

Ilona Szablowska-Gadomska

**Indukcja pluripotencjalności i różnicowania neuralnych
komórek progenitorowych z ludzkiej krwi pępowinowej:
rola czynników epigenetycznych
i obniżonego stężenia tlenu**

Rozprawa doktorska

Promotor:

Dr hab. Leonora Bużańska, prof. IMDiK



Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego

Polskiej Akademii Nauk

Warszawa, 2013

STRESZCZENIE

Ludzkie indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (hiPSC), podobnie jak ludzkie zarodkowe komórki macierzyste (hESC) charakteryzują się nieograniczoną zdolnością do podziałów i potencjałem do różnicowania we wszystkie rodzaje komórek organizmu. To podobieństwo, jak również fakt, że hiPSC można teoretycznie otrzymać z każdej komórki somatycznej organizmu człowieka, otwiera nowe możliwości w dziedzinie medycyny regeneracyjnej oraz stanowi nieograniczone i niekontrowersyjne etycznie źródło komórek macierzystych do autologicznych transplantacji. Metoda transfekcji retrowirusowej zastosowana przez Takahashi i Yamanaka (2006) w celu uzyskania pierwszych komórek iPS wyklucza jej zastosowanie aplikacyjne ze względu na ryzyko wystąpienia mutacji oraz reaktywacji tangensów w czasie różnicowania komórek. W wielu laboratoriach badawczych na świecie opracowuje się bezpieczne terapeutycznie metody reprogramowania komórek. Jedną z nich jest metoda reprogramowania białkami rekombinowanymi OCT4, SOX2, KLF4 oraz c-MYC, którą zastosowaliśmy w tej pracy. Dzięki obecności domen poli-argininowych (9R lub 11R) przyłączonych do białek, możliwa jest ich penetracja przez błony komórkowe i aktywowanie ekspresji genów pluripotencjalności.

Jednym z czynników wspomagających otrzymanie komórek pluripotencjalnych przy użyciu metod nieintegracyjnych jest obniżona zawartość tlenu w hodowli. Wiadomo, że obniżone w stosunku do atmosferycznego stężenie tlenu odgrywa istotną rolę w utrzymywaniu komórek w stanie niezróżnicowanym oraz wpływa na proliferację komórek. Ważną rolę w tym procesie mogą odgrywać czynniki transkrypcyjne indukowane hipoksją (HIFs– HypoxiaInducibleFactors), które wpływają na ekspresję genów kodujących czynniki transkrypcyjne związane z pluripotencjalnością (m.in. *OCT4*, *NANOG* i *SOX2*). Zwiększona ekspresja tych czynników pozwala utrzymać pluripotencjalność komórek i hamuje aktywność genów związanych z różnicowaniem. W tej pracy wykazano, że niski poziom tlenu wpływa pozytywnie na indukcję pluripotencjalności lub różnicowanie w kierunku neuronów w komórkach HUCB-NSC (ang. Human UmbilicalCord Blond NeuralStemCells), w zależności od ich zaawansowania rozwojowego. Obniżone stężenie tlenu do 5% indukuje ekspresję genów typowych dla pluripotencjalności wówczas, kiedy komórki hodowane są jako nieprzylegające o morfologii zaokrąglonej w pożywce bez surowicy (SF, ang. Serum Free), komórek niezróżnicowanych.. W komórkach HUCB-NSC hodowanych w obecności surowicy (LS, ang. Low Serum) niski poziom tlenu istotnie podwyższa ekspresję genów

typowych dla dojrzałych neuronów, ale nie wpływa na indukcję genów różnicowania astrocytarnego.

Kontrola epigenetyczna, która odgrywa kluczową rolę w procesach różnicowania i rozwoju komórek, stanowi również czynnik wspomagający indukcję pluripotencjalności. Zastosowanie inhibitorów enzymów katalizujących metylację DNA, oraz deacetylację histonów (małe związki, jak np. RG 108 i TSA), których zadaniem jest aktywowanie i utrzymanie aktywności nieczynnych transkrypcyjnie genów, ma na celu zwiększenie wydajności i przyspieszenie procesu reprogramowania. Obniżone stężenie tlenu w hodowli spełnia podobną funkcję.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej jest ocena możliwości otrzymywania indukowanych komórek pluripotencjalnych (iPS) z neuralnych komórek progenitorowych z ludzkiej krwi pępowinowej, przy użyciu metod epigenetycznych, w porównaniu z metodą modyfikacji komórek białkami rekombinowanymi OCT4, KLF4 i SOX2 oraz analiza molekularna wpływu niskiego poziomu tlenu na reprogramowanie i różnicowanie tych komórek

Postanowiono sprawdzić, czy połączenie metod stymulacji epigenetycznej z zastosowaniem warunków tlenowych zbliżonych do warunków istniejących w niszach komórek macierzystych *in vivo* (obniżone stężenie tlenu do 5%) umożliwi indukcję odróżnicowania komórek somatycznych w kierunku pluripotencjalnym bez stosowania czynników transkrypcyjnych OCT4, KLF4 i SOX2.

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wykazały, że testowane czynniki epigenetyczne TSA i RG-108 (w zastosowanych stężeniach) w warunkach 5% zawartości tlenu były zdolne do stymulacji i utrzymania stabilnego reprogramowania komórek progenitorowych HUCB-NSC, ale dopiero po indukcji białkami rekombinowanymi OCT4-9R, KLF4-9R oraz SOX2-9R. Otrzymane w ten sposób komórki wykazywały wzrost klonalny i po namnożeniu miały potencjał do różnicowania *in vitro* w komórki trzech listków zarodkowych, co wskazuje na ich pluripotencjalność. Inne obserwacje potwierdzające pluripotencjalny charakter otrzymanych komórek o charakterze iPS to ekspresja czynników transkrypcyjnych (OCT4, SOX2 i NANOG), antygenów powierzchniowych SSEA4 i TRA 1-60 oraz *hTERT* (ang. *Human Telomerase Reverse Transcriptase*), typowych dla ludzkich komórek pluripotencjalnych.

W celu lepszego zrozumienia mechanizmów molekularnych towarzyszących reprogramowaniu i różnicowaniu neuralnych komórek progenitorowych z linii HUCB-NSC w warunkach obniżonego poziomu tlenu, przeprowadzono korelację ekspresji genów typowych dla pluripotencjalności i różnicowania neuralnego z ekspresją genów HIF. Zastosowano również inhibitor hydroksylazy prolinowej DMOG dla zwiększenia endogennej kumulacji czynników transkrypcyjnych HIF. W obecności DMOG obserwowano podwyższoną ekspresję HIF1 α , ale nie HIF2 α . Kumulacja HIF1 α pod wpływem DMOG nie wywołała aktywacji genów pluripotencjalności, co sugeruje, że aktywacja genów pluripotencjalności w warunkach obniżonego stężenia tlenu odbywa się za pomocą dodatkowego, niezależnego od HIF mechanizmu lub ewentualnie powiązanego (niebezpośrednio) z HIF1 α ale nie HIF2 α . Kumulacja HIF1 alfa pod wpływem inhibitora PHD koreluje ze zwiększoną ekspresją genu związanego z różnicowaniem neuralnym. Podjęto próbę ustalenia wzoru ekspresji genów istotnych dla procesów epigenetycznych zachodzących w komórkach i korelacji ich ekspresji z poziomem zróżnicowania komórek. Wykazano, że ekspresja genów związanych z metylacją *de novo* (*DNMT3a* i *DNMT3b*) w komórkach zróżnicowanych jest niższa niż w komórkach pluripotencjalnych. Natomiast najwyższy poziom ekspresji genów *HDAC1* i *HDAC2* był obserwowany w komórkach otrzymanych w wyniku reprogramowania.

Przeprowadzone badania wskazują na szczególną rolę czynników epigenetycznych i obniżonego poziomu tlenu w indukcji pluripotencjalności i w procesie różnicowania w kierunku neuronów komórek progenitorowych HUCB-NSC.

ABSTRACT

Human induced pluripotent stem cells (hiPSC), similarly to embryonic stem cells, (ESC) are characterized by the unlimited proliferation potential and ability to differentiate into any tissue of the body. This similarity, as well as the fact that iPSC theoretically can be derived from any somatic cell of the human body open the new possibilities for the personalized regenerative medicine and drug development as the unlimited and ethically non-controversial source of atologous pluripotent stem cells. The first method for obtaining iPS cells, used by Takahashi and Yamanaka (2006), was based on the retrovirus delivery of reprogramming factors. Such a method excludes possible therapeutic applications of derived cells, because of the high risk of mutation and transgen reactivity during further differentiation. Thus development of safe and efficient methods for human iPS derivation, regarding further therapeutic application, become a challenge of many laboratories all over the world. One of them based on the cell transduction with recombinant proteins OCT4, SOX2, KLF4 and c-MYC tailed with poli-arginin domains (9R or 11R), was applied in this work. Such domains enabled protein penetration through the cell membrane and activation of pluripotent gene expression.

It has been proved before, that low oxygen tension plays an important role in the maintenance of cell proliferation and pluripotency and may support derivation of iPS cells. However mechanisms that regulate particular processes are still to be evaluated.

The Hypoxia Inducible Factors (HIF), which are regulated by the cell oxygen level and influence the expression of transcription factors responsible for the pluripotency seem to be the major players. Elevated expression of transcription factors: OCT4, NANOG and SOX2 enable maintenance of pluripotency and inhibit cell differentiation. In this study we have shown, that low (5%) oxygen level stimulates either reprogramming or differentiation of HUCB-NSC (ang. Human Umbilical Cord Blood Neural Stem Cells) depending upon their developmental stage. The expression of pluripotency genes is elevated in low oxygen level, when the cells are cultured as non-adherent and rounded in serum –free medium (SF), while the expression of genes typical for advanced neuronal differentiation (but not astrocytic) is stimulated when cells were grown in low serum conditions (LS).

The epigenetic regulators, which are involved in cell developmental processes also play a supporting role in the induction of pluripotency. The treatment of cells with inhibitors of enzymes catalyzing DNA methylation and histondeacetylation (RG 108 i TSA respectively), results in the activation and the maintenance of activity of genes which have

been transcriptionally silent. This activity, similarly to the low oxygen tension condition, supports induction of pluripotency.

The aim of the present thesis is to estimate the ability to obtain induced pluripotent stem cells (iPS) from neural progenitor cells derived from human cord blood, using epigenetic methods, as compared to the method of cell modification by recombinant proteins OCT4, KLF4 and SOX2 and molecular analysis of the influence of low oxygen level on the reprogramming and differentiation of these cells.

We sought to establish whether the application of epigenetic stimulation by small molecules in conjunction with low oxygen conditions similar to those, which are typical for the neural stem cell niche in vivo (5%), will enable reprogramming of somatic cells into pluripotent state without the application of transcription factors such as OCT4, KLF4 and SOX2.

We have shown that tested epigenetic factors such as TSA and RG-108, in the presence of 5% oxygen tension, were able to stimulate and to maintain stable reprogramming of cell progenitors HUCB-NSC into pluripotency, but only after induction with recombinant proteins OCT4-9R, KLF4-9R and SOX2-9R. The obtained cells revealed morphology similar to embryonic stem cells and clonal growth. After proliferation they have shown potential to differentiate into cells representing 3 different germ layers, which indicate their pluripotent state. Different observations confirming their pluripotency regard the expression of: transcription factors (OCT4, SOX2 and NANOG), surface antigens SSEA4 and TRA 1-60, as well as *hTERT* (ang. *HumanTelomerase Reverse Transcriptase*), typical for human pluripotent stem cells.

To better understand the molecular mechanisms underlying dedifferentiation into pluripotency and neural differentiation of progenitor cells from HUCB-NSC line in low oxygen tension conditions, determine the interaction between HIFs (HIF1 α , HIF 2 α) and activity of genes responsible for induction, maintaining pluripotency state and those promoting neural differentiation. Additionally DMOG, which is a prolyl 4-hydroxylase inhibitor, was used to increase HIF α level. The results showed that HIF1 α and HIF2 α are expressed in HUCB-NSC in all oxygen conditions, but not HIF3 α . It was also indicated that low (5%) oxygen can activate *OCT4* and *NANOG* genes in neural progenitors and in such conditions the expression of HIF1 α is significantly higher than HIF2 α . The time of the cells' cultivation in low oxygen tension and the developmental stage of the cells are important factors for induction of the pluripotency genes' expression. In addition DMOG supplementation resulted in increased accumulation of HIF1 α , but not HIF2 α , thus the first

conclusion was that increased expression of pluripotency genes is correlated with HIF1 α . However, accumulation of HIF1 α ., in the presence of DMOG did not result in increased stimulation of the pluripotency genes, which finally suggests that the mechanisms of activation of pluripotency genes in low oxygen level during cell reprogramming is not dependent from HIF transcription factors or it is not directly linked to HIF1 α activity.

The pattern of the expression of some genes important for the epigenetic modulation of cells and its correlation with the developmental stage of HUCB-NSC was also estimated. It was shown, that expression of genes linked to the methylation *de novo* (DNMT3a i DNMT3b) in differentiated cells is lower than in pluripotent cells. However the highest level of expression of genes involved in histone deacetylation (HDAC1 i HDAC2) was obtained in pluripotent cells obtained after a reprogramming procedure.

The studies performed indicate the important role of epigenetic factors and low, physiological oxygen tension in the induction of pluripotency and in the process of differentiation into neuronal lineage of neural progenitor cells derived from human cord blood.