

Marzena Zychowicz



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

Rozprawa doktorska

Promotor:

Dr hab. Leonora Bużańska, prof. IMDiK

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego

PAN

*Warszawa 2012*

*Składam serdeczne podziękowania*

*mojej pani promotor*

**dr hab. Leonorze Bużańskiej**

*za nieocenioną pomoc merytoryczną, wyrozumiałość i cierpliwość,  
a także za wsparcie, jakiego mi udzieliła podczas kilkuletniej współpracy.*

*Serdecznie dziękuję wszystkim moim **Koleżankom i Kolegom***

*z **Zakładu Neurobiologii Naprawczej***

*za okazaną pomoc oraz wspierającą i twórczą atmosferę w pracy.*

*Chciałabym również podziękować dr Francois Rossi*

*oraz Dorze Mehn, Anie Ruiz i Sabrinie Gioria*

*za ogromną pomoc, życzliwość i wsparcie, jakiego udzielili podczas mojego pobytu w Isprze.*

*Mojemu **Mężowi***

*za cierpliwość i wiarę we mnie*

*oraz **Rodzicom** za pomoc w łączeniu życia naukowego i rodzinnego.*

Wyniki zamieszczone w niniejszej rozprawie doktorskiej częściowo ukazały się w następujących pracach:

1. Ruiz A, Buzanska L, Gilliland D, Rausher H, Sirghi L, Sobanski T, Zychowicz M, Ceriotti L, Bretagnol F, Coecke S, Colpo P, Rossi F (2008) Micro-stamped surfaces for the patterned growth of neural stem cells. *Biomaterials* 29: 4766-4774
2. Buzanska L, Ruiz A, Zychowicz M, Rausher H, Ceriotti L, Rossi F, Colpo P, Domanska-Janik K, Coecke S (2009) Patterned growth and differentiation of Human Cord Blood-derived Neural Stem Cells on bio-functionalized surfaces. *Acta Neurobiol Exp* 69: 1-14
3. Ruiz A, Zychowicz M, Buzanska L, Mehn D, Mills CA, Martinez E, Coecke S, Samitier J, Colpo P, Rossi F (2009) Single stem cell positioning on polylysine and fibronectin microarrays. *Micro and Nanosystems* 1: 50-56
4. Buzanska L, Zychowicz M, Ruiz A, Ceriotti L, Coecke S, Rausher H, Sobanski T, Wheland M, Domanska-Janik K, Colpo P, Rossi F (2010) Neural stem cells from human cord blood on bioengineered surfaces—Novel approach to multiparameter bio-tests. *Toxicology* 270:35-42
5. Zychowicz M, Mehn D, Ana Ruiz A, Colpo P, Francois Rossi F, Frontczak-Baniewicz M, Domanska-Janik K and Buzanska L.(2011) Proliferation capacity of cord blood derived neural stem cell line on different micro-scale biofunctional domains. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*71(1):12-23.

Badania, których wyniki przedstawiono w tej pracy były częściowo finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektu promotorskiego oraz grantu własnego dr hab. Leonory Bużańskiej, odpowiednio nr 2211/B/P01/2010/38 i nr 5978/B/P01/2010/38, a także przez Komisję Europejską Joint Research Centre w ramach projektów „NanoBiotechnology for Health” i „Validation for Consumer Products”.

## Spis treści

---

<b>Skróty używane w pracy</b> .....	8
<b>I. WSTĘP</b> .....	13
<b>1. Komórki macierzyste – definicja</b> .....	13
1.1. Zarodkowe komórki macierzyste.....	16
1.2. Somatyczne/dorosłe komórki macierzyste.....	18
1.3. Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste.....	19
<b>2. Neuralne komórki macierzyste</b> .....	19
2.1. Neuralne komórki macierzyste pochodzące z krwi pępowinowej – potencjalne źródło do wykorzystywania w medycynie regeneracyjnej.....	20
2.2. Linia ludzkich neuralnych komórek macierzystych pochodzących z krwi pępowinowej (HUCB-NSC) .....	20
<b>3. Mikrośrodowisko komórek macierzystych – nisza</b> .....	21
3.1. Definicja niszy komórek macierzystych.....	21
3.2. Fizykochemiczne właściwości macierzy zewnątrzkomórkowej i ich wpływ na różnicowanie komórek macierzystych.....	22
3.3. Nisza neuralnych komórek macierzystych .....	24
3.3.1. Struktura i funkcja niszy neuralnych komórek macierzystych.....	24
3.3.2. Najważniejsze szlaki sygnałowe neuralnych komórek macierzystych aktywowane sygnałami z niszy.....	26
3.3.3. Wpływ kształtu i struktury niszy na los neuralnych komórek macierzystych.....	30
<b>4. Powierzchnie (domeny) biofunkcjonalne</b> .....	31
4.1. Systemy mikroinżyneryjne stosowane w badaniach biologii komórek macierzystych.....	31
4.2. Kontrola składu i funkcjonalności domen .....	34
4.3. Porównanie domen biofunkcjonalnych 2D i 3D.....	35
<b>II. CEL PRACY</b> .....	37
<b>III. MATERIAŁ I METODY BADAŃ</b> .....	39

<b>1. Techniki mikroinżynieryjne zastosowane do badań procesów rozwojowych komórek macierzystych.....</b>	<b>39</b>
1.1. Przygotowanie powierzchni biofunkcyjnych techniką drukowania mikrokontaktowego.....	40
1.2. Przygotowanie powierzchni biofunkcyjnych techniką dozowania mikrokropli .....	42
1.2.1. Przygotowanie matryc (wzoru domen bioaktywnych) mikronakraplanych na platformach do wzrostu komórek.....	42
1.2.2. Dozowanie mikrokropli.....	43
<b>2. Analiza jakościowa powierzchni biofunkcyjnych.....</b>	<b>44</b>
2.1. Metody analizy powierzchni: Elipsometria i SPR.....	44
2.1.1. Elipsometria.....	45
2.1.2. SPR.....	46
<b>3. Neuralne komórki macierzyste izolowane z krwi pępowinowej.....</b>	<b>48</b>
3.1. Standardowa hodowla komórek HUCB-NSC.....	48
3.2. Hodowla komórek HUCB-NSC na domenach biofunkcyjnych.....	49
3.2.1. Hodowla HUCB-NSC na mikroplatformach wykonanych techniką drukowania mikrokontaktowego .....	49
3.2.2. Hodowla HUCB-NSC na mikroplatformach wykonanych techniką dozowania mikrokropli.....	47
<b>4. Badanie procesów rozwojowych komórek HUCB-NSC hodowanych na domenach biofunkcyjnych .....</b>	<b>50</b>
4.1. Plan wariantów doświadczalnych z wykorzystaniem powierzchni mikrodrukowanych i mikronakraplanych.....	50
4.1.1. Określenie morfologii komórek HUCB-NSC rosnących na poli-L-lizynie i fibronektynie.....	50
4.1.2. Badanie adhezji HUCB-NSC na wielokomórkowych mikrodrukowanych powierzchniach biofunkcyjnych.....	50
4.1.3. Badanie proliferacji HUCB-NSC na wielokomórkowych mikrodrukowanych powierzchniach biofunkcyjnych.....	50

4.1.4. Badanie różnicowania HUCB-NSC immobilizowanych do domen wielokomórkowych.....	51
4.1.5. Zmiany fenotypowe komórek HUCB-NSC rosnących na domenach pozycjonujących pojedyncze komórki.....	51
4.1.6. Różnicowanie komórek HUCB-NSC na mikronakraplanych domenach biofunkcjonalnych.....	51
<b>5. Analiza immunocytochemiczna komórek na domenach biofunkcjonalnych.....</b>	<b>54</b>
<b>6. Analiza mikroskopowa komórek na domenach biofunkcjonalnych.....</b>	<b>55</b>
6.1. Analiza z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego.....	53
6.2. Analiza z wykorzystaniem skaningowego mikroskopu elektronowego.....	56
<b>7. Analiza statystyczna.....</b>	<b>57</b>
<b>IV. WYNIKI.....</b>	<b>58</b>
<b>1. Rodzaje otrzymanych mikroplatform z powierzchnią biofunkcjonalną.....</b>	<b>58</b>
1.1. Geometria i skład powierzchni biofunkcjonalnej otrzymanej techniką mikrodrukowania.....	58
1.2. Geometria i skład powierzchni biofunkcjonalnej otrzymanej techniką dozowania mikrokropi.....	59
<b>2. Charakterystyka komórek HUCB-NSC w hodowli kontrolnej.....</b>	<b>60</b>
2.1. Analiza w kontraście fazowym komórek HUCB-NSC w warunkach standardowych i referencyjnych.....	60
2.2. Fenotyp HUCB-NSC w hodowli referencyjnej.....	61
2.2.1. Morfologia komórek rosnących w hodowli na poli-L-lizynie .....	61
2.2.2. Morfologia komórek rosnących w hodowli na fibronektynie .....	62
<b>3. Zastosowanie mikrodrukowanych powierzchni biofunkcjonalnych (matryc wielokomórkowych) w badaniu procesów rozwojowych HUCB-NSC.....</b>	<b>64</b>
3.1. Adhezja komórek HUCB-NSC po jednym dniu hodowli na powierzchniach mikrodrukowanych, pozycjonujących grupy komórek.....	64
3.2. Adhezja i różnicowanie komórek HUCB-NSC po siedmiu dniach hodowli na powierzchniach mikrodrukowanych, pozycjonujących grupy komórek.....	64

3.3. Analiza proliferacji HUCB-NSC na powierzchniach mikrodrukowanych, pozycjonujących grupy komórek.....	74
3.3.1. Proliferacja na domenach drukowanych poli-L-lizyną.....	74
3.3.2. Proliferacja na domenach drukowanych fibronektyną.....	76
3.3.3. Porównanie tempa proliferacji HUCB-NSC na fibronektynie i poli-L-lizynie, korelacja ze zdolnością do różnicowania.....	77
<b>4. Matryce jednokomórkowe w hodowli HUCB-NSC.....</b>	<b>80</b>
4.1. Charakterystyka jednokomórkowych domen biofunkcyjnych.....	80
4.2. Wpływ pozycjonowania komórek w domenach jednokomórkowych na morfologię i różnicowanie komórek HUCB-NSC.....	81
<b>5. Badanie procesów rozwojowych na domenach biofunkcyjnych mikronakraplanych.....</b>	<b>92</b>
5.1. Adhezja komórek HUCB-NSC do różnych białek macierzy zewnątrzkomórkowej na domenach mikronakraplanych.....	92
5.2. Badanie funkcjonalności domen bioaktywnych.....	93
5.2.1. Analiza strukturalna powierzchni domen bioaktywnych – Elipsometria.....	94
5.2.2. Analiza funkcjonalna powierzchni domen bioaktywnych – SPR.....	96
5.3. Wpływ białek sygnałowych na decyzje rozwojowe HUCB-NSC.....	99
5.3.1. Charakterystyka fenotypów komórek immobilizowanych do mikronakraplanych domen biofunkcyjnych.....	99
<b>V. DYSKUSJA.....</b>	<b>107</b>
<b>VI. PODSUMOWANIE WYNIKÓW.....</b>	<b>129</b>
<b>VII. WNIOSKI.....</b>	<b>131</b>
<b>VIII. STRESZCZENIE.....</b>	<b>132</b>
<b>IX. PIŚMIENNICTWO.....</b>	<b>137</b>

## SKRÓTY UŻYWANE W PRACY

---

AAS	- zestaw antybiotyków do hodowli komórkowej ( <i>ang. Antibiotic Antimycotic Solution</i> )
AFM	- mikroskop sił atomowych ( <i>ang. Atomic Force Microscope</i> )
Akt	- kinaza serynowo-treoninowa ( <i>ang. serine-threonine kinase</i> )
ANOVA	- analiza wariancji ( <i>ang. analysis of variance</i> )
bFGF	- zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, inaczej FGF2 ( <i>ang. Basic Fibroblast Growth Factor</i> )
B27	- suplement dodawany do pożywki hodowlanej
BDNF	- neurotropowy czynnik pochodzenia mózgowego ( <i>ang. Brain Derived Neurotrophic Factor</i> )
BMP	- Rodzina białek morfogenetycznych kości ( <i>ang. Bone Morphogenetic Protein</i> )
CamKII	- kalmodulino-zależna kinaza białkowa II
CD	- antygen powierzchniowy charakterystyczny dla określonego typu komórek ( <i>ang. Cell Determinant</i> )
CK1	- kinaza kazeinowa 1 ( <i>ang. Casein Kinase 1</i> )
cMyc	- gen regulatorowy kodujący czynnik transkrypcyjny, onkogen
CNTF	- czynnik neurotroficzny pochodzenia rzęskowego ( <i>ang. Ciliary Neurotrophic Factor</i> )
Cx43	- koneksyna 43
dBcAMP	- dwumaślan cyklicznego AMP, drugorzędowy przekaźnik sygnału wewnątrzkomórkowego ( <i>ang. Dibutyryl cyclic AdenozynoMono Phosphoran</i> )
DIV	- dni hodowli in vitro ( <i>ang. Days In Vitro</i> )
Dkk1	- białko sekrecyjne, antagonistą ścieżki Wnt ( <i>ang. Dickkopf-related protein 1</i> )
Dll-1	- ligand receptora Notch ( <i>ang. Delta-like 1</i> )
DMEM/F12	- pożywka hodowlana ( <i>ang. Dulbecco/Vogt Modified Eagle's Minimal Essential Medium</i> )
ECM	- macierz zewnątrzkomórkowa ( <i>ang. Extracellular Matrix</i> )
EGF	- naskórkowy czynnik wzrostu ( <i>ang. Epithelial Growth Factor</i> )
ESC	- zarodkowe komórki macierzyste ( <i>ang. Embryonic Stem Cells</i> )
FBS	- bydlęca surowica płodowa ( <i>ang. Fetal Bovine Serum</i> )



FGFR1	- receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu ( <i>ang. Epithelial Growth Factor- Receptor1</i> )
FITC	- pochodna fluoresceiny ( <i>ang. fluorescein isothiocyanate</i> )
FN	- fibronektyna
G0	- faza spoczynkowa cyklu komórkowego
GalC	-galaktozyloceramidaza, antygen oligodendrocytów ( <i>ang. galactosylceramidase</i> )
GFAP	- glejowe kwaśne białko włóknikowe ( <i>ang. Glial Fibrillary Acidic Protein</i> )
GSK3 $\beta$	- kinaza syntazy glikogenu 3 $\beta$ ( <i>ang. Glycogen Synthase Kinase 3 beta</i> )
H	- duża gęstość wysiania komórek ( <i>ang. High: 50 000/cm<sup>2</sup></i> )
Hes	- czynnik transkrypcyjny ( <i>ang. Hairy and enhancer of split-1</i> )
HUCB-NSC	- linia ludzkich neuralnych komórek macierzystych pochodząca z krwi pępowinowej ( <i>ang. Human Umbilical Cord Blood derived Neural Stem Cells</i> )
ID1	- białko hamujące wiązanie się do DNA białek typu HLH (helix-loop-helix) ( <i>ang. Inhibitor of DNA binding 1</i> )
Il-6	- interleukina 6
iPSC	- indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste ( <i>ang. induced Pluripotent stem Cells</i> )
ITS	- suplement zawierający Insulinę-Transferynę-Selenian
Jag 2	- białko Jagged-2, ligand Notch
Ki67	- białko obecne w jądrach komórek aktywnych mitotycznie
KLF 4	- białko kodowane przez ludzki gen KLF4 ( <i>ang. Krueppel-like factor 4</i> )
L	- mała gęstość wysiania komórek ( <i>ang. Low: 10 000/cm<sup>2</sup></i> )
LIF	- czynnik hamujący białaczkę ( <i>ang. Leukemia Inhibitory Factor</i> )
LRP5/6	- białko koreceptorowe z rodziny LDL ( <i>ang. Low-density lipoprotein receptor-related protein 5</i> )
M	- średnia gęstość wysiania komórek (25 000/cm <sup>2</sup> )
Map-2	- białko stabilizujące mikrotubule ( <i>ang. Microtubule Associated Protein 2</i> )
MeHgCl	- chlorek metylortęci
NGF	- czynnik wzrostu nerwów ( <i>ang. Nerve Growth Factor</i> )
NF-200	- neurofilament tzw. ciężki, o masie molekularnej 200kDa ( <i>ang. 200 kDa Neurofilament protein</i> )

NT3	- neurotrofina trzecia
NSC	- neuralne komórki macierzyste ( <i>ang. Neural Stem Cells</i> )
NICD	- wewnątrzkomórkowa domena receptora Notch ( <i>ang. Notch Intracellular Domain</i> )
NGS	- normalna surowica kozia ( <i>ang. Normal Goat Serum</i> )
Oct3/4	- czynnik transkrypcyjny charakterystyczny dla pluripotencjalnych komórek macierzystych ( <i>ang. Octamer-binding transcription factor-3/4</i> )
PBS	- buforowana sól fizjologiczna ( <i>ang. Phosphate-Buffered Saline</i> )
PCR	- reakcja łańcuchowa polimerazy ( <i>ang. Polymerase Chain Reaction</i> )
PDMS	- Poli(dimetylosiloksan)
PEG	- glikol polietylenowy
PEO	- antyadhezyjna warstwa tlenku polietylenu ( <i>ang. Poly-Ethylene-Oxide</i> )
PEDF	- czynnik wzrostu pochodzący z nabłonka barwnikowego ( <i>ang. Pigment Epithelium-Derived Factor</i> )
PGA	- kwas poliglikolowy
PHSRN	- domena łącząca się z integrzynami, tzw. miejsce synergistyczne (aminokwasy: prolina- histydyna- seryna- arginina- kwas asparaginowy)
PI3	- kinaza fosfatydyloinozytolu-3 ( <i>ang. Phosphoinositide 3-kinase</i> )
PLA	- kwas polimlekowy ( <i>ang. Polylactic Acid</i> )
PLGA	- kopolimer kwasów glikolowego i mlekowego ( <i>ang. Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)</i> ).
PLL	- poli-L-lizyna
PMMA	- poli(metakrylan metylu) [ <i>ang. Poly(Methyl Methacrylate)</i> ]
Ptc	- transbłonowe białko tworzące wraz z białkiem Smo receptor dla białka Shh ( <i>ang. Patched</i> )
REST/NRSF	- białko represorowe łączące się z DNA genów neuronalnych ( <i>ang. RE1-Silencing transcription Factor/ Neuron Restrictive Silencing Factor</i> )
RGD	- sekwencja aminokwasowa zawierająca argininę, glicynę i kwas asparaginowy, typowa dla białek macierzy zewnątrzkomórkowej
Rho/Rac	- białko należące do rodziny małych białek G ( <i>ang. Ras homologous/ małe białko G z rodziny Rho</i> )
RPM	- obroty na minutę ( <i>ang. Revolutions Per Minute</i> )

RT-PCR	- reakcja odwrotnej transkrypcji ( <i>ang. Reverse Transcription PCR</i> )
S100 $\beta$	- białko cytoplazmatyczne dojrzałych astrocytów ( <i>ang. S100 calcium binding protein B</i> )
SC	- komórka macierzysta ( <i>ang. Stem Cell</i> )
SD	- odchylenie standardowe ( <i>ang. Standard Deviation</i> )
SE	- błąd standardowy ( <i>ang. Standard Error</i> )
SF	- pożywka bezsurowicza ( <i>ang. Serum Free</i> )
SGZ	- strefa podziarnista ( <i>ang. Subgranular Zone</i> )
Shh	- jedno z trzech białek rodziny hedgehog ( <i>ang. Sonic hedgehog</i> )
SMAD	- wewnątrzkomórkowe białka biorące udział w transdukcji sygnału za pośrednictwem TGF $\beta$ ( <i>ang. Sma oraz MAD występujących u C. elegans i D.melanogaster</i> )
Smo	- białko receptorowe związane z białkiem G, stanowiące receptor dla Shh ( <i>ang. Smoothened</i> )
SOX-2	- czynnik transkrypcyjny charakterystyczny dla pluripotencjalnych i neuralnych komórek macierzystych ( <i>ang. SRY, sex determining region Y, -box 2</i> )
SPR	- powierzchniowy rezonans plazmonowy ( <i>ang. Surface Plasmon Resonance</i> )
SSEA 3/4	- antygen powierzchniowy charakterystyczny dla macierzystych komórek zarodkowych ( <i>ang. Stage Specific Embryonic Antygen</i> )
SVZ	- strefa okołokomorowa ( <i>ang. Subventricular Zone</i> )
TAC	- komórki przejściowo namnażające się ( <i>ang. Transient Amplifying Cells</i> )
Tcf/LEF	- czynniki transkrypcyjne biorące udział w przekaźnictwie sygnału ścieżki Wnt ( <i>ang. T-cell factor/lymphocyte enhancer factor</i> )
TGF $\beta$	- transformujący czynnik wzrostu $\beta$ ( <i>ang. Transformation Growth Factor <math>\beta</math></i> )
Tof-SIMS	- spektrometria mas jonów wtórnych z analizatorem czasu przelotu ( <i>ang. Time of flight Secondary Ion Mass Spectroscopy</i> )
Tra-1-60/ Tra-1-81	- antygeny powierzchniowe charakterystyczne dla komórek pluripotencjalnych ( <i>ang. keratan sulfate antigen</i> )
TRPC1	- kanał błonowy z rodziny kationowo-selektywnych kanałów jonowych ( <i>ang. Transient Receptor Potential channel 1</i> )
TUJ	- przeciwciało skierowane przeciwko $\beta$ tubulinie III obecnej w neuronach

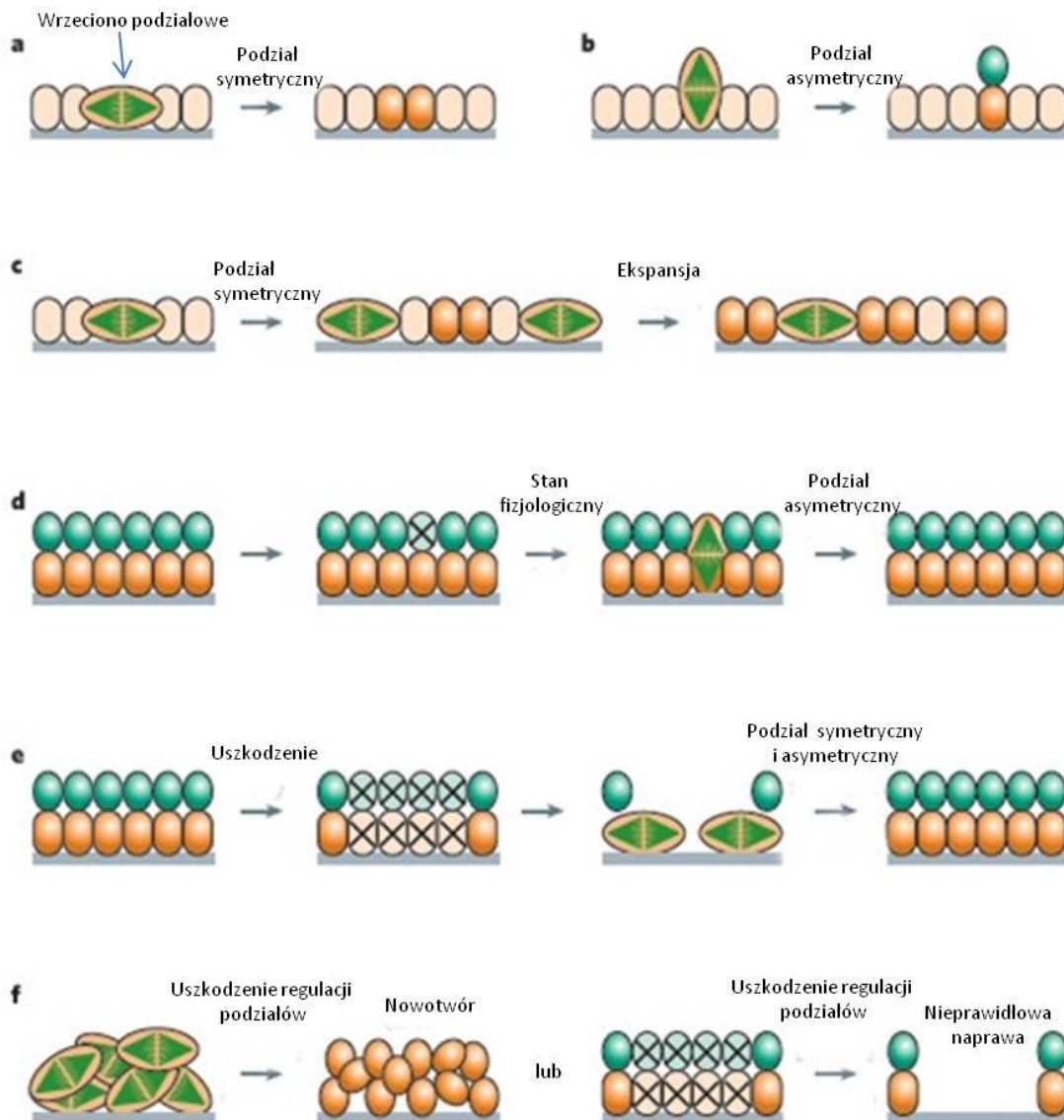
- Wnt - białka biorące udział w regulacji embriogenezy i w wielu procesach w dorosłych komórkach (*ang. wingless-type MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) integration site family member*)
- $\beta$ -tubulina III - neuronalne białko neurofilamentowe
- $\Delta R$  - współczynnik odbicia fali

# I. Wstęp

---

## 1. Komórki macierzyste – definicja

Termin „komórka macierzysta” (ang. Stem Cells, SC) pojawił się prawie 50 lat temu w badaniach nad regeneracją szpiku kostnego (Pillow i wsp., 1966). Określenie to charakteryzuje komórki zdolne do samoodnowy, jak i do generowania zróżnicowanych fenotypów komórek krwiotwórczych w żywym organizmie. Komórki macierzyste również dla wielu innych tkanek stanowią źródło wewnętrznego systemu naprawczego i decydują o możliwości utrzymania homeostazy w tkance. Dzielą się bez ograniczeń i uzupełniają brakujące komórki tak długo, jak dany organizm żyje. Po podziale komórki potomne albo zachowują właściwości komórki macierzynej (podział symetryczny, Ryc. 1a), albo tylko jedna z nich pozostaje identyczna z komórką matki, a druga różnicuje się w bardziej wyspecjalizowaną komórkę, typową dla określonej tkanki organizmu (podział asymetryczny Ryc. 1b). O wielkości puli komórek macierzystych w tkance organizmu rozwijającego się i dorosłego decyduje kinetyka podziałów i proporcja między podziałami symetrycznymi i asymetrycznymi. Uwarunkowane jest to funkcją fizjologiczną danej tkanki. Podczas rozwoju organizmu dominują zwykle podziały symetryczne SC (Ryc. 1c). W tkankach dorosłych przeważają podziały asymetryczne (Ryc. 1d), a kinetyka tych podziałów zależy od szybkości wymiany puli komórek zróżnicowanych, typowej dla danej tkanki w warunkach fizjologicznych. Na przykład w naskórku, nabłonku krypt jelitowych lub krwi taka wymiana zachodzi szybko (u człowieka, co godzinę ulega wymianie około 10 miliardów krwinek, a czas potrzebny do wymiany całej populacji komórek nabłonka jelitowego wynosi 3–6 dni), a tym samym aktywność mitotyczna SC jest większa niż np. w tkance nerwowej. Podczas regeneracji ubytku tkanki komórki macierzyste najpierw podejmują podziały symetryczne w celu uzupełnienia swojej puli wyjściowej, następnie kontynuują podziały asymetryczne, które są źródłem komórek różnicujących się (Ryc. 1e). W warunkach patologicznych (np. nowotworzenia) regulacja kontroli symetrii podziałów komórkowych jest nieprawidłowa, co może przyczyniać się do niekontrolowanego wzrostu liczby komórek (Ryc. 1f) (Morrison i Kimble, 2006).



Ryc.1 Fakultatywność podziałów symetrycznych i asymetrycznych komórek macierzystych (na przykładzie tkanki nabłonkowej). Komórki macierzyste mogą dzielić się symetrycznie dając dwie identyczne komórki potomne (a) bądź asymetrycznie produkując komórki potomne różniące się (b). Zdolność przełączania się komórek macierzystych między podziałami symetrycznymi i asymetrycznymi jest kluczowa dla zachowania homeostazy i potencjału regeneracyjnego tkanki. W trakcie rozwoju organizmu dominują podziały symetryczne, zwiększające pulę komórek potomnych o właściwościach komórki wyjściowej (c), natomiast w tkankach dojrzałych uzupełnianie populacji komórek odbywa się poprzez asymetryczny podział komórki macierzystej (d). W przypadku uszkodzenia tkanki komórki macierzyste namnażają się dzięki podziałom symetrycznym, następnie po podziale asymetrycznym produkują komórki różnicujące się (e). Defekty w procesie regulacji podziałów komórek macierzystych skutkują nieograniczonym przyrostem komórek lub niewłaściwą naprawą tkanki (f). Linia szara – błona podstawna, względem której następuje polaryzacja podziału (ustawienie wrzeciona kariokinetycznego). Zmodyfikowany na podstawie Morrison i Kimble, 2006.

Komórki macierzyste w warunkach prawidłowych występują głównie w stanie tzw. „uśpienia” nawet w tkankach zdolnych do szybkiej odnowy. Na przykład dużą zdolność odnowy szpiku zapewnia pozostawanie większości komórek macierzystych w fazie spoczynkowej G0 cyklu. Wyjście takich komórek z fazy G0 i podjęcie aktywności mitotycznej jest zwykle regulowane sygnałem zewnątrzkomórkowym z niszy, np. indukowanie proliferacji prekursorów w trzustce pod wpływem insuliny, w nabłonku macicy i gruczołów piersiowych pod wpływem cyklicznego wyrzutu hormonów (Joshi i wsp., 2010). Udowodniono również, że bodźce patologiczne wywołują proliferację komórek macierzystych: w jądrach, pod wpływem napromieniowania ocalałe komórki macierzyste zostają zaindukowane do podziałów, odbudowując populację zniszczonych komórek macierzystych i spermatogoniów (Spradling i wsp., 2001), w mózgu pod wpływem urazu dochodzi do aktywacji endogennej neurogenezy (Arvidsson i wsp., 2002, Minger i wsp., 2007).

Różnicowanie komórek macierzystych w określonym kierunku zależy od aktywności czynników regulacyjnych wewnątrzkomórkowych (genetycznych i epigenetycznych) jak również od sygnałów zewnętrznych, pochodzących z otaczającego środowiska. O losie komórek macierzystych decyduje szereg czynników obecnych w niszy komórkowej, takich jak związki chemiczne wytwarzane przez inne komórki (czynniki morfogenne i mitogenne, hormony, neuroprzekaźniki), fizyczny kontakt z komórkami sąsiadującymi (receptory i ich ligandy) i składniki macierzy zewnątrzkomórkowej (białka, proteoglikany) tworzącej dane środowisko. Tkanki charakteryzują się określoną hierarchią podziałów i różnicowania, ale podziały komórek macierzystych, nawet w tkankach, w których kinetyka wymiany komórkowej jest wysoka, zachodzą stosunkowo rzadko, produkując komórki przejściowo namnażające się (tzw. TAC, ang. transient-amplifying cells). Dopiero TAC intensywnie dzielą się i zwiększają pulę komórek zdolnych do różnicowania (Pikuła i Trzonowski 2009). Pozwala to na klonalne namnożenie komórek potomnych i zminimalizowanie ryzyka mutacji powstających podczas replikacji DNA w długo żyjących komórkach macierzystych (Riquelme i wsp., 2008).

Zdolność komórek macierzystych do tworzenia całego organizmu wraz z błonami płodowymi, zwana totipotencjalnością, charakteryzuje zygotę i powstałe z jej podziału

komórki potomne do stadium ośmiokomórkowej moruli (Wobus i Boheler 2006), u człowieka znany jest przypadek sześcioraczków jednojajowych. Komórki pluripotencjalne nie mają zdolności tworzenia struktur pozazarodkowych, ale biorą udział w tworzeniu wszystkich trzech listków zarodkowych i ich pochodnych. Kolejne w hierarchii rozwojowej komórki multipotencjalne dają początek komórkom ukierunkowanym tkankowo, natomiast komórki unipotencjalne, inaczej zwane prekursorowymi, różnicują się jedynie w jeden typ komórek tkankowo swoistych (Fortier i wsp., 2005).

### 1.1. *Zarodkowe komórki macierzyste*

Komórki pluripotencjalne, znajdujące się w węźle zarodkowym blastocysty, określane są jako zarodkowe komórki macierzyste (ang. Embryonic Stem Cells, ESC) i mają zdolność do nieograniczonego wzrostu *in vitro*, a także do różnicowania we wszystkie tkanki dorosłego organizmu. ESC charakteryzują się aktywnością swoistych czynników transkrypcyjnych, takich jak Oct-4, Nanog i Sox2, które stanowią główne elementy systemu regulującego utrzymanie stanu pluripotencjalności poprzez hamowanie transkrypcji genów związanych z różnicowaniem komórki. Zarodkowe komórki macierzyste charakteryzują się również występowaniem antygenów powierzchniowych z grupy glikolipidów, takich jak SSEA3 (*Stage Specific Embryonic Antygen*) i SSEA4 oraz Tra-1-60 i Tra-1-81 (*keratan sulfat antigen*). Dowodem funkcjonalnym pluripotencjalnego charakteru zarodkowych komórek macierzystych jest ich zdolność do wytwarzania potworniaków, czyli łagodnych guzów nowotworowych zbudowanych z komórek wywodzących się z wszystkich trzech listków zarodkowych. Niekontrolowana możliwość wielokierunkowego różnicowania w trzy listki zarodkowe, a także niestabilność genetyczna są problemem, który należy rozwiązać przed wprowadzeniem komórek zarodkowych do terapii klinicznych. Poza tym użycie komórek pochodzących z ludzkiego zarodka może stwarzać kontrowersje etyczne, które skutkują, tak jak w Polsce, zakazami prawnymi ich stosowania.



## 1.2. Somatyczne /dorosłe komórki macierzyste

„Dorosłe” komórki macierzyste to komórki niezróżnicowane, zlokalizowane w tkankowych niszach komórek macierzystych w bezpośrednim sąsiedztwie komórek zróżnicowanych, w organizmach postnatalnych. Podczas fizjologicznej wymiany, a także po uszkodzeniu i w sytuacjach patologicznych komórki macierzyste „dorosłe” są zdolne do utrzymania swojej populacji na stałym poziomie i mogą różnicować się w komórki wyspecjalizowane tkankowo. Aby podkreślić ich niezarodkowe pochodzenie, w odniesieniu do dorosłych komórek macierzystych, używa się również określenia „somatyczne”. „Somatyczne” SC jest pojęciem szerszym niż „dorosłe” SC, ponieważ uwzględnia również komórki macierzyste tkanek rozwijającego się zarodka. Somatyczne/dorosłe komórki macierzyste są multipotencjalne, czyli charakteryzują się ograniczonym potencjałem do różnicowania. Somatyczne komórki macierzyste zidentyfikowano w każdej tkance rozwijającego się zarodka (faza prenatalna) oraz w organizmie człowieka dorosłego.

Już pod koniec XIX wieku wykazano w szpiku kostnym istnienie prekursorowych komórek niekrwiotwórczych (Cohnheim, 1867, Fehrer i Lepperdinger, 2009). W latach następnym XX wieku naukowcy odkryli, że szpik kostny zawiera dwa rodzaje komórek macierzystych. Jedna populacja, nazwana hematopoetycznymi komórkami macierzystymi, tworzy wszystkie typy komórek krwi. Druga populacja, nazwana komórkami macierzystymi zrębu szpiku kostnego (*bone marrow stromal stem cells*) bądź komórkami mezenchymalnymi, może dać początek nie tylko komórkom zrębu szpiku, ale także komórkom kości, chrząstki, tłuszczu oraz tkanki łącznej (Ashton i wsp., 1980, Friedenstein i wsp., 1967). Źródłem mezenchymalnych komórek macierzystych może być również krew obwodowa, tkanki płodu (krew pępowinowa i galareta Whartona ze sznura pępowinowego) czy tkanka tłuszczowa (Barry i Murphy, 2004). Komórki te charakteryzuje określona kompozycja antygenów powierzchniowych, takich jak: CD14-, CD19-, CD34-, CD45, CD 105+, CD 90+, CD73+ oraz zdolność do przylegania do plastiku (Feng i Chen, 2009). Obecnie wiadomo, że somatyczne komórki macierzyste można wyizolować z każdej tkanki dorosłego organizmu człowieka (Bieback i Brinkmann 2010, Crisan i wsp., 2008).

### 1.3. *Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste*

W 2006 roku Takahashi i Yamanaka opisali sposób otrzymywania komórek o właściwościach komórek zarodkowych z dojrzałych, zróżnicowanych komórek somatycznych, np. fibroblastów izolowanych ze skóry myszy i człowieka. Naukowcy sprawdzili 24 geny odpowiedzialne za utrzymywanie stanu pluripotencjalności i samoodnowy zarodkowych komórek macierzystych i zauważyli, że wprowadzenie zaledwie czterech z nich do komórek somatycznych wystarczy do ich przeprogramowania w komórki o charakterze zarodkowym (Takahashi i Yamanaka, 2006). Do terminalnie zróżnicowanych komórek, przy pomocy retrowirusów wprowadzono geny Oct3/4, Sox2, c-Myc i Klf4, uzyskując w ten sposób tzw. indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (*induced pluripotent stem cells, iPSC*). Obecność czynnika transkrypcyjnego c-MYC, działającego na globalną acetylację histonów, umożliwiło przyłączanie się czynnikom OCT3/4 i SOX2 do swych specyficznych miejsc wiązania, a wprowadzenie KLF4 przyczyniło się do aktywacji charakterystycznego dla ESC białka NANOG. Tak otrzymane indukowane komórki pluripotencjalne posiadały właściwości zarodkowych komórek macierzystych, zarówno pod względem ekspresji genów jak i morfologii tworzących się kolonii, czy też (funkcjonalnie) zdolności do indukowania potworniaków (Takahashi i Yamanaka 2006). Było to przełomowe odkrycie, które pozwoliło na otrzymywanie ludzkich komórek o szerokim potencjale do różnicowania, bez użycia kontrowersyjnego etycznie materiału, jakim są zarodki. Jednak ciągle nierozwiązaną pozostaje kwestia kierunkowego i jednocześnie stabilnego różnicowania iPSC w pożądanym kierunku, a także dopracowania standardowej techniki indukcji pluripotencjalności. Wydajne metody reprogramowania, jako główny nośnik wprowadzanych genów wykorzystują wektory, takie jak lentivirusy, elementy retrowirusów, czy systemy transpozazy (Takahashi i Yamanaka 2006, Woltjen i wsp., 2009), które wbudowują transgen do genomu komórki, zaburzając tym samym jej metabolizm, co może prowadzić do mutacji, a w konsekwencji do nowotworzenia. Z drugiej strony stosowanie systemów nieintegrujących z genomem (wektor adenowirusowy, czy modyfikowane białka) jest mało wydajne (Graf i Stadtfeld i wsp., 2008, Kolanowski i Kurpisz 2010, Zhou i wsp., 2009). Problem zastosowania komórek macierzystych otrzymanych z komórek somatycznych pacjenta w medycynie regeneracyjnej spersonalizowanej jest niezwykle istotny naukowo i społecznie, dlatego spowodował

lawinowe badania w tym kierunku na całym świecie. Poszukiwanie bezpiecznych metod reprogramowania, które nie będą powodować trwałych modyfikacji genomu (Kim i wsp., 2009, Maherali i wsp., 2008) przybliżyła możliwość zastosowania iPSC w klinice.

## 2. Neuralne komórki macierzyste

W latach sześćdziesiątych dwudziestego wieku, naukowcy badający mózgi szczurów odkryli w nich dzielące się komórki, które różnicowały się w neurony (Altman 1963). Poza tymi doniesieniami aż do lat dziewięćdziesiątych odrzucano możliwość powstawania w dorosłym mózgu ssaków nowych komórek neuralnych. Ciągłe aktualny był dogmat Ramona y Cajal, mówiący, że „po zakończonym rozwoju układu nerwowego dalszy wzrost i regeneracja aksonów nie jest już możliwy, wszystko może umrzeć, natomiast nic nie może się zregenerować” (Colucci-D'Amato i wsp., 2006). W 1995 roku w mózгах szczurów odkryto proliferujące komórki, które nie tylko w warunkach *in vivo*, ale również w hodowli *in vitro* różnicowały się w neurony i komórki glejowe (Alvarez-Buylla i Loci, 1995). Pierwsze dowody na to, że zachodzi aktywna neurogeneza w mózgu człowieka dostarczyła grupa Gage'a z Salc Institute w Kalifornii w 1998 roku. Naukowcy zidentyfikowali i zlokalizowali w dorosłym mózgu człowieka obszary o aktywnej i ciągłej neurogenzie (Eriksson i wsp., 1998): strefę okołokomorową komór bocznych (SVZ, ang. subventricular zone) oraz strefę podziarnistą obszaru zakrętu zębatego hipokampa (SGZ, subgranular zone). Są to obszary stanowiące niszę endogenną dla neuralnych komórek macierzystych (ang. Neural Stem Cells, NSC) człowieka, które mogą różnicować się w neurony, astrocyty i oligodendrocyty (Doetsch, 2003b).

Neuralne komórki macierzyste występujące w mózgu dorosłych ssaków wykazują podstawowe cechy komórek macierzystych: podlegają samoodnowie oraz jako komórki multipotencjalne tworzą zarówno neurony, jak i makroglej (astrocyty i oligodendrocyty). W warunkach laboratoryjnych (*in vitro*) neuralne komórki macierzyste mogą być hodowane w obecności czynników wzrostowych (EGF, bFGF, NGF czy BDNF) i neuromorfofenów, zarówno jako hodowla adherentna, jak też w postaci swobodnie pływających kolonii komórkowych, tzw. neurosfer (Temple, 2001, van Praag, 2000). Los i decyzje rozwojowe tych komórek zależą od otaczającego je mikrośrodowiska (niszy) (Riquelme i wsp., 2008).

## *2.1. Neuralne komórki macierzyste pochodzące z krwi pępowinowej – potencjalne źródło do wykorzystywania w medycynie regeneracyjnej*

Pozyskiwanie neuralnych komórek macierzystych z ludzkiego mózgu i wykorzystanie ich w celach terapeutycznych jest praktycznie niemożliwe. W związku z tym od lat trwają poszukiwania źródła komórek macierzystych, które z jednej strony nie budzi kontrowersji etycznych, a z drugiej strony jest dogodne zarówno pod względem dostępności, jak i bezpieczeństwa i może być zastosowane w leczeniu układu nerwowego. Atrakcyjnym źródłem takich komórek są populacje somatycznych komórek macierzystych w szpiku kostnym i w krwi pępowinowej, ponieważ wykazano, że w hodowli *in vitro*, po odpowiedniej stymulacji osiągają charakter komórek neuralnych (Bużańska i wsp. 2001, 2002, Sanchez-Ramos i wsp., 2001). Neuralne komórki macierzyste izolowane z krwi pępowinowej wykazują ekspresję mRNA charakterystycznego dla genów aktywnych w neuronach (np.  $\beta$  tubulina III, MAP2, neurofilament 200) i komórkach glejowych (np. GFAP, S100b, Gal C) (Bużańska i wsp., 2002, Sanberg i wsp., 2005, Zigova i wsp., 2002).

## *2.2. Linia ludzkich neuralnych komórek macierzystych pochodzących z krwi pępowinowej (HUCB-NSC)*

W Zakładzie Neurobiologii Naprawczej IMDiK PAN otrzymano nietransformowaną linię neuralnych komórek macierzystych z ludzkiej krwi pępowinowej (HUCB-NSC - Human Umbilical Cord Blood Neural Stem Cells) (Bużańska i wsp. 2002, 2006). Linię wyprowadzono z frakcji komórek jednojądrzastych ludzkiej krwi pępowinowej, po pierwotnym wyeliminowaniu progenitorów hematopoetycznych CD34+, a następnie wielokrotnej selekcji komórek nieprzylegających, w obecności EGF i 10% surowicy bydlęcej (Bużańska i wsp. 2006). Komórki linii charakteryzują się stabilnym kariotypem oraz wzrostem klonalnym i utrzymywane są w hodowli na różnych etapach rozwojowych: jako komórki przylegające do podłoża, o charakterze progenitorów neuralnych, różnicujących się spontanicznie w pożywce z niską zawartością surowicy, oraz jako komórki wolno pływające niezróżnicowane, które w warunkach hodowli bezsurowiczej z dodatkiem EGF tworzą agregaty (neurosfer). Badania RT-PCR, jak i analiza mikromacierzy DNA, wykazały obecność ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne, uważanych za markery pluripotencjalności, takich jak Oct3/4, Sox2, Nanog. Wykazano również zwiększoną ekspresję Notch3, Jag2, Wnt5a, Frizzled, FGFR1,

NF200, SV2 i Tau, a także białek Nestyny, NF200, GFAP, GalC, świadczących o neuralnie ukierunkowanym multipotencjalnym charakterze linii. Podziały komórkowe, typowe dla komórek macierzystych (zarówno symetryczne jak i niesymetryczne) umożliwiają nieograniczony wzrost linii HUCB-NSC (Bużańska i wsp., 2006a,b, Domańska-Janik i wsp., 2008, Jurga i wsp., 2006, 2009).

Badania elektrofizjologiczne zróżnicowanych komórek linii HUCB-NSC potwierdziły występowanie cech charakterystycznych dla neuronów, m. in. funkcjonalnych kanałów jonowych i napięciowozależnych, podobnych do obserwowanych w dojrzewającym układzie nerwowym (Sun i wsp., 2005) oraz zdolność do formowania elektroaktywnych, funkcjonalnych sieci neuronalnych, wykazujących potencjał czynnościowy (Jurga i wsp., 2009).

### **3. Mikrośrodowisko komórek macierzystych - nisza**

#### *3.1. Definicja niszy komórek macierzystych*

Terminu 'nisza' w kontekście wyspecjalizowanego środowiska zawierającego ludzkie hematopoetyczne komórki macierzyste po raz pierwszy użyto w 1978 (Shoefield 1978, Fuchs i wsp., 2004). W ciągu całego życia osobniczego mikrośrodowisko (nisza) wspomaga samoodnowę oraz różnicowanie komórek macierzystych (Fuchs i wsp., 2004, Spradling i wsp., 2001). Oddziaływania międzykomórkowe oraz sygnałowe czynniki rozpuszczalne stanowią kluczowe elementy w zwrotnym interakcji i kontroli aktywacji oraz różnicowania komórek macierzystych przez składniki niszy. Badania Fullera i współpracowników (Fuller i Spradling, 2007) nad komórkami określanymi jako 'hub' (komórki węzła) w niszy płciowych komórek macierzystych u *Drosophila* wykazały istnienie oddziaływań między komórkami macierzystymi, a innymi komórkowymi składnikami niszy. Zaobserwowano, że komórki płciowe utrzymują swoje funkcje tak długo, jak długo są zakotwiczone do komórek 'hub'. Po podziale, komórka, która straciła to połączenie wchodzi na drogę różnicowania - staje się oocytem lub spermatocytem. Podobne zależności występują w niszach szpiku kostnego ssaków, między komórkami hematopoetycznymi, a sąsiadującymi chondrocytami (Yin i Li.,

2006) lub między komórkami nabłonkowymi, a komórkami macierzystymi jelita (Walker i wsp., 2008).

Komórki macierzyste wewnątrz niszy są często zakotwiczone do błony podstawnej lub do komórek podporowych/zrębu (stromal cells), co pozwala na ukierunkowanie przestrzennego podziału tych komórek (Ryc.1). Białka macierzy zewnątrzkomórkowej i glikoproteiny błony podstawnej mogą gromadzić, a następnie wydzielać specyficzne czynniki w formie nieaktywnej bądź aktywnej (Riquelme i wsp., 2008). Zakotwiczenie komórek w błonie podstawnej, a także informacja pochodząca od komórek sąsiadujących, mogą określać położenie centrosomów komórki macierzystej, warunkując rodzaj podziału komórkowego (symetryczny vs asymetryczny) oraz segregację czynników determinujących losy komórek potomnych (Fuchs i wsp. 2004, Riquelme i wsp., 2008). Częsteczki sygnałowe występujące w niszy, to zarówno czynniki rozpuszczalne, jak i cząsteczki związane trwale z błoną komórkową, takie jak Wnt, Notch czy białko Sonic hedgehog (Shh) (Shi i wsp., 2008). Ta skomplikowana, ale dobrze zharmonizowana sieć sygnałowa, w jakiej tkwią komórki macierzyste reguluje ich profil transkrypcyjny, utrzymując komórki w stanie niezróżnicowanym, bądź inicjując ich różnicowanie (Massirer i wsp., 2011).

### *3.2. Fizykochemiczne właściwości macierzy zewnątrzkomórkowej i ich wpływ na różnicowanie komórek macierzystych*

W warunkach *in vivo* macierz zewnątrzkomórkowa (ang. Extracellular Matrix, ECM) jest czynnie wydzielana przez komórki i stopniowo organizowana we włókienkową sieć, która łączy się z zakotwiczonymi w błonie komórkowej receptorami integrynowymi. Specyficzne miejsca tego wiązania zawierają (między innymi) argininę, glicynę i kwas asparaginowy, stanowiąc tzw. domenę RGD występującą na fibronektynie i innych białkach macierzy. Macierz zewnątrzkomórkowa dodatkowo tworzy wiązki włókienek, które regulują pozycję miejsc wiązania dla komórek. Dostępność domen RGD (i innych domen wiążących integryny do białek macierzy zewnątrzkomórkowej) oraz rearanżacja integryn pozwalają komórce na 'odczuwanie' struktury macierzy zewnątrzkomórkowej i zróżnicowaną odpowiedź komórkową (Engler i wsp., 2006). W badaniach *in vitro* stwierdzono, iż sama manipulacja topografią powierzchni ECM, bez zastosowania specyficznych białek sygnałowych, może wpływać na losy komórek. Wykazano, iż obecność pojedynczych dołków o głębokości

120nm, na powierzchni hodowlanej wykonanej z poli(metakrylanu metylu) (PMMA) w porównaniu do gładkiej powierzchni substratu, spowodowała pojawianie się w komórkach mezenchymalnych białek charakterystycznych dla wapnienia kości (Dalby i wsp., 2007a). Również stosowane *in vitro* nanowłókna tytanowe, różniące się średnicą, wpływają na zmiany kształtu i różnicowanie komórek mezenchymalnych. W komórkach mezenchymalnych hodowanych na włóknach o średnicy 100nm obserwowano pojawianie się osteokalcyny i osteopontyny, świadczących o różnicowaniu kostnym, natomiast włókna o mniejszym przekroju (30nm) indukowały proliferację tych komórek (Oh i wsp., 2009). Struktura powierzchni wpływa także na wzór różnicowania szczurzych neuralnych komórek macierzystych. Komórki rosnące na chitozanowej gładkiej powierzchni dzielą się i różnicują głównie w astrocyty. Struktura trójwymiarowa chitozanowego szkieletu oraz włókna wykonane z tego samego materiału powodują osłabienie proliferacji i zwiększone różnicowanie neuronalne (Wang i wsp., 2010). Zastosowanie pokrytych żelatyną powierzchni o strukturze nanometrowych rowków (350nm szerokości), indukowało markery neuralne, takie jak nestyna,  $\beta$ -tubulina III, czy MAP-2 w ludzkich zarodkowych komórkach macierzystych (Lee i wsp., 2010). Macierz zewnątrzkomórkowa charakteryzuje się też określoną elastycznością, której modyfikacja *in vitro* wpływa na różnicowanie komórek macierzystych. Używając syntetycznego hydrożelu naukowcy zaobserwowali, że adhezja, samoodnowa oraz różnicowanie neuralnych komórek macierzystych na bardzo miękkim podłożu żelowym były zahamowane, natomiast bardziej sprężysty hydrożel indukował różnicowanie neuronalne. Najwięcej komórek  $\beta$ -tubulina III-pozytywnych obserwowano na powierzchni o sprężystości podobnej do tkanki mózgowej, natomiast podłoże najtwardsze prowadziło do różnicowania w kierunku glejowym (Saha i wsp., 2007).

Mechanizm oddziaływania topografii i struktury powierzchni na proliferację i różnicowanie komórek macierzystych nie jest dobrze poznany. Wydaje się jednak, że zasadniczą rolę odgrywa cytoszkielet, którego struktura i organizacja jest wrażliwa na przestrzenne uwarunkowania macierzy zewnątrzkomórkowej (Guilak i wsp., 2009). Opisano zmiany w organizacji białek cytoszkieletu takich, jak F-aktyna, wimentyna  $\gamma$ -tubulina i  $\alpha$ -tubulina pod wpływem kształtu i struktury podłoża, na którym komórki rosły. Zmiany w proliferacji i morfologii komórek były zależne od czynników zaburzających szkielet aktynowy

(Gerecht i wsp., 2007). W przekazywanie sygnałów mechanicznych pochodzących z ECM są również włączone czynniki transkrypcyjne oraz enzymy przebudowujące chromatynę bezpośrednio zaangażowaną w ekspresję genów (Dalby i wsp., 2007b, Engler i wsp., 2006). Za przekazywanie sygnału z macierzy zewnątrzkomórkowej do wnętrza komórki odpowiedzialne są też kanały jonowe regulowane napięciem błony oraz osmolarnością. Wykazano, że np. kanał TRPC1, regulowany mechanicznym rozciągnięciem błony, pełni istotną rolę w procesie rozwoju neuronalnego, oddziałując na proliferację neuralnych komórek macierzystych, przeżycie komórek ziarnistych mózdku, synaptogenezę i kierunkowanie wzrostu aksonów w mózgach gryzoni (Fiorio Pla i wsp., 2005, Tai i wsp., 2009). Badania te potwierdzają ważny wpływ, jaki mogą wywierać czynniki fizyczne na los komórek macierzystych znajdujących się w niszy tkankowej.

### *3.3. Nisza neuralnych komórek macierzystych*

#### 3.3.1. Struktura i funkcja niszy neuralnych komórek macierzystych

Jak już wspomniano, w dojrzałym mózgu powstawanie nowych komórek neuralnych odbywa się głównie w strefie okołokomorowej i podziarnistej hipokampa. Obydwa te rejony stanowią integralną część tkanki mózgowej, bez wyraźnej bariery odgraniczającej strefy neurogenne od komórek zróżnicowanych (Kazanis i wsp., 2008). Z obszarów neurogennych sukcesywnie wymigrowują nowe neurony zasiedlając opuszkę węchową (migracja z SVZ)(Doetsch i wsp., 1999) oraz warstwę ziarnistą zakrętu zębatego hipokampa (migracja z SGZ)(Seri i wsp., 2001).

W poszczególnych strefach neurogennych *in vivo* wyróżniono dwa różne typy neuralnych komórek macierzystych. W przestrzeni okołokomorowej w rozwijającym się mózgu, są to komórki wolno dzielące się, tzw. progenitory pierwotne, zwane glemjem promienistym (ang. radial glia), wykazujące obecność GFAP i CD133 (komórki typu B), natomiast w strefie podziarnistej hipokampa są to komórki gleju promienistego, GFAP+, Sox2+ i Nestyna+, nazywane też komórkami typu 1 (Mu i Gage 2010). W niszy oprócz neuralnych komórek macierzystych można znaleźć ich potomstwo: prekursorów przejściowo namnażające się (ang. transient amplifying cell) i neuroblasty, a także komórki śródbłonkowe



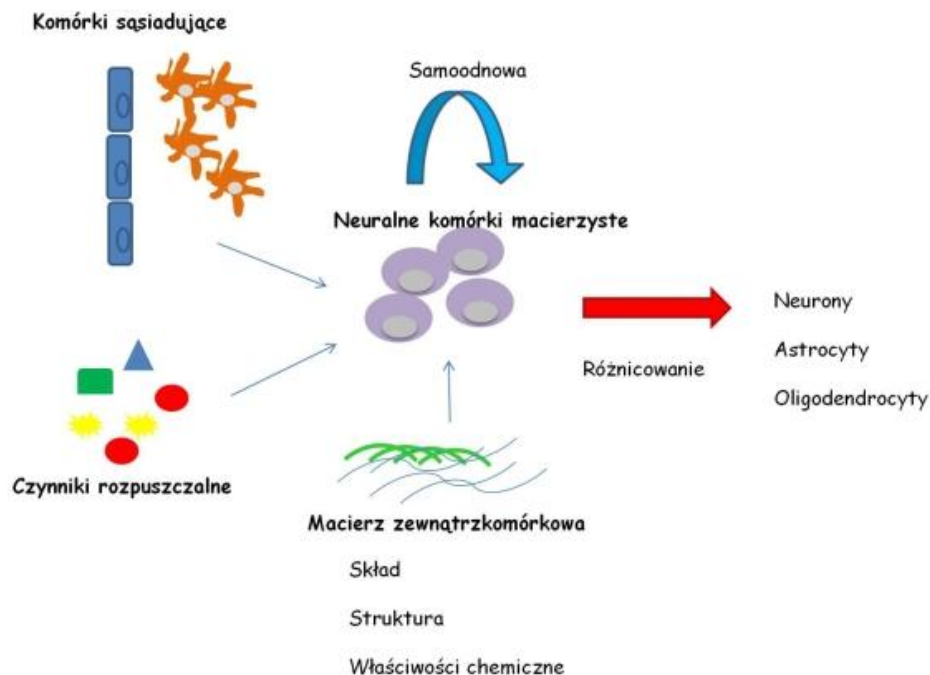
naczyń krwionośnych (Kazanis i wsp., 2008). Dodatkowo, w niszy neuralnych komórek macierzystych, przestrzeń od strony komór oddziela warstwa wyściółki komór – ependyma. Komórki gleju promienistego z jednej strony penetrują warstwę ependymocytów i bezpośrednio kontaktują się z płynem mózgowo-rdzeniowym za pomocą rzęsek (cilia), z drugiej tworzą długie wypustki dochodzące do ścian naczyń krwionośnych (Berninger, 2010). Na rzęsce stwierdzono obecność receptorów dla morfogenu Sonic hedgehog (Shh), co świadczy o bezpośrednim wpływie sygnałów pochodzących z przestrzeni płynowych mózgu na neurogenezę (Han i wsp., 2008).

W niszy SVZ komórki wyściółki komór mózgu (ependymocyty) pełnią funkcje podporowo-regulacyjne, modulując transport jonów i innych czynników pochodzących z płynu mózgowo-rdzeniowego (Bruni i wsp., 1998, Kazanis i wsp., 2008). Komórki wyściółki są także źródłem czynników neurogennych, takich jak czynnik wzrostu pochodzący z nabłonka barwnikowego (pigment epithelium-derived factor PEDF), czy białko noggin – proneuralny modulator (antagonista) ścieżki BMP (Lim i wsp., 2000, Peretto i wsp., 2004). Komórki wyściółki tworzą z astrocytami połączenia szczelinowe ('gap junction') w przestrzeni podwyściółkowej (SEZ) (Zahs, 1998). Wymienione elementy komórkowe wraz ze składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej tworzą trójwymiarowe rusztowanie dla neuralnych komórek macierzystych (Owen i Shoichet, 2010).

W naturalnej niszy los NSC jest determinowany całym zestawem oddziaływań z innymi komórkami, macierzą zewnątrzkomórkową i z modulującymi związkami rozpuszczalnymi (białka sygnałowe, czynniki wzrostowe, neuroprzekaźniki) (Ryc.2). Obecność składników ścieżki sygnałowej Notch (Notch i Jagged) udowodniono zarówno w przestrzeni podwyściółkowej (SEZ), jak i podziarnistej (SGZ) (Stump i wsp., 2002). Oddziaływania międzykomórkowe mogą być dodatkowo regulowane połączeniami międzybłonowymi z udziałem kadheryn lub połączeń szczelinowych, tworzonych przez koneksyny, jednakże ich rola w niszach NSC ciągle wymaga wyjaśnienia (Graf i Stadfeldt, 2008).

Badania *in vitro* potwierdzają wpływ komórek śródbłonkowych naczyń - endotelium, na los macierzystych komórek neuralnych (Shen i wsp., 2004). Komórki endotelium oddziałują z NSC zarówno przez bliskie sąsiedztwo, ale także jako źródło czynników kontrolujących neurogenezę: PEDF, LIF, BDNF (Riquelme i wsp., 2008). Podziały neuralnych

komórek macierzystych zależą od ich kontaktu z komórkami potomnymi, a także od kontaktu z komórkami astrogleju, które tworzą sieć przekazującą informacje z dalszych obszarów mózgu (Giaume i Venance 1998), będąc tym samym swoistym czujnikiem integrującym całe mikrośrodowisko komórek macierzystych (Kazanis i wsp., 2010).



Ryc.2. Schemat wzajemnych interakcji w niszy neuralnych komórek macierzystych. Na los komórek macierzystych (zarówno *in vivo* jak i *in vitro*) wpływają kontakty międzykomórkowe, zarówno pomiędzy samymi komórkami macierzystymi jak i komórkami sąsiadującymi, czynniki rozpuszczalne wydzielane parakrynnie jak również docierające z zakończeń nerwowych i naczyń włosowatych, a także macierz zewnątrzkomórkowa – jej skład, struktura i właściwości fizykochemiczne. Sygnały płynące z niszy stymulują komórki macierzyste do podjęcia decyzji rozwojowych: stanu „uśpienia”, samoodnowy czy różnicowania.

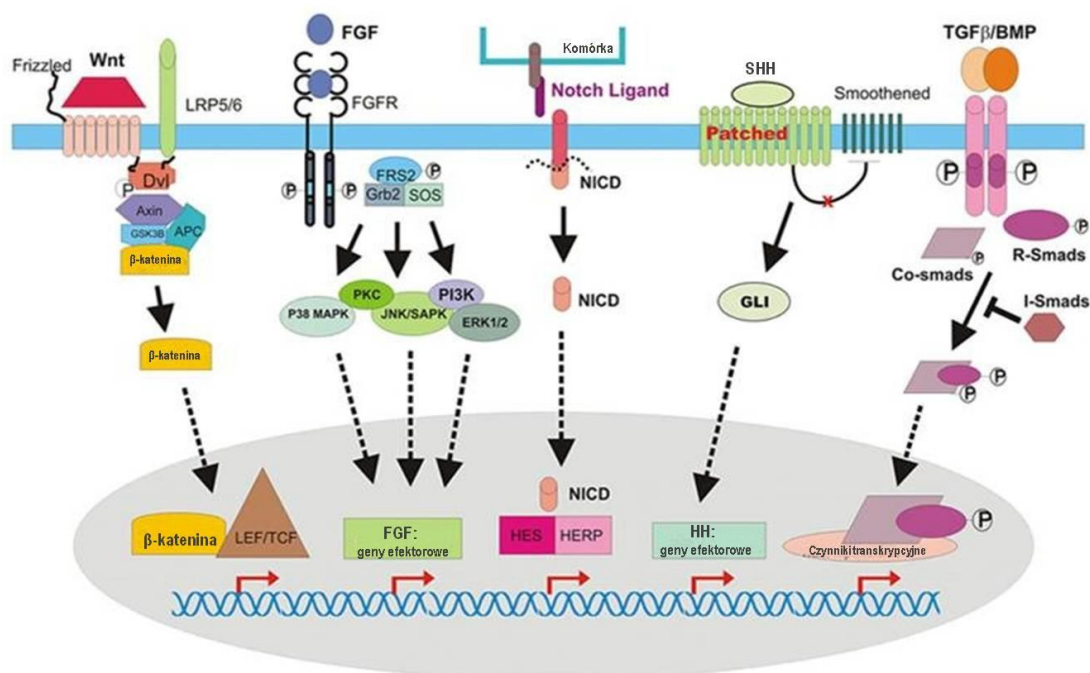
### 3.3.2. Najważniejsze szlaki sygnałowe neuralnych komórek macierzystych aktywowane sygnałami z niszy

Odpowiedź neuralnych komórek macierzystych na stan fizjopatologiczny mózgu jest uzależniona od sygnałów regulacyjnych dochodzących do niszy (Ryc.2). Jak wcześniej wspomniano, czynniki wzrostu i białka sygnałowe mogą pochodzić z samej niszy (Shh,Wnt,

Notch) bądź ze źródeł zewnętrznych, takich jak naczynia krwionośne (PEDF, LIF, BDNF) czy płyn mózgowo-rdzeniowy (ścieżka sygnałowa BMP/Noggin) (Ryc.3).

### Szlak sygnałowy Notch

Aktywacja ścieżki sygnałowej Notch następuje w momencie połączenia receptora błonowego, znajdującego się na komórce z ligandem Delta, zakotwiczonym w błonie sąsiadującej komórki. Połączenie to poprzez aktywację preseniliny gamma prowadzi do proteolitycznego usunięcia wewnątrzkomórkowej domeny NICD receptora Notch, która po przemieszczeniu do jądra komórkowego łączy się z czynnikiem transkrypcyjnym CSL i reguluje ekspresję genów efektorowych, np. białek z rodziny Hes (Shi i wsp., 2008). Białko Notch i jego ligandy pojawiają się w rozwoju embrionalnym i występują w dorosłym ośrodkowym układzie nerwowym, gdzie kontrolują neurogenezę, wzrost aksonów i dendrytów, regulują plastyczność synaps oraz przeżycie i śmierć neuronów. Białka te są również zaangażowane w procesy patologiczne uszkodzenia i naprawy mózgu w przebiegu udaru czy choroby Alzheimerera. Biorą też czynny udział w procesie nowotworzenia (Lathia i wsp., 2008).



Ryc.3. Schemat głównych ścieżek sygnałowych, takich jak Wnt/β-katenina, Notch, Sonic hedgehog, FGF czy BMP, mogących brać udział w różnicowaniu komórek macierzystych (zmodyfikowano na podstawie Deng i wsp., 2008).

### Szlak sygnałowy Wnt

Kolejnym szlakiem odgrywającym istotną rolę w rozwoju układu nerwowego jest kaskada sygnałów związana z białkami Wnt. Białka Wnt są rozpuszczalnymi, bogatymi w cysteinę glikoproteinami wydzielanymi pozakomórkowo, które uczestniczą w regulacji dojrzewania na niemal każdym etapie rozwoju układu nerwowego. Białka Wnt kontrolują między innymi segmentację cewy nerwowej i wielkość puli neuralnych komórek macierzystych oraz wpływają na dalsze losy komórek potomnych, przez kierunkowanie wzrostu aksonów, rozwój dendrytów i tworzenie synaps. Ta różnorodność oddziaływań, często przeciwstawnych, związana jest z istnieniem dwóch różnych ścieżek sygnałowych Wnt, oddziaływujących z wieloma innymi złożonymi sygnałami komórkowymi oraz cząsteczkami docelowymi (Katoh i Katoh, 2010).

Znane są dwa szlaki sygnałowe związane z białkami Wnt. W tzw. ścieżce kanonicznej białko Wnt łączy się z receptorem FRIZZLED i koreceptorem LRP5/6 powodując uwolnienie GSK3 $\beta$  i w konsekwencji przyczynia się do akumulacji nieufosforylowanej  $\beta$ -kateniny w cytoplazmie. Nieufosforylowana  $\beta$ -katenina przedostaje się do jądra komórkowego i tworzy kompleksy z różnymi czynnikami transkrypcyjnymi, między innymi z Tcf/LEF (T-cell factor/lymphocyte enhancer factor). Kompleks ten pod wpływem oddziaływania  $\beta$ -kateniny z represorem staje się aktywatorem i przy pomocy cząsteczek regulatorowych indukuje ekspresję genów docelowych (Ryc. 3).

Druga ścieżka Wnt, tzw. niekanoniczna, składa się przynajmniej z dwóch szlaków wewnątrzkomórkowych: Wnt/PCP (ang. Planar Cell Polarity) i szlaku zależnego od jonów wapnia (Wnt/Ca<sup>2+</sup>). Związanie Wnt z receptorem FRIZZLED w szlaku Wnt/PCP aktywuje GTPazę Rho/Rac, przez co reguluje ekspresję genów odpowiedzialnych za organizację cytoszkieletu w trakcie rozwoju. W szlaku Wnt/Ca<sup>2+</sup> połączenie Wnt z receptorem pobudza białko G i fosfolipazę C, powodując wzrost poziomu wewnątrzkomórkowego wapnia i aktywację kinaz zależnych od tego jonu: kalmodulino-zależnej kinazy białkowej II (CamKII) i kinazy białkowej C. Prowadzi to w efekcie do aktywacji specyficznych regulatorów transkrypcji, np. biorących udział w określeniu polaryzacji i ruchu komórek. Nie jest jasne, czy dwie ścieżki Wnt (kanoniczna i niekanoniczna) działają jednocześnie, czy też są odrębnymi szlakami, zależnymi od stadium rozwojowego komórki i otaczającego środowiska. Ścieżka

Wnt ma więc szereg receptorów, koreceptorów oraz zewnątrzkomórkowych modulatorów. Jednym z jej antagonistów jest białko Dickkopf-1 (Dkk1), które wiąże się do koreceptora LRP5/6, i jest inhibitorem kanonicznej ścieżki sygnałowej (Michaelidis i wsp., 2008).

#### Szlak sygnałowy Shh

Białko Sonic hedgehog (Shh) należy do małej rodziny białek regulatorowych, które odgrywają kluczową rolę w przebiegu organogenezy oraz ustalaniu symetryczności i parzystości kończyn. W ludzkim zarodku białko Shh produkowane jest w cewie nerwowej, mózgu, jelicie i w zawiązkach kończyn (Villavicencio i wsp., 2000). Po wydzieleniu, białko Shh ulega autoproteolizie i modyfikacjom lipidowym (dołączenie cząsteczki cholesterolu) (McMahon 2000). Następnie łączy się z kompleksem białek transbłonowych Patched (Ptc) i Smoothed (Smo), które tworzą receptor związany z białkiem G. Zapoczątkowana w ten sposób kaskada sygnału aktywuje czynnik transkrypcyjny z rodziny Gli, co uruchamia ekspresję genów docelowych, w tym również genów Ptc i Gli (Traiffort i wsp., 2000) (Ryc. 3). Aktywacja określonych czynników transkrypcyjnych zależy od przestrzennej (gradient stężenia białka) i czasowej (fazy rozwoju) ekspozycji komórek na białko Shh (Ribes i Briscoe 2009).

#### Szlak sygnałowy BMP

Rodzina białek morfogenetycznych kości (ang. Bone Morphogenetic Protein, BMP) należy do nadrodziny transformujących czynników wzrostu  $\beta$  (ang. Transforming Growth Factor  $\beta$ , TGF $\beta$ ). Białka te zaangażowane są w regulację proliferacji, różnicowania i apoptozy podczas embriogenezy. W organizmach dorosłych BMP utrzymują homeostazę, uczestniczą w przemodelowaniu i regeneracji tkanek oraz, w zależności od typu i umiejscowienia, wpływają różnorodnie na komórki macierzyste (Zhang i Li 2005). Białka BMP indukują różnicowanie komórek w szpiku kostnym, kościach, nerkach i płucach, a w mysich zarodkowych komórkach macierzystych utrzymują samoodnowę i pluripotencjalność (Gossrau i wsp., 2007, Ying i wsp., 2003), blokując różnicowanie neuralne (Zhang i Li 2005).

Białko BMP łączy się z TGF $\beta$ R aktywując białka SMAD, prowadząc do ich translokacji do jądra komórkowego i indukując transkrypcję genów. W zależności od etapu rozwojowego NSC aktywacja ścieżki sygnałowej BMP może wywierać odmienny efekt (Miller i Gauthier

2007, Olszewska 2010). Poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego ID1 hamuje indukcję neurogenezy (Ying i wsp., 2003), natomiast stymulacja procesu gliogenezy następuje po indukcji syntezy czynnika REST/NRSF (RE1-Silencing transcription Factor/ Neuron Restrictive Silencing Factor) (Sabo i wsp., 2010). W ścieżce sygnałowej BMP istnieją połączenia ze szlakiem Wnt/b-katenina oraz szlakiem FGF.

### 3.3.3. Wpływ kształtu i struktury niszy na losy neuralnych komórek macierzystych

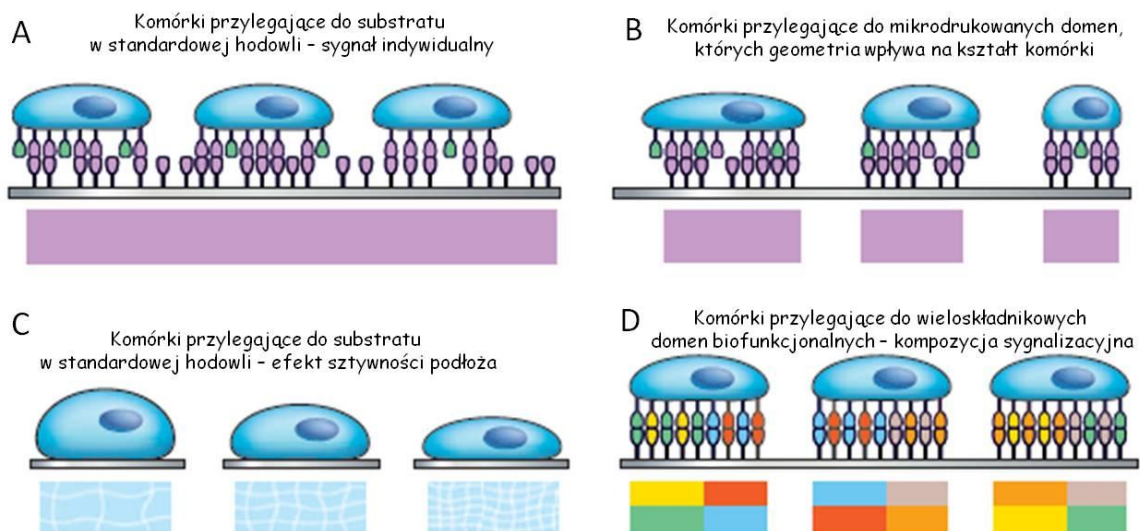
Macierz zewnątrzkomórkowa to trójwymiarowa, wielopoziomowa struktura, podtrzymująca komórki tworzące tkankę i pośrednicząca w układach regulacyjnych. ECM składa się z tkankowo specyficznych białek włóknistych, proteoglikanów i glikozaminoglikanów (siarczan heparyny, chondroityny i keratanu, kwas hialuronowy) tworzących wysoce hydrofilne środowisko. Białka włókniste, takie jak kolagen, fibronektyna (FN), czy laminina zawierają miejsca wiązania dla czynników wzrostu, proteaz, a także dla białek błonowych – integryn. Taki skład i architektura macierzy zewnątrzkomórkowej to nie tylko mechaniczne wsparcie dla komórek, ale także rezerwuar białek o właściwościach sygnałowych. Laminina 1, 10, fibronektyna i kolagen IV wchodząc w interakcje z innymi czynnikami regulują przeżycie, adhezję, migrację i różnicowanie komórek (Chothia i wsp., 1997, Freire i wsp., 2002, Powell i Kleinman 1997). Badania *in vivo* i *in vitro* dowiodły, że zarówno w trakcie rozwoju, jak i w ukształtowanej przestrzeni niszy neuralnych komórek macierzystych ekspresja podjednostek integrynowych na błonach komórkowych podlega zmianie, co wpływa na ich oddziaływanie z lamininą, fibronektyną i kolagenem, odpowiedzialnymi za utrzymywanie puli NSC w niszy i ich różnicowanie. W trakcie rozwoju zarodkowego, w pierwotnym mikrośrodowisku neuralnych komórek macierzystych dominują rozpuszczalny czynnik wzrostu bFGF (ang. basic Fibroblast Growth Factor) i laminina, oddziałujące z  $\alpha 5\beta 1$  podjednostką integryny, przez co utrzymywana jest homogenna populacja komórek macierzystych. W późniejszym etapie rozwoju ośrodkowego układu nerwowego, NSC zaczynają dojrzewać i migrować tworząc warstwy kory. Stwierdzono, że proces ten koreluje ze zmianą profilu ekspresji podjednostek integrynowych z  $\alpha 6\beta 1$  na  $\alpha 5\beta 1$  oraz z modyfikacją macierzy zewnątrzkomórkowej, polegającą na zwiększeniu ekspresji fibronektyny oraz na zmniejszeniu poziomu bFGF (Stabenfeldt i wsp., 2010).

Badania te dowodzą, że nisza komórek macierzystych jest strukturą dynamiczną, która ulega zmianom pod wpływem określonych warunków zarówno rozwojowych jak i patologicznych. Zjawisko to można wykorzystać w medycynie regeneracyjnej, sterując procesami odnowy i plastyczności tkanki (Lo Celso i wsp., 2009). Projektowanie sztucznej macierzy zewnątrzkomórkowej, z wykorzystaniem fizycznych i molekularnych właściwości jej składników, umożliwi bezpośrednią kontrolę reakcji komórek macierzystych, a w przyszłości tworzenie funkcjonalnych substytutów tkankowych (Guilak i wsp., 2009).

## **4. Powierzchnie (domeny) biofunkcjonalne**

### *4.1. Systemy mikroinżynieryjne stosowane w badaniach biologii komórek macierzystych*

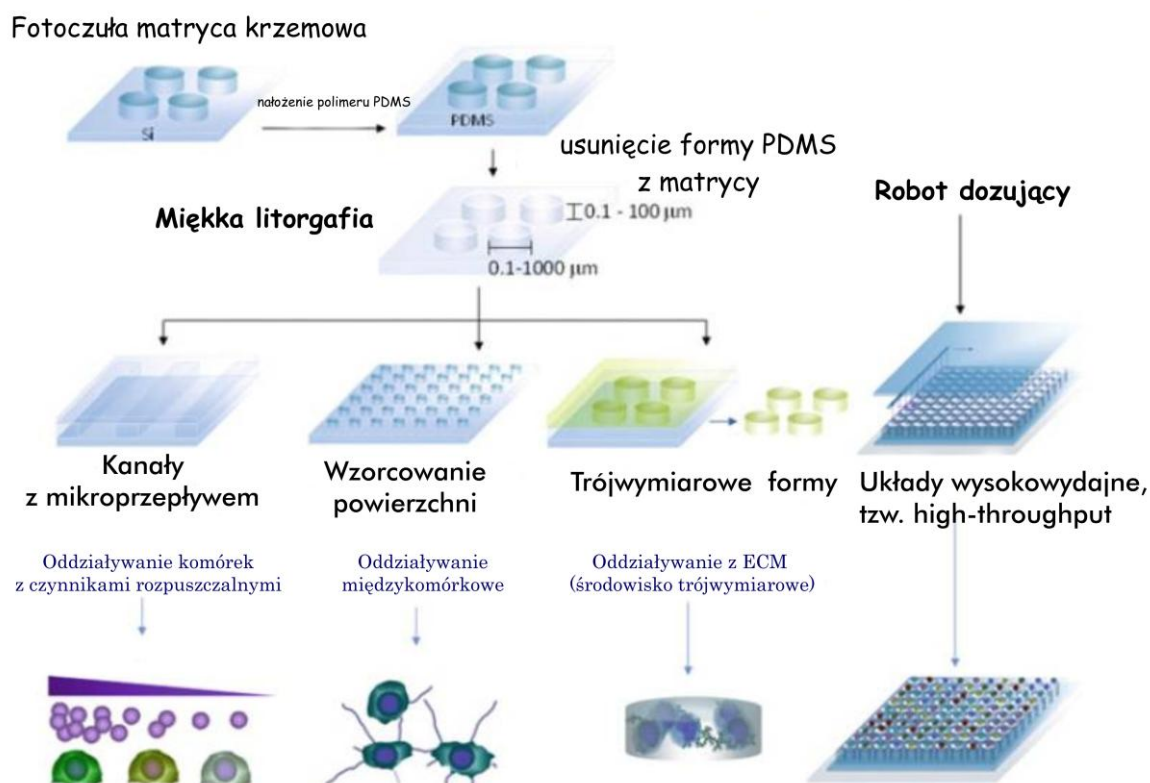
Hodowle komórek macierzystych *in vitro* prowadzone są zwykle w płaskich systemach dwuwymiarowych. Podłoże stanowi najczęściej: plastik, plastik pokryty białkami macierzy zewnątrzkomórkowej (laminina, kolagen), współhodowle z komórkami odżywcymi (tzw. feeder-cell layer) oraz inne pochodne białek ECM (kolagen, Matrigel). W standardowych warunkach hodowli komórkowej *in vitro*, najczęściej stosowane są polistyrenowe naczynia hodowlane i pożywki zawierające rozpuszczalne czynniki odżywcze, zapewniające komórkom podstawowe składniki do wzrostu. Taki sztuczny układ *in vitro* różni się całkowicie od środowiska, w jakim komórki macierzyste przebywają w naturalnej niszy tkankowej (Lutolf i wsp., 2009). Dlatego w badaniach dotyczących biologii komórek macierzystych ważne jest przejście z systemów dwu- do trójwymiarowych. Etapem przejściowym do modeli trójwymiarowych jest prowadzenie hodowli na dwuwymiarowych systemach biomateriałowych. Stanowi to dobry, uproszczony model służący do identyfikowania i oceny efektów działania składników niszy, które mogą wpływać na los komórek macierzystych i umożliwiają badanie mechanizmów molekularnych leżących u podstaw oddziaływania komórek macierzystych z niszą komórkową (Ryc.4).



Ryc.4 Modelowanie powierzchni biofunkcyjnych poprzez tworzenie dwuwymiarowych surogatów nisz komórek macierzystych. W hodowli standardowej sygnał pochodzi od jednorodnego substratu w oddziaływaniu komórek z powierzchnią (A), na mikrodrukowanych powierzchniach biofunkcyjnych geometria domen określa kształt komórki (B), zastosowanie substratu o różnej sztywności może wpływać na morfologię i fenotyp komórek (C), na komórki hodowane na domenach wieloskładnikowych ma wpływ kompozycja sygnałacyjna. Opracowano na podstawie Lutolf i wsp., 2009.

W ostatnich latach zanotowano wzrost zainteresowania systemami bioinżynieryjnymi stosowanymi w badaniach nad komórkami macierzystymi. Niekiedy systemy te osiągają bardzo zaawansowane technologicznie formy. Obecnie stosuje się systemy wytwarzane i oddziałujące na komórki w mikroskali 'nano'. Są to między innymi: nanolitografie, na których umieszcza się rowki, dołki lub słupki o różnych wymiarach (od 3 do 500 nanometrów). Inne systemy to: nanowłókna węglowe lub polimerowe, wytwarzane metodą tzw. elektrowirowania (ang. electrospinning), których skomplikowane sploty mogą odzwierciedlać ułożenie włókien w błonie podstawnej i samoorganizujące się (ang. self-assembly) systemy nanocząstek, tworzące nanowłókna sferyczne, cylindryczne micelle lub trójwymiarowe sieci (Mao i wsp. 2010).





Ryc.5 Schemat tworzenia systemów mikroinżynieryjnych mających zastosowanie w badaniach z udziałem komórek macierzystych. Matryca krzemowa służy do wyprodukowania za pomocą miękkiej litografii polimerowej formy zawierającej układ domen biofunkcyjnych zarówno dwuwymiarowych jak i formach umożliwiających hodowle trójwymiarowe. Wykorzystanie automatycznego robota dozującego umożliwia stworzenie układów wieloskładnikowych, mających zastosowanie w wysokowydajnych systemach, tzw. „high-throughput analysis”. Opracowano na podstawie Bae i wsp., 2010.

Biofunkcjonalizacja powierzchni, czyli nadawanie systemowi cech mających określone funkcje, może być prowadzona w skali mikro (Ryc.4). Istnieje wiele technik mikroinżynierii. Jedną z nich jest mikrofabrykacja, która do tworzenia powierzchni z określonym wzorem, (mikrokanaly, mikrodołki czy trójwymiarowe formy hydrożelowe) wykorzystuje metodę miękkiej litografii (Ryc.5).

W niniejszej pracy wykorzystywane są dwie techniki mikroinżynieryjne: drukowania mikrokontaktowego oraz dozowania mikrokropli na określonej powierzchni wzorcowej.

Technika drukowania mikrokontaktowego pozwala na naniesienie nano-cienkiego filmu określonej substancji antyadhezyjnej na powierzchnię szklaną lub plastikową o zróżnicowanym kształcie, zarówno dwu- jak i trójwymiarowo (Bretagnol i wsp., 2006), a następnie „wydrukowanie” na tej powierzchni zaprojektowanych domen bioaktywnych.

Metoda dozowania mikrokropli umożliwia naniesienie na powierzchnię antyadhezyjną kropli o określonej wielkości, przy pomocy automatycznego robota nakrapiającego (ang. robotic spotter).

#### *4.2. Kontrola składu i funkcjonalności domen*

Powierzchnie biofunkcjonalne wytworzone metodami mikroinżynieryjnymi, opisanymi powyżej, wymagają sprawdzenia ich jakości i funkcjonalności (Ceriotti i wsp., 2009). Stabilność i jakość domen można sprawdzić technikami takimi, jak:

- spektrometria mas jonów wtórnych z analizatorem czasu przelotu (ang. Time of flight secondary ion mass spectroscopy, ToF-SIMS), określająca stabilność wzoru matrycy i topografii domen (np. pod wpływem płukania w PBS), czyli obecności biomolekuł i braku adsorpcji między domenami, na powierzchni antyadhezyjnej;
- mikroskop sił atomowych (ang. Atomic Force Microscope, AFM), pozwala uwidocznić rozkład oraz orientację cząsteczek stosowanych biomolekuł, ze zdolnością rozdzielczą rzędu wymiarów pojedynczego atomu;
- metoda elipsometrii, wykorzystująca zmianę w odbiciu fal elektromagnetycznych od badanej powierzchni informuje o ilości zdeponowanego białka, pokazuje mapę grubości domen zdeponowanych na powierzchni antyadhezyjnej;
- powierzchniowy rezonans plazmonowy (ang. Surface Plasmon Resonance, SPR) wykorzystujący zmiany w odbiciu fal elektromagnetycznych, umożliwia pomiar adsorpcji białka na badanej powierzchni w trakcie manipulacji, np. przepłukiwania powierzchni bądź nakładania specyficznych dla badanych biomolekuł przeciwciał.

Wyżej wymienione metody pomiarowe są bardzo precyzyjne, pozwalają na obliczenie ilości cząsteczek stosowanej biomolekuły przypadającej na domenę oraz ilość miejsc wiązania dostępnych dla komórki (np. miejsc z sekwencją aminokwasową RGD).

### 4.3. Porównanie domen biofunkcjonalnych 2D i 3D

Techniki mikroinżynieryjne znalazły również zastosowanie w tworzeniu trójwymiarowych struktur przeznaczonych do hodowli komórek macierzystych. Możliwe jest wytwarzanie szkieletów zarówno syntetycznych, powstałych na bazie np. kwasu poliglikolowego (PGA), polimlekowego (PLA) i ich ko-polimerów (PLGA), hydrożeli glikolu polietylenowego (PEG), samoorganizujących się nanowłókien peptydowych (Dawson i wsp., 2008, Gelain i wsp., 2006), jak i pochodzenia naturalnego (zawierających np. kolagen, fibrynogen, kwas hialuronowy, glikozaminoglikan czy hydroksyapatyt). Oprócz szkieletów stosowane są również inne mikronośniki komórek (mikrosfery czy mikrokapsułki). Struktury trójwymiarowe mogą podlegać dodatkowym modyfikacjom, np. dzięki ustawieniu warunków polimeryzacji biomateriałów można dopasować elastyczność struktury, typową dla danej tkanki. Innym typem modyfikacji jest specyficzna biofunkcjonalizacja powierzchni poprzez wprowadzanie fragmentów RGD, bądź czynników biologicznych, czy też zmianę hydrofilności powierzchni (Dawson i wsp., 2008). W celach aplikacyjnych materiały te powinny charakteryzować się optymalnym przepływem płynów, dostarczaniem czynników odżywczych, tlenu, cząsteczek bioaktywnych, biodegradowalnością i integralnością mechaniczną (Dawson i wsp., 2008).

Projektując doświadczenia należy pamiętać, że dwuwymiarowe układy doświadczalne pozwalają na dokładną analizę wpływu poszczególnych komponentów niszy na komórki macierzyste i umożliwiają badanie mechanizmów molekularnych leżących u podstaw odpowiedzi komórkowej. System ten umożliwia modelowanie zawartości składników macierzy zewnątrzkomórkowej, kompozycji czynników wzrostu czy rodzaju kontaktów międzykomórkowych, co znajduje zastosowanie w badaniach podstawowych i przesiewowych (np. toksykologicznych). Z drugiej strony systemy trójwymiarowe, w związku ze swoimi właściwościami biologiczno-fizykochemicznymi, ściślej odwzorowują warunki niszy i znajdują zastosowanie w badaniu biologii komórek macierzystych i mechanizmów odpowiedzialnych za ich różnicowanie, proliferację, przeżywalność, a także stosowane są w inżynierii tkankowej i medycynie regeneracyjnej jako fizyczne nośniki komórek macierzystych i czynników wzrostowych (Lutolf i wsp., 2009).

W przedstawionej dysertacji otrzymanie domen biofunkcyjnych o zdefiniowanym składzie i kształcie ma na celu badanie ich oddziaływania z neuralnymi komórkami macierzystymi. Są to badania prowadzące do konstrukcji całościowego systemu biomimicznego, który w warunkach *in vitro* będzie odzwierciedlał naturalną niszę neuralnych komórek macierzystych.

## II. Cel pracy

---

Celem tej pracy jest zbadanie wpływu określonych warunków mikrośrodowiska *in vitro* na podejmowanie decyzji rozwojowych przez komórki macierzyste izolowane z ludzkiej krwi pępowinowej. Dla osiągnięcia postawionego celu skonstruowano narzędzie badawcze w postaci miniaturowych systemów (mikroplatform) zawierających powierzchnię bioaktywną w postaci określonego wzoru domen, umożliwiającą badanie kluczowych procesów rozwojowych neuralnych komórek macierzystych: adhezji, proliferacji i różnicowania.

### Sformułowano hipotezę:

Modelowanie zawartości i architektury powierzchni biofunkcjonalnych *in vitro* umożliwia kontrolę decyzji rozwojowych neuralnych komórek macierzystych pochodzących z krwi pępowinowej.

### Cele szczegółowe:

1. Konstrukcja domen biofunkcjonalnych umożliwiającą badanie procesów rozwojowych HUCB-NSC:
  - przy zastosowaniu techniki mikrodrukowania dającej możliwość manipulacji architekturą (kształtem, rozdzielczością, wielkością) domen,
  - przy zastosowaniu techniki dozowania mikrokropli umożliwiającej tworzenie domen wieloskładnikowych i platform hodowlanych zawierających domeny o różnym składzie.
2. Charakterystyka struktury, funkcjonalności i jakości domen;
3. Badanie kluczowych procesów rozwojowych neuralnych komórek macierzystych: na domenach mikrodrukowanych o różnej architekturze:
  - badanie adhezji, proliferacji i różnicowania w zależności od warunków środowiskowych (obecności surowicy, gęstości komórek i czasu trwania hodowli)

- porównanie wpływu architektury domen biofunkcyjnych na odpowiedź komórkową w zależności od typu oddziaływania komórek z powierzchnią: specyficznego (receptorowego) i niespecyficznego (elektrostatycznego)

4. Badanie decyzji rozwojowych neuralnych komórek macierzystych (samoodnowa versus różnicowanie w kierunku neuronalnym i glejowym) na domenach wieloskładnikowych mikronakraplanych, zawierających białka macierzy zewnątrzkomórkowej i małe cząsteczki sygnałowe

- wybór optymalnego białka macierzy zewnątrzkomórkowej do konstrukcji funkcjonalnych domen wieloskładnikowych,

- immobilizacja do podłoża fibronektyny z małymi cząsteczkami sygnałowymi, aktywującymi określone drogi przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego, które wpływają na rozwój komórek układu nerwowego

- analiza fenotypowa odpowiedzi komórkowych na podstawie znakowania immunocytochemicznego białek typowych dla określonych stadiów rozwoju neuronalnego.

# III. Materiał i Metody Badań

---

## 1. Techniki mikroinżynieryjne zastosowane do badań procesów rozwojowych komórek macierzystych

Określone powierzchnie szklane lub plastikowe, (np. szkiełka podstawowe lub małe szalki Petriego) pokryte substancją antyadhezyjną, z naniesionym wzorem biomolekuł nazywane będą dalej „platformami do wzrostu komórek” (Ryc. 6.)

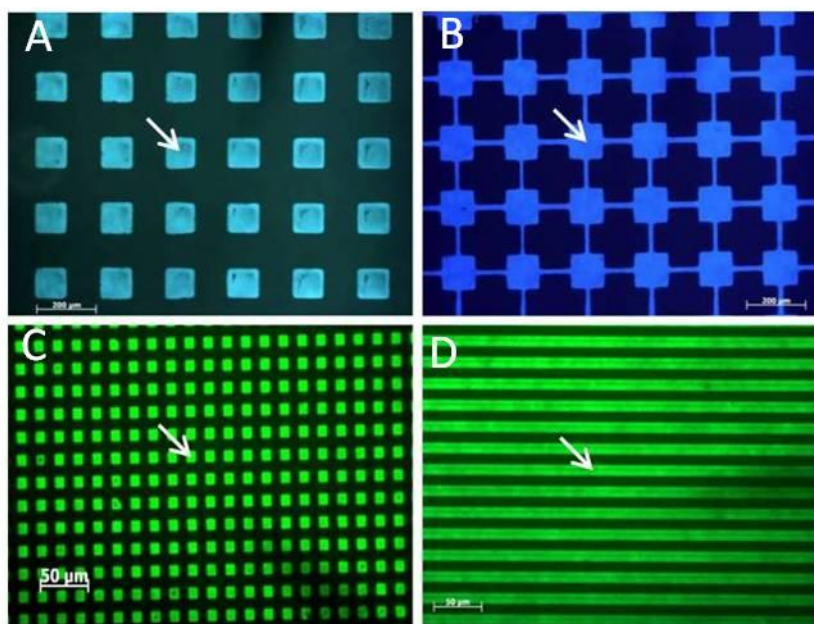
Wyodrębnione powierzchnie biofunkcjonalne na platformach do wzrostu komórek nazywane będą dalej „domenami biofunkcjonalnymi” (Ryc.6 strzałki).

Domeny biofunkcjonalne, w których znajduje się jeden rodzaj biomolekuły – to domenę jednoskładnikowe.

Domeny biofunkcjonalne, w których znajduje się więcej niż jeden rodzaj biomolekuły – to domenę wieloskładnikowe.

Określone wzory powierzchni biofunkcjonalnych immobilizujących grupy komórek, bądź komórki pojedyncze nazywane będą dalej odpowiednio: matrycami wielokomórkowymi lub matrycami jednokomórkowymi.

Otrzymywanie i charakterystyka powierzchni biofunkcjonalnych przeprowadzane było podczas mojego stażu w NanoBioscience Unit JRC, Ispra, Włochy, pod opieką naukową promotora dr hab. Leonory Bużańskiej oraz dr Francois Rossi z laboratorium Nanobiotechnology JRC. W trakcie mojego pobytu w JRC projektowałam i własnoręcznie wykonywałam powierzchnie biofunkcjonalne oraz korzystałam z dostępnego tam sprzętu w celu określenia charakterystyki powierzchni domen. Charakterystykę domen biofunkcjonalnych przeprowadzałam również w trakcie mojego dwutygodniowego pobytu w JRC już po zakończeniu stażu (wyjazd w ramach kierowanego przez dr hab. Leonorę Bużańską grantu promotorskiego oraz grantu własnego, odpowiednio nr 2211/B/P01/2010/38 i nr 5978/B/P01/2010/38).



Ryc. 6. Różne wzory domen biofunkcyjnych (matryce) na mikroplatformach do wzrostu komórek, które powstały metodą mikrodrukowania poli-L-lizyny znakowanej FITC (25μg/ml) na warstwie antyadhezyjnej (PEO). A- kwadraty o boku 120 μm, B- kwadraty o boku 120 μm połączone liniami, do pozycjonowania grup komórek, C – ‘znaczkki’ do pozycjonowania komórek pojedynczych o boku 10 μm, D – linie o grubości 10 μm do pozycjonowania komórek pojedynczych, ułożonych linowo. Strzałki wskazują na poszczególne domeny biofunkcyjne. Powierzchnia czarna to powierzchnia nieadhezyjna.

### *1.1. Przygotowanie powierzchni biofunkcyjnych techniką drukowania mikrokontaktowego*

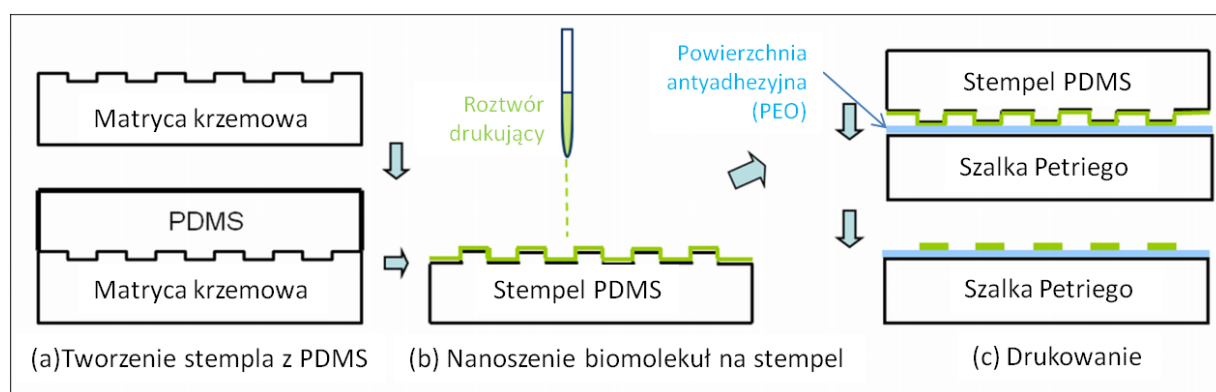
Wytwarzanie platform do wzrostu komórek techniką drukowania mikrokontaktowego polega na naniesieniu biomolekuł (poliaminokwasów czy białek macierzy zewnątrzkomórkowej) na powierzchnię antyadhezyjną.

Antyadhezyjna warstwa tlenku polietylenu: PEO (ang. poly-ethylene-oxide) o grubości ok. 10nm, nałożona została metodą laserowej depozycji plazmowej (Bretagnol i wsp.,2007), polegającej na chemicznym osadzeniu warstw z fazy gazowej z wykorzystaniem plazmy - polimeryzacji w plazmie i wytrącaniu się na podłożu molekuł organicznych, (Plazma Enhanced Chemical Vapour deposition). Warstwa tlenku polietylenu posiada właściwości antyadhezyjne tylko w roztworze, dlatego możliwe jest naniesienie na tę warstwę



określonego wzoru biomolekuł, który ogranicza adhezję komórek tylko do powierzchni z przylegającymi biomolekułami (Ruiz i wsp., 2007).

Do nanoszenia biomolekuł na warstwę antyadhezyjną stosuje się tzw. pieczętki, otrzymywane metodą litografii miękkiej. Krzemowe matryce takich „stempli” były wytwarzane komercyjnie (AMO GmbH) na podstawie zaprojektowanych przez nas wzorów o określonych parametrach geometrycznych. Poli(dimetylosiloksan) (PDMS) (Sylgard 184), jako mieszanina elastomerowej bazy i środka utwardzającego (10: 1), został nałożony na matrycę krzemową i pozostawiony do stwardnienia w 65<sup>0</sup>C przez 4 godziny. Tuż przed użyciem, stempel z PDMS został oczyszczony w łaźni ultradźwiękowej przez 5 minut, a następnie poddany łagodnemu działaniu O<sub>2</sub> (o mocy 200W, pod ciśnieniem 1.2 torr) w komorze plazmowej, przez 30 sekund. Na tak oczyszczony stempel nakładano biomolekuły, zawieszone w buforze węglanowym o pH 8,4. Znakowaną FITC poli-L-lizynę (25µg/ml, Sigma), fibronektynę (42 µg/ml, Sigma) pozostawiano przez 45 minut na stemplu, po czym, po zebraniu nadmiaru (i wysuszeniu w strumieniu N<sub>2</sub>) przykładano go na powierzchnię szalki Petriego o średnicy 3cm, pokrytej substancją antyadhezyjną (PEO) i pozostawiano w kontakcie przez 5 minut.



Ryc. 7. Schemat przeprowadzania drukowania mikrokontaktowego.

Otrzymano platformy do wzrostu komórek z wzorami domen biofunkcyjnych o różnym kształcie, wielkości i rozdzielczości:

- a) Znaczkę – domeny o wzorze małych kwadratów o boku 10 µm, umożliwiające pozycjonowanie do podłoża pojedynczych komórek;
- b) Linie – o szerokości 10µm i 20 µm ;

c) kwadraty - domeny o boku 120  $\mu\text{m}$ ;

d) Kwadraty połączone liniami- domeny o boku 120  $\mu\text{m}$  połączone liniami o szerokości 15  $\mu\text{m}$ .

Technika drukowania mikrokontaktowego umożliwia stosowanie jednorodnych wzorów domen adhezyjnych o różnym kształcie i rozmiarze, oraz jednakowym dla wszystkich domen składzie biomolekuł.

## *1.2 Przygotowanie powierzchni biofunkcjonalnych techniką dozowania mikrokropli*

Bezdotykowe, piezoelektryczne mikronakraplanie biomolekuł polega na dozowaniu mikrokropli o określonym składzie na standardowe szkiełko mikroskopowe pokryte nieadhezywną nanowarstwą tlenku polietylenu (PEO), przy użyciu automatycznego robota. Technika dozowania mikrokropli daje możliwość dowolnego rozplanowania domen, nakropienia materiału o różnym stężeniu i składzie, w bardzo dokładnie określonej objętości, w wielu powtórzeniach.

### 1.2.1 Przygotowanie matryc (wzoru domen bioaktywnych) mikronakraplanych na platformach do wzrostu komórek

Standardowe szkiełka mikroskopowe, po odtłuszczeniu etanolem, zostały pokryte tlenkiem krzemu w komorze plazmowej pod wysokim ciśnieniem, aby polepszyć przyleganie warstwy antyadhezyjnej (PEO) do szkła (dokładny opis techniczny procedury, zastosowanych sprzętów i parametrów można znaleźć w Bretagnol i wsp., 2006, 2007, Ceriotti i wsp, 2009). Szkiełka pokryto 20nm warstwą PEO metodą laserowej depozycji plazmowej (opis w pkt 2.1) i umieszczono w urządzeniu dozującym mikrokrople S3 sciFLEXARRAYER (Scenion AG, Niemcy Ryc. 8). Instrument ten zaopatrzony jest w system mikropozycjonujący igłę dozującą względem trzech osi, z dokładnością do 10 $\mu\text{m}$ . Umożliwia to dowolne zaprojektowanie wzoru przestrzennego i składu różnych substancji na jednej mikroplatformie (Ceriotti i wsp., 2009). Kamera umieszczona w aparacie umożliwia dostosowanie odpowiedniego kształtu kropli i pozwala uniknąć tzw. kropli satelitowych. Pojedyncza kropla ma objętość 4nl, w eksperymencie stosowaliśmy dozowanie 4 mikrokropli roztworu przypadających na jedną

domenę. Odległość pomiędzy środkami poszczególnych domen wynosi  $600\mu\text{m}$ . Nakraplanie przeprowadza się w temperaturze  $20^{\circ}\text{C}$ , oraz wilgotności około 30-60%.



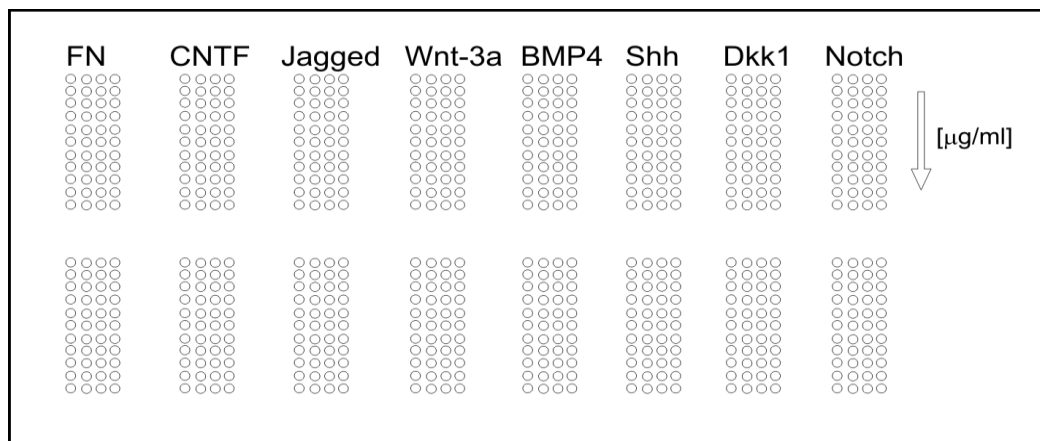
Ryc.8. Urządzenie dozujące mikrokrople typu S3 sciFLEXARRAYER.

### 1.2.2 Dozowanie mikrokropeli

Mikroplatformy z domenami zawierającymi fibronektynę, lamininę, witronektynę, kolagen I, kolagen V i kolagen IX (każde w serii stężeń:  $21\mu\text{g/ml}$ ,  $42\mu\text{g/ml}$  i  $84\mu\text{g/ml}$ ) otrzymano metodą dozowania mikrokropeli w celu porównania adhezji komórek HUCB-NSC do różnych białek macierzy zewnątrzkomórkowej.

Fibronektyna ( $84\mu\text{g/ml}$ , Sigma F0895), która w eksperymencie z białkami sygnałowymi stosowana była jako białko kontrolne, została rozcieńczona w buforze „drukującym”, zawierającym: bufor octanowy ( $100\text{ mM}$ , Riedel deHaën), EDTA o pH 5,  $5\text{ mM}$  (Merck),  $0.01\%$  Triton-X 100 (Fluka) i  $0,1\%$  glicerol (Carlo Erba).

Białka sygnałowe: CNTF, Jagged-1, Wnt3-a, BMP-4, Shh, Dkk-1, Notch-2 zostały przygotowane w trzech stężeniach:  $10\mu\text{g/ml}$ ,  $5\mu\text{g/ml}$  i  $2,5\mu\text{g/ml}$ , (Wnt3a w stężeniu  $1\mu\text{g/ml}$ ,  $0,7\mu\text{g/ml}$ ,  $0,5\mu\text{g/ml}$ ) w buforze drukującym, zawierającym fibronektynę ( $84\mu\text{g/ml}$ ). Wszystkie białka sygnałowe pochodziły z firmy R&D. Schemat nakraplanych domen biofunkcyjnych na antyadhezyjnej platformie do wzrostu komórek przedstawia Ryc. 9.



Ryc.9. Schemat układu domen utworzonych metodą dozowania mikro kropli na szkiełku mikroskopowym. Pojedyncze kółeczko oznacza odrębną domenę bioaktywną, zawierającą samą fibronektynę (FN) lub fibronektynę immobilizowaną do podłoża razem z białkami sygnałowymi.

## 2. Analiza jakościowa powierzchni biofunkcjonalnych

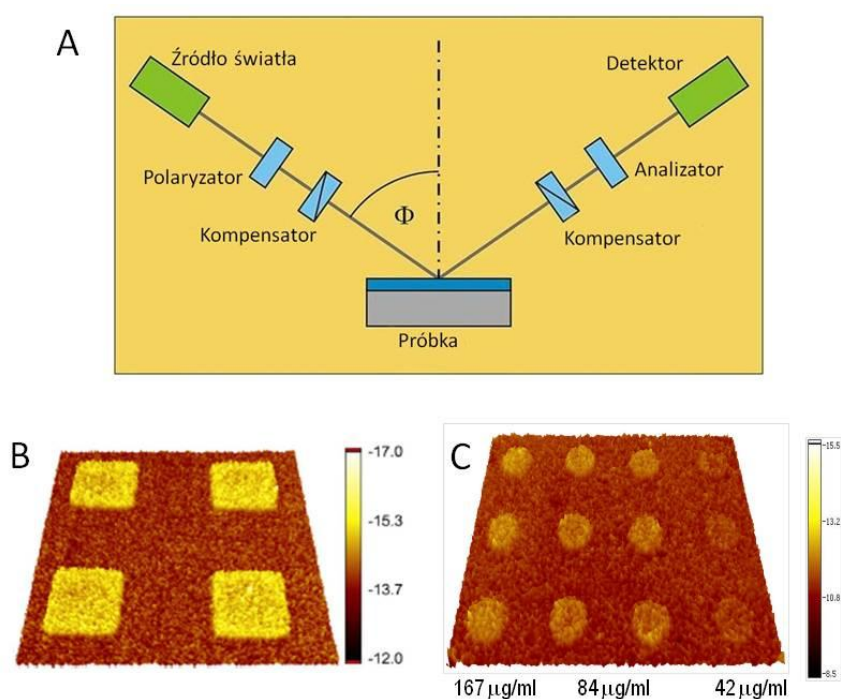
### 2.1 Metody analizy powierzchni: elipsometria i SPR

Domeny biofunkcjonalne zostały poddane analizie powierzchni w celu określenia ilości oraz jakości dostępnych dla komórek biomolekuł. Analityczna technika elipsometrii, wykorzystująca zmianę w odbiciu fal elektromagnetycznych od badanej powierzchni, służy do oznaczania jej właściwości optycznych i struktury powierzchniowej, tworząc mapę ilości/grubości deponowanych cząsteczek (np. nakroplonych biomolekuł). Druga metoda, również wykorzystująca zmiany w odbiciu fal elektromagnetycznych, to powierzchniowy rezonans plazmonowy (SPR), mierzący w czasie rzeczywistym adsorpcję białek, przeciwciał, nanocząsteczek do badanych systemów/powierzchni. Wykorzystując adsorpcję specyficznych przeciwciał można określić dostępność miejsc wiązania dla komórek. Takie badanie umożliwia określenie ilości dostępnych dla komórek substratów oraz ich funkcjonalność, np. zastosowanie monoklonalnego przeciwciała skierowanego przeciwko sekwencji fibronektyny zawierającej region RGD (Arg-Gly-Asp) wskaże na dostępność dla komórek tej części fibronektyny, która specyficznie wiąże receptory integrynowe.

### 2.1.1 Elipsometria

Technika ta opiera się na pomiarze stanu polaryzacji światła po jego odbiciu od próbki, korelując wartości delta i psi (współczynniki opisujące geometrię elipsy polaryzacyjnej) z fizyko-chemicznymi parametrami badanego materiału ([www.korozja.pl](http://www.korozja.pl)) (Ryc. 10 A).

Na krzemowe płytki, pokryte cienką warstwą PEO, zostały nakropione białka sygnałowe w dwóch układach: w obecności i braku fibronektyny w podłożu. Takie preparaty zostały przepłukane PBS przez 30 min w 37°C i poddane analizie w elipsometrze (model EP3, Nanofilm Surface Analysis GmbH, Niemcy).



Ryc.10. Schemat działania elipsometru (A). Mapa grubości zdeponowanej fibronektyny na domenach mikrodrukowanych (jedno stężenie fibronektyny, B) i mikronakraplanych (różne stężenia fibronektyny, C).

Wszystkie pomiary zostały wykonane w temperaturze pokojowej. Źródłem monochromatycznego światła była lampa xenonowa o  $\lambda = 554.3 \text{ nm}$  i kącie padania  $42^\circ$ . Z wybranych pól na podstawie kątów delta  $\Delta$  i psi  $\Psi$  wyznaczono mapy grubości zdeponowanych warstw białka (biomolekuł) przy użyciu oprogramowania EP3View (Ryc. 10 B, C) (Ceriotti i wsp., 2009).

### 2.1.2. SPR

W celu sprawdzenia dostępności dla komórek fibronektyny bądź białek sygnałowych, przeprowadzono analizę powierzchni metodą powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR) (Ryc.11). Metoda ta polega na detekcji fal elektromagnetycznych, pojawiających się na granicy metalu i ośrodka (np. powierzchni lub wody), których oscylacje, np. adsorpcja molekuł na powierzchni metalu, są bardzo czułe na jakiegokolwiek zmiany tej granicy ([wikipedia.pl](http://wikipedia.pl), <http://info.ifpan.edu.pl/nanobiom/ichf/ML2.pdf>).

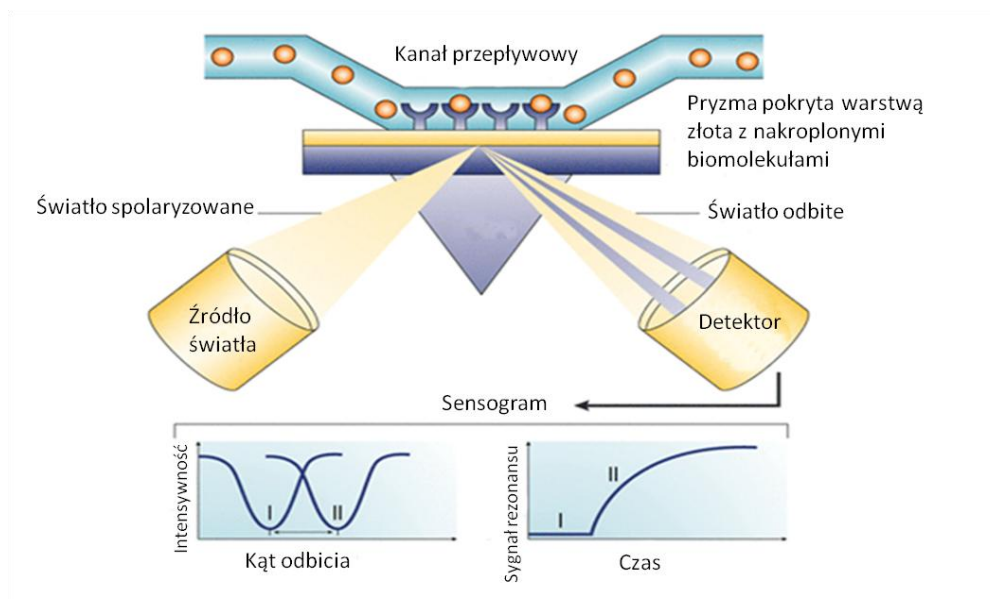
Szklane ostrosłupy powlekane złotem (tzw. pryzmy) pokryto warstwą antyadhezyjną PEO, a następnie na tej powierzchni dozowano mikrokrople w dwóch układach: w obecności i braku fibronektyny w buforze drukującym zawierającym białka sygnałowe w różnych stężeniach (10µg/ml, 5µg/ml, 2,5µg/ml, 1,25µg/ml) (6 powtórzeń każdego wariantu po 4 krople, plus kontrola z fibronektyny i PEO). Po 24 godz. inkubacji w 4<sup>0</sup>C pryzmy zostały umieszczone w przyrządzie pomiarowym i poddane jednostajnemu przepływowi PBS, w trakcie którego ustalone zostały parametry pomiarów i określone położenia analizowanych miejsc. Podczas następnej godziny przepływu PBS mierzono ilość białka uwalnianego z domen. Następnie po 10 minutowym przepłukaniu PBS, w celu zablokowania niespecyficznego wiązania przeciwciał do powierzchni zastosowano 20-minutowy przepływ roztworu surowicy bydlęcej (BSA 200µg/ml).

Kolejno, po 10 minutowym przepłukaniu PBS zastosowano mysie monoklonalne przeciwciała przeciwko fragmentom RGD fibronektyny (1mg/ml, Chemicon MAB 88916) bądź przeciwciała przeciwko białkom sygnałowym (Tabela1).

Tabela 1. Białka sygnałowe stosowane do otrzymania domen biofunkcyjnych i przeciwciała zastosowane w technice SPR.

<b>Zastosowane białko sygnałowe, producent, numer katalogowy</b>	<b>Przeciwciało, producent, numer katalogowy</b>
<b>Rekombinowane ludzkie białko CNTF, R&amp;D Systems, 257-NT</b>	Mysie monoklonalne przeciwciało skierowane przeciwko ludzkiemu białku CNTF, R&D Systems, MAB257
<b>Rekombinowane szczurze białko Jagged 1, R&amp;D Systems, 599-JG</b>	Kozie poliklonalne przeciwciało skierowane przeciwko szczurczemu białku Jagged1, R&D Systems, AF599
<b>Rekombinowane mysie białko Wnt-3a, R&amp;D Systems, 1324-WN</b>	Szczurze monoklonalne przeciwciało skierowane przeciwko białku myszy Wnt-3a, R&D Systems, MAB1324
<b>Rekombinowane ludzkie białko BMP-4, R&amp;D Systems, 314-BP</b>	Mysie monoklonalne przeciwciało skierowane przeciwko ludzkiemu białku BMP-4, R&D Systems, MAB757
<b>Rekombinowane ludzkie białko Sonic Hedgehog (C24II) (fragment N-końcowy peptydu, R&amp;D Systems, 1845-SH/CF</b>	Mysie monoklonalne przeciwciało skierowane przeciwko ludzkiemu białku Shh (N-końcowy fragment), R&D Systems, MAB4641
<b>Rekombinowane ludzkie białko Dkk-1, R&amp;D Systems, 1096-DK</b>	Mysie monoklonalne przeciwciało skierowane przeciwko ludzkiemu białku Dkk-1, R&D Systems, MAB10961
<b>Rekombinowane szczurze białko Notch-2, R&amp;D Systems, 1190-NT</b>	Kozie poliklonalne przeciwciało skierowane przeciwko szczurczemu białku notch-2, R&D Systems, AF1190

Wyniki przedstawiono w postaci współczynnika zmiany odbicia fal elektromagnetycznych (ang. reflectivity difference) od powierzchni złotej pryzmy z nakroplonymi biomolekułami po adsorpcji określonych przeciwciał.



Ryc.11. Schemat działania plazmonowego rezonansu powierzchniowego (zmodyfikowane z [http://www.unitus.it/biophysics/RicercaEn\\_file/spr%20sito.htm](http://www.unitus.it/biophysics/RicercaEn_file/spr%20sito.htm))

### 3. Neuralne komórki macierzyste izolowane z krwi pępowinowej

#### 3.1 Standardowa hodowla komórek HUCB-NSC

Linia komórek HUCB-NSC utrzymywana jest w ciągłej hodowli w pożywce zawierającej: DMEM/F12, 2%FBS, insulinę-transferynę-selenian (ITS, 1:100, Gibco), AAS (1:100, Immuniq) w standardowych warunkach wilgotności (98%) i zawartości CO<sub>2</sub> (5%). Wymiana pożywki przeprowadzana jest 2 razy w tygodniu, pasażowanie następuje co dwa tygodnie przy użyciu trypsyny/EDTA (0,025%, Immuniq). Pożywka bezsurowicza zawiera DMEM/F12, suplement B27 (1:50, Gibco), EGF (20ng/ml), AAS (1:100) i służy do utrzymywania komórek w hodowli jako populacja komórek pływających, niezróżnicowanych morfologicznie i tworzących neurosfery.

Do przeprowadzenia wszystkich doświadczeń komórki HUCB-NSC, rosnące w butelce hodowlanej o powierzchni 25cm<sup>2</sup> w pożywce zawierającej 2% surowicy zostały przepłukane PBS, a następnie zbierane przez trypsynizację, (0,7 ml trypsyny na butelkę, 1,5 minuty w 37°C, dodanie pożywki zawierającej surowicę w celu inaktywacji trypsyny). Komórki wirowano (1000rpm), a następnie liczone przy użyciu komory Burkera lub urządzenia do



automatycznego liczenia komórek Cell Counter (Invitrogen) określającego również żywotność komórek. Żywotność wynosiła nie mniej niż 95%. Komórki były wysiewane w określonych gęstościach, w zależności od rodzaju doświadczenia (Ryc.12). Po zakończonym doświadczeniu komórki zostały utrwalone i poddane analizie.

### *3.2. Hodowla komórek HUCB-NSC na domenach biofunkcjonalnych*

#### 3.2.1 Hodowla HUCB-NSC na mikroplatformach wykonanych techniką drukowania mikrokontaktowego

Platformy do wzrostu komórek w postaci polistyrenowych szalek Petriego o przekroju 3 cm zawierające wzory domen biofunkcjonalnych o różnym kształcie wielkości i rozdzielczości (patrz punkt 1.1) drukowane mikrokontaktowo poli-L-lizyną lub fibronektyną zostały wysterylizowane 15-sto minutową ekspozycją na promienie UV. Następnie wysiano komórki w określonej gęstości (Ryc.12), w pożywce bezsurowiczej i zawierającej 2% FBS. Po jednym dniu wymieniono pożywkę, odplukując nieprzyklejone komórki.

#### 3.2.2. Hodowla HUCB-NSC na mikroplatformach wykonanych techniką dozowania mikrokropeli

Standardowe szkiełka mikroskopowe z nakroplonymi domenami (fibronektyna plus białka sygnałowe) zostały poddane 15 minutowej sterylizacji światłem UV. Następnie wysiano komórki w pożywce surowiczej, w gęstości  $2 \times 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup>. Przez pierwszą godzinę inkubacji co 10 minut wytrząsano szalkę przez 10 sekund w celu równomiernej dystrybucji komórek po całym szkiełku. Następnie po 3 godzinnej stacjonarnej inkubacji szkiełka przekładano do nowej czystej pożywki w celu pozbycia się nadmiaru komórek. Po 4 dniach hodowli komórki zostały bardzo delikatnie przepłukane PBS o temp. 37°C i utrwalone 4% PFA o temp. 37°C i poddane analizie immunocytochemicznej.

## 4. Badanie procesów rozwojowych komórek HUCB-NSC hodowanych na domenach biofunkcjonalnych

### 4.1. Plan wariantów doświadczalnych z wykorzystaniem powierzchni mikrodrukowanych i mikronakraplanych

W celu sprawdzenia czy i w jakim stopniu architektura domen, ich skład i warunki hodowlane wpływają na decyzje rozwojowe komórek HUCB-NSC zastosowano różne układy doświadczalne.

#### 4.1.1. Określenie morfologii komórek HUCB-NSC rosnących na poli-L-lizynie i fibronektynie

Hodowla komórek HUCB-NSC w standardowych warunkach charakteryzuje się określonymi parametrami morfologii i różnicowania. W tym celu wysiano komórki HUCB-NSC na podłoża o różnym charakterze oddziaływań z powierzchnią komórki, na szkiełka pokryte poli-L-lizyną (25µg/ml) bądź fibronektyną (42µg/ml), a także na platformy pozycjonujące pojedyncze komórki, w warunkach przedstawionych na Rycinie 12. Wizualizację przeprowadzono w mikroskopie elektronowym skaningowym i transmisyjnym.

#### 4.1.2. Badanie adhezji HUCB-NSC na wielokomórkowych mikrodrukowanych powierzchniach biofunkcjonalnych

W celu zbadania adhezji komórek HUCB-NSC zależnej od niespecyficznego i specyficznego (receptorowego) oddziaływania z podłożem wykorzystano platformy pozycjonujące grupy komórek o domenach kwadratowych (Ryc. 12). Ocena adhezji odbywała się po wykonaniu zdjęć w mikroskopie kontrastowo fazowym po 1 i 7 dniach, a następnie zliczaniu komórek przypadających na domenę.

#### 4.1.3. Badanie proliferacji HUCB-NSC na wielokomórkowych mikrodrukowanych powierzchniach biofunkcjonalnych

W celu zbadania proliferacji komórek HUCB-NSC zależnej od zastosowanej początkowej gęstości wysiania, zmiennej pożywki hodowlanej i czasu trwania hodowli wykorzystano domeny o wzorze kwadratów o boku 120µm oddalonych od siebie o 120µm.

Na domeny mikrodrukowane poli-L-lizyną lub fibronektyną wysiano komórki w pożywce bezsurowiczej bądź zawierającej 2% surowicy w trzech gęstościach początkowych: niskiej (L)  $1 \times 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup>, średniej (M)  $2,5 \times 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup> i dużej (H)  $5 \times 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup>. Po 24 godzinach zmieniono pożywkę odpłukując nieprzyklejone komórki. Komórki zostały przepłukane PBS, utrwalone 4% PFA po 2, 4 i 7 dniach hodowli i poddane analizie immunocytochemicznej na obecność markera proliferacji Ki67.

#### 4.1.4. Badanie różnicowania HUCB-NSC immobilizowanych do domen wielokomórkowych

W celu weryfikacji tezy o możliwości kontroli różnicowania komórek HUCB-NSC przy pomocy architektury i składu domen biofunkcyjnych wysiano HUCB-NSC w pożywce bezsurowiczej lub surowiczej dodatkowo wzbogaconej o czynnik różnicujący dbcAMP (100μM) i po 7 dniach utrwalono hodowlę. Liczono komórki przypadające na kwadrat o boku 120μm i wykonano znakowanie immunocytochemiczne (na obecność markerów różnicowania neuronalnego: β-tubulina III i MAP-2 oraz astrocytarnego GFAP oraz S100β).

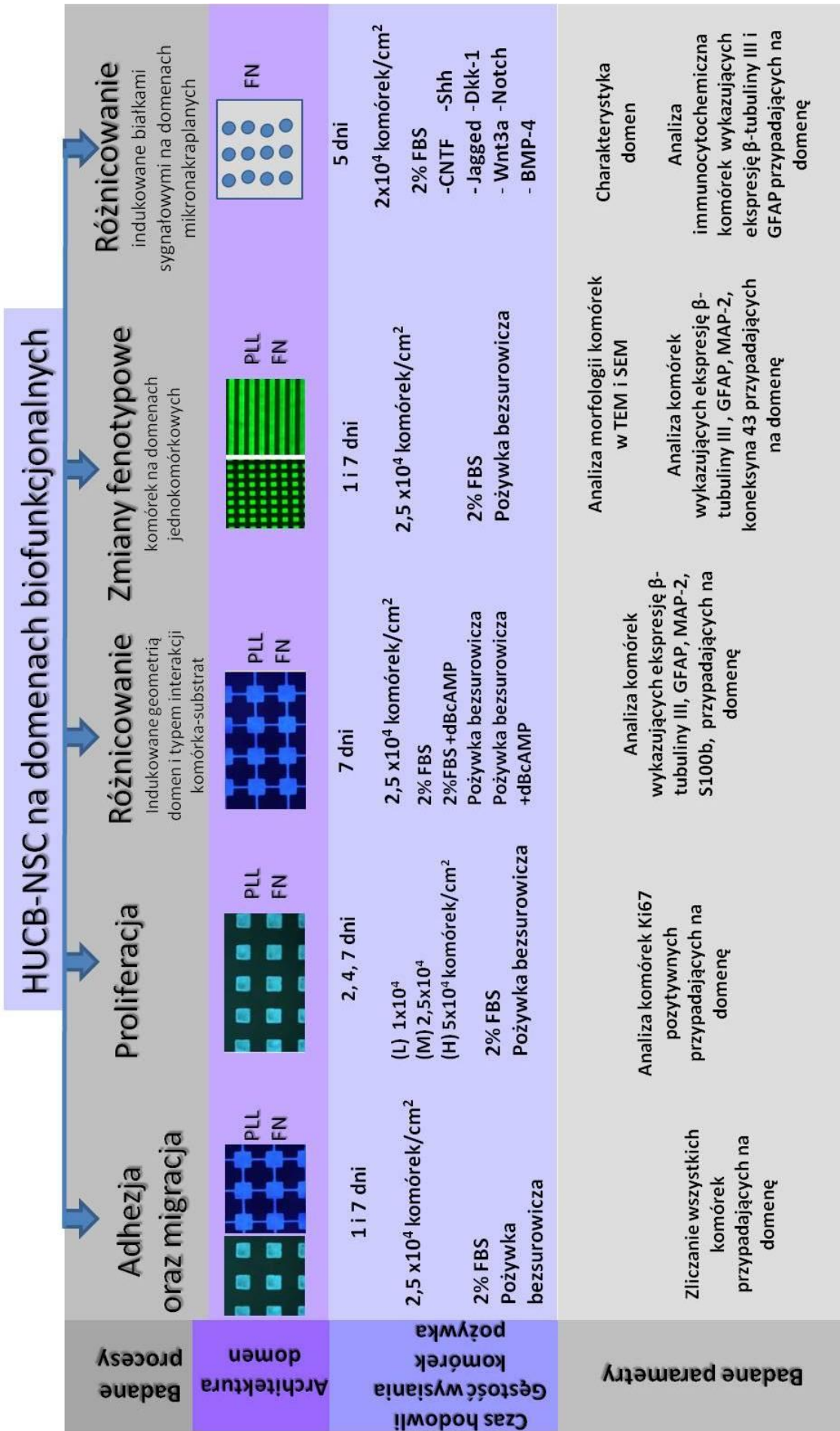
#### 4.1.5. Zmiany fenotypowe komórek HUCB-NSC rosnących na domenach pozycjonujących pojedyncze komórki

W celu określenia wpływu pozycjonowania pojedynczych komórek na morfologię i różnicowanie komórek HUCB-NSC wykorzystano domeny jednokomórkowe (kwadraty o boku 10μm oraz linie o szerokości 10μm). Komórki HUCB-NSC wysiano w gęstości  $2,5 \times 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup> w pożywce bezsurowiczej lub surowiczej, po 24 godzinach zmieniono pożywkę na świeżą odpłukując nieprzyklejone komórki. Po upływie 1 i 7 dni hodowlę utrwalono i wykonano znakowanie immunocytochemiczne (na obecność markerów: beta-tubuliny III, GFAP, MAP-2, koneksyny 43).

#### 4.1.6. Różnicowanie komórek HUCB-NSC na mikronakraplanych domenach biofunkcyjnych

Wpływ białek macierzy zewnątrzkomórkowej i białek sygnałowych na różnicowanie HUCB-NSC określano ilościowo na podstawie analizy immunocytochemicznej obecności

markerów GFAP i  $\beta$ -tubuliny III w wyznakowanych komórkach zasiedlających domeny i przedstawiono jako odsetek komórek posiadających badany marker.



Ryc.12. Zestawienie stosowanych parametrów przeprowadzanych badań.

## **5. Analiza immunocytochemiczna komórek na domenach biofunkcyjnych**

W każdym wariancie doświadczalnym po określonej liczbie dni hodowli, komórki zostały przepłukane PBS o temp. 37°C, następnie utrwalone w 4% PFA w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Po 2-krotnym przepłukaniu PBS (10 minut) nałożono 0,1% Triton X-100 (15 minut) w celu permeabilizacji błony komórkowej. Następnie, dla uniknięcia niespecyficznego wiązania przeciwciał, blokowano odsłonięte epitopy białkowe 10% surowicą kozią (NGS -normal goat serum) przez 60 minut, po czym przeprowadzono reakcję z przeciwciałami I-rzędowym, pozostawionymi na noc w 4°C. Po 3-krotnym przepłukaniu PBS nałożono odpowiednie przeciwciała II-rzędowe koniugowane z fluorochromami na 1 godz. w temperaturze pokojowej. Rodzaje i rozcieńczenia przeciwciał pierwszo i drugorzędowych przedstawiono odpowiednio w tabelach 2 i 3. Aby uwidocznić jądra komórkowe użyto 5µM Hoechst 33258 (Sigma), (20 minut, temp. pokojowa). Po zakończeniu płukania preparaty zostały zamknięte przy użyciu substancji Dakocytomation Fluorescent Mounting Medium (DakoCytomation).

Tabela 2. Przeciwciała pierwszorzędowe użyte w badaniach immunocytochemicznych

<b>Przeciwciała pierwszorzędowe</b>	<b>izotyp</b>	<b>Producent, rozcieńczenie, nr kat.</b>
Mysie monoklonalne skierowane przeciwko $\beta$ -tubulinie III	IgG 2b	Sigma, 1:1000
Mysie monoklonalne skierowane przeciwko białku Ki-67	IgG1	NovoCastra, 1:500
Mysie monoklonalne skierowane przeciwko białku Nestynie	IgG1	Chemicon 1:500
Mysie monoklonalne skierowane przeciwko białku MAP-2	IgG1	Sigma, 1:750
Mysie monoklonalne skierowane przeciwko koneksynie 43	IgG1	Millipore, 1:500
Królicze poliklonalne przeciwciało skierowane przeciwko kwaśnemu białku włókienkowemu (ang. glial fibrillary acidic protein, GFAP)	IgG H+L	Cappel, 1:500
Królicze poliklonalne przeciwciało skierowane przeciwko białku S100b	IgG H+L	Swant, 1:2000
Mysie monoklonalne przeciwciało skierowane przeciwko białku TUJ	IgG2a	Sigma, 1:500

Tabela 3. Przeciwciała drugorzędowe użyte w badaniach immunocytochemicznych

<b>Przeciwciała drugorzędowe</b>	<b>Producent, rozcieńczenie</b>
Alexa Fluor 488 kozie skierowane przeciw mysiej cząsteczce IgG1	Invitrogen, 1:1000
Alexa Fluor 546 kozie skierowane przeciw mysiej cząsteczce IgG1	Invitrogen, 1:1000
Alexa Fluor 488 kozie skierowane przeciw mysiej cząsteczce IgG2b	Invitrogen, 1:1000
Alexa Fluor 546 kozie skierowane przeciw mysiej cząsteczce IgG2b	Invitrogen, 1:1000
Alexa Fluor 546 kozie skierowane przeciw całej cząsteczce króliczej H+L	Invitrogen, 1:1000

## 6. Analiza mikroskopowa komórek na hodowanych na poli-L-lizynie i fibronektynie

Podczas trwania hodowli komórki obserwowane były w mikroskopie z kontrastem fazowym Axiovert (Zeiss), natomiast preparaty wykonane techniką immunocytochemiczną

analizowano przy użyciu mikroskopu Axioscope 2 (Zeiss) połączonego z kamerą cyfrową AxioCam MRmv.2 i programu AxioVision Rel.4.8. bądź mikroskopu konfokalnego LSM 510 (Zeiss).

### *6.1. Analiza z użyciem transmisyjnego mikroskopu elektronowego*

W celu przeprowadzenia analizy komórek w transmisyjnym mikroskopie elektronowym komórki utrwalono w 1% PFA i 1,25% glutaraldehydzie w buforze kakodylanowym o pH 7.4 przez 20 godz. Następnie materiał został ponownie utwalany w 1% czterotlenku osmu ( $\text{OsO}_4$ ) z dodatkiem 0,8%  $\text{K}_4\text{FeCN}_6$  przez 2 godz. Komórki odwodniono w szeregu rozcieńczeń alkoholu etylowego o wzrastającym stężeniu od 30% do 99,8% a następnie płukano tlenkiem propylenu. Przed zatopieniem materiału w żywicy komórki przesycono mieszaniną żywicy (epon 812) z tlenkiem propylenu w stosunku 1:3 (20 min.), 1:1 (40 min.) i 3:1 (2 godz.). Materiał zatopiono w żywicy i pozostawiono 24 godz. w temperaturze pokojowej, a następnie na 2 doby w temp. 60°C. Bloczki z zatopionym materiałem zostały pokrojone na ultramikrotomie LKB NOVA na skrawki o grubości 600Å. Po naniesieniu skrawków na miedziane siatki skrawki wybarwiono roztworem wodnym octanu uranylu przez 15 min. Następnie materiał przepłukano kilkakrotnie w wodzie destylowanej i wysuszono, po czym dobarwiono roztworem cytrynianu ołowiu przez 10 min. w obecności wodorotlenku sodu. Po ponownym przepłukaniu w wodzie destylowanej i wysuszeniu, skrawki analizowane były w transmisyjnym mikroskopie elektronowym JEOL 1011 (współpraca z Pracownią Mikroskopii Elektronowej IMDiK PAN im. M. Mossakowskiego).

### *6.2 Analiza z użyciem skaningowego mikroskopu elektronowego*

W celu wizualizacji komórek w skaningowym mikroskopie elektronowym materiał został utrwalony w 1% PFA i 1,25% glutaraldehydzie w buforze kakodylanowym o pH 7.4 przez 2 godz., następnie dotrwalony w 1% czterotlenku osmu ( $\text{OsO}_4$ ) i odwodniony w szeregu rozcieńczeń alkoholu etylowego i acetonu. Komórki zostały wysuszone w punkcie krytycznym, pokryte cząsteczkami złota i analizowane w mikroskopie JEOL JSM-6390LV (współpraca z Pracownią Mikroskopii Elektronowej IMDiK PAN im. M. Mossakowskiego).



## 7. Analiza statystyczna

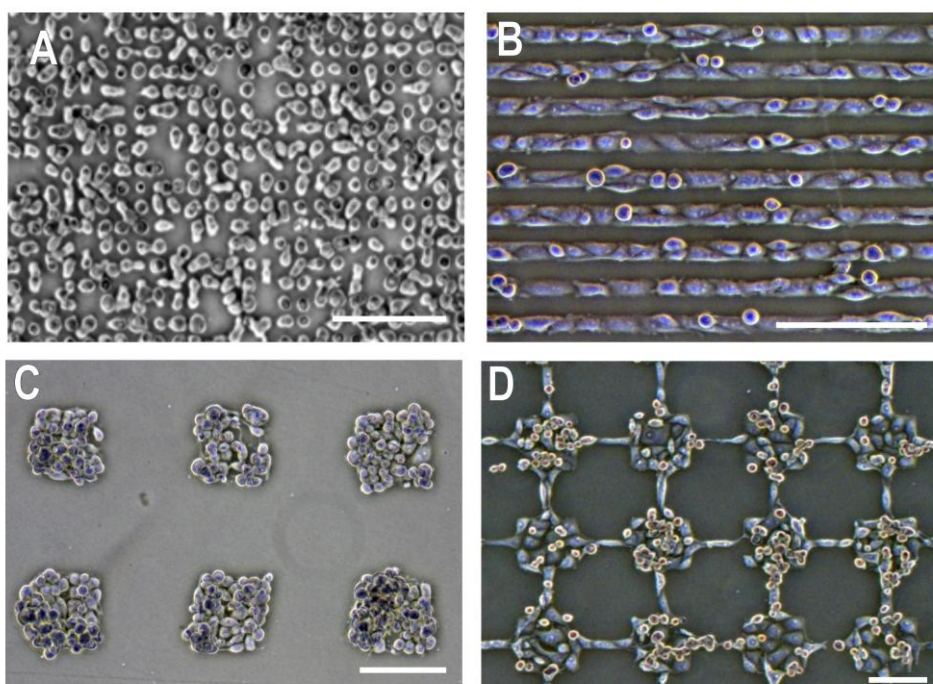
W przeprowadzonych doświadczeniach liczone komórki pozytywne pod względem danego markera/antygeny w przeliczeniu na wszystkie komórki na danej powierzchni, z co najmniej trzech powtórzeń eksperymentu. Analizę statystyczną wykonano w programie GraphPad Prism 5.0, wykorzystując test Mann'a Whitney'a dla porównania dwóch niezależnych grup. Jednoczynnikowa analiza wariancji (ang. One-Way Analysis of Variance, One-Way ANOVA) z testem wielokrotnych porównań Bonferroni została użyta dla porównania więcej niż dwóch grup danych. Dla porównania więcej niż dwóch grup danych z wartościami kontrolnymi użyto jednoczynnikowej analizy wariancji z testem Dunnett'a. Istotność statystyczną otrzymanych wyników określono dla wartości średnich z zaznaczeniem odchylenia standardowego (SD) lub błęd standardowego (SE) dla  $p < 0,05$ .

## IV. Wyniki

---

### 1. Rodzaje otrzymanych mikroplatform z powierzchnią biofunkcjonalną

#### 1.1. Geometria i skład powierzchni biofunkcjonalnej otrzymanej techniką mikrodrukowania



Ryc.13. Immobilizacja do podłoża komórek HUCB-NSC na powierzchni mikrodrukowanej domenami biofunkcjonalnymi o różnym kształcie i wielkości. Komórki HUCB-NSC rosnące na domenach jednokomórkowych o kształcie znaczków o boku  $10\mu\text{m}$  (A), i linii (B), odseparowanych kwadratów o boku  $120\mu\text{m}$  (C) oraz kwadratów połączonych liniami (D). Skala=  $100\mu\text{m}$ .

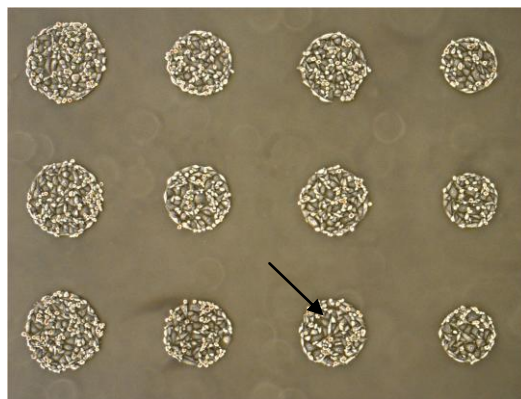
Metoda mikrodrukowania umożliwia zaprojektowanie i wykonanie domen o różnorodnych wymiarach, kształcie i rozdzielczości. W niniejszej pracy otrzymano i zastosowano domeny biofunkcjonalne pozycjonujące grupy komórek, o kształcie kwadratów o boku  $120\mu\text{m}$  oddalonych od siebie na  $120\mu\text{m}$  lub połączonych liniami o grubości  $15\mu\text{m}$  (Ryc. 13 C, D). Otrzymano również mikroplatformy o dużej rozdzielczości, z domenami

biofunkcjonalnymi pozycjonującymi pojedyncze komórki. Małe domeny - kwadraty o boku 10 $\mu$ m miały na celu pozycjonowanie pojedynczych komórek, oraz linie o szerokości 10 $\mu$ m lub 20 $\mu$ m (Ryc. 13 A i B ), które „wymuszają” ułożenie pojedynczych komórek obok siebie, wzdłuż określonej linii. Właściwości antyadhezyjne pomiędzy domenami stanowiła warstwa tlenku polietylenu (PEO-like film) zapewniająca ograniczenie komórek tylko do powierzchni domen. Każdy wzór drukowany był poli-L-lizyną w stężeniu 25 $\mu$ g/ml bądź fibronektyną w stężeniu 42 $\mu$ g/ml.

Powierzchnie biofunkcjonalne o różnej geometrii domen zaprojektowano w celu sprawdzenia, czy zmiana kształtu i wielkości domen, czyli niszy, w której znajdują się komórki macierzyste ma wpływ na procesy rozwojowe takie jak adhezja, proliferacja i różnicowanie neuralnych komórek macierzystych pochodzących z krwi pępowinowej (Ryc.13).

### *1.2. Geometria i skład powierzchni biofunkcjonalnej otrzymanej techniką dozowania mikrokropli*

Dozując mikrokrople z określonym substratem bioaktywnym otrzymujemy domeny o kształcie koła, możemy jednak regulować wielkość i skład domen (Ryc. 14).



Ryc. 14. Różna wielkość domen mikronakraplanych, zależna od ilości dozowanych mikrokropli (5, 4- strzałka i 3 krople o objętości 0,4nl).

W celu określenia optymalnej wielkości domen do dalszych doświadczeń (patrz Wyniki punkt 5.3) przeprowadzono analizę wielkości domen i ilości komórek adherujących do tych domen. Ustalano, że optymalna wielkość domen do badań związanych z analizą różnicowania HUCB-NSC w różnych warunkach mikrośrodowiska to domena o średnicy ok.

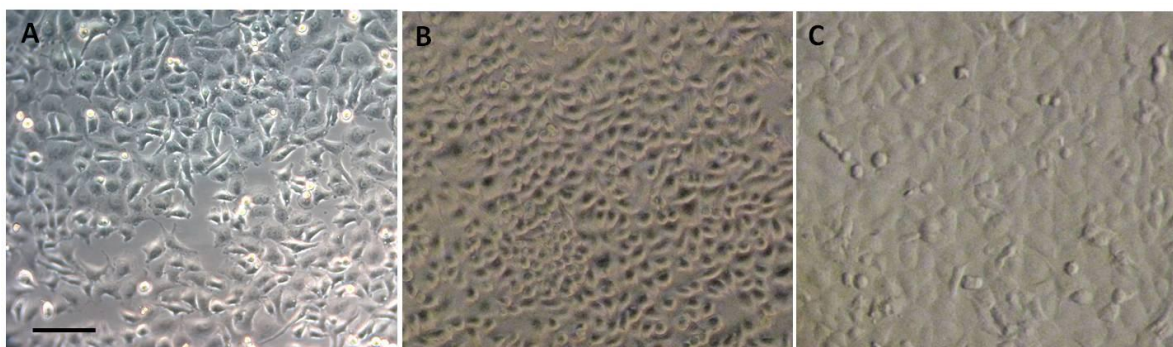
250µm (Ryc. 1 strzałka). Średnia liczba komórek adherujących do takiej domeny zawierającej fibronektynę o stężeniu 84 µg/ml wynosi około 100 komórek.

## **2. Charakterystyka komórek HUCB-NSC w hodowli kontrolnej**

### *2.1. Analiza w kontraście fazowym komórek HUCB-NSC w warunkach standardowych i referencyjnych*

Linia komórek HUCB-NSC hodowana w standardowych warunkach, czyli w pożywce z dodatkiem 2% surowicy bydlęcej (FBS) oraz suplementem ITS, na podłożu plastikowym charakteryzuje się występowaniem komórek niezróżnicowanych, okrągłych, pływających w toni (lub lekko osiadłych na warstwie komórek przylegających) oraz komórek przylegających, mających tendencję do spontanicznego różnicowania w fenotypy neuralne: neurony, astrocyty i oligodendrocyty (Bużańska i wsp.2006, Ryc. 15 A). Takie komórki stanowiły populację wyjściową do badań procesów rozwojowych HUCB-NSC na domenach biofunkcjonalnych.

W celu zbadania zmian fenotypu komórek w wyniku przytwierdzenia komórki do podłoża w warunkach hodowli prowadzonych na domenach biofunkcjonalnych, założono hodowle referencyjne HUCB-NSC. Hodowla komórek HUCB-NSC referencyjna prowadzona była na powierzchniach pokrytych dwoma różnymi substratami: poliaminokwasem poli-L-lizyną lub białkiem macierzy zewnątrzkomórkowej – fibronektyną, ponieważ substraty te są głównym składnikiem domen biofunkcjonalnych badanych w niniejszej pracy. Hodowle prowadzono w pożywce bezsurowiczej lub z dodatkiem 2% surowicy (Ryc. 15 B,C). Zarówno na poli-L-lizynie jak i na fibronektynie komórki adherowały do podłoża, tworząc jednolitą warstwę, przy czym na poli-L-lizynie były mniejsze i bardziej zaokrąglone niż na fibronektynie (Ryc. 15 B i C).



Ryc. 15 Standardowa hodowla komórek HUCB-NSC na powierzchni plastikowej (A) i w warunkach referencyjnych na poli-L-lizynie (B) lub fibronektynie (C) w pożywce hodowlanej zawierającej 2% surowicy. Zdjęcie wykonane w mikroskopie kontrastowo-fazowym. Skala=100 $\mu$ m.

## *2.2. Fenotyp HUCB-NSC w hodowli referencyjnej*

Wizualizacja komórek w mikroskopie elektronowym umożliwia bardziej szczegółową ocenę morfologii i wewnątrzkomórkowej ultrastruktury HUCB-NSC w różnych warunkach hodowli. Analiza taka pozwala na ocenę interakcji na poziomie komórka-komórka i komórka-substrat, a także wpływu zawartości pożywki hodowlanej.

### 2.2.1. Morfologia komórek rosnących w hodowli na poli-L-lizynie

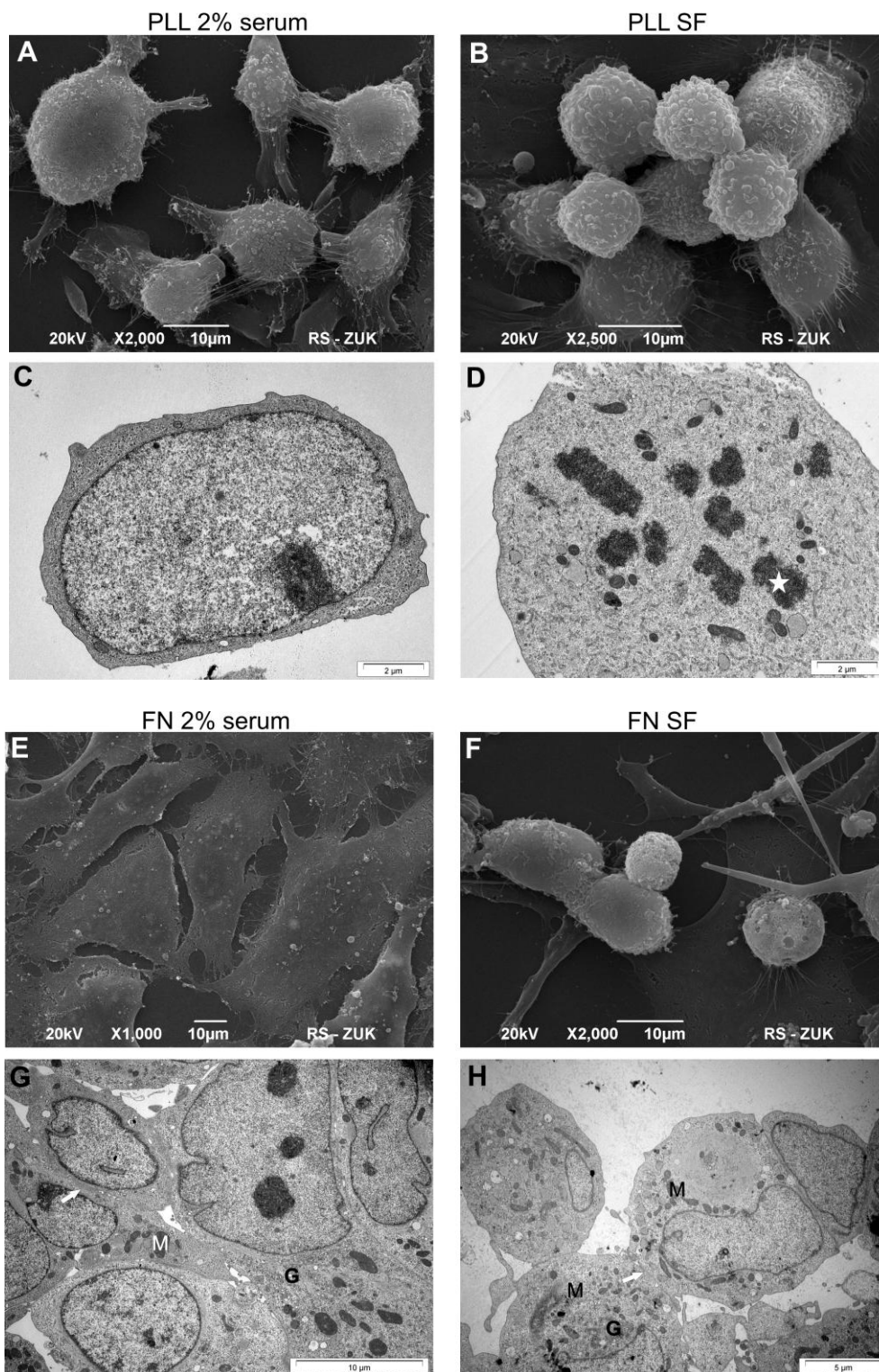
Komórki linii HUCB-NSC rosnące w standardowych warunkach, na pokrytych poli-L-lizyną szkiełkach wykazywały morfologię komórek niezróżnicowanych (Ryc.16 A-D). Komórki w większości pozostawały okrągłe, słabo przytwierdzone do podłoża, ubogie w organelle wewnątrzkomórkowe. Obserwowano niewielką powierzchnię kontaktu komórek z podłożem (Ryc. 16A), jak również ograniczony kontakt między sąsiadującymi komórkami. W cytoplazmie komórek obserwowano dużą ilość filamentów, które w mikroskopie elektronowym odpowiadają grubości filamentów pośrednich (o średnicy 10 nm). Cechy morfologiczne komórek hodowanych na PLL mogą świadczyć o ich niskiej aktywności (jądra z niewielką ilością heterochromatyny). Komórki ubogie w organelle komórkowe, to prawdopodobnie komórki o niskim stopniu zróżnicowania. Dodatkowo, komórki hodowane w pożywce bezsurowiczej wykazywały obecność licznych filopodii i drobnych wypustek (Ryc. 16B). W badanym materiale występowały również komórki w trakcie metafazy podziału

komórkowego (obecne w cytoplazmie chromosomy) (Ryc. 16 D). Komórki rosnące na poli-L-lizynie charakteryzowały się słabą adhezją do substratu, łatwo ulegając rozproszeniu.

### 2.2.2. Morfologia komórek rosnących w hodowli na fibronektynie

Komórki linii HUCB-NSC rosnące w warunkach referencyjnych, na szkiełkach pokrytych fibronektyną, silnie przylegały do podłoża i były znacznie rozplaszczone (Ryc. 16E-H). Analiza mikroskopowo-elektronowa (mikroskop transmisyjny) wykazała obecność komórek z mniejszą ilością mikrowypustek/mikrokosmków, zwłaszcza w pożywce z zawartością 2% surowicy (Ryc. 16 G) oraz dużą powierzchnię kontaktu międzykomórkowego. Podkreślić należy, że komórki rosnące w pożywce pozbawionej surowicy nie tworzyły zwartych skupisk, nie były ściśle upakowane, często posiadały długie wypustki (Ryc. 16F, H, strzałka). Cytoplazma komórek rosnących na fibronektynie wykazywała dużą ilość organelli wewnątrzkomórkowych, takich jak rozbudowany aparat Golgiego, mocno rozwinięta siateczka śródplazmatyczna oraz dzielące się mitochondria (Ryc. 16 G i H). Cechy morfologiczne jąder komórkowych wskazują na obecność komórek o różnym stopniu aktywności (różna zawartość heterochromatyny). Ogniskowo, cechy morfologiczne połączeń międzykomórkowych wskazują na połączenia typu szczelinowego (ang. gap junction) (Ryc. 16G, strzałka). Morfologia komórek w obrazach z mikroskopu elektronowego (bogactwo organelli wewnątrzkomórkowych, ryc. 16 G i H) wskazuje na wyższy stopień zróżnicowania komórek rosnących na powierzchniach pokrytych fibronektyną w porównaniu z komórkami rosnącymi na poli-L-lizynie.





Ryc.16 Mikrofotografie komórek HUCB-NSC rosnących na poli-L-lizynie (A-D) lub fibronektynie (E-H) w dwóch pożywkach hodowlanych: 2% surowicy i w pożywce bezsurowiczej wykonane w elektronowym mikroskopie skaningowym (A,B,E,F) i transmisyjnym (C,D,G,H). Gwiazdką oznaczono komórkę w trakcie podziału (D), strzałki oznaczają połączenia pomiędzy komórkami hodowanymi na fibronektynie, zawierającymi liczne organelle wewnątrzkomórkowe (mitochondria – M, aparat Golgiego –G; G,H)

### 3. Zastosowanie mikrodrukowanych powierzchni biofunkcjonalnych (matryc wielokomórkowych) w badaniu procesów rozwojowych HUCB-NSC

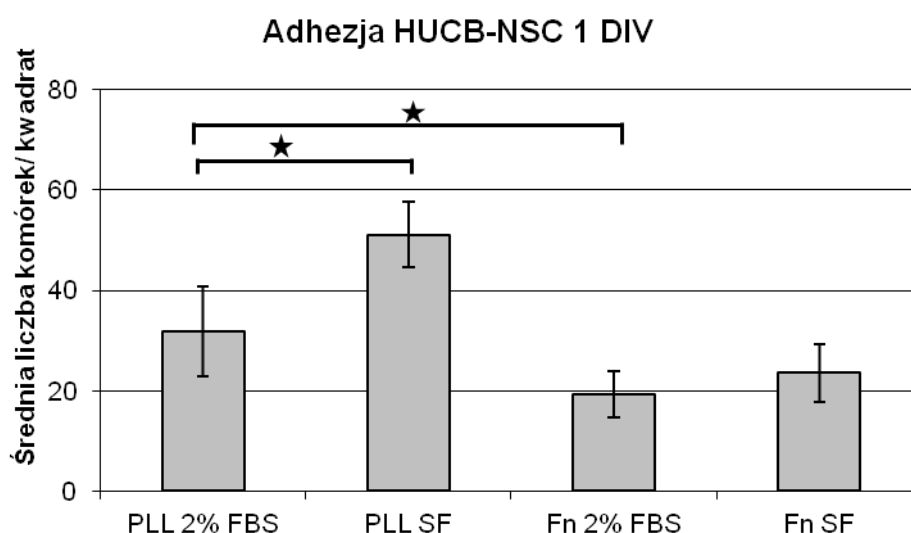
#### 3.1. Adhezja komórek HUCB-NSC po jednym dniu hodowli na powierzchniach mikrodrukowanych, pozycjonujących grupy komórek

Liczba i kształt komórek przytwierdzonych do badanych powierzchni zależy od typu stosowanego substratu oraz obecności surowicy. Właściwości adhezyjne HUCB-NSC do domen drukowanych poli-L-lizyną lub fibronektyną przedstawione są w postaci histogramu (Ryc. 17). Komórki zostały wysiane w gęstości  $2.5 \times 10^4$  na  $\text{cm}^2$ . Nadmiar komórek, które się nie przykleiły został usunięty po całonocnej inkubacji, następnie stan hodowli oceniano w mikroskopie kontrastowo-fazowym. Obecność komórek, które nie przykleiły się do domen i pływały w toni nie wpłynęła na właściwości antyadhezyjne PEO, na co wskazuje duży kontrast pomiędzy domenami drukowanymi biomolekułami a przestrzenią niepokrytą komórkami. Komórki HUCB-NSC pokrywały cały obszar domen fibronektynowych, dobrze przylegając i silnie rozplaszczając się zarówno w warunkach surowicznych jak i bezsurowicznych, natomiast na domenach utworzonych poprzez nadrukowanie poli-L-lizyny widoczne były wolne przestrzenie, co świadczy o braku szczelnego wypełnienia komórkami, oraz braku widocznego ścisłego przylegania (Ryc.18).

Fibronektyna indukuje silną adhezję, dlatego też „rozplaszczony” fenotyp limituje liczbę komórek przypadających na jednostkę powierzchni (kwadrat). Liczba komórek przyłączających się do domen drukowanych fibronektyną w warunkach surowicznych ( $19 \pm 5$  komórek na kwadrat o boku  $120\mu\text{m}$ ) jak i bezsurowicznych ( $23 \pm 6$  komórek) nie różni się statystycznie (Ryc. 17). Liczba komórek przylegających do domen pokrytych poli-L-lizyną w obecność 2% surowicy ( $32 \pm 9$  komórek) jest znacząco większa w porównaniu do domen pokrytych fibronektyną ( $p < 0,01$ ), ponieważ komórki pozostawały okrągłe, co umożliwiło adhezję większej liczby komórek na kwadracie domeny biofunkcjonalnej. Pożywka pozbawiona surowicy dodatkowo wzmacniała ten efekt, gdzie liczba komórek przypadających na badaną powierzchnię osiągnęła  $51 \pm 7$  komórek ( $p < 0,01$ ) (Ryc.17). Użyte w doświadczeniu domeny funkcjonalne, drukowane poli-L-lizyną i fibronektyną, wskazują na



istotną różnicę, zarówno morfologii, jak i liczby adherujących komórek, zależną od rodzaju oddziaływania pomiędzy powierzchnią domen, a błoną komórkową: oddziaływanie specyficzne, receptorowe na fibronektynie limituje liczbę komórek i umożliwia ścisłe przyleganie, podczas gdy niespecyficzne, elektrostatyczne oddziaływanie poliaminokwasów z powierzchnią komórki umożliwia adhezję większej liczby niezróżnicowanych komórek.



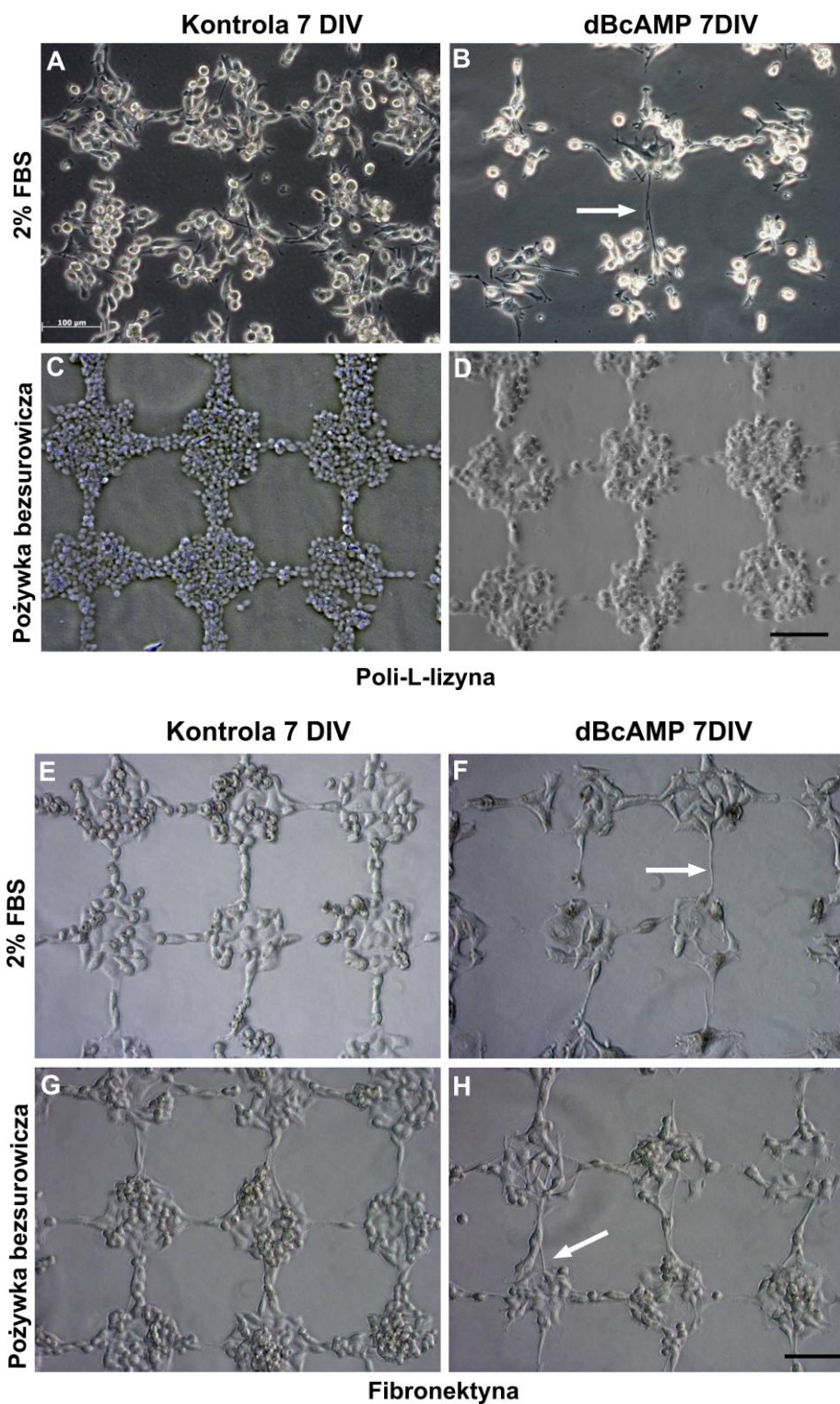
Ryc.17. Liczba komórek HUCB-NSC na domenach o kształcie kwadratów o boku 120µm, drukowanych poli-L-lizyną (PLL) oraz fibronektyną (FN), mierzona po jednodniowej hodowli (1 DIV) w różnych warunkach hodowli: w obecności 2% surowicy (2% FBS) oraz w pożywce bezsurowiczej (SF). Wyniki przedstawiają średnie ( $\pm$ SD) z trzech niezależnych eksperymentów. Testem ANOVA z testem dodatkowym Bonferroni sprawdzono istotność statystyczną pomiędzy grupami, \* $p < 0,01$ .

### *3.2. Adhezja i różnicowanie komórek HUCB-NSC po siedmiu dniach hodowli na powierzchniach mikrodrukowanych, pozycjonujących grupy komórek*

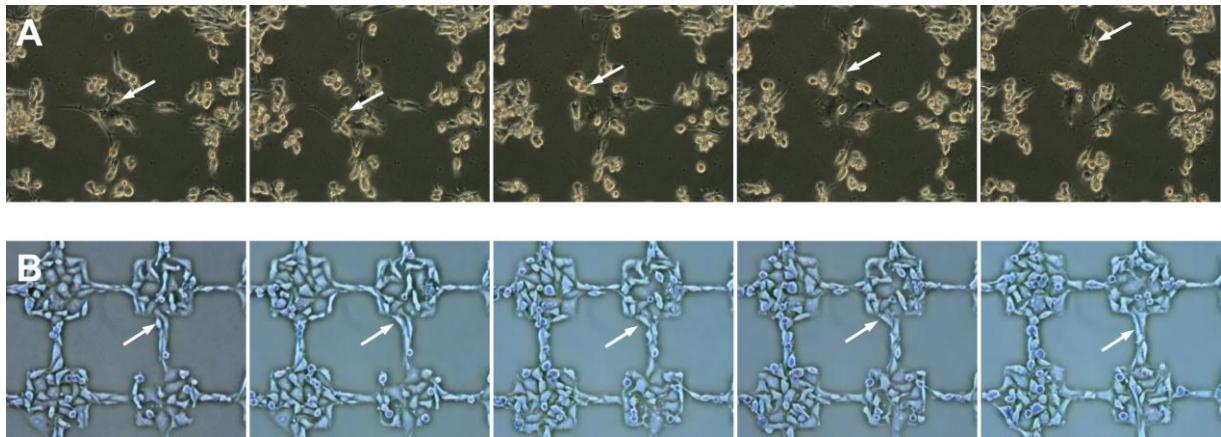
Po siedmiu dniach hodowli ponownie zbadano adhezję a także różnicowanie HUCB-NSC na mikrodrukowanych powierzchniach biofunkcyjnych.

Rycina 18 przedstawia zdjęcia z kontrastu fazowego siedmiodniowej hodowli HUCB-NSC w różnych pożywkach hodowlanych. Komórki HUCB-NSC rosnące w warunkach kontrolnych na poli-L-lizynie pozostają w większości okrągłe, luźno przytwierdzone do

podłoża, często migrują poza powierzchnię pokrytą poli-L-lizyną, (Ryc.18A, Ryc. 19). Dodanie dBcAMP indukuje fenotyp przypominający neurony i ukierunkowuje wzrost wypustek komórek mocniej przytwierdzonych do podłoża w linii łączące domeny (Ryc.18B strzałka). Pożywka bez dodatku surowicy utrzymuje stabilność wzoru (Ryc. 18C, D- brak migrujących komórek pomiędzy kwadratami, Ryc. 19), komórki pozostają zaokrąglone i w większości niezróżnicowane. Komórki rosnące na fibronektynie w warunkach kontrolnych są ściśle przytwierdzone do podłoża (Ryc. 19), niektóre pozostają okrągłe, szczelnie wypełniają zajmowaną powierzchnię (Ryc.18 E, G). W środowisku różnicującym, zarówno w obecności jak i braku surowicy można zaobserwować długie wypustki komórek, prowadzone w liniach łączących sąsiadujące kwadraty (Ryc. 18 F, H strzałki).

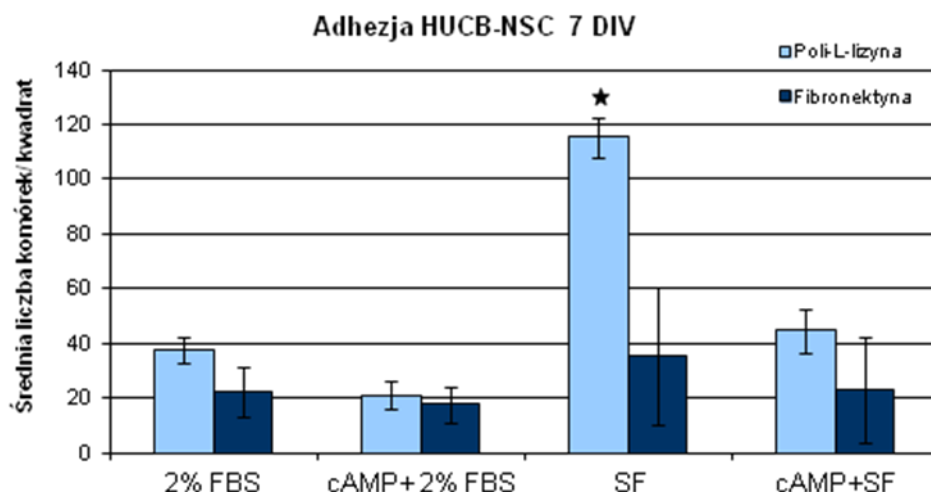


Ryc.18 Komórki HUCB-NSC na powierzchniach drukowanych poli-L-lizyną (A-D) lub fibronektyną (E-H) w siódmym dniu hodowli (7DIV), w warunkach kontrolnych (obecność 2% surowicy lub pożywka bezsurowicza) i różnicujących (dodatek 100 $\mu$ M dBcAMP). Linie łączące domeny kierkują wzrost wypustek neuronalnych (strzałki). Skala = 100 $\mu$ m.



Ryc.19. Sekwencja zdjęć przedstawiających zależną od typu adhezji migrację komórek HUCB-NSC na domenach biofunkcyjnych. Strzałki wskazują tę samą komórkę podczas 24-godzinnej obserwacji. Komórki na poli-L-lizynie intensywnie się przemieszczają z jednej domeny na drugą (A), natomiast na fibronektynie (B) nie opuszczają domeny, a ich ruch ograniczony jest jedynie do miejsca przylegania do powierzchni adhezyjnej.

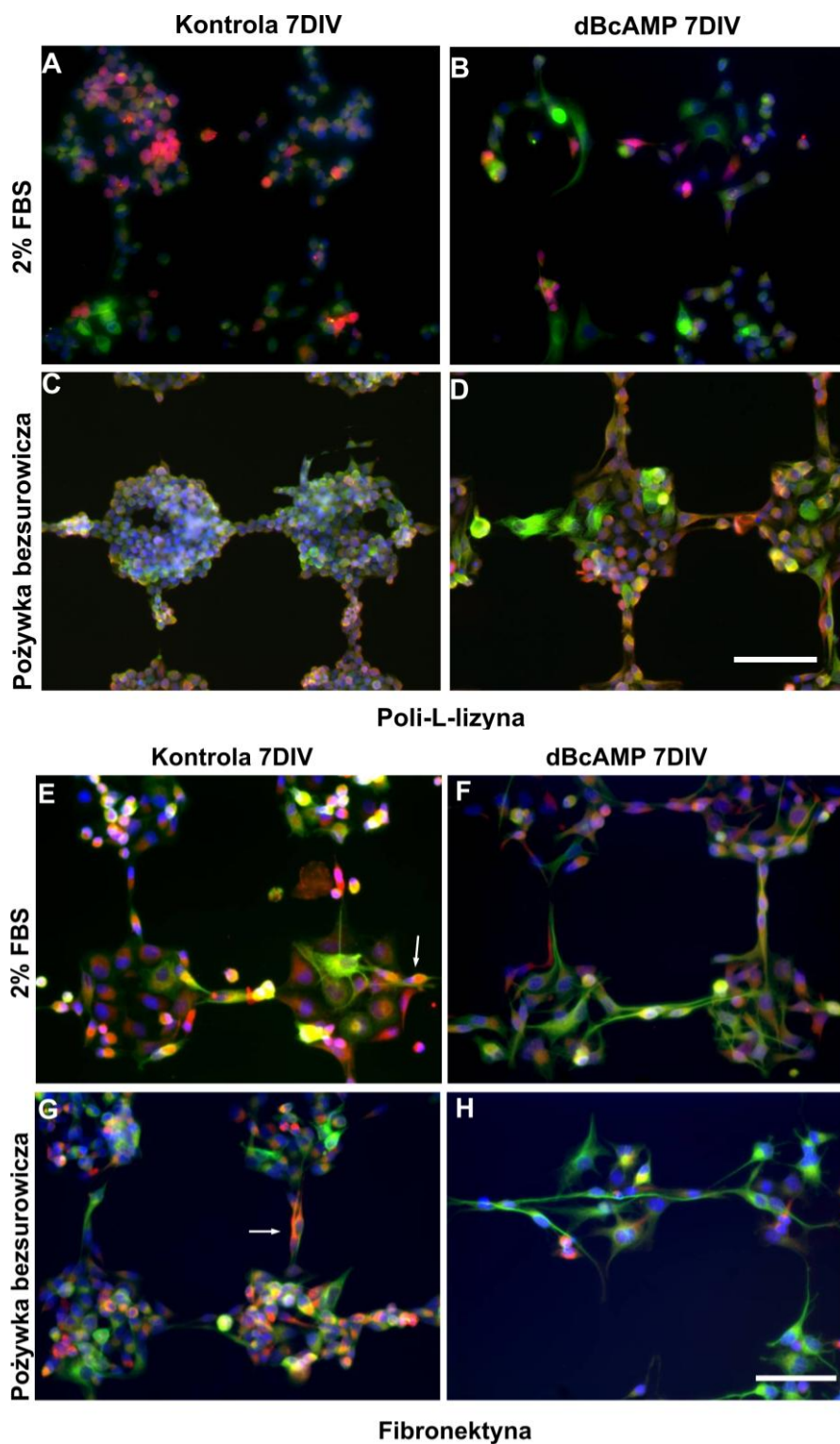
Dla zróżnicowania komórek hodowlę prowadzono z dodatkiem  $100\mu\text{M}$  dBcAMP do pożywki zawierającej lub pozbawionej surowicy (Ryc.20). W warunkach kontrolnych (bez dodatku czynnika różnicującego) liczba komórek przypadających na jednostkę badanej powierzchni była podobna lub większa (dla poli-L-lizyny) od adhezji w pierwszym dniu hodowli (Ryc. 20). Największą liczbę komórek w porównaniu z innymi wariantami doświadczalnymi obserwowano na poli-l-lizynie w pożywce pozbawionej surowicy ( $125 \pm 29$ ). Dodatek dBcAMP zarówno w hodowli prowadzonej na fibronektynie jak i poli-L-lizynie znacząco obniżał ilość zaadherowanych komórek w porównaniu do kontroli (Ryc. 20). Czynniki różnicujące dodano do hodowli 24 godz. po jej założeniu, aby nie wpływał na adhezję i rozpuszczanie komórek. Indukując różnicowanie dBcAMP spowodował pozostanie na PLL tylko komórek dobrze przytwierdzonych i takich, które zaczęły tworzyć wypustki.



Ryc.20. Średnia liczba komórek HUCB-NSC obserwowanych na kwadratach drukowanych poli-L-lizyną lub fibronektyną w warunkach kontrolnych (obecność 2% FBS lub pożywka bezsurowicza-SF) i różnicujących (dodatek dBcAMP), mierzona siódmego dnia hodowli (7DIV). Wyniki przedstawiają średnie ( $\pm$ SD) z trzech niezależnych eksperymentów. Testem ANOVA z testem dodatkowym Bonferroni sprawdzono istotność statystyczną pomiędzy grupami, ( $\pm$ SD), \*  $p < 0,01$ .

Przeprowadzono analizę immunocytochemiczną komórek hodowanych na powierzchniach drukowanych poli-L-lizyną bądź fibronektyną w warunkach kontrolnych i różnicujących, w obecności dBcAMP. Komórki zróżnicowane w kierunku neuronalnym wykazywały ekspresję beta-tubuliny III i MAP-2, natomiast różnicowanie w kierunku astrocytarnym określano na podstawie ekspresji GFAP lub S100 $\beta$  (Ryc. 21).





Ryc. 21. Analiza immunocytochemiczna komórek HUCB-NSC hodowanych na domenach mikrodrukowanych poli-L-lizyną (A-D) lub fibronektyną (E-H) na obecność markerów: neuronalnego beta-tubuliny III (kolor zielony) i astrocytarnego GFAP (kolor czerwony). Komórki wykazujące współwystępowanie  $\beta$ -tubuliny III i GFAP zaznaczono strzałkami (E,G). Jądra komórkowe wybarwione Hoechst 33258 (niebieski). Skala = 100  $\mu$ m.

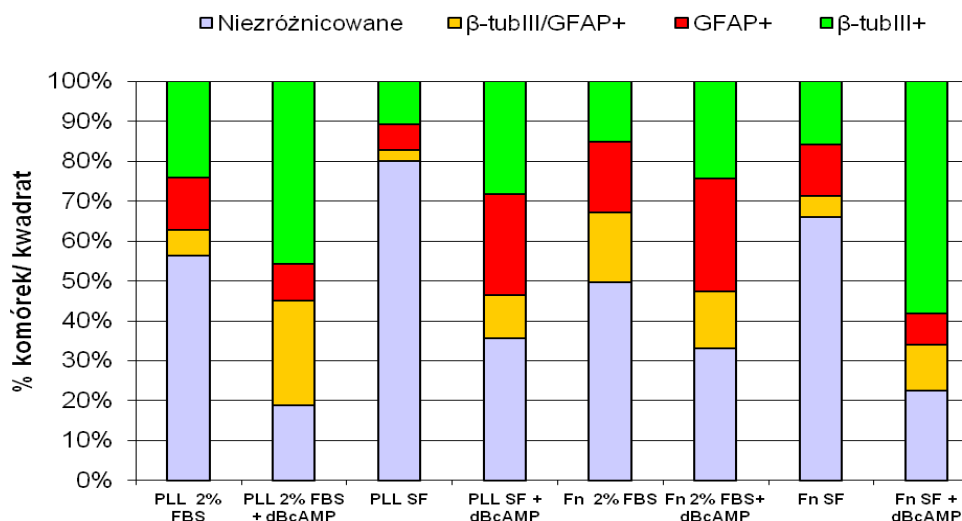
Kontrolne warunki bezsurowicze, zarówno w przypadku hodowli naPLL jak i na FN sprzyjały utrzymaniu największej liczby komórek niezróżnicowanych (odpowiednio  $79.9 \pm 9\%$  i  $65.8 \pm 7\%$ ,  $p < 0,05$ ) (Ryc. 21, 22). Obecność surowicy w pożywce sprzyjała występowaniu obserwowanego pośredniego fenotypu komórek, w których zachodzi ko-ekspresja badanych markerów, na obu badanych powierzchniach (Tabela 4). W warunkach kontrolnych neuronalne różnicowanie spontaniczne, miało najwyższą wartość na domenach 'poli-L-lizynowych' w obecności surowicy.

W grupie 2%FBS z dodatkiem dBcAMP, pośród komórek rosnących na PLL, obserwowano większą liczbę komórek  $\beta$ -tubulina III pozytywnych niż na FN ( $45.9 \pm 5\%$  vs  $24.5 \pm 6\%$ ,  $p < 0,05$ ) (Tabela 4, Ryc.22). Jednakże morfologia komórek hodowanych na fibronektynie sugeruje, że choć w mniejszości, wykazują one bardziej zaawansowany neuronalnie fenotyp (małe, wyznakowane na zielono komórki na PLL w porównaniu do zielonych, wydłużonych komórek z wypustkami – na fibronektynie, Ryc. 21). W warunkach bezsurowiczych obecność dBcAMP indukowała różnicowanie neuronalne najbardziej na kwadratach mikrodrukowanych FN ( $58,2 \pm 6,1\%$  vs  $28,4 \pm 7,7\%$ ,  $p < 0,05$ ) (Tabela 4, Ryc.22). Dodatek dBcAMP, w połączeniu z jednoczesnym wycofaniem surowicy z hodowli, indukował różnicowanie astrocytarne na PLL, podczas gdy fibronektyna stymulowała różnicowanie astrocytarne w warunkach bezsurowiczych.

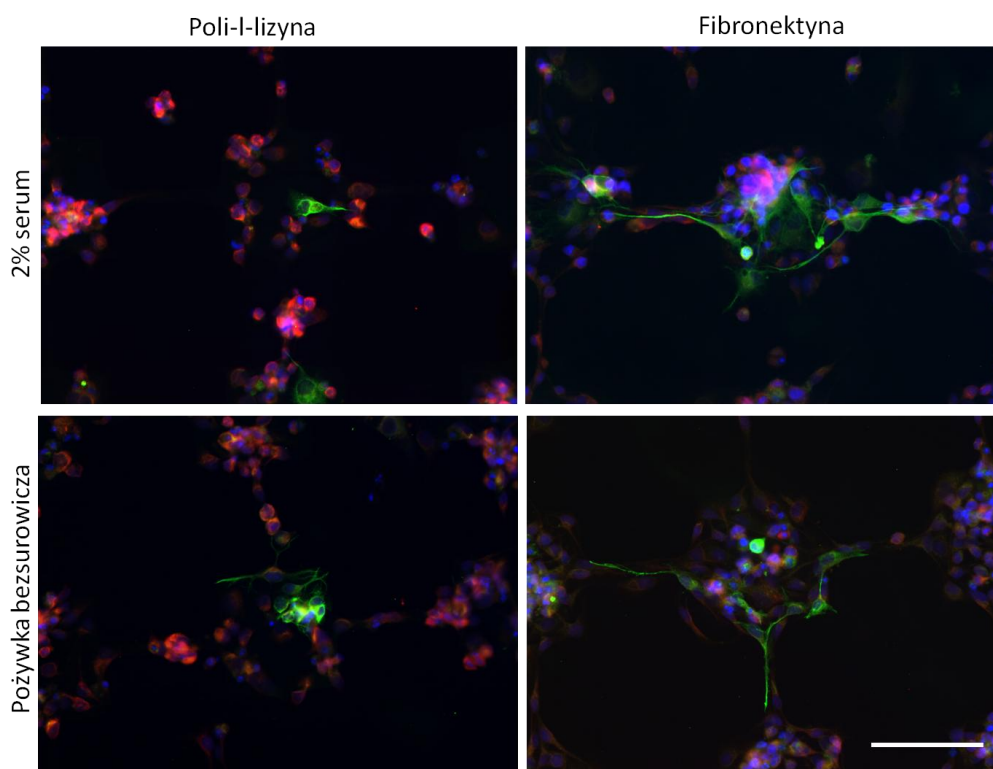
Tabela 4. Odsetek liczby komórek HUCB-NSC niezróżnicowanych i wykazujących obecność markera GFAP (o charakterze astrocytów),  $\beta$ -tubuliny III (o charakterze neuronów), czy kolokalizację badanych markerów (brak decyzji rozwojowej) przypadających na mikrodrukowaną domenę.

	<b>% komórek nie wykazujących ekspresji badanych markerów niezróżnicowanych</b>	<b>% komórek wykazujących koekspresję badanych markerów</b>	<b>% komórek z ekspresją GFAP</b>	<b>% komórek z ekspresją <math>\beta</math>-tub III</b>
<b>PLL 2%FBS</b>	56,3 $\pm$ 8.3	6,3 $\pm$ 3.6	13,2 $\pm$ 6.8	24,1 $\pm$ 4.7
<b>PLL 2%FBS + dBcAMP</b>	18,6 $\pm$ 3.9	26,4 $\pm$ 12.9	9,0 $\pm$ 4.9	45,9 $\pm$ 6.2
<b>PLL pożywka bezsurowicza</b>	79,9 $\pm$ 9.4	2,6 $\pm$ 1.4	6,4 $\pm$ 3.6	10,8 $\pm$ 4.2
<b>PLL pożywka bezsurowicza + dBcAMP</b>	35,6 $\pm$ 4.1	10,7 $\pm$ 0.6	25,3 $\pm$ 3.4	28,4 $\pm$ 7.7
<b>FN 2% FBS</b>	49,6 $\pm$ 4	17,4 $\pm$ 1.5	17,7 $\pm$ 6.5	15,1 $\pm$ 2.8
<b>FN 2% FBS+ dBcAMP</b>	33,1 $\pm$ 6.2	14,1 $\pm$ 2.3	28,2 $\pm$ 2.01	24,5 $\pm$ 5.9
<b>FN pożywka bezsurowicza</b>	65,8 $\pm$ 7.5	5,2 $\pm$ 1.2	12,9 $\pm$ 0.1	15,9 $\pm$ 6.1
<b>FN pożywka bezsurowicza + dBcAMP</b>	22,4 $\pm$ 4.5	11,4 $\pm$ 7.6	7,8 $\pm$ 7	58,2 $\pm$ 6.1





Ryc.22. Procentowy rozkład fenotypowy komórek HUCB-NSC na domenach funkcjonalnych, pokrytych PLL lub FN, w zależności od warunków hodowli. Kolor czerwony – ekspresja GFAP, różnicowanie w kierunku astrocytów, kolor zielony – ekspresja  $\beta$ -tub III – różnicowanie w kierunku neuronów, kolor żółty- koekspresja badanych markerów, brak decyzji rozwojowej, kolor niebieski – brak ekspresji badanych markerów, komórki niezróżnicowane.



Ryc. 23. Ekspresja MAP-2 (kolor zielony), białka świadczącego o zaawansowanym różnicowaniu neuronalnym na domenach mikrodrukowanych poli-L-lizyną lub fibronektyną w obecności 2% surowicy lub w pożywce bezsurowicznej. Kolorem czerwonym wyznakowano obecność GFAP, jądra wybarwiono na niebiesko barwnikiem Hoechst 33258. Skala = 100 $\mu$ m.

Po siedmiu dniach hodowli wykonano również znakowanie na obecność markera świadczącego o zaawansowanym zróżnicowaniu neuronalnym – MAP-2, jedynie w hodowlach prowadzonych bez dodatku dBcAMP, żeby stwierdzić, czy sama geometria domen bez dodatkowej inkubacji z neuromorfogenami wpłynie na różnicowanie HUCB-NSC (Ryc.23). Zaobserwowano większą liczbę komórek MAP-2 pozytywnych na domenach mikrodrukowanych fibronektyną w porównaniu z domenami mikrodrukowanymi poli-L-lizyną, dodatkowo komórki te lokalizowały się na obrzeżach domen, bądź w liniach łączących sąsiadujące domeny.

### *3.3. Analiza proliferacji HUCB-NSC na powierzchniach mikrodrukowanych, pozycjonujących grupy komórek*

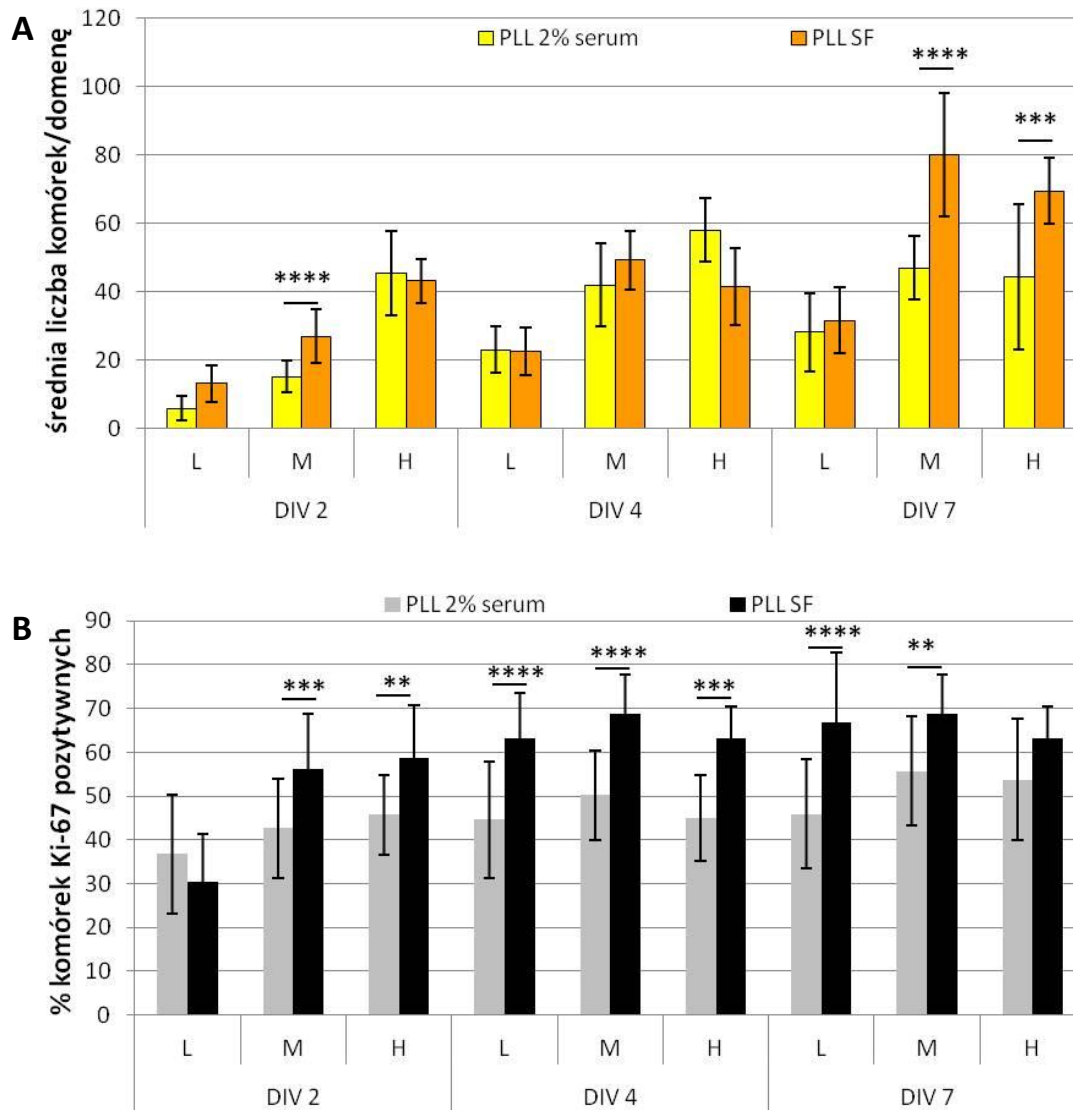
Proliferację HUCB-NSC badano na mikroplatformach z domenami funkcjonalnymi mikrodrukowanymi poli-L-lizyną lub fibronektyną, o kształcie kwadratów 120/120  $\mu\text{m}$ . Hodowlę komórek HUCB-NSC prowadzono w warunkach bezsurowiczych lub w obecności 2% FBS w trzech różnych gęstościach początkowych: niskiej (L), średniej (M) i dużej (H).

Analizę ilościową proliferacji wykonano badając w komórkach HUCB-NSC ekspresję białka typowego dla komórek dzielących się - Ki67 w trzech różnych punktach czasowych trwania hodowli (2, 4 i 7 DIV).

#### 3.3.1. Proliferacja na domenach drukowanych poli-L-lizyną

Całkowita liczba komórek przypadająca na domenę drukowaną PLL zależna była od początkowej gęstości wysiania komórek i wzrastała stopniowo wraz z upływem czasu hodowli. Liczba komórek rosnących w obydwu pożywkach była podobna, przy przewadze liczby komórek w pożywce bezsurowiczej, jednakże różnice istotne statystycznie zanotowano dopiero dla hodowli w dniu 7 przy średniej i dużej gęstości wysiania (80 komórek na kwadrat w SF vs 47 komórek w 2% serum, Ryc. 24 A). Analizując tempo proliferacji komórek rosnących na podłożu poliaminokwasowym obserwuje się istotną statystycznie przewagę liczby komórek Ki67-pozytywnych w pożywce bezsurowiczej (Ryc. 24 B), natomiast brak jest wyraźnych różnic pomiędzy poszczególnymi dniami hodowli. W pożywce zawierającej 2% surowicy, populacja aktywnie proliferująca w grupie o średniej i dużej gęstości wysiania (M i H) była większa w dniu siódmym od proliferacji w dniu 2 i 4 (Ryc. 24 B). Na domenach

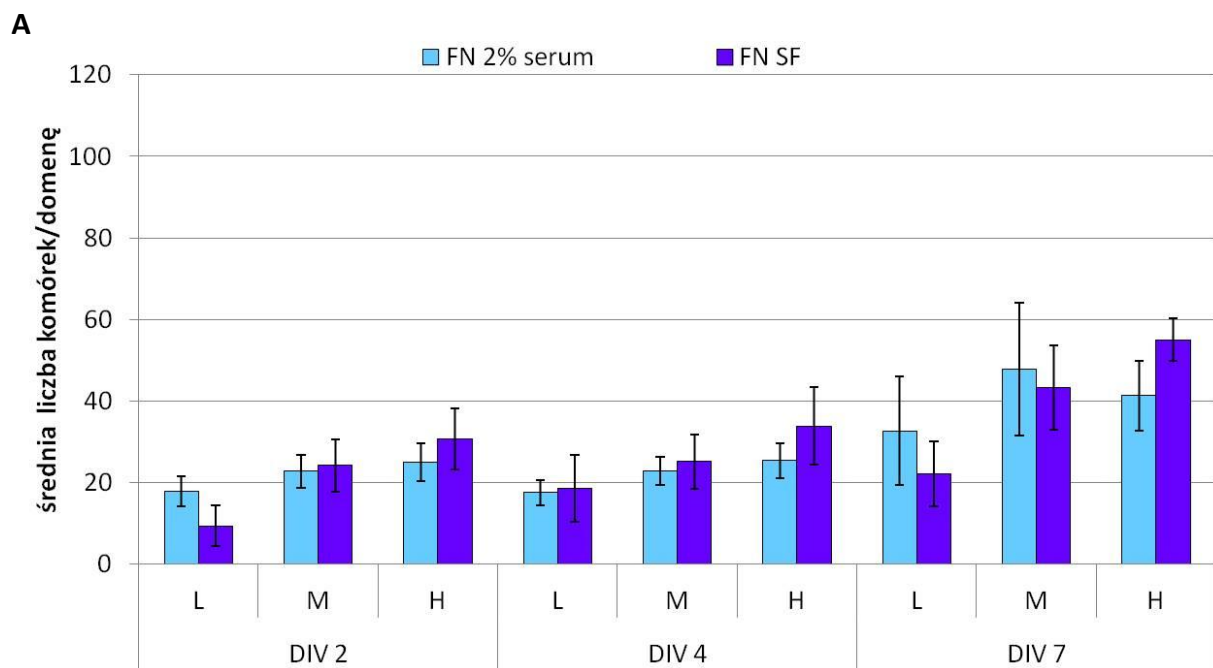
drukowanych PLL procent komórek Ki67-pozytywnych był wyższy w pożywce bezsurowiczej i wynosił od ok. 56% do 68%, począwszy od dnia drugiego w średniej gęstości wysiania do dnia siódmego, w którym to poziom proliferacji komórek HUCB-NSC dla wszystkich początkowych gęstości wysiania osiągają wartości od 63% do 68%.

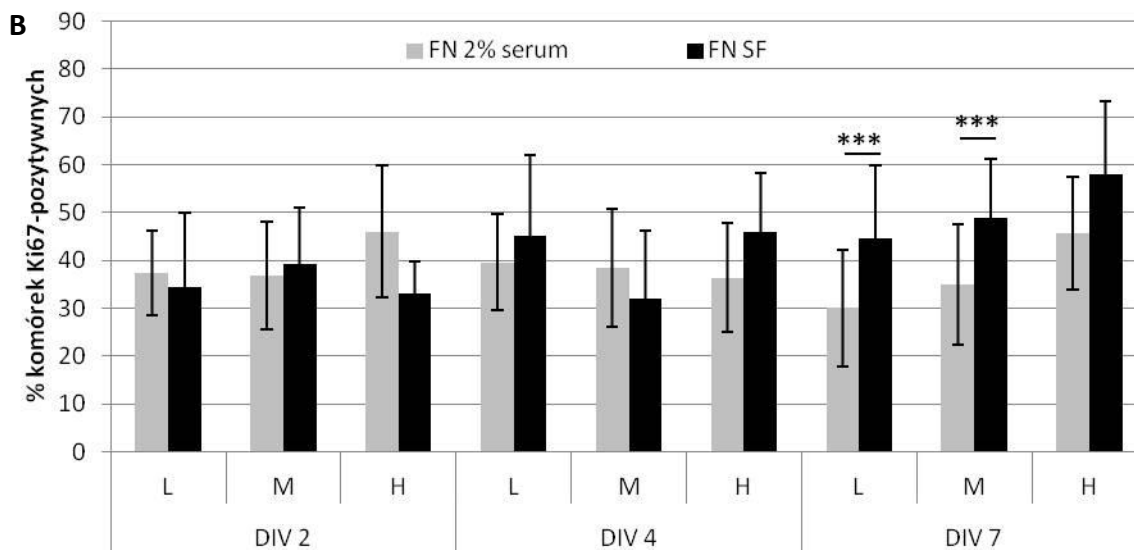


Ryc. 24 Średnia całkowita liczba komórek HUCB-NSC przypadających na domenę mikrodrukowaną poli-L-lizyną (A) oraz odsetek komórek wykazujących obecność markera Ki67 (B), obserwowana po 2, 4 i 7 dniach hodowli w trzech początkowych gęstościach wysiania: niskiej L ( $1 \times 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup>), średniej M ( $2,5 \times 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup>) i dużej H ( $5 \times 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup>), w obecności 2% surowicy lub w hodowli bezsurowiczej. Wyniki przedstawiają średnie ( $\pm$ SD) z trzech niezależnych eksperymentów. Testem ANOVA z testem dodatkowym Bonferroni sprawdzono istotność statystyczną pomiędzy grupami, \*\*\*\*p<0,0001, \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01.

### 3.3.2. Proliferacja na domenach drukowanych fibronektyną

Proliferację HUCB-NSC na domenach mikrodrukowanych fibronektyną o zdefiniowanej powierzchni określono, podobnie jak w przypadku poli-L-lizyny, pomiarem liczby komórek w trakcie trwania hodowli oraz odsetkiem komórek Ki67 pozytywnych. Liczba komórek HUCB przypadających na fibronektynową kwadratową domenę wzrastała wraz ze zwiększeniem gęstości wysiania, a także wraz z czasem hodowli w obydwu badanych pożywkach hodowlanych. Nie zaobserwowano znaczących i powtarzalnych różnic pomiędzy liczbą komórek w obydwu grupach (2% serum i SF, Ryc. 25 A). Jedyne różnice w tempie proliferacji zanotowano siódmego dnia hodowli, gdzie komórek w trakcie aktywnej fazy cyklu komórkowego było więcej w warunkach bezsurowiczych w niskiej i średniej początkowej gęstości wysiania w porównaniu do warunków surowiczych (Ryc.25 B).





Ryc. 25. Średnia całkowita liczba komórek HUCB-NSC przypadających na domenę mikrodrukowaną fibronektyną (A) oraz odsetek komórek wykazujących obecność markera Ki67 (B), obserwowana po 2, 4 i 7 dniach hodowli w trzech początkowych gęstościach wysiania: niskiej L ( $1 \times 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup>), średniej M ( $2,5 \times 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup>) i dużej H ( $5 \times 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup>), w obecności 2% surowicy i w hodowli bezsurowiczej. Wyniki przedstawiają średnie ( $\pm$ SD) z trzech niezależnych eksperymentów. Testem ANOVA z testem dodatkowym Bonferroni sprawdzono istotność statystyczną pomiędzy grupami, \*\*\*  $p < 0,001$ .

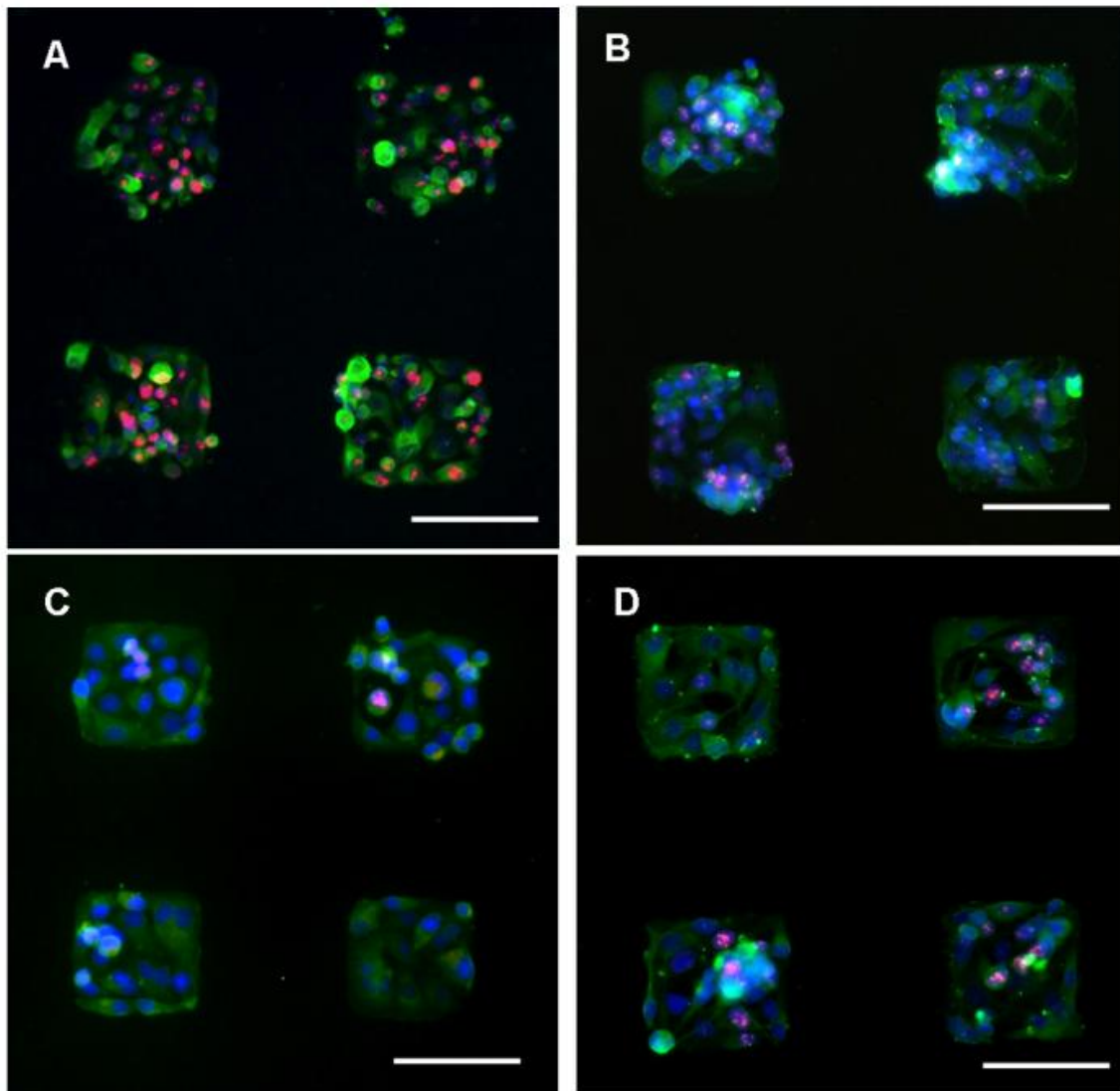
### 3.3.3. Porównanie tempa proliferacji HUCB-NSC na fibronektynie i poli-L-lizynie, korelacja ze zdolnością do różnicowania

Komórki HUCB-NSC rosnące na fibronektynie odznaczały się niższym tempem proliferacji niż komórki rosnące na domenach drukowanych PLL. Zaobserwowano, że w pożywce bezsurowiczej procent komórek Ki-67 pozytywnych jest większy w przypadku hodowli na poli-L-lizynie niż na fibronektynie, w każdym badanym punkcie czasowym hodowli. Wyjątkiem jest wynik obserwowany dla małej gęstości wysiania (L) w dniu drugim oraz największej gęstości wysiania (H) w dniu siódmym (Ryc. 24 B vs Ryc. 25 B, Tabela 5). W obecności surowicy również obserwowano taką tendencję, jednakże statystycznie istotne różnice pomiędzy stosowanymi biomolekułami obserwowano jedynie w grupach M DIV 4 ( $p < 0,001$ ) i L DIV 7 ( $p < 0,001$ ) (Tabela 5).

Tabela 5. Zestawienie istotności statystycznych w różnicy tempa proliferacji pomiędzy grupami doświadczalnymi, w zależności od warunków hodowli. Analizę wykonano testem "One-Way Anova" z porównaniami wielokrotnymi z testem dodatkowym Bonferroni,  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p > 0,05$  (ns).

	PLL vs FN w pożywce z dodatkiem 2% FBS	PLL vs FN w pożywce bezsurowiczej
L DIV 2	ns	ns
M DIV2	ns	****
H DIV2	ns	****
L DIV4	ns	***
M DIV4	****	****
H DIV4	ns	**
L DIV 7	****	****
M DIV7	ns	****
H DIV7	ns	ns

Analiza immunocytochemiczna badanych grup wykazała obecność na poli-L-lizynie wielu okrągłych, niezróżnicowanych komórek Ki67-pozytywnych (Ryc.26), co pozwala przypuszczać, że PLL promuje immobilizację komórek z dużą zdolnością do proliferacji, zarówno w obecności jak i przy braku surowicy w pożywce. 2 % surowica w pożywce stymuluje neuronalne ukierunkowanie komórek HUCB-NSC obecnych na PLL (więcej komórek  $\beta$ -tubulina III – pozytywnych na Ryc. 26 A niż Ryc. 26 B) i spadek aktywności proliferacyjnej. Z kolei na fibronektynie komórki pozostają mocno przytwierdzone do podłoża, zajmując większą przestrzeń dostępnej domeny (Ryc. 26 C i D), a także wykazują znakowanie markerem neuronalnym w obydwu badanych warunkach hodowlanych, przy czym pożywka bezsurowicza promuje wytwarzanie cienkich neuronalnych wypustek. Różnicowaniu towarzyszy spadek aktywności proliferacyjnej (mniejsza liczba komórek Ki67+). Obserwacje z użyciem mikroskopu elektronowego, jak również analiza różnicowania komórek HUCB-NSC na domenach o kształcie kwadratów połączonych liniami (Ryc. 21, Ryc. 23) potwierdzają obserwacje związane z większym zaawansowaniem różnicowania i spadkiem aktywności proliferacyjnej na domenach fibronektynowych w porównaniu z domenami poli-L-lizynowymi.



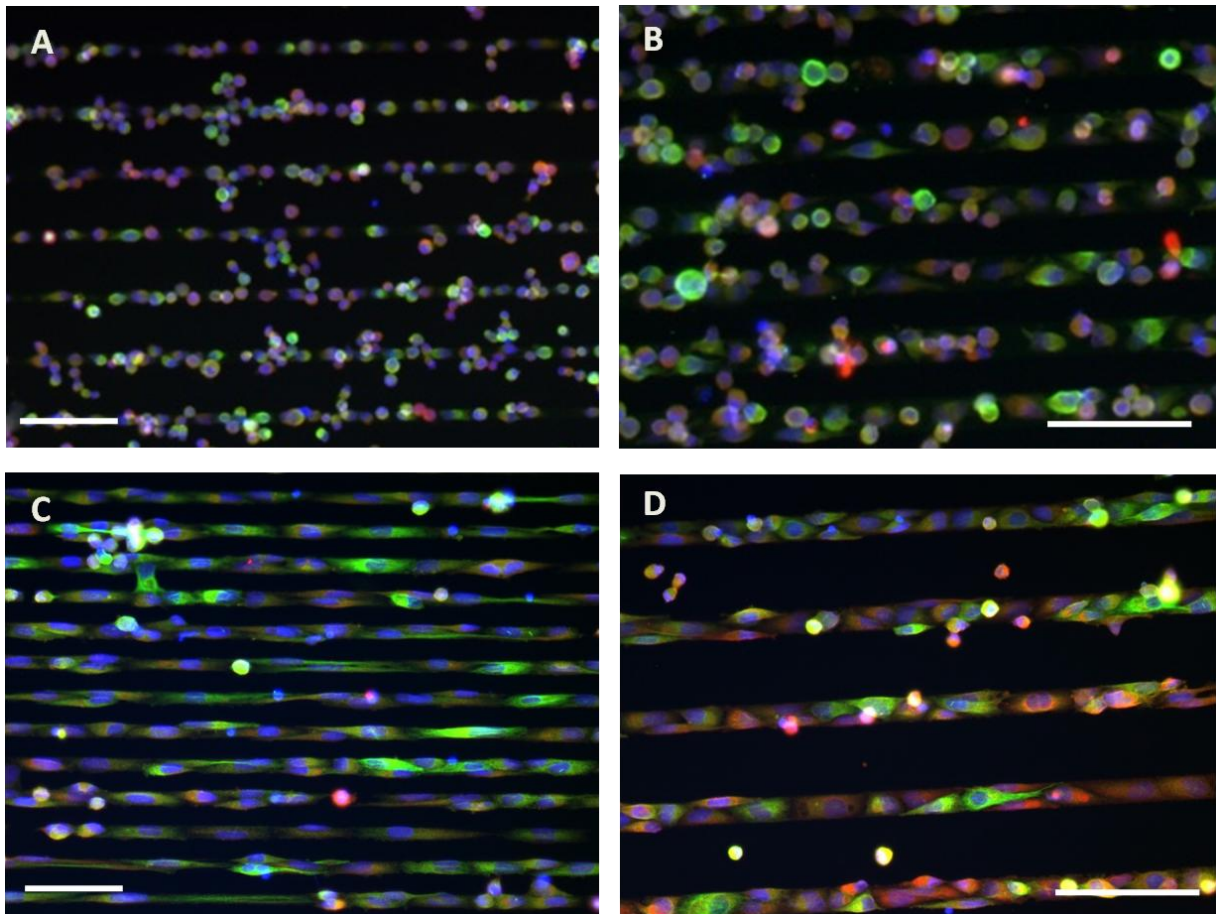
Ryc. 26. Analiza proliferacji HUCB-NSC wysianych w gęstości  $2,5 \times 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup>, na mikroplatformach drukowanych poli-L-lizyną (A,B) lub fibronektyną (C,D). Zielonym kolorem wyznakowano komórki wykazujące obecność markera  $\beta$ -tubuliny III, czerwonym – Ki67. Jądra komórkowe wybarwione na niebiesko Hoechst 33258. Znakowanie wykonane w 4 dniu hodowli w pożywce z 2% zawartością surowicy (A,C) oraz w warunkach bezsurowiczych (B,D). Skala=100 $\mu$ m.



## 4. Matryce jednokomórkowe w hodowli HUCB-NSC

### 4.1. Charakterystyka jednokomórkowych domen biofunkcjonalnych

Technika mikrodrukowania stwarza możliwości dopasowania domen funkcjonalnych do rozmiarów pojedynczych komórek, a tym samym konstrukcję matryc jednokomórkowych. Jednokomórkowe matryce zapewniają możliwość badania wpływu mikrośrodowiska na pojedyncze komórki. Możliwe jest stosowanie domen o rozdzielczości sięgającej nawet 10µm, umożliwiające immobilizowanie pojedynczych komórek, oraz tworzenie linii o szerokości 10 µm limitującej ułożenie pojedynczych komórek obok siebie (Ryc.27).

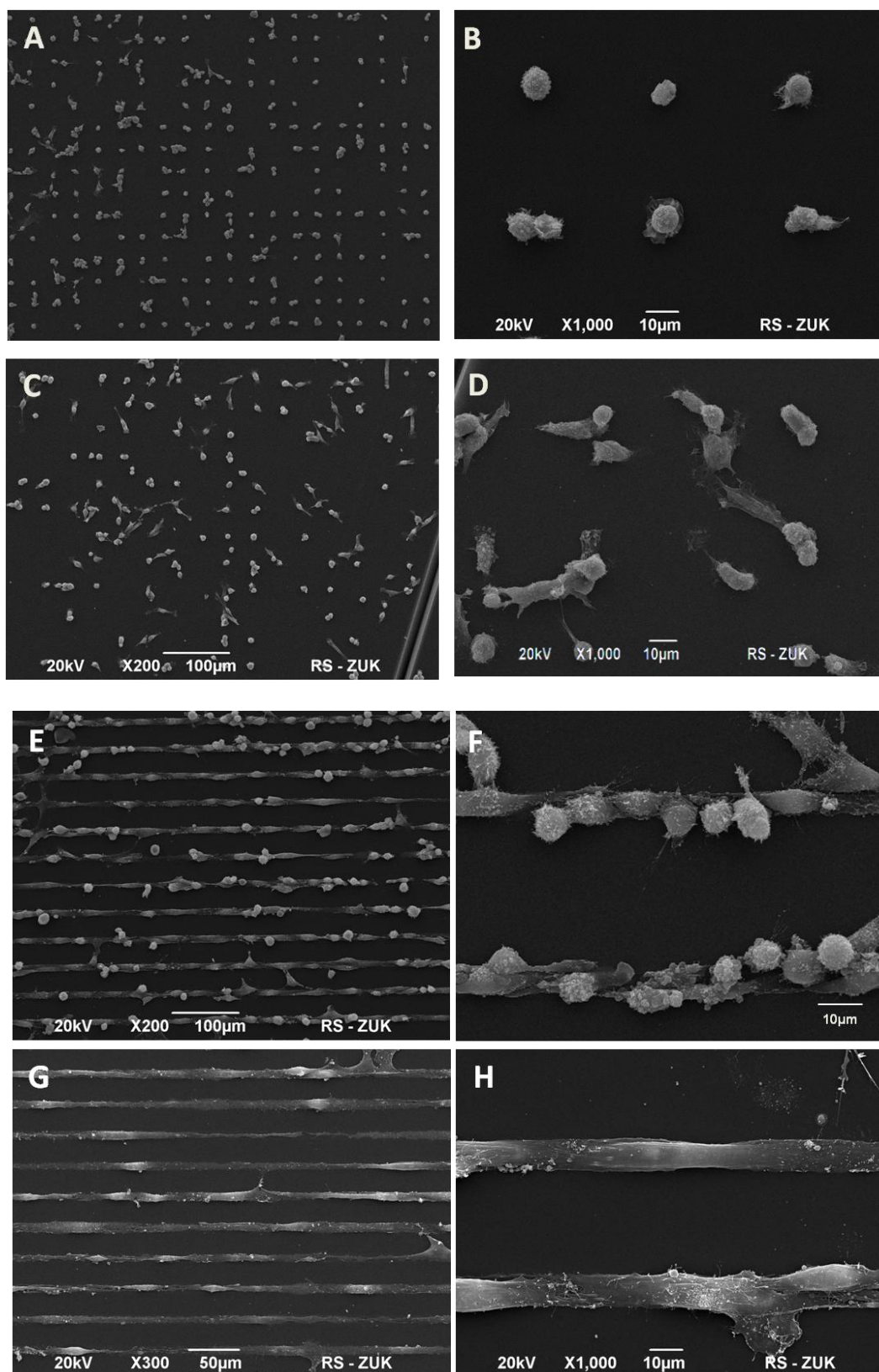


Ryc.27. Komórki HUCB-NSC wyznakowane na obecność  $\beta$ -tubuliny III (kolor zielony) i GFAP (kolor czerwony), hodowane na liniach mikrodrukowanych PLL o szerokości 10 µm (A) i 20 µm (B) oraz FN o szerokości 10 µm (C) i 20 µm (D). Jądra komórkowe wybarwione na niebiesko Hoechst 33258. Skala = 100µm



#### *4.2. Wpływ pozycjonowania komórek w domenach jednokomórkowych na morfologię i różnicowanie komórek HUCB-NSC*

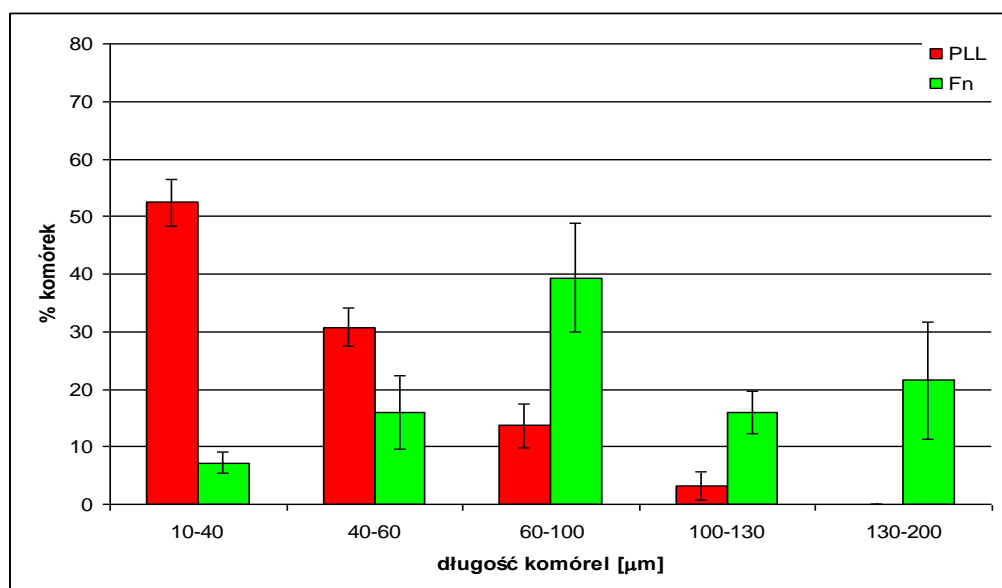
Zastosowano matryce biofunkcjonalne, będące zbiorem pojedynczych kwadratów (tzw. znaczków) o boku 10 $\mu$ m oraz cienkich linii o szerokości 10 $\mu$ m lub 20 $\mu$ m drukowanych poli-L-lizyną lub fibronektyną (Ryc. 27). Po wysianiu komórek HUCB-NSC, hodowlę analizowano przyżyciowo w mikroskopie z kontrastem fazowym. Już po jednej godzinie od wysiania obserwowano znacząco lepszą adhezję komórek do matrycy drukowanej fibronektyną, podczas gdy na poli-L-lizynie stabilna adhezja możliwa była dopiero po 24 godzinach. Po jednym dniu hodowli zaobserwowano zależność morfologii komórek od typu powierzchni. Na poli-L-lizynie obserwowano w większości komórki okrągłe, nietworzące długich wypustek (Ryc.28 A, B) lub okupujące pojedynczy kwadrat (Ryc. 28 E, F). Natomiast w przypadku zastosowania fibronektyny komórki bardzo silnie przylegają do powierzchni, często zajmując sąsiadujące kwadraty (Ryc. 28 C) i tworząc bardzo długie i cienkie wypustki układające się wzdłuż linii matrycy (Ryc.28 D).



Ryc.28. Zdjęcia wykonane w skaningowym mikroskopie elektronowym hodowli HUCB-NSC na matrycach jednokomórkowych, drukowanych poli-L-lizyną (A,B,E,F) lub fibronektyną (C,D,G,H), stanowiących kwadraty o boku  $10\mu\text{m}$  (A-D) oraz linie o szerokości  $10\mu\text{m}$  (E-H).

Aby ocenić różnicę w adhezji komórek HUCB-NSC do linii mikrodrukowanych poli-L-lizyną lub fibronektyną zmierzono ich długość po jednym dniu hodowli (Ryc.29). Zaobserwowano znaczącą przewagę liczby komórek małych (krótkich) rosnących na poli-L-lizynie w porównaniu z fibronektyną, a z kolei komórki wydłużone w przeważającej ilości obserwowane były głównie na białku macierzy zewnątrzkomórkowej, co potwierdza obserwacje dokonane w mikroskopie elektronowym.

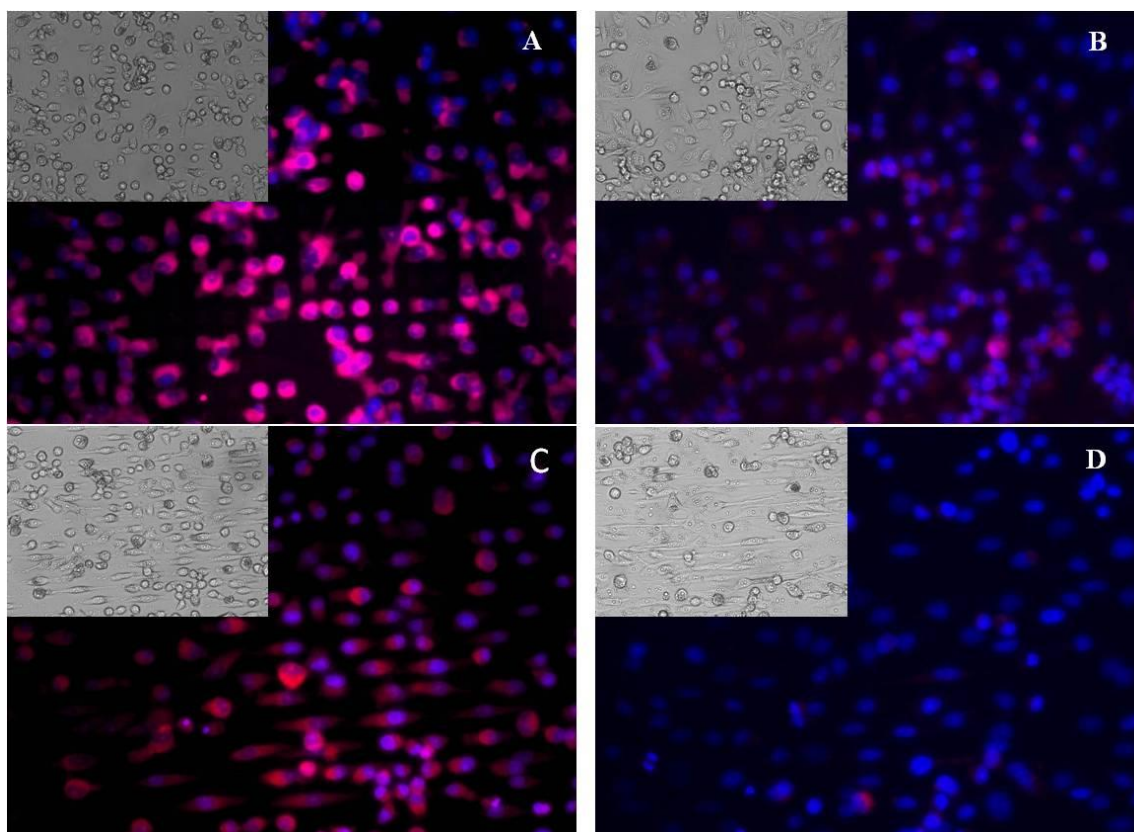
Rycina 29 przedstawia zależność długości komórek od składu domen biofunkcyjnych o kształcie linii. Widoczna jest korelacja mechanizmu oddziaływania błony komórkowej z cząsteczkami adhezyjnymi. Oddziaływanie elektrostatyczne pomiędzy komórkami a powierzchnią poliaminokwasową (PLL) skutkuje ich niezróżnicowaną morfologią (większość komórek jest luźno przytwierdzona, okrągła, bez wypustek), natomiast specyficzny rodzaj adhezji poprzez receptory integrynowe umożliwia komórkom silne przyleganie do fibronektyny i tworzenie długich wypustek.



Ryc. 29. Długość komórek HUCB-NSC rosnących na liniach drukowanych poli-L-lizyną lub fibronektyną, mierzona po jednym dniu hodowli. Wyniki przedstawiają średni % ( $\pm$ SD) komórek o określonej długości.

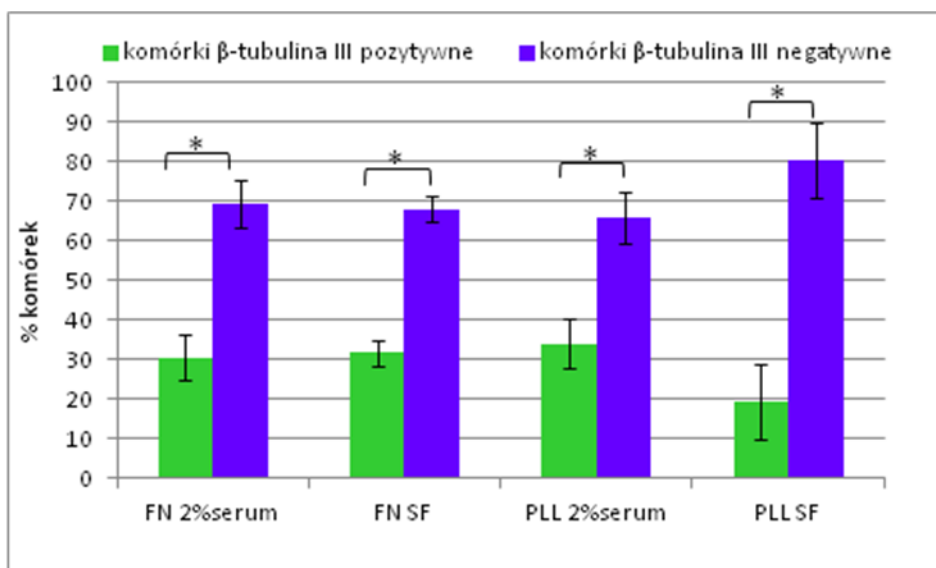
Po siedmiu dniach hodowli matryce jednokomórkowe zostały utrwalone i wyznakowane na obecność markera niezróżnicowanych komórek neuralnych, nestyny.

Powierzchnie drukowane poli-L-lizyną, zarówno kwadraty jak i linie, utrzymują komórki w stanie niezróżnicowania (komórki wykazują obecność nestyny, Ryc. 30 A, C), natomiast powierzchnie pokryte fibronektyną indukują różnicowanie komórek i spadek ekspresji badanego białka (Ryc. 30 B, D).



Ryc. 30. Analiza immunocytochemiczna komórek wykazujących ekspresję nestyny (wyznakowanej kolorem czerwonym), hodowanych 7 dni na mikrodrukowanych PLL (A, C) bądź fibronektyną (B, D) znaczkach (A, B) i liniach (C, D). Jądra komórkowe wybarwione na niebiesko Hoechst 33258. Wstawki przedstawiają obraz z mikroskopu kontrastowo fazowego.

Po jednym dniu hodowli komórki HUCB-NSC hodowane na liniach drukowanych mikrokontaktowo zostały utrwalone i wyznakowane na obecność markera różnicowania neuronalnego ( $\beta$  tubulina III) oraz astrocytarnego (GFAP). Największa liczba komórek niezróżnicowanych pod względem neuronalnym występuje na powierzchni drukowanej PLL w warunkach bezsurowiczych, ale w każdym z wariantów hodowli liczba komórek nieukierunkowanych neuronalnie jest znacząco większa od liczby potencjalnych neuronów (Ryc.31).

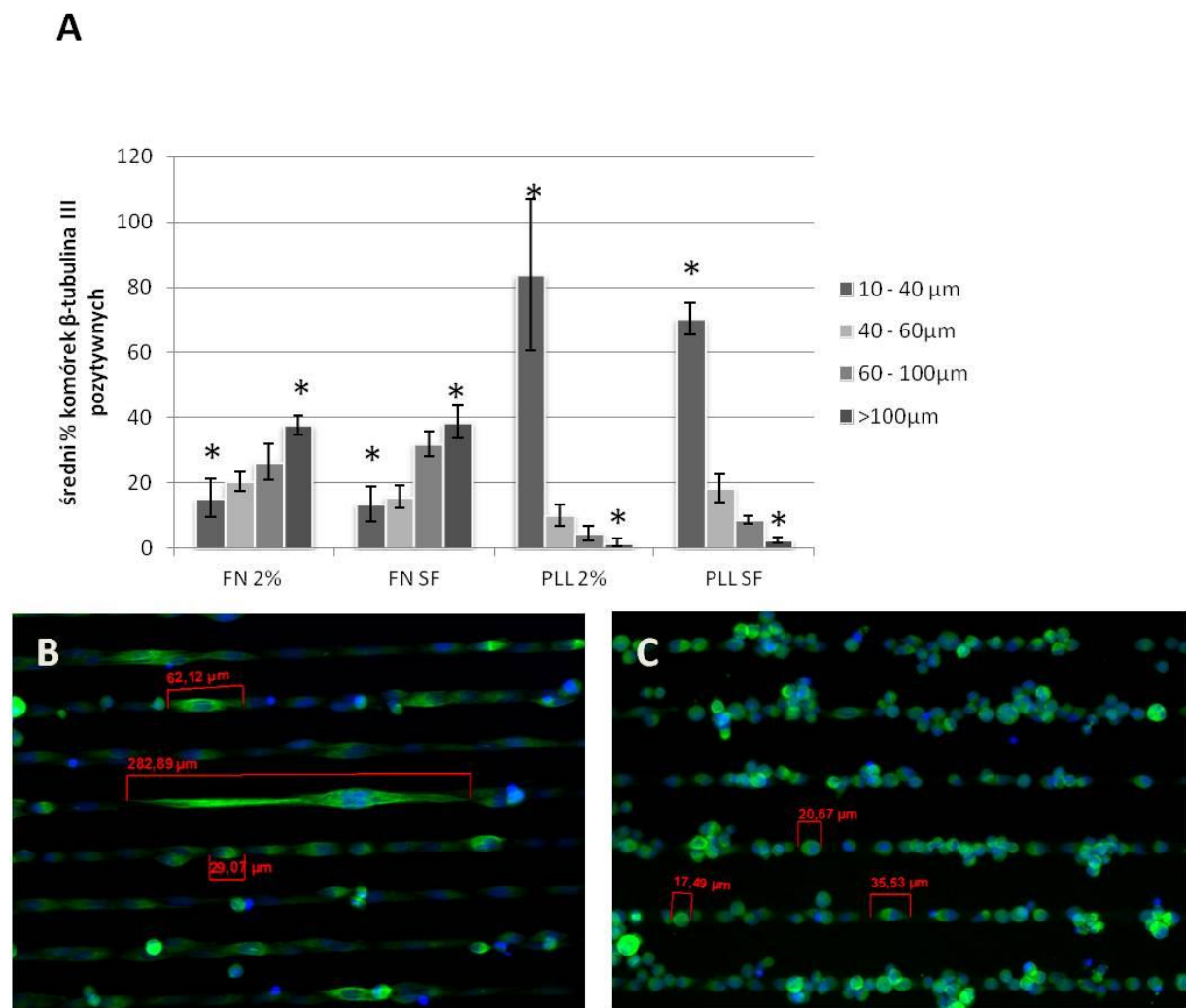


Ryc. 31. Procent komórek HUCB-NSC hodowanych na liniach, wykazujących obecność lub brak markera  $\beta$ -tubuliny III w różnych warunkach eksperymentalnych, po jednym dniu hodowli. Wyniki przedstawiają średnie ( $\pm$ SD) z trzech niezależnych eksperymentów. Testem ANOVA z testem dodatkowym Bonferroni sprawdzono istotność statystyczną pomiędzy grupami,  $p < 0,0001$  (\*).

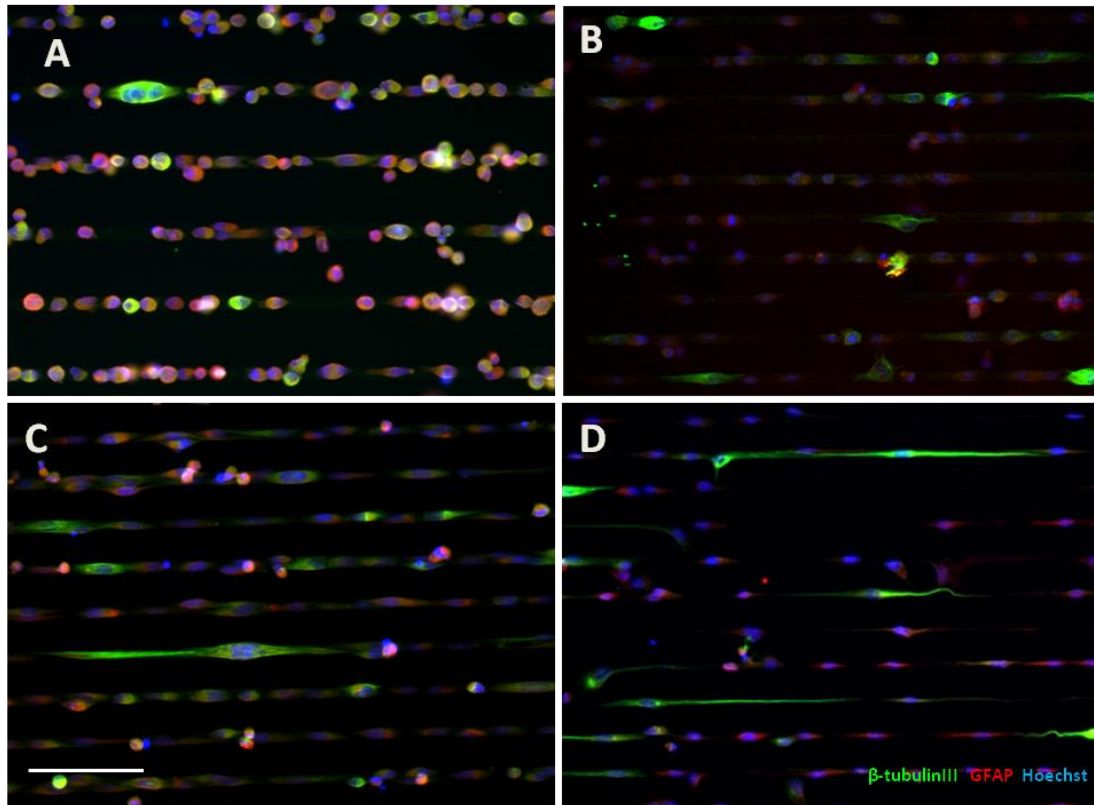
Podobną liczbę komórek wykazujących znakowanie neuronalne obserwowano na liniach drukowanych fibronektyną lub poli-L-lizyną (Ryc. 31). Tak jak w przypadku matryc mikrodrukowanych o innym kształcie, na domenach drukowanych poli-L-lizyną występuje populacja ok. 30 % komórek znakujących się na obecność  $\beta$ tubuliny III, jednakże charakteryzująca się odmienną morfologią. Zaobserwowane różnice w morfologii – różna długość komórek HUCB-NSC hodowanych w obecności badanych substratów zostały zmierzone i przedstawione na wykresie (Ryc. 32). Różnicowanie neuronalne jest zwykle związane z wydłużaniem się komórek i tworzeniem wypustek. Zaobserwowano znaczne różnice w długości komórek pozytywnych pod względem beta-tubuliny III w zależności od stosowanych do mikrodrukowania biomolekuł (Ryc. 32 A): na fibronektynie występuje najwięcej komórek o długości ponad  $100\mu\text{m}$  (Ryc. 32 B), natomiast na poli-L-lizynie istotna statystycznie większość komórek to te przytwierdzone do podłoża jako ‘krótkie’ okrągłe lub lekko wydłużone i nieznacznie dopasowujące się do drukowanego wzoru powierzchni (Ryc.32 C). Nie zaobserwowano różnic statystycznie istotnych w zależności od stosowanej



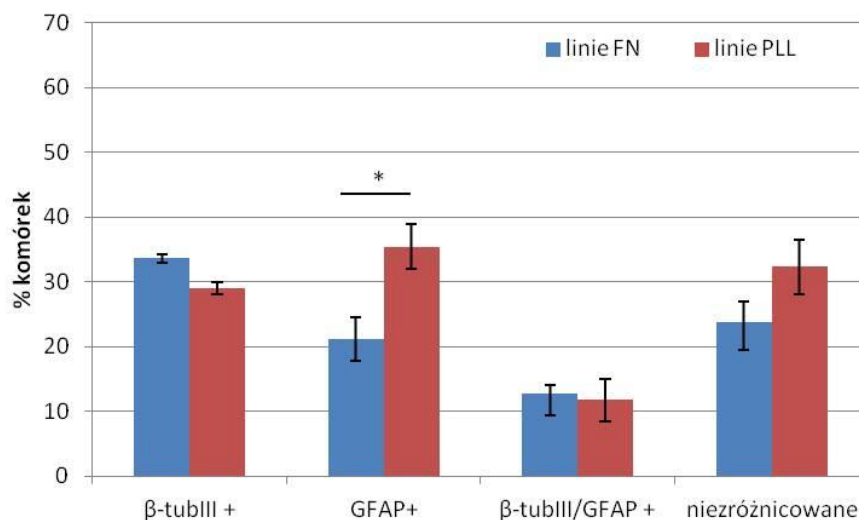
pożywki hodowlanej, jednakże takie różnice stwierdzono pomiędzy różnymi biomolekułami stosowanymi do wytwarzania domen. Komórki rosnące na poli-L-lizynie już po jednym dniu hodowli mają tendencję do tworzenia agregatów i mniej regularnego układania się wzdłuż domen liniowych.



Ryc. 32. Morfologia komórek HUCB-NSC określona występowaniem cytoplazmatycznym  $\beta$ -tubuliny III (zielony kolor). Komórki hodowano na liniach mikrodrukowanych FN lub PLL w różnych warunkach hodowlanych: w obecności 2% surowicy oraz w pożywce bezsurowiczej (A). Wykonywanie pomiarów długości komórek rosnących na liniach fibronektynowych (B) lub poli-L-lizynowych (C). Jądra komórkowe wybarwione na niebiesko Hoechst 33258. Wyniki przedstawiają średnie ( $\pm$ SD) z trzech niezależnych eksperymentów. Testem ANOVA z testem dodatkowym Bonferroni sprawdzono istotność statystyczną pomiędzy grupami, \*  $p < 0,0001$ .



Ryc.33. Immunocytochemiczna analiza komórek HUCB-NSC hodowanych na liniach mikrodukowanych PLL (A,B) lub FN (C,D) w pożywce z 2% surowicą (A,C) lub pożywce bezsurowiczej (B,D). Kolorem zielonym przedstawiono znakowanie  $\beta$ -tubuliny III, kolorem czerwonym GFAP. Jądra komórkowe wybarwione Hoechst 33258. Skala = 100 $\mu$ m.

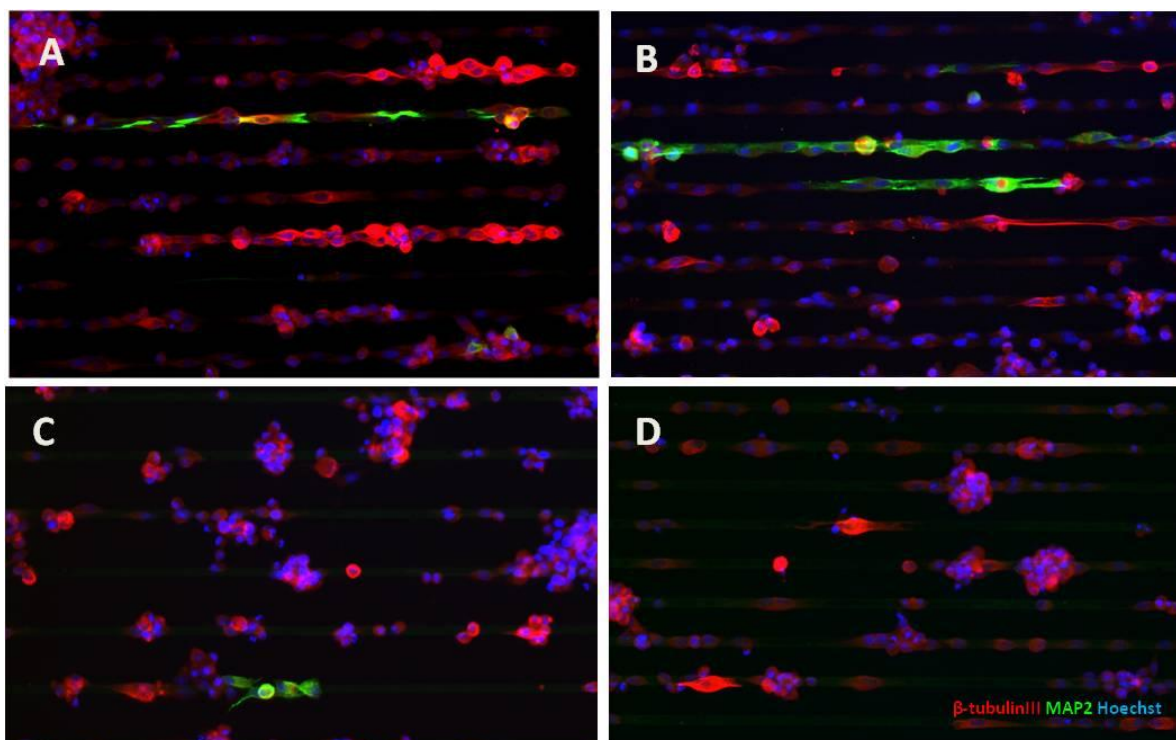


Ryc.34. Profil różnicowania komórek HUCB-NSC rosnących na liniach drukowanych poli-L-lizyną i fibronektyną pod względem obserwowanych markerów ( $\beta$ -tubuliny III i GFAP). Wyniki przedstawiają średnie ( $\pm$ SD) z trzech niezależnych eksperymentów. Testem ANOVA z testem dodatkowym Bonferroni sprawdzono istotność statystyczną pomiędzy grupami,\*  $p < 0,01$ .

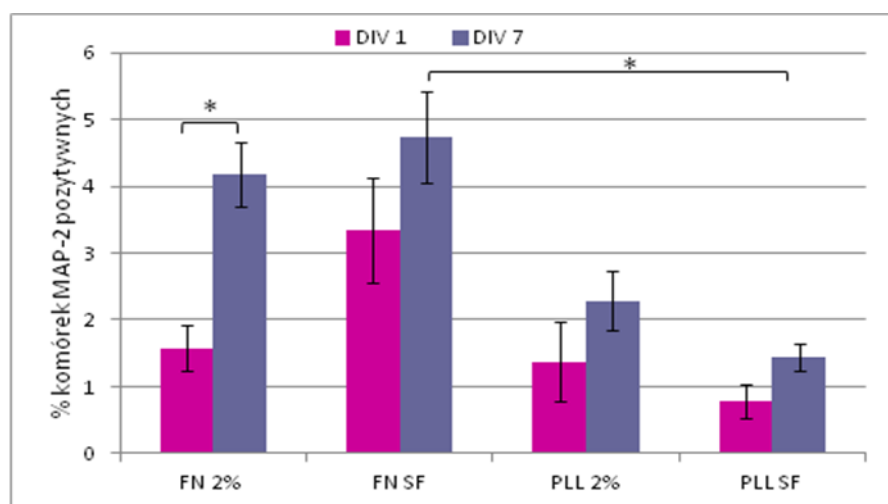
Analiza różnicowania na liniach wykazała przewagę komórek wykazujących ekspresję glicynowego kwaśnego białka włókienkowego na domenach mikrodrukowanych poli-L-lizyną (Ryc. 33 i 34), gdzie ilość komórek HUCB-NSC GFAP-pozytywnych była statystycznie większa na liniach drukowanych PLL niż na FN w hodowli z dodatkiem 2% surowicy (Ryc.34).

Po jedno i siedmiodniowej hodowli sprawdzono obecność markera neuronalnego, typowego dla bardziej zaawansowanego rozwoju, jakim jest białko związane z mikrotubulami, MAP-2, lokalizujące się głównie w wypustkach (dendrytach) komórek nerwowych. Po siedmiu dniach obserwowano liczne agregaty komórek HUCB-NSC (Ryc. 35), głównie na poli-L-lizynie (Ryc.35 C i D). Komórki pozytywne pod względem obecności białka MAP-2 są rzadko obserwowane w opisywanych tu warunkach hodowli, ich liczba po siedmiu dniach dochodzi do 4,7% (Ryc. 36) na fibronektynie, co jest statystycznie większą ilością od komórek MAP-2 pozytywnych w hodowli na poli-L-lizynie (1,4%). Również na fibronektynie w pożywce surowiczej zanotowano istotne zwiększenie pojawiania się badanego markera w siódmym dniu hodowli (4,1%) w stosunku do wartości początkowej (1,5%). Na fibronektynie z dodatkiem 2% FBS zanotowano istotne zwiększenie pojawiania się białka MAP-2 w siódmym dniu hodowli (4,1%) w stosunku do wartości początkowej (1,5%). Nie zaobserwowano jednak istotnych statystycznie różnic pomiędzy występowaniem badanego markera pomiędzy pożywką surowiczą a bezsurowiczą na poszczególnych domenach (Ryc. 36).



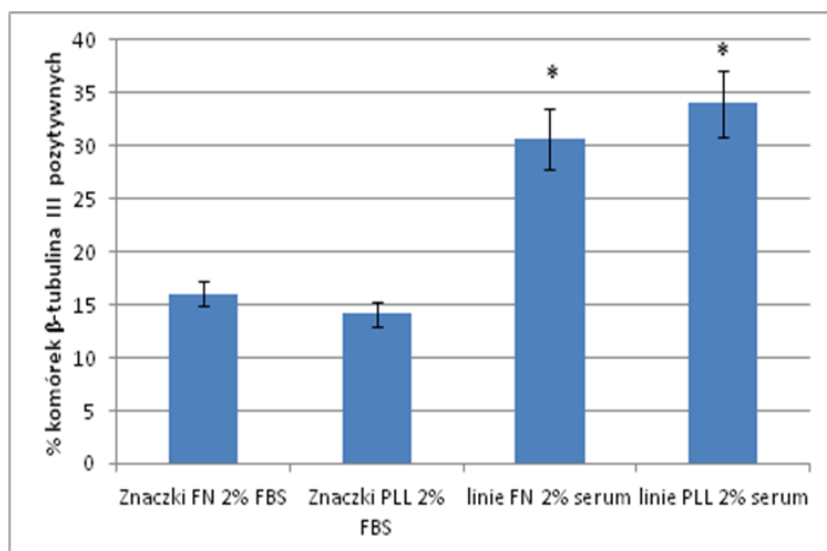


Ryc.35 Immunolokalizacja markerów neuronalnych MAP-2 (kolor zielony) i  $\beta$ -tubuliny III (kolor czerwony) w komórkach HUCB-NSC po 7 dniach hodowli na liniach mikrodrukowanych fibronektyną (A,B) lub poli-L-lizyną (C,D) w obecności 2% surowicy (A,C) bądź w pożywce bezsurowiczej (B,D). Jądra komórkowe wybarwione na niebiesko Hoechst 33258.



Ryc.36. Obecność białka Map-2 w HUCB-NSC po jedno i siedmiodniowej hodowli w różnych wariantach hodowlanych. Wyniki przedstawiają średnie ( $\pm$ SD) z trzech niezależnych eksperymentów. Testem ANOVA z testem dodatkowym Bonferroni sprawdzono istotność statystyczną pomiędzy grupami, \* $p < 0,001$ .

Podczas hodowli komórek zarówno na domenach liniowych jak i na małych kwadratach (znaczkach) stwierdzono zależność występowania omawianego markera ( $\beta$ -tub-III) od kształtu domen mikrodrukowanych. Małe domeny o ograniczonej do  $10^2 \mu\text{m}$  powierzchni znacząco hamowały osiągnięcie przez komórki HUCB-NSC fenotypu neuronalnego. Na domenach tzw. znaczkach obserwowano  $16,6 \pm 1 \%$  w obecności FN i  $14,1 \pm 1,1 \%$  na PLL komórek  $\beta$ -TubIII pozytywnych, podczas gdy na liniach drukowanych fibronektyną  $30,6 \pm 2,9$ , a na PLL  $34,03 \pm 3,1$  (Ryc.37).



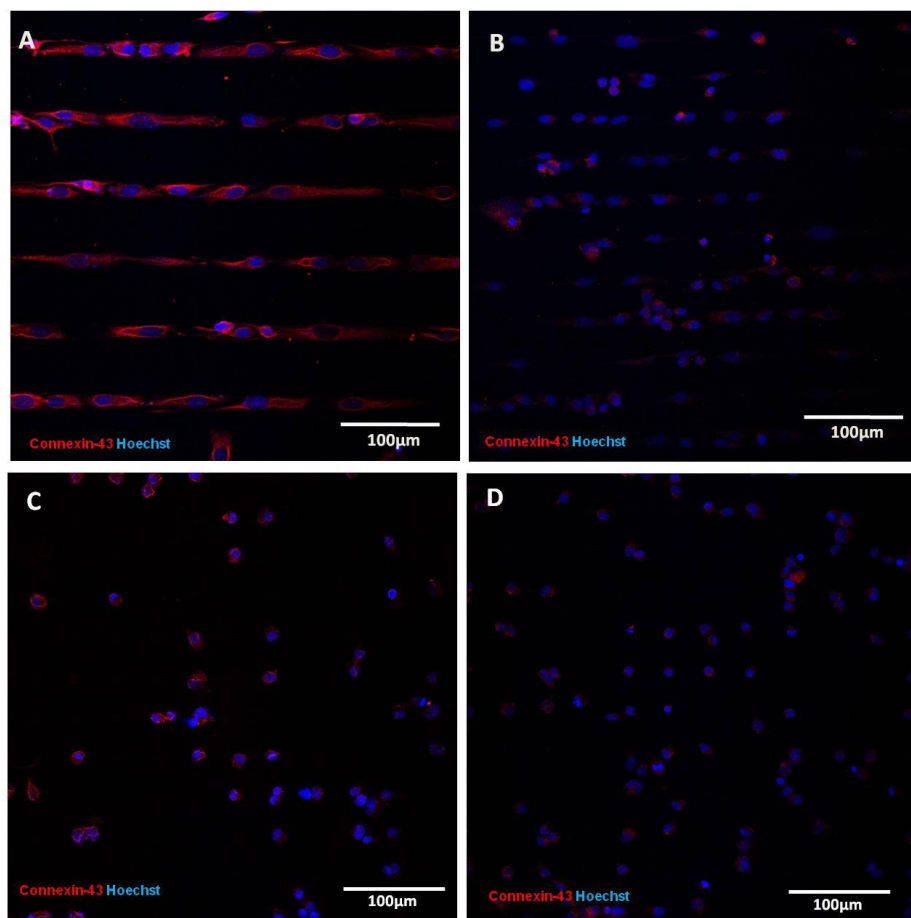
Ryc. 37. Porównanie różnicowania neuronalnego komórek HUCB-NSC rosnących na małych kwadratach (znaczkach) i liniach mikrodrukowanych FN i PLL w różnych warunkach hodowlanych. Słupki przedstawiają odsetek komórek  $\beta$ -tubulina III pozytywnych wyrażone jako średnie ( $\pm$ SD) z trzech niezależnych eksperymentów. Testem ANOVA z testem

dodatkowym Bonferroni sprawdzono istotność statystyczną, \* $p < 0,001$ .

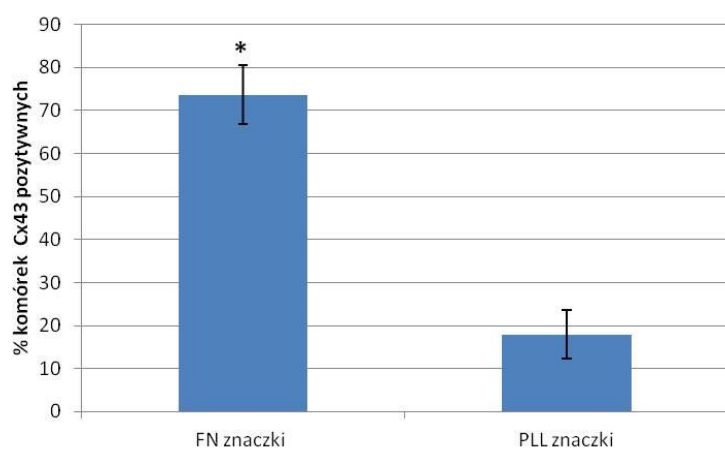
#### Analiza ekspresji koneksyny 43 w hodowli HUCB-NSC na matrycach jednokomórkowych

W celu sprawdzenia czy na platformach z wzorem domen biofunkcjonalnych jednokomórkowych dochodzić może do aktywnych połączeń międzykomórkowych przeprowadzono znakowanie na obecność koneksyny 43, białka należącego do rodziny białek tworzących międzykomórkowe połączenia szczelinowe typu 'gap junction'. Obserwowano intensywne znakowanie na liniach drukowanych fibronektyną (Ryc. 38 A), podczas gdy na liniach z PLL stwierdzono obecność pojedynczych wybarwionych komórek (Ryc. 38 B, D). Komórki rosnące na domenach odseparowanych od siebie wykazywały mniejszą liczbę komórek z ekspresją koneksyny 43 w porównaniu z domenami w kształcie linii (Ryc.38 C i D),

jakkolwiek również w tym przypadku fibronektyna indukowała ekspresję koneksyny w większej liczbie komórek, w porównaniu do poli-L-lizyną (Ryc.39).



Ryc.38. Immunolokalizacja białka koneksyny-43 (kolor czerwony) w komórkach HUCB-NSC hodowanych na liniach (A,B) i małych kwadratach (C,D) mikrodrukowanych fibronektyną (A,C) i poli-L-lizyną (B,D) po jednym dniu hodowli w pożywce zawierającej surowicę. Jądra komórek wybarwione na niebiesko Hoechst.



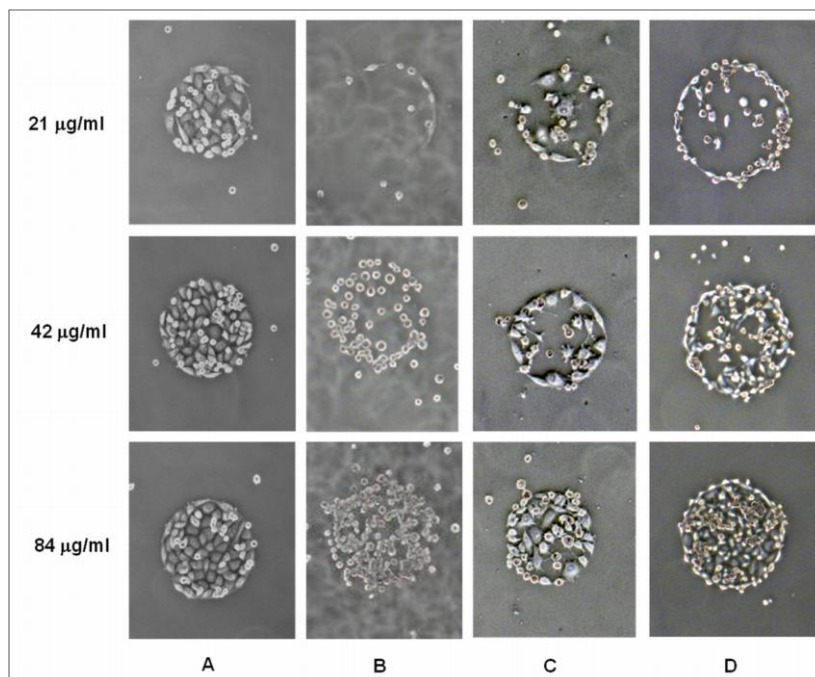
Ryc.39. Odsetek komórek HUCB-NSC rosnących na mikrodrukowanych małych kwadratach (sq 10µm) wykazujących obecność koneksyny 43, obserwowany po jednym dniu hodowli. Wyniki badań przedstawiono jako średnia (±SD), istotność statystyczną wyznaczono testem Mann'a Whitney'a gdzie\* oznacza p<0,05.

## 5. Badanie procesów rozwojowych HUCB-NSC na domenach biofunkcjonalnych mikronakraplanych

Technika mikroinżynierijna dozowania mikrokropli umożliwia tworzenie domen wieloskładnikowych, dzięki czemu możemy badać porównawczo, na tej samej platformie wpływ określonych składników niszy na podejmowanie decyzji rozwojowych przez komórki macierzyste.

### 5.1. Adhezja komórek HUCB-NSC do różnych białek macierzy zewnątrzkomórkowej na domenach mikronakraplanych

W celu określenia, które z białek macierzy zewnątrzkomórkowej jest optymalne dla immobilizacji (adhezji) komórek HUCB-NSC do podłoża wykonano matrycę z domenami mikronakraplanymi, zawierającymi różne białka macierzy zewnątrzkomórkowej: lamininę, fibronektynę, kolagen V i witronektynę, w stężeniach: 21, 42 i 84 $\mu$ g/ml (Ceriotti et al., 2009). Po wysianiu komórek w gęstości 5x10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup> i pozostawieniu w hodowli w obecności 2% surowicy na 24 godziny, zaobserwowano proporcjonalny wzrost liczby komórek adherujących zależny od stężenia białek, jak również zmienną morfologię komórek w zależności od stosowanych biomolekuł (Ryc. 40). Fibronektyna umożliwiła adhezję komórek do całej powierzchni domeny już w najniższym zastosowanym stężeniu. Przeprowadzono wstępną analizę fenotypową komórek HUCB-NSC hodowanych na domenach z fibronektyną, znakowanych na obecność białek typowych dla różnicowania neuralnego ( $\beta$ -tubulina III i GFAP), która wykazała niski % komórek pozytywnych (Ryc 48). Optymalna adhezja, stabilność domen podczas kilkudniowej hodowli oraz analiza fenotypowa komórek, wskazująca na brak zaawansowanego różnicowania w kierunku neuronów i astrocytów, pozwoliły na określenie fibronektyny jako białka referencyjnego do dalszych badań nad wpływem małych cząsteczek sygnałowych na podejmowanie decyzji rozwojowych komórek HUCB-NSC.

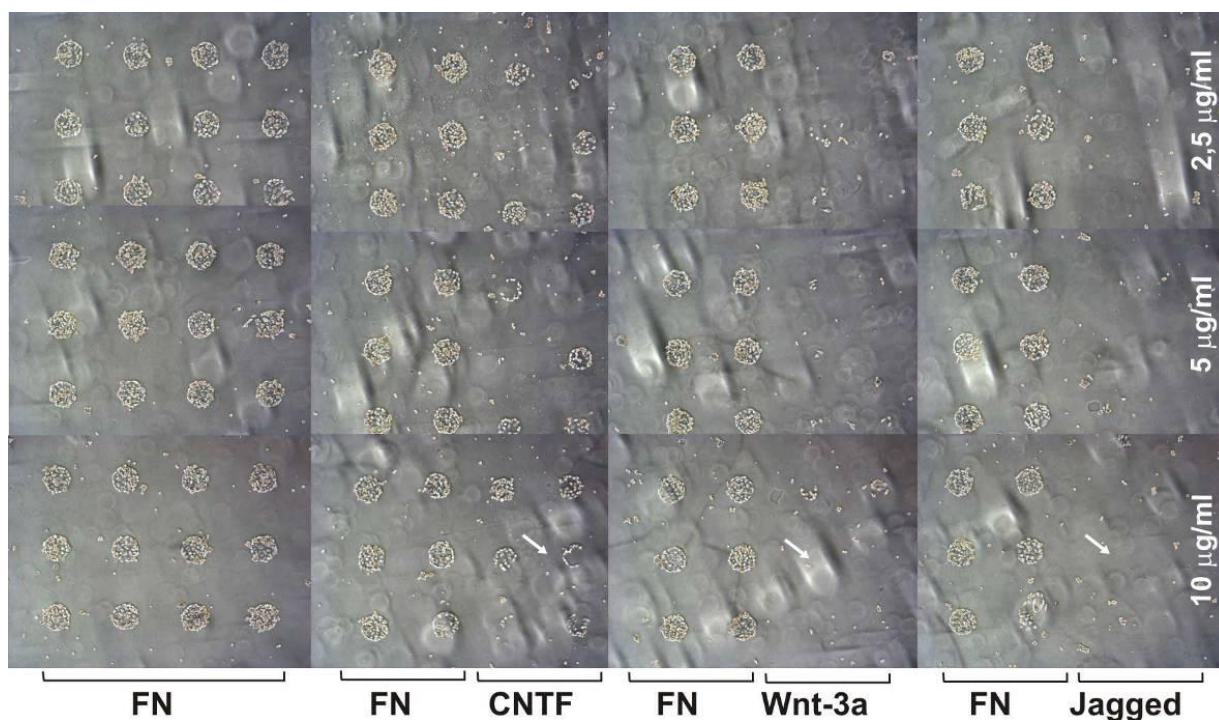


Ryc. 40 Wpływ białek macierzy zewnątrzkomórkowej i ich stężenia na adhezję i morfologię komórek HUCB-NSC. Białka obecne w mikronakraplanych domenach: fibronektyna (A), laminina (B), kolagen V (C) i witronektyna (D) (Ceriotti i wsp., 2009).

## 5.2. Badanie funkcjonalności domen bioaktywnych

Domeny bioaktywne zastosowane do dalszych badań nad wpływem składników niszy na decyzje rozwojowe HUCB-NSC zawierały fibronektynę i określone cząsteczki sygnałowe immobilizowane do podłoża wraz z fibronektyną. Platformy przygotowane do wzrostu komórek z nakroplonymi domenami białkowymi badano pod kątem ich funkcjonalności. Pierwszą kontrolę stanowiło sprawdzenie adhezji HUCB-NSC wysianych na nakraplane mikrodomeny zawierające cząsteczki sygnałowe zawieszono w buforze do nakraplania (bez fibronektyny). Sprawdzono również czy różne stężenia stosowanych cząsteczek sygnałowych mogą mieć wpływ na adhezję neuralnych komórek macierzystych do nakroplonych domen. Po 5 dniach hodowli nie obserwowano trwale przylegających komórek do domen zawierających jedynie cząsteczki sygnałowe, podczas gdy obserwowano trwale przylegające komórki do domen zawierających białko macierzy zewnątrzkomórkowej – fibronektynę (Ryc.41, taki sam efekt obserwowano w przypadku pozostałych stosowanych białek sygnałowych).

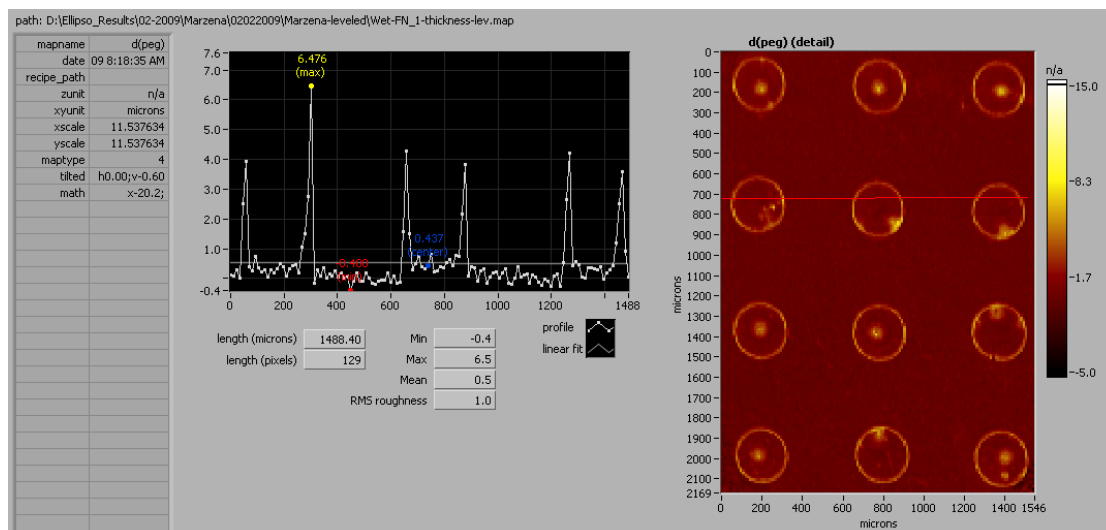




Ryc. 41. Hodowla HUCB-NSC na domenach zawierających fibronektynę (FN, 84µg/ml) oraz małe cząsteczki sygnałowe. W piątym dniu hodowli nie obserwowano trwale przyklejonych komórek do domen zawierających jedynie białka sygnałowe (strzałki).

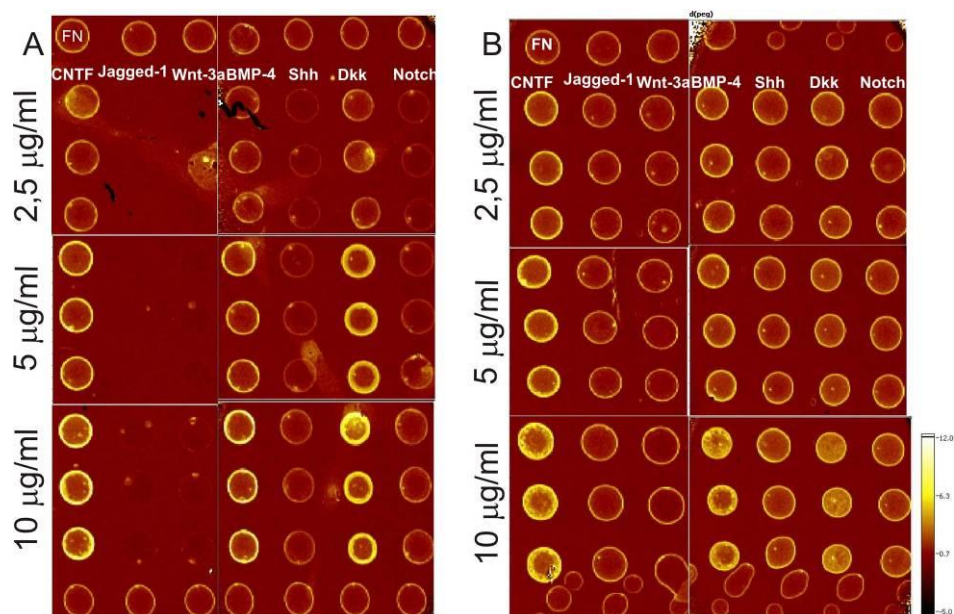
### 5.2.1. Analiza strukturalna powierzchni domen bioaktywnych - elipsometria

W celu sprawdzenia stabilności mikronakraplanych domen platformy z domenami zawierającymi jedynie fibronektynę, jak również platformy zawierające fibronektynę wraz z cząsteczkami sygnalizacyjnymi poddano płukaniu PBS przez jedną godzinę. Badanie elipsometryczne wykonane po płukaniu wykazało, że na powierzchni mikrodomen kontrolnych (fibronektyna w stężeniu 84µg/ml) pozostaje pewna ilość białka, która wystarcza komórkom do adhezji (komórki przyklejały się do analogicznie przygotowywanych preparatów, (Ryc. 42). Przeanalizowano również, czy dodane do mieszaniny buforu i fibronektyny cząsteczki sygnałowe będą ulegały odpłukaniu w trakcie hodowli.



Ryc.42. Mapa i profil grubości próbki nakropionej fibronektyny [84 $\mu$ g/ml] poddanej analizie elipsometrycznej.

Zaobserwowano, iż badane białka sygnałowe, po nakropieniu ich bez obecności fibronektyny w buforze, w większości pozostają na powierzchni (oprócz białka Jagged-1 oraz WNT-3a, Ryc. 43). Jednakże obecność białek sygnałowych nie gwarantuje adhezji wysiewanych komórek (Ryc.41). Dopiero obecność fibronektyny gwarantuje adhezję komórek do badanych domen, oraz powoduje bardziej homogenne rozmieszczenie białka sygnałowego na domenie, poprzez zmniejszenie tzw. efektu brzeżnego (większej ilości deponowanego białka na brzegu domeny, ryc. 43 b, w szczególności białka Dkk-1 oraz BMP-4).



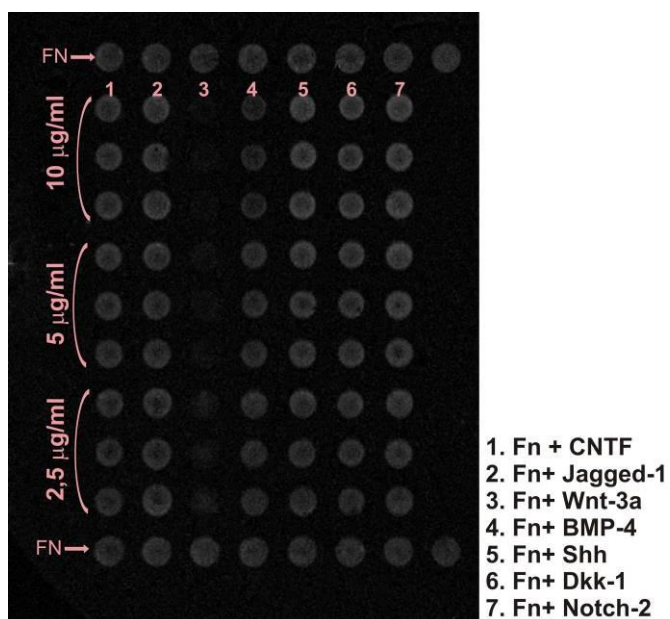
Ryc.43 Porównanie ilości białka, które pozostało na domenach po płukaniu, w nakroplonych roztworach zawierających jedynie bufor i białka sygnałowe (A), oraz roztworach zawierających bufor, fibronektynę oraz badane białka sygnałowe(B).

### 5.2.2. Analiza funkcjonalna powierzchni domen bioaktywnych – SPR

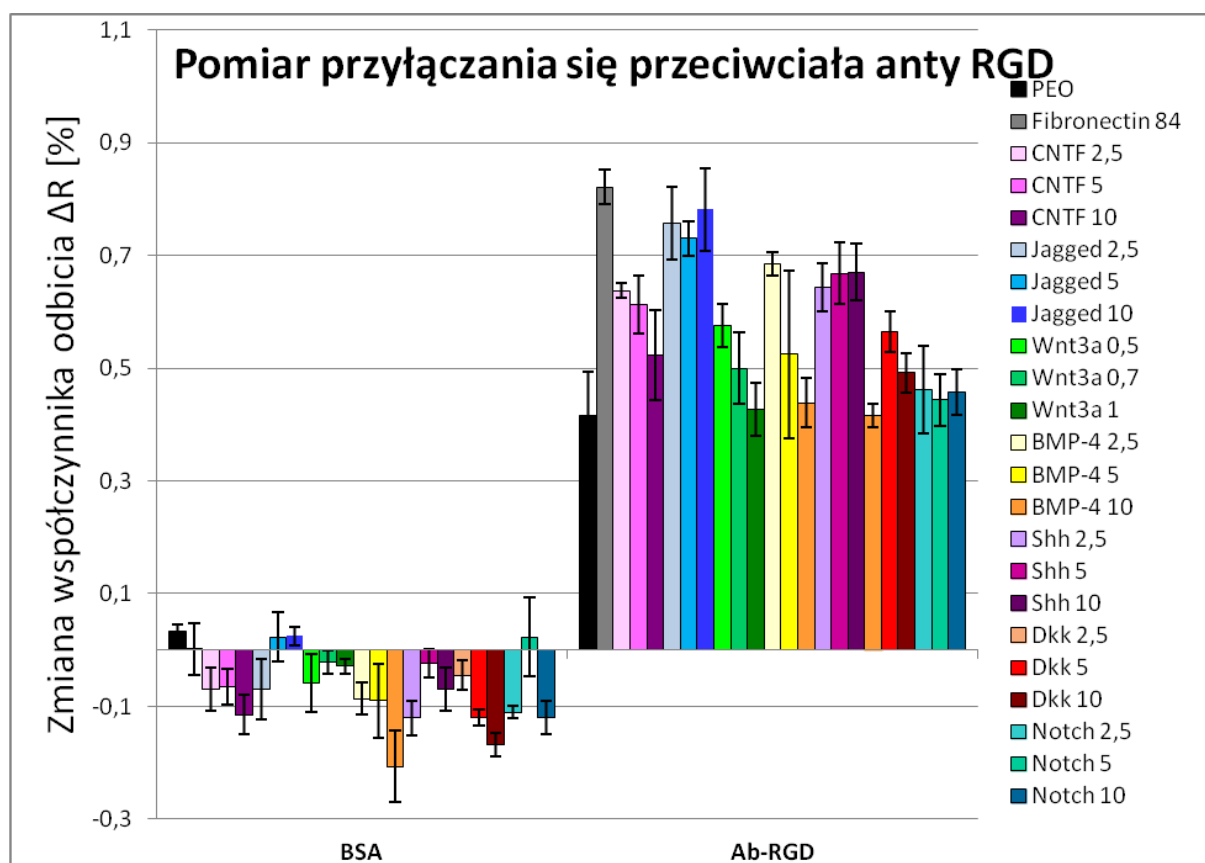
Wykonano analizę funkcjonalności domen metodą powierzchniowego rezonansu plazmonowego, co pozwala określić dostępności sekwencji „RGD” fibronektyny, koniecznej do wiązania receptorów integrynowych na powierzchni komórki oraz dostępność dla komórek białek sygnałowych w nakroplonych domenach.

Zaobserwowano, iż w większości zastosowanych białek ilość przeciwciała anty RGD, przyłączona do nakroplonych domen jest mniejsza niż na domenach kontrolnych, zawierających jedynie fibronektynę (Ryc. 45). Najsilniejszy efekt tego typu występuje w przypadku białka Wnt-3a, co może sugerować iż białko to zasłania fragmenty fibronektyny odpowiedzialne za adhezję komórek (Ryc. 44).

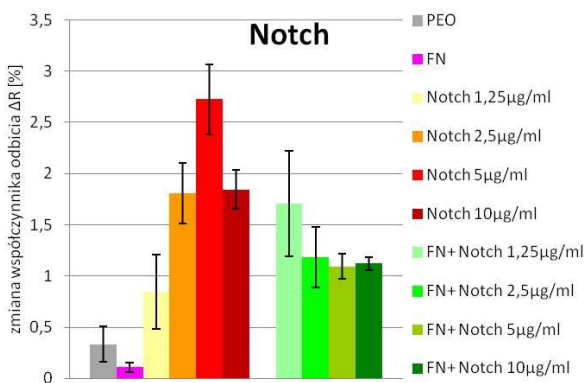
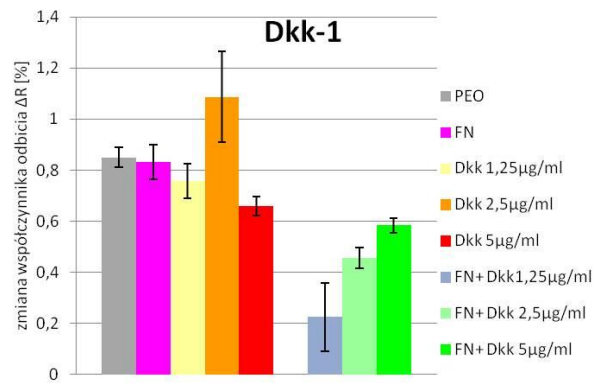
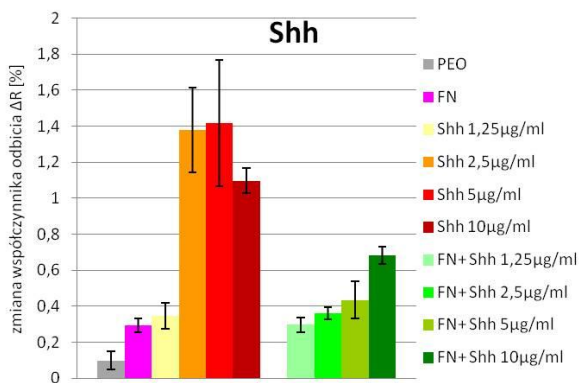
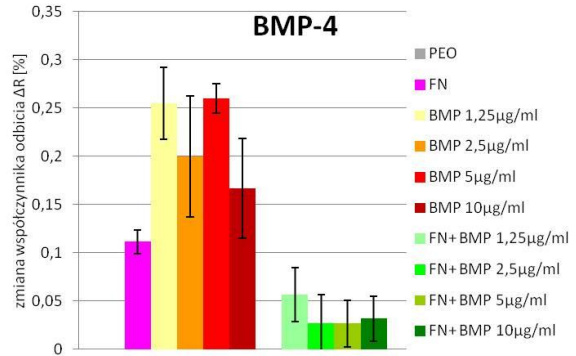
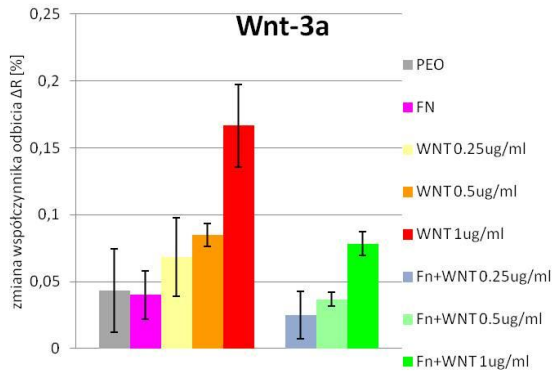
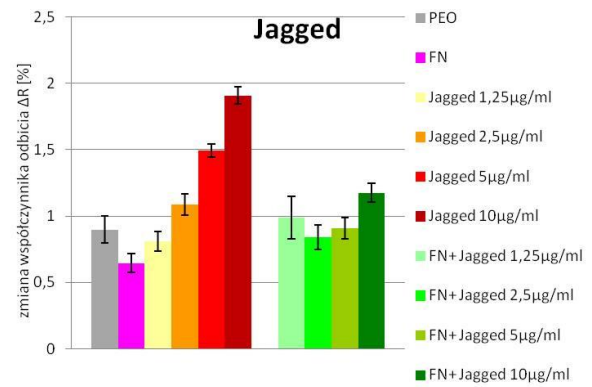
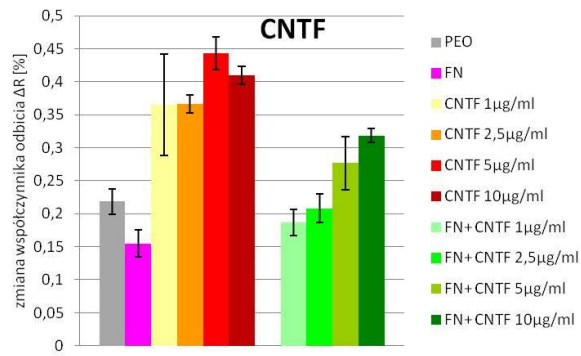




Ryc. 44. Obraz pomiaru wiązania przeciwciała anti-RGD, wykonanego metodą SPR, która wykorzystuje różnicę współczynnika odbicia fal, zależną od interakcji cząsteczek przeciwciała z badanymi domenami.



Ryc. 45. Zmiana współczynnika odbicia  $\Delta R$  mierzonego przed i po ekspozycji badanych domen na przepływ BSA oraz przepływ przeciwciała skierowanego przeciwko sekwencjom RGD fibronektyny (Ab-RGD, 10 $\mu$ g/ml).



Ryc. 46. Pomiar przyłączania się przeciwciał specyficznych dla danych białek sygnałowych, przeprowadzony metodą SPR na domenach mikronakraplanych.

Przeprowadzono analizę interakcji przeciwciał skierowanych przeciwko białkom sygnałowym znajdującym się w domenach mikronakraplanych. Zmierzono ilość przeciwciała przyłączającego się do domen nakraplanych jedynie samym białkiem sygnałowym w różnych stężeniach oraz do domen zawierających mieszaninę fibronektyny i cząstek sygnałowych (Ryc. 46). Badanie to przeprowadzono po uprzednim przepływie roztworu BSA w celu zablokowania miejsc niespecyficznego przyłączania się przeciwciał. W przypadku wszystkich reakcji badanych białek sygnałowych ze specyficznymi przeciwciałami zaobserwowano, że większa ilość przeciwciała łączy się z domenami jednorodnymi pod względem składu, natomiast dodanie fibronektyny do roztworu nakraplającego częściowo zasłania epitopy białek, do których przeciwciała się przyłącza. Pomimo takiego efektu obecność badanego białka jest wykrywana przez urządzenie pomiarowe. W większości przypadków stwierdzono, że ilość przyłączających się cząsteczek specyficznych przeciwciał jest proporcjonalna do stężenia stosowanych białek. W przypadku białka Notch tendencji takiej nie obserwowano, jakkolwiek ilość ta była na bardzo wysokim poziomie. W przypadku białka BMP-4 ilość przyłączonego przeciwciała w domenach z fibronektyną w mieszaninie była niższa niż w 'czystych' próbach. Istotną wartością dla dalszych doświadczeń jest poziom współczynnika odbicia fali  $\Delta R$  dla wariantu zawierającego użytą molekułę sygnałową w roztworze zawierającym fibronektynę i wynosi on: 0,31 dla CNTF; 1,17 dla Jagged; 0,08 dla Wnt-3a; 0,03 dla BMP-4; 0,68 dla Shh; 0,5 dla Dkk-1 oraz 1,12 dla Notch. Badanie to jest w tym przypadku badaniem jakościowym (*ilościowe- dokładne oznaczenia ilości aktywnych cząsteczek białek sygnałowych wymagają wielokrotnych powtórzeń*).

### *5.3. Wpływ białek sygnałowych na decyzje rozwojowe HUCB-NSC*

#### 5.3.1. Charakterystyka fenotypów komórek immobilizowanych do mikronakraplanych domen biofunkcyjnych

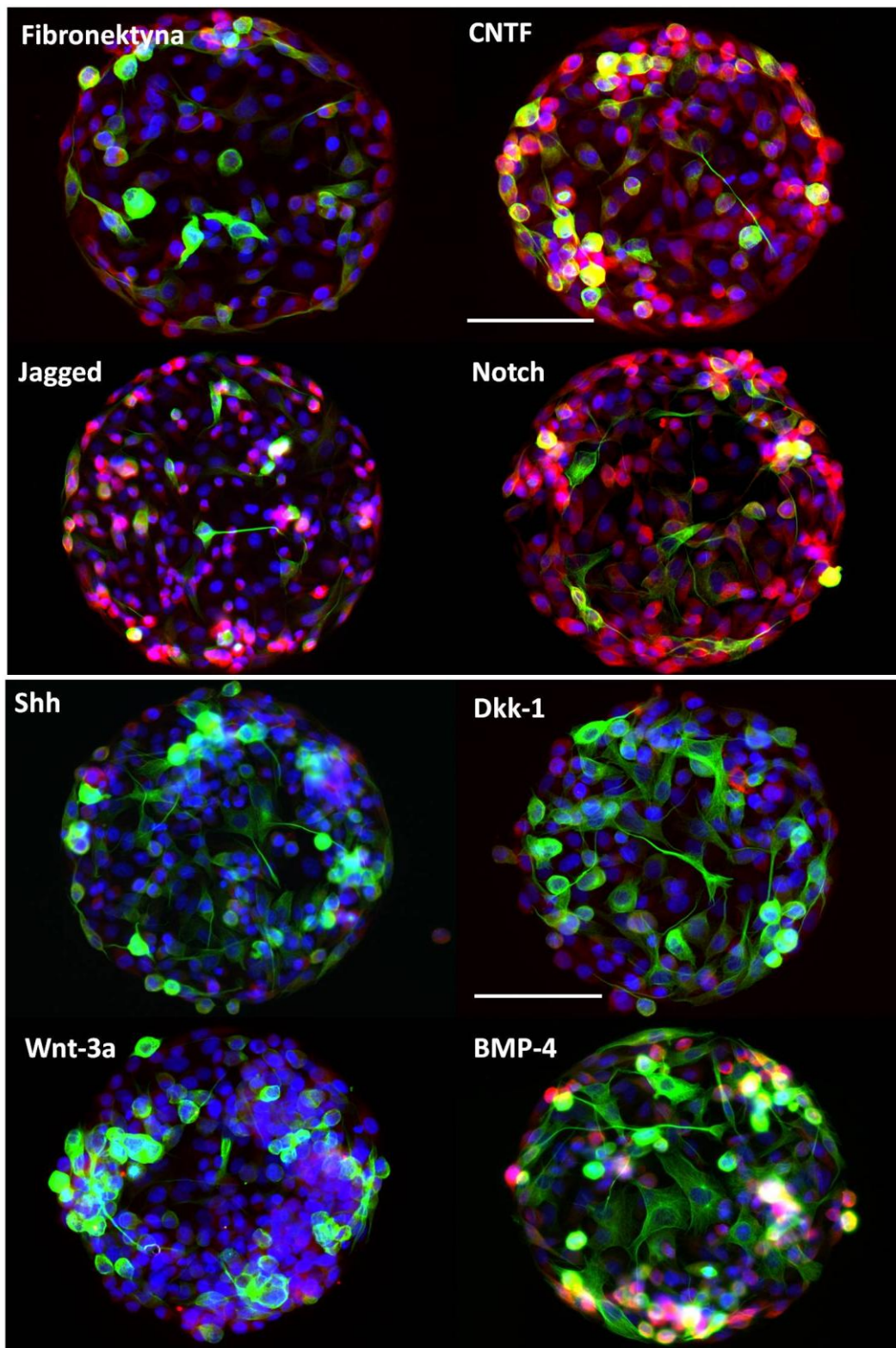
Analiza strukturalna jak i funkcjonalna powierzchni biofunkcyjnych z zastosowanymi białkami, użytymi do stymulacji określonych dróg przekazywania sygnału i różnicowania HUCB-NSC, wykonana była przy zastosowaniu co najmniej trzech stężeń białek sygnałowych. Pozwoliło to na stwierdzenie obecności biomolekuł nawet w domenach o

niższych stosowanych stężeniach. Po wstępnej analizie wpływu różnych stężeń białek na kierunek różnicowania HUCB-NSC, wybrano najwyższe z nich (10µg/ml) jako wywierające najsilniejszy efekt.

W celu określenia stopnia zróżnicowania komórek HUCB-NSC na określonych domenach bioaktywnych, zawierających fibronektynę z białkami sygnałowymi, po 4 dniach hodowli wykonano analizę immunocytochemiczną na obecność beta-tubuliny III (marker różnicowania neuronalnego) oraz GFAP (markera różnicowania astrocytarnego). Jako kontrolę różnicowania zastosowano domeny nakroplone fibronektyną (Ryc. 47). Podobny rozkład fenotypowy uzyskano stosując również przeciwciała skierowane przeciwko cytoplazmatycznemu białku S100β, które świadczy o astrocytarnym fenotypie komórek HUCB-NSC. Do analizy porównawczej fenotypów zastosowano znakowanie β-tubuliny III i GFAP.

Na podstawie znakowania immunocytochemicznego określono cztery grupy fenotypowe komórek: komórki GFAP pozytywne, zakwalifikowano jako różnicujące się w kierunku astrocytów (A), komórki wykazujące obecność β-tubuliny III jako różnicujące się w kierunku neuronów (N), komórki charakteryzujące się współwystępowaniem obydwu markerów, określono jako komórki o fenotypie przejściowym (przed decyzją rozwojową różnicowania w kierunku neuronów lub astrocytów) oraz komórki niewykazujące ekspresji żadnego z badanych białek, które określono mianem niezróżnicowanych. Domeny składające się jedynie z fibronektyny charakteryzowały się równomiernym rozkładem określanych fenotypów, nie obserwowano istotnie statystycznych różnic pomiędzy grupami (Ryc. 48).

Badane białka sygnałowe immobilizowane do podłoża wraz z fibronektyną powodowały pojawianie się wszystkich grup fenotypowych HUCB-NSC, lecz w różnych proporcjach. Nie obserwowano natomiast braku któregoś z fenotypów lub przewagi określonego fenotypu powyżej 50%.



Ryc. 47. Znakowanie immunocytochemiczne komórek linii HUCB-NSC na obecność  $\beta$ -tubuliny III (kolor zielony) i GFAP (kolor czerwony), hodowanych na mikronakraplanych domenach biofunkcyjnych zawierających fibronektynę oraz określone cząsteczki sygnałowe. Jądra komórkowe wybarwiono barwnikiem Hoechst 33258 (kolor niebieski). Skala=100 $\mu$ m.

Analiza zdjęć fluorescencyjnych przedstawiających wieloskładnikowe domeny biofunkcjonalne wykazała obecność komórek o różnej morfologii (Ryc. 47). Zaobserwowano komórki niezróżnicowane, nie wykazujące ekspresji GFAP i  $\beta$ -tubuliny III, o wyższym stopniu upakowania na danej domenie (Wnt3a, Shh), o czym świadczy duża liczba jąder zabarwionych Hoechst. Na innych domenach znajdują się zarówno okrągłe (na domenie Jagged w większości) jak i mocno przylegające (rozpłaszczone) komórki, cechujące się występowaniem GFAP (domeny z CNTF, Notch). W przypadku domen CNTF jak i BMP-4 obserwowane są okrągłe komórki w kolorze pomarańczowym, wykazujące współobecność obydwu badanych markerów. Mimo zwiększonego różnicowania glejowego na domenach CNTF, Notch czy Jagged obserwowane są komórki  $\beta$ -tubulina -III pozytywne, dające długie wypustki sięgające pomiędzy komórki sąsiadujące, podobnie na powierzchniach biofunkcjonalnych zawierających BMP-4. Domeny charakteryzujące się najwyższą liczbą komórek niewyznakowanych również zawierają morfologicznie zróżnicowane komórki o fenotypie neuronalnym (Shh, Wnt3a).

*Poniżej przedstawiono omówienie otrzymanych wyników według zastosowanych białek sygnałowych (Ryc. 48).*

Białko CNTF w największym stopniu promowało powstawanie fenotypu astrocytarnego (33,95%) ( $p < 0,001$ ), podczas gdy odsetek pozostałych komórek wahał się w granicach 21%-23%.

Białko Jagged promowało pojawianie się największej liczby komórek GFAP pozytywnych (31,46%), jak również dużej liczby komórek niezróżnicowanych (26,31%).

Na domenach z cząsteczką sygnałową Wnt-3a obserwowano przewagę komórek niezróżnicowanych (35,32%), ( $p < 0,001$ ) i o fenotypie neuronalnym (32,63%) nad komórkami GFAP pozytywnymi, których było zaledwie 12%, jak również nad tzw. fenotypem pośrednim, wykazującymi koekspresję badanych markerów.

W obecności białka BMP-4 obserwowano ok. 8% przewagę fenotypu neuronalnego (komórki  $\beta$ -tubulina III pozytywne) nad innymi fenotypami w badanej populacji komórek, co stanowiło różnicę istotną statystycznie ( $p < 0,001$ ).



Domeny bioaktywne z białkiem Shh, podobnie jak Wnt3 wykazywały, istotną statystycznie ( $p < 0,0001$ ) przewagę liczby komórek o fenotypie neuronalnym nad wszystkimi pozostałymi fenotypami, gdzie liczba komórek o charakterze neuronów wynosi 37,018% w porównaniu do komórek o charakterze astrocytów i wykazujących podwójne znakowanie, odpowiednio 17,16% i 18%. Na uwagę zwraca duża liczba komórek niezróżnicowanych (27,83%), chociaż istotnie mniejsza od komórek wykazujących fenotyp neuronalny.

W przypadku domen z białkiem Dkk1, które jest inhibitorem ścieżki sygnałowej Wnt, stwierdzono istotną statystycznie ( $p < 0,001$ ) przewagę fenotypu neuronalnego (35,22 %) nad pozostałymi fenotypami, które osiągnęły odpowiednio wartości 22,86%, 20,49, 21,43% dla komórek GFAP pozytywnych, o fenotypie przejściowym i niezróżnicowanym.

W obecności białka Notch obserwowano istotnie statystyczną przewagę fenotypu astrocytarnego (33%) nad resztą badanych rodzajów.

*Ponizej przedstawiono omówienie otrzymanych wyników według uzyskanych fenotypów komórek HUCB-NSC hodowanych na domenach zawierających białka sygnałowe (Ryc. 49).*

Najbardziej zaawansowane różnicowanie astrocytarne stwierdzono na domenach zawierających białka sygnałowe: CNTF (33,95%), Jagged (31,46%) i Notch (33,37%) ( $p < 0,001$ ). Najmniejszy odsetek komórek GFAP pozytywnych stwierdzono na domenach zawierających białko Wnt-3a (13,81%).

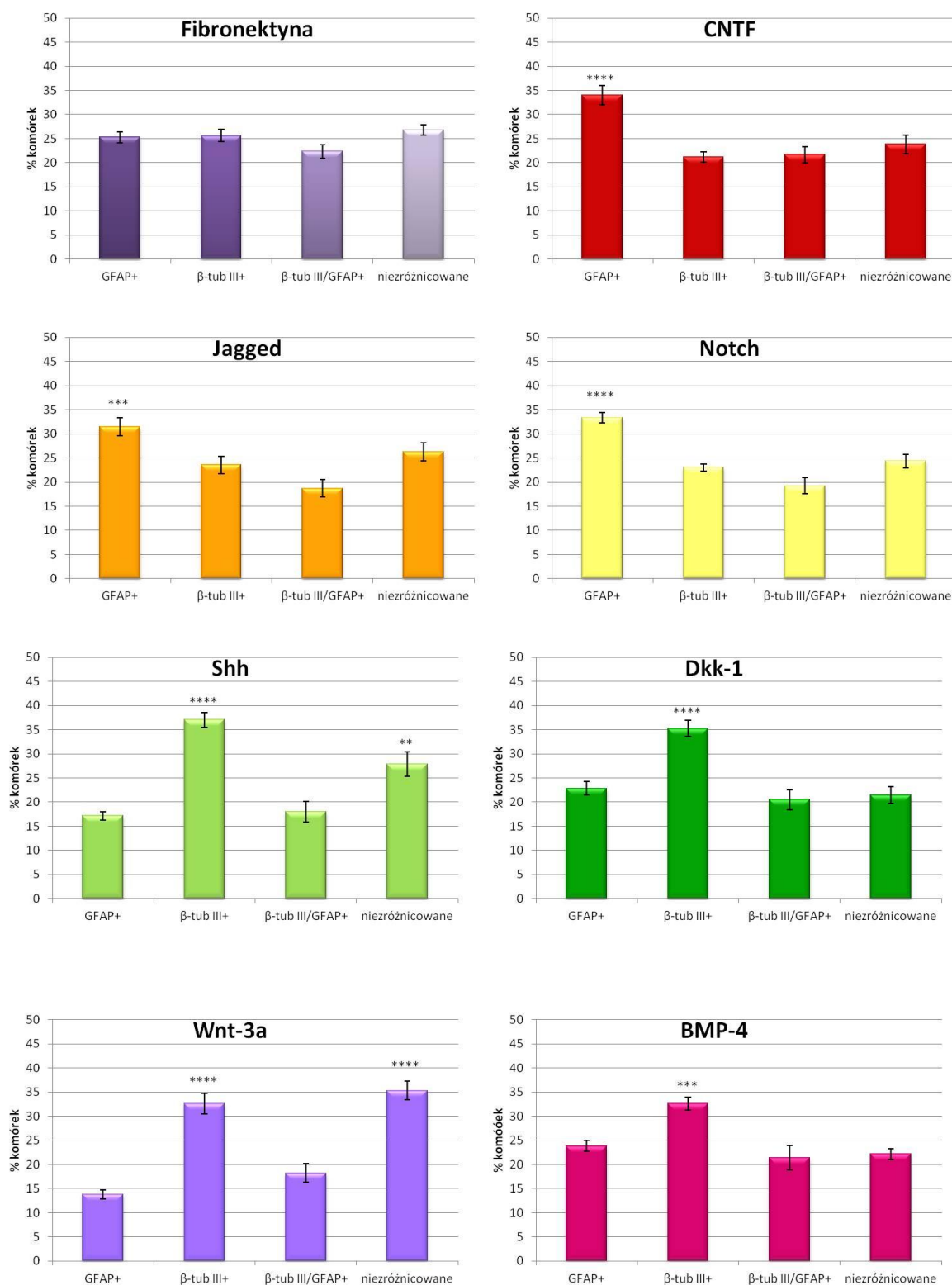
Najwyższy odsetek komórek wykazujących znakowanie markerem neuronalnym zanotowano na domenach z dodatkiem białka Shh (37,01%), jak i Dkk (35,22%). Równie wysoka liczba tych komórek obecna była na domenach zawierających białka Wnt (32,63%) jak i BMP-4 (32,59%), natomiast najmniej komórek  $\beta$ -tub pozytywnych było w obecności białka CNTF (21,13%).

Fenotyp przejściowy (komórki, w których ekspresji podlegały zarówno  $\beta$ -tubulina III jak i GFAP) obserwowano na podobnym poziomie we wszystkich grupach eksperymentalnych. Nie zanotowano różnic istotnych statystycznie między grupami.

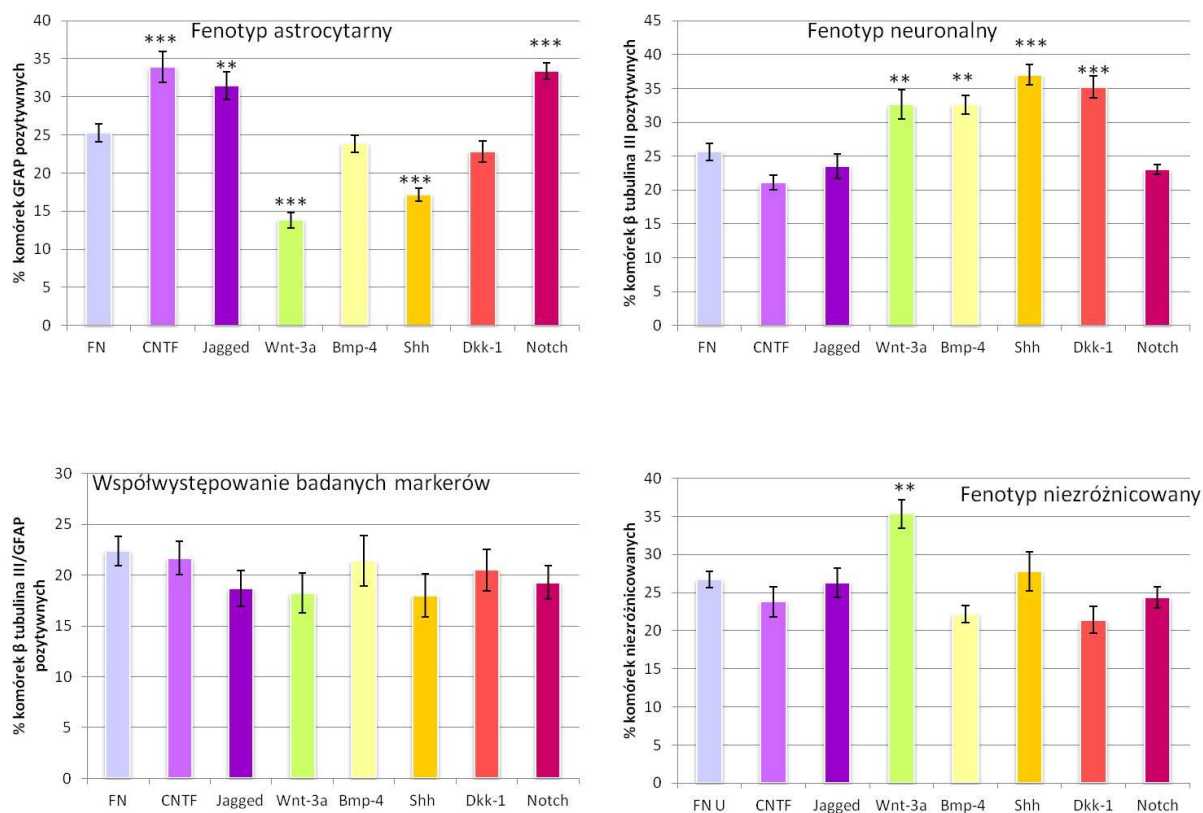
Fenotyp niezróżnicowany, świadczący o samoodnowie komórek HUCB-NSC zanotowano głównie w obecności białka Wnt-3a. Odsetek komórek niezróżnicowanych na

domenach z białkiem Wnt-3a był znamienne wyższy ( $p < 0,0001$ ) od poziomu wartości % komórek niezróżnicowanych na domenach zawierających wszystkie pozostałe białka sygnałowe i wynosił 35,32%.





Ryc. 48. Rozkład fenotypów komórek HUCB-NSC hodowanych na domenach bioaktywnych w obecności fibronektyny i poszczególnych białek sygnałowych. Wyniki przedstawiają średnie ( $\pm$ SE) z pięciu niezależnych eksperymentów. Testem ANOVA z testem dodatkowym Bonferroni sprawdzono istotność statystyczną pomiędzy grupami, \*\*\*\* $p < 0,0001$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ .



Ryc.49. Występowanie fenotypów neuralnych w zależności od obecności białek sygnałowych w domenach. Wyniki przedstawiają średnie ( $\pm$ SE) z pięciu niezależnych eksperymentów. Testem ANOVA z testem dodatkowym Dunnet'a sprawdzono istotność statystyczną, porównując poszczególne grupy do kontroli (FN), \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ .

## V. Dyskusja

---

Jednym z głównych wyzwań medycyny regeneracyjnej i inżynierii tkankowej jest opracowanie efektywnych i bezpiecznych metod hodowli *in vitro*, umożliwiających zarówno ekspansję jak i kierunkowe różnicowanie ludzkich komórek macierzystych. Staje się to możliwe dzięki połączeniu najnowszych osiągnięć w badaniach nad ludzkimi komórkami macierzystymi z intensywnie rozwijającą się wiedzą biotechnologiczną dotyczącą biomateriałów i substancji bioaktywnych. Odnotowuje się szybki postęp w zastosowaniu metod nano/biotechnologicznych, dostarczających nowych narzędzi do konstrukcji *in vitro* mikrośrodowiska przypominającego naturalną niszę komórek macierzystych, w której badane komórki podlegają oddziaływaniu zróżnicowanych sygnałów, zarówno strukturalnych jak i biochemicznych. Opracowanie warunków mikrośrodowiska *in vitro*, permissywnych dla różnicowania neuronalnego somatycznych komórek macierzystych, umożliwi również dostosowanie rodzaju komórek do potrzeb ewentualnych transplantacji w przypadku schorzeń układu nerwowego.

Celem tej pracy było zbadanie wpływu określonych warunków mikrośrodowiska *in vitro* na przebieg procesów rozwojowych komórek macierzystych izolowanych z ludzkiej krwi pępowinowej. Wymagało to skonstruowania miniaturowych systemów badawczych (mikroplatform), zawierających modyfikowalną powierzchnię bioaktywną ze zmiennym wzorem domen, umożliwiających przeprowadzenie badań kluczowych procesów rozwojowych neuronalnych komórek macierzystych, takich jak: adhezja, migracja, proliferacja i różnicowanie.

### 1. Mikroplatformy z domenami biofunkcjonalnymi i ich rola w różnicowaniu neuronalnych komórek macierzystych

W przedstawionej pracy komórki linii HUCB-NSC hodowałam na mikroplatformach z powierzchnią bioaktywną o określonym składzie i geometrii, którą wykonano przy pomocy dwóch podstawowych technik mikroinżynierijnych: a) drukowania mikrokontaktowego oraz b) dozowania mikrokropli czynników bioaktywnych. Zastosowane techniki mikroinżynierijne okazały się odpowiednie do tworzenia mikroplatform ze zdefiniowanym wzorem domen

biofunkcyjnych, które można zastosować do badania losów komórek macierzystych (Buzanska i wsp., 2009b, Ruiz i wsp., 2007, 2008a, 2008b, 2009). Otrzymane mikroplatformy różnią się swoistością w stosunku do badanych procesów. Dozowanie mikrokropli pozwala na łatwe dostosowanie kompozycji badanych białek/biomolekuł pozwalając na jednoczesne śledzenie kierunku rozwoju odpowiedzi komórek hodowanych na tym samym nośniku w różnych mikrośrodkach (Anderson i wsp., 2005, Kuschel i wsp., 2006, Flaim i wsp., 2005, Soen i wsp., 2006). Z drugiej strony technika drukowania mikrokontaktowego, umożliwia zastosowanie tylko jednego rodzaju substratu w tym samym nośniku, ale zapewnia możliwość kształtowania rozmiaru i wzoru geometrycznego powierzchni bioaktywnej (Ruiz i Chen 2007, Quist i wsp., 2005), z możliwością przestrzennego tworzenia mikrośrodków w trzech wymiarach (Ochsner i wsp., 2007). Prezentowane w niniejszej pracy wyniki wykazują, że oba badane determinanty: różny skład mikrośrodków, jak i zmienna geometria jego aktywnej powierzchni, umożliwiają sterowanie kierunkiem rozwoju neuralnych komórek macierzystych, wpływając na ich wybiórcze różnicowanie.

W mojej pracy, przy pomocy wspomnianych wyżej technik mikroinżynierskich otrzymałam matryce zawierające domeny mikrodrukowane jednoskładnikowe o różnej wielkości i kształcie: pozycjonujące grupy komórek (odseparowane kwadraty i kwadraty połączone liniami), a także pozycjonujące pojedyncze komórki (linie lub „znaczkę” o rozdzielczości ok. 10 $\mu$ m) oraz wieloskładnikowe domeny mikronakraplane. Protokół tworzenia domen biofunkcyjnych mikronakraplanych zawierających białka macierzy zewnątrzkomórkowej i białka sygnałowe został opracowany i zoptymalizowany tak, aby otrzymywać pożądaną wielkość domen (koła o 250 $\mu$ m średnicy), umożliwiającą immobilizowanie do podłoża odpowiedniej liczby komórek. Powierzchnie biofunkcyjne wytworzone metodą mikrodrukowania i mikronakraplania podlegały następnie kontroli jakościowej (określenie stabilności, składu i funkcjonalności domen) z wykorzystaniem technik Tof-SIMS, elipsometrii, mikroskopii sił atomowych oraz powierzchniowego rezonansu plazmonowego (Ceriotti i wsp., 2009, Ruiz i wsp., 2008).

Prowadzone wcześniej badania przy użyciu mikroskopu sił atomowych (AFM) oraz elipsometrii (Ceriotti i wsp., 2009) wykazały jednorodny i zależny od stosowanego stężenia rozkład cząsteczek fibronektyny, jej losową orientację oraz wysokość na powierzchni domen

nie przekraczającą 8 nm. W przypadku komórek HUCB-NSC, podobnie jak dla innych komórek (Martino i wsp., 2009, Prowse i wsp., 2011) adhezja do fibronektyny zachodzi głównie poprzez przyłączenie się receptorów integrynowych do modułu białkowego zawierającego aminokwasy argininę- glicynę- kwas asparaginowy (RGD) (Ceriotti i wsp., 2009). Wykorzystując technikę powierzchniowego rezonansu plazmonowego w naszych badaniach stwierdzono dostępność fibronektyny w wytworzonych domenach, zawierających również białka sygnałowe. Wykluczono w ten sposób możliwość zaślepienia aktywnych fragmentów RGD dodanymi białkami. Z drugiej strony potwierdzono skuteczną immobilizację białek sygnałowych zawartych w nakraplanej mieszaninie przez ich reakcję ze specyficznymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko poszczególnym komponentom domeny bioaktywnej.

*Skład podłoża determinujący charakter oddziaływania komórki z powierzchnią, jako czynnik wpływający na losy HUCB-NSC*

Na podstawie uzyskanych wyników, stwierdziłam, że architektura i skład powierzchni biofunkcyjnych podłoża ma istotny wpływ na decyzje rozwojowe i fenotyp komórek HUCB-NSC. W przedstawianej pracy zastosowano dwa typy substratów bioaktywnych o różnym charakterze oddziaływania na powierzchnię komórki: poli-L-lizynę, i fibronektynę. Badania na domenach o różnej geometrii i wielkości wykazały wyraźnie, że rodzaj oddziaływania komórek z powierzchnią (receptorowe na fibronektynie vs elektrostatyczne na poli-L-lizynie) determinuje fenotyp, adhezję i migrację komórek macierzystych. Komórki HUCB-NSC hodowane na poli-L-lizynie charakteryzowały się morfologią świadczącą o mniejszym stopniu ich zróżnicowania niż na fibronektynie, pozostawały słabo przytwierdzone do podłoża, zaokrąglone, co umożliwiało większe zagęszczenie komórek w danej domenie.

Jednorodne pokrycie powierzchni hodowlanych PLL stosowane jest od lat w wielu modelach eksperymentalnych (Mazia i wsp., 1975). Poli-L-lizyna jest homopolimerem aminokwasu lizyny, polikationem powszechnie używanym do pokrywania naczyń hodowlanych w celu polepszenia adhezji komórek do podłoża. Poli-L-lizyna oddziałuje na zasadzie elektrostatycznych interakcji pomiędzy ujemnie naładowanymi jonami w błonie komórkowej, a pozytywnie naładowanymi składnikami polimeru. Zaadsorbowanie PLL na

powierzchni hodowlanej zwiększa liczbę pozytywnie naładowanych miejsc wiązania komórek (Rao i wsp., 2009, Yavin i Yavin 1974). PLL w trakcie dłuższej hodowli komórek może promować adsorpcję białek z pożywki hodowlanej, prowadząc do wydzielania białek macierzy zewnątrzkomórkowej przez komórki i w konsekwencji również specyficzną adhezję receptorową, ich większe rozplaszczanie i różnicowanie (Rao i wsp., 2009). Tłumaczy to pojawianie się w naszych doświadczeniach nielicznych komórek mocno przylegających, a także tworzenie długich wypustek przez komórki rosnące dłuższy czas na PLL.

Zgodnie z moimi obserwacjami komórki HUCB-NSC hodowane w obecności fibronektyny wykazywały zwiększoną aktywność komórkową, silniejsze połączenia międzykomórkowe i intensywniejszą adhezję do substratu niż na PLL. Na fibronektynie obserwowano heterogenną populację komórek HUCB-NSC, która zawierała komórki o fenotypie zróżnicowanym, jak również komórki będące na wcześniejszych etapach rozwoju, zaokrąglone i zdolne do proliferacji. Badania ultrastrukturalne omawiane w tej pracy potwierdziły również, że komórki HUCB-NSC rosnące na fibronektynie, zarówno w obecności 2% FBS jak i w warunkach bezsurowiczych wykazują zmiany wewnątrzkomórkowe, charakterystyczne dla różnicowania: bogatą w organelle wewnątrzkomórkowe cytoplazmę i wyraźną obecność wypustek cytoplazmatycznych. Podobną charakterystykę ultrastrukturalną komórek różnicujących się w neurony obserwował Meinertzhagen i wsp., (2009). Jak wspomniano wcześniej, w przeciwieństwie do poli-L-lizyny, fibronektyna działa poprzez specyficzne oddziaływanie receptorowe. Białka macierzy zewnątrzkomórkowej, takie jak laminina, kolagen czy fibronektyna, zawierają domenę RGD, łączącą się z integrynami, zawierającą minimalną sekwencję aminokwasową prowadzącą do adhezji wielu typów komórek, także neuronów (Hersel i wsp., 2003, Rao i wsp., 2009). Cząsteczka fibronektyny, oprócz domeny RGD, posiada również drugą domenę łączącą integryny, tzw. miejsce synergistyczne, składające się z aminokwasów PHSRN (prolina- histydyna- seryna- arginina- kwas asparaginowy). Obydwie domeny biorą udział w połączeniu i rozpoznaniu komórka-ECM (Mao i wsp., 2006, Stabenfeldt i wsp., 2010). Fibronektyna zwiększa migrację i przeżycie pierwotnych NSC (Tate i wsp., 2004) i, jak wykazano w tej pracy, różnicowanie HUCB-NSC (Bużańska i wsp., 2009), co więcej, efekt ten jest wzmożony w obecności neurotrofin, takich jak NGF czy NT-3 (Nakajima i wsp., 2007, Silva i wsp., 2009).

W prezentowanej pracy wykazano, że komórki HUCB-NSC hodowane na domenach zawierających fibronektynę, wykazują morfologię świadczącą o ich gotowości do różnicowania, jednocześnie wciąż utrzymując wysoki poziom proliferacji. Podobna sytuacja była obserwowana w rozwijającym się mózgu ssaka, gdzie wykazano współwystępowanie przejściowo namnażających się (ang. transient amplifying) i migrujących progenitorów neuralnych (Alvarez-Buylla i wsp., 1996). Proces ten jest skorelowany z reorganizacją macierzy zewnątrzkomórkowej w mózgu. Zmieniają się wówczas proporcje między ilością i rodzajem białek macierzy zewnątrzkomórkowej, komórki tracą kontakt z obecną głównie w błonie podstawnej lamininą, a wymiana podjednostek integrynowych (tzw. „integrin switch”) w błonach migrujących komórek umożliwia ich interakcję z obecną w macierzy zewnątrzkomórkowej fibronektyną (Stabenfeldt i wsp., 2010). Należy zwrócić uwagę, że choć na fibronektynie komórki HUCB-NSC wykazują zdolność do proliferacji, to poziom tego procesu jest wyższy w obecności poli-L-lizyny, która zapewnia elektrostatyczne oddziaływanie pomiędzy podłożem a komórkami, co stanowi sztuczne środowisko dla komórek. Informacja ta ważna jest dla właściwego określenia warunków eksperymentalnych *in vitro*, w których można otrzymać dużą liczbę komórek namnażających się, ale nie ma to bezpośredniego przełożenia na warunki *in vivo*. W niszy naturalnej na proliferację komórek macierzystych głównie mają wpływ oddziaływania receptorowe z ECM.

Generalizując te obserwacje w niniejszej pracy stwierdzono, że adhezja komórek do domen bioaktywnych zależy od rodzaju substratu zewnątrzkomórkowego, który decyduje o sposobie oddziaływania komórki z podłożem. PLL w porównaniu z FN umożliwia adhezję do domen mikrodrukowanych istotnie większej liczby komórek po jednym i siedmiu dniach hodowli. Obecność surowicy w środowisku osłabia efekt adhezyjny PLL, co jest prawdopodobnie związane z niespecyficznym blokującym osadzaniem się białek zawartych w surowicy na domenach bioaktywnych, a także na powierzchni antyadhezyjnej. Ocena w mikroskopie skaningowym oraz badania immunocytochemiczne morfologii komórek przyłączonych do domen zawierających poli-L-lizynę wykazały obecność małych, lekko przylegających do podłoża, okrągłych komórek. Fenotyp tych komórek świadczy o braku zróżnicowania i przypomina komórki pluripotencjalne izolowane z ludzkiej krwi pępowinowej (Habich i wsp., 2006, Kucia i wsp., 2007, McGuckin i wsp., 2006, McGuckin i Forraz 2008). W

warunkach bezsurowiczych zaobserwowano populację ok. 80% komórek niezróżnicowanych na powierzchniach zawierających PLL, tymczasem efekt wywołany dodaniem surowicy hodowlanej może sprzyjać pojawianiu się fenotypów neuralnych komórek HUCB-NSC.

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. W dostępnej literaturze brak doniesień na temat możliwości hodowania adherentnych, niezróżnicowanych neuralnych komórek macierzystych. Dotychczas typowym sposobem utrzymywania takich komórek w stanie niezróżnicowanym była hodowla w pożywce bezsurowiczej w postaci pływających trójwymiarowych neurosfer. Neurosfery otrzymuje się z macierzystych komórek zarodkowych (Pomp i wsp., 2008), bądź z tkanek o różnym pochodzeniu: np. z ludzkich mózgów płodowych (Caldwell i wsp., 2001, Kim i wsp., 2006), ze stref neurogennych dojrzałych mózgów (Beduer i wsp., 2012), ze szpiku kostnego (Sanchez-Ramos 2002, Yang i wsp., 2008), krwi pępowinowej (Bużańska i wsp., 2005, 2006, Habich i wsp., 2006) czy z indukowanych komórek macierzystych (Nori i wsp., 2011, Inoue i Yamanaka 2011). Możliwość tworzenia neurosfer w środowisku pozbawionym surowicy jest wyznacznikiem neuralnych komórek macierzystych i jedną z ich podstawowych cech. Po osadzeniu się neurosfery na podłożu rozpoczyna się typowa, brzeżna migracja i różnicowanie komórek z niej wychodzących. Przedstawiona w niniejszej pracy możliwość unieruchomienia na powierzchni biofunkcjonalnej populacji neuralnych komórek macierzystych w stadium wczesnym – niezróżnicowanym, dostarcza nam nowego, przydatnego układu badawczego.

#### *Geometria domen jako czynnik biorący udział w określaniu losów HUCB-NSC*

Wyniki tej pracy wykazały, że kształt i wielkość domen bioaktywnych wpływa na proces różnicowania komórek macierzystych. Określona architektura domen stymuluje komórki HUCB-NSC do różnicowania. Zaprojektowane linie łączące wielokomórkowe domeny kwadratowe umożliwiają ukierunkowany wzrost neuronalnych wypustek komórkowych pomiędzy domenami, a także w warunkach oddziaływania niespecyficznego stanowią drogę dla migracji, jaką wykazują komórki na poli-L-lizynie. Zapewnienie możliwości komunikacji pomiędzy komórkami macierzystymi i ich komórkami potomnymi jest kluczowe dla prawidłowego rozwoju organizmu. Właściwości te i odpowiedź na otaczające środowisko



(a także toksyny) zmieniają się w trakcie rozwoju, np. pluripotencjalne komórki macierzyste, wykazują ekspresję czynnika transkrypcyjnego Oct3/4, natomiast nie podlega ekspresji w tych komórkach koneksyna 43. Z kolei progenitory neuralne, w których ekspresja Oct3/4 jest wygaszona, zaczynają produkować koneksynę 43, formując połączenia szczelinowe i umożliwiając wymianę cytoplazmatyczną pomiędzy komórkami (Davila i wsp., 2004, Trosko 2006). W tej pracy adhezja komórek HUCB-NSC do fibronektyny stymulowała ekspresję koneksyny 43. Hodowla komórek HUCB-NSC przypomina warunki *in vivo*, gdzie w niszy współwystępują komórki będące na różnym etapie rozwoju, dzięki czemu możliwe jest badanie specyficznej komórkowo odpowiedzi na obecność np. czynników toksycznych (Bużańska i wsp. 2009) lub, tak jak w prezentowanej pracy, różnych substratów obecnych w domenach biofunkcjonalnych.

Wpływ substratów adhezyjnych/biomolekuł na decyzje rozwojowe komórek macierzystych może być wywierany nie tylko przez ich skład chemiczny, ale również fizyczno-mechaniczne właściwości ECM, jak elastyczność, geometria/kształt domen w mikro i nanoskali oraz mechaniczne sygnały kontaktowe, wywierane przez substrat na komórkę (Guilak i wsp., 2009). Ściśle określony kształt i rozmiar domen może wywierać bezpośredni wpływ na osiągnięte przez komórki fenotypy. Stosowane w pracy domeny o różnych kształtach (kwadraty o boku 100  $\mu\text{m}$ , pojedyncze „znaczkii”, czy linie o szerokości 10  $\mu\text{m}$ ) mają ściśle określoną powierzchnię dostępną dla adhezji i rozprzestrzeniania się komórek, ograniczoną wokół przestrzeni będącą repelentem dla komórek (PEO). Domeny takie, drukowane poli-L-lizyną umożliwiają utrzymywanie w hodowli adherentnej proliferującej, niezróżnicowanej populacji komórek HUCB-NSC, podczas gdy nielimitowana powierzchnia hodowlana pokryta PLL (na szalkach wielodołkowych czy butelkach hodowlanych), pozwala komórkom tej samej linii różnicować się i wytwarzać wypustki neuronalne, (Bużańska i wsp., 2006, Sypecka i wsp., 2009, Szymczak i wsp., 2010). Sugeruje to znaczący wpływ mikroskali powierzchni na różne decyzje rozwojowe HUCB-NSC. Podobne obserwacje dotyczą komórek mezenchymalnych, hodowanych na fibronektynowych domenach, których mały rozmiar wpływał na osiągnięcie fenotypu linii tłuszczowej, natomiast różnicowanie kostne obserwowano na dużych powierzchniach (Marklein i Burdick 2010).

Zbadanie procesów komórkowych, takich jak metabolizm, różnicowanie czy odpowiedź na czynniki toksyczne zachodzące na poziomie pojedynczej komórki umożliwia zastosowanie domen jednokomórkowych. Mikrowzór drukowany zarówno poli-L-lizyną jak i fibronektyną składa się z małych domen kwadratowych o boku 10 $\mu$ m, (tzw. 'znaczkii') lub z linii o szerokości 10  $\mu$ m odseparowanych od siebie przestrzenią antyadhezyjną. Już po dwóch godzinach od wysiania komórek HUCB-NSC na domeny jednokomórkowe obserwowano silną adhezję do domen drukowanych fibronektyną, natomiast równomierne zasiedlenie powierzchni pokrytych poli-L-lizyną możliwe było dopiero po całonocnej inkubacji. Komórki adherujące do domen tzw. znaczków często pozostawały okrągłe, choć na fibronektynie miały tendencję do zajmowania sąsiadujących kwadratów, natomiast HUCB-NSC na liniach układały się równolegle do ich krawędzi, zachowując charakter przylegania typowy dla niespecyficznego (PLL) bądź specyficznego (FN) oddziaływania z substratem. W naszych badaniach płaska dwuwymiarowa krawędź domeny graniczącej z nieadhezyjnym substratem stanowiła architektoniczny wyznacznik kierowania wypustek neuronalnych zarówno na liniach o szerokości 10 $\mu$ m, jak i w liniach łączących wielokomórkowe domeny kwadratowe. Badania *in vitro* z użyciem dorosłych szczurzych progenitorów hipokampalnych (ang. Adult Rat Hippocampal Progenitor Cells, AHPs) potwierdzają zależność różnicowania od architektury domen: przyjmowały fenotyp neuronalny (ekspresja  $\beta$ -tubuliny III) układając się wzdłuż trójwymiarowego mikrowzoru zawierającego rowki o wysokości 4  $\mu$ m (Recknor i wsp., 2006). Świadczy to o tym, że zastosowanie wzoru dwuwymiarowej powierzchni o różnej geometrii w połączeniu z polem będącym repelentem dla komórek może służyć równie dobrze w kierunkowaniu różnicowania i wzrostu wypustek neuronalnych jak trójwymiarowe struktury: nanometrowe rowki, gdzie osiągnięto stymulację różnicowania neuronalnego ludzkich komórek embrionalnych stosując jedynie zmianę wzoru nanopowierzchni (Lee i wsp., 2010). Podobny efekt osiągnięto stosując chitozanowe nanowłókna, tworzące rusztowanie dla wzrostu szczurzych komórek NSC i promujące ich neuronalne różnicowanie (Wang i wsp., 2010). Brak jednak danych o różnicowaniu funkcjonalnym w kierunku neuronalnym na domenach bioaktywnych 2D. Jak do tej pory aktywną sieć neuronalną wykazującą potencjał czynnościowy udało się otrzymać dla

komórek HUCB-NSC jedynie w warunkach hodowli trójwymiarowej na rusztowaniach keratynowych (Jurga i wsp. 2009).

W prezentowanej pracy w przypadku domen mikrodrukowanych o różnej geometrii, różnicowanie komórek HUCB-NSC w kierunku neuronalnym (ekspresja  $\beta$ -tubuliny III) obserwowano w znacznie większym stopniu na mikrodrukowanych liniach o szerokości 10 i 20 $\mu$ m (powyżej 30%), w porównaniu z kwadratami o boku 120 $\mu$ m (ok. 20%), najmniej komórek wykazujących obecność badanego markera zanotowano na jednokomórkowych domenach kwadratowych, tzw. 'znaczkach'. Podobna tendencja zależności wpływu kształtu domen bioaktywnych na różnicowanie obserwowana była dla szczurzych neuralnych komórek macierzystych na mikrodrukowanych powierzchniach o wzorach pasków, kwadratów i linii tworzących siatkę (Solanki i wsp., 2010). Obserwowany efekt może być skutkiem oddziaływań międzykomórkowych zależnych od liczby i rodzajów kontaktów międzykomórkowych. Na większych domenach kwadratowych komórki mają kontakt z sąsiadującymi komórkami ze wszystkich stron, podczas gdy na liniach kontakt ten jest ograniczony zazwyczaj do dwóch komórek sąsiadujących. Umożliwienie połączeń pomiędzy domenami (10-cio mikrometrowe linie łączące domeny kwadratowe, zastosowane w tej pracy) czy użycie domen o wzorze siatki (Solanki i wsp., 2010) promują pojawianie się komórek neuronalnych i wytwarzanie wypustek MAP-2-pozytywnych. W niniejszej pracy brak kontaktów międzykomórkowych obserwowany na jednokomórkowych domenach - 'znaczkach' wpływał hamująco na różnicowanie neuronalne, nie obserwowano również żadnych komórek MAP-2 pozytywnych. Na domenach o rozmiarze większym niż 10 $\mu$ m komórki HUCB-NSC zachowywały proporcje komórek zróżnicowanych w kierunku astro- i neuronalnym porównywalne do powierzchni standardowych (bez wzoru). Natomiast dane literaturowe wskazują, że mniejsze domeny (10  $\mu$ m) mogą powodować przełączenie decyzji rozwojowych ludzkich komórek śródbłonkowych ze wzrostu w kierunku apoptozy (Chen i wsp., 1998).

Kształt komórki lub agregatów komórkowych jest silnie działającym regulatorem ich wzrostu i fizjologii (Guilak i wsp., 2009). Wiele procesów związanych z rozwojem embrionalnym i różnicowaniem komórek macierzystych regulowane jest właśnie przez kształt. Na przykład zmiany w kształcie komórki warunkują regulację rozwoju serca (Manasek

i wsp., 1972), podczas gdy wzrost i różnicowanie komórek śródbłonka naczyń włosowatych regulowany jest zmianą kształtu, którą indukuje macierz zewnątrzkomórkowa. Typowego przykładu wpływu jednowarstwowego versus trójwymiarowego wzrostu komórek na determinację ich losów, dostarcza hodowla chondrocytów, gdzie podczas hodowli w warunkach 2D (płaskich naczyniach hodowlanych) komórki zaczynają przyjmować fenotyp fibroblastowy (Holzer i wsp., 1960), a utrzymywanie hodowli w formie trójwymiarowej zawiesiny (peletu) lub zamknięcie komórek w agarozowym żelu utrzymuje ich chondrocytarny fenotyp (Guilak i wsp., 2009). Stwierdzono również większą ekspresję markerów związanych z chrząstką (chondrogenesis) w komórkach mezenchymalnych pochodzących ze szpiku kostnego o bardziej okrągłym kształcie komórki i jądra komórkowego (McBride i wsp., 2008). Podobnie, mysie kule zarodkowe hodowane w trójwymiarowym systemie hodowli w hydrożelu wykazują zwiększoną ekspresję markerów specyficznych dla chrząstki w porównaniu z systemem jednowarstwowym (ang. monolayer) (Hwang i wsp., 2006). Zmiany w morfologii komórek mogą również być wywołane np. hydrofobową powierzchnią substratu środowiska zewnątrzkomórkowego. Powoduje ona słabą adhezję i okrągły kształt komórek mezenchymalnych, natomiast zastosowanie silnie pofałdowanej/porowatej powierzchni wywołało ich rozplaszczanie się i silniejsze przyleganie (Dalby i wsp., 2007).

Obecność koneksyny 43 w komórkach HUCB-NSC hodowanych na liniach drukowanych fibronektyną może świadczyć o obecności połączeń szczelinowych między sąsiadującymi komórkami typu „gap junction”. Koneksyna 43 podlegała różnej ekspresji w komórkach na jednokomórkowych ‘znaczkach’ drukowanych fibronektyną, pomimo braku bezpośredniego kontaktu między komórkami z sąsiadujących domen (zdjęcia z mikroskopu skaningowego). Fakt ten tłumaczyć można prawdopodobnym wpływem oddziaływania receptorowego komórek z fibronektyną, które może indukować syntezę komórkową koneksyny 43, pomimo braku połączeń szczelinowych. Wzmoczoną ekspresję koneksyny 43 pod wpływem fibronektyny obserwowano w komórkach nabłonkowych pęcherzyków płucnych (Alford i Rannels 2001), jak również osłabienie odpowiedzi migracyjnej (szybkości i kierunkowości migracji) komórek grzebienia nerwowego (neural crest cells) z

wyeliminowanym genem koneksyny 43 (knock-out) w obecności fibronektyny (Xu i wsp., 2006).

2. Warunki zewnętrzne mikrośrodowiska i ich wpływ na losy HUCB-NSC w hodowli na domenach bioaktywnych

#### *Gęstość wysiania determinująca losy HUCB-NSC*

Istotnym czynnikiem wpływającym na dynamikę proliferacji HUCB-NSC, zarówno na domenach mikrodrukowanych PLL jak i fibronektyną jest gęstość wysiania komórek. Średnia początkowa gęstość komórek (M) stymuluje pojawianie się markera proliferacji Ki67 w większym stopniu niż niska (L) i wysoka (H) gęstość wysiania komórek. Co więcej, na PLL zwiększenie gęstości wysiania do 50 000 komórek/cm<sup>2</sup> powoduje obniżenie współczynnika proliferacji. Podobny związek pomiędzy początkową gęstością wysiania a proliferacją progenitorów komórek endotelialnych wyizolowanych z ludzkiej żyły pępowinowej i hodowanych na różnych biomateriałach obserwowany był przez zespół Heng'a (Heng i wsp., 2010). Dodatkowo, bardzo niska gęstość wysiania komórek powodowała znaczące obniżenie ekspresji profilu genów związanych z adhezją i funkcją endotelium. Na proliferację mogą mieć również wpływ siły mechaniczne, generowane przez substrat i połączenia międzykomórkowe (Janmey i Miller 2010). Gęstość wysiewania komórek może mieć ogromny wpływ na charakter ich późniejszej odpowiedzi rozwojowej. Dla przykładu, podczas różnicowania komórek mezenchymalnych w kierunku chondroblastów istotnym czynnikiem jest zastosowanie tzw 'micromass culture', czyli początkowej hodowli o bardzo dużej liczbie komórek w małej objętości. Chcąc różnicować komórki w kierunku osteoblastów, należy zachować standardowe gęstości wysiania (Felka i wsp., 2010). Z naszych wcześniejszych obserwacji wynika, że podczas różnicowania komórek HUCB-NSC w standardowej hodowli w obecności neuromorfogenu, np. dBcAMP, należy zachować odpowiednią, optymalną gęstość ich wysiania (ok. 5x10 000/cm<sup>2</sup>), ponieważ czynniki parakryne, wydzielane przez gęstą hodowlę, a także kontakty międzykomórkowe wywierają często silniejszy i przeciwny efekt niż zastosowany czynnik różnicujący. Natomiast zbyt mała liczba początkowa inicjująca hodowlę w obecności dBcAMP może powodować indukcję apoptozy.

### *Rola obecności surowicy w hodowli komórek HUCB-NSC na mikrodomenach biofunkcjonalnych*

Obecność surowicy w pożywce w prezentowanych badaniach miała wpływ na fenotyp komórek HUCB-NSC. 2 % zawartość surowicy w standardowych warunkach hodowli linii HUCB-NSC pozwala na spontaniczne ich różnicowanie (Bużańska i wsp., 2006, Jurga i wsp., 2006). W przedstawianych w niniejszej pracy doświadczeniach jej brak pozwalał na otrzymanie puli komórek niezróżnicowanych immobilizowanych do platform zawierających poli-L-lizynę, a także podwyższał stopień proliferacji HUCB-NSC. Wycofanie surowicy z pożywki hodowlanej wzmacniało również efekt różnicowania, jaki osiągnęto używając dBcAMP. Szczegółowe znaczenie wpływu obecności surowicy będzie przedstawione przy okazji omawiania poszczególnych procesów rozwojowych HUCB-NSC. Zastosowanie kliniczne hodowli komórkowych wymaga eliminacji produktów odzwierzęcych, w tym surowicy (warunki tzw. xeno-free), stosowanych powszechnie *in vitro*. Używana w laboratoriach surowica jest koktajlem niezidentyfikowanych, niezbędnych do wzrostu czynników, a ponadto stanowi zagrożenie patogenami pochodzącymi od zwierząt. Dodatkowo, zawarta w pożywce hodowlanej surowica może prowadzić do niekontrolowanego różnicowania komórek. Dlatego też proponuje się opracowanie protokołów hodowli komórek macierzystych w zdefiniowanych pod względem składu warunkach bezsurowicznych (Richards i wsp., 2008, Tsuji i wsp., 2008). W ostatnim czasie producenci odczynników używanych do hodowli komórek wprowadzają na rynek całą serię zamienników surowicy. Pomimo to, warunki hodowli nie są całkowicie zdefiniowane, ponieważ skład tych pożywek stanowi przeważnie tajemnicę producenta.

### *Rola obecności dBcAMP w hodowli komórek HUCB-NSC na mikrodomenach biofunkcjonalnych*

Wcześniejsze badania wykazały znaczący wpływ obecności dBcAMP na różnicowanie HUCB-NSC w kierunku neuronalnym w hodowli standardowej (Buzanska i wsp. 2006, Sun i wsp. 2005), dlatego w tej pracy zastosowano dBcAMP do wzmocnienia efektu różnicowania komórek HUCB-NSC na wielokomórkowych domenach mikrodrukowanych o różnym kształcie. Podobnie jak w hodowli standardowej dBcAMP wzmacniał efekt różnicowania na domenach biofunkcjonalnych (szczegółowe omówienie tych wyników zamieszczono poniżej,

przy opisie procesu różnicowania). dBcAMP jest powszechnie stosowanym związkiem służącym do różnicowania neuronalnego progenitorów neuralnych in vitro (Lepski i wsp., 2011, Ng i wsp., 2009, Sanchez i wsp., 2004, Yang i wsp., 2004b). Działa aktywując zależną od cAMP kinazę białkową PKA (Sanchez i wsp., 2004), a także fosforyluje białko CREB (ang. cAMP response-element) (Stachowiak i wsp., 2003), które, jak wykazano, indukuje różnicowanie progenitorów hipokampalnych in vitro (Yang i wsp., 2004b) i reguluje dorosłą neurogenezę w strefie SVZ in vivo (Giachino i wsp., 2005).

### 3. Sterowanie kluczowymi procesami rozwojowymi HUCB-NSC w hodowli z zastosowaniem określonych mikrodomen biofunkcjonalnych

#### *Prolifercja i różnicowanie HUCB-NSC*

Poziom proliferacji komórek HUCB-NSC był znacząco wyższy na domenach mikrodrukowanych poli-L-lizyną w porównaniu z fibronektyną, niezależnie od obecności (czy braku) surowicy w podłożu hodowlanym. Wyniki te świadczą o tym, że surowica może mieć wpływ na przyleganie komórek do różnych biomateriałów (adhezję) oraz na różnicowanie komórek HUCB-NSC, natomiast nie wpływa znacząco na poziom proliferacji.

Komórki Ki-67 pozytywne obserwowane były na domenach fibronektynowych zarówno w warunkach bezsurowicznych jak i w obecności 2% FBS, co świadczy o zdolności ukierunkowanych, różnicujących się komórek /progenitorów neuralnych do intensywnej proliferacji in vitro i in vivo (Bużańska i wsp., 2009, Encinas i Enikolopo 2008, Peltier i wsp., 2010, Tucker i wsp., 2010).

Badanie proliferacji z zastosowaniem różnych domen bioaktywnych w układzie doświadczalnym z różnymi czasami trwania hodowli, różną początkową gęstością wysiania komórek daje możliwość testowania wpływu czynników toksycznych na procesy rozwojowe komórek macierzystych. Odmienne działanie takich czynników może zależeć od czasu ekspozycji, etapu rozwojowego komórek (Castoldi i wsp., 2001) czy też sposobu oddziaływania między komórkami – działanie ochronne kontaktów międzykomórkowych (Nefedova i wsp., 2003). Przykładem substancji wpływającej na rozwijający się układ nerwowy jest chlorek metylortęci (MeHgCl) – neurotoksyna tzw. rozwojowa, której działanie zależne jest od stopnia zróżnicowania komórek neuralnych (Bużańska i wsp. 2009b).

Część komórek HUCB-NSC rosnących na PLL jak i FN, na domenach biofunkcjonalnych, zarówno w warunkach różnicowania spontanicznego jak i pod wpływem dBcAMP czy białek sygnałowych wykazywała współwystępowanie markera neuronalnego ( $\beta$ -tubuliny III) jak i astrocytarnego GFAP. Komórki takie określiliśmy jako komórki o fenotypie pośrednim, przed podjęciem decyzji rozwojowej. Koekspresja tych obydwu markerów obserwowana była również *in vivo* w przypadku badań rozwoju ludzkiego układu nerwowego (Draberova i wsp., 2008), gdzie użycie  $\beta$ -tubuliny III, jako markera komórek neuronalnych wczesnego rozwoju, było kwestionowane. Możliwą interpretacją obecności takich komórek w znaczącym procencie, szczególnie w komórkach różnicujących się spontanicznie na określonych domenach biofunkcjonalnych, bez dodatku neuromorfogenów, jest niski stopień zaawansowania rozwojowego komórek pochodzących z krwi pępowinowej, które są pochodzenia płodowego. Niemniej fakt, że koekspresję tych dwóch markerów typowo zaliczanych do neuronalnego i astrocytarnego obserwowano we wczesnych etapach rozwoju *in vivo*, sugeruje, że może to być cecha komórek przed wyborem kierunku różnicowania, która to decyzja zależy może od czynników środowiskowych. W przedstawianej pracy wyodrębnianie tego fenotypu zastosowano w celu uniknięcia błędnego zakwalifikowania wszystkich komórek wykazujących ekspresję  $\beta$ -tubuliny III do linii neuronalnej i GFAP do linii glejowej.

Obecność czynnika różnicującego dBcAMP w pożywce hodowlanej powodowała spadek liczby komórek obserwowanych na domenach mikrodrukowanych, zarówno na PLL jak i na fibronektynie, jednakże istotną statystycznie różnicę stwierdzono jedynie na PLL w warunkach bezsurowiczych. W przeprowadzanych doświadczeniach dBcAMP dodawano do pożywki hodowlanej po 24 godzinach, wraz z jej wymianą i po odpłukaniu nieprzyklejonych komórek, wobec czego nie miało to wpływu na ich adhezję i rozprzestrzenianie się na domenach. Na powierzchniach mikrodrukowanych PLL, dBcAMP zaindukowało różnicowanie w komórkach, które dość dobrze były przytwierdzone do podłoża, powodując wzrost wypustek. Duży ubytek liczby komórek pod wpływem dBcAMP w warunkach bezsurowiczych mógł być spowodowany odklejaniem się delikatnie przytwierdzonych komórek i ich śmiercią. W przeciwieństwie do PLL FN powodowała silną adhezję i rozplaszczanie się komórek HUCB-



NSC, podobną morfologię obserwowano w przypadku innych typów ssaczych komórek adherujących do fibronektyny (Longhurst i Jennings 1998).

Różnicowanie HUCB-NSC pod wpływem dBcAMP w kierunku neuronalnym było znacząco wyższe na fibronektynie niż na poli-L-lizynie. Warunki bezsurowicze dodatkowo wzmacniały ten efekt. Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami o możliwości różnicowania neuralnych komórek macierzystych poprzez wycofanie czynników wzrostu (Widera i wsp., 2007). Jednakże w prezentowanej tu pracy warunki kontrolne, bezsurowicze (brak dBcAMP) nie powodują wzmożonego różnicowania komórek HUCB-NSC, co więcej na PLL promują utrzymywanie fenotypu niezróżnicowanego. W przypadku HUCB-NSC samo wycofanie surowicy z pożywki bez dodatkowego wzbogacenia jej czynnikami morfogennymi jest niewystarczające do osiągnięcia zaawansowanych fenotypów neuralnych.

*Adhezja komórek do podłoża jest procesem regulowanym przez wielorakie czynniki środowiskowe.*

Zastosowanie techniki bezdotykowego dozowania mikrokropli biomolekuł pozwala na dowolne rozplanowanie układu serii domen o wybranym przez użytkownika składzie, stężeniu i nakrapianiu ściśle określonej ilości roztworu bez ryzyka przeniesienia próby z jednej domeny na drugą i wystąpienia zanieczyszczenia. W naszych badaniach wstępnych określono stabilność w trakcie hodowli, a także sposób oddziaływania z komórkami szeregu białek macierzy zewnątrzkomórkowej, takich jak laminina, fibronektyna, kolagen czy witronektyna w określonym panelu stężeń. Fibronektyna zapewniała najlepszą adhezję i trwałość komórek w trakcie hodowli we wszystkich testowanych stężeniach (HUCB-NSC pokrywały całą domenę) (Ceriotti i wsp., 2009), dlatego została wybrana jako białko referencyjne do dalszych badań różnicowania na domenach mikronakraplanych. Poza fibronektyną adhezja komórek HUCB-NSC zależna była od stężenia użytego białka, natomiast morfologia jak i stabilność komórek HUCB-NSC zarówno na kolagenie jak i na lamininie była najłabsza. Komórki mają tendencję do początkowego przyłączania się do krawędzi domen, tworząc pierścień, kolejno zarastając całą dostępną powierzchnię. Efekt ten obserwowano również w przypadku domen składających się z kolagenu (Roth i wsp., 2003). Dodatkowo, odmienne zachowanie komórek HUCB-NSC w zależności od stosowanego białka ECM może być spowodowane faktem, iż komórki te w porównaniu do frakcji komórek

mononuklearnych izolowanych z krwi pępowinowej, mają podwyższoną ekspresję genów dla Kolagenu V, III i IX, jak również wykazują ekspresję dla podjednostki  $\beta 1$ ,  $\alpha 1$  i  $\alpha 3$  integryny, tworzącej w odpowiedniej kombinacji receptory dla fibronektyny i lamininy ( $\beta 1$  i  $\alpha 3$ ) oraz kolagenu V ( $\beta 1$  i  $\alpha 1$ ) (Bużańska i wsp., 2006, Prowse i wsp., 2011).

Badania *in vitro* nad oddziaływaniem komórek z powierzchniami biofunkcjonalnymi było wielokrotnie dotychczas stosowane przy użyciu różnego typu domen bioaktywnych i modeli komórkowych. W tym celu używano mikromacierze zawierające białka ECM w badaniu szczurzych hepatocytów i różnicowaniu mysich zarodkowych komórek macierzystych (Flaim i wsp., 2005), obserwowano właściwości adhezyjne zarodkowych komórek nerki czy mysich fibroblastów (Kuschel i wsp., 2006), różnicowano ludzkie prekursor neuralne w obecności białek sygnałowych (Soen i wsp., 2006) oraz sprawdzano interakcję ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych z polimerami (Anderson i wsp., 2005).

#### *Modelowanie niszy komórek macierzystych przez konstrukcję domen wieloskładnikowych*

Tworząc domeny biofunkcjonalne wieloskładnikowe mieliśmy na celu odzwierciedlenie, chociaż częściowej kompozycji naturalnej niszy komórek macierzystych, czyli zapewnienie kontaktów międzykomórkowych, oddziaływania z białkiem macierzy ECM oraz stymulację specyficzną komórek cząsteczkami sygnałowymi wpływającymi na decyzje rozwojowe NSC. Dlatego też fibronektyna została zastosowana w tej pracy nie tylko jako składnik niszy, ale również czynnik umożliwiający immobilizację rozpuszczalnych białkowych cząsteczek sygnałowych. Sprawdzone, czy możliwe jest tworzenie domen mikronakraplanych jedynie białkami sygnałowymi, bez fibronektyny. Detekcja niektórych z nich przy użyciu elipsometru była ledwie wykrywalna (Jagged, Wnt3a), słaba (Shh czy Notch), bądź dość wysoka (BMP-4, Dkk1), ale w każdym przypadku niewystarczająca dla adhezji HUCB-NSC.

Immobilizacja/unieruchomienie cząstek sygnałowych na powierzchniach biofunkcjonalnych daje możliwość kontroli ich rozmieszczenia, generowania gradientu stężenia, pozwala na oszczędność przy zużywaniu często drogich produktów, które w systemie dozowania mikrokropli zużywane są w bardzo małej ilości w porównaniu do uzyskania podobnego stężenia w przypadku pokrycia nimi całego dołka naczynia hodowlanego (Kuschel i wsp., 2006). Zastosowanie układu domen o różnym składzie na tym

samym nośniku umożliwia obserwację wpływu zawartych w domenach różnych czynników na komórki w dokładnie identycznych warunkach hodowlanych (czas trwania hodowli, zawartość i jakość pożywki hodowlanej), a także umożliwia zastosowania mniejszej ilości komórek w celu zbadania wielu różnych czynników na nie wpływających (Flaim i wsp., 2008, Kuschel i wsp., 2006).

W tkankach związku rozpuszczalne, takie jak czynniki wzrostu czy cytokiny, zazwyczaj są usieciowane przez składniki macierzy zewnątrzkomórkowej (np. proteoglikany), natomiast receptory znajdują się na powierzchni komórek bezpośrednio sąsiadujących z komórkami macierzystymi. Dodatkowo, *in vivo*, działanie rozpuszczalnych czynników sygnałowych zawężone jest często do okolic powierzchni komórki (Burdick i Vunjak-Novakovic 2009), a immobilizacja ligandów pozwala na lokalne zwiększenie ich stężenia i silniejszą odpowiedź, niż ma to miejsce w przypadku białek rozpuszczonych w pożywce (Soen i wsp., 2006). Unieruchomienie czynników sygnałowych wraz z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej wpływa na ich stabilność, ciągłość w utrzymywaniu przekazywanego sygnału, a także sprzyja grupowaniu się receptorów (receptor clustering) (Irvine i wsp., 2002). Ponadto stwierdzono lepszą odpowiedź komórek na cząsteczki immobilizowane do powierzchni w stosunku do czynników rozpuszczonych w pożywce hodowlanej (Soen i wsp., 2006). Mezenchymalne komórki macierzyste wykazywały zwiększone przeżycie, odporność na śmierć komórkową wywołaną cytokiną prozapalną Fas ligand, lepszą adhezję do biomateriału zawierającego kowalencyjnie związany epidermalny czynnik wzrostu (EGF) w porównaniu do hodowli z wysokim stężeniem rozpuszczonego w pożywce FGF (Fan i wsp., 2007). Immobilizowany do naczyń hodowlanego LIF wydłużał zachowanie pluripotencjalnego charakteru mysich zarodkowych komórek macierzystych do 6-8 pasażów, a także utrzymywał długotrwałą aktywację genów docelowych (Alberti i wsp., 2008).

#### *Rola sygnałów inicjowanych przez immobilizowane białka sygnałowe*

W celu zbadania wpływu białek sygnałowych zawartych w wieloskładnikowych domenach biofunkcyjnych na decyzje rozwojowe komórek HUCB-NSC wybrano białka aktywujące ścieżki przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego pobudzane w trakcie rozwoju neuralnych komórek macierzystych. Zastosowano stały pięciodniowy czas hodowli komórek HUCB-NSC na domenach, co ogranicza efekt różnicowania, w którym można

obserwować dużą przewagę jednego z badanych fenotypów. Jednakże dłuższa hodowla skutkowała warstwowym namnażaniem się komórek na domenach uniemożliwiającym ich ilościową immunodetekcję. Komórki hodowane były na domenach w standardowej pożywce, zawierającej 2% FBS, bez dodatkowych czynników, ponieważ interesował nas efekt wywołany przez stymulację określonej ścieżki sygnałowej przez efektor wbudowany do podłoża, bez dodatkowego efektu działania innych neuromorfogenów. Soen i współpracownicy (2006), do pożywki ludzkich NSC pochodzących z mózgu płodów hodowanych na mikronakraplanych domenach zawierających białka sygnałowe, dodawali kwas retinowy, NT3 (neurotrofinę 3) jak i BDNF, wzmacniając tym samym efekt stosowanych biomolekuł (Soen i wsp., 2006).

W niniejszej pracy, poza wyborem układu eksperymentalnego zawierającego w domenach określone białko sygnałowe i fibronektynę, podjęto próbę eliminacji z pożywki nawet małej ilości (2%) surowicy. Surowica zawarta w pożywce ma hamujący wpływ na różnicowanie się komórek HUCB-NSC, co stwierdzono w tej pracy na domenach mikrodrukowanych. Okazało się, że w przypadku domen mikroakraplanych zastosowanie pożywki bez surowicy powodowało silną proliferację, a powstająca dwuwarstwa komórek już po 5 dniach hodowli uniemożliwiała analizę immunocytochemiczną.

Do określenia kierunków różnicowania indukowanych przez białka sygnałowe zastosowano analizę immunocytochemiczną na obecność  $\beta$ -tubuliny III oraz GFAP, białek powszechnie używanych jako markery różnicowania, odpowiednio, neuronalnego i astroglejowego (Pierret i wsp., 2007, Solanki i wsp., 2010). Proces różnicowania neuronalnego i astroglejowego jest bardzo złożony i wieloetapowy, dlatego, żeby w pełni ocenić zaawansowanie w różnicowaniu na domenach wieloskładnikowych, panel stosowanych przeciwciał należałoby w dalszych badaniach uzupełnić o inne, typowe dla dalszych etapów gli- i neurogenezy. Weryfikacja ukierunkowania neuronalnego, bądź astrocytarnego komórek HUCB-NSC przeprowadzona była na podstawie analizy zmiany proporcji pomiędzy komórkami charakteryzującymi się obecnością  $\beta$ -tubuliny III i GFAP, co świadczy o względnej zmianie frakcji komórek wykazujących cechy komórek neuronalnych i glejowych (Soen i wsp., 2006). Podobny rozkład fenotypowy uzyskano również stosując przeciwciało skierowane przeciwko cytoplazmatycznemu białku S100 $\beta$ , świadczącemu o

astrocytarnym fenotypie komórek HUCB-NSC indukowanym obecnością określonych białek sygnałowych. Na domenach wieloskładnikowych indukujących różnicowanie komórek HUCB-NSC w kierunku neuronalnym obserwowano również ekspresję białka MAP-2, typowego dla zaawansowanych w rozwoju komórek neuronalnych.

Na domenach kontrolnych, mikronakraplanych jedynie fibronektyną, obserwowano stałą podobną wartość występowania różnych fenotypów komórkowych. Dlatego otrzymane wyniki z białkami sygnałowymi normalizowano porównując je do wyników z fibronektyną. Na tej podstawie wyodrębniono cząsteczki sygnałowe posiadające największy wpływ na różnicowanie w kierunku neuro- czy astrocytarnym.

Różnicowanie zwiększone istotnie statystycznie w kierunku astrocytarnym zaobserwowano na domenach zawierających białko CNTF, Jagged i Notch. Jednym z głównych czynników warunkujących losy neuralnych komórek macierzystych jest sygnał powierzchniowy pochodzący z receptora błonowego Notch. W progenitorach neuralnych aktywacja ścieżki sygnałowej Notch hamuje różnicowanie neuronalne przez przyłączenie liganda (DELTA bądź JAGGED), stymulując jednocześnie proliferację. Natomiast w różnicujących się neuralnych komórkach macierzystych Notch indukuje powstawanie astrocytów, współdziałając z cytokiną CNTF (czynnik neurotroficzny pochodzenia rzęskowego, ang. Ciliary neurotrophic factor) (Nagao i wsp., 2007).

Notch jest przezbłonowym receptorem, którego aktywacja zaczyna się po połączeniu z ligandem Delta lub Jagged. U kręgowców odkryto 4 homologi genu *notch* (*notch1-4*) oraz 5 ligandów (*jagged-1 i 2, Delta 1,2 i 3*) (Lathia i wsp., 2008). Komórki progenitorowe produkują podwyższone ilości liganda dla Notch, hamują tym samym przekształcanie komórek sąsiadujących w neurony (Graf i Stadtfeld 2008). Badania ścieżki sygnałowej Notch, z wykorzystaniem mutacji wpływających na przekaźnictwo sygnału sugerują, iż Notch utrzymuje neuralne komórki macierzyste w niezróżnicowanym, samo odnawiającym się stanie, a mutacja (delecja) w receptorze Notch-1 powodowała wcześniejsze różnicowanie neuronalne oraz zmniejszenie puli komórek neuralnych (Yang i wsp., 2004a). Usunięcie receptora Delta-like 1 (Dll1) zmniejszyło ekspresję markera progenitorów gleju promienistego oraz spowodowało zwiększenie ekspresji markera neuronalnego w mózгах embrionów, potwierdzając tezę, iż sygnał płynący z receptora Notch hamuje różnicowanie

neuronalne w rozwijającym się mózgu (Shi i wsp., 2008) i powoduje ostateczne różnicowanie komórek astrocytarnych (Tanigaki i wsp., 2001). Notch utrzymuje multipotencjalny charakter NSC wpływając na fosforylacje związane z kinazą serynowo-treoninową AKT i kinazą PI3 (Ables i wsp., 2011). Z powyższych danych literaturowych wynika, że efekt stymulacji ścieżki sygnałowej Notch zależy od stadium rozwojowego, na którym komórka się znajduje oraz od obecności czynników wzrostowych i cytokin (Nagao i wsp., 2007). Do aktywacji ścieżki sygnałowej Notch potrzebny jest bezpośredni kontakt międzykomórkowy lub immobilizacja ligandów Notch, takich jak Delta-1,4 czy Jagged-1 (Goncalves i wsp., 2009). Dodatkowo stwierdzono, że do zaktywowania Notch przy pomocy ligandów, niezbędne jest ich unieruchomienie na powierzchniach biofunkcyjnych (Varnum-Finney i wsp., 2000). Komórki HUCB-NSC posiadają podwyższoną ekspresję dla białka Jagged (Bużańska i wsp., 2006) toteż immobilizacja receptora Notch w domenach może działać synergistycznie i powodować efekt różnicowania astrocytarnego.

W prezentowanej pracy białko CNTF obecne w domenach wieloskładnikowych w największym stopniu indukowało komórki HUCB-NSC do osiągnięcia fenotypu astrocytarnego, manifestującego się obecnością białka GFAP. Białko CNTF należy do rodziny cytokin interleukiny 6 (IL-6), biorących istotny udział w różnicowaniu astocytów (He i wsp., 2005), zwiększając udział komórek wykazujących obecność GFAP. Postuluje się również zależność działania zarówno CNTF jak i Notch od etapu rozwojowego, na którym komórka się znajduje. Na wczesnym etapie rozwoju CNTF przeciwdziała białku Notch, hamującemu różnicowanie komórek macierzystych, natomiast, gdy komórka jest bardziej zaawansowana w rozwoju (progenitory neuralne) CNTF współdziała z Notch i czynnikami wzrostu (EGF/FGF2) indukując różnicowanie astrocytów (Nagao i wsp., 2007).

Zwiększoną ekspresję markera wczesnego zróżnicowania neuronalnego obserwowano w przypadku zastosowania białek Shh, Dkk-1, oraz BMP-4 w porównaniu do komórek hodowanych w tych samych warunkach na fibronektynie.

Białko Shh jest morfogenem regulującym neurogenezę i gliogenezę w trakcie rozwoju. Z danych literaturowych wiadomo, iż Shh zwiększa proliferację prekursorów komórek ziarnistych hipokampa w SGZ (Wechsler-Reya i Scott 1999), zwiększa proliferację komórek macierzystych w przestrzeni podwyściółkowej w SVZ (Palma i wsp., 2004) oraz

utrzymuje stan ich macierzystości (Balordi i Fishel 2007). W niniejszej pracy stwierdzono zwiększoną liczbę komórek wykazujących znakowanie na  $\beta$ -tubulinę III, jak również obserwowano ponad 27% komórek o charakterze nieodróżnionym, nie wykazujących obecności badanych markerów, co jest zgodne z danymi literaturowymi, stwierdzającymi wzrost proliferacji neuralnych komórek macierzystych pod wpływem podwyższonej zawartości Shh (Palma i wsp., 2003). Białko Shh utrzymuje proliferację progenitorów neuralnych dorosłego hipokampa *in vitro* (Lai i wsp., 2003) poprzez mechanizm aktywacji czynnika transkrypcyjnego Gli 1-3, który działa jako aktywator proliferacji, utrzymujący w mózgu populację progenitorów neuralnych. Zaktywowany szlak sygnałowy hedgehog prowadzi do transkrypcji genów czynników wzrostowych i ich receptorów, takich jak *Pdgfr*, *Gli-1*, *Wnt*, *Igf-2* (Wu i wsp., 2010).

W trakcie rozwoju szlak BMP hamuje rozwój neuroektodermy, promując różnicowanie mezodermy i trofoblastu (Zhang i wsp., 2005). W komórkach zarodkowych białko BMP-4 stanowi czynnik hamujący różnicowanie neuralne (Finley i wsp., 1999, Zhang i wsp., 2005). Wiadomo jest, że działanie tego białka zależy od etapu rozwojowego komórek macierzystych i w fazie gliogennej polega na hamowaniu indukcji neurogenezy poprzez aktywację białek ID1 (Sabo i wsp. 2010) i na aktywacji gliogenezy (Miller i Gauthier 2007). W zaawansowanych progenitorach neuralnych, w neurogennej fazie rozwoju, aktywacja szlaku BMP (tworzenie kompleksu ko-aktywatora p300/CBP z czynnikiem transkrypcyjnym SMAD) może indukować transkrypcję genów neuronalnych (Miller i Gauthier 2007). Stwierdzono również, że białko BMP-4 współdziałając z czynnikiem wzrostu bFGF indukuje również pojawianie się komórek wykazujących obecność  $\beta$ -tubuliny III (marker TUJ1) w szczurzych NSC (Moon i wsp., 2009). To może częściowo wyjaśniać pojawianie się komórek HUCB-NSC wykazujących fenotyp neuronalny w domenach z immobilizowanym do powierzchni biofunkcjonalnych czynnikiem BMP-4.

Ścieżka sygnałowa związana z Wnt/ $\beta$ -kateniną bierze udział w procesie proliferacji i samoodnowy prekursorów neuralnych, przez działanie cykliny D1 (Willert i Nusse, 1998). Białko Wnt pełni istotną rolę w procesie różnicowania neuronalnego, zarówno w hodowli neuralnych komórek macierzystych, jak i w dorosłych hipokampach. Wskazuje to na zróżnicowaną funkcję działania białka Wnt. Dowiedziono, że białko Wnt3a i Wnt5a mogą

zarówno zwiększać proliferację, jak i stymulować różnicowanie progenitorów neuralnych izolowanych z mózgow młodych myszy (Kalani i wsp., 2008). Podobne działanie białka Wnt3a obserwowano w niniejszej pracy, gdzie pod jego wpływem komórki HUCB-NSC w większości pozostawały niezróżnicowane (ponad 35%), ale także różnicowały się w komórki o fenotypie neuronalnym. Dodatkowo, w obecności Wnt3a zaobserwowano najmniejszą ilość komórek zawierających glejowe kwaśne białko włókienkowe (GFAP). Inhibitor kanonicznej ścieżki sygnałowej związanej z Wnt – Dkk-1, promował pojawianie się komórek wykazujących obecność badanego markera neuronalnego, co jest zgodne z danymi literaturowymi (Verani i wsp., 2007). Hamujący charakter Dkk1, oddziałujący na ścieżkę sygnałową Wnt przejawiał się w represji procesu samoodnowy i utrzymywania zróżnicowanego charakteru komórek HUCB-NSC.

W coraz większym stopniu mikroplatformy z domenami bioaktywnymi o różnym składzie biomolekuł na powierzchni hodowlanej znajdują zastosowanie w badaniach podstawowych, diagnostycznych np. w testach immunologicznych, urządzeniach typu 'lab on chip', bioczuJNIkach badających metabolizm komórki oraz testach toksykologicznych (Peterbauer i wsp., 2006, Falconnet i wsp., 2006). Prezentowane w niniejszej pracy obserwacje mogą przyczynić się do zastosowania przedstawianych układów doświadczalnych zarówno w badaniu podstawowych procesów rozwojowych innych typów komórek, a także mogą stanowić dogodny system weryfikujący działanie różnych czynników farmakologicznych czy toksykologicznych.



## VI. Podsumowanie wyników

---

- Zastosowanie technik bioinżynieryjnych: mikrodrukowania i dozowania mikrokropli umożliwiło otrzymanie matryc z określonym wzorem domen biofunkcjonalnych, o różnym składzie i architekturze:
  - domeny mikrodrukowane jednoskładnikowe pozycjonujące grupy komórek (kwadraty i kwadraty połączone liniami);
  - domeny mikrodrukowane jednoskładnikowe pozycjonujące pojedyncze komórki (linie oraz znaczkii o rozdzielczości 10 $\mu$ m);
  - domeny mikronakraplane wieloskładnikowe pozycjonujące grupy komórek;
- Metody elipsometrii i powierzchniowego rezonansu plazmowego potwierdziły obecność nanoszonych biomolekuł i ich funkcjonalność
- Architektura i skład powierzchni biofunkcjonalnych ma istotny wpływ na decyzje rozwojowe i fenotyp komórek HUCB-NSC:
  - Rodzaj oddziaływania komórek z powierzchnią (receptorowe na fibronectynie vs elektrostatyczne na poli-L-lizynie) determinuje fenotyp, adhezję i migrację komórek macierzystych;
  - Adhezja komórek jest istotnie zwiększona na domenach mikrodrukowanych poli-L-lizyną w porównaniu z domenami zawierającymi fibronectynę, wycofanie surowicy z pożywki wzmacnia ten efekt;
  - Proliferacja i migracja komórek HUCB-NSC są istotnie zwiększone na domenach mikrodrukowanych PLL w porównaniu z FN;
  - Kształt domen wpływa na różnicowanie komórek HUCB-NSC: domeny pozycjonujące komórki pojedyncze (tzw. znaczkii) utrzymują charakter niezróżnicowany komórek; linie promują wydłużanie komórek i osiągnięcie fenotypu neuronalnego; domeny kwadratowe wielokomórkowe mikrodrukowane fibronectyną sprzyjają różnicowaniu neuronalnemu,

(ekspresja  $\beta$ -tubuliny III oraz MAP-2), linie łączące domeny kierunkują wzrost wypustek neuronalnych;

- Adhezja HUCB-NSC do domen mikronakraplanych białkami macierzy zewnątrzkomórkowej zależy od rodzaju i stężenia białka: fibronektyna zapewnia optymalną adhezję i stanowi białko referencyjne domen wieloskładnikowych;
- Zawarte w wieloskładnikowych domenach mikronakraplanych białka sygnałowe, (CNTF, Jagged, Wnt-3a, BMP4, Shh, Dkk-1 i Notch) wywierają istotny wpływ na wybór drogi rozwojowej przez HUCB-NSC:
  - Białka sygnałowe CNTF, Jagged i Notch stymulują HUCB-NSC do różnicowania w kierunku astrocytarnym
  - Białka sygnałowe Shh, Dkk-1 i BMP-4 promują różnicowanie komórek HUCB-NSC w kierunku neuronalnym
  - Białko sygnałowe Wnt-3a sprzyja samoodnowie HUCB-NSC i utrzymuje HUCB-NSC w stanie niezróżnicowanym.

## VII. Wnioski

---

1. Przetawione w dysertacji wyniki pozytywnie weryfikują postawioną hipotezę. Zmienna architektura i skład domen biofunkcjonalnych może być elementem kontroli decyzji rozwojowych komórek macierzystych w hodowli *in vitro*.
2. Opracowanie metody unieruchomienia na powierzchni biofunkcjonalnej populacji neuralnych komórek macierzystych w stadium wczesnym – niezróżnicowanym, dostarcza nam nowe, przydatne narzędzie badawcze, umożliwiające porównanie tej samej populacji komórek macierzystych na różnych etapach rozwoju.
3. Zastosowanie domen biofunkcjonalnych wieloskładnikowych umożliwia aktywację specyficznych dróg przekazywania sygnału w neuralnych komórkach macierzystych i badanie mechanizmów molekularnych leżących u wyboru drogi rozwojowej przez neuralne komórki macierzyste.

## VIII. STRESZCZENIE

---

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 mikrośrodowisku 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. Dojrzewaniu 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 mikrośrodowiskiem.

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 do badań 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,

proliferaacja i różnicowanie. Konstrukcję domen biofunkcyjnych przeprowadzono przy zastosowaniu dwóch technik mikroinżynijnych: 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 specyficjnych dla komórek proliferujących (Ki-67) a także białek charakterystycznych dla różnicowania neuronalnego ( $\beta$ -tubuliny III, MAP-2) oraz astrocytarnego (GFAP, S100 $\beta$ ). 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 specyficjnych 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, niespecyficjne, elektrostatyczne na PLL versus specyficjne, 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 biofunkcyjnych ma duże znaczenie w determinacji losu HUCB-NSC: domeny pozycjonujące komórki pojedyncze (tzw. znaczkami) 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  $\beta$ -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 biofunkcyjnych *in vitro* umożliwia kontrolę decyzji rozwojowych neuralnych komórek macierzystych pochodzących z krwi pępowinowej. Zmienna architektura i skład

domen biofunkcyjnych może być elementem kontroli decyzji rozwojowych komórek macierzystych w hodowli *in vitro*. Domeny biofunkcyjne 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 $\mu$ 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 ( $\beta$ -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.



## VIII. PIŚMIENNICTWO:

---

1. Ables JL, Breunig JJ, Eisch AJ, Rakic P. Not(ch) just development: Notch signalling in the adult brain. *Nat Rev Neurosci.* 2011;12(5):269-83.
2. Alberti K, Davey RE, Onishi K, George S, Salchert K, Seib FP, Bornhäuser M, Pompe T, Nagy A, Werner C, Zandstra PW. Functional immobilization of signaling proteins enables control of stem cell fate. *Nat Methods.* 2008;5(7):645-50.
3. Altman J. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat Rec.* 1963; 145:573-91.
4. Alvarez-Buylla A, Lois C. Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates. *Stem Cells.* 1995;13(3):263-72.
5. Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nature medicine* 2002;8:963–970
6. Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Relat Res.* 1980;(151):294-307.
7. Alford AI, Rannels DE. Extracellular matrix fibronectin alters connexin43 expression by alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;280(4):L680-8.
8. Bae Hojae, Nichol Jason W, Foudeh Amir, Zamanian Behnam, Cheong Hoon Kwon, Khademhosseini Ali. *Microengineering Approach for Directing Embryonic Stem Cell Differentiation.* Stud Mechanobiol Tissue Eng Biomater, Springer Verlag Berlin Heidelberg 2010
9. Balordi F, Fishell G. Hedgehog signaling in the subventricular zone is required for both the maintenance of stem cells and the migration of newborn neurons. *J Neurosci.* 2007;30;27(22):5936-47.
10. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(4):568-84.
11. Bédurier A, Vieu C, Arnauduc F, Sol JC, Loubinoux I, Vaysse L. Engineering of adult human neural stem cells differentiation through surface micropatterning. *Biomaterials.* 2012;33(2):504-14.
12. Berninger B. Making neurons from mature glia: a far-fetched dream? *Neuropharmacology.* 2010;58(6):894-902.
13. Bieback K, Brinkmann I. Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy. *World J Stem Cells.* 2010;26;2(4):81-92.
14. Brétagnol F, Lejeune M, Papadopoulou-Bouraoui A, Hasiwa M, Rauscher H, Ceccone G, Colpo P, Rossi F. Fouling and non-fouling surfaces produced by plasma polymerization of ethylene oxide monomer. *Acta Biomater.* 2006;2(2):165-72.

15. Brétagne F, Ceriotti L, Valsesia A, Sasaki T, Ceccone G, Gilliland D, Colpo P, Rossi F. Fabrication of functional nano-patterned surfaces by a combination of plasma processes and electron-beam lithography. *Nanotechnology*. 2007;4;18(13):135303.
16. Bruni JE. Ependymal development, proliferation, and functions: a review. *Microsc Res Tech*. 1998;1;41(1):2-13.
17. Burdick JA, Vunjak-Novakovic G. Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(2):205-19.
18. Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1996;12:463-518.
19. Bużańska L, EK Machaj, B Zablocka, Z Pojda and K Domanska-Janik. Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features in vitro. *J Cell Sci* 2002;115: 2131–2138.
20. Bużańska L, Habich A, Jurga M, Sypecka J, Domańska-Janik K. Human cord blood-derived neural stem cell line—possible implementation in studying neurotoxicity. *Toxicol In Vitro*. 2005;19(7):991-9
21. Bużańska, L., Jurga, M., Stachowiak, E.K., Stachowiak, M.K., Domanska-Janik, K. Neural stem-like cell line derived from a nonhematopoietic population of human umbilical cord blood. *Stem Cells Dev*. 2006a;15, 391–406.
22. Bużańska, L., Jurga, M., Domanska-Janik, K. Neuronal differentiation of human umbilical cord blood neural stem-like cell line. *Neurodegener. Dis*. 2006b; 3, 19–26.
23. Bużańska L, Sypecka J, Nerini-Molteni S, Compagnoni A, Hogberg HT, del Torchio R, Domanska-Janik K, Zimmer J, Coecke S. A human stem cell-based model for identifying adverse effects of organic and inorganic chemicals on the developing nervous system. *Stem Cells*. 2009a;27(10):2591-601.
24. Bużańska, L., Ruiz, A., Zychowicz, M., Rauscher, H., Ceriotti, L., Rossi, F., Colpo, P., Domanska-Janik, K., Coecke, S. Patterned growth and differentiation of human cord blood-derived neural stem cells on bio-functionalized surfaces. *Acta Neurobiol. Exp*. 2009b; 69, 24–36.
25. Bużańska L, Ruiz A, Zychowicz M, Rausher H, Ceriotti L, Rossi F, Colpo P, Domanska-Janik K, Coecke S. Patterned growth and differentiation of Human Cord Blood-derived Neural Stem Cells on bio-functionalized surfaces. *Acta Neurobiol Exp* 2009;69: 1-14
26. Bużańska L, Zychowicz M, Ruiz A, Ceriotti L, Coecke S, Rausher H, Sobanski T, Wheland M, Domanska-Janik K, Colpo P, Rossi. Neural stem cells from human cord blood on bioengineered surfaces—Novel approach to multiparameter bio-tests. *Toxicology*. 2010;270:35-42
27. Caldwell MA, He X, Wilkie N, Pollack S, Marshall G, Wafford KA, Svendsen CN. Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres. *Nat Biotechnol*. 2001;19(5):475-9.
28. Castoldi AF, Coccini T, Ceccatelli S, Manzo L. Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. *Brain Res Bull*. 2001; 15;55(2):197-203.

29. Ceriotti, L., Buzanska, L., Rausche, rH., Mannelli, I., Sirghi, L., Gilliland, D., Hasiwa, M., Bretagnol, F., Zychowicz, M., Ruiz, A., Bremer, S., Coecke, S., Colpo, P., Rossi, F. Fabrication and characterization of protein arrays for stem cell patterning. *Soft Matter*. 2009; 5, 1406–1416.
30. Charras GT, Horton MA. Single cell mechanotransduction and its modulation analyzed by atomic force microscope indentation. *Biophys J*. 2002;82(6):2970-81.
31. Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE. Micropatterned surfaces for control of cell shape, position, and function. *Biotechnol Prog*. 1998;14(3):356-63.
32. Chothia C, Jones EY. The molecular structure of cell adhesion molecules. *Annu Rev Biochem*. 1997;66:823-62.
33. Cohnheim L. Uber Entzudung und Eiterung. *J. Arch. Path. Anat. Physiol. Klin. Med*. 1867; 40:1-79.
34. Colucci-D'Amato L, Bonavita V, di Porzio U. The end of the central dogma of neurobiology: stem cells and neurogenesis in adult CNS. *Neurol Sci*. 2006;27(4):266-70.
35. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008;11;3(3):301-13.
36. Curtis MA, Eriksson PS, Faull RL. Progenitor cells and adult neurogenesis in neurodegenerative diseases and injuries of the basal ganglia. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34(5-6):528-32.
37. Dalby MJ, Gadegaard N, Tare R, Andar A, Riehle MO, Herzyk P, Wilkinson CD, Oreffo RO. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nat Mater*. 2007a; 6(12):997-1003.
38. Dalby MJ, Gadegaard N, Herzyk P, Sutherland D, Agheli H, Wilkinson CD, Curtis AS. Nanomechanotransduction and interphase nuclear organization influence on genomic control. *J Cell Biochem*. 2007b;1;102(5):1234-44.
39. Daley WP, Peters SB, Larsen M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J Cell Sci*. 2008; 1;121(Pt 3):255-64.
40. Davila JC, Cezar GG, Thiede M, Strom S, Miki T, Trosko J. Use and application of stem cells in toxicology. *Toxicol Sci*. 2004;79(2):214-23.
41. Dawson E, Mapili G, Erickson K, Taqvi S, Roy K. Biomaterials for stem cell differentiation. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008;14;60(2):215-28.
42. Deng ZL, Sharff KA, Tang N, Song WX, Luo J, Luo X, Chen J, Bennett E, Reid R, Manning D, Xue A, Montag AG, Luu HH, Haydon RC, He TC. Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development. *Front Biosci*. 2008; 1;13:2001-21.
43. Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*. 1999; 11;97(6):703-16.

44. Doetsch F. The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci.* 2003a;6(11):1127-34.
45. Doetsch F. A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev.* 2003b; 13(5):543-50.
46. Domanska-Janik, K., Buzanska, L., Lukomska, B. A novel, neural potential of non-hematopoietic human umbilical cord blood stem cells *Int. J Dev Biol.* 2008; 52, 237–248.
47. Dráberová E, Del Valle L, Gordon J, Marková V, Smejkalová B, Bertrand L, de Chadarevian JP, Agamanolis DP, Legido A, Khalili K, Dráber P, Katsetos CD. Class III beta-tubulin is constitutively coexpressed with glial fibrillary acidic protein and nestin in midgestational human fetal astrocytes: implications for phenotypic identity. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008; 67(4):341-54
48. Encinas JM, Enikolopov G. Identifying and quantitating neural stem and progenitor cells in the adult brain. *Methods Cell Biol.* 2008; 85:243-72.
49. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell.* 2006; 25;126(4):677-89.
50. Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.*, 1998,4(11), 1313-1317.
51. Falconnet D, Csucs G, Grandin HM, Textor M. Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays. *Biomaterials.* 2006;27(16):3044-63.
52. Fan VH, Tamama K, Au A, Littrell R, Richardson LB, Wright JW, Wells A, Griffith LG. Tethered epidermal growth factor provides a survival advantage to mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2007;25(5):1241-51
53. Fehrer C, Lepperdinger G. Mesenchymal stem cell aging. *Exp Gerontol.* 2005; 40(12):926-30.
54. Felka T, Schäfer R, De Zwart P, Aicher WK. Animal serum-free expansion and differentiation of human mesenchymal stromal cells. *Cytherapy.* 2010;12(2):143-53.
55. Feng B, Chen L. Review of mesenchymal stem cells and tumors: executioner or coconspirator? *Cancer Biother Radiopharm.* 2009;24(6):717-21.
56. Fiorio Pla, A., Maric, D., Brazer, S.C., Giacobini, P., Liu, X., Chang, Y.H., Ambudkar, I.S., and Barker, J.L. Canonical transient receptor potential 1 plays a role in basic fibroblast growth factor (bFGF)/FGF receptor-1-induced Ca<sup>2+</sup> entry and embryonic rat neural stem cell proliferation. *J. Neurosci.* 2005; 25, 2687–2701.
57. Flaim CJ, Teng D, Chien S, Bhatia SN. Combinatorial signaling microenvironments for studying stem cell fate. *Stem Cells Dev.* 2008;17(1):29-39.
58. Fortier LA. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg.* 2005;;34(5):415-23.
59. Freire E, Gomes FC, Linden R, Neto VM, Coelho-Sampaio T. Structure of laminin substrate modulates cellular signaling for neuritogenesis. *J Cell Sci.* 2002;15;115(Pt 24):4867-76.
60. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet.* 1987; 20(3):263-72.
61. Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell.* 2004; 19;116(6):769-78.

62. Gan Wang a, Qiang Ao b, Kai Gong a, Aijun Wangc, Lu Zheng a, Yandao Gong a, Xiufang Zhang a, The effect of topology of chitosan biomaterials on the differentiation and proliferation of neural stem cells. *Acta Biomaterialia* 6 2010; 3630–3639
63. Gelain F, Bottai D, Vescovi A, Zhang S. Designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds for adult mouse neural stem cell 3-dimensional cultures. *PLoS One*. 2006 27;1:e119
64. Gerecht S, Bettinger CJ, Zhang Z, Borenstein JT, Vunjak-Novakovic G, Langer R. The effect of actin disrupting agents on contact guidance of human embryonic stem cells. 2007;28(28):4068-77.
65. Giachino C, De Marchis S, Giampietro C, Parlato R, Perroteau I, Schütz G, Fasolo A, Peretto P. cAMP response element-binding protein regulates differentiation and survival of newborn neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci*. 2005;25(44):10105-18.
66. Giaume C, Venance L. Intercellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes. *Glia*. 1998;24(1):50-64.
67. Gonçalves RM, Martins MC, Almeida-Porada G, Barbosa MA. Induction of notch signaling by immobilization of jagged-1 on self-assembled monolayers. *Biomaterials*. 2009;30(36):6879-87.
68. Gossrau G, Thiele J, Konang R, Schmandt T, Brüstle O. Bone morphogenetic protein-mediated modulation of lineage diversification during neural differentiation of embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2007;25(4):939-49.
69. Graf T, Stadtfeld M. Heterogeneity of embryonic and adult stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008; 6;3(5):480-3.
70. Guilak F, Cohen DM, Estes BT, Gimble JM, Liedtke W, Chen CS. Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix. *Cell Stem Cell*. 2009; 2;5(1):17-26.
71. Habich A, Jurga M, Markiewicz I, Lukomska B, Bany-Laszewicz U, Domanska-Janik K. Early appearance of stem/progenitor cells with neural-like characteristics in human cord blood mononuclear fraction cultured in vitro. *Exp Hematol*. 2006;34(7):914-25.
72. Han YG, Spassky N, Romaguera-Ros M, Garcia-Verdugo JM, Aguilar A, Schneider-Maunoury S, Alvarez-Buylla A. Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nat Neurosci*. 2008;11(3):277-84.
73. He F, Ge W, Martinowich K, Becker-Catania S, Coskun V, Zhu W, Wu H, Castro D, Guillemot F, Fan G, de Vellis J, Sun YE. A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astroglialogenesis. *Nat Neurosci*. 2005;8(5):616-25.
74. Heng BC, Bezerra PP, Preiser PR, Law SK, Xia Y, Boey F, Venkatraman SS. Effect of cell-seeding density on the proliferation and gene expression profile of human umbilical vein endothelial cells within ex vivo culture. *Cytotherapy*. 2011;13(5):606-17.
75. Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*. 2003;24(24):4385-415.
76. Holtzer H, Abbott J, Lash J, Holtzer S. The loss of phenotypic traits by differentiated cells in vitro, i. Dedifferentiation of cartilage cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1960; 46(12):1533-42.

77. Hwang NS, Kim MS, Sampattavanich S, Baek JH, Zhang Z, Elisseeff J. Effects of three-dimensional culture and growth factors on the chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2006;24(2):284-91.
78. Inoue H, Yamanaka S. The use of induced pluripotent stem cells in drug development. *Clin Pharmacol Ther*. 2011;89(5):655-61.
79. Irvine DJ, Hue KA, Mayes AM, Griffith LG. Simulations of cell-surface integrin binding to nanoscale-clustered adhesion ligands. *Biophys J*. 2002;82(1 Pt 1):120-32.
80. Janmey PA, Miller RT. Mechanisms of mechanical signaling in development and disease. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 1):9-18.
81. Joshi PA, Jackson HW, Beristain AG, Di Grappa MA, Mote PA, Clarke CL, Stingl J, Waterhouse PD, Khokha R. Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. *Nature*. 2010;10;465(7299):803-7.
82. Jurga, M., Markiewicz, I., Sarnowska, A., Buzanska, L., Lukomska, B., Domanska-Janik, K. Preconditioning of human neural stem cells in low serum medium increases their differentiation into neurons. *J Neurosci Res* 2006; 83, 627–631.
83. Jurga, M., Lipkowski, A.W., Lukomska, B., Buzanska, L., Kurzepa, K., Sobanski, T., Habich, A., Coecke, S., Gajkowska, B., Domanska-Janik, K.,. Generation of functional neural artificial tissue from human umbilical cord blood stem cells. *Tissue Eng. Part A* 2009; 15, 1–7.
84. Kalani MY, Cheshier SH, Cord BJ, Bababeygy SR, Vogel H, Weissman IL, Palmer TD, Nusse R. Wnt-mediated self-renewal of neural stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 4;105(44):16970-5.
85. Katoh M, Katoh M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res*. 2007; 15;13(14):4042-5.
86. Kazanis I, Lathia J, Moss L, French-Constant C. The neural stem cell microenvironment. *StemBook* [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008 Aug 31.
87. Kazanis I, Lathia JD, Vadakkan TJ, Raborn E, Wan R, Mughal MR, Eckley DM, Sasaki T, Patton B, Mattson MP, Hirschi KK, Dickinson ME, French-Constant C. Quiescence and activation of stem and precursor cell populations in the subependymal zone of the mammalian brain are associated with distinct cellular and extracellular matrix signals. *J Neurosci*. 2010; 21;30(29):9771-81.
88. Kim M, Morshead CM. Distinct populations of forebrain neural stem and progenitor cells can be isolated using side-population analysis. *J Neurosci*. 2003; 19;23(33):10703-9.
89. Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R, Kim KS. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*. 2009; 5;4(6):472-6.
90. Kolanowski T, Kurpisz M. Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste — geneza, problemy oraz perspektywy wykorzystania w terapii chorób serca. *Kardiologia Polska*. 2010;68 Suppl 5:S412-7.

91. Kucia M, Halasa M, Wysoczynski M, Baskiewicz-Masiuk M, Moldenhawer S, Zuba-Surma E, Czajka R, Wojakowski W, Machalinski B, Ratajczak MZ. Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4+ SSEA-4+ Oct-4+ very small embryonic-like cells purified from human cord blood: preliminary report. *Leukemia*. 2007;21(2):297-303
92. Kuschel C, H Steuer, AN Maurer, B Kanzok, R Stoop and B Angres. Cell adhesion profiling using extracellular matrix protein microarrays. *Biotechniques* 2006; 40:523– 531.
93. Lathia JD, Mattson MP, Cheng A. Notch: from neural development to neurological disorders. *J Neurochem*. 2008;107(6):1471-81.
94. Lee MR, Kwon KW, Jung H, Kim HN, Suh KY, Kim K, Kim KS. Direct differentiation of human embryonic stem cells into selective neurons on nanoscale ridge/groove pattern arrays. *Biomaterials*. 2010;31(15):4360-6.
95. Lepski G, Jannes CE, Maciaczyk J, et al. Limited Ca<sup>2+</sup> and PKA-pathway dependent neurogenic differentiation of human adult mesenchymal stem cells as compared to fetal neuronal stem cells. *Exp Cell Res* 2010; 316:216-31.
96. Lepski G, Cinthia Elim Jannes CE, Mikkhah G. cAMP promotes differentiation of rodent neuronal progenitor cells. *Stem Cell Studies* 2011; volume 1:e9
97. Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron*. 2000;28(3):713-26.
98. Lo Celso C, Fleming HE, Wu JW, Zhao CX, Miake-Lye S, Fujisaki J, Côté D, Rowe DW, Lin CP, Scadden DT. Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature*. 2009; 1;457(7225):92-6.
99. Longhurst CM, Jennings LK. Integrin-mediated signal transduction. *Cell Mol Life Sci*. 1998;;54(6):514-26.
100. Lutolf MP, Gilbert PM, Blau HM. Designing materials to direct stem-cell fate. *Nature*. 2009; 26;462(7272):433-41
101. Maherali N, Hochedlinger K (2008) Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 595–605.
102. Mao Hai-Quan, Lim Shawn H., Zhang Shuming, Christopherson Gregory, Kam Korey, Fischer Stephen. *The Nanofiber Matrix as an Artificial Stem Cell Niche*. Stud Mechanobiol Tissue Eng Biomater. Springer Verlag Berlin Heidelberg 2010
103. Mao Y, Schwarzbauer JE. Accessibility to the fibronectin synergy site in a 3D matrix regulates engagement of alpha5beta1 versus alphavbeta3 integrin receptors. *Cell Commun Adhes*. 2006; 13(5-6):267-77.
104. Marastoni S, Ligresti G, Lorenzon E, Colombatti A, Mongiat M. Extracellular matrix: a matter of life and death. *Connect Tissue Res*. 2008; 49(3):203-6.
105. Marklein RA, Burdick JA. Controlling stem cell fate with material design. *Adv Mater*. 2010; 12;22(2):175-89.

106. Martino MM, Mochizuki M, Rothenfluh DA, Rempel SA, Hubbell JA, Barker TH. Controlling integrin specificity and stem cell differentiation in 2D and 3D environments through regulation of fibronectin domain stability. *Biomaterials*. 2009; 30(6):1089-97.
107. Massirer KB, Carromeu C, Griesi-Oliveira K, Muotri AR. Maintenance and differentiation of neural stem cells. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2011 Jan; 3(1):107-14.
108. Mazia D, Schatten G, Sale W. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy. *J Cell Biol*. 1975;;66(1):198-200.
109. Miller F.D., Gauthier A.S.: Timing Is Everything: Making Neurons versus Glia in the Developing Cortex. *Neuron*, 2007, 54, 357-369.
110. McBride SH, Falls T, Knothe Tate ML. Modulation of stem cell shape and fate B: mechanical modulation of cell shape and gene expression. *Tissue Eng Part A*. 2008; 14(9):1573-80.
111. McGuckin C, Forraz N, Baradez MO, Basford C, Dickinson AM, Navran S, Hartgerink JD. Embryonic-like stem cells from umbilical cord blood and potential for neural modeling. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2006; 66(4):321-9.
112. McGuckin CP, Forraz N. Umbilical cord blood stem cells--an ethical source for regenerative medicine. *Med Law*. 2008;27(1):147-65.
113. McMahon AP. More surprises in the Hedgehog signaling pathway. *Cell*. 2000; 21;100(2):185-8.
114. Meinertzhagen IA, Takemura SY, Lu Z, Huang S, Gao S, Ting CY, Lee CH. From form to function: the ways to know a neuron. *J Neurogenet*. 2009; 23(1-2):68-77.
115. Michaelidis TM, Lie DC. Wnt signaling and neural stem cells: caught in the Wnt web. *Cell Tissue Res*. 2008;331(1):193-210.
116. Minger SL, Ekonomou A, Carta EM, Chinoy A, Perry RH, Ballard CG Endogenous neurogenesis in the human brain following cerebral infarction. *Regen Med*. 2007; 2(1):69-74
117. Moon BS, Yoon JY, Kim MY, Lee SH, Choi T, Choi KY. Bone morphogenetic protein 4 stimulates neuronal differentiation of neuronal stem cells through the ERK pathway. *Exp Mol Med*. 2009; 28;41(2):116-25.
118. Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*. 2006; 29;441(7097):1068-74.
119. Mu Y, Lee SW, Gage FH. Signaling in adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol*. 2010; 20(4):416-23.
120. Nagao M, Sugimori M, Nakafuku M. Cross talk between notch and growth factor/cytokine signaling pathways in neural stem cells. *Mol Cell Biol*. 2007; 27(11):3982-94.
121. Nakajima M, Ishimuro T, Kato K, Ko IK, Hirata I, Arima Y, Iwata H. Combinatorial protein display for the cell-based screening of biomaterials that direct neural stem cell differentiation. *Biomaterials*. 2007;28(6):1048-60.



122. Nefedova Y, Landowski TH, Dalton WS Bone marrow stromal-derived soluble factors and direct cell contact contribute to de novo drug resistance of myeloma cells by distinct mechanisms. *Leukemia*. 2003; 17(6):1175-82.
123. Ng YP, Wu Z, Wise H, Tsim KW, Wong YH, Ip NY. Differential and synergistic effect of nerve growth factor and cAMP on the regulation of early response genes during neuronal differentiation. *Neurosignals*. 2009; 17(2):111-20.
124. Nori S, Okada Y, Yasuda A, Tsuji O, Takahashi Y, Kobayashi Y, Fujiyoshi K, Koike M, Uchiyama Y, Ikeda E, Toyama Y, Yamanaka S, Nakamura M, Okano H. Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 4;108(40):16825-30.
125. Oh S, Brammer KS, Li YS, Teng D, Engler AJ, Chien S, Jin S. Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 17;106(7):2130-5.
126. Owen SC, Shoichet MS. Design of three-dimensional biomimetic scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2010; 15;94(4):1321-31.
127. Palma V, Ruiz i Altaba A. Hedgehog-Gli signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. *Development*. 2004;131(2):337-45.
128. Peltier J, Agrawal S, Robertson MJ, Schaffer DV. In vitro culture and analysis of adult hippocampal neural progenitors. *Methods Mol Biol*. 2010;621:65-87.
129. Peretto P, Dati C, De Marchis S, Kim HH, Ukhanova M, Fasolo A, Margolis FL. Expression of the secreted factors noggin and bone morphogenetic proteins in the subependymal layer and olfactory bulb of the adult mouse brain. *Neuroscience*. 2004;128(4):685-96.
130. Peterbauer T, Heitz J, Olbrich M, Hering S. Simple and versatile methods for the fabrication of arrays of live mammalian cells. *Lab Chip*. 2006;6(7):857-63.
131. Pierret C, Spears K, Morrison JA, Maruniak JA, Katz ML, Kirk MD. Elements of a neural stem cell niche derived from embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. 2007;16(6):1017-26.
132. Pikuła M, Trzonkowski P. Biologia komórek macierzystych naskórka oraz ich znaczenie w medycynie. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2009; 15;63:449-56.
133. Pillow RP, Epstein RB, Buckner CD, Giblett ER, Thomas ED. Treatment of bone-marrow failure by isogeneic marrow infusion. *N Engl J Med*. 1966; 14;275(2):94-7.
134. Powell, S.K., Kleinman, H.K. Neuronal laminins and their cellular receptors. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 29(3), 401-414 (1997)
135. Prowse AB, Chong F, Gray PP, Munro TP. Stem cell integrins: implications for ex-vivo culture and cellular therapies. *Stem Cell Res*. 2011;6(1):1-12.
136. Pomp O, Brokhman I, Ziegler L, Almog M, Korngreen A, Tavian M, Goldstein RS. PA6-induced human embryonic stem cell-derived neurospheres: a new source of human peripheral sensory neurons and neural crest cells. *Brain Res*. 2008; 16;1230:50-60.
137. Quist AP, Pavlovic E, Oscarsson S. Recent advances in microcontact printing. *Anal Bioanal Chem*. 2005; 381(3):591-600.

138. Rao SS, Winter JO. Adhesion molecule-modified biomaterials for neural tissue engineering. *Front Neuroeng.* 2009;2:6
139. Recknor JB, Sakaguchi DS, Mallapragada SK. Growth and differentiation of astrocytes and neural progenitor cells on micropatterned polymer films. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1049:24-7.
140. Ribes V, Briscoe J. Establishing and interpreting graded Sonic Hedgehog signaling during vertebrate neural tube patterning: the role of negative feedback. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009; 1(2):a002014.
141. Richards S, Leavesley D, Topping G, Upton Z. Development of defined media for the serum-free expansion of primary keratinocytes and human embryonic stem cells. *Tissue Eng Part C Methods.* 2008;14(3):221-32.
142. Riquelme PA, Drapeau E, Doetsch F. Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2008; 12;363(1489):123-37.
143. Roth EA, Xu T, Das M, Gregory C, Hickman JJ, Boland T. Inkjet printing for high-throughput cell patterning. *Biomaterials.* 2004; 25(17):3707-15.
144. Ruiz A, Valsesia A, Ceccone G, Gilliland D, Colpo P, Rossi F. Fabrication and characterization of plasma processed surfaces with tuned wettability. *Langmuir.* 2007; 18;23(26):12984-9.
145. Ruiz A, Buzanska L, Gilliland D, Rauscher H, Sirghi L, Sobanski T, Zychowicz M, Ceriotti L, Bretagnol F, Coecke S, Colpo P, Rossi F. Micro-stamped surfaces for the patterned growth of neural stem cells. *Biomaterials.* 2008a;29(36):4766-74.
146. Ruiz A, Buzanska L, Ceriotti L, Bretagnol F, Coecke S, Colpo P, Rossi F. Stem-cell culture on patterned bio-functional surfaces. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2008b;19(12):1649-57.
147. Ruiz A, Zychowicz M, Buzanska L, Mehn D, Mills CA, Martinez E, Coecke S, Samitier J, Colpo P, Rossi F. Single stem cell positioning on polylysine and fibronectin microarrays. *Micro and Nanosystems* 2009; 1: 50-56
148. Sabo J.K., Kilpatrick T.J., Cate H.S.: Effects of bone morphogenic proteins on neural precursor cells and regulation during central nervous system injury. *Neurosignals*, 2009,17(4), 255-264.
149. Saha K, Pollock JF, Schaffer DV, Healy KE. Designing synthetic materials to control stem cell phenotype. *Curr Opin Chem Biol.* 2007; 11(4):381-7.
150. Sanberg PR, Willing AE, Garbuzova-Davis S, Saporta S, Liu G, Sanberg CD, Bickford PC, Klasko SK, El-Badri NS. Umbilical cord blood-derived stem cells and brain repair. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1049:67-83.
151. 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(1):109-15.
152. Sanchez-Ramos JR. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J Neurosci Res.* 2002; 15;69(6):880-93.
153. Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature.* 2006 Jun 29;441(7097):1075-9.

154. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978; 4(1-2):7-25.
155. Seri B, García-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci*. 2001; 15;21(18):7153-60.
156. Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, Vincent P, Pumiglia K, Temple S. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science*. 2004; 28;304(5675):1338-40.
157. Shi Y, Sun G, Zhao C, Stewart R. Neural stem cell self-renewal. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008; 65(1):43-53.
158. Silva A, Pereira J, Oliveira CR, Relvas JB, Rego AC. BDNF and extracellular matrix regulate differentiation of mice neurosphere-derived cells into a GABAergic neuronal phenotype. *J Neurosci Res*. 2009; 87(9):1986-96.
159. Solanki A, Shah S, Memoli KA, Park SY, Hong S, Lee KB. Controlling differentiation of neural stem cells using extracellular matrix protein patterns. *Small*. 2010; 22;6(22):2509-13.
160. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature*. 2001; 1;414(6859):98-104.
161. Stabenfeldt E, Ashley Carson Brown and Thomas H. Barker Engineering ECM Complexity into Biomaterials for Directing Cell Fate *Stud Mechanobiol Tissue Eng Biomater* (2010) 2: 1 18
162. Stachowiak EK, Fang X, Myers J, Dunham S, Stachowiak MK. cAMP-induced differentiation of human neuronal progenitor cells is mediated by nuclear fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR1). *J Neurochem*. 2003; 84(6):1296-312.
163. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*. 2008; 7;322(5903):945-9.
164. Sun,W., Buzanska, L., Domanska-Janik, K., Salvi, R.J., Stachowiak,M.K. Voltage sensitive and ligandgated channels in differentiating neural stem-like cells derived from the nonhematopoietic fraction of human umbilical cord blood. *Stem Cells* 2005; 23, 931–945.
165. Sypecka J, Dragun-Szymczak P, Zalewska T, Domańska-Janik K. Laminin promotes oligogliogenesis and increases MMPs activity in human neural stem cells of HUCB-NSC line. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2009; 69(1):37-45.
166. Szymczak P, Wojcik-Stanaszek L, Sypecka J, Sokolowska A, Zalewska T. Effect of matrix metalloproteinases inhibition on the proliferation and differentiation of HUCB-NSCs cultured in the presence of adhesive substrates. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2010; 70(4):325-36.
167. Tai Y, Feng S, Du W, Wang Y. Functional roles of TRPC channels in the developing brain. *Pflugers Arch*. 2009; 458(2):283-9.
168. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126, 663–676.
169. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131, 861–872.

170. Tanigaki K, Nogaki F, Takahashi J, Tashiro K, Kurooka H, Honjo T. Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate. *Neuron* 2001; 29(1):45–55.
171. Tate MC, García AJ, Keselowsky BG, Schumm MA, Archer DR, LaPlaca MC. Specific beta1 integrins mediate adhesion, migration, and differentiation of neural progenitors derived from the embryonic striatum. *Mol Cell Neurosci*. 2004; 27(1):22-31.
172. Temple S. The development of neural stem cells. *Nature*. 2001; 1;414(6859):112-7.
173. Traiffort E, Angot E, Ruat M. Sonic Hedgehog signaling in the mammalian brain. *J Neurochem*. 2010; 113(3):576-90.
174. Tsuji Y, Yoshimura N, Aoki H, Sharov AA, Ko MS, Motohashi T, Kunisada T. Maintenance of undifferentiated mouse embryonic stem cells in suspension by the serum- and feeder-free defined culture condition. *Dev Dyn*. 2008; 237(8):2129-38.
175. Tucker ES, Lehtinen MK, Maynard T, Zirlinger M, Dulac C, Rawson N, Pevny L, Lamantia AS. Proliferative and transcriptional identity of distinct classes of neural precursors in the mammalian olfactory epithelium. *Development*. 2010; 1;137(15):2471-81.
176. van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci*. 2000; 1(3):191-8.
177. Varnum-Finney B, Wu L, Yu M, Brashem-Stein C, Staats S, Flowers D, Griffin JD, Bernstein ID. Immobilization of Notch ligand, Delta-1, is required for induction of notch signaling. *J Cell Sci*. 2000; 113 Pt 23:4313-8.
178. Verani R, Cappuccio I, Spinsanti P, Gradini R, Caruso A, Magnotti MC, Motolese M, Nicoletti F, Melchiorri D. Expression of the Wnt inhibitor Dickkopf-1 is required for the induction of neural markers in mouse embryonic stem cells differentiating in response to retinoic acid. *J Neurochem*. 2007; 100(1):242-50.
179. Villavicencio EH, Walterhouse DO, Iannaccone PM. The sonic hedgehog-patched-gli pathway in human development and disease. *Am J Hum Genet*. 2000; 67(5):1047-54.
180. Walker MR, Patel KK, Stappenbeck TS. The stem cell niche. *J Pathol*. 2009; 217(2):169-80.
181. Wang G, Ao Q, Gong K, Wang A, Zheng L, Gong Y, Zhang X. The effect of topology of chitosan biomaterials on the differentiation and proliferation of neural stem cells. *Acta Biomater*. 2010; 6(9):3630-9.
182. Wechsler-Reya RJ, Scott MP. Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron*. 1999; 22(1):103-14.
183. Widera D, Grimm WD, Moebius JM, Mikenberg I, Piechaczek C, Gassmann G, Wolff NA, Thévenod F, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B Highly efficient neural differentiation of human somatic stem cells, isolated by minimally invasive periodontal surgery. *Stem Cells Dev*. 2007; 16(3):447-60.
184. Willert K, Nusse R. Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev*. 1998; 8(1):95-102.
185. Wobus AM, Boheler KR. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev*. 2005; 85(2):635-78.

186. Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämäläinen R, Cowling R, Wang W, Liu P, Gertsenstein M, Kaji K, Sung HK, Nagy A. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2009; 9;458(7239):766-70.
187. Wu SM, Choo AB, Yap MG, Chan KK. Role of Sonic hedgehog signaling and the expression of its components in human embryonic stem cells. *Stem Cell Res*. 2010; 4(1):38-49.
188. Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest*. 2006; 116(5):1195-201.
189. Ying QL, Stavridis M, Griffiths D, Li M, Smith A. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol*. 2003; 21(2):183-6.
190. Yu JM, Kim JH, Song GS, Jung JS. Increase in proliferation and differentiation of neural progenitor cells isolated from postnatal and adult mice brain by Wnt-3a and Wnt-5a. *Mol Cell Biochem*. 2006; 288(1-2):17-28.
191. Xu X, Francis R, Wei CJ, Linask KL, Lo CW. Connexin 43-mediated modulation of polarized cell movement and the directional migration of cardiac neural crest cells. *Development*. 2006; 133(18):3629-39.
192. Yang X, Klein R, Tian X, Cheng HT, Kopan R, Shen J. Notch activation induces apoptosis in neural progenitor cells through a p53-dependent pathway. *Dev Biol*. 2004a; 1;269(1):81-94.
193. Yang EJ, Yoon JH, Min DS, Chung KC. LIM kinase 1 activates cAMP-responsive element-binding protein during the neuronal differentiation of immortalized hippocampal progenitor cells. *J Biol Chem*. 2004b; 5;279(10):8903-10.
194. Yang Q, Mu J, Li Q, Li A, Zeng Z, Yang J, Zhang X, Tang J, Xie P. A simple and efficient method for deriving neurospheres from bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 8;372(4):520-4
195. Yavin E, Yavin Z. Attachment and culture of dissociated cells from rat embryo cerebral hemispheres on polylysine-coated surface. *J Cell Biol*. 1974; 62(2):540-6.
196. Zahs, K. R. Heterotypic coupling between glial cells of themammalian central nervous system. *Glia* 1998; 24, 85–96.
197. Zhang J, Li L. BMP signaling and stem cell regulation. *Dev Biol*. 2005; 1;284(1):1-11.
198. Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Schöler HR, Duan L, Ding S. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*. 2009; 8;4(5):381-4.
199. Zigova T, Song S, Willing AE, Hudson JE, Newman MB, Saporta S, Sanchez-Ramos J, Sanberg PR. Human umbilical cord blood cells express neural antigens after transplantation into the developing rat brain. *Cell Transplant*. 2002; 11(3):265-74.
200. Zychowicz M , Mehn D, Ana Ruiz A, Colpo P, Francois Rossi F, Frontczak-Baniewicz M, Domanska-Janik K and Buzanska L. Proliferation capacity of cord blood derived neural stem cell line on different micro-scale biofunctional domains. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2011; 71(1):12-23.