

mgr Natalia Maria Ziojła

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

Słowa kluczowe: ludzkie pluripotencjalne komórki macierzyste, adhezja ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych, terapia komórkowa, endokryna część trzustki, cukrzyca, różnicowanie *in vitro* komórek beta z ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych

Streszczenie

Trzustka jest narządem gruczołowym odgrywającym istotną rolę w wytwarzaniu i uwalnianiu enzymów trawiennych (część egzokryna) oraz hormonów regulujących homeostazę glukozy (część endokryna). Komórki endokryne trzustki tworzą wyspy Langerhansa, w których najwięcej komórek (około 90%) to komórki α i β . Komórki β kontrolują homeostazę glukozy poprzez wydzielanie insuliny w odpowiedzi na podwyższony poziom cukru we krwi. Insulina umożliwia wychwyt glukozy z krwi przez receptory komórek tkanek 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 poziomu 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, ang. *human pluripotent stem cells*) 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, ang. *single cell RNA-sequencing*) mysich trzustek z dnia embrionalnego 14,5, wyselekcjonowałam czynnik transkrypcyjny Etv1. Co ciekawe, ekspresja Etv1 była ograniczona do endokrynych komórek prekursorowych i nowo powstałych komórek α i β . Na podstawie tych obserwacji można sugerować, że Etv1 bierze udział w dojrzewaniu endokrynych komórek progenitorowych i ich specyfikacji do funkcjonalnych komórek endokrynych. 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 nieznanymi. 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 żaby szponiastej (łac. *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 edytowanych komórek hPSC. 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 obecności *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 obecności *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 \square 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.