

**NEURALNE KOMÓRKI MACIERZYSTE  
Z LUDZKIEJ KRWI PĘPOWINOWEJ –  
CHARAKTERYSTYKA IMMUNOCYTOCHEMICZNA,  
FIZJOLOGICZNA I MOLEKULARNA\***

NEURAL STEM CELLS FROM HUMAN CORD BLOOD –  
IMMUNOCYTOCHEMICAL, PHYSIOLOGICAL  
AND MOLECULAR ANALYSIS

Leonora BUŻAŃSKA

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im M. Mossakowskiego PAN,  
Warszawa

*Streszczenie:* Populację komórek macierzystych/progenitorów, mających zdolność do różnicowania się w komórki o charakterze neuronów, astrocytów i oligodendrocytów wyizolowano z frakcji mononuklearnej ludzkiej krwi pępowinowej, pozbawionej komórek hematopoetycznych (CD 34<sup>+</sup>, CD 45<sup>-</sup>). Ekspansja tej populacji, poprzez wielokrotne pasażowanie komórek nieprzylegających w obecności EGF, umożliwiła otrzymanie stabilnej, klonogennej linii neuralnych komórek macierzystych z ludzkiej krwi pępowinowej (HUCB-NSC), bez uprzedniej immortalizacji. Opracowano metody pozwalające na utrzymanie w hodowli linii HUCB-NSC na różnych etapach zaawansowania rozwojowego. Ustalono warunki *in vitro* standaryzowanej hodowli dla HUCB-NSC, w których możemy kierować decyzjami rozwojowymi komórek przy pomocy czynników wzrostowych, mitogenów lub neuromorfogenów. Analiza molekularna (mikromacierze DNA) i immunocytochemiczna komórek niezróżnicowanych HUCB-NSC wskazuje na aktywację szlaków komórkowych WNT, DELTA/NOTCH oraz FGFR1. W obecności dBcAMP HUCB-NSC różnicują się głównie w kierunku neuronalnym (do 80%). W komórkach zróżnicowanych wykazano ekspresję zarówno mRNA, jak i białek receptorowych (dopaminergicznych, gabaergicznych, glutamatergicznych, serotonergicznych i cholinergicznych) oraz związanych z przekaźnictwem synaptycznym. Badania elektrofizjologiczne wykazały obecność w komórkach HUCB-NSC typowych dla neuronów prądów potencjało-zależnych i receptorowych. Udowodniono, że HUCB-NSC jest linią neuralnych komórek macierzystych, zdolną do różnicowania w komórki typowe dla OUN. Jest to pierwsze doniesienie dotyczące otrzymania i różnicowania funkcjonalnego w kierunku neuronalnym, nieimmortalizowanej, somatycznej linii komórek macierzystych.

\*Praca finansowana przez granty: KBN 6P05A 049 20, K053/P05/2003.

*Słowa kluczowe:* neuralne komórki macierzyste, ludzka krew pępowinowa, różnicowanie neuronalne, mikromacierze DNA, elektrofizjologia.

*Summary:* The population of stem/progenitor cells was selected from human cord blood non-hematopoietic (CD<sup>34</sup> and CD<sup>45</sup> negative) mononuclear fraction and was shown to attain neural features. Due to repeated expansion and selection of these cells in the presence of EGF we have established the first clonogenic, non-immortalized human umbilical cord blood neural stem cell like line (HUCB-NSC). This line can be maintained in culture at different developmental stages and their fate decisions can be experimentally manipulated *in vitro* by the presence of trophic factors, mitogenes and neuromorphogenes. Standardized conditions for their growth and differentiation have been established. The activation of the WNT, DELTA/NOTCH and FGFR1 signaling pathways in HUCB-NSC was shown by molecular and immunocytochemical analysis. Differentiation in the presence of dBcAMP directed HUCB-NSC predominantly (80%) into neuronal lineage, as revealed by DNA microarray and immunocytochemistry. This included expression of several functional proteins: glutamatergic, GABA-ergic, dopamine, serotonin and acetylcholine receptors or synaptic vesicle proteins. That was further confirmed by electrophysiological studies showing in differentiated HUCB-NSC two types of voltage-sensitive and several ligand gated currents typical for neuronal cells. Obtained results confirm the stem character and neural commitment of HUCB-NSC cell line. This is the first report of establishment and functional neuronal differentiation of nonimmortalized somatic stem cell line.

*Key words:* neural stem cells, human cord blood, neuronal differentiation, DNA microarray, electrophysiology.

## WSTĘP

Komórki macierzyste (*Stem Cells*, SC) mają zdolność do samoodnowy przez ciągłe podziały (odpowiednikiem funkcjonalnym jest klonogenność) oraz do różnicowania się w dojrzałe komórki tkanek i narządów. Na określonych etapach rozwoju osobniczego SC wykazują różny stopień ograniczenia potencjału do dalszego różnicowania, począwszy od komórki totipotencjalnej, która może różnicować się we wszystkie pozostałe komórki organizmu (jedynie zapłodniona komórka jajowa i pierwsze komórki potomne), poprzez pluri-, multi- oraz unipotencjalne.

Zarodkowe komórki macierzyste (*Embryonic Stem Cells*, ESC) mogą namnażać się w hodowli *in vitro* logarytmicznie, w czasie nieograniczonym, zachowując jednocześnie swoją pluripotentność, to jest zdolność do różnicowania się we wszystkie (poza płciowymi) komórki organizmu [1]. Dzięki temu można otrzymać w krótkim czasie dużą ilość komórek do zastosowania w terapii transplantacyjnej. Jednakże linie komórkowe wyprowadzane z ESC wykazują cechy niestabilności genetycznej i epigenetycznej [2], co może być powodem ich skłonności do tworzenia guzów w organizmach otrzymujących przeszczep komórkowy.

Te problemy natury biologicznej, a także zastrzeżenia natury etyczno-moralnej związane ze sposobem otrzymywania ESC skłoniły wielu badaczy do poszukiwania alternatywnych źródeł komórek macierzystych z jednej strony bezpiecznych onkologicznie, z drugiej strony podobnie jak ESC wykazujących zdolność do ekspansji *in vitro*. Specyficzne tkankowo, somatyczne komórki macierzyste (*Somatic Stem Cells*, SSC) są drugim źródłem komórek macierzystych stosowanym w terapii transplanta-

cyjnej i podobnie jak ESC wykazują zdolność do strukturalnej i funkcjonalnej integracji z tkanką biorcy przeszczepu, jednakże mają ograniczoną zdolność do podziałów i ekspansji *in vitro*. Początkowo uważano, że SSC mogą różnicować się jedynie w komórki tkanki, z której pochodzą. Badania ostatnich lat wykazały jednak, że SSC są multipotencjalne nie tylko w obrębie jednej tkanki, ale mogą także przekraczać bariery tkankowe i różnicować się w komórki pochodzące z innych listków zarodkowych. Taka zdolność SSC tłumaczona jest zjawiskiem plastyczności (przeprogramowania – transdiferencjacji populacji już ukierunkowanych tkankowo komórek) i/lub transpotencji (wyjściowego braku zaprogramowania – utrzymania autonomicznego, niezróżnicowanego stanu pluripotencjalności części komórek występujących w określonej niszy tkankowej) [3]. Mechanizmy molekularne tych zjawisk nie są do końca poznane, choć koncepcja „*open transcriptosom*”, która zakłada, że większość genów w komórkach macierzystych jest utrzymywana w tzw. „stanie otwartym”, czyli z aktywacją na niskim poziomie [4], ma coraz więcej zwolenników. Podstawą tej hipotezy było wykrycie, że w niektórych typach somatycznych komórek macierzystych (np. mezenchymalnych) ekspresji podlegają wybrane transkrypty typowe dla różnych listków zarodkowych [5, 6]. Z drugiej strony istnieje coraz więcej dowodów na to, że w dojrzałych tkankach somatycznych znajdują się pluripotencjalne komórki o charakterze ESC, których podziały w warunkach *in vivo* są skutecznie hamowane przez sygnały płynące z otaczającej niszy tkankowej [7, 8]. W sprzyjających warunkach *in vitro*, promujących aktywność proliferacyjną, takie „uśpione” pluripotencjalne komórki macierzyste izolowane z tkanki somatycznej mogłyby podlegać pozytywnej selekcji [9,10,11].

Ukierunkowane tkankowo komórki macierzyste (również komórki prekursorowe układu nerwowego) zwykle, w hodowli *in vitro*, po pewnej liczbie podziałów nieodwracalnie przestają się dzielić i spontanicznie różnicują się. Jedną z przyczyn tego zjawiska jest tzw. asymetria podziałów komórek macierzystych pochodzących z tkanek somatycznych [12]. Z pojedynczej komórki tego typu po podziale powstaje jedna komórka macierzysta, która jest kopią komórki matczynej i jedna komórka progenitorowa, czyli komórka macierzysta „ukierunkowana” już w dalszym rozwoju. O podziałach lub dalszej specjalizacji komórki decydują sygnały zarówno pochodzenia wewnątrzkomórkowego, jak i z otaczającego ją środowiska [13, 14, 15]. W niszach mózgu jest to wystarczające do utrzymania stałej puli komórek macierzystych, natomiast *in vitro*, jeśli nie zostaną zapewnione odpowiednie warunki do stymulacji podziałów symetrycznych, przesunięcie kinetyki podziałów komórkowych w stronę podziałów asymetrycznych prowadzi do starzenia się i zamierania hodowli komórkowej. Dlatego problemem wciąż trudnym w przypadku SSC jest opracowanie metody nieograniczonego namnażania tych komórek *in vitro* i możliwość wyprowadzenia, bez uprzedniego unieśmiertelniania, ustalonych linii komórkowych. Takie linie komórkowe są niezwykle potrzebne zarówno dla dalszych badań podstawowych, jak i dla oczekiwanego zastosowania terapeutycznego.

W pracy Bużańska i wsp. [9] dokumentujemy wyprowadzenie stabilnej, nietransformowanej linii neuralnych komórek macierzystych z krwi pępowinowej. Tym samym dostarczamy dowodów na to, że możliwe jest w warunkach *in vitro* wyselekcjonowanie

somatycznych komórek macierzystych, które mogą namnażać się w sposób nieograniczony (podobnie jak dzielące się symetrycznie embrionalne komórki macierzyste). Podobną stymulację do podziałów symetrycznych w hodowli *in vitro* uzyskano dla somatycznych komórek macierzystych izolowanych z mózgow płodowych szczura i człowieka [10]. Co więcej, Conti i wsp. [10] zastosowali protokół doświadczalny podobny do naszego w kontekście zarówno sposobu izolacji komórek zdolnych do podziałów symetrycznych, jak i metody utrzymywania w hodowli komórek proliferujących.

Ludzkie neuralne komórki macierzyste (*Human Neural Stem Cells* – hNSC) można otrzymywać *in vitro* z hodowli ESC [16, 17] i z mózgowych tkanek somatycznych (płodowych – [18] i dorosłego człowieka – [19]), ale również ze szpiku kostnego [20, 21, 7] i skóry człowieka [22]. Praca podjęta przez nasz Zespół i realizowana od 2000 roku we współpracy z Zakładem Hematologii Doświadczalnej Instytutu Onkologii w Warszawie udowodniła, że źródłem neuralnych komórek macierzystych może być również ludzka krew pępowinowa [23]. Badania te, wówczas pionierskie, zostały przedstawione na Konferencji ISN/ASN (*International Society of Neuroscience/American Society of Neuroscience*) w sierpniu 2001 roku w Buenos Aires [24]. Podobne wyniki równoległe otrzymał zespół pracujący w Tampie (Floryda) [25].

Niniejsza praca stanowi przegląd wyników prezentowanych w cytowanych publikacjach [9, 23, 26, 27, 28] i dotyczy następujących zagadnień:

- otrzymywanie progenitorów neuralnych z ludzkiej krwi pępowinowej i dowody na ich zdolność do wielokierunkowego różnicowania się w komórki o charakterze neuronów, astrocytów i oligodendrocytów [23];
- wyprowadzenie stabilnie ukierunkowanej linii neuralnych komórek macierzystych (*Human Umbilical Cord Blood – Neural Stem Cells: HUCB-NSC*) z progenitorów pochodzących z krwi pępowinowej [9];
- standaryzacja wzrostu i różnicowania HUCB-NSC: opracowanie metod hodowli *in vitro* umożliwiających utrzymywanie HUCB-NSC na różnych etapach zaawansowania rozwojowego (od niezróżnicowanych, poprzez ukierunkowane progenitory neuralne o zawężonym spektrum rozwojowym, do komórek zróżnicowanych) [26,27];
- analiza molekularna mechanizmów leżących u podstaw utrzymania „macierzystości” wyprowadzonej linii HUCB-NSC [9];
- różnicowanie HUCB-NSC w komórki o charakterze funkcjonalnych neuronów: dowody na podstawie badań molekularnych (mikromacierze DNA), immunocytochemicznych (ekspresja białek) oraz elektrofizjologicznych (metoda „*patch clamp*”) [9, 27, 28].

## **OTRZYMYWANIE PROGENITORÓW NEURALNYCH Z LUDZKIEJ KRWI PĘPOWINOWEJ**

Nasze badania udowodniły, że ludzka krew pępowinowa może być źródłem komórek macierzystych, które pod wpływem odpowiednich warunków środowiska (obecność surowicy i stymulacja neuromorfogenami) mogą różnicować się w komórki o charakterze neuronów, astrocytów i oligodendrocytów [23].

Założeniem wyjściowym do przeprowadzanych doświadczeń było uzyskanie frakcji mononuklearnej krwi pępowinowej zawierającej komórki klonogenne o możliwie najniższym stopniu ograniczenia potencjału do różnicowania. W tym celu przeprowadzono immunodeplecję (metodą sortowania magnetycznego) komórek macierzystych już ukierunkowanych hematopoetycznie (CD34+), a następnie przez 6 tygodni stabilizowano hodowlę w obecności 10% surowicy. Otrzymana jednowarstwowo rosnąca hodowla komórek mononuklearnych była CD34(-), CD45(-), tj. negatywna odpowiednio pod względem powierzchniowych markerów hematopoetycznych i endotelialnych. Dalsza selekcja polegała na zmianie warunków hodowli w kierunku stymulacji do podziałów tej części komórek, która jest wrażliwych na czynnik wzrostowy EGF (*Epidermal Growth Factor*). Wcześniejsze prace [19] wykazały, że EGF specyficznie stymuluje do podziałów neuralne komórki macierzyste izolowane z OUN (Ośrodkowego Układu Nerwowego). Wybór do dalszej selekcji i propagacji w hodowli komórek nieprzylegających był również nieprzypadkowy. Założeniem było, że są to komórki niezróżnicowane, wrażliwe na EGF i o dużej zdolności proliferacyjnej. Doprowadziło to do skutecznego wyizolowania frakcji namnażających się komórek o charakterze neuralnych komórek macierzystych. Komórki te wykazywały zdolność do tworzenia klonów, pozytywnych pod względem ekspresji nestyny (zarówno na poziomie białka, jak i RNA) – typowego markera dla neuralnych komórek macierzystych. Co więcej, w obrębie tego samego klonu zidentyfikowano immunocytochemicznie komórki różniące się do trzech różnych fenotypów neuralnych (neuronów, astrocytów i oligodendrocytów), co świadczy o multipotencjalnym charakterze izolowanych komórek. Zastosowanie kwasu retinowego (RA) z BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) lub tylko RA, powoduje różnicowanie wyizolowanej frakcji komórek macierzystych krwi pępowinowej w komórki o charakterze neuronów (35%), astrocytów (30%) i oligodendrocytów (10%). Stymulacja do różnicowania neuralnego jest jeszcze bardziej skuteczna w obecności czynników typowych dla niszy neurogennej w mózgu niż sama obecność badanych czynników wzrostowych. Udowodniono to w doświadczeniach, w których komórki macierzyste z krwi pępowinowej znakowano pochodnymi chlorometylowymi dwuocianu fluoresceiny (*Molecular Probs*) i hodowano w ko-kulturze z komórkami izolowanymi z kory mózgu szczura. Spowodowało to ok. 10% wzrost zdolności do różnicowania zarówno w kierunku neuronalnym, jak i w kierunku astrocytalnym.

## WYPROWADZENIE LINII HUCB-NSC Z PROGENITORÓW POCHODZĄCYCH Z KRWI PĘPOWINOWEJ

Stabilna linia komórkowa neuralnych komórek macierzystych wywodzących się z krwi pępowinowej HUCB-NSC (*Human Umbilical Cord Blood – Neural Stem Cells*) została otrzymana bez uprzedniego unieśmiertelniania komórek [9]. Stało się to możliwe, dzięki zastosowaniu metody hodowli *in vitro* przez selekcję komórek niezróżnicowanych (klonogennych, nieprzylegających) i ich propagację – wielokrotne pasażowanie w obecności mitogennego czynnika wzrostowego EGF, promującego przeżycie komórek ukierunkowanych neuralnie [19]. Ustabilizowanie linii jako neuralnej linii komórek



macierzystych nastąpiło po jej przejściowej hodowli w warunkach bez surowicy w obecności czynników wzrostowych EGF, bFGF (*basic fibroblast growth factor*) i LIF (*leukemia inhibitory factor*). Umożliwiło to jednoczesną selekcję komórek ukierunkowanych neuralnie i ich stymulację do proliferacji. Badania immunocytochemiczne i molekularne wykazały, że komórki tak wyprowadzonej linii, po zastosowaniu neuromorfogenów (np. dBcAMP) [9] lub niektórych czynników wzrostowych (np. CNTF – *ciliary neurotrophic factor*) [27] mogą się różnicować do fenotypów neuralnych w ok. 80% badanej populacji, co potwierdza neutralny charakter tej linii.

Linia HUCB-NSC utrzymywana jest już ponad cztery lata w ciągłej hodowli (60. pasaż). Wykazano, że komórki HUCB-NSC mają prawidłowy ludzki kariotyp (46xy) i są wysoce klonogenne (wydajność 10%), co pozwoliło na otrzymanie klonalnych podlinii. W celu ustalenia, czy linia komórkowa jest stabilna i czy spełnia cechy linii neuralnych komórek macierzystych, porównywano dane dotyczące kinetyki wzrostu, klonogenności, stabilności kariotypu i potencjału do różnicowania pomiędzy wczesnymi (<10) i późnymi (>25, obecnie w pasażu 42.) pasażami linii podczas prawie trzech lat ciągłej hodowli. Wyniki wykazały brak różnic statystycznych pomiędzy porównywanymi pasażami udowadniając, że linia jest stabilna i spełnia cechy linii neuralnych komórek macierzystych. Stabilność kariotypu, brak zwiększonej ekspresji typowych onkogenów (np. *myc*, *ras*), inhibicja kontaktowa w warunkach hodowli konfluentnej, a także brak tworzenia guzów nowotworowych po przeszczepie HUCB-NSC do myszy NOD/SCID (*non-obese diabetic* (NOD)/*severely combined-immunodeficient* (SCID), pozbawionej odporności immunologicznej, pozwalają sądzić, że nie jest to linia transformowana [9 oraz dane niepublikowane].

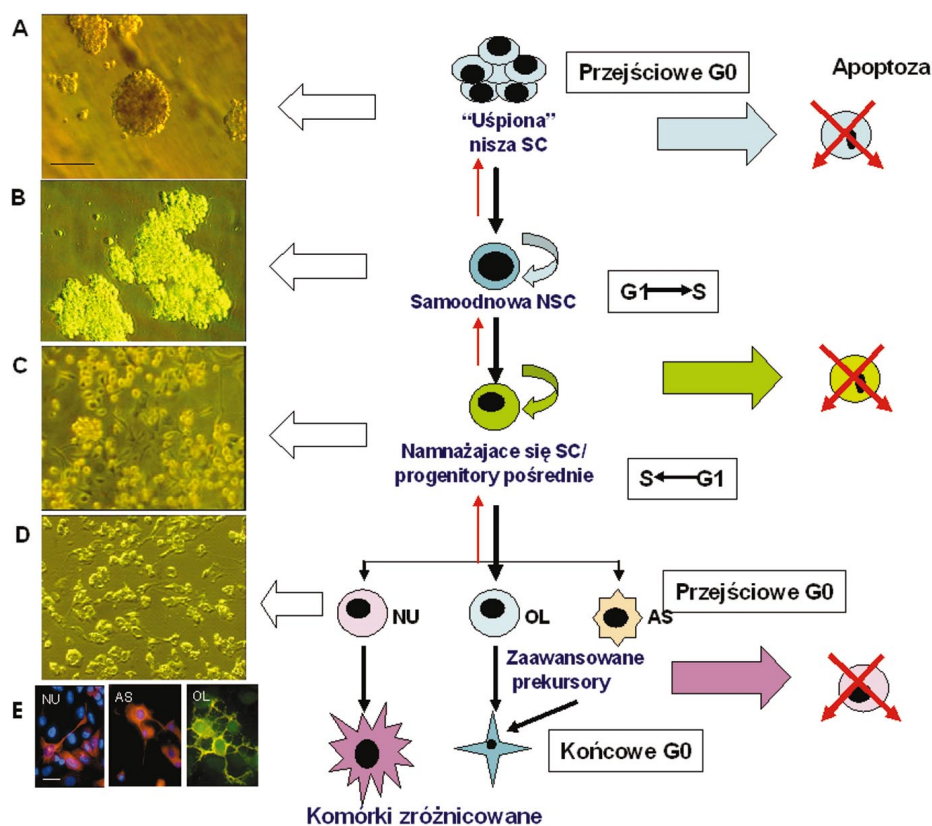
Propagacja hodowli komórek HUCB-NSC prowadzona jest w trzech różnych warunkach:

1) bez surowicy w obecności czynników LIF, EGF i bFGF – hodowla nieodróżnianych, nieprzylegających komórek w formie luźno pływających nieregularnych lub typowych regularnych agregatów określanych jako „neurosfer” (ryc. 1 A, B),

2) w pożywce z niską zawartością surowicy (2%), wzbogaconą ITS (*insulin/transferin/selenium*), bez dodatkowych czynników wzrostowych – hodowla mieszana: komórek pływających (nieodróżnianych) i przylegających do podłoża ukierunkowanych progenitorów oraz (ryc. 1 C),

3) w obecności 10% surowicy z dodatkiem mitogenów EGF i bFGF – hodowla komórek tylko przylegających, ale ciągle proliferujących zaawansowanych progenitorów neuralnych (ryc. 1 D).

Badaliśmy ekspresję określonych białek typowych dla komórek rozwijającego się i dojrzałego OUN w różnych warunkach hodowli, stosując metodę znakowania immunocytochemicznego. W komórkach nieodróżnianych HUCB-NSC, hodowanych bez surowicy wysokiej ekspresji podlegają białka typowe dla neuralnych komórek macierzystych, takie jak: nestyna (ok. 90%), GFAP (*glial fibrillary acidic protein*, ok. 40%) oraz neurofilament NF-200 (ok. 20%). Struktura włóknista, typowa dla tych białek nie była widoczna. Białka typowe dla komórek zaawansowanych w różnicowaniu neuralnym ( $\beta$ -TUBULINA III, MAP2 – *microtubul associated protein 2* dla neuronów,



RYCINA 1. Stadia rozwojowe HUCB-NSC podczas różnicowania w kierunku linii neuralnych. A–D: kontrast fazowy, wskaźnik powiększenia: 100  $\mu$ m. A – neurosfery w hodowli nieodróżnicowanych HUCB-NSC – nisza utrzymująca komórki w „uśpieniu” (przejściowy stan G0), w środowisku bez surowicy; B – samoodnawiające się, nieadherentne HUCB-NSC stymulowane do podziałów w środowisku bez surowicy z dodatkami mitogenów (EGF i bFGF); C – hodowla mieszana: komórek pływających (nieodróżnicowanych) i przylegających do podłoża ukierunkowanych progenitorów w środowisku z niską zawartością surowicy (2%), bez dodatkowych czynników wzrostowych; D – hodowla komórek tylko przylegających, ale mających zdolność do proliferacji zaawansowanych progenitorów neuralnych (przejściowa faza G0, w obecności 10% surowicy z dodatkami mitogenów EGF i bFGF); E – immunodetekcja (metoda znakowania ref. [26]):  $\beta$ -TUBULIN III, w komórkach o charakterze neuronów (NU), GFAP w komórkach o charakterze astrocytów (AS) oraz GAL C w komórkach o charakterze oligodendrocytów (OL), niebieskie – jądra barwione Hoechst 33258. Komórki różnicowane przez dwa tygodnie w 2% surowicy z dodatkami neuromorfogenów, nie proliferują, są w końcowej fazie G0. Wskaźnik powiększenia 50  $\mu$ m. Komórki macierzyste proliferujące lub będące w przejściowej fazie G0 nie wchodzi na ścieżkę apoptozy

S100 $\beta$  dla astrocytów, GAL C – galaktocerebrozyd C dla oligodendrocytów) w warunkach hodowli nieodróżnicowanej nie podlegają ekspresji. W komórkach adherentnych, hodowanych w obecności 2% surowicy zarówno ekspresja, jak i organizacja strukturalna tych białek zmieniła się: dla nestyny i GFAP poziom ekspresji spada odpowiednio do 15% i 23% komórek w populacji, w przypadku NF200 zwiększa się do

ok. 30%, przy czym wszystkie te białka, w tej fazie różnicowania, występują już w formie spolimeryzowanej. Wynik ten tłumaczymy stopniowym ukierunkowaniem progenitorów neuralnych, jakimi są komórki przylegające HUCB-NSC. Łączy się to ze stopniową utratą ekspresji wczesnych markerów dla neuralnych komórek macierzystych, do których należą nestyna i GFAP, z jednoczesnym zwiększeniem ekspresji białek charakterystycznych dla neuronów, takich jak NF-200. Równocześnie we frakcji przylegającej komórek HUCB-NSC, hodowanych w pożywce z niską zawartością surowicy, pojawia się ekspresja  $\beta$ -TUBULINY III, S100 $\beta$  i galaktozy-cerebrozydu – GAL C, co świadczy o stymulacji do różnicowania tej hodowli we wszystkie trzy linie typowe dla OUN. Na uwagę zasługuje pozornie nietypowa ekspresja GFAP – białka charakterystycznego dla zróżnicowanych astrocytów, w niezróżnicowanych, nieadherentnych HUCB-NSC. Badania prowadzone w wielu laboratoriach wykazały, że białko to podlega ekspresji również w neuralnych komórkach macierzystych, ale tylko pochodzenia ludzkiego [30, 10].

HUCB-NSC hodowane w wysokim stężeniu surowicy, bez mitogenów lub w pożywce z małą zawartością surowicy, ale w obecności neuromorfogenów zmieniają fenotyp na bardziej przypominający komórki o charakterze neuronów, astrocytów czy oligodendrocytów zarówno morfologicznie, jak i pod względem ekspresji białek. Świadczy to o znaczącym wpływie warunków hodowli i związanej z tym dostępnością czynników epigenetycznych na różnicowanie HUCB-NSC.

W innej pracy [31] wykazaliśmy również wpływ czynników genetycznych na zdolność do różnicowania HUCB-NSC. Podobnie jak w przypadku ludzkich transformowanych komórek macierzystych linii DEV [32], podejmowanie decyzji rozwojowej o sposobie różnicowania zależy m.in. od ekspresji czynników transkrypcyjnych typu bHLH (*basic helix loop helix*). Różnicowanie w kierunku neuronów komórek linii HUCB-NSC hamowane jest obecnością bądź endogennego, bądź dostarczonego drogą transfekcji czynnika ID1 (inhibującego czynniki proneuralne, takie jak neurogeniny lub neuroD), a rozmieszczenie wewnątrzkomórkowe białka ID1 (jądro lub cytoplazma) może być wskaźnikiem stanu macierzystości komórek HUCB-NSC.

## STANDARYZACJA WZROSTU I RÓŻNICOWANIA HUCB-NSC

Stabilna linia HUCB-NSC zarówno stanowi łatwo dostępne źródło neuralnych komórek macierzystych, jak również umożliwia standaryzację układów eksperymentalnych do badań *in vitro*. Co więcej, wykazaliśmy [26, 8, 9], że HUCB-NSC mogą być hodowane jako warstwa przylegających do podłoża komórek (ryc. 1 C,D) lub jako przestrzenne, pływające konglomeraty niezróżnicowanych komórek o charakterze neurosfer (ryc. 1 A). „Neurosfer” są to struktury typowe dla hodowli neuralnych komórek macierzystych zarówno somatycznych (izolowanych z mózgu płodu lub mózgu dorosłego osobnika [33]), jak i zarodkowych (wyprowadzanych z blastocysty rozwijającego się zarodka [34]). Zdolność HUCB-NSC do tworzenia „neurosfer” potwierdza neuralny charakter wyprowadzonej przez nas linii komórkowej.



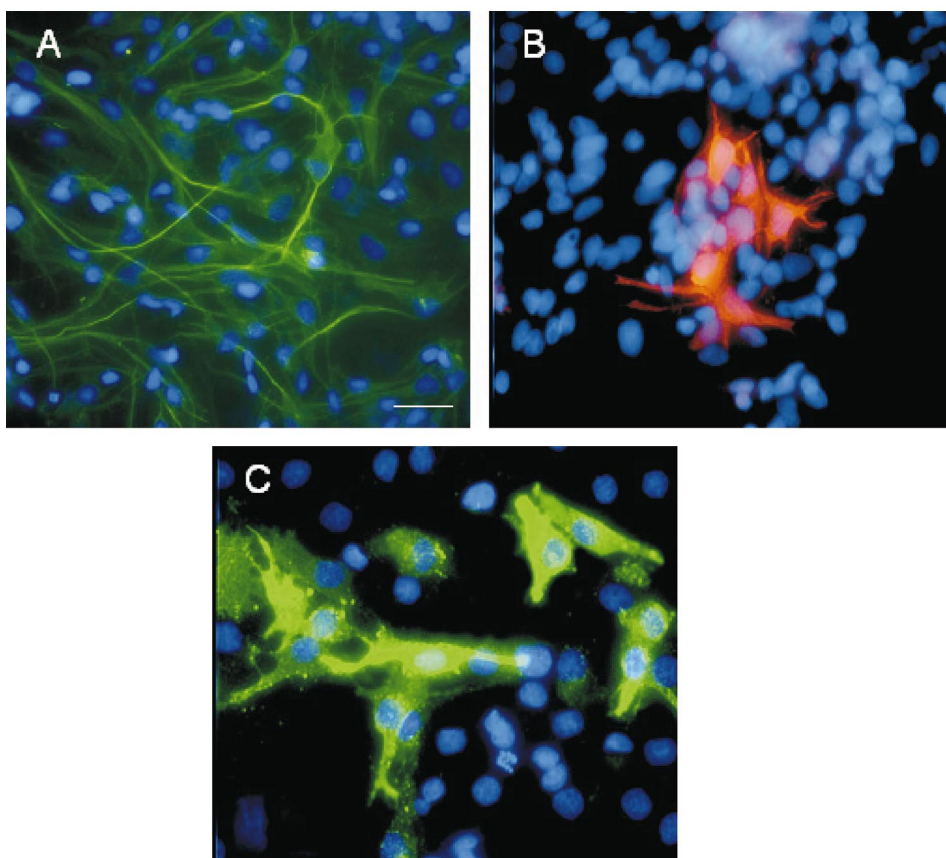
Opracowaliśmy metody umożliwiające utrzymywanie komórek linii HUCB-NSC w hodowli *in vitro*, na różnych etapach rozwoju, które odzwierciedlają hierarchię ich wzrostu i różnicowania: od niezróżnicowanych, poprzez progenitory neuralne o zawężonym spektrum rozwojowym, do komórek zróżnicowanych [26] (ryc. 1). Możliwość izolacji frakcji komórek HUCB-NSC odzwierciedlającej określony etap rozwoju ontogenetycznego neuralnych komórek macierzystych sprawia, że linia HUCB-NSC jest dobrym modelem badań nad neurotoksycznością rozwojową [26, 27].

W pracy Bużańska i wsp. [26], ustaliliśmy optymalne warunki wzrostu i różnicowania HUCB-NSC w długo- i krótkoterminowej hodowli HUCB-NSC. Badania prowadzono w 2-wymiarowej hodowli adherentnej i przestrzennej 3-wymiarowej hodowli reprezentowanej przez neurosfery. W warunkach standaryzowanej hodowli przylegającej, oszacowaliśmy tempo proliferacji i przeżywalność komórek oraz ich zdolność do różnicowania. Wykazaliśmy, że podczas różnicowania spontanicznego indukowanego jedynie adhezją komórek do podłoża (hodowla 2-wymiarowa, adherentna), komórki częściej uzyskują fenotyp neuronalny (ok. 30 %) niż glejowy (astrocyty ok.10%, oligodendrocyty ok.2%). Badaliśmy również proliferację i zdolność do różnicowania komórek HUCB-NSC rosnących w neurosferach. Adhezja neurosfer do podłoża stymuluje spontaniczną migrację i różnicowanie komórek HUCB-NSC. Proces ten może być kontrolowany obecnością czynników wzrostowych (np. LIF/CNTF stymuluje proliferację komórek w neurosferach), a także składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej (np. fibronektyna hamuje zarówno proliferację, jak i migrację komórek) [26].

Procesem różnicowania HUCB-NSC możemy sterować – w warunkach przylegania do podłoża i w obecności neuromorfogenów podejmowane decyzje rozwojowe dotyczące neuronalnego lub astocytalnego, czy oligodendrogialnego fenotypu zależą od rodzaju zastosowanego neuromorfogenu lub czynnika wzrostowego [27]. Badaliśmy wpływ niektórych czynników wzrostowych i neuromorfogenów (PDGF-AA, PDGF-BB, RA, T3, CNTF, cAMP) stosowanych w 10 różnych kombinacjach w standaryzowanej hodowli na kierunkowe różnicowanie HUCB-NSC w komórki o charakterze neuronów, astrocytów i oligodendrocytów. Wykazaliśmy, że CNTF promuje różnicowanie w kierunku neuronów (ok. 80% komórek  $\beta$ -TUBULINA III pozytywnych) (ryc. 2A), PDGF-BB + RA w kierunku astrocytów (ok. 65% komórek S100 $\beta$  pozytywnych) (ryc. 2B), natomiast PDGF-AA + T3 w kierunku oligodendrocytów (ok.12% komórek GAL C pozytywnych) (ryc. 2C) [27 oraz dane niepublikowane].

### **ANALIZA MOLEKULARNA MECHANIZMÓW LEŻĄCYCH U PODSTAW UTRZYMANIA „MACIERZYSTOŚCI” WYPROWADZONEJ LINII HUCB-NSC**

Analiza molekularna z zastosowaniem mikromacierzy DNA polegała na badaniu profilu transkrypcyjnego komórek niezróżnicowanych linii HUCB-NSC i różnicowanych pod wpływem dBcAMP (*HUCB-NSC Differentiated* – HUCB-NSCD) oraz populacji referencyjnej komórek mononuklearnych izolowanych z krwi pępowinowej w taki sam



RYCINA 2. HUCB-NSC znakowane immunocytochemicznie przeciwciałami skierowanymi przeciwko  $\beta$ -TUBULINIE III (A), S100 $\beta$  (B), GAL C (C), w komórkach różnicowanych przez 2 tygodnie odpowiednio: w kierunku neuronów (w obecności CNTF), astrocytów (w środowisku z PDGF +RA), oraz oligodendrocytów (w obecności T3). Niebieskie – jądra barwione Hoechst 33258, wskaźnik powiększenia 50  $\mu$ m. Zdjęcia spod mikroskopu fluorescencyjnego. Szczegóły znakowania w ref. [27]

sposób, w jaki izolowano komórki linii HUCB-NSC (frakcja komórek CD 34<sup>-</sup>, CD 45<sup>-</sup>) – (HUCB-MC) [9].

Porównywaliśmy profil transkrypcyjny niezróżnicowanych komórek HUCB-NSC i wyjściowych – CD 34(-) HUCB-MC. Wykazaliśmy, że 93% genów, określanych jako typowe dla neuralnych, ludzkich komórek macierzystych [35], które są aktywne w HUCB-NSC, nie podlega ekspresji w frakcji referencyjnej komórek mononuklearnych. Świadczy to o neuralnym charakterze linii HUCB-NSC.

Za utrzymywanie „macierzystości”, czyli zdolności do samoodnowy zarówno komórek somatycznych, jak i embrionalnych odpowiedzialna jest aktywacja komórkowych szlaków przekazywania sygnału, takich jak: WNT/ $\beta$ CATENINA [36] oraz LIF/JAK/STAT [37, 35]. Neuralne komórki macierzyste charakteryzują się aktywacją szlaków DELTA/NOTCH oraz FGFR1 [38]. W naszych badaniach, w niezróżnico-

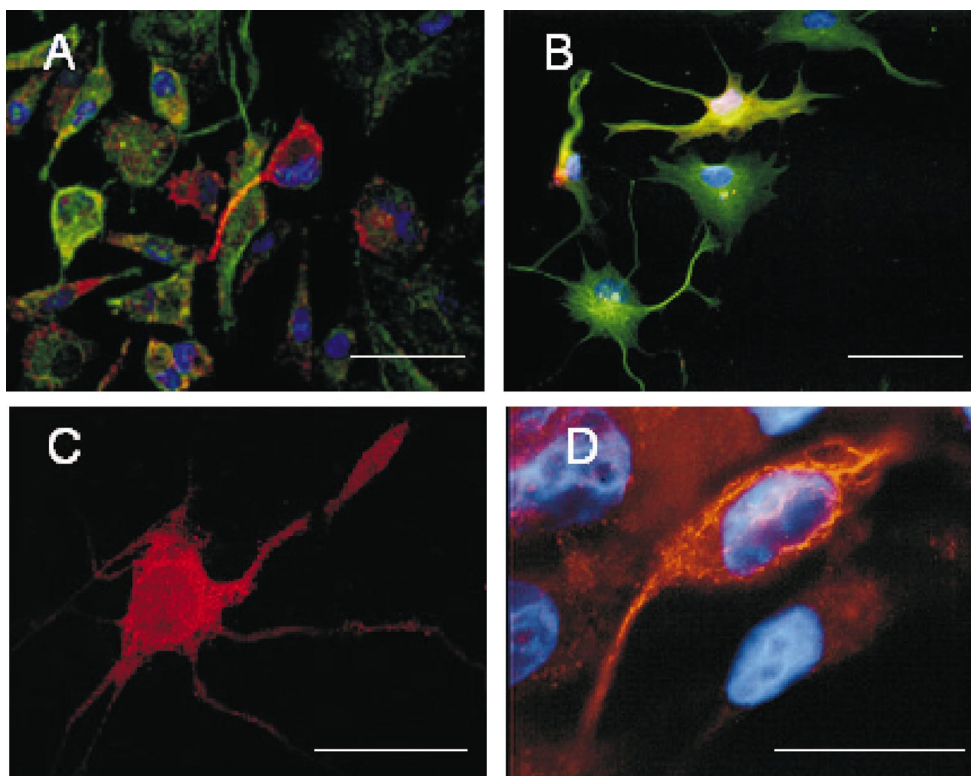
wanych komórkach HUCB-NSC wykazaliśmy wzmożoną aktywność szeregu genów związanych z wymienionymi drogami sygnałowymi. Dla szlaku inicjowanego sygnałem liganda Lif są to geny: *LIFR*, *LIF*, *JAK* oraz *STAT*. Aktywacja drogi WNT koreluje z nadekspresją takich genów, jak: *WNT*, *FRIZZLED*, *LPR*,  $\beta$ -*CATENINA*, *CADHERYNA* i *TCF*, natomiast o aktywacji szlaku DELTA/NOTCH świadczy zwiększona ekspresja *JAGGED2*, *NOTCH3*, *HEY1* oraz *PEN2*. Neuralne ukierunkowanie niezróżnicowanej frakcji komórek HUCB-NSC jest związane między innymi ze zwiększoną ekspresją genów dla czynników wzrostowych FGF, PDGF, NRG1 oraz ich receptorów: FGFR1, FGFR3, PDGFR oraz ERBB2. Na szczególną rolę w tym procesie receptora FGFR1 wskazuje aż 600-krotne zwiększenie aktywności tego genu w porównaniu z wyjściową frakcją mononuklearną komórek krwi pępowinowej [9].

## RÓŻNICOWANIE HUCB-NSC W KOMÓRKI O CHARAKTERZE FUNKCJONALNYCH NEURONÓW

Analizę molekularną przy użyciu mikromacierzy DNA zastosowano również do badania ekspresji genów w komórkach różnicowanych w obecności dBcAMP [9]. Różnicowaniu towarzyszy aktywacja genów związanych z receptorami białek G (*GPR17*), a także wzrost ekspresji genów specyficznych dla neuronów, np. *MAPT* (białko Tau), *LXN* (lateksyna), *CALB2* (kalretynina), *GAD 67* (dekarboksylaza kwasu glutaminowego 67), czy też genów kodujących białka zasocjowane z receptorem GABA<sub>A</sub>: *GABARAPL3* i *GABARAPL1*, co sugeruje gabaergiczny charakter różnicowania części komórek HUCB-NSC. Analiza immunocytochemiczna potwierdziła obecność białek kodowanych przez te geny (ryc. 3). Uwagę należy zwrócić również na wzrost ekspresji genów związanych z przekaznictwem synaptycznym: *SV2a* (*synaptic vesicle 2a*), *SYNJ1* (*synaptojanin 1*), *PCLO* (*piccolo*) oraz *NPTX1* (*neuronal pentraxin*) [9].

Badania elektrofizjologiczne [28] prowadzone metodą „patch clamp” wykazały w komórkach różnicowanych potencjał spoczynkowy wysokości 50 mV oraz obecność potencjało-zależnych prądów potasowych (Kir – *inward rectifying potassium current* oraz  $I_{K^+}$  – *outward potassium current*) (ryc. 4 a-e). Prądy te są specyficznie i w sposób odwracalny blokowane przez inhibitory Kir i  $I_{K^+}$ : Kir był inhibowany obecnością jonów Cs<sup>+</sup>, Ba<sup>2+</sup> i Cd<sup>2+</sup>, natomiast  $I_{K^+}$  antagonistami kanałów potasowych: TEA (tetraethylammonium) lub 4-AP (4-aminopridine) (ryc. 4 c,e).

Wykazano również aktywność receptorów dopaminergicznych, gabaergicznych, glutamatergicznych i serotonergicznych. W obecności kwasu kainowego, acetylocholino (ACH), serotoniny (5-HT), glicyny, GABA i dopaminy (DA) Kir w różnicowanych komórkach HUCB-NSC był znacząco modyfikowany. Ekspresja tych receptorów na poziomie białka została potwierdzona immunocytochemicznie. Badania profilu transkrypcyjnego różnicowanych HUCB-NSC przy zastosowaniu mikromacierzy DNA wykazały ekspresję genów dla potencjało-zależnych kanałów potasowych i sodowych, jak również niektórych typów receptorów: dla ACH, GABA, 5-HT, DA, glicyny czy kwasu glutaminowego. Świadczy to o funkcjonalnym różnicowaniu HUCB-NSC w

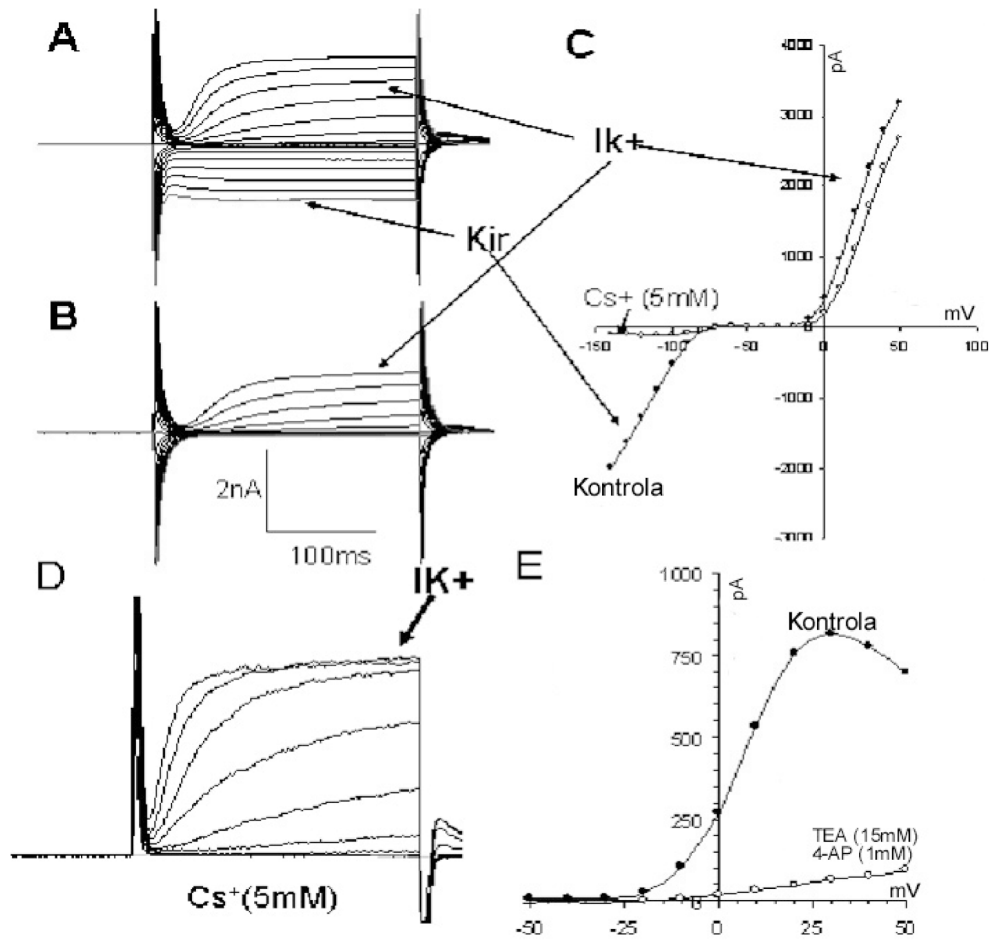


RYCINA 3. HUCB-NSC różnicowane przez 2 tygodnie w obecności dBcAMP. A – koekspresja białka TAU (czerwone) i  $\beta$ -TUB III (zielona), B – koekspresja kalretyniny CALB (czerwona) i  $\beta$ -TUB III (zielona), C – ekspresja dekarboksylazy kwasu glutaminowego 67 (GAD 67), D – ekspresja białka zasocjowanego z receptorem GABAA1. Niebieskie – jądra barwione Hoechst 33258, wskaźnik powiększenia 50  $\mu$ m (A i B), 20  $\mu$ m (C i D). Zdjęcia spod mikroskopu fluorescencyjnego. Szczegóły znakowania w ref. [9]

komórki o charakterze neuronów. Jednakże brak zapisu potencjałów czynnościowych, jak również brak ekspresji niektórych receptorów (np. NMDA) wskazują na to, że komórki HUCB-NSC różnicowane w obecności dBcAMP mają cechy funkcjonalnego, ale jeszcze niedojrzałego systemu neuronalnego [28, 27]. Obecnie prowadzone badania, w których HUCB-NSC różnicowane są bezpośrednio na powierzchni modyfikowanej do przeprowadzenia pomiarów elektrofizjologicznych (z wbudowanymi elektrodami), wskazują na możliwość uzyskania potencjału czynnościowego w komórkach HUCB-NSC (dane niepublikowane).

## PODSUMOWANIE

Komórki macierzyste wyizolowane z mononuklearnej frakcji ludzkiej krwi pępowinowej można skutecznie różnicować w komórki o charakterze neuronów, astrocytów i oligodendrocytów. Stabilna, nieimmortalizowana linia neuralnych komórek



RYCINA 4. Prądy potencjało-zależne Kir oraz  $I_{K^+}$  indukowane w komórkach HUCB-NSC przez skokowe zmiany potencjału od  $-140$  do  $+50$  mV (skok co  $10$  mV), potencjał spoczynkowy  $+50$  mV. Badania prowadzono metodą „patch clamp” w komórkach różnicowanych przez 2 tygodnie w obecności dBcAMP. Prądy te są specyficznie i w sposób odwracalny blokowane przez inhibitory Kir i  $I_{K^+}$ : Kir był inhibowany obecnością jonów  $Cs^+$ , (B,C,D), natomiast  $I_{K^+}$  antagonistami kanałów potasowych: TEA (tetraethylammonium) lub 4-AP (4-aminopridine) (E). Szczegóły metodyczne ref. [28]

macierzystych HUCB-NSC jest potencjalnym źródłem komórek somatycznych do badań związanych z terapią chorób neurodegeneracyjnych, jest również dobrym modelem do badań nad neurotoksycznością rozwojową.

Przedstawione dowody otrzymania neuralnych komórek macierzystych z ludzkiej krwi pępowinowej i wyprowadzenie stabilnej linii komórkowej HUCB-NSC są pionierskie w dziedzinie badań komórek macierzystych.



## LITERATURA

- [1] THOMSON JA, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO SS, MICHELLE A, WAKNITZ MA, SWIERGIEL JJ, MARSHALL VS, JONES JM. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* 1998; **282**: 1145.
- [2] HUMPHERYS D, EGGAN K, AKUTSU H, HOCHEDLINGER K, RIDEOUT WM3RD, BINISZKIEWICZ D, YANAGIMACHI R, JAENISCH R. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science* 2001; **293**(5527): 95–97.
- [3] SHERLEY JL. Asymmetric cell kinetics genes: the key to expansion of adult stem cells in culture. *Stem cells* 2002; **20**: 561–572.
- [4] LIU Y, RAO MS. Transdifferentiation – fact or artifact *J Cell Biochem* 2003; **88**: 29–40.
- [5] SONG S, SANCHEZ-RAMOS J. Brain as the sea of marrow. *Exp Neurology* 2003; **184**: 54–60.
- [6] TONDREAU T, LAGNEAUX L, DEJENEFFE M, MASSY M, MORTIER C, DELFORGE A, BRON D. Bone marrow derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation* 2004; **72**: 319–326.
- [7] JIANG Y, JAHAGIRDAR BN, REINHARDT RL, SCHWARTZ RE, KEENE CD, ORITZ-GONZALEZ XR, REYES M, LENVIK T, LUND M, DU J, ALDRICH S, LISBERG A, LOW WC, LARGAESPADA DA, VERFAILLIE C. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; **418**: 41–49.
- [8] JURGA M, MAKAREWICZ I, SARNOWSKA A, HABICH A, KOZŁOWSKA H, ŁUKOWSKA B, BUŻAŃSKA L, DOMAŃSKA-JANIK K. Neurogenic Potential of Human Umbilical Cord Blood-Neural Stem Cells Depends on Previous Long-Term Culture Conditions. *J Neurosci Res* 2006; **83**: 627–631.
- [9] BUŻAŃSKA L, JURGA M, STACHOWIAK EK, STACHOWIAK MK, DOMAŃSKA-JANIK K. Neural Stem-like Cell Line Derived from Nonhematopoietic Population of Human Umbilical Cord Blood. *Stem Cells Dev* 2006; **15**: 391–406.
- [10] CONTI L, POLLARD SM, GORBA T, REITANO E, TOSELLI M, BIELLA G, SUN Y, SANZONE S, YING Q, CATTANO E, SMITH A. Niche-independent symmetrical self-renewal of mammalian tissue stem cell. *PLoS Biol* 2005; **3**: 1–12.
- [11] KUCIA M, ZHANG YP, RECA R, WYSOCZYNSKI M, MACHALINSKI M, MAJKA M, STILDSTAD ST, RATAJCZAK J, SHIELDS CB, RATAJCZAK MZ. Cells enriched in markers of neural tissue-committed stem cells reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood following stroke. *Leukemia* 2006; **20**: 18–28.
- [12] SOMMER N, RAO M. Neural stem cells and regulation of cell number. *Progress in Neurobiol* 2002; **66**: 1–18.
- [13] WURMSER AE, PALMER TD, GAGE FH. Cellular interactions in the stem cell niche. *Science* 2004; **304**: 1253–1254.
- [14] HSIEH J, GAGE F. Epigenetic control of neural stem cell fate. *Cur Opin Genet Dev* 2004; **14**: 461–469.
- [15] RAO M. Conserved and divergent paths that regulate self-renewal in mouse and human embryonic stem cells. *Dev Biol* 2004; **275**: 269–286.
- [16] LENKA N. Derivation and characterization of neural cells from embryonic stem cells using nestin enhancer. *Methods Mol Biol* 2006; **330**: 33–54.
- [17] CARPENTER MK, ROSLER E, RAO MS. Characterization and differentiation of human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 2003; **5**(1): 79–88.
- [18] VESCOVI A.L, PARATI E.A, GRITTI A., POULIN P., FERRARIO M., WANKE E., FROLICHSTHAL-SCHOELLER P., COVA L., ARCELLANA-PANLILIO M., COLOMBO A., GALLI R. Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation. *Exp Neurol* 1999; **156**: 71–83.
- [19] ROY NS, WANG S, JIANG L, KANG J, BENRAISS A, HARRISON-RESTELLI C, FRASER RA, COULDWELL WT, KAWAGUCHI A, OKANO H, NEDERGAARD M, GOLDMAN SA. *In vitro* neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. *Nat Med* 2000; **6**(3): 271–277.
- [20] TROPEL P, PLATET N, PLATEL JC, NOEL D, ALBRIEUX M, BENABID AL, BERGER F. Functional neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006 [Epub ahead of print]

- [21] ALEXRIAN AR. Epigenetic modifiers promote efficient generation of neural-like cells from bone marrow-derived mesenchymal cells grown in neural environment. *J Cell Biochem* 2006 [Epub ahead of print]
- [22] TOMA JG, AKHAVAN M, FERNANDES KJ, BARNABE-HEIDER F, SADIKOT A, KAPLAN DR, MILLER FD. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 2001; **3**(9): 778–784.
- [23] BUŻAŃSKA L, MACHAJ EK, ZABŁOCKA B, POJDA Z, DOMAŃSKA-JANIK K. Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features *in vitro*. *J Cell Sci* 2002; **115**: 2131–2138.
- [24] BUŻAŃSKA L, MACHAJ EK, ZABŁOCKA B, POJDA Z, BERDOWSKA P, DOMAŃSKA-JANIK K. Human cord blood derived neurons, astrocytes and oligodendrocytes. *J Neurochem* 2001; **78**, suppl. 1: 58.
- [25] SANCHEZ-RAMOS JR., SONG S, KAMATH SG., ZIGOVA T, WILLING A, CARDOZO-PELAEZ F, STEDEFORD T, CHOPP M, SANBERG PR. Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Exp Neurol* 2001; **171**: 109–115.
- [26] BUŻAŃSKA L, HABICH A, JURGA M, SYPECKA J, DOMAŃSKA-JANIK K. Human Cord Blood-derived Neural Stem Cell Line – Possible Implementation in Studying Neurotoxicity. *Tox in Vitro* 2005; **19**: 991–999.
- [27] BUŻAŃSKA L, JURGA M, DOMAŃSKA-JANIK K. Neuronal differentiation of Human Umbilical Cord Blood Neural Stem-Like Cell Line. *Neurodeg Dis* 2006; **3**: 19–26.
- [28] SUN W, BUŻAŃSKA L, DOMAŃSKA-JANIK K, SALVI RJ, STACHOWIAK MK. Voltage-sensitive and ligand-gated channels in differentiating neural stem-like cells derived from the nonhematopoietic fraction of human umbilical cord blood. *Stem Cells* 2005; **23**: 931–945.
- [29] SINGH SK, IAN D, CLARKE ID, HIDE T, DIRKS PD. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 2004; **23**: 7267–7273.
- [30] DOETSCH F. A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 2003; **13**: 543–550.
- [31] JURGA M, BUŻAŃSKA L, HABICH A, MAŁECKI M, DOMAŃSKA-JANIK K. Function of ID1 protein in human cord blood – derived neural stem-like cells. *J Neurosci Res* 2006 (proofs).
- [32] BUŻAŃSKA L, SPASSKY N, BELIN MF, GIANGRANDE A, GUILLEMOT F, KLAMBT C, LABOUESSE M, THOMAS JL, DOMAŃSKA-JANIK K, ZALC B. Human medulloblastoma cell line DEV is a potent tool to screen for factors influencing differentiation of neural stem cells. *J Neurosci Res* 2001; **65**: 17–23.
- [33] SVENDSEN CN, CALDWELL MA, OSTENFELD T. Human neural stem cells: isolation, expansion and transplantation. *Brain Pathol* 1999; **9**: 499–513.
- [34] O'SHEA KS. Neural differentiation of embryonic stem cells. W: T. Zigowa, P.R. Sandberg, J.R. Sanchez-Ramos [red.] Neural stem Cells: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology* 2002; **198**: 3–14.
- [35] WRIGHT LS, LI J, CALDWELL MA, WALLACE K, JOHNSON JA, SVENDSEN CN. Gene expression in human neural stem cells: effects of leukemia inhibitory factor. *J Neurochem* 2003; **86**: 179–195.
- [36] SATO N, MEIJER L, SKALTSOUNIS L. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nature Med* 2004; **10**: 55–63.
- [37] OGAWA K, NISHINAKAMURA R, IWAMATSU Y, SHIMOSATO D, NIWA H. Synergistic action of Wnt and LIF in maintaining pluripotency of mouse ES cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006 Apr 28; **343**(1):159–166.
- [38] D'AMOUR KA, GAGE FH. Genetic and functional differences between multipotent neural and pluripotent embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **30**: 11866–11872.

*Redaktor prowadzący – Maciej Zabel*

*Otrzymano: 05.07. 2006 r.*

*Przyjęto: 07.09. 2006 r.*

*ul Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa,*

*e-mail: buzanska@cmdik.pan.pl, leonora.buzanska@jrc.it*