

Poszukiwanie metody selekcji komórek prymitywnych z populacji mezenchymalnych komórek stromalnych

Temat pracy doktorskiej: Opracowanie metody izolacji i długotrwałej hodowli subpopulacji pluripotencjalnych komórek macierzystych wywodzących się z mezenchymalnych komórek stromalnych

Wstęp: Mezenchymalne komórki macierzyste/stromalne (MSC) to multipotencjalna grupa komórek macierzystych, charakteryzująca się dużą heterogennością populacji. Zgodnie z wytycznymi ISCT, komórki te mają zdolność do różnicowania w komórki mezodermy t.j. chondro-, oseteo- i adipocyty. W literaturze istnieje jedna liczna praca, wskazująca na możliwość zróżnicowania tych komórek w komórki innych listków zarodkowych: ektodermy np. w komórki nerwowe lub endodermy np. w hepatocyty. Teoria tłumacząca zdolność do różnicowania się tych komórek poza mezodermę związana jest ze zjawiskiem przejścia epitelialno-mezenchymalnego i odmigrowywania kohorty preMSC (prymitywnych MSC) z grzebienia nerwowego do pozostałych tkanek organizmu w trakcie rozwoju zarodkowego. MSC o prymitywnych cechach powinny charakteryzować się wysokim potencjałem do proliferacji, wyższą ekspresję genów związanych z macierzystością SRTF (*Stemness-Related Transcription Factors*) oraz zdolnością do różnicowania w komórki trzech listków zarodkowych. PreMSC o takim fenotypie miałyby częściowo cechy komórek pluripotencjalnych i stanowiłyby ze względu na pochodzenie, optymalny materiał do regeneracji układu nerwowego.

W celu wyizolowania opisywanej subpopulacji komórek prymitywnych, w poprzednim roku akademickim analizowałam długotrwałą hodowlę MSC w postaci sferoidów 3D. Niestety długotrwała hodowla sferoidów otrzymanych z heterogennej subpopulacji MSC związana była ze znacznym zwiększeniem śmiertelności komórek. W trakcie analizy sferoidów, stwierdziłam, że wśród populacji komórek, które przeżywają długą hodowlę w niekorzystnych warunkach środowiska, znacznie zwiększyła się subpopulacja komórek SSEA-4 pozytywnych (*Stage specific embryonic antigen 4*). Opisane doświadczenia zostały przeanalizowane, opracowane i opublikowane w bieżącym roku akademickim, w międzynarodowym czasopiśmie *Cells* (Kaminska et al. 2021).

W oparciu o dane literaturowe oraz doświadczenia własne, w kolejnym etapie projektu zdecydowałam się na zastosowanie innej metody selekcji komórek prymitywnych – sortowanie magnetyczne (MACS) w oparciu o antygeny powierzchniowe. Na podstawie literatury oraz uzyskanych wyników wybrałam dwa antygeny: SSEA-4 (*Stage specific embryonic antigen 4*) oraz CD271 (*Low affinity nerve growth factor receptor*).

Cel: Celem tego etapu pracy doktorskiej było opracowanie metody izolacji subpopulacji komórek SSEA-4, otrzymanie z nich sferoidów oraz analiza zgodnie z wcześniej przeprowadzonym protokołem dla heterogennej subpopulacji sferoidów.

Materiały i metody: W badaniach jako kontrola zostały wykorzystane MSC pochodzące z galarety Whartona (WJ-MSC), standardowo hodowane w hodowli adherentnej (2D). Za pomocą cytometrii przepływowej przeanalizowano odsetek komórek pozytywnych na SSEA-4 i CD271 w heterogennej populacji WJ-MSC. Następnie komórki pozytywne wysortowano z zastosowaniem sortera komórkowego AutoMACS ProSeparator. Otrzymano sferoidy z komórek SSEA-4 i CD271 oraz oznaczono ich żywotność i przeanalizowano ekspresję genów pluripotencjalnych w 1 pasażu.

Wyniki: Subpopulacja komórek SSEA-4 pozytywnych w heterogennej populacji WJ-MSC stanowi zaledwie 38% wszystkich komórek. Subpopulacja komórek CD271+ jest mniejsza i wynosi 2% WJ-MSC. Komórki wysortowane z zastosowaniem powyższych markerów powierzchniowych wykazują wyższą ekspresję genów SRTF. Sfery utworzone z tych komórek są mniejsze i zawierają większą liczbę komórek żywych w stosunku do sfer z niesortowanych komórek.

Wnioski i dalsze plany: Długotrwała hodowla 3D heterogennej populacji MSC nie umożliwia wyselekcjonowania subpopulacji komórek o charakterze prymitywnym, ale prowadzi do zwiększenia subpopulacji komórek SSEA-4 pozytywnych. Wyizolowane z heterogennej populacji WJ-MSC subpopulacje komórek CD271 i SSEA-4 pozytywnych, wykazują wyższą ekspresję genów SRTF oraz tworzą sferoidy o lepszej przeżywalności i młodszym fenotypie. W kolejnym etapie pracy zamierzamy kontynuować analizę subpopulacji WJ-MSC-CD271 i WJ-MSC-SSEA-4 w celu określenia ich zdolności do różnicowania w komórki innych listków zarodkowych, mając nadzieję, że w ten sposób otrzymana subpopulacja komórek będzie posiadała cechy poszukiwanych komórek preMSC. W przygotowaniu jest również praca przeglądowa przedstawiająca perspektywy wykorzystania zarówno preMSC, jak i neuralnych komórek macierzystych w regeneracji układu nerwowego.

Finansowanie: Grant NCN 2018/31/B/NZ4/03172, Projekt nr POWR.03.02.00-00-I028/17-00 realizowany w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020 współfinansowany ze środków ESF