

Ćwiczenie 05

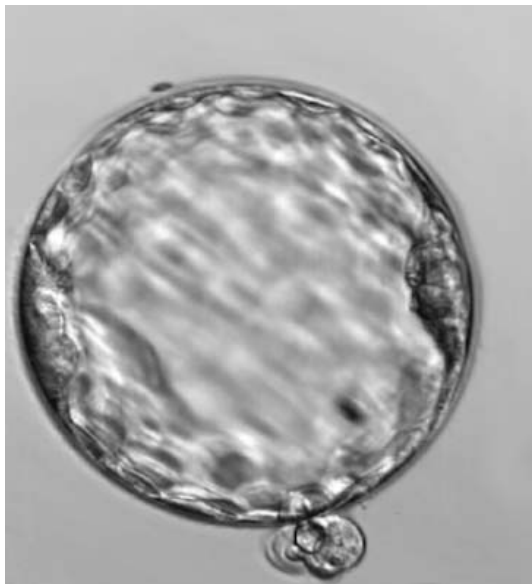
Komórki macierzyste i ich pochodzenie. Wykorzystanie komórek macierzystych. Genetyczne aspekty wykorzystania komórek macierzystych.

Kornelia Polok

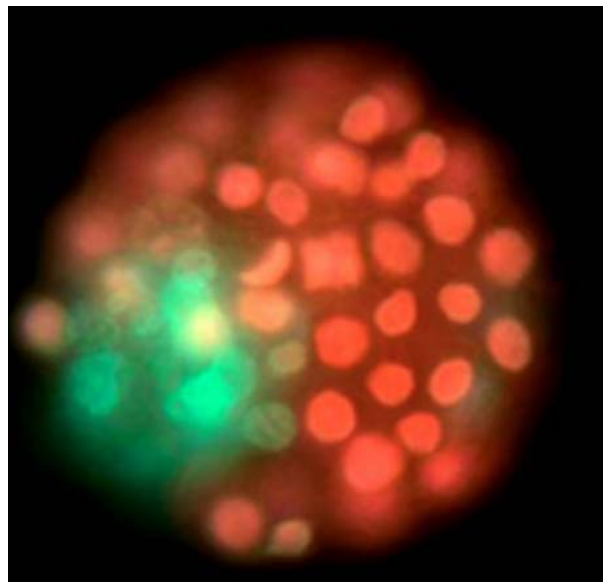
1. Komórki macierzyste i ich pochodzenie

1.1. Komórki macierzyste

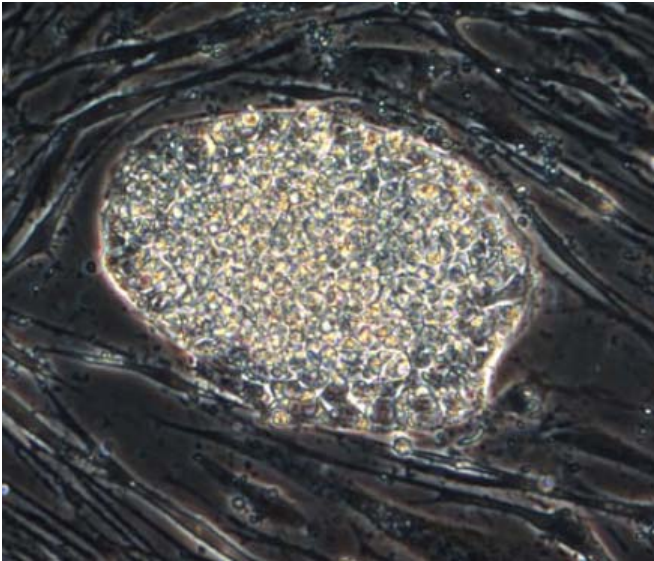
➔ Komórki macierzyste to komórki niezróżnicowane, które mogą przekształcić się w różne typy komórek oraz dzielić się w sposób nieograniczony dając początek kolejnym komórkom macierzystym. Komórki macierzyste występują w embrionach (HeSC: Human embryonic Stem Cells) oraz u osobników dorosłych. U osobników dorosłych komórki macierzyste zlokalizowane są w niszach jak szpik kostny, krypty jelitowe i inne.



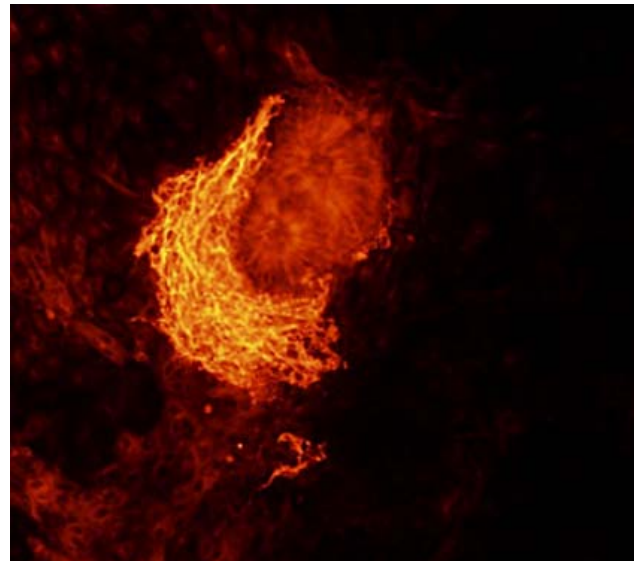
Rys. 1. Pięciodniowy embrion ludzki (blastocysta). Linia UM4-6, pierwsza linia embrionalnych komórek macierzystych pochodzi z takiej blastocysty. Stworzona przez Consortium for Stem Cell Therapies w Michigan.



Rys. 2. Ludzka blastocysta. Obszar zielony to grupa komórek przy ścianie wewnętrznej, która stanowi materiał wyjściowy do otrzymywania embrionalnych komórek macierzystych.



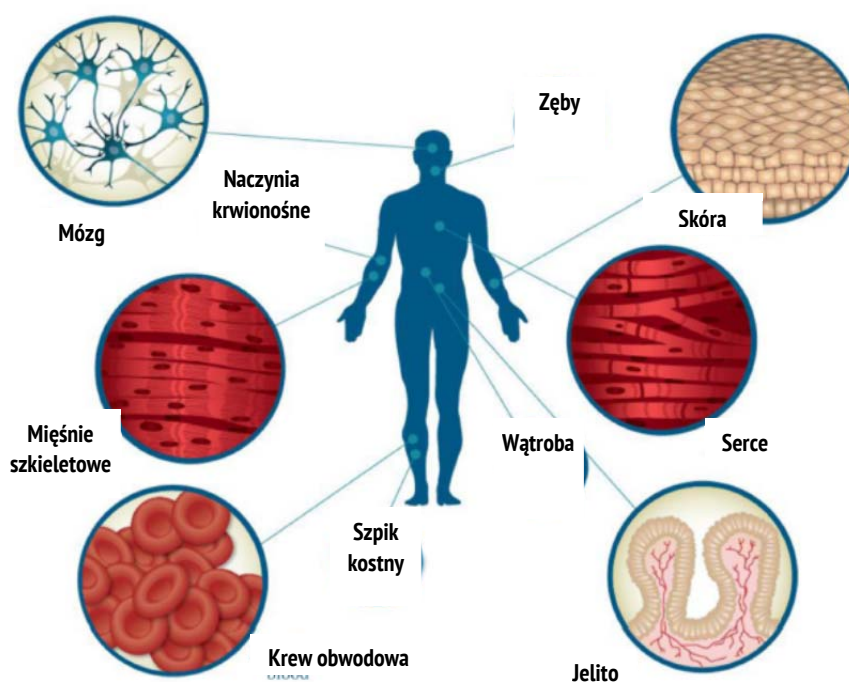
Rys. 3. Grupa ludzkich embrjonalnych komórek macierzystych, które tworzą kolonię.



Rys. 4. Ludzkie embrjonalne komórki macierzyste różnicujące się w kierunku neuronów.

1.2. Pochodzenie komórek macierzystych

- ➔ ● Komórki embrjonalne: pochodzą z blastocysty.
- Komórki macierzyste somatyczne (dorosłe): pochodzą z tkanek dojrzałych organów, są to komórki pochodzenia endodermalnego (komórki nabłonka płuc, jelit, trzustki, hepatocyty), mezodermalnego (np. szpik kostny, somatyczne komórki płodu), ektodermalnego (nerwowe, nabłonkowe).
- Nowotworowe komórki macierzyste: zostały zidentyfikowane w przypadku prawie wszystkich nowotworów
- Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste: komórki sztucznie otrzymane z nie-pluripotencjalnych komórek somatycznych poprzez indukcję ekspresji specyficznych genów.



Rys. 5. Lokalizacja komórek macierzystych somatycznych w ciele człowieka.

2. Wykorzystanie komórek macierzystych

2.1. Medycyna regeneracyjna

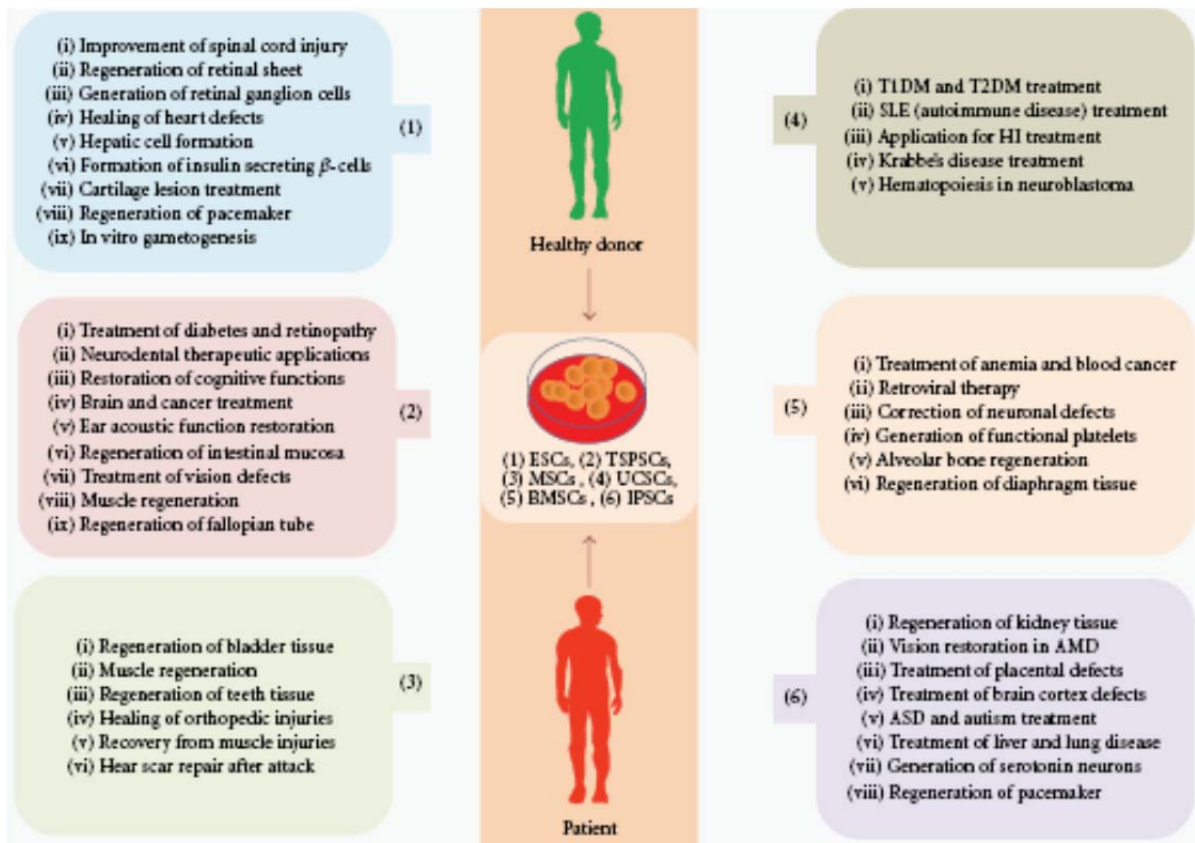
➔ Medycyna regeneracyjna zajmuje się procesem gojenia i regeneracji tkanek wraz z mechanizmami wszczepiania tkanek, gdy organizm nie jest w stanie się wyleczyć. Komórki macierzyste pochodzące od pacjenta eliminują problem odrzucenia przeszczepu pod warunkiem, że możliwa jest regeneracja organów z komórek macierzystych. Najczęściej wykorzystuje się mesenchymalne komórki macierzyste.

2.2. Możliwości wykorzystania komórek macierzystych

➔ Do najczęściej wykorzystywanych komórek macierzystych należą komórki szpiku kostnego wykorzystywane w leczeniu białaczki oraz innych chorób krwi. Do bezpiecznych terapii zalicza się także wykorzystanie komórek macierzystych w regeneracji skóry po uszkodzeniach. Wszystkie inne terapie uznawane są za eksperymentalne. Przykłady obiecujących wyników obejmują:

- wykorzystanie hepatocytów otrzymanych z komórek macierzystych do naprawy uszkodzeń wątroby;
- neurony otrzymane z embrionalnych komórek macierzystych integrują się z neuronami mózgu i mogą być wykorzystane do naprawy uszkodzeń wywołanych udarem;

Komórki macierzyste są powszechnie wykorzystywane w badaniach podstawowych oraz badaniach oraz w badaniach nad lekami.



2.3. Regulacje prawne, w tym badania kliniczne



Wszystkie badania kliniczne, w tym dotyczące terapii z wykorzystaniem komórek macierzystych są rejestrowane w Europejskim Rejestrze Badań Klinicznych (EU Register of Clinical Trials) dostępnym na stronie: <https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/search> Korzystając z danych zawartych w rejestrze proszę odpowiedzieć na poniższe pytania.

- A. Ile badań klinicznych jest zarejestrowanych w bazie, jaki procent dotyczy badań nad komórkami macierzystymi. **(1 punkt)**
- B. Ile badań klinicznych dotyczących komórek macierzystych jest zgłoszonych przez Warszawski Uniwersytet Medyczny (Medical University of Warsaw i jakich chorób dotyczą one? **(1 punkt)**
- C. Ile badań klinicznych dotyczy leczenia zaburzeń genetycznych (genetic disorders) komórkami macierzystymi? Jaki procent badań dotyczy anemii (anaemia)? **(1 punkt)**

Czas wykonania: 15 minut

3. Genetyczne aspekty pluripotencji komórek macierzystych

3.1. Geny pluripotencji

3.1.1. W trakcie rozwoju embrionalnego komórki się różnicują i po pewnym czasie nieodwracalnie tracą zdolność przekształcania się w komórki dowolnego typu czyli pluripotencję. Zmiany te mają charakter genetyczny co oznacza, że kontrolowane są przez określone geny, jak również epigenetyczny obejmujący modyfikację DNA oraz histonów w wyniku metylacji. Regiony DNA zawierające geny podlegające silnej ekspresji nie są zmetylowane.

3.1.2. Indukcja pluripotencji w przypadku zróżnicowanych komórek wymaga represji genów, które ulegają ekspresji w komórkach somatycznych i aktywacji genów odpowiedzialnych za samoodnawianie. Geny, które odgrywają istotną rolę w regulacji samoodnawiania komórek oraz ich różnicowaniu zarówno w procesie embriogenezy jak i w przypadku komórek macierzystych to:

- A. *Oct4 (Pou5f1)*
- B. *Sox2*
- C. *Klf4*
- D. *Myc* (Yamanaka factor)
- E. *Nanog*

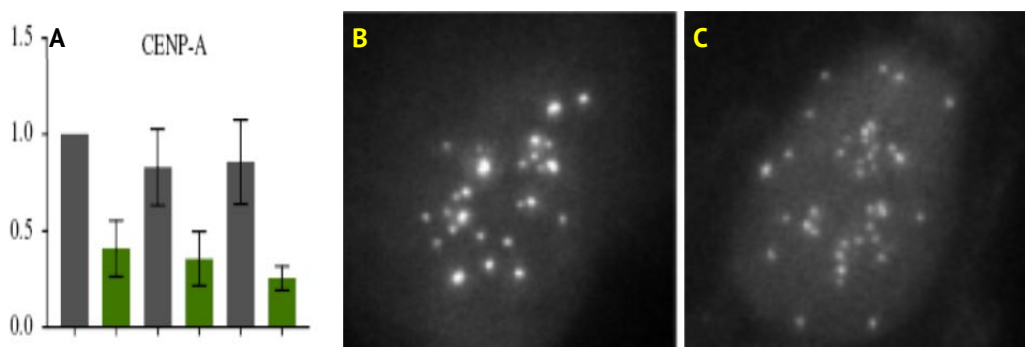
Na podstawie informacji zawartej w OMIM oraz innych źródłach internetowych proszę podać podstawowe informacje o powyższych genach. **(2 punkty/gen)**

- Lokalizację.
- Strukturę genu lub kodowanego białka.
- Główną funkcję.

Czas wykonania: 15 minut

3.2. Genetyczna niestabilność komórek macierzystych

- 3.2.1. Regulacja mitozy w komórkach macierzystych nie jest dobrze poznana. Przeprogramowanie komórki związane jest z przemodelowaniem chromatyny, demetylacją DNA, a także uruchomieniem wzmacniaczy transkrypcji. Szczególną rolę pełnią potranslacyjne modyfikacje histonu H3 polegające na metylacji lizyny w pozycji 4 (H3K4me2 oraz H3K4me3). Metylacja ta jest częsta w okolicy promotorów genów podlegających silnej ekspresji. Występowanie zmetylowanych histonów utrudnia przejście do pluripotencji.
- 3.2.2. W kulturach embrionalnych (hESC) i indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC) człowieka często obserwuje się aberracje chromosomowe. Dane z kilkuset linii komórkowych wskazują na występowanie aberracji typu aneuploidii nawet w 34% linii. Aberracje chromosomowe towarzyszą innym zaburzeniom i utrudniają różnicowanie komórek. Uważa się, że przyczyną zaburzeń jest bardzo skrócona faza G1 oraz szybka proliferacja tych komórek.
- 3.2.3. Centromer w komórkach macierzystych jest słabiej wykształcony, ma mniejsze rozmiary niż w komórkach somatycznych. Istotną rolę w utrzymaniu funkcji centromeru odgrywa wariant histonu **H3 typu CENP-A**, który w komórkach somatycznych jest stabilnie powiązany z DNA podczas całego cyklu życiowego komórki. Połączenie CENP-A z DNA i utworzenie centromeru jest regulowane przez białko chaperonowe (opiekuńcze) HJURP. W fazie S nukleosomy z CENP-A są rozdzielane do chromatyd siostrzanych. Ponowne składanie centromeru odbywa się w fazie G1. Stabilizacja CENP-A jest efektem inaktywacji kinaz cyklino-zależnych w fazie G1. W komórkach macierzystych zredukowane rozmiary regionu centromerowego związane są z redukcją liczby nukleosomów CENP-A o 60% w embrionalnych komórkach macierzystych (hESC) w stosunku do kontroli czyli somatycznych komórek warstwy barwnikowej siatkówki (RPE). W indukowanych komórkach pluripotencjalnych redukcja wynosi 75% stosunku do kontroli (RPE) oraz 58% w stosunku do donorowych fibroblastów.



Rys. 6. Porównanie liczby nukleosomów CENP-A w embrionalnych komórkach macierzystych (hESC) z liczbą CENP-A w kontroli – komórkach warstwy barwnikowej siatkówki (RPE). A. Liczba CENP-A w trzech seriach doświadczeń, dwukrotny spadek w hESC (zielone słupki). B. Barwienie fluorescencyjne CENP-A w kontroli (RPE) oraz C. w hESC. Intensywność immunofluorescencji niższa w hESC.

- 3.2.4. Wariant histonu CENP-A współdziała z białkami **CENP-C** i **CENP-T**, które łączą centromer z mikrotubulami i kinetochorem w trakcie mitozy. Białka CENP-C i CENP-T są odpowiedzialne za interakcję między centromerem a kinetochorem w trakcie mitozy. Poziom obu białek jest znacznie niższy w komórkach macierzystych. Skutkuje to zmniejszeniem rozmiarów kinetochoru.
- 3.2.5. Redukcja rozmiarów centromeru i kinetochoru wynika prawdopodobnie wynika ze skrócenia fazy G1 w komórkach macierzystych. Poziom ekspresji genów kodujących CENP-A, CENP-C i CENP-T w komórkach macierzystych jest porównywalny z poziomem ekspresji w kontroli (RPE).

Odpowiedzi

2. Wykorzystanie komórek macierzystych

2.3. Regulacje prawne, w tym badania kliniczne

Wszystkie badania kliniczne, w tym dotyczące terapii z wykorzystaniem komórek macierzystych są rejestrowane w Europejskim Rejestrze Badań Klinicznych (EU Register of Clinical Trials) dostępnym na stronie: <https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/search> Korzystając z danych zawartych w rejestrze proszę odpowiedzieć na poniższe pytania wykorzystując odpowiednie hasło do przeszukiwania rejestru.

- A. Ile badań klinicznych jest zarejestrowanych w bazie, jaki procent dotyczy badań nad komórkami macierzystymi. **(1 punkt)**
- ▶ **38 454** badań klinicznych jest zarejestrowane (2020.11.24.).
 - ▶ **665** badania dotyczą komórek macierzystych, co stanowi 1,73%.
- B. Ile badań klinicznych dotyczących komórek macierzystych jest zgłoszonych przez Warszawski Uniwersytet Medyczny (Medical University of Warsaw i jakich chorób dotyczą one? **(1 punkt)**
- ▶ **3** badania kliniczne.
 - ▶ Cukrzyca i związana z nią trudność gojenia się ran (stopa cukrzycowa).
 - ▶ Syndrom wiotkiej skóry (*cutis laxa*).
 - ▶ Pęcherzowe oddzielenie się naskórka.
- C. Ile badań klinicznych dotyczy leczenia zaburzeń genetycznych (genetic disorders) komórkami macierzystymi? Jaki procent badań dotyczy anemii (anaemia)? **(1 punkt)**
- ▶ 36 badań.
 - ▶ 7 badań co stanowi 19,4%

3. Genetyczne aspekty pluripotencji komórek macierzystych

3.1. Geny pluripotencji

3.1.2. Geny, które odgrywają istotną rolę w regulacji samoodnawiania komórek oraz ich różnicowaniu zarówno w procesie embriogenezy jak i w przypadku komórek macierzystych to:

A. *Pou5f1(Oct4)*

- ▶ **Lokalizacja:** 6p21.33
- ▶ **Struktura:** 7 kbp, 5 egzonów
- ▶ **Funkcja:** Czynn timeranskrypcyjny zawierający homeodomenę POU. Alternatywny slicing prowadzi do powstania wielu izoform. Gen występuje u wszystkich kręgowców. Niezbędny do utrzymania samoodnawiania niezróżnicowanych embrionalnych komórek macierzystych. Białko zawiera motyw będący oktamerem DNA, AGTCAAAT, który łączy się z odpowiednią sekwencją genu. Gen także wpływa na proliferację komórek nowotworowych, głównie w nowotworach

trzustki, płuc i wątroby. Ulega ekspresji w oocytach, która utrzymuje się przez cały okres poprzedzający implantację zarodka.

B. *Sox2*

- ▶ **Lokalizacja:** 3q26.33
- ▶ **Struktura:** jeden egzon, który jest zlokalizowany w intronie genu *SOX2OT*.
- ▶ **Funkcja:** czynnik transkrypcyjny należący do rodziny Sox. U ssaków jest on niezbędny do prawidłowego rozwoju układu nerwowego i oddechowego. Delecje w genie prowadzą do zaburzeń w obrębie centralnego układu nerwowego oraz mikroftalmii (małoccze). Gen niezbędny do indukcji pluripotencji w komórkach macierzystych. W nowotworowych komórkach macierzystych *Sox2* podlega nadekspresji.

C. *Klf4*

- ▶ **Lokalizacja:** 9q31.2
- ▶ **Struktura:** gen kodujący białko o długości 513 aa, 91% podobieństwa do genu myszy, 3.5 kbp (heterogenny RNA)
- ▶ **Funkcja:** czynnik transkrypcyjny typu palców cynkowych, Reguluje proliferację, różnicowanie, apoptozę i przeprogramowanie komórek somatycznych. Pełni także funkcję supresora nowotworzenia w niektórych typach nowotworów.

D. *Myc* (Yamanaka factor)

- ▶ **Lokalizacja:** 8q24.21
- ▶ **Struktura:** Długość: 3,2 kbp. Alternatywny splicing prowadzi do powstania 10 izoform. Białko kodowane przez *Myc* ma 439 aa, 13 domen typu palec cynkowy i domenę poxvirusową.
- ▶ **Funkcja:** czynnik transkrypcyjny należący do rodziny *Myc* z motywem bHLH (helisa-pętla-helisa) oraz motywem zamka leucynowego. Zawiera miejsce IRES (internal ribosome entry site), które umożliwia translację mRNA w sytuacji inhibicji translacji zależnej od 5'cap, np. podczas infekcji wirusowej. Kontroluje on istotne funkcje komórkowe, w tym wzrost komórek, cykl życiowy komórek i replikację DNA. Szacuje się, że 15% genów u człowieka jest kontrolowane przez czynnik *Myc*. Białko MYC aktywuje ekspresję genów jako element heteromeru z białkami MAX. Białko MYC indukuje ekspresję katalitycznej podjednostki telomerazy (wyspecjalizowanej odwrotnej transkryptazy), która jest niezbędna do utrzymania prawidłowej długości telomerów

E. *Nanog*

- ▶ **Lokalizacja:** 12p13.31
- ▶ **Struktura:** Długość: 7 kbp, 4 egzony i 3 introny. Region promotorowy zawiera wyspy CpG, SOX2 motyw, TATA box. Białko 305 aa, zawiera 3 funkcjonalne domeny, N-terminalną, C-terminalną oraz homeodomenę. Alternatywny splicing prowadzi do powstania czterech izoform.
- ▶ **Funkcja:** czynnik transkrypcyjny niezbędny do utrzymania pluripotencji. Blokuje różnicowanie komórek. Ulega silnej ekspresji w niezróżnicowanych komórkach embrionalnych, nowotworowych komórkach macierzystych. U osobników dorosłych najsilniejsza ekspresja jest w spermatogoniach i jądrach.