. <i>fibroblast growth factor 9</i>)
FOXA2	– czynnik transkrypcyjny FOXA2	(ang. <i>forkhead box A2</i>).
FZD	– receptory FZD	(ang. <i>frizzled</i>)
GATA4	– białko wiążące GATA 4	(ang. <i>GATA binding protein 4</i>)
GATA6	– czynnik wiążący GATA 6	(ang. <i>GATA binding protein 6</i>)
GCG	– glukagon	(ang. <i>glucagon</i>)
GDF	– czynniki wzrostu i różnicowania	(ang. <i>growth and differentiation factors</i>)

GFP	– białko zielonej fluorescencji	(ang. <i>green fluorescent protein</i>)
GSK3 β	– kinaza syntazy glikogenu β	(ang. <i>glycogen synthase kinase 3β</i>)
HDF	– linia komórkowa ludzkich fibroblastów	(ang. <i>human dermal fibroblasts</i>)
HDR	– rekombinacja homologiczna	(ang. <i>homology-directed repair</i>)
IGF	– czynnik wzrostu podobny do insuliny	(ang. <i>insulin-like growth factor</i>)
IgG	– immunoglobulina G	(ang. <i>immunoglobulin G</i>)
INS	– insulina	(ang. <i>insulin</i>)
INSM1	– białko związane z insulinoma 1	(ang. <i>insulinoma-associated protein 1</i>)
iPSC	– indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste	(ang. <i>induced pluripotent stem cells</i>)
IRX1	– czynnik transkrypcyjny IRX1	(ang. <i>iroquois homeobox 1</i>)
ITGA5	– integryna 5 α	(ang. <i>integrin 5α</i>)
ITGA9	– integryna 9 α	(ang. <i>integrin 9α</i>)
ITPR3	– 1,4,5-trifosforan inozytoli	(ang. <i>inositol 1,4,5-trisphosphate</i>)
JAK	– kinaza Janusa	(ang. <i>janus kinase</i>)
KGF	– czynnika wzrostu keranocytów	(ang. <i>keratinocyte growth factor</i>)
KLF2	– czynnik Kruppela 2	(ang. <i>Kruppel-like factor 2</i>)
KLF4	– czynnik Kruppela 4	(ang. <i>Kruppel-like factor 4</i>)
KLF5	– czynnik Kruppela 5	(ang. <i>Kruppel-like factor 5</i>)
KLF5	– czynnik Kruppela 17	(ang. <i>Kruppel-like factor 17</i>)
LEF	– czynnik wzmacniający komórki limfoidalne	(ang. <i>lymphoid enhancer factor</i>)
LEFTY	– czynnik determinacji stron lewo-prawo	(ang. <i>left-right determination factor</i>)
LIF	– czynnik hamujący leukemię	(ang. <i>leukemia inhibitory factor</i>)
LIN28	– homolog A LIN-28	(ang. <i>LIN-28 homolog A</i>)
LPR	– receptor lipoprotein o niskiej gęstości	(ang. <i>low-density lipoprotein related receptor</i>)
MAFA	– czynnik transkrypcyjny MAFA	(ang. <i>MAF bZIP transcription factor A</i>)
MAPK	– kinazy białkowe aktywowane mitogenami	(ang. <i>mitogen-activated protein kinases</i>)
MEF	– mysie embrionalne fibroblasty	(ang. <i>mouse embryonic fibroblasts</i>)
mEpiSC	– mysie epiblastyczne komórki macierzyste	(ang. <i>mouse epiblast stem cells</i>)
MESP1	– czynnik transkrypcyjny mezodermy posterior bHLH	(ang. <i>mesoderm posterior bHLH transcription factor 1</i>)
MKI67	– marker proliferacji ki-67	(ang. <i>marker of proliferation ki-67</i>)

mTOR	– kinaza ssaczy cel rapamycyny	(ang. <i>mammalian target of rapamycin kinase</i>)
MYL9	– lekki łańcuch miozyny 9	(ang. <i>myosin light chain 9</i>)
NANOG	– czynnik transkrypcyjny NANOG	(ang. <i>Nanog homeobox</i>)
NETO1	– neuropilina „tolloid like” 1	(ang. <i>neuropilin and tolloid like 1</i>)
NEUROD1	– czynnik transkrypcyjny neuronalnego różnicowania 1	(ang. <i>neuronal differentiation 1</i>)
NGN3	– neurogenina 3	(ang. <i>neurogenin 3</i>),
NHEJ	– rekombinacja niehomologiczna	(ang. <i>non-homologous end joining</i>)
NKX6-1	– czynnika transkrypcyjny NKX6-1	(ang. <i>NK6 homeobox 1</i>)
NLGL1	– neuroligina 1	(ang. <i>neuroligin 1</i>)
NT-ESC	– podobne do embrionalnych pluripotencjalne komórki macierzyste uzyskane na drodze transferu jądrowego	(ang. <i>nuclear transfer embryonic stem cells</i>)
OTX2	– ortodontyczny gen 2	(ang. <i>orthodenticle homeobox 2</i>)
OTX3	– ortodontyczny gen 3	(ang. <i>orthodenticle homeobox 3</i>)
Parmel7	– gen kodujący białko podobne do PRAME 7	(ang. <i>PRAME like 7</i>)
PAX4	– czynnik transkrypcyjny PAX4	(ang. <i>paired box 4</i>)
PAX6	– czynnik transkrypcyjny PAX6	(ang. <i>paired box 6</i>)
PCDHB2	– protokadheryna $\beta 2$	(ang. <i>protocadherin $\beta 2$</i>)
PCK2	– karboksykinaza fosfoenolopirogronianowa 2	(ang. <i>phosphoenolpyruvate carboxykinase 2</i>)
PDGFR α	– receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu α	(ang. <i>platelet-derived growth factor receptor α</i>)
PDGFR β	– receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu β	(ang. <i>platelet-derived growth factor receptor β</i>)
PDK1	– kinaza 1 zależna od fosfatydyloinozytolu	(ang. <i>phosphoinositide-dependent kinase 1</i>)
PDX1	– czynnik transkrypcyjny trzustki i dwunastnicy 1	(ang. <i>pancreatic and duodenal homeobox 1</i>)
PEA3	– aktywator 3 wzmacniacza poliomy	(ang. <i>polyomavirus enhancer activator 3</i>)
PGT	– endoderma przedjelitowa	(ang. <i>primitive gut tube</i>)
PI3K	– kinaza 3-fosfatydyloinozytolu	(ang. <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>)
PIP2	– 4,5-bifosforan fosfatydyloinozytolu	(ang. <i>phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>)
PIP3	– 3,4,5-trifosforan fosfatydyloinozytolu	(ang. <i>phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate</i>)
Pol II	– polimeraza II	(ang. <i>polymerase II</i>)
POU5F1, OCT3/4	– domena POU klasy 5 homeobox 1	(ang. <i>domain POU class 5 homeobox 1</i>)

PP	– komórki prekursorowe trzustki	(ang. <i>pancreatic progenitors</i>)
PSC	– pluripotencjalne komórki macierzyste	(ang. <i>pluripotent stem cells</i>)
PTF1A	– swoisty czynnik transkrypcyjny trzustki 1A	(ang. <i>pancreas specific transcription factor 1A</i>)
PXN	– paksylina	(ang. <i>paxillin</i>)
pz	– par zasad	
RA	– kwas retinowy	(ang. <i>retinoic acid</i>)
RFX6	– czynnik regulujący X6	(ang. <i>regulatory factor X6</i>)
RIN	– współczynnik integralności RNA	(ang. <i>RNA integrity</i>)
RNA-Seq	– sekwencjonowanie mRNA	(ang. <i>RNA sequencing</i>)
ROCKi (Y-27632)	– inhibitory kinazy Rho ROCK	(ang. <i>Rho kinase ROCK inhibitors</i>)
RTK	– receptor kinazy tyrozyny	(ang. <i>receptor tyrosine kinase</i>)
RYR2	– receptor ryanodyny 2	(ang. <i>ryanodine receptor 2</i>)
scRNA-Seq	– sekwencjonowanie RNA z pojedynczych komórek	(ang. <i>single-cell RNA sequencing</i>)
SFRP2	– białko pokrewne z frizzled 2	(ang. <i>frizzled related protein 2</i>)
sgRNA	– cząsteczka RNA naprowadzająca enzym Cas9	(ang. <i>single guide RNA</i>)
SHH	– sygnalizacja sonic hedgehog	(ang. <i>sonic hedgehog pathway</i>)
SLIT3	– białko homologu szczeliny 3	(ang. <i>slit guidance ligand 3</i>)
SOX1	– czynnik transkrypcyjny SRY-box 1	(ang. <i>SRY-box transcription factor 1</i>)
SOX1	– czynnik transkrypcyjny SRY-box 1	(ang. <i>SRY-box transcription factor 1</i>)
SOX17	– czynnik transkrypcyjny SRY-box 17	(ang. <i>SRY-box transcription factor 17</i>)
SOX2	– czynnik transkrypcyjny SRY-box 2	(ang. <i>SRY-box transcription factor 2</i>)
SOX7	– czynnik transkrypcyjny SRY-box 7	(ang. <i>SRY-box transcription factor 7</i>)
SOX9	– czynnik transkrypcyjny SRY-box 9	(ang. <i>SRY-box transcription factor 9</i>)
SSEA4	– specyficzny dla stadium antygen embrionalny 4	(ang. <i>stage-specific embryonic antigen 4</i>)
STAT3	– przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji 3	(ang. <i>signal transducer and activator of transcription 3</i>)
Tbx3	– czynnik transkrypcyjny T-box 3	(ang. <i>T-box transcription factor 3</i>)
TCF	– czynnik transkrypcyjny komórek T	(ang. <i>T-cell factor</i>)

TGF β	– transformujący czynnik wzrostu β	(ang. <i>transforming growth factor β</i>)
TOP2A	– topoisomeraza DNA II α	(ang. <i>DNA topoisomerase IIα</i>)
TRA-1-60	– antygen powierzchniowy TRA-1-60	
TRA-1-81	– antygen powierzchniowy TRA-1-81	
TNNT2	– troponina T2	(ang. <i>troponin T2, cardiac type</i>)
tSNE	– stochastyczna metoda porządkowania sąsiadów w oparciu o rozkład t	(ang. <i>t-distributed stochastic neighbor embedding</i>)
UMI	– unikalny identyfikator molekularny	(ang. <i>unique molecular identifier</i>)
UTF1	– niezróżnicowany czynnik transkrypcyjny komórek embrionalnych 1	(ang. <i>undifferentiated embryonic cell transcription factor 1</i>)
VCL	– winkulina	(ang. <i>vinculin</i>)
WNT	– sygnalizacja zintegrowanego miejsca związanego z bezskrzydłowością	(ang. <i>wingless-related integration site</i>)
ZIC2	– 2 członek rodziny związanej z palcem cynkowym	(ang. <i>zic family member 2</i>)

Streszczenie

Trzustka jest narządem gruczołowym odgrywającym istotną rolę w wytwarzaniu i uwalnianiu enzymów trawiennych (część zewnątrzwydzielnicza) oraz hormonów regulujących homeostazę glukozy (część endokrynną). Komórki endokrynnie trzustki tworzą wyspy Langerhansa, w których najczęściej komórek (około 90%) to komórki α i β . Komórki β kontrolują homeostazę glukozy poprzez wydzielanie insuliny w odpowiedzi na podwyższony poziom cukru w krwi. Insulina umożliwia wychwyt glukozy z krwi przez komórki w tkankach obwodowych, gdzie cukier jest magazynowany (np. w hepatocytach) lub wykorzystywany jako źródło energii (np. w mięśniach). W przeciwieństwie do komórek β , komórki α wydzielające glukagon zwiększają poziom cukru we krwi poprzez stymulowanie hepatocytów do lizy zmagazynowanego glikogenu i uwalniania glukozy. Długotrwałe zakłócenie homeostazy glukozy może prowadzić do przewlekłej choroby metabolicznej – cukrzycy. Typową cechą charakterystyczną każdego typu cukrzycy jest zmniejszona produkcja insuliny spowodowana utratą komórek β w wyniku ataku autoimmunologicznego (w cukrzycy typu 1) lub upośledzenia funkcji komórek β lub receptorów insuliny w tkankach obwodowych (w cukrzycy typu 2). Obecne strategie terapeutyczne polegają na kontrolowaniu homeostazy węglowodanów poprzez zdrowy tryb życia, wraz z zastosowaniem zastrzyków z insuliną. Dodatkowo stosuje się leki odpowiednio stymulujące lub hamujące wydzielanie insuliny i glukagonu. Jednak te sposoby leczenia powodują niedogodności dla pacjentów z cukrzycą i nie oferują wyleczenia.

Ludzkie pluripotencjalne komórki macierzyste (hPSC) zapewniają potencjalnie nieograniczone źródło komórek do terapii komórkowej w medycynie regeneracyjnej. Regeneracja masy komórek β powstałych z różnicowania hPSC *in vitro* stanowi atrakcyjną alternatywę przywracania normoglikemii u pacjentów z cukrzycą. Warto pamiętać, że lepsze zrozumienie biologii komórek macierzystych jest wymagane do utrzymania wysokiej jakości hodowli hPSC i wysoce wydajnego różnicowania *in vitro* do wszystkich linii.

Na podstawie danych uzyskanych z sekwencjonowania z pojedynczych komórek (scRNA-Seq) mysich trzustek z dnia embrionalnego 14,5, wyselekcjonowałam czynnik transkrypcyjny *Etv1*. Co ciekawe, ekspresja *Etv1* była ograniczona do endokrynnych komórek prekursorowych i nowo powstałych komórek α i β . Na podstawie tych obserwacji można sugerować, że *Etv1* bierze udział w dojrzewaniu endokrynnych komórek progenitorowych i ich specyfikacji do funkcjonalnych komórek endokrynnych. Co więcej, u myszy z wyłączoną ekspresją *Etv1* rozmiar wysp trzustkowych był zmniejszony, co

potwierdza rozwojową rolę Etv1 w trzustce. Jednak mechanizmy, za pomocą których Etv1 reguluje rozwój trzustki pozostają nieznane. Poza trzustką wykazano, że ETV1 bierze udział w dojrzewaniu kardiomiocytów, zarówno mysich, jak i pochodzących z hPSC, końcowym dojrzewaniu mysich komórek ziarnistych mózdzku oraz w rozwoju komórek grzebienia nerwowego w zarodkach *Xenopus laevis*.

Jednym z celów przedstawionego badania było stworzenie narzędzia do odkrycia roli czynnika transkrypcyjnego ETV1 w rozwoju ludzkich wysepek trzustkowych, które wykorzystuje różnicowanie *in vitro* hPSC w kierunku komórek β trzustki. W niniejszej rozprawie doktorskiej, z wykorzystaniem techniki edycji genów CRISPR/Cas9, została wyprowadzona linia hPSC z wyłączoną ekspresją genu *ETV1*. Podczas charakteryzowania wyprowadzonej linii zaobserwowano fenotyp związany ze zwiększoną adhezją komórek edytowanych. Powszechnie wiadomo, że adhezja komórka–macierz zewnątrzkomórkowa i komórka–komórka regulują pluripotencję i samoodnawianie hPSC oraz wyjście komórek ze stanu pluripotencjalnego. Jednakże szczegółowe mechanizmy kontrolujące i spajające adhezję z pluripotencją pozostają nieznane. Na przykład nadal nie odkryto kluczowych regulatorów transkrypcji kontrolujących ekspresję genów adhezji w hPSC.

Jako część niniejszej pracy, stanowiły porównawcze analizy konfluencji hPSC z wyłączoną ekspresją ETV1 i typu dzikiego, na podstawie których zaobserwowano zwiększoną konfluencję w hPSC bez ETV1. Analizy transkryptomu pozwoliły na zidentyfikowanie ścieżek sygnałowych zaangażowanych w adhezję komórka–komórka oraz komórka–macierz zewnątrzkomórkowa. Wykorzystując metodę barwienia immunofluorescencyjnego potwierdzono zwiększoną syntezę białek adhezyjnych takich jak: e-kadheryna, paksylina i integryna 5 α w hPSC z wyłączoną ekspresją *ETV1* w porównaniu do typu dzikiego. Ponadto geny zaangażowane w utrzymywanie pluripotencji ulegały obniżonej ekspresji w hPSC bez ETV1 w porównaniu do typu dzikiego, co sugeruje rolę ETV1 w utrzymywaniu samoodnawiania i pluripotencji w hPSC. Podsumowując, na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że ETV1 jest nowo odkrytym w hPSC regulatorem adhezji i pluripotencji.

Kolejnym istotnym celem przedstawionego badania było ustalenie roli ETV1 w rozwoju ludzkich trzustkowych komórek endokrynych. Na podstawie eksperymentów wykorzystujących spontaniczne różnicowanie *in vitro* hPSC z wyłączoną ekspresją *ETV1* i typu dzikiego zaobserwowano wyższą efektywność różnicowania w kierunku endodermy i mezodermy w komórkach bez ETV1. Co ciekawe, na podstawie wyników ukierunkowanego

różnicowania *in vitro* do trzustkowych komórek β stwierdzono, że hPSC z wyłączoną ekspresją *ETV1* nie są zdolne do specyfikacji do komórek endokrynych trzustki. Ponadto zastosowano sekwencjonowanie RNA z pojedynczych komórek w celu zidentyfikowania różnic w powstających populacjach komórek podczas różnicowania *in vitro* w kierunku endokrynej trzustki hPSC z wyłączoną ekspresją *ETV1* oraz typu dzikiego.

Podsumowując, niniejsza rozprawa doktorska dostarcza interesującego i głębszego wglądu w podwójną rolę *ETV1* zarówno w pluripotencji, jak i rozwoju części endokrynej trzustki.

Abstract

The pancreas is a glandular organ with a vital role in the production and release of the digestive enzymes (exocrine part) and the hormones regulating glucose homeostasis (endocrine part). The pancreatic endocrine cells form islets of Langerhans, in which the most abundant cells (about 90% per islet) are α - and β -cells. The β -cells control the glucose homeostasis by secreting insulin in response to increased sugar levels in the serum. Insulin allows glucose uptake from the bloodstream by cells in peripheral tissues where the sugar is stored (hepatocytes) or used as energy source (muscle). In the opposite manner, the glucagon secreting α -cells increase blood sugar level by stimulating hepatocytes to lyse the stored glycogen and to release the glucose. Long-term disruption of glucose homeostasis may lead to a chronic, metabolic disease – diabetes mellitus. The typical hallmark of each diabetes type is decreased insulin production caused by either β -cell loss by an autoimmune attack (in type 1 diabetes) or impaired function of β -cells or insulin receptors on peripheral tissues (in type 2 diabetes). Current therapeutic strategies rely on the controlling of the carbohydrate's homeostasis by a healthy lifestyle, together with multiple insulin injections or medicines stimulating or inhibiting insulin or glucagon secretion, respectively. However, these approaches cause inconvenience for diabetes patients and do not offer a cure.

The human pluripotent stem cells (hPSCs) provide a potentially unlimited cell source for cell replacement therapies in regenerative medicine. The regeneration of β -cell mass derived from hPSC *in vitro* differentiation offers an attractive platform to restore normoglycemia in diabetes patients. Thus, better understanding of stem cell biology is required for maintaining the high quality in hPSC culture and highly efficient differentiation *in vitro* to all lineages.

Using single-cell transcriptomics, we have recently identified ETS Variant Transcription Factor 1, *Etv1*, as specifically expressed in a subset of cells within the mouse pancreas at embryonic day 14.5. The *Etv1* expression was restricted in endocrine progenitors and newborn α - and β -cells, suggesting the *Etv1* role in endocrine progenitor maturation and endocrine cell specification. Moreover, in *Etv1* knock-out mice, the pancreatic islet size was decreased in newborns, supporting the developmental role of *Etv1* in pancreas. Yet, the mechanisms by which *Etv1* regulates pancreas development remain unknown. Besides the pancreas, *ETV1* was shown to be involved in maturation of murine and hPSC-derived cardiomyocytes, terminal maturation of murine cerebellar granule cells, and development of neural crest cells in *Xenopus laevis* embryos.

Here, one of the aims of the study was to create a tool for discovering the ETV1 role in pancreatic islet development using hPSC *in vitro* differentiation to pancreatic β -cells. In the thesis, the ETV1 knock-out hPSC line was established using the CRISPR/Cas9 method. During characterization of ETV1 deficient cell lines the phenotype of enhanced cell adhesion was identified. The cell-to-matrix or cell-to-cell adhesion regulates pluripotency and self-renewal and drives pluripotency exit. However, the detailed mechanisms of the adhesion-pluripotency network remain elusive. For instance, the critical transcriptional regulators controlling the expression of adhesion genes in hPSC are still not discovered.

As part of this work, a comparative confluency analysis between ETV1 knock-out and wild-type hPSCs revealed increased confluency in ETV1 deficient cells. The whole transcriptome analysis discovered enrichment in pathways involved in cell adhesion and cell attachment to the extracellular matrix. The immunofluorescence staining confirmed the increase in adhesion protein levels, including e-cadherin, paxillin and integrin 5 α , after ETV1 ablation compared to wild-type cells. Additionally, the pathways involved in pluripotency were downregulated in ETV1 knock-out compared to wild-type hPSCs suggesting the ETV1 role in maintaining self-renewal and pluripotency in hPSCs. Therefore, together this work revealed ETV1 as novel regulator of adhesion and pluripotency in hPSCs.

Another important goal of the research was to determine the ETV1 role in human endocrine development. The spontaneous differentiation experiments using ETV1 knock-out and wild-type hPSCs revealed higher efficiency of endoderm and mesoderm differentiation in ETV1 knock-out cells. Interestingly, the directed differentiation into pancreatic β -cells resulted in a loss of the endocrine specification in ETV1 deficient cells. The single-cell RNA-sequencing was performed to determine the differences in arising cell populations in ETV1 knock-out and wild-type during pancreatic *in vitro* differentiation and discover the molecular mechanisms underlying the deficient endocrine pancreas differentiation after ETV1 ablation.

Taken together, the research provides an interesting deeper view into ETV1's double role in both pluripotency and development.

1. Wstęp

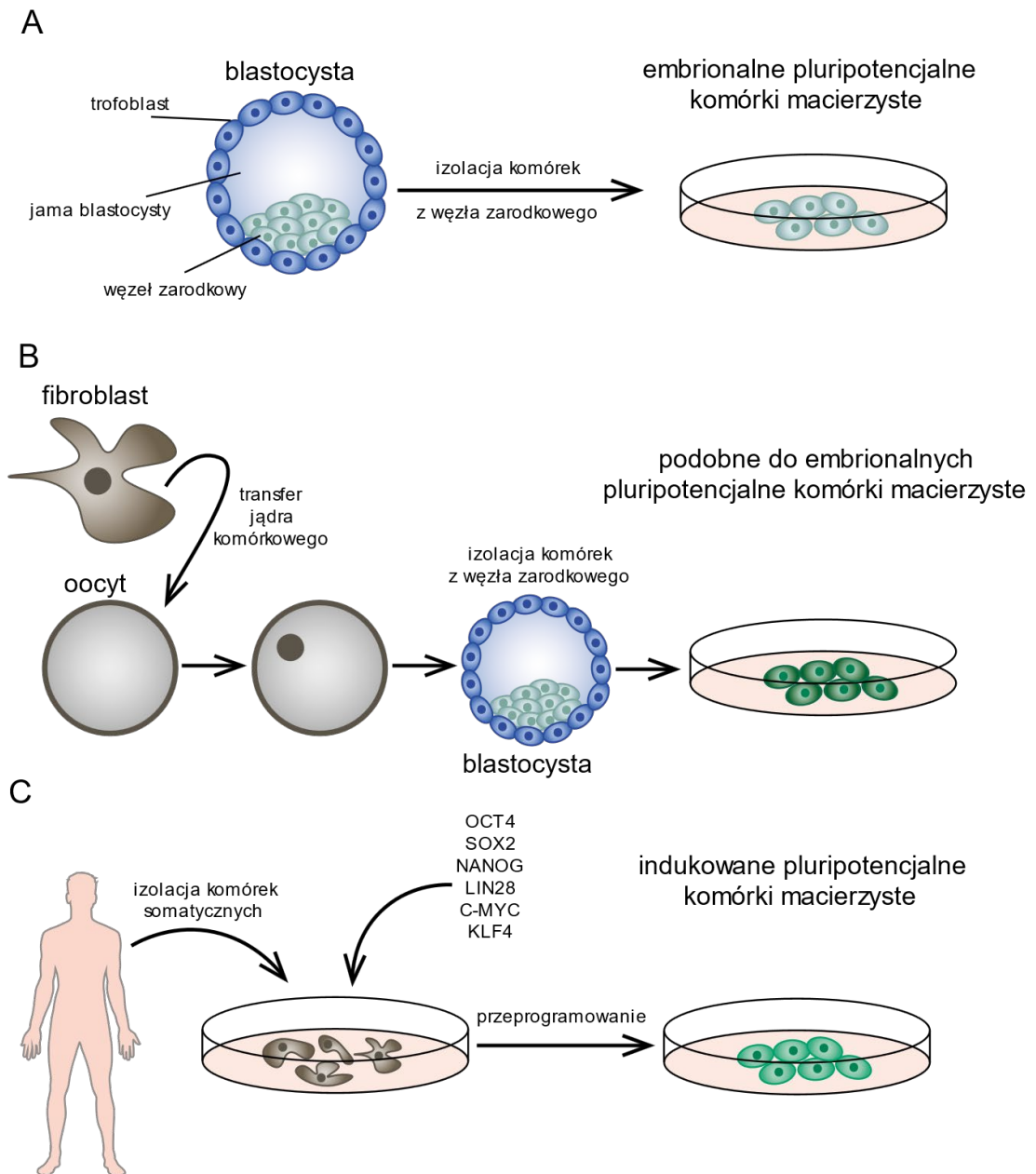
1.1. Pluripotencjalne komórki macierzyste

Pluripotencjalne komórki macierzyste (PSC, ang. *pluripotent stem cells*) wykazują zdolność do samoodnawiania, co oznacza, że po podziale komórki przynajmniej jedna z potomnych komórek pozostają w stanie niezróżnicowanym. Drugą charakterystyczną cechą jest umiejętność różnicowania do wszystkich typów komórek pochodzących z trzech listków zarodkowych (Yamanaka, 2020). Różnicowanie, jest to proces, w trakcie którego komórki specjalizują się w budowie i nabierają specyficzności funkcjonalnej. Te dwie cechy sprawiają, że PSC, szczególnie ludzkie, mogą być wykorzystane do badań w zakresie biologii rozwoju, modelowania chorób, identyfikacji i badań przesiewowych substancji terapeutycznych czy w medycynie regeneracyjnej.

Wyróżniamy 3 typy pluripotencjalnych komórek macierzystych:

- a) embrionalne pluripotencjalne komórki macierzyste (ESC, ang. *embryonic stem cells*),
- b) indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (iPSC, ang. *induced pluripotent stem cells*),
- c) podobne do embrionalnych pluripotencjalne komórki macierzyste uzyskane na drodze transferu jądrowego (NT-ESC, ang. *nuclear transfer embryonic stem cells*).

Pierwsze doniesienia dotyczące ESC sięgają lat osiemdziesiątych, kiedy to po raz pierwszy z mysiego embrionu na stadium przed implantacją zarodka wyizolowano komórki macierzyste (Evans i Kaufman 1981; Martin 1981). Ludzkie ESC stanowiły większe wyzwanie. Dopiero 17 lat później, w 1998 roku udało się wyizolować i wyprowadzić linie ESC z ludzkiego zarodka (Thomson i in. 1998). ESC pobrano z zarodków na stadium rozwojowym blastocysty uzyskanych metodą zapłodnienia *in vitro*. Komórki wyizolowano z węzła zarodkowego i uzyskano 5 linii ESC, w tym 3 z kariotypem XY (H1, H13 i H14) i 2 z kariotypem XX (H7 i H9) (Thomson i in. 1998) (**ryc. 1A**). Jednakże, pozyskiwanie nowych linii ESC wiąże się z konfliktami natury etycznej ponieważ podczas procedury izolacji komórek zarodek zostaje zniszczony (Ilic i Ogilvie 2016; Volarevic i in. 2018).



Rycina 1. Pochodzenie rodzajów pluripotencjalnych komórek macierzystych. **A.** Embrionalne komórki macierzyste wyizolowane z węzła zarodkowego blastocysty rozwiniętej z zapłodnionej komórki jajowej. **B.** Podobne do embrjonalnych pluripotencjalne komórki macierzyste wyizolowane z węzła zarodkowego blastocysty rozwiniętej na drodze transferu jądra komórki somatycznej do oocytu. **C.** Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste uzyskane po przeprogramowaniu *in vitro* komórek somatycznych

Uzyskanie komórek podobnych do embrjonalnych z dorosłych komórek somatycznych rozwiązuje problemy etyczne związane z wykorzystaniem ludzkich zarodków. Seria badań przeprowadzonych od 1958 roku przez Johna Gurdon, który zastępował jądro komórki jajowej żaby szponiastej (łac. *Xenopus laevis*) jądrem pobranym z komórki jelita kijanki, jest pierwszą próbą stworzenia pluripotencjalnych komórek ze zróżnicowanej komórki i rozwoju całego organizmu z otrzymanych PSC w warunkach *in vitro*. Z uzyskanych komórek rozwinęły się kijanki, które przeszły metamorfozę i przekształciły się w dorosłe żaby, które mogły się prawidłowo rozmnażać (Gurdon i in. 1958; Elsdale i in. 1960; Gurdon

1960, 1962). Badania te wykazały, że wykorzystując transfer jądrowy można cofnąć somatyczne jądro do stadium pluripotencjalnego. Ponadto w 1996 roku stworzenie owcy Dolly poprzez transfer jądra komórki dorosłej do oocyty dało nadzieję na przeprogramowanie zróżnicowanej komórki ssaczej w warunkach *in vitro* do pluripotencjalnych komórek, z których może się wytworzyć cały organizm (Campbell i in. 1996). Chociaż stworzenie ludzkich NT-ESC było dużym wyzwaniem technicznym, w 2013 roku pokazano, że jest to możliwe (Tachibana i in., 2013). Jądro komórki somatycznej wyizolowane z linii ludzkich skórnych fibroblastów pochodzenia płodowego przeszczepiono do dojrzałego oocyty zatrzymanego w metafazie II. Czynniki cytoplazmatyczne obecne w oocycie okazały się wystarczające do przeprogramowania jądra komórki somatycznej do stadium embrionalnego (**ryc. 1B**). Co ciekawe, dodanie kofeiny znacząco podniosło efektywność i jakość przeprogramowania oraz przeżywalność komórek. Uzyskano w ten sposób 4 linie NT-ESC, które wykazywały ekspresję genów kluczowych dla pluripotencji takich jak domena POU klasy 5 homeobox 1 (gen *POU5F1*, ang. *domain POU class 5 homeobox 1*; białko OCT3/4), czynnik transkrypcyjny NANOG (NANOG, ang. *Nanog homeobox*), czynnik transkrypcyjny SRY box 2 (SOX2, ang. *SRY-Box transcription factor 2*), specyficzny dla stadium antygen embrionalny 4 (SSEA4, ang. *stage-specific embryonic antygen 4*), antygen powierzchniowy TRA-1-60, antygen powierzchniowy TRA-1-81 oraz posiadały prawidłowy kariotyp XX. Ponadto przeszczepione do transgenicznych myszy pozbawionych układu immunologicznego wytworzyły potworniaki (łac. i ang. *teratoma*), czyli guzy składające się z komórek pochodzenia trzech listków zarodkowych (Tachibana i in., 2013), co potwierdziło ich pluripotencjalny charakter.

W trakcie badań nad wyprowadzeniem NT-ESC postawiono hipotezę, że pluripotencja w komórkach somatycznych może być indukowana przez określone geny, które odgrywają kluczową rolę w utrzymywaniu stanu pluripotencji w ESC. W 2006 roku z sukcesem przeprogramowano mysie fibroblasty do stanu pluripotencji poprzez wprowadzenie na drodze transdukcji retrowirusowej 4 czynników transkrypcyjnych kluczowych dla pluripotencji – *Oct3/4*, *Sox2*, protoonkogen *c-Myc* i czynnik Kruppela 4 (*Klf4*, ang. *Kruppel-like factor 4*) (Takahashi & Yamanaka, 2006). Typ PSC przeprogramowanych ze zróżnicowanych komórek określono mianem indukowanych komórek macierzystych (**ryc. 1C**). Ludzkie komórki iPSC zostały wygenerowane rok później przez dwa niezależne zespoły (Takahashi i in. 2007; Yu i in. 2007). Oba zespoły uzyskały iPSC z ludzkich fibroblastów. Otrzymane iPSC wykazywały podobieństwo do ludzkich ESC pod względem morfologii, proliferacji, aktywności telomerazy oraz ekspresji genów charakterystycznych

dla pluripotencji. Ponadto, otrzymane iPSC zachowały potencjał do różnicowania się do pochodnych trzech listków zarodkowych (Takahashi i in. 2007; Yu i in. 2007). Takahashi i współpracownicy przeprogramowali ludzką linię komórek fibroblastów (HDF, ang. *human dermal fibroblasts*) z użyciem tych samych czynników transkrypcyjnych jak w przypadku przeprogramowania mysich fibroblastów – *OCT3/4*, *SOX2*, *C-MYC* i *KLF4* (Takahashi i in., 2007). Yu i współpracownicy do przeprogramowania ludzkich fibroblastów do stanu pluripotencji użyli czynników transkrypcyjnych takich jak *OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG* i homolog A LIN-28 (*LIN28*, ang. *LIN-28 homolog A*) (Yu i in. 2007).

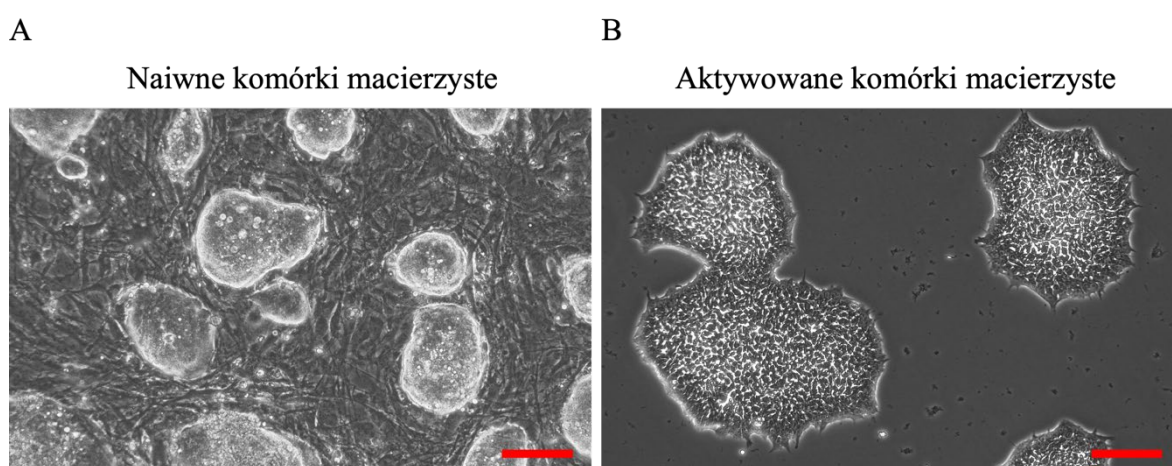
Warto zauważyć, że generowanie iPSC oprócz wyeliminowania używania ludzkich zarodków, ma również inną ważną zaletę – iPSC wyprowadzone od pacjentów mogą stanowić idealny model do badań nad etiologią i patogenezą wielu chorób, która często jest bardzo złożona i nie do końca poznana. Przykładem może być badanie, w którym użyto iPSC przeprogramowanych z fibroblastów ze skóry pacjenta z rzadką odmianą cukrzycy. Następnie, otrzymane iPSC zróżnicowano do komórek trzustki (Yang i in. 2021). Podczas różnicowania okazało się, że komórki pacjenta nie zróżnicowały się do komórek prekursorowych trzustki (PP, ang. *pancreatic progenitors*) i zatrzymały swój rozwój na etapie endodermy (DE, ang. *definitive endoderm*). Na podstawie analizy materiału genetycznego pozyskanego z komórek pacjenta wykazano mutację w regionie niekodującym 5' genu czynnik transkrypcyjny trzustki i dwunastnicy 1 (*PDX1*, ang. *pancreatic and duodenal homeobox 1*), który jest kluczowy podczas rozwoju embrionalnego trzustki, w szczególności endokrynych komórek β produkujących insulinę. Różnicowanie iPSC w tym badaniu jak i w przypadku innych chorób pozwala na otrzymanie pełniejszego obrazu etiologii oraz przebiegu choroby.

1.2. Spektrum pluripotencji

PSC w oparciu o charakterystykę wzrostu *in vitro*, ekspresję genów markerowych, stan aktywacji chromosomu X, sposób pozyskiwania energii oraz ich potencjał do różnicowania w komórki somatyczne i rozrodcze (gamety), dzieli się na:

- a) naiwne pluripotencjalne komórki macierzyste (ang. *naïve pluripotent stem cells*),
- b) aktywowane pluripotencjalne komórki macierzyste (ang. *primed pluripotent stem cells*),
- c) formatywne pluripotencjalne komórki macierzyste (ang. *formative pluripotent stem cells*).

Tradycyjnie mysie ESC w hodowli *in vitro* występują w naiwnym oraz aktywowanym stanie pluripotencji. W stanie naiwnym hoduje się komórki pobrane z wewnętrznego węzła zarodkowego blastocysty przed implantacją zarodka. W warunkach *in vitro* mogą różnicować się do pochodnych wszystkich trzech listków zarodkowych, a wszczepione do wczesnego zarodka różnicują się w linie somatyczne oraz komórki rozrodcze, co wskazuje na ich pluripotencję *in vivo*. W hodowli rosną jako małe, zwarte i kopulaste kolonie, zazwyczaj hodowane są na warstwie mitotycznie inaktywowanych mysich embrionalnych fibroblastów (MEF, ang. *mouse embryonic fibroblasts*) (**ryc. 2A**).



Rycina 2. Morfologia kolonii ESC w stadium naiwnej i aktywowanej pluripotencji. A. Mysie ESC w stadium naiwnej pluripotencji. Kolonie są małe, zwarte i kopulaste, hodowla na warstwie mitotycznie inaktywowanych MEF. B. Ludzkie iPSC w stadium aktywowanej pluripotencji. Kolonie są płaskie o gładko zakończonych brzegach, hodowla na macierzy Geltrex. Skala = 200 µm

Natomiast stan pluripotencji aktywowanej wykazują mysie epiblastyczne komórki macierzyste (mEpiSC, ang. *mouse epiblast stem cells*) wyizolowane z epiblastu po implantacji zarodka (Brons i in., 2007) lub przekształcone *in vitro* z mysich ESC (Guo i in. 2009) oraz ludzkie ESC i iPSC hodowane *in vitro*. Cechą charakterystyczną aktywowanej pluripotencji jest morfologia kolonii, które są płaskie o gładko zakończonych brzegach (**ryc. 2B**). Podobnie jak naiwne PSC, w warunkach *in vitro* różnicują się do wszystkich typów tkanek pochodzących z trzech listków zarodkowych. Istotną cechą odróżniającą aktywowane od naiwnych PSC jest to, że wszczepione do wczesnego zarodka nie mają zdolności różnicowania się do komórek rozrodczych (Huang i in. 2012).

Cechami odróżniającymi naiwne od aktywowanych PSC jest również proces uzyskiwania energii i, w przypadku żeńskich PSC, stan chromosomów X. Aktywowane PSC uzyskują energię w procesie glikolizy, podczas gdy komórki w stanie naiwnej pluripotencji wykorzystują zarówno proces glikolizy jak i oddychania mitochondrialnego (Teslaa i Teitell 2015). Żeńskie zygoty mają dwa chromosomy X, z których jeden musi ulec transkrypcyjnej

inaktywacji aby wyrównać poziom ekspresji genów między osobnikami męskimi i żeńskimi, a tym samym zapewnić prawidłowy przebieg embriogenezy (Barakat i Gribnau 2012). Komórki znajdujące się w stanie naiwnej pluripotencji wykazują aktywne obydwie chromosomy X, z kolei aktywowane PSC posiadają nieaktywny jeden z chromosomów X (Bar i in. 2019; Mandal i in. 2020). Ponadto aktywowane PSC wykazują większą metylację DNA i histonu H3, co przejawia się wyciszeniem większej ilości genów niż w stanie naiwnym (Theunissen i in. 2016).

Istnieje również różnica w ścieżkach sygnałowych regulujących pluripotencję pomiędzy mysimi a ludzkimi ESC i iPSC, czyli odpowiednio naiwnymi i aktywowanymi PSC. W przypadku mysich ESC, czynnik hamujący leukemię (LIF, ang. *leukemia inhibitory factor*) w połączeniu z drobnocząsteczkowymi związkami negatywnie regulującymi aktywność ścieżki kinazy białkowej aktywowanej mitogenami/kinazy regulowanej sygnałem pozakomórkowym (MAPK/ERK, ang. *mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinase*) – 2i, oraz inhibitorem kinazy syntazy glikogenu (GSK3 β , ang. *glycogen synthase kinase 3 β*) – CHIR99021, dodane do pożywki chronią ESC przed czynnikami promującymi różnicowanie (Niwa i in. 2009; Ying i in. 2008). Natomiast stan aktywowanej pluripotencji w ludzkich ESC i iPSC utrzymują czynniki takie jak podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF, ang. *basic fibroblast growth factor*) oraz transformujący czynnik wzrostu β 1 (TGF β 1, ang. *transforming growth factor β 1*) (James i in. 2005; Wang i in. 2005). Ścieżki sygnałowe i mechanizmy regulujące pluripotencję opisane są szczegółowo w kolejnym podrozdziale niniejszej rozprawy.

Cechą odróżniającą stan naiwnej pluripotencji od aktywowanej jest również ekspresja genów markerowych dla każdego z tych stanów. Niektóre geny kluczowe dla utrzymania pluripotencji ulegają ekspresji w obu tych stadiach na podobnym poziomie (*OCT3/4*, *SOX2*) lub są podwyższone w stanie naiwnym (*NANOG*) (Messmer i in. 2019). Geny charakterystyczne dla naiwnej pluripotencji to gen powiązany z pluripotencją rozwojową 5 (*DPPA5*, ang. *developmental pluripotency associated 5*), czynnik Kruppela 5 (*KLF5*, ang. *Kruppel-like factor 5*), czynnik Kruppela 17 (*KLF17*, ang. *Kruppel-like factor 17*), czynnik wiążący GATA 6 (*GATA6*, ang. *GATA binding protein 6*) (Guo i in. 2016; Messmer i in. 2019). Natomiast, przykładowe markery ulegające ekspresji wyłącznie w stadium aktywowanej pluripotencji to antygen *CD24*, 2 członek rodziny związanej z palcem cynkowym (*ZIC2*, ang. *zic family member 2*) i białko pokrewne z frizzled 2 (*SFRP2*, ang. *frizzled related protein 2*) (Messmer i in. 2019; Theunissen i in. 2016).

Tradycyjna hodowla *in vitro* ludzkich ESC i iPSC utrzymuje aktywowany stan pluripotencji, jednak możliwe jest przeprogramowanie tych komórek do stanu naiwnej pluripotencji. Cofnięcie komórek do stanu naiwnej pluripotencji można otrzymać poprzez dodanie do pożywki komponentów używanych do hodowli mysich ESC – LIF, 2i i CHIR99021 lub wywołanie zwiększonej ekspresji genów kluczowych dla naiwnej pluripotencji (*NANOG* i *KLF4*). W ten sposób możliwe jest otrzymanie ludzkich naiwnych PSC, które pod względem morfologicznym, ekspresji genów i aktywacji dwóch chromosomów X przypominają mysie ESC (Buecker i Geijsen 2010; de Los Angeles i in. 2012; Guo i in. 2016, 2021; Hanna i in. 2010).

W 2017 roku profesor Austin Smith wysunął hipotezę istnienia pośredniego stadium pluripotencji, między naiwną a aktywowaną, którą nazwał formatywną pluripotencją (Smith, 2017). Kiedy komórka przechodzi ze stanu naiwnej, przez formatywną aż do aktywowanej pluripotencji, następują dynamiczne procesy molekularne takie jak zmiany transkryptomyczne, epigenetyczne, sygnalizacyjne oraz metaboliczne (Hoogland & Marks, 2021; Smith, 2017). W 2020 roku trzy zespoły opublikowały protokoły hodowli mysich i ludzkich formatywnych PSC w warunkach 2D (Kinoshita i in. 2021; Neagu i in. 2020; Yu i in. 2021), a w 2021 Wang i współpracownicy opracowali warunki hodowli 3D w formie organoidów zanurzonych w Matrigelu (Wang i in. 2021). Linie PSC w stanie formatywnym po transplantacji *in vivo* tworzą potworniaki oraz są zdolne do wytworzenia mysich chimer. Ponadto wykazują wysoki poziom ekspresji ortodontycznego genu 2 (*OTX2*, ang. *orthodenticle homeobox 2*) i czynnika wzrostu fibroblastów 5 (*FGF5*, ang. *fibroblast growth factor 5*) oraz niski poziom genów markerowych dla pluripotencji naiwnej, takich jak czynnik transkrypcyjny podobny do CP2 1 (*TFCP2L1*, ang. *transcription factor CP2 like 1*) i czynnik Kruppela 2 (*KLF2*, ang. *Kruppel-like factor 2*). Podobnie jak komórki w stanie aktywowanej pluripotencji, formatywne PSC uzyskują energię w procesie glikolizy, wykazują wysoki poziom metylacji DNA i histonu H3 oraz mają jeden nieaktywny chromosom X (żeńskie komórki). Cechą charakterystyczną komórek w stadium formatywnej pluripotencji jest to, że mogą różnicować się do wczesnych prekursorów gamet, ponadto w hodowli *in vitro* tworzą spolaryzowane rozety (Neagu i in. 2020; Kinoshita i in. 2021; Wang i in. 2021; Yu i in. 2021). Przyszłe badania wykorzystujące formatywne linie PSC dadzą możliwość zrozumienia procesów zachodzących zaraz po implantacji zarodka podczas wczesnego rozwoju embrionalnego. Ponadto stanowią one idealny model do lepszego poznania dynamicznych procesów molekularnych zachodzących podczas osiągnięcia przez komórki kolejnych stanów pluripotencji.

1.3. Mechanizmy regulujące pluripotencję *in vitro*

Utrzymywanie stanu pluripotencji oraz odpowiedniej morfologii podczas samoodnawiania komórek macierzystych podlega bardzo precyzyjnym regulacjom. Warunki hodowli PSC bazują na kombinacji drobnocząsteczkowych związków i czynników wzrostu, aby podtrzymywać ekspresję genów kluczowych dla pluripotencji oraz kontrolować zewnętrzne sygnały, które mogłyby rozpocząć proces różnicowania. Zrozumienie mechanizmów leżących u podstaw pluripotencji oraz zbadanie w jaki sposób jest ona zachowana i podtrzymywana są niezbędne do pełnego wyjaśnienia mechanizmów wczesnej embriogenezy ssaków. Jest to konieczne do opracowania skutecznych terapii medycyny regeneracyjnej opartych na technologii komórek macierzystych, modeli chorób oraz odkrywania i badania nowych leków. Kluczowe dla utrzymania stadium pluripotencji są odpowiednia regulacja genetyczna oraz działanie ścieżek sygnalizacyjnych.

1.3.1. Regulacja genetyczna

Stan pluripotencji i procesy samoodnawiania są regulowane przez zależną od siebie ekspresję określonych genów. Rdzeń genetycznych zależności regulacyjnych kontrolującej fenotyp PSC stanowi zestaw podstawowych czynników transkrypcyjnych. Fundamentalne znaczenie tych genów najlepiej obrazuje fakt, że są wystarczające i niezbędne do nabycia i utrzymania pluripotencji podczas przeprogramowania komórek somatycznych do iPSC (Yu i in. 2007; Takahashi i in. 2007).

Czynnik transkrypcyjny OCT3/4, kodowany przez gen *POU5F1* został zidentyfikowany jako jeden z pierwszych czynników odpowiedzialnych za utrzymywanie pluripotencji ESC. Ulega ekspresji specyficznemu w ESC oraz pierwotnych komórkach rozrodczych (Scholer i in. 1989; Nichols i in. 1998; Niwa i in. 2000). Podobnie *SOX2* jest czynnikiem transkrypcyjnym niezbędnym dla ESC i dodatkowo jest kluczowym regulatorem ekspresji *POU5F1* (Avilion i in. 2003; Masui i in. 2007). Wyciszenie ekspresji *POU5F1* i *SOX2* powoduje, że ESC zaczynają różnicować do komórek trofoektodermi. Z kolei podwyższona ekspresja *POU5F1* lub *SOX2* w ESC prowadzi do zainicjowania różnicowania w kierunku odpowiednio mezodermi lub neuralnej ektodermi (Niwa i in. 2000; Thomson i in. 2011). Z tego względu, precyzyjna regulacja ekspresji *POU5F1* i *SOX2* jest podstawą utrzymywania pluripotencji w ESC.

Z kolei czynnik transkrypcyjny *NANOG* jest również uważany za podstawowy markerowy gen podtrzymujący stan pluripotencji. Podczas wczesnej embriogenezy *NANOG*

jest kluczowy w nabywaniu pluripotencji przez komórki wężła zarodkowego blastocysty, a w hodowli *in vitro* ESC jest zdolny do utrzymania samoodnowy mysich ESC bez obecności czynnika LIF w pożywce (Chambers i in. 2003, 2007; Mitsui i in. 2003; Suzuki i in. 2006; Silva i in. 2009).

Co ciekawe, czynnik OCT3/4 razem z SOX2 współpracują ze sobą w regulacji ekspresji genów ważnych dla pluripotencji poprzez tworzenie heterodimerów. Miejsca wiązania w genomie białek OCT3/4 i SOX2 oraz NANOG również się pokrywają. Warto zauważyć, że miejscami wiązania podstawowych czynników transkrypcyjnych utrzymujących pluripotencję najczęściej są wzmacniacze ekspresji genów wykazujących grupy w ontologii genów związane z samoodnawianiem, takich jak czynnik wzrostu fibroblastów 4 (*FGF4*, ang. *fibroblast growth factor 4*), *SOX2*, niezróżnicowany czynnik transkrypcyjny komórek embrionalnych 1 (*UTF1*, ang. *undifferentiated embryonic cell transcription factor 1*), białko F-Box 15 (*FBX15*, ang. *F-box protein 15*), czynnik determinacji stron lewo-prawo (*LEFTY*, ang. *left-right determination factor*) (Chew i in. 2005; Rodda i in. 2005; Chen i in. 2008; Young 2011). Dodatkowo, podstawowe czynniki transkrypcyjne odpowiedzialne za utrzymywanie fenotypu ESC mogą wzajemnie się regulować wykorzystując zjawisko sprzężenia zwrotnego (Boyer i in., 2005). Jednakże, występują pewne różnice pomiędzy białkami OCT3/4 i SOX2 a NANOG. Mianowicie, *POU5F1* i *SOX2* ulegają ekspresji na ściśle kontrolowanych poziomach jednolicie w całej populacji ESC. Dodatkowo *POU5F1* i *SOX2* ulegają wysokiej ekspresji zarówno w stanie naiwnej jak i aktywowanej pluripotencji. W przeciwieństwie do *POU5F1* i *SOX2*, gen *NANOG* może ulegać ekspresji na różnych poziomach w różnych komórkach tej samej populacji ESC. Ponadto w stanie aktywowanej pluripotencji ulega niższej ekspresji w porównaniu do pluripotencji naiwnej (Chambers i in. 2003; Festuccia i in. 2012). Co ciekawe, komórki z wyłączoną ekspresją *NANOG* nadal samoodnawiają się w stanie niezróżnicowanym, jednak wykazują zwiększoną zdolność do różnicowania w porównaniu z ESC typu dzikiego. Dodatkowo geny regulowane przez NANOG nadal ulegają ekspresji w ESC po wyłączeniu ekspresji *NANOG* (Chambers i in. 2003; Silva i Smith in. 2008; Silva i in. 2009). Sugeruje to, że rola NANOG w stanie naiwnej pluripotencji polega bardziej na ochronie ESC przed sygnałami i bodźcami promującymi różnicowanie, niż na utrzymywaniu ekspresji genów odpowiedzialnych za pluripotencję.

1.3.2. Ścieżki sygnalizacyjne

Wśród kaskad sygnalizacji zaangażowanych w utrzymywanie pluripotencji i samoodnawiania wyróżniamy:

- a) sygnalizację TGF β i białek morfogenetycznych kości (BMP, ang. *bone morphogenetic proteins*),
- b) sygnalizację FGF,
- c) sygnalizację LIF/kinaza Janusa/przebieżnik sygnału i aktywator transkrypcji 3 (LIF/JAK/STAT3; JAK, ang. *janus kinase*; STAT3, ang. *signal transducer and activator of transcription*),
- d) sygnalizację zintegrowanego miejsca związanego z bezskrzydłowością (WNT, ang. *wingless-related integration site*),
- e) sygnalizacja kinazy 3-fosfatidyloinozytolu i kinazy białkowej AKT (PI3K, ang. *phosphatidylinositol 3-kinase*; AKT, ang. *AKT/protein kinase B*).

1.3.2.1. Sygnalizacja TGF β i BMP

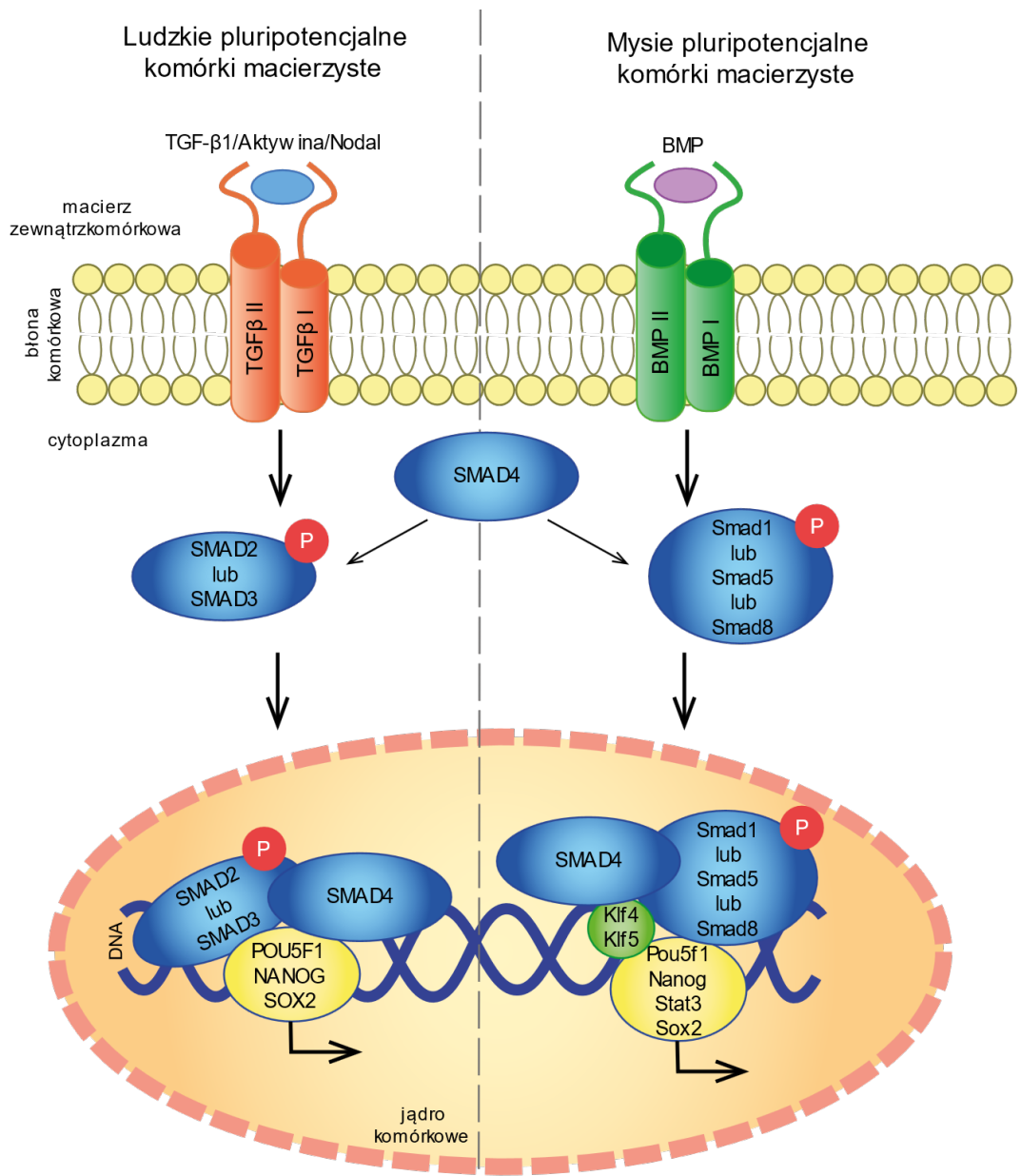
Receptory TGF β odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu pluripotencji zarówno ludzkich jak i mysich PSC (ryc. 3). Receptory te są transbłonowymi kinazami, które składają się z receptorów typu I i typu II (Morikawa i in. 2016; Watabe i Miyazono 2009). Do ligandów receptorów TGF β należą białka:

- a) TGF β 1,
- b) aktywiny,
- c) nodal,
- d) BMP,
- e) czynniki wzrostu i różnicowania (GDF, ang. *growth and differentiation factors*).

W przypadku ludzkich PSC istotną rolę odgrywa sygnalizacja przez ligandy TGF β 1/aktywina/nodal, natomiast w mysich PSC ważną funkcję pełni sygnalizacja przez ligandy BMP (Mullen i Wrana 2017). Przyłączenie ligandu do receptorów powoduje fosforylację białek SMAD, które pośredniczą w przekazywaniu sygnału do jądra komórkowego. Białko SMAD4 jest białkiem wspólnym dla sygnalizacji przez TGF β 1/aktywina/nodal oraz BMP. W mysich PSC, białko Smad4 łączy się z białkami Smad1, Smad5 i Smad8. Natomiast, w ludzkich PSC białko SMAD4 łączy się z białkami SMAD2 i SMAD3 (Watabe i Miyazono 2009; Mullen i Wrana 2017). Kompleksy SMAD

przemieszczają się z cytoplazmy do jądra komórkowego, gdzie są rekrutowane do miejsc promotorowych i kontrolują ekspresję genów przez interakcję z czynnikami transkrypcyjnymi i aktywatorami lub represorami ekspresji.

W ludzkich i mysich PSC sygnalizacja przez receptory TGF β podtrzymuje pluripotencję przez aktywację ekspresji genów markerowych, takich jak *POU5F1*, *NANOG* czy *SOX2* (James i in. 2005; Vallier i in. 2005; Xiao i in. 2006). Co ciekawe, receptor dla TGF β 1 jest charakterystyczny dla ludzkich PSC, ale mysie PSC mogą aktywować białko Smad2 i Smad3 w odpowiedzi na aktywinę lub nodal (James i in. 2005). W mysich PSC, sygnalizacja TGF β jest częściej wywołana przez Bmp4 i powoduje, że Smad1 i Smad5 razem z Klf4 i Klf5 wzmacniają ekspresję *Pou5f1*, *Nanog*, *Sox2* i *Stat3* oraz *Id1* i *Dusp9*, które odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu naiwnej pluripotencji (Chen i in. 2011). W przeciwieństwie do mysich ESC, u których aktywacja szlaku przez Bmp4 utrzymuje stan pluripotencji, w przypadku ludzkich PSC aktywacja sygnalizacji TGF β przez BMP prowadzi do różnicowania do mezodermy i komórek podobnych do trofoblastu (Orlova i in. 2016).



Rycina 3. Sygnalizacja TGFβ w ludzkich (po lewej) i mysich (po prawej) pluripotencjalnych komórkach macierzystych. Po przyłączeniu specyficznych ligandów do receptorów białka SMAD ulegają fosforylacji i tworzą kompleksy z białkiem SMAD4, dzięki czemu mogą z cytoplazmy przemieścić się do jądra komórkowego, gdzie aktywują ekspresję genów utrzymujących pluripotencję i samoodnawianie

1.3.2.2. Sygnalizacja FGF

Receptory FGF są kinazami, z którymi łączą się ligandy z rodziny FGF (22 białka) (ryc. 4). Aktywowane receptory przekazują sygnał przez kaskady sygnałowe takie jak:

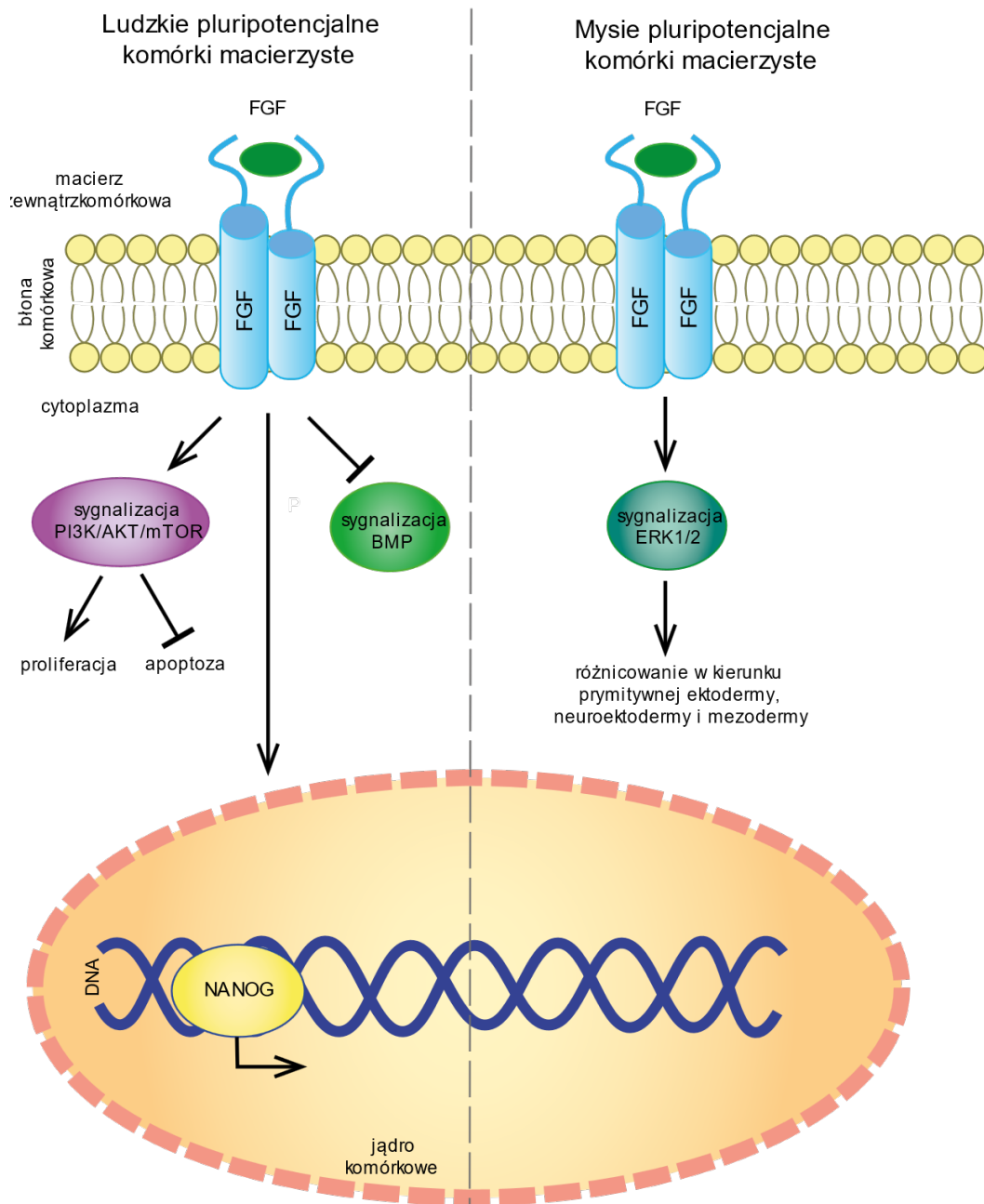
- a) MAPK,
- b) JAK/STAT,
- c) PI3K/AKT,
- d) ERK.

Efektym aktywacji receptorów FGF i dalszych kaskad sygnałowych jest regulacja przeżycia komórki, proliferacji i różnicowania (Hanna i in. 2010; Greber i in. 2010).

Sygnalizacja FGF jest bardzo ważna dla utrzymania pluripotencji ludzkich PSC. Świadczy o tym fakt, że ludzkie PSC są hodowane w medium zawierającym FGF (Amit i in. 2000; Xu i in. 2001). Początkowo, kiedy ludzkie ESC były hodowane na warstwie odżywczej MEF, FGF2 (inaczej zwany bFGF) indukował komórki MEF do wydzielania TGFβ1 i czynnika wzrostu podobnego do insuliny (IGF, ang. *insulin-like growth factor*), które wspólnie utrzymują niezróżnicowany stan ludzkich ESC (Amit i in. 2000; Diecke i in. 2008). Szczególnie ważne dla utrzymania pluripotencji ludzkich PSC jest białko FGF2, które wspomaga samoodnawianie oraz zatrzymuje różnicowanie poprzez inhibicję ścieżki BMP. Ponadto aktywuje ścieżkę PI3K/AKT, która przez oddziaływanie na kinazę ssaczy cel rapamycyny (mTOR, ang. *mammalian target of rapamycin kinase*) hamuje apoptozę i zwiększa proliferację PSC. Dodatkowo FGF2 razem z FGF4, czynnikiem wzrostu fibroblastów 6 (FGF6, ang. *fibroblast growth factor 6*) i czynnikiem wzrostu fibroblastów 9 (FGF9, ang. *fibroblast growth factor 9*) może indukować zwiększoną ekspresję *NANOG* w ludzkich ESC (Mayshar i in. 2008; Mossahebi-Mohammadi i in. 2020).

W mysich ESC ekspresja *Fgf4* prowadzi do aktywacji szlaku ERK1/2, co rozpoczyna różnicowanie. W obecności kwasu retinowego *Fgf4* indukuje różnicowanie w kierunku prymitywnej ektodermy. Ponadto FGF4 dodany do medium powoduje zwiększoną liczbę komórek zróżnicowanych w kulturze *in vitro* mysich ESC, głównie wykazujących cechy komórek endodermy pozazarodkowej. Zahamowanie ekspresji *Fgf4* prowadzi do niewłaściwego różnicowania. Dodatkowo sygnalizacja FGF4/ERK1/2 w mysich ESC odgrywa istotną rolę w kierowaniu komórek w różnicowaniu do neuroektodermy i mezodermy, ponieważ zaburzenie sygnalizacji szlaku FGF4/ERK1/2 prowadzi do inhibicji

różnicowania w kierunku tych komórek (Kunath i in. 2007; Stavridis i in. 2007; Nichols i Smith 2009; Mossahebi-Mohammadi i in. 2020).



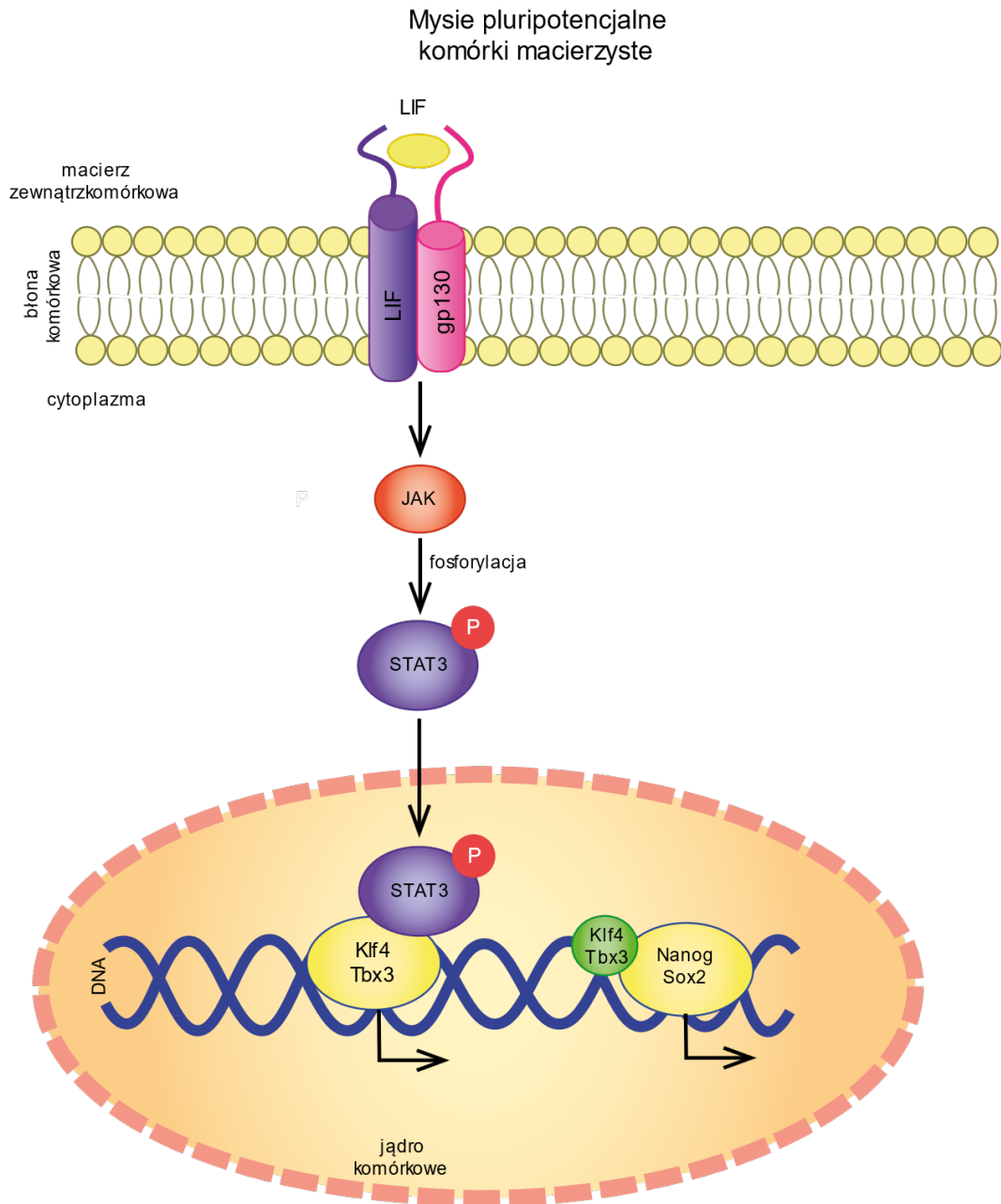
Rycina 4. Sygnalizacja FGF w ludzkich (po lewej) i mysich (po prawej) pluripotencjalnych komórkach macierzystych. Po przyłączeniu specyficznych ligandów FGF do receptorów FGF, w ludzkich PSC następuje aktywacja szlaku PI3K/AKT, który aktywuje mTOR promując proliferację i hamując apoptozę. Dodatkowo FGF4 indukuje ekspresję *NANOG* i hamuje ścieżkę BMP, która w ludzkich PSC musi być wyciszona aby utrzymywać pluripotencję. Aktywacja ścieżki FGF w mysich PSC prowadzi do aktywacji sygnalizacji ERK1/2 i indukuje różnicowanie w kierunku prymitywnej ektodermi, neuroektodermi i mezodermi

1.3.2.3. Sygnalizacja LIF/JAK/STAT3

Sygnalizacja LIF/JAK/STAT3 podtrzymuje stan naiwnej pluripotencji (mysie ESC), natomiast nie bierze udziału w utrzymaniu aktywowanej pluripotencji (ludzkie PSC) (Daheron i in. 2004; Yang i in. 2010) (ryc. 5).

Czynnik LIF jest cytokiną, która w hodowli *in vitro* mysich ESC podtrzymuje samoodnawianie i zapobiega rozpoczęciu różnicowania. LIF łączy się do kompleksu receptora LIF/glikoproteiny 130, co z kolei aktywuje kinazę JAK. Kinaza JAK następnie fosforyluje czynnik transkrypcyjny STAT3, który wchodzi do jądra komórkowego, gdzie reguluje transkrypcję (Matsuda i in. 1999; Niwa i in. 1998; van Oosten i in. 2012). Wykazano, że aktywacja ścieżki LIF/JAK/STAT3 indukuje ekspresję *Klf4* i czynnika transkrypcyjnego T-box 3 (Tbx3, ang. *T-box transcription factor 3*), które indukują ekspresję czynników transkrypcyjnych kluczowych dla utrzymania pluripotencji – *Nanog* i *Sox2* (Niwa i in. 2009).

Mimo dużego znaczenia szlaku LIF/JAK/STAT3 dla utrzymania pluripotencji naiwnych PSC, nadal nie zostały poznane wszystkie geny zależne od STAT3 i nadal odkrywane są nowe cele genetyczne tej ścieżki. Przykładem może być gen kodujący współaktywator transkrypcji *Blc3* (*Blc3*, ang. *Blc3 transcription coactivator*), który początkowo został zidentyfikowany jako regulator ekspresji genów związanych z odpowiedzią immunologiczną lub fizjologią komórek nowotworowych. Wykorzystując metodę immunoprecypitacji chromatyny (ChIP, ang. *chromatin immunoprecipitation*), udowodniono, że czynnik transkrypcyjny Stat3 wiąże się z sekwencją wspomagającą ekspresję *Blc3*. W kontekście utrzymywania pluripotencji wykazano, że wyciszenie ekspresji *Blc3* w mysich ESC zmieniło ich morfologię oraz zmniejszyło ekspresję genów markerowych – *Nanog*, *Sox2*, *Pou5f1*, natomiast podwyższona ekspresja *Blc3* zapobiegała różnicowaniu i promowała ekspresję *Pou5f1*. Dodatkowo ujawniono, że białko *Blc3* immunoprecypituje razem z białkiem Oct3/4, wskazując na regulację ekspresji *Pou5f1* przez *Blc3* (Chen i in. 2015). Innym przykładem może być gen kodujący białko podobne do PRAME 7 (*Pramel7*, ang. *PRAME like 7*), którego podwyższona ekspresja powoduje wzmocnienie ekspresji *Nanog* i *Pou5f1*. Zwiększona ekspresja genu *Pramel7* po dodaniu LIF do pożywki świadczy o zależności ekspresji *Pramel7* od ścieżki LIF/JAK/STAT3 (Casanova i in. 2011).



Rycina 5. Sygnalizacja LIF/JAK/STAT3 w mysich pluripotencjalnych komórkach macierzystych. Po przyłączeniu ligandu LIF do kompleksu receptora LIF z glikoproteiną 130 następuje aktywacja kinazy JAK, która fosforyluje STAT3. Fosforylowany STAT3 może przejść do jądra komórkowego gdzie indukuje ekspresję *Klf4* i *Tbx3*. Z kolei *Klf4* i *Tbx3* aktywują ekspresję genów utrzymujących pluripotencję i samoodnawianie, takich jak *Nanog* i *Sox2*

1.3.2.4. Sygnalizacja WNT

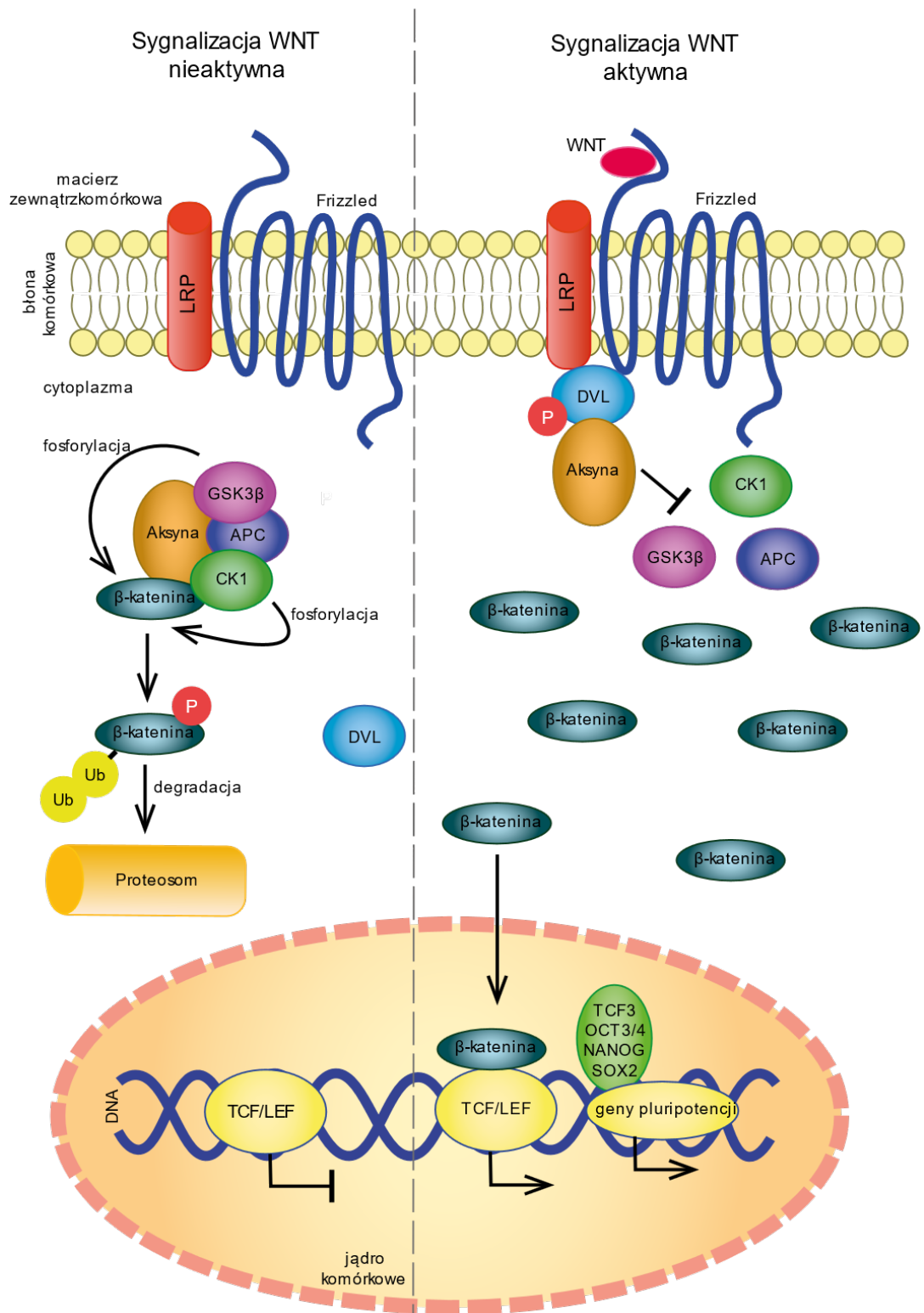
Sygnalizacja WNT reguluje wiele procesów komórkowych takich jak proliferacja, samoodnowa PSC, różnicowanie czy homeostazę dorosłych komórek somatycznych. Szlak WNT może występować w dwóch ścieżkach:

- a) kanoniczny szlak WNT/ β -katenina,
- b) niekanoniczny szlak WNT/polaryzacja planarna komórki.

W utrzymaniu pluripotencji kluczowa jest kanoniczna ścieżka WNT (**ryc. 6**). Ligandy WNT są glikoproteinami wydzielanymi na zewnątrz komórki przez co działają parakrynnie lub autokrynnie na otaczające komórki. Rodzina białek WNT liczy 19 członków. Ligandy WNT łączą się z receptorami FZD (ang. *frizzled*), które przechodzą przez błonę siedmiokrotnie. Ponadto niezbędny do przekazywania sygnału jest receptor pomocniczy – receptor lipoprotein o niskiej gęstości (LRP, ang. *low-density lipoprotein related receptor*) (de Jaime-Soguero i in. 2018).

Nieaktywna ścieżka WNT przejawia się degradacją białka β -kateniny. β -katenina jest wiązana przez kompleks białek – aksynę, białko gruczołakowatej polipowatości okrężnicy (APC, ang. *adenomatous polyposis coli protein*), kinazę kazeinową 1 (CK1, ang. *casein kinase 1*) i GSK3 β . Kompleks degradujący fosforyluje β -kateninę, która rozpoznawana jest przez podjednostkę ligazy ubikwityny i degradowana w proteasomie. Degradacja β -kateniny uniemożliwia translokację do jądra, gdzie może regulować ekspresję genów (de Jaime-Soguero i in. 2018).

Aktywacja ścieżki WNT rozpoczyna się przyłączeniem białek z rodziny WNT do receptora FZD i LRP, co powoduje fosforylację i aktywację białka DVL (ang. *dishevelled*). Aktywne białko DVL łączy aksynę, która nie może łączyć się z GSK3 β i cały kompleks degradujący nie może powstać. Zakumulowana w cytoplazmie β -katenina może przejść do jądra, gdzie we współpracy z czynnikiem transkrypcyjnym komórek T/czynnik wzmacniający komórki limfoidalne (TCF, ang. *T-cell factor*; LEF, ang. *lymphoid enhancer factor*) aktywuje geny zależne od sygnalizacji WNT, w tym również geny zaangażowane w utrzymywanie pluripotencji (Wang i in. 2012; Scheibner i in. 2019).



Rycina 6. Sygnalizacja WNT – ścieżka sygnalizacyjna nieaktywna (po lewej) i aktywna (po prawej). Nieaktywna sygnalizacja WNT (po lewej) prowadzi do utworzenia kompleksu aksyna, APC, CK1 i GSK3 β , który wiąże i fosforyluje β -kateninę. Do ufosforylowanej β -kateniny przyłącza się ubikwityna i białko ulega degradacji w proteasomie. Przyłączenie ligandu WNT do receptora FZD i receptora pomocniczego LRP prowadzi do fosforylacji DVL, który rekrutuje aksynę. Kompleks degradujący β -kateninę nie może powstać i β -katenina przechodzi do jądra komórkowego, gdzie aktywuje ekspresję czynników transkrypcyjnych TCF/LEF współpracujących z OCT3/4, NANOG i SOX2 w utrzymaniu pluripotencji

W ESC czynnik transkrypcyjny TCF3 współpracuje z OCT3/4, SOX2 i NANOG w regulowaniu genów związanych z pluripotencją poprzez wiązanie się do sekwencji

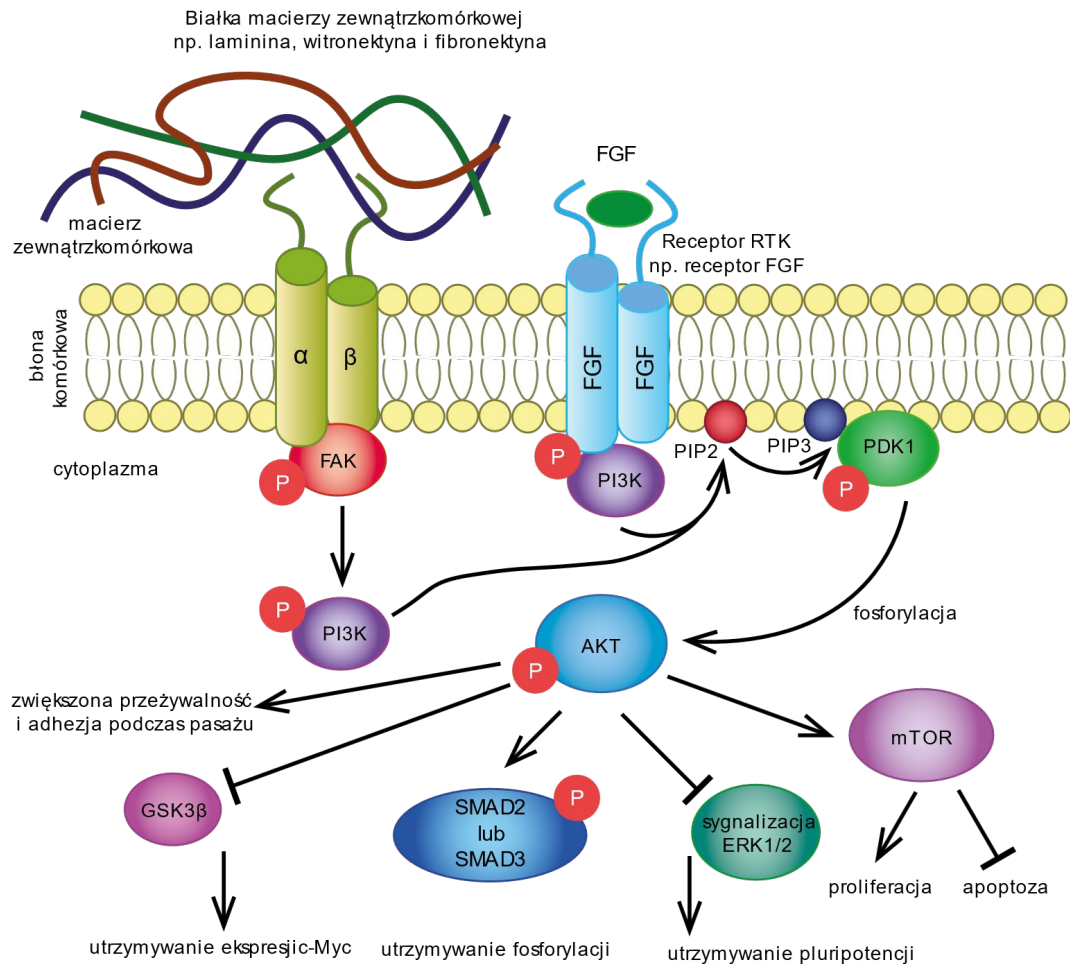
wspomagających transkrypcję. W przypadku nieaktywnego szlaku WNT, czynnik TCF3 działa antagonistycznie do OCT3/4 i SOX2, a więc wycisza ekspresję genów związanych z samoodnową. Dodatkowo, kanoniczna ścieżka WNT aktywuje ekspresję genu markerowego dla stanu naiwnej pluripotencji – *KLF2* (Cole i in. 2008; Martello i in. 2012; Qiu i in. 2015). Wykazano również, że aktywacja ścieżki WNT w ESC poprzez inhibicję GSK3 β była wystarczająca do utrzymania pluripotencji w pożywce bez dodatku LIF (Sato i in. 2004).

1.3.2.5. Sygnalizacja PI3K/AKT

Sygnalizacja PI3K/AKT jest ścieżką, która w odpowiedzi na zewnątrzkomórkowe sygnały promuje wiele funkcji komórkowych takich jak metabolizm, proliferacja, przeżywalność czy adhezja (ryc. 7).

Jedną drogą aktywacji ścieżki PI3K/AKT jest przyłączenie ligandu do receptora kinazy tyrozyny (RTK, ang. *receptor tyrosine kinase*). Rodzina receptorów RTK obejmuje receptory błonowe dla cytokin, czynników wzrostu czy hormonów. Przykładem są receptory FGF i IGF. Przyłączenie ligandu autofosforyluje wewnątrzkomórkową domenę receptora RTK. Fosforylacja rekrutuje kinazę PI3K, która zostaje aktywowana i przyłącza się do fosfolipidu wchodzącego w skład błony komórkowej – 4,5-bifosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP2, ang. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*). Aktywna PI3K fosforyluje PIP2 i powstaje cząsteczka 3,4,5-trifosforan fosfatydyloinozytolu (PIP3, ang. *phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate*), która jako cząsteczka sygnałowa rekrutuje do błony wiele białek sygnałowych, w tym kinazę 1 zależną od fosfatydyloinozytolu (PDK1, ang. *phosphoinositide-dependent kinase 1*) i kinazę AKT. PDK1 aktywuje przez fosforylację kinazę AKT, która następnie reguluje aktywność wielu białek (Yu i Cui 2016; Madsen 2020).

Alternatywną drogą aktywacji ścieżki PI3K/AKT jest sygnalizacja zależna od integryn. Integryny są to białka transmembranowe zbudowane z podjednostek α i β . Integryny łączą białka macierzy zewnątrzkomórkowej takie jak laminina, witronektyna czy fibronektyna z cytoszkieletem aktywnym komórki, przez co odgrywają kluczową rolę w przyczepianiu komórek do podłoża (Matsuoka i in. 2012). Przyłączenie ligandu do receptora integryn powoduje zmianę w konformacji podjednostek receptora co prowadzi do fosforylacji i aktywacji kinazy ogniskowej adhezji (FAK, ang. *focal adhesion kinase*). Z kolei aktywna kinaza FAK aktywuje kinazę PI3K i wywołuje kaskadę sygnalizacyjną opisaną wyżej (Wu i in. 2016).



Rycina 7. Sygnalizacja PI3K/AKT. Po aktywacji receptora RTK (po prawej), np. receptora FGF, kinaza PI3K jest aktywowana co prowadzi do fosforylacji PIP2 i powstania PIP3. Aktywny PIP3 rekrutuje do błony kinazę PDK1, która fosforyluje i aktywuje kinazę AKT. Aktywna kinaza AKT reguluje aktywność wielu białek przyczyniając się do utrzymania pluripotencji i samoodnowy PSC. Alternatywna ścieżka aktywacji kinazy PI3K to aktywacja przez ścieżkę zależną od integryn (po lewej)

W ludzkich ESC wywołanie podwyższonej ekspresji kinazy AKT skutkuje utrzymywaniem stałej ekspresji genów odpowiedzialnych za pluripotencję i zaburzonym różnicowaniem *in vitro*. Ponadto wyciszenie szlaku PI3K/AKT przez inhibitory takie jak LY294002 prowadzi do utraty pluripotencji (Bendall i in., 2007; McLean, 2007). Co ciekawe, w mysich ESC sygnalizacja PI3K/AKT poprzez inhibicję GSK3β przyczynia się do zachowania pluripotencji poprzez utrzymywanie ekspresji *c-Myc* (Cartwright i in. 2005; Singh i in. 2012; Chen i in. 2015). W przypadku ludzkich ESC wykazano, że PI3K wspomaga ścieżkę TGFβ przez utrzymywanie odpowiedniego poziomu fosforylacji SMAD2 i SMAD3, jednakże dokładny mechanizm nie został jeszcze wyjaśniony. Warto zauważyć, że ma to ogromne znaczenie dla utrzymywania pluripotencji, ponieważ przy supresji PI3K zwiększa się poziom fosforylacji białek SMAD2 i SMAD3, prowadząc do aktywacji genów odpowiedzialnych za rozpoczęcie różnicowania (Dalton 2013; Yu i in. 2015; Yu i Cui 2016). Kolejnym ważnym aspektem utrzymywania pluripotencji w ludzkich

ESC przez kaskadę PI3K/AKT jest fakt, że kinaza AKT inhibuje ERK1 i ERK2, które w aktywowanej pluripotencji muszą być nieaktywne. Dodatkowo podwyższona aktywacja ścieżki PI3K/AKT wywołana insuliną (INS, ang. *insulin*) prowadzi do zwiększenia przeżywalności i adhezji ludzkich ESC podczas pasażu pojedynczych komórek (Godoy-Parejo i in. 2019).

1.4. Nisza ludzkich komórek PSC *in vitro*

Nisza (ang. *niche*) ludzkich komórek PSC, na którą składają się adhezja komórka-komórka, przyleganie komórki do macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, ang. *extracellular matrix*) oraz sztywność i skład podłoża hodowlanego, jest zaangażowana w wiele najważniejszych procesów komórkowych, takich jak przekazywanie sygnałów, komunikacja międzykomórkowa, migracja komórek czy organizacja cytoszkieletu, które mają znaczenie w określaniu kierunku różnicowania i rozwoju tkanek (Collins i in. 2017). Nisza oddziałuje też mechanicznie na komórki PSC, wpływając na ich polaryzację i adhezję, co odzwierciedla się w charakterystycznej morfologii kolonii ludzkich PSC w warunkach *in vitro*.

Zwarta morfologia kolonii ludzkich PSC zapewniona przez utrzymanie odpowiedniego poziomu adhezji jest niezbędna dla utrzymania pluripotencji i samoodnawiania. Charakterystyczny kształt ludzkich kolonii PSC *in vitro* wynika z właściwości adhezyjnych komórek budujących kolonię. Pozycja w kolonii wpływa na polaryzację komórek PSC, która uwidacznia się różnym rozłożeniem fosfolipidów, kompleksów białkowych i składnikami cytoszkieletu w części apikalnej (wierzchołkowej), lateralnej (środkowej) i bazalnej (podstawnej) komórki PSC (Närvä i in. 2017; Stubb i in., 2019). Komórki wewnątrz kolonii wykazują większą adhezję do otaczających komórek niż do ECM. Połączenia komórka-komórka w koloniach ludzkich PSC utrzymuje białko e-kadheryna (CDH1, ang. *e-cadherin*). Wzajemna adhezja komórek PSC wzmacnia ich przeżycie, zwłaszcza podczas pasażu. Ludzkie komórki PSC można pasażować z użyciem 0,5 mM roztworu EDTA, który odczepia komórki od podłoża, równocześnie zachowując połączenia międzykomórkowe. Pasażowanie ludzkich komórek PSC w klastrach zwiększa ich przeżycie podczas tej procedury, ponieważ zniszczenie połączeń CDH1 prowadzi do apoptozy komórek PSC (Watanabe i in. 2007). Podczas pasażu do pojedynczych komórek, kiedy dochodzi do zniszczenia połączeń CDH1 między komórkami ludzkich PSC, co prowadzi do hiperaktywacji niemięśniowej miozyny IIA (NMMIIA, ang. *nonmuscle myosin IIA*) przez kinazę białkową związaną z Rho (ROCK, ang. *Rho-associated protein kinase*).

Kinaza ROCK w ludzkich komórkach PSC w koloniach fosforyluje lekkie łańcuchy miozynowe (np. NMMIIA), utrzymując je na prawidłowym poziomie i stabilizuje kateninę p120, regulator połączeń kadherynowych, i tym samym wpływa na trwałość połączeń CDH1 między komórkami PSC (Li i in. 2010).

Natomiast komórki układające się na brzegach kolonii mocniej przylegają do ECM i tworzą połączenia pasm adhezji ogniskowej, ponieważ jedna strona komórki PSC ułożonej na krawędzi nie łączy się z drugą komórką PSC, co wpływa na ich większą specjalizację bazalno-lateralną. Pasma adhezji ogniskowej (inaczej zwanej fokalną, ang. *focal adhesion*) w komórkach PSC, które łączą ECM z cytoszkieletem komórki przez białka integryny zapewniają niezróżnicowany stan ludzkich PSC. Połączenia te są regulowane przez kinazę FAK, a obniżenie ekspresji kinazy FAK powoduje zmiany w morfologii kolonii, co przejawia się obniżeniem poziomu ekspresji markerów pluripotencji takich jak *NANOG*, *POU5F1* i *SOX2* (Vitillo i in. 2016; Villa-Diaz i in. 2019). Ponadto kinaza FAK może regulować szlak PI3K/AKT, który bierze udział w utrzymaniu pluripotencji (Närvä i in., 2017; Kallas-Kivi i in. 2018; Stubb i in. 2019). Na podstawie analizy porównawczej transkryptomu ludzkich komórek PSC z centralnej i brzegowej części kolonii stwierdzono, że komórki na brzegach kolonii wykazywały wzbogacenie o terminy funkcjonalne związane między innymi z adhezją ogniskową czy organizacją cytoszkieletu, co potwierdza wcześniejsze badania zespołu profesor Ivaski, że komórki PSC na brzegach kolonii wykazują większą adhezję do ECM poprzez tworzenie pasm adhezji fokalnych w porównaniu do komórek PSC w centrum kolonii (Närvä i in. 2017; Stubb i in. 2019; Kim i in. 2022).

Ścieżki łączące ECM z wnętrzem komórek PSC sprzężone są za pomocą mechanotransdukcji, czyli odbieraniu bodźców mechanicznych i zamianie ich na informację biochemiczną. Opór podłoża hodowlanego na mechaniczne napieranie pochodzące z wnętrza komórki reguluje stabilność adhezji ogniskowych i aktywność kinazy FAK. Z kolei, kinaza FAK fosforyluje i aktywuje sygnalizacje zależne od sił mechanicznych, takie jak sygnalizacja MAPK czy sygnalizację transformującego białka RhoA. Jednocześnie, sztywność podłoża hodowlanego wpływa na sztywność ludzkich komórek PSC, organizację i napięcie cytoszkieletu aktynowego oraz sygnalizację wewnątrzkomórkową (Vining i Mooney 2017). Ścieżką sygnalizacyjną wpływającą na organizację cytoszkieletu aktynowego jest sygnalizacja Hippo. Aktywna ścieżka Hippo przejawia się zatrzymaniem białka związanego z Yes (YAP, ang. *yes-associated protein*) i aktywatora transkrypcji z motywem wiążącym PDZ (TAZ, ang. *transcriptional activator with PDZ-binding motif*) w

cytoplazmie przez fosforylację YAP/TAZ przez białko dużą kinazę supresorową guza 1/2 (LATS1/2, ang. *large tumor supresor kinase 1/2*). Natomiast defosforylacja YAP/TAZ podczas nieaktywnej ścieżki Hippo powoduje translokację YAP/TAZ do jądra komórkowego, gdzie łącząc się z czynnikiem wzmacniającym transkrypcyjnym TEF1/4 (TEAD1/4, ang. *transcriptional enhancer factor TEF1/4*) regulują ekspresję genów zaangażowanych w proliferację, polaryzację komórki i organizację cytoszkieletu aktywnego. W kontekście ludzkich komórek PSC wykazano, że aktywność YAP/TAZ jest niezbędna do utrzymania pluripotencji, a obniżenie aktywności YAP/TAZ prowadziło do różnicowania w kierunku neuroektodermy. Ponadto utrzymanie aktywności YAP/TAZ w hodowli *in vitro* ludzkich PSC przez sygnalizację Rho moduluje organizację mikrofilamentów aktynowych, co z kolei wpływa na przeżywalność, samoodnawianie i pluripotencję ludzkich komórek PSC (Ohgushi i in. 2015). Pomimo ogromnego znaczenia niszy w pluripotencji i różnicowaniu PSC, regulatory kierujące adhezją komórkową i przyleganiem do ECM komórek PSC nie są do końca poznane i zrozumiane.

Początkowo ustanowione kultury *in vitro* ludzkich PSC hodowane były na warstwie odżywczej inaktywowanych mitotycznie MEF i w podstawowej pożywce hodowlanej DMEM/F12 z dodatkiem cielej surowicy płodowej (FCS, ang. *fetal calf serum*) (Thomson 1998; Reubinoff i in. 2000; Hoffman i Carpenter 2005). Takie warunki hodowli określa się jako zależne od komórek odżywczych (ang. *feeder-dependent*). Jednakże obecność w medium niezdefiniowanych komponentów pochodzenia zwierzęcego jest problematyczna ze względu na to, że:

- a) występowanie niezdefiniowanych czynników zawartych w FCS oraz wytwarzanych przez warstwę komórek MEF może zakłócać wyniki badań i zaburzać ich prawidłową interpretację,
- b) zmienność składu FCS oraz warstwy komórek MEF wynikającej ze zmienności osobniczej może zmniejszyć/wpływać na powtarzalność wyników,
- c) możliwość przeniesienia patogenów odzwierzęcych do hodowli ludzkich PSC stanowi barierę dla przyszłego klinicznego zastosowania w terapii.

Poznanie mechanizmów i czynników niezbędnych do utrzymania pluripotencji ludzkich PSC przyczyniło się do rozwiązania wyżej wymienionych problemów związanych z hodowlą ludzkich PSC z wykorzystaniem komponentów odzwierzęcych. Hodowla ludzkich PSC w medium z dodatkiem bFGF i TGFβ1 pozwoliła na zrezygnowanie z warstwy odżywczych komórek MEF (ang. *feeder-free*) i zastosowanie bardziej zdefiniowanych

podłoży, takich jak Matrigel (inaczej Geltrex), fibronektyna, laminina i witronektyna (**tab. 1**) (Xu i in. 2001; Amit i in. 2004; Rosler i in. 2004; Chen i in. 2011).

Należy jednak pamiętać, że wszystkie wymienione wyżej podłoża hodowlane różnią się między sobą składem, co z pewnością wpływa na różną sygnalizację zewnątrzkomórkową. Mimo tego, że hodowla ludzkich PSC i utrzymywanie stanu pluripotencji jest możliwe z wykorzystaniem wymienionych podłoży, ich wpływ na ekspresję genów i inne cechy fenotypowe ludzkich PSC nie jest jeszcze dokładnie poznany. Ponadto nie są znane geny, które mogą regulować przyczepność PSC do podłoża.

Tabela 1. Skład zdefiniowanych podłoży do hodowli ludzkich PSC. EHS – mysz nowotwór Engelbreth-Holm-Swarm, który powstał spontanicznie u szczepu myszy ST/Eh. Linia komórkowa wyprowadzona z tego guza produkuje i wydziela do medium duże ilości białek błony podstawnej (Hayashi i in. 2004). 804-G – linia komórkowa wyizolowana ze szczurzego nowotworu pęcherza moczowego, produkuje i wydziela do medium duże ilości głównie białka lamininy, mniej fibronektyny (Langhofer i in. 1993)

		Rodzaj podłoża			
		Matrigel (Geltrex)	Laminina	Witronektyna	Fibronektyna
Skład		Laminina kolagen IV entaktyna proteoglikany siarczanu heparanu	Laminina	Witronektyna	Fibronektyna
	Pochodzenie	Rozpuszczony ekstrakt błony podstawnej mysiego guza EHS	Oczyszczona z ludzkiego łożyska, komórek mysiego guza EHS, medium komórek 804-G	Rekombinowane ludzkie białko	Oczyszczona z ludzkiego, bydłowego lub mysiego osocza, lub z ludzkich fibroblastów

1.5. Zastosowanie komórek macierzystych w terapii w medycynie regeneracyjnej

Istotą medycyny regeneracyjnej jest zastąpienie chorych, dysfunkcyjnych lub uszkodzonych tkanek lub narządów zdrowymi. PSC mogą być użyte jako źródło komórek do terapii komórkowej w leczeniu różnych chorób i urazów, takich jak cukrzyca typu I, choroba Parkinsona, nowotwory czy uszkodzenie rdzenia kręgowego. Schorzenia, takie jak cukrzyca typu I, są dobrym celem dla medycyny regeneracyjnej, ponieważ tylko jeden typ komórek, komórki β produkujące insulinę, jest utracony. Warto zauważyć, że PSC i ich pochodne zróżnicowane w warunkach *in vitro* stanowią nielimitowaną pulę komórek do

przeszczepu, w porównaniu do narządów pochodzących od nieżywych dawców, których liczba jest ograniczona. Dodatkową zaletą wykorzystania PSC w medycynie regeneracyjnej jest to, że zróżnicowane *in vitro* tkanki z iPSC od pacjenta ograniczają odpowiedź immunologiczną organizmu po transplantacji i zmniejszają prawdopodobieństwo odrzucenia przeszczepu. Do terapii wykorzystujących technologię komórek macierzystych zastosowanie znalazły zarówno ESC, jak i iPSC.

Warto zauważyć, że chociaż leczenie wykorzystujące PSC uważa się za obiecującą i przyszłościową terapię medyczną, nadal istnieją problemy do rozwiązania, takie jak:

- a) heterogenność linii komórkowych ESC i iPSC,
- b) niska wydajność różnicowania *in vitro* do funkcjonalnych komórek somatycznych.

Mimo tego, że wszystkie PSC wykazują niezróżnicowany fenotyp przejawiający się nieograniczoną proliferacją, każda linia ma nieco inne właściwości i wykazuje odmienny potencjał do różnicowania się do poszczególnych typów komórek (Osafune i in. 2008; Cahan i Daley 2013; Yohei i in. 2019). Heterogenność obserwowana jest wśród linii ESC. W 2008 roku zweryfikowano 17 linii ludzkich ESC pod kątem potencjału do różnicowania. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano znaczące różnice w ekspresji genów specyficznych dla danej linii rozwojowej. Ponadto wykazano, że poszczególne linie ESC przejawiają inny potencjał do przechodzenia w komórki somatyczne, i tak niektóre z nich bardziej efektywnie różnicowały się w kierunku komórek trzustki (Hues2, Hues4, Hues8), a inne w kierunku kardiomiocytów (Hues2, Hues3, Hues4, Hues11) (Osafune i in. 2008). Pierwszym powodem różnorodności pomiędzy poszczególnymi liniami PSC jest zróżnicowanie genetyczne pomiędzy osobnikami. Odmienność genetyczna oddziałuje na specyficzne zachowanie w warunkach *in vitro* poszczególnych linii poprzez ekspresję genów i ścieżki sygnałowe. W jednym z badań porównano potencjał do różnicowania *in vitro* do komórek wątroby z iPSC wygenerowanych z komórek krwi lub fibroblastów od tego samego lub różnych donorów. Wyniki wykazały znaczne różnice w efektywności różnicowania, które były efektem zmienności pomiędzy donorami, a nie pochodzeniem tkankowym komórek użytych do przeprogramowania (Kajiwara i in. 2012). Drugim powodem heterogenności wśród różnych linii PSC są mutacje genetyczne w komórkach somatycznych, które były źródłem komórek do przeprogramowania lub mutacje powstające *de novo* podczas procesu przeprogramowania komórek dorosłych do iPSC (Howden i in. 2011; Abyzov i in. 2012; Young i in. 2012).

Terapie medycyny regeneracyjnej opierające się na transplantacji komórek i tkanek zróżnicowanych *in vitro* są dużą nadzieją dla pacjentów, dla których dotychczas opracowane leczenie nie jest skuteczne. Jednakże, aby komórki zróżnicowane *in vitro* z PSC mogły być przeszczepione do pacjentów, muszą być wyspecjalizowane w pełnieniu określonych funkcji fizjologicznych. Dużą przeszkodą na drodze do powszechnego wprowadzenia terapii komórkowych jest niska i zmienna wydajność różnicowania, która przejawia się małą populacją zróżnicowanych komórek somatycznych, które są w pełni funkcjonalne. Przykładem może być różnicowanie *in vitro* do trzustkowych endokrynnych komórek β , które mogłyby być potencjalnie przeszczepione do pacjentów cierpiących na cukrzycę typu I. Jednakże efektywność różnicowania zmniejsza się w miarę przechodzenia z jednego stadium do drugiego, i tak w końcowym stadium komórek β osiąga się efektywność rzędu około 20–50%. Przyczyną niskiej wydajności może być fakt, że kluczowe etapy i czynniki kierujące rozwojem trzustki, zwłaszcza mechanizmy na późniejszych etapach embriogenezy, nie zostały jeszcze w pełni poznane i zrozumiane. Ponadto nie są odkryte czynniki decydujące, w którym momencie komórka rozpoczyna specjalizację w kierunku np. komórki α czy β . Należy pamiętać, że wszystkie komórki wchodzące w skład wysp trzustkowych pochodzą od tych samych komórek prekursorowych, a drogi i czas rozchodzenia się poszczególnych linii rozwojowych nie są w pełni znane. Ta sama ścieżka rozwoju i pełnienie podobnej funkcji przez komórki endokryennej trzustki jest przyczyną powstawania nielicznej populacji w pełni funkcjonalnych komórek β w różnicowaniu *in vitro* ludzkich PSC. Efektem jest również powstawanie komórek polihormonalnych, które produkują więcej niż jeden hormon, przez co nie są zdolne do prawidłowego reagowania na zmiany poziomu glukozy (Rezania i in. 2014; Scavuzzo, Hill i in. 2018; Szlachcic i in. 2021).

Prócz tego w przyszłości, kiedy stosowanie zróżnicowanych *in vitro* tkanek z ludzkich komórek PSC będzie powszechnie stosowaną terapią medycyny regeneracyjnej, mogą pojawić się nowe problemy, które będą wymagać rozwiązania:

- c) tworzenie się guzów z komórek zróżnicowanych *in vitro*,
- d) immunogenność komórek zróżnicowanych *in vitro*.

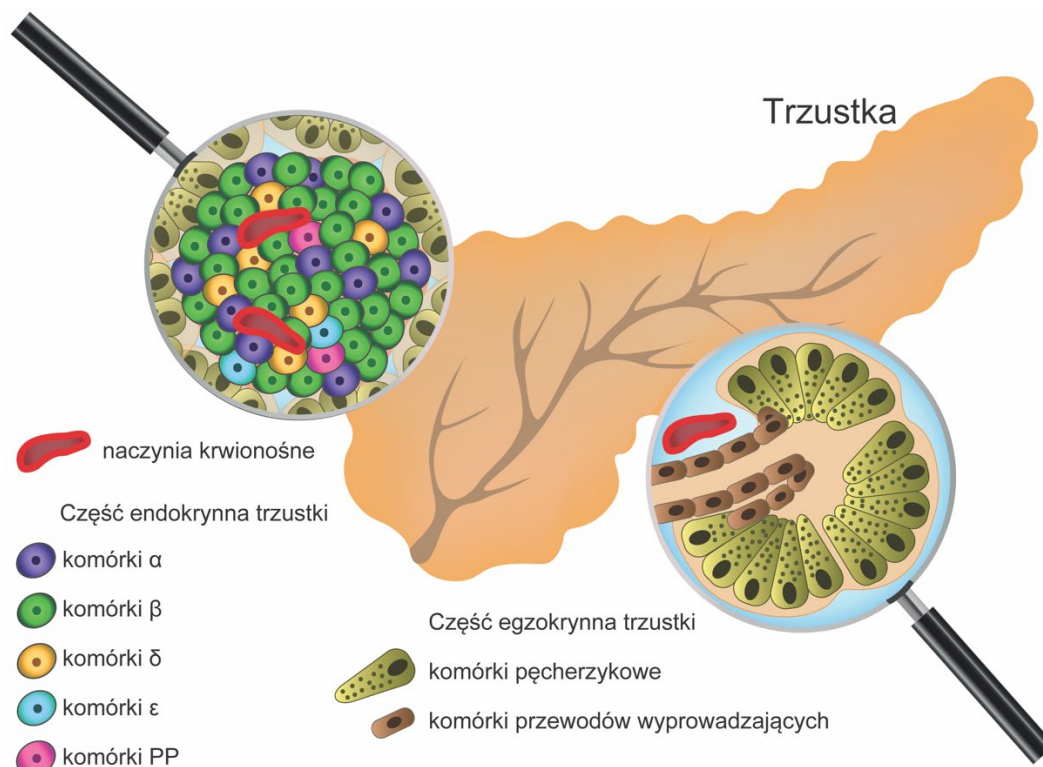
Zdolność do nieograniczonej liczny podziałów (samoodnawianie) niewątpliwie jest zaletą PSC, ponieważ pozwala na uzyskanie w krótkim czasie bardzo dużej puli komórek, które można zróżnicować *in vitro* do wszystkich typów komórek tworzących nasz organizm. Jednakże proliferacja utrzymująca się po przeszczepie, która może wynikać z niekompletnego lub nieprawidłowego kierunku różnicowania, stanowi zagrożenie

wytworzenia się guzów u pacjentów. Nawet niewielka liczba komórek niezróżnicowanych może doprowadzić do rozwoju guzów (Lee i in. 2009; Martin i in. 2020). Rozwiązaniem tego problemu jest dopracowanie protokołów różnicowania *in vitro* w taki sposób, aby generowały możliwie jak największą pulę prawidłowo zróżnicowanych komórek. Drugim możliwym wyjściem jest oczyszczanie grupy wygenerowanych komórek poprzez selekcję prawidłowo zróżnicowanych lub eliminację niezróżnicowanych PSC, w obu przypadkach na przykład z użyciem odpowiednich przeciwciał (Hayashi i in. 2018; Sougawa i in. 2018; Yamanaka 2020).

Kwestia wywołania odpowiedzi immunologicznej i odrzucenia pochodnych ESC i iPSC zróżnicowanych *in vitro* pozostaje bardzo ważna w terapii medycyny regeneracyjnej. W przeciwieństwie do ESC technologia iPSC przyniosła nadzieję na wytworzenie autologicznego organu do przeszczepu, który nie wywoła odpowiedzi immunologicznej u pacjenta. Jednakże niektóre badania u myszy wskazują na to, że autologiczne pochodne iPSC mogą być immunogenne (Zhao i in. 2011; 2015; Deuse i in. 2019). Niemniej prowadzone już badania kliniczne wykorzystujące komórki zróżnicowane z iPSC dają nadzieję na immunologiczną tolerancję i nieodrżucenie transplantu. Przykładem jest badanie wykorzystujące autologiczny przeszczep komórek pigmentowych nabłonka siatkówki, które zostały zróżnicowane *in vitro* z iPSC wygenerowanych z fibroblastów pacjenta ze związanym z wiekiem zwyrodnieniem plamki żółtej w oku. Dwa lata po transplantacji nie zaobserwowano odrzucenia przeszczepu (Mandai i in. 2017). Warto zauważyć, że obecnie transplantacje allogeniczne są preferowane względem przeszczepów autogenicznych, ponieważ weryfikacja jakości i bezpieczeństwa każdej wyprowadzonej linii iPSC jest czasochłonna, kosztowna i wymaga dużych nakładów pracy. Dodatkowo występują różnice w efektywności różnicowania do poszczególnych komórek pomiędzy poszczególnymi liniami ludzkich PSC.

1.6. Budowa i funkcja trzustki

Trzustka jest narządem gruczołowym spełniającym równocześnie funkcję zewnątrz- (część egzokrynną) i wewnątrzwydzielniczą (część endokrynną) (ryc. 8).



Rycina 8. Schemat budowy trzustki. Trzustka składa się z dwóch części: **endokrynną** (wewnątrzwydzielniczej, po lewej) tworzącej wyspy trzustkowe Langerhansa i produkującej hormony. Główną funkcją części endokrynną jest utrzymywanie homeostazy glukozy we krwi. Wyspy trzustkowe są dobrze unaczynione, aby szybko reagować na zmiany poziomu cukru we krwi; **egzokrynną** (zewnątrzwydzielniczej, po prawej) zbudowanej z komórek pęcherzykowych produkujących i wydzielających do dwunastnicy enzymy trawienne

Egzokrynną część trzustki składa się z komórek pęcherzykowych wyspecjalizowanych w produkcji i uwalnianiu soku trzustkowego składającego się z enzymów trawiennych biorących udział w trawieniu białek, cukrów i tłuszczów. Enzymy wydzielane przez komórki pęcherzykowe są zbierane przez mniejsze przewody trzustkowe, które łączą się w przewód trzustkowy główny (przewód Wirsunga) uwalniający sok trzustkowy do dwunastnicy. Enzymy w trzustce produkowane są w postaci nieaktywnych proenzymów (zymogenów) i aktywowane są dopiero w miejscu docelowym. Enterokinaza obecna w dwunastnicy aktywuje tripsynogen do tripsyny, która następnie aktywuje pozostałe proenzymy obecne w soku trzustkowym (tab. 2) (Alexandre-Heymann i in. 2019).

Komórki części endokrynną tworzą wyspy trzustkowe (wyspy Langerhans'a, około 5% wszystkich komórek trzustki), które rozproszone są wśród egzokrynną część trzustki. Podstawową funkcją części endokrynną jest utrzymywanie homeostazy glukozy poprzez produkcję i sekrecję określonych hormonów (tab. 2). Najliczniejsze w wyspach są komórki α i β , a pozostała część wysp zbudowana jest z komórek ϵ , δ i PP regulujących parakrynnie

funkcję komórek α i β (Benitez i in. 2012; Braun 2014; Gromada i in. 2018). Architektura oraz stosunek liczbowy określonych typów komórek różnią się między ludźmi a myszami. Mysie wysepki mają bardziej zdefiniowaną strukturę. Centralna część wyspy składa się z komórek β (około 60–80% komórek wysp), która otoczona jest przez komórki α (około 15–20% komórek wysp), komórki δ (<10% komórek wysp) oraz niewielkiej liczby komórek PP i ϵ . Natomiast ludzkie wyspy trzustkowe nie mają podobnie zorganizowanej struktury, a komórki części endokrynnej są losowo rozproszone w wyspie. W porównaniu do mysich wysp w ludzkich wyspach występuje większa populacja komórek α i mniejszy odsetek komórek β . Komórki α stanowią około 40% komórek wysp, natomiast komórki β około 50% komórek wysp (Steiner i in. 2010).

Komórki β kontrolują homeostazę glukozy poprzez sekrecję INS w odpowiedzi na wzrost stężenia poziomu cukru we krwi, co pozwala na pobieranie glukozy z krwi do komórek tkanek peryferyjnych, np. hepatocytów lub komórek mięśniowych. Glukoza pobrana przez tkanki może być zmagazynowana w postaci glikogenu (tak jak w komórkach wątroby) lub wykorzystana jako źródło energii (tak jak np. w komórkach mięśniowych). Podczas gdy INS obniża poziom glukozy we krwi, glukagon (GCG, ang. *glucagon*) wydzielany przez komórki α zwiększa poziom cukru poprzez stymulowanie hepatocytów do lizy zmagazynowanego glikogenu i uwolnienia glukozy (Benitez i in. 2012).

Tabela 2. Substancje produkowane i wydzielane przez trzustkę – część endokrynną (wewnątrzwydzielnicza) i część egzokrynną (zewnątrzwydzielnicza)

Typ komórki	Wydzielina	Funkcja
<i>Część endokrynną – produkująca i wydzielająca hormony</i>		
Komórki α	glukagon	wzrost stężenia glukozy we krwi
Komórki β	insulina	spadek stężenia glukozy we krwi
	amylina	spadek stężenia glukozy we krwi, opóźnienie opróżnienia żołądka
Komórki δ	somatostatyna	inhibicja wydzielania insuliny lub glukagonu
Komórki ϵ	grelina	stymulacja wydzielania somatostatyny
Komórki PP	polipeptyd trzustkowy	regulacja wydzielania insuliny i somatostatyny, regulacja wydzielania enzymów z trzustki
<i>Część egzokrynną – produkująca i wydzielająca enzymy trawienne</i>		
Komórki pęcherzykowe	trypsynogen (aktywna forma: trypsyna)	rozkład białek do oligopeptydów
	chymotrypsynogen (aktywna forma: chymotrypsyna)	rozkład białek do oligopeptydów
	karboksypeptydaza	rozkład oligonukleotydów do aminokwasów
	proelastaza (forma aktywna: elastaza)	wspomaganie rozkładu białek poprzez rozrywanie wiązań peptydowych
	lipaza	rozkład związków tłuszczów do wolnych kwasów tłuszczowych i monoacyloglicerolu
	fosfolipaza	rozkład związków tłuszczowych, wspomaganie rozkładu fosfolipidów
	esteraza	rozkład związków tłuszczów na kwasy i alkohole poprzez rozrywanie wiązań estrowych
	amylaza	rozkład węglowodanów na cukry proste
	nukleazy	rozkład wiązań fosfodiesterowych w kwasach nukleinowych

1.7. Cukrzyca jako cel medycyny regeneracyjnej

Długotrwałe utrzymywanie się zaburzonej gospodarki glukozy może prowadzić do rozwoju metabolicznej, chronicznej choroby jaką jest cukrzyca. Wyróżniamy dwa podstawowe typy cukrzycy. Cukrzyca typu I spowodowana jest utratą puli komórek β produkujących INS z powodu ataku autoimmunologicznego. Natomiast cukrzyca typu II przejawia się nieprawidłową funkcją komórek β , utratą funkcjonalnej puli komórek β oraz/lub insulinoopornością tkanek peryferyjnych (Johannesson i in. 2015). Swoistą cechą cukrzycy jest utrzymujący się podwyższony poziom glukozy we krwi (hiperglikemia).

Obecne strategie terapeutyczne opierają się na kontroli homeostazy węglowodanów poprzez prowadzenie zdrowego stylu życia w połączeniu z terapiami. Najczęściej leczenie wiąże się z częstym badaniem poziomu cukru we krwi oraz, w przypadku cukrzycy typu I i zaawansowanego stadium typu II, podaniem odpowiedniej ilości egzogennej INS w formie iniekcji. Ponadto w leczeniu cukrzycy typu II stosowane są leki stymulujące sekrecję INS lub inhibujące wydzielanie GCG. Warto zauważyć, że metody leczenia pozwalają na stabilne utrzymanie homeostazy glukozy, jednak nie prowadzą do wyleczenia cukrzycy. Dodatkowo często powodują niedogodności dla pacjentów z cukrzycą i z biegiem czasu stają się niewystarczające, co może prowadzić do wystąpienia trwałych zaburzeń (Marín-Peñalver i in., 2016; Yabe i in., 2019). Przeszczep całych trzustek lub wysp trzustkowych od nieżywych dawców może stanowić potencjalnie sposób na złagodzenie objawów cukrzycy. Jednakże allogeniczna transplantacja wiąże się z koniecznością przyjmowania leków immunosupresyjnych, aby odwlec czas odrzucenia przeszczepu. Ze względu na stopniową utratę przeszczepionej tkanki, powrót do konwencjonalnego leczenia lub kolejny przeszczep jest nieunikniony. Ponadto w trakcie procedury przeszczepu może dojść do niedotlenienia i obumarcia części transplantowanych wysp ze względu na zbyt długi czas trwania zabiegu oraz angiogenezy. Należy również pamiętać, że liczba potencjalnych dawców jest ograniczona (Shapiro i in. 2006; Moore i in. 2015). W związku z powyższym regeneracja puli komórek β pacjenta poprzez transplantację ludzkich komórek β uzyskanych przez różnicowanie w warunkach *in vitro* z PSC stwarza atrakcyjne rozwiązanie dla odzyskania normoglikemii u pacjentów z cukrzycą.

Obecne protokoły służące do różnicowania *in vitro* PSC do komórek β trzustki opierają się na odzwierciedleniu następujących po sobie stadiów rozwoju embriogenezy trzustki poprzez modulację szlaków sygnałowych zaangażowanych w ten proces (Borowiak i in. 2009; Pagliuca i in. 2014; Rezania i in. 2014; Russ i in. 2015; Millman i in. 2016; Velazco-Cruz i in. 2019; Hogrebe i in. 2020). Jednakże efektywne zróżnicowanie klinicznie użytecznych i w pełni funkcjonalnych komórek β trzustki lub struktur podobnych do wysp trzustkowych jest utrudnione ze względu na luki w wiedzy na temat czynników i ścieżek sygnałowych modulujących różnicowanie prekursorów i dojrzewanie komórek endokrynych trzustki. Na podstawie wyników badań wykorzystujących metodę sekwencjonowania RNA na poziomie pojedynczych komórek (scRNA-Seq, ang. *single-cell RNA sequencing*) z rozwijającej się mysiej trzustki, ujawniono bardziej złożony obraz embriogenezy tego organu niż dotychczas sądzono (Byrnes i in. 2018; Scavuzzo i in. 2018; Szlachcic i in. 2021). Wykorzystując uzyskane wyniki, wyodrębniono również nowe podtypy komórek prekursorowych czy czynniki transkrypcyjne i ścieżki sygnałowe z

dotychczas nieopisaną funkcją w rozwoju trzustki, które są potencjalnym celem do modulacji, aby zwiększyć efektywność różnicowania komórek endokrynych trzustki w warunkach *in vitro*.

1.8. Rozwój komórek endokrynych trzustki na tle embriogenezy trzustki

Procesy i mechanizmy zachodzące podczas tworzenia się trzustki w zarodku są zachowane pomiędzy człowiekiem i myszą, z małymi różnicami. W czasie embriogenezy trzustka rozwija się z jelita pierwotnego pochodzenia endodermalnego, która podzielona jest zgodnie z morfologicznym ukształtowaniem zarodka na część przednią, środkową i tylną. Trzustka powstaje na granicy części przedniej i środkowej zwanej pętlą dwunastnicy (Lawson i Schoenwolf 2003; Wells i Melton 2000). Rozwój trzustki możemy podzielić na dwa główne wydarzenia:

- a) przejście pierwotne (ang. *primary transition*),
- b) przejście wtórne (ang. *secondary transition*).

Przejście pierwotne rozpoczyna się od powstania wybrzuszenia w ścianie jelita pierwotnego, które następnie dzieli się na dwie części: grzbietową i brzuszna. Dzieje się to około 29–33 dnia po zapłodnieniu u ludzi i w okolicach dnia embrionalnego 9,5-10 (e9,5-10, ang. *embryonic day*) u myszy (Pan i Wright 2011; Benitez i in. 2012). Komórki tworzące część grzbietową i brzuszna zbudowane są z komórek prekursorów multipotencjalnych, które dają początek wszystkim typom komórek trzustkowych i charakteryzują się ekspresją czynników transkrypcyjnych, takich jak: PDX1, czynnik transkrypcyjny SRY-box 9 (SOX9, ang. *SRY-box transcription factor 9*) i swoisty czynnik transkrypcyjny trzustki 1A (PTF1A, ang. *pancreas specific transcription factor 1A*) (Offield i in. 1996; Krapp i in. 1998; Kawaguchi i in. 2002; Lynn i in. 2007; Burlison i in. 2008). Wyłączenie ekspresji każdego z tych genów u myszy czy delecja u ludzi uniemożliwia wytworzenie się trzustki w procesie embriogenezy. Z postępem rozwoju, około 6 tygodnia embriogenezy u ludzi i e11–12 u myszy, część brzuszna i grzbietowa zaczynają się wybrzuszać, i część brzuszna przemieszcza się na drugą część rury przewodu pokarmowego i łączy się z częścią grzbietową (Jeon i in. 2009; Jennings i in. 2013). Następnie rozwijająca się trzustka zaczyna przejście wtórne.

Przejście wtórne ma miejsce pomiędzy 10 a 14 tygodniem embriogenezy u człowieka i w e13,5 u myszy. Intensywna morfogeneza rozgałęzionej struktury, która będzie w przyszłości tworzyć sieć przewodów wyprowadzających trzustki, przyczynia się do

powstania części podstawnej (ang. *trunk domain*) łączącej się z rurą jelita i części końcowej (ang. *tip domain*). Komórki, w których zachodzi ekspresja genów markerowych *PDX1* i *PTF1A* tworzą część końcową i początkowo wykazują zdolności multipotencjalne, ale z biegiem przejścia wtórnego nabywają cech komórek pęcherzykowych części egzokrynnej (Zhou i in., 2007). Natomiast część podstawna z komórkami prekursorów bipotentnych wykazujących ekspresję *PDX1*, *SOX9* i czynnika transkrypcyjnego *NKX6-1* (*NKX6-1*, ang. *NK6 homeobox 1*) różnicuje się w komórki przewodów wyprowadzających i prekursorów endokrynnej trzustki (EP, ang. *endocrine progenitors*) (Jennings i in. 2015). Komórki EP powstają z komórek epitelium (nabłonka) części podstawnej bez ekspresji *SOX9*, ale wykazujących ekspresję neurogeniny 3 (*NGN3*, ang. *neurogenin 3*), czynnika transkrypcyjnego niezbędnego do zainicjowania różnicowania się komórek EP (Gu i in. 2002; Sheets i in. 2018). Ekspresja *NGN3* aktywuje kolejne czynniki transkrypcyjne kluczowe dla rozwoju endokrynnej trzustki, takie jak czynnik transkrypcyjny neuronalnego różnicowania 1 (*NEUROD1*, ang. *neuronal differentiation 1*), białko związane z insulinoma 1 (*INSM1*, ang. *insulinoma-associated protein 1*), czynnik transkrypcyjny *IRX1* (*IRX1*, ang. *iroquois homeobox 1*), czynnik regulujący X6 (*RFX6*, ang. *regulatory factor X6*) czy czynnik transkrypcyjny *PAX4* (*PAX4*, ang. *paired box 4*) (Gu i in. 2002).

Co ciekawe, u myszy ekspresja *Ngn3* zachodzi dwufazowo. Pierwsza fala ekspresji *Ngn3* jest związana z pojawieniem się pierwszych wczesnych komórek α pomiędzy e8,5 a e11 (Villasenor i in. 2008; Yu i in. 2019). Druga fala wysokiej ekspresji *Ngn3* ma miejsce od e13,5 do e17,5, prowadząc do zróżnicowania się wszystkich typów komórek endokrynych trzustki (Villasenor i in. 2008; Yu i in. 2019). Z kolei u ludzi zwiększona ekspresja *NGN3* koreluje z pojawieniem się pierwszych skupisk komórek β , zaczynając od 7 tygodnia rozwoju i z mocnym zwiększeniem poziomu ekspresji w tygodniach 8–10 (Jennings i in. 2013).

Bardzo ważnym procesem zachodzącym podczas powstawania i różnicowania komórek endokrynych trzustki jest zmiana fenotypu komórek epitelialnych na charakterystykę komórek mezenchymalnych – przejście epitelialno-mezenchymalne (EMT, ang. *epithelial to mesenchymal transition*) (Benitez i in. 2012). Proces EMT jest kluczowy dla embriogenezy, ponieważ zapewnia tworzenie się skomplikowanej struktury 3D tkanek i narządów. W miarę postępu EMT morfologia komórki, właściwości adhezyjne, ruchliwość komórki oraz profil ekspresji genów zmienia się całkowicie (Thiery i in. 2009). Powszechnie uważało się, że EMT jest niezbędne do tworzenia wysepek trzustkowych podczas rozwoju,

gdy EP wyłaniają się z rdzenia nabłonkowego i przechodzą do otaczającej mezenchymy, aby różnicować się w kierunku wszystkich typów komórek endokrynych trzustki. Tradycyjny pogląd na EMT opiera się na binarnym przejściu od silnie przylegających komórek nabłonka do luźno upakowanych komórek, które migrują wśród mezenchymy. Proces ten kończy się agregacją komórek endokrynych i stworzeniem struktur wysepek Langerhansa (Pan i Wright 2011; Villasenor i in. 2012; Bankaitis i in. 2015). Jednakże ostatnie badania wykazały, że wychodzenie komórek EP z epitelium jest bardziej stopniowym procesem niż klasycznie opisywane EMT. Mianowicie potwierdzono, że przejawia się ono kilkoma przejściowymi podtypami komórek EP charakteryzującymi się specyficznym profilem ekspresji genów (Byrnes i in. 2018; Scavuzzo, Hill i in. 2018; Sharon i in. 2019a; Yu i in. 2019). Opierając się na badaniach przeprowadzonych na rozwijającej się mysiej trzustce z wykorzystaniem scRNA-Seq, możemy spekulować, że pojedyncze komórki EP nie migrują w mezenchymie, ale tworzą struktury pęcherzyków utrzymujących kontakt komórka–komórka poprzez białko CDH1. Ponadto, grupa profesora Meltona wykryła pączkujące struktury pęcherzyków dojrzewających EP podczas różnicowania *in vitro* ludzkich PSC do komórek endokrynej trzustki. W badaniu tym pęcherzyki wykazują ekspresję markera komórek EP chromograniny A (CHGA, ang. *chromogranin A*) oraz hormonów produkowanych przez wyspy trzustkowe – INS, GCG i somatostatynę (Sharon i in. 2019a).

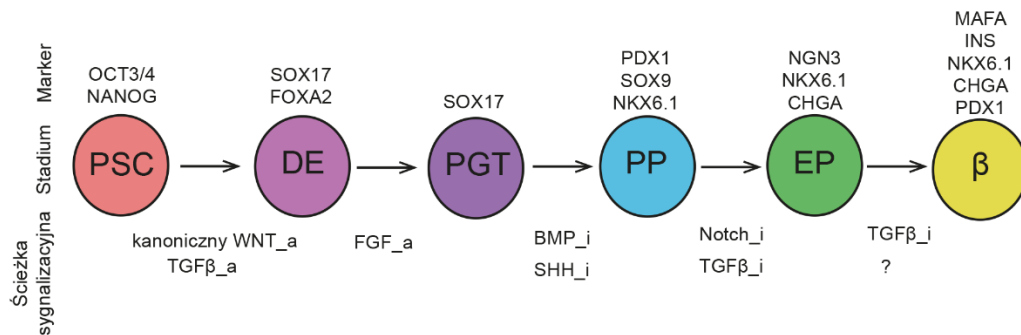
Wszystkie typy komórek endokrynych powstają z komórek EP wykazujących ekspresję *NGN3*. Unikatowa kombinacja czynników transkrypcyjnych wyzwala i kieruje kaskadą genów specyficznych dla wysp trzustkowych, hamując alternatywne sygnały i ostatecznie prowadząc do powstania funkcjonalnych komórek produkujących specyficzne hormony.

1.9. Różnicowanie *in vitro* ludzkich PSC do komórek β produkujących insulinę

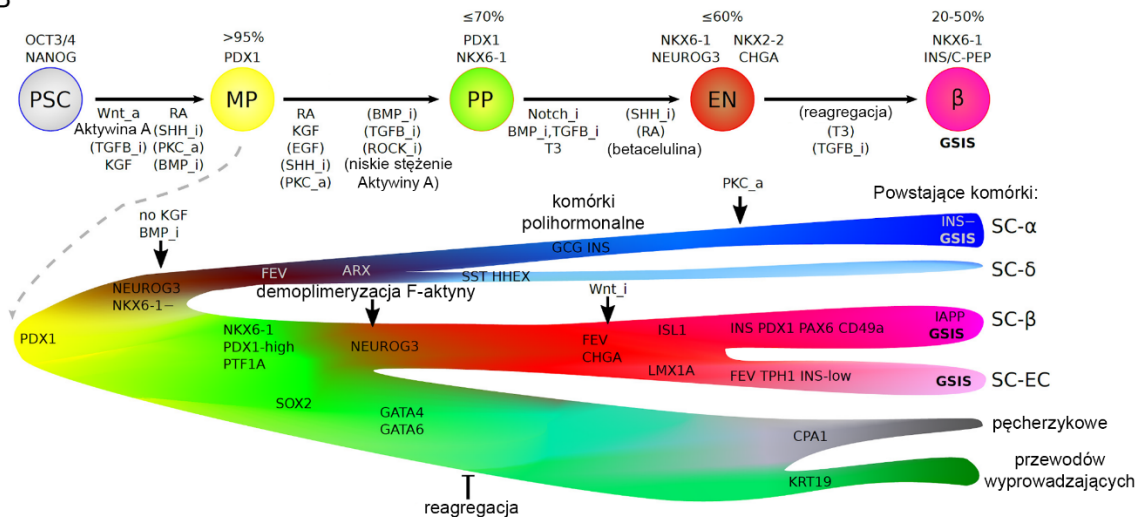
Obecne protokoły różnicowania komórek β *in vitro* z PSC opierają się na naśladowaniu kolejnych etapów rozwojowych trzustki poprzez modulację szlaków sygnałowych zaangażowanych w ten proces (**ryc. 9**). Modulacja poszczególnych ścieżek sygnalizacyjnych odbywa się z użyciem związków drobnocząsteczkowych i czynników wzrostu. Początkowo opracowywane były planarne protokoły różnicowania 2D, czyli takie, w których komórki przyłączone są do podłoża z ECM. Aktualnie największą efektywność różnicowania osiąga się używając protokołów 3D, w których komórki tworzą organoidy

zawieszane w medium różnicującym. Przyczyny zwiększonej efektywności protokołów 3D nie są jeszcze do końca poznane. Możliwe, że struktura organoidu odzwierciedla rozwijający się embrion, w którym każda komórka otoczona jest przez inne co ułatwia przekazywanie sygnałów między nimi. Należy jednak pamiętać, że w miarę różnicowania i przechodzenia komórek przez kolejne etapy, efektywność różnicowania spada. W związku z tym dobrą praktyką jest sukcesywne określanie efektywności osiąganej na poszczególnych etapach poprzez sprawdzanie ekspresji kilku genów markerowych dla każdego z nich.

A



B



Rycina 9. Różnicowanie *in vitro* ludzkich PSC w kierunku komórek β trzustki. A. Schemat przedstawiający poszczególne etapy różnicowania *in vitro* z regulacją pozytywną (a) lub negatywną (i) najważniejszych szlaków sygnalizacyjnych. Nad poszczególnymi etapami zaznaczono markery powszechnie używane do weryfikacji efektywności różnicowania. B. Górny panel odzwierciedla kolejne etapy rozwoju trzustki. Zaznaczono markery powszechnie używane do weryfikacji wydajności różnicowania i efektywność osiąganą na każdym stadium podaną w procentach (nad etapami) oraz szlaki sygnalizacyjne (pod strzałkami), które są aktywowane (a) lub hamowane (i). Nazwy ścieżek bez nawiasów oznaczają sygnalizacje modulowane we wszystkich ustanowionych protokołach, natomiast nazwy ścieżek w nawiasach oznaczają sygnalizacje modulowane tylko w części znanych protokołach. MP – multipotencjalne komórki prekursorowe; BP – bipotencjalne komórki prekursorowe; EN – linia komórek endokrynych (komórek prekursorowych i dojrzałych); GSIS – wydzielanie insuliny stymulowane glukozą. Dolny panel ukazuje szczegółowy obraz różnicowania *in vitro* ludzkich PSC do komórek β stworzony na podstawie analizy danych z scRNA-Seq. SC – komórki pochodzące z różnicowania *in vitro* ludzkich PSC; EC – komórki enterochromafinowe

Pierwszym etapem jest zróżnicowanie PSC do DE poprzez aktywację kanonicznego szlaku WNT i TGF β . CHIR99021 poprzez inhibicję GSK3 β aktywuje kanoniczny szlak WNT. Aktywacja szlaku TGF β odbywa się zazwyczaj poprzez białko aktywiny A.

Aktywacja tych sygnałów indukuje ekspresję genów markerowych dla endodermy – czynnik transkrypcyjny SRY-box 17 (SOX17, ang. *SRY-box transcription factor 17*) i czynnik transkrypcyjny FOXA2 (FOXA2, ang. *forkhead box A2*). Efektywność różnicowania na tym etapie wynosi około 90-95% (D'Amour i in. 2005; Takenaga i in. 2007; Borowiak i in. 2009; Teo i in. 2011; Payne i in. 2011; Dziedzicka i in. 2021). Po osiągnięciu stadium DE ma miejsce aktywacja ścieżki FGF poprzez dodanie czynnika wzrostu keratynocytów (KGF, ang. *keratinocyte growth factor*; inaczej FGF7). Aktywacja ścieżki FGF prowadzi dalszą specyfikację do komórek endodermy przedjelitowej (PGT, ang. *primitive gut tube*), czyli prekursorów dla przełyku, żołądka, wątroby oraz trzustki (D'Amour i in. 2006; Kroon i in. 2008; Russ i in. 2015).

Następnym stadium osiąganym przez komórki podczas różnicowania są komórki PP. Dodanie do pożywki różnicującej kwasu retinowego (RA, ang. *retinoic acid*) indukuje ekspresję markerowego genu *PDX1*, niezbędnego do formowania się trzustki (Johannesson i in. 2009). Na tym etapie bardzo ważne jest uniemożliwienie różnicowania w kierunku wątroby, co osiąga się poprzez inhibicję szlaku BMP przez dodanie małowcząsteczkowego związku LDN-193189. Ponadto inhibicja szlaku sonic hedgehog (SHH, ang. *sonic hedgehog pathway*) jest niezbędna do specyfikacji trzustki, dlatego do medium różnicującego dodaje się związek małowcząsteczkowy SANT-1 (Rezania i in. 2012; Pagliuca i in. 2014; Russ i in. 2015). Dodatkowo kombinacja embrionalnego czynnika wzrostu (EGF, ang. *embryonic growth factor*) i nikotynamidy zwiększa efektywność różnicowania *in vitro* ludzkich PSC do komórek β poprzez aktywację ekspresji specyficznego czynnika transkrypcyjnego *NKX6-1* już na etapie komórek PP. *NKX6-1* jest niezbędny do prawidłowego rozwoju i funkcjonowania komórek β (McGaugh i Nostro 2017). Markerem wyróżniającym komórki PP jest również *SOX9*. Na tym etapie różnicowania osiąga się efektywność około 70%.

Kolejnym etapem różnicowania *in vitro* jest nabycie przez komórki cech EP. Inhibicja szlaku Notch jest niezbędna do aktywacji *NGN3* i rozpoczęcia powstawania komórek EP (Murtaugh i in. 2003; Zhang i in. 2021). Z tego względu dodanie inhibitora XXI lub LY-411575 prowadzi do zahamowania aktywności enzymu γ sekretazy, który odgrywa kluczową rolę w aktywacji szlaku Notch. Po przyłączeniu się ligandu do receptora Notch, γ sekretaza przeprowadza proteolizę w strukturze receptora Notch i uwolniony fragment aktywnie przechodzi do jądra komórkowego, gdzie pełni funkcję czynnika transkrypcyjnego (Scavuzzo i in. 2018). Ponadto zahamowanie szlaku TGF β przez dodanie inhibitora receptora ALK5 (receptor TGF β typu I) wspomaga różnicowanie endokrynnych

komórek trzustki (Nostro i in. 2011; Rezania i in. 2012). Warto zauważyć, że system różnicowania w formie organoidów wzmacnia efektywność różnicowania do komórek endokrynych z tego względu, że struktura 3D w pewien sposób lepiej odzwierciedla zmiany podczas embriogenezy niż monowarstwa komórek 2D (Pagliuca i in. 2014; Russ i in. 2015; Millman i in. 2016; Vegas i in. 2016; Sharon i in. 2019b). Stadium komórek EP charakteryzuje się ekspresją genów takich jak, *CHGA* i *NGN3*, a efektywność różnicowania wynosi około 60%. Warto zauważyć, że czas aktywacji określonych genów, a także populacja komórek, w której ulegają ekspresji, jest kluczowym aspektem wydajnej specyfikacji komórek β *in vitro*. W stadium komórek PP pierwszym czynnikiem transkrypcyjnym kierującym różnicowanie w kierunku komórek endokrynych jest *NKX6-1*. Przedwczesna ekspresja markerów endokrynych komórek trzustkowych, w tym *NGN3*, skutkuje powstaniem niefunkcjonalnych komórek polihormonalnych (Johansson i in. 2007; Hogrebe i in. 2020). Badanie grupy profesora Millmana wykazało, że modulacja stanu polimeryzacji cytoszkieletu aktynowego na różnych etapach różnicowania *in vitro* wpływa na ekspresję czynników transkrypcyjnych będących markerami komórek endokrynych (Hogrebe i in. 2020). Wykazano, że silne przyleganie do ECM indukuje polimeryzację cytoszkieletu aktynowego w komórkach PP. Usztywnienie włókien aktynowych zapobiega przedwczesnej ekspresji *NGN3* i aktywuje ekspresję *NKX6-1*. W kolejnych etapach różnicowania, aby wytworzyć funkcjonalne komórki β , cytoszkielet aktynowy komórek EP z ekspresją *NKX6-1* i *NGN3* musi zostać rozluźniony, co uzyskano przez potraktowanie różnicujących komórek latrunkuliną A. W wyżej wymienionym badaniu najwyższą wydajność różnicowania osiągnięto po dodaniu latrunkuliny A w pierwszym dniu stadium komórek EP. Warto zauważyć, że manipulacja sztywności cytoszkieletu aktynowego umożliwiła uzyskanie funkcjonalnych komórek β z wykorzystaniem protokołu planarnego. Powszechnie wiadomo, że polimeryzacja cytoszkieletu aktynowego jest regulowana przez połączenia adhezyjne komórki z ECM – zwiększone przyleganie skutkuje sztywną i zwartą organizacją cytoszkieletu (Kim i in. 2012). W innym badaniu wykazano, że podczas rozwoju embrionalnego trzustki tworzenie bardziej zwartych połączeń komórka-ECM musi być zahamowane na etapie komórek EP, aby wzmocnić EMT i specyfikację komórek endokrynych (Liu i in. 2020). Jednak warto zauważyć, że regulatory mechanizmów modulujących stany polimeryzacji aktyny i przyczepności komórek EP są jeszcze mało poznane.

Końcowym stadium jest dojrzewanie komórek EP i specjalizacja w kierunku funkcjonalnych komórek β . Jednakże wciąż niewystarczająco poznane są mechanizmy

kierujące procesami dojrzewania EP i ich różnicowania w stronę komórek β . Podczas różnicowania *in vitro* nadal problem stanowi niska i zmienna efektywność uzyskiwania funkcjonalnych komórek β , jest to około 20–50% komórek. Na etapie dojrzewania EP do wczesnych niedojrzałych komórek β wymagana jest dalsza inhibicja szlaku TGF β przez inhibitor ALK5 oraz szlaku Notch przez inhibitory XXI lub LY-411575. Ponadto wykazano, że hormon trijodotyronina T3 bierze udział w dojrzewaniu komórek β poprzez aktywację genu *MAFA* (Aguayo-Mazzucato i in. 2013). Czynnikiem transkrypcyjnym MAFA (MAFA, ang. *MAF bZIP transcription factor A*) jest markerem niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania komórek β , ponieważ aktywuje ekspresję INS (Olbrot i in. 2002). Natomiast dodanie białka betaceluliny, należącego do rodziny epidermalnych czynników wzrostu, wspomaga efektywność różnicowania *in vitro* do komórek β poprzez podtrzymywanie ekspresji *NKX6-1* oraz stymulowanie proliferacji (Cho i in. 2008; Oh i in. 2011). Po osiągnięciu stadium wczesnych niedojrzałych komórek β następuje ich dojrzewanie, czyli nabieranie cech charakterystycznych dla dojrzałych funkcjonalnych komórek β , takich jak ekspresja specyficznych genów (*INS*, *NKX6-1*, *PDX1*, *MAFA*) oraz zdolność sekrecji INS w odpowiedzi na zwiększony poziom glukozy. Tradycyjnie do pożywki różnicującej nadal podawało się inhibitor ALK5 oraz hormon trijodotyroninę T3, aby uzyskać komórki podobne do komórek β . Jednakże ostatnio Velazco-Cruz i współpracownicy wykazali, że umieszczenie wczesnych komórek β w pożywce bez dodatku inhibitora ALK5 i hormonu trijodotyroniny T3 oraz reagregacja spowodowały wzrost wydajności procesu różnicowania komórek β (Velazco-Cruz i in. 2019). Inne grupy również zaobserwowały, że reagregacja promuje dojrzewanie komórek β *in vitro* (Nair i in. 2019; Veres i in. 2019). Dysocjacja i ponowna agregacja sfer 3D na stadium komórek EP/wczesnych komórek β oczyszcza organoidy endokrynne z populacji komórek niewykazujących cech endokrynych.

1.10. Czynniki transkrypcyjne ETV1

ETV1 (ang. *ETS variant transcription factor 1*; inaczej ER81) należy do rodziny czynników transkrypcyjnych E-dwadzieścia sześć (ETS, ang. *E-twenty-six transcription factors*). Pierwszy członek rodziny, od którego wzięła się nazwa całej grupy, ETS1, został zidentyfikowany jako onkogen transdukowany przez ptasiego wirusa erytroblastozy E26 u kurcząt (LePrince i in. 1983; Sizemore i in. 2017). Rodzina czynników transkrypcyjnych ETS liczy 28 członków u ludzi i 27 u myszy. Cechą wspólną wszystkich członków rodziny ETS jest obecność domeny ETS wiążącej DNA w motywie GGAA/T. Z uwagi na wiązanie

się wszystkich białek z rodziny ETS do tej samej sekwencji DNA, aktywność czynników ETS jest ściśle regulowana między innymi przez mikroRNA (miRNA) i białka regulatorowe. Ponadto obróbka potranslacyjna poszczególnych białek ETS skutecznie kontroluje wiązanie się ich do DNA, interakcję białko–białko co wpływa na aktywację lub represję ekspresji genów zależnych od czynników ETS (Kobberup i in. 2007; Sizemore i in. 2017).

Białka ETS podzielone są na podrodziny ze względu na podobieństwo sekwencji w domenie ETS oraz obecność dodatkowych motywów. ETV1, razem z ETV4 (aktywator 3 wzmacniacza poliomy, PEA3, ang. *polyomavirus enhancer activator 3*) i ETV5 (cząsteczka związana z ETS, ERM, ang. *ETS-related molecule*), należy do podrodziny PEA3. Domena ETS powszechnie występująca wśród czynników transkrypcyjnych ETS zlokalizowana jest na końcu karboksylowym białek z podrodziny PEA3. Natomiast na końcu aminowym białka znajduje się domena charakterystyczna dla białek z tej podrodziny – domena PEA3 odpowiedzialna za aktywację lub represję transkrypcji (Sizemore i in. 2017; Kandemir i in. 2020).

Analizując dane uzyskane z scRNA-Seq z mysiej trzustki e14,5, zidentyfikowałam transkrypt genu *Etv1* jako specyficzny dla komórek EP. W tym dniu rozwoju EP zaczynają delaminować z nabłonka embrionalnej trzustki, aby w otaczającej mezenchymie zacząć formować wyspy trzustkowe i różnicować się do specyficznych typów komórek endokrynych (Scavuzzo i in. 2018). Dodatkowo, ekspresja *Etv1* była ograniczona nie tylko do EP, ale również wczesnych komórek α i β . Rola ETV1 w rozwijającej się embrionalnej ludzkiej i mysiej trzustce nie jest jeszcze poznana.

Mimo tego, że mechanizmy przez które ETV1 może potencjalnie regulować embriogenezę trzustki pozostają nieznane, istnieją wzmianki w literaturze wskazujące na ekspresję *Etv1* podczas rozwoju endokrynej trzustki. W 2007 roku Kobberup i współpracownicy określili profil ekspresji członków rodziny ETS w rozwijającej się mysiej trzustce. Na podstawie wyników stwierdzono ekspresję *Etv1* we wszystkich badanych punktach czasowych (od dnia e12,5 do e18,5), przy czym najwyższą ekspresję *Etv1* zaobserwowano w dniach od e12,5 do e15,5, czyli w okresie różnicowania się komórek wysp. Ponadto, od dnia e17,5 ekspresja *Etv1* była ograniczona do endokrynej części trzustki (Kobberup i in. 2007). W innym badaniu zostało pokazane, że *Etv1* może być u myszy kontrolowany przez *Ngn3* – kluczowy regulator powstawania endokrynej trzustki podczas rozwoju embrionalnego. Mianowicie ekspresja *Etv1* u myszy z wyłączoną ekspresją *Ngn3*

(mysz *Ngn3*^{-/-}) była obniżona. Natomiast po podwyższeniu ekspresji *Ngn3* w linii komórek trzustkowych przewodów wyprowadzających mPAC, ekspresja i synteza białka *Etv1* była również podwyższona. U nowo narodzonych myszy z wyłączoną ekspresją genu *Etv1* masa komórek PP wydzielających polipeptyd trzustkowy jest zmniejszona. Można przypuszczać, że po delecji genu *Etv1* nastąpiło zaburzenie embriogenezy wysp trzustkowych, co wspiera hipotezę, że *Etv1* odgrywa rolę w rozwoju embrionalnym trzustki (Benitez i in. 2014). Jednakże mechanizmy przez które ETV1 może potencjalnie regulować embriogenezę trzustki pozostają nieznane. Warto również zauważyć, że wyłączenie ekspresji *Etv1*, *Etv4* oraz *Etv5* u dorosłych myszy zaburza metabolizm glukozy (Gutierrez-Aguilar i in. 2014; Suriben i in. 2015). Nieznana jest rola ETV1 w rozwoju ludzkiej trzustki. Na podstawie badań GWAS wiadomo tylko, że u ludzi polimorfizm *ETV5* powiązany jest z występowaniem otyłości (Gutierrez i in. 2015; Hu i in. 2021).

ETV1 odgrywa również ważną rolę podczas embriogenezy serca i mózdzku u myszy. Badania na myszach z wyłączoną ekspresją genu *Etv1* specyficznym w kardiomiocytach wykazały, że *Etv1* jest zaangażowany w dojrzewanie mysich kardiomiocytów przedsionkowych oraz tworzenie się układu Hisa-Purkiniego odpowiedzialnego za przewodnictwo impulsów w sercu. Ponadto podwyższona ekspresja *ETV1* w ludzkich kardiomiocytach wyprowadzonych *in vitro* z iPSC była wystarczająca do indukowania kaskady transkrypcyjnej odpowiedzialnej za tworzenie się układu Hisa-Purkiniego (Shekhar i in. 2016, 2018). Dodatkowo badania z wykorzystaniem hodowli pierwotnych komórek ziarnistych mózdzku myszy ujawniły, że *Etv1* jest również zaangażowany w końcowe dojrzewanie tych komórek. Udowodniono, że *Etv1* przyłącza się do miejsc promotorowych genów odpowiedzialnych za dojrzewanie komórek ziarnistych oraz zaobserwowano zwiększoną ekspresję tych genów po indukcji ekspresji *Etv1*. Natomiast częściowe wyciszenie ekspresji *Etv1* (o około 80%) spowodowało znaczne zmniejszenie ekspresji grupy genów odpowiedzialnych za końcowe dojrzewanie komórek ziarnistych mózdzku myszy (Abe i in. 2011).

Białka ETV regulują również pluripotencje mysich komórek macierzystych. Ekspresja *Etv1* może być indukowana przez ścieżkę FGF, która odgrywa znaczącą rolę w utrzymaniu pluripotencji PSC. W 1999 roku przeprowadzono badania na embrionach *Xenopus laevis* na stadium blastocysty. Eksperymenty te wykazały, że po dodaniu do hodowli *in vitro* eFGF i bFGF ekspresja *Etv1* wzrosła. Regulację ekspresji *Etv1* przez ścieżkę FGF dodatkowo potwierdził eksperyment z wykorzystaniem negatywnie dominującego receptora FGF w embrionach żaby, który zmniejszył funkcję komórkową receptora FGF typu dzikiego.

Zwiększona ekspresja negatywnie dominującego receptora FGF znacząco obniżyła ekspresję *Etv1*, wskazując, że zablokowanie ścieżki FGF zahamowało transkrypcję *Etv1* (Münchberg i Steinbeisser 1999).

Badanie z 2019 roku wykazało, że ETV1 i ścieżka TGF β , która bierze udział w utrzymywaniu pluripotencji, mogą wzajemnie oddziaływać. Udowodniono, że białko ETV1 tworzy kompleksy z białkiem SMAD4, które odgrywa kluczową rolę w sygnalizacji TGF β . Ponadto podwyższona ekspresja białka SMAD4 w linii komórkowej ludzkich embrionalnych komórek nerki HEK293T obniżyła ekspresję genów zależnych od *ETV1* (takich jak metaloproteinaza 1), sugerując, że wiązanie ETV1-SMAD4 osłabia aktywność transkrypcyjną ETV1. Odwrotną sytuację zaobserwowano w linii komórek nowotworowych prostaty PC3. Po wyciszeniu ekspresji *ETV1* i aktywowaniu ścieżki TGF β przez dodanie ligandu TGF β 1, niemożliwa była aktywacja genów zależnych od ścieżki TGF β . Natomiast po podwyższeniu ekspresji *ETV1* zaobserwowano wzrost w ekspresji genów zależnych od TGF β . Dane te wskazują, że ETV1 może również promować sygnalizację TGF β (Oh i in. 2019).

Co ciekawe, rola ETV1 w PSC wydaje się różna od roli ETV4 i ETV5, które razem z ETV1 tworzą podrodzinę białek PEA3. Mianowicie ETV4 i ETV5 odgrywają rolę w utrzymywaniu fenotypu naiwnej pluripotencji w mysich ESC. Po wyłączeniu ekspresji *Etv5* mysie ESC nie były zdolne do różnicowania do mEpiSC (Kalkan i in. 2019). Ponadto po wyłączeniu dodatkowo ekspresji genu *Etv4* mysie ESC wykazywały obniżoną ekspresję genów markerowych dla naiwnej pluripotencji, natomiast podwyższoną ekspresję genów identyfikujących zarodek przed implantacją. Co ważne, nie zauważono kompensacji utraty ekspresji *Etv4* i *Etv5* przez podwyższoną ekspresję *Etv1*, co świadczy o tym, że funkcja *Etv1* nie pokrywa się z funkcją genów *Etv4* i *Etv5* (Kinoshita i in. 2021). Podsumowując, w zależności od etapu rozwoju embrionalnego czy typu komórek, czynniki transkrypcyjne należące do podrodziny PEA3 mogą pełnić podobne lub odmienne funkcje.

ETV1 odgrywa również dużą rolę w progresji wielu typów nowotworów. Czynniki transkrypcyjne ETV1 zaangażowany jest w rozwój mięsaka Ewinga (ang. *Ewing's sarcoma*), który jest złośliwym nowotworem najczęściej dotykającym dzieci. W chorobie tej następuje translokacja chromosomu w regionie kodującym białko mięsaka Ewinga (EWS, ang. *Ewing's sarcoma protein*). W wyniku tego procesu powstają różnego rodzaju białka fuzyjne, a jednym z nich jest EWS-ETV1. Powstałe w ten sposób nieprawidłowe czynniki transkrypcyjne stają się onkogenami i ich podwyższona ekspresja prowadzi do

rozwoju nowotworu (Fuchs i in. 2003). Ponadto podwyższona ekspresja ETV1 zaobserwowana w typach nowotworów, takich jak rak prostaty, trzustki czy żołądka, powiązana jest ze zjawiskiem EMT, co prowadzi do tworzenia się przerzutów i inwazji nowotworów (Cai i in. 2007; Baena i in. 2013; Li i in. 2013; Li i in. 2015; Heeg i in. 2016; Oh i in. 2019).

2. Cel pracy

Czynnik transkrypcyjny *Etv1* został zidentyfikowany z danych scRNA-Seq rozwijającej się mysiej trzustki w dniu embrionalnym e14,5. Na tym etapie embriogenezy, ekspresja *Etv1* była ograniczona do komórek EP i wczesnych komórek α i β . Mimo wcześniejszego zidentyfikowania ekspresji genu *Etv1* w rozwijającej się mysiej trzustce i potencjalnej współpracy z kluczowym regulatorem powstawania komórek endokrynych trzustki *Ngn3*, rola *Etv1* w rozwoju tego organu nie została jeszcze wyjaśniona. Prócz tego w rozwoju embrionalnym ludzkiej trzustki rola ETV1 nie została jeszcze poznana. Podobnie w kontekście ludzkich PSC, rola ETV1 nie została jeszcze określona, mimo tego, że badania z mysich ESC wskazują, iż inne białka z podrodziny PEA3 biorą udział w utrzymywaniu fenotypu naiwnej pluripotencji.

W związku z powyższym celem niniejszej pracy było określenie roli ETV1 w ludzkich PSC i różnicowaniu *in vitro* na przykładzie trzustki. Przeprowadzone badania obejmowały poniższe zadania:

- a) scharakteryzowanie profilu ekspresji *ETV1* na etapie pluripotencji w ludzkich PSC oraz w rozwijającej się mysiej oraz nowo powstałej ludzkiej i dojrzałej ludzkiej trzustce;
- b) identyfikacja syntezy białka ETV1 w modelach ludzkich i mysich stosowanych w rozprawie – mysie embrionalne i dojrzałe trzustki, ludzkie PSC;
- c) wyprowadzenie niezależnych linii klonalnych ludzkich PSC z wyłączoną ekspresją *ETV1* z użyciem metody CRISPR/Cas9;
- d) scharakteryzowanie roli czynnika transkrypcyjnego ETV1 na etapie pluripotencji w ludzkich PSC;
- e) określenie wpływu wyłączenia ekspresji *ETV1* na różnicowanie ludzkich PSC:
 - różnicowanie *in vitro* spontaniczne;
 - różnicowanie *in vitro* ukierunkowane do endokrynych komórek β trzustki.

3. Wyniki

Na podstawie zdobytej wiedzy na temat rozwoju embrionalnej trzustki i komórek ją tworzących możliwe było opracowanie protokołów różnicowania *in vitro* z komórek ESC i iPSC do komórek endokrynnych trzustki. Jednakże mimo włożenia wielkiego wysiłku w identyfikację kluczowych czynników transkrypcyjnych i szlaków sygnałowych zaangażowanych w rozwój trzustki, wiele aspektów pozostaje jeszcze niezrozumiałych oraz niezidentyfikowanych. Komórki β zróżnicowane *in vitro* z ludzkich PSC mogą być wykorzystane do badań obejmujących zagadnienia rozwoju embrionalnego ludzkich komórek β .

Konwencjonalne metody doświadczalne, takie jak sekwencjonowanie RNA (RNA-Seq), daje informację o średniej ekspresji genów dla wszystkich komórek w określonej tkance, natomiast pomija subtelne różnice molekularne wynikające ze stanów przejściowych komórek podczas różnicowania czy heterogeniczność populacji komórek. Dodatkowo, z analiz RNA-Seq niemożliwe jest uzyskanie wiedzy na temat przejściowych lub rzadkich typów i podtypów komórek. Aspekty te są bardzo ważne dla uzyskania lepszego poglądu na rozwój embrionalny endokrynnych komórek trzustki, co przeniesie się na udoskonalenie protokołów różnicowania komórek β z komórek PSC i zwiększenie efektywności uzyskiwania funkcjonalnych komórek.

Szybko rozwijająca się metoda scRNA-Seq pozwala na głębsze poznanie czynników i ścieżek kierujących rozwojem embrionalnym trzustki. Metoda scRNA-Seq polega na określeniu transkryptomu poszczególnych komórek w obrębie określonej tkanki, narządu lub hodowli komórek *in vitro*. Ponadto komórki grupuje się na podstawie podobieństwa transkryptomicznego, tworząc skupiska – klastry. Wyodrębnienie interesującego typu komórek z większego zbioru danych umożliwia identyfikację podtypów określonej populacji. Zidentyfikowane podtypy mogą stanowić przejściowe grupy obecne w czasie różnicowania, które wcześniej nie były odkryte. Prócz tego z danych scRNA-Seq, transkryptom poszczególnych komórek można ułożyć w pseudoczasie, odzwierciedlając potencjalną kolejność ich różnicowania przekładającą się na trajektorię rozwojową.

Myszy stanowią idealny model do badań nad rozwojem embrionalnym, ponieważ ich ciąża nie trwa długo (21 dni), a sekwencja różnicowania trzustki w dużym stopniu pokrywa się ze zdarzeniami rozwojowymi zachodzącymi u ludzi. Poza tym, ze względów etycznych dostęp do ludzkich rozwijających się organów jest bardzo ograniczony. Eksperymenty z

użyciem metody scRNA-Seq na rozwijającej się trzustce mysiej pozwalają na identyfikację genów kierujących embriogenezą określonych typów komórek trzustkowych, które potencjalnie również odgrywają istotną rolę u człowieka. Nowo zidentyfikowane geny mogą być następnie sprawdzone w rozwoju ludzkiej trzustki z wykorzystaniem różnicowania *in vitro* z ludzkich komórek PSC do komórek trzustkowych. Ponadto, modulacja ekspresji wybranych genów podczas generowania *in vitro* endokrynych komórek trzustkowych może doprowadzić do ulepszenia obecnych protokołów i bardziej efektywnego uzyskania funkcjonalnych komórek.

3.1. Selekcja ETV1 z danych scRNA-Seq z embrionalnej mysiej trzustki

W celu zidentyfikowania genów potencjalnie zaangażowanych w rozwój komórek endokrynych trzustki, przeanalizowano dane z scRNA-Seq z mysiej embrionalnej trzustki z e14,5. Dane wygenerowane zostały w laboratorium prof. M. Borowiak w Houston, USA, i opublikowane w 2018 roku (Scavuzzo i in. 2018). Do procedury scRNA-Seq użyto 39 trzusteek i uzyskano transkryptomu z 15 228 komórek. Po wyodrębnieniu grup komórek i wizualizacji z użyciem stochastycznej metody porządkowania sąsiadów w oparciu o rozkład t (tSNE, ang. *t-distributed stochastic neighbor embedding*), zidentyfikowano 26 transkrypcyjnie unikatowych klastrów. Każdy klaster został przypisany do odpowiedniego typu komórek na podstawie ekspresji genów markerowych. Ważnym odkryciem było zidentyfikowanie po raz pierwszy podtypów komórek mezenchymalnych oraz komórek EP.

Heterogenność komórek EP przejawiała się występowaniem 2 populacji komórek z wysoką oraz 2 populacji EP z niską ekspresją *Ngn3*, z których łącznie można było wyodrębnić 4 podtypy EP. Komórki EP z wysoką ekspresją *Ngn3* były podobne do komórek prekursorowych trzustki i komórek części końcowej (ang. *tip domain*). Natomiast komórki EP z niską ekspresją *Ngn3* wykazywały również ekspresję genów związanych z komórkami α i β .

Została wyodrębniona lista genów specyficznych dla klastra EP z niską ekspresją *Ngn3*, a więc dla wczesnych komórek α i β . Rozszerzenie analizy o dane z embrionalnej trzustki e16,5 pozwoliło na zawężenie listy genów do ulegających wyłącznej lub podwyższonej ekspresji w klastrach komórek EP i endokrynych. Z tej listy genów, bazując na analizie ontologii genów, wyselekcjonowano 20 kandydatów zidentyfikowanych jako geny biorące udział w syntezie i sekrecji hormonów, cyklu komórkowym lub będącymi czynnikami transkrypcyjnymi. Uzyskane dane porównano z danymi literaturowymi, co umożliwiło

wyselekcjonowanie genów z dotychczas niepoznaną lub niejasną rolą w rozwoju ludzkiej trzustki. Jednym z interesujących kandydatów okazał się gen *Etv1*.

3.2. Potwierdzenie ekspresji *ETVI* w ogólnodostępnych bazach danych z eksperymentów scRNA-Seq

W celu potwierdzenia ekspresji genu *Etv1* przeanalizowano bazy danych scRNA-Seq z otwartym dostępem pochodzące z sekwencjonowania rozwijającej się i dorosłej trzustki oraz z ludzkich PSC.

3.2.1. Ekspresja *ETVI* na etapie pluripotencji w ludzkich komórkach PSC

W celu sprawdzenia ekspresji *ETVI* na etapie pluripotencji w ludzkich ESC przeanalizowano dane z trzech badań (Petropoulos i in. 2016; Messmer i in. 2019; Yiangou i in. 2019).

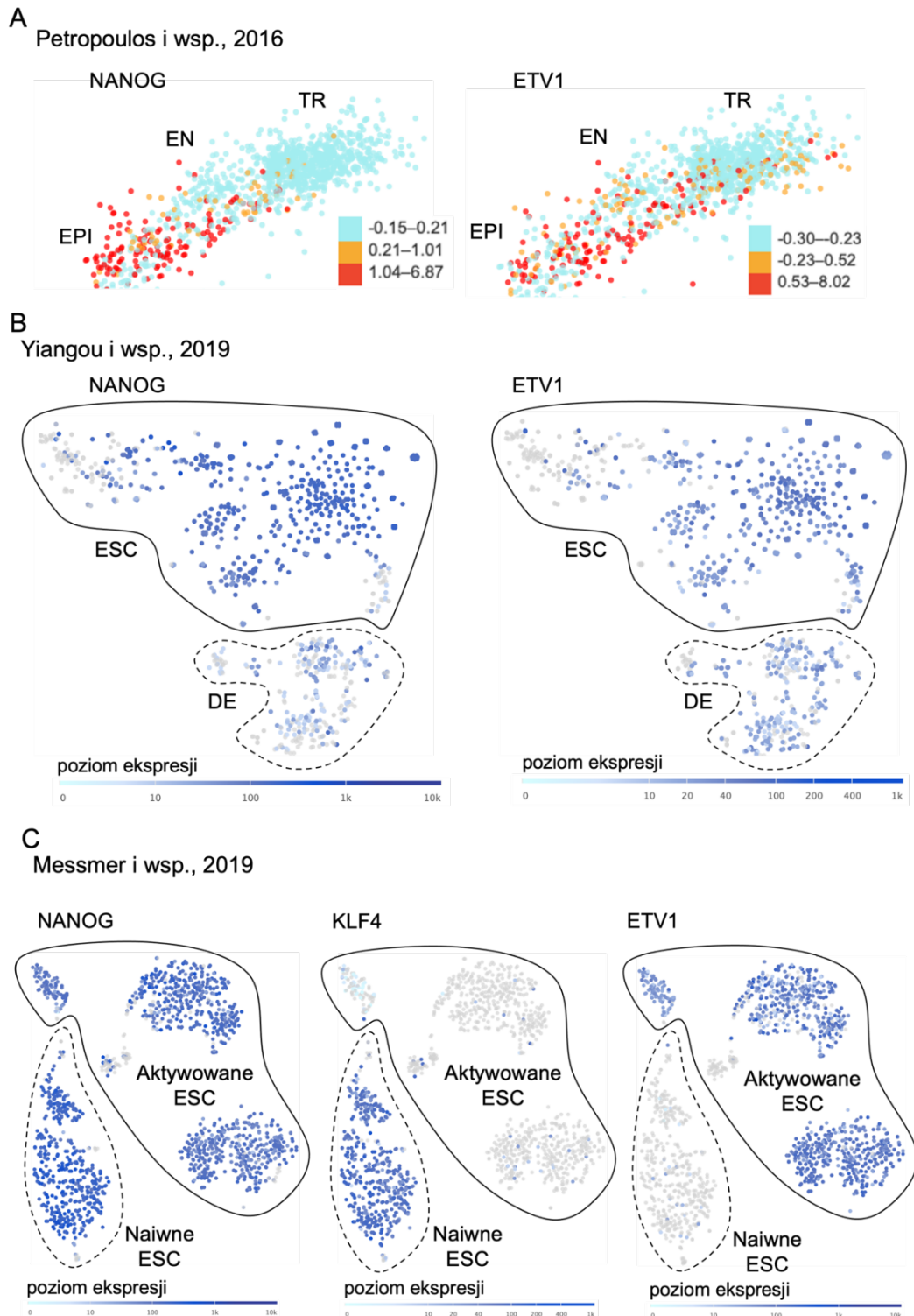
W zarodku przed implantacją zaobserwowano, że ekspresja *ETVI* jest najbardziej specyficzna dla komórek tworzących epiblast, z którego rozwinię się ektoderma. Ekspresja *ETVI* jest również zauważona w komórkach endodermy pierwotnej. Natomiast, w komórkach trofoblastu, czyli ściany blastocysty, zaobserwowano ekspresję *ETVI* na niskim poziomie. Ponadto ekspresja *ETVI* w niektórych komórkach była wyższa niż ekspresja *NANOG*. Na podstawie tych wyników można sugerować, że czynnik transkrypcyjny *ETVI* pełni swoją funkcję w zarodku jeszcze przed implantacją (**ryc. 10A**).

W badaniu Yiangou i współpracowników zaobserwowano wyższą ekspresję *ETVI* na etapie pluripotencji niż na etapie endodermy. Potwierdza to wnioski sformułowane na podstawie analizy danych scRNA-Seq od Weng i współpracowników, gdzie ekspresja *ETVI* była wyższa na etapie pluripotencji i spadała w miarę postępu różnicowania, aby znowu wzrosnąć na etapie pojawiania się komórek endokrynych. Prócz tego wykazano wyższy poziom ekspresji *NANOG* niż *ETVI* (**ryc. 10B**).

Co ciekawe, czynnik transkrypcyjny *ETVI* jest potencjalnie specyficzny dla pluripotencji aktywowanej, ponieważ na etapie pluripotencji naiwnej nie zaobserwowano jego ekspresji. Dodatkowo poziom ekspresji *ETVI* był niższy niż *NANOG*, co potwierdza obserwacje z badania Yiangou (**ryc. 10C**).

Podsumowując, czynnik transkrypcyjny *ETVI* ulega wysokiej ekspresji w prawie całej populacji ludzkich komórek PSC w stanie aktywowanej pluripotencji, sugerując, że

może mieć on potencjalny wpływ na utrzymanie stanu pluripotencji. Natomiast dotychczas nie określono roli *ETV1* w ludzkich komórkach PSC.

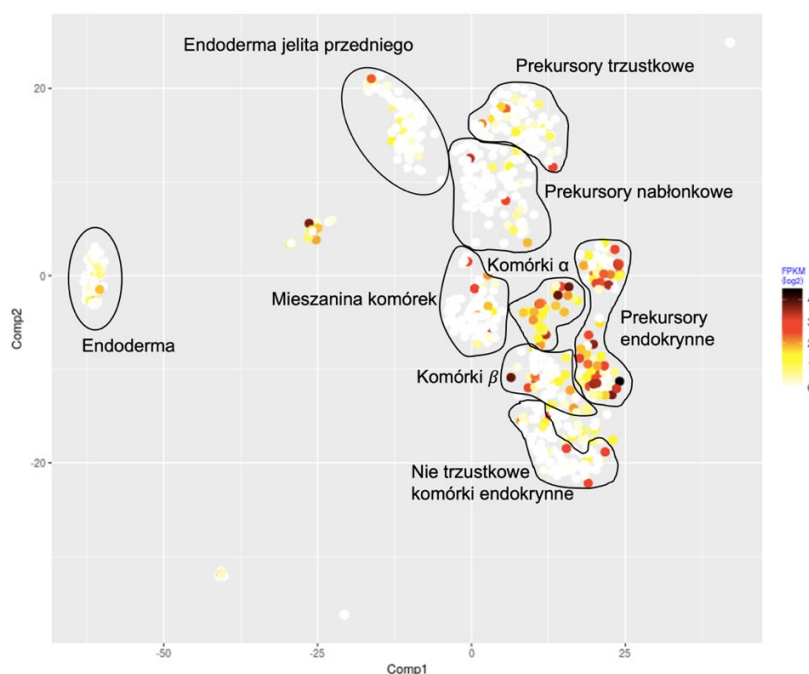


Rycina 10. Wizualizacja ekspresji *ETV1*, *NANOG* i *KLF4* w ludzkim zarodku przed implantacją (A), w ludzkich komórkach ESC podczas różnicowania *in vitro* do komórek endodermy (B) lub w aktywowanych i naiwnych ludzkich PSC (C). A. EPI – epiblast; EN – pierwotna endoderma; TR – trofoblast. Na podstawie Petropoulos i in. (2016). Przeglądarka UCSC Cell Browser. Kolor niebieski – brak lub niski poziom ekspresji; kolor czerwony – wysoki poziom ekspresji. **B.** ESC – embrjonalne komórki macierzyste; DE – endoderma. Na podstawie Yiangou i in. (2018). Przeglądarka Single cell Expression Atlas, EMBL-EBI. Kolor szary – brak ekspresji; kolor ciemno-niebieski – wysoka ekspresja. **C.** Na podstawie Messmer i in. (2019). Przeglądarka Single cell Expression Atlas, EMBL-EBI. Kolor szary – brak ekspresji; kolor ciemno-niebieski – wysoka ekspresja

3.2.2. Ekspresja *ETV1* w rozwijającej się trzustce podczas różnicowania *in vitro* z ludzkich komórek PSC

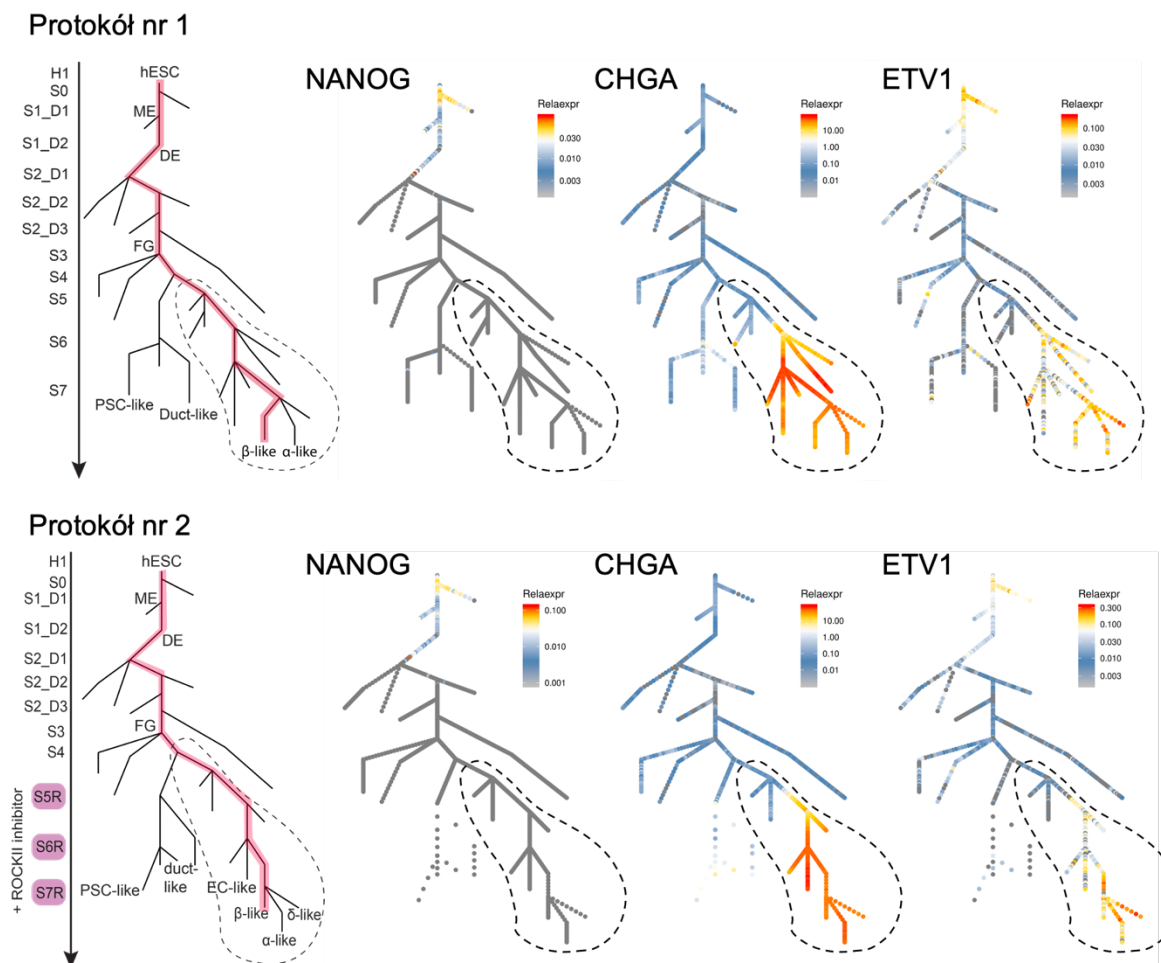
W celu określenia profilu ekspresji *ETV1* podczas rozwoju ludzkiej trzustki przeanalizowano dane scRNA-Seq uzyskane podczas różnicowania *in vitro* ludzkich PSC do komórek endokrynych trzustki. Wykorzystano do tego dane z dwóch badań opublikowanych przez dwa niezależne zespoły profesora D. Meltona i Y. Li (Sharon, Vanderhooft i in. 2019; Weng i in. 2020).

W badaniu zespołu profesora D. Meltona, eksperymenty scRNA-Seq przeprowadzono w 10 różnych punktach czasowych podczas różnicowania *in vitro* odzwierciedlających zakończenie danego etapu różnicowania lub wybrane punkty czasowe pomiędzy poszczególnymi stadiami. Następnie, na podstawie profilu ekspresji określonych genów wyodrębniono 8 podtypów komórek reprezentujących trajektorię rozwojową komórek endokrynych trzustki. Ekspresja *ETV1* była na niskim poziomie na poszczególnych etapach: endoderma, endoderma jelita przedniego, prekursorzy trzustkowe, prekursorzy nabłonkowe i nie trzustkowe komórki endokryne. Natomiast wysoką ekspresję *ETV1* zaobserwowano w komórkach EP, komórkach α i β . Ponadto ujawniono wyższą ekspresję *ETV1* w komórkach α niż w komórkach β , co potwierdza obserwację z danych scRNA-Seq z rozwijającej się mysiej trzustki (ryc. 11).



Rycina 11. Wizualizacja ekspresji *ETV1* podczas różnicowania *in vitro* ludzkich PSC do komórek endokrynych trzustki. Skala FPKM (ang. fragments per kilobase million) pozwala znormalizować ekspresję z eksperymentów RNA-Seq, przedstawia liczbę odczytów danego transkryptu na milion uwzględniając długość fragmentów. Kolor biały – brak ekspresji; kolor czarny – wysoka ekspresja. Na podstawie Sharon i in. (2019). Źródło: <https://ifx.rc.fas.harvard.edu/invitrobetacells/>

W badaniu zespołu profesor Y. Li podstawą było odtworzenie trajektorii rozwojowych podczas różnicowania *in vitro* do komórek β z ludzkich komórek PSC. Ekspresja *ETV1* wykazywała ciekawy profil. Z jednej strony była specyficzna dla endokrynej linii rozwojowej, zwłaszcza dla komórek podobnych do komórek α i β . Z drugiej strony, na etapie pluripotencji również zaobserwowano ekspresję *ETV1*, co może świadczyć o roli tego genu w komórkach pluripotencjalnych. Warto zauważyć, że w badaniu tym użyto dwóch protokołów różnicowania i w obu zastosowanych protokołach ekspresja *ETV1* wykazywała taki sam profil ekspresji (ryc. 12).

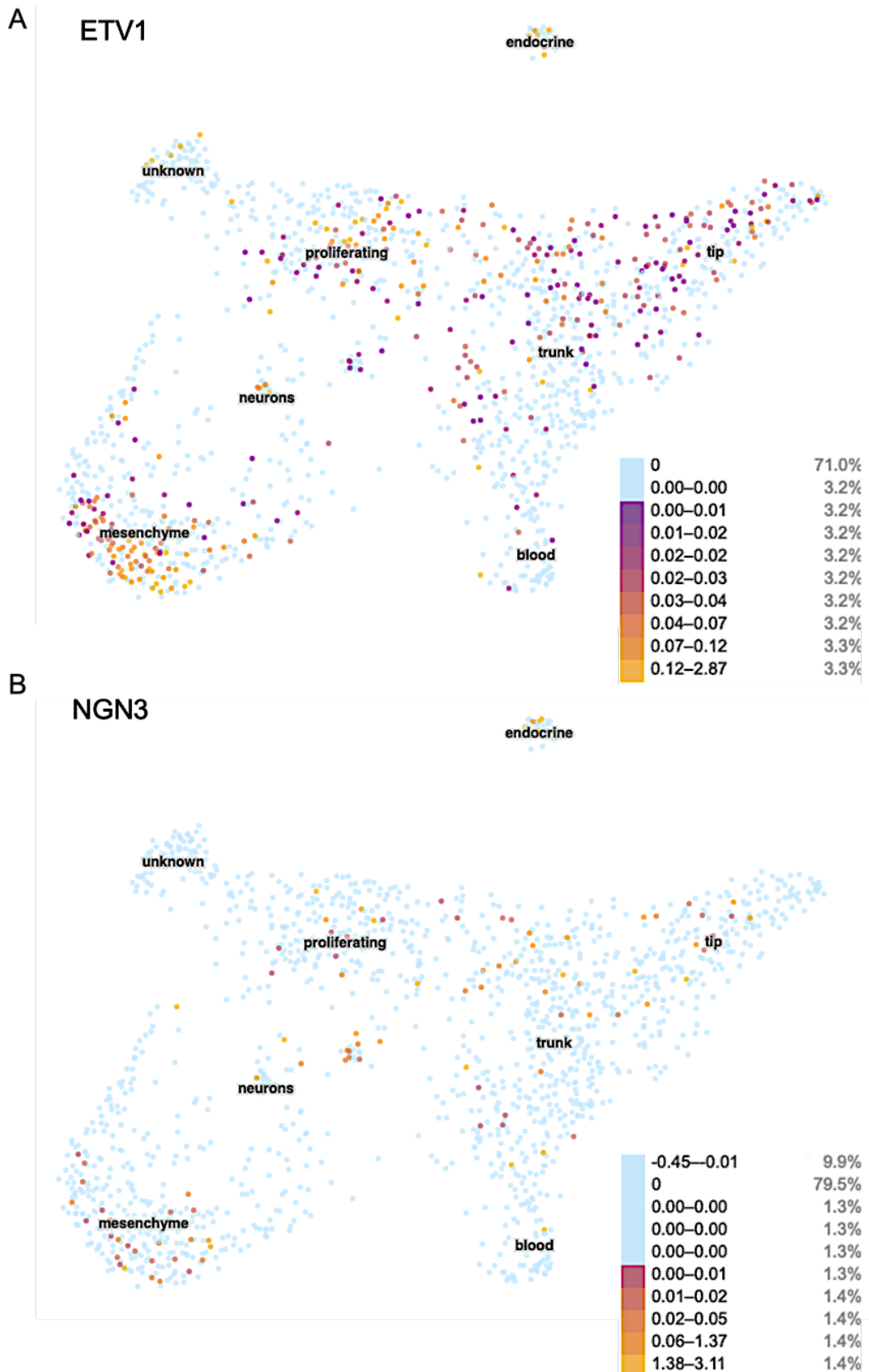


Rycina 12. Wizualizacja ekspresji *ETV1*, *NANOG* i *CHGA* podczas różnicowania *in vitro* ludzkich PSC do komórek endokrynych trzustki. hESC – ludzkie embrionalne komórki macierzyste; ME – mezo-endoderma; DE – endoderma; FG – endoderma jelita przedniego; PSC-like – komórki podobne do komórek gwiaździstych trzustki; duct-like – komórki podobne do komórek przewodów wyprowadzających trzustki; EC-like – komórki podobne do komórek endokrynych trzustki; α -like – komórki podobne do komórek α ; β -like – komórki podobne do komórek β . Kolor szary – brak ekspresji; kolor czerwony – wysoka ekspresja. Linia przerywaną zaznaczono komórki endokryne. Na podstawie Weng i in. (2020). Źródło: www.hiview.case.edu/public/BetaCellHub/Primaryislet.php

3.2.3. Ekspresja *ETVI* w rozwijającej się ludzkiej trzustce

W badaniu Goncalves i współpracowników jako model badawczy zastosowano między innymi ludzkie trzustki płodowe w 7–10 tygodniu po zapłodnieniu (Gonçalves i in. 2021).

Ekspresję *ETVI* wykryto we wszystkich grupach wyodrębnionych komórek trzustki. Najwyższa ekspresja była zaobserwowana w komórkach endokrynych, mezenchymalnych oraz proliferujących. Odsetek komórek wykazujących ekspresję *ETVI* wynosił 25,8% i w porównaniu do markera komórek EP *NGN3* (odsetek komórek pozytywnych 6,9%) był wyższy (**ryc. 13**).



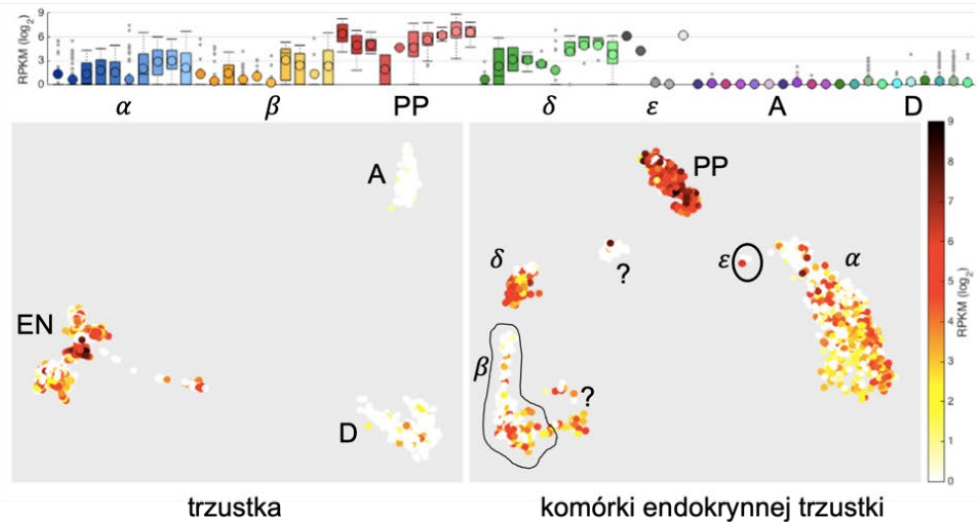
Rycina 13. Wizualizacja ekspresji ETV1 (A) i NGN3 (B) w ludzkiej płodowej trzustce w 7–10 tygodniu po zapłodnieniu. Endocrine – komórki endokryne; tip – końcowe komórki prekursorowe; trunk – podstawne komórki prekursorowe; proliferating – komórki proliferujące; neurons – komórki nerwowe; blood – komórki krwi; mesenchyme – komórki mezenchymy; unknown – komórki niezidentyfikowane. Brak ekspresji – kolor błękitny, niski poziom ekspresji – odcienie fioletowego, wysoki poziom – odcienie pomarańczowe i żółte. Rozkład danych uzyskany za pomocą algorytmu UMAP. Przeglądarka UCSC Cell Browser, na podstawie Goncalves i in. (2021)

3.2.4. Ekspresja *ETV1* w dojrzałej ludzkiej trzustce

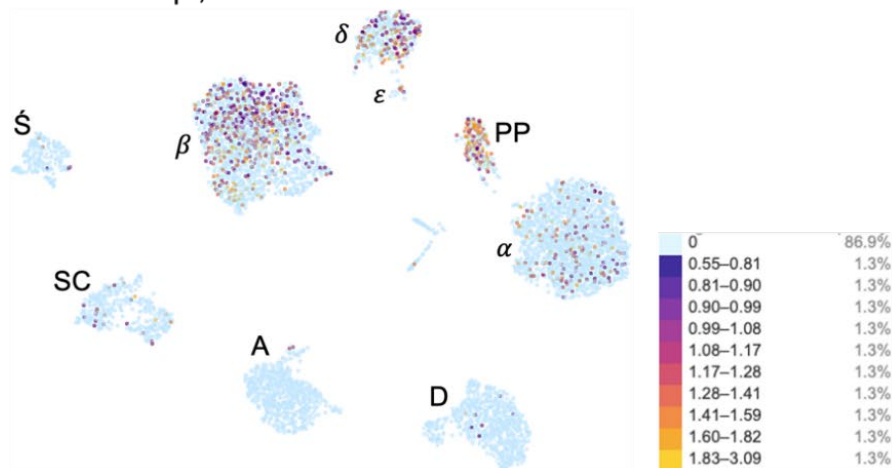
W celu określenia specyficzności ekspresji *ETV1* w dojrzałej ludzkiej trzustce, przeanalizowano dane z czterech badań (Baron i in. 2016; Segerstolpe i in. 2016; Enge i in. 2017; Weng i in. 2020).

We wszystkich wyżej zobrazowanych badaniach zaobserwowano, że obecność transkryptu *ETV1* w ludzkiej dorosłej trzustce jest specyficzna dla komórek części endokryennej. Co ciekawe, transkrypt *ETV1* był obecny we wszystkich typach komórek endokrynych. Najwyższy poziom transkryptu *ETV1* zaobserwowano w komórkach PP. Natomiast w komórkach części egzokryennej, pojedyncze komórki przewodów wyprowadzających trzustki wykazywały obecność transkryptu *ETV1*, a w komórkach pęcherzykowych nie została ona wykryta. Ponadto, w komórkach śródbłonkowych oraz gwiaździstych trzustki transkrypt *ETV1* został wykryty w pojedynczych komórkach. Komórki gwiaździste trzustki w stanie nieaktywnym regulują produkcję macierzy ECM, a w stanach patologicznych uaktywniają się prowadząc do rozwinięcia się stanu zapalnego trzustki (ryc. 14).

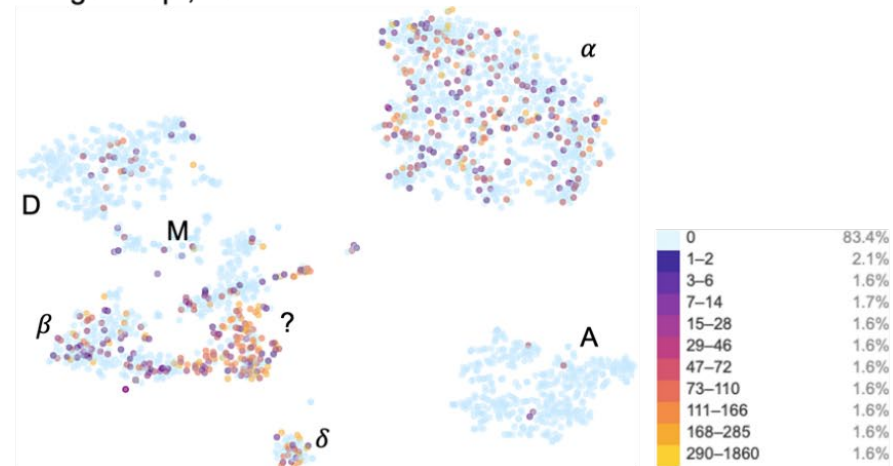
A Segerstolpe i wsp., 2016



B Baron i wsp., 2016

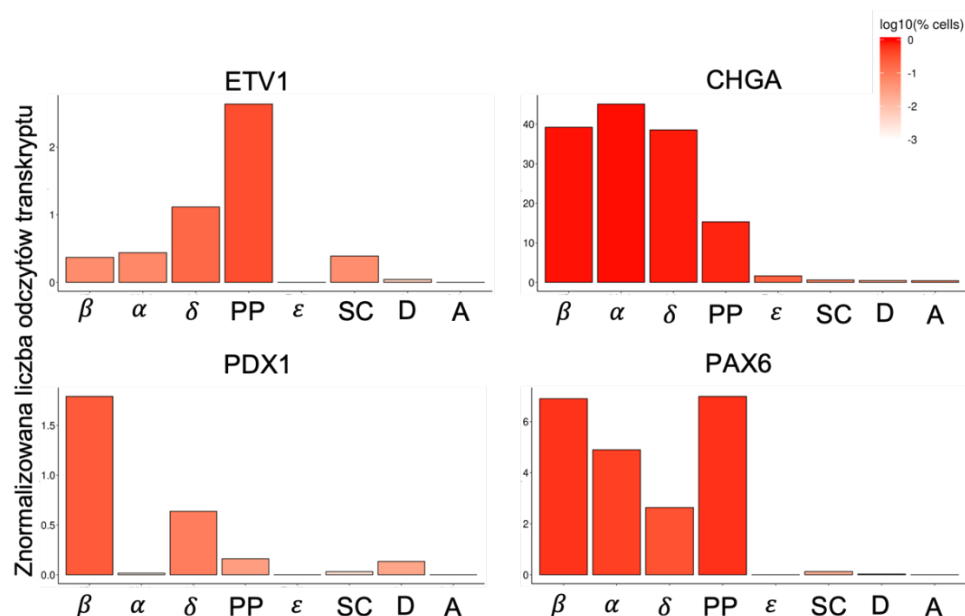


C Enge i wsp., 2017



Rycina 14. Wizualizacja ekspresji ETV1 w ludzkiej dorosłej trzustce. EN – komórki endokryjne; α – komórki α ; β – komórki β ; ϵ – komórki ϵ ; δ – komórki δ ; PP – komórki PP; D – komórki przewodzących trzustki; A – komórki pęcherzykowe; M – komórki mezenchymy; SC – komórki gwiaździste trzustki; \acute{S} – komórki śródbłonka naczyń krwionośnych; ? – komórki niezidentyfikowane. **A.** Na podstawie Segerstolpe i in. (2016). Źródło: <http://sandberg.cmb.ki.se/pancreas/>. Kolor biały – brak ekspresji; kolor czarny – wysoka ekspresja. **B.** Na podstawie Baron i in. (2016). Przeglądarka UCSC Cell Browser. Kolor błękitny – brak ekspresji; kolor żółty – wysoka ekspresja. **C.** Na podstawie Enge i in. (2017). Przeglądarka UCSC Cell Browser. Kolor błękitny – brak ekspresji; kolor żółty – wysoka ekspresja.

Na podstawie badania Weng i współpracowników (Weng i in. 2020) możliwe jest określenie ilościowe poziomu transkryptu *ETV1* w dorosłej ludzkiej trzustce, w porównaniu z markerami wysp trzustkowych. Wyniki potwierdzają poprzednie obserwacje, że *ETV1* jest specyficzny dla komórek części endokrynej trzustki. Co ciekawe, wykryto wyższy poziom transkryptu *ETV1* w komórkach PP i δ niż w komórkach α i β . Ogólnie poziom transkryptu *ETV1* w porównaniu do poziomu transkryptu *PDX1* był wyższy, z wyjątkiem komórek β gdzie poziom *PDX1* był wyższy niż *ETV1*. Natomiast w porównaniu do poziomu transkryptów *CHGA* i czynnika transkrypcyjnego *PAX6* (*PAX6*, ang. *paired box 6*) poziom ekspresji *ETV1* był niższy we wszystkich komórkach wysp trzustkowych (**ryc. 15**).



Rycina 15. Wizualizacja ekspresji *ETV1*, *CHGA*, *PDX1* i *PAX6* w ludzkiej dorosłej trzustce. α – komórki α ; β – komórki β ; ϵ – komórki ϵ ; δ – komórki δ ; PP – komórki PP; D – komórki przewodów wyprowadzających trzustki; A – komórki pęcherzykowe; SC – komórki gwiaździste trzustki. Na podstawie Weng i in. (2020). Kolor jasnoczerwony – brak ekspresji; kolor ciemnoczerwony – wysoka ekspresja. Źródło: www.hiview.case.edu/public/BetaCellHub/Primaryislet.php

3.2.5. Ekspresja *Etv1* w rozwijającej się mysiej trzustce

W celu potwierdzenia profilu ekspresji *Etv1* podczas rozwoju trzustki, przeanalizowano dane scRNA-Seq z badania grupy profesor J. Sneddon i E. Koning (Byrnes i in. 2018; van Gurp i in. 2019). Ekspresję genu *Etv1* w trzustce oceniono w poszczególnych dniach embrionalnych:

- e12,5 (Byrnes, van Gurp),
- e13,5 (van Gurp),
- e14,5 (Byrnes, van Gurp),
- e15,5 (van Gurp),

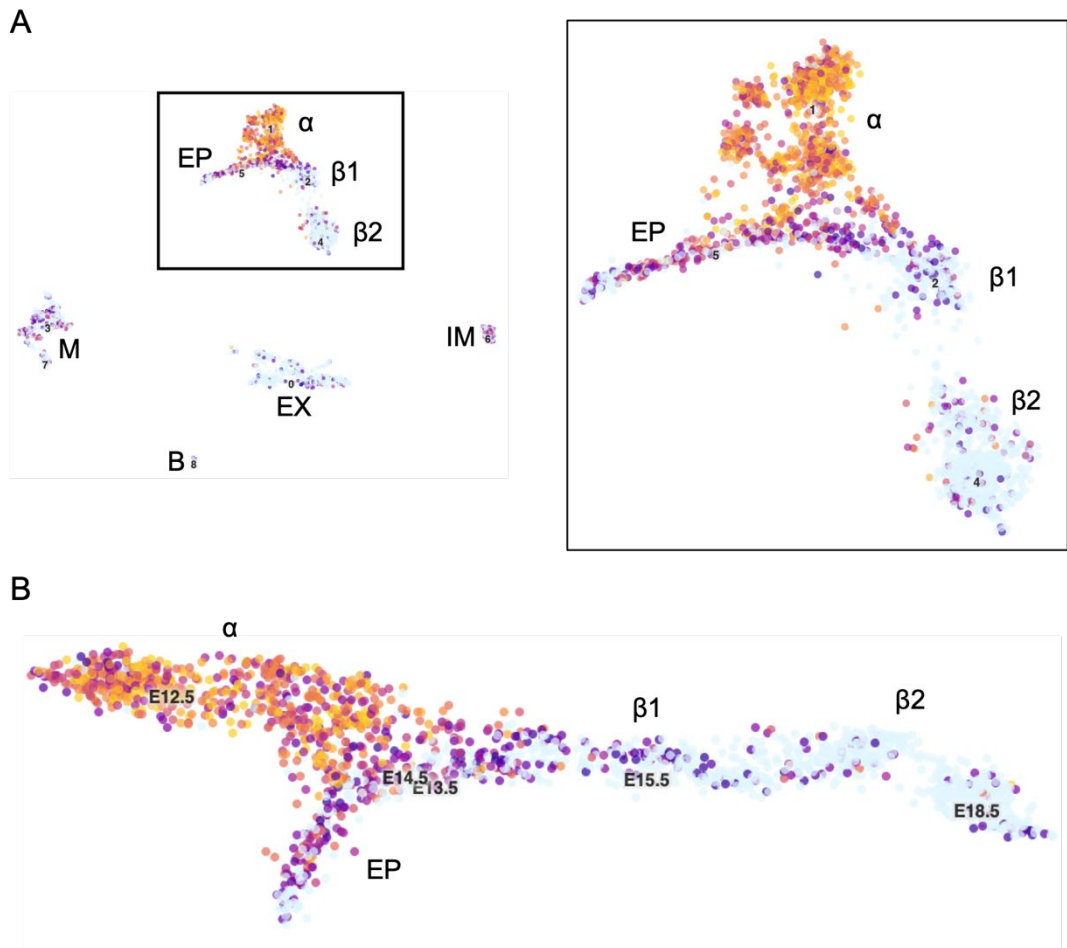
e) e17,5 (Byrnes, van Gurp),

f) e18,5 (van Gurp).

W obu badaniach profil ekspresji *Etv1* w mysiej trzustce jest podobny. Ekspresję *Etv1* potwierdzono w każdym badanym dniu embrionalnym. W zintegrowanych danych ze wszystkich badanych dni embrionalnych podzielonych na typy komórek najwyższa ekspresja *Etv1* była obserwowana w komórkach α , natomiast niższa w komórkach EP oraz β . Ekspresja *Etv1* w trakcie trajektorii rozwojowej wykazuje najwyższy poziom w dniu e12,5 i tendencję spadkową w kolejnych dniach embrionalnych. Może to wynikać z faktu, że w dniu e12,5 zaobserwowano najwięcej komórek α , a w następnych dniach więcej było komórek β (van Gurp i in., 2019) (**ryc. 16**).

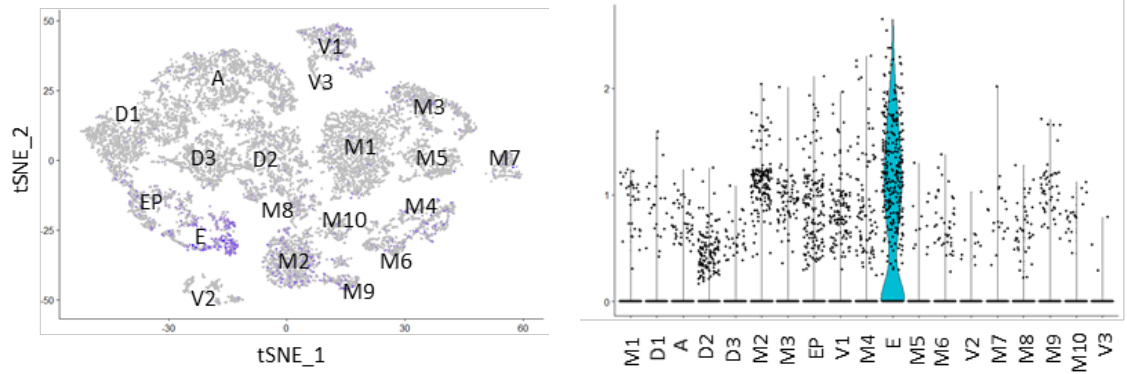
W dniu e12,5 najwyższa ekspresja *Etv1* była widoczna w klastrze wczesnych komórek endokrynych. Wysoką ekspresję *Etv1* zaobserwowano również w klastrze komórek EP oraz klastrach komórek mezenchymalnych (nazwanych odpowiednio M2, M3, M4). W dniu e14,5 ekspresja *Etv1* osiągnęła najwyższy poziom w komórkach EP2, które były dojrzałymi komórkami EP rozpoczynającymi specjalizację w określony typ komórek endokrynych, oraz we wczesnych komórkach α . W dniu e17,5, ekspresja *Etv1* była ograniczona do komórek α oraz komórek wykazujących ekspresję więcej niż jednego hormonu endokrynej trzustki (komórki multihormonalne) (Byrnes i in. 2018) (**ryc. 17**).

Wyniki uzyskane z analizy danych scRNA-Seq uzyskanych przez niezależne zespoły badawcze potwierdziły profil ekspresji *Etv1* w rozwijającej się mysiej trzustce. Dodatkowo, potwierdzono, że gen *Etv1* jest specyficzny dla komórek EP oraz komórek endokrynych trzustki, ponieważ w pozostałych komórkach tworzących trzustkę (egzokrynych lub naczyń krwionośnych) zaobserwowano niską ekspresję *Etv1* w niewielu komórkach. Ponadto ulega on wyższej ekspresji w komórkach α niż w komórkach β .

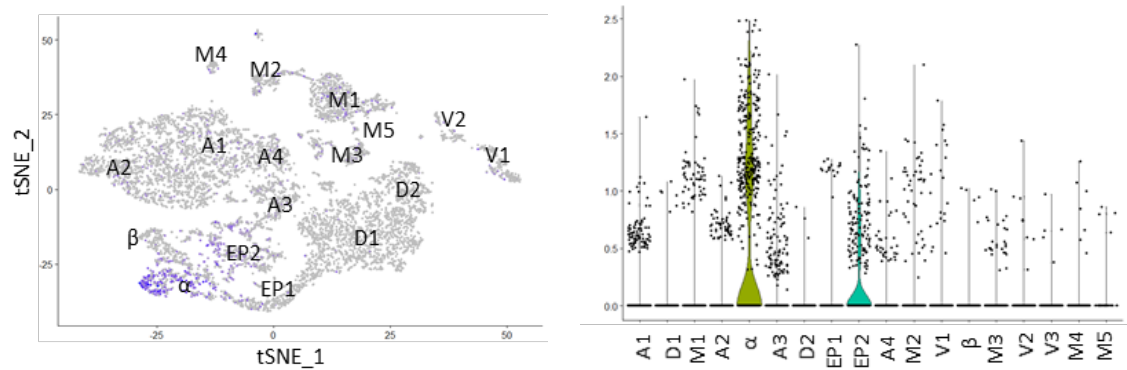


Rycina 16. Wizualizacja ekspresji *Etv1* w rozwijającej się mysiej trzustce. A. Zintegrowane dane ze wszystkich badanych dni embrjonalnych, komórki podzielone na grupy obrazujące typy komórek budujących trzustkę. Grupy zaznaczone w ramce (po prawej) obrazują komórki endokryne i ich prekursory, powiększenie zaznaczonego fragmentu (po lewej) **B**. Dane z poszczególnych dni embrjonalnych e12,5, e13,5, e14,5, e15,5, e18,5. α – komórki α ; $\beta1$, $\beta2$ – komórki β ; EP – prekursorzy komórek endokrynych; EX – komórki części egzokrynej; M – komórki mezenchymy; B – komórki krwi; IM – komórki układu immunologicznego. Kolor błękitny – brak ekspresji; odcienie fioletowego – niski poziom ekspresji, odcienie pomarańczowe i żółte – wysoki poziom. Przeglądarka UCSC Cell Browser, na podstawie Van Gurp i in. (2019).

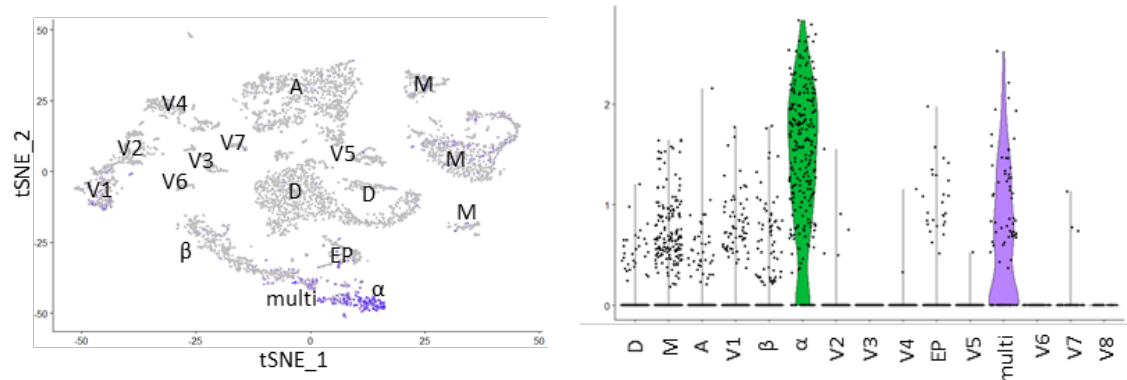
A e12,5



B e14,5



C e17,5

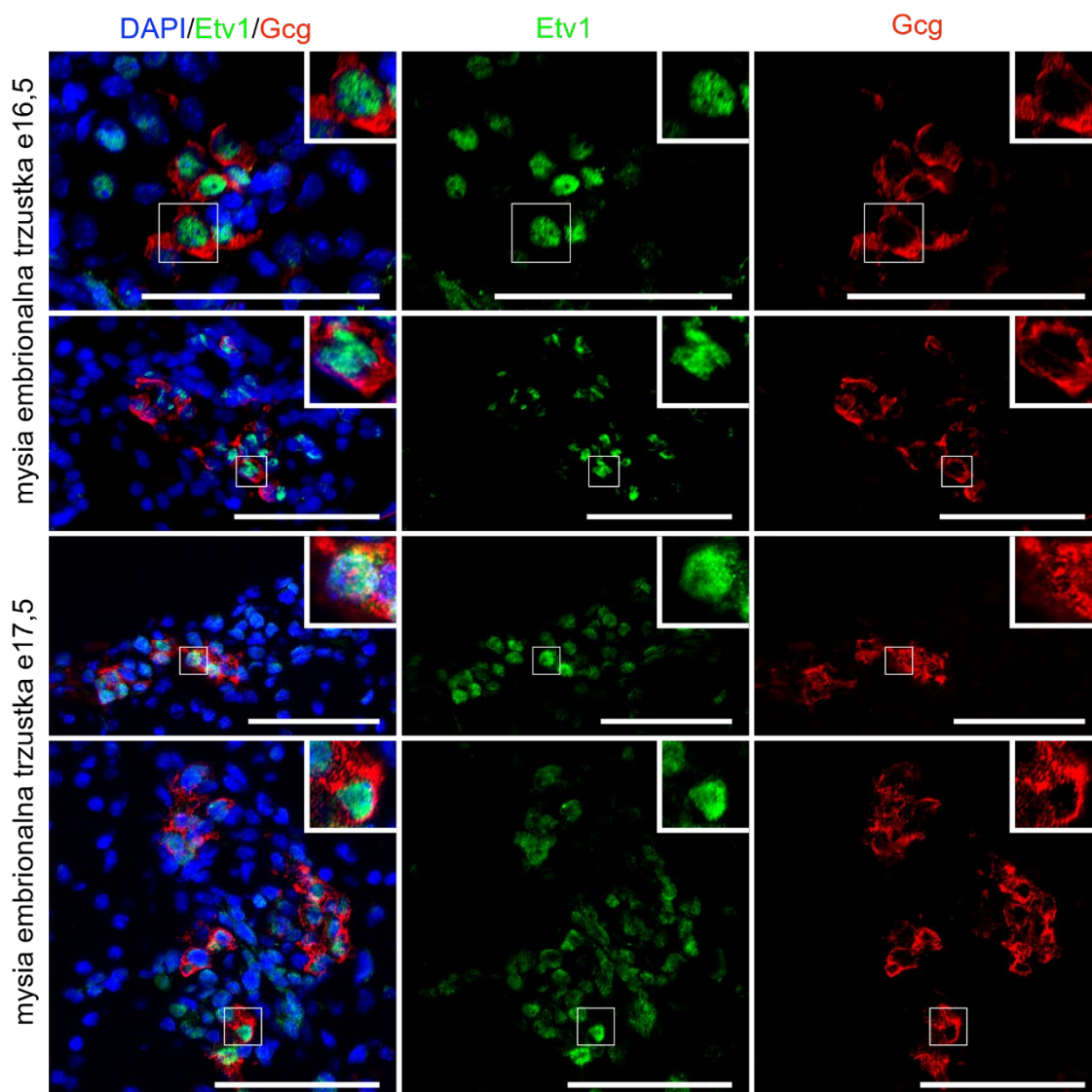


Rycina 17. Wizualizacja ekspresji *Etv1* w rozwijającej się mysiej trzustce w dniach embrjonalnych e12,5 (A), e14,5 (B) i e17,5 (C). α – komórki α ; β – komórki β ; EP – prekursorzy komórek endokrynnych; multi – komórki wykazujące ekspresję więcej niż jednego hormonu; E – komórki endokrynne; A – komórki pęcherzykowe; D – komórki przewodów wyprowadzających; M – komórki mezenchymy; V – komórki naczyń krwionośnych. Liczby przy określonym skrócie wskazują na rozróżnione podtypy komórek. Ekspresja *Etv1* zaznaczona jest kolorem niebieskim. Na podstawie danych GSE101099 (Byrnes i in. 2018)

3.3. Obecność białka ETV1 w modelach mysim i ludzkim

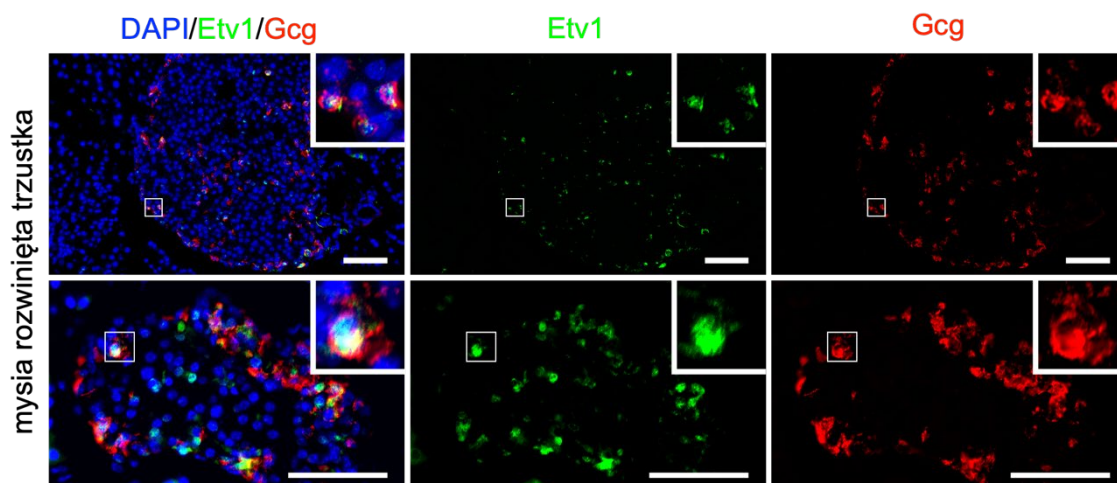
3.3.1. Embrionalna i rozwinięta mysia trzustka

W celu potwierdzenia syntezy białka Etv1 w rozwijającej się mysiej trzustce przeprowadzono barwienie immunofluorescencyjne embrionalnych mysich trzustek z dnia e16,5 i e17,5 (ryc. 18). Jako markera komórek α użyto Gcg, ponieważ transkrypt Etv1 został zidentyfikowany jako specyficzny dla komórek endokrynych, a jego ekspresja była wyższa w nowo powstałych komórkach α w porównaniu do komórek β . Zarówno w dniu e16,5 jak i e17,5 obecna jest synteza białka Etv1 w komórkach wykazujących ekspresję Gcg. Warto zauważyć, że białko Etv1 jest również obecne w komórkach najbardziej sąsiadujących z komórkami α .



Rycina 18. Reprezentatywne barwienia immunofluorescencyjne mysiej embrionalnej trzustki z dnia e16,5 i e17,5. Białko Etv1 (zielony), białko glukagon jako marker komórek α (Gcg, czerwony), jądra komórkowe wybarwione DAPI (niebieski). Skala = 100 μ m

Określono również obecność białka Etv1 w mysiej dorosłej trzustce (**ryc. 19**). Białko Etv1 było zlokalizowane w komórkach syntetyzujących Gcg oraz niektórych innych komórkach wchodzących w skład wyspy trzustkowej. Jednakże białko Etv1 nie było wykryte w komórkach otaczających wyspy.



Rycina 19. Reprezentatywne barwienia immunofluorescencyjne mysiej rozwiniętej trzustki. Białko Etv1 (zielony), białko glukagon jako marker komórek α (Gcg, czerwony), jądra komórkowe wybarwione DAPI (niebieski). Skala = 100 μ m

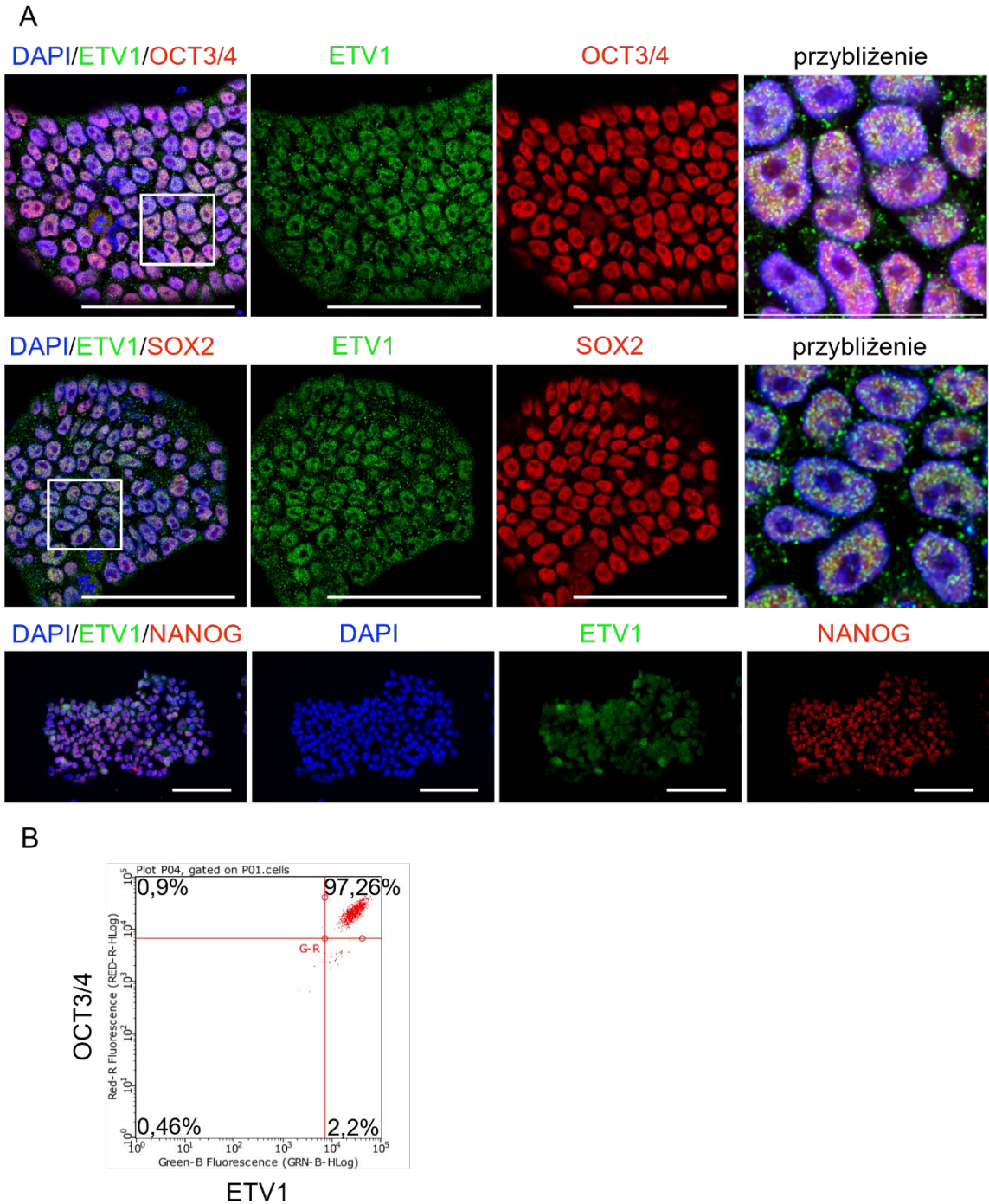
3.3.2. Ludzkie komórki PSC

W celu określenia obecności białka w wykorzystywanej w badaniach linii ludzkich PSC Hues8-iCas9 przeprowadzono barwienie immunofluorescencyjne oraz analizę za pomocą cytometru przepływowego (**ryc. 20**).

Wykazano, że białko ETV1 jest obecne w komórkach PSC wykazujących syntezę markerów PSC, takich jak OCT3/4, SOX2 i NANOG (**ryc. 20A**). Ponadto, z wykorzystaniem cytometru przepływowego, ujawniono, że białka ETV1 oraz OCT3/4 są równocześnie obecne w 97,26% ludzkich PSC (**ryc. 20B**).

Powyższe wyniki potwierdzają wnioski z analizy danych z scRNA-Seq, że *ETV1* ulega ekspresji w ludzkich PSC.

Ludzkie pluripotencjalne komórki macierzyste linia Hues8-iCas9



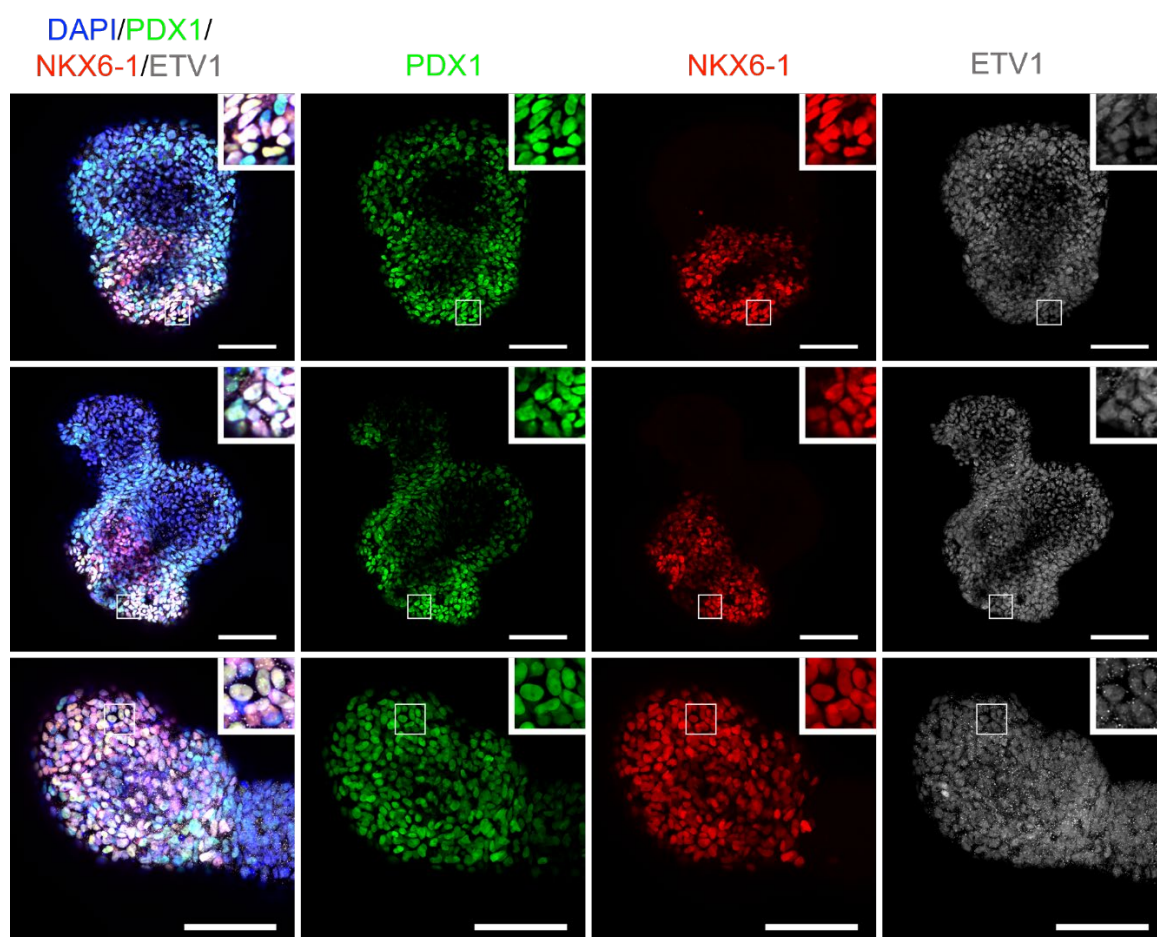
Rycina 20. Reprezentatywne barwienia immunofluorescencyjne ludzkich PSC, linia komórkowa Hues8-iCas9. **A.** Białko ETV1 (zielony), markery PSC (OCT3/4, SOX2, NANOG, czerwony), jądra komórkowe wybarwione DAPI (niebieski). Skala = 100 μ m. **B.** Analiza z cytometru przepływowego wykazała, że 97,26% komórek Hues8-iCas9 wykazuje syntezę równocześnie białek ETV1 i OCT3/4

3.3.3. Różnicowanie *in vitro* ludzkich PSC w kierunku komórek β trzustki

W celu określenia obecności białka w komórkach rozwijającej się ludzkiej trzustki przeprowadzono barwienie immunofluorescencyjne podczas różnicowania *in vitro* ludzkich PSC w kierunku komórek β trzustki.

W 12 dniu różnicowania, kiedy komórki osiągnęły stadium PP, wybarwiono sfery 3D przeciwciałami skierowanymi przeciwko ETV1 oraz markerom komórek PP – PDX1 oraz NKX6-1. Obecność białka ETV1 zaobserwowano w komórkach z syntezą białka PDX1 oraz NKX6-1 (ryc. 21).

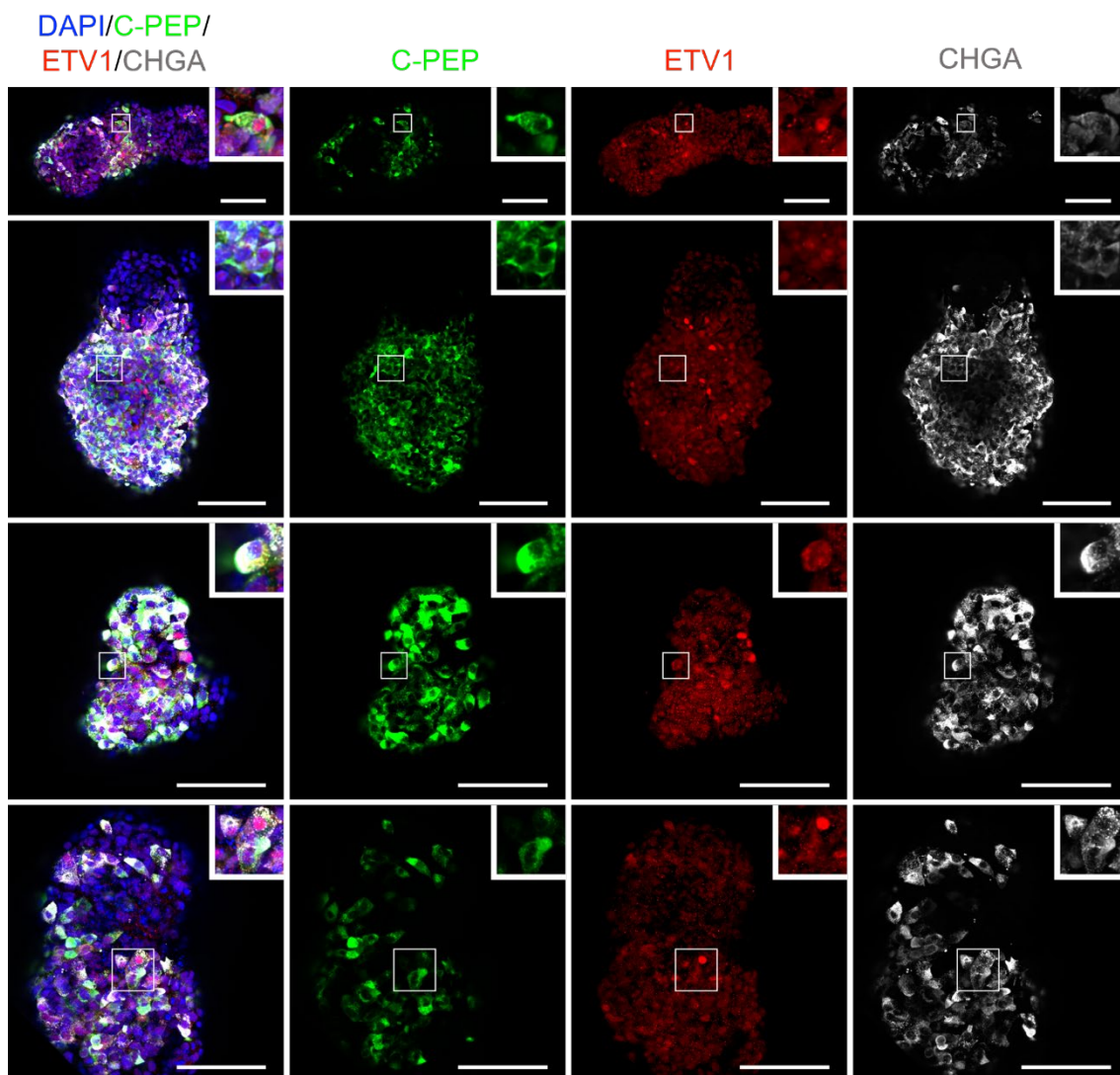
stadium: komórki prekursorowe trzustki (PP)



Rycina 21. Reprezentatywne barwienia immunofluorescencyjne ze stadium PP (dzień 12) różnicowania *in vitro* ludzkich PSC w kierunku komórek β trzustki, linia komórkowa *Hues8-iCas9*. Białko ETV1 (szary), markery komórek PP PDX1 (zielony) oraz NKX6-1 (czerwony), jądra komórkowe wybarwione DAPI (niebieski). Skala = 100 μ m

W dniu 20 rozwoju *in vitro*, kiedy komórki różnicowały się do wczesnych komórek β , sfery 3D wybarwiono używając przeciwciał skierowanych przeciwko ETV1 oraz markerom komórek endokrynych trzustki i komórek β . Zaobserwowano obecność białka ETV1 w komórkach wykazujących syntezę peptydu C (C-PEP, ang. *c-peptide*), który jest częścią białka INS, oraz CHGA (ryc. 22).

stadium: wczesne komórki β trzustki



Rycina 22. Reprezentatywne barwienia immunofluorescencyjne ze stadium wczesnych komórek β (dzień 20) różnicowania *in vitro* ludzkich PSC w kierunku komórek β trzustki, linia komórkowa Hues8-iCas9. Białko ETV1 (czerwony), marker komórek endokrynych trzustki CHGA (szary), marker komórek β C-PEP (zielony), jądra komórkowe wybarwione DAPI (niebieski). Skala = 100 μ m

3.4. Wyłączenie ekspresji *ETV1* w ludzkich komórkach PSC za pomocą metody CRISPR/Cas9

Ponieważ rola *ETV1* nie jest poznana w ludzkich PSC oraz podczas rozwoju ludzkiej trzustki, wyprowadziłam linię ludzkich komórek PSC z wyłączoną ekspresją *ETV1*. Wyprowadzona linia jest uniwersalnym narzędziem eksperymentalnym, ponieważ stanowi model zarówno do zbadania funkcji *ETV1* na etapie pluripotencji jak i podczas różnicowania, nie tylko w kierunku trzustki, ale w dowolnym kierunku rozwojowym. Ponadto analizy dostępnych danych z scRNA-Seq przedstawione w rozdziale 3.2.5 niniejszej rozprawy wykazały, że ekspresja *ETV1* nie jest wykrywalna na etapie naiwnej pluripotencji. Fakt ten stanowi interesujące pole do wykorzystania linii z wyłączoną ekspresją *ETV1* do badań stadium formatywnej i naiwnej pluripotencji.

W celu wyprowadzenia ludzkiej linii komórek PSC z wyłączoną ekspresją *ETV1* zastosowano metodę edycji genów CRISPR/Cas9 (CRISPR, pol. zgrupowane, regularnie rozproszone, krótkie, powtarzające się sekwencje palindromiczne, ang. *clustered regularly-interspaced short palindromic repeats*; Cas9, pol. białko 9 związane z CRISPR, ang. *CRISPR associated protein 9*). W metodzie tej kompleks cząsteczki naprowadzającej RNA (sgRNA, ang. *single guide RNA*) z enzymem Cas9 rozpoznaje specyficzne miejsce w genomie zlokalizowane obok sekwencji PAM i powoduje przecięcie obu nici DNA. Następnie mechanizmy rekombinacji DNA w komórce rozpoczynają naprawę nici DNA, która może odbywać się na dwa sposoby:

- a) rekombinacja homologiczna (HDR, ang. *homology-directed repair*) – wprowadzamy matrycę z ramionami homologicznymi do sekwencji w okolicy cięcia, która stanowi podstawę naprawy DNA, można w ten sposób wprowadzić do sekwencji DNA pożądane mutacje;
- b) rekombinacja niehomologiczna (NHEJ, ang. *non-homologous end joining*) – pęknięcie nici DNA zostaje naprawione przez enzym o aktywności ligazy, w wyniku połączenia powstają mutacje typu indel (insercje lub delecje), które prowadzą do zmiany ramki odczytu i powstania niefunkcjonalnego białka lub pojawienia się przedwczesnego kodonu stop, skutkiem czego jest wyłączenie ekspresji genu.

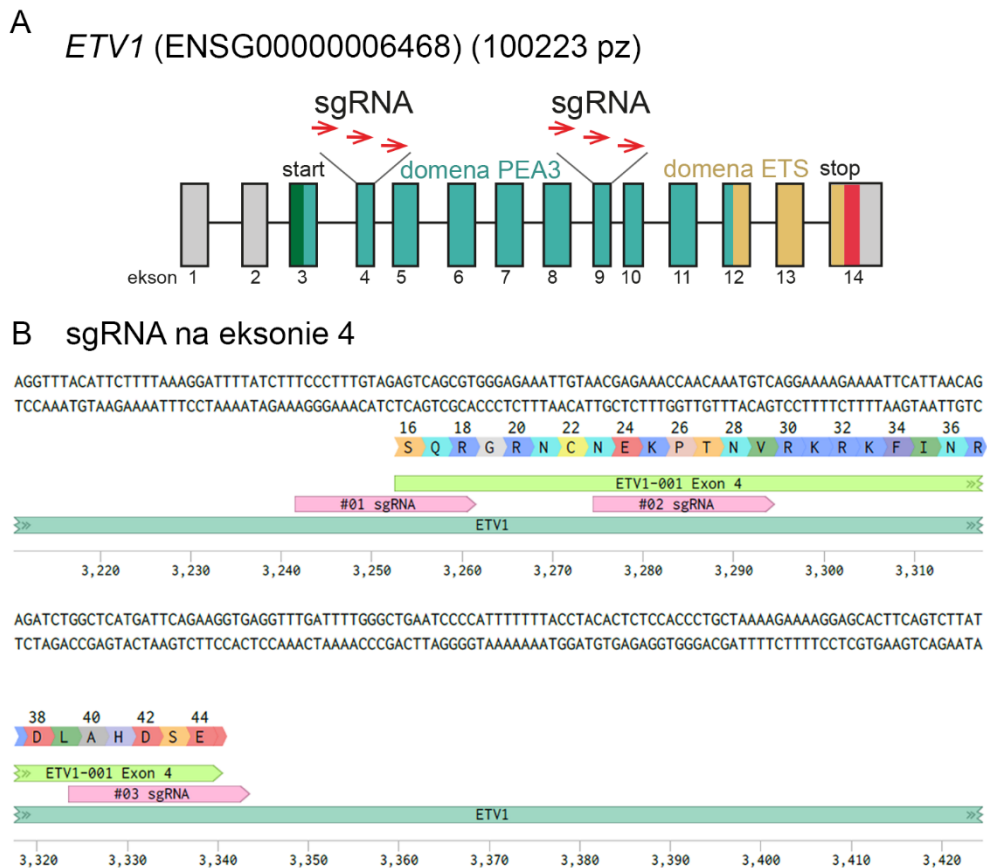
W niniejszej rozprawie do wyłączenia ekspresji *ETV1* zastosowano linię komórkową Hues8 (ludzką linię komórek PSC) z indukowaną doksycykliną ekspresją enzymu Cas9 (Hues8-iCas9) (Zhu i in. 2014). Linia komórkowa Hues8-iCas9 została wyprowadzona w laboratorium profesor D. Huangfu z wykorzystaniem techniki inżynierii genetycznej

TALEN poprzez wprowadzenie do lokus AAVS1 kasety kodującej indukowaną ekspresję białka Cas9. System indukowanej ekspresji Cas9 wymaga dostarczenia do komórki tylko cząsteczek sgRNA, bez konieczności dostarczania białka Cas9, co znacząco zwiększa efektywność edycji genów. Enzym Cas9 w komórkach Hues8-iCas9 wykazuje aktywność endonukleazy, która indukuje przecięcie dwóch nici DNA, prowokując naprawę DNA przez rekombinację NHEJ.

Do naprowadzenia enzymu Cas9 do specyficznej sekwencji zastosowano niezależnie dwa rodzaje sgRNA:

- syntetyczne sgRNA zamówione z firmy SYNTHEGO,
- sgRNA zaprojektowane w naszym laboratorium.

Obydwa rodzaje sgRNA zaprojektowane były tak, aby przeciąć DNA w obrębie domeny PEA3 odpowiedzialnej za aktywację wiązania ETV1 do sekwencji DNA. Syntetyczne sgRNA zaprojektowane były na ekson 9, natomiast sgRNA z naszego laboratorium zaprojektowano na ekson 4 (ryc. 23).



C sgRNA na eksonie 9

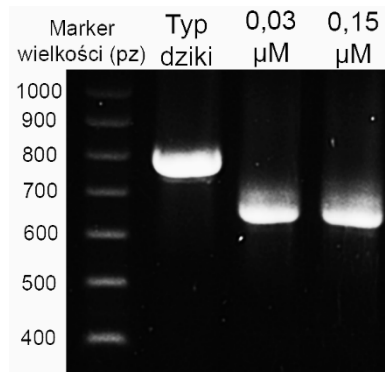


Rycina 23. Strategia wyłączenia ekspresji *ETV1* w ludzkich PSC. **A.** Schemat ludzkiego genu *ETV1*. *ETV1* ma 14 eksonów, transkrypcja zaczyna się na eksonie 3 (start), a kończy na eksonie 14 (stop). Zaznaczono domenę PEA3 odpowiedzialną za aktywację przyłączenia czynnika transkrypcyjnego *ETV1* do sekwencji DNA (kolor zielony) i domenę ETS łączącą *ETV1* do sekwencji w genomie (kolor żółty). Cząsteczki sgRNA zaprojektowane zostały na ekson 4 i 9 (czerwone strzałki). **B.** Schemat eksonu 4 i umiejscowienie zaprojektowanych sgRNA (kolor różowy). **C.** Schemat eksonu 9 i umiejscowienie syntetycznych sgRNA (kolor zielony)

3.4.1. Ustalenie stężenia sgRNA

W pierwszej kolejności ustalono stężenie sgRNA niezbędne do efektywnego wycięcia w obrębie pożądanego regionu genu *ETV1*. Jednocześnie stężenie sgRNA powinno być jak najmniej toksyczne dla komórek. Efektywność powstania mutacji typu indel oceniano z użyciem programu ICE Analysis (<https://ice.synthego.com/#/>) na podstawie sekwencjonowania DNA.

Syntetyczne sgRNA zostały dostarczone przez producenta zmieszane w jednej probówce w stężeniu 3 μM . Testowano stężenia końcowe 0,03 i 0,15 μM . Produkty PCR ze starterami specyficznymi do eksonu 9 sugerowały efektywne wycięcie fragmentu genu *ETV1* (ryc. 24).



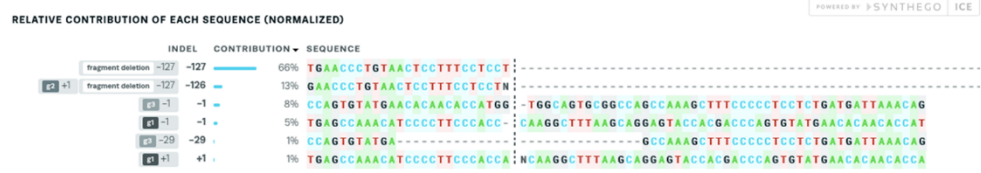
Rycina 24. Reprezentatywny żel agarozowy z DNA wyizolowanego z komórek typu dzikiego (po lewej) i heterogennej populacji komórek po transfekcji sgRNA na ekson 9 ze stężeniem sgRNA 0,03 μM (na środku) i 0,15 μM (po prawej)

Analiza ICE Analysis wykazała, że prawdopodobieństwo wyłączenia genu *ETV1* (w programie oznaczone jako współczynnik KO) w przypadku zastosowania stężenia sgRNA 0,03 μM wyniosło 94%, w porównaniu do współczynnika KO przy użyciu stężenia 0,15 μM , który wyniósł 65%. Ponadto, zaobserwowano różnej długości delecje. Delecja, która prowadziła do wyłączenia ekspresji *ETV1* wynosiła 127 par zasad (pz) i występowała z największą częstością w przypadku obu testowanych stężeń sgRNA (66% przy 0,03 μM i 15% przy 0,15 μM). Dodatkowo 3 kolejne transfekcje z zastosowaniem 0,03 μM stężenia końcowego syntetycznych sgRNA wykazały prawdopodobieństwo wyłączenia ekspresji *ETV1* na podobnym poziomie (odpowiednio 97%, 95% i 96%) i częstość delecji 127 pz odpowiednio 85%, 76% i 87%. Druga najczęściej wykrywana delecja wynosiła 126 pz, jednak nie prowadziła ona do wystąpienia przedwczesnego kodonu stop i wyłączenia ekspresji genu *ETV1*. Syntetyczne sgRNA wykazały bardzo dużą powtarzalność wyników, zarówno ze względu na długość zaindukowanej delecji jak i na efektywność działania (**ryc. 25**).

A

Transfekcja nr 1

sgRNA: 0,03 μ M; współczynnik mutacji indel = 94%



sgRNA: 0,15 μ M; współczynnik mutacji indel = 65%



Transfekcja nr 2

sgRNA: 0,03 μ M; współczynnik mutacji indel = 97%



Transfekcja nr 3

sgRNA: 0,03 μ M; współczynnik mutacji indel = 95%

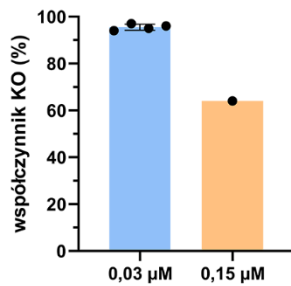


Transfekcja nr 4

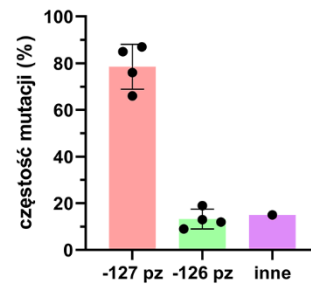
sgRNA: 0,03 μ M; współczynnik mutacji indel = 96%



B



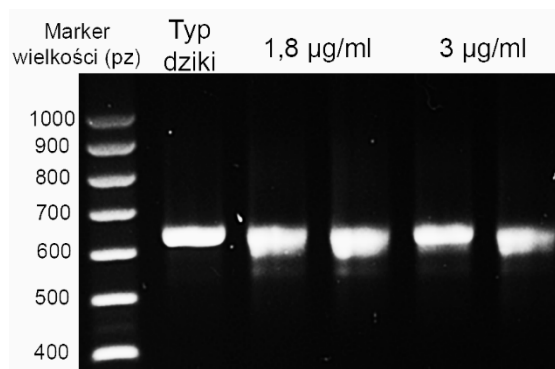
C



Rycina 25. Analiza działania syntetycznych sgRNA skierowanych na ekson 9 genu ETV1. A. Analiza z programu ICE Analysis przedstawiająca 4 niezależne transfekcje. B. Średnie prawdopodobieństwo (współczynnik KO) wyłączenia ekspresji genu ETV1 z zastosowaniem stężenia sgRNA 0,03 μ M (niebieski) lub 0,15 μ M (pomarańczowy). C. Średnia częstotliwość mutacji typu indel -127 pz (różowy), -126 pz (zielony) i innych długości (fioletowy)

3 cząsteczki sgRNA zaprojektowane w naszym laboratorium wprowadzono do komórek równocześnie, aby zwiększyć prawdopodobieństwo mutacji podczas rekombinacji NHEJ po wycięciu większego fragmentu z sekwencji *ETVI* i pojawienia się przedwczesnego kodonu stop. Testowano stężenia końcowe sgRNA 1,8 µg/ml (po 0,6 µg/ml z każdego sgRNA) i 3 µg/ml (po 1 µg/ml z każdego sgRNA).

Smugi widoczne po reakcji PCR ze starterami specyficznymi dla eksonu 4 sugerowały efektywne wycięcie fragmentu genu *ETVI* (**ryc. 26**).



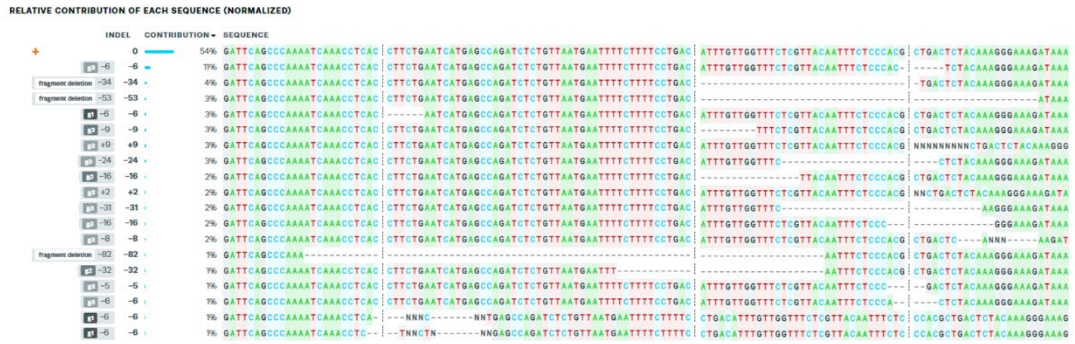
Rycina 26. Wyniki reakcji PCR przeprowadzonej z wykorzystaniem DNA wyizolowanego z komórek typu dzikiego (po lewej) i heterogennej populacji komórek po transfekcji sgRNA zaprojektowanych na ekson 4. Zastosowane stężenie sgRNA: 1,8 µg/ml (na środku) i 3 µg/ml (po prawej)

Analiza ICE Analysis wykazała, że użycie większego stężenia sgRNA skutkowało wyższą częstością wystąpienia mutacji typu indel. Mianowicie efektywność sgRNA o stężeniu 1,8 µg/ml (średni współczynnik mutacji indel wynosi 35%) była istotnie statystycznie niższa w porównaniu do efektywności sgRNA o stężeniu 3 µg/ml (średni współczynnik mutacji indel wynosi 45%). Prawdopodobieństwo wyłączenia ekspresji genu *ETVI* również było większe w przypadku zastosowania większego stężenia sgRNA 3 µg/ml (średni współczynnik KO 86%) w porównaniu do niższego stężenia sgRNA 1,8 µg/ml (średni współczynnik KO 23,33%).

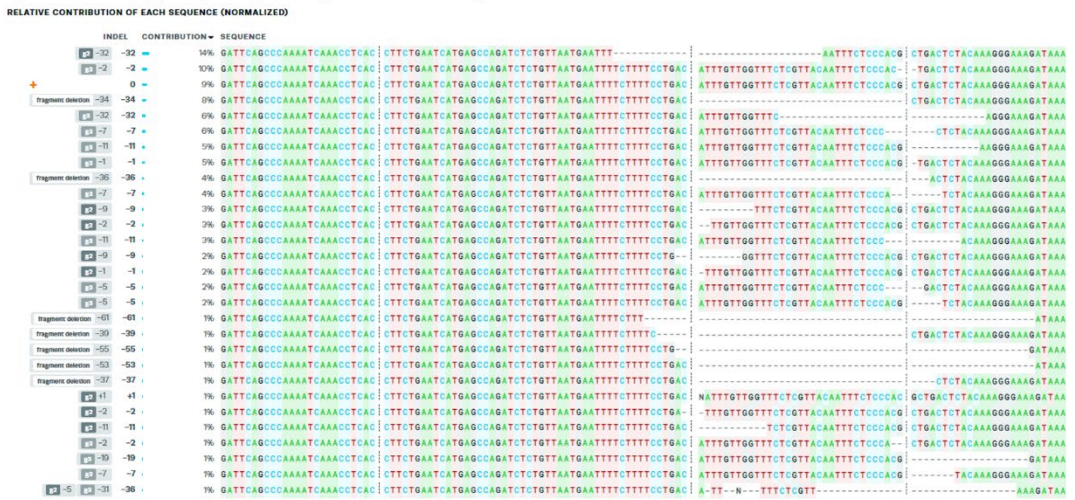
Ponadto pomimo użycia tego samego stężenia sgRNA różnorodność mutacji typu indel pomiędzy kolejnymi transfekcjami była bardzo duża, w porównaniu do syntetycznych sgRNA, gdzie w każdej wykonanej transfekcji otrzymywano tę samą delecję z dużą efektywnością (**ryc. 27**).

Transfekcja nr 3

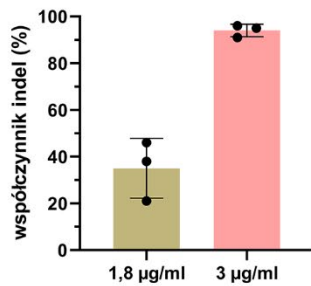
sgRNA: 1,8 µg/ml; współczynnik mutacji indel = 46%



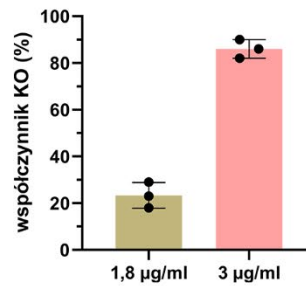
sgRNA: 3 µg/ml; współczynnik mutacji indel = 91%



B



C

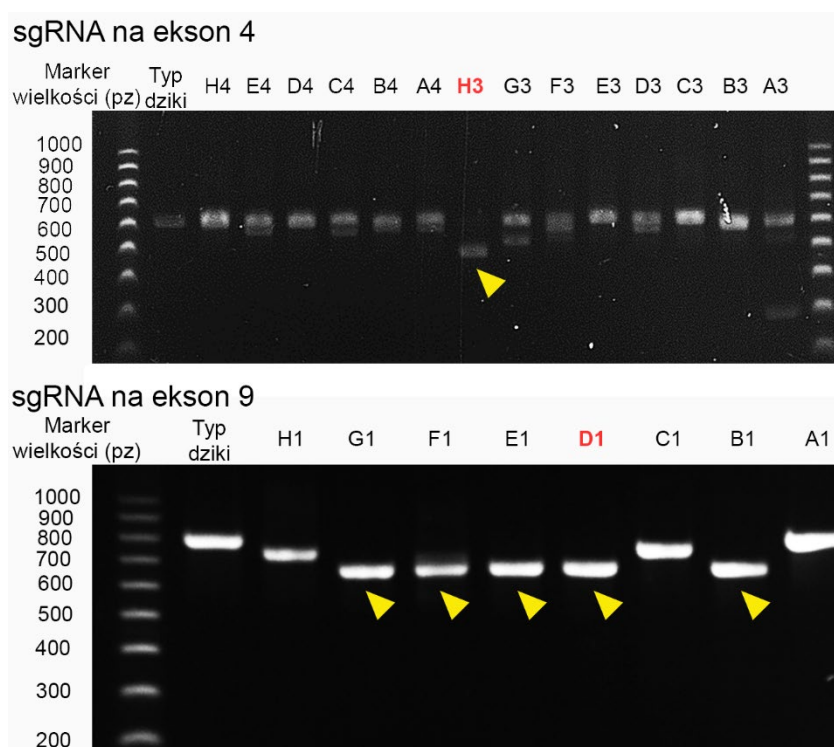


Rycina 27. Analiza działania sgRNA nakierowanych na ekson 4 **A.** Analiza z programu ICE Analysis przedstawiająca 3 niezależne transfekcje. **B.** Średnia częstość (współczynnik indel) wystąpienia mutacji typu indel z zastosowaniem stężenia sgRNA 1,8 µg/ml (brązowy) lub 3 µg/ml (różowy), $p = 0,0014$ **C.** Średnie prawdopodobieństwo (współczynnik KO) wyłączenia ekspresji genu *ETV1* z zastosowaniem stężenia sgRNA 1,8 µg/ml (brązowy) lub 3 µg/ml (różowy). Statystyka: test t-Studenta, $n=3$ powtórzeń biologiczne, $p < 0,0001$

3.4.2. Identyfikacja linii klonalnych z wyłączoną ekspresją *ETV1*

Kolejnym krokiem była identyfikacja klonów z wyłączoną ekspresją genu *ETV1* i wyprowadzenie homozygotycznej linii.

W tym celu heterogenną populację po transfekcji z sgRNA rozszano do pojedynczych komórek w stężeniu klonalnym (około 2 komórki/cm²). Następnie, wyselekcjonowano i przepasażowano pojedyncze kolonie, które zostały sprawdzone pod względem mutacji w genie *ETV1*. Analiza produktów reakcji PCR ze specyficznymi starterami nakierowanymi na ekson 4 i 9 i okalającymi miejsce edycji CRISR/Cas9 pozwoliła na wstępną selekcję klonów z wyciętym fragmentem genu *ETV1* (ryc. 28). Z transfekcji sgRNA zaprojektowanymi na ekson 4 wyselekcjonowano 1 klon (H3), natomiast z transfekcji sgRNA nakierowanymi na ekson 9 wybrano 5 klonów (B1, D1, E1, F1, G1).



Rycina 28. Wyniki reakcji PCR przeprowadzonej z wykorzystaniem DNA wyizolowanego z komórek typu dzikiego i klonów uzyskanych z pojedynczych komórek. Żółta strzałką zaznaczono klony z mutacją prowadzącą do wyłączenia ekspresji *ETV1* przez pojawienie się przedwczesnego kodonu stop. Na czerwono zaznaczono klony, które zostały wybrane do dalszych eksperymentów

Następnie DNA z wybranych klonów zostało zsekwencjonowane w celu wykrycia mutacji w genie *ETV1*.

W klonie H3 za pomocą sekwencjonowania Sangera wykryto homozygotyczną delecję 116 nukleotydów w intronie pomiędzy eksonem 3 i 4 oraz 12 nukleotydową delecję i 1

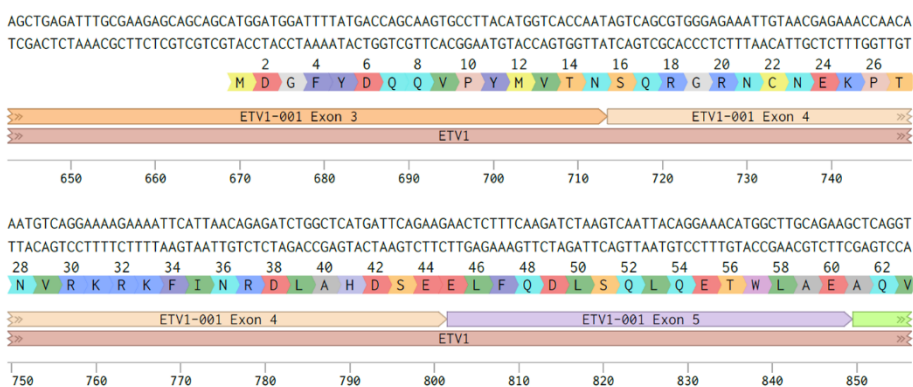
nukleotydową insercję na początku eksonu 4. Mutacje te spowodowały wystąpienie przedwczesnego kodonu stop w 32 aminokwasie białka ETV1 (ryc. 29).

A DNA

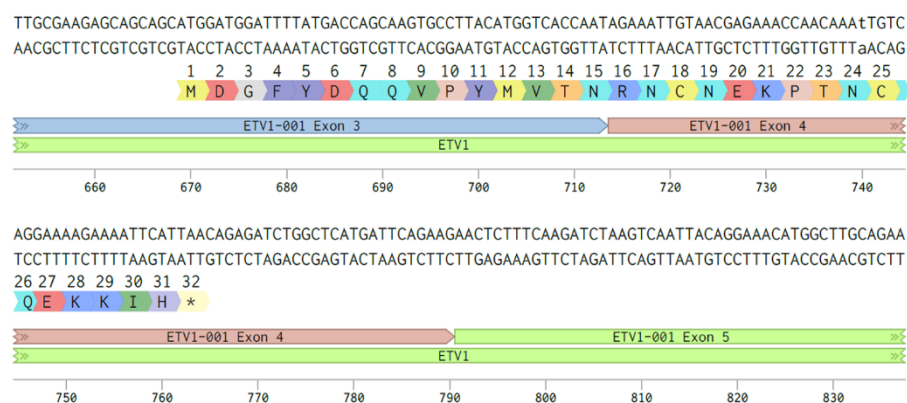


B cDNA i białko

Typ dziki



H3



Rycina 29. Porównanie klonu H3 do typu dzikiego. **A.** Przyrównanie sekwencji DNA *ETV1* typu dzikiego i klonu H3. **B.** Przyrównanie sekwencji cDNA i powstającego białka *ETV1* typu dzikiego i klonu H3. * – przedwczesny kodon stop w 32 aminokwasie

W klonach B1, D1, E1, F1, G1 wykryta mutacja była w identycznym miejscu w genomie, do dalszych analiz wybrano 1 klon (D1). Klon D1 wykazywał homozygotyczną 127 nukleotydową delecję w eksonie 9, która doprowadziła do powstania dwóch przedwczesnych kodonów stop w 212 i 213 aminokwasie (ryc. 30).

A DNA

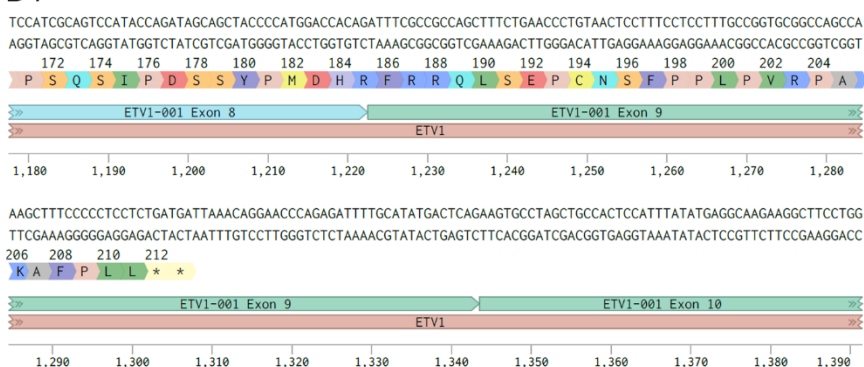


B cDNA i białko

Typ dziki



D1

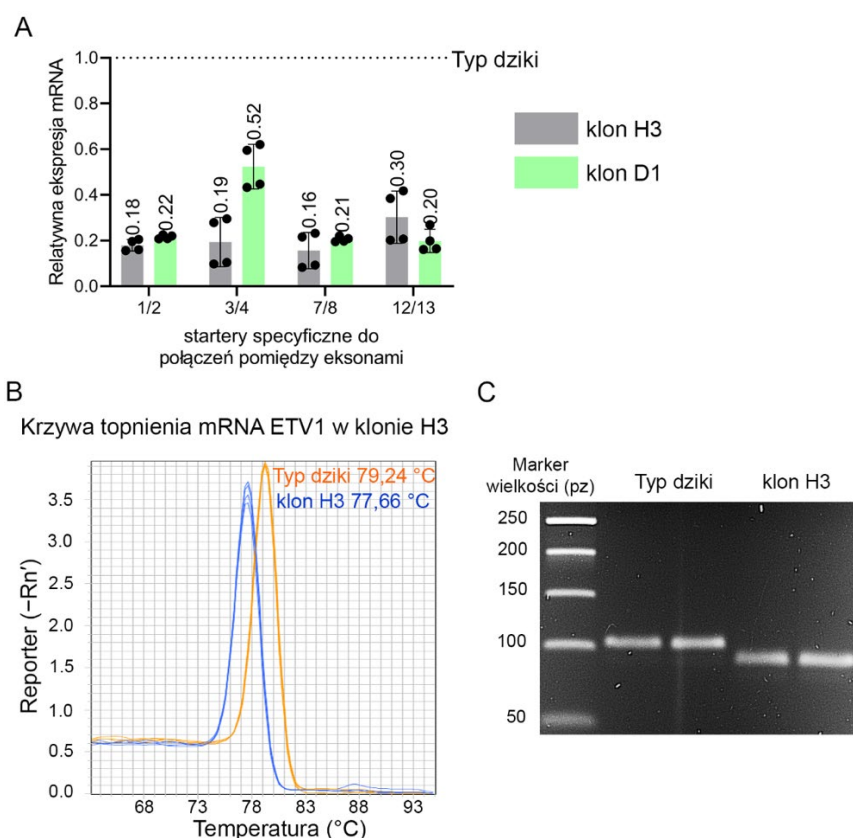


Rycina 30. Porównanie klonu D1 do typu dzikiego. A. Przyrównanie sekwencji DNA *ETV1* typu dzikiego i klonu D1. **B.** Przyrównanie sekwencji cDNA i powstającego białka *ETV1* typu dzikiego i klonu D1. * – przedczesny kodon stop w 212 i 213 aminokwasie

Następnie sprawdzono poziom ekspresji *ETV1* w klonach H3 i D1 w porównaniu do komórek typu dzikiego z wykorzystaniem metody qPCR. Do reakcji qPCR wykorzystano specyficzne startery na połączenia eksonów w przedniej, środkowej i końcowej części cząsteczki mRNA *ETV1*.

Analiza wyników reakcji qPCR wykazała obniżenie ekspresji ETV1 w obydwu badanych klonach. W porównaniu do typu dzikiego w klonie H3 nastąpiło obniżenie ekspresji mRNA ETV1 o około 80% (średnia ekspresja to 20,75% z ekspresji typu dzikiego), natomiast w klonie D1 obniżenie ekspresji mRNA ETV1 wynosiło około 71% (średnia ekspresja to 28,75% z ekspresji typu dzikiego) (**ryc. 31A**).

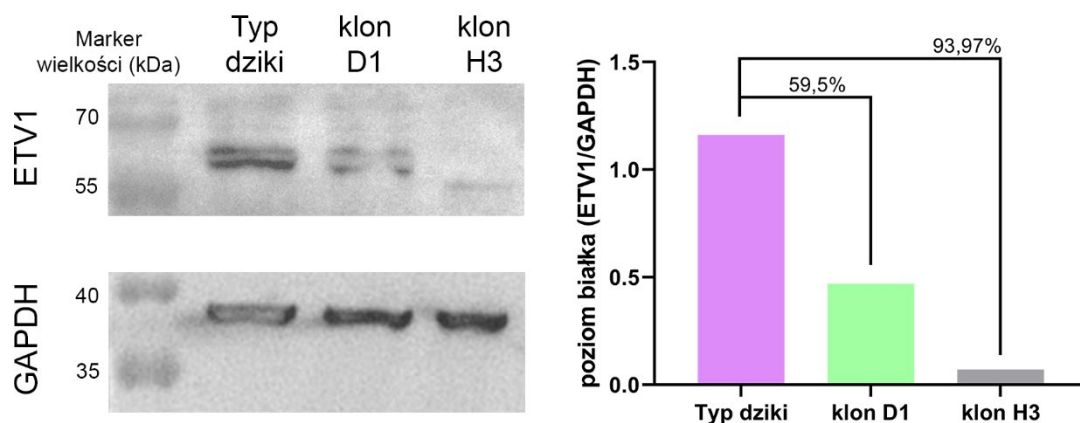
Ponieważ w klonie H3 nastąpiła delecja początkowego fragmentu eksonu 4, przeanalizowano dokładniej produkt qPCR powstający z użyciem starterów zaprojektowanych na połączenie eksonu 3 i 4. Analiza krzywej topnienia wykazała, że przy użyciu tych samych starterów oraz matryc z komórek typu dzikiego i klonu H3 powstają produkty różnej długości, co można stwierdzić na podstawie różnej temperatury topnienia produktów (**ryc. 31B**). Ponadto, uzyskane amplikony rozdzielono na żelu agarozowym i wykazano, że w przypadku klonu H3 powstaje krótszy produkt qPCR niż uzyskany z komórek typu dzikiego (94 pz w klonie H3 i 106 pz w komórkach typu dzikiego) (**ryc. 31C**). Powyższe obserwacje stanowią dodatkowe potwierdzenie zmiany w sekwencji genu *ETV1* w klonie H3 zaindukowane metodą CRISPR/Cas9.



Rycina 31. Analiza porównawcza względnych ilości mRNA ETV1 w klonach D1 i H3 i komórkach typu dzikiego. **A.** Względny poziom mRNA *ETV1* w klonach D1 (zielony) i H3 (szary) w porównaniu do typu dzikiego (na skali zaznaczono przerywaną linią jako 1). **B.** Krzywa topnienia amplikonu ETV1 z użyciem starterów na łączenie eksonu 3 i 4 oraz matrycy z komórek PSC typu dzikiego (niebieski) i klonu H3 (pomarańczowy). **C.** Żel agarozowy z produktami qPCR z komórek PSC typu dzikiego i klonu H3 ze starterami na łączenie eksonu 3 i 4, n=2 powtórzeń biologiczne

Ostatnim etapem było sprawdzenie, czy w klonach H3 i D1 powstaje białko ETV1. W tym celu wykorzystano metodę western blot.

Zaobserwowano obniżony poziom białka ETV1 w obu badanych klonach względem typu dzikiego. W przypadku klonu D1 poziom białka ETV1 spadł o 59,5%, natomiast w klonie H3 o 93,97% (ryc. 32).



Rycina 32. Obecność białka ETV1 w klonach D1 i H3 w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego. ETV1 – przeciwciało anti-ETV1; GAPDH – przeciwciało anti-GAPDH, jako kontrola. Wykres przedstawia poziom białka ETV1 znormalizowany względem poziomu białka GAPDH. Komórki typu dzikiego (fioletowy); klon D1 (zielony); klon H3 (szary), n=1 powtórzenie biologiczne

W związku z powyższym do dalszych analiz mających na celu sprawdzenie wpływ wyłączenia ekspresji *ETV1* wybrano linię komórkową klonu H3 (od tej pory oznaczane jako ETV1-KO, ang. *ETV1 knock-out*).

3.5. Charakterystyka fenotypu ludzkich komórek PSC z wyłączoną ekspresją *ETV1*

3.5.1. Wpływ wyłączenia ekspresji *ETV1* na homeostazę ludzkich komórek PSC

Jednym z celów niniejszej rozprawy było określenie roli *ETV1* w ludzkich PSC.

W pierwszej kolejności określono wpływu wyłączenia ekspresji *ETV1* na proliferację ludzkich komórek PSC. W tym celu wykorzystano system do obrazowania żywych komórek IncuCyte, aby porównać komórki typu dzikiego i ETV1-KO. Przyrost konfluencji był analizowany z interwałem co dwie godziny, przez łączny okres 96 godzin, ponieważ po tym czasie konfluencja komórek osiągała 100%. Komórki typu dzikiego i ETV1-KO były posiane w pasażu do pojedynczych komórek z dodatkiem inhibitora ROCK wspomagającego przeżycie podczas tego typu pasażu. Badane typy komórek posiane były

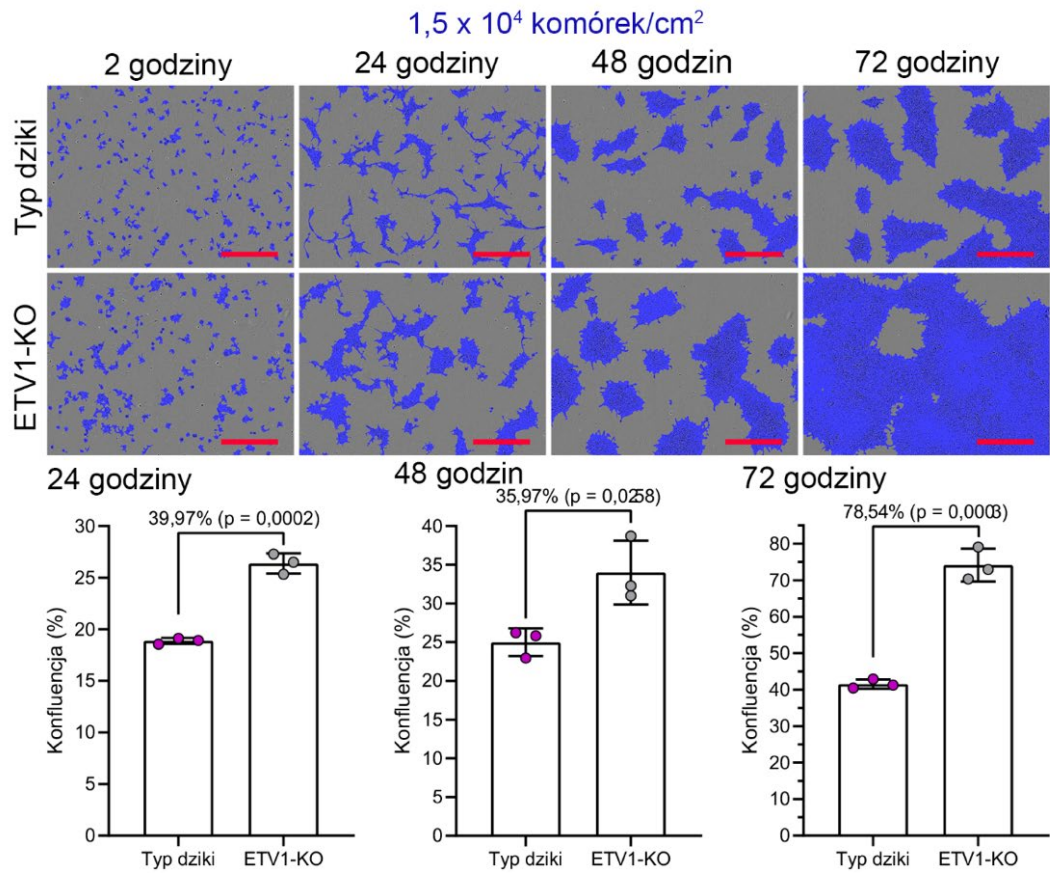
w trzech początkowych gęstościach na dołki płytki 24-dołkowej (powierzchnia całkowita jednego dołka = 2 cm²):

- a) $1,5 \times 10^4$ komórek/cm² dołka hodowlanego,
- b) $2,5 \times 10^4$ komórek/cm² dołka hodowlanego,
- c) 5×10^4 komórek/cm² dołka hodowlanego.

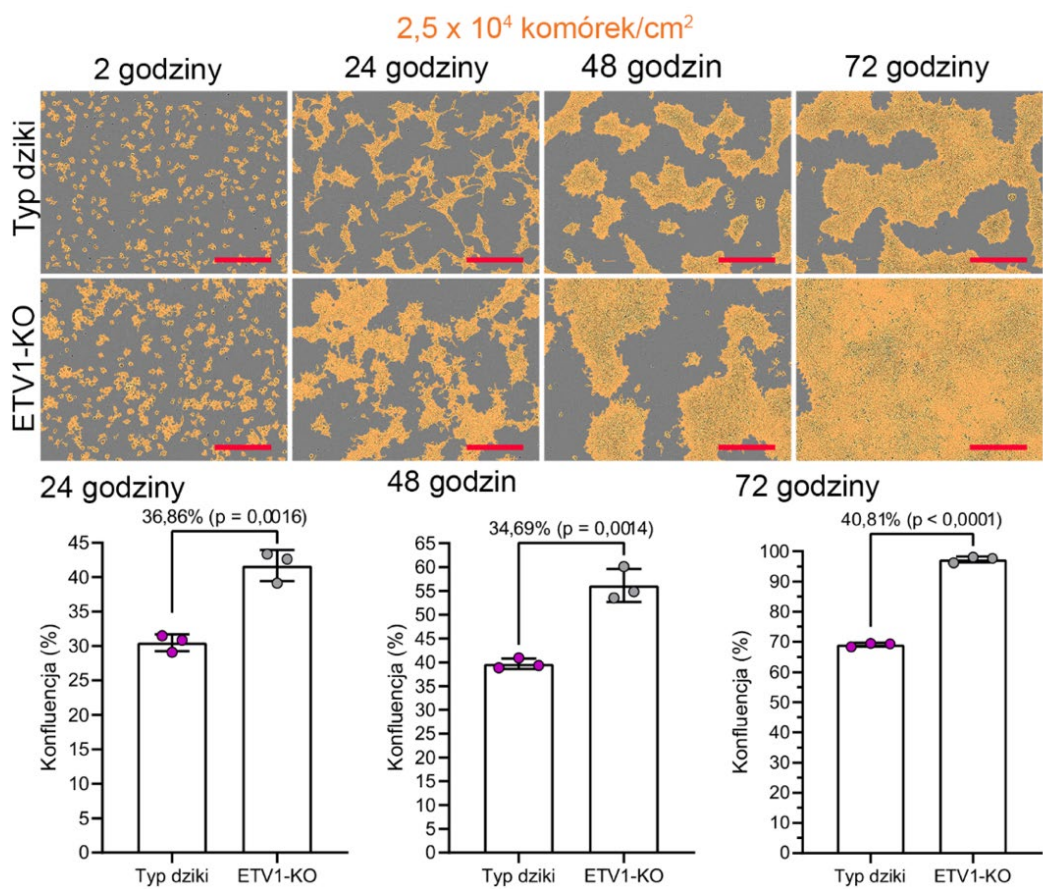
Co ciekawe, po 24 godzinach od pasażu zaobserwowano większą konfluencję komórek ETV1-KO w porównaniu do komórek typu dzikiego o 39,97%, 36,85% lub 33,54%, kiedy komórki posiewane były odpowiednio $1,5 \times 10^4$ komórek/cm², $2,5 \times 10^4$ komórek/cm² lub 5×10^4 komórek/cm². Ponadto efekt ten utrzymywał się również przez kolejne godziny hodowli niezależnie od początkowej gęstości komórek, aż do osiągnięcia konfluencji 100%. Największą różnicę (78,54%) zaobserwowano po 72 godzinach hodowli przy początkowej gęstości komórek $1,5 \times 10^4$ komórek/cm² (ryc. 33).

Zwiększona konfluencja komórek ETV1-KO może być spowodowana kilkoma czynnikami. Po pierwsze, komórki po wyłączeniu ekspresji ETV1 mogą szybciej proliferować. Po drugie, komórki ETV1-KO mogą lepiej przeżywać podczas pasażu do pojedynczych komórek. Powszechnie wiadomo, że ludzkie PSC rozbite do pojedynczych komórek umierają w wyniku apoptozy, z tego względu w tradycyjnej hodowli pasażuje się je w grupach komórek przy pomocy delikatnego roztworu 0,5 mM EDTA w 1×PBS zachowując tym samym przyleganie między komórkami. Dlatego, po trzecie, większa konfluencja komórek ETV1-KO może być wynikiem lepszego przylegania tych komórek do siebie nawzajem i do ECM.

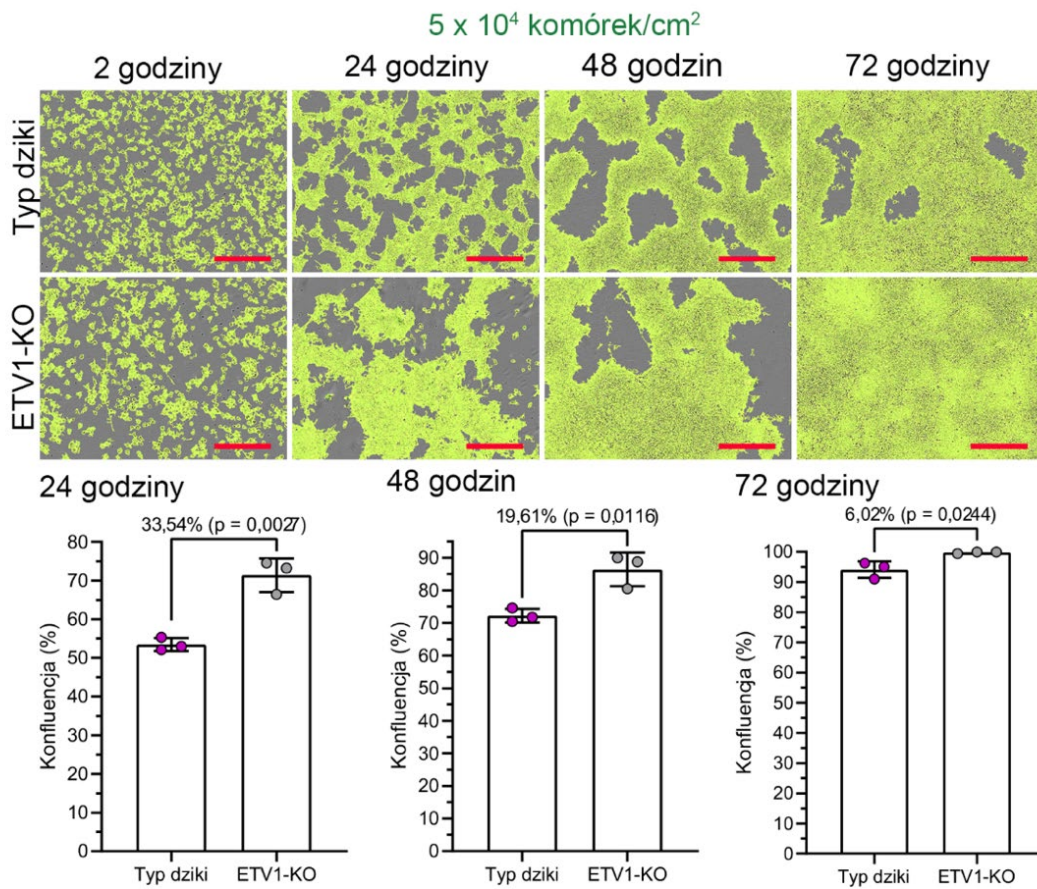
A



B

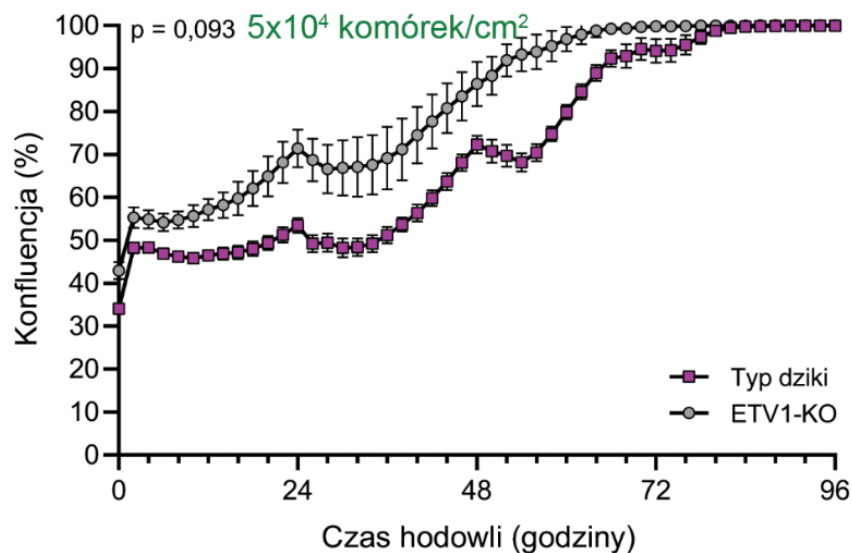
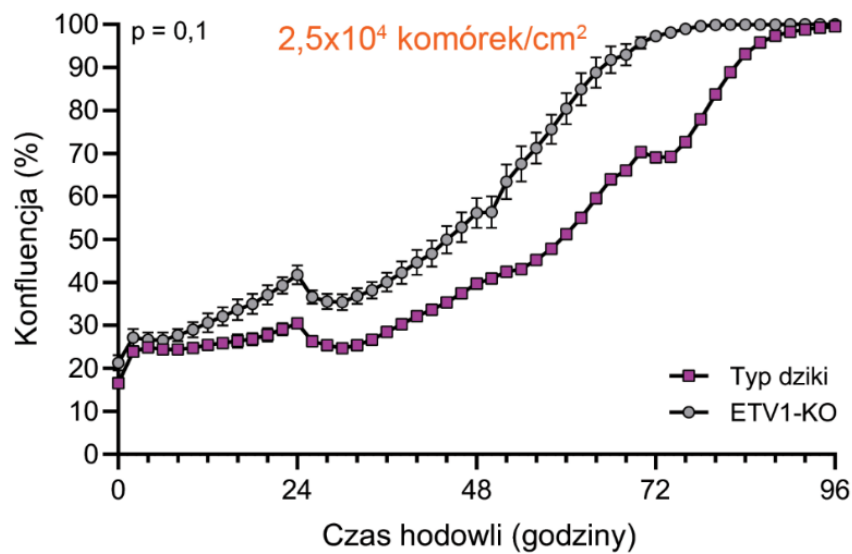
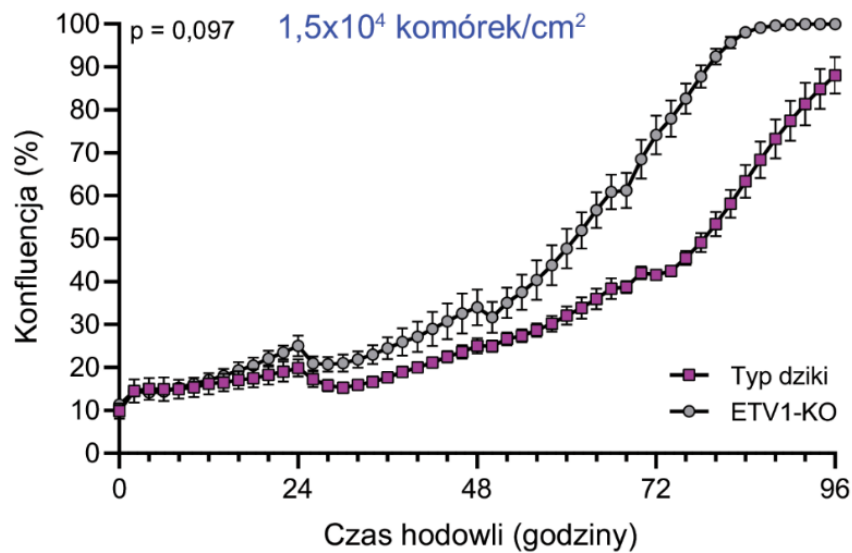


C



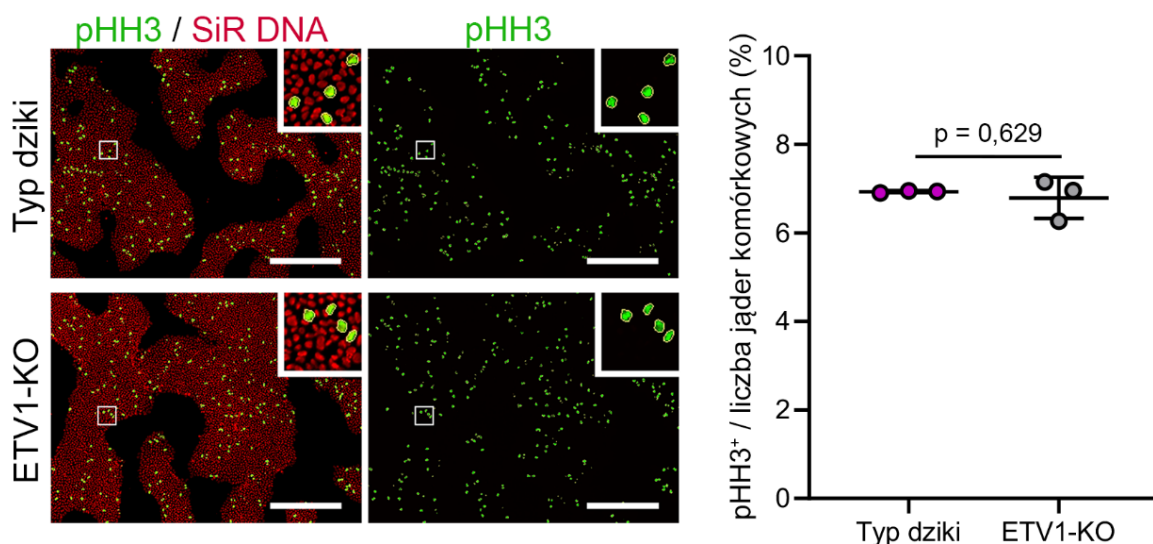
Rycina 33. Trzydniowe obrazowanie żywych komórek za pomocą systemu IncuCyte. Komórki typu dzikiego i ETV1-KO posiano w taki sam sposób badając trzy początkowe gęstości komórek: **A.** $1,5 \times 10^4$ komórek/cm²; **B.** $2,5 \times 10^4$ komórek/cm²; **C.** 5×10^4 komórek/cm². Statystyka: test t-Studenta, n=3 powtórzenia biologiczne

Dla każdej początkowej gęstości komórek porównano kształty krzywych wzrostu używając algorytmu CGGC (<https://bioinf.wehi.edu.au/software/compareCurves/>) (Baldwin i in., 2007; Elso i in., 2004). Algorytm CGGC oblicza wartość statystyczną „p” permutacji dla każdej pary grup, używając średniej statystyki t-Studenta między grupami jako statystyki testowej. Porównując krzywe wzrostu komórek typu dzikiego i ETV1-KO dla każdej początkowej gęstości komórek nie wykazano różnicy istotnej statystycznie, co wskazuje na brak różnic w proliferacji pomiędzy badanymi komórkami (ryc. 34).



Rycina 34. Przyżyciowa analiza konfluencji ludzkich komórek PSC typu dzikiego oraz ETV1-KO za pomocą systemu IncuCyte. Dane nie są znormalizowane, co ukazuje większą konfluencję komórek ETV1-KO utrzymującą się przez cały czas analizy. Jednakże komórki typu dzikiego i ETV1-KO wykazują podobny kształt krzywej wzrostu, co wskazuje na podobny czas pomiędzy podziałami komórek, niezależnie od początkowej gęstości komórek. Komórki posiane na podłożu Geltrex. Statystyka: Algorytm CGGC, n=3 powtórzeń biologiczne

W celu zbadania w proliferacji komórek PSC typu dzikiego oraz ETV1-KO przeprowadzono barwienie immunofluorescencyjne, wykorzystując przeciwciało wykrywające fosforylację histonu H3 (pHH3). Fosforylacja seryny 10 histonu H3 jest zależna od cyklu komórkowego i prowadzi do upakowania chromatyny podczas mitozy. Z tego względu fosforylacja histonu H3 uważana jest za marker mitozy i dzielących się komórek. Procent komórek będących w trakcie podziału nie różnił się istotnie statystycznie pomiędzy komórkami PSC typu dzikiego a ETV1-KO (ryc. 35).



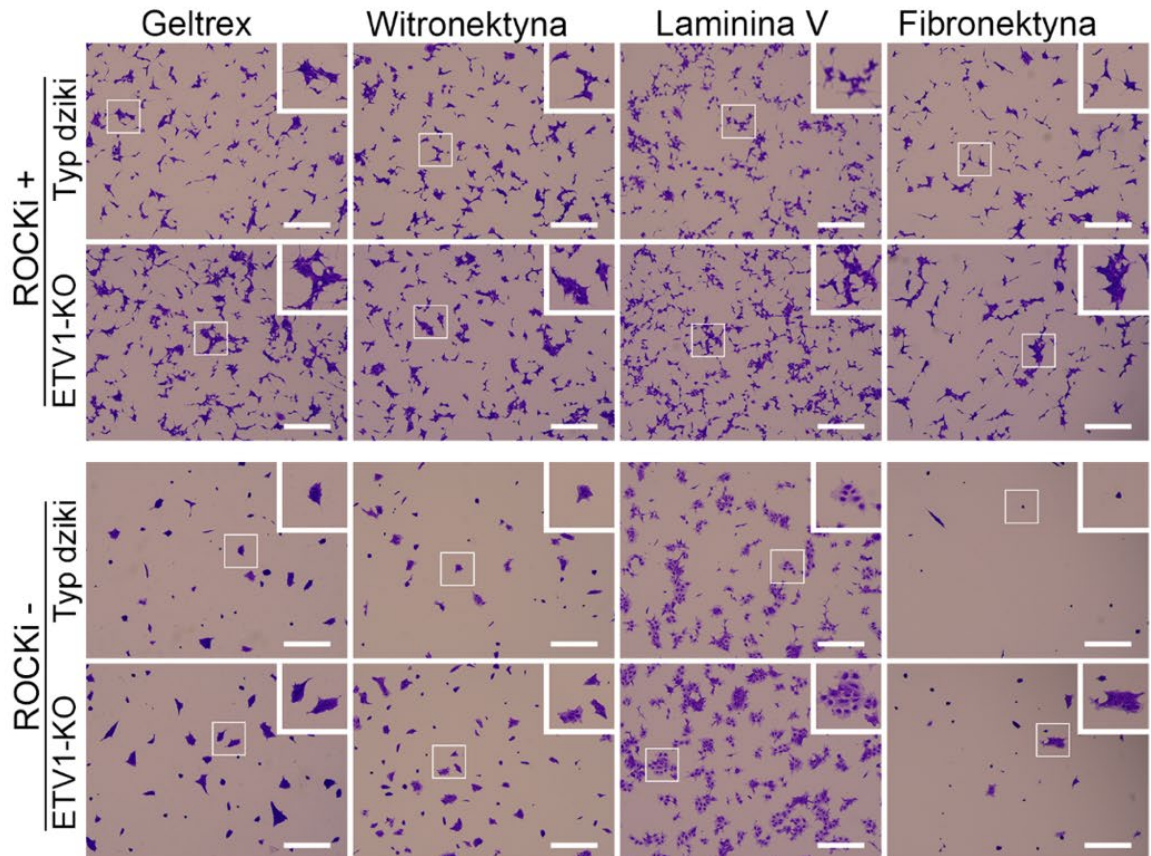
Rycina 35. Reprezentatywne barwienie immunofluorescencyjne fosforylacji histonu H3 w ludzkich komórkach PSC typu dzikiego oraz ETV1-KO. Komórki policzono automatycznie z wykorzystaniem oprogramowania IncuCyte. Liczbę komórek w fazie mitozy podzielono przez całkowitą liczbę komórek. Fosforylacja histonu H3 (zielony), jądra komórkowe wybarwiono barwnikiem SiR DNA (czerwony). Próby porównano ze sobą za pomocą testu t-Studenta. Skala = 400 μ m; statystyka: test t-Studenta, n=3 powtórzenia biologiczne

W związku z powyższym, postawiono hipotezę, że ETV1 może kontrolować adhezję i przyleganie do ECM ludzkich PSC. Następnie przeprowadzono inny test sprawdzający przyczepianie się komórek po pasażu. Użyto barwienia fioletem krystalicznym, który niespecyficznie barwi zarówno DNA jak i białka w komórkach. Następnie, wynik zmierzonej absorbancji przyrównywany był do krzywej wzorcowej, co umożliwiło oszacowanie liczby przyczepionych komórek.

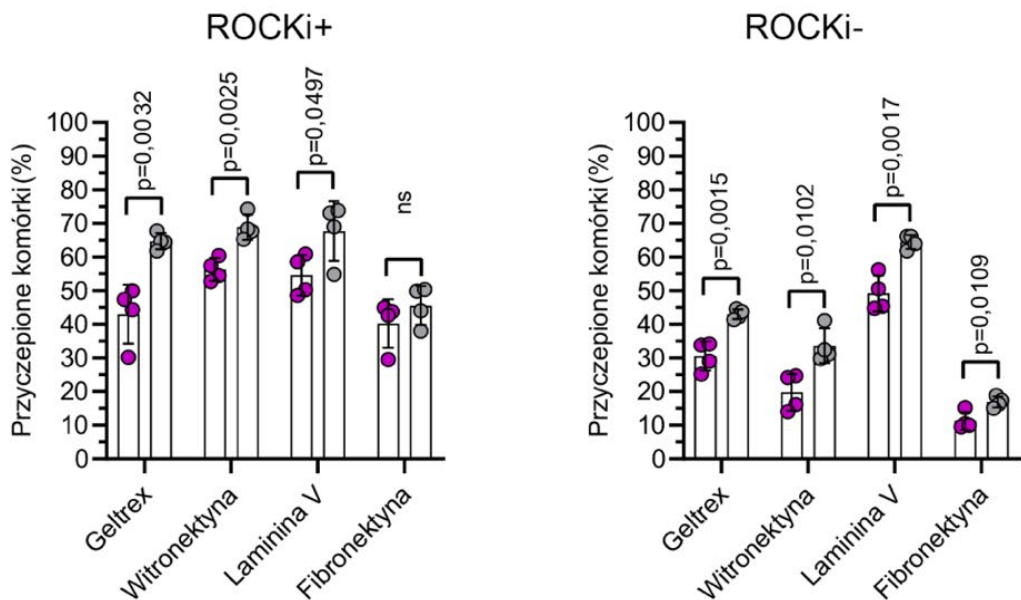
Komórki typu dzikiego i ETV1-KO rozbito do pojedynczych komórek i posiano w takiej samej gęstości początkowej ($1,5 \times 10^4$ komórek/cm²) z pożywką z dodatkiem inhibitorów ROCK (ROCKi+) i bez inhibitorów ROCK (ROCKi-). Brak suplementacji pożywki inhibitorami ROCK stworzył trudniejsze warunki pasażu dla badanych komórek. Ponadto, aby określić, czy zwiększona adhezja komórek ETV1-KO jest niezależna od podłoża i wynika z wyłączenia ekspresji *ETV1*, zastosowano różne podłoża hodowlane ECM:

- a) Geltrex,
- b) witronektynę,
- c) lamininę V,
- d) fibronektynę.

Zaobserwowano większą konfluencję komórek ETV1-KO na podłożach Geltrex, witronektyna i laminina V zarówno w warunkach ROCKi+, jak i ROCKi-. W przypadku fibronektyny fenotyp związany ze zwiększoną przyczepnością do ECM został zaobserwowany w warunkach ROCKi-. W warunkach ROCKi+ na fibronektynie nie było różnicy w przyczepności pomiędzy komórkami typu dzikiego a ETV1-KO (**ryc. 36**).



- Typ dziki
- ETV1-KO

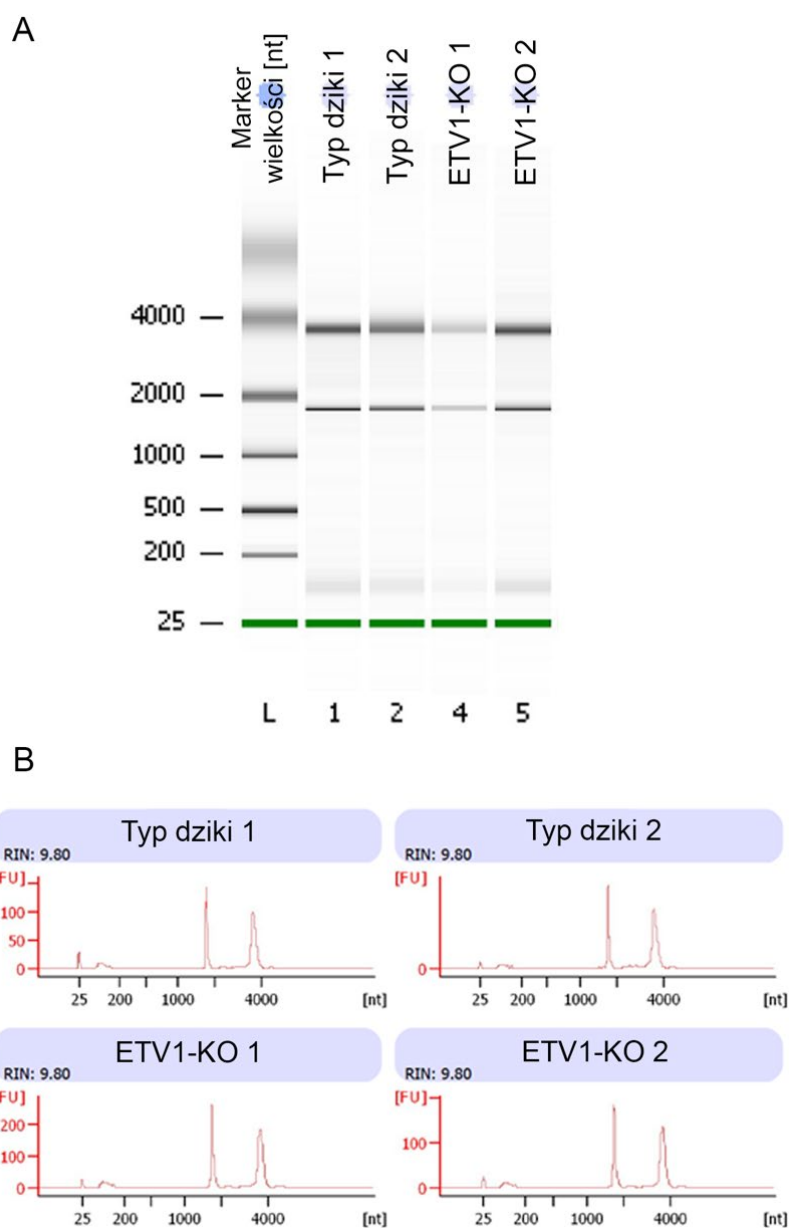


Rycina 36. Reprezentatywne barwienie fioletem krystalicznym. Absorbancję po liczeniu komórek i uwolnieniu zmagazynowanego barwnika zmierzono używając spektrofotometru. Liczbę przyczepionych komórek określano przyrównując do ustanowionej krzywej wzorcowej. Odsetek przyczepionych komórek obliczono dzieląc liczbę przyczepionych komórek przez liczbę komórek posianych na dołek. ROCKi+ – pożywka z dodatkiem inhibitorów ROCK; ROCKi- – pożywka bez suplementacji inhibitorami ROCK. Skala = 100 μm; Statystyka: test t-Studenta, n=4 powtórzenia biologiczne

3.5.2. Określenie różnic na poziomie transkryptomu z użyciem metody RNA-Seq

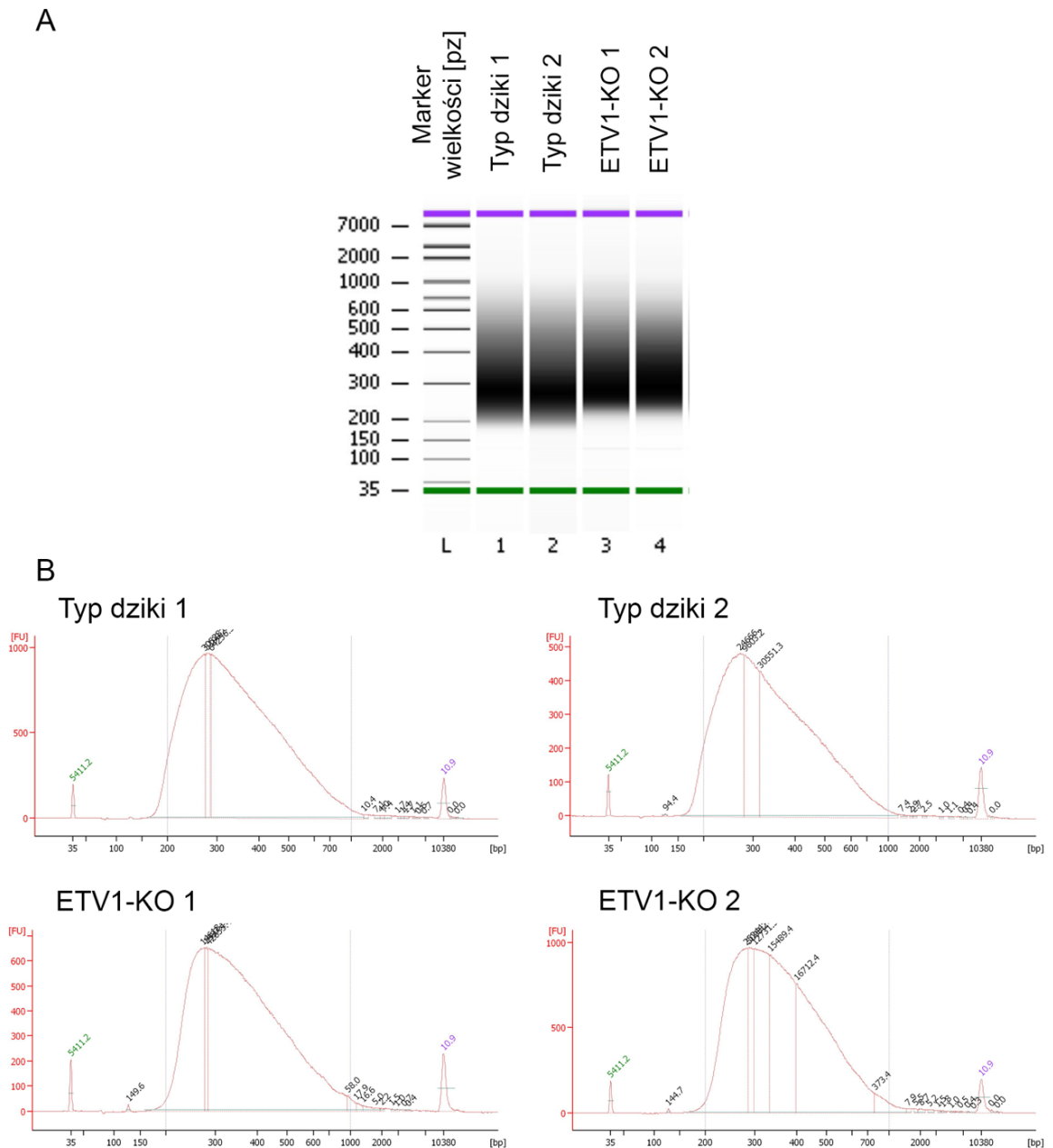
W celu zidentyfikowania globalnych zmian w transkryptomie w komórkach ETV1-KO względem komórek typu dzikiego, przeprowadzono sekwencjonowanie mRNA (RNA-Seq, ang. *RNA sequencing*).

Materiał mRNA został wyizolowany z komórek typu dzikiego i ETV1-KO z dwóch następujących po sobie pasażów jako dwa niezależne powtórzenia biologiczne. Następnie próbki poddane były analizie jakości. Próbkę mRNA uzyskały współczynnik integralności RNA (RIN, ang. *RNA integrity*) powyżej 9,0 i zostały użyte jako matryca do przygotowania bibliotek cDNA (ryc. 37).



Rycina 37. Analiza jakości mRNA wyizolowanego z komórek PSC typu dzikiego i ETV1-KO. A. Rozdział elektroforetyczny. **B.** Elektroforegramy próbek mRNA z ludzkich komórek PSC typu dzikiego i ETV1-KO

Uzyskane biblioteki cDNA poddane zostały analizie jakości, która wykazała, że wielkość uzyskanych bibliotek mieściła się w zakresie 200–1000 pz, z czego najwięcej produktów było długości 300 pz. Następnie biblioteki cDNA zostały sekwencjonowane z jednego końca (ang. *single-end sequencing*) z głębokością 10 milionów odczytów na próbkę (ryc. 38).

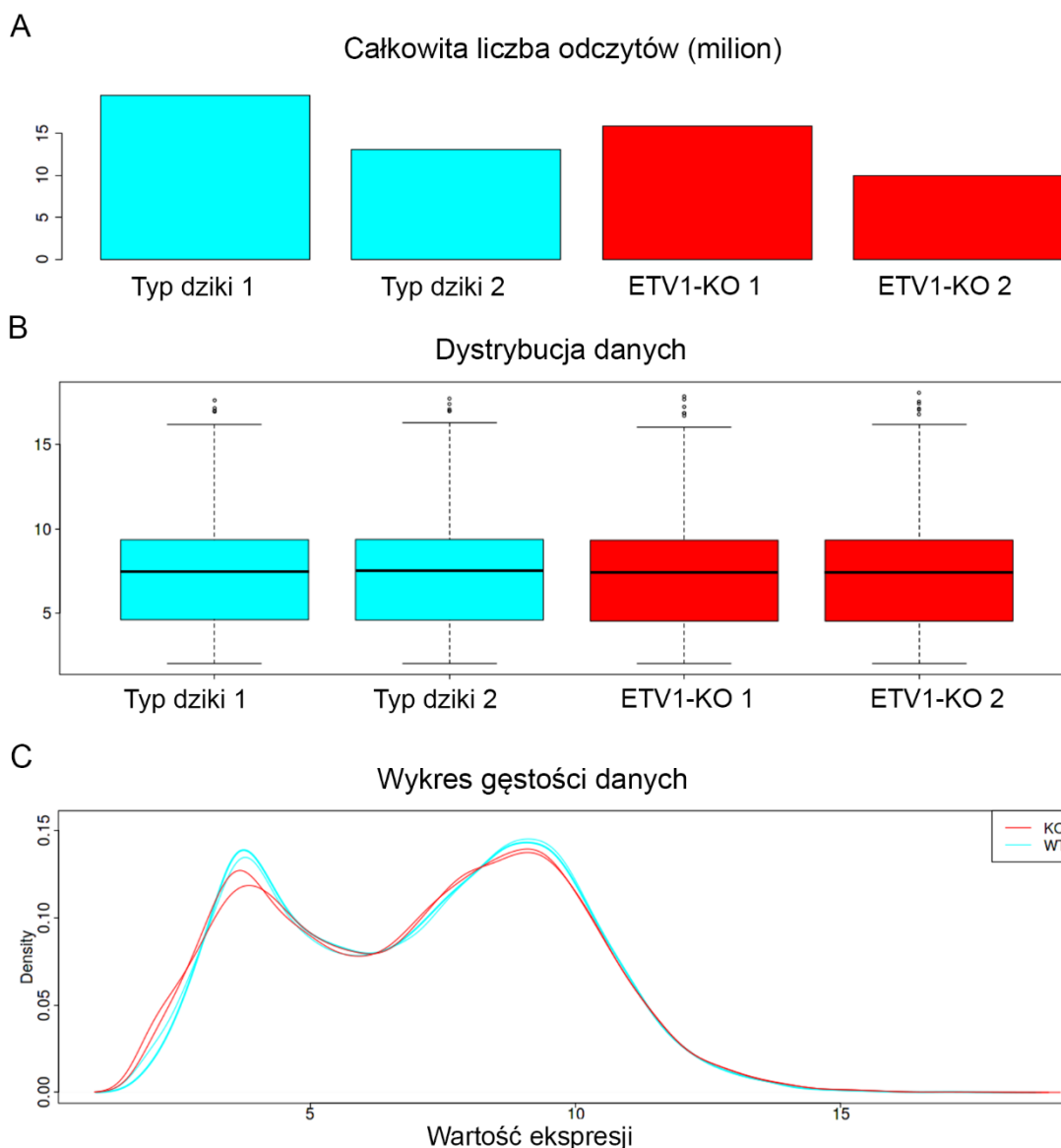


Rycina 38. Analiza jakości bibliotek cDNA uzyskanych na matrycy z mRNA z komórek typu dzikiego i ETV1-KO. A. Rozdział elektroforetyczny bibliotek cDNA. **B.** Elektroforegramy bibliotek cDNA z ludzkich komórek PSC typu dzikiego i ETV1-KO

Po otrzymaniu wstępnych danych z ekspresji w poszczególnych zbiorach danych wyniki RNA-Seq przeanalizowano w programie iDEP. Program ten umożliwia między innymi wygenerowanie graficznych raportów ze wstępnej analizy jakości bibliotek cDNA, wyodrębnienie listy genów o różnej ekspresji pomiędzy badanymi próbkami (dzięki

pakietowi z programu R DESeq2) czy wstępną analizę ontologii genów i ścieżek sygnałowych (dzięki połączeniu z bazą danych KEGG).

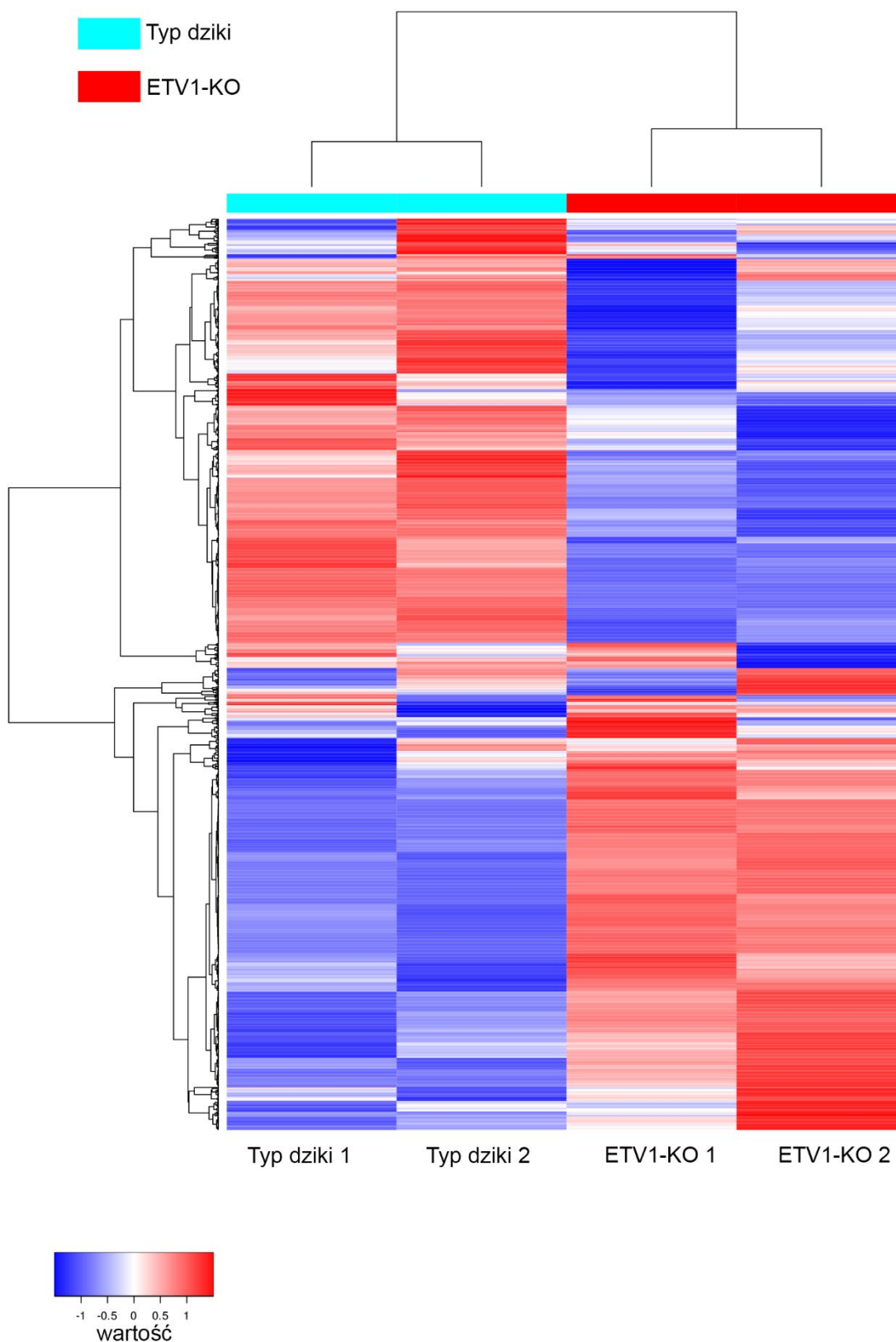
Program rozpoznał 18795 genów. Do transformacji odczytów zastosowano algorytm EdgeR: $\log_2(\text{CMP}+4)$. Wielkość poszczególnych bibliotek nieznacznie się różniła. Natomiast dystrybucja danych, porównująca całkowity poziom ekspresji pomiędzy badanymi próbkami oraz wykres gęstości danych były podobne pomiędzy grupami danych (ryc. 39).



Rycina 39. Wstępne przetwarzanie danych uzyskanych z eksperymentu RNA-Seq. **A.** Całkowita liczba odczytów w milionach odzwierciedla wielkość poszczególnych bibliotek. **B.** Dystrybucja danych względem wartości ekspresji. **C.** Wykres gęstości danych obrazujący rozłożenie danych względem wartości ekspresji

Hierarchiczne klastrowanie na podstawie 1000 najbardziej zróżnicowanych genów pomiędzy danymi wykazało minimalne różnice pomiędzy poszczególnymi powtórzeniami

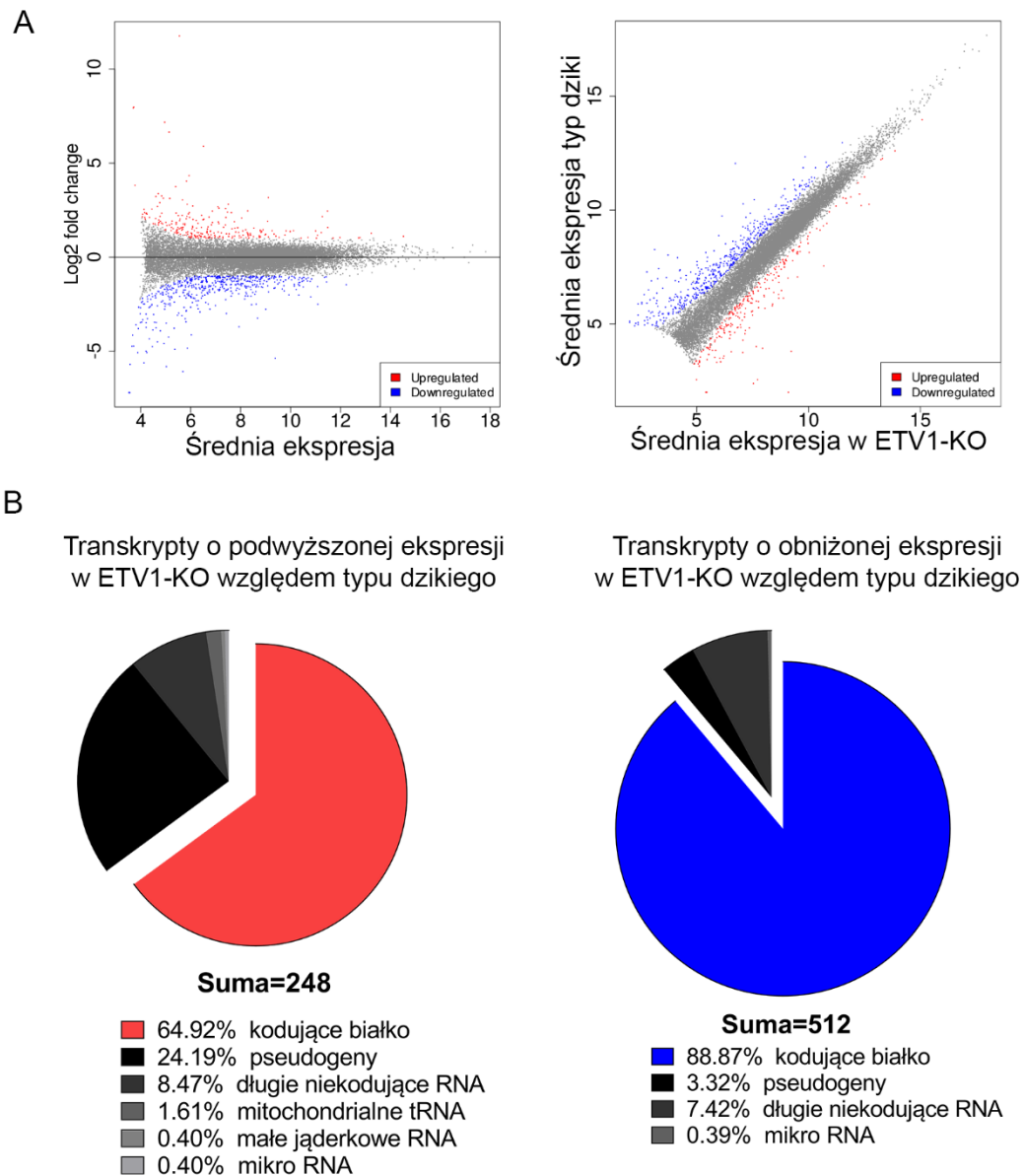
biologicznymi. Natomiast wykazano znaczne różnice w ekspresji wielu genów pomiędzy próbkami typu dzikiego a ETV1-KO (ryc. 40).



Rycina 40. Hierarchiczne klastrowanie 1000 genów o największej różnicy w ekspresji genów pomiędzy danymi z ludzkich komórek PSC typu dzikiego i ETV1-KO

Następnie używając pakietu DESeq2, przeprowadzono analizę różnicowej ekspresji genów. Stosując próg współczynnika fałszywych odkryć (FDR, ang. *false discovery rate*) < 0,05 i współczynnika zmiany między próbkami (FC, ang. *fold change*) ≥ 2 zidentyfikowano 248 i 512 transkryptów o odpowiednio wyższym lub niższym poziomie w ETV1-KO względem komórek PSC typu dzikiego (**ryc. 41A**).

Wśród 248 transkryptów o wyższym poziomie w ETV1-KO 64,92% (161) stanowiły transkrypty kodujące białko, które zostały wykorzystane do dalszych analiz. Natomiast, wśród 512 transkryptów o niższym poziomie w komórkach ETV1-KO 88,87% (455) to były transkrypty kodujące białko, które zostały wykorzystane do dalszych analiz (**ryc. 41B**).



Rycina 41. Analiza różnicowej ekspresji genów z użyciem DESeq2 zidentyfikowała transkrypty o podwyższonej lub obniżonej ekspresji w ETV1-KO względem komórek typu dzikiego. A. Wykres MA (po lewej) i wykres punktowy (po prawej). Czerwony (upregulated) – transkrypty o podwyższonej ekspresji; niebieski (downregulated) – transkrypty o obniżonej ekspresji. Log2 fold change – logarytm 2 z współczynnika zmiany **B.** Wykresy kołowe obrazujące kompozycję puli transkryptów o podwyższonej (po lewej) lub obniżonej ekspresji (po prawej) podzielonej ze względu na typ transkryptu

Następnie przeprowadzono analizy wzbogacenia terminów funkcjonalnych (GO:terms) odpowiadające lokalizacji białek w komórce (CC, ang. *cellular component*), procesom biologicznym (BP, ang. *biological processes*) oraz szlakom metabolicznym (KEGG), używając programów DAVID, PANTHER i GeneCodis.

Na podstawie analizy BP i KEGG transkryptów, których poziom wzrósł po wyłączeniu ekspresji *ETV1* w ludzkich PSC, wykazano wzbogacenie o 48 terminów funkcjonalnych istotnych statystycznie ($p < 0,01$). Zidentyfikowano 2 terminy funkcjonalne związane z adhezją komórek, między innymi adhezja fokalna ($p < 0,0001$) czy adhezja komórkowa

($p < 0,001$), w których grupowały się transkrypty takie jak, winkulina (VCL, ang. *vinculin*), integryna 5 α (ITGA5, ang. *integrin 5 α*), integryna 9 α (ITGA9, ang. *integrin 9 α*), paksyliina (PXN, ang. *paxillin*) czy lekki łańcuch miozyny 9 (MYL9, ang. *myosin light chain 9*). Zaobserwowano również wzbogacenie o 3 terminy funkcjonalne związane z budową i funkcją ECM: proteoglikany w nowotworach ($p < 0,001$), interakcja ECM–receptor ($p < 0,001$) i organizacja ECM ($p < 0,001$). Transkrypty wyróżnione w tych grupach to między innymi kolagen typu IV $\alpha 6$ (COL4A6, ang. *collagen type IV $\alpha 6$*), dezintegryna i metaloproteinaza z motywami trombospondyny 5 (ADAMTS5, ang. *disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5*), ITGA5 i ITGA9. Ponadto zidentyfikowano termin funkcjonalny odpowiadający regulacji cytoszkieletu aktynowemu ($p = 0,01$), do którego zaklasyfikowały się transkrypty takie jak, VCL, MYL9, ITGA5 i ITGA9. Kolejnym zaobserwowanym terminem funkcjonalnym, który może mieć związek z obserwowanym fenotypem komórek PSC ETV1-KO, jest sygnalizacja PI3K/AKT ($p = 0,01$). Do tej grupy należały transkrypty, np. karboksykinaza fosfoenolopirogronianowa 2 (PCK2, ang. *phosphoenolpyruvate carboxykinase 2*), ITGA5, ITGA9. Co ciekawe, zidentyfikowano 4 terminy funkcjonalne związane z funkcją wydzielniczą trzustki, a dokładniej sygnalizacją wapniową. Do tych terminów funkcjonalnych należały: wydzielanie z trzustki ($p = 0,002$), wydzielanie insuliny ($p = 0,006$), szlak sygnalizacyjny glukagonu ($p = 0,01$) oraz ścieżka sygnalizacyjna wapnia ($p = 0,002$). Natomiast transkrypty zaklasyfikowane w tych grupach, to np. 1,4,5-trifosforan inozytolu (ITPR3, ang. *inositol 1,4,5-trisphosphate*), receptor ryanodyny 2 (RYR2, ang. *ryanodine receptor 2*) i receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu β (PDGFR β , ang. *platelet-derived growth factor receptor β*) (**ryc. 42A**).

W przypadku analiz CC zaobserwowano, że wśród 20 najbardziej istotnych statystycznie terminów ($p < 0,01$) znalazły się terminy powiązane z ECM, takie jak ECM zawierający kolagen ($p < 0,0001$), ECM ($p < 0,0001$) lub ECM tkanki łącznej ($p < 0,0001$), błoną komórkową, np. sarkolemma, wierzchołkowa błona komórkowa czy podstawno-boczna błona komórkowa ($p < 0,0001$), oraz adhezją komórek, między innymi adhezja fokalna ($p < 0,0001$) czy połączenia komórka-komórka ($p = 0,001$). Z kolei przykładami transkryptów zaklasyfikowanych do powyższych grup są COL4A6, PXN, ITGA5, VCL i PDGFR β (**ryc. 42A**).

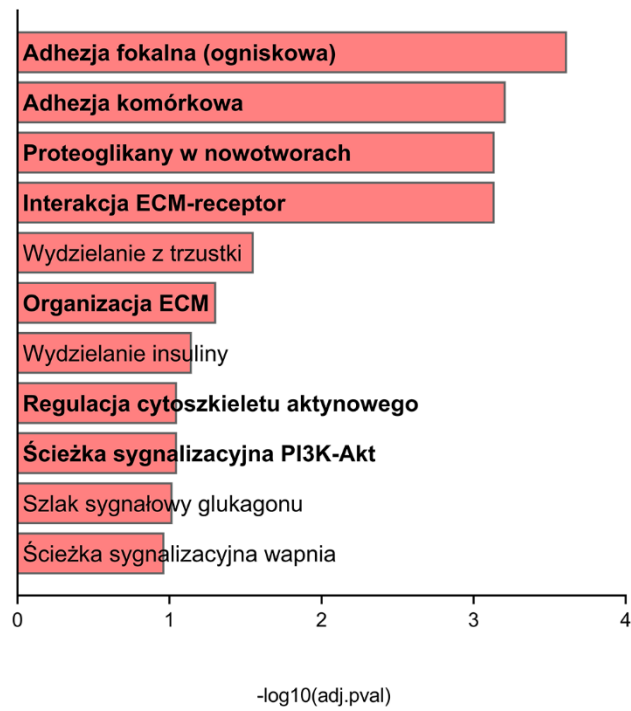
Podsumowując, analiza wyników z RNA-Seq potwierdza wcześniejsze obserwacje dotyczące lepszej przyczepności i przeżywalności komórek ETV1-KO podczas pasażu. Dodatkowo analiza szlaków sygnalizacji komórkowej KEGG ujawniła potencjalny

mechanizm stojący za fenotypem komórek ETV1-KO – wzbogacenie w transkrypty biorące udział w szlaku PI3K/AKT.

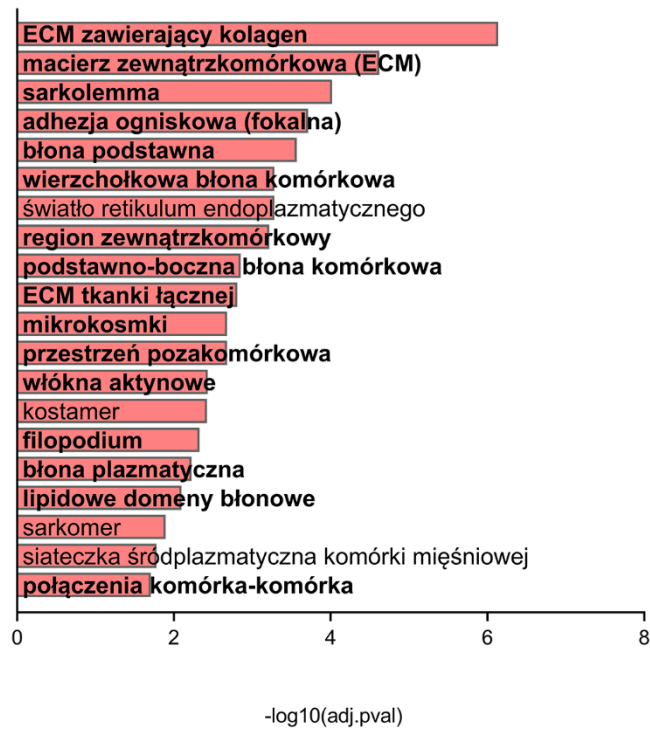
Transkrypty należące do wyselekcjonowanych grup terminów funkcjonalnych KEGG i BP związanych z adhezją wymienione są na mapie poziomym oraz w tabeli 3 (**ryc. 42B; tab. 3**). Natomiast transkrypty należące do wyselekcjonowanych grup terminów funkcjonalnych CC związanych z błoną komórkową i cytoszkieletem aktynowym wymienione są na mapie poziomym oraz w tabeli 3 (**ryc. 43; tab. 3**).

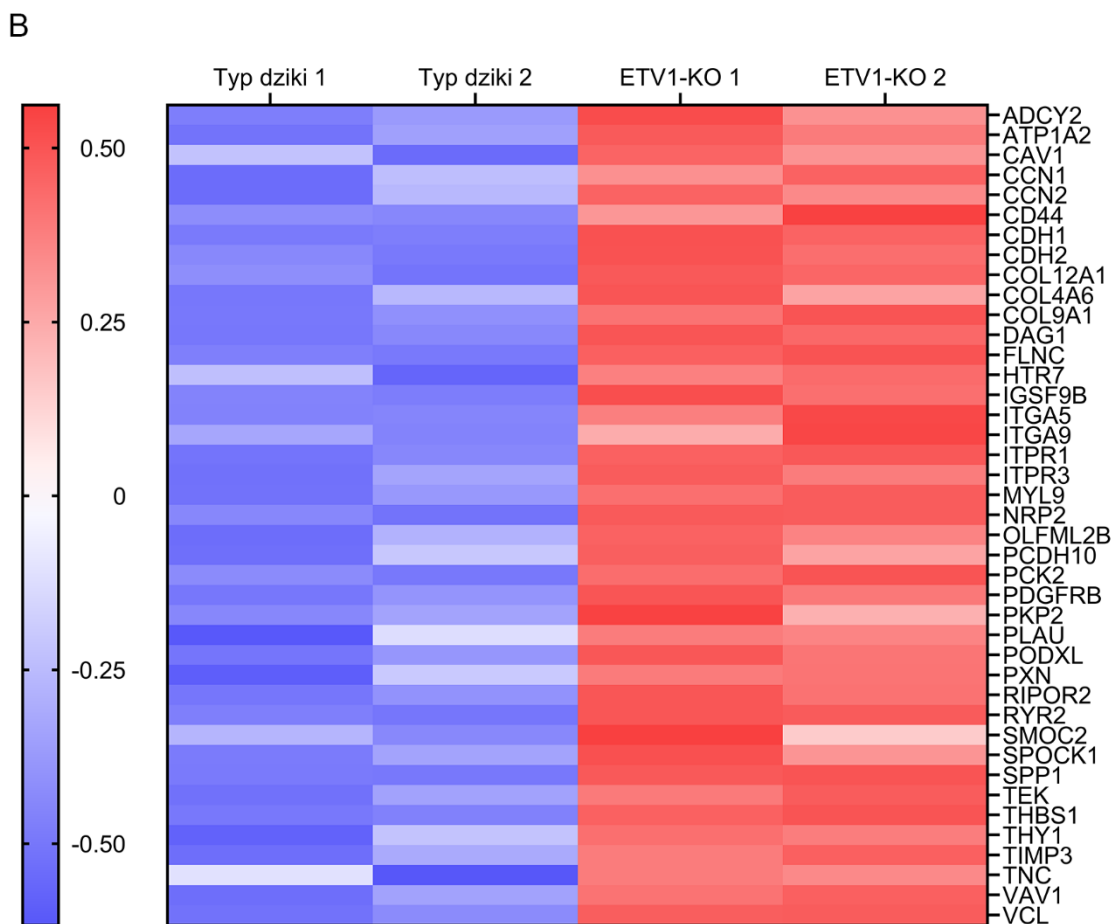
A

Analiza KEGG i BP

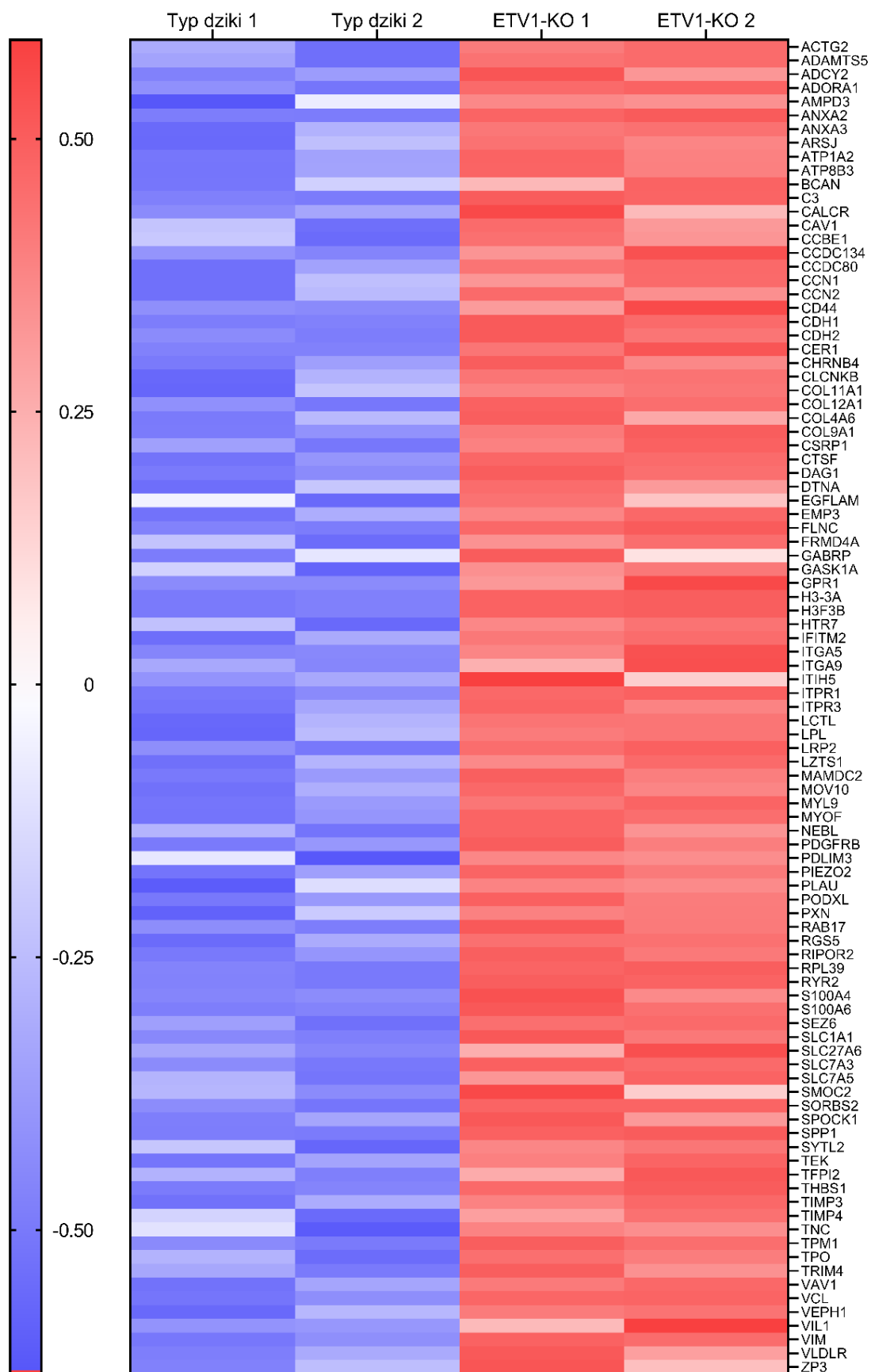


Analiza CC





Rycina 42. Transkrypty, których poziom był wyższy w ETV1-KO względem typu dzikiego. A. Analiza ścieżek metabolicznych (KEGG) i procesów biologicznych (BP) (po lewej) i analiza lokalizacji białek w komórce (CC) (po prawej). Na wykresie KEGG i BP przedstawiono wybrane interesujące terminy funkcjonalne, a pogrubiono te związane z adhezją i interakcją z ECM. Na wykresie CC przedstawiono 20 pierwszych terminów najbardziej istotnych statystycznie, a pogrubiono te związane z ECM, błoną komórkową i cytoszkieletem aktywnym, ponieważ odgrywają one rolę w przekazywaniu sygnałów i adhezji komórek. $-\log_{10}(\text{adj.pval})$ – ujemny logarytm10 ze skorygowanej wartości p. **B.** Mapa poziomu wybranych transkryptów, których poziom uległ podwyższeniu należących do terminów funkcjonalnych z KEGG i BP. Mapa znormalizowana metodą średniej normalizacji



Rycina 43. Mapa poziomu wybranych transkryptów, które uległy podwyższeniu w ETV1-KO, należących do terminów funkcjonalnych z CC związanych z ECM, błoną komórkową i cytoszkieletem aktynowym. Mapa znormalizowana metodą średniej normalizacji

Tabela 3. Wybrane terminy funkcjonalne wzbogacone w puli transkryptów, które uległy podwyższeniu w ETV1-KO względem typu dzięki. Terminy funkcjonalne związane są z adhezją, ECM, błoną komórkową oraz cytoszkieletem aktynowym. Terminy funkcjonalne ułożone według wartości p od najbardziej istotnych statystycznie

Termin funkcjonalny	Baza danych	ID adnotacji	Liczba znalezionych genów	Całkowita liczba genów w grupie	Wartość p	Skorygowana wartość p	Zidentyfikowane geny
ECM zawierający kolagen	CC	GO:0062020 3	17	379	2,56448E-09	7,26E-07	DAG1, COL12A1, TIMP3, COL11A1, CCN2, ZP3, S100A4, CTSF, SMOCC2, ADAMTS5, CCN1, ITH5, S100A6, TNC, ANXA2, CDH2, THBS1
Macierz zewnątrzkomórkowa (ECM)	CC	GO:003101 2	13	284	1,69116E-07	2,39E-05	TIMP3, COL11A1, CCN2, ZP3, EGFLAM, CCDC80, TFPI2, ADAMTS5, CCN1, BCAN, CCBE1, TIMP4, THBS1, COL4A6, COL9A1
Adhezja komórkowa	BP	GO:000715 5	17	661	5,21621E-07	0,000614991	COL12A1, IGSF9B, CCN2, SPOCK1, VCL, COL4A6, PODXL, NRP2, RIPOR2, PKP2, THY1, ITGA5, CCN1, PCDH10, CDH1, CDH2, PCDHGC3, THBS1
Adhezja fokalna (ogniskowa)	KEGG	hsa04510	11	201	1,23935E-06	0,000242912	SPPI, FLNC, PDGFRB, VCL, VAV1, MYL9, ITGA5, TNC, ITGA9, CAV1, THBS1
Adhezja ogniskowa (fokalna)	CC	GO:000592 5	14	423	2,72951E-06	0,000193113	VIM, DAG1, CSRPI, SORBS2, FLNC, PDGFRB, VCL, TEK, ITGA5, PLAU, TNC, CD44, CDH2, CAV1, PKN
Błona podstawna	CC	GO:000560 4	7	94	5,76106E-06	0,00027173	DAG1, TIMP3, EGFLAM, SMOCC2, CCDC80, TNC, ANXA2
Proteoglikany w nowotworach	KEGG	hsa05205	10	205	1,10316E-05	0,000727516	TIMP3, ITPR3, FLNC, VAV1, ITGA5, PLAU, CD44, ITPR1, CAV1, THBS1
Interakcja ECM-receptor	KEGG	hsa04512	7	88	1,11354E-05	0,000727516	DAG1, SPPI, ITGA5, TNC, CD44, ITGA9, THBS1
Wierchołkowa błona komórkowa	CC	GO:001632 4	12	361	1,39516E-05	0,000521975	SORBS2, SLC1A1, PDGFRB, LRP2, TEK, PODXL, SLC7A5, RIPOR2, RAB17, CD44, CDH2, CAV1
Region zewnątrzkomórkowy	CC	GO:000557 6	36	2422	1,91728E-05	0,000602877	DAG1, SPPI, COL12A1, AMPD3, TIMP3, H3-3A, COL11A1, H3F3B, ARSI, CCN2, SPOCK1, ZP3, VCL, CCDC134, S100A4, EGFLAM, TEK, LPL, SMOCC2, CCDC80, C3, TFPI2, ADAMTS5, CER1, CCN1, ITH5, S100A6, BCAN, PLAU, TNC, CCBE1, ANXA2, MAMDC2, TIMP4, THBS1, GASK1A
Podstawno-boczna błona komórkowa	CC	GO:001632 3	9	230	4,95951E-05	0,001403541	DAG1, TEK, SLC7A5, RAB17, CD44, ANXA2, CDH2, CAV1, ADORA1

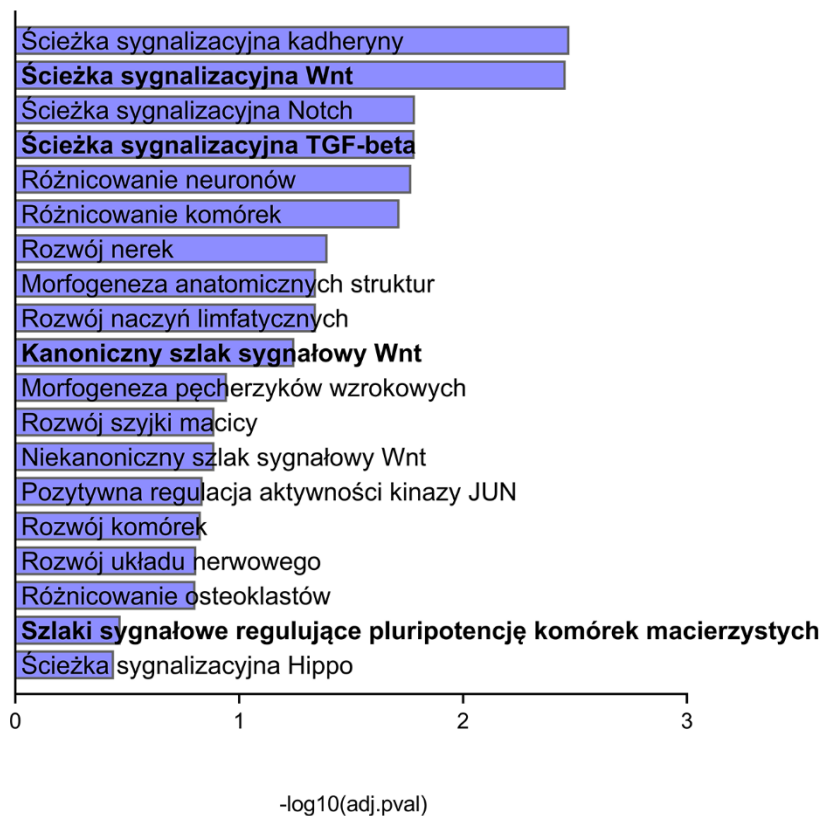
ECM tkanki łącznej	CC	GO:000561 4	3	11	6,03694E-05	0,00155314	EGFLAM, CCDC80, TNC
Mikrokosmki	CC	GO:000590 3	5	62	8,97805E-05	0,00210159	ITPR3, VCL, LRP2, LCTL, VIL1
Przestrzeń pozakomórkowa	CC	GO:000561 5	28	1803	9,65395E-05	0,00210159	DAG1, SPP1, COL12A1, VLDLR, TIMP3, RPL39, MOV10, COL11A1, ACTG2, TPO, CCN2, SPOCK1, ZP3, S100A4, CTSF, LPL, SMOG2, PODXL, C3, TFP12, ADAMTS5, CER1, PLAU, TNC, CCBE1, ANXA2, TIMP4, THBS1
Włókna aktywne	CC	GO:000172 5	5	72	0,00018310 9	0,003701418	TPM1, NEBL, TEK, PDLIM3, MYL9
Kostamer	CC	GO:004303 4	3	16	0,00019947 2	0,003763371	DAG1, FLNC, VCL
Filopodium	CC	GO:003017 5	5	78	0,00026677 9	0,004718657	DAG1, ACTG2, PODXL, R1POR2, VIL1
Błona plazmatyczna	CC	GO:000588 6	56	5098	0,00035802 6	0,005960073	VIM, DAG1, DTNA, VLDLR, SLC7A3, ATP8B3, ITPR3, ATP1A2, SORBS2, FLNC, GABRP, TPO, CCN2, SLC1A1, PDGFRB, TRIM4, RGS5, ZP3, VCL, HTR7, ADCY2, LRP2, SLC27A6, PIEZO2, LZTS1, TEK, CLCNKB, LPL, PODXL, C3, IFITM2, CALCR, RYR2, SLC7A5, R1POR2, MYOF, SYTL2, VEPHI, VAV1, SEZ6, CHRN4, GPR1, ITGA5, S100A6, ANXA3, PLAU, RAB17, CD44, ANXA2, CDH2, EMP3, ITPR1, ITGA9, CAV1, ADORA1, VIL1
Lipidowe domeny błonowe	CC	GO:004512 1	8	250	0,00051016 3	0,008020903	DAG1, SLC1A1, VCL, ADCY2, TEK, PODXL, ANXA2, CAV1
Organizacja ECM	BP	GO:003019 8	6	171	0,00063757 9	0,049279924	COL9A1, COL4A6, SMOG2, ITGA5, CCN1, OLFML2B
Połączenia komórka-komórka	CC	GO:000591 2	6	169	0,00152708 2	0,019643831	DAG1, FRMD4A, VCL, PDLIM3, ANXA2, CDH2
Wydzielanie z trzustki	KEGG	hsa04972	5	102	0,00200116 9	0,028016368	ITPR3, ATP1A2, ADCY2, RYR2, ITPR1
Wydzielanie insuliny	KEGG	hsa04911	4	86	0,00689170 4	0,071093364	ITPR3, ATP1A2, ADCY2, RYR2
Ścieżka sygnalizacyjna PI3K-AKT	KEGG	hsa04151	8	353	0,01214892 5	0,08921106	SPP1, PCK2, PDGFRB, TEK, ITGA5, TNC, ITGA9, THBS1

Regulacja cytoszkieletu aktynowego	KEGG	hsa04810	6	218	0,01228927 9	0,08921106	PDGFRB, VCL, VAV1, MYL9, ITGA5, ITGA9
Szlak sygnałowy glukagonu	KEGG	hsa04922	4	106	0,01413804 3	0,095553667	ITPR3, PCK2, ADCY2, ITPR1
Ścieżka sygnalizacyjna wapnia	KEGG	hsa04020	6	238	0,01825273	0,108138498	ITPR3, PDGFRB, HTR7, ADCY2, RYR2, ITPR1

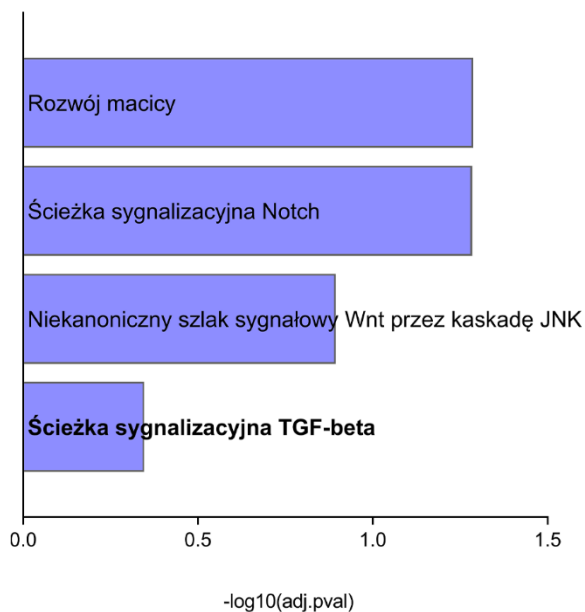
Analizy BP i KEGG transkryptów, których poziom obniżył się po wyłączeniu ekspresji *ETV1* w ludzkich PSC wykazały wzbogacenie o 391 terminów funkcjonalnych istotnych statystycznie ($p < 0,01$). Interesujące terminy funkcjonalne związane były ze ścieżkami sygnałowymi, które biorą udział w utrzymywaniu pluripotencji lub są kluczowe dla prawidłowego rozwoju embrionalnego, takie jak TGF β ($p < 0,0001$), WNT ($p < 0,0001$), Notch ($p < 0,0001$). Transkrypty zgrupowane do terminów funkcjonalnych związanych z utrzymywaniem pluripotencji to np. białko gruczolakowatej polipowatości okrężnicy 2 (APC2, ang. *adenomatous polyposis coli protein 2*), WNT5A czy KLF4. Ponadto zaobserwowano wzbogacenie w terminy funkcjonalne odpowiadające rozwojowi pochodnych ektodermy i mezodermy takie jak różnicowanie neuronów ($p < 0,0001$), rozwój naczyń limfatycznych ($p < 0,0001$), rozwój macicy ($p < 0,0001$), różnicowanie osteoklastów ($p = 0,003$) (**ryc. 44**). Przykłady transkryptów zaklasyfikowanych do wymienionych wyżej terminów funkcjonalnych to czynnik transkrypcyjny SRY-box 1 (SOX1, ang. *SRY-box transcription factor 2*), protokadheryna $\beta 2$ (PCDHB2, ang. *protocadherin $\beta 2$*) czy WNT5A. Wzbogacenie w wyżej wymienione terminy funkcjonalne sugeruje, że ludzkie komórki PSC po wyłączeniu ekspresji *ETV1* mogą wykazywać mniejszą pluripotencję w porównaniu z komórkami typu dzikiego. Dodatkowo ETV1-KO potencjalnie mogą mieć mniejsze zdolności do różnicowania w kierunku pochodnych mezodermy i ektodermy. Transkrypty należące do wyselekcjonowanych grup terminów funkcjonalnych KEGG i BP związanych z pluripotencją i różnicowaniem wymienione są na mapie ekspresji oraz w tabeli 4 (**ryc. 45; tab. 4**).

Co ciekawe, bazując na analizie CC, białka powstające na bazie transkryptów o obniżonym poziomie w ETV1-KO są w większości komponentami jądra komórkowego i chromatyny, w porównaniu do transkryptów o podwyższonym poziomie w ETV1-KO, które lokowały się w okolicach cytoszkieletu aktynowego, błony komórkowej i ECM.

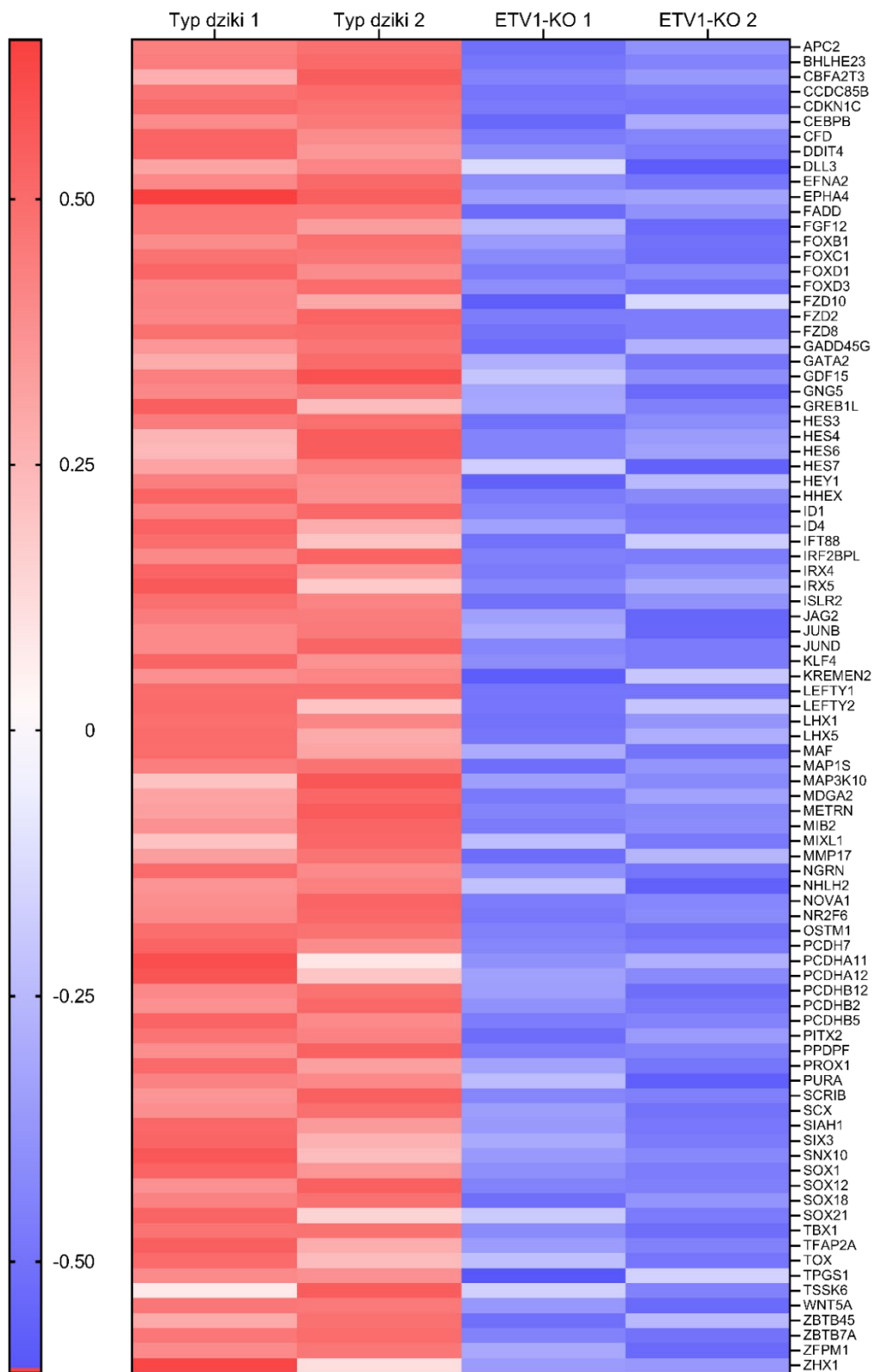
Analiza KEGG i BP



Analiza terminów funkcjonalnych w Panther



Rycina 44. Transkrypty, których poziom uległ obniżeniu w *ETV1-KO* względem typu dzikiego. Analiza ścieżek metabolicznych (KEGG) i procesów biologicznych (BP) (po lewej) i analiza terminów funkcjonalnych w programie Panther (po prawej). Na wykresach przedstawiono wybrane interesujące terminy funkcjonalne związane z utrzymywaniem pluripotencji (pogrubione) i różnicowaniem oraz embriogenezą. $-\log_{10}(\text{adj.pval})$ – ujemny logarytm10 ze skorygowanej wartości p



Rycina 45. Mapa poziomu wybranych transkryptów, które uległy obniżeniu w ETV1-KO należących do terminów funkcjonalnych z KEGG, BP i Panther związanych z pluripotencją komórek macierzystych i różnicowaniem. Mapa znormalizowana metodą średniej normalizacji

Tabela 4. Wybrane terminy funkcjonalne wzbogacone w puli transkryptów, które uległy obniżeniu w ETV1-KO względem typu dzikiego. Terminy funkcjonalne związane są z pluripotencją i różnicowaniem w kierunku pochodnych ektodermy i mezodermy. Terminy funkcjonalne ułożone według wartości p od najbardziej istotnych statystycznie

Termin funkcjonalny	Baza danych	ID adnotacji	Liczba znalezionych genów	Całkowita liczba genów w grupie	Wartość p	Skorygowana wartość p	Zidentyfikowane geny
Ścieżka sygnalizacyjna kadheryny	BP	GO:0030182	14	183	1,39E-05	0,003354545	LHX1, GATA2, IRX5, LHX5, CEBPB, NGRN, FZD8, BHLHE23, IRX4, DDIT4, FZD2, FZD10, WNT5A, ID1
Ścieżka sygnalizacyjna WNT	KEGG	hsa04550	11	143	1,65E-05	0,003481821	ID4, KLF4, LEFTY1, LHX5, APC2, FZD8, FZD2, FZD10, WNT5A, ID1, LEFTY2
Ścieżka sygnalizacyjna Notch	BP	GO:0030154	38	1013	7,63E-05	0,016407768	TPGS1, SCRIB, ZHX1, LHX1, GADD45G, ID4, SIAH1, PURA, SCX, HES4, TSSK6, SOX12, SOX18, KLF4, GATA2, CCDC85B, FOXD3, DLL3, SOX21, MIXL1, CEBPB, ZFPML1, METRN, HES6, NGRN, HHX, FOXCI, ZBTB7A, JAG2, FOXDI, SOX1, WNT5A, PPPDF, FOXBI, ID1, NR2F6, NHLH2, CBEA2T3
Ścieżka sygnalizacyjna TGFβ	BP	GO:0001822	11	139	8,51E-05	0,016470707	LHX1, CDKN1C, MMP17, GREBIL, FOXCI, PROX1, TFAP2A, FADD, FOXDI, WNT5A, IFT88
Różnicowanie neuronów	BP	GO:0009653	11	141	9,68E-05	0,017030564	LHX1, SIAH1, SOX12, SOX18, FOXD3, SOX21, PITX2, FOXCI, FOXDI, SOX1, FOXBI
Różnicowanie komórek	BP	GO:0001945	4	14	0,000119147	0,019222398	SOX18, FOXCI, PROX1, TBX1
Rozwój nerek	BP	GO:0060065	4	17	0,000270539	0,040289516	LHX1, CDKN1C, GREBIL, WNT5A
Morfogeneza anatomicznych struktur	BP	GO:0003404	2	2	0,000374748	0,045344478	SIX3, TFAP2A
Rozwój naczyń limfatycznych	BP	GO:0060067	2	2	0,000374748	0,045344478	LHX1, WNT5A
Rozwój macicy	Panther	P00012	10	153	0,000874899	0,051619028	PCDHB12, PCDHA11, FZD8, PCDHB2, FZD2, FZD10, WNT5A, PCDH7, PCDHA12, PCDHB5

Morfogeneza pęcherzyków wzrokowych	BP	GO:0035567	4	24	0,001085213	0,113082314	FZD8, FZD2, FZD10, WNT5A
Rozwój szyjki macicy	BP	GO:0007219	8	110	0,001356915	0,128958924	DLL3, CFD, FOXC1, HEY1, MIB2, JAG2, HES3, HES7
Niekanoniczny szlak sygnałowy WNT	BP	GO:0043507	5	43	0,001398831	0,128958924	FZD8, MAP3K10, EPHA4, FZD10, WNT5A
Ścieżka sygnalizacyjna Notch	Panther	P00057	14	294	0,001762321	0,05198846	SIAH1, PCDHB12, PCDHA11, APC2, FZD8, GNG5, PCDHB2, KREMEN2, FZD2, FZD10, WNT5A, PCDH7, PCDHA12, PCDHB5
Pozytywna regulacja aktywności kinazy JUN	BP	GO:0048468	4	30	0,002554356	0,145448043	IRX5, MAF, BHLHE23, IRX4
Rozwój komórek	BP	GO:0007399	21	552	0,002676699	0,148059704	LHX1, ZBTB45, FGF12, SIAH1, PURA, HES4, PCDHB12, METRN, HES6, PCDHA11, APC2, MDGA2, TOX, NOVA1, ISLR2, MAPIS, PCDHB2, EPHA4, SOX1, IRF2BPL, PCDHB5
Rozwój układu nerwowego	BP	GO:0030316	4	31	0,002888547	0,155339612	OSTM1, SNX10, EFNA2, JUNB
Różnicowanie osteoklastów	BP	GO:0038031	2	5	0,003605072	0,156781048	FZD10, WNT5A
Kanoniczny szlak sygnałowy WNT	BP	GO:0060070	6	74	0,004520891	0,056674761	KLF4, FZD8, FZD2, PCDHB12, PCDH7, PCDHB5
Niekanoniczny szlak sygnałowy WNT przez kaskadę JNK	Panther	P00045	4	40	0,008647777	0,127554705	HES4, DLL3, HEY1, JAG2

Szlaki sygnałowe regulujące pluripotencję komórek macierzystych	KEGG	hsa04390	7	157	0,012842095	0,338710243	SCRIB, APC2, FZD8, FZD2, FZD10, WNT5A, ID1
Ścieżka sygnalizacyjna Hippo	KEGG	hsa04350	5	94	0,017185777	0,362619889	ID4, LEFTY1, PITX2, ID1, LEFTY2
Sygnalizacja TGFβ	Panther	P00052	5	91	0,038156581	0,45024766	JUND, LEFTY1, GDF15, JUNB, LEFTY2

3.5.3. Poziom białek adhezyjnych w ludzkich komórkach PSC typu dzikiego i ETV1-KO

Z uwagi na fakt, że po wyłączeniu ekspresji ETV1 ludzkie PSC wykazywały większą konfluencję po pasażu, a wyniki z eksperymentu RNA-Seq potwierdziły wzbogacenie w terminy funkcjonalne związane z adhezją, porównano poziom białek adhezyjnych w komórkach ETV1-KO i typu dzikiego za pomocą barwienia fluorescencyjnego.

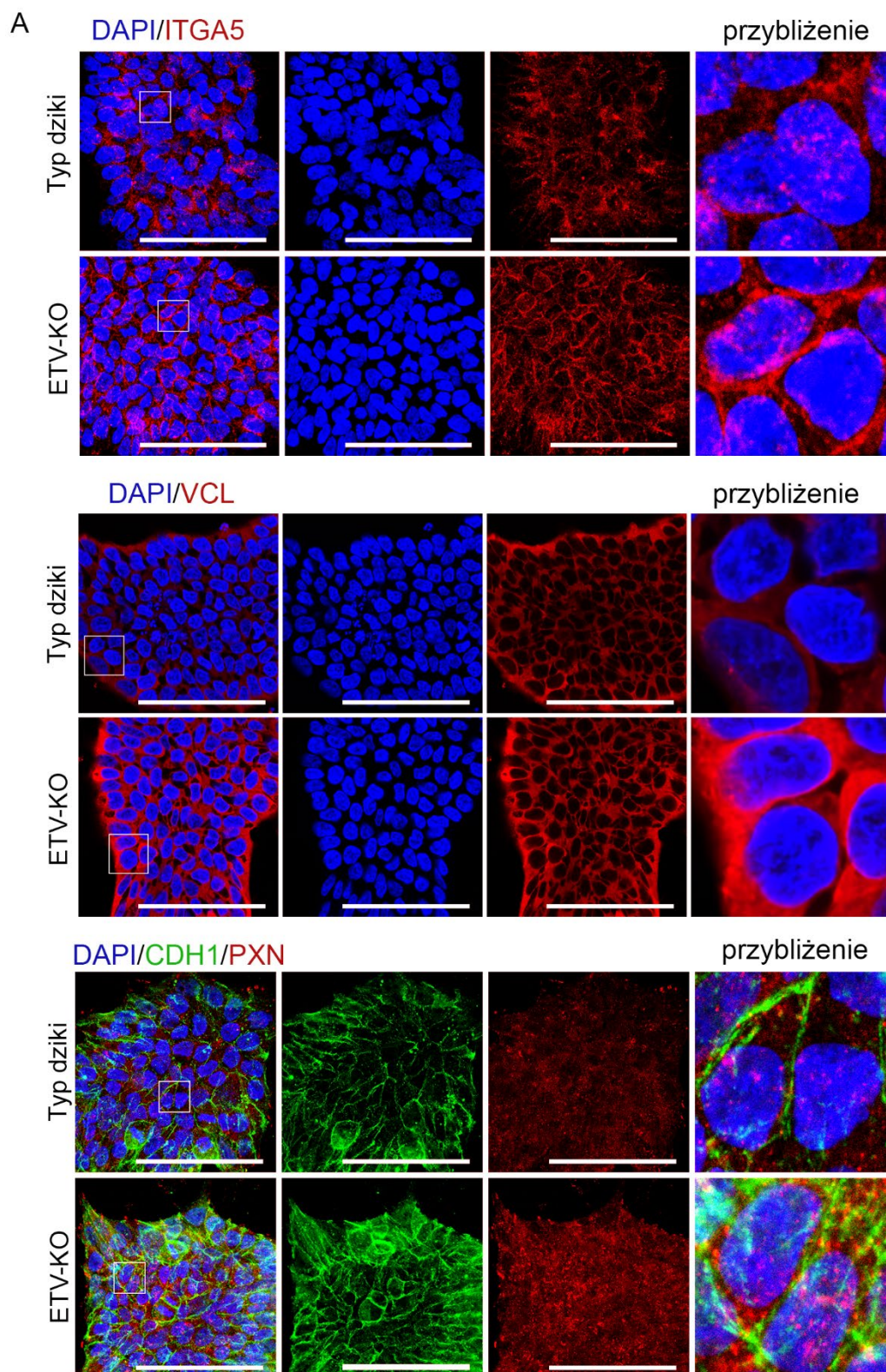
Z danych RNA-Seq wyselekcjonowano 4 kandydatów należących do terminów funkcjonalnych związanych z adhezją ogniskową (fokalną), interakcją komórka–ECM i adhezją komórkową i porównano poziom syntezy białka w komórkach ETV1-KO z poziomem w komórkach typu dzikiego.

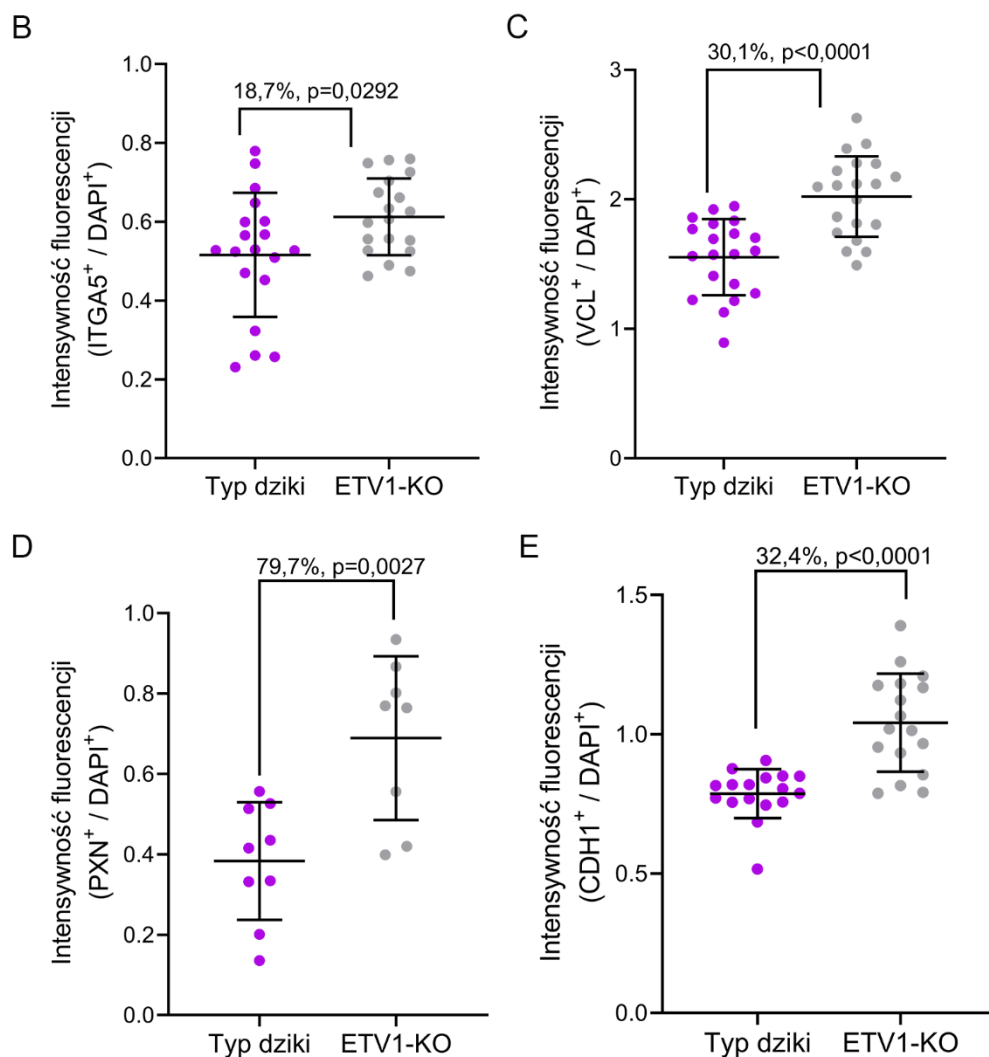
ITGA5 należy do rodziny białek integrzyn i pośredniczy w adhezji komórek do ECM. Wspólnie z integrzyną 1β tworzy receptor błonowy, którego ligandem jest zewnątrzkomórkowa fibronektyna (ang. *fibronectin*). Wewnątrz komórki receptory integrzynowe łączą się z białkiem taliną lub PXN, które z kolei wiążą się z VCL połączoną z cytoszkieletem aktynowym. Struktura stworzona z wyżej wymienionych białek nazywa się adhezją fokalną. Dodatkowo VCL może brać udział w adhezji komórka–komórka poprzez wiązanie z α - lub β -kateniną (ang. *α - or β -catenin*), co jest kluczowe dla stabilizacji białka CDH1 na powierzchni komórki. Białko CDH1 jest transmembranową glikoproteiną inicjującą adhezję komórka–komórka zależną od kadheryn.

Na podstawie pomiaru intensywności fluorescencji, w oparciu o które można określić poziom badanego białka, stwierdzono, że białka ITGA5, PXN, VCL oraz CDH1 wykazywały wyższy poziom w komórkach PSC ETV1-KO w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego. Największą różnicę zaobserwowano w poziomie białka PXN (o 79,7% więcej w ETV1-KO względem komórek typu dzikiego), a najmniejszą różnicę w przypadku białka ITGA5 (o 18,7% więcej w ETV1-KO względem komórek typu dzikiego). Poziom białek VCL i CDH1 był podwyższony w ETV1-KO w porównaniu do komórek typu dzikiego na podobnym poziomie, a różnica wynosiła odpowiednio 30,1% i 32,4% (ryc. 46). Z kolei, bazując na danych RNA-Seq, na poziomie mRNA zaobserwowano, że poziom transkryptu PXN był wyższy o 2,6 razy ($p < 0,01$) w komórkach PSC ETV1-KO w porównaniu do typu dzikiego. Poziom transkryptu VCL i ITGA5 był odpowiednio o 2,4 ($p < 0,001$) i 2,1 ($p < 0,001$) razy wyższy w komórkach PSC ETV1-KO względem typu dzikiego. Wyniki te korelują z wynikami z pomiarów intensywności fluorescencji. Natomiast poziom mRNA

CDH1 nie wykazywał istotnej statystycznie różnicy ($p=0,85$) pomiędzy komórkami PSC ETV1-KO i typu dzikiego.

Podsumowując, wyższy poziom mRNA (z wyjątkiem CDH1) oraz większa synteza białek adhezyjnych w komórkach PSC ETV1-KO względem typu dzikiego, wskazuje na wyższą adhezję po wyłączeniu ekspresji *ETV1* w ludzkich PSC.





Rycina 46. Białka adhezyjne w komórkach *ETV1-KO* i typu dzikiego. A. Reprezentatywne barwienia immunofluorescencyjne wybranych białek adhezyjnych. Jądra komórkowe wybarwione są DAPI (niebieski). Skala = 50 μ m. Ze zdjęć wyliczono intensywność fluorescencji dla białek ITGA5 (**B**), VCL (**C**), PXN (**D**) i CDH1 (**E**) i znormalizowano do intensywności fluorescencji DAPI. Statystyka: wartość p obliczono testem t-Studenta; n \geq 8 zdjęć z 3 powtórzeń biologicznych

3.5.4. Podwyższona ekspresja *ETV1* w ludzkich komórkach PSC

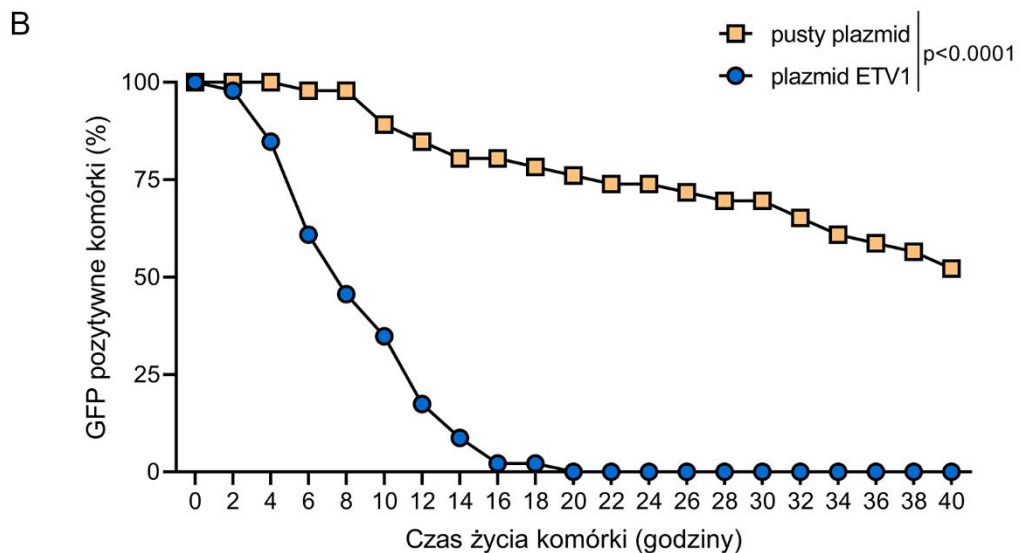
Następnie, aby udowodnić, że przyczyną zaobserwowanych zmian w adhezji i ścieżkach sygnałowych było wyłączenie ekspresji *ETV1* w komórkach Hues8-iCas9 typu dzikiego wywołano tymczasową podwyższoną ekspresję *ETV1*.

W tym celu do plazmidu pEGFP-F1-FLAG wklonowano cDNA *ETV1* pod promotorem CMV (plazmid *ETV1*). Plazmid dostarczony był do komórek na drodze lipofekcji. Kontrolę stanowił plazmid bez cDNA *ETV1* (pusty plazmid).

24 godziny po transfekcji zaobserwowano komórki pozytywne na białko zielonej fluorescencji (GFP; ang. *green fluorescent protein*) w przypadku transfekcji pustym

plazmidem, natomiast nie zaobserwowano komórek GFP pozytywnych po transfekcji plazmidem z ETV1. Aby obserwować transfekowane komórki w 2-godzinnych interwałach, zaczynając od momentu dostarczenia plazmidów do komórek, użyto systemu do obrazowania żywych komórek IncuCyte. Co ciekawe, już po 4 godzinach od lipofekcji zaobserwowano komórki pozytywne na GFP w przypadku komórek transfekowanych plazmidem ETV1. Jednakże na skutek śmierci lub odzepienia od podłoża hodowlanego żadna z nich nie była wykrywalna 24 godziny od dostarczenia plazmidu. Warto zauważyć, że komórki transfekowane plazmidem ETV1 wykazywały sygnał GFP tylko w jądrze komórkowym w porównaniu do komórek z pustym plazmidem. Jest to ważne, ponieważ potwierdza, że plazmid ETV1 zadziałał prawidłowo w komórce, prowadząc do podwyższonej ekspresji *ETV1* w miejscu, w którym ten czynnik transkrypcyjny naturalnie pełni swoją funkcję. Ponadto nie zaobserwowano komórki transfekowanej plazmidem ETV1, która przestałaby wykazywać fluorescencję GFP i nadal była przyczepiona do podłoża. W związku z tym określono czas życia i świecenia zarówno komórek z pustym plazmidem jak i z plazmidem ETV1. Na tej podstawie stwierdzono, że komórki transfekowane pustym plazmidem przeżywały dłużej niż komórki z plazmidem ETV1. Przykładowo po 8 godzinach od transfekcji ponad 50% komórek z podwyższoną ekspresją ETV1 było martwych lub odzepionych w porównaniu do komórek transfekowanych pustym plazmidem, spośród których nadal było żywych 100% (ryc. 47).

W związku z powyższym niemożliwe było dokładniejsze zbadanie wpływu podwyższonej ekspresji ETV1 w ludzkich PSC.

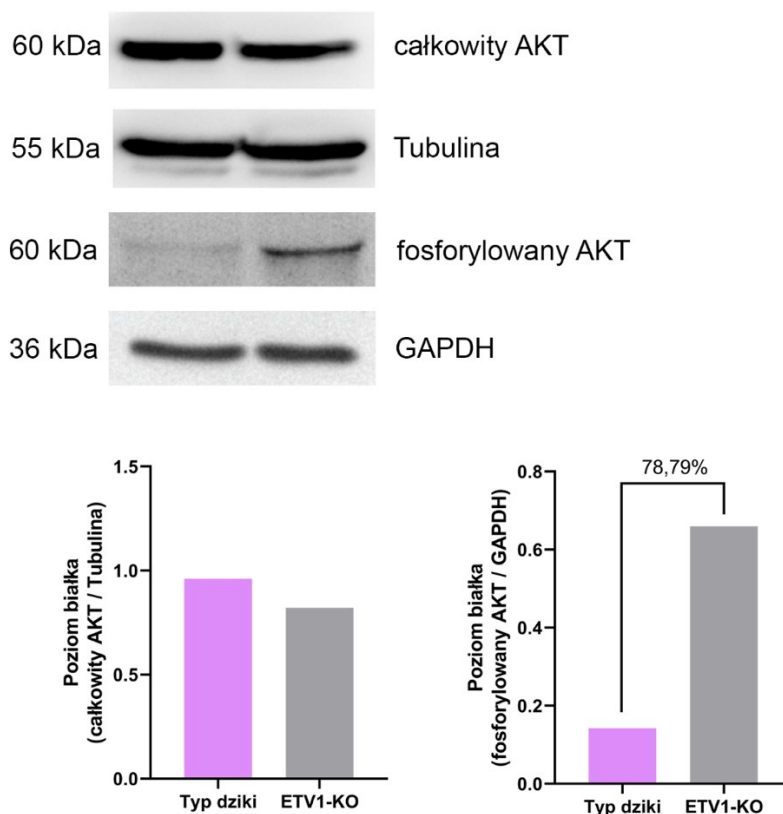


Rycina 47. Podwyższona ekspresja ETV1 w ludzkich PSC typu dzikiego. **A.** Zdjęcia komórek Hues8-iCas9 transfekowanych plazmidem wywołującym podwyższoną ekspresję *ETV1* (plazmid ETV1) i plazmidem kontrolnym (pusty plazmid). Po 8 godzinach komórka z plazmidem ETV1 odzepia się od podłoża, podczas gdy komórki z pustym plazmidem nadal są przyłączone przez kolejne co najmniej 20 godzin. **B.** Wykres pokazujący czas życia komórek transfekowanych plazmidem ETV1 i plazmidem kontrolnym. Statystyka: test t-Studenta dla prób zależnych, n=2 powtórzenia biologiczne

3.5.5. Modulacja ścieżki sygnalizacyjnej PI3K/AKT w ludzkich komórkach PSC typu dzikiego i ETV1-KO

W celu potwierdzenia mechanizmu molekularnego, przez który ETV1 może regulować adhezję ludzkich PSC, modulowano ścieżkę sygnalizacyjną PI3K/AKT poprzez inhibicję lub aktywację tego szlaku. W analizie eksperymentu RNA-Seq geny wchodzące w tę ścieżkę lub ją regulujące, takie jak ITGA5, ITGA9 lub PCK2, wykazywały podwyższoną ekspresję w komórkach ETV1-KO. Ponadto powszechnie wiadomo, że ścieżka ta jest zaangażowana w regulację adhezji i przeżywalności wielu typów komórek, w tym ludzkich PSC.

Najpierw w celu potwierdzenia podwyższonej aktywacji ścieżki PI3K/AKT wykonano western blot z przeciwciałami skierowanymi na kinazę AKT (całkowity AKT) oraz jej aktywowaną formę (fosforylowany AKT w 473 serynie). Podczas gdy całkowity poziom białka AKT nie był zmieniony w komórkach ETV1-KO względem komórek typu dzikiego, poziom fosforylowanego białka AKT był podwyższony o 78,79% w komórkach ETV1-KO. Sugeruje to aktywację sygnalizacji PI3K/AKT w komórkach po wyłączeniu ekspresji *ETV1* (ryc. 48).



Rycina 48. Porównanie poziomu fosforylowanego białka AKT i całkowitego białka AKT w komórkach typu dzikiego i ETV1-KO. Górny panel przedstawia membrany wybarwione odpowiednimi przeciwciałami. Dolny panel reprezentuje poziom białek wyliczony z intensywności prążków na membranie znormalizowane do intensywności prążka odpowiadającego kontroli (tubulinie lub GAPDH). Z wykorzystaniem oprogramowania ImageJ wyliczono intensywność prążków z membrany, n=1 powtórzenie biologiczne

W związku z powyższym, modulowano ścieżkę PI3K/AKT z użyciem inhibitorów (PI-103 i Torin2) i aktywatora (INS) zarówno w komórkach PSC typu dzikiego, jak i ETV1-KO. W tym celu badane komórki posiane były w takiej samej gęstości początkowej ($2,5 \times 10^4$ komórek/cm² dołka hodowlanego) w medium z dodatkiem inhibitora lub aktywatora. Stężenie modulatorów wybrano według zaleceń producenta oraz na podstawie przeprowadzonego wstępnego eksperymentu mającego na celu ustalenie odpowiedniego stężenia modulatorów. Kontrolę stanowiły komórki PSC typu dzikiego i ETV1-KO posiane w medium z dodatkiem odpowiedniej objętości DMSO (1,5 μ l/0,5 ml pożywki), w którym rozcieńczone były modulatory, lub w pożywce hodowlanej bez dodatku modulatorów.

W celu ustalenia odpowiednich stężeń modulatorów ścieżki PI3K/AKT przetestowano trzy różne stężenia dla każdego modulatora. Dla inhibitorów, PI-103 i Torin2, sprawdzono odpowiednio 5 nM, 15 nM i 30 nM oraz 5 nM, 15 nM i 200 nM. Dla aktywatora, insuliny, przetestowano stężenia 0,03 μ g/ml, 0,3 μ g/ml i 3 μ g/ml. 24 godziny po pasażu komórek PSC typu dzikiego i ETV1-KO z modulatorami przeprowadzono barwienia fioletem krystalicznym i wyniki absorbancji przyrównano do krzywej wzorcowej (opisanej w podrozdziale 6.5 niniejszej rozprawy). Zaobserwowano, że zmiany w konfluencji zależne były od stężenia modulatora.

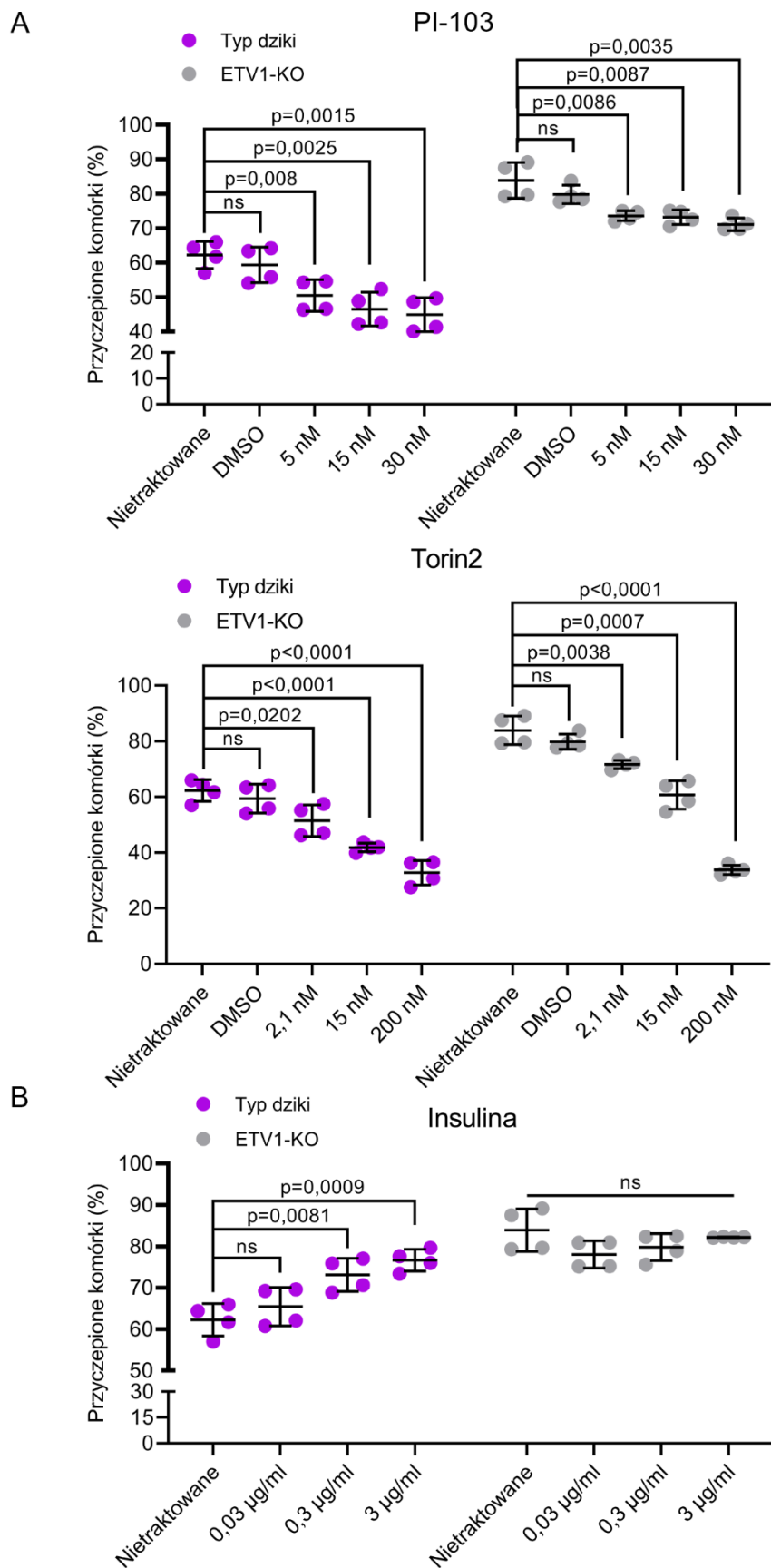
Po pierwsze, podczas pasażu, bez dodania do pożywki hodowlanej inhibitora lub aktywatora ścieżki PI3K/AKT, na podłoże hodowlane Geltrex przyczepiło się średnio 62,26% pasażowanych komórek typu dzikiego, a w przypadku komórek ETV1-KO średnio 83,91%. Wyniki te potwierdzają większą przyczepność komórek ETV1-KO, opisaną w podrozdziale 3.5.1 niniejszej rozprawy.

Po drugie, inhibicja ścieżki PI3K/AKT przez cząsteczkę PI-103 istotnie statystycznie obniżyła frakcję przyczepionych komórek typu dzikiego oraz ETV1-KO we wszystkich zastosowanych stężeniach (5 nM, 15 nM, 30 nM), w porównaniu do nietraktowanych komórek kontrolnych. Podobnie po zastosowaniu cząsteczki Torin2, zarówno komórki typu dzikiego jak i ETV1-KO wykazywały niższy procent przyczepionych komórek względem komórek kontrolnych we wszystkich badanych stężeniach (2,1 nM, 15 nM, 200 nM) (**ryc. 49A**).

Ponadto, obniżenie aktywności ścieżki PI3K/AKT z użyciem 15 nM stężenia Torin2 w ETV1-KO spowodowało, że procent komórek ETV1-KO, które przyczepiły się po pasażu nie różnił się od procentu przyczepionych komórek typu dzikiego nietraktowanych

inhibitorami. Na podstawie tej obserwacji można sugerować, że obniżenie aktywności ścieżki PI3K/AKT w komórkach ETV1-KO spowodowało, że powróciły one do fenotypu komórek typu dzikiego.

Z kolei aktywacja szlaku PI3K/AKT z zastosowaniem INS istotnie statystycznie zwiększyła procent przyczepionych komórek typu dzikiego w dwóch badanych stężeniach (0,3 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$) w porównaniu do komórek nietraktowanych. Warto zauważyć, że zastosowanie stężenia 3 $\mu\text{g/ml}$ INS zwiększyło frakcję przyczepionych komórek typu dzikiego prawie do poziomu komórek ETV1-KO. Natomiast użycie INS podczas pasażu komórek ETV1-KO nie wpłynęło na przyczepność komórek w porównaniu do komórek nie traktowanych. Sugeruje to, że wyłączenie ekspresji ETV1 podniosło poziom aktywności ścieżki PI3K/AKT do maksymalnego poziomu (**ryc. 49B**).



Rycina 49. Modulacja ścieżki PI3K/AKT w komórkach PSC typu dzikiego i ETV1-KO. A. Inhibicja szlaku PI3K/AKT. **B.** Aktywacja szlaku PI3K/AKT. Absorbancję uwolnionego barwnika po lizie komórek PSC zmierzono za pomocą spektrofotometru i przyrównano do krzywej wzorcowej. Odsetek przyczepionych komórek obliczono normalizując liczbę przyczepionych komórek do liczby komórek posianych na dołek. Do analizy statystycznej zastosowano test t-Studenta; n=4 powtórzenia biologiczne

Porównanie statystyczne z wartościami p podano w tabeli 5.

Tabela 5. Porównanie statystyczne komórek nietraktowanych typu dzikiego i ETV1-KO względem traktowanych inhibitorami lub aktywatorami ścieżki PI3K/AKT. Wartości p wyliczone testem t-Studenta

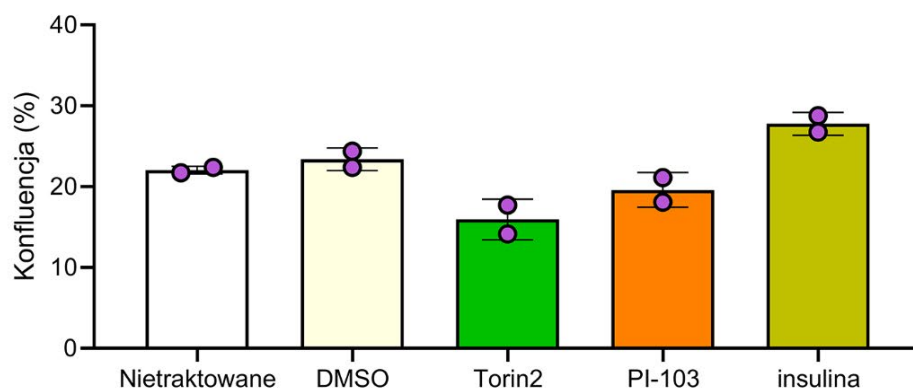
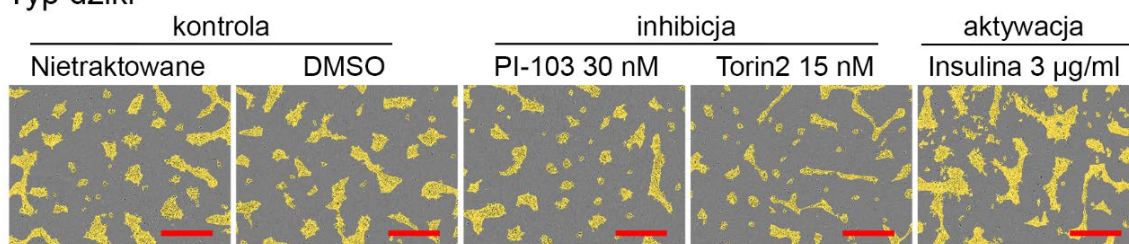
Porównanie t-test	Wartość p
Nietraktowane typ dziki : DMSO typ dziki	0,4081
Nietraktowane typ dziki : PI-103 5 nM typ dziki	0,008
Nietraktowane typ dziki : PI-103 15 nM typ dziki	0,0025
Nietraktowane typ dziki : PI-103 30 nM typ dziki	0,0015
Nietraktowane typ dziki : Torin2 2,1 nM typ dziki	0,0202
Nietraktowane typ dziki : Torin2 15 nM typ dziki	<0,0001
Nietraktowane typ dziki : Torin2 200 nM typ dziki	<0,0001
Nietraktowane typ dziki : INS 0,03 µg/ml typ dziki	0,3372
Nietraktowane typ dziki : INS 0,3 µg/ml typ dziki	0,0081
Nietraktowane typ dziki : INS 3 µg/ml typ dziki	0,0009
Nietraktowane ETV1-KO : DMSO ETV1-KO	0,209
Nietraktowane ETV1-KO : PI-103 5 nM ETV1-KO	0,0086
Nietraktowane ETV1-KO : PI-103 15 nM ETV1-KO	0,0087
Nietraktowane ETV1-KO : PI-103 30 nM ETV1-KO	0,0035
Nietraktowane ETV1-KO : Torin2 2,1 nM ETV1-KO	0,0038
Nietraktowane ETV1-KO : Torin2 15 nM ETV1-KO	0,0007
Nietraktowane ETV1-KO : Torin2 200 nM ETV1-KO	<0,0001
Nietraktowane ETV1-KO : INS 0,03 µg/ml ETV1-KO	0,1032
Nietraktowane ETV1-KO : INS 0,3 µg/ml ETV1-KO	0,2271
Nietraktowane ETV1-KO : INS 3 µg/ml ETV1-KO	0,5287
Nietraktowane typ dziki : Nietraktowane ETV1-KO	0,0005
Nietraktowane typ dziki : DMSO ETV1-KO	0,0003
Nietraktowane typ dziki : PI-103 5 nM ETV1-KO	0,0016
Nietraktowane typ dziki : PI-103 15 nM ETV1-KO	0,0026
Nietraktowane typ dziki : PI-103 30 nM ETV1-KO	0,0063
Nietraktowane typ dziki : Torin2 2,1 nM ETV1-KO	0,0043
Nietraktowane typ dziki : Torin2 15 nM ETV1-KO	0,6414
Nietraktowane typ dziki : Torin2 200 nM ETV1-KO	<0,0001
Nietraktowane ETV1-KO : INS 0,03 µg/ml typ dziki	0,0018
Nietraktowane ETV1-KO : INS 0,3 µg/ml typ dziki	0,0162
Nietraktowane ETV1-KO : INS 3 µg/ml typ dziki	0,0463

W dalszej kolejności, w celu potwierdzenia niezależną metodą badawczą wyżej opisanych wyników modulacji ścieżki PI3K/AKT w komórkach PSC typu dzikiego i ETV1-KO badane komórki posiano w pożywce zawierającej 30 nM PI-103, 15 nM Torin2 lub 3 µg/ml INS. Komórki monitorowano przez 24 godziny z interwałem 2-godzinnym dzięki systemowi do obrazowania żywych komórek IncuCyte i porównywano konfluencję osiągniętą przez badane komórki 24 godziny po pasażu.

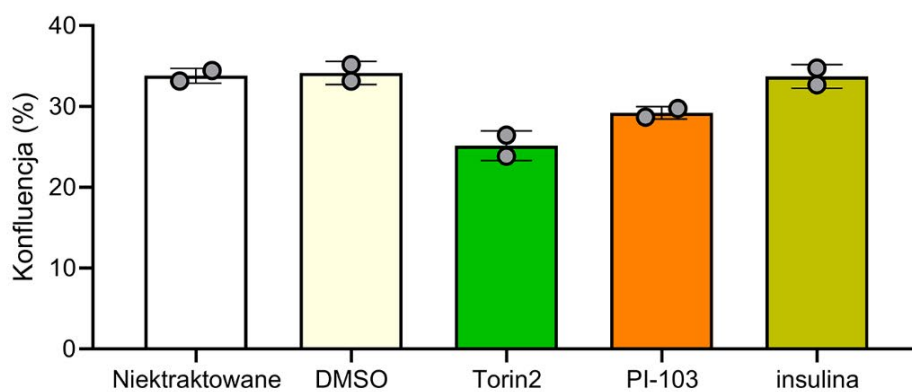
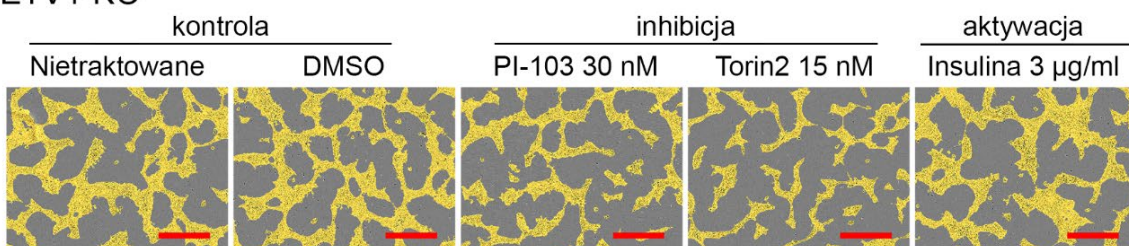
Następnego dnia, zaobserwowano zmniejszoną konfluencję komórek ETV1-KO i typu dzikiego traktowanych inhibitorami ścieżki PI3K/AKT w porównaniu do kontroli. W przypadku dodania INS, zwiększoną konfluencję wykazywały komórki typu dzikiego w porównaniu do komórek kontrolnych. Natomiast komórki ETV1-KO traktowane INS nie osiągnęły większej konfluencji w porównaniu do komórek kontrolnych. Obserwacja ta sugeruje, że wyłączenie ekspresji ETV1 w ludzkich PSC maksymalnie podwyższyło poziom aktywacji ścieżki PI3K/AKT (**ryc. 50**).

Na podstawie tych wyników można potwierdzić, że adhezja ludzkich komórek PSC regulowana jest przez ścieżkę PI3K/AKT. Dodatkowo czynnik transkrypcyjny ETV1 może regulować aktywność ścieżki PI3K/AKT, prowadząc do modulacji adhezji komórek PSC. Wynika to z faktu, że w komórkach ETV1-KO po inhibicji szlaku PI3K/AKT zaobserwowano mniejszy procent przyczepionych komórek sugerując, że po wyłączeniu ekspresji *ETV1* na przyczepność komórek nie wpłynął inny mechanizm molekularny.

Typ dziki



ETV1-KO



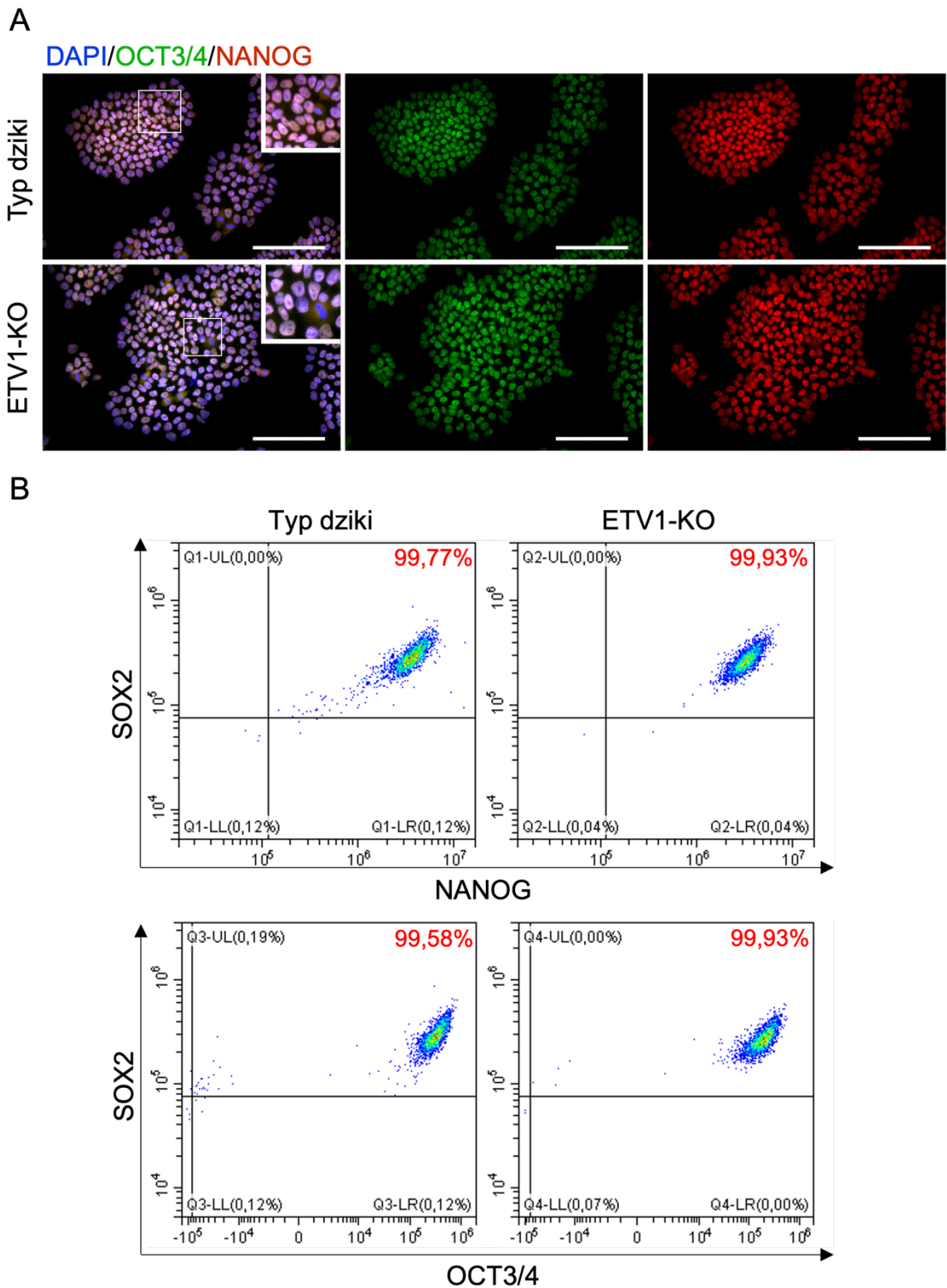
Rycina 50. Modulacja szlaku PI3K/AKT w komórkach PSC typu dzikiego (górny panel) i ETV1-KO (dolny panel). Zdjęcia i analiza przeprowadzona za pomocą systemu do obrazowania żywych komórek IncuCyte. Konfluencję (%) obliczono automatycznie wykorzystując oprogramowanie IncuCyte. Skala = 400 µm; n=2 powtórzenia biologiczne

3.5.6. Badanie pluripotencji w ludzkich komórkach PSC typu dzikiego i ETV1-KO

Jako że analiza RNA-Seq wykazała obniżenie poziomu aktywności ścieżek sygnalizacyjnych zaangażowanych w utrzymywanie pluripotencji, takich jak sygnalizacja TGF β czy sygnalizacja WNT, porównano poziom podstawowych markerowych białek pluripotencjalnych w ludzkich komórkach PSC typu dzikiego oraz ETV1-KO za pomocą barwienia immunofluorescencyjnego oraz cytometrii przepływowej.

Na podstawie barwienia immunofluorescencyjnego stwierdzono, że synteza białek markerowych dla pluripotencji OCT3/4 oraz NANOG zachodziła zarówno w komórkach PSC typu dzikiego jak i ETV1-KO (**ryc. 51A**). Dodatkowo, analiza z cytometru przepływowego z wykorzystaniem przeciwciał przeciwko białkom markerowym OCT3/4, SOX2 i NANOG wykazała, że w przypadku komórek PSC typu dzikiego 99,77% komórek wykazuje równoczesną syntezę białek SOX2 i NANOG, a 99,58% komórek PSC typu dzikiego wykazuje równoczesną syntezę białek SOX2 i OCT3/4. Natomiast w komórkach PSC ETV1-KO 99,93% komórek wykazywało równoczesną syntezę białek SOX2 i NANOG oraz 99,93% komórek wykazywało równoczesną syntezę białek SOX2 i OCT3/4 (**ryc. 51B**).

Na podstawie powyższych wyników można wnioskować, że obecność ekspresji i syntezy podstawowych markerów pluripotencji aktywowanej nie różni się pomiędzy ludzkimi komórkami PSC typu dzikiego oraz ETV1-KO. Należy zauważyć, że transkrypty OCT3/4 oraz NANOG nie wykazywały istotnej statystycznie różnicy w ekspresji w danych z eksperymentu RNA-Seq pomiędzy komórkami PSC typu dzikiego i ETV1-KO. Jednakże dalsze eksperymenty dokładniej sprawdzające różne typy pluripotencji oraz np. potencjał do różnicowania w określonym kierunku lub proces zainicjowania różnicowania, których prawidłowy i wydajny przebieg zależy od dobrej jakości stanu aktywowanej pluripotencji, są niezbędne do potwierdzenia różnic pomiędzy komórkami PSC typu dzikiego i ETV1-KO.



Rycina 51. Obecność markerów pluripotencji w komórkach PSC typu dzikiego i ETV1-KO. **A.** Barwienie immunofluorescencyjne z przeciwciałami przeciwko markerom pluripotencji OCT3/4 (zielony) i NANOG (czerwony). Jądra wybarwiono za pomocą DAPI (niebieski). Skala = 100 μ m. **B.** Analiza z cytometru przepływowego z przeciwciałami przeciwko markerom pluripotencji NANOG i SOX2 (górny panel) oraz OCT3/4 i SOX2 (dolny panel)

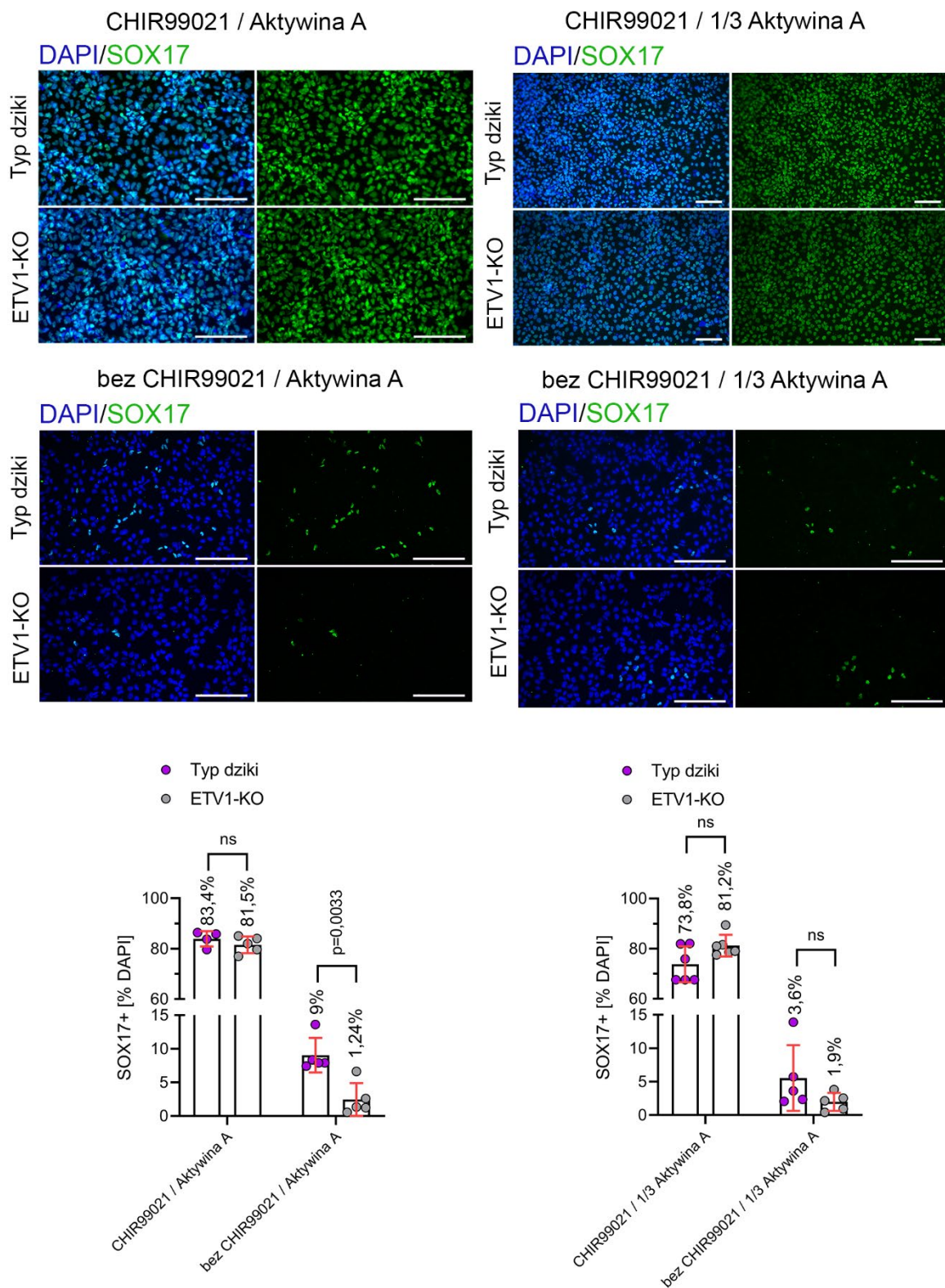
3.5.7. Modulacja ścieżki sygnalizacyjnej WNT podczas różnicowania w kierunku endodermy komórek PSC typu dzikiego i ETV1-KO

Na podstawie analizy danych RNA-Seq zaobserwowano istotny statystycznie spadek w aktywności ścieżki sygnalizacyjnej WNT ($p < 0,001$) w komórkach PSC ETV1-KO w porównaniu do typu dzikiego. W celu potwierdzenia różnicy w aktywności sygnalizacji WNT w komórkach PSC typu dzikiego i ETV1-KO, komórki różnicowano *in vitro* do stadium DE w formacie 2D. W specjalizacji ludzkich komórek PSC do komórek DE niezbędna jest aktywacja ścieżki WNT, którą uzyskuje się, dodając związek drobnocząsteczkowy CHIR99021 będący inhibitorem GSK3 β i aktywatorem ścieżki WNT (Siller i in. 2016). Jako kontrolę negatywną do poniżej opisanych eksperymentów zastosowano komórki PSC typu dzikiego i ETV1-KO w pożywce różnicującej bez dodatku związku drobnocząsteczkowego CHIR99021 i z dodatkiem 1/3 stężenia aktywiny A, które kierują komórki PSC do różnicowania *in vitro* do endodermy. Po dniu trzecim różnicowania komórki PSC typu dzikiego i ETV1-KO wybarwiono immunofluorescencyjnie z przeciwciałem przeciwko SOX17, który jest czynnikiem transkrypcyjnym charakterystycznym dla komórek DE. Za pomocą pomiaru zajmowanej powierzchni fluorescencji znormalizowanej do powierzchni fluorescencji DAPI określono frakcję komórek zróżnicowanych do komórek DE.

Określono potencjał do różnicowania w kierunku DE komórek PSC typu dzikiego i ETV1-KO w pełnej pożywce różnicującej (3 μ M CHIR99021 i 100 ng/ml aktywiny A). Komórki typu dzikiego i ETV1-KO osiągnęły odpowiednio 83,4% i 81,5% wydajności zróżnicowania do komórek DE, co nie było różnicą istotną statystycznie ($p = 0,14$). Natomiast w pożywce z dodatkiem CHIR99021 i z 1/3 stężeniem aktywiny A (aktywującej ścieżkę TGF β) również nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy we frakcji komórek wykazujących syntezę SOX17 pomiędzy komórkami DE ETV1-KO (81,2% komórek wykazujących syntezę SOX17) oraz komórkami DE typu dzikiego (73,8% komórek wykazujących syntezę SOX17). Podczas różnicowania *in vitro* do stadium DE komórek PSC typu dzikiego i ETV1-KO bez dodatku CHIR99021 i z 1/3 stężeniem aktywiny A zaobserwowano bardzo małą frakcję komórek zróżnicowanych do stadium DE, 3,6% w przypadku komórek typu dzikiego i 1,9% w przypadku komórek ETV1-KO. Różnica pomiędzy badanymi typami komórek również nie była istotna statystycznie (ryc. 52).

Następnie określono efektywność różnicowania do komórek DE po modulacji ścieżki WNT. Bez aktywacji sygnalizacji WNT zarówno komórki PSC typu dzikiego, jak i ETV1-KO wykazywały obniżenie efektywności różnicowania w kierunku DE. Do stadium DE w warunkach nieaktywowania ścieżki WNT zróżnicowało *in vitro* 9% komórek PSC typu dzikiego i 1,24% komórek PSC ETV1-KO, co stanowi różnicę istotną statystycznie na poziomie istotności $p=0,0033$. Dodatkowo komórki PSC typu dzikiego w pożywce różnicującej bez CHIR99021 zróżnicowały gorzej o 89,2% ($p<0,0001$) względem komórek PSC typu dzikiego w pełnej pożywce różnicującej. Z kolei komórki PSC ETV1-KO przy negatywnej regulacji aktywności ścieżki WNT wykazywały obniżenie potencjału do różnicowania do komórek DE o 98,5% ($p<0,0001$) w porównaniu do komórek PSC ETV1-KO w pełnej pożywce różnicującej (**ryc. 52**).

Podsumowując, powyższe wyniki potwierdzają wnioski opracowane na podstawie analizy porównawczej z eksperymentu RNA-Seq pomiędzy komórkami PSC typu dzikiego i ETV1-KO, że w komórkach PSC ETV1-KO nastąpiło zmniejszenie aktywności sygnalizacji WNT po wyłączeniu ekspresji *ETV1*. Ścieżka WNT jest niezbędna do różnicowania *in vitro* w kierunku DE, a zaburzenie aktywności tej ścieżki spowodowało, że komórki PSC ETV1-KO wykazują mniejszy potencjał do specjalizacji do DE w rygorystycznych warunkach różnicowania.



Rycina 52. Modulacja ścieżki WNT podczas różnicowania 2D *in vitro* komórek typu dzikiego i ETV1-KO do stadium DE. Komórki różnicowano w pełnej pożywce (górny lewy panel), pożywce z 1/3 stężeniem aktywiny A (górny prawy panel), pożywce bez CHIR99021 (dolny lewy panel) lub pożywce bez CHIR99021 i z 1/3 stężeniem aktywiny A jako kontrola negatywna (dolny prawy panel). Komórki wybarwiono przeciwciałem przeciwko markerowi DE SOX17 (zielony), jądra wyznaczono DAPI (niebieski). Skala = 200 μ m. Wykresy przedstawiają porównanie efektywności różnicowania komórek PSC typu dzikiego i ETV1-KO do stadium DE w różnych warunkach specjalizacji. Statystyka: wartość p obliczona testem t-Studenta, n=1 powtórzenie biologiczne

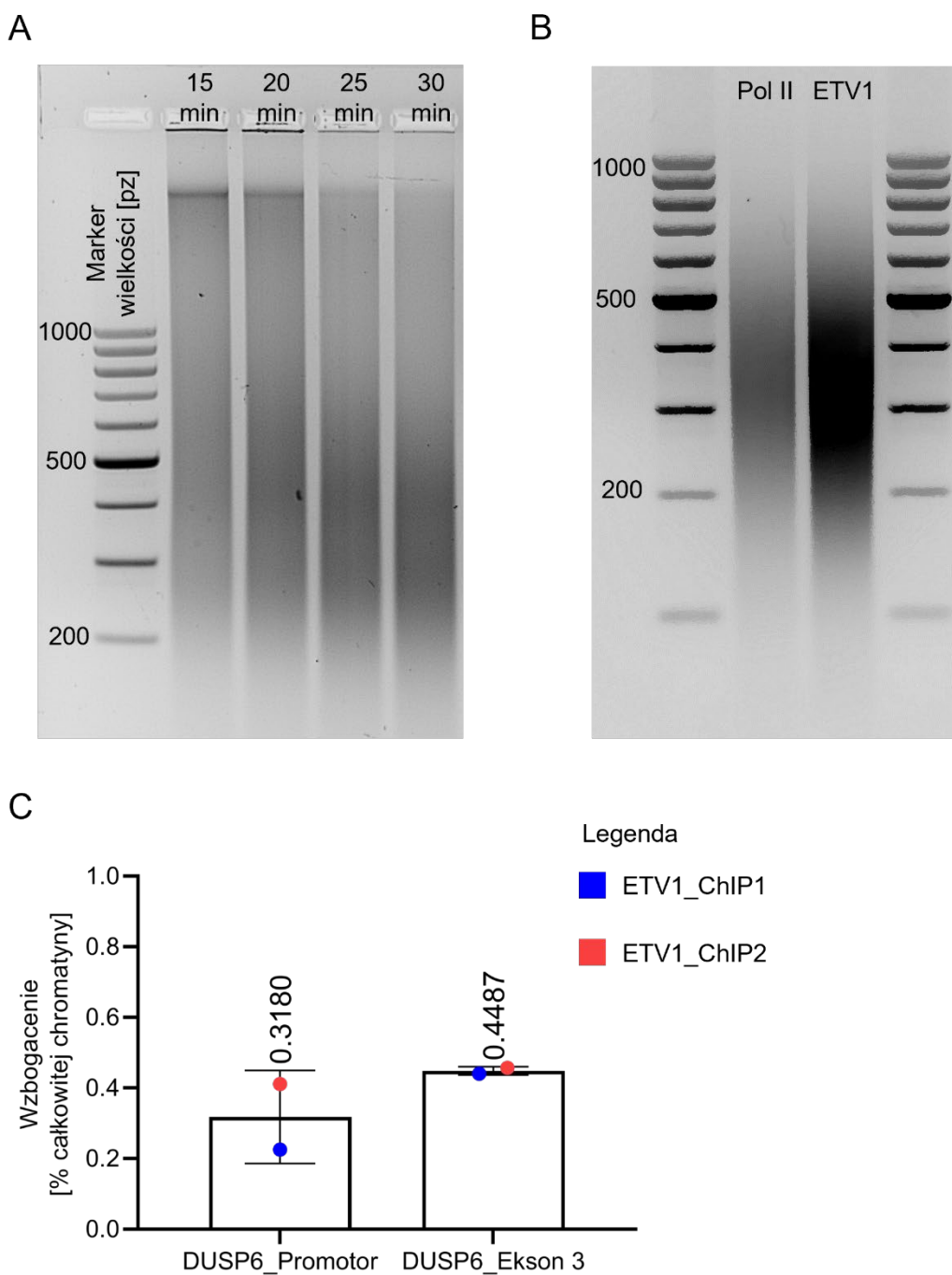
3.5.8. Identyfikacja genów bezpośrednio regulowanych przez ETV1 w ludzkich komórkach PSC z użyciem metody ChIP-Seq i CUT&RUN

Aby lepiej zrozumieć mechanizmy molekularne stojące za lepszym przyleganiem komórek PSC ETV1-KO oraz w celu określenia genów bezpośrednio regulowanych przez czynnik transkrypcyjny ETV1 przeprowadzono analizę wykorzystującą ChIP z przeciwciałem przeciwko ETV1 oraz technologię CUT&RUN (ang. *Cleavage Under Targets & Release Using Nuclease*).

Technologia CUT&RUN, podobnie jak ChIP, jest metodą służącą do wyznaczenia w genomowym DNA miejsc wiązania dla danego białka, a wytrącone za pomocą specyficznego przeciwciała pierwszorzędowe fragmenty genomowego DNA poddaje się reakcji qPCR lub sekwencjonowaniu. W przeciwieństwie do reakcji ChIP, w której genomowe DNA tnie się na mniejsze fragmenty za pomocą sonikacji, w technologii CUT&RUN do przeciwciała przyłącza się enzym pAG-MNaza, który wycina fragment chromatyny. W reakcji CUT&RUN uzyskuje się krótsze fragmenty DNA niż w przypadku ChIP.

W pierwszej kolejności komórki PSC typu dzikiego wykorzystano do eksperymentu z ChIP. Pierwszym etapem była optymalizacja warunków sonikacji w celu uzyskania fragmentów chromatyny długości między 200 pz a 500 pz, ponieważ taka wielkość fragmentów DNA zapewnia najlepszą rozdzielczość podczas sekwencjonowania. Sprawdzone 4 warunki sonikacji i na podstawie analizy żelu agarozowego ustalono, że po 30 minutach sonikacji możliwe jest uzyskanie fragmentów genomowego DNA pożądanej długości. Do immunoprecypitacji kompleksów chromatyny z ETV1 użyto przeciwciała przeciwko ETV1. Dodatkowo do identyfikacji regionów euchromatyny w genomie PSC typu dzikiego użyto przeciwciała przeciwko polimerazie II (Pol II, ang. *polymerase II*). Pomimo niskiego stężenia otrzymanego genomowego DNA, przeprowadzono reakcję qPCR w celu oceny efektywności reakcji ChIP. Na matrycy wytrąconej za pomocą przeciwciała przeciwko ETV1 oraz 1% całkowitej chromatyny (ang. *input*) zastosowanej do eksperymentu przeprowadzono reakcję qPCR ze starterami specyficznymi do miejsca wiązania ETV1 w obrębie promotora znanego i potwierdzonego genu regulowanego przez czynnik transkrypcyjny ETV1 – fosfataza 6 o podwójnej swoistości (*DUSP6*, ang. *dual specificity phosphatase 6*) (Hollenhorst i in. 2011; Gertz i in. 2013; Britton i in. 2017). Jako kontrolę negatywną zastosowano parę starterów specyficzných dla ostatniego eksonu genu *DUSP6*. Na podstawie wyników reakcji qPCR nie zaobserwowano wzbogacenia

amplikonów miejsc promotorowych *DUSP6*. Dlatego uznano, że reakcja ChIP z użyciem przeciwciał przeciwko ETV1 nie powiodła się (ryc. 53).

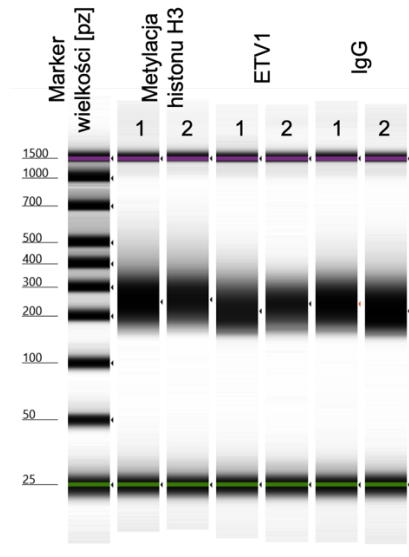


Rycina 53. Analiza ChIP. **A.** Optymalizacja warunków sonikacji. **B.** Reprezentatywny żel agarozowy z chromatyną wyizolowaną z komórek PSC typu dzikiego użytą w eksperymencie ChIP z użyciem przeciwciał przeciwko polimerazie II (Pol II) i ETV1 (ETV1). **C.** Wynik reakcji qPCR na matrycy DNA z reakcji ChIP z przeciwciałami przeciwko ETV1. Do reakcji użyto specyficznych starterów dla miejsca wiązania ETV1 do regionu promotorowego genu *DUSP6* (DUSP6_Promotor) oraz fragmentu sekwencji eksonu 3 (DUSP6_Ekson 3). Z wartości CT obliczono wzbogacenie względem całkowitej chromatyny wziętej do reakcji. ETV1_ChIP1 – pierwsze powtórzenie biologiczne (niebieski); ETV1_ChIP2 – drugie powtórzenie biologiczne (czerwony)

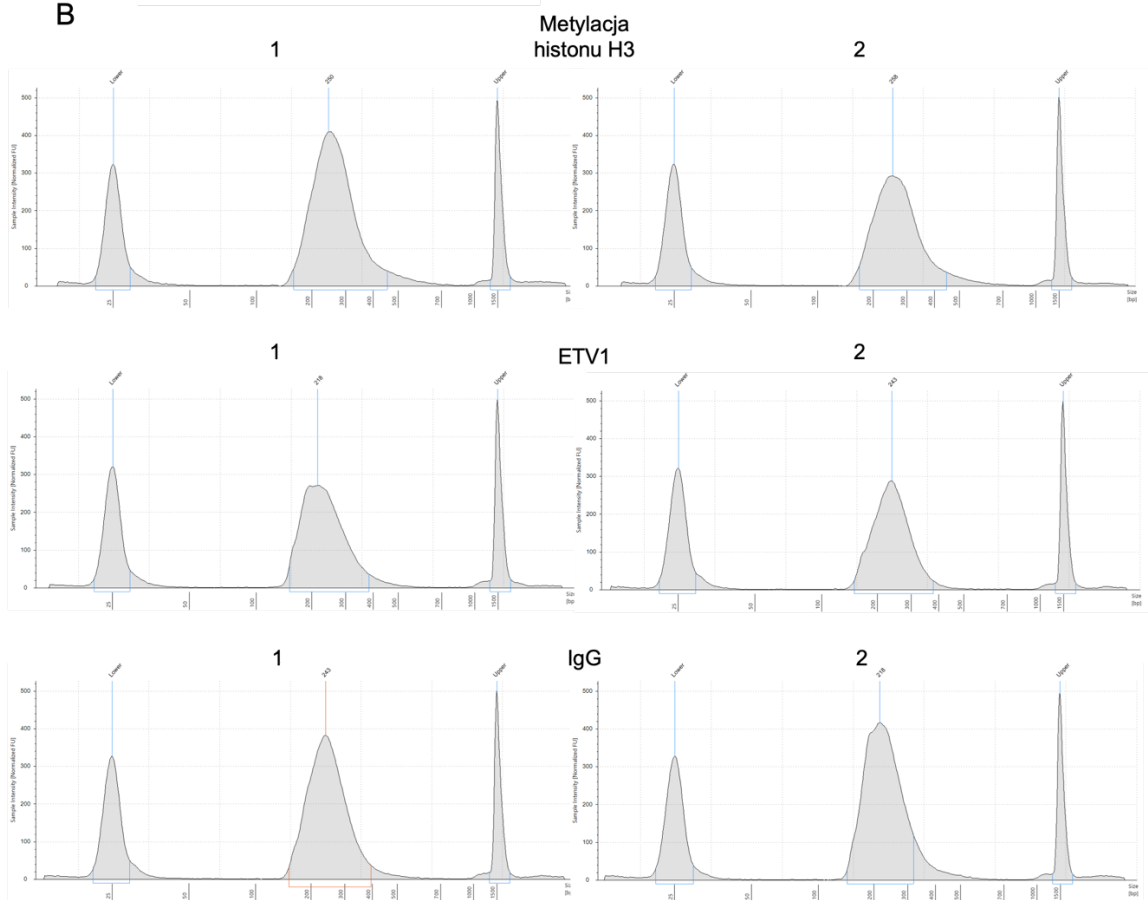
W związku z powyższym zastosowano metodę CUT&RUN na komórkach PSC typu dzikiego z zastosowaniem przeciwciała przeciwko ETV1. Jako kontrolę pozytywną

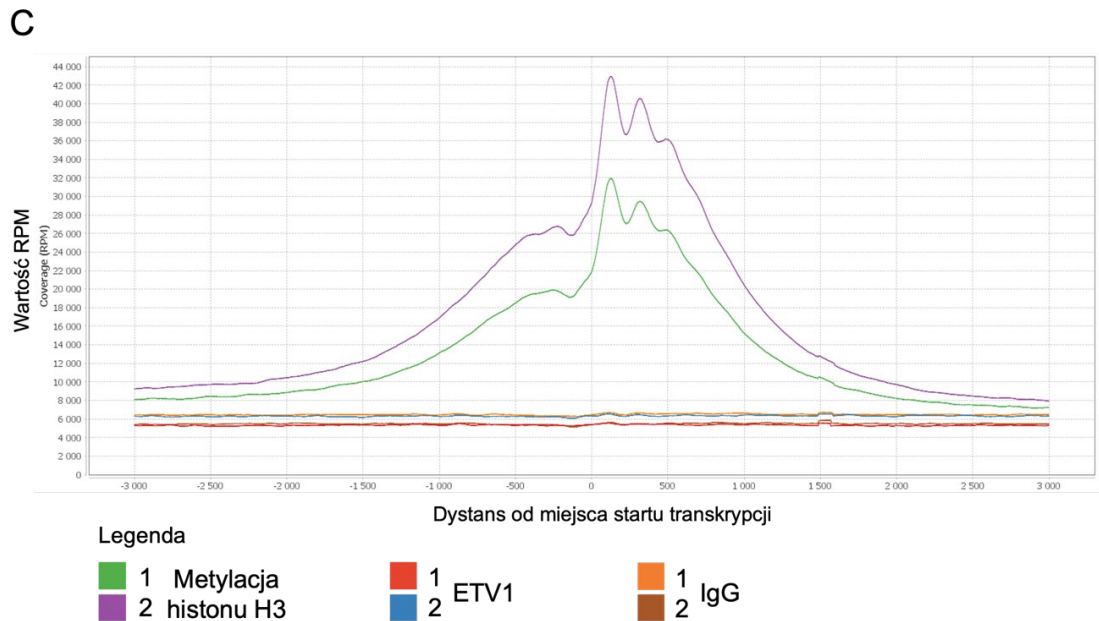
odzwierciedlającą euchromatynę użyto przeciwciała przeciwko metylacji histonu H3, natomiast kontrolę negatywną stanowiła reakcja z przeciwciałem przeciwko immunoglobulinie G (IgG, ang. *immunoglobulin G*) dostarczonymi w zestawie. Z uzyskanych fragmentów genomowego DNA przygotowano biblioteki, które poddano analizie jakości. Analiza jakości wykazała, że w bibliotekach DNA obecne były fragmenty wielkości między 150 pz a 450 przypadku bibliotek przygotowanych na matrycy DNA wytrąconej za pomocą przeciwciała przeciwko metylacji histonu H3. Natomiast wielkość bibliotek przygotowanych na matrycy DNA wytrąconej za pomocą przeciwciał przeciwko ETV1 i IgG wynosiła między 150 pz a 400 pz. Analiza sekwencjonowania bibliotek DNA z CUT&RUN z użyciem programu NGS Strand wykazała, że sekwencjonowane fragmenty w bibliotekach z metylacji histonu H3 odpowiadały miejscom w genomie w okolicach miejsca startu transkrypcji (około -1000 pz i +1500 pz od miejsca startu transkrypcji). Natomiast takiego rozkładu nie zaobserwowano ani w przypadku bibliotek ETV1 ani IgG (**ryc. 54**).

A



B





Rycina 54. Analiza CUT&RUN. **A, B.** Analiza jakości bibliotek DNA uzyskanych z komórek PSC typu dzikiego po reakcji CUT&RUN z wykorzystaniem przeciwciał przeciwko metylacji histonu H3, ETV1 i IgG. **A.** Rozdział elektroforetyczny bibliotek DNA. **B.** Elektroforegramy bibliotek DNA. **C.** Rozkład sekwencjonowanych fragmentów chromatyny w obrębie miejsca startu transkrypcji. Wartość RPM – liczba odczytów zmapowanych na jeden milion odczytów (ang. *reads per milion mapped reads*)

3.6. Wpływ wyłączenia ekspresji *ETV1* na różnicowanie ludzkich komórek PSC

Delecja genu *ETV1* w ludzkich PSC powoduje hiperaktywację ścieżki sygnalizacyjnej PI3K/AKT oraz zwiększoną adhezję międzykomórkową oraz do podłoża hodowlanego. Następnie, w celu zbadania potencjału do różnicowania komórek z wyłączoną ekspresją *ETV1* i komórek typu dzikiego przeprowadzono dwa eksperymenty:

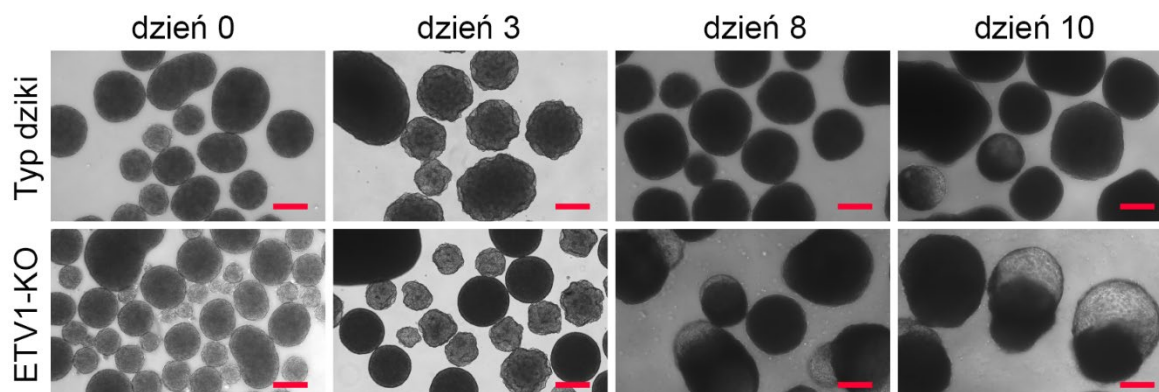
- a) różnicowanie *in vitro* spontaniczne,
- b) różnicowanie *in vitro* ukierunkowane do endokrynych komórek β trzustki.

3.6.1. Różnicowanie *in vitro* spontaniczne

Różnicowanie *in vitro* spontaniczne polega na umieszczeniu PSC w pożywce hodowlanej pozbawionej czynników utrzymujących pluripotencję. Komórki zaczynają różnicować się spontanicznie w komórki będące pochodnymi wszystkich trzech listków zarodkowych.

72 godziny po usunięciu czynników utrzymujących pluripotencję morfologia klastrów 3D ludzkich komórek PSC typu dzikiego i *ETV1*-KO znacznie się zmieniła. W dniu trzecim różnicowania zarówno klastry komórek PSC typu dzikiego, jak i *ETV1*-KO zaczęły tworzyć pączkujące struktury. W dniu 8, klastry komórek PSC *ETV1*-KO tworzyły

duże pąki i cysty. Natomiast klastry komórek PSC typu dzikiego występowały w formie zwartych sfer. Z kolei, w dniu 10 klastry komórek PSC ETV1-KO wyraźnie różniły się pod względem morfologii od organoidów typu dzikiego tworząc duże cysty (**ryc. 55**).



Rycina 55. Reprezentatywne zdjęcia przedstawiające morfologię klastrów podczas różnicowania spontanicznego ludzkich komórek PSC typu dzikiego i ETV1-KO. Zdjęcia wykonane mikroskopem świetlnym. Skala = 200 µm

W celu zbadania różnic pomiędzy organoidami typu dzikiego i ETV1-KO, w dniu 8 i 10 różnicowania spontanicznego, przeprowadzono analizę qPCR ze starterami dla markerów pochodnych trzech listków zarodkowych. Zarówno w dniu 8, jak i 10 w organoidach ETV1-KO zaobserwowano zwiększoną ekspresję markerów endodermalnych.

W dniu 8 spontanicznego różnicowania *in vitro* istotną statystycznie różnicę w ekspresji markerów endodermalnych zaobserwowano w przypadku *SOX17* (262,375 razy większą w komórkach PSC ETV1-KO w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego), białko wiążące GATA 4 (*GATA4*, ang. *GATA binding protein 4*) (26,3709 razy większą w komórkach PSC ETV1-KO w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego), czynnik transkrypcyjny SRY-box 7 (*SOX7*, ang. *SRY-box transcription factor 7*) (10,5732 razy większą w komórkach PSC ETV1-KO w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego) i czynnik neuronów motorycznych i trzustki 1 (*MNX1*, ang. *motor neuron and pancreas homeobox 1*) (3,3961 razy większą w komórkach PSC ETV1-KO w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego) (**ryc. 56A**). Natomiast, w dniu 10 spontanicznego różnicowania *in vitro* zaobserwowano istotnie statystycznie różnicę w ekspresji genów specyficznych dla endodermy: *SOX17* (1115,25 razy większą w komórkach PSC ETV1-KO w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego), *GATA4* (94, 4195 razy większą w komórkach PSC ETV1-KO w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego), *SOX7* (23,4205 razy większą w komórkach PSC ETV1-KO w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego) i *MNX1* (5,4861 razy większą w komórkach PSC ETV1-KO w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego) (**ryc. 56B**).

Ponadto w klastrach komórek PSC ETV1-KO w porównaniu do typu dzikiego wykryto podwyższoną ekspresję genów specyficznych dla mezodermy. W dniu 8 różnicowania spontanicznego *in vitro* istotną statystycznie różnicę w ekspresji genów specyficznych dla mezodermy wykazywały czynnik transkrypcyjny mezodermy *posterior* bHLH (MESP1, ang. *mesoderm posterior bHLH transcription factor 1*) (23,1719 razy większą w komórkach PSC ETV1-KO w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego), HOXA1 (ang. *homeobox A1*) (20,0489 razy większą w komórkach PSC ETV1-KO w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego), MIXL1 (ang. *mix paired-like homeobox 1*) (9,4805 razy większą w komórkach PSC ETV1-KO w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego), troponina T2 (TNNT2, ang. *troponin T2, cardiac type*) (5,4561 razy większą w komórkach PSC ETV1-KO w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego), receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu α (PDGFR α , ang. *platelet-derived growth factor receptor α*) (3,2283 razy większą w komórkach PSC ETV1-KO w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego) oraz MEIS2 (ang. *meis homeobox 2*) (3,1215 razy większą w komórkach PSC ETV1-KO w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego) (**ryc. 56A**). Natomiast, w dniu 10 różnicowania spontanicznego *in vitro* istotnie statystycznie wyższą ekspresję genów mezodermalnych w klastrach komórek PSC ETV1-KO względem typu dzikiego wykazywały TNNT2 (86,2446 razy większą w komórkach PSC ETV1-KO w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego), PDGFR α (28,5006 razy większą w komórkach PSC ETV1-KO w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego), MESP1 (25,0767 razy większą w komórkach PSC ETV1-KO w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego), HOXA1 (ang. *homeobox A1*) (22,5481 razy większą w komórkach PSC ETV1-KO w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego), MEIS2 (ang. *meis homeobox 2*) (6,7348 razy większą w komórkach PSC ETV1-KO w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego) oraz MIXL1 (ang. *mix paired-like homeobox 1*) (4,271 razy większą w komórkach PSC ETV1-KO w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego) (**ryc. 56B**).

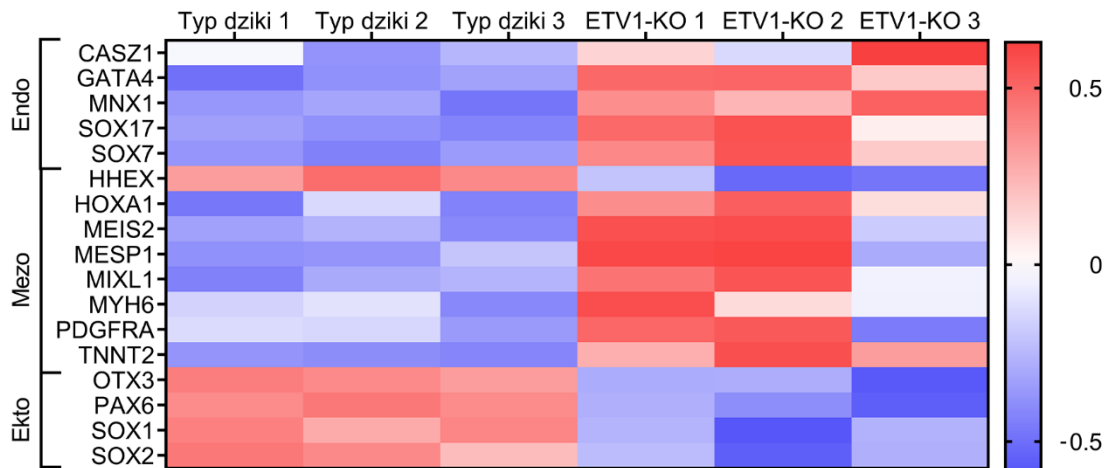
Z kolei klastry 3D komórek PSC ETV1-KO wykazywały znacznie niższą ekspresję markerów ektodermy w porównaniu do klastrów 3D komórek PSC typu dzikiego zarówno w dniu 8 jak i 10 różnicowania spontanicznego *in vitro*. W dniu 8, markery ektodermy ulegały statystycznie niższej ekspresji w klastrach komórek PSC ETV1-KO w porównaniu do klastrów komórek PSC typu dzikiego odpowiednio PAX6 (0,1571 razy niższą w komórkach PSC ETV1-KO w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego), ortodontyczny *hen 3* (OTX3, ang. *orthodenticle homeobox 3*) (0,2250 razy niższą w komórkach PSC ETV1-KO w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego), czynnik transkrypcyjny SRY-box 1

(SOX1, ang. *SRY-box transcription factor 1*) (0,3051 razy niższą w komórkach PSC ETV1-KO w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego) i SOX2 (0,3694 razy niższą w komórkach PSC ETV1-KO w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego) (**ryc. 56A**). Natomiast, w dniu 10 różnicowania spontanicznego *in vitro* geny specyficzne dla ektodermy ulegały statystycznie niższej ekspresji w klastrach 3D komórek PSC ETV1-KO względem klastrów 3D komórek PSC typu dzikiego odpowiednio SOX1 (0,0362 razy niższą w komórkach PSC ETV1-KO w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego), SOX2 (0,0624 razy niższą w komórkach PSC ETV1-KO w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego), PAX6 (0,1187 razy niższą w komórkach PSC ETV1-KO w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego) oraz OTX3 (0,285 razy niższą w komórkach PSC ETV1-KO w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego) (**ryc. 56B**).

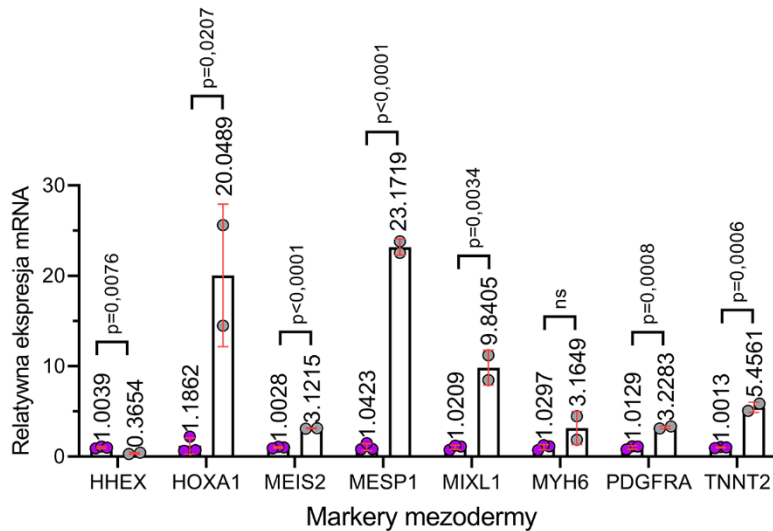
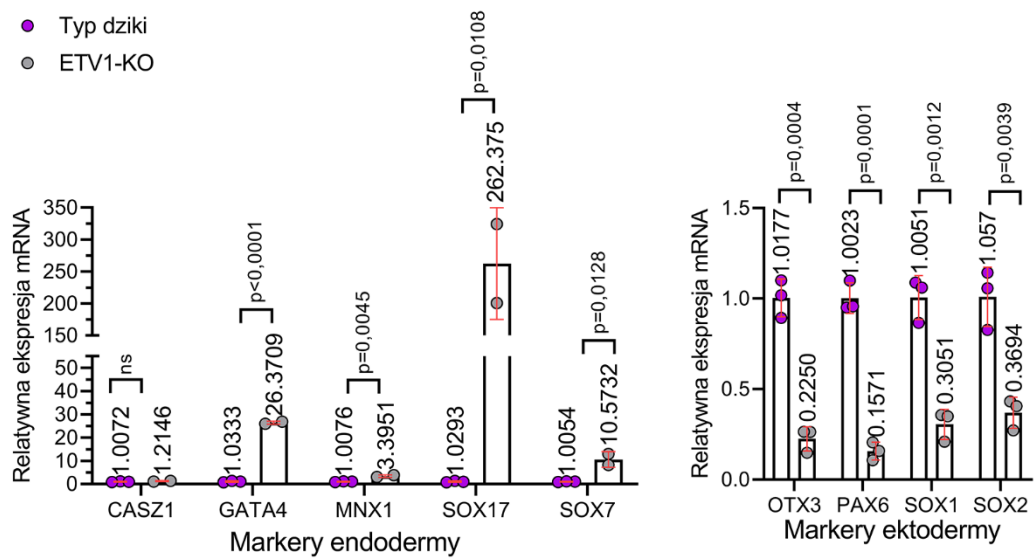
Powyższe wyniki wskazują na efektywniejsze różnicowanie *in vitro* w warunkach nieukierunkowanego rozwoju komórek PSC ETV1-KO w stronę endodermy i mezodermy oraz upośledzony rozwój w stronę ektodermy, w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego.

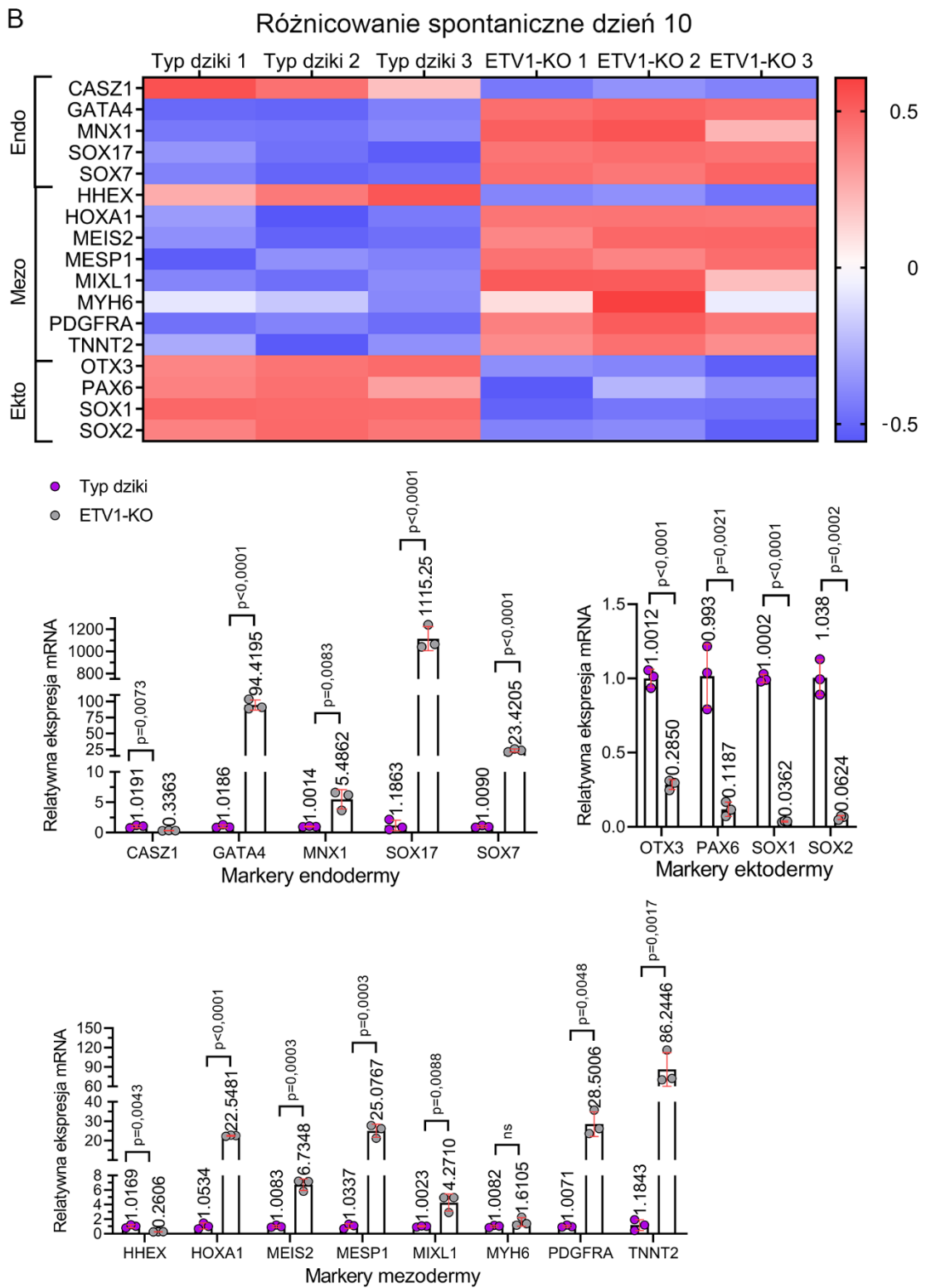
A

Różnicowanie spontaniczne dzień 8



- Typ dziki
- ETV1-KO





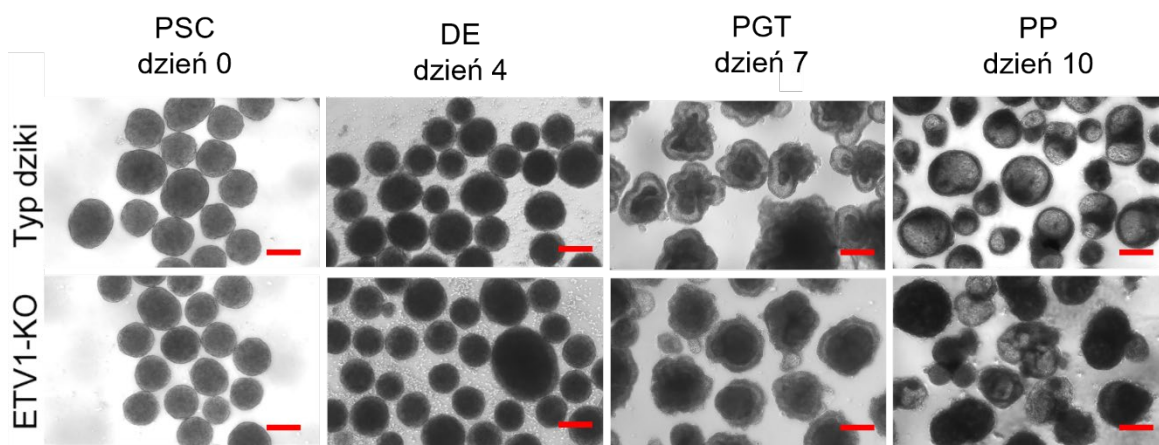
Rycina 56. Wyniki qPCR ze starterami specyficznymi dla markerów endodermy, mezodermy i ektodermy. Ekspresja mRNA względem typu dzikiego. Mapy ekspresji stworzone z wartości deltaCT i znormalizowane **A.** Wyniki z dnia 8 różnicowania spontanicznego. **B.** Wyniki z dnia 10 różnicowania spontanicznego. Statystyka: wartość p obliczona testem t-Studenta, n=3 powtórzenie biologiczne

3.6.2. Różnicowanie *in vitro* w kierunku komórek β trzustki

Różnicowanie *in vitro* nakierowane na fenotyp określonego typu komórek polega na umieszczeniu PSC w pożywce hodowlanej pozbawionej czynników utrzymujących pluripotencję, natomiast zawierających odpowiednio dobraną mieszaninę związków drobnocząsteczkowych i czynników wzrostu. Pod wpływem pożywki różnicującej, która moduluje określone szlaki metaboliczne i ekspresję wybranych genów, komórki PSC nabierają cech fenotypowych i genotypowych określonego typu komórek. W niniejszej rozprawie w celu zróżnicowania *in vitro* ludzkich PSC w kierunku komórek β trzustki, zastosowano protokół 3D opracowany przez zespół profesora Millmana z własnymi modyfikacjami.

3.6.2.1. Określenie różnic w morfologii i syntezie białek markerowych dla poszczególnych etapów różnicowania *in vitro* do komórek β trzustki

W miarę postępu różnicowania po usunięciu pożywki utrzymującej plenipotencję morfologia sfer komórek PSC typu dzikiego i ETV1-KO znacznie się zmieniła. W dniu, w którym rozpoczęto różnicowanie (dzień 1) organoidy stworzone z komórek PSC ETV1-KO nie różniły się w porównaniu z organoidami wytworzonymi z komórek typu dzikiego. Podobnie na stadium DE (dzień 4 różnicowania) – morfologia klastrów 3D komórek PSC ETV1-KO i typu dzikiego nie różniła się między sobą. Jednak na stadium PGT (dzień 7 różnicowania) można było zaobserwować różnice w morfologii pomiędzy sferami zróżnicowanymi z komórek PSC ETV1-KO i typu dzikiego. Mianowicie sfery komórek typu dzikiego tworzyły mocniej upakowane wnętrza otoczone przez luźniej ułożone komórki, natomiast sfery zróżnicowanych komórek ETV1-KO tworzyły bardziej upakowane struktury ze znacznie mniejszą otoczką luźno ułożonych komórek. Na etapie PP (dzień 10 różnicowania) różnice w morfologii pomiędzy sferami komórek ETV1-KO i typu dzikiego były mocno widoczne. W zawieszynie sfer komórek typu dzikiego można było zauważyć większe i mniejsze organoidy, jednak ich morfologia nie różniła się między sobą. Na powierzchni sfer komórek PP typu dzikiego można było zauważyć małe, pączkujące struktury. Natomiast w przypadku sfer komórek PP ETV1-KO zawieszyna organoidów była heterogenna – zauważalne były zwarte klastry komórek oraz takie, które złożone były z luźno ułożonych komórek tworzących we wnętrzu puste, nieregularne struktury (**ryc. 57**).

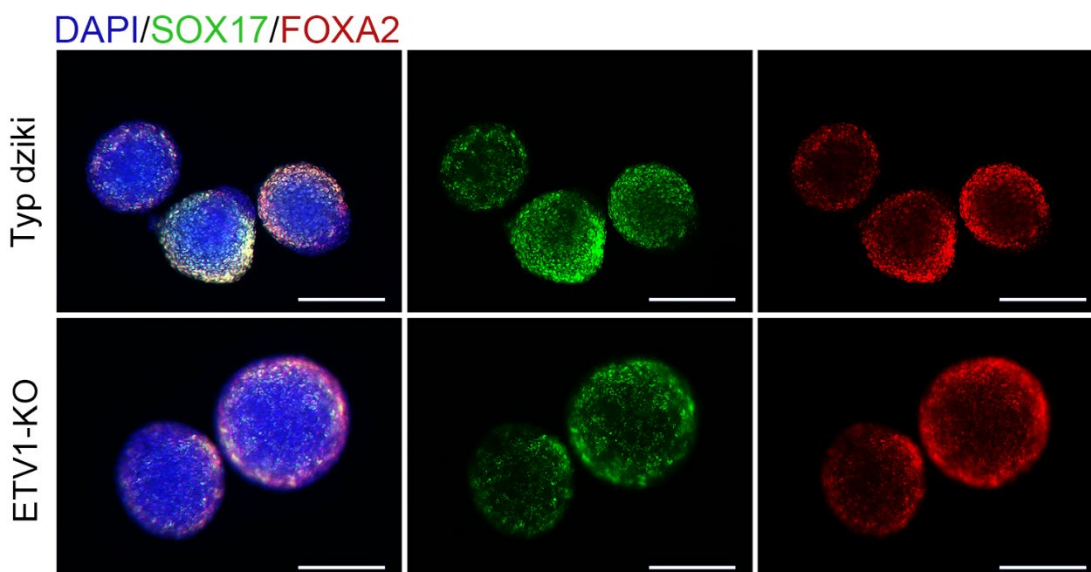


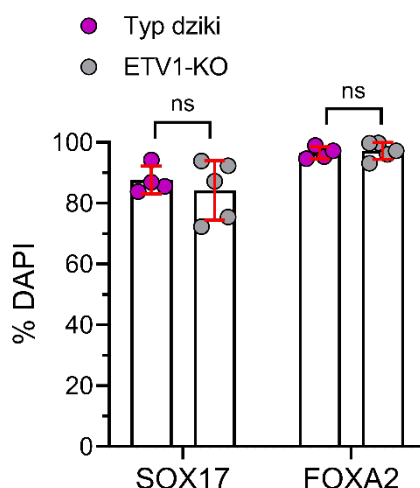
Rycina 57. Reprezentatywne zdjęcia sfer typu dzikiego oraz ETV1-KO podczas różnicowania *in vitro* do trzustkowych komórek β . Zdjęcia wykonane mikroskopem świetlnym. Skala = 200 μ m

W celu zbadania różnic pomiędzy komórkami PSC ETV1-KO i typu dzikiego w specyfikacji *in vitro* komórek PSC do komórek β trzustki przeprowadzono barwienie immunofluorescencyjne z wykorzystaniem przeciwciał przeciwko białkom markerowym poszczególnych etapów różnicowania.

Na stadium DE liczba komórek wykazujących syntezę zarówno białka SOX17 jak i FOXA2 nie różniła się pomiędzy sferami komórek DE ETV1-KO i typu dzikiego. Ponadto, badane komórki osiągnęły wysoką efektywność w różnicowaniu do stadium DE – sfery komórek ETV1-KO na poziomie 84,2% w przypadku SOX17 i 97,2% w przypadku FOXA2, natomiast sfery komórek typu dzikiego na poziomie 87,6% w przypadku SOX17 i 96,5% w przypadku FOXA2 (**ryc. 57**).

4 dzień różnicowania w kierunku komórek β trzustki
stadium: DE



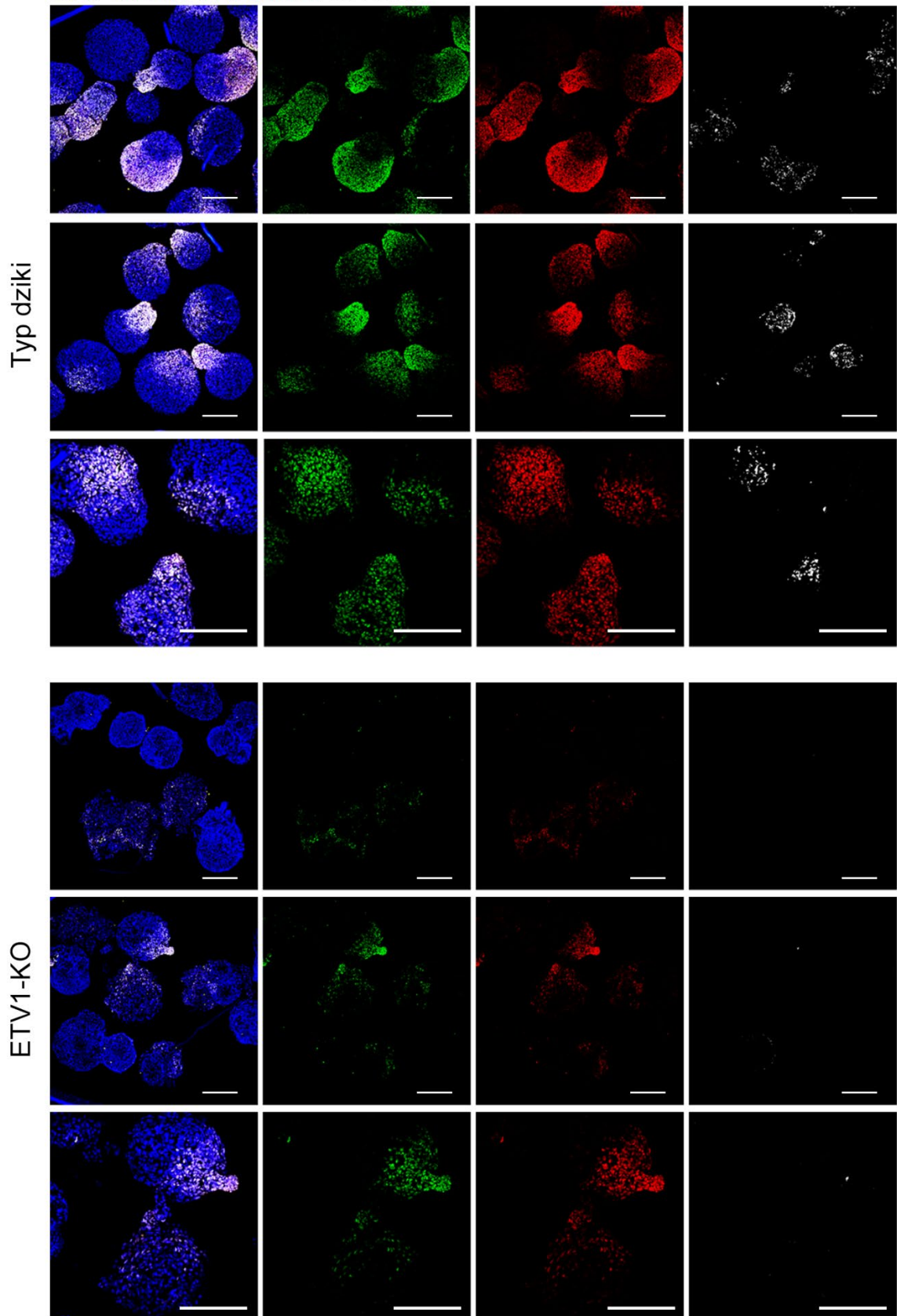


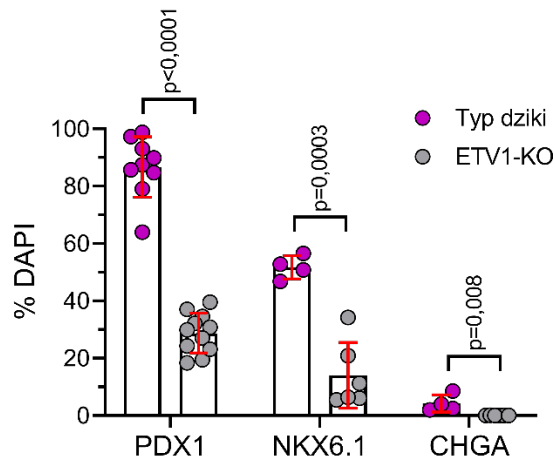
Rycina 57. Stadium DE sfer typu dzikiego oraz ETV1-KO podczas różnicowania *in vitro* do trzustkowych komórek β . Reprezentatywne barwienia immunofluorescencyjne białek markerowych dla stadium DE – SOX17 (zielony) i FOXA2 (czerwony). Jądra komórkowe wybarwione są DAPI (niebieski). Skala = 200 μ m. Ze zdjęć wyliczono powierzchnię fluorescencji dla białek SOX17 i FOXA2, którą znormalizowano do powierzchni fluorescencji DAPI. Wartości p wyliczone za pomocą testu t Studenta. $n \geq 4$ powtórzenia biologiczne

Na etapie PP różnicowania *in vitro* sfer komórek PSC ETV1-KO i typu dzikiego w kierunku endokrynych komórek β trzustki zaobserwowano istotnie statystycznie różnice w liczbie komórek wykazujących syntezę białek markerowych – PDX1, NKX6-1 oraz CHGA. W organoidach komórek PP typu dzikiego zaobserwowano wysoki procent komórek wykazujących syntezę białek PDX1 (86,7%) oraz NKX6-1 (51,7%). Ponadto sfery komórek PP typu dzikiego wykazywały również syntezę białka CHGA (4%). Natomiast w sferach komórek PP ETV1-KO zauważono mniejszy odsetek komórek wykazujących syntezę czynników transkrypcyjnych PDX1 (28,7%) oraz NKX6-1 (6,4%). Dodatkowo synteza białka CHGA w organoidach komórek ETV1-KO była wykrywalna w niewielkim odsetku komórek (0,07%) (ryc. 58). Czynniki transkrypcyjne PDX1 i NKX6-1 są niezbędnymi regulatorami rozwoju endokrynej trzustki oraz regulatorami zapewniającymi prawidłowe funkcjonowanie komórek β trzustki. Z tego względu na podstawie wyżej opisanych wyników wyciągnięto wniosek, że delecja ETV1 prowadzi do zmniejszenia potencjału do różnicowania *in vitro* do komórek PP. Zmniejszona pula prawidłowo zróżnicowanych komórek PP powoduje, że dalsza specjalizacja do komórek EP, i w następstwie do komórek β trzustki, jest niemożliwa.

12 dzień różnicowania w kierunku komórek β trzustki
stadium: PP

DAPI/PDX1/NKX6.1/CHGA

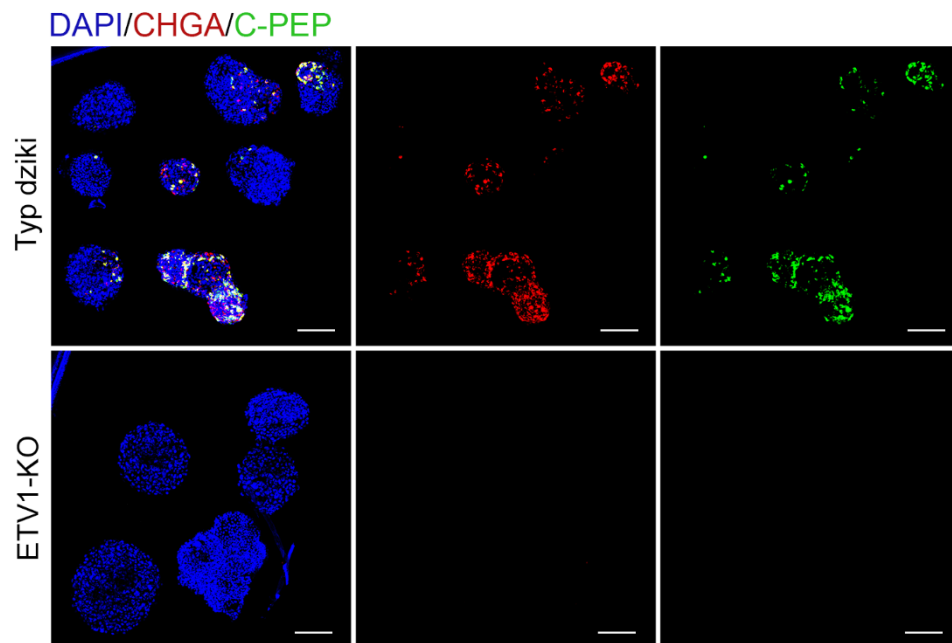




Rycina 58. Stadium PP sfer typu dzikiego oraz ETV1-KO podczas różnicowania *in vitro* do trzustkowych komórek β Reprezentatywne barwienia immunofluorescencyjne białek markerowych – PDX1 (zielony), NKX6-1 (czerwony) i CHGA (szary). Jądra komórkowe wybarwione są DAPI (niebieski). Skala = 200 μ m. Ze zdjęć wyliczono powierzchnię fluorescencji dla białek PDX1, NKX6-1 i CHGA, którą znormalizowano do powierzchni fluorescencji DAPI. Statystyka: wartości p wyliczono za pomocą testu t Studenta. n=3 powtórzeń biologiczne

Na stadium wczesnych komórek β różnicowania *in vitro* w organoidach typu dzikiego zaobserwowano syntezę białek CHGA (21%) oraz C-PEP (15%). Natomiast, sfery ETV1-KO nie wykazywały syntezy białek specyficznych dla części endokrynej trzustki (CHGA) oraz komórek β (C-PEP) (ryc. 59).

20 dzień różnicowania w kierunku komórek β trzustki
stadium: EP/wczesnych komórek β



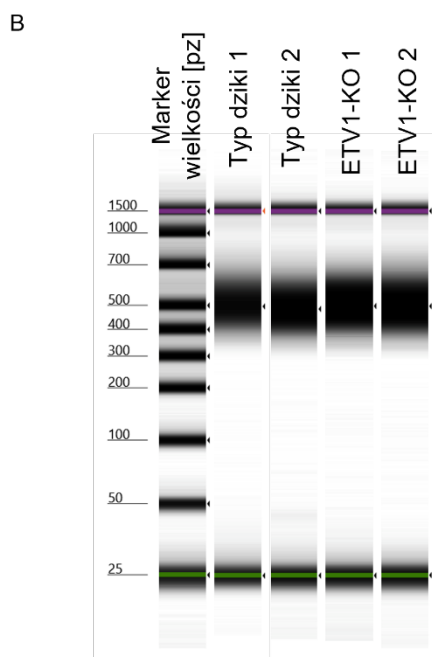
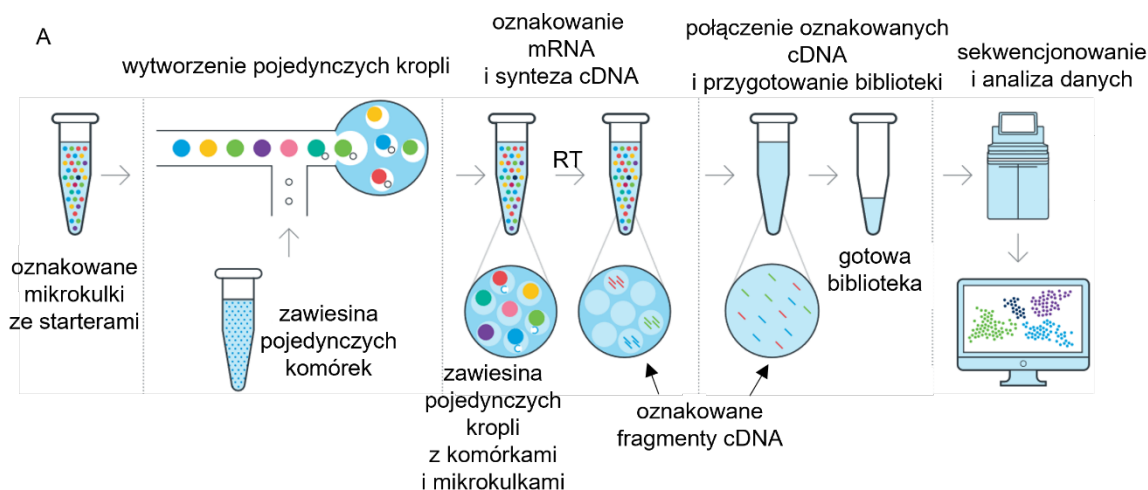
Rycina 59. Stadium wczesnych komórek β sfer typu dzikiego oraz ETV1-KO podczas różnicowania *in vitro* do trzustkowych komórek β Reprezentatywne barwienia immunofluorescencyjne białek markerowych – CHGA (czerwony) i C-PEP (zielony). Jądra komórkowe wybarwione są DAPI (niebieski). Skala = 200 μ m

Z komórek PSC ETV1-KO różnicuje się mniej komórek PP, a z tych których powstają niemożliwa jest specjalizacja do komórek wykazujących obecność CHGA i C-PEP. Na podstawie powyższych wyników można stwierdzić, że czynnik transkrypcyjny ETV1 jest niezbędny do prawidłowego wytworzenia komórek PP.

3.6.2.2. Określenie różnic na poziomie transkryptomu w komórkach PP zróżnicowanych z komórek PSC typu dzikiego i ETV1-KO

W celu zrozumienia mechanizmów molekularnych stojących za różną efektywnością różnicowania *in vitro* komórek PSC typu dzikiego oraz ETV1-KO do komórek PP przeprowadzono analizę scRNA-Seq.

W stadium komórek PP zebrano sfery typu dzikiego i ETV1-KO i poddano procedurze przygotowania bibliotek do scRNA-Seq w dwóch powtórzeniach biologicznych z 8000 komórek każde. Zastosowano metodę scRNA-Seq opartą na kroplach (ang. *droplet-based scRNA-Seq*), która wykorzystuje urządzenie mikroprzepływowe do podziału kropli zawierających pojedynczą komórkę, bufor do lizy i mikrokulki pokryte starterami z kodem kreskowym unikatowym dla każdej komórki oraz unikalne identyfikatory molekularne (UMI, ang. *unique molecular identifier*) znakujące cząsteczki mRNA. Liza komórki w kropli pozwala na hybrydyzację cząsteczek mRNA ze starterami na mikrokulkach. Następnie reakcja odwrotnej transkrypcji prowadzi do syntezy oznakowanych pełnej długości cDNA na matrycy mRNA, które poddawane są amplifikacji i ligacji adapterów. Uzyskane biblioteki poddane zostały analizie jakości, która wykazała, że wielkość przygotowanych bibliotek mieściła się w zakresie 400–600 pz. Następnie, biblioteki zostały sekwencjonowane z dwóch końców (ang. *pair-end sequencing*) z głębokością 40 tysięcy odczytów na komórkę (**ryc. 60**).

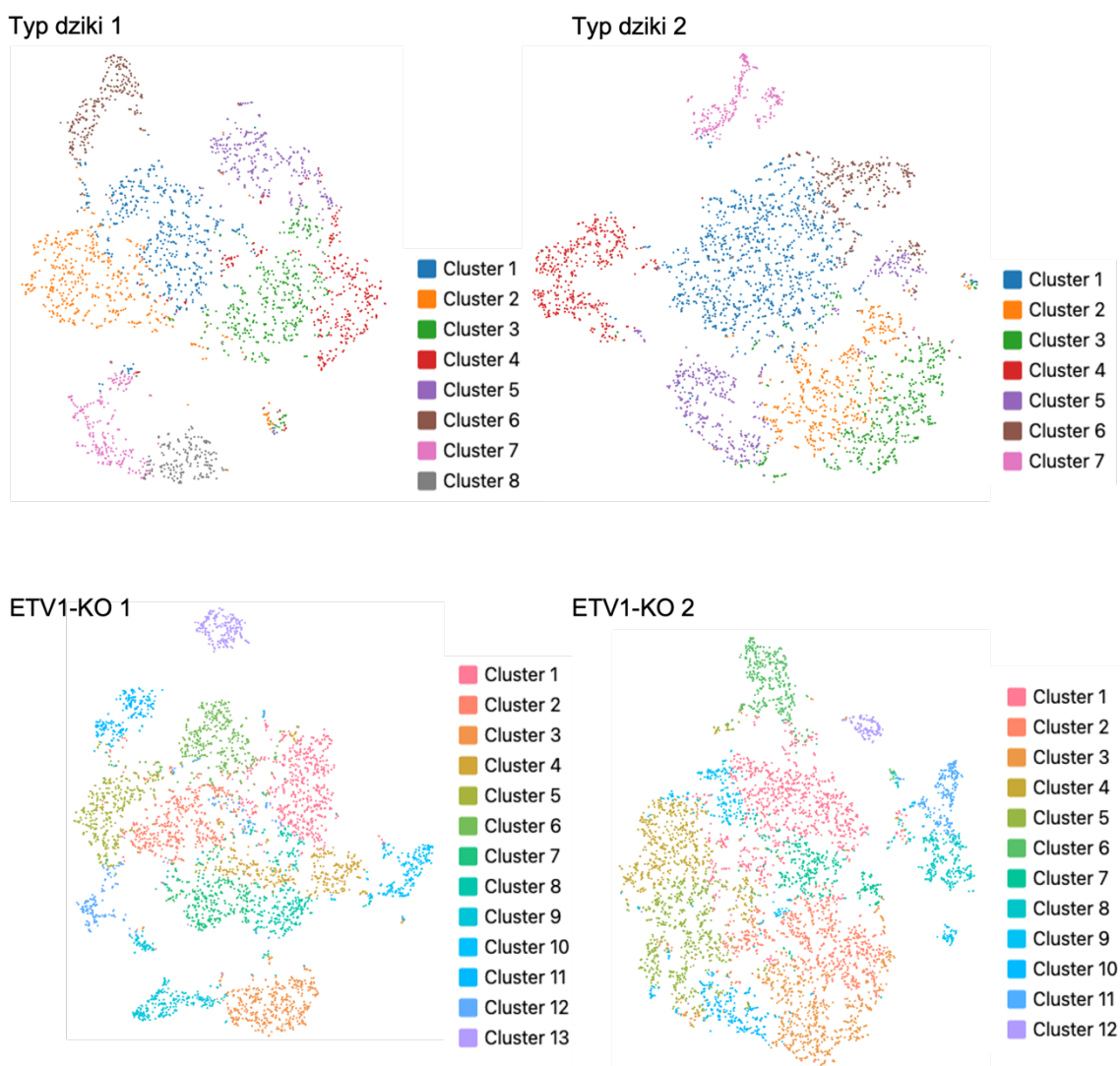


Rycina 60. Analiza scRNA-Seq. **A.** Schemat przebiegu metody scRNA-Seq. Przedstawiono etapy oznakowania pojedynczych komórek, syntezy nici cDNA, przygotowania bibliotek cDNA oraz sekwencjonowania i analizy. RT – reakcja odwrotnej transkrypcji. Na podstawie schematu z 10xGenomics www.10xgenomics.com. **B.** Analiza jakości bibliotek do scRNA-Seq z komórek PP typu dzikiego i ETV1-KO podczas różnicowania *in vitro* do komórek β trzustki

Z organoidów typu dzikiego uzyskano sekwencjonowane transkrypty z 2571 (typ dziki 1) i 3372 (typ dziki 2) komórek. Natomiast z organoidów ETV1-KO uzyskano sekwencjonowane transkrypty z 4617 (ETV1-KO 1) i 5649 (ETV1-KO 2) komórek.

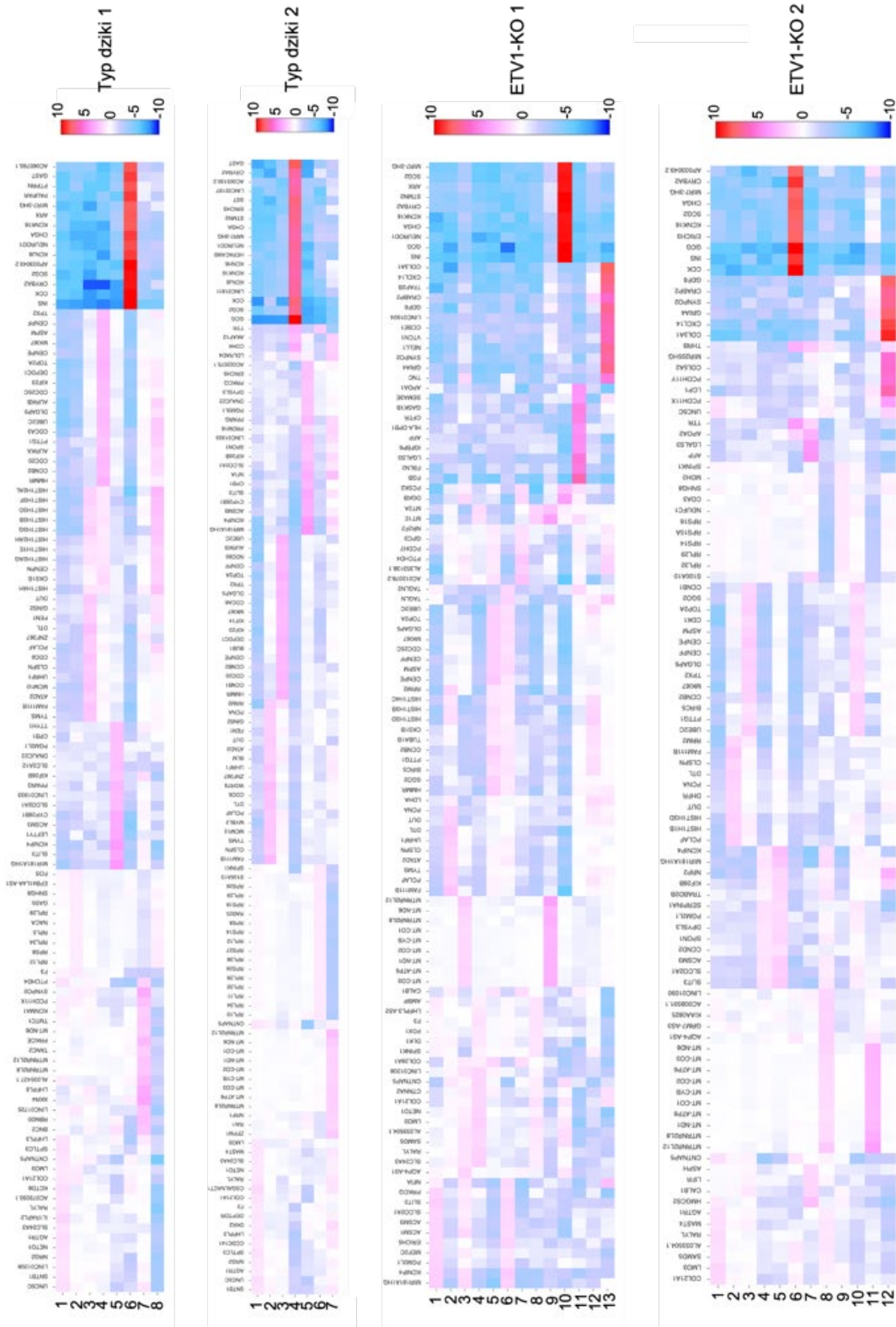
Wyodrębnienie grup komórek i wizualizacja z użyciem metody tSNE pozwoliła na zidentyfikowanie transkrypcyjnie unikatowych skupisk komórek. Wstępna analiza wykazała, że komórki ETV1-KO w stadium PP podczas różnicowania *in vitro* do komórek β trzustki tworzą bardziej różnorodny organoidy, w porównaniu do komórek typu dzikiego. Mianowicie, w obrębie prób ETV1-KO zidentyfikowano 13 (ETV1-KO 1) i 12 (ETV1-KO

2) skupisk. Z kolei w obrębie prób typu dzikiego wyselekcjonowano 8 (typ dziki 1) i 7 (typ dziki 2) typów komórek (**ryc. 61**).



Rycina 61. Wyodrębnione skupiska komórek z 12 dnia różnicowania *in vitro* komórek PSC typu dzikiego i ETV1-KO do komórek β trzustki – analiza scRNA-Seq

W programie Loupe Browser 6.2.0 utworzono mapę poziomą zidentyfikowanych transkryptów w komórkach PP typu dzikiego oraz ETV1-KO zróżnicowanych *in vitro* (**ryc.62**).

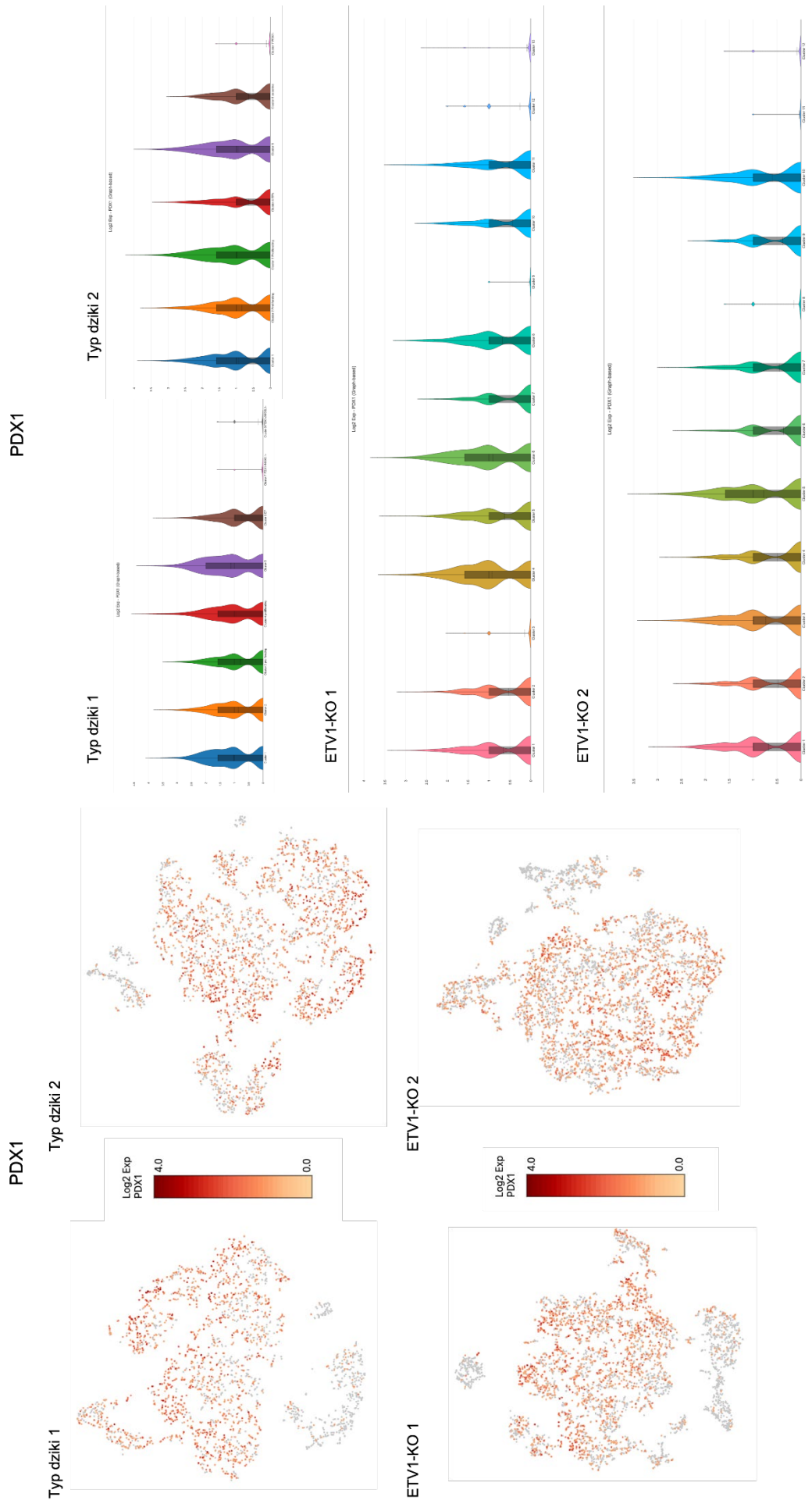


Rycina 62. Mapa poziomu transkryptów w komórkach PSC ETV1-KO i typu dzikiego w 12 dniu różnicowania in vitro do komórek β trzustki. Liczby symbolizują numer wyodrębnionego klastra

Następnie sprawdzono obecność markerowych transkryptów dla komórek PP oraz EP.

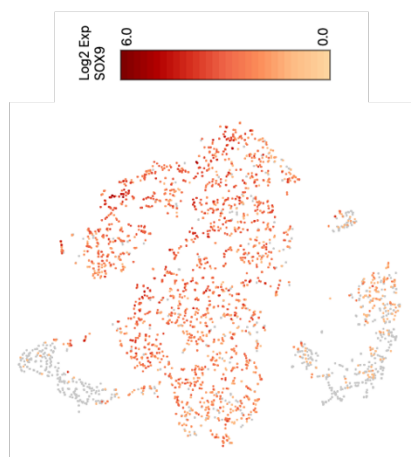
We wszystkich analizowanych zestawach danych zaobserwowano obecność markerów PP: PDX1 i SOX9 (**ryc. 63A**). Dodatkowo, zarówno w klastrach komórek typu dzikiego (typ dziki 1: skupisko 6; typ dziki 2: skupisko 4), jak i ETV1-KO (ETV1-KO 1: skupisko 10; ETV1-KO 2: skupisko 6) w 12 dniu różnicowania *in vitro*, kiedy komórki osiągnęły etap komórek PP, zaobserwowano skupisko komórek odpowiadających wczesnym komórkom EP, który charakteryzował się podwyższonym poziomem transkryptów specyficznych dla części endokrynnej trzustki, np. CHGA, NGN3, NEUROD1 (**ryc. 63B**).

A



SOX9

Typ dziki 1

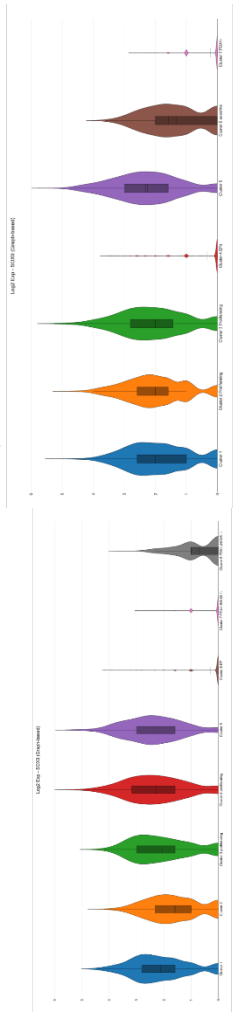


Typ dziki 2

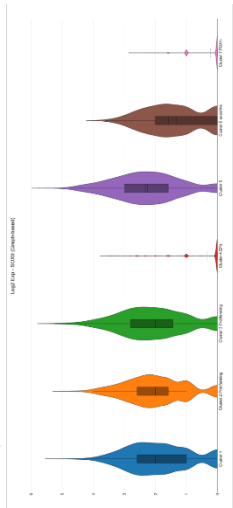


SOX9

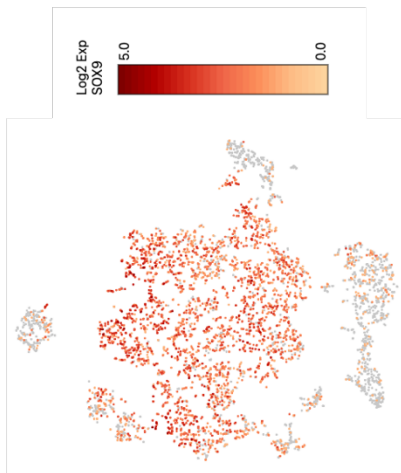
Typ dziki 1



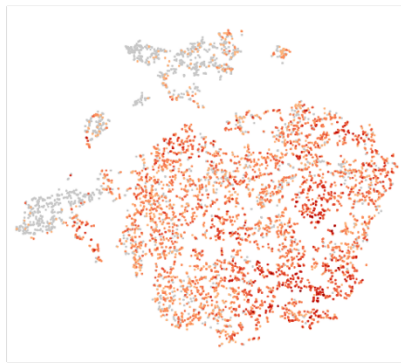
Typ dziki 2



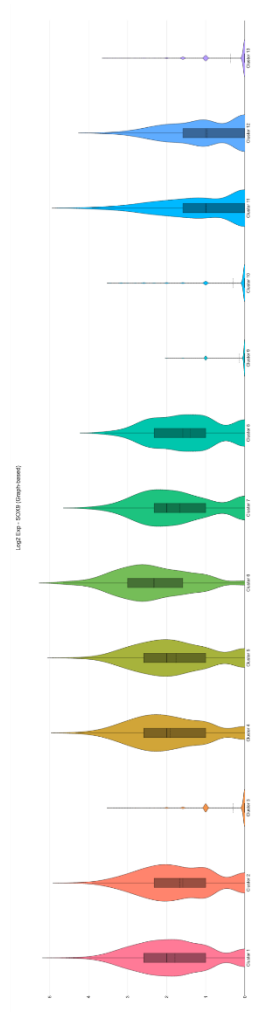
ETV1-KO 1



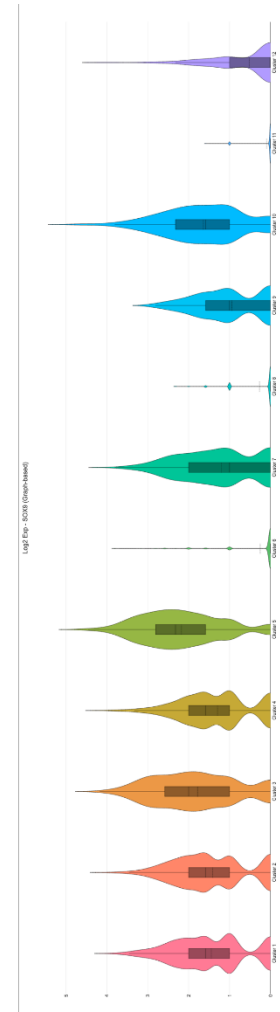
ETV1-KO 2



ETV1-KO 1



ETV1-KO 2



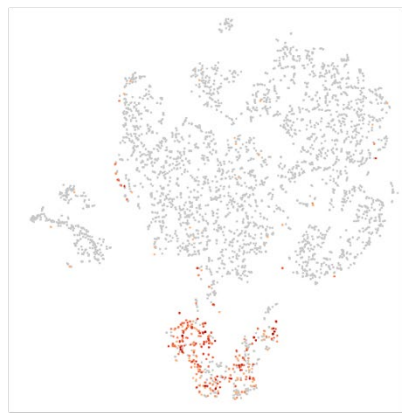
B

NGN3

Typ dziki 1

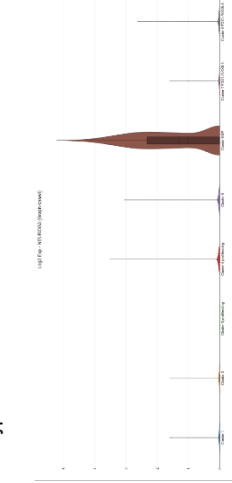


Typ dziki 2

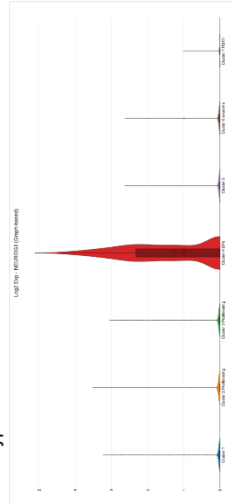


NGN3

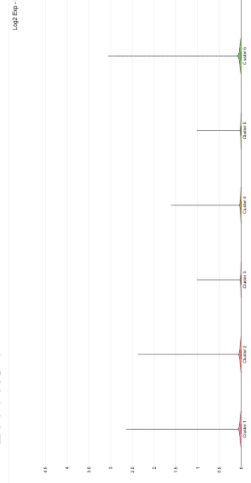
Typ dziki 1



Typ dziki 2



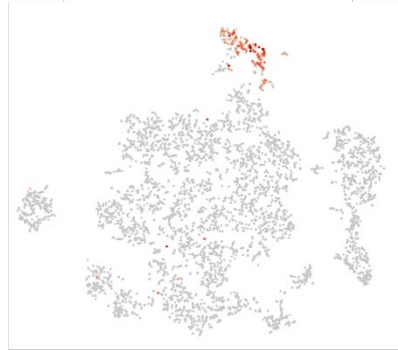
ETV1-KO 1



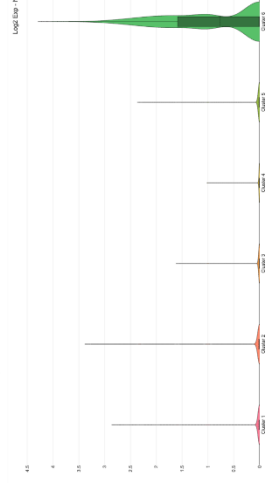
ETV1-KO 2



ETV1-KO 1



ETV1-KO 2

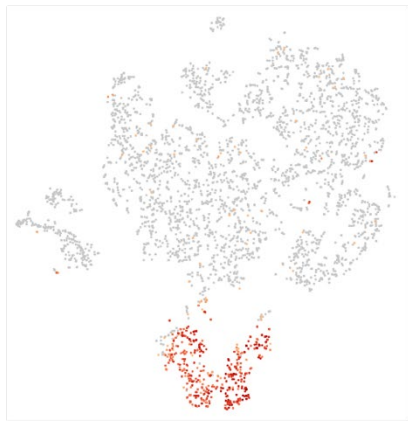


NEUROD1

Typ dziki 1

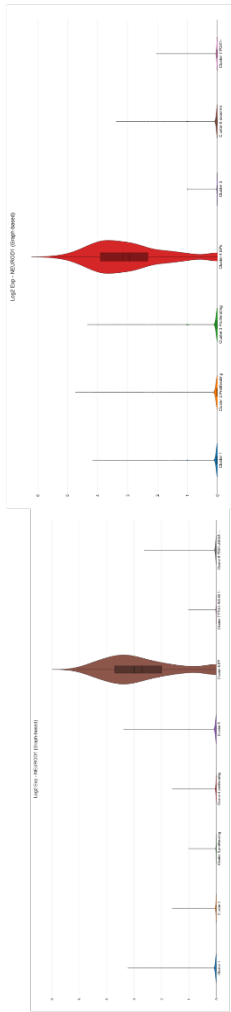


Typ dziki 2

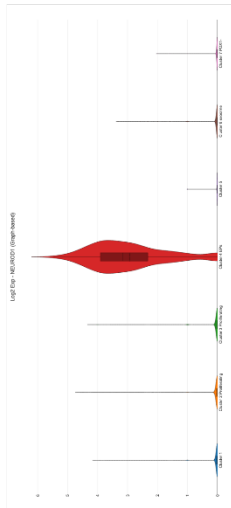


NEUROD1

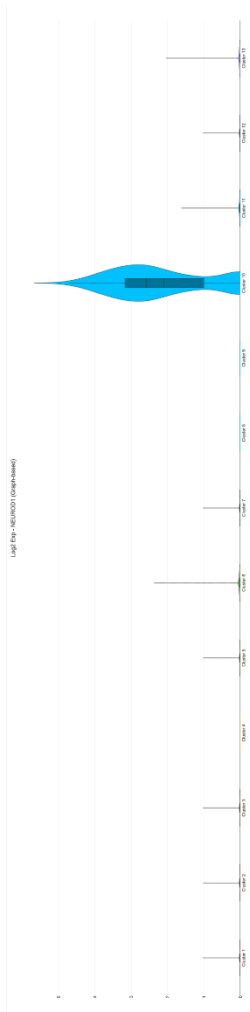
Typ dziki 1



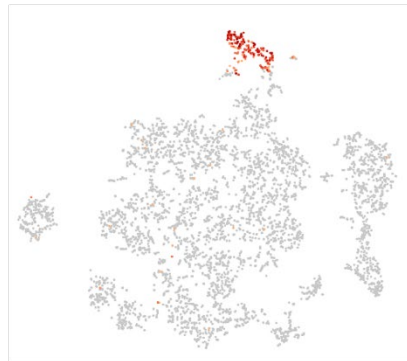
Typ dziki 2



ETV1-KO 1



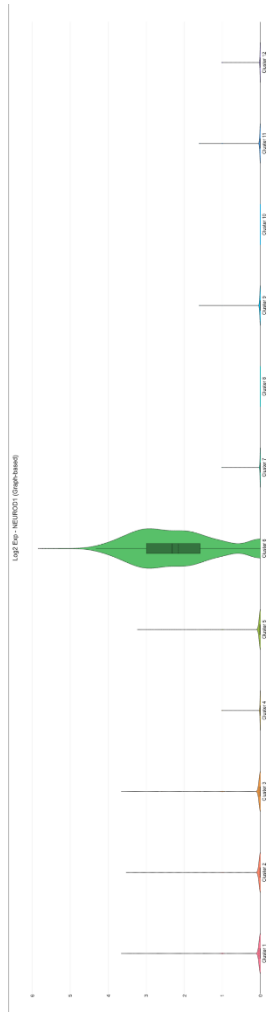
ETV1-KO 1

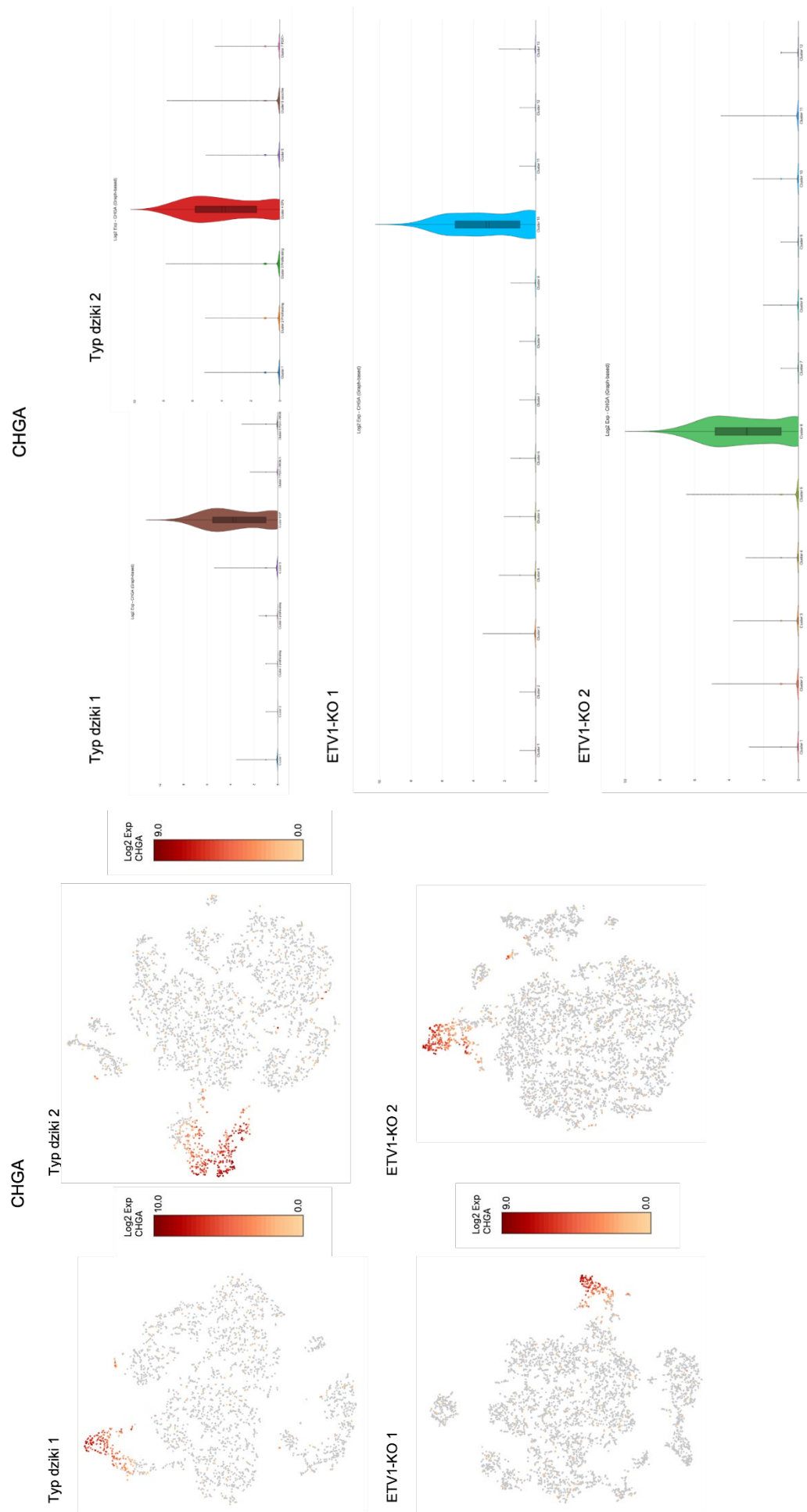


ETV1-KO 2



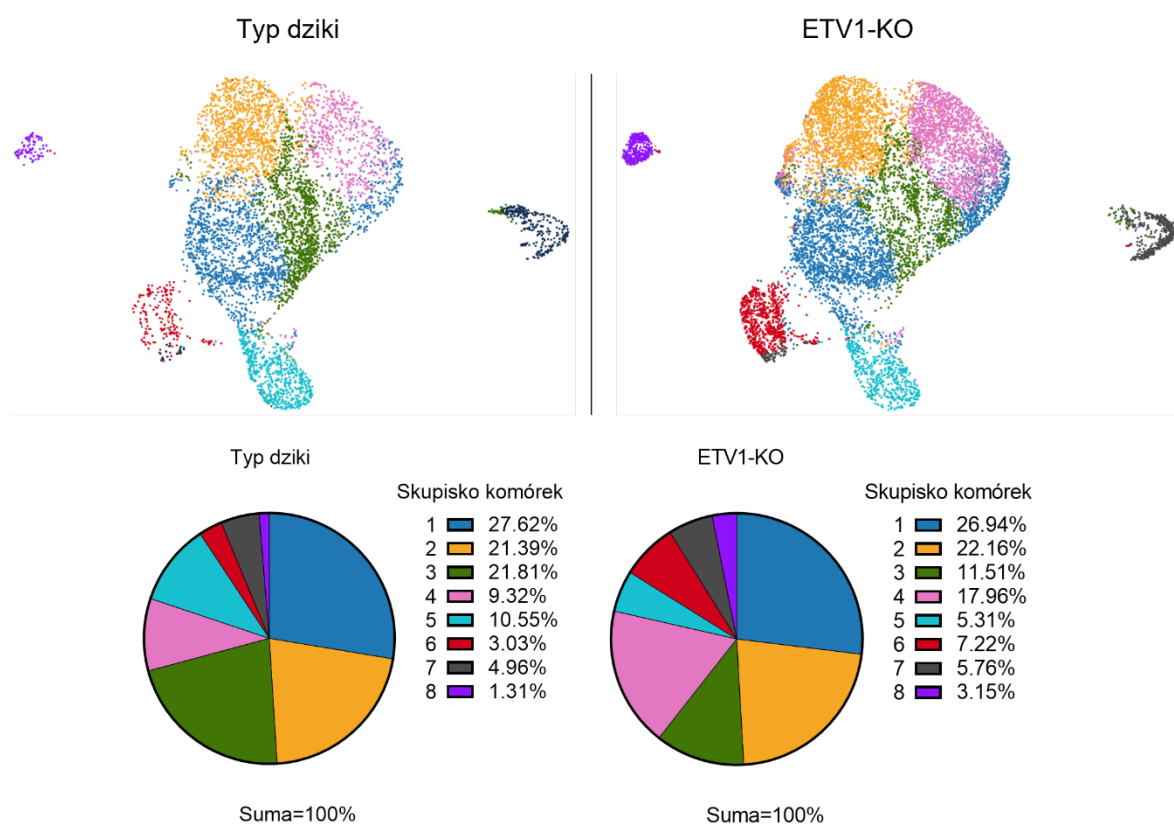
ETV1-KO 2





Rycina 63. Mapy rozkładu transkryptów w skupiskach komórek PSC ETV1-KO i typu dzikiego w 12 dniu różnicowania in vitro do komórek β trzustki. A. Markery komórek PP. B. Markery komórek EP

Następnie wykonano dalsze analizy mające na celu zidentyfikowanie różnic pomiędzy komórkami typu dzikiego i ETV1-KO w procesie specjalizacji *in vitro* do komórek β trzustki. W tym celu zestawy danych z scRNA-Seq z powtórzeń biologicznych z komórek PP typu dzikiego i ETV1-KO złączono w programie Cell Ranger z użyciem algorytmu „cellagr” i zanalizowano w programie Loupe Browser 6.2.0. Z użyciem algorytmu do wizualizacji UMAP (ang. *uniform manifold approximation and projection*) i algorytmu centroidów do grupowania (ang. *k-means*) wyodrębniono 8 skupisk komórek (ryc. 64). Na podstawie analizy procentowego rozkładu klastrów w obrębie komórek PP typu dzikiego i ETV1-KO zidentyfikowano różnice pomiędzy badanymi typami PP. Nie zaobserwowano dużej różnicy w wielkości procentowej klastra 1, 2 i 7 między komórkami PP typu dzikiego i ETV1-KO. Natomiast w przypadku skupiska 3 i 5 zidentyfikowano odpowiednio 1,9 i 2 razy mniejszy odsetek w komórkach PP ETV1-KO w porównaniu do komórek PP typu dzikiego. Z kolei zaobserwowano wzrost częstotliwości występowania skupiska 4, 6 i 8 o odpowiednio 1,9, 2,4 i 2,4 razy w komórkach PP ETV1-KO względem typu dzikiego.

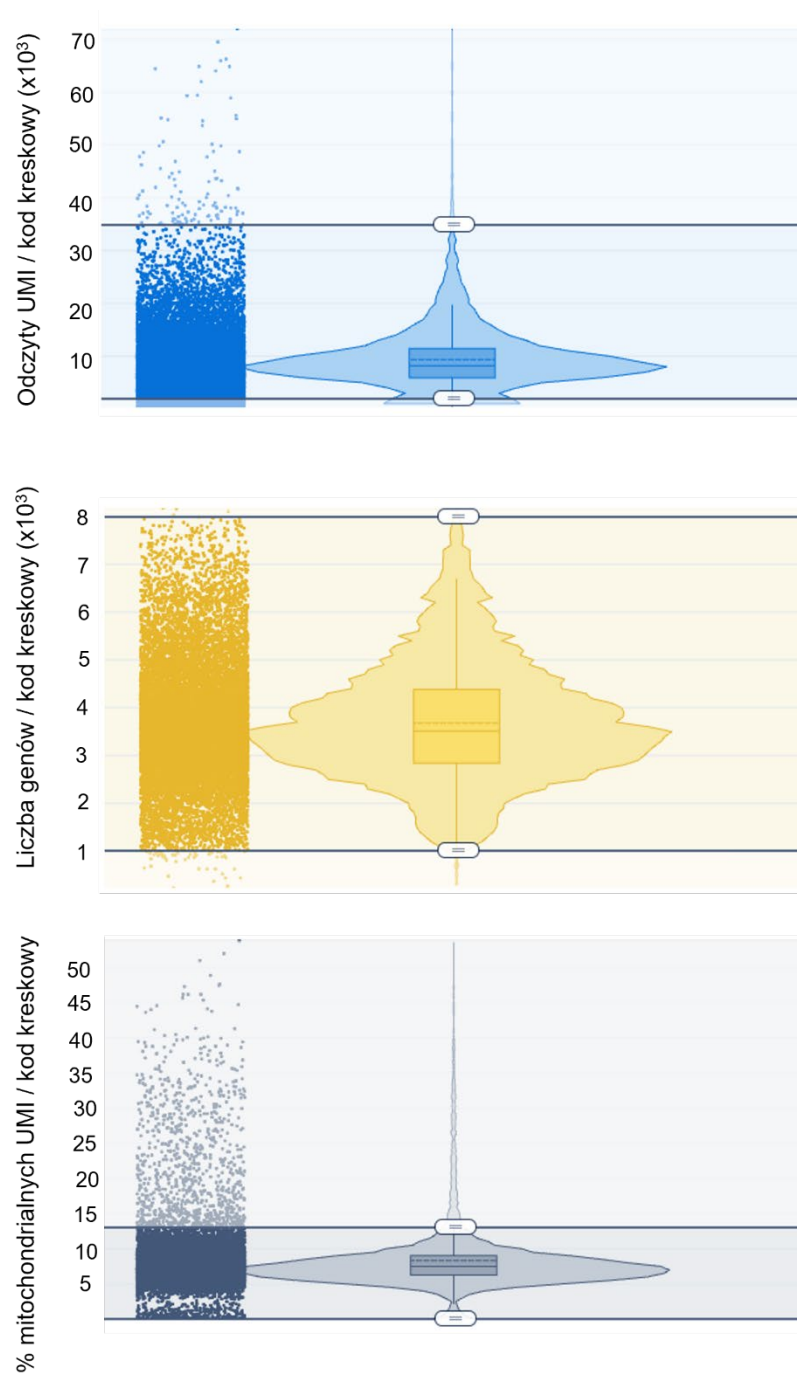


Rycina 64. Wizualizacja zidentyfikowanych klastrów z scRNA-Seq komórek PP typu dzikiego i ETV1-KO (górny panel) oraz rozkład procentowy poszczególnych klastrów wśród komórek PP typu dzikiego i ETV1-KO (dolny panel)

Ponieważ w klastrze 6 i 7 zaobserwowano wzbogacenie o transkrypty mitochondrialne, przeprowadzono ponowne grupowanie komórek za pomocą funkcji „recluster”.

Wzbogacenie o transkrypty mitochondrialne świadczy o nieżywych lub umierających komórkach i aby zwiększyć jakość danych, należy usunąć komórki wykazujące wysoki procent transkryptów mitochondrialnych. Dodatkowo używając funkcji „recluster”, możliwe jest zwiększenie jakości danych przez ustawienie progu liczby odczytów UMI oraz zidentyfikowanych genów na komórkę, gdzie zbyt duże liczby odczytów tych parametrów mogą wynikać z obecności w kropli podczas znakowania komórek więcej niż jednej komórki. Natomiast zbyt małe liczby odczytów wymienionych wyżej parametrów wskazują na nieżywe lub słabej jakości komórki.

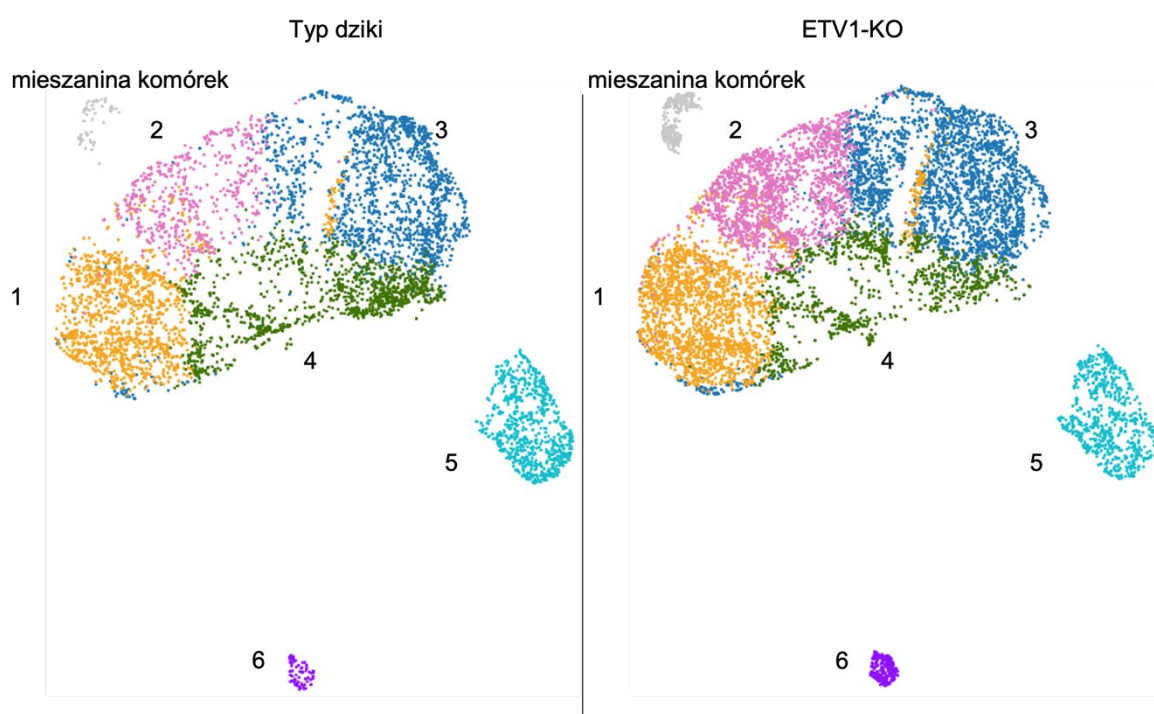
Bazując na rozkładzie liczby odczytów UMI, zidentyfikowanych genów i transkryptów mitochondrialnych, ustawiono wartości progowe wspólne dla komórek PP typu dzikiego i ETV1-KO. Do dalszej analizy wzięto komórki wykazujące od 2000 do 35000 odczytów UMI na kod kreskowy (odzwierciedlający jedną komórkę) oraz od 1000 do 8000 zidentyfikowanych genów na kod kreskowy (odzwierciedlający jedną komórkę). Ponadto górną granicę frakcji mitochondrialnej ustawiono na 13% (**ryc. 65**). Ponowne grupowanie komórek spowodowało redukcję liczby kodów kreskowych, inaczej pojedynczych komórek, o 13,9% z początkowej liczby 16209 komórek do 13951 komórek (łącznie typu dzikiego i ETV1-KO).



Rycina 65. Procedura ponownego grupowania unikatowych kodów kreskowych uzyskanych z analizy scRNA-Seq komórek PP typu dzikiego i ETV1-KO. Wartości progowe dla liczby odczytów UMI przypadających na kod kreskowy (pojedynczą komórkę) ustawiono na zakres 2000 – 35000 odczytów (górną wykreś); wartości progowe dla liczby zidentyfikowanych genów przypadających na kod kreskowy (pojedynczą komórkę) ustawiono na zakres 1000 – 8000 genów (środkowy wykres); wartość progową frakcji transkryptów mitochondrialnych przypadającą na kod kreskowy (pojedynczą komórkę) ustawiono na 13% (dolny wykres)

Procedura ponownego grupowania spowodowała usunięcie z analizy klastrów 6 i 7, które wykazywały wysoką ekspresję transkryptów mitochondrialnych.

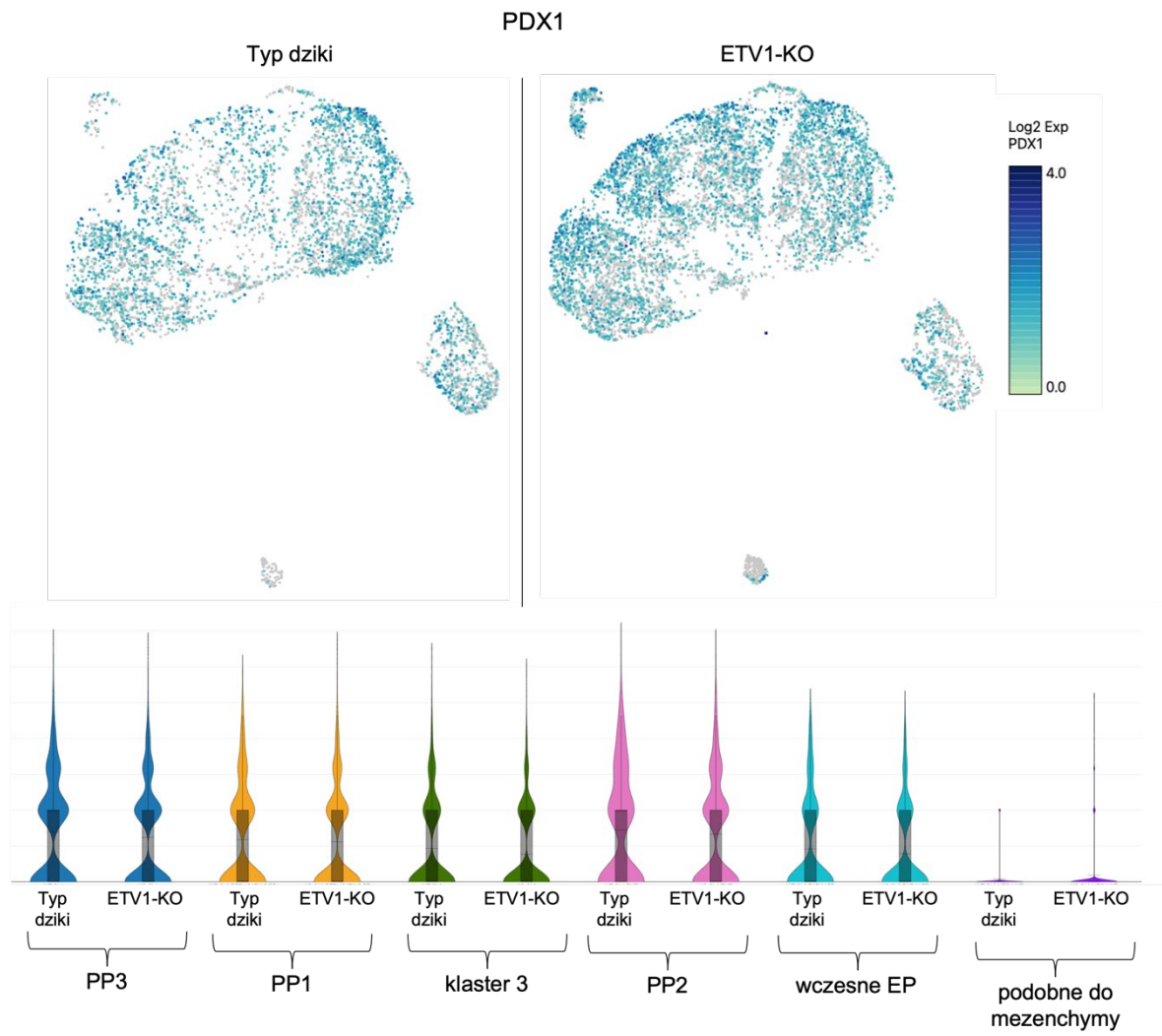
Następnie ponownie określono procentowość wyodrębnionych frakcji w próbie komórek PP typu dzikiego i ETV1-KO oraz na podstawie analizy wzbogacenia o specyficzne transkrypty zidentyfikowano i nazwano poszczególne klastry (ryc. 66).



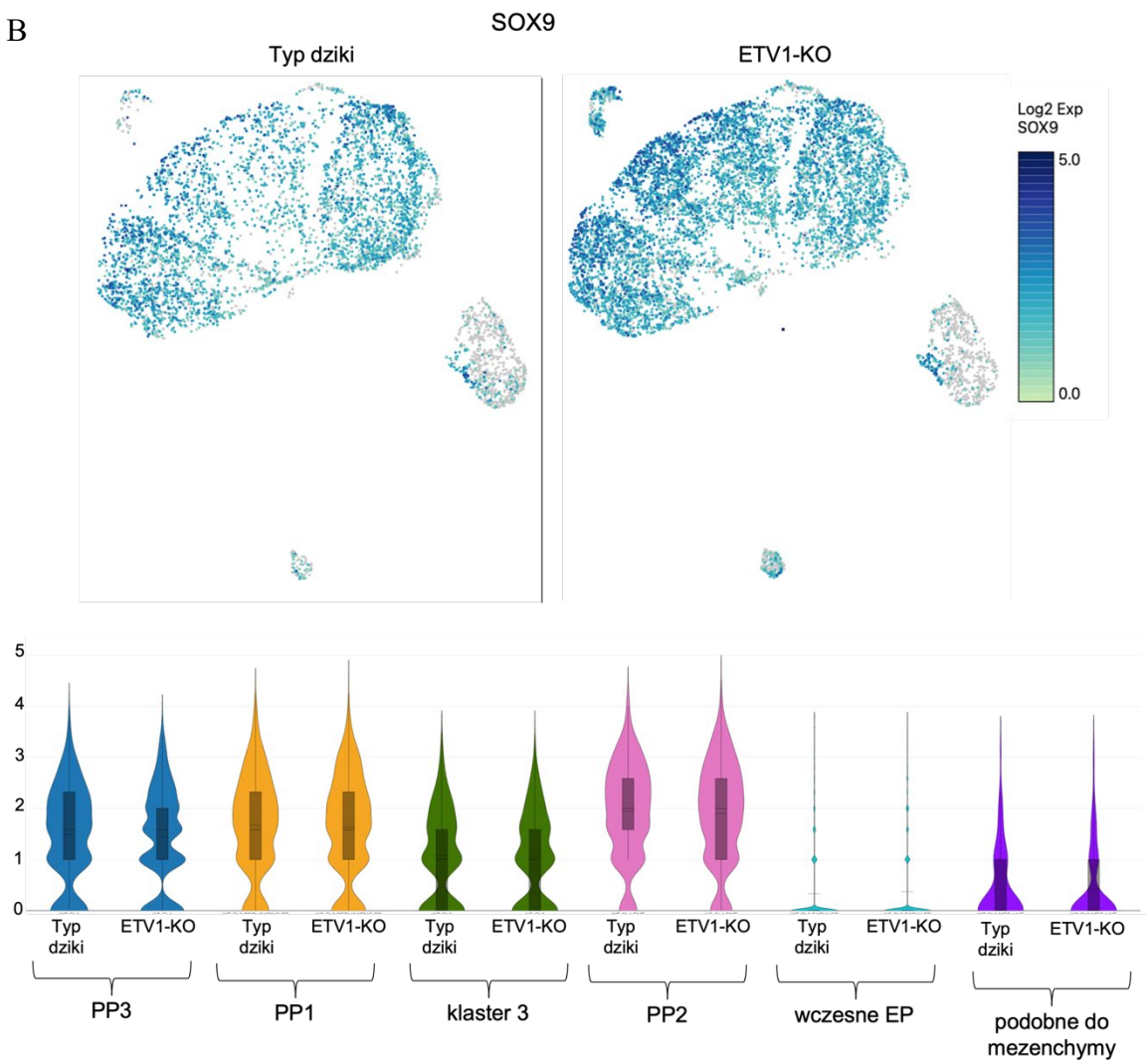
Rycina 66. Wizualizacja zidentyfikowanych klastrów z *scRNA-Seq* komórek PP typu dzikiego i ETV1-KO po przegrupowaniu klastrów i usunięciu komórek wzbogaconych o transkrypty mitochondrialne

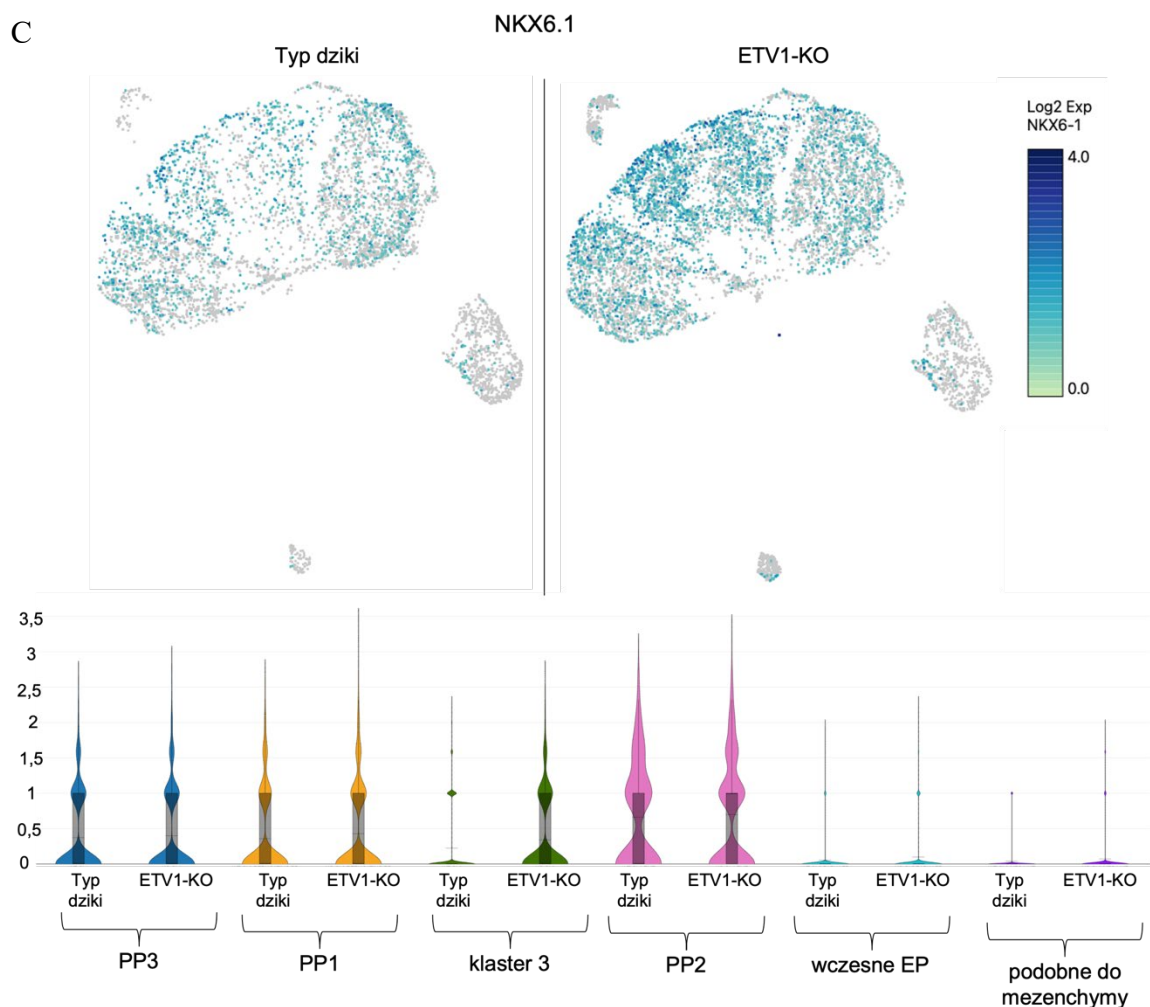
W pierwszej kolejności określono profil występowania markerów specyficznych dla komórek PP. Obecność transkryptu PDX1 zaobserwowano w klastrach 1, 2, 3, 4 i 5 na podobnym poziomie w komórkach typu dzikiego i ETV1-KO. Natomiast obecność transkryptu SOX9 zidentyfikowano w klastrach 1, 2, 3, 4 i 6. Ponadto transkrypt NKX6-1, marker zaawansowanych komórek PP, zaobserwowano w klastrze 1, 2, 3 i 4. Klastry wykazujące równoczesną obecność transkryptów charakterystycznych dla komórek PP: PDX1 i SOX9 nazwano odpowiednio PP1, PP2 i PP3. Prócz tego powyższe obserwacje potwierdzają, że komórki PSC typu dzikiego oraz ETV1-KO zróżnicowano *in vitro* do komórek PP (ryc. 67).

A



B



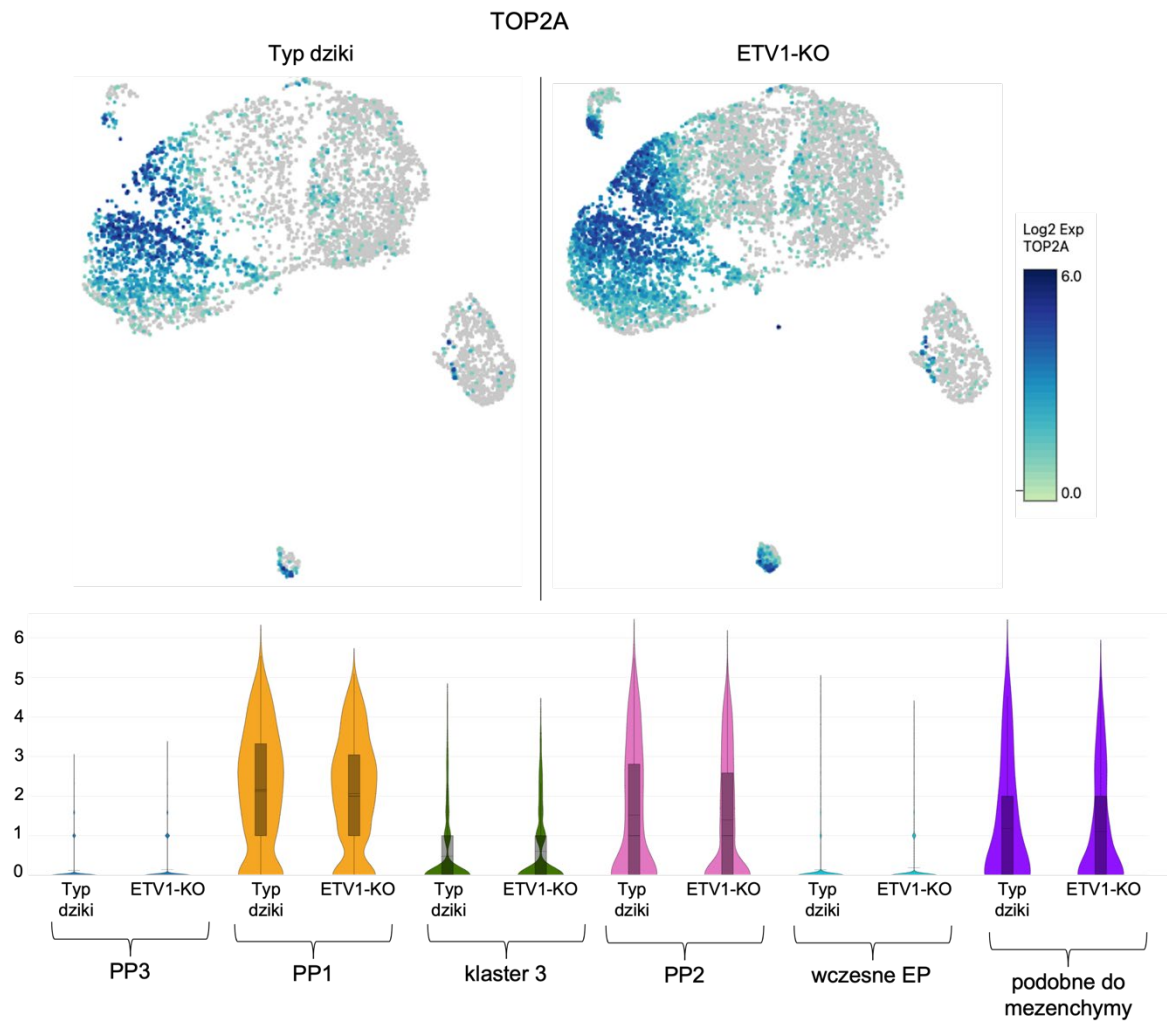


Rycina 67. Mapy rozkładu transkryptów *PDX1* (A), *SOX9* (B) i *NKX6-1* (C) w skupiskach komórek PP typu dzikiego i *ETV1-KO*

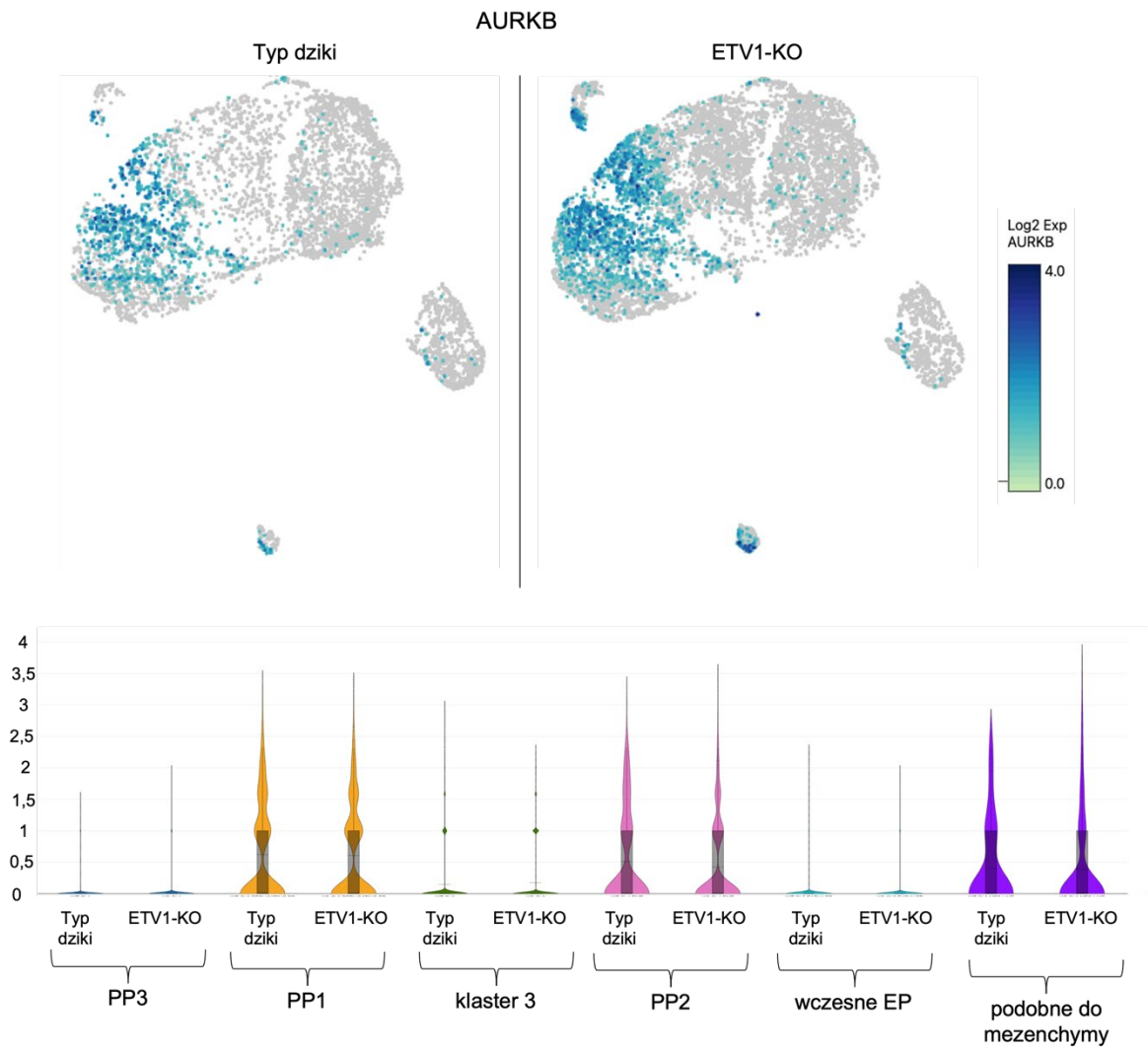
Następnie, na podstawie analizy zróżnicowanej ekspresji transkryptów porównującej poszczególne klastry oraz analizy wzbogacenia terminów funkcjonalnych używając programu DAVID, określono rodzaj poszczególnych skupisk.

W klastrze 1 zaobserwowano wzbogacenie o transkrypty, których funkcja jest związana z procesami biologicznymi, takimi jak mitozą ($p < 0,001$), cykl komórkowy ($p < 0,001$) czy tworzenie wrzecion podziałowych ($p < 0,001$). Na podstawie specyficznej obecności markerów podziału komórki i cyklu komórkowego, takich jak topoisomeraza DNA II α (*TOP2A*, ang. *DNA topoisomerase II α*) ($p < 0,001$), kinaza aurora B (*AURKB*, ang. *aurora kinase B*) ($p < 0,001$) oraz marker proliferacji Ki-67 (*MKI67*, ang. *marker of proliferation ki-67*) ($p < 0,001$) skupisko PP1 określono jako komórki PP proliferujące. Obecność transkryptów *TOP2A*, *AURKB* oraz *MKI67* zaobserwowano również w skupiskach PP2 oraz podobnych do mezenchymy, jednakże poziom ekspresji w tych klastrach nie był statystycznie wyższy od innych wyodrębnionych skupisk (ryc. 68).

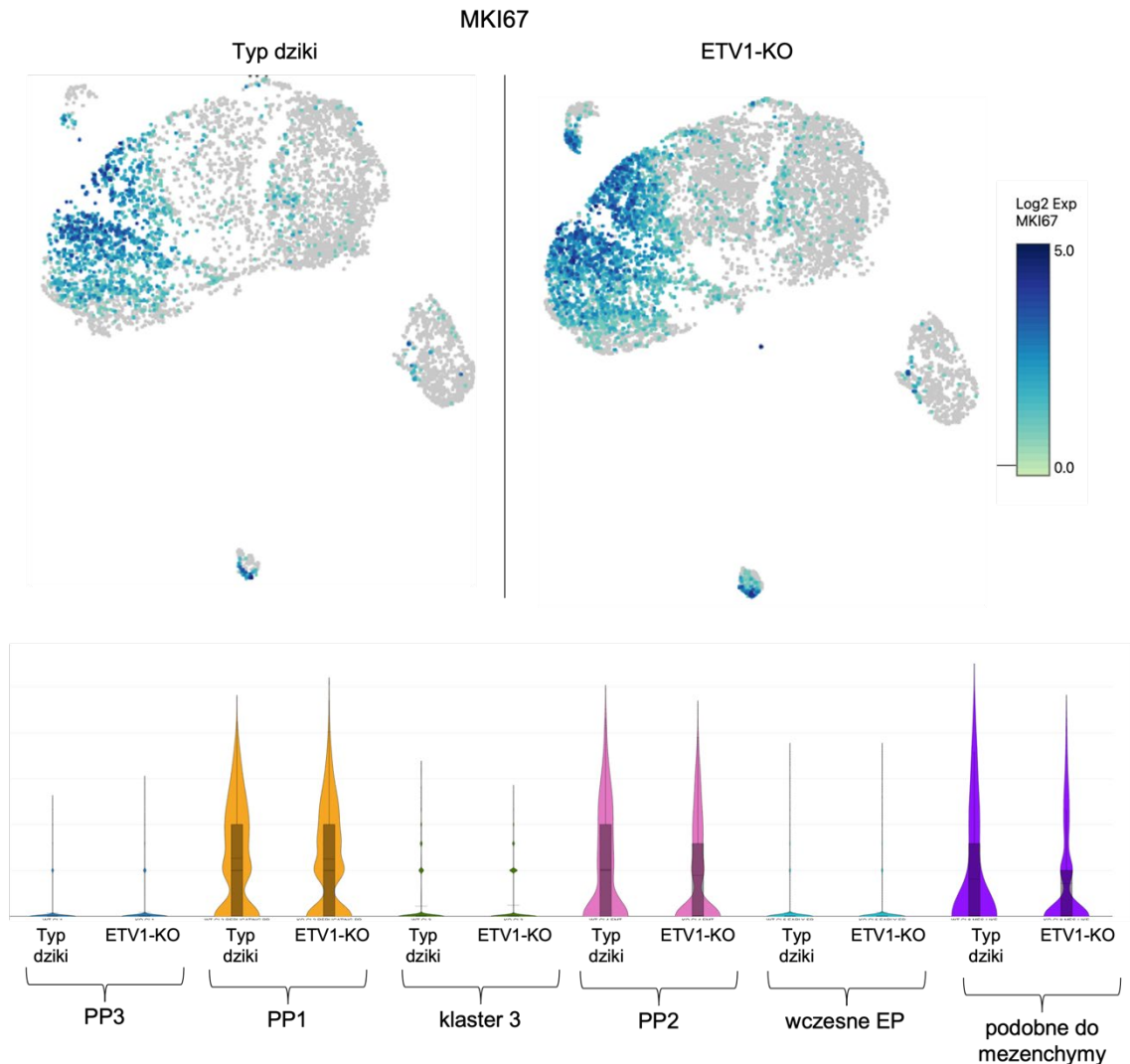
A



B



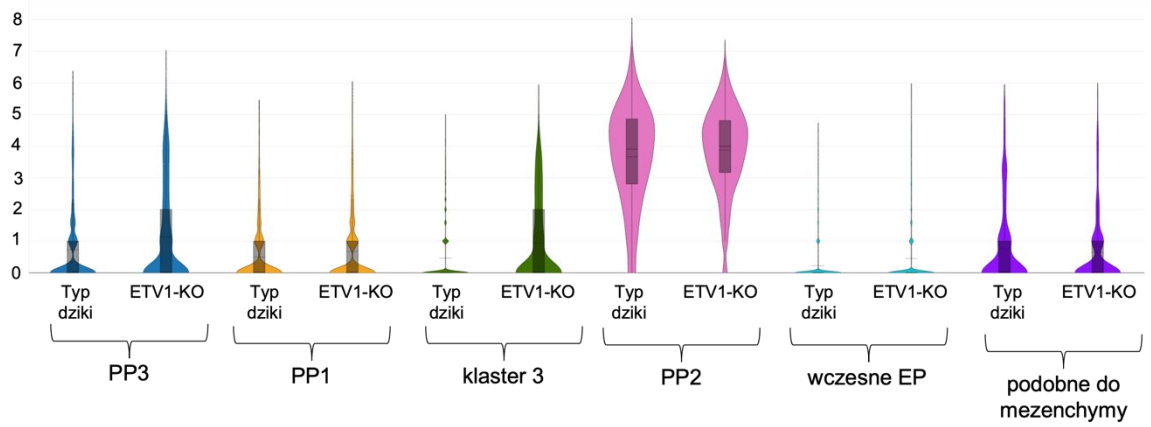
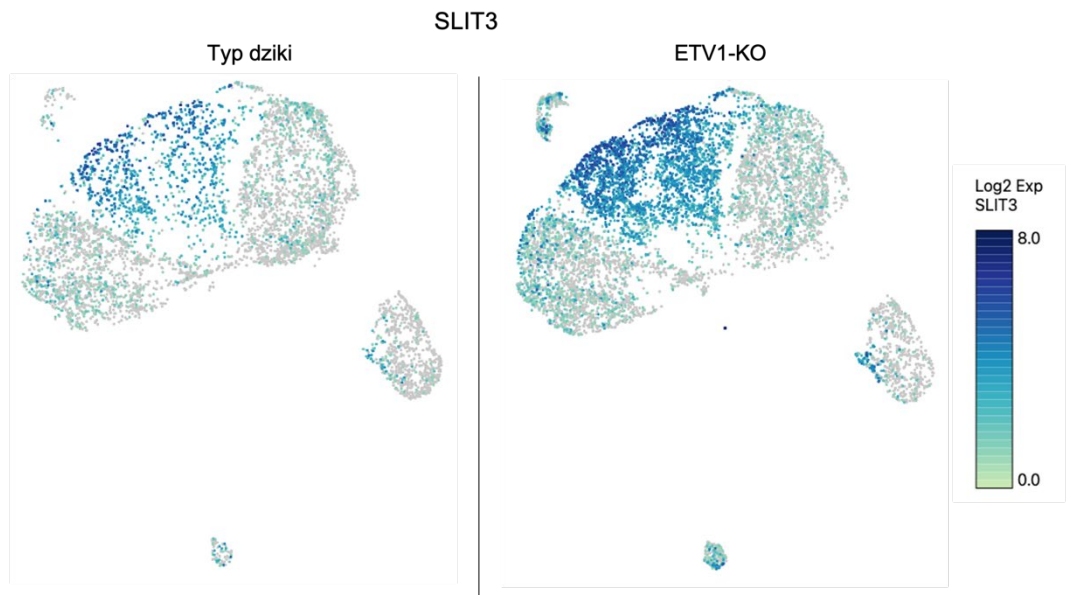
C



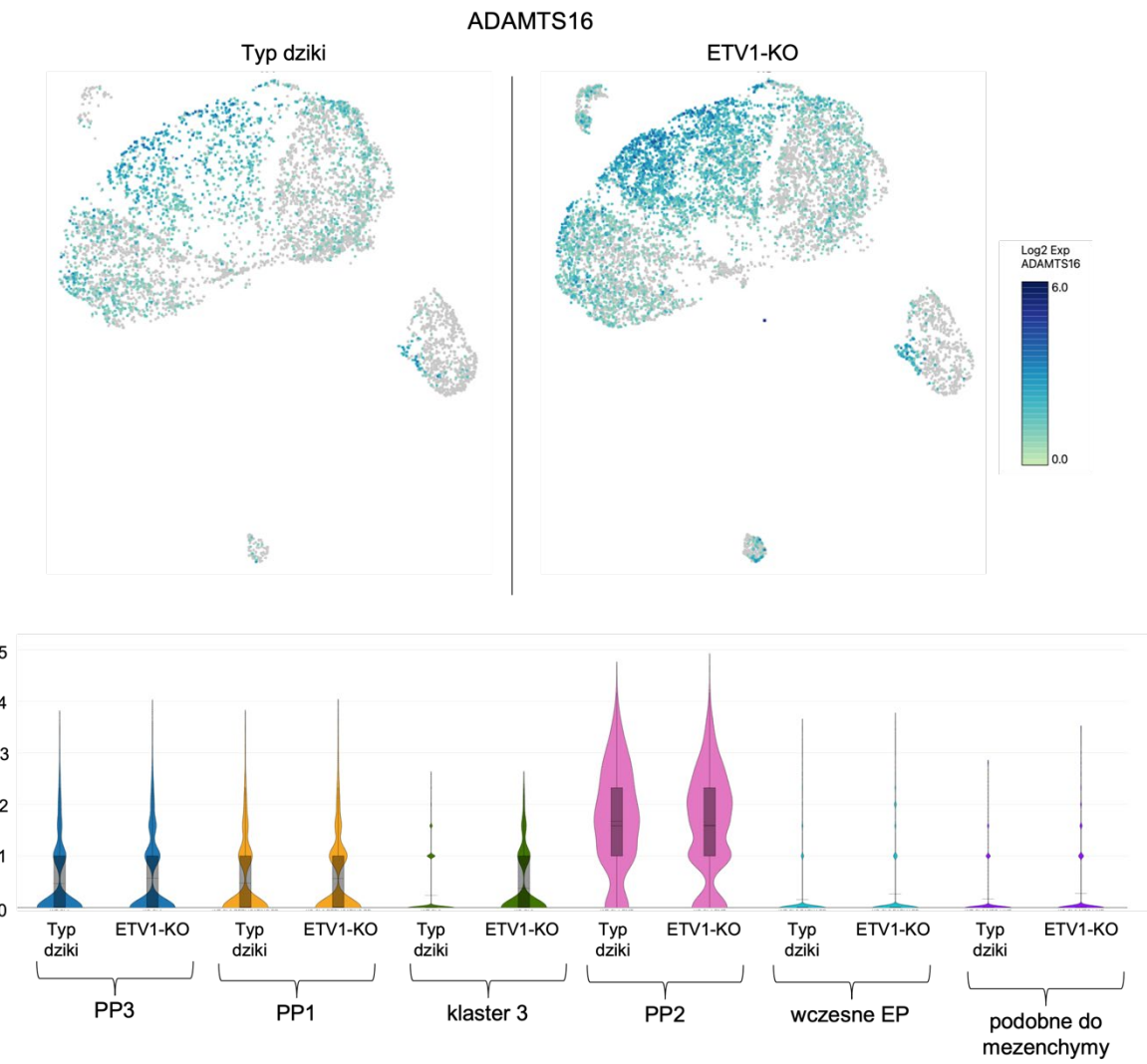
Rycina 68. Mapy rozkładu transkryptów *TOP2A* (A), *AURKB* (B) i *MKI67* (C) w skupiskach komórek PP typu dzikiego i *ETV1-KO*, które charakteryzują komórki proliferujące

Następnie, na podstawie statystycznie istotnie podwyższonych poziomów transkryptów scharakteryzowano wzbogacone terminy funkcjonalne w klastrze PP2. Analizy w programie DAVID pozwoliły stwierdzić, że skupisko PP2 charakteryzuje się podwyższonym poziomem transkryptów biorących udział między innymi w migracji komórek, sygnalizacji PI3K/AKT ($p < 0,001$), sygnalizacji Hippo ($p < 0,001$) czy interakcje z ECM ($p < 0,001$). Na tej podstawie stwierdzono, że klaster PP2 reprezentowany jest przez komórki podczas migracji, a przykłady podwyższonych transkryptów w klastrze PP2, które związane są z regulacją migracji komórek, to białko homologu szczeliny 3 (SLIT3, ang. *slit guidance ligand 3*) ($p < 0,001$), metalopeptydaza ADAM z motywem trombospondyny typu 1/16 (ADAMTS16, ang. *ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 16*) ($p < 0,001$) i PIK3AP ($p < 0,001$) (ryc. 69).

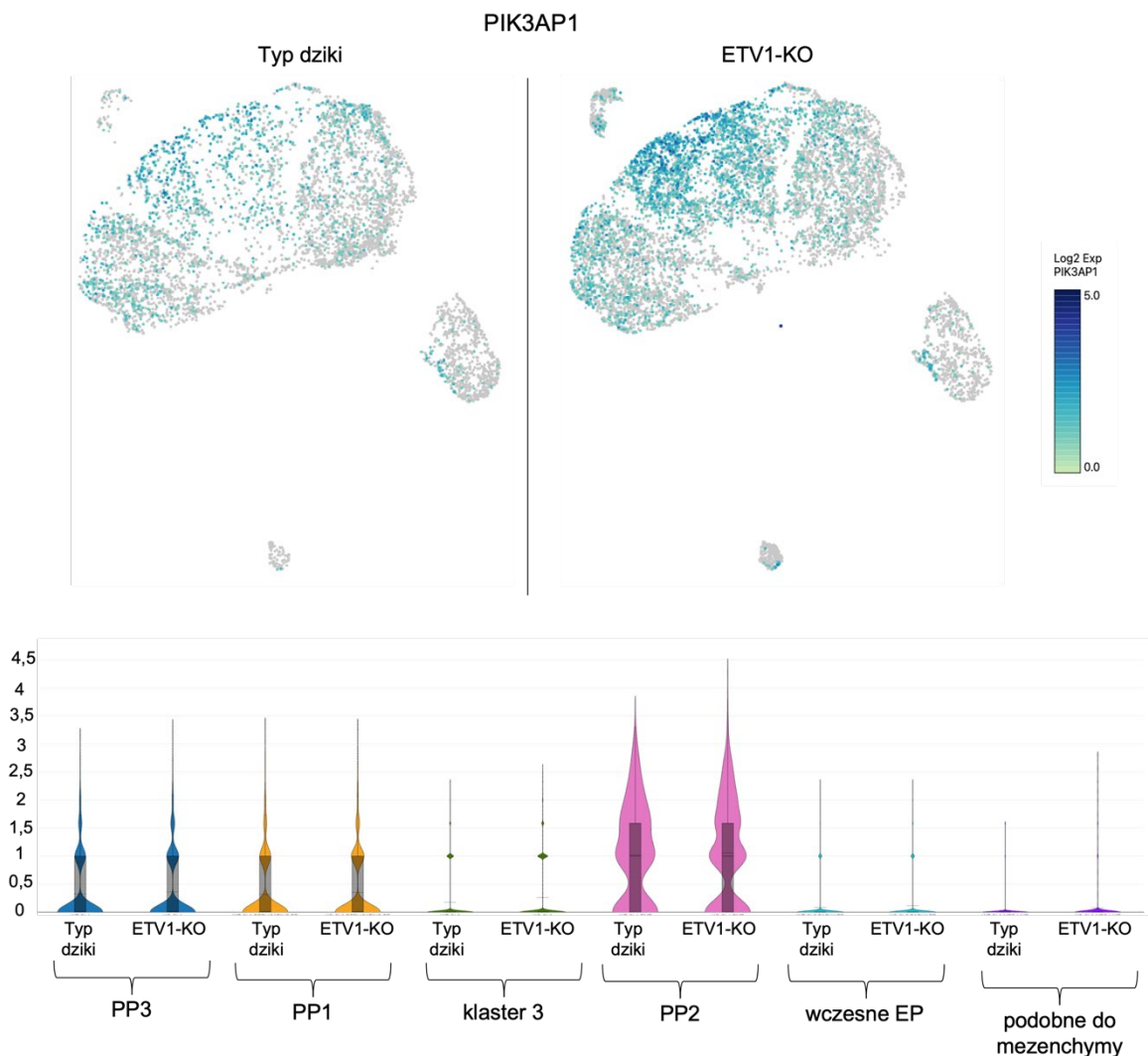
A



B



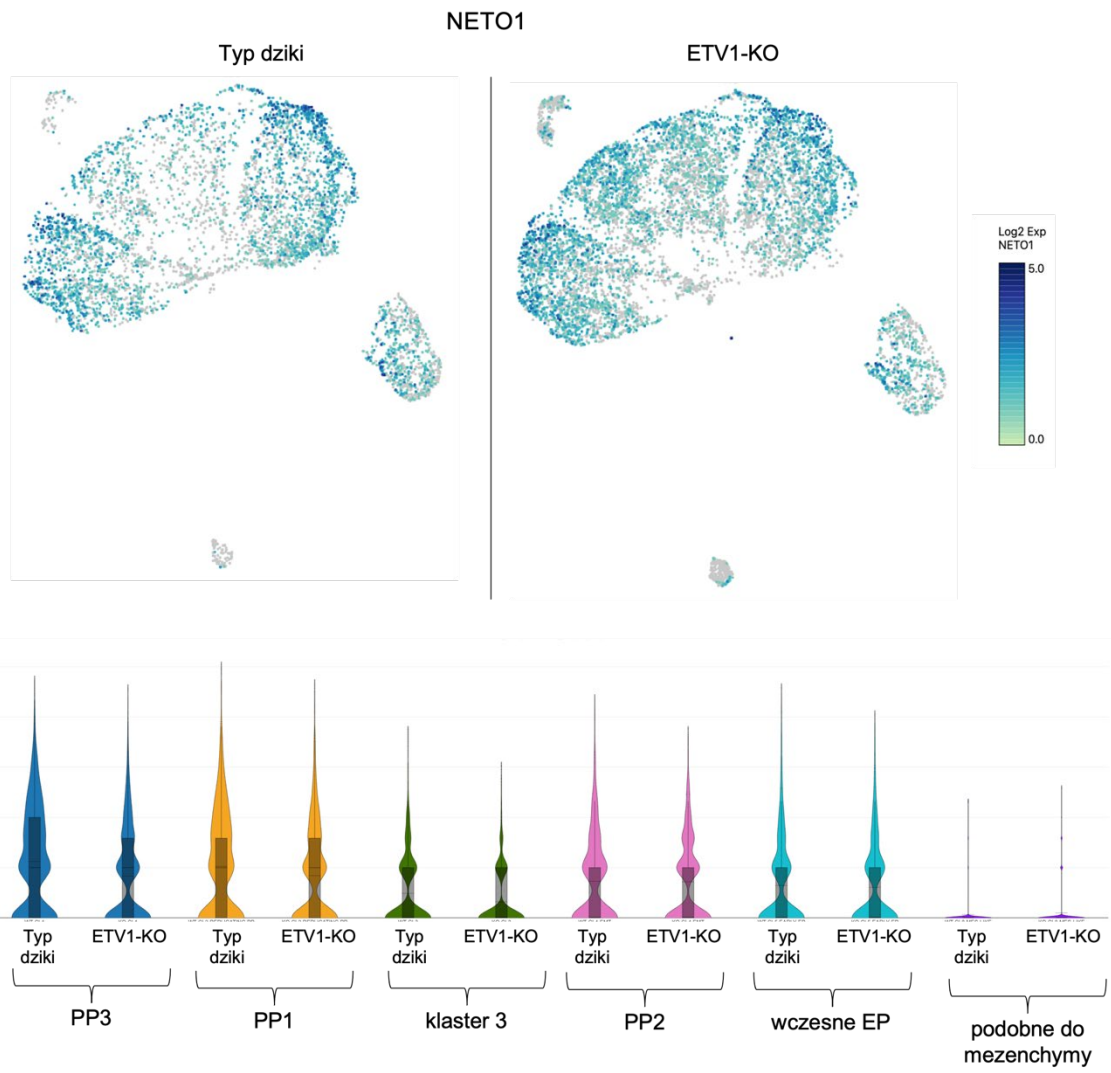
C



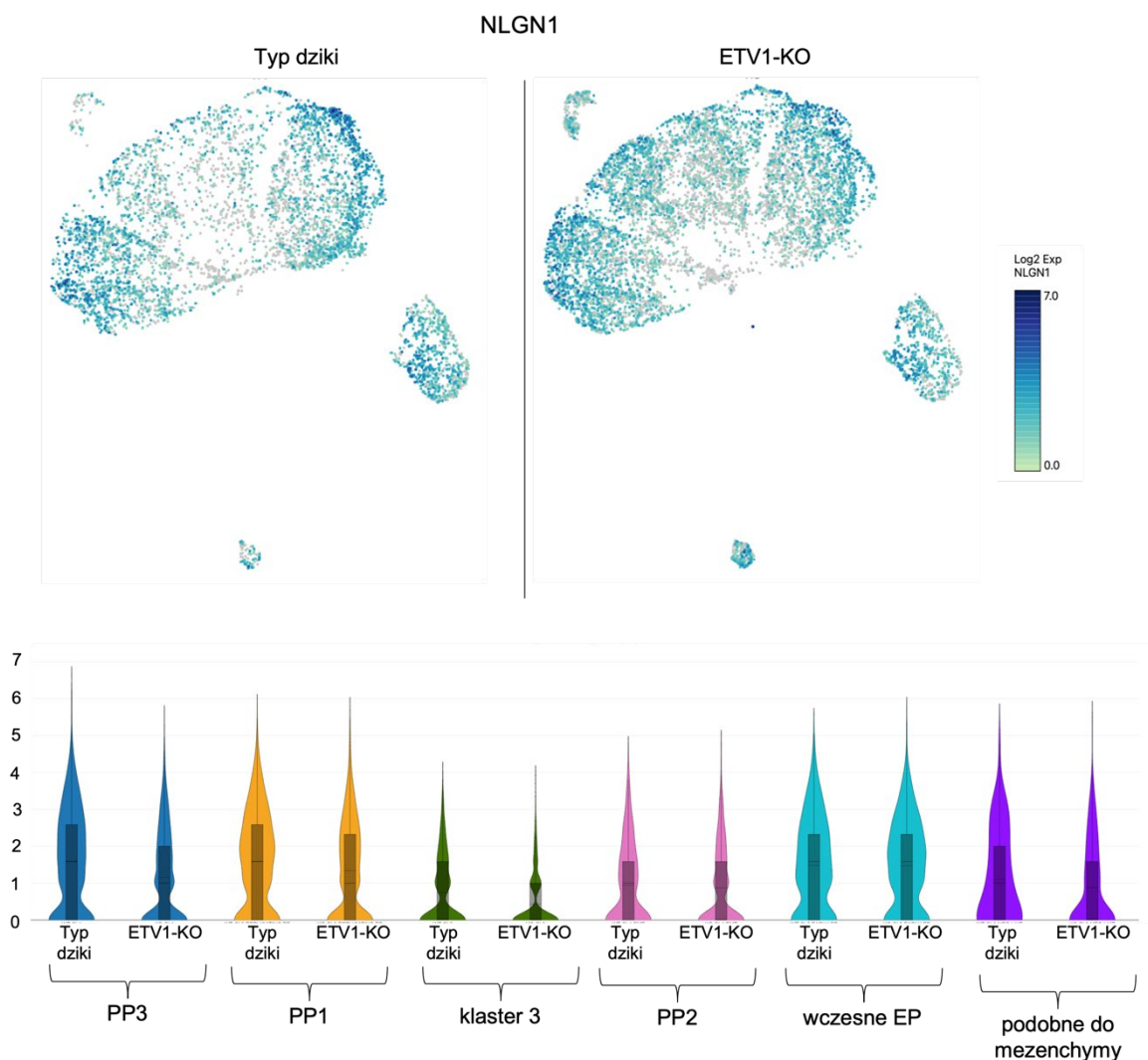
Rycina 69. Mapy rozkładu transkryptów *SLIT3* (A), *ADAMTS16* (B) i *PIK3AP1* (C) w skupiskach komórek PP typu dzikiego i *ETV1-KO*, które regulują proces migracji komórek

Kolejnym zidentyfikowanym klastrem był klaster komórek PP3. Bazując na analizie wzbogacenia terminów funkcjonalnych stwierdzono, że komórki wchodzące w jego skład wykazują wyższą adhezję do siebie nawzajem. Mianowicie zaobserwowano wzbogacenie o terminy funkcjonalne między innymi złącza komórkowe ($p=0,01$), adhezję komórkową ($p=0,02$) czy komponenty błony komórkowej ($p=0,02$). Komórki w klastrze PP3 wykazywały istotnie statystycznie podwyższoną ekspresję transkryptów takich jak neurolegina 1 (*NLGL1*, ang. *neuroligin 1*) ($p=0,004$) czy neuropilina „tolloid like” 1 (*NETO1*, ang. *neuropilin and tolloid like 1*) ($p=0,00009$) (ryc. 70).

A



B

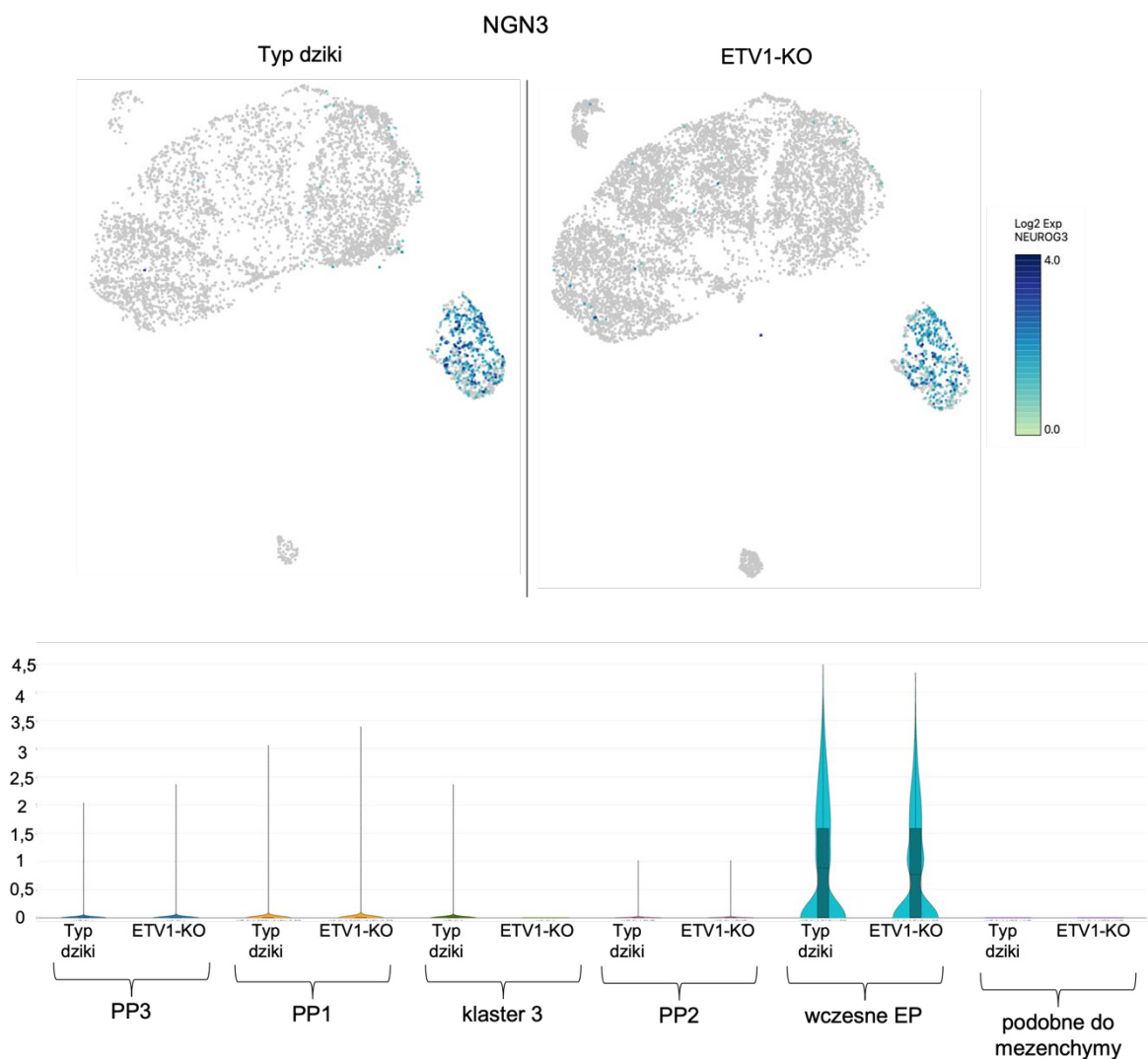


Rycina 70. Mapy rozkładu transkryptów *NETO1* (A) i *NLGN1* (B) w skupiskach komórek PP typu dzikiego i *ETV1-KO*, które regulują adhezję komórek

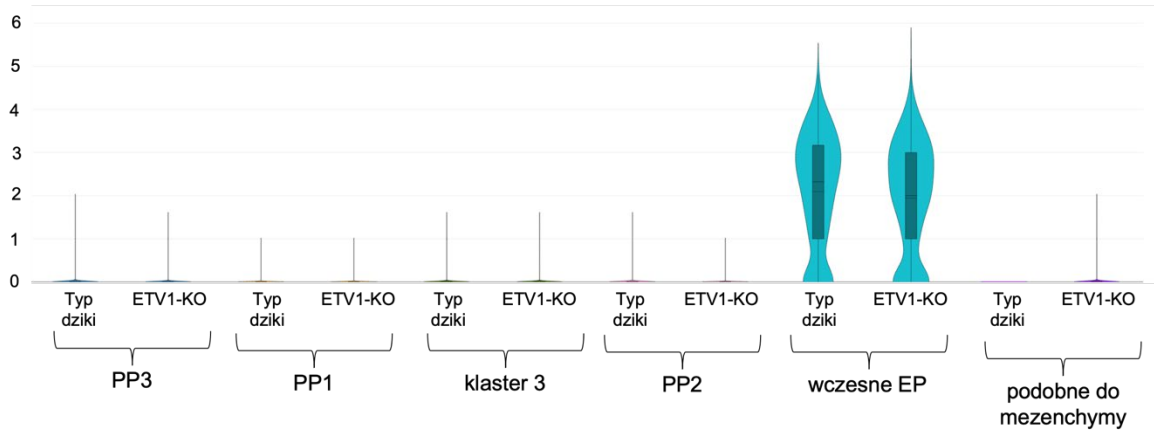
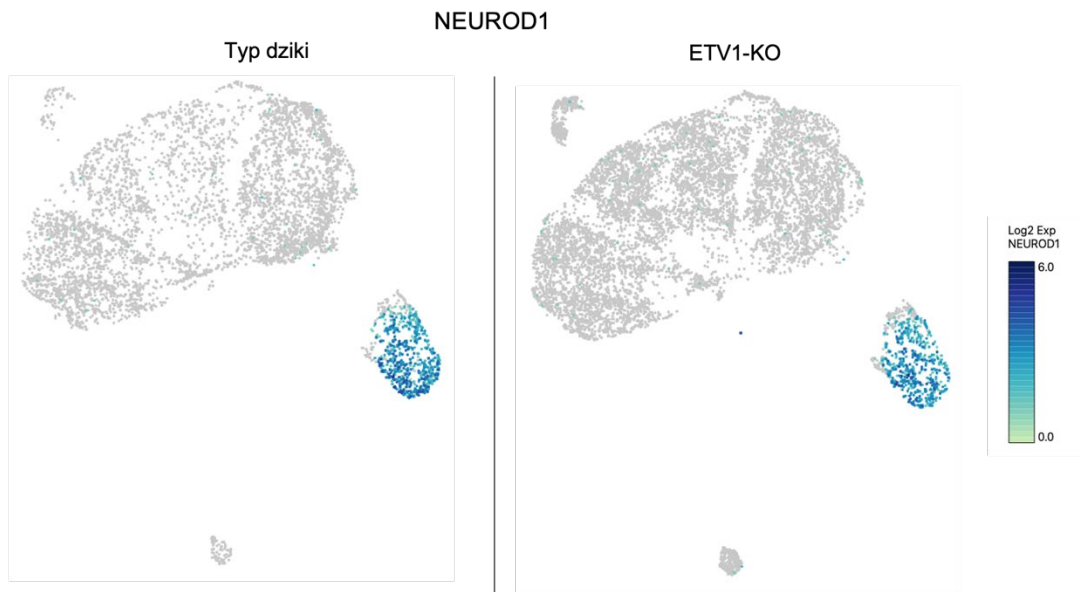
Na podstawie podwyższonej ekspresji transkryptów markerowych dla komórek EP, takich jak *NGN3* ($p < 0,001$), *NEUROD1* ($p < 0,001$) i *CHGA* ($p < 0,001$), klaster 5 określono jako wczesne EP (ryc. 71). Do prawidłowego funkcjonowania komórek β niezbędny jest czynnik transkrypcyjny *NKX6-1*, a podczas rozwoju jego ekspresja musi nastąpić w odpowiednim czasie, aby wytworzyły się funkcjonalne komórki β . Mianowicie w trakcie różnicowania *in vitro* komórki PP początkowo wykazują ekspresję *PDX1*, a następnie wykazują równoczesną ekspresję *NKX6-1*. Dopiero później następuje ekspresja *NGN3*. Jednakże przedwczesna ekspresja *NGN3* prowadzi do wytworzenia się niefunkcyjnych i polihormonalnych komórek oraz pojawienia się komórek α . W niniejszym eksperymencie na podstawie danych scRNA-Seq stwierdzono, że w klastrze wczesnych komórek EP zidentyfikowano niską ekspresję *NKX6-1*, natomiast zaobserwowano podwyższoną ekspresję markerowego transkryptu dla powstających komórek α : *ARX* (ang. *aristaless*

related homeobox) (ryc. 72). W klastrze wczesnych EP odnotowano ekspresję INS w 18,6% i 20,6% komórek odpowiednio typu dzikiego i ETV1-KO. Jednakże, tylko 3,6% komórek typu dzikiego wykazujących ekspresję INS w klastrze wczesnych EP wykazywało równoczesną obecność INS i NKX6-1. W przypadku komórek ETV1-KO charakteryzujących się obecnością INS w obrębie klastra wczesnych EP, 4,3% komórek wykazywało równoczesną ekspresję INS i NKX6-1 (ryc. 73). Na podstawie tej obserwacji można przypuszczać, że klastery wczesnych EP powstały z komórek, u których nastąpiła przedwczesna ekspresja NGN3 i prawdopodobnie nie są zdolne do dalszego zróżnicowania się do funkcjonalnych komórek β .

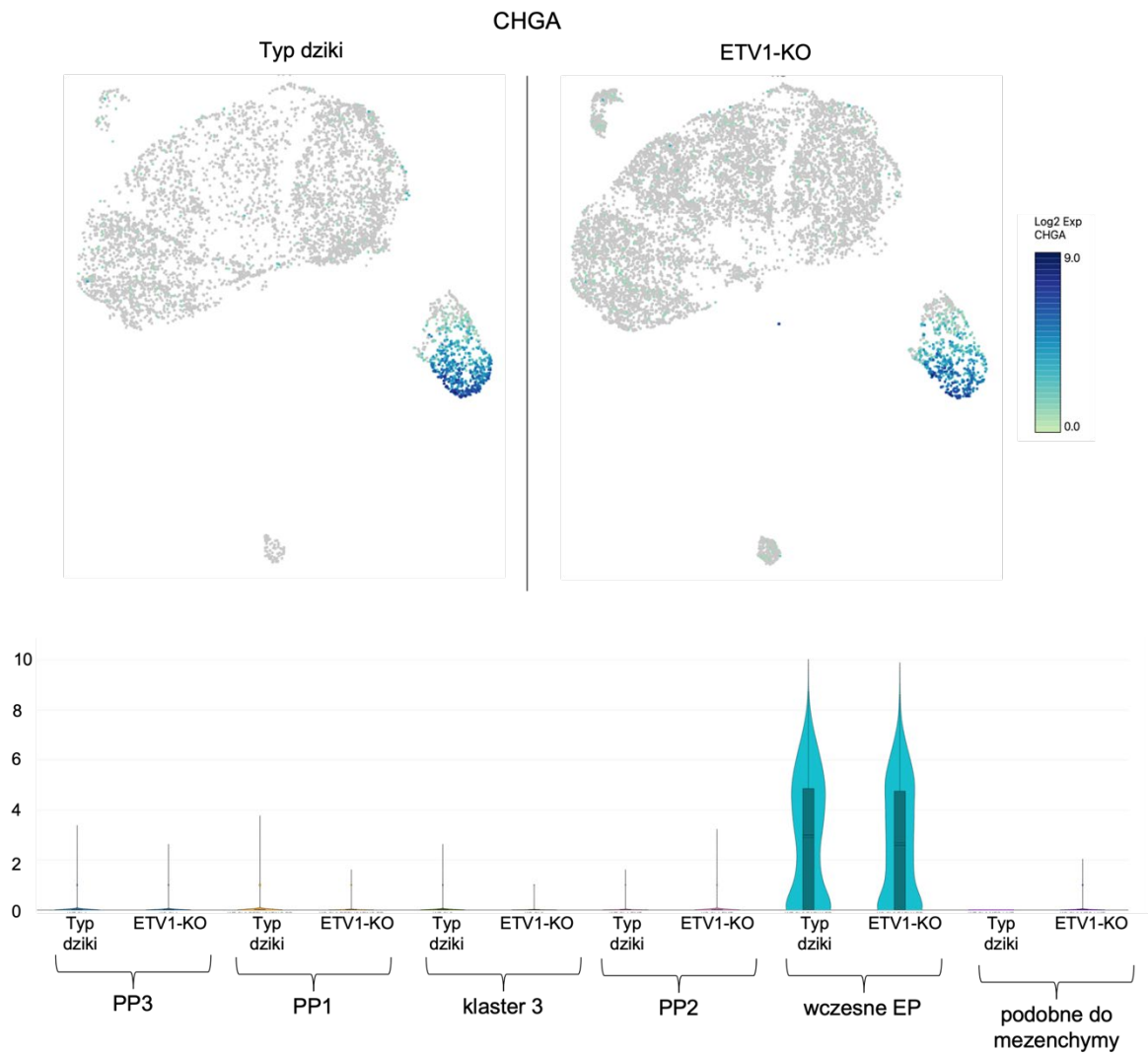
A



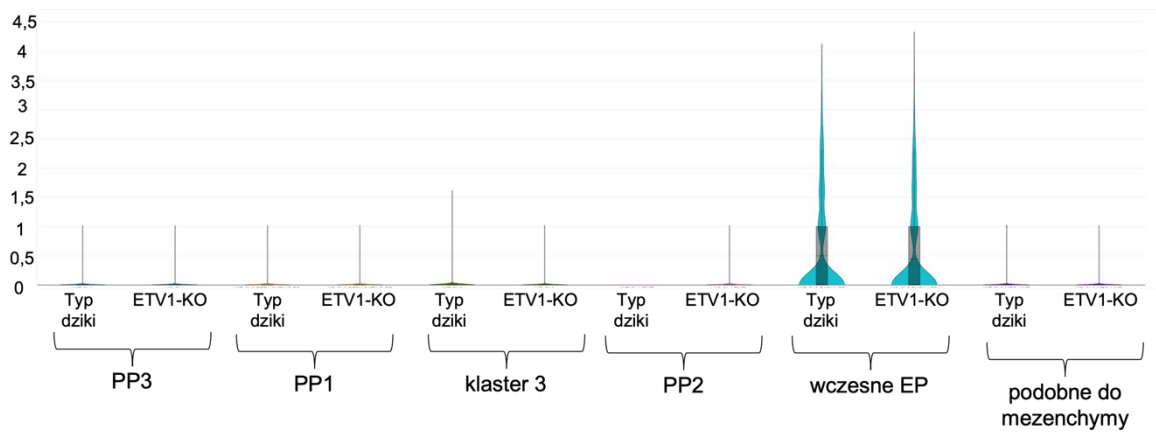
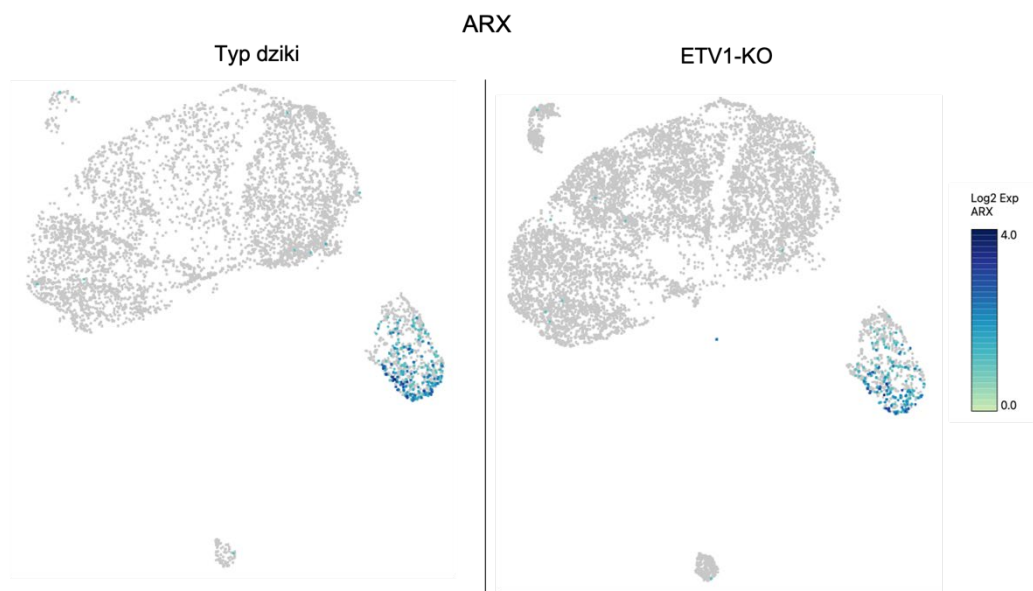
B



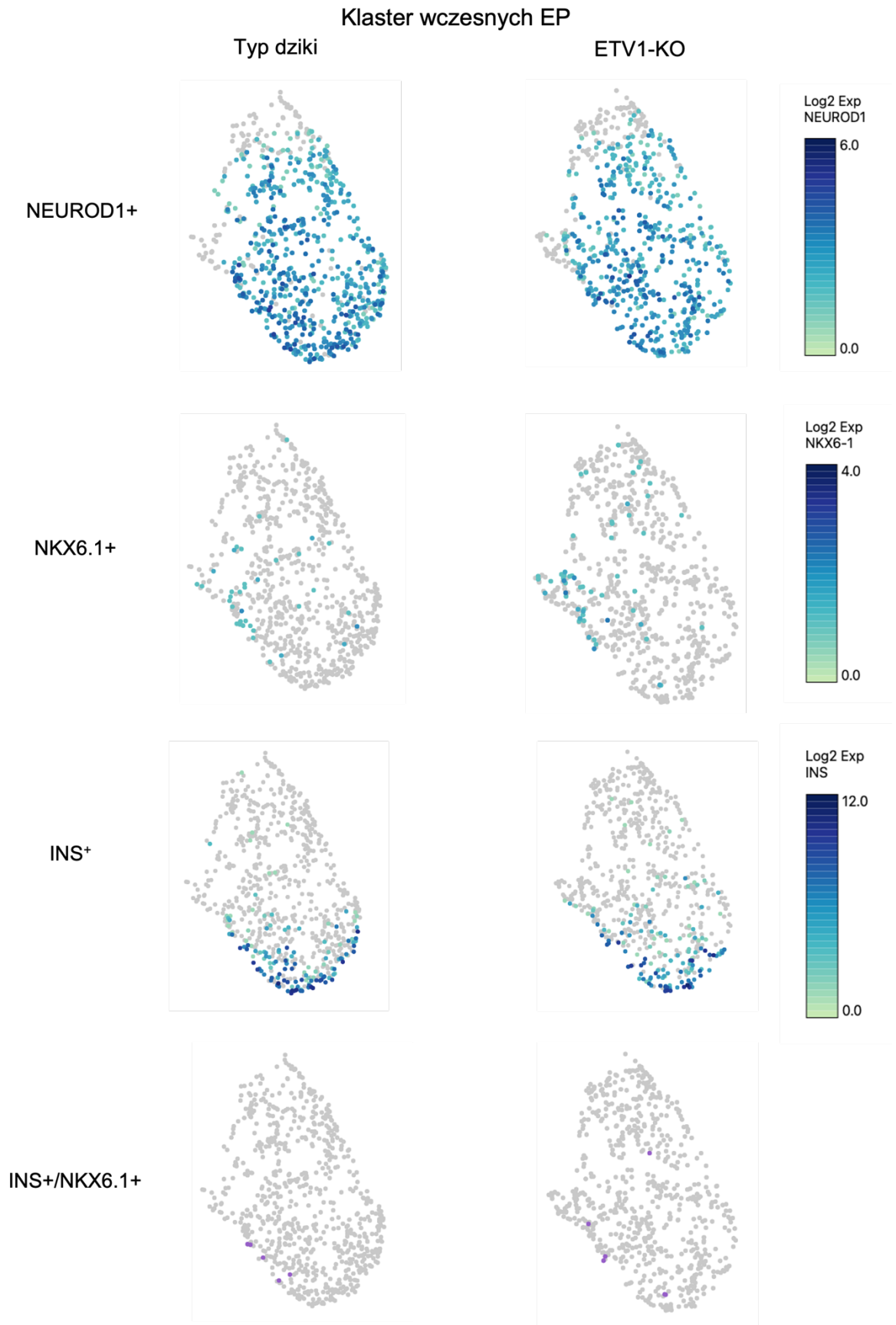
C



Rycina 71. Mapy rozkładu transkryptów *NGN3* (A) *NEUROD1* (B) i *CHGA* (C) w skupiskach komórek PP typu dzikiego i *ETV1-KO*, które charakteryzują wczesne komórki EP

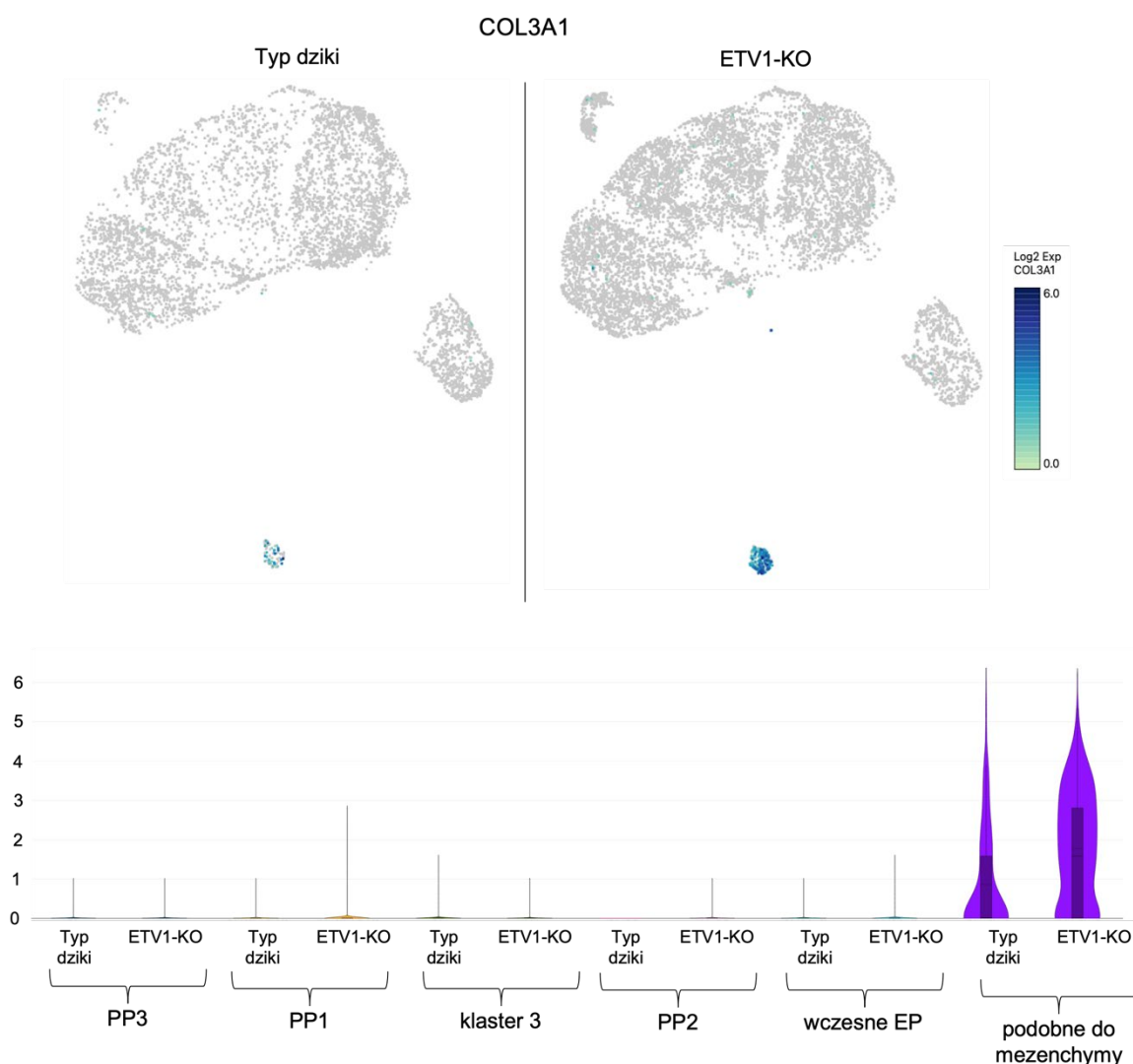


Rycina 72. Mapa rozkładu transkryptu *ARX* w skupiskach komórek PP typu dzikiego i *ETV1-KO*, który charakteryzuje powstające komórki α



Rycina 73. Porównanie rozkładu obecności transkryptów *NEUROD1*, *NKX6-1* i *INS* (trzy górne panele) oraz zaznaczone komórki wykazujące równoczesną ekspresję *INS* i *NKX6-1* (dolny panel) w klastrze wczesnych komórek EP w komórkach na stadium PP typu dzikiego i *ETV1-KO*

Dodatkowo na podstawie podwyższonego poziomu kolagen typu III $\alpha 1$ (COL3A1, ang. *collagen type III $\alpha 1$*) znanego markera mezenchymalnego, klaster 6 zidentyfikowano jako komórki podobne do mezenchymy (ryc. 74).

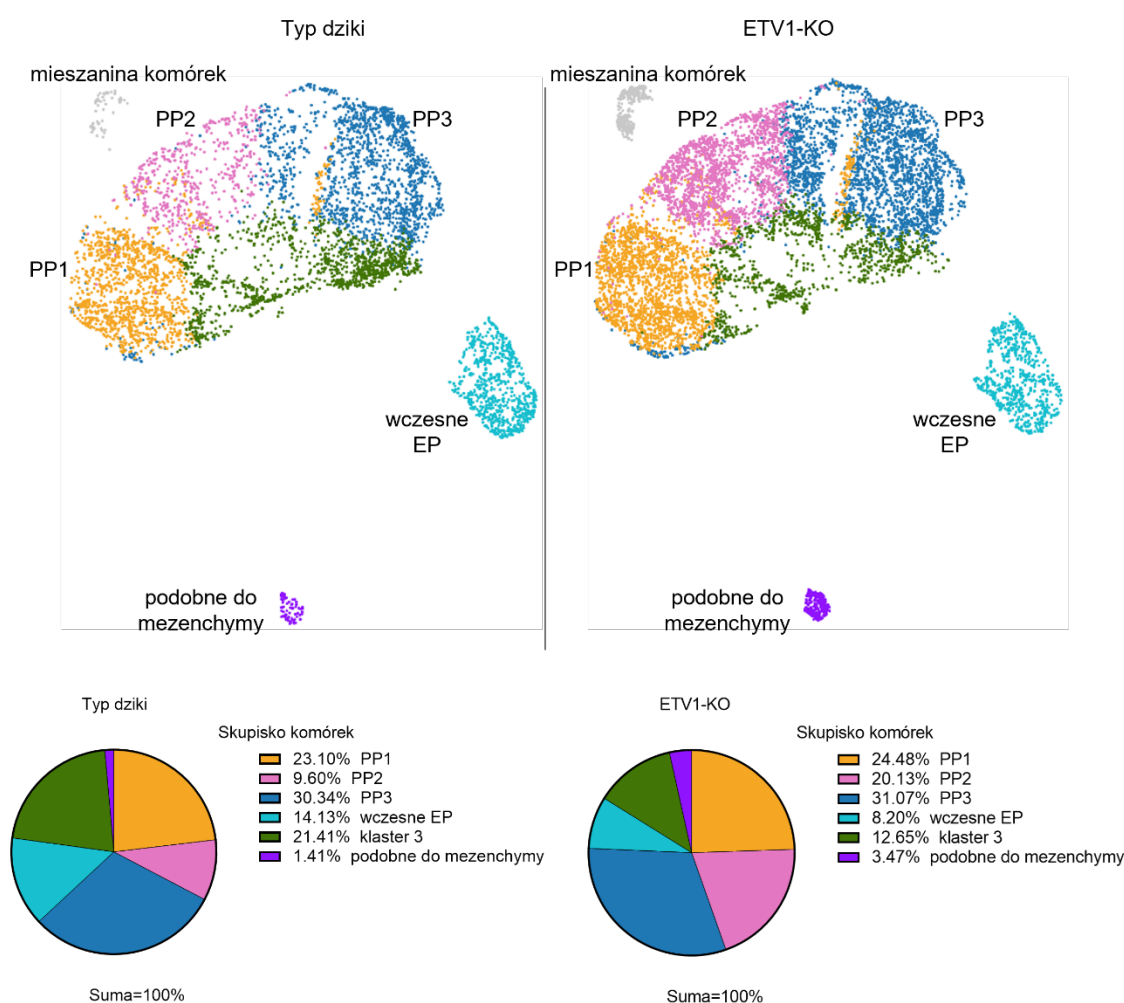


Rycina 74. Mapa rozkładu transkryptu COL3A1 w skupiskach komórek PP typu dzikiego i ETV1-KO, który charakteryzuje komórki podobne do mezenchymy

Ponadto w klastrze 4 nie wykazano istotnie statystycznie charakterystycznych transkryptów. Klaster ten układa się na mapie rozkładu pod klastrami PP1, PP2 oraz PP3, a komórki układające się bliżej poszczególnych klastrów wykazują profil ekspresji podobny do odpowiedniego klastra, np. komórki z klastra 4 w okolicy klastra PP1 wykazują profil ekspresji podobny do komórek z klastra PP1. Prawdopodobnie komórki ze skupiska 4 reprezentują podtypy tych klastrów. W dalszej analizie to skupisko komórek zostanie włączone do odpowiedniego klastra komórek PP1, PP2 lub PP3.

Następnie określono procentowe rozłożenie wszystkich zidentyfikowanych klastrów w komórkach PP typu dzikiego i ETV1-KO i na podstawie analizy porównującej komórki na

stadium PP typu dzikiego i ETV1-KO stwierdzono, że odsetek komórek znajdujących się w klastrach PP1 oraz PP2 nie różni się pomiędzy badanymi komórkami. Z kolei zauważono zwiększony odsetek komórek znajdujących się w klastrze PP2 w ETV1-KO w porównaniu do typu dzikiego o 2 razy. Podobny trend zaobserwowano w przypadku klastra komórek podobnych do mezenchymy, gdzie zauważono, że w komórkach PP ETV1-KO odsetek był 2,4 razy większy niż w komórkach PP typu dzikiego. Natomiast w komórkach PP typu dzikiego zaobserwowano większy o 1,7 razy odsetek frakcji komórek wczesnych EP w porównaniu do komórek PP ETV1-KO (ryc. 75).



Rycina 75. Wizualizacja zidentyfikowanych klastrów z scRNA-Seq komórek PP typu dzikiego i ETV1-KO (górny panel) oraz rozkład procentowy poszczególnych frakcji (dolny panel)

4. Dyskusja i perspektywy na przyszłe badania

Ludzkie PSC stanowią potencjalnie nieograniczone źródło komórek, które można zróżnicować do każdego typu tkanki i wykorzystać do przeszczepu w medycynie regeneracyjnej. Ponadto zróżnicowane tkanki z PSC mogą stanowić bazę do badań wielu nowych substancji terapeutycznych. Dlatego utrzymanie na wysokim poziomie pluripotencji i samoodnowy w hodowlach *in vitro* PSC jest niezbędne do wydajnej specyfikacji do wszystkich linii rozwojowych. Należy również pamiętać, że odwzorowanie kolejnych etapów embriogenezy podczas różnicowania *in vitro* jest jedyną platformą do badań nad rozwijającym się ludzkim organizmem, ponieważ niemożliwe jest wykorzystanie w tym celu ludzkich płodów.

Adhezja w kulturze *in vitro* i podtrzymywaniu cech PSC stanowi ważny aspekt, ponieważ pozwala na utrzymywanie specyficznego dla PSC kształtu kolonii, który jest niezbędny do prawidłowego przekazywania sygnałów międzykomórkowych. Dodatkowo odpowiednia nisza jest niezbędna do utrzymywania pluripotencji oraz samoodnawiania, za czym przemawia fakt, iż PSC w hodowli *in vitro* mogą być utrzymywane w niezmienionym stanie tylko na określonych rodzajach ECM (Xu i in. 2001; Amit i in. 2004; Rosler i in. 2004; Chen i in. 2011; Lamshead i in. 2013) i w zdefiniowanej pożywce hodowlanej. Jednakże szczegółowe mechanizmy, przez które adhezja wpływa na utrzymywanie charakterystyki PSC oraz czynniki transkrypcyjne regulujące właściwości adhezyjne PSC pozostają nieznanne. W niniejszej rozprawie doktorskiej po raz pierwszy opisano rolę czynnika transkrypcyjnego ETV1 w ludzkich PSC i powiązano ją z modulacją adhezji.

W badaniu zespołu Närvä i współpracowników, dzięki zastosowaniu mikroskopii wysokorozdzielczej, możliwe było zbadanie struktury PSC tworzących kolonię w kulturze *in vitro*. Kolonie PSC formują zwarte centrum, które podtrzymywane jest dzięki połączeniom komórka-komórka przez białko CDH1. Na brzegach kolonii zaobserwowano białka tworzące fokalną adhezję, takie jak F-aktyna czy PXN (Närvä i in. 2017). W kolejnej publikacji tej samej grupy badawczej opisano dokładną strukturę adhezji fokalnych, które występują w ludzkich PSC. Mianowicie część w błonie komórkowej, która łączy się z ECM, stanowią białka biorące udział w sygnalizacji integryn, między innymi ITGA5, która łączy się z witronektyną (białkiem ECM). Do receptorów integryn przyłącza się PXN, która przez talinę łączy się z VCL i włóknami aktynowymi. Ponadto ustalono, że białka KANK1 i KANK2 lokalizują się na granicy fokalnej adhezji i tworzą połączenia z taliną i cytoszkieletem aktynowym (Stubb i in. 2019). Obydwa te badania wnoszą szczegółową

wiedzę na temat budowy i funkcji fokalnych adhezji w biologii PSC, jednakże nie poruszają kwestii czynników regulujących poziom adhezji w PSC. W niniejszej rozprawie doktorskiej przedstawiono podwyższony poziom składników budujących adhezję fokalną po wyłączeniu ekspresji *ETV1* w ludzkich PSC. Otóż poziom *ITGA5* był podwyższony 2,1 razy na poziomie mRNA i o 18,7% na poziomie białka. Również *PXN* i *VCL*, które również tworzą adhezje fokalne w ludzkich PSC, były podwyższone odpowiednio 2,6 i 2,4 razy na poziomie mRNA oraz o 79,7% i 30,1% na poziomie białka w komórkach PSC *ETV1-KO* względem PSC typu dzikiego. Na podstawie wyników opisanych w rozdziale 3.5 niniejszej rozprawy doktorskiej można po raz pierwszy stwierdzić, że czynnik transkrypcyjny *ETV1* może regulować poziom adhezji ludzkich komórek PSC podczas hodowli *in vitro*.

W badaniu Godoy-Parejo i współpracowników podwyższenie poziomu aktywności ścieżki *PI3K/AKT* z użyciem aktywatora *INS* spowodowało zwiększoną przeżywalność podczas pasażu do pojedynczych komórek oraz lepszą przyczepność do podłoża (Godoy-Parejo i in., 2019). W niniejszej rozprawie doktorskiej wyłączenie ekspresji *ETV1* w ludzkich PSC skutkowało wyższą adhezją linii *ETV1-KO* w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego. Ponadto na podstawie analizy danych *RNA-Seq* stwierdzono, że podwyższeniu ulegają ścieżki sygnałowe odpowiedzialne za adhezję oraz organizację *ECM*, takie jak *PI3K/AKT*. Podwyższenie poziomu białek adhezyjnych oraz fosforylowanej formy białka *AKT*, która świadczy o aktywacji sygnalizacji *PI3K/AKT* w *ETV1-KO* względem typu dzikiego potwierdzono za pomocą barwienia immunofluorescencyjnego oraz western blot. Prócz tego obniżenie poziomu aktywności szlaku *PI3K/AKT* przy użyciu 15 nM stężenia *Torin2* w *ETV1-KO* spowodowało, że wyprowadzona linia uzyskała poziom przyczepności do podłoża po pasażu podobny do komórek typu dzikiego.

W kontekście adhezji PSC opisano również rolę kinazy *FAK* i integryn jako niezbędnych do hodowli PSC. Inhibicja kinazy *FAK* z wykorzystaniem *siRNA* doprowadziła do zmiany morfologii kolonii oraz odczepienia PSC od podłoża hodowlanego. Podobny efekt zaobserwowano po zablokowaniu receptora integryny $5\alpha/5\beta$ (Vitulo i in., 2016). Natomiast w innym badaniu zaobserwowano, że po zmniejszeniu fosforylacji *FAK* przez interakcję z receptorem integryną $6\alpha/1\beta$ wzmocniono samoodnawianie PSC. Wyciszenie integryny 6α skutkowało podwyższeniem poziomu aktywacji *FAK* i wyciszeniem ekspresji *NANOG*, *OCT3/4* i *SOX2* (Villa-Diaz i in. 2019). Sugeruje to, że zachowanie odpowiedniego poziomu *FAK* jest niezbędne do utrzymywania charakterystyki PSC. W niniejszej rozprawie doktorskiej przedstawiono przesłanki przemawiające za

hipotezą, że poziom aktywności kinazy FAK się zmienia po wyłączeniu ekspresji ETV1 w ludzkich komórkach PSC. Otóż, w komórkach PSC ETV1-KO zaobserwowano podwyższony poziom komponentów zaangażowanych w tworzenie adhezji fokalnych, między innymi ITGA5, zarówno na poziomie mRNA jak i białka, które regulują poziom aktywności kinazy FAK. W związku z powyższym, a więc można przypuszczać, że aktywność kinazy FAK w ludzkich komórkach PSC ETV1-KO również ulega zmianie. Aby to udowodnić należy przeprowadzić analizę western blot z użyciem przeciwciał przeciwko kinazie FAK oraz fosforylowanej formie kinazy FAK i ocenić ilościowo poziom tych dwóch form.

W przedstawionej rozprawie doktorskiej po podwyższeniu ekspresji genu *ETV1* zaobserwowano efekt podobny do przedstawionego w badaniu Vitillo i współpracowników (Vitillo i in., 2016). Po wyciszeniu aktywności kinazy FAK ludzkie komórki ESC odzepiały się od podłoża hodowlanego i przechodziły apoptozę. Co ciekawe, niektóre komórki, aby uniknąć apoptozy spontanicznie różnicowały. Prócz tego inhibicja aktywności integrzyn również spowodowała apoptozę komórek ESC. W niniejszej rozprawie doktorskiej ludzkie PSC po podwyższeniu poziomu czynnika transkrypcyjnego ETV1 nie przeżywały w hodowli *in vitro* i odzepiały się od podłoża hodowlanego. W wyprowadzonej linii komórek PSC ETV1-KO zaobserwowano fenotyp większej adhezji oraz na podstawie analizy danych RNA-Seq wykazano wzbogacanie o terminy funkcjonalne związane z adhezją, organizacją cyoszkieletu i ECM oraz ścieżką sygnalizacyjną PI3K/AKT. W związku z powyższym można przypuszczać, że w komórkach PSC po podwyższeniu poziomu czynnika transkrypcyjnego ETV1 zajdą odwrotne mechanizmy molekularne. Należy pamiętać, że w komórkach ETV1-KO ITGA5 ulegała podwyższeniu, zarówno na poziomie mRNA i białka. Na podstawie przedstawionych wyników można wnioskować, że ETV1 moduluje adhezję PSC między innymi przez regulowanie szlaku PI3K/AKT i/lub poziomu integrzyn i innych białek adhezyjnych. Jednakże należy pamiętać, że nie wiadomo czy regulacja ta jest pośrednia czy bezpośrednia. Wykorzystując analizę *in silico* np. w programie Pscan, który pozwala na znalezienie motywów wiązania czynników transkrypcyjnych w sekwencjach promotorowych wprowadzonej do analizy listy genów. Wstępna analiza w programie Pscan pozwoliła na wygenerowanie listy kandydatów, którzy mogą być bezpośrednio regulowani przez ETV1 i równocześnie są zaangażowani w adhezję komórkową. Ponieważ eksperymenty ChIP-Seq oraz CUT&RUN nie przyniosły odpowiedzi na to pytanie, można wykonać eksperyment RNA-Seq na komórkach PSC po wywołaniu podwyższonej ekspresji *ETV1* w plazmidzie ze słabszym promotorem, aby

komórki nie odczepiały się po kilku godzinach w hodowli. Ponieważ komórki z podwyższoną ekspresją *ETV1* odczepiały się od podłoża, możemy przypuszczać, że transkrypty odpowiedzialne za adhezję komórek będą obniżone. Eksperyment ten wniesie ostateczną odpowiedź na pytanie, na ekspresję których genów wpływa *ETV1* bezpośrednio oraz w które ścieżki sygnalizacyjne w PSC jest zaangażowany.

Kolejnym istotnym aspektem, wartym do rozwinięcia jest rola *ETV1* w utrzymywaniu pluripotencji. W wyprowadzonej linii *ETV1*-KO po analizie danych RNA-Seq zaobserwowano obniżenie poziomu ścieżek sygnałowych zaangażowanych w utrzymywanie cech PSC. Na podstawie tych wyników można sugerować, że czynnik transkrypcyjny *ETV1* jest nowo odkrytym regulatorem pluripotencji. Bardziej szczegółowe eksperymenty badające rolę *ETV1* w wychodzeniu z pluripotencji stanowią interesującą perspektywę do przyszłych badań. Ponadto na podstawie analizy danych z scRNA-Seq można wnioskować, że ekspresja *ETV1* jest specyficzna dla stanu aktywowanej pluripotencji (Messmer i in. 2019). Z tego względu wyprowadzona w niniejszej rozprawie linia PSC *ETV1*-KO może stanowić idealny model do badania procesu przejścia ze stanu aktywowanej do naiwnej pluripotencji. Dodatkowo linia *ETV1*-KO potencjalnie może zostać przeprogramowana do stanu naiwnej pluripotencji z większą efektywnością niż PSC z niezmienną ekspresją *ETV1*.

W naszym laboratorium oprócz wyprowadzenia ludzkiej linii komórek PSC *ETV1*-KO, z wykorzystaniem protokołu opisanego w niniejszej rozprawie doktorskiej otrzymaliśmy linie klonalne ludzkich komórek PSC z wyłączoną ekspresją innych członków podrodziny PEA3 – *ETV4* i *ETV5*. Prócz tego wyprowadziliśmy linię klonalną z wyłączoną ekspresją wszystkich trzech członków podrodziny PEA3, czego nigdy wcześniej nie opisano. Na podstawie publikacji grupy profesora Austina Smitha zaprojektowaliśmy serię eksperymentów opierających się na przeprogramowaniu otrzymanych linii ludzkich PSC do stanu formatywnej i naiwnej pluripotencji (Kinoshita i in. 2021). W oparciu o wyniki RNA-Seq oraz scRNA-Seq z materiału wyizolowanego z przeprogramowanych komórek wyprowadzonych linii możliwe będzie określenie efektywności oraz różnic w mechanizmach molekularnych kierowanych przez czynniki transkrypcyjne z podrodziny PEA3 w stanie formatywnej i naiwnej pluripotencji. Ponieważ na podstawie analizy dostępnych danych z scRNA-Seq oraz badań grupy profesora Smitha, można stwierdzić, że czynniki transkrypcyjne *ETV4* oraz *ETV5* odgrywają znaczącą rolę w regulacji genów formatywnej i naiwnej pluripotencji (Kalkan i in. 2019; Kinoshita i in. 2021). Ponadto

przeprowadzenie eksperymentu ChIP-Seq z przeciwciałami przeciwko białkom z podrodziny PEA3 pozwoli na określenie genów bezpośrednio regulowanych przez te czynniki transkrypcyjne. Podsumowując, wyniki uzyskane z zaproponowanych eksperymentów wniosą większą wiedzę na temat słabo poznanych mechanizmów kierujących fenotypem ludzkiej formatywnej i naiwnej pluripotencji.

Kolejnym interesującym kierunkiem badań jest głębsze poznanie roli ETV1 w regulowaniu procesów rozwoju embrionalnego. Spontaniczne różnicowanie *in vitro* wyprowadzonej linii ETV1-KO wykazało, że komórki te różnicują bardziej efektywnie w porównaniu do PSC typu dzikiego do linii endodermy i mezodermy oraz nie są zdolne do wytworzenia komórek ektodermy. Potwierdzeniem przedstawionych w niniejszej rozprawie wyników ze spontanicznego różnicowania *in vitro* będzie eksperyment wytworzenia potworniaka (ang. *teratoma*) poprzez przeszczepienie komórek PSC ETV1-KO i typu dzikiego do transgenicznych myszy pozbawionych układu immunologicznego. Określenie składu komórkowego wyizolowanych potworniaków pozwoli na zidentyfikowanie różnic w potencjale różnicowania między komórkami PSC ETV1-KO i typu dzikiego. Następnym cennym eksperymentem może być odwzorowanie gastrulacji w warunkach *in vitro*, aby głębiej poznać mechanizmy molekularne regulowane przez ETV1 we wczesnych etapach rozwoju embrionalnego. W tym celu można wykorzystać system opracowany i wykorzystywany przez grupę profesora Aryeha Warmflasha, który polega na zastosowaniu mikrodołków do hodowli *in vitro* kolonii ludzkich komórek PSC, które są precyzyjnie regulowane pod względem rozmiaru i geometrii (Warmflash i in. 2014). Opracowany system opiera się na hipotezie, że nieregularne kształty kolonii ludzkich komórek PSC wpływają na różnorodność przekazywania sygnałów pomiędzy komórkami PSC, co wpływa na utratę przez nie zdolności do samoorganizacji podczas różnicowania. Odwzorowanie w warunkach *in vitro* procesu gastrulacji wyprowadzonej linii komórek PSC ETV1-KO, typu dzikiego oraz pozostałych otrzymanych linii z wyłączoną ekspresją genów z podrodziny PEA3 na mikrodołkach i analiza procesu samoorganizacji podczas różnicowania pozwoli na odkrycie mechanizmów regulowanych przez czynniki transkrypcyjne ETV1, ETV4 i ETV5 w trakcie wychodzenia ze stanu pluripotencji i na wczesnych etapach embriogenezy.

Równie ważnym i ciekawym aspektem jest głębsze zrozumienie roli ETV1 na poszczególnych etapach specyfikacji endokrynnych komórek β trzustki. Obecne protokoły różnicowania *in vitro* PSC do komórek β trzustki opierają się na naśladowaniu kolejnych etapów rozwojowych embriogenezy trzustki poprzez modulację szlaków sygnałowych

zaangażowanych w ten proces (Pagliuca i in. 2014; Millman i Pagliuca 2017; Velazco-Cruz i in. 2019; Hoglebe i in. 2020). Wysiłki zmierzające do skutecznego wytworzenia klinicznie przydatnych funkcjonalnych komórek β lub struktur podobnych do wysp są jednak utrudnione przez luki w wiedzy na temat czynników i szlaków modulujących różnicowanie i dojrzewanie komórek PP do komórek EP.

Na podstawie powiązania roli ETV1 z regulacją adhezji i tworzeniem adhezji ogniskowych (adhezji fokalnych) oraz z modulacją ścieżki sygnalizacyjnej PI3K/AKT w komórkach w stanie pluripotencji aktywowanej, postawiłam hipotezę, że ETV1 może pełnić tę samą lub zbliżoną funkcję podczas rozwoju *in vitro* w kierunku komórek β . W przypadku ukierunkowanego różnicowania *in vitro* do komórek β trzustki z komórek PSC ETV1-KO i typu dzikiego na etapie DE nie zaobserwowano różnicy w efektywności specyfikacji. Natomiast na późniejszym etapie PP zróżnicowane komórki PSC ETV1-KO cechowały się niższym odsetkiem komórek wykazujących syntezę białek specyficznych dla tego stadium (PDX1, NKX6-1 oraz CHGA), w porównaniu do zróżnicowanych komórek PSC typu dzikiego. Ponadto komórki PSC ETV1-KO nie były zdolne do ostatecznej specyfikacji do komórek β trzustki. Na podstawie powyższych wyników można wnioskować, że w procesie przejścia ze stadium DE do etapu PP oraz na późniejszych etapach dojrzewania komórek EP niezbędna jest ekspresja *ETV1*. Mianowicie podczas różnicowania *in vitro* komórek PSC w kierunku komórek β trzustki mniejsza liczba komórek PP ETV1-KO w porównaniu do liczby komórek PP typu dzikiego może wynikać z faktu, że czynnik transkrypcyjny ETV1 jest niezbędny do wytworzenia prawidłowych komórek PP. Z kolei komórki PP powstające podczas specyfikacji *in vitro* komórek PSC ETV1-KO, mimo obecności czynnika transkrypcyjnego PDX1 i NKX6-1, mogą być mniej funkcjonalne, przez co nie są zdolne do późniejszego przejścia w komórki wykazujące obecność CHGA i C-PEP. Ponieważ w niniejszej rozprawie doktorskiej zaproponowałam rolę czynnika transkrypcyjnego ETV1 w regulacji adhezji w ludzkich komórkach PSC, w trakcie różnicowania może on również przejawiać podobną funkcję. Ostatnie badania grupy profesora Millmana wykazały, że modulacja stanu polimeryzacji cytoszkieletu aktynowego na różnych etapach specyfikacji w kierunku komórek endokrynnych trzustki wpływa na ekspresję charakterystycznych genów dla endokrynej trzustki (Hoglebe i in. 2020). Wykazano, że silne przyleganie komórek indukujące polimeryzację cytoszkieletu aktynowego w komórkach PP wykazujących obecność PDX1 zapobiega przedwczesnej ekspresji *NGN3* i wspiera aktywację *NKX6-1*. W niniejszej rozprawie doktorskiej na podstawie danych scRNA-Seq przedstawiono, że na stadium PP różnicowania *in vitro* z komórek PSC ETV1-KO powstaje

mniej komórek wczesnych EP wykazujących ekspresję *NGN3*. Można spekulować, że po wyłączeniu ekspresji *ETV1* zwiększa się przyleganie komórek do siebie podczas różnicowania *in vitro*, co przekłada się na większy poziom polimeryzacji cytoszkieletu. Na początkowym etapie komórek PP stan zwiększonej polimeryzacji cytoszkieletu jest niezbędny do wytworzenia prawidłowych komórek PP. Jednakże aby funkcjonalne komórki β mogły się wytworzyć, cytoszkielet aktywny musi ulec depolimeryzacji na stadium EP w komórkach charakteryzujących się ekspresją *NKX6-1* i *NGN3*. W badaniu grupy profesora Milmana stosując latrunkulinę A, roluźniono cytoszkielet aktywny w pierwszym dniu stadium EP i w efekcie uzyskano wysoką frakcję funkcjonalnych komórek β (Hogrebe i in., 2020). W przypadku różnicowania *in vitro* komórek PSC *ETV1-KO* do dalszych etapów specyfikacji endokrynej trzustki wykazano brak komórek β oraz innych komórek endokrynych charakteryzujących się obecnością białka CHGA. Być może dalsze utrzymywanie zwiększonego poziomu adhezji fokalnych i równocześnie większej polimeryzacji cytoszkieletu aktywnego uniemożliwiło EMT i w konsekwencji specyfikację komórek endokrynych. W badaniu Liu wykazano, że podczas rozwoju embrionalnego trzustki tworzenie adhezji ogniskowej musi być zahamowane w komórkach EP, aby wzmocnić EMT i specyfikację komórek endokrynych. Jednak dokładny mechanizm transkrypcyjny regulujący stany aktywności i przyczepności komórek PP i EP nie są jeszcze znane. Dalsze badania sprawdzające szczegółowo rolę *ETV1* w rozwoju trzustki przyczynią się do pogłębienia wiedzy na temat procesów specyfikacji komórek endokrynych i pozwolą na zwiększenie efektywności uzyskiwania funkcjonalnych komórek β w celach terapeutycznych.

Wykonanie eksperymentu scRNA-Seq na stadium PP różnicowania *in vitro* pozwoliło na uzyskanie dużej ilości danych, których analiza pozwoli na szczegółowe opisanie efektu wyłączenia ekspresji *ETV1* na rozwijającą się trzustkę. Wstępna analiza wykazała większą różnorodność w PP zróżnicowanych z *ETV1-KO* w porównaniu do PP wyprowadzonych z PSC typu dzikiego. Ponadto, po zgrupowaniu powtórzeń badanych prób z wykorzystaniem algorytmu „cellranger aggr” i ponownej analizie danych z użyciem metody grupowania UMAP, wyszczególniono 6 funkcjonalnych skupisk komórek PP typu dzikiego i *ETV1-KO*. Analiza zróżnicowanej ekspresji poszczególnych transkryptów pomiędzy wyróżnionymi klastrami pozwoliła na określenie funkcjonalnej aktywności w poszczególnych klastrach. Zidentyfikowano klaster komórek PP, które wykazywały proliferację komórek oraz grupę wczesnych komórek EP. Podobne klastry zaobserwowano w pracy zespołu profesora Meltona, w której przeprowadzono analizę scRNA-Seq na różnych stadiach różnicowania

in vitro, jednakże w tym badaniu skupiono się na głębszej analizie końcowych etapów różnicowania *in vitro* – komórek EP oraz komórek β (Veres i in. 2019). W porównaniu do pracy zespołu Meltona, w niniejszej rozprawie doktorskiej zidentyfikowano klaster komórek PP, w którym intensywnie zachodzą procesy regulujące migrację komórek oraz grupę komórek PP tworzących ścisłe połączenia między komórkami. Takie rozłożenie funkcjonalne klastrów może odzwierciedlać trajektorię rozwojową, mianowicie komórki PP początkowo mocno proliferują, aby następnie regulować swoją migrację i tworzyć bardziej zwarte struktury przylegających do siebie komórek. Jednakże, wyniki scRNA-Seq opisane w tej pracy są wstępną analizą, którą należy rozszerzyć, np. o ułożenie komórek w pseudoczasie, co pozwoli na szczegółowe poznanie trajektorii rozwojowej *in vitro* komórek PP.

5. Podsumowanie

W niniejszej rozprawie doktorskiej przedstawiono rolę czynnika transkrypcyjnego ETV1 w regulowaniu poziomu adhezji i przyczepności ludzkich komórek PSC w warunkach *in vitro* oraz w procesie powstawania komórek PP podczas różnicowania *in vitro* ludzkich PSC do komórek β trzustki.

W pierwszym etapie badań z naszych danych scRNA-Seq z embrionalnych mysich trzustek (e14,5 i e16,5) wyselekcjonowano czynnik transkrypcyjny Etv1 jako potencjalny regulator rozwoju endokrynnej trzustki. Zaobserwowano, że Etv1 występował specyficznie w komórkach EP oraz wczesnych komórkach α i β . Następnie, na podstawie danych scRNA-Seq z niezależnych badań przeprowadzono analizę profilu obecności transkryptu ETV1 w ludzkich komórkach PSC, podczas różnicowania *in vitro* komórek PSC w kierunku komórek β trzustki, w rozwiniętych komórkach ludzkiej trzustki oraz podczas rozwoju embrionalnego *in vivo* mysiej trzustki. Wyniki analizy scRNA-Seq potwierdziły specyficzność ETV1 dla części endokrynnej trzustki i wzmocniły hipotezę, że może on pełnić funkcję podczas rozwoju trzustki. Ponadto wykryto obecność czynnika transkrypcyjnego ETV1 w ludzkich komórkach PSC, co sprawiło, że stał się interesującym kandydatem do zbadania jego funkcji na etapie pluripotencji aktywowanej. Potwierdzono również obecność białka ETV1 w stosowanych w pracy modelach badawczych – ludzkich komórkach PSC, podczas rozwoju *in vitro* w kierunku komórek β trzustki oraz dodatkowo w mysiej embrionalnej trzustce (jako potwierdzenie obserwacji z danych scRNA-Seq).

W kolejnym kroku z użyciem metody CRISPR/Cas9 wyprowadziłam linie klonalne ludzkich PSC z wyłączoną ekspresją *ETV1*. Stworzone linie wykorzystałam jako narzędzie do zbadania funkcji ETV1 na etapie pluripotencji oraz w procesie powstawania komórek PP w warunkach *in vitro*.

Na etapie pluripotencji zauważono fenotyp związany z większą przyczepnością i adhezją komórek PSC ETV1-KO względem typu dzikiego. Na podstawie porównawczych analiz konfluencji w trakcie pierwszych 24 godzin po pasażu ujawniono większą powierzchnię zajmowaną przez komórki PSC ETV1-KO niż komórki PSC typu dzikiego. Analiza eksperymentu z wykorzystaniem RNA-Seq potwierdził powyższe obserwacje, ujawniając wzbogacenie wśród transkryptów o podwyższonym poziomie, o terminy funkcjonalne związane z adhezją, organizacją ECM, organizacją cytoszkieletu aktynowego oraz ścieżką sygnalizacyjną PI3K/AKT. Dodatkowo barwienie immunofluorescencyjne białek

adhezyjnych – PXN, CDH1, ITGA5 oraz VCL, które wykazywały wyższy poziom mRNA po wyłączeniu ekspresji *ETV1*, ujawniło ich podwyższenie na poziomie białka. Ponadto po wywołaniu podwyższonej ekspresji *ETV1* w ludzkich komórkach PSC zaobserwowano odłączenie się komórek od podłoża, co jest odwrotnym fenotypem do obserwowanego w komórkach PSC *ETV1*-KO.

W niniejszej pracy modulowano również aktywność ścieżki sygnalizacyjnej PI3K/AKT z użyciem inhibitorów – PI-103 i Torin2 oraz aktywatora INS. Inhibicja ścieżki PI3K/AKT w komórkach *ETV1*-KO skutkowałą zmniejszeniem przyczepności komórek podczas pasażu. Natomiast po aktywacji ścieżki PI3K/AKT w komórkach PSC typu dzikiego zaobserwowano fenotyp zbliżony do komórek PSC *ETV1*-KO – zwiększoną przyczepność komórek podczas pasażu. Na podstawie tych wyników można wnioskować, że *ETV1* reguluje adhezję ludzkich PSC między innymi poprzez modulację ścieżki PI3K/AKT.

Ponieważ na podstawie analizy danych RNA-Seq zidentyfikowano obniżenie transkryptów związanych z utrzymywaniem pluripotencji, określono poziom białek pluripotencjalnych – SOX2, OCT3/4 oraz NANOG w komórkach PSC *ETV1*-KO i typu dzikiego. Nie stwierdzono różnicy w poziomie białek pluripotencjalnych. Następnie przeprowadzono modulację ścieżki kanonicznej WNT w komórkach PSC *ETV1*-KO i typu dzikiego podczas tworzenia *in vitro* w kierunku komórek DE, ponieważ aktywacja tego szlaku jest niezbędna do wytworzenia komórek DE. Należy pamiętać, że ścieżka sygnalizacyjna WNT wykazywała obniżoną aktywność w komórkach PSC *ETV1*-KO względem komórek typu dzikiego. Warto zauważyć, że aktywację ścieżki WNT w protokole do różnicowania *in vitro* do DE stosuje się wyłącznie w dniu 1 różnicowania. Z tego względu niższy poziom białka markerowego DE – SOX17 w komórkach PSC *ETV1*-KO w porównaniu do komórek PSC typu dzikiego w warunkach bez aktywacji ścieżki WNT, wskazuje na problemy podczas wyjścia ze stanu pluripotencji aktywowanej komórek po wyłączeniu ekspresji *ETV1*.

Następnie celem zidentyfikowania bezpośrednich celów regulacyjnych *ETV1* przeprowadzono CHIP-Seq oraz CUT&RUN. Niskie stężenie wytrąconej chromatyny oraz brak wzbogacenia w miejscach promotorowych w chromatynie ściągniętej za pomocą przeciwciała przeciwko *ETV1* wskazywało na niepowodzenie w procedurze eksperymentalnej.

Kolejnym krokiem było określenie wpływu wyłączenia ekspresji *ETV1* na proces różnicowania *in vitro*. W pierwszej kolejności porównano potencjał do różnicowania w komórki trzech listków zarodkowych w warunkach nieukierunkowanych na określony typ komórek. Na podstawie analizy qPCR markerów dla poszczególnych linii rozwojowych wykazano, że po wyłączeniu ekspresji *ETV1* komórki PSC efektywniej specjalizują w kierunku komórek endodermy i mezodermy, natomiast mniej efektywnie w kierunku komórek ektodermy.

W ostatniej części pracy, skupiono się na określeniu roli czynnika transkrypcyjnego *ETV1* podczas rozwoju *in vitro* ludzkich komórek PSC w kierunku komórek β trzustki. W pierwszej kolejności określono różnice w morfologii i syntezie białek charakterystycznych dla poszczególnych etapów różnicowania. Na podstawie analizy z barwienia immunofluorescencyjnego stwierdzono, że komórki PSC *ETV1*-KO i typu dzikiego różnicują z podobną efektywnością do komórek DE. Natomiast na etapie komórek PP zauważono mniej komórek wykazujących syntezę białek *PDX1*, *NKX6-1* i *CHGA* w komórkach PP *ETV1*-KO w porównaniu do typu dzikiego. Mniejsza liczba komórek PP *ETV1*-KO skutkowałą zahamowaniem specjalizacji w kierunku wczesnych komórek β . Następnie celem określenia molekularnego mechanizmu stojącego za otrzymaniem mniejszej frakcji komórek PP po wyłączeniu ekspresji *ETV1* przeprowadzono eksperyment scRNA-Seq na etapie PP różnicowania *in vitro* w kierunku komórek β trzustki. Na podstawie analizy scRNA-Seq ujawniono, że wśród komórek PP *ETV1*-KO wytworzyło się mniej wczesnych komórek EP oraz więcej komórek, w których zachodzą procesy regulacji migracji komórek.

Podsumowując, w niniejszej rozprawie doktorskiej zaproponowano rolę czynnika transkrypcyjnego *ETV1* w regulowaniu adhezji i przyczepności ludzkich komórek PSC w hodowli *in vitro* oraz w procesie formowania się komórek PP w rozwoju *in vitro* endokrynej trzustki.

6. Materiały i metody

6.1. Hodowla *in vitro* ludzkich komórek PSC

Kultury *in vitro* linii komórkowej Hues8-iCas9 oraz wyprowadzonych linii z wyłączoną ekspresją *ETV1* były utrzymywane w hodowli w inkubatorze z 5% stężeniem CO₂ w 37°C. Komórki hodowano na podłożu Geltrex 1:70 w pożywce StemFlex (Gibco, numer katalogowy: A3349401). Godzinę przed pasażem lub rozmrożeniem nowe płytki hodowlane pokrywano podłożem hodowlanym Geltrex i inkubowano w temperaturze 37°C. Pożywka zmieniana była dzień po pasażu, a następnie co dwa dni. Na weekend podawano podwójną objętość pożywki.

Rozmrażanie komórek

Komórki przechowywano w zbiorniku wypełnionym ciekłym azocie w specjalnych krioprobówkach. Po wyciągnięciu probówki z komórkami ogrzewano probówki w temperaturze 37°C tylko do momentu pojawienia się kostki lodu z zawieszoną komórkową. Następnie przenoszono zawartość krioprobówki do falkonu 15 mL i dodawano po kropli ogrzanej pożywki do przepłukania (DMEM/F12 z 0,75% BSA). Probówki wirowano przez 5 minut 150×g. Osad komórkowy zawieszano w pożywce hodowlanej Stem Flex i przenoszono na płytkę hodowlaną uprzednio pokrytą warstwą Geltrex.

Standardowy pasaż

Komórki pasażowane były dwa razy w tygodniu. Do standardowego pasażu używano 0,5 mM EDTA w 1 × PBS (EDTA-PBS). Po ściągnięciu pożywki hodowlanej, podawano roztwór EDTA-PBS i inkubowano w temperaturze 37°C przez 5 minut. Potem roztwór EDTA-PBS odciągano i komórki odczepiano, używając pożywki hodowlanej. 1/6 zawiesiny komórkowej przenoszono na nową płytkę. Podczas całej procedury komórki traktowane były delikatnie, aby zachować połączenia komórkowe i grupy około 20 komórek.

Pasaż do pojedynczych komórek

Po ściągnięciu pożywki hodowlanej, podawano roztwór TrypLE i komórki inkubowano w 37°C przez 5 minut. Następnie podawano potrójną objętość zimnego roztworu 10% płodowej surowicy cielęcej (FBS) w pożywce DMEM/F12. Komórki rozbijano mechanicznie do pojedynczych komórek i zawieszono komórki wirowano przez 5 minut

150×g. Odciągano supernatant, a osad komórkowy zawieszano w pożywce hodowlanej Stem Flex z dodatkiem inhibitorów ROCK (Y-27632) lub bez liczonego i przenoszono na nową płytkę wcześniej pokrytą odpowiednim podłożem hodowlanym.

Generacja organoidów 3D do różnicowania

Dwa dni przed pasażem na różnicowanie, komórki pasażowano do pojedynczych komórek i $1,2 \times 10^6$ komórek przenoszono na płytki hodowlane 10 cm. Po dwóch dniach hodowli, komórki rozbijano do pojedynczych komórek, tak jak opisano powyżej. Całą procedurę komórki trzymano na lodzie. Po wirowaniu, osad komórkowy zawieszano w pożywce hodowlanej E8 z dodatkiem inhibitorów ROCK i 3×10^6 komórek przenoszono na 1 dołek na płytkę 6-dołkową z obniżoną przyczepnością komórek. Płytkę wkładano do inkubatora na wytrząsarkę orbitalną, aby umożliwić utworzenie się organoidów 3D nieróżniących się wielkością. Kolejnego dnia zmieniano pożywkę na E8 bez dodatku inhibitorów ROCK. Różnicowanie zaczynano 24 godziny później.

Liczenie komórek

Przed liczeniem komórki rozbijano do pojedynczych komórek, tak jak opisano powyżej w procedurze pasażu do pojedynczych komórek. Następnie 10 μ l zawiesiny komórkowej mieszano z 10 μ l roztworu niebieskiego trypanu, który penetruje błonę komórkową, barwiąc na niebiesko komórki martwe. Przenoszono 10 μ l zawiesiny na szkiełko do liczenia komórek. Komórki liczone w automatycznym liczniku komórek (Countess™ 3, Invitrogen).

Zamrażanie komórek

Komórki odczepiano z naczynia hodowlanego tak jak opisano w procedurze standardowego pasażu. Następnie komórki wirowano przez 5 minut 150×g. Osad komórkowy zawieszano w 0,5 mL pożywki hodowlanej i przenoszono do odpowiednio opisanych krioprobówek. Do zawiesiny komórkowej dodawano 0,5 mL 2 × stężonej pożywki do mrożenia (**tab. 6**).

Tabela 6. Skład pożywki do mrożenia komórek

Odczynnik	Stężenie końcowe
Pożywka hodowlana E8	80%
Dimetylosulfotlenek (DMSO)	20%

Krioprobówki umieszczano w pojemniku do mrożenia komórek (Nalgene, Mr. Frosty) na 24 godziny do -80°C i następnie do zbiornika z ciekłym azotem.

6.2. Wyprowadzenie linii klonalnych ludzkich komórek PSC z wyłączoną ekspresją genu *ETV1*

Otrzymanie cząsteczek sgRNA

Za pomocą metody CRISPR/Cas9 otrzymano pulę komórek hPSC z wyłączoną ekspresją *ETV1*. Do nakierowania białka Cas9 użyto cząsteczek sgRNA syntetycznych z firmy SYNTHOGO, które powodowały mutacje w eksonie 9 genu *ETV1*. Ekson 9 wchodzi w końcową część domeny PEA3.

Ponadto niezależnie użyto cząsteczek sgRNA syntetyzowanych w naszym laboratorium. Cząsteczki sgRNA zaprojektowano z wykorzystaniem platformy Benchling. Zaprojektowano sgRNA, które powodowały mutacje w eksonie 4, czyli drugim eksonie podlegającym transkrypcji w domenie PEA3. Wybrano sekwencje, które miały najwyższy wskaźnik „on-target”, przy równoczesnym jak najniższym wskaźniku „off-target”, które razem stanowią wskaźnik specyficzności sekwencji sgRNA do określonego miejsca w genomie. Następnie zamówiono sekwencję gRNA w formie oligonukleotydu DNA, jednocześnie dodając do niej z przodu sekwencję promotorową T7, a z tyłu sekwencję Tracr (tab. 7).

Tabela 7. Sekwencje oligonukleotydów użytych do syntezy gRNA

Nazwa gRNA	Sekwencja gRNA (5'-3') [T7-gRNA-Tracr]
ETV1_gRNA_01	TAATACGACTCACTATAGGGG TCCCTTTGTAGAGTCAGCGTGTT TTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTAT CAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTT
ETV1_gRNA_02	TAATACGACTCACTATAGGGG ACGAGAAACCAACAAATGTC TCG TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTT ATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTT
ETV1_gRNA_03	TAATACGACTCACTATAGGGG GGCTCATGATTCAGAAGGTG TG TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTT ATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTT

Oligonukleotydy namnożono metodą PCR z użyciem polimerazy Q5. Profil termiczny reakcji PCR przedstawiono w tabeli 8 (tab. 8).

Skład mieszaniny reakcyjnej do PCR (50 µl):

- woda 32,5 µl,
- 5 × bufor Q5 10 µl,

- 10 mM dNTP 1 μ l,
- 5 μ M mieszanina starterów przedniego i tylnego 5 μ l,
- 25 nM matryca 1 μ l,
- polimeraza Q5 0,5 μ l.

Tabela 8. Profil termiczny reakcji PCR

Etap	Temperatura	Czas trwania	Liczba cykli
<i>Wstępna denaturacja</i>	98°C	30 sekund	1
<i>Denaturacja nici</i>	98°C	10 sekund	30
<i>Przylączenie starterów</i>	57°C	20 sekund	
<i>Amplifikacja</i>	72°C	1 minuta	
<i>Terminacja</i>	72°C	2 minuty	1

Po reakcji PCR produkty oczyszczono z użyciem gotowego zestawu PCR Purification GeneJet (Invitrogen) i zmierzono stężenie podwójnej nici DNA na spektrofotometrze Nanodrop. Dodatkowo przeprowadzono elektroforezę w 1,5% żelu agarozowym (5 μ l z mieszaniny reakcyjnej) w celu określenia wielkości powstałego produktu.

W kolejnym etapie, 8 μ g produktu PCR posłużyło jako matryca do transkrypcji *in vitro*, którą przeprowadzono z użyciem gotowego zestawu MEGA shortscript (Invitrogen). Reakcja inkubowana była przez noc w 37°C. Po inkubacji, produkt oczyszczono używając zestawu MEGA Clear (Invitrogen), i zmierzono stężenie RNA przy zastosowaniu spektrofotometru Nanodrop.

Wyprowadzenie linii klonalnych

Do wyprowadzenia linii klonalnych z wyłączoną ekspresją *ETV1* użyto linii hPSC Hues8-iCas9. Linia ta charakteryzuje się indukcją ekspresji i syntezą białka Cas9 po traktowaniu komórek doksycykliną. Doksycyklinę w stężeniu 2 μ g/ml podawano do pożywki hodowlanej 24 godziny przed oraz w momencie transfekcji cząsteczkami sgRNA. Zastosowano transfekcję odwrotną, czyli komórki Hues8-iCas9 zdysocjowane do pojedynczych komórek z użyciem TrypLE Express posiane były w gęstości $1,5 \times 10^5$ komórek/dołek (24-dołkowa płytki) w pożywce E8 z dodatkiem 10 μ M inhibitorów ROCK (Y-27632, 10 μ M) i odpowiednim stężeniem cząsteczek sgRNA. Do lipofekcji użyto lipofektaminy RNAiMax. Kolejnego dnia zmieniono pożywkę na świeżą pożywkę Stem Flex i komórki hodowano przez kolejne 24 godziny w zmieszanej populacji komórek typu dzikiego i edytowanych metodą CRISPR. Następnie komórki posiano do pojedynczych komórek w stężeniu klonalnym (1:10 000) na płytce hodowlanej 60 mm i hodowano przez

tydzień. Połowa z pozostałych komórek została zamrożona w celu zapewnienia kopii zapasowej, natomiast druga połowa posłużyła do określenia efektywności edycji CRISPR/Cas9.

Z komórek wyizolowano DNA, używając gotowego zestawu Genomic Mini (A&A Biotechnology) i przeprowadzono PCR z użyciem polimerazy GoTaq G2 ze starterami flankującymi miejsce edycji CRISPR/Cas9 w genomie. Profil termiczny reakcji PCR przedstawiono w tabeli 9 (**tab. 9**).

Skład mieszaniny reakcyjnej do PCR (10 μ l):

- woda 5,15 μ l,
- 5 \times bufor GoTaq 2 μ l,
- 10 mM dNTP 0,2 μ l,
- 25 mM MgCl₂ 0,6 μ l,
- 5 μ M mieszanina starterów przedniego i tylnego 1 μ l,
- matryca 1 μ l,
- polimeraza GoTaq G2 0,05 μ l.

Tabela 9. Profil termiczny reakcji PCR

Etap	Temperatura	Czas trwania	Liczba cykli
<i>Wstępna denaturacja</i>	95°C	2 minuty	1
<i>Denaturacja nici</i>	95°C	15 sekund	40
<i>Przylączenie starterów</i>	63°C	15 sekund	
<i>Amplifikacja</i>	72°C	1 minuta 15 sekund	
<i>Terminacja</i>	72°C	5 minut	1

Po reakcji PCR, 2 μ l mieszaniny reakcyjnej poddano elektroforezie w 1% żelu agarozowym. Natomiast 8 μ l mieszaniny reakcyjnej oczyszczono używając gotowego zestawu EZ-10 (BioBasic). Oczyszczony produkt poddano sekwencjonowaniu DNA metodą Sangera. Wyniki sekwencjonowania przeanalizowano, wykorzystując platformę Benchling oraz program FinchTV. Efektywność edycji CRISPR/Cas9 określono stosując bioinformatyczne narzędzie do wnioskowania edycji CRISPR (ICE Analysis; synthego.com).

Po tygodniu hodowli w stężeniu klonalnym wybrane kolonie przeniesiono na dołek płytki 96-dołkowej. Równy i okrągły kształt kolonii wskazywał, że wyrosła ona z

pojedynczej komórki. Z każdego klonu wyizolowano genomowe DNA i analizowano analogicznie, jak opisano powyżej. Przyrównanie sekwencji DNA wybranego klonu do sekwencji DNA typu dzikiego za pomocą platformy Benchling pozwoliło na wytypowanie homozygotycznych klonów z wyłączoną ekspresją *ETV1*.

6.3. Analiza poziomu ekspresji genów metodą qPCR

Izolacja RNA

Komórki zostały poddane lizie roztworem Trizolu (Invitrogen) według protokołu producenta. RNA zostało wyizolowane z wodnej fazy po dodaniu chloroformu. Wytrącono je za pomocą izopropanolu i oczyszczono 70% etanolem. Następnie, RNA zawieszano w wodzie wolnej od nukleaz i przechowywano w temperaturze -80°C . Stężenie próbek RNA mierzono na spektrofotometrze DeNovix DS-11 przy długości fali 260 nm. Czystość każdej próbki oceniano, sprawdzając stosunek 260/280 dla zanieczyszczenia białka (próbka RNA uznana za czystą: ~ 2) i stosunek 260/230 dla zanieczyszczenia związkami organicznymi (próbka RNA uznana za czystą: 2,0–2,2). Integralność RNA potwierdzano elektroforezą w żelu agarozowym.

Odwrotna transkrypcja

Odwrotną transkrypcję przeprowadzono przy użyciu zestawu RevertAid First Strand cDNA (ThermoFisher) zgodnie z protokołem producenta. Do reakcji brano 1 μg całkowitego RNA i usuwano ewentualne zanieczyszczenia DNA, stosując DNazę I. Do reakcji odwrotnej transkrypcji zastosowano startery losowe heksamery. Produkt reakcji odwrotnej transkrypcji przechowywano w -20°C .

Projektowanie starterów

Wszystkie startery zaprojektowano przy użyciu platformy Primer-BLAST. W celu wykluczenia ryzyka amplifikacji genomowego DNA startery projektowano na miejsca w sekwencji odpowiadające łączeniu eksonów. Swoistość zaprojektowanych starterów weryfikowano za pomocą BLAST. Krzywe topnienia produktów przewidywano za pomocą programu uMelt. Wszystkie startery syntetyzowane były w Sigma Aldrich.

Tabela 10. Lista starterów

Nazwa startera	Sekwencja startera (5'-3')
ACTB_F	ACAGAGCCTCGCCTTTGCCGAT
ACTB_R	ATCATCCATGGTGAGCTGGCGG
GAPDH_F	AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA
GAPDH_R	AATGAAGGGGTCATTGATGG
GATA4_F	CGACACCCCAATCTCGATATGT
GATA4_R	ACAGATAGTGACCCGTCCCA
HHEX_F	GAAATATCTCTCTCCGCCCGA
HHEX_R	GGGTTCTCCTGTTTTAGTCTCC
HOXA1_F	GGTGTCTACTCCCCTCAAG
HOXA1_R	TCTCCAACCTTCCCTGTTTTGG
MESPI_F	CACCGTCCCCGCTCCTT
MESPI_R	AGAGACGGCGTCAGTTGTCC
MIXL1_F	GGATCCAGCTTTTATTTTCTCCCC
MIXL1_R	TCCAGGAGCACAGTGGTTGA
OTX2_F	CGAGGGTGCAGGTATGGTTTA
OTX2_R	GCCACTTGTCCACTCTCTGA
PAX6_F	CGATAACATACCAAGCGTGCA
PAX6_R	TGCCCGTTCAACATCCTTAGT
PDGFR α _F	CTATGTGCCAGACCCAGATGT
PDGFR α _R	CAGGAGTCTCGGGATCAGTTG
SOX1_F	GCAGGTCCAAGCACTTACAAG
SOX1_R	GGGTGGTGGTGGTAATCTCTT
SOX17_F	CGCTTTCATGGTGTGGGCTA
SOX17_R	CTTCCACGACTTGCCCAGC
SOX2_F	CATGCACCGCTACGACGT
SOX2_R	CTGCGAGTAGGACATGCTGTA
SOX7_F	TTTGGGCCAAGGACGAGAGG
SOX7_R	CTTCCACGACTTCCCAGCAT
MNX1_F	CAAGCTCAACAAGTACCTGTGC
MNX1_R	GCTGCGTTTCCATTTTCATCCG
CASZ1_F	TGGAAAGTCACCCAAAGCCG
CASZ1_R	CCCAAACCTCTCGTAGCAGGT
MEIS2_F	TCCAGCATCTCACACATCCG
MEIS2_R	ACTGGTCAATCATGGGCTGT
MYH6_F	CTACGCAACTGCCGATACTG
MYH6_R	TGAGATTTTCCCGGTGGAGAG
TNNT2_F	GAATGAGCGGGAGAAGGAGC
TNNT2_R	TGCTTCTGGATGTAACCCCC
ETV1_ekson 1/2_F	GCGTGGCCTTCAGTCCCGTTAG
ETV1_ekson 1/2_R	CCGGGCAGCTCTGATTCGCAAA

ETV1_ekson 3/4_F	GCGAAGAGCAGCAGCATG
ETV1_ekson 3/4_R	TCCTGACATTTGTTGGTTTCTCGT
ETV1_ekson 7/8_F	TGCCTGCAGTCAAGAACAGCCC
ETV1_ekson 7/8_R	GGGCCTCATTCCCACTTGTGGC
ETV1_ekson 12/13_F	CTGAAGAGGTGGCCCCGACGTTG
ETV1_ekson 12/13_R	AGCGGAGTGAACGGCTAAGTTT

Ilościowy PCR w czasie rzeczywistym (qPCR)

Produkty cDNA z reakcji odwrotnej transkrypcji rozcieńczono w wodzie wonnej od nukleaz 20 razy przed reakcją qPCR. Wszystkie reakcje wykonano w 3 technicznych powtórzeniach. Dla każdej serii reakcji przygotowano kontrolę bez matrycy (wodna, negatywna). Do przeprowadzenia reakcji qPCR zastosowano system Applied Biosystems™ QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR (ThermoFisher). Profil termiczny reakcji PCR przedstawiono w tabeli 11 (**tab. 11**).

Skład mieszaniny reakcyjnej do PCR (10 µl):

- power SYBR™ Green PCR Master Mix 5 µl,
- 5 µM mieszanina starterów przedniego i tylnego (stężenie końcowe starterów: 0,125 µM) 3 µl,
- rozcieńczona matryca cDNA lub woda w kontroli bez matrycy 2 µl.

Tabela 11. Profil termiczny reakcji qPCR

Etap	Temperatura	Czas trwania	Liczba cykli
<i>Wstępna denaturacja</i>	50°C	2 minuty	1
	95°C	10 minut	1
<i>Denaturacja nici</i>	95°C	15 sekund	45
<i>Przyłączenie starterów i amplifikacja</i>	63°C	1 minuta	
<i>Krzywa topnienia</i>	95°C	15 sekund	1
	63-95°C	30 minut	1

Analiza wyników

Dane z reakcji qPCR analizowane były metodą $\Delta\Delta C_t$. Poziom ekspresji badanych genów został znormalizowany do poziomu ekspresji genów referencyjnych GAPDH (dehydrogenaza 3-fosforanu aldehydu glicerynowego) lub ACTB (β -aktyna). Relatywną wartość ekspresji obliczano z pomocą wzorów:

$$\Delta Ct A = Ct_genu\ badanego - Ct_genu\ referencyjnego$$

$$\Delta Ct B = Ct_genu\ badanego - Ct_genu\ referencyjnego$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct B - \Delta Ct A$$

$$R = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

gdzie:

$\Delta Ct A$ – znormalizowana wartość ekspresji w próbie referencyjnej,

$\Delta Ct B$ – znormalizowana wartość ekspresji w próbie badanej,

R – względny poziom ekspresji obliczony jako krotność zmiany między poziomem ekspresji genów w badanej próbie a próbie referencyjnej.

6.4. Analiza transkryptomu

Sekwencjonowanie RNA

Całkowite RNA zostało wyizolowane z komórek Hues8-iCas9 typu dzikiego i ETV1-KO z użyciem metody wykorzystującej Trizol (Invitrogen). Do przygotowania bibliotek cDNA użyto zestawu RNA Truseq RNA V2 zgodnie z protokołem producenta. Do każdej biblioteki użyto po 1000 ng wyizolowanego RNA. Biblioteki zostały przygotowane w duplikatach. Do weryfikacji ilościowej i jakościowej otrzymanych bibliotek użyto odpowiednio fluorometru Qubit (TFS) i zestawu DNA Agilent o wysokiej czułości (Agilent Technologies). Biblioteki zsekwencjonowano za pomocą sekwenatora Illumina HiScanSQ. Sekwencjonowanie wykonano metodą z jednego końca z wydajnością 10 milionów odczytów na próbkę. Z surowych odczytów uzyskano dane Fastp. Następnie, odczyty zostały przyrównane do sekwencji ludzkiego genomu (Ensembl GRCh38 v2.7). Wartości ekspresji poszczególnych transkryptów uzyskano za pomocą programu FeatureCounts V1.6.3. Analizę różnicowej ekspresji genów pomiędzy danymi z komórek typu dzikiego i ETV1-KO przeprowadzono za pomocą programu iDEP.94. Geny o różnej ekspresji pomiędzy badanymi próbkami zidentyfikowano i znormalizowano za pomocą pakietu DESeq2 (FDR < 0,05; współczynnik zmiany między próbkami ≥ 2). Zidentyfikowane geny o statystycznie zmienionej ekspresji pomiędzy danymi z komórek typu dzikiego i ETV1-

KO zostały wybrane do dalszej analizy wzbogacenia terminów funkcjonalnych (GO:terms). Dane przeanalizowano pod kątem lokalizacji w komórce (CC, ang. cellular component), procesów biologicznych (BP, ang. biological processes) oraz szlaków metabolicznych (KEGG) używając programu DAVID, PANTHER i GeneCodis. Mapy ekspresji zostały stworzone używając programu GraphPad Prism 8. Do hierarchicznego klastrowania zastosowano metodę średniej normalizacji według wzoru:

$$\text{Wartość transformowana} = (x - \text{średnia}) / (\text{maks} - \text{min})$$

gdzie:

x – wartość ekspresji danej próby,

średnia – średnia wartości ekspresji ze wszystkich prób,

maks – maksymalna wartość ekspresji wśród wszystkich prób,

min – minimalna wartość ekspresji wśród wszystkich prób.

Sekwencjonowanie RNA z pojedynczych komórek

Sfery komórek PP typu dzikiego i ETV1-KO w 12 dniu różnicowania *in vitro* w kierunku komórek β trzustki przemyto 2 razy roztworem HBSS i rozbito do pojedynczych komórek inkubując w roztworze 1% trypsyny w $1 \times$ PBS/0,5 mM EDTA w 37°C z wytrząsaniem 80 rpm. Następnie zawiesinę sfer i komórek przepipetowano 15 razy i dezaktywowano działanie trypsyny, rozcieńczając ją 3 razy w 20% roztworze surowicy cielęcej (FBS) w DMEMF/12. Zawiesinę komórek wirowano przez 5 minut z prędkością $300 \times g$ w temperaturze pokojowej i zawieszono w 0,04% roztworze BSA w $1 \times$ PBS. Komórki przepuszczono przez sito o wielkości porów 40 μm w celu rozbicia sklejonnych komórek. Procedurę wirowania i przepuszczenia przez sito wykonano łącznie 3 razy. Ostatecznie komórki policzono i 8000 komórek załadowano na chip 10xGenomics. Krople zawierające pojedyncze komórki, bufor do lizy i mikrokulki pokryte starterami z kodem kreskowym unikatowym dla każdej komórki oraz UMI znakujące cząsteczki mRNA uzyskano, umieszczając chip w maszynie Chromium 10xGenomics. Do przygotowania bibliotek cDNA z pojedynczych komórek użyto zestawu 3' Single Cell v3.1 według protokołu producenta. Biblioteki zostały przygotowane w duplikatach. Do weryfikacji jakościowej i ilościowej otrzymanych bibliotek użyto Agilent TapeStation i taśmy High Sensitivity D1000

ScreenTape®. Biblioteki zsekwencjonowano z dwóch końców z rozdzielczością 40 tysięcy odczytów na komórkę. Analizę bioinformatyczną przeprowadzono z użyciem skryptów do programu CellRanger. Do zintegrowania danych z komórek PP typu dzikiego i ETV1-KO użyto algorytmu „cellranger agrr”. Analizę zróżnicowanej ekspresji oraz mapy rozkładu i poziomu transkryptów wykonano w programie Loupe Browser 6.2.0. Analizę wzbogacenia terminów funkcjonalnych przeprowadzono na platformie DAVID.

6.5. Analiza adhezji

Pasaż badanych komórek

Badane komórki typu dzikiego i ETV1-KO dysocjowano do pojedynczych komórek i posiewano w stężeniu początkowym $1,5 \times 10^4$ komórek/cm² w pożywce z dodatkiem inhibitorów ROCK (Y-27632, 10 μM) lub bez. Komórki pasażowano na dołki 24–dołkowej płytki uprzednio pokrytej odpowiednim podłożem hodowlanym (Geltrex, witronektyna, laminina V lub fibronektyna).

Geltrex rozcieńczano w stosunku 1:70 w pożywce hodowlanej DMEM/F12. Witronektynę rozcieńczano w 1 × PBS do stężenia końcowego 5 μg/ml. Laminina V obecna była w zebranej pożywce hodowlanej z kultury linii komórkowej 804-G. Na powierzchnię jednego dołka płytki 24–dołkowej podawano 250 μl odpowiedniego podłoża hodowlanego i inkubowano przez godzinę w 37°C. Po inkubacji nadmiar podłoża ściągano i posiewano badane komórki.

Fibronektynę rozcieńczano w 1 × PBS do stężenia końcowego 0,06 μg/μl. Na powierzchnię jednego dołka 24 dołkowej płytki podawano 100 μl fibronektyny i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 45 minut. W tym czasie podana objętość fibronektyny odparowała. Po inkubacji posiewano badane komórki.

24 godziny po pasażu komórki poddawano analizie adhezji z wykorzystaniem barwienia fioletem krystalicznym.

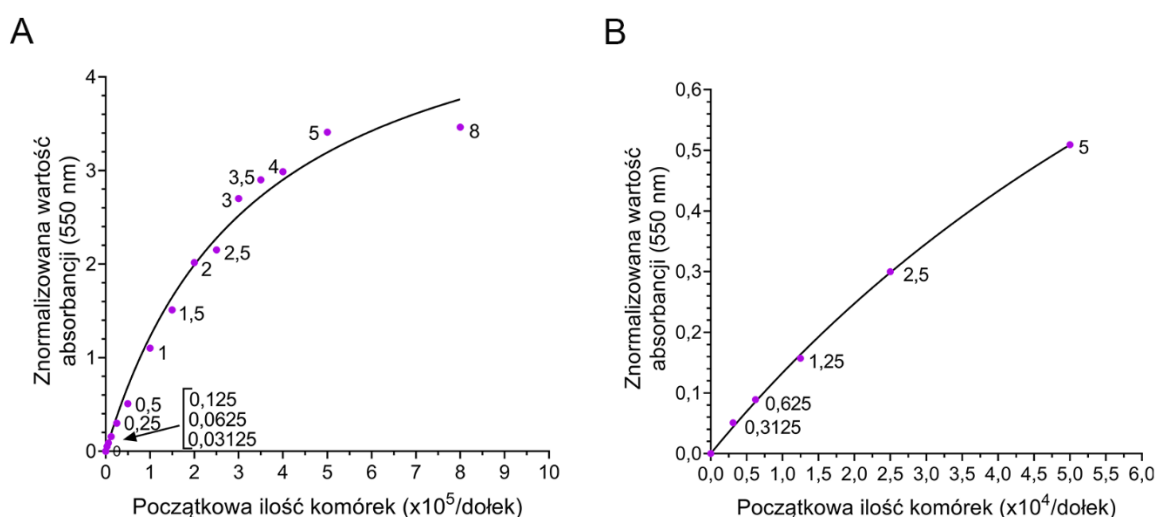
Barwienie fioletem krystalicznym

Komórki utrwalono 4% roztworem paraformaldehydu (PFA) w 1 × PBS przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie, utrwalone komórki barwiono świeżo przygotowanym 0,1% roztworem fioletu krystalicznego w wodzie przez 30 minut z

wytrząsaniem w temperaturze pokojowej. Wybarwione komórki przepłukano dwa razy wodą i lizowano używając 0,2% roztworu SDS w $1 \times$ PBS przez 30 minut. Absorbancję mierzono za pomocą spektrofotometru TEKAN SPARK przy długości fali 550 nm. Wartość absorbancji normalizowano do wartości absorbancji z dołków pokrytych odpowiednim podłożem hodowlanym bez komórek i przyrównano w programie GraphPad Prism 8.4.2 do uprzednio wyznaczonej krzywej standardowej.

Ustalenie krzywej

W celu ustalenia krzywej standardowej komórki typu dzikiego i ETV1-KO rozbito do pojedynczych komórek i posiano w medium Stem Flex z dodatkiem inhibitorów ROCK (Y-27632, $10 \mu\text{M}$) po 3125, 6250, 12 500, 25 000, 50 000, 100 000, 150 000, 200 000, 250 000, 300 000, 350 000, 400 000, 500 000 i 800 000 komórek na dołek płytki 24-dołkowej (powierzchnia dołka 2 cm^2). W celu zmniejszenia różnic w adhezji pomiędzy komórkami typu dzikiego i ETV1-KO badane linie zmieszano w stosunku 1:1 podczas pasażu. Następnie 24 godziny po pasażu, komórki utrwalono i wybarwiono fioletem krystalicznym, analogicznie do opisu powyżej. Absorbancję zmierzono za pomocą spektrofotometru TEKAN SPARK przy długości fali 550 nm. Uzyskane wartości absorbancji znormalizowano do wartości absorbancji uzyskanej z dołka pokrytego wyłącznie podłożem Geltrex. Otrzymane wartości posłużyły do stworzenia krzywej standardowej w programie GraphPad Prism 8.4.2 (ryc. 77).



Rycina 77. Krzywa standardowa absorbancji 0,2% SDS z fioletem krystalicznym uwolnionym z komórek na długości fali 550 nm. A. Początkowa ilość komórek 3125 – 800000. B. Część krzywej standardowej dla początkowej ilości komórek 3125 – 50000.

6.6. Analiza w IncuCyte

Do śledzenia żywych komórek zastosowano urządzenie do obrazowania żywych komórek IncuCyte (Sartorius). Do analizy krzywej wzrostu, komórki typu dzikiego lub ETV1-KO wysiano w gęstości początkowej $1,5 \times 10^4$ komórek/cm², $2,5 \times 10^4$ komórek/cm² lub 5×10^4 komórek/cm² na dołki 24 dołkowych płytek hodowlanych pokrytych podłożem Geltrex. Komórki inkubowano przez 96 godzin z interwałem 2-godzinnym w 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO₂. Konfluencję kultur mierzono w czasie rzeczywistym za pomocą oprogramowania IncuCyte Base Analysis Software (Sartorius). Proliferację komórek monitorowano, analizując zmianę obszaru zajmowanych obrazów komórek (procent konfluencji) w czasie. Do eksperymentu monitorującego żywotność komórek po wywołaniu podwyższonej ekspresji *ETV1* do identyfikacji poszczególnych komórek użyto białka GFP, które było kodowane przez wprowadzony do komórek plazmid.

6.7. Podwyższona ekspresja *ETV1*

Startery zostały zaprojektowane za pomocą narzędzia Benchling Assembly Wizard na platformie Benchling (**tab. 12**).

Tabela 12. Lista starterów użytych do amplifikacji cDNA *ETV1*.

Nazwa startera	Sekwencja startera (5'-3')
ETV1-FLAG-EGFP_F	ggtaccgcgggcccgatccaccATGGATGGATTTTAT
ETV1-FLAG-EGFP_R	gtcatccttgaatcacgcgTATACACGTAGCCTTCGTTG

Tabela 13. Profil termiczny reakcji PCR

Etap	Temperatura	Czas trwania	Liczba cykli
<i>Wstępna denaturacja</i>	98°C	2 minuty	1
<i>Denaturacja nici</i>	98°C	15 sekund	15
<i>Przylączenie starterów</i>	62°C	15 sekund	
<i>Amplifikacja</i>	72°C	1 minuta 10 sekund	
<i>Denaturacja nici</i>	98°C	15 sekund	25
<i>Przylączenie starterów</i>	72°C	15 sekund	
<i>Amplifikacja</i>	72°C	1 minuta 10 sekund	
<i>Terminacja</i>	72°C	2 minuty	1

Produkt PCR wyizolowano z 1,2% żelu agarozowego za pomocą gotowego zestawu PureLink Quick Gel Extraction Kit w objętości końcowej 50 µl.

Plazmid został przecięty w odpowiednich miejscach sekwencji enzymami restrykcyjnymi XhoI i MluI (Thermo Fisher Scientific). Inkubacja z enzymami restrykcyjnymi trwała 4 godziny w 37°C, następnie, aby zakończyć trawienie temperaturę podniesiono do 80°C i inkubowano przez 20 minut. Przecięty plazmid wycięto z 0,8% żelu agarozowego i izolowano za pomocą PureLink Quick Gel Extraction Kit w końcowej objętości 25 µl.

Do ligacji cDNA ETV1 z przeciętym plazmidem użyto zestawu The NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit (NEB) w stosunku wektor:insert 1:2. Złożony plazmid został poddany sekwencjonowaniu metodą Sangera w celu weryfikacji prawidłowego wklonowania insertu i wykluczenia powstania mutacji.

Plazmid z sekwencją bez mutacji, został namnożony w komórkach *E.coli*. Plazmid został transformowany do komórek bakterii kompetentnych za pomocą szoku cieplnego. Bakterie hodowane były w pożywce Lennox-Broth (LB). Po 20-minutowej inkubacji na lodzie zawiesiny bakteryjnej z 10 µg plazmidu, próbówki umieszczano w temperaturze 42°C na 90 sekund i ponownie inkubowano na lodzie przez 5 minut. Transformowane bakterie rozsiewano na szalki Petriego w stałej pożywce LB z dodatkiem antybiotyku selekcyjnego i inkubowano przez noc w 37°C. Następnego dnia pojedyncze kolonie bakteryjne umieszczano w płynnej pożywce LB z dodatkiem antybiotyku selekcyjnego. Hodowlę bakteryjną płynną inkubowano w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 150 rpm. Namnożoną hodowlę bakteryjną wirowano 30 minut przy 2000 rpm. Z otrzymanego osadu izolowano

plazmid za pomocą zestawu PureLink™ Fast Low-Endotoxin Midi Plasmid Purification Kit (ThermoScientific).

Komórki Hues8-iCas9 typu dzikiego i ETV1-KO transfekowane plazmidem kontrolnym lub z sekwencją cDNA ETV1 po 750 ng każdego plazmidu, używając lipofektaminy STEM (Thermo Fisher Scientific) według protokołu producenta.

6.8. Analiza białek

Barwienie immunofluorescencyjne komórek adhezyjnych

Komórki utrwalono 4% roztworem paraformaldehydu (PFA) w $1 \times$ PBS przez 15 minut w temperaturze pokojowej i przepłukano 3 razy $1 \times$ PBS. Utrwalone komórki przechowywano maksymalnie miesiąc w $1 \times$ PBS w 4°C lub procedowano dalej protokołem barwienia. Używając 0,5% roztwór Tritonu X-100 w $1 \times$ PBS, komórki permeabilizowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie przeprowadzono blokowanie niespecyficycznych białek używając 3% roztworu BSA w 0,1% roztworze Tween20 w $1 \times$ PBS. Inkubacja z roztworem blokującym przeprowadzona była w temperaturze pokojowej i trwała 30 minut. Następnie, próbki były inkubowane przez noc w 4°C z przeciwciałami pierwszorzędowymi rozcieńczonymi w 5% roztworze surowicy osłej (NDS, ang. normal donkey serum). Przeciwciała pierwszorzędowe rozcieńczone były do odpowiedniego stężenia, według zaleceń producenta lub bazując na publikacjach naukowych, w których przeciwciała były użyte. Po inkubacji z roztworem przeciwciał pierwszorzędowych, komórki były przepłukiwane 3 razy przez 10 minut w temperaturze pokojowej w 0,1% roztworze Tween20 w $1 \times$ PBS. Potem komórki inkubowane były przez 2 godziny w temperaturze pokojowej w roztworze przeciwciał drugorzędowych rozcieńczonych 1:400 w 5% roztworze NDS. Przeciwciała drugorzędowe połączone były z fluorochromami Alexa Fluor 488, Rhodamina TRITC lub Alexa Fluor 647 (Jackson ImmunoResearch). Nadmiar przeciwciał drugorzędowych usunięty był przez 2 płukania po 5 minut każde w 0,1% roztworze Tween20 w $1 \times$ PBS. Na koniec komórki inkubowane były w roztworze 1:10000 DAPI w $1 \times$ PBS. Wybarwione komórki obserwowane były przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Leica DM IL-Led (Leica, Niemcy) lub mikroskopu konfokalnego Nikon A1Rsi (Nikon, Niemcy). Obiektywy dla mikroskopu Leica DM IL-Led: N Plan Fluor 4x/0.12, N Plan Fluor 10x/0.30, N Plan Fluor 20x/0.40 i N Plan Fluor 40x/0.60. Program komputerowy dla mikroskopu Leica DM IL-Led: JENOPTIK Gryphax. Obiektywy dla mikroskopu konfokalnego Nikon A1Rsi: Plan Fluor 4x/0.13, Plan Apo 10x/0.45 DIC N1,

Plan Apo VC 20x/0.75 DIC N2, Apo 40x/1.25 WI λS DIC N2 I Plan Apo VC 60x/1.4 Oil DIC N2. Program komputerowy dla mikroskopu Nikon A1Rsi: Nikon NIS Elements. Zdjęcia analizowano i oznaczano ilościowo w programie ImageJ z wykorzystaniem funkcji mierzenia powierzchni i średniej intensywności fluorescencji.

Barwienie immunofluorescencyjne mysich trzustek

Zwierzęta hodowano w zwierzętarni Wielkopolskiego Centrum Zaawansowanych Technologii w Poznaniu. Zwierzęta były hodowane w odpowiednich warunkach, które spełniały normy określone w ustawie z dnia 15 stycznia 2015 roku o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych i edukacyjnych. Trzustki embrionalnych i dorosłych myszy *Mus musculus* szczepu CD1 (AnimaLab, nr katalogowy 241011) zostały wykorzystane do barwienia immunofluorescencyjnego. Samica i samiec zostali ze sobą sparowani i od momentu pojawienia się czopu kopulacyjnego zaczęto liczyć dni embrionalne zaczynając od dnia e0,5. Zwierzęta były uśmiercane według wytycznych określonych w ustawie dnia 15 stycznia 2015 roku o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych i edukacyjnych.

Mysie embrionalne oraz rozwinięte trzustki po sekcji utrwalono w 4% roztworze paraformaldehydu (PFA) w $1 \times$ PBS przez noc w temperaturze 4°C i przepłukano 3 razy $1 \times$ PBS. Utrwalone trzustki odwodniono za pomocą inkubacji w 4°C w 15% roztworze sacharozy przez 4 godziny, a następnie w 4°C w 30% roztworze sacharozy przez noc. Następnie trzustki zatopiono w macierzy do krioskrawków O.C.T. i zamrażano w ciekłym azocie. Zamrożone bloczki przechowywano w temperaturze -80°C. Bloczki krojono na kriostacie w temperaturze -24°C na skrawki grubości 10–12 μm, na szkiełka podstawowe Superfrost. Szkiełka ze skrawkami przechowywano w temperaturze -80°C. Przed rozpoczęciem barwienia szkiełka ogrzewano w temperaturze pokojowej przez 30 minut i płukano 3 razy po 10 minut w $1 \times$ PBS w celu pozbycia się macierzy O.C.T. Potem skrawki barwiono według protokołu barwienia komórek adhezyjnych opisanego powyżej.

Barwienie immunofluorescencyjne organoidów 3D

Organoidy 3D zbierano w minimalnej objętości pożywki i przenoszono do roztworu 1% BSA w $1 \times$ PBS na lodzie, aby zapobiec sklejanemu się sfer ze sobą. Po jednym płukaniu z użyciem $1 \times$ PBS, organoidy utrwalano 4% roztworem paraformaldehydu (PFA) w $1 \times$ PBS przez 45 minut w temperaturze 4°C i płukano jednokrotnie 0,1% roztworem Tween20 w 1

× PBS. Podstawowym roztworem wykorzystywanym w dalszej części protokołu barwienia immunofluorescencyjnego organoidów był bufor do płukania organoidów (OWB, ang. *organoid wash buffer*; 2% BSA, 0,1% Triton X-100, 0,025% SDS, 1 × PBS). Organoidy inkubowano przez noc w temperaturze 4°C z przeciwciałami pierwszorzędowymi rozcieńczonymi według zaleceń producenta w roztworze OWB. Po 3 płukaniach w OWB (pierwsze szybkie, dwa kolejne po 1 godzinę) w temperaturze 4°C, organoidy inkubowano przez noc w temperaturze 4°C w roztworze przeciwciał drugorzędowych rozcieńczonych 1:400 i 1:10000 DAPI w OWB. Przeciwciała drugorzędowe połączone były z fluorochromami Alexa Fluor 488, Rhodamina TRITC lub Alexa Fluor 647 (Jackson ImmunoResearch). Następnie organoidy płukano 2 razy w 0,1% roztworze Tween20 w 1 × PBS (pierwsze szybkie, kolejne przez 1 godzinę) w temperaturze 4°C. Wybarwione organoidy przenoszono na płytkę ze szklanym dnem poprawiającą jakość obrazowania i wykonywania zdjęć. Wybarwione organoidy obrazowane były na mikroskopie konfokalnym Nikon A1Rsi (Nikon, Niemcy). Obiektywy dla mikroskopu konfokalnego Nikon A1Rsi: Plan Fluor 4x/0.13, Plan Apo 10x/0.45 DIC N1, Plan Apo VC 20x/0.75 DIC N2, Apo 40x/1.25 WI λS DIC N2 I Plan Apo VC 60x/1.4 Oil DIC N2. Program komputerowy dla mikroskopu Nikon A1Rsi: Nikon NIS Elements. Zdjęcia analizowano i oznaczano ilościowo w programie ImageJ z wykorzystaniem funkcji mierzenia powierzchni. Powierzchnię komórek wykazujących syntezę określonego białka markerowego znormalizowano do powierzchni DAPI.

Western blot

Ekstrakty białkowe izolowane były z badanych komórek przy użyciu lizującego buforu RIPA (50 mM Tris-HCl, pH = 8,0, 150 mM NaCl, 1% Nonidet-40, 0,5% sodium deoxycholate, 0,1% SDS, 1% inhibitor proteaz i fosfataz, 1% EDTA, 0,1% PMSF) i przechowywane w temperaturze -80°C. Stężenie białek określone było z użyciem metody wykorzystującej kwas bicynchoninowy (BCA) w gotowym zestawie do analizy BCA. Do analizy używano 30 µg ekstraktu białkowego uprzednio inkubowanego przez 10 minut w temperaturze 70°C buforze obciążającym (Bolt LDS buffer ThermoFisher). 30 µg ekstraktu białkowego rozciągnięto w 4–12% żelu Bis-akrylamidowym (4-12% Bis-Tris Plus Gel ThermoFisher). Elektroforezę prowadzono przy 165 V przez 10 minut, a następnie 200 V przez dodatkowe 30 minut, przy stałym prądzie 100 amperów. Powstałe prążki przeniesiono na membrany PVDF (Thermo Fisher Scientific) przez 10 minut w urządzeniu BioRad Trans-Blot Turbo Transfer System. Następnie, membrany zablokowano 0,125% odłuszczonego

mlekiem w proszku lub 1% BSA w roztworze 0,05% Tween20 w $1 \times$ TBS i inkubowano z pierwszorzędowymi i drugorzędowymi przeciwciałami połączonymi z peroksydazą chrzanową (HRP). Kompleksy przeciwciało-antygen wizualizowano za pomocą wzmocnionej chemiluminescencji (ECL) za pomocą substratu Pierce™ ECL WB substrat (Thermo Scientific) i wykrywano za pomocą systemu G:Box (Syngene). Wyniki oznaczono ilościowo w programie ImageJ z funkcją analizy żelu.

Cytometria przepływowa

Komórki zdysocjowano za pomocą TrypLE w celu uzyskania zawiesiny pojedynczych komórek. Następnie komórki utrwalano przez inkubację z 4% roztworem paraformaldehydu (PFA) w $1 \times$ PBS z 0,1% saponiną przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Utrwalone komórki przemyto jednorazowo roztworem 0,1% saponiny z 1% BSA w $1 \times$ PBS. Zawiesinę komórkową wirowano $1000 \times g$ przez 5 minut w temperaturze $4^{\circ}C$. Osad komórkowy zawieszono w 1 ml roztworu 0,1% saponiny z 1% BSA w $1 \times$ PBS, policzono i 3×10^4 komórek pobierano do jednego barwienia. Zawiesinę 3×10^4 komórek inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi przez noc w $4^{\circ}C$ z wytrząsaniem. Przeciwciała rozcieńczone były w roztworze 0,1% saponiny z 1% BSA w $1 \times$ PBS. Następnego dnia komórki przemywano dwukrotnie roztworem 0,1% saponiny z 1% BSA w $1 \times$ PBS i inkubowano z drugorzędowymi przeciwciałami połączonymi z fluorochromami Rhodamine TRITC lub Alexa Fluor 647 (Jackson ImmunoResearch) rozcieńczonymi 1:800 w roztworze 0,1% saponiny z 1% BSA w $1 \times$ PBS. Inkubacja z przeciwciałami drugorzędowymi trwała 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Nadmiar drugorzędowych przeciwciał usunięto przez jednokrotne przemycie $1 \times$ PBS. Po płukaniu komórki ponownie zawieszano w $1 \times$ PBS, zastosowano bezpośrednio do analizy cytometrii przepływowej. Dane z analiz uzyskano za pomocą cytometru Guava EasyCyte HT (Millipore). Analizę danych, w tym bramkowanie, ocenę ilościową i generowanie wykresów gęstości/histogramów, przeprowadzono za pomocą oprogramowania Guava EasyCyte (Millipore).

6.9. Różnicowanie *in vitro* ludzkich komórek PSC

Różnicowanie spontaniczne

Różnicowanie spontaniczne przeprowadzano w formie organoidów 3D, płytka przez cały czas różnicowania była na wytrząsarce orbitalnej. Pożywkę bez dodatku związków

utrzymujących pluripotencję zmieniano codziennie. Przez pierwsze 48 godzin podawano pożywkę S1, następnie pożywkę S2 (tab. 14).

Tabela 14. Skład pożywki do różnicowania spontanicznego

Odczynnik	Stężenie końcowe
<i>Pożywka S1</i>	
Pożywka Advanced DMEM/F12	1×
Penicylina/Streptomycyna (10,000 U/mL, 100×	1%
Suplement Glutamax (100×	1×
Płodowa surowica cielęca (FBS)	2%
<i>Pożywka S2</i>	
Pożywka Advanced DMEM/F12	1×
Penicylina/Streptomycyna (10 000 U/mL, 100×	1×, 100 U/ml
Suplement Glutamax (100×	1×
Płodowa surowica cielęca (FBS)	10%
Roztwór aminokwasów (NEAA, 100×	1×

Różnicowanie w kierunku komórek β trzustki

Różnicowanie w kierunku komórek β trzustki przeprowadzano w formie organoidów 3D, płytka przez cały czas różnicowania była na wytrząsarce orbitalnej. Przed rozpoczęciem różnicowania organoidy przepłukano pożywką DMEM/F12. Pożywkę różnicującą do dnia 20 zmieniano codziennie, po dniu 20 co dwa dni. Szczegółowy skład podstawowych pożywek przedstawiono w tabeli 15 (tab. 15).

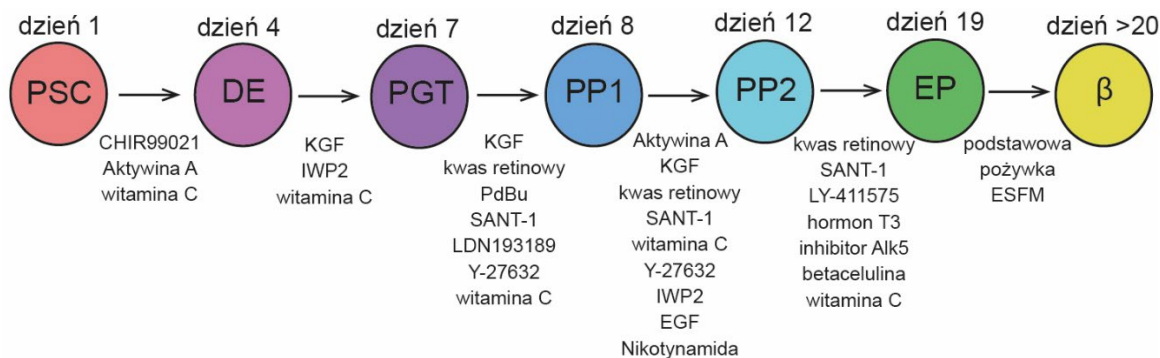
Tabela 15. Szczegółowy skład podstawowych pożywek różnicujących

Odczynnik	Dzień 1-3 (pożywka S1)	Dzień 4-6 (pożywka S2)	Dzień 7-12 (pożywka S3)	Dzień 13-19 (pożywka S5)	Dzień 20-26 (pożywka ESFM)
Pożywka MCDB131	1×	1×	1×	1×	1×
Suplement Glutamax (100×	1×	1×	1×	1×	1×
Penicylina/Streptomycyna (10,000 U/mL, 100×	1×, 100 U/ml	1×, 100 U/ml	1×, 100 U/ml	1×, 100 U/ml	1×, 100 U/ml
Glukoza	2,44 mM	2,44 mM	2,44 mM	20 mM	2,6 mM
Wodorowęglan sodu	29 mM	13 mM	13 mM	18,5 mM	-
Roztwór aminokwasów (NEAA, 100×	-	-	-	-	1×
BSA	2%	2%	2%	2%	2,1%
ITS-X	2 µl/100 ml	2 µl/100 ml	500 µl/100 ml	500 µl/100 ml	-
Siarczan cynku	-	-	-	260 nM	1,04 µM
Siarczan heparyny	-	-	-	-	10 mg/l
Pierwiastki śladowe A (1000×	-	-	-	-	1×
Pierwiastki śladowe B (1000×	-	-	-	-	1×

Związki niskocząsteczkowe i białka kierunkujące różnicowaniem dodawano na świeżo każdego dnia do odpowiedniej objętości podstawowej pożywki różnicującej. Szczegółowy skład pożywki różnicującej używanej podczas różnicowania podano poniżej (**ryc. 76**). W nawiasie zapisano stężenie końcowe związku niskocząsteczkowego lub białka.

- Dzień 1: podstawowa pożywka S1, CHIR99021 (3 µM), aktywina A (100 ng/ml), witamina C (250 µM).
- Dzień 2–3: podstawowa pożywka S1, aktywina A (100 ng/ml), witamina C (250 µM).
- Dzień 4–6: podstawowa pożywka S2, KGF (50 ng/ml), witamina C (250 µM), IWP2 (1,25 µM).
- Dzień 7: podstawowa pożywka S3, KGF (50 ng/ml), kwas retinowy (2 µM), PdBu (500 nM), SANT-1 (250 nM), LDN193189 (200 nM), witamina C (250 µM), Y-27632 (10 µM).
- Dzień 8–12: podstawowa pożywka S3, aktywina A (5 ng/mL), KGF (50 ng/ml), kwas retinowy (100 nM), SANT-1 (250 nM), witamina C (250 µM), Y-27632 (10 µM), IWP2 (1,25 µM), EGF (100 ng/mL), nikotynamida (10 mM).

- Dzień 13–19: podstawowa pożywka S5, kwas retinowy (100 nM), SANT-1 (250 nM), LY-411575 (1 μ M), hormon T3 (1 μ M), inhibitor Alk5 (10 μ M), betacelulina (20 ng/mL), witamina C (250 μ M).
- Dzień 20–26: podstawowa pożywka ESFM.



Rycina 76. Etapy różnicowania in vitro z ludzkich PSC w kierunku komórek β trzustki. Na schemacie zaznaczono poszczególne stadia (w kołach), w którym dniu różnicowania osiąga się dane stadium (nad kołami) oraz związki niskocząsteczkowe, białka i czynniki wzrostu wpływające na osiągnięcie przez różnicowane komórki określonego stadium (pod strzałkami)

6.10. Spis materiałów

Biologia molekularna

Tabela 16. Spis materiałów wykorzystywanych do biologii molekularnej

Odczynnik	Producent	Nr katalogowy
Zestawy		
Agilent High sensitivity DNA	Agilent	5067-4626
Agilent RNA 6000 Nano	Agilent	5067-1511
CUT&RUN	Cell Signaling	8665S
GeneJET PCR Purification Kit	Thermo Fisher Scientific	K0702
Genomic minizestaw do izolacji genomowego DNA	A&A Biotechnology	116-250
GoTaq G2 Hot Start	Promega	M7405
MEGAclean™ Transcription Clean-Up	Invitrogen	AM1908
MEGAscript™ T7 Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific	AM1354
NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina®	NEB	E7760G
NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Index Primers Set 1)	NEB	E7335S
NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina®	NEB	E7645S
NEBuilder HiFi DNA assembly kit	NEB	E2621L
Pożywka LB	Bioshop	3400-010-02
PureLink™ Fast Low-Endotoxin Midi Plasmid Purification Kit	Thermo Fisher Scientific	K210012
PureLink™ Quick Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific	K210012

Q5 start high-fidelity	NEB	M0493L
Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen	Q32850
Qubit™ dsDNA standardy	Invitrogen	Q32854
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific	K1622
PCR i qPCR		
Power SYBR Green PCR	Thermo Fisher Scientific	4367659
dNTP (100 mM)	Thermo Fisher Scientific	R0182
TRIzol™ roztwór	Thermo Fisher Scientific	15596026
GlycoBlue Coprecipitant	Invitrogen	AM9516
6× bufor obciążający do DNA	Thermo Fisher Scientific	R0611
Bromek etydyny (10 mg/ml)	IBI Scientific	IB40075
DNA Marker 1	A&A Biotechnology	3000-500
Agarozą	Sigma Aldrich	A9539
Enzymy		
DNase I, RNase-free (1 U/μL)	Thermo Fisher Scientific	EN0521
FastDigest XhoI	Thermo Fisher Scientific	FD0694
FastDigest MluI	Thermo Fisher Scientific	FD0564
Odczynniki do buforów		
Tween20	Bioshop	TWN510.100
Triton X-100	Bioshop	TRX777.100
Dimetylosulfotlenek (DMSO)	Bioshop	DMS555.1
Chloroform CZDA 98,5%	Chempur	363-112344306
Izopropanol CZDA 99,7%	Chempur	363-117515002
Etanol CZDA 99,8%	Chempur	363-113964800
TRIS-HCl	Bioshop	TRS002.1
NaCl	Sigma Aldrich	16818
Nonidet-P40	Bioshop	NON505.100
Deoksychołan sodu	Bioshop	DCA333
SDS	Bioshop	SDS999.500
Glicerol	Bioshop	GLY001.500
EDTA	Bioshop	EDT001.1
1 × PBS	Invitrogen	3002
Inne		
UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water	Thermo Fisher Scientific	10977035
NEB Turbo Competent <i>E. coli</i>	NEB	C2984I
Kanamycyna	IBI Scientific	IB02120
Lipofectamine RNAiMax	Thermo Fisher Scientific	13778-100
Lipofectamine Stem	Thermo Fisher Scientific	STEM00001

Analiza białek

Tabela 17. Spis przeciwciał i materiałów wykorzystywanych do analizy białek. Cz – człowiek; My – mysz; Sz – szczur; Kr – Królik; Ma – małpa; Ku – kurczak; DP – danio pręgowany; Ch – chomik

Antygen	Gatunek	Specyficzność	Producent	Nr katalogowy	Rozcieńczenie	Metoda
Przeciwciała pierwszorzędowe						
α-TUBULIN	Królik	Cz, My, Sz, Kr	Merck Millipore	04-1117	1:2000	WB
AKT	Królik	Cz, My, Sz, Ma	Cell Signaling	C67E7	1:1000	WB
AKT fosforylowany (Ser473)	Królik	Cz, My, sz, Ch, Ma	Cell Signaling	#9271	1:1000	WB
CDH1	Koza	Cz, My	R&D	AF748	1:100	IF
CHGA	Mysz	Cz, My, Sz	Santa Cruz	sc-393941	1:200	IF
CHGA	Królik	Cz, My, Ma	Abcam	ab15160	1:200	IF
ETV1	Królik	Cz, My, Sz	Abcam	ab184120	1:1500	IF
ETV1	Mysz	Cz	R&D	MAB9398	1:500	WB
ETV1	Królik	Cz	Invitrogen	PA5-67447	1:100	IF
FOXA2	Królik	Cz, My, Sz	Merck Millipore	07-633	1:250	IF
GAPDH	Mysz	Cz, My, Sz, Kr	Merck Millipore	MAB374	1:2000	WB
GCG	Mysz	Cz, My, Sz	Santa Cruz	sc-514592	1:100	IF
ITGA5	Mysz	Cz	Santa Cruz	sc-9969	1:100	IF
NANOG	Koza	Cz	R&D	AF1997	1:40	IF
NKX6-1	Mysz	Cz, My, Sz, Ku, DP	DSHB	F55A10	1:20	IF
OCT3/4	Mysz	Cz, My, Sz	Santa Cruz	sc-5279	1:100	IF, FC
PDX1	Koza	Cz	R&D	AF2419	1:100	IF
Peptyd C (proinsulina)	Szczur	Cz	DSHB	GN-ID4	1:20	IF
pHH3	Królik	Cz, My	Merck Millipore	06-570	1:100	IF
PXN	Mysz	Cz	Santa Cruz	sc-365379	1:100	IF
SOX17	Koza	Cz	R&D	AF1924	1:100	IF
SOX2	Koza	Cz	Santa Cruz	sc-17320	1:300	IF
SOX9	Królik	Cz, My, Sz, Ku	Merck Millipore	AB5535	1:100	IF
VCL	Mysz	Cz	Santa Cruz	sc-73614	1:100	IF
Przeciwciała drugorzędowe						
AlexaFluor488	Osiół	Mysie IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	715-545-150	1:400	IF
AlexaFluor488	Osiół	Królicze IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	711-545-152	1:400	IF, FC
AlexaFluor488	Osiół	Kozie IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	705-545-147	1:400	IF
TRITC	Osiół	Kozie IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	705-025-147	1:400	IF
TRITC	Osiół	Mysie IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	715-025-150	1:400	IF
TRITC	Osiół	Królicze IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	711-025-152	1:400	IF
TRITC	Osiół	Szczurze IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	712-025-153	1:400	IF
AlexaFluor647	Osiół	Kozie IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	705-605-147	1:400	IF

AlexaFluor647	Osiół	Królicze IgG (H+L)	Jackson Immunoresearch	711-605-152	1:400	IF, FC
AlexaFluor647	Osiół	Mysie IgG (H+L)	Jackson Immunoresearch	715-605-151	1:400	IF
Peroksydaza chrzanowa HRP	Koza	Królicze IgG	Sigma Aldrich	A9169	1:4000	WB
Peroksydaza chrzanowa HRP	Królik	Mysie IgG	A9044	A9044	1:4000	WB
Surowica						
Ośła surowica (ang. <i>Normal Donkey Serum</i>)	Osiół	–	Jackson Immunoresearch	017-000-121	5%	IF
Inne						
Odczynnik			Producent		Nr katalogowy	
DAPI			Sigma Aldrich		D9542	
SiR-DNA			Tebu-bio		251SC007	
O.C.T.			VWR		361603E	
Szkiełka nakrywkowe			Zeiss		474030-9000-000	
Szkiełka podstawowe Superfrost			VWR		631-0108	
Środek przeciw blaknięciu ProLong™ Diamond			Invitrogen		P36961	
Paraformaldehyd			Sigma Aldrich		158127	
Glicerol			Bioshop		GLY001.500	
Saponina			Carl Roth		ROTH-4185.1	
Sacharoza			Merck Millipore		S0389	
Halt™ inhibitor proteaz i fosfataz (100×)			Thermo Fisher Scientific		78441	
Pierce™ ECL WB substrat			Thermo Fisher Scientific		32209	
PVDF membrana, 0.45 µm			Thermo Fisher Scientific		88518	
Trans-Blot Turbo Transfer system			Bio-Rad		1704150	
Zestaw do analizy BCA			Thermo Fisher Scientific		J63283.QA	
4× Bolt™ LDS bufor obciążający			Thermo Fisher Scientific		B0007	
PageRuler Plus marker białkowy			Thermo Fisher Scientific		26620/26619	
Żel bis-akrylamidowy 4-12% Bis-tris Plus Gel			Invitrogen		NW0412C	
Guava EasyCyte HT			Merck Millipore		HT	
G:Box			Syngene			

Hodowla komórkowa, różnicowanie i modulacja szlaku PI3K/AKT

Tabela 18. Spis odczynników i materiałów wykorzystywanych do hodowli komórkowej, różnicowania i modulacji szlaku PI3K/AKT

Odczynnik	Producent	Nr katalogowy
Pożywki		
Pożywka StemFlex	Thermo Fisher Scientific	A3349301
Pożywka Essential 8 (E8)	Thermo Fisher Scientific	A1516901
Penicylina/streptomycyna (10,000 U/mL, 100×)	Thermo Fisher Scientific	15140122
Płodowa surowica cielęca (FBS)	Sigma Aldrich	F7524
Roztwór aminokwasów (NEAA, 100×)	Thermo Fisher Scientific	11140035
Pożywka DMEM/F12	Corning	10-090-CV
Pożywka Advanced DMEM/F12	Thermo Fisher Scientific	12634-010
Suplement Glutamax	Thermo Fisher Scientific	35050038
Pożywka OptiMEM	Thermo Fisher Scientific	11058021
Pożywka MCDB 131	Corning	15-100-CV
Insulina-Transferyna-Selen-Etanolamina (ITS-X, 100×)	Thermo Fisher Scientific	51500056
Pierwiastki śladowe A	Polgen	25820008
Pierwiastki śladowe B	Polgen	23720004
Albumina surowicy bydlęcej, frakcja V (7,5%)	Thermo Fisher Scientific	15260037
Siarczan heparyny	Sigma Aldrich	H3149
Siarczan cynku	Merck Millipore	1.08883
Glukoza	Merck Millipore	G7021-1KG
Probumin® Albumina surowicy bydlęcej, frakcja V, wolna od kwasów tłuszczowych	Merck Millipore	810685
Wodorowęglan sodu	Merck Millipore	S5761-500G
Podłoża ECM		
Geltrex (dla hESC)	Thermo Fisher Scientific	A1413302
Witronektyna (rekombinowana ludzka)	Thermo Fisher Scientific	A14700
Fibronektyna (ludzkie osocze)	Merck Millipore	FC010
Laminina V	Pożywka hodowlana z komórek 804-G	
Związki niskocząsteczkowe i białka		
CHIR 99021	Peprtech	2520691
Witamina C	Sigma Aldrich	A4544
LDN193189	Peprtech	1066208
LY-411575	Adooq	A11176
Nikotynamida	Sigma Aldrich	N0636
12,13-dimaślan forbolu (PdBu)	Tocris	4153
PI-103	Adooq	A15212
Inhibitor Alk5 (Alk5i II)	Adooq	A11762
Kwas retinowy	Peprtech	3027949
SANT-1	Tocris	1974

Hormon T3	Sigma Aldrich	T6397
Torin 2	Adooq	A11586
Inhibitor ROCK (Y-27632)	Peprtech	1293823
Aktywina A	Peprtech	120-14P
KGF (FGF7)	Peprtech	AF-100-19
EGF	Peprtech	AF-100-15
Betacelulina	Peprtech	100-50
IWP2	Selleckchem	S7085
Insulina	Sigma Aldrich	I3536
<i>Inne</i>		
EDTA	Bioshop	EDT001.1
1 x PBS	Invitrogen	3002
TrypLE™ Express	Thermo Fisher Scientific	12604021
Trypsyna (2,5%)	Thermo Fisher Scientific	15090046
Doxycyclina	Sigma Aldrich	D9891
Błękit trypanu (0,4%)	Thermo Fisher Scientific	15250061
Dimetylosulfotlenek (DMSO)	Sigma Aldrich	D2650
Automatyczny licznik komórek Countess™ 3	Invitrogen	AMQAX2000
Inkubator z atmosferą CO ₂	PHCbi	MCO-170AICD-PE
Płytki do hodowli 24-dołkowe, adhezyjne	CELLSTAR	662160
Płytki do hodowli 6-dołkowe, adhezyjne	CELLSTAR	657160
Płytki do hodowli 6-dołkowe, nisko adhezyjne	Eppendorf	0030 720.016
IncuCyte SX1	Sartorius	SX1

7. *Spis literaturowy*

- Abe, H., Okazawa, M., Nakanishi, S. (2011). The Etv1/Er81 transcription factor orchestrates activity-dependent gene regulation in the terminal maturation program of cerebellar granule cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(30), 12497–12502. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109940108>
- Abyzov, A., Mariani, J., Palejev, D., Zhang, Y., Haney, M. S., Tomasini, L., Ferrandino, A. F., Rosenberg Belmaker, L. A., Szekely, A., Wilson, M., Kocabas, A., Calixto, N. E., Grigorenko, E. L., Huttner, A., Chawarska, K., Weissman, S., Urban, A. E., Gerstein, M., Vaccarino, F. M. (2012). Somatic copy number mosaicism in human skin revealed by induced pluripotent stem cells. *Nature*, 492(7429), 438–442. <https://doi.org/10.1038/nature11629>
- Aguayo-Mazzucato, C., Zavacki, A. M., Marinelarena, A., Hollister-Lock, J., el Khattabi, I., Marsili, A., Weir, G. C., Sharma, A., Larsen, P. R., Bonner-Weir, S. (2013). Thyroid hormone promotes postnatal rat pancreatic β -cell development and glucose-responsive insulin secretion through MAFA. *Diabetes*, 62(5), 1569–1580. <https://doi.org/10.2337/db12-0849>
- Alexandre-Heymann, L., Mallone, R., Boitard, C., Scharfmann, R., Larger, E. (2019). Structure and function of the exocrine pancreas in patients with type 1 diabetes. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 20(2), 129–149. <https://doi.org/10.1007/s11154-019-09501-3>
- Amit, M., Carpenter, M. K., Inokuma, M. S., Chiu, C. P., Harris, C. P., Waknitz, M. A., Itskovitz-Eldor, J., Thomson, J. A. (2000). Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Developmental Biology*, 227(2), 271–278. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9912>
- Amit, M., Shariki, C., Margulets, V., Itskovitz-Eldor, J. (2004). Feeder Layer- and Serum-Free Culture of Human Embryonic Stem Cells. *Biology of Reproduction*, 70(3), 837–845. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.021147>

- Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N., Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes and Development*, *17*(1), 126–140. <https://doi.org/10.1101/gad.224503>
- Baena, E., Shao, Z., Linn, D. E., Glass, K., Hamblen, M. J., Fujiwara, Y., Kim, J., Nguyen, M., Zhang, X., Godinho, F. J., Bronson, R. T., Mucci, L. A., Loda, M., Yuan, G. C., Orkin, S. H., Li, Z. (2013). ETV1 directs androgen metabolism and confers aggressive prostate cancer in targeted mice and patients. *Genes and Development*, *27*(6), 683–698. <https://doi.org/10.1101/gad.211011.112>
- Baldwin, T., Sakthianandeswaren, A., Curtis, J. M., Kumar, B., Smyth, G. K., Foote, S. J., Handman, E. (2007). Wound healing response is a major contributor to the severity of cutaneous leishmaniasis in the ear model of infection. *Parasite Immunology*, *29*(10), 501–513. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.00969.x>
- Bankaitis, E. D., Bechard, M. E., Wright, C. V. E. (2015). Feedback control of growth, differentiation, and morphogenesis of pancreatic endocrine progenitors in an epithelial plexus niche. *Genes and Development*, *29*(20), 2203–2216. <https://doi.org/10.1101/gad.267914.115>
- Bar, S., Seaton, L. R., Weissbein, U., Eldar-Geva, T., Benvenisty, N. (2019). Global Characterization of X Chromosome Inactivation in Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Reports*, *27*(1), 20-29.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.019>
- Barakat, T. S., Gribnau, J. (2012). X chromosome inactivation in the cycle of life. *Development (Cambridge)*, *139*(12), 2085–2089. <https://doi.org/10.1242/dev.069328>
- Baron, M., Veres, A., Wolock, S. L., Faust, A. L., Gaujoux, R., Vetere, A., Ryu, J. H., Wagner, B. K., Shen-Orr, S. S., Klein, A. M., Melton, D. A., Yanai, I. (2016). A Single-Cell Transcriptomic Map of the Human and Mouse Pancreas Reveals Inter- and Intra-cell Population Structure. *Cell Systems*, *3*(4), 346-360.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2016.08.011>
- Bendall, S. C., Stewart, M. H., Menendez, P., George, D., Vijayaragavan, K., Werbowetski-Ogilvie, T., Ramos-Mejia, V., Rouleau, A., Yang, J., Bossé, M., Lajoie, G., Bhatia, M. (2007). IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of

- pluripotent human cells in vitro. *Nature*, 448(7157), 1015–1021.
<https://doi.org/10.1038/nature06027>
- Benitez, C. M., Goodyer, W. R., Kim, S. K. (2012). Deconstructing pancreas developmental biology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(6), 1–17.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012401>
- Benitez, C. M., Qu, K., Sugiyama, T., Pauerstein, P. T., Liu, Y., Tsai, J., Gu, X., Ghodasara, A., Arda, H. E., Zhang, J., Dekker, J. D., Tucker, H. O., Chang, H. Y., Kim, S. K. (2014). An Integrated Cell Purification and Genomics Strategy Reveals Multiple Regulators of Pancreas Development. *PLoS Genetics*, 10(10).
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004645>
- Borowiak, M., Maehr, R., Chen, S., Chen, A. E., Tang, W., Fox, J. L., Schreiber, S. L., Melton, D. A. (2009). Small Molecules Efficiently Direct Endodermal Differentiation of Mouse and Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.01.014>
- Boyer, L. A., Tong, I. L., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., Gifford, D. K., Melton, D. A., Jaenisch, R., Young, R. A. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 122(6), 947–956.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.020>
- Braun, M. (2014). The somatostatin receptor in human pancreatic β -cells. *W Vitamins and Hormones*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800174-5.00007-7>
- Britton, E., Rogerson, C., Mehta, S., Li, Y., Li, X., Fitzgerald, R. C., Ang, Y. S., Sharrocks, A. D. (2017). Open chromatin profiling identifies AP1 as a transcriptional regulator in oesophageal adenocarcinoma. *PLoS Genetics*, 13(8), 1–24.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006879>
- Brons, I. G. M., Smithers, L. E., Trotter, M. W. B., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva De Sousa Lopes, S. M., Howlett, S. K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R. A., Vallier, L. (2007). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*, 448(7150), 191–195. <https://doi.org/10.1038/nature05950>

- Buecker, C., Geijsen, N. (2010). Different flavors of pluripotency, molecular mechanisms, and practical implications. *Cell Stem Cell*, 7(5), 559–564. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.10.007>
- Burlison, J. S., Long, Q., Fujitani, Y., Wright, C. V. E., Magnuson, M. A. (2008). Pdx-1 and Ptf1a concurrently determine fate specification of pancreatic multipotent progenitor cells. *Developmental Biology*, 316(1), 74–86. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.01.011>
- Byrnes, L. E., Wong, D. M., Subramaniam, M., Meyer, N. P., Gilchrist, C. L., Knox, S. M., Tward, A. D., Ye, C. J., Sneddon, J. B. (2018). Lineage dynamics of murine pancreatic development at single-cell resolution. *Nature Communications*, 9(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06176-3>
- Cahan, P., Daley, G. Q. (2013). Origins and implications of pluripotent stem cell variability and heterogeneity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(6), 357–368. <https://doi.org/10.1038/nrm3584>
- Cai, C., Hsieh, C. L., Omwancha, J., Zheng, Z., Chen, S. Y., Baert, J. L., Shemshedini, L. (2007). ETV1 is a novel androgen receptor-regulated gene that mediates prostate cancer cell invasion. *Molecular Endocrinology*, 21(8), 1835–1846. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0480>
- Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A., Rivett, D., Jones, K., Dalton, S. (2005). LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development*, 132(5), 885–896. <https://doi.org/10.1242/dev.01670>
- Casanova, E. A., Shakhova, O., Patel, S. S., Asner, I. N., Pelczar, P., Weber, F. A., Graf, U., Sommer, L., Bürki, K., Cinelli, P. (2011). Pramel7 mediates LIF/STAT3-dependent self-renewal in embryonic stem cells. *Stem Cells*, 29(3), 474–485. <https://doi.org/10.1002/stem.588>
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 113(5), 643–655. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00392-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00392-1)

- Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L., Smith, A. (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature*, 450(7173), 1230–1234. <https://doi.org/10.1038/nature06403>
- Chen, G., Gulbranson, D. R., Hou, Z., Bolin, J. M., Ruotti, V., Probasco, M. D., Smuga-Otto, K., Howden, S. E., Diol, N. R., Propson, N. E., Wagner, R., Lee, G. O., Antosiewicz-Bourget, J., Teng, J. M. C., Thomson, J. A. (2011). Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nature Methods*, 8(5), 424–429. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1593>
- Chen, J., Liu, J., Yang, J., Chen, Y., Chen, J., Ni, S., Song, H., Zeng, L., Ding, K., Pei, D. (2011). BMPs functionally replace Klf4 and support efficient reprogramming of mouse fibroblasts by Oct4 alone. *Cell Research*, 21(1), 205–212. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.172>
- Chen, X., Xu, H., Yuan, P., Fang, F., Huss, M., Vega, V. B., Wong, E., Orlov, Y. L., Zhang, W., Jiang, J., Loh, Y. H., Yeo, H. C., Yeo, Z. X., Narang, V., Govindarajan, K. R., Leong, B., Shahab, A., Ruan, Y., Bourque, G., Ng, H. H. (2008). Integration of External Signaling Pathways with the Core Transcriptional Network in Embryonic Stem Cells. *Cell*, 133(6), 1106–1117. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.043>
- Chen-Yun Chen, Desy Lee, Yu-Ting Yan, Chia-Ning Shen, Shiaw-Min Hwang, Sho Tone Lee, P. H. (2015). Pluripotent stem cells Bcl3 Bridges LIF-STAT3 to Oct4 Signaling in the Maintenance of Naive Pluripotency. *Oxford Stem Cells*, 33(2015), 3468–3480.
- Chew, J.-L., Loh, Y.-H., Zhang, W., Chen, X., Tam, W.-L., Yeap, L.-S., Li, P., Ang, Y.-S., Lim, B., Robson, P., Ng, H.H. (2005). Reciprocal Transcriptional Regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 Complex in Embryonic Stem Cells . *Molecular and Cellular Biology*, 25(14), 6031–6046. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.14.6031-6046.2005>
- Cho, Y. M., Lim, J. M., Yoo, D. H., Kim, J. H., Chung, S. S., Park, S. G., Kim, T. H., Oh, S. K., Choi, Y. M., Moon, S. Y., Park, K. S., Lee, H. K. (2008). Betacellulin and nicotinamide sustain PDX1 expression and induce pancreatic β -cell differentiation in

- human embryonic stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 366(1), 129–134. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.11.112>
- Cole, M. F., Johnstone, S. E., Newman, J. J., Kagey, M. H., Young, R. A. (2008). Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes and Development*, 22(6), 746–755. <https://doi.org/10.1101/gad.1642408>
- Collins, C., Denisin, A. K., Pruitt, B. L., Nelson, W. J. (2017). Changes in E-cadherin rigidity sensing regulate cell adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(29), E5835–E5844. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618676114>
- D. Leprince, A. Gegonne, J. Coll, C. de Taisne, A. Schneeberger, C. Lagrou, D. S. (1983). A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature*, 306(24 november), 395–397.
- Dalton, S. (2013). Signaling networks in human pluripotent stem cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 25(2), 241–246. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.09.005>
- D’Amour, K. A., Agulnick, A. D., Eliazer, S., Kelly, O. G., Kroon, E., Baetge, E. E. (2005). Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nature Biotechnology*, 23(12), 1534–1541. <https://doi.org/10.1038/nbt1163>
- D’Amour, K. a, Bang, A. G., Eliazer, S., Kelly, O. G., Agulnick, A. D., Smart, N. G., Moorman, M. A., Kroon, E., Carpenter, M. K., Baetge, E. E. (2006). Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 24(11), 1392–1401. <https://doi.org/10.1038/nbt1259>
- de Jaime-Soguero, A., de Oliveira, W. A. A., Lluís, F. (2018). The pleiotropic effects of the canonical wnt pathway in early development and pluripotency. *Genes*, 9(2), 1–23. <https://doi.org/10.3390/genes9020093>
- de Los Angeles, A., Loh, Y. H., Tesar, P. J., Daley, G. Q. (2012). Accessing naïve human pluripotency. *Current Opinion in Genetics and Development*, 22(3), 272–282. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2012.03.001>

- Deuse, T., Hu, X., Agbor-Enoh, S., Koch, M., Spitzer, M. H., Gravina, A., Alawi, M., Marishta, A., Peters, B., Kosaloglu-Yalcin, Z., Yang, Y., Rajalingam, R., Wang, D., Nashan, B., Kiefmann, R., Reichenspurner, H., Valantine, H., Weissman, I. L., Schrepfer, S. (2019). De novo mutations in mitochondrial DNA of iPSCs produce immunogenic neoepitopes in mice and humans. *Nature Biotechnology*, *37*(10), 1137–1144. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0227-7>
- Diecke, S., Quiroga-Negreira, A., Redmer, T., Besser, D. (2008). FGF2 signaling in mouse embryonic fibroblasts is crucial for self-renewal of embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs*, *188*(1–2), 52–61. <https://doi.org/10.1159/000121282>
- Dziedzicka, D., Tewary, M., Keller, A., Tilleman, L., Prochazka, L., Östblom, J., Couvreur De Deckersberg, E., Markouli, C., Franck, S., van Nieuwerburgh, F., Spits, C., Zandstra, P. W., Sermon, K., Geens, M. (2021). Endogenous suppression of WNT signalling in human embryonic stem cells leads to low differentiation propensity towards definitive endoderm. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85447-4>
- Elsdale, T. R., Gurdon, J. B., Fischberg, M. (1960). A description of the technique for nuclear transplantation in *Xenopus laevis*. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, *8*(January 1961), 437–444. <https://doi.org/10.1242/dev.8.4.437>
- Elso, C. M., Roberts, L. J., Smyth, G. K., Thomson, R. J., Baldwin, T. M., Foote, S. J., Handman, E. (2004). Leishmaniasis host response loci (*lmr1-3*) modify disease severity through a Th1/Th2-independent pathway. *Genes and Immunity*, *5*(2), 93–100. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364042>
- Enge, M., Arda, H. E., Mignardi, M., Beausang, J., Bottino, R., Kim, S. K., Quake, S. R. (2017). Single-Cell Analysis of Human Pancreas Reveals Transcriptional Signatures of Aging and Somatic Mutation Patterns. *Cell*, *171*(2), 321–330.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.004>
- Festuccia, N., Osorno, R., Halbritter, F., Karwacki-Neisius, V., Navarro, P., Colby, D., Wong, F., Yates, A., Tomlinson, S. R., Chambers, I. (2012). *Esrrb* is a direct *Nanog* target gene that can substitute for *Nanog* function in pluripotent cells. *Cell Stem Cell*, *11*(4), 477–490. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.08.002>

- Fuchs, B., Inwards, C. Y., Janknecht, R. (2003). Upregulation of the matrix metalloproteinase-1 gene by the Ewing's sarcoma associated EWS-ER81 and EWS-Fli-1 oncoproteins, c-Jun and p300. *FEBS Letters*, 553(1–2), 104–108. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00984-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00984-0)
- Gertz, J., Savic, D., Varley, K. E., Partridge, E. C., Safi, A., Jain, P., Cooper, G. M., Reddy, T. E., Crawford, G. E., Myers, R. M. (2013). Distinct properties of cell-type-specific and shared transcription factor binding sites. *Molecular Cell*, 52(1), 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.037>
- Godoy-Parejo, C., Deng, C., Liu, W., Chen, G. (2019). Insulin Stimulates PI3K/AKT and Cell Adhesion to Promote the Survival of Individualized Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, 37(8), 1030–1041. <https://doi.org/10.1002/stem.3026>
- Gonçalves, C. A., Larsen, M., Jung, S., Stratmann, J., Nakamura, A., Leuschner, M., Hersemann, L., Keshara, R., Perlman, S., Lundvall, L., Thuesen, L. L., Hare, K. J., Amit, I., Jørgensen, A., Kim, Y. H., del Sol, A., Grapin-Botton, A. (2021). A 3D system to model human pancreas development and its reference single-cell transcriptome atlas identify signaling pathways required for progenitor expansion. *Nature Communications*, 12(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23295-6>
- Greber, B., Wu, G., Bernemann, C., Joo, J. Y., Han, D. W., Ko, K., Tapia, N., Sabour, D., Sternecker, J., Tesar, P., Schöler, H. R. (2010). Conserved and Divergent Roles of FGF Signaling in Mouse Epiblast Stem Cells and Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 6(3), 215–226. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.01.003>
- Gromada, J., Chabosseau, P., Rutter, G. A. (2018). The α -cell in diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(12), 694–704. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0097-y>
- Gu, G., Dubauskaite, J., Melton, D. A. (2002). Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3⁺ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development*, 129(10), 2447–2457. <https://doi.org/10.1242/dev.129.10.2447>
- Guo, G., Stirparo, G. G., Strawbridge, S. E., Spindlow, D., Yang, J., Clarke, J., Dattani, A., Yanagida, A., Li, M. A., Myers, S., Özel, B. N., Nichols, J., Smith, A. (2021). Human naive epiblast cells possess unrestricted lineage potential. *Cell Stem Cell*, 28(6), 1040–1056.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.02.025>

- Guo, G., von Meyenn, F., Santos, F., Chen, Y., Reik, W., Bertone, P., Smith, A., Nichols, J. (2016). Naive Pluripotent Stem Cells Derived Directly from Isolated Cells of the Human Inner Cell Mass. *Stem Cell Reports*, 6(4), 437–446. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.02.005>
- Guo, G., Yang, J., Nichols, J., Hall, J. S., Eyres, I., Mansfield, W., Smith, A. (2009). Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development*, 136(7), 1063–1069. <https://doi.org/10.1242/dev.030957>
- Gurdon, J. B. (1960). The developmental capacity of nuclei taken from differentiating endoderm cells of *Xenopus laevis*. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 8(May), 505–526. <https://doi.org/10.1242/dev.8.4.505>
- Gurdon, J. B., Elsdale, T. R., Fischberg, M. (1958). Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature*, 182(4627), 64–65. <https://doi.org/10.1038/182064a0>
- Gutierrez-Aguilar, R., Kim, D. H., Casimir, M., Dai, X. Q., Pfluger, P. T., Park, J., Haller, A., Donelan, E., Park, J., D'Alessio, D., Woods, S. C., MacDonald, P. E., Seeley, R. J. (2014). The role of the transcription factor ETV5 in insulin exocytosis. *Diabetologia*, 57(2), 383–391. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-3096-5>
- Hanna, J., Cheng, A. W., Saha, K., Kim, J., Lengner, C. J., Soldner, F., Cassady, J. P., Muffat, J., Carey, B. W., Jaenisch, R. (2010). Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(20), 9222–9227. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004584107>
- Hayashi, R., Ishikawa, Y., Katayama, T., Quantock, A. J., Nishida, K. (2018). CD200 facilitates the isolation of corneal epithelial cells derived from human pluripotent stem cells. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34845-2>
- Hayashi, Y., Emoto, T., Futaki, S., Sekiguchi, K. (2004). Establishment and characterization of a parietal endoderm-like cell line derived from Engelbreth-Holm-Swarm tumor (EHSPEL), a possible resource for an engineered basement membrane matrix. *Matrix Biology*, 23(1), 47–62. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2004.02.003>

- Hayashi, Y., Ohnuma, K., Furue, M. K. (2019). Pluripotent Stem Cell Heterogeneity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1123, 71–94. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11096-3_6
- Heeg, S., Das, K. K., Reichert, M., Bakir, B., Takano, S., Caspers, J., Aiello, N. M., Wu, K., Neesse, A., Maitra, A., Iacobuzio-Donahue, C. A., Hicks, P., Rustgi, A. K. (2016). ETS-Transcription Factor ETV1 Regulates Stromal Expansion and Metastasis in Pancreatic Cancer. *Gastroenterology*, 151(3), 540-553.e14. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.06.005>
- Hoffman, L. M., Carpenter, M. K. (2005). Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 23(6), 699–708. <https://doi.org/10.1038/nbt1102>
- Hogrebe, N. J., Augsornworawat, P., Maxwell, K. G., Velazco-Cruz, L., Millman, J. R. (2020). Targeting the cytoskeleton to direct pancreatic differentiation of human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, 38(4), 460–470. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0430-6>
- Hollenhorst, P. C., Ferris, M. W., Hull, M. A., Chae, H., Kim, S., Graves, B. J. (2011). Oncogenic ETS proteins mimic activated RAS/MAPK signaling in prostate cells. *Genes and Development*, 25(20), 2147–2157. <https://doi.org/10.1101/gad.17546311>
- Hoogland, S. H. A., Marks, H. (2021). Developments in pluripotency: a new formative state. *Cell Research*, 31(5), 493–494. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00494-w>
- Howden, S. E., Gore, A., Li, Z., Fung, H. L., Nisler, B. S., Nie, J., Chen, G., McIntosh, B. E., Gulbranson, D. R., Diol, N. R., Taapken, S. M., Vereide, D. T., Montgomery, K. D., Zhang, K., Gamm, D. M., Thomson, J. A. (2011). Genetic correction and analysis of induced pluripotent stem cells from a patient with gyrate atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(16), 6537–6542. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103388108>
- Hu, R. D., Zhang, W., Li, L., Zuo, Z. Q., Ma, M., Ma, J. F., Yin, T. T., Gao, C. Y., Yang, S. H., Zhao, Z. bin, Li, Z. J., Qiao, G. bin, Lian, Z. X., Qu, K. (2021). Chromatin accessibility analysis identifies the transcription factor ETV5 as a suppressor of adipose tissue macrophage activation in obesity. *Cell Death and Disease*, 12(11). <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04308-0>

- Huang, Y., Osorno, R., Tsakiridis, A., Wilson, V. (2012). In Vivo Differentiation Potential of Epiblast Stem Cells Revealed by Chimeric Embryo Formation. *Cell Reports*, 2(6), 1571–1578. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.10.022>
- Ilic, D., Ogilvie, C. (2016). Pluripotent Stem Cells Concise Review : Human Embryonic Stem Cells — What Have We Done ? What Are We Doing ? Where Are We Going ? *Stem Cells*, 35(1), 17–25.
- James, D., Levine, A. J., Besser, D., Hemmati-Brivanlou, A. (2005). TGF β /activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development*, 132(6), 1273–1282. <https://doi.org/10.1242/dev.01706>
- Jennings, R. E., Berry, A. A., Kirkwood-Wilson, R., Roberts, N. A., Hearn, T., Salisbury, R. J., Blaylock, J., Hanley, K. P., Hanley, N. A. (2013). Development of the human pancreas from foregut to endocrine commitment. *Diabetes*, 62(10), 3514–3522. <https://doi.org/10.2337/db12-1479>
- Jennings, R. E., Berry, A. A., Strutt, J. P., Gerrard, D. T., Hanley, N. A. (2015). Human pancreas development. *Development (Cambridge)*, 142(18), 3126–3137. <https://doi.org/10.1242/dev.120063>
- Jeon, J., Correa-Medina, M., Ricordi, C., Edlund, H., Diez, J. A. (2009). Endocrine cell clustering during human pancreas development. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 57(9), 811–824. <https://doi.org/10.1369/jhc.2009.953307>
- Johannesson, B., Sui, L., Freytes, D. O., Creusot, R. J., Egli, D. (2015). Toward beta cell replacement for diabetes. *The EMBO Journal*, 34(7), 841–855. <https://doi.org/10.15252/embj.201490685>
- Johannesson, M., Ståhlberg, A., Ameri, J., Sand, F. W., Norrman, K., Semb, H. (2009). FGF4 and retinoic acid direct differentiation of hESCs into PDX1-expressing foregut endoderm in a time- and concentration-dependent manner. *PLoS ONE*, 4(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004794>
- Johansson, K. A., Dursun, U., Jordan, N., Gu, G., Beermann, F., Gradwohl, G., Grapin-Botton, A. (2007). Temporal Control of Neurogenin3 Activity in Pancreas Progenitors

- Reveals Competence Windows for the Generation of Different Endocrine Cell Types. *Developmental Cell*, 12(3), 457–465. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.02.010>
- John B. Gurdon. (1962). The Developmental Capacity of Nuclei taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 10(December).
- Kajiwara, M., Aoi, T., Okita, K., Takahashi, R., Inoue, H., Takayama, N., Endo, H., Eto, K., Toguchida, J., Uemoto, S., Yamanaka, S. (2012). Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(31), 12538–12543. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209979109>
- Kalkan, T., Bornelöv, S., Mulas, C., Diamanti, E., Lohoff, T., Ralser, M., Middelkamp, S., Lombard, P., Nichols, J., Smith, A. (2019). Complementary Activity of ETV5, RBPJ, and TCF3 Drives Formative Transition from Naive Pluripotency. *Cell Stem Cell*, 24(5), 785-801.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.03.017>
- Kallas-Kivi, A., Trei, A., Stepanjuk, A., Ruisu, K., Kask, K., Pooga, M., Maimets, T. (2018). The role of integrin $\beta 1$ in the heterogeneity of human embryonic stem cells culture. *Biology Open*, 7(11). <https://doi.org/10.1242/bio.034355>
- Kandemir, B., Gulfidan, G., Arga, K. Y., Yilmaz, B., Kurnaz, I. A. (2020). Transcriptomic profile of Pea3 family members reveal regulatory codes for axon outgrowth and neuronal connection specificity. *Scientific Reports*, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75089-3>
- Kawaguchi, Y., Cooper, B., Gannon, M., Ray, M., MacDonald, R. J., Wright, C. V. E. (2002). The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nature Genetics*, 32(1), 128–134. <https://doi.org/10.1038/ng959>
- Kim, M. C., Kim, C., Wood, L., Neal, D., Kamm, R. D., Asada, H. H. (2012). Integrating focal adhesion dynamics, cytoskeleton remodeling, and actin motor activity for predicting cell migration on 3D curved surfaces of the extracellular matrix. *Integrative Biology (United Kingdom)*, 4(11), 1386–1397. <https://doi.org/10.1039/c2ib20159c>

- Kim, Y., Jang, H., Seo, K., Kim, J. H., Lee, B., Cho, H. M., Kim, H. J., Yang, E., Kim, H., Gim, J. A., Park, Y., Ryu, J. R., Sun, W. (2022). Cell position within human pluripotent stem cell colonies determines apical specialization via an actin cytoskeleton-based mechanism. *Stem Cell Reports*, 17(1), 68–81. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.11.005>
- Kinoshita, M., Barber, M., Mansfield, W., Cui, Y., Spindlow, D., Stirparo, G. G., Dietmann, S., Nichols, J., Smith, A. (2021). Capture of Mouse and Human Stem Cells with Features of Formative Pluripotency. *Cell Stem Cell*, 28(3), 453-471.e8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.11.005>
- Kobberup, S., Nyeng, P., Juhl, K., Hutton, J., Jensen, J. (2007). ETS-family genes in pancreatic development. *Developmental Dynamics*, 236(11), 3100–3110. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21292>
- Krapp, A., Knöfler, M., Ledermann, B., Bürki, K., Berney, C., Zoerkler, N., Hagenbüchle, O., Wellauer, P. K. (1998). The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes and Development*, 12(23), 3752–3763. <https://doi.org/10.1101/gad.12.23.3752>
- Kroon, E., Martinson, L. A., Kadoya, K., Bang, A. G., Kelly, O. G., Eliazer, S., Young, H., Richardson, M., Smart, N. G., Cunningham, J., Agulnick, A. D., D'Amour, K. A., Carpenter, M. K., Baetge, E. E. (2008). Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nature Biotechnology*, 26(4), 443–452. <https://doi.org/10.1038/nbt1393>
- Kunath, T., Saba-El-Leil, M. K., Almousailleakh, M., Wray, J., Meloche, S., Smith, A. (2007). FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development*, 134(16), 2895–2902. <https://doi.org/10.1242/dev.02880>
- Lamshead, J. W., Meagher, L., O'Brien, C., Laslett, A. L. (2013). Defining synthetic surfaces for human pluripotent stem cell culture. *Cell Regeneration*, 2(1), 2:7. <https://doi.org/10.1186/2045-9769-2-7>

- Langhofer, M., Hopkinson, S. B., Jones, J. C. R. (1993). The matrix secreted by 804G cells contains laminin-related components that participate in hemidesmosome assembly in vitro. *Journal of Cell Science*, 105(3), 753–764. <https://doi.org/10.1242/jcs.105.3.753>
- Laurence Daheron, Sarah Opitz, Holm Zaehres, William Lensch, Peter Andrews, Joseph ItskovitzEldor, G. D. (2004). LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 22(7), 1127–1127. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-ed12>
- Lawson, A., Schoenwolf, G. C. (2003). Epiblast and primitive-streak origins of the endoderm in the gastrulating chick embryo. *Development*, 130(15), 3491–3501. <https://doi.org/10.1242/dev.00579>
- Lee, A. S., Tang, C., Cao, F., Xie, X., van der Bogt, K., Hwang, A., Connolly, A. J., Robbins, R. C., Wu, J. C. (2009). Effects of cell number on teratoma formation by human embryonic stem cells. *Cell Cycle*, 8(16), 2608–2612. <https://doi.org/10.4161/cc.8.16.9353>
- Li, C., Wang, Z., Chen, Y., Zhou, M., Zhang, H., Chen, R., Shi, F., Wang, C., Rui, Z. (2015). Transcriptional silencing of ETS-1 abrogates epithelial-mesenchymal transition resulting in reduced motility of pancreatic cancer cells. *Oncology Reports*, 33(2), 559–565. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3613>
- Li, L., Wang, B. H., Wang, S., Moalim-Nour, L., Mohib, K., Lohnes, D., Wang, L. (2010). Individual cell movement, asymmetric colony expansion, Rho-associated kinase, and E-cadherin impact the clonogenicity of human embryonic stem cells. *Biophysical Journal*, 98(11), 2442–2451. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.02.029>
- Li, Z., Zhang, L., Ma, Z., Yang, M., Tang, J., Fu, Y., Mao, Y., Hong, X., Zhang, Y. (2013). ETV1 induces epithelial to mesenchymal transition in human gastric cancer cells through the upregulation of Snail expression. *Oncology Reports*, 30(6), 2859–2863. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2776>
- Liu, X., Qin, J., Chang, M., Wang, S., Li, Y., Pei, X., Wang, Y. (2020). Enhanced differentiation of human pluripotent stem cells into pancreatic endocrine cells in 3D culture by inhibition of focal adhesion kinase. *Stem Cell Research and Therapy*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-02003-z>

- Lynn, F. C., Smith, S. B., Wilson, M. E., Yang, K. Y., Nekrep, N., German, M. S. (2007). Sox9 coordinates a transcriptional network in pancreatic progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(25), 10500–10505. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704054104>
- Madsen, R. R. (2020). PI3K in stemness regulation: From development to cancer. *Biochemical Society Transactions*, 48(1), 301–315. <https://doi.org/10.1042/BST20190778>
- Mandai, M., Watanabe, A., Kurimoto, Y., Hirami, Y., Morinaga, C., Daimon, T., Fujihara, M., Akimaru, H., Sakai, N., Shibata, Y., Terada, M., Nomiya, Y., Tanishima, S., Nakamura, M., Kamao, H., Sugita, S., Onishi, A., Ito, T., Fujita, K., ... Takahashi, M. (2017). Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *New England Journal of Medicine*, 376(11), 1038–1046. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1608368>
- Mandal, S., Chandel, D., Kaur, H., Majumdar, S., Arava, M., Gayen, S. (2020). Single-Cell Analysis Reveals Partial Reactivation of X Chromosome instead of Chromosome-wide Dampening in Naive Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 14(5), 745–754. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.03.027>
- Marín-Peñalver, J. J., Martín-Timón, I., Sevillano-Collantes, C., Cañizo-Gómez, F. J. del. (2016). Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*, 7(17), 354. <https://doi.org/10.4239/wjd.v7.i17.354>
- Martello, G., Sugimoto, T., Diamanti, E., Joshi, A., Hannah, R., Ohtsuka, S., Göttgens, B., Niwa, H., Smith, A. (2012). Esrrb is a pivotal target of the Gsk3/Tcf3 axis regulating embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell*, 11(4), 491–504. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.06.008>
- Martin, R. M., Fowler, J. L., Cromer, M. K., Lesch, B. J., Ponce, E., Uchida, N., Nishimura, T., Porteus, M. H., Loh, K. M. (2020). Improving the safety of human pluripotent stem cell therapies using genome-edited orthogonal safeguards. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16455-7>
- Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A. A., Ko, M. S. H., Niwa, H. (2007). Pluripotency

- governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), 625–635. <https://doi.org/10.1038/ncb1589>
- Matsuda, T., Nakamura, T., Nakao, K., Arai, T., Katsuki, M., Heike, T., Yokota, T. (1999). STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO Journal*, 18(15), 4261–4269. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.15.4261>
- Matsuoka, T., Yashiro, M., Nishioka, N., Hirakawa, K., Olden, K., & Roberts, J. D. (2012). PI3K/Akt signalling is required for the attachment and spreading, and growth in vivo of metastatic scirrhous gastric carcinoma. *British Journal of Cancer*, 106(9), 1535–1542. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.107>
- Mayshar, Y., Rom, E., Chumakov, I., Kronman, A., Yayon, A., Benvenisty, N. (2008). Fibroblast Growth Factor 4 and Its Novel Splice Isoform Have Opposing Effects on the Maintenance of Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Stem Cells*, 26(3), 767–774. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-1037>
- McGaugh, E. C., Nostro, M. C. (2017). Efficient differentiation of pluripotent stem cells to NKX6-1+ pancreatic progenitors. *Journal of Visualized Experiments*, 2017(121), 1–5. <https://doi.org/10.3791/55265>
- McLean, A. (2007). Embryonic Stem Cells : Characterization Series Activin A Efficiently Specifies Definitive Endoderm from Human Embryonic Stem Cells Only When Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Molecular Biology*, 114(10), 29–38. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0219.S>
- Messmer, T., von Meyenn, F., Savino, A., Santos, F., Mohammed, H., Lun, A. T. L., Marioni, J. C., Reik, W. (2019). Transcriptional Heterogeneity in Naive and Primed Human Pluripotent Stem Cells at Single-Cell Resolution. *Cell Reports*, 26(4), 815–824.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.099>
- Millman, J. R., Pagliuca, F. W. (2017). Autologous pluripotent stem cell-derived β -like cells for diabetes cellular therapy. *Diabetes*, 66(5), 1111–1120. <https://doi.org/10.2337/db16-1406>

- Millman, J. R., Xie, C., van Dervort, A., Gürtler, M., Pagliuca, F. W., Melton, D. A. (2016). Generation of stem cell-derived β -cells from patients with type 1 diabetes. *Nature Communications*, 7(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms11463>
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 113(5), 631–642. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00393-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00393-3)
- Moore, S. J., Gala-Lopez, B. L., Pepper, A. R., Pawlick, R. L., Shapiro, A. J. (2015). Bioengineered stem cells as an alternative for islet cell transplantation. *World Journal of Transplantation*, 5(1), 1. <https://doi.org/10.5500/wjt.v5.i1.1>
- Morikawa, M., Koinuma, D., Mizutani, A., Kawasaki, N., Holmborn, K., Sundqvist, A., Tsutsumi, S., Watabe, T., Aburatani, H., Heldin, C. H., Miyazono, K. (2016). BMP Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal through Distinct Functions of Different Krüppel-like Factors. *Stem Cell Reports*, 6(1), 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.12.004>
- Mossahebi-Mohammadi, M., Quan, M., Zhang, J. S., Li, X. (2020). FGF Signaling Pathway: A Key Regulator of Stem Cell Pluripotency. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(February), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00079>
- Mullen, A. C., Wrana, J. L. (2017). TGF- β family signaling in embryonic and somatic stem-cell renewal and differentiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022186>
- Münchberg, S. R., Steinbeisser, H. (1999). The *Xenopus* Ets transcription factor XER81 is a target of the FGF signaling pathway. *Mechanisms of Development*, 80(1), 53–65. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(98\)00193-2](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(98)00193-2)
- Murtaugh, L. C., Stanger, B. Z., Kwan, K. M., Melton, D. A. (2003). Notch signaling controls multiple steps of pancreatic differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(25), 14920–14925. <https://doi.org/10.1073/pnas.2436557100>

- Nair, G. G., Liu, J. S., Russ, H. A., Tran, S., Saxton, M. S., Chen, R., Juang, C., Li, M. Ian, Nguyen, V. Q., Giacometti, S., Puri, S., Xing, Y., Wang, Y., Szot, G. L., Oberholzer, J., Bhushan, A., Hebrok, M. (2019). Recapitulating endocrine cell clustering in culture promotes maturation of human stem-cell-derived β cells. *Nature Cell Biology*, *21*(2), 263–274. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0271-4>
- Närvä, E., Stubb, A., Guzmán, C., Blomqvist, M., Balboa, D., Lerche, M., Saari, M., Otonkoski, T., Ivaska, J. (2017). A Strong Contractile Actin Fence and Large Adhesions Direct Human Pluripotent Colony Morphology and Adhesion. *Stem Cell Reports*, *9*(1), 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.05.021>
- Neagu, A., van Genderen, E., Escudero, I., Verwegen, L., Kurek, D., Lehmann, J., Stel, J., Dirks, R. A. M., van Mierlo, G., Maas, A., Eleveld, C., Ge, Y., den Dekker, A. T., Brouwer, R. W. W., van IJcken, W. F. J., Modic, M., Drukker, M., Jansen, J. H., Rivron, N. C., ... ten Berge, D. (2020). In vitro capture and characterization of embryonic rosette-stage pluripotency between naive and primed states. *Nature Cell Biology*, *22*(5), 534–545. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0508-x>
- Nichols, J., Smith, A. (2009). Naive and Primed Pluripotent States. *Cell Stem Cell*, *4*(6), 487–492. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.015>
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, *95*(3), 379–391. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81769-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81769-9)
- Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., Smith, A. (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes and Development*, *12*(13), 2048–2060. <https://doi.org/10.1101/gad.12.13.2048>
- Niwa, H., Miyazaki, J. I., Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics*, *24*(4), 372–376. <https://doi.org/10.1038/74199>
- Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D., Adachi, K. (2009). A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature*, *460*(7251), 118–122. <https://doi.org/10.1038/nature08113>

- Nostro, M. C., Sarangi, F., Ogawa, S., Holtzinger, A., Corneo, B., Li, X., Micallef, S. J., Park, I., Basford, C., Wheeler, M. B., Daley, G. Q., Elefanty, A. G., Stanley, E. G., Keller, G., Nostro, M. C., Sarangi, F., Ogawa, S., Holtzinger, A., Corneo, B., ... Keller, G. (2011). Erratum to Stage-specific signaling through TGF β family members and WNT regulates patterning and pancreatic specification of human pluripotent stem cells (*Development*, 138, (861-871)). *Development*, 138(7), 1445. <https://doi.org/10.1242/dev.065904>
- Offield, M. F., Jetton, T. L., Labosky, P. A., Ray, M., Stein, R. W., Magnuson, M. A., Hogan, B. L. M., Wright, C. V. E. (1996). *duodenum*. 995, 983–995.
- Oh, S., Shin, S., Song, H., Grande, J. P., Janknecht, R. (2019). Relationship between ETS Transcription Factor ETV1 and TGF- β -regulated SMAD Proteins in Prostate Cancer. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44685-3>
- Oh, Y. S., Shin, S., Lee, Y. J., Kim, E. H., Jun, H. S. (2011). Betacellulin-induced beta cell proliferation and regeneration is mediated by activation of ErbB-1 and ErbB-2 receptors. *PLoS ONE*, 6(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023894>
- Ohgushi, M., Minaguchi, M., Sasai, Y. (2015). Rho-Signaling-Directed YAP/TAZ Activity Underlies the Long-Term Survival and Expansion of Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 17(4), 448–461. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.009>
- Olbrot, M., Rud, J., Moss, L. G., Sharma, A. (2002). Identification of β -cell-specific insulin gene transcription factor RIPE3b1 as mammalian MafA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(10), 6737–6742. <https://doi.org/10.1073/pnas.102168499>
- Orlova, V. v., Chuva de Sousa Lopes, S., Valdimarsdottir, G. (2016). BMP-SMAD signaling: From pluripotent stem cells to cardiovascular commitment. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 27, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.11.007>
- Osafune, K., Caron, L., Borowiak, M., Martinez, R. J., Fitz-Gerald, C. S., Sato, Y., Cowan, C. A., Chien, K. R., Melton, D. A. (2008). Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nature Biotechnology*, 26(3), 313–315. <https://doi.org/10.1038/nbt1383>

- Pagliuca, F. W., Millman, J. R., Gürtler, M., Segel, M., van Dervort, A., Ryu, J. H., Peterson, Q. P., Greiner, D., Melton, D. A. (2014). Generation of functional human pancreatic β cells in vitro. *Cell*, 159(2), 428–439. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.040>
- Pan, F. C., Wright, C. (2011). Pancreas organogenesis: From bud to plexus to gland. *Developmental Dynamics*, 240(3), 530–565. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22584>
- Payne, C., King, J., Hay, D. (2011). The Role of Activin/Nodal and Wnt Signaling in Endoderm Formation. W *Vitamins and Hormones* (1. wyd., T. 85). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385961-7.00010-X>
- Petropoulos, S., Edsgård, D., Reinius, B., Deng, Q., Panula, S. P., Codeluppi, S., Plaza Reyes, A., Linnarsson, S., Sandberg, R., Lanner, F. (2016). Single-Cell RNA-Seq Reveals Lineage and X Chromosome Dynamics in Human Preimplantation Embryos. *Cell*, 165(4), 1012–1026. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.023>
- Qiu, D., Ye, S., Ruiz, B., Zhou, X., Liu, D., Zhang, Q., Ying, Q. L. (2015). Klf2 and Tfc2l1, Two Wnt/ β -Catenin Targets, Act Synergistically to Induce and Maintain Naive Pluripotency. *Stem Cell Reports*, 5(3), 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.07.014>
- Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C., Trounson, A., Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature Biotechnology* 18, 399–404.
- Rezania, A., Bruin, J. E., Arora, P., Rubin, A., Batushansky, I., Asadi, A., O'Dwyer, S., Quiskamp, N., Mojibian, M., Albrecht, T., Yang, Y. H., Johnson, J. D., Kieffer, T. J. (2014a). Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, 32(11), 1121–1133. <https://doi.org/10.1038/nbt.3033>
- Rezania, A., Bruin, J. E., Arora, P., Rubin, A., Batushansky, I., Asadi, A., O'Dwyer, S., Quiskamp, N., Mojibian, M., Albrecht, T., Yang, Y. H., Johnson, J. D., Kieffer, T. J. (2014b). Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, 32(11), 1121–1133. <https://doi.org/10.1038/nbt.3033>

- Rezania, A., Bruin, J. E., Riedel, M. J., Mojibian, M., Asadi, A., Xu, J., Gauvin, R., Narayan, K., Karanu, F., O'Neil, J. J., Ao, Z., Warnock, G. L., Kieffer, T. J. (2012). Maturation of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitors into functional islets capable of treating pre-existing diabetes in mice. *Diabetes*, *61*(8), 2016–2029. <https://doi.org/10.2337/db11-1711>
- Rodda, D. J., Chew, J. L., Lim, L. H., Loh, Y. H., Wang, B., Ng, H. H., Robson, P. (2005). Transcriptional regulation of Nanog by OCT4 and SOX2. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(26), 24731–24737. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502573200>
- Rosler, E. S., Fisk, G. J., Ares, X., Irving, J., Miura, T., Rao, M. S., Carpenter, M. K. (2004). Long-Term Culture of Human Embryonic Stem Cells in Feeder-Free Conditions. *Developmental Dynamics*, *229*(2), 259–274. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10430>
- Russ, H. A., Parent, A. v., Ringler, J. J., Hennings, T. G., Nair, G. G., Shveygert, M., Guo, T., Puri, S., Haataja, L., Cirulli, V., Blesloch, R., Szot, G. L., Arvan, P., Hebrok, M. (2015). Controlled induction of human pancreatic progenitors produces functional beta-like cells in vitro. *The EMBO Journal*, *34*(13), 1759–1772. <https://doi.org/10.15252/embj.201591058>
- Ruth Gutierrez-Aguilar, Abigail Thompson, Nathalie Marchand, Patrick Dumont, Stephen C. Woods, Yvan de Launoit, Randy J. Seeley (2015). The obesity-associated transcription factor ETV5 modulates circulating glucocorticoids. *Physiol Behav*, *72*(150), 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.03.027>.The
- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., Brivanlou, A. H. (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nature Medicine*, *10*(1), 55–63. <https://doi.org/10.1038/nm979>
- Scavuzzo, M. A., Chmielowiec, J., Yang, D., Wamble, K., Chaboub, L. S., Duraine, L., Tepe, B., Glasgow, S. M., Arenkiel, B. R., Brou, C., Deneen, B., Borowiak, M. (2018). Pancreatic Cell Fate Determination Relies on Notch Ligand Trafficking by NFIA. *Cell Reports*, *25*(13), 3811–3827.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.078>
- Scavuzzo, M. A., Hill, M. C., Chmielowiec, J., Yang, D., Teaw, J., Sheng, K., Kong, Y., Bettini, M., Zong, C., Martin, J. F., Borowiak, M. (2018). Endocrine lineage biases

- arise in temporally distinct endocrine progenitors during pancreatic morphogenesis. *Nature Communications*, 9(1), 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05740-1>
- Scheibner, K., Bakhti, M., Bastidas-Ponce, A., Lickert, H. (2019). Wnt signaling: implications in endoderm development and pancreas organogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*, 61, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.07.002>
- Scholer, H. R., Hatzopoulos, A. K., Balling, R., Suzuki, N., Gruss, P. (1989). A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *EMBO Journal*, 8(9), 2543–2550. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08392.x>
- Segerstolpe, Å., Palasantza, A., Eliasson, P., Andersson, E. M., Andréasson, A. C., Sun, X., Picelli, S., Sabirsh, A., Clausen, M., Bjursell, M. K., Smith, D. M., Kasper, M., Ämmälä, C., Sandberg, R. (2016). Single-Cell Transcriptome Profiling of Human Pancreatic Islets in Health and Type 2 Diabetes. *Cell Metabolism*, 24(4), 593–607. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.08.020>
- Shapiro, A. M. J., Ricordi, C., Hering, B. J., Auchincloss, H., Lindblad, R., Robertson, R. P., Secchi, A., Brendel, M. D., Berney, T., Brennan, D. C., Cagliero, E., Alejandro, R., Ryan, E. A., DiMercurio, B., Morel, P., Polonsky, K. S., Reems, J.-A., Bretzel, R. G., Bertuzzi, F., ... Lakey, J. R. T. (2006). International Trial of the Edmonton Protocol for Islet Transplantation. *New England Journal of Medicine*, 355(13), 1318–1330. <https://doi.org/10.1056/nejmoa061267>
- Sharon, N., Chawla, R., Mueller, J., Vanderhooft, J., Whitehorn, L. J., Rosenthal, B., Gürtler, M., Estanboulieh, R. R., Shvartsman, D., Gifford, D. K., Trapnell, C., Melton, D. (2019a). A Peninsular Structure Coordinates Asynchronous Differentiation with Morphogenesis to Generate Pancreatic Islets. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.003>
- Sharon, N., Vanderhooft, J., Straubhaar, J., Mueller, J., Chawla, R., Zhou, Q., Engquist, E. N., Trapnell, C., Gifford, D. K., Melton, D. A. (2019b). Wnt Signaling Separates the Progenitor and Endocrine Compartments during Pancreas Development. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.083>

- Sheets, T. P., Park, K. E., Park, C. H., Swift, S. M., Powell, A., Donovan, D. M., Telugu, B. P. (2018). Targeted Mutation of NGN3 Gene Disrupts Pancreatic Endocrine Cell Development in Pigs. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22050-0>
- Shekhar, A., Lin, X., Lin, B., Liu, F. Y., Zhang, J., Khodadadi-Jamayran, A., Tsirigos, A., Bu, L., Fishman, G. I., Park, D. S. (2018). ETV1 activates a rapid conduction transcriptional program in rodent and human cardiomyocytes. *Scientific Reports*, 8(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28239-7>
- Shekhar, A., Lin, X., Liu, F. Y., Zhang, J., Mo, H., Bastarache, L., Denny, J. C., Cox, N. J., Delmar, M., Roden, D. M., Fishman, G. I., Park, D. S. (2016). Transcription factor ETV1 is essential for rapid conduction in the heart. *Journal of Clinical Investigation*, 126(12), 4444–4459. <https://doi.org/10.1172/JCI87968>
- Silva, J., Nichols, J., Theunissen, T. W., Guo, G., van Oosten, A. L., Barrandon, O., Wray, J., Yamanaka, S., Chambers, I., Smith, A. (2009). Nanog Is the Gateway to the Pluripotent Ground State. *Cell*, 138(4), 722–737. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.039>
- Silva, J., Smith, A. (2008). Capturing Pluripotency. *Cell*, 132(4), 532–536. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.006>
- Singh, A. M., Bechard, M., Smith, K., Dalton, S. (2012). Reconciling the different roles of Gsk3 β in „naïve” and „primed” pluripotent stem cells. *Cell Cycle*, 11(16), 2991–2996. <https://doi.org/10.4161/cc.21110>
- Sizemore, G. M., Pitarresi, J. R., Balakrishnan, S., Ostrowski, M. C. (2017). The ETS family of oncogenic transcription factors in solid tumours. *Nature Reviews Cancer*, 17(6), 337–351. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.20>
- Smith, A. (2017). Formative pluripotency: The executive phase in a developmental continuum. *Development (Cambridge)*, 144(3), 365–373. <https://doi.org/10.1242/dev.142679>
- Sougawa, N., Miyagawa, S., Fukushima, S., Kawamura, A., Yokoyama, J., Ito, E., Harada, A., Okimoto, K., Mochizuki-Oda, N., Saito, A., Sawa, Y. (2018). Immunologic

- targeting of CD30 eliminates tumourigenic human pluripotent stem cells, allowing safer clinical application of hiPSC-based cell therapy. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21923-8>
- Stavridis, M. P., Simon Lunn, J., Collins, B. J., Storey, K. G. (2007). A discrete period of FGF-induced Erk1/2 signalling is required for vertebrate neural specification. *Development*, 134(16), 2889–2894. <https://doi.org/10.1242/dev.02858>
- Steiner, D. J., Kim, A., Miller, K., & Hara, M. (2010). Pancreatic islet plasticity: Interspecies comparison of islet architecture and composition. *Islets*, 2(3). <https://doi.org/10.4161/isl.2.3.11815>
- Stubb, A., Guzmán, C., Närvä, E., Aaron, J., Chew, T. L., Saari, M., Miihkinen, M., Jacquemet, G., Ivaska, J. (2019). Superresolution architecture of cornerstone focal adhesions in human pluripotent stem cells. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12611-w>
- Suriben, R., Kaihara, K. A., Paolino, M., Reichelt, M., Kummerfeld, S. K., Modrusan, Z., Dugger, D. L., Newton, K., Sagolla, M., Webster, J. D., Liu, J., Hebrok, M., Dixit, V. M. (2015). β -Cell Insulin Secretion Requires the Ubiquitin Ligase COP1. *Cell*, 163(6), 1457–1467. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.076>
- Suzuki, A., Raya, Á., Kawakami, Y., Morita, M., Matsui, T., Nakashima, K., Gage, F. H., Rodríguez-Esteban, C., & Belmonte, J. C. I. (2006). Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(27), 10294–10299. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506945103>
- Szlachcic, W. J., Ziojla, N., Kizewska, D. K., Kempa, M., Borowiak, M. (2021). Endocrine Pancreas Development and Dysfunction Through the Lens of Single-Cell RNA-Sequencing. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(April), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.629212>
- Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Gutierrez, N. M., Tippner-Hedges, R., Ma, H., Kang, E., Fulati, A., Lee, H. S., Sritanandomchai, H., Masterson, K., Larson, J., Eaton, D., Sadler-Fredd, K., Battaglia, D., Lee, D., Wu, D., Jensen, J., Patton, P., ... Mitalipov,

- S. (2013). Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*, 153(6), 1228–1238. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.006>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Takahashi, K., Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Takenaga, M., Fukumoto, M., Hori, Y. (2007). Regulated nodal signaling promotes differentiation of the definitive endoderm and mesoderm from ES cells. *Journal of Cell Science*, 120(12), 2078–2090. <https://doi.org/10.1242/jcs.004127>
- Teo, A. K. K., Arnold, S. J., Trotter, M. W. B., Brown, S., Ang, L. T., Chng, Z., Robertson, E. J., Dunn, N. R., Vallier, L. (2011). Pluripotency factors regulate definitive endoderm specification through eomesodermin. *Genes and Development*, 25(3), 238–250. <https://doi.org/10.1101/gad.607311>
- Teslaa, T., Teitell, M. A. (2015). Pluripotent stem cell energy metabolism: an update. *The EMBO Journal*, 34(2), 138–153. <https://doi.org/10.15252/embj.201490446>
- Theunissen, T. W., Friedli, M., He, Y., Planet, E., O’Neil, R. C., Markoulaki, S., Pontis, J., Wang, H., Iouranova, A., Imbeault, M., Duc, J., Cohen, M. A., Wert, K. J., Castanon, R., Zhang, Z., Huang, Y., Nery, J. R., Drotar, J., Lungjangwa, T., ... Jaenisch, R. (2016). Molecular Criteria for Defining the Naive Human Pluripotent State. *Cell Stem Cell*, 19(4), 502–515. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.06.011>
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., Nieto, M. A. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*, 139(5), 871–890. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>
- Thomson, J. A. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145–1147. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>

- Thomson, M., Liu, S. J., Zou, L. N., Smith, Z., Meissner, A., Ramanathan, S. (2011). Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell*, *145*(6), 875–889. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.05.017>
- Vallier, L., Alexander, M., Pedersen, R. A. (2005). Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *Journal of Cell Science*, *118*(19), 4495–4509. <https://doi.org/10.1242/jcs.02553>
- van Gurp, L., Muraro, M. J., Dielen, T., Seneby, L., Dharmadhikari, G., Gradwohl, G., van Oudenaarden, A., de Koning, E. J. P. (2019). A transcriptomic roadmap to α - and β -cell differentiation in the embryonic pancreas. *Development (Cambridge)*, *146*(12). <https://doi.org/10.1242/dev.173716>
- van Oosten, A. L., Costa, Y., Smith, A., Silva, J. C. R. (2012). JAK/STAT3 signalling is sufficient and dominant over antagonistic cues for the establishment of naive pluripotency. *Nature Communications*, *3*(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms1822>
- Vegas, A. J., Veisoh, O., Gürtler, M., Millman, J. R., Pagliuca, F. W., Bader, A. R., Doloff, J. C., Li, J., Chen, M., Olejnik, K., Tam, H. H., Jhunjhunwala, S., Langan, E., Aresta-Dasilva, S., Gandham, S., McGarrigle, J. J., Bochenek, M. A., Hollister-Lock, J., Oberholzer, J., ... Anderson, D. G. (2016). Long-term glycemic control using polymer-encapsulated human stem cell-derived beta cells in immune-competent mice. *Nature Medicine*, *22*(3), 306–311. <https://doi.org/10.1038/nm.4030>
- Velazco-Cruz, L., Song, J., Maxwell, K. G., Goedegebuure, M. M., Augsornworawat, P., Hoglebe, N. J., Millman, J. R. (2019). Acquisition of Dynamic Function in Human Stem Cell-Derived β Cells. *Stem Cell Reports*, *12*(2), 351–365. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.12.012>
- Veres, A., Faust, A. L., Bushnell, H. L., Engquist, E. N., Kenty, J. H. R., Harb, G., Poh, Y. C., Sintov, E., Gürtler, M., Pagliuca, F. W., Peterson, Q. P., Melton, D. A. (2019a). Charting cellular identity during human in vitro β -cell differentiation. *Nature*, *569*(7756), 368–373. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1168-5>
- Villa-Diaz L. G., Kim K., Laperle A, Palecek B.(2019). Inhibition of Focal Adhesion Kinase Signaling by Integrin α 6 β 1 Supports Human Pluripotent Stem Cell Self-Renewal. *Stem Cells*, 724–730.

- Villasenor, A., Chong, D. C., Cleaver, O. (2008). Biphasic Ngn3 expression in the developing pancreas. *Developmental Dynamics*, 237(11), 3270–3279. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21740>
- Villasenor, A., Marty-Santos, L., Dravis, C., Fletcher, P., Henkemeyer, M., Cleaver, O. (2012). EphB3 marks delaminating endocrine progenitor cells in the developing pancreas. *Developmental Dynamics*, 241(5), 1008–1019. <https://doi.org/10.1002/dvdy.23781>
- Vining, K. H., Mooney, D. J. (2017). Mechanical forces direct stem cell behaviour in development and regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(12), 728–742. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.108>
- Vitillo, L., Baxter, M., Iskender, B., Whiting, P., Kimber, S. J. (2016). Integrin-Associated Focal Adhesion Kinase Protects Human Embryonic Stem Cells from Apoptosis, Detachment, and Differentiation. *Stem Cell Reports*, 7(2), 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.07.006>
- Volarevic, V., Markovic, B. S., Gazdic, M., Volarevic, A., Jovicic, N., Arsenijevic, N., Armstrong, L., Djonov, V., Lako, M., Stojkovic, M. (2018). Ethical and safety issues of stem cell-based therapy. *International Journal of Medical Sciences*, 15(1), 36–45. <https://doi.org/10.7150/ijms.21666>
- Wang, G., Zhang, H., Zhao, Y., Li, J., Cai, J., Wang, P., Meng, S., Feng, J., Miao, C., Ding, M., Li, D., Deng, H. (2005). Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330(3), 934–942. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.058>
- Wang, J., Sinha, T., Wynshaw-Boris, A. (2012). Wnt signaling in mammalian development: Lessons from mouse genetics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(5), 6. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007963>
- Wang, X., Xiang, Y., Yu, Y., Wang, R., Zhang, Y., Xu, Q., Sun, H., Zhao, Z. A., Jiang, X., Wang, X., Lu, X., Qin, D., Quan, Y., Zhang, J., Shyh-Chang, N., Wang, H., Jing, N., Xie, W., Li, L. (2021). Formative pluripotent stem cells show features of epiblast cells

- poised for gastrulation. *Cell Research*, 31(5), 526–541. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00477-x>
- Warmflash, A., Sorre, B., Etoc, F., Siggia, E. D., Brivanlou, A. H. (2014). A method to recapitulate early embryonic spatial patterning in human embryonic stem cells. *Nature Methods*, 11(8), 847–854. <https://doi.org/10.1038/nMeth.3016>
- Watabe, T., Miyazono, K. (2009). Roles of TGF- β family signaling in stem cell renewal and differentiation. *Cell Research*, 19(1), 103–115. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.323>
- Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J. B., Nishikawa, S., Nishikawa, S. I., Muguruma, K., Sasai, Y. (2007). A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 25(6), 681–686. <https://doi.org/10.1038/nbt1310>
- Wells, J. M., Melton, D. A. (2000). Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. *Development*, 1572(127), 1563–1572.
- Weng, C., Xi, J., Li, H., Cui, J., Gu, A., Lai, S., Leskov, K., Ke, L., Jin, F., Li, Y. (2020). Single-cell lineage analysis reveals extensive multimodal transcriptional control during directed beta-cell differentiation. *Nature Metabolism*, 2(12), 1443–1458. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-00314-2>
- Wu, C., You, J., Fu, J., Wang, X., Zhang, Y. (2016). Phosphatidylinositol 3-Kinase / Akt Mediates Integrin Signaling To. *Mol Cell Biol.*, 36(10), 1555–1568. <https://doi.org/10.1128/MCB.00004-16>.Address
- Xiao, L., Yuan, X., Sharkis, S. J. (2006). Activin A Maintains Self-Renewal and Regulates Fibroblast Growth Factor, Wnt, and Bone Morphogenic Protein Pathways in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, 24(6), 1476–1486. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0299>
- Xu, C., Inokuma, M. S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J. D., Carpenter, M. K. (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 19(10), 971–974. <https://doi.org/10.1038/nbt1001-971>

- Yabe, S. G., Fukuda, S., Nishida, J., Takeda, F., Nashiro, K., Okochi, H. (2019). Induction of functional islet-like cells from human iPS cells by suspension culture. *Regenerative Therapy*, 10, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2018.11.003>
- Yamanaka, S. (2020). Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy—Promise and Challenges. *Cell Stem Cell*, 27(4), 523–531. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.09.014>
- Yang, D., Patel, S., Szlachcic, W. J., Chmielowiec, J., Scaduto, D., Putluri, N., Sreekumar, A., Suliburk, J., Metzker, M., Balasubramanyam, A., Borowiak, M. (2021). Pancreatic Differentiation of Stem Cells Reveals Pathogenesis of a Syndrome of Ketosis-Prone Diabetes. *Diabetes*, 70(10), 2419–2429. <https://doi.org/10.2337/db20-1293>
- Yang, J., van Oosten, A. L., Theunissen, T. W., Guo, G., Silva, J. C. R., Smith, A. (2010). Stat3 activation is limiting for reprogramming to ground state pluripotency. *Cell Stem Cell*, 7(3), 319–328. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.022>
- Yiangou, L., Grandy, R. A., Morell, C. M., Tomaz, R. A., Osnato, A., Kadiwala, J., Muraro, D., Garcia-Bernardo, J., Nakanoh, S., Bernard, W. G., Ortmann, D., McCarthy, D. J., Simonic, I., Sinha, S., Vallier, L. (2019). Method to Synchronize Cell Cycle of Human Pluripotent Stem Cells without Affecting Their Fundamental Characteristics. *Stem Cell Reports*, 12(1), 165–179. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.11.020>
- Ying, Q. L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., Smith, A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, 453(7194), 519–523. <https://doi.org/10.1038/nature06968>
- Young, M. A., Larson, D. E., Sun, C. W., George, D. R., Ding, L., Miller, C. A., Lin, L., Pawlik, K. M., Chen, K., Fan, X., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., Cook, L. L., Swift, G. W., Demeter, R. T., Wendl, M. C., Sands, M. S., Mardis, E. R., Wilson, R. K., ... Ley, T. J. (2012). Background mutations in parental cells account for most of the genetic heterogeneity of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 10(5), 570–582. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.03.002>
- Young, R. A. (2011). Control of the embryonic stem cell state. *Cell*, 144(6), 940–954. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.032>

- Yu, J. S. L., Cui, W. (2016). Proliferation, survival and metabolism: The role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development (Cambridge)*, 143(17), 3050–3060. <https://doi.org/10.1242/dev.137075>
- Yu, J. S. L., Ramasamy, T. S., Murphy, N., Holt, M. K., Czapiewski, R., Wei, S. K., Cui, W. (2015). PI3K/mTORC2 regulates TGF- β /Activin signalling by modulating Smad2/3 activity via linker phosphorylation. *Nature Communications*, 6(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms8212>
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. I., Thomson, J. A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318(5858), 1917–1920. <https://doi.org/10.1126/science.1151526>
- Yu, L., Wei, Y., Sun, H. X., Mahdi, A. K., Pinzon Arteaga, C. A., Sakurai, M., Schmitz, D. A., Zheng, C., Ballard, E. D., Li, J., Tanaka, N., Kohara, A., Okamura, D., Mutto, A. A., Gu, Y., Ross, P. J., Wu, J. (2021). Derivation of Intermediate Pluripotent Stem Cells Amenable to Primordial Germ Cell Specification. *Cell Stem Cell*, 28(3), 550-567.e12. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.11.003>
- Yu, X., Qiu, W., Yang, L., Zhang, Y., He, M., Li, L., Xu, C. (2019). Defining multistep cell fate decision pathways during pancreatic development at single-cell resolution. *The EMBO Journal*, 38(8), 1–20. <https://doi.org/10.15252/embj.2018100164>
- Zhang, X., Tao, J., Yu, J., Hu, N., Zhang, X., Wang, G., Feng, J., Xiong, X., Li, M., Chai, D., Li, H., Rong, Y., Tang, Z., Wang, W., Peng, Z., Shi, Q. (2021). Inhibition of Notch activity promotes pancreatic cytokeratin 5-positive cell differentiation to beta cells and improves glucose homeostasis following acute pancreatitis. *Cell Death and Disease*, 12(10). <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04160-2>
- Zhao, T., Zhang, Z. N., Rong, Z., & Xu, Y. (2011). Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*, 474(7350), 212–216. <https://doi.org/10.1038/nature10135>
- Zhao, T., Zhang, Z. N., Westenskow, P. D., Todorova, D., Hu, Z., Lin, T., Rong, Z., Kim, J., He, J., Wang, M., Clegg, D. O., Yang, Y. G., Zhang, K., Friedlander, M., Xu, Y. (2015). Humanized Mice Reveal Differential Immunogenicity of Cells Derived from

Autologous Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 17(3), 353–359.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.021>

Zhou, Q., Law, A. C., Rajagopal, J., Anderson, W. J., Gray, P. A., Melton, D. A. (2007). A Multipotent Progenitor Domain Guides Pancreatic Organogenesis. *Developmental Cell*, 13(1), 103–114. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.06.001>

Zhu, Z., González, F., Huangfu, D. (2014). The iCRISPR platform for rapid genome editing in human pluripotent stem Cells. *W Methods in Enzymology* (T. 546, Issue C). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801185-0.00011-8>