

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Zakład Neurobiologii Naprawczej

Promotor pracy:

Dr hab. Leonora Bużańska, prof. IMDiK

Marzena Zychowicz

Streszczenie rozprawy doktorskiej pt. :

Kontrola decyzji rozwojowych neuralnych komórek macierzystych pochodzących z krwi pępowinowej (HUCB-NSC): zastosowanie powierzchni biofunkcjonalnych

Komórki macierzyste dzięki swym zdolnościom do samoodnawiania się i jednocześnie tworzenia wielu typów komórek zróżnicowanych stanowią dogodny materiał do aplikacji w medycynie regeneracyjnej. Neuralne komórki macierzyste, rezydujące w OUN znajdują się w specyficznym mikrośrodkowisku stymulującym i regulującym neurogenezę, zwanym niszą. Zawiera ona komponenty macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), rozpuszczalne cząsteczki sygnałowe, takie jak czynniki wzrostu, neuroprzekaźniki, hormony, receptory umiejscowione na sąsiadujących komórkach. Dodatkowo trójwymiarowa architektura samej niszy determinuje dostępność i gradient składników rozpuszczalnych, jak również sposób oddziaływania komórek macierzystych z czynnikami strukturalnymi. Dojrzwaniu NSC w niszach neurogennych towarzyszą takie procesy rozwojowe, jak proliferacja, migracja i różnicowanie, które są precyzyjnie regulowane przez cały kontekst dynamicznych oddziaływań NSC z otaczającym mikrośrodkowiskiem.

Badanie neuralnych komórek macierzystych z zastosowaniem najnowszych osiągnięć z zakresu nanotechnologii i bioinżynierii stanowi nowy rozdział w dziedzinie zajmującej się komórkami macierzystymi. Hodowla komórek macierzystych na dwuwymiarowych systemach biomateriałowych jest dobrym, uproszczonym modelem służącym do identyfikacji i oceny działania składników niszy, które mogą wpływać na ich procesy rozwojowe, umożliwiając badanie mechanizmów molekularnych leżących u podstaw oddziaływania komórek macierzystych z niszą komórkową. Miniaturyzacja platform zawierających powierzchnie biofunkcjonalne umożliwia równoległą analizę wielu parametrów jednocześnie, co może mieć szerokie zastosowanie w badaniach podstawowych oraz testów biomedycznych i toksykologicznych.

Celem przedstawionej rozprawy było zbadanie wpływu określonych warunków mikrośrodowiska *in vitro* na podejmowanie decyzji rozwojowych przez komórki macierzyste izolowane z ludzkiej krwi pępowinowej. Wymagało to skonstruowania miniaturowych systemów badawczych (mikroplatform) zawierających modyfikowalną powierzchnię bioaktywną ze zmiennym wzorem domen umożliwiającą przeprowadzenie badań kluczowych procesów rozwojowych neuralnych komórek macierzystych, takich jak adhezja, proliferacja i różnicowanie. Konstrukcję domen biofunkcyjnych przeprowadzono przy zastosowaniu dwóch technik mikroinżynierijnych: drukowania mikrokontaktowego oraz dozowania mikrokropli. Pierwsza daje możliwość manipulacji architekturą (kształtem, rozdzielczością, wielkością) domen, ale ograniczająca skład domen do jednego typu biomolekuły, druga umożliwia tworzenie domen wieloskładnikowych i miniplatform hodowlanych zawierających domeny o różnym składzie. Otrzymane domeny biofunkcyjne scharakteryzowano pod kątem obecności i funkcjonalności stosowanych molekuł posługując się technikami takimi, jak elipsometria i powierzchniowy rezonans plazmonowy (SPR).

Zbadano wpływ powierzchni biofunkcyjnych na kluczowe procesy rozwojowe komórek HUCB-NSC hodowanych na domenach mikrodrukowanych o różnej architekturze, analizując adhezję po jednym i siedmiu dniach hodowli, proliferację w różnych układach gęstości komórek i czasu trwania hodowli oraz różnicowanie w kierunku neuronalnym lub glejowym. Matryce mikrodrukowane posłużyły do porównania wpływu architektury domen biofunkcyjnych na odpowiedź komórkową w zależności od typu oddziaływania komórek z powierzchnią: specyficznego (receptorowego, na fibronektynie) i niespecyficznego (elektrostatycznego, na poli-L-lizynie). Weryfikację wyżej wymienionych procesów oparto na analizie mikroskopowej oraz immunodetekcji przeciwciał specyficznych dla komórek proliferujących (Ki-67) a także białek charakterystycznych dla różnicowania neuronalnego (β -tubuliny III, MAP-2) oraz astrocytarnego (GFAP, S100 β). Domeny mikronakraplane wieloskładnikowe posłużyły do stymulacji określonych dróg przekazywania sygnału w komórkach macierzystych przez małe cząsteczki sygnałowe, takie jak CNTF, Jagged, Wnt-3a, BMP-4, Shh, Dkk-1, Notch, które były immobilizowane do podłoża razem z białkiem macierzy zewnątrzkomórkowej. Decyzje rozwojowe NSC (samoodnowa versus różnicowanie w kierunku neuronalnym i glejowym) identyfikowano immunocytochemicznie za pomocą specyficznych przeciwciał.

Wykazano, iż geometria oraz wielkość domen, a także ich skład wpływają na decyzje rozwojowe podejmowane przez komórki linii HUCB-NSC. Stwierdzono również, że sposób oddziaływań komórek HUCB-NSC z substratem powierzchni, niespecyficzne, elektrostatyczne na PLL versus specyficzne, receptorowe na fibronektynie determinuje ich fenotyp oraz zdolności migracyjne. Komórki hodowane w obecności poli-L-lizyny charakteryzowały się

niezróżnicowaną morfologią, pozostawały okrągłe, słabo przytwierdzone do podłoża, z dużą zdolnością do migracji. HUCB-NSC rosnące na fibronectynie wykazywały większe zróżnicowanie morfologiczne, silną adhezję do podłoża (rozpłaszczenie) oraz nie wykazywały zdolności do migracji pomiędzy domenami mikrodrukowanymi. Powyższe właściwości wpływają również na analizowane procesy rozwojowe komórek. Adhezja HUCB-NSC zarówno po jednym jak i po siedmiu dniach hodowli jest istotnie zwiększona na domenach mikrodrukowanych poli-L-lizyną w porównaniu do domen zawierających fibronectynę. Zastosowanie pożywki bezsurowiczej dodatkowo potęgowało ten efekt. Obserwowano również zwiększoną proliferację HUCB-NSC na powierzchniach mikrodrukowanych PLL w porównaniu do fibronectyny. Stosując opisaną technikę mikrodomen wykazano w tej pracy, że neuralne komórki macierzyste mogą być immobilizowane do powierzchni PLL i hodowane przez dłuższy czas utrzymując jednocześnie swój niezróżnicowany fenotyp.

Otrzymane wyniki wskazują, że kształt i wielkość domen biofunkcjonalnych ma duże znaczenie w determinacji losu HUCB-NSC: domeny pozycjonujące komórki pojedyncze (tzw. znaczkę) utrzymują charakter niezróżnicowany komórek. Zastosowane mikrodrukowane linie o szerokości 10µm promują wydłużanie komórek oraz osiągnięcie fenotypu neuronalnego, a domeny wielokomórkowe mikrodrukowane fibronectyną sprzyjają różnicowaniu neuronalnemu, (obecność β -tubuliny III oraz MAP-2) i ukierunkowaniu wypustek wewnątrz linii łączących domeny. Stwierdziłam również, że adhezja HUCB-NSC do domen mikronakraplanych białkami macierzy zewnątrzkomórkowej zależy od rodzaju i stężenia białka, a fibronectyna zapewnia optymalną adhezję i dlatego stanowi białko referencyjne w badaniu różnicowania HUCB-NSC na domenach wieloskładnikowych. Domeny wieloskładnikowe zawierające białka sygnałowe w sposób specyficzny wpływają na decyzje rozwojowe komórek HUCB-NSC. Białka sygnałowe CNTF, Jagged i Notch stymulują HUCB-NSC do różnicowania w kierunku astrocytarnym; Shh, Dkk-1 i BMP-4 wpływają pozytywnie na różnicowanie neuronalne, a Wnt-3a sprzyja samoodnowie HUCB-NSC i utrzymuje HUCB-NSC w stanie niezróżnicowanym.

Przedstawione w dysertacji wyniki wykazały, że modelowanie zawartości i architektury powierzchni biofunkcjonalnych *in vitro* umożliwia kontrolę decyzji rozwojowych neuralnych komórek macierzystych pochodzących z krwi pępowinowej. Zmienna architektura i skład domen biofunkcjonalnych może być elementem kontroli decyzji rozwojowych komórek macierzystych w hodowli *in vitro*. Domeny biofunkcjonalne wieloskładnikowe umożliwiają badanie mechanizmów

molekularnych leżących u podstaw podejmowania decyzji rozwojowych przez komórki macierzyste, a zawarte w wieloskładnikowych domenach mikronakraplanych białka sygnałowe, takie jak CNTF, Jagged, Wnt-3a, BMP4, Shh, Dkk-1 i Notch wywierają istotny wpływ na wybór drogi rozwojowej przez HUCB-NSC.

ABSTRACT

Neural stem cell fate decisions are dependent upon signals coming from microenvironment composed of extracellular matrix proteins, soluble factors and specificity of cell-cell contacts. Studying *in vitro* mutual interactions of the stem cells with the components of their microenvironment mimicking *in vivo* conditions is crucial for the further tissue engineering and regenerative medicine applications. We have developed *in vitro* system to control fate commitment and investigate the activation of intracellular pathways in neural stem cells derived from human umbilical cord blood (HUCB-NSC). Bioactive domains obtained by nano/micro emerging technologies, such as microcontact printing or piezoelectric spotting, were designed to reflect the stem cell niche composition and to influence their fate decisions. Different geometry of biofunctionalized surfaces, obtained by microcontact printing of poly-L-lysine or fibronectin, was created to study the adhesion, migration, proliferation as well as the differentiation of human cord blood-derived neural stem cells. Multicomponent biofunctionalized surface with array of domains containing selected biomolecules: fibronectin enriched with small signaling molecules (CNTF, Jagged, Bmp-4, Wnt 3a, Shh, Dkk1 and Notch) was obtained by piezoelectric non contact spotting. This system with “smart” domains was designed to activate particular molecular pathways leading to the maintenance of the self renewal of non-differentiated cells or to promote their differentiation into different neural lineages. The presence of the spotted proteins and their functionality were tested by ellipsometry and surface plasmon resonance (SPR) measurement. Ellipsometry was used to assess the amount and the distribution of the protein within the spots while SPR estimated accessibility of the receptor binding sites and protein reactivity on the fabricated domains. The bioactive domains have been shown to bind antibodies against signaling molecules and RGD sequence typical for particular small proteins and fibronectin, respectively.

The results show that adhesion of HUCB-NSC to the domains after one and seven days of culture is increased on poly-L-lysine microprinted domains comparing to fibronectin, such effect is intensified in serum free culture. The similar tendency is observed concerning proliferation. This effect can be due to different content of biomolecules in tested domains, that govern unspecific (electrostatic) on poly-L-lysine or specific (receptor-mediated) on fibronectin cell adhesion. It has

been also shown that the geometry of the domain has the important impact on the investigated differentiation of HUCB-NSC. The applied microprinted thin lines (10 μ m) promote neuronal phenotype of HUCB-NSC along the pattern and, in addition to that, the interconnecting lines between multicellular domains govern growth of neuronal protrusions. It has been also shown that type of interactions on the cell membrane/bioactive domain interface were crucial to keep the cells either in neurally committed or non-differentiated stage by fibronectin or poly-L-lysine pattern respectively. Additionally single cell versus multicellular positioning of cells further promoted non-differentiated stage of HUCB-NSC. Immunocytochemical analysis of HUCB-NSC for neuronal (β -tubulin III) or astroglia (GFAP) markers revealed that implemented signaling molecules can direct cells into astrocytic (CNTF, Jagged, Notch) and neuronal (Dkk-1, Shh) fate or allowed their surface immobilization in non-differentiate stage (Wnt-3a). This type of bioengineered cell growth platforms reflecting natural stem cell niche microenvironment can be used for screening the mechanisms governing neural stem cell fate decisions and adverse reactions upon environmental stimuli.