

mgr Anna Andrzejewska

Aktywność biologiczna ludzkich mezenchymalnych komórek
macierzystych z nad-ekspresją receptora VLA-4;
badania funkcjonalne *in vitro* i *in vivo*

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych
w dyscyplinie: biologii medycznej

Promotor: Prof. dr hab. Barbara Łukomska

Promotor pomocniczy: Dr hab. Mirosław Janowski



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa 2018

STRESZCZENIE

Terapia regeneracyjna z wykorzystaniem komórek macierzystych w celu odtworzenia uszkodzonych tkanek i narządów jest przedmiotem zainteresowania środowisk medycznych i gremiów naukowych od kilkunastu lat. W początkowym okresie zakładano, iż przeszczepiane komórki egzogenne zastąpią zniszczone struktury w rejonie uszkodzenia. Obecnie wiadomo, iż pozytywne efekty transplantacji komórek macierzystych wynikają raczej z ich protekcyjnego działania i stymulacji endogennych procesów naprawczych niż przekształcania się tych komórek w dojrzałe komórki biorcy i ich wbudowywania w struktury tkanki. W ostatnich latach dużym zainteresowaniem wśród naukowców i klinicystów, również z punktu widzenia ich zastosowań terapeutycznych cieszą się mezenchymalne komórki macierzyste (MSCs). Łatwość pozyskiwania MSCs z różnych źródeł, ich niska immunogenność i zdolności immunomodulacyjne sprawiają, iż mogą być przeszczepiane nie tylko w układzie auto-, ale również allogenicznym. Ponadto właściwości anty-apoptotyczne, parakryne i wielokierunkowa zdolność do różnicowania MSCs sprawia, że są one aktualnie wykorzystywane w próbach eksperymentalnych i klinicznych terapii najczęściej występujących chorób, w tym chorób neurologicznych obejmujących struktury ośrodkowego układu nerwowego (OUN), takich jak udar mózgu, choroba Alzheimera, stwardnienie zanikowe boczne, choroba Huntingtona, Parkinsona, stwardnienie rozsiane czy uszkodzenie rdzenia kręgowego, dla których brak jest skutecznych alternatywnych metod leczenia.

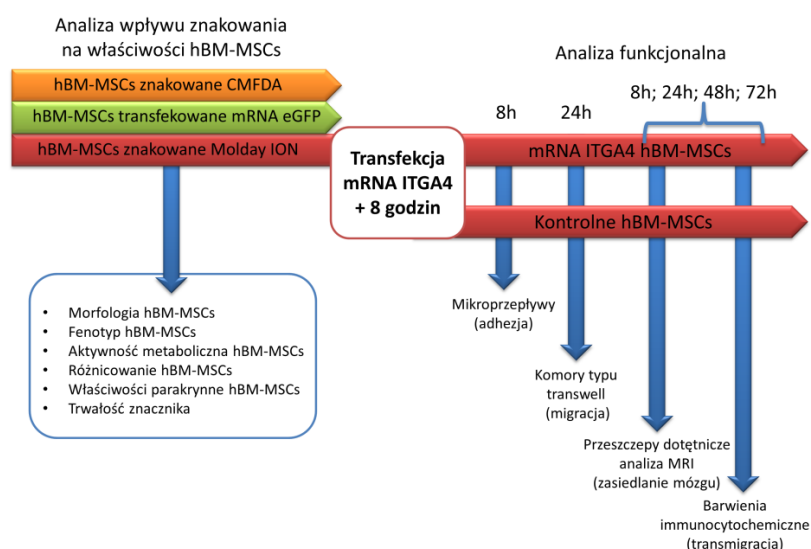
W dostępnych źródłach literaturowych możemy znaleźć prace pokazujące, że przeszczepiane MSCs podlegają mobilizacji do uszkodzonych tkanek w sposób aktywny, jednak mechanizm odpowiedzialny za ten proces nie został jak dotąd poznany. Ponadto, zasiedlanie rejonów uszkodzenia w tkance przez systemowo podane komórki jest dużo mniej wydajne w przypadku MSCs niż leukocytów, czego przyczyną może być brak ekspresji istotnych dla tego procesu receptorów oraz białek adhezyjnych. Zwiększenie ekspresji białek odpowiedzialnych za adhezję i migrację może mieć pozytywny wpływ na przechodzenie przeszczepianych komórek z łożyska naczyniowego i ich mobilizację do rejonu uszkodzenia. Stąd też rozwój metod zwiększających migrację systemowo podanych komórek do mózgu wydaje się być istotny w celu podniesienia wydajności terapii z użyciem egzogennych MSCs w chorobach neurologicznych. Badania Gorelik i wsp. (Gorelik i in., 2012) wykazały, że wywołanie w progenitorach glejowych (GRPs) nad-ekspresji cząsteczek adhezyjnych VLA-4, białka zaangażowanego fizjologicznie w proces diapedezy leukocytów, skutkowało zwiększonym gromadzeniem się zmodyfikowanych GRPs w naczyniach mózgu po iniekcji dotętniczej. Obserwacje te stanowiły asumpt do zaprojektowania badań, będących przedmiotem mojej pracy doktorskiej. Istotą tych badań była analiza etapów diapedezy, niezbędnych w procesie transmigracji ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego (hBM-MSCs) wykazujących zwiększoną ekspresją receptora VLA-4. Ocena migracji, lokalizacji tkankowej oraz stopnia zasiedlania uszkodzonych obszarów, również w badaniach długoterminowych stwarza konieczność stosowania najbardziej neutralnych znaczników, umożliwiających zachowanie prawidłowej morfologii i niezmiennych funkcji komórek po ich transplantacji, a także sprawowanie precyzyjnej kontroli podczas procesu podawania chorym komórek macierzystych.

Celem moich badań było zweryfikowanie hipotezy czy zwiększenie ekspresji integryny VLA-4 w hBM-MSCs pozwoli na wzmocnienie ich właściwości adhezyjnych i transmigracyjnych po transplantacji systemowej u szczurów w modelu uszkodzenia mózgu.

Badania wstępne miały na celu wybór barwnika do przyżyciowego znakowania hBM-MSCs, który nie zmieniałby cech biologicznych znakowanych komórek jednocześnie umożliwiając ich identyfikację w długoczasowych eksperymentach prowadzonych w warunkach *in vitro* i *in vivo*.

Przedmiotem badań były ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego (LONZA) z wywołaną nad-ekspresją VLA-4. Komórki te uzyskano poprzez transfekcję mRNA ITGA4 kodującym podjednostkę $\alpha 4$ integryny VLA-4 według metody opracowanej w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej (Nowakowski, Andrzejewska i wsp. 2017). Badania funkcjonalne hBM-MSCs *in vitro* wykonano z użyciem komór mikroprzepływowych (*microfluid device*) i komór migracyjnych typu *transwell*. Doświadczenia *in vivo* przeprowadzono u dorosłych szczurów stada Wistar w modelu ogniskowego uszkodzenia mózgu z zastosowaniem inhibitora pompy sodowo-potasowej (ouabainy) opracowanego w naszym zespole (Janowski i in., 2008).

Schemat przeprowadzonych doświadczeń



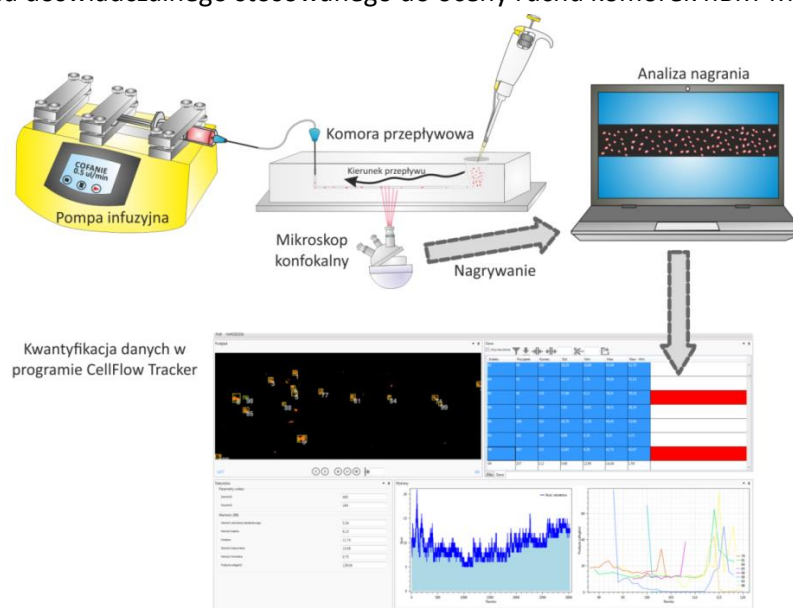
I etap moich badań dotyczył oceny przydatności wybranych przyżyciowych barwników zastosowanych do znakowania komórek hBM-MSCs w celu ich wizualizacji w dalszych eksperymentach. Prowadzone badania obejmowały analizę porównawczą wpływu trzech typów znaczników: CellTracker™ Green CMFDA (Life Technologies, CMFDA), mRNA eGFP (Stemgent) i Molday ION (BiOPAL, Molday) na morfologię i funkcje znakowanych hBM-MSCs. Istotą tych badań było wytypowanie przyżyciowego barwnika optymalnego dla hBM-MSCs, który nie zmieniałby cech biologicznych znakowanych komórek, a jednocześnie umożliwiłby ich identyfikację w długoczasowych eksperymentach prowadzonych zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Wyniki tych badań wykazały, że z wykorzystanych do przyżyciowego znakowania hBM-MSCs trzech różnych barwników fluorescencyjnych najbardziej użyteczny okazał się Molday ION zawierający nanocząstki tlenku żelaza i rodaminę B. Znacznik ten długo utrzymywał się w komórkach hBM-MSCs podczas ich hodowli *in vitro*. Komórki hBM-MSCs wyznakowane Molday ION zachowywały prawidłowe cechy morfologiczne i fenotypowe, prezentowały porównywalny z komórkami natywnymi poziom aktywności metabolicznej oraz ekspresji większości czynników wzrostu i zdolność do różnicowania w kierunku adipocytów i osteoblastów. Na podstawie powyższych wyników badań hBM-MSCs znakowane

Molday ION zostały wybrane do badań w dalszych moich eksperymentach. Rodamina B, która wykazuje silne właściwości fluorescencyjne pozwoliła na identyfikację znakowanych komórek zarówno w hodowli *in vitro* jak i po przeszczepie w tkance *post mortem*. Właściwości ferromagnetyczne, jakie posiadają nanocząstki żelaza będące składową częścią znacznika Molday ION umożliwiły natomiast wizualizację wyznakowanych hBM-MSCs w czasie rzeczywistym podczas infuzji komórek, a także ich obserwację w dalszej sekwencji czasowej po ich transplantacji u żywych zwierząt, z użyciem MRI.

Kolejne eksperymenty stanowiły główny nurt moich badań, jakim było porównanie właściwości biologicznych hBM-MSCs natywnych i wykazujących nad-ekspresję receptora VLA-4 uczestniczącego w adhezji i transmigracji komórek w warunkach *in vitro* i *in vivo* po transplantacji systemowej u szczurów w modelu uszkodzenia mózgu. Komórki hBM-MSCs z nad-ekspresją VLA-4 zostały przez nas otrzymane metodą modyfikacji genetycznej z udziałem mRNA ITGA4. Wyniki badań ujawniły, że transfekcja wymienionym konstruktem powoduje, iż w komórkach pojawia się mRNA kodujące podjednostkę $\alpha 4$ integryny VLA-4, która nie występuje w natywnych hBM-MSCs. W zmodyfikowanych genetycznie komórkach, najwyższy poziom ekspresji białka $\alpha 4$ obecnego w błonie komórkowej obserwuje się w okresie 8-12 godzin od wprowadzenia mRNA ITGA4 do komórek.

II etap moich badań miał na celu porównanie właściwości biologicznych dwóch rodzajów komórek znakowanych Molday ION *in vitro*, w tym hBM-MSCs natywnych i wykazujących nad-ekspresję receptora VLA-4. Istotą badań była ocena ruchu i przylegania zmodyfikowanych przez transfekcję mRNA ITGA4 komórek hBM-MSCs poprzez zastosowanie zaadaptowanej do naszych celów techniki mikroprzepływów. Do badań służyły komory przepływowe (microfluidic device) będące układem bardzo precyzyjnych mikrokanalów, które stanowią model naczyń kapilarnych, a obserwowany w nich laminarny przepływ imituje warunki panujące w układzie krwionośnym. W naszych doświadczeniach komórki hBM-MSCs podawane do otworu wpustowego przemieszczały się przez kanał komory przepływowej. Przezroczystość kamery pozwalała na obserwację zachowania przepływających komórek oraz ilościową ocenę ich przylegania. Przeprowadzane eksperymenty były nagrywane kamerą połączoną z mikroskopem konfokalnym, a pochodzące z nich filmy analizowano manualnie bądź przy użyciu opracowanego do tych celów specjalnego programu CellFlowTracker.

Schemat układu doświadczalnego stosowanego do oceny ruchu komórek hBM-MSCs *in vitro*



Dzięki zastosowaniu wielkoskalowej zautomatyzowanej analizy danych generowanych przez opracowany do naszych doświadczeń program CellFlowTracker wykazano, że podczas przepływu komórek przez kanał komory zarówno natywne jak i modyfikowane mRNA ITGA4 hBM-MSCs podlegają procesom toczenia i pełzania, analogicznym do etapów obserwowanych podczas diapedezy leukocytów w naczyniach krwionośnych. Analizując wyniki moich badań okazało się, że hBM-MSCs modyfikowane przez wprowadzenie mRNA ITGA4 charakteryzują się wzmożoną aktywnością adhezyjną, co skutkuje zwiększeniem liczby komórek, które zatrzymują się podczas przepływu przez komorę (microfluidic device). Wzrost zdolności przylegania komórek transfekowanych mRNA ITGA4 został potwierdzony w badaniach z wykorzystaniem dwukomorowych szalek hodowlanych typu *transwell*. hBM-MSCs wykazujące nad-ekspresję VLA-4 silniej wiązały się z błoną półprzepuszczalną górnej komory w porównaniu z komórkami niemodyfikowanymi, zatrzymując się na górnej powierzchni błony, co ograniczało ich zdolność migracji.

Powyższe informacje stały się inspiracją do przeprowadzenia III etapu moich badań, który miał za zadanie ocenę funkcjonalną *in vivo* hBM-MSCs transfekowanych mRNA ITGA4, a w szczególności zdolności zasiedlania przez nie mózgu szczura po przeszczepie dotętniczym w eksperymentalnym modelu uszkodzenia prążkowiego ouabainą. Komórki hBM-MSCs charakteryzujące się zwiększoną ekspresją podjednostki $\alpha 4$ integryny VLA-4 lub komórki natywne niemodyfikowane genetycznie przeszczepiano dotętniczo, do tętnicy szyjnej wewnętrznej, szczurom po 48 godzinach od wykonania uszkodzenia prążkowiego. Proces napływu komórek do mózgu podczas ich transplantacji był monitorowany w czasie rzeczywistym przy użyciu obrazowania w rezonansie magnetycznym. Wyniki badań wykazały, że hBM-MSCs znakowane Molday ION napływały do prawej uszkodzonej półkuli. Na podstawie intensywności sygnału, generowanego przez nanocząstki tlenku żelaza w MRI można wnioskować, że więcej hBM-MSCs z nad-ekspresją VLA-4 w stosunku do komórek nasympatycznych niemodyfikowanych genetycznie, było widocznych w okolicy lezji. Badania immunohistochemiczne potwierdziły wyniki uzyskane w MRI. Podczas prowadzonych przez nas dalszych obserwacji okazało się, że hBM-MSCs pozostawały w obrębie naczyń krwionośnych mózgu. Po 72 godzinach od transplantacji niektóre z komórek były widoczne w przestrzeni periwaskularnej.

Uzyskane wyniki przeprowadzonych badań pozwalają sformułować następujące wnioski:

- dobór znaczników w celu wizualizacji komórek nakłada obowiązek przeprowadzania restrykcyjnej oceny właściwości komórek po ich znakowaniu w każdym nowym układzie doświadczalnym przed przystąpieniem do transplantacji
- transfekcja ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego mRNA ITGA4 indukuje ekspresję podjednostki $\alpha 4$ integryny VLA-4, zwiększając zdolność adhezji zmodyfikowanych komórek zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* po ich transplantacji
- zwiększenie ekspresji receptora VLA-4 na powierzchni hBM-MSCs skutkuje efektywnym gromadzeniem się przeszczepianych komórek w naczyniach krwionośnych mózgu przebiegających w pobliżu lezji
- wydaje się, że wzmocnienie ekspresji dodatkowych receptorów na komórkach podawanych systemowo mogłoby promować ich przechodzenie przez ścianę naczyń krwionośnych i ukierunkowaną migrację