

Mgr Piotr Rogujski

Doktorant, III rok studiów

Zakład Neurobiologii Naprawczej

Opiekun naukowy: prof. dr hab. Barbara Łukomska

Opiekun pomocniczy: dr Luiza Stanaszek

Temat: Próby zwiększania właściwości terapeutycznych glejowo-specyficznych komórek progenitorowych (GRPs) w eksperymentalnych terapiach chorób demielinizacyjnych

Celem moich badań jest ocena zdolności mielinizacyjnych mysich progenitorów glejowych (mGRPs) przeszczepianych w eksperymentalnym modelu demielinizacji u myszy *shiverer* oraz weryfikacja hipotezy, czy długotrwała nad-ekspresja neureguliny-1 (NRG-1) w mGRPs, wywołana poprzez transdukcję komórek przy użyciu wektorów lentiwirusowych, mogłaby zwiększyć ich właściwości funkcjonalne. Przedmiotem badań będą zarówno natywne mGRPs, jak i komórki wykazujące nad-ekspresję NRG-1 (mGRPs-NRG-1). Weryfikacja efektów działania dwóch rodzajów mGRPs będzie stanowić odpowiedź na pytanie o skuteczność zastosowania progenitorów glejowych w modulacji procesów mielinizacyjnych w mózgu i rdzeniu myszy *shiverer*, cechujących się delecją w genie zasadowego białka mieliny (MBP).

Początkowe eksperymenty służyły opracowaniu protokołu izolacji i hodowli mGRPs z tkanki nerwowej płodów myszy. Uzyskane komórki scharakteryzowano metodami immunocytochemicznymi, potwierdzając ich progenitorowy fenotyp, jak również homogenność komórek w hodowli. Odpowiednia liczba komórek została zamrożona na potrzeby dalszych eksperymentów. Ustalono ponadto optymalne warunki współhodowli otrzymanych natiwnych mGRPs i mysich neuronów zwojów korzenia grzbietowego (mDRGs). Uzyskane we współhodowli komórki scharakteryzowano metodami immunocytochemicznymi, potwierdzając obecność neuronów oraz dojrzałych oligodendrocytów o właściwościach mielinizacyjnych. W dalszych badaniach *in vitro* procedury te będą wykorzystane w celu porównania zdolności mielinizacji aksonów przez natywne mGRPs i mGRPs-NRG-1.

Następnie podjęto rozliczne próby wywołania nadekspresji NRG-1 w otrzymanych przez nas mGRPs. W tym celu zaprojektowane zostały wektory lentiwirusowe zawierające sekwencje dwóch wariantów NRG-1 (typ I oraz typ III). Zastosowane wektory posiadały również sekwencję kodującą fluorescencyjne białko reporterowe mCherry umożliwiające nieinwazyjną weryfikację wydajności i skuteczności transdukcji, oraz gen oporności na antybiotyki puromycynę. Transdukcje prowadzono stosując szereg modyfikacji służących podniesieniu wydajności transdukcji, w tym spinokulację, dodatek polybrenu oraz różne czasy inkubacji z wektorem lentiwirusowym (10-48 godzin). Stwierdzono, iż pozytywny wpływ na wydajność transdukcji ma dłuższy czas inkubacji (48 godzin) lub dodatek polybrenu przy 10-godzinnej inkubacji. Niestety, toksyczność polybrenu na mGRPs uniemożliwia jego stosowanie przez czas dłuższy niż 10 godzin, co pozbawia nas możliwości przetestowania potencjalnego, synergistycznego efektu dłuższej inkubacji i chemicznej stymulacji transdukcji. Wydajność transdukcji oszacowana na podstawie ekspresji mCherry wynosiła ok. 30% ogółu komórek, a względny wzrost ekspresji mRNA dla NRG-1 typ 1 i NRG-1 typ 3, określony techniką RT-PCR, był, odpowiednio, ok. 90-krotny i 130-krotny. Jednak wykonanie pasażu i dodatek puromycyny w celu wyselekcjonowania faktycznie pozytywnych kolonii powodował spadek liczby żywych komórek niemal do zera.

Jako alternatywny sposób wywołania nadekspresji NRG-1 w mGRPs przetestowano komercyjny system z lentiwirusowymi cząstkami aktywacyjnymi (ang. *lenticviral activation particles*; LAP) oparty na zmodyfikowanej technologii CRISP-R/Cas9, w celu pobudzenia ekspresji endogennej NRG-1. Selekcja pozytywnych klonów oparta była na uzyskaniu przez komórki jednoczesnej oporności na antybiotyki puromycynę, hygromycynę i blastycydynę. Niestety, wydajność nadekspresji NRG-1 w mGRPs systemem LAP przy trzech niezależnych powtórzeniach okazała się znikoma. Dodatkowy pomiar poziomu białka NRG-1 w mGRPs transdukowanych systemem LAP techniką Western-blot potwierdził brak nad-ekspresji NRG-1.

Reasumując, w dotychczasowych badaniach wykazaliśmy, iż najlepszym źródłem mGRPs są mózg i rdzeń kręgowy płodów myszy. Ponadto opracowaliśmy optymalne warunki hodowli i namnażania mysich progenitorów glejowych, a także metodę współhodowli mGRPs i mDRGs *in vitro*. Dotychczasowe próby wprowadzenia do mGRPs egzogennej kopii NRG-1 oraz stymulacja ekspresji endogennej NRG-1 okazały się jednak niewystarczająco skuteczne. W dalszych badaniach podjęte zostaną zatem próby wielokrotnej transdukcji mGRPs wektorem lentiwirusowym kodującym NRG-1, dodatek inhibitora kinazy Rho (ang. *rho-associated protein kinase inhibitor*, ROCK) podczas transdukcji oraz zbadana zostanie możliwość dostarczenia do mGRPs rekombinowanego białka NRG-1.