

Rola genu AMOTL2 w pluripotencji i różnicowaniu ludzkich komórek macierzystych

Anna Paulina Jędrzejak

W ostatnich latach prowadzone były szerokie badania nad regulacją transkrypcji w procesach rozwojowych, jednakże nadal istnieje znaczna luka w wiedzy o mechanistycznych i metabolicznych sygnałach, oraz zdarzeniach morfologicznych towarzyszących różnicowaniu ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych (ang. human pluripotent stem cells, hPSCs). W poszukiwaniu takich sygnałów po raz pierwszy zidentyfikowałem gen *Amotl2* w danych z sekwencjonowania RNA pojedynczych komórek (ang. single cell RNA-sequencing, scRNA-seq) z rozwijającej się mysiej trzustki z dni embrionalnych 14.5 (e14.5) i 16.5 (e16.5). Co ciekawe, pomimo zachowanych kanonicznych markerów, populacje progenitorów endokrynych (ang. endocrine progenitors, EP) z tych punktów czasowych różniły się znacząco pod względem transkryptomu, przy czym EP z dnia 16.5 preferencyjnie tworzyły komórki β trzustki, a e14.5 EP preferencyjnie tworzyły komórki α . *Amotl2* ulegał specyficznej ekspresji w podtypie e16.5 EP, który odzwierciedlał wychodzenie EP ze struktury sznurów nabłonkowych, słabo poznane zdarzenie, które z kolei może wpływać na los komórek endokrynych.

AMOTL2 należy do rodziny angiomotyn. Jest to białko cytoplazmatyczne, które znajduje się w cytozolu lub na połączeniach komórkowych, ułatwiając przekazywanie sygnału, organizację cytoszkieletu, i modulację szlaków sygnalizacyjnych. AMOTL2 jest znanym regulatorem szlaku Hippo i jego efektor – białka YAP. Jednym z celów niniejszej pracy była identyfikacja wzorców ekspresji genu *AMOTL2* w rozwoju ludzkiej trzustki *in vivo* i różnicowaniu trzustki *in vitro* przy użyciu publicznie dostępnych zbiorów danych scRNA-seq. *AMOTL2* ulegał ekspresji na różnych etapach różnicowania trzustki, w tym w endodermie właściwej, komórkach prekursorowych trzustki i EP *in vitro*, ale także w EP, mezenchymie i komórkach pęcherzykowych *in vivo*. Ekspresja genu *AMOTL2* nie utrzymywała się w dojrzałych komórkach endokrynych. Co ważne, tutaj po raz pierwszy wykazano istnienie populacji *NGN3(+)* / *AMOTL2(+)* PE u człowieka, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, którą wcześniej zidentyfikowano jedynie u myszy. Ekspresję *AMOTL2* zidentyfikowano także w zarodku przedimplantacyjnym i hPSCs, co sugeruje, że może on wpływać również na wcześniejsze decyzje dotyczące losu komórki.

W niniejszej pracy wyprowadziłam linię hPSC z wyłączoną ekspresją genu *AMOTL2* (ang. knockout, KO) przy użyciu metody CRISPR/Cas9. Podczas wstępnej charakterystyki wyłonił się silny fenotyp dotyczący morfologii kolonii, przy czym kolonie *AMOTL2* KO hPSC były bardziej nieregularne i mniej ciasno upakowane niż u typu dzikiego (ang. wild type, WT). Dodatkowo hPSC *AMOTL2* KO wykazywały zwiększoną konfluencję w porównaniu z hPSC WT, co było wynikiem ich zwiększonej proliferacji i zmniejszonej szybkości apoptozy.

Sekwencjonowanie RNA ujawniło istotne zmiany w zakresie cytoszkieletu, adhezji oraz migracji, rozwoju, metabolizmu komórkowego i szlaków sygnałowych. Wykazano również potencjalne tendencje rozwojowe komórek *AMOTL2* KO w kierunku ektodermy kosztem endodermy i mezodermy, co zostało potwierdzone spontanicznym i ukierunkowanym różnicowaniem. W poszukiwaniu mechanizmu odpowiedzialnego za takie tendencje w różnicowaniu jako możliwych winowajców zidentyfikowano depolimeryzację F-aktyny i zwiększoną aktywność YAP. Co zaskakujące, spontaniczne różnicowanie z dodatkiem substancji depolimeryzującej F-aktynY-27632 lub inhibitora YAP, werteporfiny, nie powtórzyło ani nie uratowało fenotypu rozwojowego *AMOTL2* KO. Oznacza to, że w grze biorą udział inni, silniejsi gracze, za pomocą których *AMOTL2* kontroluje los komórek, a którzy w oparciu o sekwencjonowanie RNA i wstępne dane funkcjonalne mogą obejmować mechanizm wytwarzania energii lub metabolizm komórkowy.