

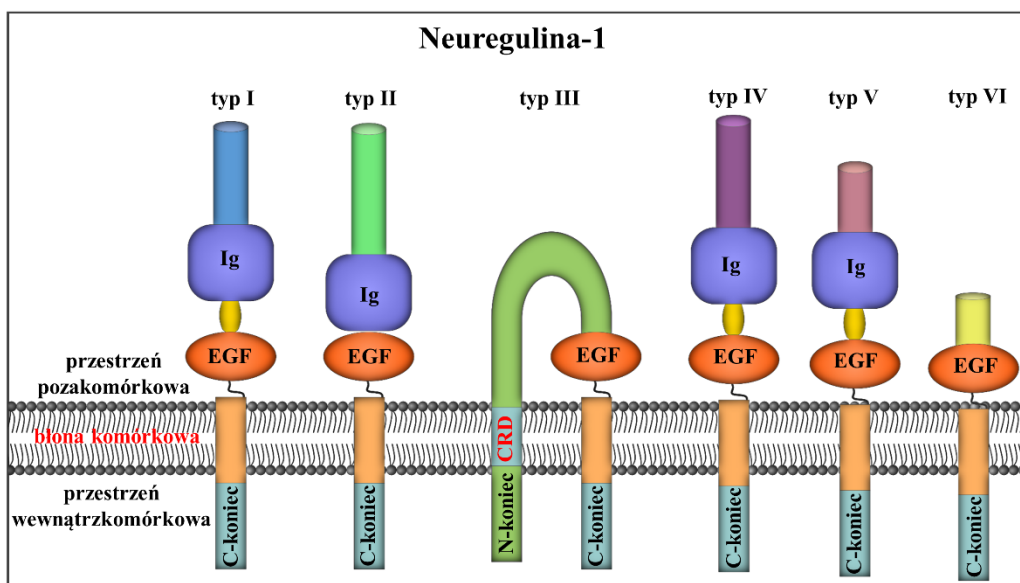
Piotr Aleksander Rogujski - rozprawa doktorska:

Modyfikacje mysich glejowo-specyficznych komórek progenitorowych z użyciem neureguliny-1 w celu zwiększenia ich potencjału regeneracyjnego w leczeniu chorób demielinizacyjnych

Streszczenie

Spośród szeregu schorzeń układu nerwowego, jednym z istotnych problemów klinicznych są choroby demielinizacyjne, charakteryzujące się uszkodzeniem otoczki mielinowej w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym. Do chorób demielinizacyjnych zaliczyć można m.in. leukodystrofię czy stwardnienie rozsiane. Zjawisko demielinizacji związane jest także z wieloma chorobami neurodegeneracyjnymi, takimi jak stwardnienie zanikowe boczne, czy z urazami mózgu i rdzenia kręgowego. Z uwagi na zróżnicowaną etiologię, schorzenia te manifestują się w postaci szeregu objawów neurologicznych, które upośledzają normalne funkcjonowanie pacjentów, stanowiąc jedno z głównych obciążeń współczesnego społeczeństwa. Brak możliwości skutecznego leczenia tych chorób skłania naukowców i klinicystów do poszukiwania nowych metod terapii w celu przywrócenia upośledzonych funkcji mielinizacji neuronów i regeneracji uszkodzonych struktur układu nerwowego. Glejowo-specyficzne komórki progenitorowe (GRPs) posiadają cechy wskazujące na ich duży potencjał do zastosowania w terapii regeneracyjnej schorzeń związanych z demielinizacją. Dotychczasowe badania eksperymentalne, podobnie jak wyniki naszych poprzednich badań wykazały, że przeszczepy GRPs w zwierzęcych modelach demielinizacji powodują wytwarzanie mieliny i częściową kompensację deficytów neurologicznych u biorców. Jednak niedostateczna skuteczność terapeutyczna egzogennych progenitorów glejowych zachęca badaczy do poszukiwań nowych możliwości zwiększania potencjału tych komórek w celu spotęgowania ich właściwości regeneracyjnych po podaniu *in vivo*. Jedną ze stosowanych metod są modyfikacje komórek w oparciu o plejotropowe czynniki wzrostu, wśród których, szczególnie zainteresowanie wzbudza, kodowana przez gen *Nrg-1*, neuregulina-1.

Izoformy białkowe neureguliny-1



Najnowsze badania wykazały wpływ neureguliny-1 na rozwój i stabilizację aksonów w obwodowym układzie nerwowym oraz ich mielinizację przez komórki Schwanna, a także zdolność do modulacji odpowiedzi immunologicznej po uszkodzeniach, co sugeruje jej istotne zaangażowanie w proces endogennej regeneracji uszkodzonych struktur nerwowych. Powyższe obserwacje stanowiły podstawę do zaprojektowania badań, będących przedmiotem mojej pracy doktorskiej. Postanowiłem sprawdzić, czy neuregulina-1 (NRG-1) ma wpływ na właściwości funkcjonalne GRPs.

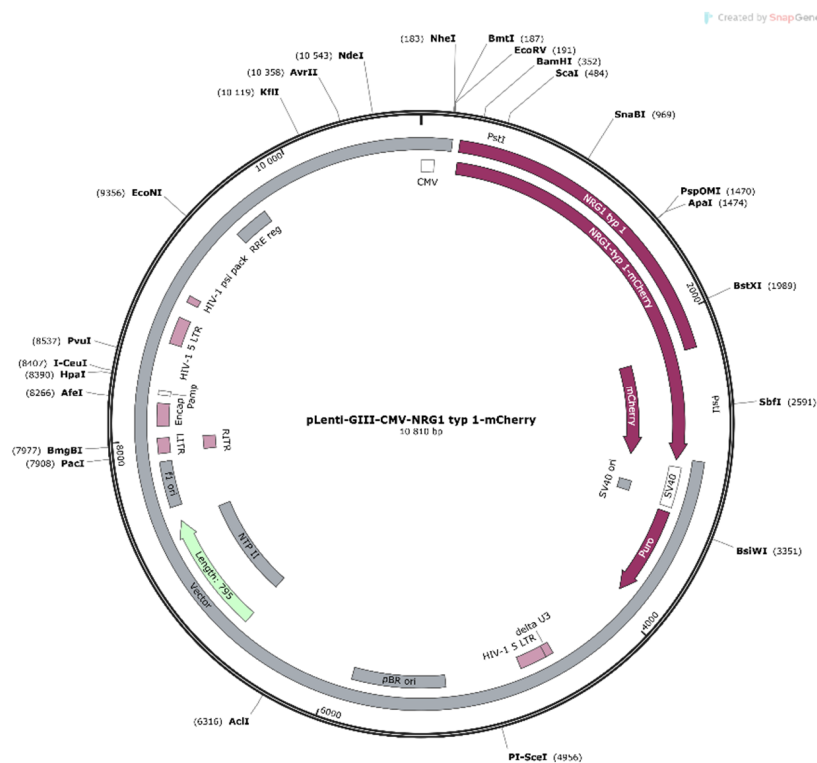
Celem moich badań była weryfikacja hipotezy zakładającej, że nadekspresja neureguliny-1 w glejowo-specyficznych komórkach progenitorowych (GRPs) zmienia ich właściwości funkcjonalne, które mogą być istotne dla zwiększenia potencjału zastosowania GRPs w terapii chorób związanych z demielinizacją.

Przedmiotem prowadzonych przeze mnie badań były GRPs izolowane z tkanki nerwowej płodów myszy (mGRPs). Modyfikacje genetyczne mGRPs w celu wywołania nadekspresji neureguliny-1 typu I (NRG-1 typu I) przeprowadzone zostały poprzez transdukcję komórek wektorami lentiwirusowymi kodującymi NRG-1 typu I. Badania dotyczyły analizy poziomu ekspresji NRG-1 w zmodyfikowanych mGRPs, ich fenotypu, oraz właściwości funkcjonalnych mGRPs-NRG-1 *in vitro*.

I etap badań miał na celu opracowanie metody izolacji i selektywnej hodowli mGRPs. Kolejne eksperymenty stanowiły główny cel moich badań i dotyczyły transdukcji mGRPs w celu wywołania nadekspresji neureguliny-1 przy pomocy wektorów lentiwirusowych.

W II etapie badań zoptymalizowałem protokół transdukcji mGRPs wektorami lentiwirusowymi i przeprowadziłem transdukcję mGRPs wektorem pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry, kodującym NRG-1 typu I w fuzji z fluorescencyjnym białkiem reporterowym mCherry, w celu wywołania w nich konstytutywnej nadekspresji NRG-1 typu I.

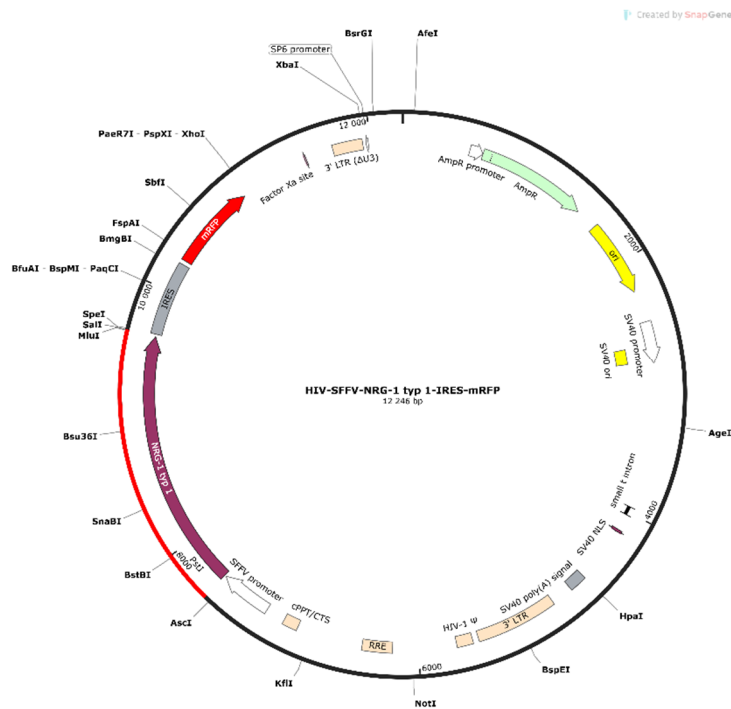
Mapa wektora lentiwirusowego pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry



Ocena mGRPs transdukowanych wektorem pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry (NRG-1 typ I) wykazała, że komórki te w kolejnych próbach transdukcji prezentują zróżnicowany poziom syntezy transkryptu dla NRG-1 typu I, a ich dalsza hodowla skutkuje spontanicznym odklejaniem się komórek od powierzchni naczynia hodowlanego i ich śmiercią.

Negatywne wyniki transdukcji mGRPs wektorem pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry skłoniły mnie, aby w kolejnym etapie badań zastosować do transdukcji mGRP wektor HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP, kodujący sekwencje NRG-1 typu I i fluorescencyjne białko reporterowe mRFP, przedzielone sekwencją IRES (ang. *Internal Ribosome Entry Site*, wewnętrzne miejsce wiązania rybosomu), umożliwiającą ko-ekspresję obydwu sekwencji pod kontrolą transkrypcyjną wspólnego promotora, lecz z niezależnie zachodzącą translacją.

Mapa wektora lentiwirusowego HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP



W kolejnych etapach badań oceniałem fenotyp i właściwości funkcjonalne mGRPs transdukowanych wektorem HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP *in vitro*. Analiza wykazała, że transdukowane mGRPs prezentowały zróżnicowany poziom ekspresji mRNA dla NRG-1 typ I pomiędzy poszczególnymi próbami transdukcji. Analiza fenotypowa komórek wykazała, że w populacji mGRPs transdukowanej tym wektorem występuje mniej progenitorów glejowych, natomiast więcej prekursorów oligodendrocytów (OPCs) i niedojrzałych oligodendrocytów oraz komórek różnicujących o fenotypie pośrednim pomiędzy GRPs a OPCs, w porównaniu do populacji komórek kontrolnych. Z kolei analiza poziomu mielinizacji aksonów przez mGRPs transdukowane wektorem HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP i mGRPs kontrolne nie wykazała pomiędzy nimi istotnych różnic w zdolności do mielinizacji. Identyfikacja białka reporterowego po transdukcjach była problematyczna, z uwagi na specyfikę zastosowanego wektora bicistronowego z sekwencją IRES. Populacja mGRPs transdukowanych HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP cechowała się niskim tempem wzrostu. Uzyskanie za pomocą wektora HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP wystarczającej liczby mGRPs ze stabilną nadekspresją egzogennej NRG-1 typu I do przeprowadzenia dalszych badań okazało się zatem nieosiągalne.

W związku z pogorszeniem się właściwości mGRPs w wyniku konstytutywnej nadekspresji egzogennej kopii genu kodującego NRG-1, w kolejnym etapie badań podjąłem próbę transdukcji mGRPs lentiwirusowymi cząstkami aktywacyjnymi, zaprojektowanymi w celu nadekspresji endogennego genu kodującego NRG-1 (NRG-1-LAPs). Jednak, jednoczesna transdukcja mGRPs trzema wektorami lentiwirusowymi wchodzącymi w skład systemu NRG-1-LAPs, okazała się nieskuteczna. W związku z tym próba wywołania w mGRPs nadekspresji endogennej NRG-1 poprzez transdukcję komórek lentiwirusowymi cząstkami aktywacyjnymi nie powiodła się.

Wobec niepowodzeń związanych z modyfikacjami genetycznymi mGRPs w kierunku nadekspresji NRG-1, postanowiłem przeprowadzić dodatkowe badania, oparte na stymulacji mGRPs egzogenным rekombinowanym peptydem neuregulina-1 z myszy (rmNRG-1), poprzez suplementację nim standardowej pożywki, w której hodowano komórki. Suplementacja mGRPs peptydem rmNRG-1 miała zróżnicowany wpływ na fenotyp komórek w hodowli *in vitro*. W warunkach hamujących różnicowanie komórek, w hodowli mGRPs suplementowanej rmNRG-1 stwierdziłem obecność progenitorów glejowych i brak dojrzałych oligodendrocytów. W tych samym warunkach okazało się, że rmNRG-1 istotnie zwiększa liczbę komórek proliferujących (Ki67⁺) w hodowli. Natomiast w warunkach stymulujących różnicowanie mGRPs, suplementacja rmNRG-1 zmniejszała poziom ich różnicowania w kierunku mielinizujących oligodendrocytów o fenotypie MBP⁺, a efekt widoczny był zarówno w hodowli samych mGRPs, jak i we współhodowli z neuronami. Wstępne pomiary prędkości migracji komórek zwracają uwagę na potencjalnie niższą średnią prędkość migracji mGRPs suplementowanych peptydem rmNRG-1, w porównaniu do średniej prędkości migracji dla komórek niesuplementowanych. Wyniki powyższych badań wstępnych sugerują, że suplementacja mGRPs peptydem rmNRG-1 zmieniała fenotyp mGRPs zwiększając ich proliferację, ale pogarszała zdolności migracyjne, a efekt mógł być zależny zarówno od stężenia peptydu, jak i od warunków hodowli. Dalsze badania są w toku.

Na podstawie przeprowadzonych badań można sformułować następujące wnioski:

- nadekspresja NRG-1 typu I, wywołana poprzez transdukcję mGRPs wektorami lentiwirusowymi, powoduje spadek tempa wzrostu tych komórek i stymuluje ich różnicowanie w kierunku oligodendrocytów, nie stwierdziłem jednak istotnego wpływu nadekspresji NRG-1 typu I na właściwości mielinizacyjne mGRPs
- moje wstępne badania dotyczące stymulacji mGRPs egzogenным rekombinowanym peptydem neuregulina-1 sugerują zwiększoną proliferację i spowolnienie migracji suplementowanych mGRPs, przy jednoczesnym spadku zdolności tych komórek do różnicowania w dojrzałe oligodendrocyty
- wyniki badań przedstawionych w mojej rozprawie doktorskiej wskazują, że wpływ neureguliny-1 na właściwości funkcjonalne mGRPs jest zależny od zastosowanego układu doświadczalnego.

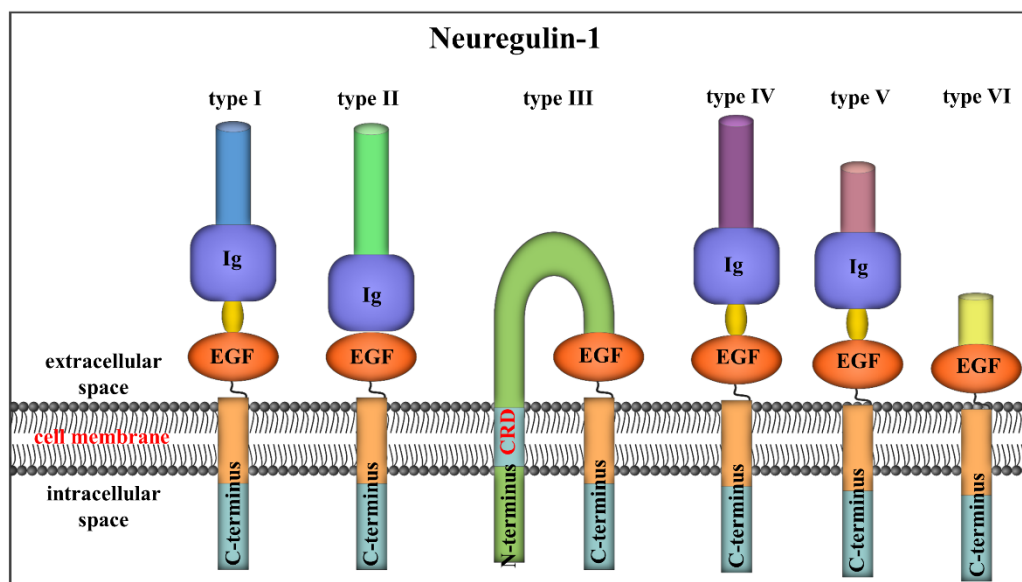
Piotr Aleksander Rogujski - PhD thesis:

Modifications of mice glial-restricted progenitor cells using neuregulin-1 to enhance their regenerative potential in the treatment of demyelinating diseases

Abstract

Among a range of disorders of the nervous system, some of the most significant clinical problems are demyelinating diseases, characterized by damage to the myelin sheath in the central and peripheral nervous system. Demyelinating diseases include leukodystrophies and multiple sclerosis, among others. The phenomenon of demyelination is also associated with various neurodegenerative diseases, such as amyotrophic lateral sclerosis, and with brain and spinal cord injuries. Due to their diverse etiology, these conditions manifest in the form of a series of neurological symptoms that impair the normal functioning of patients, representing a major burden on modern societies. The lack of effective treatment for these diseases has prompted scientists and clinicians to seek new therapeutic methods to restore impaired neuronal myelination and regenerate damaged structures of the nervous system. Glial-restricted progenitor cells (GRPs) demonstrate features indicating their great potential for application in regenerative therapy for demyelination-related disorders. Previous experimental studies, as well as the results of our own previous research, have shown that grafts of GRPs in animal models of demyelination result in myelin production and partial compensation of neurological deficits in recipients. However, the insufficient therapeutic efficacy of exogenous glial progenitors motivates researchers to explore new possibilities for enhancing the potential of these cells to enhance their regenerative properties after *in vivo* administration. One of the methods used is cell modification based on pleiotropic growth factors, among which neuregulin-1, encoded by the *Nrg-1* gene, has sparked particular interest.

Protein isoforms of neuregulin-1



Recent studies have demonstrated the impact of neuregulin-1 on the development and stabilization of axons in the peripheral nervous system, as well as their myelination by Schwann cells. Neuregulin-1 also shows the ability to modulate the immune response following injuries, suggesting its

significant involvement in the endogenous regeneration of damaged neural structures. These observations served as the basis for designing the research that formed the focus of my doctoral work.

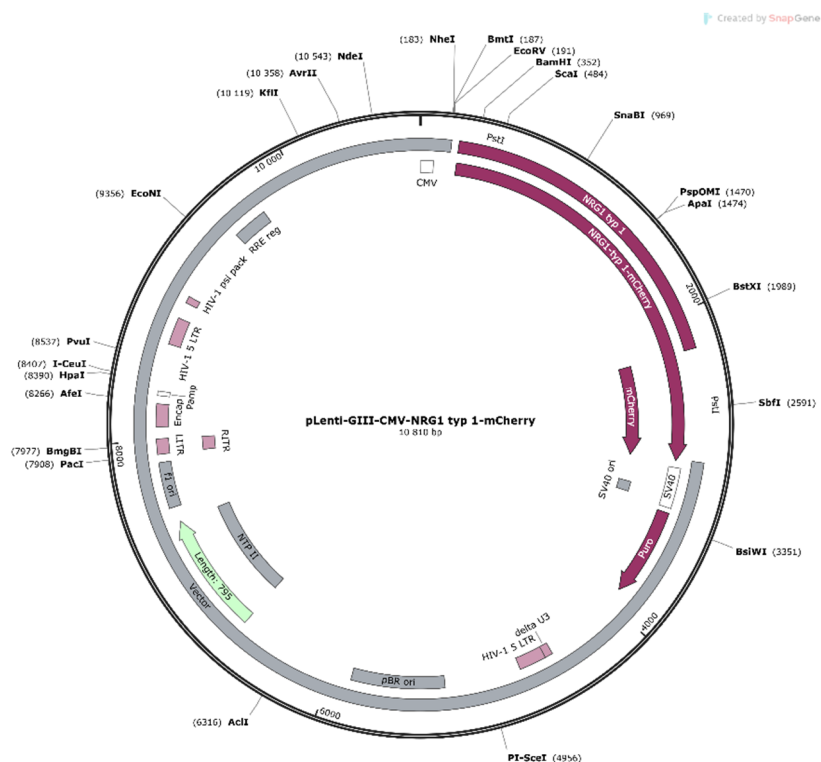
I aimed to investigate the influence of neuregulin-1 (NRG-1) on the functional properties of glial-restricted progenitor cells (GRPs). The hypothesis I sought to verify was that overexpressing neuregulin-1 in GRPs would alter their functional characteristics, potentially enhancing their application potential in the therapy of demyelination-related diseases.

The study focused on GRPs isolated from mouse fetal nervous tissue (referred to as mGRPs). To induce overexpression of neuregulin-1 type I (NRG-1 type I), genetic modifications were performed on mGRPs through the transduction of cells using lentiviral vectors encoding NRG-1 type I. The research involved analyzing the expression levels of NRG-1 in the modified mGRPs, examining their phenotype, and investigating the functional properties of mGRPs-NRG-1 *in vitro*.

The initial phase of the study aimed to develop a method for isolating and selectively culturing mGRPs. Subsequent experiments constituted the main objective of the research, focusing on transducing mGRPs with lentiviral vectors to induce overexpression of neuregulin-1.

In the second stage of the study, I optimized the transduction protocol for mGRPs using lentiviral vectors. Specifically, I performed transduction of mGRPs using the pLenti-GIII-CMV-NRG-1 type I-mCherry vector, which encodes neuregulin-1 type I fused with the fluorescent reporter protein mCherry. This approach aimed to induce constitutive overexpression of neuregulin-1 type I in the cells.

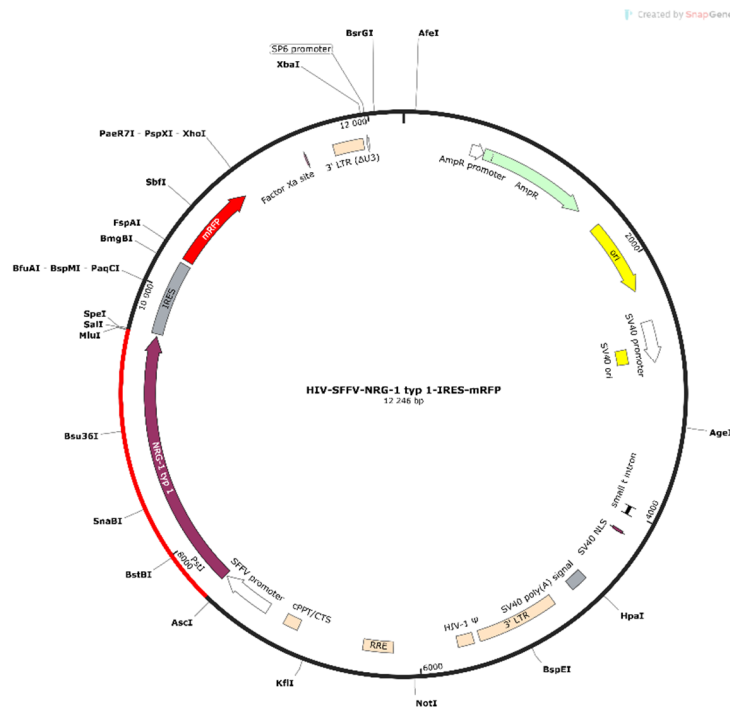
Map of pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry lentiviral vector



Evaluation of mGRPs transduced with the pLenti-GIII-CMV-NRG-1 type I-mCherry vector demonstrated that these cells exhibit varying levels of NRG-1 type I transcript synthesis in subsequent transduction attempts, and their continued culture leads to spontaneous detachment of cells from the surface of the culture vessel and subsequent cell death.

The unfavorable results obtained from transducing mGRPs with the pLenti-GIII-CMV-NRG-1 type I-mCherry vector prompted me to use the HIV-SFFV-NRG-1 type I-IRES-mRFP vector for the next phase of the study. This vector encodes NRG-1 type I sequence and the mRFP fluorescent reporter protein, separated by the IRES (Internal Ribosome Entry Site) sequence. This arrangement allows for the coexpression of both sequences under the transcriptional control of a shared promoter, while their translation occurs independently.

Map of HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP lentiviral vector



In the subsequent stages of the study, I evaluated the phenotype and functional properties of mGRPs transduced with the HIV-SFFV-NRG-1 type I-IRES-mRFP vector *in vitro*. The analysis revealed that transduced mGRPs exhibited varied levels of NRG-1 type I mRNA expression among different transduction attempts. Phenotypic analysis of the cells showed that the population of mGRPs transduced with this vector was composed of fewer glial progenitors but an increased number of oligodendrocyte precursors (OPCs), immature oligodendrocytes, and differentiating cells with an intermediate phenotype between GRPs and OPCs, compared to the control cell population. However, the analysis of axon myelination levels by mGRPs transduced with the HIV-SFFV-NRG-1 type I-IRES-mRFP vector and control mGRPs did not show significant differences in their myelination capacity. The identification of the reporter protein after transductions posed challenges due to the specific nature of the bicistronic vector with the IRES sequence. The population of mGRPs transduced with HIV-SFFV-NRG-1 type I-IRES-mRFP exhibited a low growth rate. Consequently, obtaining a sufficient number of mGRPs with stable overexpression of exogenous NRG-1 type I using the HIV-SFFV-NRG-1 type I-IRES-mRFP vector for further investigations proved to be unattainable.

Due to the deterioration of mGRPs' properties resulting from constitutive overexpression of the exogenous NRG-1 gene copy, in the next stage of the study, I attempted to transduce mGRPs with lentiviral activating particles designed to overexpress the endogenous NRG-1 gene (NRG-1-LAPs). However, simultaneous transduction of mGRPs with the three lentiviral vectors comprising the NRG-

1-LAPs system proved ineffective. Therefore, the attempt to induce endogenous NRG-1 overexpression in mGRPs through transduction with lentiviral activating particles was unsuccessful.

In light of the setbacks associated with genetic modifications aimed at overexpressing NRG-1 in mGRPs, I decided to conduct additional research based on the stimulation of mGRPs with exogenous recombinant mouse neuregulin-1 peptide (rmNRG-1) through its supplementation in the standard culture medium. Supplementation of mGRPs with rmNRG-1 peptide had a diverse impact on the phenotype of the cells *in vitro*. Under conditions that inhibit cell differentiation, I observed the presence of glial progenitors and the absence of mature oligodendrocytes in the culture of rmNRG-1-supplemented mGRPs. Under the same conditions, rmNRG-1 was found to significantly increase the number of proliferating cells (Ki67⁺) in the culture. Conversely, under conditions that promote the differentiation of mGRPs, rmNRG-1 supplementation reduced their level of differentiation towards myelinating oligodendrocytes with an MBP⁺ phenotype. This effect was observed in both the culture of mGRPs alone and their co-culture with neurons. Preliminary measurements of cell migration velocity indicate a potentially lower average migration velocity of rmNRG-1-supplemented mGRPs compared to non-supplemented cells. The results of these preliminary studies suggest that rmNRG-1 supplementation altered the phenotype of mGRPs by increasing their proliferation but impairing their migratory capacity. This effect may depend on both the concentration of the peptide used and the culture conditions. Further studies are currently underway.

Based on the conducted research, the following conclusions can be drawn:

- overexpression of NRG-1 type I, achieved by transducing mGRPs with lentiviral vectors, resulted in a decrease in the growth rate of these cells and promoted their differentiation towards oligodendrocytes; however, I did not observe a significant impact of NRG-1 type I overexpression on the myelination properties of mGRPs
- my preliminary investigations into the stimulation of mGRPs using exogenous recombinant neuregulin-1 peptide indicate an enhanced proliferation rate and reduced migratory capacity of supplemented mGRPs, accompanied by a diminished capability of these cells to differentiate into mature oligodendrocytes
- the findings presented in my doctoral thesis highlight that the influence of neuregulin-1 on the functional properties of mGRPs is contingent upon the experimental setup.