

mgr Piotr Aleksander Rogujski

Modyfikacje mysich glejowo-specyficznych komórek  
progenitorowych z użyciem neureguliny-1  
w celu zwiększenia ich potencjału regeneracyjnego  
w leczeniu chorób demielinizacyjnych

*Modifications of mice glial-restricted progenitor cells using  
neuregulin-1 to enhance their regenerative potential  
in the treatment of demyelinating diseases*

Rozprawa na stopień naukowy doktora  
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: prof. dr hab. Barbara Łukomska

Promotor pomocniczy: dr inż. Luiza Róża Stanaszek



Postępowanie w sprawie nadania stopnia doktora  
w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa, 2023

*„Albo znajdziemy drogę, albo ją zbudujemy”*

~ Hannibal

*Pracę dedykuję Rodzicom*

*Chciałbym złożyć najszersze wyrazy wdzięczności mojej Promotorce*

*Pani Profesor Dr hab. Barbarze Łukomskiej*

*za umożliwienie mi realizacji pracy doktorskiej,  
za wsparcie merytoryczne przy badaniach i przygotowaniu rozprawy,  
a także za wkład w mój rozwój naukowy.*

*Najserdeczniejsze wyrazy podziękowania składam mojej Promotorce Pomocniczej*

*Dr inż. Luizie Stanaszek*

*za umożliwienie mi realizacji niniejszych badań,  
za bezcenne lekcje i inspirujące dyskusje,  
a nade wszystko - za cierpliwość, życzliwość i nieskończony optymizm.*

*Za współpracę naukową i wsparcie merytoryczne przy realizacji badań oraz pisaniu pracy dziękuję*

*Dr Agnieszce Graczyk-Jarzynce*

*(Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN)*

*Dr Agacie Klejman*

*(Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN)*

*Lic. Almirze Ibragimovej*

*(Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego)*

*Dr. hab. inż. Maciejowi Trusiakowi wraz z Członkami Zespołu*

*(Instytut Mikromechaniki i Fotoniki Wydziału Mechatroniki Politechniki Warszawskiej)*

*Dr. Rafałowi Płatkowi*

*(Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej)*

*Dr. Jarosławowi Mazurykowi*

*(Institute of Condensed Matter and Nanosciences, Université catholique de Louvain)*

*Za przemiłą atmosferę w pracy pragnę podziękować*

*Członkom Zakładu Neurobiologii Naprawczej*

*...a za inspirację, motywację i dużo, dużo więcej dziękuję*

*Dr Annie Andrzejewskiej*

*(Department of Diagnostic Radiology and Nuclear Medicine, University of Maryland)*

## Spis treści

Oświadczenie autora .....	8
Wykaz skrótów .....	10
Streszczenie.....	15
Abstract.....	19
Innowacyjność pracy.....	23
1. Wprowadzenie .....	24
1.1. Choroby demielinizacyjne.....	24
1.1.1. Leukodystrofie (LDs) .....	24
1.1.2. Stwardnienie rozsiane (MS) .....	25
1.1.3. Stwardnienie zanikowe boczne (ALS) .....	26
1.1.4. Uszkodzenie mózgu (BI) .....	27
1.1.5. Uraz rdzenia kręgowego (SCI) .....	28
1.2. Charakterystyka glejowo-specyficznych komórek progenitorowych (GRPs) .....	29
1.2.1. Ontogeneza GRPs.....	29
1.2.2. Fenotyp GRPs.....	30
1.2.3. Funkcje GRPs .....	30
1.3. Źródła GRPs.....	31
1.3.1. Komórki zarodkowe .....	31
1.3.2. Tkanki płodu .....	32
1.3.3. Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste .....	33
1.3.4. Reprogramowane komórki somatyczne.....	34
1.3.5. Endogenne komórki macierzyste osobników dorosłych.....	35
1.3.5.1. Neuralne komórki macierzyste .....	35
1.3.5.2. Mezenchymalne komórki macierzyste.....	36
1.4. Eksperymentalne próby wykorzystania GRPs w leczeniu chorób demielinizacyjnych....	37
1.4.1. Zastosowanie GRPs w leczeniu leukodystrofii .....	37
1.4.2. Zastosowanie GRPs w leczeniu stwardnienia rozsianego .....	39
1.4.3. Zastosowanie GRPs w leczeniu stwardnienia zanikowego bocznego .....	39
1.4.4. Zastosowanie GRPs w leczeniu uszkodzeń mózgu .....	41
1.4.5. Zastosowanie GRPs w leczeniu urazów rdzenia kręgowego.....	42
1.5. Neuregulina-1 .....	42
1.5.1. Charakterystyka neureguliny-1.....	42
1.5.2. Udział neureguliny-1 w rozwoju układu nerwowego.....	43
1.5.3. Funkcje neureguliny-1 w regeneracji układu nerwowego .....	45
1.6. Wektory lentiwirusowe w inżynierii genetycznej .....	46

1.6.1. Charakterystyka lentiwirusów .....	46
1.6.2. Powstanie i optymalizacja wektorów lentiwirusowych.....	47
1.6.3. Zastosowanie wektorów lentiwirusowych.....	48
2. Założenia i cel pracy .....	49
3. Materiał badawczy .....	50
3.1. Mysie glejowo-specyficzne komórki progenitorowe (mGRPs) .....	50
3.2. Mysie neurony zwojów korzeni grzbietowych (mDRGs).....	50
4. Metody badań.....	50
4.1. Izolacja mGRPs.....	50
4.2. Selektywna hodowla pierwotna mGRPs .....	51
4.3. Nadekspresja NRG-1 w mGRPs .....	52
4.3.1. Metody wywołania nadekspresji z użyciem lentiwirusowych wektorów ekspresyjnych	52
4.3.1.1. Wektory lentiwirusowe (LVs) .....	52
4.3.1.2. Przygotowanie LVs.....	54
4.3.1.3. Transdukcja mGRPs z użyciem LVs .....	55
4.3.2. Metoda wywołania nadekspresji z użyciem lentiwirusowych cząstek aktywacyjnych	56
4.3.2.1. System lentiwirusowych cząstek aktywacyjnych (LAPs).....	56
4.3.2.2. Transdukcja mGRPs z użyciem LAPs .....	56
4.4. Suplementacja mGRPs egzogenną neuregulina-1 .....	57
4.5. Analiza fenotypowa komórek za pomocą badań immunocytochemicznych.....	57
4.6. Analiza fenotypowa mGRPs z użyciem cytometrii przepływowej .....	59
4.7. Analiza ekspresji genu NRG-1 w mGRPs z zastosowaniem metody RT-qPCR.....	59
4.7.1. Izolacja RNA .....	59
4.7.2. Synteza cDNA .....	60
4.7.3. Reakcja qPCR.....	60
4.7.4. Analiza reakcji qPCR .....	60
4.8. Analiza ekspresji neureguliny-1 w mGRPs przy użyciu metody Western Blot.....	61
4.8.1. Izolacja białka.....	61
4.8.2. Oznaczanie stężenia białka metodą Lowry'ego.....	61
4.8.3. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym.....	61
4.8.4. Elektrotransfer białek na membranę nitrocelulozową .....	61
4.8.5. Immunodetekcja białek.....	62
4.9. Analiza tempa wzrostu mGRPs .....	62
4.10. Analiza zdolności migracyjnych mGRPs <i>in vitro</i> .....	63
4.11. Analiza zdolności mielinizacji mGRPs <i>in vitro</i> .....	64

4.11.1. Izolacja zwojów korzeni grzbietowych myszy .....	64
4.11.2. Izolacja neuronów ze zwojów korzeni grzbietowych myszy (mDRGs).....	64
4.11.3. Selektywna hodowla pierwotna mGRPs.....	65
4.11.4. Współhodowle mGRPs i mDRGs .....	65
4.11.5. Analiza poziomu mielinizacji we współhodowli mGRPs i mDRGs .....	65
4.12. Analiza statystyczna uzyskanych wyników .....	66
5. Wyniki badań.....	66
5.1. Ocena fenotypu natywnych mGRPs.....	66
5.2. Wywołanie nadekspresji NRG-1 w mGRPs z użyciem lentiwirusowych wektorów ekspresyjnych .....	69
5.2.1. Wektor pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry .....	69
5.2.1.1. Optymalizacja protokołu transdukcji mGRPs.....	69
5.2.1.2. Ocena poziomu ekspresji NRG-1 typu I w mGRPs transdukowanych wektorem pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry.....	71
5.2.2. Wektor HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP .....	72
5.2.2.1. Ocena ekspresji białka reporterowego w mGRPs i mGRPs-NRG-1 .....	72
5.2.2.2. Ocena poziomu ekspresji NRG-1 typu I w mGRPs transdukowanych wektorem HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP.....	74
5.2.2.3. Ocena fenotypu mGRPs i mGRPs-NRG-1 .....	74
5.2.2.4. Ocena tempa wzrostu mGRPs i mGRPs-NRG-1 .....	78
5.2.2.5. Ocena zdolności mielinizacyjnych mGRPs i mGRPs-NRG-1 <i>in vitro</i> .....	80
5.3. Nadekspresja NRG-1 z użyciem systemu lentiwirusowych cząstek aktywacyjnych.....	83
5.4. Suplementacja mGRPs egzogenną neuregulina-1 .....	84
5.4.1. Ocena wpływu neureguliny-1 na fenotyp mGRPs .....	84
5.4.2. Ocena wpływu neureguliny-1 na proliferację mGRPs .....	85
5.4.3. Ocena wpływu neureguliny-1 na zdolności mielinizacyjne mGRPs .....	86
5.4.4. Ocena wpływu neureguliny-1 na zdolności migracyjne mGRPs.....	88
6. Dyskusja.....	92
6.1. Optymalizacja warunków izolacji i hodowli mGRPs.....	93
6.2. Wybór neureguliny-1 .....	94
6.3. Wybór wektora lentiwirusowego .....	96
6.4. Optymalizacja procedury transdukcji mGRPs wektorem lentiwirusowym kodującym NRG-1 .....	99
6.5. Charakterystyka mGRPs z nadekspresją NRG-1 .....	100
6.6. Zastosowanie systemu lentiwirusowych cząstek aktywacyjnych w celu wywołania nadekspresji endogennej NRG-1 w mGRPs.....	101
6.7. Charakterystyka mGRPs suplementowanych egzogenną neuregulina-1 .....	102

7. Podsumowanie .....	107
8. Wnioski .....	107
9. Spis piśmiennictwa .....	108

## Oświadczenie autora

I. Osiągnięcia naukowe związane z tematyką zagadnień będących przedmiotem pracy doktorskiej:

### Publikacje

- Majchrzak M, Drela K, Andrzejewska A, Figurska S, **Rogujski P**, Fiedorowicz M, Walczak P, Janowski M, Lukomska B, Stanaszek L: SOD1/Rag2 Mice with Low Copy Number of SOD1 Gene as a New Long-Living Immunodeficient Model of ALS. *Scientific Reports* 2019 Jan 28;9(1):799. doi.org/10.1038/s41598-018-37235-w  
*IF<sub>5-letni</sub>*=4,576
- Stanaszek L, Majchrzak M, Drela K, **Rogujski P**, Sanford J, Fiedorowicz M, Gewartowska M, Frontczak-Baniewicz M, Walczak P, Lukomska B, Janowski M: Myelin-Independent Therapeutic Potential of canine glial restricted progenitors transplanted in mouse model of dysmyelinating disease. *Cells* 2021;10(11):2968. doi.org/10.3390/cells10112968  
*IF<sub>5-letni</sub>*=7,677
- Stanaszek L, **Rogujski P**, Drela K, Fiedorowicz M, Walczak P, Lukomska B, Janowski M: Transplantation of human glial progenitors to immunodeficient neonatal mice with amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxidants* 2022;11:1050. doi.org/10.3390/antiox11061050  
*IF<sub>5-letni</sub>*=7,886
- Mirecki B, Rogalski M, Arcab P, **Rogujski P**, Stanaszek L, Jozwik M, Trusiak M. Low-intensity illumination for lensless digital holographic microscopy with minimized sample interaction. *Biomedical Optics Express* 2022;13:10. doi.org/10.1364/BOE.464367  
*IF<sub>5-letni</sub>*=3,069
- **Rogujski P**, Fedorowicz M, Gewartowska M, Frontczak-Baniewicz M, Sanford J, Walczak P, Janowski M, Lukomska B, Stanaszek L: Multisite injections of canine glial-restricted progenitors promote brain myelination and extend survival of dysmyelinated mice. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2023 (po recenzjach)  
*IF<sub>5-letni</sub>*=6,178
- **Rogujski P**, Lukomska B, Janowski M, Stanaszek L: Glial-restricted progenitors: a cure for diseased brain. *Biological Research* 2023 (w recenzjach)  
*IF<sub>5-letni</sub>*=6,700

### Komunikaty zjazdowe

- **Rogujski P**, Lukomska B, Stanaszek L: Overexpression of neuregulin-1 in glial restricted progenitors (GRPs) – an approach to increase the functional properties of GRPs. *Neuronus; Kraków, Polska. 8-11.12.2020 (prezentacja ustna)*
- **Rogujski P**, Graczyk-Jarzynka A, Ibragimova A, Lukomska B, Stanaszek L: Characterization of glial-restricted progenitors transduced with lentiviral vectors overexpressing neuregulin-1. *International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function; Glasgow, Szkocja. 29.05-01.06.2022 (prezentacja ustna)*
- Stanaszek L, **Rogujski P**, Graczyk-Jarzynka A, Lukomska B: Overexpression of neuregulin-1 as an approach to increase the therapeutic potential of glial restricted progenitors (GRPs). *Society for Image Guided Neurointerventions Meeting (SIGN); Warwick, Wielka Brytania. 22-23.08.2022 (plakat)*



II. Badania, których wyniki przedstawiono w niniejszej rozprawie doktorskiej były finansowane w ramach projektów naukowo-badawczych:

- Projekt NCBiR pt. „Zastosowanie progenitorów glejowych w leczeniu stwardnienia zanikowego bocznego” (2015-2019) w ramach “STRATEGMED II” nr 233209/12/NCBR/2015
- Projekt NCN pt. „Nadekspresja neureguliny-1 w progenitorach gleju (GRPs), jako metoda zwiększenia właściwości funkcjonalnych GRPs” (2018-2023) w ramach grantu „SONATA” nr 00721/NZ3/D/26/2017
- Projekt realizowany w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020 współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego pt. „Próby zwiększania właściwości terapeutycznych glejowo-specyficznych komórek progenitorowych (GRPs) w eksperymentalnych terapiach chorób demielinizacyjnych” (2018-2023) nr POWER.03.02.00-00-I028/17-00
- Projekt realizowany w ramach Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014-2020 finansowanego w ramach projektu „Wsparcie zarządzania badaniami naukowymi i komercjalizacja wyników prac B+R w jednostkach naukowych i przedsiębiorstwach” pt. „Metoda izolowania rdzenia kręgowego gryzoni” (2022-2023) finansowany z programu Inkubator Przedsiębiorczości 4.0 realizowanego przez Centrum Transferu Wiedzy i Technologii Politechniki Gdańskiej nr CTWT/314/2022

## Wykaz skrótów

AAV	wirus związany z adenowirusami (ang. <i>adeno-associated virus</i> )
ANOVA	analiza wariancji (ang. <i>analysis of variance</i> )
ApoB	apolipoproteina B
AD	choroba Alzheimera (ang. <i>Alzheimer's disease</i> )
AIDS	zespół nabytego niedoboru odporności (ang. <i>acquired immunodeficiency syndrome</i> )
ALS	stwardnienie zanikowe boczne (ang. <i>amyotrophic lateral sclerosis</i> )
APC	komórka prezentująca antygen (ang. <i>antigen-presenting cell</i> )
ARSA	arylosulfataza A (ang. <i>arylsulfatase A</i> )
BBB	bariera krew-mózg (ang. <i>blood-brain barrier</i> )
BDNF	czynnik troficzny pochodzenia mózgowego (ang. <i>brain-derived neurotrophic factor</i> )
bFGF	zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. <i>basic fibroblast growth factor</i> )
BMP	białko morfogenetyczne kości (ang. <i>bone morphogenetic protein</i> )
BSA	albumina surowicy bydłowej (ang. <i>bovine serum albumin</i> )
CAR	chimeryczny receptor antygenowy (ang. <i>chimeric antigen receptor</i> )
Cas	białko związane z CRISPR (ang. <i>CRISPR-associated protein</i> )
CCI	kontrolowany uraz kory mózgowej (ang. <i>controlled cortical impact</i> )
CD	antygen różnicowania komórkowego (ang. <i>cluster of differentiation</i> )
cGRPs	psie glejowo-specyficzne komórki progenitorowe (ang. <i>canine glial-restricted progenitor cells</i> )
CM	pożywka kondycjonowana (ang. <i>conditioned medium</i> )
CNS	ośrodkowy układ nerwowy (ang. <i>central nervous system</i> )
copGFP	białko zielonej fluorescencji z widłonoga (ang. <i>copepod green fluorescent protein</i> )
CRD	domena bogata w cysteinę (ang. <i>cysteine-rich domain</i> )
CRISPR	zgrupowane, regularnie rozproszone, krótkie, powtarzające się sekwencje palindromiczne (ang. <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> )
CsA	cyklosporyna A (ang. <i>cyclosporine A</i> )
CSPG4	proteoglikan siarczanu chondroityny typu 4 (ang. <i>chondroitin sulfate proteoglycan type 4</i> )
DAPI	4',6-diamidyno-2-fenylindol
EAE	eksperymentalne autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego (ang. <i>experimental autoimmune encephalomyelitis</i> )

EB	kula zarodkowa (ang. <i>embryoid body</i> )
EGF	naskórkowy czynnik wzrostu (ang. <i>epidermal growth factor</i> )
ESC	zarodkowa komórka macierzysta (ang. <i>embryonic stem cell</i> )
Fab	region wiążący antygen (ang. <i>fragment, antigen-binding</i> )
FACS	sortowanie komórek aktywowane fluorescencją (ang. <i>fluorescence-activated cell sorting</i> )
FBS	płodowa surowica bydlęca (ang. <i>fetal bovine serum</i> )
FGF	czynnik wzrostu fibroblastów (ang. <i>fibroblast growth factor</i> )
GALC	galaktocerebrozyd (ang. <i>galactocerebroside</i> )
GDNF	czynnik neurotroficzny pochodzenia glejowego (ang. <i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i> )
GFAP	kwaśne białko włóknkowe gleju (ang. <i>glial fibrillary acidic protein</i> )
GFP	białko zielonej fluorescencji (ang. <i>green fluorescent protein</i> )
GLT1	transporter glutaminianu 1 (ang. <i>glutamate transporter 1</i> )
GPC	komórka progenitorowa gleju (ang. <i>glial progenitor cell</i> )
GRPs	glejowo-specyficzne komórki progenitorowe (ang. <i>glial-restricted progenitor cells</i> )
hADSC	ludzka komórka macierzysta izolowana z tłuszczu (ang. <i>human adipose-derived stem cell</i> )
HD	choroba Huntingtona (ang. <i>Huntington's disease</i> )
HEK	linia ludzkich zarodkowych komórek nerki (ang. <i>human embryonic kidney</i> )
hESC	ludzka zarodkowa komórka macierzysta (ang. <i>human embryonic stem cell</i> )
HFFs	ludzkie fibroblasty z napletka (ang. <i>human foreskin fibroblasts</i> )
hGRPs	ludzkie glejowo-specyficzne komórki progenitorowe (ang. <i>human glial-restricted progenitors</i> )
hiPSCs	ludzkie indukowalne komórki pluripotencjalne (ang. <i>human induced pluripotent stem cells</i> )
HIF-1 $\alpha$	czynnik 1 $\alpha$ indukowany hipoksją (ang. <i>hypoxia-inducible factor 1<math>\alpha</math></i> )
hOPCs	ludzkie komórki progenitorowe oligodendrocytów (ang. <i>human oligodendrocyte progenitor cells</i> )
HSPG	proteoglikan siarczanu heparanu (ang. <i>heparan sulfate proteoglycan</i> )
Ig	immunoglobulina
IGF	insulinopodobny czynnik wzrostu (ang. <i>insulin growth factor</i> )
IL	interleukina (ang. <i>interleukin</i> )

iPSCs	indukowane komórki pluripotencjalne (ang. <i>induced pluripotent stem cells</i> )
IRES	wewnętrzne miejsce wiązania rybosomu (ang. <i>Internal Ribosome Entry Site</i> )
KD	choroba Krabbego (ang. <i>Krabbe disease</i> )
LAM	laminina
LAPs	lentiwirusowe cząstki aktywacyjne (ang. <i>lentiviral activation particles</i> )
LDL	lipoproteina o niskiej gęstości (ang. <i>low-density lipoprotein</i> )
LDHM	cyfrowa holograficzna mikroskopia bezsoczewkowa (ang. <i>lensless digital holographic microscopy</i> )
LTRs	długie powtarzające się sekwencje końcowe (ang. <i>long terminal repeats</i> )
LV	wektor lentiwirusowy (ang. <i>lentiviral vector</i> )
MBP	zasadowe białko mieliny (ang. <i>myelin basic protein</i> )
MCAO	zamknięcie tętnicy środkowej mózgu (ang. <i>middle cerebral artery occlusion</i> )
mDRGs	mysie neurony zwoju korzenia grzbietowego (ang. <i>mouse dorsal root ganglion neurons</i> )
MEFs	mysie zarodkowe fibroblasty (ang. <i>mouse embryonic fibroblasts</i> )
mGRPs	mysie glejowo-specyficzne komórki progenitorowe (ang. <i>mouse glial-restricted progenitors</i> )
MHC	główny kompleks zgodności tkankowej (ang. <i>major histocompatibility complex</i> )
MHV	mysi wirus zapalenia wątroby (ang. <i>mouse hepatitis virus</i> )
MLD	leukodystrofia metachromatyczna (ang. <i>metachromatic leukodystrophy</i> )
MNs	motoneurony (ang. <i>motor neurons</i> )
MOG	glikoproteina mieliny oligodendrocytów (ang. <i>myelin oligodendrocyte glycoprotein</i> )
mOPCs	mysie komórki progenitorowe oligodendrocytów (ang. <i>mouse oligodendrocyte progenitor cells</i> )
MRF	czynnik regulatorowy mieliny (ang. <i>myelin regulatory factor</i> )
MRI	obrazowanie w rezonansie magnetycznym (ang. <i>magnetic resonance imaging</i> )
MS	stwardnienie rozsiane (ang. <i>multiple sclerosis</i> )
MSCs	mezenchymalne komórki macierzyste (ang. <i>mesenchymal stem cells</i> )
NAC	N-acetylocysteina (ang. <i>N-acetyl cysteine</i> )
NCCs	komórki grzebienia nerwowego (ang. <i>neural crest cells</i> )
NG2	neuralno/glejowy antygen 4 (ang. <i>neural/glial antigen 2</i> )
NGF	czynnik wzrostu nerwów (ang. <i>nerve growth factor</i> )

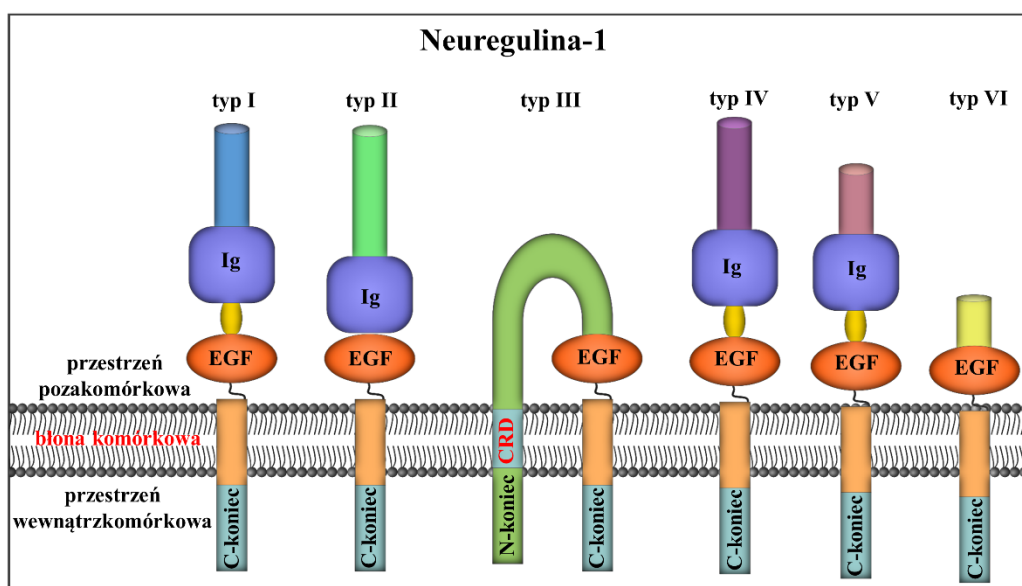
NPCs	neuralne komórki progenitorowe (ang. <i>neural progenitor cells</i> )
NSCs	neuralne komórki macierzyste (ang. <i>neural stem cells</i> )
nTBI	nieurazowe uszkodzenie mózgu (ang. <i>non-traumatic brain injury</i> )
NT3	neurotrofina 3 (ang. <i>neurotrophin-3</i> )
O4	marker O4 oligodendrocytów (ang. <i>oligodendrocyte marker O4</i> )
OE	nabłonek węchowy (ang. <i>olfactory epithelium</i> )
OMIM	baza danych on-line chorób uwarunkowanych genetycznie występujących u człowieka (ang. <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> )
OPCs	komórki progenitorowe oligodendrocytów (ang. <i>oligodendrocyte progenitor cells</i> )
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
PAMAM	dendrymer hydroksylopoliamidoaminowy (ang. <i>hydroxyl polyamidoamine dendrimer</i> )
PBS	buforowana fosforanem sól fizjologiczna (ang. <i>phosphate buffered saline</i> )
PDGF $\alpha$	płytkowy czynnik wzrostu $\alpha$ (ang. <i>platelet-derived growth factor <math>\alpha</math></i> )
PDGFR $\alpha$	receptor płytkowego czynnika wzrostu $\alpha$ (ang. <i>platelet-derived growth factor receptor <math>\alpha</math></i> )
PEI	polietylenoimina
PFA	paraformaldehyd
PLL	poli-L-lizyna
PLP	białko proteolipidowe mieliny (ang. <i>myelin proteolipid protein</i> )
PMD	choroba Pelizaeusa-Merzbachera (ang. <i>Pelizaeus-Merzbacher disease</i> )
PSA-NCAM	polisialowana neuralna cząsteczka adhezyjna (ang. <i>polysialylated neural cell adhesion molecule</i> )
pz	par zasad
RAG	gen aktywujący rekombinację (ang. <i>recombination-activating gene</i> )
rmNRG-1	mysia rekombinowana neuregulina-1 (ang. <i>recombinant mouse neuregulin-1</i> )
RMS	donosowy strumień migracyjny (ang. <i>rostral migratory stream</i> )
rOPCs	szczurze komórki progenitorowe oligodendrocytów (ang. <i>rat oligodendrocyte progenitor cells</i> )
RT	temperatura pokojowa (ang. <i>room temperature</i> )
RT-qPCR	ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. <i>real time quantitative polymerase chain reaction</i> )
SAM	synergistyczny mediator aktywacji (ang. <i>synergistic activation mediator</i> )

SCI	uraz rdzenia kręgowego (ang. <i>spinal cord injury</i> )
SD	odchylenie standardowe (ang. <i>standard deviation</i> )
SDS	dodecylosiarczan sodu
SGZ	strefa podziarnista (ang. <i>subgranular zone</i> )
Shh	białko sonic hedgehog (ang. <i>sonic hedgehog</i> )
SMA	rdzeniowy zanik mięśni (ang. <i>spinal muscular atrophy</i> )
SOD1	dysmutaza ponadtlenkowa 1 (ang. <i>superoxide dismutase 1</i> )
ssRNA	jednoniciowe RNA (ang. <i>single-stranded RNA</i> )
SVZ	strefa przykomorowa (ang. <i>subventricular zone</i> )
TBI	urazowe uszkodzenie mózgu (ang. <i>traumatic brain injury</i> )
tPA	tkankowy aktywator plazminogenu (ang. <i>tissue plasminogen activator</i> )
TF	czynnik transkrypcyjny (ang. <i>transcription factor</i> )
TH	hormon tarczycy (ang. <i>thyroid hormone</i> )
TNF- $\alpha$	czynnik martwicy nowotworu $\alpha$ (ang. <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> )
TSA	trichostatyna A (ang. <i>Trichostatin A</i> )
VCAM-1	cząstka adhezji komórkowej śródbłonna naczyniowego typu pierwszego (ang. <i>vascular cell adhesion molecule 1</i> )
VEGF	naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (ang. <i>vascular endothelial growth factor</i> )
VLA-4	bardzo późny antygen 4 (ang. <i>very late antigen 4</i> )
VSV	wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (ang. <i>vesicular stomatitis virus</i> )
VWM	leukoencefalopatia z zanikającą istotą białą (ang. <i>leukoencephalopathy with vanishing white matter</i> )
VZ	strefa komorowa (ang. <i>ventricular zone</i> )
WJ	galareta Wharton'a (ang. <i>Wharton's jelly</i> )
WT	typ dziki (ang. <i>wild type</i> )

## Streszczenie

Spśród szeregu schorzeń układu nerwowego, jednym z istotnych problemów klinicznych są choroby demielinizacyjne, charakteryzujące się uszkodzeniem otoczki mielinowej w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym. Do chorób demielinizacyjnych zaliczyć można m.in. leukodystrofie czy stwardnienie rozsiane. Zjawisko demielinizacji związane jest także z wieloma chorobami neurodegeneracyjnymi, takimi jak stwardnienie zanikowe boczne, czy z urazami mózgu i rdzenia kręgowego. Z uwagi na zróżnicowaną etiologię, schorzenia te manifestują się w postaci szeregu objawów neurologicznych, które upośledzają normalne funkcjonowanie pacjentów, stanowiąc jedno z głównych obciążeń współczesnego społeczeństwa. Brak możliwości skutecznego leczenia tych chorób skłania naukowców i klinicystów do poszukiwania nowych metod terapii w celu przywrócenia upośledzonych funkcji mielinizacji neuronów i regeneracji uszkodzonych struktur układu nerwowego. Głejowo-specyficzne komórki progenitorowe (GRPs) posiadają cechy wskazujące na ich duży potencjał do zastosowania w terapii regeneracyjnej schorzeń związanych z demielinizacją. Dotychczasowe badania eksperymentalne, podobnie jak wyniki naszych poprzednich badań wykazały, że przeszczepy GRPs w zwierzęcych modelach demielinizacji powodują wytwarzanie mieliny i częściową kompensację deficytów neurologicznych u biorców. Jednak niedostateczna skuteczność terapeutyczna egzogennych progenitorów głejowych zachęca badaczy do poszukiwań nowych możliwości zwiększania potencjału tych komórek w celu spotęgowania ich właściwości regeneracyjnych po podaniu *in vivo*. Jedną ze stosowanych metod są modyfikacje komórek w oparciu o plejotropowe czynniki wzrostu, wśród których, szczególne zainteresowanie wzbudza, kodowana przez gen *Nrg-1*, neuregulina-1.

### Izoformy białkowe neureguliny-1



Najnowsze badania wykazały wpływ neureguliny-1 na rozwój i stabilizację aksonów w obwodowym układzie nerwowym oraz ich mielinizację przez komórki Schwanna, a także zdolność do modulacji odpowiedzi immunologicznej po uszkodzeniach, co sugeruje jej istotne zaangażowanie w proces endogennej regeneracji uszkodzonych struktur nerwowych. Powyższe obserwacje stanowiły podstawę do zaprojektowania badań, będących przedmiotem mojej pracy doktorskiej. Postanowiłem sprawdzić, czy neuregulina-1 (NRG-1) ma wpływ na właściwości funkcjonalne GRPs.

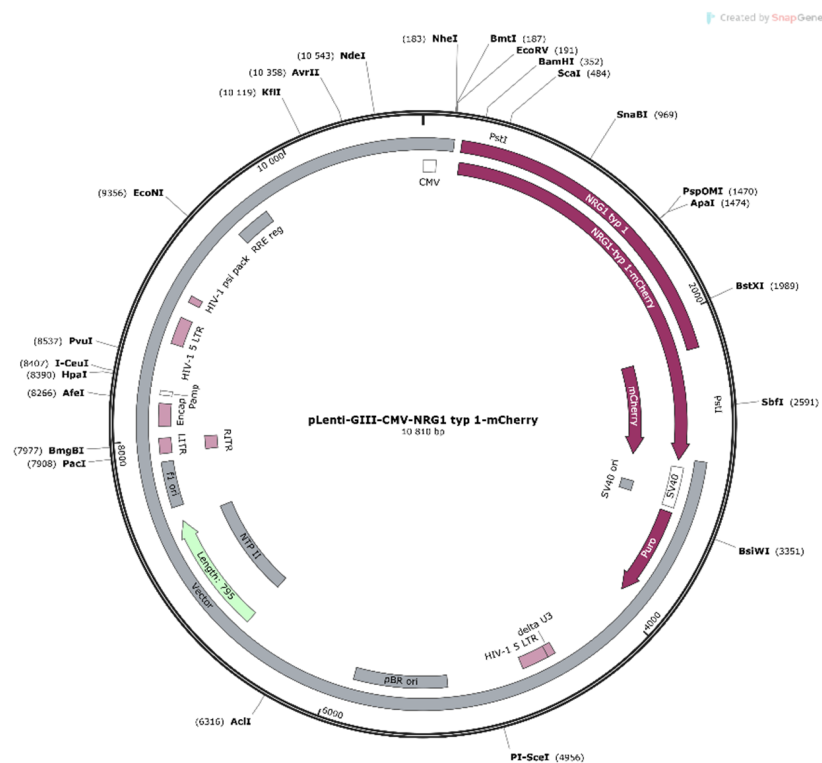
Celem moich badań była weryfikacja hipotezy zakładającej, że nadekspresja neureguliny-1 w glijowo-specyficznych komórkach progenitorowych (GRPs) zmienia ich właściwości funkcjonalne, które mogą być istotne dla zwiększenia potencjału zastosowania GRPs w terapii chorób związanych z demielinizacją.

Przedmiotem prowadzonych przeze mnie badań były GRPs izolowane z tkanki nerwowej płodów myszy (mGRPs). Modyfikacje genetyczne mGRPs w celu wywołania nadekspresji neureguliny-1 typu I (NRG-1 typu I) przeprowadzone zostały poprzez transdukcję komórek wektorami lentiwirusowymi kodującymi NRG-1 typu I. Badania dotyczyły analizy poziomu ekspresji NRG-1 w zmodyfikowanych mGRPs, ich fenotypu, oraz właściwości funkcjonalnych mGRPs-NRG-1 *in vitro*.

I etap badań miał na celu opracowanie metody izolacji i selektywnej hodowli mGRPs. Kolejne eksperymenty stanowiły główny cel moich badań i dotyczyły transdukcji mGRPs w celu wywołania nadekspresji neureguliny-1 przy pomocy wektorów lentiwirusowych.

W II etapie badań zoptymalizowałem protokół transdukcji mGRPs wektorami lentiwirusowymi i przeprowadziłem transdukcję mGRPs wektorem pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry, kodującym NRG-1 typu I w fuzji z fluorescencyjnym białkiem reporterowym mCherry, w celu wywołania w nich konstytutywnej nadekspresji NRG-1 typu I.

Mapa wektora lentiwirusowego pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry



Ocena mGRPs transdukowanych wektorem pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry (NRG-1 typ I) wykazała, że komórki te w kolejnych próbach transdukcji prezentują zróżnicowany poziom syntezy transkryptu dla NRG-1 typu I, a ich dalsza hodowla skutkuje spontanicznym odklejeniem się komórek od powierzchni naczynia hodowlanego i ich śmiercią.

Negatywne wyniki transdukcji mGRPs wektorem pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry skłoniły mnie, aby w kolejnym etapie badań zastosować do transdukcji mGRP wektor HIV-SFFV-NRG-



1 typ I-IRES-mRFP, kodujący sekwencje NRG-1 typu I i fluorescencyjne białko reporterowe mRFP, przedzielone sekwencją IRES (ang. *Internal Ribosome Entry Site*, wewnętrzne miejsce wiązania rybosomu), umożliwiającą ko-ekspresję obydwu sekwencji pod kontrolą transkrypcyjną wspólnego promotora, lecz z niezależnie zachodzącą translacją.

Mapa wektora lentiwirusowego HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP



W kolejnych etapach badań oceniałem fenotyp i właściwości funkcjonalne mGRPs transdukowanych wektorem HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP *in vitro*. Analiza wykazała, że transdukowane mGRPs prezentowały zróżnicowany poziom ekspresji mRNA dla NRG-1 typ I pomiędzy poszczególnymi próbami transdukcji. Analiza fenotypowa komórek wykazała, że w populacji mGRPs transdukowanej tym wektorem występuje mniej progenitorów glejowych, natomiast więcej prekursorów oligodendrocytów (OPCs) i niedojrzałych oligodendrocytów oraz komórek różnicujących o fenotypie pośrednim pomiędzy GRPs a OPCs, w porównaniu do populacji komórek kontrolnych. Z kolei analiza poziomu mielinizacji aksonów przez mGRPs transdukowane wektorem HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP i mGRPs kontrolne nie wykazała pomiędzy nimi istotnych różnic w zdolności do mielinizacji. Identyfikacja białka reporterowego po transdukcjach była problematyczna, z uwagi na specyfikę zastosowanego wektora bicistronowego z sekwencją IRES. Populacja mGRPs transdukowanych HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP cechowała się niskim tempem wzrostu. Uzyskanie za pomocą wektora HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP wystarczającej liczby mGRPs ze stabilną nadekspresją egzogennej NRG-1 typu I do przeprowadzenia dalszych badań okazało się zatem nieosiągalne.

W związku z pogorszeniem się właściwości mGRPs w wyniku konstytutywnej nadekspresji egzogennej kopii genu kodującego NRG-1, w kolejnym etapie badań podjąłem próbę transdukcji mGRPs lentiwirusowymi cząstkami aktywacyjnymi, zaprojektowanymi w celu nadekspresji endogennego genu kodującego NRG-1 (NRG-1-LAPs). Jednak, jednoczesna transdukcja mGRPs trzema wektorami lentiwirusowymi wchodzącymi w skład systemu NRG-1-LAPs, okazała się

nieskuteczna. W związku z tym próba wywołania w mGRPs nadekspresji endogennej NRG-1 poprzez transdukcję komórek lentiwirusowymi cząstkami aktywacyjnymi nie powiodła się.

Wobec niepowodzeń związanych z modyfikacjami genetycznymi mGRPs w kierunku nadekspresji NRG-1, postanowiłem przeprowadzić dodatkowe badania, oparte na stymulacji mGRPs egzogennym rekombinowanym peptydem neuregulina-1 z myszy (rmNRG-1), poprzez suplementację nim standardowej pożywki, w której hodowano komórki. Suplementacja mGRPs peptydem rmNRG-1 miała zróżnicowany wpływ na fenotyp komórek w hodowli *in vitro*. W warunkach hamujących różnicowanie komórek, w hodowli mGRPs suplementowanej rmNRG-1 stwierdziłem obecność progenitorów glejowych i brak dojrzałych oligodendrocytów. W tych samym warunkach okazało się, że rmNRG-1 istotnie zwiększa liczbę komórek proliferujących (Ki67<sup>+</sup>) w hodowli. Natomiast w warunkach stymulujących różnicowanie mGRPs, suplementacja rmNRG-1 zmniejszała poziom ich różnicowania w kierunku mielinizujących oligodendrocytów o fenotypie MBP<sup>+</sup>, a efekt widoczny był zarówno w hodowli samych mGRPs, jak i we współhodowli z neuronami. Wstępne pomiary prędkości migracji komórek zwracają uwagę na potencjalnie niższą średnią prędkość migracji mGRPs suplementowanych peptydem rmNRG-1, w porównaniu do średniej prędkości migracji dla komórek niesuplementowanych. Wyniki powyższych badań wstępnych sugerują, że suplementacja mGRPs peptydem rmNRG-1 zmieniała fenotyp mGRPs zwiększając ich proliferację, ale pogarszała zdolności migracyjne, a efekt mógł być zależny zarówno od stężenia peptydu, jak i od warunków hodowli. Dalsze badania są w toku.

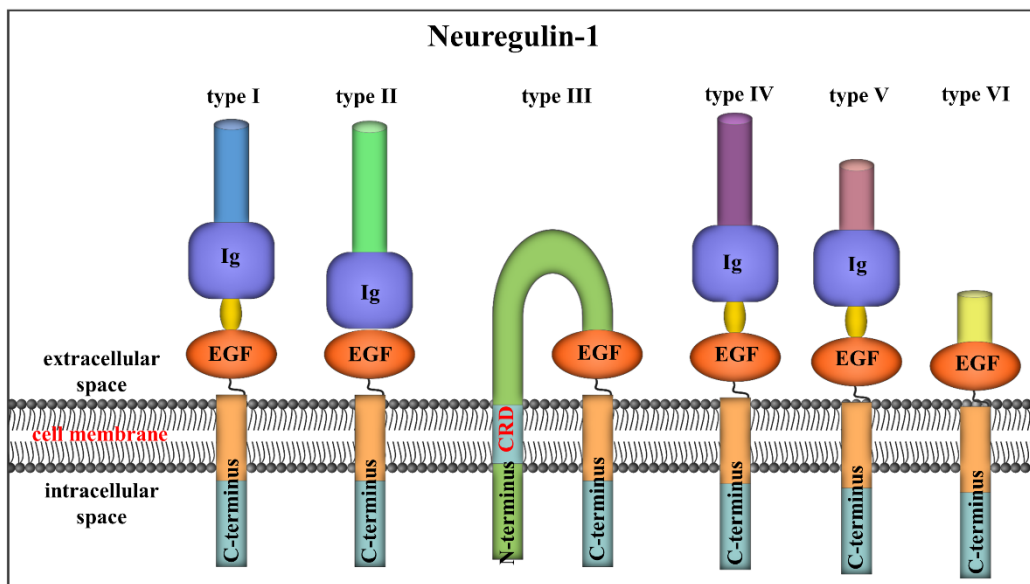
Na podstawie przeprowadzonych badań można sformułować następujące wnioski:

- nadekspresja NRG-1 typu I, wywołana poprzez transdukcję mGRPs wektorami lentiwirusowymi, powoduje spadek tempa wzrostu tych komórek i stymuluje ich różnicowanie w kierunku oligodendrocytów, nie stwierdziłem jednak istotnego wpływu nadekspresji NRG-1 typu I na właściwości mielinizacyjne mGRPs
- moje wstępne badania dotyczące stymulacji mGRPs egzogennym rekombinowanym peptydem neuregulina-1 sugerują zwiększoną proliferację i spowolnienie migracji suplementowanych mGRPs, przy jednoczesnym spadku zdolności tych komórek do różnicowania w dojrzałe oligodendrocyty
- wyniki badań przedstawionych w mojej rozprawie doktorskiej wskazują, że wpływ neureguliny-1 na właściwości funkcjonalne mGRPs jest zależny od zastosowanego układu doświadczalnego.

## Abstract

Among a range of disorders of the nervous system, some of the most significant clinical problems are demyelinating diseases, characterized by damage to the myelin sheath in the central and peripheral nervous system. Demyelinating diseases include leukodystrophies and multiple sclerosis, among others. The phenomenon of demyelination is also associated with various neurodegenerative diseases, such as amyotrophic lateral sclerosis, and with brain and spinal cord injuries. Due to their diverse etiology, these conditions manifest in the form of a series of neurological symptoms that impair the normal functioning of patients, representing a major burden on modern societies. The lack of effective treatment for these diseases has prompted scientists and clinicians to seek new therapeutic methods to restore impaired neuronal myelination and regenerate damaged structures of the nervous system. Glial-restricted progenitor cells (GRPs) demonstrate features indicating their great potential for application in regenerative therapy for demyelination-related disorders. Previous experimental studies, as well as the results of our own previous research, have shown that grafts of GRPs in animal models of demyelination result in myelin production and partial compensation of neurological deficits in recipients. However, the insufficient therapeutic efficacy of exogenous glial progenitors motivates researchers to explore new possibilities for enhancing the potential of these cells to enhance their regenerative properties after *in vivo* administration. One of the methods used is cell modification based on pleiotropic growth factors, among which neuregulin-1, encoded by the *Nrg-1* gene, has sparked particular interest.

*Protein isoforms of neuregulin-1*

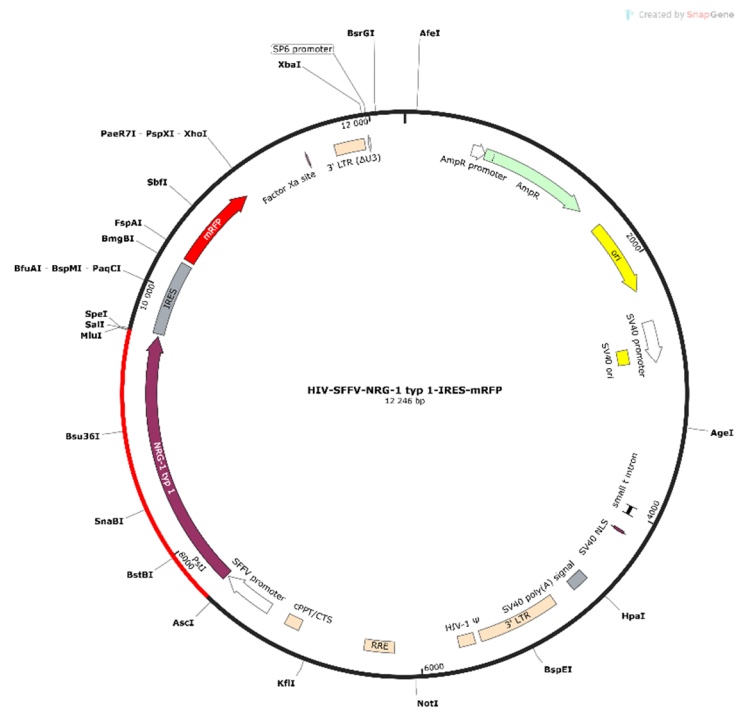


Recent studies have demonstrated the impact of neuregulin-1 on the development and stabilization of axons in the peripheral nervous system, as well as their myelination by Schwann cells. Neuregulin-1 also shows the ability to modulate the immune response following injuries, suggesting its significant involvement in the endogenous regeneration of damaged neural structures. These observations served as the basis for designing the research that formed the focus of my doctoral work.

I aimed to investigate the influence of neuregulin-1 (NRG-1) on the functional properties of glial-restricted progenitor cells (GRPs). The hypothesis I sought to verify was that overexpressing neuregulin-1 in GRPs would alter their functional characteristics, potentially enhancing their application potential in the therapy of demyelination-related diseases.



### Map of HIV-SFFV-NRG-1 type I-IRES-mRFP lentiviral vector



In the subsequent stages of the study, I evaluated the phenotype and functional properties of mGRPs transduced with the HIV-SFFV-NRG-1 type I-IRES-mRFP vector *in vitro*. The analysis revealed that transduced mGRPs exhibited varied levels of NRG-1 type I mRNA expression among different transduction attempts. Phenotypic analysis of the cells showed that the population of mGRPs transduced with this vector was composed of fewer glial progenitors but an increased number of oligodendrocyte precursors (OPCs), immature oligodendrocytes, and differentiating cells with an intermediate phenotype between GRPs and OPCs, compared to the control population. However, the analysis of axon myelination levels by mGRPs transduced with the HIV-SFFV-NRG-1 type I-IRES-mRFP vector and control mGRPs did not show significant differences in their myelination capacity. The identification of the reporter protein after transductions posed challenges due to the specific nature of the bicistronic vector with the IRES sequence. The population of mGRPs transduced with HIV-SFFV-NRG-1 type I-IRES-mRFP exhibited a low growth rate. Consequently, obtaining a sufficient number of mGRPs with stable overexpression of exogenous NRG-1 type I using the HIV-SFFV-NRG-1 type I-IRES-mRFP vector for further investigations proved to be unattainable.

Due to the deterioration of mGRPs' properties resulting from constitutive overexpression of the exogenous NRG-1 gene copy, in the next stage of the study, I attempted to transduce mGRPs with lentiviral activating particles designed to overexpress the endogenous NRG-1 gene (NRG-1-LAPs). However, simultaneous transduction of mGRPs with the three lentiviral vectors comprising the NRG-1-LAPs system proved ineffective. Therefore, the attempt to induce endogenous NRG-1 overexpression in mGRPs through transduction with lentiviral activating particles was unsuccessful.

In light of the setbacks associated with genetic modifications aimed at overexpressing NRG-1 in mGRPs, I decided to conduct additional research based on the stimulation of mGRPs with exogenous recombinant mouse neuregulin-1 peptide (rmNRG-1) through its supplementation in the standard culture medium. Supplementation of mGRPs with rmNRG-1 peptide had a diverse impact on the phenotype of the cells *in vitro*. Under conditions that inhibit cell differentiation, I observed the presence

of glial progenitors and the absence of mature oligodendrocytes in the culture of rmNRG-1-supplemented mGRPs. Under the same conditions, rmNRG-1 was found to significantly increase the number of proliferating cells (Ki67<sup>+</sup>) in the culture. Conversely, under conditions that promote the differentiation of mGRPs, rmNRG-1 supplementation reduced their level of differentiation towards myelinating oligodendrocytes with an MBP<sup>+</sup> phenotype. This effect was observed in both the culture of mGRPs alone and their co-culture with neurons. Preliminary measurements of cell migration velocity indicate a potentially lower average migration velocity of rmNRG-1-supplemented mGRPs compared to non-supplemented cells. The results of these preliminary studies suggest that rmNRG-1 supplementation altered the phenotype of mGRPs by increasing their proliferation but impairing their migratory capacity. This effect may depend on both the concentration of the peptide used and the culture conditions. Further studies are currently underway.

Based on the conducted research, the following conclusions can be drawn:

- overexpression of NRG-1 type I, achieved by transducing mGRPs with lentiviral vectors, resulted in a decrease in the growth rate of these cells and promoted their differentiation towards oligodendrocytes; however, I did not observe a significant impact of NRG-1 type I overexpression on the myelination properties of mGRPs
- my preliminary investigations into the stimulation of mGRPs using exogenous recombinant neuregulin-1 peptide indicate an enhanced proliferation rate and reduced migratory capacity of supplemented mGRPs, accompanied by a diminished capability of these cells to differentiate into mature oligodendrocytes
- the findings presented in my doctoral thesis highlight that the influence of neuregulin-1 on the functional properties of mGRPs is contingent upon the experimental setup.

## Innowacyjność pracy

- Opracowanie metody izolacji i selektywnej hodowli glejowo-specyficznych komórek progenitorowych z tkanki nerwowej płodów myszy (mGRPs)
- Opracowanie techniki i przeprowadzenie modyfikacji genetycznej mGRPs poprzez transdukcję wektorów lentiwirusowych kodujących neuregulinę-1
- Opracowanie metody izolacji i selektywnej hodowli neuronów zwojów korzeni grzbietowych z dorosłych myszy (mDRGs)
- Opracowanie metody współhodowli mGRPs i mDRGs *in vitro*
- Stworzenie modelu badania migracji mGRPs *in vitro* w oparciu o obrazowanie komórek z użyciem cyfrowej holograficznej mikroskopii bezsoczewkowej (LDHM) oraz analizy procesów związanych z migracją komórek

# 1. Wprowadzenie

## 1.1. Choroby demielinizacyjne

Spośród szeregu schorzeń układu nerwowego, jednym z istotnych problemów klinicznych są choroby demielinizacyjne, charakteryzujące się uszkodzeniem otoczki mielinowej w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym. Do chorób demielinizacyjnych zaliczyć można m.in. leukodystrofie czy stwardnienie rozsiane. Zjawisko demielinizacji związane jest także z szeregiem chorób neurodegeneracyjnych, takich jak stwardnienie zanikowe boczne, czy z urazami mózgu i rdzenia kręgowego. Z uwagi na złożoną etiologię, schorzenia te manifestują się w postaci szeregu objawów neurologicznych, które upośledzają normalne funkcjonowanie pacjentów. Stanowią ponadto ogromne wyzwanie ekonomiczne: w przypadku samego stwardnienia rozsianego szacowany roczny koszt opieki nad jednym pacjentem w Europie wynosi ponad €40 000 (Paz-Zulueta i in., 2020). Z uwagi na postępujący rozwój schorzeń demielinizacyjnych choroby często wymagają stałej opieki ze strony bliskich oraz profesjonalnej opieki fizjoterapeutów.

### 1.1.1. Leukodystrofie (LDs)

Leukodystrofie (ang. *leukodystrophies*, LDs) stanowią heterogenną grupę rzadkich, metabolicznych chorób istoty białej mózgu, rdzenia kręgowego, a niekiedy również nerwów obwodowych. Zróżnicowane mutacje genetyczne leżące u podstaw leukodystrofii skutkują nieprawidłowym rozwojem lub degeneracją istniejącej otoczki mielinowej, co przekłada się na wieloraki przebieg choroby. Całkowite rozpowszechnienie chorób ze spektrum leukodystrofii wynosi ok. 1/7 600 osób (Bonkowsky i in., 2010).

W zależności od momentu wystąpienia degeneracji mieliny, leukodystrofia może być traktowana, jako hipomielinizacyjna (ang. *hypomyelinating leukodystrophy*) w przypadku deficytów rozwojowych, lub demielinizacyjna (ang. *demyelinating leukodystrophy*) w przypadku utraty już wykształconej mieliny (Vanderver i in., 2016). Obecnie przyjmuje się, że leukodystrofie obejmują ponad 50 jednostek chorobowych o zróżnicowanej etiologii (Son, Kim i Kim, 2022), a podstawą klasyfikacji są zaburzenia metaboliczne leżące u podstaw danego procesu patologicznego. Do szerzej rozpowszechnionych postaci leukodystrofii należą:

(i) Adrenoleukodystrofia (ALD) (OMIM #300100), związana jest z mutacją w genie ABCD1, skutkującą peroksymalną  $\beta$ -oksydacją długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, w wyniku czego następuje ich agregacja w narządach, m.in. w korze nadnerczy oraz w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). W cięższych postaciach choroby objawy pojawiają się ok. 5-10 roku życia i prowadzą do śmierci w okresie pokwitania.

(ii) Choroba Alexandra (OMIM #203450), spowodowana jest mutacją w genie kodującym kwaśne białko włóknkowe gleju (ang. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP), i charakteryzuje się postępującą agregacją w wypustkach astrocytów złogów białkowych w postaci tzw. włókien Rosenthal'a, która z czasem prowadzi do rozległej degeneracji istoty białej. Diagnozowana jest w okresie niemowlęcym i wczesnym dzieciństwie.

(iii) Choroba Canavan'a (OMIM #271900), zwana leukodystrofią gąbczastą, związana jest z niedoborem enzymu N-acetyloaspartazy spowodowanym mutacją w genie ASPA. Funkcją enzymu jest rozkład kwasu N-acetylo-L-asparaginowego (NAA). Złogi nierozłożonego NAA z czasem tworzą w obrębie OUN agregaty, prowadząc do uszkodzenia osłonek mielinowych. Objawy choroby Canavan'a widoczne są we wczesnym dzieciństwie.



(iv) Choroba Krabbé'go (OMIM #245200), zwana leukodystrofią globoidalną, spowodowana jest mutacją w genie kodującym  $\beta$ -galaktozydazę galaktocerebrozydu (GALC). Nagromadzenie niezmetylizowanych składników mieliny, w tym galaktozylosfingozyny, jest toksyczne dla oligodendrocytów i powoduje postępującą demielinizację. W większości przypadków choroba postępuje szybko, a śmierć następuje przed 2 rokiem życia.

(v) Leukodystrofia metachromatyczna (ang. *metachromatic leukodystrophy*, MLD) (OMIM #250100), określana również, jako sulfatydoza, jest związana z niedoborem aktywności enzymu arylosulfatazy A (ARSA). W efekcie w narządach wewnętrznych i w OUN agregacji ulegają siarczany galaktocerebrozydów, tzw. złogi metachromatyczne (sulfatydy). Zaburzenie metabolizmu sulfatydów upośledza funkcję oligodendrocytów, powodując rozległą demielinizację. MLD jest chorobą o niekorzystnych rokowaniach, dzieci umierają zwykle przed 5 rokiem życia, a w przypadku pacjentów młodocianych do zgonu dochodzi pomiędzy 10 a 20 rokiem życia.

(vi) Choroba Pelizaeusa-Merzbachera (ang. *Pelizaeus-Merzbacher disease*, PMD) (OMIM #312080), powodowana jest przez mutację w genie kodującym białko proteolipidowe mieliny (ang. *myelin proteolipid protein*, PLP), związane z tworzeniem i utrzymaniem struktury mieliny. PMD zaczyna objawiać się w dzieciństwie, ale postęp choroby jest powolny, w wyniku czego chorzy często dożywają wieku średniego.

(vii) Leukoencefalopatia z zanikającą istotą białą (ang. *leukoencephalopathy with vanishing white matter*, VWM), określana również jako dziecięca ataksja z rozlaną hipomielinizacją OUN (ang. *childhood ataxia with central nervous system hypomyelination*) (OMIM #603896), powodowana jest przez mutację w co najmniej 1 z 5 genów kodujących podjednostki czynnika inicjacji translacji EIF2B (EIF2B1, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B4 i/lub EIF2B5). Powoduje to zanik istoty białej, który już w dzieciństwie objawia się skrajną wrażliwością na urazy czaszki i infekcje, powodując zaburzenia świadomości, a nawet śpiączkę. Charakterystycznymi, często występującymi objawami choroby są także zanik nerwu wzrokowego oraz utrata zdolności mowy.

(viii) Choroba Refsuma (RD) (OMIM #266500), związana jest z niedoborem  $\alpha$ -hydroksylazy kwasu fitanowego, co prowadzi do nagromadzenia w tkankach kwasu fitanowego. Złogi kwasu fitanowego są toksyczne dla mieliny, co w przypadku choroby Refsuma często objawia się postępującą neuropatią obwodową. Objawy choroby zaczynają być widoczne są ok. 20 roku życia. RD traktowana jest jako choroba uleczalna, gdyż kwas fitanowy nie jest naturalnie produkowany w organizmie, a zatem korzystne działanie wywiera eliminacja go z diety chorego.

W obrazie klinicznym leukodystrofie mogą powodować zróżnicowane objawy, w tym zaburzenia rozwojowe, utratę zdolności motorycznych, padaczkę miokloniczną, zaburzenia funkcji poznawczych i pamięci. Jeśli śmierć nie nastąpi we wczesnym wieku dziecięcym z czasem u chorych obserwuje się trudności w samodzielnym poruszaniu się, co dramatycznie obniża jakość życia pacjentów (Ammann-Schnell i in., 2021).

### 1.1.2. Stwardnienie rozsiane (MS)

Stwardnienie rozsiane (ang. *multiple sclerosis*, MS) jest chorobą o podłożu autoimmunologicznym, stanowiącą najczęstsze chroniczne schorzenie demielinizacyjne OUN, dotykające ok. 2,8 miliona osób na całym świecie. Większość zachorowań stwierdza się u osób w wieku 20-40 lat, z wyższym odsetkiem wśród kobiet niż wśród mężczyzn (Reich, Lucchinetti i Calabresi, 2018; Walton i in., 2020). Etiologia choroby nie została do końca poznana, sugerowany jest jednak udział w niej komponenty genetycznej, zakaźnej (wirusowej) oraz środowiskowej (Olsson, Barcellos i Alfredsson, 2017).

Mechanizm MS związany jest z obwodową aktywacją autoreaktywnych limfocytów i komórek prezentujących antygen (ang. *antigen-presenting cells*, APCs). Powoduje to produkcję cytokin prozapalnych i powstawanie miejscowych ognisk zapalnych, czemu towarzyszy rozszczelnienie bariery krew-mózg (ang. *blood-brain barrier*, BBB). Dodatkowo następuje rekrutacja innych komórek układu immunologicznego, w tym komórek tucznych, neutrofilów i makrofagów, które migrując do OUN przez rozszczelnioną BBB powodują stopniowe niszczenie otoczki mielinowej i w konsekwencji degenerację aksonów (Chastain, Duncan, Rodgers i Miller, 2011; Riedhammer i Weissert, 2015). Reakcja autoimmunologiczna w przebiegu MS trwa od kilku do kilkunastu dni. Po tym czasie rozpoczyna się proces regeneracji z udziałem endogennych progenitorów glejowych, czemu towarzyszy wydzielanie cytokin przeciwzapalnych i czynników wzrostu. W efekcie dochodzi do częściowej remielinizacji aksonów, jednakże powstająca otoczka mielinowa jest cieńsza, co przekłada się na stopniowe spowalnianie przewodnictwa nerwowego (McTigue i Tripathi, 2008). Zdegenerowane neurony zastępowane są ponadto astrocytami w procesie powstawania tzw. blizny glejowej (Ponath, Park i Pitt, 2018).

Patologiczne zmiany towarzyszące MS przekładają się na postępującą utratę sprawności fizycznej pacjenta. W obrazie klinicznym MS duże znaczenie ma lokalizacja zmian zwyrodnieniowych; najczęściej występującymi objawami są: zaburzenia zmysłów, w szczególności czucia, utrata równowagi i koordynacji ciała, zaburzenia funkcji seksualnych, niedowład, a z czasem deficyty pamięci i zaburzenia poznawcze (Ford, 2020). Utrata komfortu życia i samodzielności często skutkuje także występowaniem u pacjentów z MS stanów depresyjnych (Ruiz-Sánchez i in., 2022).

### 1.1.3. Stwardnienie zanikowe boczne (ALS)

Stwardnienie zanikowe boczne (ang. *amyotrophic lateral sclerosis*, ALS), popularnie zwane chorobą Charcot'a lub chorobą Lou Gehrig'a, jest nieuleczalną, chroniczną chorobą nerwowo-mięśniową. ALS klasyfikowane jest jako choroba rzadka; jej rozpowszechnienie szacuje się na ok. 6 przypadków na 100 000 osób, z roczną zachorowalnością na poziomie 1-2,6 przypadków na 100 000 osób (Talbot, Malek i Lacomis, 2016).

Etiologia ALS nie jest dokładnie znana, wyróżniane są natomiast dwie postaci choroby: (i) rzadsza, uwarunkowana genetycznie postać ALS (ang. *familial amyotrophic lateral sclerosis*, FALS) stanowiąca 5-10% przypadków, związana często z mutacją w genie kodującym SOD1 (dysmutaza nadadtlenkowa 1, ang. *superoxide dismutase 1*) o dziedziczeniu autosomalnym dominującym lub z mutacją w genie C9orf72, znajdującym się na krótkim ramieniu chromosomu 9, w otwartej ramce odczytu 72; (ii) częstsza, spontaniczna postać ALS, stanowiąca 90-95% przypadków (Brown, Lally, Kupelian i Flanders, 2021). W większości przypadków diagnoza ALS następuje pomiędzy 40 a 70 rokiem życia (Talbot, Malek i Lacomis, 2016). Przebieg choroby jest wyjątkowo dramatyczny i zwykle kończy się śmiercią pacjenta w ciągu 2-5 lat od diagnozy (Su i in., 2021).

W przebiegu ALS następuje wybiórcza degeneracja neuronów ruchowych kory ruchowej, pnia mózgu i rogów przednich rdzenia kręgowego. W obrębie samych komórek obserwuje się m.in. tigrolizę (zanik tigroidów w neuronach) i obecność wtrętów, w tym mielinowych, zasadochłonnych i ciałek Buniny (wtręty eozynofilne) (Okamoto, Mizuno i Fujita, 2008). Ponadto, w cytozolu obserwowane są wtręty ubikwitynowane, w skład których wchodzi białko TDP-43, które normalnie występuje w jądrze komórkowym (Smethurst i in., 2016). Akumulacja patologicznych złogów białkowych skutkuje także postępującą degeneracją progenitorów glejowych, w tym bezpośrednich prekursorów oligodendrocytów, a tym samym mielinizujących oligodendrocytów. Powstałe oligodendrocyty mają niższy potencjał mielinizacyjny i nie są zdolne do wspierania funkcji motoneuronów przez wydzielanie mleczanu (Raffaele, Boccazzi i Fumagalli, 2021).

Pierwszymi objawami ALS są spontaniczne skurcze mięśni, w szczególności kończyn i języka, spastyczność mięśniowa i spadek siły mięśniowej. Z czasem mowa pacjenta staje się niewyraźna, pojawiają się problemy z żuciem i połykaniem pokarmu (Chiò, Mora i Lauria, 2017). Postępująca degeneracja motoneuronów prowadzi do zaniku mięśni szkieletowych i mięśnia przepony, co przekłada się na zanik funkcji oddechowych, stanowiący często bezpośrednią przyczynę zgonu pacjenta (Neudert, Oliver, Wasner i Borasio, 2001; de Carvalho, Swash i Pinto, 2019).

#### 1.1.4. Uszkodzenie mózgu (BI)

Uszkodzenia mózgu mogą mieć charakter nieurazowy (ang. *non-traumatic brain injury*, nTBI) lub urazowy (ang. *traumatic brain injury*, TBI). Uszkodzenie nieurazowe związane są z przebiegiem istniejącej choroby lub zaburzeniami w obrębie naczyń krwionośnych zaopatrujących mózg (Kjeldgaard, Soendergaard, Wolffbrandt i Norup, 2023). Zaburzenia krążenia mózgowego mogą wynikać z: i) zamknięcia światła naczynia krwionośnego doprowadzającego krew do mózgu poprzez powstanie zatoru (udar niedokrwienny, ang. *ischemic stroke*); ii) wynaczynienia krwi w obrębie parenchymy mózgu lub w przestrzeni podpajęczynówkowej na skutek przerwania ciągłości naczynia krwionośnego (udar krwotoczny, ang. *hemorrhagic stroke*); iii) całkowitego zatrzymania krążenia wynikającego z nagłego ustania pracy serca (zawał). 87% przypadków udaru mózgu u ludzi ma podłoże niedokrwienne (Benjamin i in., 2018). Sam udar niedokrwienny stanowi dziś globalnie drugą przyczynę śmiertelności i trzecią przyczynę niepełnosprawności (Vos i in., 2020). W wyniku udaru niedokrwiennego dochodzi do niedotleniania obszaru mózgu. Skutkuje to powstaniem martwicy otoczonej strefą półcienia (penumbra), w obrębie, której spowolniony zostaje metabolizm tlenowy, jednak szybka reperfuzja potencjalnie jest w stanie przywrócić homeostazę komórkową. Dwie z dopuszczonych klinicznie metod przywracania przepływu krwi do mózgu w udarach niedokrwiennych mają jednak stosunkowo wąskie okna terapeutyczne. Tromboliza oparta o dożylnie podanie tkankowego aktywatora plazminogenu (ang. *tissue plasminogen activator*, tPA) jest skuteczna w ciągu 3-4,5 godzin od udaru (Bluhmki i in., 2009), natomiast wewnątrznaczyniowa trombektomia mechaniczna do 6 godzin po udarze, choć w przypadku bardzo wąskiej grupy pacjentów także do 24 godzin (Zivelonghi i Tamburin, 2018). Dodatkowo, w przypadku zastosowania tPA stosunkowo często występującym skutkiem ubocznym jest krwotok śródczaszkowy (Maier, Desilles i Mazighi, 2020).

W obrazie klinicznym udar niedokrwienny prowadzi do szeregu objawów neurologicznych, w tym niedowładu nerwu twarzonego oraz kończyn, upośledzenia mowy, zaburzeń zmysłowych, utraty pamięci i świadomości. Skutkiem przeżytego udaru może być niepełnosprawność o różnym stopniu nasilenia związana bezpośrednio z lokalizacją i rozmiarem obszaru mózgu objętego niedotlenieniem, i wahać się od łagodnej (zaburzenia koordynacji ruchowej) do ciężkiej postaci (paraliż ciała) (Kleindorfer i in., 2021).

Z kolei urazowe uszkodzenie mózgu (ang. *traumatic brain injury*, TBI), znane również pod nazwą ciężkiego urazu czaszkowo-mózgowego, określa uszkodzenie mózgu powstałe wskutek działania siły zewnętrznej. Wśród najczęstszych przyczyn urazowego uszkodzenia mózgu uznaje się wypadki komunikacyjne, przemoc fizyczną i upadki. Klasyfikacja TBI może być oparta o lokalizację uszkodzenia (rozproszone/lokalne), mechanizm (otwarty/penetrujący mózgowie lub zamknięty/nie penetrujący), bądź nasilenie (lekkie, średnie lub ciężkie) (Blennow i in., 2016). Szacuje się, iż corocznie na całym świecie średnio 69 milionów osób doświadcza urazowego uszkodzenia mózgu, co stanowi największą liczbę spośród wszystkich występujących urazów (Dewan i in., 2019). Jednocześnie, TBI jest główną przyczyną zgonów i niepełnosprawności wśród osób poniżej 45 roku życia (<https://www.med.upenn.edu/cbir/silentepidemic.html>; stan na dzień 21.04.2023).

Z uwagi na swój natychmiastowy charakter, pierwszym efektem urazowego uszkodzenia mózgu jest z reguły wstrząs (ang. *concussion*) i towarzyszący mu wzrost ciśnienia śródczaszkowego w momencie urazu (Sussman, Pendharkar, Ho i Ghajar, 2018). Od tego momentu TBI manifestuje się w postaci szeregu skutków pierwotnych i wtórnych. Najczęstszym pierwotnym skutkiem TBI jest rozproszone uszkodzenie aksonów (ang. *diffuse axonal injury*), powodujące uszkodzenie istoty białej mózgu na skutek skręcenia, naciągnięcia bądź zerwania aksonów, co przekłada się na zaburzenie lub przerwanie transmisji synaptycznej (Jolly i in., 2021, s. 2). Co ciekawe, urazy mózgu o średnim nasileniu w największym stopniu dotyczą długich, zmielinizowanych aksonów, powodując ich intensywną demielinizację (Mahoney i in., 2022). Kolejnym skutkiem jest przerwanie ciągłości naczyń krwionośnych w mózgu powodujące krwotoki o zróżnicowanej lokalizacji, w tym podpajęczynówkowe i zewnątrzoponowe, skutkujące obrzękiem mózgu. Dalsze pogorszenie stanu pacjenta wynika z wtórnych skutków TBI pojawiających się w ciągu pierwszych godzin i dni, w tym: (i) niekontrolowanej, nadmiernej aktywacji lokalnych komórek układu immunologicznego (mikrogleju) i komórek obwodowych, napływających do mózgu przez przerwana BBB; (ii) ekscytotoksyczności; (iii) atrofii i obumierania neuronów w obszarze urazu mózgu; (iv) utraty krwi obwodowej, często na skutek przerwania ciągłości tkanek przez pęknięte odłamki czaszki, prowadzącej niekiedy do udaru niedokrwiennego (Blennow i in., 2016).

Obraz kliniczny TBI jest zależny od lokalizacji, nasilenia i mechanizmu urazu, i może obejmować szereg objawów, w tym m.in. bóle głowy, epilepsję, utratę wzroku, mdłości, omdlenia i anizokorię. Nade wszystko jednak, TBI może prowadzić do trwałej niepełnosprawności fizycznej, w ogromnym stopniu pogarszającej jakość życia chorych (Blyth i Bazarian, 2010; Kent i in., 2020).

#### 1.1.5. Uraz rdzenia kręgowego (SCI)

Uraz rdzenia kręgowego (ang. *spinal cord injury*, SCI) jest definiowany, jako uszkodzenie rdzenia kręgowego, skutkujące tymczasową lub trwałą utratą jego funkcji. Pod względem etiologii wyróżnia się dwie postaci SCI: (i) traumatyczną (ang. *traumatic SCI*), wynikającą z czynników zewnętrznych, w szczególności kontuzji sportowych i wypadków motoryzacyjnych; oraz (ii) nie traumatyczną (ang. *non-traumatic SCI*), związaną z przebiegiem ostrej lub chronicznej fazy istniejącej już choroby, takiej jak infekcja lub nowotwór (Ahuja i in., 2017). Według statystyk, w krajach rozwiniętych urazy rdzenia kręgowego dotyczą rocznie 10-40 osób na milion, przy czym uwzględnić należy fakt, iż nierzadko okoliczności i natychmiastowy przebieg SCI powodują u pacjentów zgon jeszcze przed dotarciem do szpitala. Z kolei pacjenci pourazowi bardzo często doświadczają trwałej niepełnosprawności, dramatycznie pogarszającej jakość życia (Cadotte i Fehlings, 2011).

Anatomicznie SCI związany jest z przerwaniem i wsteczną degeneracją dróg nerwowych rozpoczynających się w obszarach nadrdzeniowych. Upośledzone zostają także interneurony i motoneurony w obwodach wewnątrzrdzeniowych poniżej miejsca uszkodzenia. Bezpośrednio uszkodzone w trakcie urazu neurony przechodzą w stan atrofii lub stopniowo obumierają. Obserwowany jest również obrzęk aksonów oraz degradacja otoczek mielinowych (Grumbles i Thomas, 2017). Przerwana zostaje ciągłość naczyń krwionośnych, skutkująca m.in. zmniejszonym przepływem i utratą ciśnienia krwi, przerwaniem ciągłości BBB, nadmierną aktywacją komórek układu immunologicznego i ekscytotoksycznością. Skutkuje to aktywnym hamowaniem przez mikrośrodowisko rdzenia jego regeneracji, w tym upośledzonym wzrostem aksonów i procesem ich remielinizacji przez oligodendrocyty (Fan i in., 2018). Ponadto, jeśli przerwana zostaje ciągłość opon rdzenia, w miejscu lezji pojawiają się także komórki opony rdzeniowej, które wraz z fibroblastami i astrocytami uczestniczą w tworzeniu tzw. blizny gлевой, stanowiącej dodatkową, mechaniczną barierę upośledzającą regenerację uszkodzonej tkanki (Pang i in., 2021; Deumens, Koopmans i Joosten, 2005).

Obraz kliniczny SCI jest mocno zróżnicowany, i zależy od poziomu i lokalizacji uszkodzenia rdzenia. Uraz może powodować częściową bądź całkowitą utratę funkcji sensomotorycznych poniżej odcinka uszkodzenia, i tak np. uszkodzenie powyżej odcinka C5 rdzenia skutkuje odnerwieniem przepony, a urazy powyżej odcinka L1 - odnerwieniem mięśni brzucha (Ahuja i in., 2017).

Podsumowując, choroby demielinizacyjne stanowią heterogenną grupę schorzeń neurologicznych związanych z degeneracją osłonki mielinowej aksonów. Choroby te mają dramatyczny przebieg i często prowadzą do trwałej niepełnosprawności fizycznej pacjentów. Brak możliwości skutecznego leczenia tych chorób skłania naukowców i klinicystów do poszukiwania nowych metod terapii w celu przywrócenia upośledzonych funkcji mielinizacji neuronów i regeneracji uszkodzonych struktur układu nerwowego. Jedną z potencjalnych strategii terapeutycznych jest zastosowanie terapii komórkowych, w tym przeszczepów glejowo-specyficznych komórek progenitorowych (GRPs). Dotychczasowe badania eksperymentalne, podobnie jak wyniki naszych poprzednich badań wykazały, że przeszczepy GRPs w zwierzęcych modelach demielinizacji powodują wytwarzanie mieliny i częściową kompensację objawów neurologicznych.

## 1.2. Charakterystyka glejowo-specyficznych komórek progenitorowych (GRPs)

### 1.2.1. Ontogeneza GRPs

W trakcie rozwoju zarodkowego ektodermy, po zakończeniu gastrulacji, powstałe komórki neuroepitelialne zasiedlają przestrzeń wzdłuż neuronów, w obrębie wyściółki komory. Tam generowane są pierwotne neuronalne komórki macierzyste (ang. *primitive NSCs*) (Hitoshi i in., 2004), dające początek neuronom, astrocytom, komórkom gleju radialnego i GRPs. GRPs zaczynają migrować i ostatecznie zasiedlają cały OUN (Schoenwolf i Alvarez, 1989).

Aktualna wiedza na temat ontogenezy ludzkich GRPs (hGRPs) oparta jest w dużej mierze na badaniach prowadzonych u zwierząt, w szczególności gryzoni. U myszy rozwój GRPs odbywa się w trzech etapach, zwanych falami (ang. *waves*). Różnice w przebiegu poszczególnych etapów pomiędzy mózgiem a rdzeniem kręgowym są niewielkie. W mózgu pierwsza fala rozpoczyna się w 12 dniu rozwoju zarodkowego po brzusznej stronie cewy nerwowej i jest kontrolowana przez białko sonic hedgehog (Shh) pochodzące z brzusznej strony blaszki podstawnej (ang. *ventral floor plate*). Shh jest niezbędny do aktywacji ekspresji dwóch czynników transkrypcyjnych specyficznych dla rozwoju GRPs: Olig1 i Olig2 (Vallstedt, Klos i Ericson, 2005). GRPs powstają głównie w obrębie zwoju przyśrodkowego wzgórza (ang. *medial ganglionic eminence*), skąd migrują wzdłuż całego rozwijającego się przodomózgowia. Druga fala rozwoju GRPs rozpoczyna się w 15 dniu rozwoju zarodkowego w zwoju bocznym wzgórza (ang. *lateral ganglionic eminence*) pod kontrolą czynnika transkrypcyjnego Gsx2, i ponownie postępuje wzdłuż przodomózgowia. Z kolei trzecia fala zachodzi na etapie neo- i post-natalnym, i ma swój początek w strefie przykomorowej komór bocznych (ang. *subventricular zone*). Kontrolowana jest ona przez czynnik Emx1, a powstałe GRPs migrują w całym obszarze mózgu, współtworząc populacje GRPs powstałe podczas pierwszej i drugiej fali (Kessarisi i in., 2006).

W przypadku rdzenia kręgowego pierwsza fala rozwoju GRPs jest także kontrolowana przez białko Shh. Druga fala ma swój początek po grzbietowej stronie cewy nerwowej. Na poziomie transkrypcyjnym regulowana jest przez czynniki Ascl1 i Dbx1. Wymaga także zwiększonego stężenia czynnika FGF i zmniejszonego stężenia BMP (Sugimori i in., 2008). Trzecia fala powstawania GRPs w rdzeniu kręgowym zachodzi neo- i post-natalnie. Pochodzenie tych GRPs nie jest jednak do końca poznane. Pochodzić mogą one z progenitorów pozostających w kanale środkowym lub z prekursorów rozproszonych w obrębie parenchymy (Goldman i Kuypers, 2015). Co istotne, GRPs powstałe podczas

pierwszej fali są zbędne i mogą degradować na etapie pourodzeniowym, lub przetrwać i zastępować GRPs powstałe podczas kolejnych fal (Kessaris i in., 2006).

Do dziś wciąż brak jest pełnej wiedzy na temat ontogenezy hGRPs. Wiadomo jednak, iż podczas rozwoju zarodkowego przodomózgowia człowieka GRPs zdolne do różnicowania w oligodendrocyty są wykrywalne w 16-18 tygodniu ciąży (Sim i in., 2011). Po urodzeniu, u człowieka hGRPs można znaleźć w obrębie całego OUN, gdzie stanowią one, według różnych źródeł, około 8-9% komórek całej istoty białej i 2-3% istoty szarej. Czyni je to czwartą, co do wielkości populacją komórek glejowych, po astrocytach, komórkach mikrogleju i oligodendrocytach (Dawson, Polito, Levine i Reynolds, 2003).

### 1.2.2. Fenotyp GRPs

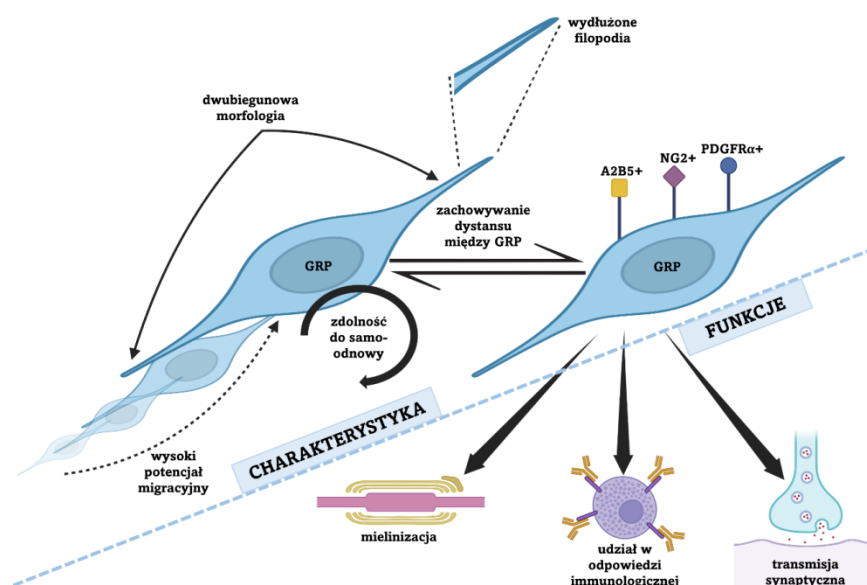
Badania nad rozwojem progenitorów glejowych sięgają lat osiemdziesiątych XX wieku, kiedy Raff i współpracownicy opisali tzw. komórki typu "O-2A" (ang. *oligodendrocyte-type-2-astrocytes*) w nerwie wzrokowym szczura. Komórki te posiadały zdolność różnicowania w astrocyty oraz w oligodendrocyty u szczurów (Raff, Miller i Noble, 1983) oraz, według pewnych źródeł, dodatkowo w neurony u ludzi (Nunes i in., 2003). Cechowała je ponadto dwubiegunowa morfologia oraz wysoka aktywność mitotyczna, a także ekspresja charakterystycznego białka błonowego, neuralno/glejowego antygeny 4 (NG2, ang. *neural/glial antigen 2*), zwanego również proteoglikanem siarczanu chondroityny typu 4 (CSPG4, ang. *chondroitin sulfate proteoglycan type 4*). Co istotne, CSPG4 ulega ekspresji w większości nieneuronalnych komórek w OUN (Raff, Miller i Noble, 1983). Na powierzchni komórek typu "O-2A" stwierdzono także ekspresję gangliozydu powierzchniowego A2B5 (Rao, Noble i Mayer-Pröschel, 1998), do dziś szeroko stosowanego w metodach izolacji GRPs opartych na wiązaniu przez przeciwciała (Wang i in., 2013b). Jednakże ani NG2, ani A2B5 nie ulegają ekspresji wyłącznie na powierzchni GRPs. A2B5 ulega bowiem ekspresji również na powierzchni progenitorów neuronalnych, natomiast NG2 na perycytach (Ozerdem i Stallcup, 2003). Charakterystyczną cechą GRPs jest natomiast ekspresja receptora płytkowego czynnika wzrostu  $\alpha$  (PDGFR $\alpha$ ), znanego również, jako CD140a. PDGFR $\alpha$  jest uważany za jedyny antygen w OUN ulegający ekspresji wyłącznie na powierzchni GRPs. Czyni go to jednym z najbardziej specyficznych celów przy izolacji GRPs (Sim i in., 2011). Dodatkowo, bardziej zróżnicowane GRPs, zwane progenitorami oligodendrocytów (OPCs, ang. *oligodendrocyte progenitor cells*), mogą być identyfikowane także poprzez użycie przeciwciał anti-O4 (Sommer i Schachner, 1981).

W warunkach fizjologicznych GRPs są komórkami o wysokiej aktywności migracyjnej, z tendencją do zachowywania dystansu pomiędzy sobą. Mają wydłużone filopodia, które cofają się po kontakcie z filopodiami tej samej lub sąsiedniej GRP. Dzięki wysokiej aktywności mitotycznej mogą stale odnawiać swoją populację, migrować i zasiedlać uszkodzone obszary układu nerwowego (**Ryc. 1**). Te wyjątkowe cechy pozwalają GRPs na utrzymywanie homeostazy wśród komórek glejowych (Hughes, Kang, Fukaya i Bergles, 2013), a także sugerują ich potencjalne zastosowanie terapeutyczne.

### 1.2.3. Funkcje GRPs

Różnicujące GRPs stanowią podstawowe źródło nowych oligodendrocytów w dorosłym mózgu. Z kolei oligodendrocyty produkują mielinę - otoczkę składającą się głównie z białek i kwasów tłuszczowych. Mielina owija się wokół aksonu i zapewnia izolację elektryczną, przyspieszając przekazywanie sygnałów w układzie nerwowym (Rasband i Macklin, 2012). Utrata osłonki mielinowej jest związana z licznymi chorobami neurodegeneracyjnymi i urazami OUN. Co ciekawe, osłonki mielinowe powstające w wyniku spontanicznej remielinizacji z udziałem endogennych oligodendrocytów są zwykle cieńsze i zapewniają słabsze przewodzenie impulsów nerwowych (Blakemore, 1974; Smith, Bostock i Hall, 1982).

Oprócz zdolności do mielinizacji, oligodendrocyty wspierają również metabolicznie neurony poprzez wydzielanie mleczanu (Lee i in., 2012). Co ciekawe, w pewnych warunkach GRPs mogą generować również komórki Schwanna w OUN. GRP mogą różnicować także w niewielkim stopniu do astrocytów typu 1 i typu 2, przechodząc przez stadium prekursorów astrocytów (Tripathi i in., 2010; Zawadzka i in., 2010). Pewne źródła dowodzą nawet, iż w warunkach *in vitro* oraz po przeszczepie dorosłe GRPs mogą różnicować również w neurony (Nunes i in., 2003; Guo i in., 2010; Rivers i in., 2008), jednak inne temu zaprzeczają (Herrera i in., 2001). Ponadto, GRPs mogą nawiązywać komunikację synaptyczną z neuronami GABAergicznymi i glutamatergicznymi, wpływając na aktywność obwodów neuronalnych (Bergles, Roberts, Somogyi i Jahr, 2000; Lin i Bergles, 2004). Ostatnie badania wykazały, że dzięki ekspresji MHC klasy II GRPs są zdolne do angażowania się w odpowiedź immunologiczną, działając jako komórki prezentujące antygen oraz aktywujące komórki T CD4<sup>+</sup> (Falcão i in., 2018) (**Ryc. 1**).



**Rycina 1.** Charakterystyka i funkcje glejowo-specyficznych komórek progenitorowych (GRPs). Stworzono z użyciem oprogramowania BioRender (<https://www.biorender.com/>)

### 1.3. Źródła GRPs

#### 1.3.1. Komórki zarodkowe

Zarodkowe komórki macierzyste (ESCs) są pluripotencjalnymi komórkami uzyskiwanymi z nieodróżnionego wężła zarodkowego na etapie blastocysty. Ich pluripotencjalny charakter rozumiany jest, jako (i) zdolność do różnicowania w komórki wszystkich trzech listków zarodkowych (ektodermy, mezodermy, endodermy), i (ii) zdolność do nieograniczonej samoodnowy (Martin, 1981). Eksperymenty Brüstle i współpracowników dowiodły, iż *in vitro* GRPs mogą zostać uzyskane bezpośrednio z ludzkich ESCs (hESCs) (**Ryc. 2**). Hodowla hESCs w postaci przestrzennych sfer, określanych jako kule zarodkowe (ang. *embryoid bodies*, EBs), suplementowanych najpierw czynnikiem bFGF, następnie bFGF oraz EGF, a na koniec FGF i PDGF, doprowadziła do powstania GRPs o dwubiegunowej morfologii, z ekspresją A2B5. Natomiast usunięcie z pożywki czynników wzrostu spowodowało zróżnicowanie powstałych GRPs do oligodendrocytów i astrocytów (Brüstle i in., 1999).

Wiele innych prac pokazało także skuteczne otrzymywanie z hESCs ludzkich progenitorów oligodendrocytów (hOPCs), stanowiących bardziej zróżnicowaną formę GRPs, a będących prekursorami oligodendrocytów. W większości prace te oparte były na odtworzeniu, w warunkach eksperymentalnych, poszczególnych etapów rozwoju zarodkowego, w tym także z przejściem ESCs przez stadium GRPs, poprzez stymulację ESCs czynnikami wzrostu i kluczowymi białkami sygnałowymi, w tym Shh, FGF, retinoidem, IGF i TH. W pracy Nistor i wsp., 42-dniowa hodowla hESCs na podłożu typu Matrigel pozwoliła na uzyskanie progenitorów glejowych z ponad 80-procentową wydajnością (Nistor i in., 2005). W innych badaniach do różnicowania hESCs zastosowano warstwę komórek odżywczych (ang. *feeder cell layer*), w tym mysie zarodkowe fibroblasty (MEFs) (Kang i in., 2007; Izrael i in., 2007; Gil i in., 2009; Hu, Du i Zhang, 2009) oraz ludzkie fibroblasty izolowane z napletka (Hu, Li, Zhang i Chen, 2009; Sundberg i in., 2011; Sundberg, Skottman, Suuronen i Narkilahti, 2010). W większości z tych prac progenitory glejowe uzyskiwano między 40 a 90 dniem hodowli, z 80-90-procentową wydajnością. Obecnie, w celu uzyskiwania progenitorów glejowych z ESCs, wykorzystywane są syntetyczne podłoża hodowlane, takie jak biorusztowania witronektynowo-akrylanowe (Li i in., 2013) oraz hodowle 3D z użyciem hydrożeli (Rodrigues i in., 2017).

Jednak, ze stosowaniem hESCs związane są poważne wątpliwości etyczne, gdyż w celu izolacji wymagają one poświęcenia ludzkiego zarodka. Ponadto, po przeszczepie ich nieograniczony potencjał proliferacyjny stwarza ryzyko nowotworzenia. Wreszcie terapia komórkowa z użyciem egzogennych hESC obarczona jest ryzykiem odrzucenia przeszczepu, co wymusza u pacjentów dodatkową immunosupresję (Wert i Mummery, 2003).

### 1.3.2. Tkanki płodu

Pierwszym odkrytym, bezpośrednim źródłem GRPs była hodowla pierwotna komórek z rdzenia kręgowego szczura w wieku 13,5 dnia rozwoju płodowego (**Ryc. 2**). Uzyskana hodowla komórek neuroepitelialnych prowadzona była przez 6 dni, po których, z użyciem techniki *immunopanning* i przeciwciała monoklonalnego anti-A2B5, wyselekcjonowano z niej komórki wykazujące na powierzchni ekspresję antygenu A2B5. Oczyszczone komórki cechowała ponad 90-procentowa żywotność oraz zdolność do różnicowania zarówno w oligodendrocyty, jak i w astrocyty (Rao, Noble i Mayer-Pröschel, 1998), co potwierdziło, iż posiadają fenotyp GRPs. Dalsze badania umożliwiły uzyskanie GRPs także z ludzkiej tkanki nerwowej. W tym celu wykorzystano technikę sortowania komórek aktywowanego fluorescencją (FACS, ang. *fluorescence-activated cell sorting*) w oparciu o aktywność promotora genu CNP2, co pozwoliło na wyselekcjonowanie niewielkiej (< 0.5%) populacji hGRPs o dwubiegunowej morfologii (Roy i in., 1999, s. 19). Do dziś wiele badań wskazało na możliwość skutecznego uzyskiwania hGRPs z ludzkiej tkanki nerwowej płodu (Lepore i in., 2011, s. 20; Walczak i in., 2011; Windrem i in., 2004, 2008). Z kolei badania Nunes i wsp. wskazały na możliwość uzyskania GRPs o szerszym potencjale do różnicowania nie tylko w oligodendrocyty i astrocyty, ale również w neurony (Nunes i in., 2003), jednak kwestia ta wzbudza wątpliwości (Herrera i in., 2001).

Aby zwiększyć specyficzność izolacji hGRPs z heterogennej puli komórek z płodu, obok selekcji względem antygenu A2B5 wykorzystano także dodatkowy czynnik selekcyjny - obecność antygenu CD140a (Sim i in., 2011). Jednakże komórki wyselekcjonowane w ten sposób cechował pewien poziom heterogenności (Marques i in., 2016). Pod względem ekspresji poszczególnych markerów wyszczególniono trzy podgrupy GRPs izolowane z tkanki nerwowej płodu: I. A2B5<sup>+</sup>, O4<sup>-</sup>, MOG<sup>-</sup>; II. A2B5<sup>+</sup>, O4<sup>+</sup>, MOG<sup>-</sup>; III. A2B5<sup>-</sup>, O4<sup>+</sup>, MOG<sup>-</sup>. Z kolei wśród trzech podgrup hGRPs pochodzących z tkanki nerwowej osobnika dorosłego wyróżniono następujący profil ekspresji markerów: I. A2B5<sup>+</sup>, O4<sup>-</sup>, MOG<sup>-</sup>; II. A2B5<sup>-</sup>, O4<sup>+</sup> (o wyższym poziomie ekspresji niż w przypadku tkanki płodu), MOG<sup>-</sup>; III. A2B5<sup>+</sup>, O4<sup>+</sup> (o wyższym poziomie ekspresji niż w przypadku tkanki płodu), MOG<sup>+</sup>



(Leong i in., 2014). Ponadto, ze względu na swoje pochodzenie tkanka nerwowa płodu nie jest optymalnym źródłem hGRPs z uwagi na wątpliwości etyczne związane z jej izolacją oraz wykorzystaniem. Jednocześnie hGRPs z tkanki nerwowej żywego osobnika dorosłego można uzyskać wyłącznie na drodze resekcji neurochirurgicznej, która jest procedurą inwazyjną i obciążoną dużym ryzykiem.

### 1.3.3. Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste

Indukowalne komórki pluripotencjalne (iPSCs, ang. *induced pluripotent stem cells*) stanowią relatywnie nowe źródło komórek wykazujących cechy ESCs. Technologia generowania iPSCs zaproponowana została w 2006 roku przez Yamanakę i Takahashiego (Takahashi i in., 2007; Takahashi i Yamanaka, 2006), i otworzyła nowy rozdział w badaniach nad komórkami macierzystymi. W swojej pracy badacze zastosowali zdefiniowany „koktajl” czterech czynników transkrypcyjnych (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc), który dostarczony został do dojrzałych komórek somatycznych (fibroblastów) za pomocą oddzielnych wektorów wirusowych. Doprowadził on do swoistego przeprogramowania komórek, skutkującego uzyskaniem przez nie pluripotencji. Otrzymane komórki cechowała: i. zdolność do odbudowy telomerów wynikająca z wysokiej aktywności telomerazy, ii. zdolność do formowania potworniaków po przeszczepie do zwierzęcia, iii. utrzymywanie stanu niezróżnicowanego przy odpowiednich warunkach hodowli *in vitro*, oraz iv. zdolność do różnicowania w komórki wszystkich trzech listków zarodkowych (ektodermy, mezodermy, endodermy). Niezwykle istotnym jest przy tym fakt, iż w przeciwieństwie do ESCs, wykorzystanie technologii iPSCs nie stwarza problemów natury etycznej, gdyż opiera się ona zastosowaniu dorosłych komórek somatycznych. Ponadto, możliwość uzyskania iPSCs z komórek własnych pacjenta pozwala na wykonywanie przeszczepów autologicznych, ograniczając ryzyko odrzucenia przeszczepu.

Dotychczas iPSCs udało się skutecznie zróżnicować do wielu rodzajów komórek z linii neuralnej, w tym neuronów (Wernig i in., 2008), astrocytów (Krencik i in., 2011, s. 20), komórek mikrogleju (Muffat i in., 2016, s. 2) i oligodendrocytów (Hu, Du i Zhang, 2009). Z kolei w roku 2013 zespół Goldman'a jako pierwszy skutecznie zróżnicował iPSCs do progenitorów glejowych (**Ryc. 2**). Zastosowany protokół oparty był najpierw (i) na stymulacji czynnikiem FGF i retinoidami, następnie (ii) Shh, a na koniec (iii) PDGF, IGF i TH. W hodowli iPSC najpierw zaobserwowano pojawianie się EBs, a następnie komórek o charakterze neuroepitelialnym, które po odklejeniu hodowano w postaci zawiesiny, z której stopniowo odróżnicowały progenitory glejowe zdolne do różnicowania w astrocyty i oligodendrocyty zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Jak widać, pełne zróżnicowanie iPSCs do komórek somatycznych wymaga zatem odtworzenia przez komórkę głównych stadiów rozwoju, co przekłada się na względnie długi czas hodowli (110 dni w przypadku progenitorów glejowych). Co ciekawe jednak, w dniu 150 wydajność różnicowania iPSCs wynosiła  $79,5 \pm 8,5\%$ , w porównaniu do  $45,4 \pm 20,3\%$  w przypadku różnicowania ESCs (Wang i in., 2013c). W kolejnych badaniach Douvaras'a i Fossati'ego zoptymalizowano protokół różnicowania ESCs do progenitorów glejowych stosując Matrigel, intensywniejszą suplementację retinoidami oraz krótszy czas suplementacji Shh. Pozwoliło to na wygenerowanie pierwszych progenitorów glejowych w czasie ok. 50 dni z ok. 43-procentową wydajnością w dniu 75 (Douvaras i Fossati, 2015). Z kolei zespół Chen'a wykorzystał do różnicowania iPSCs w progenitory glejowe koktajl czynników transkrypcyjnych Sox10 i Olig2, dostarczonych poprzez transdukcję wektorami wirusowymi. Ok. 45% komórek zaczęło demonstrować ekspresję PDGFR $\alpha$  po 14 dniach, a w dniu 56 zaobserwowano komórki z ekspresją markera O4, zidentyfikowane, jako OPCs. Wreszcie hodowla jednowarstwowa iPSCs bez stosowania warstwy komórek odżywczych, suplementowana FGF2, PDGF-AA i Shh pozwoliła na uzyskanie progenitorów glejowych ok. 85 dnia hodowli (Yamashita i in., 2017).

Technologia i różnicowanie iPSCs stanowi bardzo obiecujący system do modelowania chorób i generowania autologicznych komórek terapeutycznych. Jednakże stwarza ona pewne zagrożenia. Przykładowo, jeśli nie w pełni zróżnicowana iPSC zostanie przeszczepiona wraz ze zróżnicowaną pulą komórek terapeutycznych, w organizmie pacjenta może dojść do nowotworzenia (Medvedev, Shevchenko i Zakian, 2010; Okita, Ichisaka i Yamanaka, 2007, s. 200). Ponadto, pewne źródła dowodzą, iż iPSCs zachowują, w pewnym stopniu, pamięć epigenetyczną pierwotnej somatycznej komórki użytej do jej uzyskania, co może wpływać np. na zdolność do różnicowania iPSCs w komórki innych listków zarodkowych (Kim i in., 2010; Laurent i in., 2011; Vaskova, Stekleneva, Medvedev i Zakian, 2013).

#### 1.3.4. Reprogramowane komórki somatyczne

Ryzyka związane z technologią iPSCs zainspirowały wielu badaczy do podjęcia prób przeprogramowania jednego typu komórek somatycznych w inne, bez przechodzenia przez stadium pluripotencji. Wykorzystanie oryginalnej metodyki z prac Yamanaki, a więc reprogramowanie fibroblastów poprzez egzogenny koktajl czynników transkrypcyjnych, pozwoliło na bezpośrednie uzyskanie m.in. neuronów (Caiazzo i in., 2011; Vierbuchen i in., 2010), astrocytów (Caiazzo i in., 2015), czy prekursorów neuralnych (Lujan i in., 2012; Thier i in., 2012). Z kolei w 2013 roku, dwa niezależne zespoły przeprogramowały fibroblasty do prekursorów glejowych techniką reprogramowania bezpośredniego, wykorzystując wektory wirusowe jako nośniki czynników transkrypcyjnych (**Ryc. 2**). Pierwszy z zespołów, kierowany przez Tesar'a, wykorzystał kombinację 8 czynników: Olig1, Olig2, Nkx2.2, Sox10, ST18, Nkx6.2, Myrf i Myt1, uzyskując ok. 9,2% wydajności reprogramowania w dniu 21 (Najm i in., 2013). Z kolei zespół Wernig'a posłużył się 3 czynnikami, Sox10, Olig2 i Zfp536, dzięki czemu  $15,6\% \pm 3,3\%$  komórek zostało przeprogramowanych w czasie 3 tygodni hodowli (Yang i in., 2013). Dalsze badania wskazały możliwość reprogramowania do progenitorów glejowych także astrocytów, stosując pojedyncze czynniki Sox10 (Mokhtarzadeh Khangahi i in., 2018) lub Sox 2 (Farhangi, Dehghan, Totonchi i Javan, 2019).

Należy mieć jednak na uwadze, iż reprogramowanie komórek somatycznych oparte o wektory wirusowe kodujące czynniki transkrypcyjne jest obarczone ryzykiem mutagenyzy w transdukowanych komórkach, mogącym skutkować utratą kontroli nad procesem. W związku z tym wielu badaczy podjęło próby reprogramowania komórek małowzrasteczkowymi związkami o aktywności epigenetycznej. Przykładem takiego związku okazała się trichostatyna A (TSA), która pozwoliła na przeprogramowanie mysich i ludzkich astrocytów do GRPs (Zare, Baharvand i Javan, 2019). W innym badaniu, kombinacja 9 czynników (kwasu retinowego, SMER28, LDN193189, Hh-Ag1.5, CHIR99021, RG108, A83-01, tranilcyprominy oraz bFGF) pozwoliła na uzyskanie progenitorów glejowych z mysich fibroblastów (Liu i in., 2019), z wydajnością na poziomie reprogramowania z użyciem wektorów wirusowych (Najm i in., 2013; Yang i in., 2013).

W ostatnich latach z ogromnym zainteresowaniem spotkała się technika manipulacji genetycznej oparta o zgrupowane, regularnie rozproszone, krótkie, powtarzające się sekwencje palindromiczne (ang. *Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats*, CRISPR). Technika ta pozwala na precyzyjną, względnie łatwą i tanią edycję genomu, i zainspirowana jest naturalnym mechanizmem odporności archeonów i bakterii na egzogenny materiał genetyczny. U organizmów tych, materiał genetyczny atakujących bakteriofagów ulega integracji w locus CRISPR, gdzie rozpoczyna on kodowanie krótkich RNA CRISPR (crRNA). crRNA kierują cięciem komplementarnej nici egzogenego DNA przez nukleazę Cas9, także kodowaną w locus CRISPR. Dodatkowo system koduje także sekwencję tracrRNA (ang. *trans-activating CRISPR RNA*), umożliwiającą wiązanie nukleazy Cas9. crRNA i tracrRNA wspólnie noszą nazwę gRNA (ang. *guide RNA*). W ten sposób CRISPR/Cas9 pozwala bakteriom i archeonom zwalczać kolejne zarażenia ze strony analogicznych bakteriofagów (Wiedenheft, Sternberg i Doudna, 2012). Zastosowanie przez Doudna i Charpentier techniki

CRISPR/Cas9 do ukierunkowanej modyfikacji DNA otworzyło kolejny rozdział w badaniach nad inżynierią genetyczną (Jinek i in., 2012), i przyniosło badaczkom Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii w 2020 roku (Ledford i Callaway, 2020). Adaptacja idei bakteryjnego systemu CRISPR/Cas do potrzeb inżynierii genetycznej w zasadniczej mierze oparta jest na syntezie specyficznego gRNA, rozpoznającego pożądane miejsce w genomie, oraz dostarczenie do komórki nukleazy Cas.

Technika CRISPR/Cas9 okazała się także skuteczna w celu przeprogramowania fibroblastów do progenitorów glejowych, poprzez ukierunkowane wprowadzenie sekwencji kodujących trzy czynniki transkrypcyjne (Sox10, Olig2 i Nkx6-2) (Matjusaitis i in., 2019). Badacze oszacowali wydajność tak przeprowadzonego reprogramowania na poziomie tradycyjnych metod z użyciem wektorów wirusowych, jednak przy zachowaniu większej precyzji samej manipulacji genetycznej.

### 1.3.5. Endogenne komórki macierzyste osobników dorosłych

#### 1.3.5.1. Neuralne komórki macierzyste

Neuralne komórki macierzyste (NSCs, ang. *neural stem cells*), zwane również komórkami typu B, powstają z gleju radialnego podczas rozwoju zarodkowego OUN. Wykazują one multipotencjalną zdolność różnicowania na drodze podziału asymetrycznego w neurony, astrocyty oraz oligodendrocyty. Podczas rozwoju zarodkowego NSCs zasiedlają przejściową strefę komorową (VZ), z kolei po urodzeniu można je znaleźć w strefie przykomorowej komór bocznych (SVZ), strefie podziarnistej (SGZ) zakrętu zębatego hipokampa (DG), i w nabłonku węchowym (OE), określanymi wspólnie, jako nisze neurogenne (Beites, Kawauchi, Crocker i Calof, 2005; Temple, 2001). Podziały asymetryczne NSCs w obrębie nisz neurogennych są źródłem nowych neuroblastów oraz komórek progenitorowych w dojrzałym mózgu, w tym także progenitorów glejowych (Gage, 2000) (**Ryc. 2**). Pod względem aktywności mitotycznej NSCs podzielić można na (i) „uśpione” (ang. *quiescent NSCs*) o znikomej aktywności mitotycznej, zwane również komórkami typu B1q, o fenotypie GFAP<sup>+</sup> EGFR<sup>-</sup>, oraz (ii) aktywne (ang. *active NSCs*) o wysokiej aktywności mitotycznej, określane, jako komórki B1a, o fenotypie GFAP<sup>+</sup> EGFR<sup>+</sup> (Płatek i in., 2022).

Eksperymentalne różnicowanie NSCs do GRPs jest procesem analogicznym do różnicowania NSC podczas rozwoju zarodkowego, i opiera się na wykorzystaniu podobnych czynników stymulujących, w tym FGF i Shh. Ponadto, wiele protokołów różnicowania progenitorów glejowych z komórek somatycznych opartych jest o pośrednie stadium NSCs (Lee i in., 2018). Jak dowiodły badania Zhang i wsp., stymulacja NSCs już samym czynnikiem EGF powoduje ich stopniowe różnicowanie do progenitorów glejowych (Zhang i in., 1998). W innych pracach zastosowanie czynników Shh, agonisty białka Smoothened (SAG), bFGF oraz PDGF-AA zróżnicowało NSC do progenitorów glejowych w ciągu ok. tygodnia przy ok. 90-procentowej wydajności (Li i in., 2019). Z kolei poddanie NSCs suplementacji małowcząsteczkowym związkiem GANT61 w celu zablokowania czynnika transkrypcyjnego Gli1, związanego ze ścieżką sygnałową Shh, spowodowało ich różnicowanie do progenitorów oligodendrocytów (OPCs) o wysokich zdolnościach migracyjnych (Namchaiw i in., 2019). Podobny efekt wywołała nadekspresja białka Zfp488 (Biswas i in., 2019, s. 20).

Wiele prac dowiodło zdolności różnicowania przeszczepionych NSCs do GRPs (Mothe i Tator, 2008; Uchida i in., 2012; Xu i in., 2011, 2006). Potencjał do różnicowania NSCs w komórki glejowe wydaje się na tyle obiecujący, iż w 1999 roku Snyder zaproponował nawet termin „globalna wymiana gleju” (ang. *global glia replacement*) na określenie potencjału terapeutycznego NSCs w leczeniu chorób demielinizacyjnych (Yandava, Billinghamurst i Snyder, 1999). Należy jednak pamiętać, iż przeszczepienie NSCs bezpośrednio do mikrośrodowiska objętego zwyrodnieniem („nieprzyjaznego obszaru”, ang.

*hostile microenvironment*) może zaburzyć ich zdolność do różnicowania, a tym samym pogorszyć ich potencjał terapeutyczny (Reekmans i in., 2012; Tang, Yu i Cheng, 2017; Stanaszek i in., 2022).

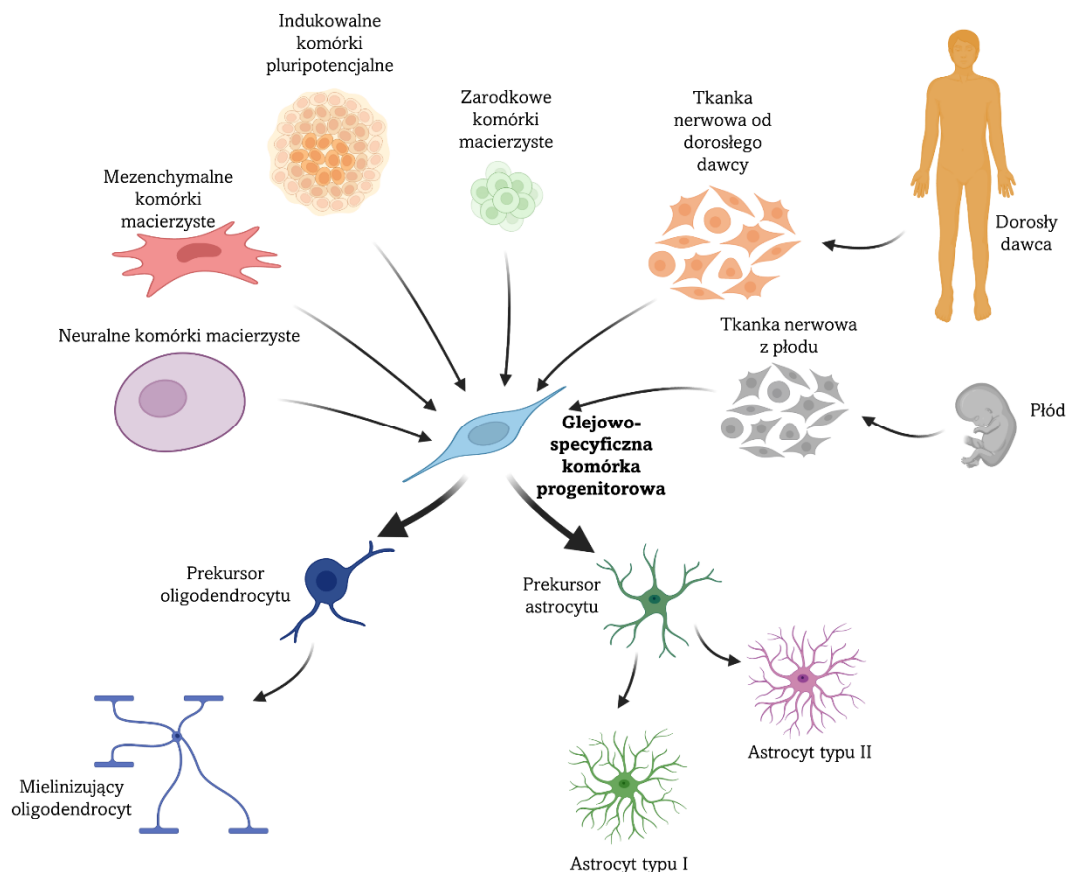
#### 1.3.5.2. Mezenchymalne komórki macierzyste

Mezenchymalne komórki macierzyste/stromalne (MSCs), określane również jako mezenchymalne komórki zrębu, stanowią heterogenną grupę komórek o właściwościach multipotencjalnych. W 2006 roku Komitet ds. Mezenchymalnych i Tkankowych Komórek Macierzystych Międzynarodowego Towarzystwa Terapii Komórkowych (ang. *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy*) zdefiniował minimalne kryteria, które muszą zostać spełnione, aby dana komórka mogła zostać zdefiniowana jako MSC. Należą do nich: (i) zdolność adhezji do plastiku podczas hodowli *in vitro*; (ii) ekspresja markerów CD73, CD90 i CD105, przy jednoczesnym braku ekspresji CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79 $\alpha$  oraz HLA-DR; (iii) potencjał do różnicowania w adipocyty, osteoblasty i chondrocyty (Dominici i in., 2006).

W zależności od potrzeb MSCs mogą być uzyskane z wielu źródeł, w tym m.in. z galarety Wharton'a (WJ) z pępownicy (**Ryc. 2**). Jak dowiodły badania Zhang i wsp., MSCs z WJ mogą różnicować w progenitory glejowe z wydajnością 25,9%. Protokół różnicowania oparty był najpierw na wygenerowaniu neurosfer, a następnie zastosowaniu czynników FGF2 i PDGF-AA. Co ciekawe jednak, w porównaniu do kontrolnych progenitorów glejowych różnicowanych z ESCs, progenitory glejowe z WJ-MSCs cechował niższy poziom ekspresji czynników neurotroficznych (Zhang i in., 2010), co sugerować może ich niższy potencjał terapeutyczny. Innym, wydajniejszym protokołem różnicowania WJ-MSCs do progenitorów glejowych okazała się trzyetapowa hodowla z użyciem, w kolejności, następujących czynników: (i) suplementu ITS (insulina-transferyna-selen, ang. *insulin-transferrin-selenium*) i fibronektyny; (ii) FGF2 i EGF; (iii) FGF2 i PDGF-AA. Tak prowadzona hodowla doprowadziła do uzyskania 44,3% komórek z ekspresją PDGFR $\alpha$  oraz 51,8% komórek z ekspresją A2B5 (Mikaeili Agah, Parivar i Joghataei, 2014), markerów charakterystycznych dla GRPs.

Z uwagi na problematyczną dostępność galarety Wharton'a wiele innych badań ukierunkowano na uzyskanie progenitorów glejowych z MSCs z łatwiej dostępnych źródeł. Przykładem są MSCs izolowane z tkanki tłuszczowej (ADSCs). Jak stwierdzono, hodowla *in vitro* ADSCs w pożywce suplementowanej m.in. czynnikami Shh, retinoidami, neurotrofiną-3 (NT3) i PDGF $\alpha$ , pozwoliła na wygenerowanie progenitorów glejowych z wydajnością sięgającą 90%. Z kolei MSCs pochodzące z miazgi zębowej (ang. *dental pulp*) skutecznie zróżnicowano do progenitorów glejowych poprzez transfekcję plazmidu kodującego kopię genu Olig2 (Askari, Yaghoobi, Shamsara i Esmaeili-Mahani, 2014).

Mimo to, należy zaznaczyć, iż MSCs są grupą komórek o wysokiej heterogenności. Duże znaczenie ma zarówno źródło ich izolacji, jak również protokół hodowli i historia dawcy, w tym tło genetyczne (Lukomska i in., 2019). Wszystkie te czynniki mogą wpływać zarówno na potencjał MSCs do różnicowania w progenitory glejowe, jak i ich zastosowanie w terapii wspomagającej regenerację endogennej gleju.



**Rycina 2.** Źródła glejowo-specyficznych komórek progenitorowych i kierunki ich różnicowania. Stworzono z użyciem oprogramowania BioRender (<https://www.biorender.com/>)

#### 1.4. Eksperymentalne próby wykorzystania GRPs w leczeniu chorób demielinizacyjnych

Z uwagi na swoje właściwości regeneracyjne progenitory glejowe przetestowane zostały wielokrotnie w badaniach eksperymentalnych z użyciem licznych modeli chorób neurodegeneracyjnych. Badania te wykazały różne efekty wynikające zarówno z rodzaju źródła i sposobu przygotowania samych GRPs, jak również ze specyfiki zastosowanych modeli zwierzęcych, które w różny sposób odzwierciedlają modelowane schorzenia człowieka. Część badań przedklinicznych okazała się jednak na tyle obiecująca, że wdrożone zostały próby kliniczne z użyciem progenitorów glejowych. Poniżej przedstawiony został przegląd reprezentatywnych badań z zastosowaniem progenitorów glejowych w pięciu jednostkach chorobowych opisanych w **Rozdziale 1.1.**

##### 1.4.1. Zastosowanie GRPs w leczeniu leukodystrofii

GRPs dowiodły swojej skuteczności terapeutycznej w kilku zwierzęcych modelach leukodystrofii, w tym u myszy *shiverer* (MBP<sup>shi/shi</sup>). U zwierząt tych, w wyniku spontanicznej delecji w genie kodującym zasadowe białko mieliny (ang. *myelin basic protein*, MBP), dochodzi do wrodzonej hipomielinizacji w obrębie całego układu nerwowego, co skutkuje spontanicznym drżeniem ciała oraz przedwczesną śmiercią zwierząt, zwykle w ciągu pierwszych sześciu miesięcy ich życia (Readhead i in., 1987; Jean Harry i Toews, 1998). Pionierskie badania zespołu Goldman'a oparte na wielokrotnych,

domózgowych iniekcjach mysich (mGRPs) lub ludzkich (hGRPs) progenitorów glejowych u myszy *shiverer* wykazały ich zdolność do różnicowania się *in vivo* w funkcjonalne oligodendrocyty i astrocyty, a także częściową kompensację deficytów neurologicznych i wydłużenie życia biorców przeszczepu (Windrem i in., 2004, 2008, 2014, s. 201). W pracy Windrem'a i wsp. (2008) wielokrotne iniekcje hGRPs w okolice spoidła wielkiego mózgu i konaru środkowego mózdzku u osesków myszy *shiverer* skutkowały mielinizacją ośrodkowego układu nerwowego, a powstała mielina była pochodzenia egzogenego. 52 tygodnie po transplantacji hGRPs 78% aksonów w OUN myszy *shiverer* zostało zmielinizowanych. Długookresowa obserwacja wykazała, że większość progenitorów glejowych, oligodendrocytów i astrocytów w mózgu biorców była pochodzenia ludzkiego, co autorzy określili mianem „chimeryzacji” myszy. Należy dodać, że w celu zapobieżenia odrzuceniu przeszczepów ksenogenicznych eksperymenty prowadzone były u myszy *shiverer* posiadających dodatkową mutację w genie RAG2 (RAG2-KO; RAG2<sup>-/-</sup>), wykazujących upośledzenie układu odpornościowego. Gen ten koduje enzym Rag2, zaangażowany w rekombinację genów V(D)J, która prowadzi do zwiększenia różnorodności limfocytów T i B. Zaburzenia ekspresji RAG2 skutkują brakiem antygenowo-swoistej odpowiedzi immunologicznej (Shinkai, 1992).

Badania grupy Walczaka dowiodły zdolności hGRPs do intensywnej migracji w obrębie istoty białej po dokomorowym podaniu komórek u myszy *shiverer/RAG2<sup>-/-</sup>*. W ciągu pierwszych 31 tygodni od podania hGRPs zdolność mielinizacji aksonów była znikoma. Natomiast analiza zwierząt w 62 tygodniu od iniekcji hGRPs wykazała intensywną mielinizację, porównywalną ze zwierzętami kontrolnymi typu dzikiego (ang. *wild type*, WT). Ponadto, dokomorowa transplantacja hGRPs u myszy *shiverer/RAG2<sup>-/-</sup>* wydłużała życie zwierząt powyżej 400 dni u 48% biorców przeszczepu. Wynik ten porównany został z dokomorową iniekcją mGRPs u myszy *shiverer/RAG2<sup>-/-</sup>*. Po przeszczepie mGRPs autorzy obserwowali *in vivo* dużo niższy potencjał migracyjny mysich progenitorów glejowych w porównaniu z hGRPs, ale dużo większą zdolność do mielinizacji aksonów, demonstrowaną w krótszym czasie, bo już po 18 tygodniach od transplantacji komórek. Co ciekawe, u biorców przeszczepu mGRPs nie zanotowano wydłużenia życia myszy *shiverer/RAG2<sup>-/-</sup>*. Autorzy pracy zasugerowali, że potencjał terapeutyczny progenitorów glejowych może być inny niż tylko ich zdolność do różnicowania w mielinizujące oligodendrocyty (Lyczek i in., 2017). Dalsze badania prowadzone w naszym zespole, oparte o przeszczepy progenitorów glejowych izolowanych z psich płodów (cGRPs), przeszczepianych domózgowo u myszy *shiverer/RAG2<sup>-/-</sup>*, wydają się potwierdzać tę hipotezę. W naszych eksperymentach obserwowaliśmy, iż mimo przetrwania i integracji przeszczepianych cGRPs w mózgu myszy poziom mielinizacji istoty białej u biorców przeszczepu był ograniczony, to w dużej grupie zwierząt zanotowano istotne wydłużenie życia zwierząt (Stanaszek i in., 2021).

Skuteczność terapeutyczna GRPs dowiedziona została także w innych modelach leukodystrofii. W badaniach Dooves'a i wsp. wykorzystane zostały myszy z zanikającą istotą białą (ang. *vanishing white matter*), które poddano przeszczepom trzech różnych subpopulacji mysich progenitorów glejowych: (i) z ekspresją A2B5, (ii) z ekspresją GLAST, i (iii) z ekspresją PDGFR $\alpha$ . Przy podaniu domózgowym komórki każdej z trzech subpopulacji ulegały integracji w mózgu biorców. Funkcjonalnie wszystkie trzy populacje mGRPs różnicowały się w komórki glejowe, a u myszy po transplantacji progenitorów glejowych obserwowano selektywną poprawę zdolności motorycznych. Co ciekawe, po podaniu mGRPs wykazujących ekspresję PDGFR $\alpha$  notowano najwyższą przeżywalność zwierząt po przeszczepie (Dooves i in., 2019). Givogri i wsp. badali efekt transplantacji szczurzych progenitorów glejowych (rGRPs) u myszy z mutacją w genie kodującym ARSA, stanowiących model leukodystrofii metachromatycznej (MLD). Przeszczepione rGRPs ulegały integracji w mózgu biorców, różnicując się w mielinizujące oligodendrocyty. Ponadto, w układzie nerwowym biorców przeszczepu zaobserwowano wzrost stężenia arylosulfatazy A, skutkujący redukcją złogów

metachromatycznych. Funkcjonalnie podanie rGRPs spowodowało poprawę przewodnictwa nerwowego i ograniczyło deficyty motoryczne, typowe dla myszy MLD (Givogri i in., 2006).

#### 1.4.2. Zastosowanie GRPs w leczeniu stwardnienia rozsianego

Hipotezę, jakoby potencjał terapeutyczny progenitorów glejowych nie był realizowany tylko w drodze różnicowania się ich w mielinizujące oligodendrocyty, zdają się potwierdzać także badania prowadzone na zwierzęcych modelach stwardnienia rozsianego (MS). W badaniach tych GRPs wykazywały dodatkowo zdolność modulowania mikrośrodowiska w obrębie zmian patologicznych, stymulując funkcjonowanie endogennych oligodendrocytów (Pluchino i in., 2009). W eksperymentach wykorzystywany był zwierzęcy model MS - gryzoni z eksperymentalnym autoimmunologicznym zapaleniem mózgu i rdzenia kręgowego (ang. *experimental autoimmune encephalomyelitis*, EAE). W celu wywołania objawów choroby zwierzęta te immunizowane są homogenatem z ośrodkowego układu nerwowego lub białkiem proteolipidowym mieliny (PLP), zasadowym białkiem mieliny (MBP), białkiem mieliny oligodendrocytów (MOG), lub ich epitopami (PLP<sub>139-151</sub>, MBP<sub>84-104</sub>, MOG<sub>92-106</sub>) w postaci emulsji z adjuwantem Freund'a. Immunizacja skutkuje schorzeniem autoimmunologicznym mediowanym przez limfocyty T pomocnicze, co powoduje infiltrację OUN przez komórki T i monocyty (Robinson, Harp, Noronha i Miller, 2014). W badaniach Kim'a i wsp. progenitory glejowe pochodzące z ludzkich zarodkowych komórek macierzystych przeszczepiane były dokomorowo do myszy z EAE. U zwierząt tych po podaniu hGRPs widoczna była poprawa deficytów motorycznych w testach sprawności neurologicznej, a w obrazie histologicznym zaobserwowano ograniczenie infiltracji komórek CD45<sup>+</sup> w obrębie przestrzeni podpajęczynówkowej (Kim i in., 2012). Podobnie, progenitory glejowe różnicowane z ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z WJ, przeszczepione dokomorowo u myszy z EAE, ograniczały skalę demielinizacji aksonów w mózgu zwierząt powodowaną chorobą, co przełożyło się na złagodzenie objawów choroby (Mikaeili Agah, Parivar i Joghataei, 2014).

Jako alternatywę wobec badań w modelu EAE skuteczność terapeutyczna progenitorów glejowych została wykazana również w modelu myszy z chroniczną infekcją mysim wirusem zapalenia wątroby (ang. *mouse hepatitis virus*, MHV), która skutkuje rozległym zapaleniem mózgu (ang. *encephalitis*) i demielinizacją (Houtman i Fleming, 1996). Przeszczep mysich progenitorów glejowych do rdzenia kręgowego myszy z MHV prowadził do remielinizacji oraz chronił endogenne aksony w rdzeniu przed degeneracją. Przełożyło się to na poprawę zdolności motorycznych w porównaniu do zwierząt kontrolnych, dotkniętych całkowitym paraliżem ciała (Totou, Nistor, Lane i Keirstead, 2004). Co ciekawe, badania Hardison'a i wsp. na myszach z MHV dowiodły, że remielinizacji stymulowanej przez egzogenne mGRPs nie towarzyszyło ograniczenie procesów zapalnych stymulowanych przez cytokiny wydzielane przez limfocyty T specyficzne wobec wirusa. Sugeruje to, iż progenitory glejowe są w stanie demonstrować swój potencjał regeneracyjny nawet w niesprzyjającym, „wrogim” mikrośrodowisku (Hardison i in., 2006), co więcej, mogą być stymulowane przez procesy zapalne (Tourbah i in., 1998).

#### 1.4.3. Zastosowanie GRPs w leczeniu stwardnienia zanikowego bocznego

Progenitory glejowe są również szeroko badane w eksperymentalnych terapiach stwardnienia zanikowego bocznego (ALS), choroby relatywnie rzadkiej, lecz o wciąż niepoznanej do końca etiologii, a co za tym idzie, brakiem skutecznej metody leczenia. Badania dowodzą, że istotny udział w rozwoju ALS mają zaburzenia funkcjonowania komórek glejowych, w szczególności astrocytów, co powoduje upośledzenie i degenerację motoneuronów. Sugeruje to zastosowanie potencjału GRPs w celu kompensacji deficytów glejowych w układzie nerwowym chorych na ALS. W tym celu w badaniach przedklinicznych szeroko stosowany jest model gryzoni z punktowymi mutacjami w genie SOD1,

kodującym dysmutazę nadadtlenkową 1. Enzym ten wiąże wolne jony miedzi i cynku tworząc homodimery o właściwościach dysmutaz, usuwające toksyczne, wolne rodniki tlenowe, metabolizując je do tlenu cząsteczkowego i nadtlenu wodoru (Saccon, Bunton-Stasyshyn, Fisher i Fratta, 2013). Z kolei produkty białkowe zmutowanego genu SOD1 ulegają agregacji w komórkach nerwowych, prowadząc do ich stopniowej degeneracji (Berdyński i in., 2022), a dodatkowo mogą przemieszczać się między komórkami na drodze podobnej do prionów, co skutkuje progresją choroby (Lee i Kim, 2015). W przypadku myszy transgenicznych z substytucją glicyny w miejsce alaniny w kodonie 93 genu SOD1 (SOD1<sup>G93A</sup>) występuje spowolnienie szybkiego transportu aksonalnego (Rao i Nixon, 2003), paraliż kończyn przednich i tylnych związany z degeneracją motoneuronów, a ostatecznie przedwczesna śmierć w wieku 129 ± 9 dni życia zwierząt (Majchrzak i in., 2019).

W badaniach zespołu Maragakis'a szczurze progenitory glejowe (rGRPs) podane zostały do odcinka szyjnego rdzenia kręgowego szczurów z mutacją SOD1<sup>G93A</sup>. Przeszczepione egzogenne rGRPs przetrwały w miejscu iniekcji i różnicowały się z wydajnością 87,9% w kierunku astrocytów i 8,6% w kierunku oligodendrocytów. U biorców przeszczepu zaobserwowano redukcję mikroglejozy w rogu brzuszonym rdzenia kręgowego, a na poziomie behawioralnym poprawę zdolności motorycznych i funkcji oddechowych. Po podaniu rGRPs zanotowano przedłużenie życia zwierząt średnio do 172 dni, w stosunku do długości życia szczurów kontrolnych o średniej długości życia 155 dni (Lepore i in., 2008). W kolejnych badaniach tej samej grupy autorów potencjał ludzkich progenitorów glejowych został sprawdzony u myszy z punktową mutacją SOD1<sup>G93A</sup>, poddanych immunosupresji poprzez iniekcję cyklosporyny A. Co ciekawe, hGRPs po przeszczepie do odcinka szyjnego rdzenia kręgowego myszy cechowała dużo niższa przeżywalność i znacznie niższy potencjał do różnicowania w oligodendrocyty i astrocyty niż rGRPs przeszczepione u szczurów z mutacją SOD1<sup>G93A</sup>. Nie zaobserwowano znamiennej poprawy w testach behawioralnych oraz wydłużenia długości życia zwierząt (Lepore i in., 2011). Jak wspomniano wcześniej, badania zespołu Walczaka sugerują, że czas potrzebny przeszczepianym progenиторom glejowym pochodzenia ludzkiego (hGRPs) na rozpoczęcie mielinizacji wynosi ok. 4 miesiące od transplantacji (Lyczek i in., 2017). Wyniki prac Maragakis'a zdają się potwierdzać tę hipotezę, co oznaczałoby, że przedwczesna śmierć myszy SOD1<sup>G93A</sup> uniemożliwia demonstrację u nich potencjału terapeutycznego przeszczepianych progenitorów glejowych. Liczne doniesienia sugerują, że moment pojawienia się i intensywność objawów choroby u zwierząt SOD1<sup>G93A</sup> związana jest z liczbą kopii zmutowanego genu SOD1 oraz tłem genetycznym zwierzęcia (Alexander i in., 2004; Heiman-Patterson i in., 2005). Dlatego w celu przetestowania skuteczności terapeutycznej hGRPs stworzyliśmy w naszym zespole model myszy ze zróżnicowaną liczbą kopii zmutowanego genu SOD1, o upośledzonym układzie immunologicznym (SOD1<sup>G93A</sup>/RAG2<sup>-/-</sup>) (Majchrzak i in., 2019). Dokomorowy przeszczep hGRPs u osesków myszy SOD1<sup>G93A</sup>/RAG2<sup>-/-</sup> nie przełożył się na zmniejszenie akumulacji zmutowanego białka dysmutazy nadadtlenkowej 1 oraz na wydłużenie życia biorców. Co więcej, analizy *post mortem* nie wykazały obecności komórek egzogennych w mózгах tych zwierząt w terminalnym stadium choroby (150-200 dni po transplantacji, w zależności od liczby kopii zmutowanego genu SOD1) (Stanaszek i in., 2022). Być może, brak efektu terapeutycznego spowodowany był niską przeżywalnością przeszczepionych komórek. W kolejnych badaniach planujemy wyznakovanie hGRPs białkiem reporterowym, które umożliwiłoby prześledzenie losów wszczepionych progenitorów glejowych.

W badaniach Kondo i wsp. przetestowano u myszy SOD1<sup>G93A</sup> potencjał terapeutyczny progenitorów neuralnych o wzbogaconej populacji glejowej, zróżnicowanych z ludzkich indukowalnych komórek pluripotencjalnych (ang. *human induced pluripotent stem cell-derived glial-rich neural progenitors*, hiPSC-GRNPs), z konstytutywną ekspresją białka reporterowego GFP (Kondo i in., 2014). Po iniekcji komórek do lędźwiowego odcinka rdzenia kręgowego zwierząt 60-80% hiPSC-GRNPs różnicowało się w astrocyty; zaobserwowano również poprawę sprawności lokomotorycznej



oraz przedłużenie życia biorców przeszczepu. Badania molekularne wykazały wzrost poziomu czynników neuroprotekcyjnych VEGF, GDNF i NT-3 (Morcuende i in., 2013) w lędźwiowym odcinku rdzenia kręgowego myszy. Co ciekawe, czynniki te były zarówno pochodzenia egzogenego, jak i endogenego (Kondo i in., 2014), co sugeruje, że potencjał terapeutyczny hiPSC-GRNPs w leczeniu ALS może dotyczyć też ich pośredniego działania, poprzez stymulację endogennych mechanizmów neuroprotekcyjnych.

#### 1.4.4. Zastosowanie GRPs w leczeniu uszkodzeń mózgu

Badania wielu autorów dowiodły, że przeszczepione progenitory glejowe wykazują potencjał terapeutyczny zarówno w przypadku modeli traumatycznego (TBI), jak i nietraumatycznego uszkodzenia mózgu (nTBI). W przypadku TBI, w najnowszej pracy zespołu Walczaka wykazano proregeneracyjne właściwości mGRPs przeszczepionych do komórek bocznych mózgu myszy poddanych urazowemu uszkodzeniu mózgu poprzez zlokalizowany, kontrolowany uraz kory mózgowej (ang. *controlled cortical impact*, CCI). U tych myszy zaobserwowano migrację i integrację egzogennych mGRPs, skutkującą zmniejszeniem się obszaru lezji spowodowanej CCI. W rejonie uszkodzenia stwierdzono ponadto zmniejszenie liczby leukocytów CD45<sup>+</sup>, co sugeruje modulację wtórnej odpowiedzi immunologicznej przez przeszczepione mGRPs (Wang i in., 2021). Pozytywne efekty działania progenitorów glejowych zaobserwowano także w pracy Xu i wsp., gdzie badano terapeutyczny efekt przeszczepu progenitorów oligodendrocytów otrzymanych z ludzkich zarodkowych komórek macierzystych (hESC-OPCs) w modelu rozprzestrzenionego, urazowego uszkodzenia aksonów u szczura (ang. *diffuse traumatic axonal injury*) wg. procedury Marmarou (ang. *Marmarou's weight-drop model*) (Marmarou i in., 1994). Przeszczepione hESC-OPCs migrowały w obrębie spoidła wielkiego różnicując się w mielinizujące oligodendrocyty, chroniące endogenne aksony w mózgu biorcy (Xu i in., 2015).

W przypadku nTBI, Salikhova i wsp. zbadali potencjał terapeutyczny sekretomu GRPs w modelu udaru niedokrwiennego u szczura (ang. *ischemic stroke*), spowodowanego przejściowym zamknięciem tętnicy środkowej mózgu (ang. *middle cerebral artery occlusion*, MCAO), trwającym 90 minut. Po dotętnicznej iniekcji pożywki kondycjonowanej (ang. *conditioned medium*, CM) z hodowli GRPs uzyskanych z ludzkich indukowalnych komórek pluripotencjalnych (hiPSC-GRPs) zaobserwowano zwiększoną angiogenezę i przeżywalność komórek w obszarze niedokrwienia. Ponadto, stwierdzono zmniejszoną infiltrację komórek mikrogleju, ograniczenie ekspresji genu kodującego prozapalną cytokinę TNF- $\alpha$ , a jednocześnie zwiększenie ekspresji genów kodujących cytokiny przeciwzapalne IL-4, IL-10 i IL-13, co sugeruje modulację odpowiedzi immunologicznej. Na poziomie behawioralnym stwierdzono poprawę funkcji motorycznych biorców w testach neurologicznych po 30 dniach od podania szczurom CM z hodowli hGRPs (Salikhova i in., 2021).

W pracy Ahn i wsp. zbadano potencjał progenitorów oligodendrocytów (OPCs) w leczeniu skutków udaru w modelu MCAO. Wyniki badań ujawniły, że po dożylniej iniekcji OPCs u myszokoczek poddanego procedurze MCAO nastąpiła poprawa pamięci krótkotrwałej i innych deficytów poznawczych w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi, bez przeszczepu. Co ciekawe, zaobserwowano wzrost ekspresji MBP i BDNF w hipokampie biorców OPCs, mimo, iż autorom nie udało się wykazać obecności egzogennych komórek w mózgu zwierząt. Sugeruje to, iż w udarze niedokrwiennym, przy podaniu systemowym, OPCs mogą wykazywać humoralną aktywność terapeutyczną nawet bez bezpośredniej infiltracji mózgu (Ahn i in., 2016).

#### 1.4.5. Zastosowanie GRPs w leczeniu urazów rdzenia kręgowego

Szeroki potencjał regeneracyjny progenitorów glejowych skłonił badaczy także do prób zastosowania GRP w eksperymentalnych terapiach leczenia urazów rdzenia kręgowego (SCI). W licznych badaniach grupy Fischer'a, hGRPs przetestowane zostały u dorosłych szczurów z miejscowym nacięciem odcinka szyjnego rdzenia kręgowego, pozbawionych dodatkowo grasicy w celu upośledzenia reakcji immunologicznej. Przeszczepione komórki przetrwały w miejscu wszczepu i migrowały w obszarze lezji, gdzie różnicowały się w astrocyty, stymulując regenerację uszkodzonych aksonów (Haas i Fischer, 2013) oraz w mniejszym stopniu w oligodendrocyty, stymulując remielinizację aksonów (Jin i in., 2011). Z kolei badania zespołu Walczaka wykazały, że przeszczep hGRPs w modelu indukowanego farmakologicznie, poprzecznego zapalenia rdzenia kręgowego (ang. *transverse myelitis*, TM) u szczurów pozwolił na utrzymanie przewodnictwa nerwowego wzdłuż rdzenia kręgowego. Wszczepione ludzkie progenitory glejowe wykazywały zdolność do różnicowania w astrocyty i, w mniejszym stopniu, w mielinizujące oligodendrocyty. U biorców nie stwierdzono poprawy koordynacji ruchowej oraz siły chwytu mierzonej w testach behawioralnych (Walczak i in., 2011). W celu zademonstrowania potencjału terapeutycznego szczurzych progenitorów glejowych Nout i wsp. przeszczepili rGRPs w modelu kontuzyjnego uszkodzenia rdzenia kręgowego na wysokości odcinka piersiowego. Zaobserwowano 6-cio tygodniową przeżywalność komórek w miejscu lezji i ich zdolność do różnicowania w astrocyty i oligodendrocyty. Ponadto, przeszczep rGRPs częściowo przywrócił zdolność kontroli oddawania moczu i częstotliwość erekcji u tych zwierząt (Nout i in., 2011).

W licznych badaniach w modelach SCI przetestowany został także potencjał progenitorów oligodendrocytów (OPCs). W pracach zespołu Lebkowski, OPCs zróżnicowane z ludzkich zarodkowych komórek macierzystych (hESCs) przeszczepione zostały u szczurów z uszkodzeniem rdzenia kręgowego w odcinku szyjnym, pozbawionych grasicy. Transplantacja OPCs do obszaru lezji ograniczyła tworzenie się w parenchymie rdzenia cyst wypełnionych płynem tkankowym i zwiększyła mielinizację aksonów, co przełożyło się na poprawę sprawności motorycznej u biorców przeszczepu (Manley i in., 2017; Priest i in., 2015). Obiecujące wyniki badań przedklinicznych z użyciem OPCs w zwierzęcych modelach SCI stanowiły asumpt do wszczęcia wielośrodkowych badań klinicznych fazy I/IIa z użyciem ludzkich progenitorów oligodendrocytów (LCTOPC1) u chorych z objawami podostrego uszkodzenia rdzenia kręgowego w odcinku szyjnym (ang. *subacute cervical spinal cord injury*) (NCT02302157). Badania dowiodły, że LCTOPC1 podane bezpośrednio do rdzenia kręgowego w miejscu lezji są bezpieczne, a ponadto w okresie jednego roku od transplantacji u 96% pacjentów (21 z 22) przywróciły przynajmniej jedną z upośledzonych funkcji neurologicznych po przynajmniej jednej stronie ciała, natomiast u 32% pacjentów (7 z 22) przywróciły przynajmniej dwie z upośledzonych funkcji neurologicznych po przynajmniej jednej stronie ciała (Fessler i in., 2022).

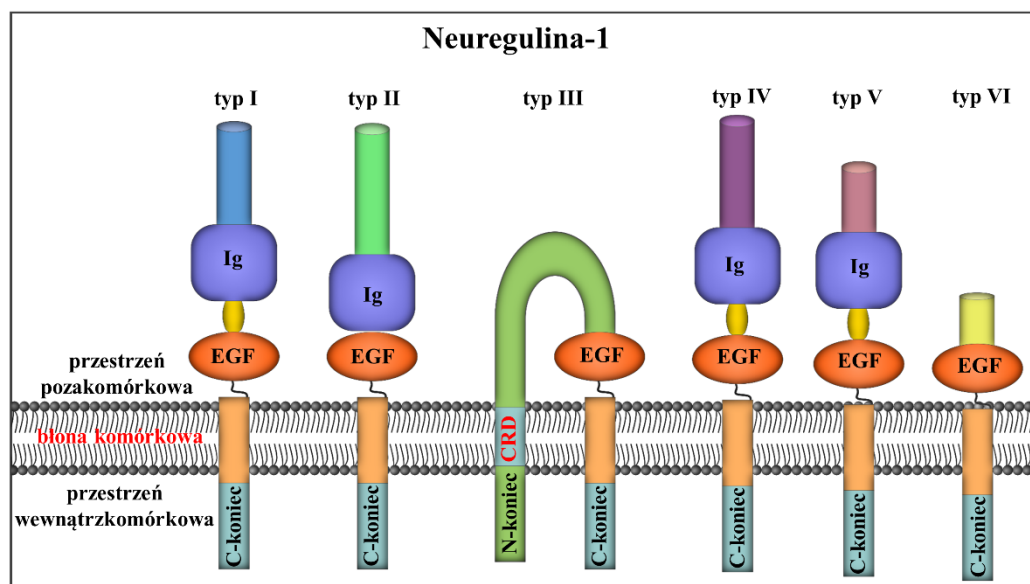
Reasumując, GRPs wykazują obiecujące wyniki w badaniach przedklinicznych, stymulując regenerację układu nerwowego. Jednakże, niedostateczna skuteczność terapeutyczna egzogennych progenitorów glejowych zachęca badaczy do poszukiwań możliwości zwiększenia potencjału tych komórek, w celu spotęgowania ich właściwości regeneracyjnych po podaniu *in vivo*. Jedną z metod stanowi zmiana właściwości komórek z użyciem plejotropowych czynników wzrostu, w tym szczególnie zainteresowanie wzbudza kodowana przez gen *Nrg-1* neuregulina-1 (NRG-1).

### 1.5. Neuregulina-1

#### 1.5.1. Charakterystyka neureguliny-1

Neureguliny (hereguliny) należą do glikoprotein z domeną EGF-podobną. Białka te kodowane są przez 4 różne geny (od *Nrg-1* do *Nrg-4* u człowieka), które wykazują oddziaływanie poprzez

receptory kinazy tyrozynowej z rodziny Erb. Neureguliny pełnią istotną rolę w rozwoju i regeneracji m.in. serca, piersi, oraz OUN. W kontekście badań OUN szczególne zainteresowanie wzbudza kodowana przez gen *Nrg-1* neuregulina-1, oddziałująca poprzez sieć trzech receptorów: ErbB2, ErbB3 i ErbB4 (Mei i Nave, 2014; Stefansson i in., 2002). U człowieka gen *Nrg-1* ma długość 2,6 Mbp i składa się z 21 egzonów zlokalizowanych na chromosomie 8p22-21. W wyniku selekcji jednego z wielu miejsc inicjacji transkrypcji i alternatywnego *splicingu* powstać może z niego ok. 33 różnych izoform białkowych, pogrupowanych w 6 typów (od NRG-1 typ I do NRG-1 typ VI), różniących się N-końcem (Chou i Ozaki, 2010). Typy I, II, IV oraz V posiadają na N-końcu domenę immunoglobulinową (Ig) pozwalającą na oddziaływanie z elementami macierzy zewnątrzkomórkowej, a tym samym na działanie parakryne (Nave i Salzer, 2006) oraz autoparakryne (Fledrich i in., 2019). Co istotne, sekrecyjne izoformy neureguliny-1 mogą być syntetyzowane zarówno przez neurony, jak również przez komórki glejowe, w tym przez astrocyty, komórki Schwanna i oligodendrocyty (Raabe, Deadwyler, Varga i Devries, 2004; Bernstein i in., 2006). Tymczasem typy III i VI oddziałują z domeną EGF-podobną bezpośrednio poprzez N-koniec, co kotwiczony je na stałe w błonie komórkowej. Dodatkowo, oprócz domeny EGF-podobnej, NRG-1 typu III posiada na N-końcu także domenę bogatą w cysteinę (ang. *cysteine-rich domain*, CRD), co umożliwia jej działanie autokryne poprzez wykazywanie zarówno cech receptora, jak i ligandu (**Ryc. 3**). Ponadto, jej ekspresja jest ograniczona tylko do neuronów (Kataria, Alizadeh i Karimi-Abdolrezaee, 2019; Esper, Pankonin i Loeb, 2006).



**Rycina 3.** Izoformy białkowe neureguliny-1 oraz ich umiejscowienie w błonie komórkowej. Typy I, II, IV oraz V neureguliny-1 posiadają na N-końcu domenę immunoglobulinową (Ig), pozwalającą na oddziaływanie z elementami macierzy zewnątrzkomórkowej, a tym samym na działanie parakryne oraz autoparakryne. Typy III i VI neureguliny-1 oddziałują z domeną EGF-podobną bezpośrednio poprzez N-koniec, co kotwiczony je na stałe w błonie komórkowej. Dodatkowo, oprócz domeny EGF-podobnej, NRG-1 typu III posiada na N-końcu także domenę bogatą w cysteinę (ang. *cysteine-rich domain*, CRD), co umożliwia jej działanie autokryne. [na podst. Zhang i wsp. (Zhang, Huang, Shen i Li, 2017b), zmodyfikowane]

### 1.5.2. Udział neureguliny-1 w rozwoju układu nerwowego

Dokładne badania nad udziałem neureguliny-1 w rozwoju zarodkowym są skomplikowane z uwagi na letalność zwierząt pozbawionych funkcjonalnego genu kodującego neuregulinę-1 (Nrg-1 KO) wynikającą z zatrzymania rozwoju serca, która, w przypadku myszy *Nrg-1* KO, następuje pomiędzy 10

a 13 dniem rozwoju (Kramer i in., 1996; Erickson i in., 1997). Większość badań oparta jest zatem na badaniach *in vitro* i zwierzętach heterozygotycznych, zwierzętach z warunkowo inaktywowanym genem kodującym NRG-1 lub farmakologiczną modulacją poziomu NRG-1 i działania receptorów ErbB (Schmucker i in., 2003; Liu i in., 2005). Jak zasugerowali Le Douarin i Dupin, podczas rozwoju zarodkowego NRG-1 reguluje funkcjonowanie prekursorów neuralnych w OUN i migrację komórek grzebienia nerwowego (ang. *neural crest cells*, NCCs), oddziałując jako chemoatraktant dla NCCs (Le Douarin i Dupin, 2003). Prekursory neuralne wyizolowane z prądkowia myszy w 14 dniu rozwoju zarodkowego produkują NRG-1, która reguluje ich proliferację i różnicowanie także w warunkach *in vitro* (Calaora i in., 2001). Z kolei receptory ErbB4 dla neureguliny-1 ulegają ekspresji na powierzchni rozwijających się neuroblastów w niszy neurogennej w SVZ oraz wzdłuż donosowego strumienia migracyjnego (ang. *rostral migratory stream*, RMS), którym neuroblasty migrują do rozwijającej się opuszki węchowej (Płatek i in., 2022; Anton i in., 2004). Z kolei w przypadku rozwoju zarodkowego danio pręgowanego, zablokowanie interakcji receptora ErbB z NRG-1 zaburza mitozę w rozwijającej się SVZ (Sato i in., 2015). Badania te sugerują istotny udział neureguliny-1 w procesie neurogenezy zarodkowej.

NRG-1 jest także kluczowym białkiem sygnałowym regulującym wszystkie etapy rozwoju komórek Schwanna w obwodowym układzie nerwowym i oligodendrocytów w OUN. W przypadku obwodowego układu nerwowego, NRG-1 stymuluje dojrzewanie NCCs w kierunku górnym (Shah, 1994), jak również wpływa na dojrzewanie i migrację komórek Schwanna (głównie NRG-1 typu III) (Miyamoto i in., 2017). Jak wspomniano, NRG-1 typu III ulega ekspresji w neuronach, a w szczególności w ich aksonach, dzięki czemu możliwa jest regulacja mielinizacji aksonów przez komórki Schwanna bezpośrednio przez mielinizowane aksony (Michailov i in., 2004). Z kolei deficyt NRG-1 typu III uniemożliwia powstanie prekursorów komórek Schwanna (Wolpowitz i in., 2000). Eksperymenty Zanazzi i współpracowników pokazały natomiast, iż NRG-1 typu II indukuje demielinizację aksonów we współhodowli komórek Schwanna i neuronów (Zanazzi i in., 2001). W przypadku OUN udział poszczególnych białek z rodziny neureguliny-1 nie jest jednak tak dobrze poznany. Wiadomo, iż receptory ErbB dla neureguliny-1 ulegają ekspresji zarówno w progenitorach górnym, jak i w dojrzałych oligodendrocytach (Vartanian, Goodearl, Viehöver i Fischbach, 1997). W warunkach *in vitro*, w eksplantach tkanki nerwowej ze zwierząt pozbawionych genu *Nrg-1* powstawanie oligodendrocytów było zahamowane (Vartanian, Fischbach i Miller, 1999). U szczurów ekspresja NRG-1 w SVZ stymuluje różnicowanie progenitorów górnym w kierunku oligodendrocytów (Vartanian i in., 1994). W badaniach Kataria i wsp. z użyciem modelu farmakologicznie indukowanej demielinizacji u szczura zademonstrowano, iż suplementacja ludzką rekombinowaną neuregulina-1 typu 1 $\beta$  zdemielinizowanego obszaru obniża tam ekspresję CSPG, a jednocześnie podwyższa ekspresję IL-10 w komórkach układu odpornościowego. Czynniki te, odpowiednio, hamują i stymulują proces remielinizacji. Z kolei we współhodowli prekursorów neuralnych i neuronów zwojów korzeni grzbietowych (ang. *dorsal root ganglion neurons*, DRGs) egzogenna neuregulina-1 stymulowała różnicowanie prekursorów w kierunku intensywnie rozgałęzionych oligodendrocytów (Kataria i in., 2018). Co ciekawe jednak, badania Brinkmann'a i współpracowników przeprowadzone na zwierzętach z warunkową ekspresją NRG-1 oraz receptorów ErbB pokazały, iż nawet przy całkowitym braku stymulacji ze strony NRG-1 mielinizacja w OUN przez oligodendrocyty nie jest zaburzona. Z kolei przejściowa nadekspresja zarówno NRG-1 typu I, jak i NRG-1 typu III w OUN prowadzi do hypermielinizacji (Brinkmann i in., 2008). Przykłady te dowodzą, iż oddziaływanie NRG-1 z receptorami ErbB ma zróżnicowany wpływ na mielinizację pomiędzy obwodowym a ośrodkowym układem nerwowym (**Tab. 1**). Przegląd literatury sugeruje ponadto kluczowy udział dwóch typów neureguliny-1, typu I i typu III w dojrzewaniu i funkcjonowaniu komórek mielinizujących i w samej

mielinizacji w obydwu ośrodkach układu nerwowego (Kataria, Alizadeh i Karimi-Abdolrezaee, 2019; Mei i Xiong, 2008).

**Tabela 1.** Udział izoform I i III neureguliny-1 w funkcjonowaniu komórek mielinizujących i regulacji mielinizacji w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym

	Ośrodkowy układ nerwowy	Obwodowy układ nerwowy
<b>NRG-1 typ I</b>	nadekspresja prowadzi do hypermielinizacji (Brinkmann i in., 2008)	nadekspresja prowadzi do demielinizacji (Zanazzi i in., 2001)
	nie jest niezbędna do mielinizacji przez komórki Schwanna (Bartus i in., 2016)	wpływa na różnicowanie komórek Schwanna (Fledrich i in., 2014) poziom wzrasta po zaindukowaniu demielinizacji (Stassart i in., 2013)
<b>NRG-1 typ III</b>	nadekspresja prowadzi do hypermielinizacji (Brinkmann i in., 2008)	nadekspresja prowadzi do hypermielinizacji (Michailov i in., 2004)
	stymuluje mielinizację przez oligodendrocyty (Taveggia i in., 2008)	wpływa na dojrzewanie prekursorów i migrację komórek Schwanna (Miyamoto i in., 2017; Wolpowitz i in., 2000) reguluje pierwotną mielinizację i remielinizację aksonów przez komórki Schwanna (Fricker i in., 2011)

### 1.5.3. Funkcje neureguliny-1 w regeneracji układu nerwowego

Wpływ neureguliny-1 na rozwój i stabilizację aksonów w obwodowym układzie nerwowym oraz ich mielinizację przez komórki Schwanna sugeruje jej silne zaangażowanie w proces endogennej regeneracji. Zwiększona ekspresja NRG-1 w obwodowym układzie nerwowym została stwierdzona po uszkodzeniu aksonów obwodowych, motoneuronów i neuronów zwojów korzeni grzbietowych (Stassart i in., 2013; Carroll i in., 1997). Warto zaznaczyć, iż nadekspresja zarówno NRG-1 typu I, jak i NRG-1 typu III po uszkodzeniu nerwów obwodowych wzmagała co prawda remielinizację, jednak przewodnictwo nerwowe w tak zremielinizowanych aksonach okazało się słabsze niż przed demielinizacją (Stassart i in., 2013). Z kolei w pracy Belin i wsp., z wykorzystaniem zwierzęcego modelu wrodzonej neuropatii hipomielinizacyjnej (ang. *congenital hypomyelinating neuropathy*) pokazano, iż genetyczna modulacja ekspresji NRG-1 typu III na różnych etapach rozwoju może poprawić mielinizację aksonów przez komórki Schwanna (Belin i in., 2019).

W przypadku uszkodzeń OUN stwierdzono natomiast rozregulowanie ekspresji NRG-1. W pracach zespołu Karimi-Abdolrezaee pokazano, iż zarówno w wyniku kompresyjnego, jak i indukowanego farmakologicznie uszkodzenia rdzenia kręgowego u szczurów następuje spadek ekspresji NRG-1 (Kataria i in., 2018; Gauthier, Kosciuczyk, Tapley i Karimi-Abdolrezaee, 2013). Ponadto, zaburzenie ekspresji NRG-1 typu  $\beta 1$  stwierdzono także w eksperymentalnym autoimmunologicznym zapaleniu mózgu i rdzenia kręgowego (EAE), będącym MS. Spadek poziomu NRG-1 typu  $\beta 1$  zaobserwowano zarówno w fazie presymptomatycznej, jak i symptomatycznej w rdzeniu kręgowym, śledzienie i w osoczu krwi. Podskórna suplementacja rekombinowanym peptydem NRG-1 typu  $\beta 1$  łagodziła z kolei przebieg choroby poprzez regulację aktywności monocytów i makrofagów, limfocytów Th1 i mikrogleju (Kataria i in., 2021). Z kolei u myszy z mutacją G93A w

genie kodującym SOD1, stanowiącym zwierzęcy model ALS cechujący się ograniczoną przeżywalnością osobników (SOD1<sup>G93A</sup>), stwierdzono spadek ekspresji NRG-1 w zakończeniach post-synaptycznych motoneuronów, a ekspresja egzogennej NRG-1 typu III przedłużała życie zwierząt (Lasiene i in., 2016). W pracy Mòdol-Caballero i wsp. zaobserwowano natomiast synergistyczny efekt nadekspresji NRG-1 typu I w mięśniach szkieletowych i nadekspresję NRG-1 typu III w rdzeniu kręgowym myszy SOD1<sup>G93A</sup>, polegający na poprawie przeżywalności motoneuronów i zmniejszonej aktywacji gleju, co przełożyło się na poprawę wyników testów behawioralnych oraz odsunięcie w czasie symptomów neurologicznych choroby (Mòdol-Caballero i in., 2021). W przypadku farmakologicznego uszkodzenia mózgu neurotoksyną fluorofosforanem diizopropylu (DFP) podanie NRG-1 ograniczyło nadmierną aktywację komórek mikrogleju, co przełożyło się na zwiększenie przeżycia neuronów w obszarze uszkodzenia (Li i in., 2015b). Co ciekawe, Marballi i wsp. zaobserwowali także związek pomiędzy polimorfizmem genu *Nrg-1*, a zaburzeniami aktywności układu immunologicznego w schizofrenii. Badania rodzin z Kostaryki posiadających mutację typu zmiany sensu (ang. *missens*) w genie *Nrg-1* wykazały istotny wzrost poziomu cytokin prozapalnych w osoczu krwi, co potwierdzono także w analizach *in vitro* komórek linii limfoblastoidalnej (Marballi i in., 2010). Te i inne badania (Kataria, Alizadeh i Karimi-Abdolrezaee, 2019) wskazują zatem istotny udział NRG-1 w funkcjonowaniu komórek układu immunologicznego. Z klinicznego punktu widzenia terapia oparta na suplementacji NRG-1 również wydaje się realna, gdyż peptyd NRG-1 ma zdolność przechodzenia przez barierę krew-mózg (Kastin, Akerstrom i Pan, 2004). W połączeniu z pozytywnym wpływem na funkcjonowanie komórek glejowych daje to zatem podstawy do zastosowania NRG-1 do stymulacji procesów regeneracyjnych oraz przeciwdziałaniu skutkom przeszczepu komórek terapeutycznych do „nieprzyjaznego mikrośrodowiska” (**Rozdz. 1.3.5.1.**) w upośledzonym układzie nerwowym.

Z powyższych badań wynika, że NRG-1 jest zaangażowana w mielinizację na poziomie rozwoju płodowego i remielinizację po urodzeniu, oraz dojrzewanie i migrację oligodendrocytów. W związku z tym obiecującym kierunkiem dalszych badań wydaje się zastosowanie GRPs z nadekspresją NRG-1. Jedną z metod wywołania nadekspresji NRG-1 jest użycie odpowiednich nośników genetycznych, takich jak wektory lentiwirusowe.

## 1.6. Wektory lentiwirusowe w inżynierii genetycznej

### 1.6.1. Charakterystyka lentiwirusów

Lentiwirusy, zwane również wirusami „powolnymi” (łac. *lente*, powoli), należą do rodziny retrowirusów (łac. *Retroviridae*). Zasadniczymi cechami uniwersalnymi dla retrowirusów jest: i. kodowanie informacji genetycznej w postaci RNA, ii. obecność genu kodującego odwrotną transkryptazę, i iii. zdolność integracji do genomu komórki-gospodarza (Cockrell i Kafri, 2007). Funkcją enzymu odwrotnej transkryptazy jest przepisywanie informacji genetycznej z RNA na DNA, w procesie zwanym odwrotną transkrypcją. Lentiwirusy przechowują informację genetyczną w postaci dwóch kopii jednoniciowego RNA o dodatniej polarności [ssRNA(+)], otoczonych kapsydem i białkami otoczki (Chen, Keiser i Davidson, 2018). Wszystkie lentiwirusy kodują ponadto przynajmniej trzy geny (*gag*, *pol* i *env*) odpowiadające, odpowiednio, za replikację, integrację, i syntezę otoczki wirusowej, które otoczone są długimi sekwencjami końcowymi (LTRs) o długości 600-900 nukleotydów, zaangażowanymi m.in. w integrację wirusa do genomu gospodarza (Gouvarchin Ghaleh i in., 2020; Pereira, 2000).

Spośród wielu poznanych lentiwirusów szczególne zainteresowanie w inżynierii genetycznej wzbudza wirus ludzkiego niedoboru odporności (HIV). Podyktowane jest to jego zdolnością stabilnej integracji do genomu komórek zarówno dzielących, jak i nie dzielących się. Stwarza to możliwość

szerokiego zastosowania zmodyfikowanego wirusa HIV, jako wektora genetycznego (Sachdeva i in., 2007; Liu i Berkhout, 2014).

Cykl życiowy lentiwirusa składa się z fazy wczesnej oraz fazy późnej. Pierwszym etapem jest wniknięcie autonomicznego, dojrzałego wirusa (wirionu) do komórki gospodarza na drodze endocytozy lub adsorpcji mediowanej przez receptor (Ryu, 2017; Wang i in., 2018a). W przypadku HIV adsorpcja jest możliwie dzięki interakcji pomiędzy receptorem CD4 na powierzchni limfocytów T a białkiem gp120 otoczki wirusa. Skutkuje to zmianami konformacyjnymi otoczki, co umożliwia połączenie się wirusa z ko-receptorami CCR5 lub CXCR4 komórki, a w konsekwencji jego fuzję błonową (Cervera i in., 2019). W cytoplazmie dochodzi do rozpadu otoczki wirusowej, syntezy odwrotnej transkryptazy i przepisania informacji genetycznej wirusa z RNA na cDNA z użyciem endogennych nukleotydów, a następnie transport nowo zsyntetyzowanego cDNA do jądra komórkowego (Borrenberghs i in., 2016). Co ciekawe, cDNA HIV transportowane jest do jądra przez pory jądrowe z udziałem białka CA kapsydu, a brak białka CA uniemożliwia HIV zakażenie komórek nie dzielących się (Yamashita i Emerman, 2004). W jądrze prowirusowe cDNA ulega integracji do genomu gospodarza, a tym samym lentiwirus osiąga stan prowirusowy. Samo miejsce integracji nie jest całkowicie losowe, w przypadku HIV jest to z reguły obszar jednostek transkrypcyjnych (Larsen i in., 2018; Singh, Bedwell i Engelman, 2022; Winans i in., 2022). Ponadto, w przypadku zakażenia komórki dzielącej się, stabilna integracja prowirusa umożliwia ciągłe replikowanie się cDNA wirusa wraz z replikacją DNA gospodarza. Od tego momentu lentiwirus wchodzi w końcową fazę cyklu życiowego, ukierunkowaną na syntezę wirusowego RNA i białkowych części wirusowych niezbędnych do odtworzenia nowego, samodzielnego wirionu, poprzez wykorzystanie maszynerii transkrypcyjnej i translacyjnej gospodarza. Nowopowstały lentiwirus wydostaje się z komórki w kilkietapowym procesie zwanym pączkowaniem (ang. *budding*) do przestrzeni międzykomórkowej, gdzie dojrzewa i ponownie wchodzi we wczesną fazę cyklu życiowego (Sundquist i Krausslich, 2012; Milone i O'Doherty, 2018).

### 1.6.2. Powstanie i optymalizacja wektorów lentiwirusowych

Do dziś stworzono cztery generacje wektorów lentiwirusowych opartych o HIV. Pierwsza generacja lentiwirusów powstała dzięki pionierskim eksperymentom Luigiego Naldiniego i współpracowników (Naldini i in., 1996b; a), którzy posegregowali sekwencje wirusowe do trzech oddzielnych plazmidów. W pierwszym plazmidzie zakodowany został gen reporterowy otoczony sekwencjami wirusowymi 5' i 3' LTR, w drugim geny związane z pakowaniem wirusa, a w trzecim gen *env* kodujący białka otoczki. Ponieważ poszczególne plazmidy nie były zdolne do samodzielnej replikacji, zwiększyło to kontrolę nad wektorem, a tym samym bezpieczeństwo jego stosowania. Ponadto, w procesie określanym jako pseudotypowanie (ang. *pseudotyping*), gen *env* kodujący otoczkę wirusową HIV zastąpiony został analogicznym genem z wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV). Wirus ten rozpoznaje receptor dla lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL), który występuje na komórkach częściej niż CD4, a tym samym poszerza pole do zastosowanie wektora lentiwirusowego. Pozostałe geny HIV, w tym *vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*, *gag*, *pol*, *tat* oraz *rev*, pozostały zachowane. Kompletny wektor lentiwirusowy uzyskiwano w wyniku ko-transfekcji wszystkimi trzema plazmidami linii ludzkich komórek zarodkowych nerki (HEK 293T). W trakcie dalszej hodowli w stransfekowanych komórkach HEK 293T ekspresji ulegały poszczególne geny wirusa, a na koniec złożony wektor izolowano z nadsączy hodowli komórek.

Druga generacja lentiwirusów pozbawiona była już genów *vif*, *vpr*, *vpu* i *nef*. Stwierdzono, bowiem, iż dla zachowania zdolności integracji i replikacji wektora lentiwirusowego niezbędne okazały się cztery geny: *gag*, *pol*, *tat* oraz *rev*. Ekspresja wklonowanego transgenu kontrolowana była przez słaby promotor znajdujący się w obrębie sekwencji 5' LTR, zależny od *Tat* (Schlimgen i in., 2016).

Trzecia generacja wektorów lentiwirusowych w jeszcze większym stopniu poprawiła bezpieczeństwo ich stosowania. Plazmid pakujący został podzielony na dwa – geny *pol* i *gag* zakodowane zostały na oddzielnym plazmidzie od genów *env* i *rev*. Z kolei przed transgenem, w obrębie sekwencji 5' LTR, zastosowany został konstytutywny promotor, co umożliwiło usunięcie genu *tat* (Dull i in., 1998; Trono, 2002). Było to niezbędne, gdyż gen *tat* powiązany został z częstszym występowaniem mięsaka Kaposiego u pacjentów z zespołem nabytego niedoboru odporności (AIDS), powodowany przez HIV (Yang i in., 2020). Ponadto, w obrębie 3' LTR wprowadzono 400-nukleotydową delecję, co ograniczyło ryzyko replikacji w wyniku spontanicznej rekombinacji natywnych sekwencji HIV. Powstały obszar, określony jako SIN-LTR, uczynił wektory lentiwirusowe typu trzeciego wektorami typu samo-inaktywującego (SIN, ang. *self-inactivating*), w jeszcze większym stopniu zwiększając ich bezpieczeństwo (Dull i in., 1998; Gouvarchin Ghaleh i in., 2020).

Ostatnia, czwarta generacja wektorów lentiwirusowych, zwanych LTR1, zaproponowana została w 2017 roku przez Vink i współpracowników (Vink i in., 2017). Sekwencje pakujące umieszczono poniżej obszaru SIN-LTR, co spowodowało, iż nie poddawane były one odwrotnej transkrypcji, a tym samym nie ulegały integracji do DNA gospodarza. Ograniczyło to do 441 nukleotydów długość sekwencji pochodzenia wirusowego wbudowywanych do genomu, zmniejszając tym samym ryzyko spontanicznych rekombinacji, a dodatkowo umożliwiło osiągnięcie wyższego poziomu ekspresji transgenu w krótszym czasie, w stosunku do poprzednich generacji wektorów lentiwirusowych.

### 1.6.3. Zastosowanie wektorów lentiwirusowych

Wiele lat badań uczyniło wektory lentiwirusowe jednymi z najlepiej poznanych narzędzi w inżynierii genetycznej, zarówno w badaniach podstawowych, jak i klinicznych i przedklinicznych. Jednym z głównych zastosowań wektorów lentiwirusowych jest wywoływanie nadekspresji (ang. *overexpression*) bądź wyciszenia (ang. *silencing*) genetycznego (Tolmachov, Tolmachova i A., 2011). W przypadku nadekspresji, komórki poddawane są transdukcji wektorem z wklonowaną, egzogenną sekwencją mającą ulec ekspresji, a znajdującą się pod konstytutywnym (np. pochodzącym z genu  $\beta$ -aktyny), bądź indukowalnym promotorem (np. w przypadku systemu Tet-On, aktywowanym tetracykliną) (Nowak i in., 2022; Gossen i Bujard, 1992). W analogiczny sposób zaprojektowany może zostać lentiwirusowy wektor wyciszający. W tym celu, jako transgen zastosowana może być sekwencja kodująca małe interferujące RNA (ang. *small interfering RNA*, siRNA). Te 21-25-nukleotydowe sekwencje powodują degradację endogennego, komplementarnego mRNA, hamując powstawanie w komórce funkcjonalnego produktu (wyciszenie jego ekspresji) (Lam, Chow, Zhang i Leung, 2015). Dodatkowo, system ekspresyjny zaprojektowany może zostać tak, aby ulegać ekspresji tylko w konkretnych rodzajach komórek (np. poprzez zastosowanie promotora genu kodującego GFAP w celu wywołania specyficznej ekspresji transgenu m.in. w komórkach glejowych), bądź w konkretnych stanach patofizjologicznych [np. stosując promotor genu kodującego HIF-1 $\alpha$  (czynnik 1 $\alpha$  indukowany hipoksją, ang. *hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$* ), aktywowany w przebiegu udaru mózgu] (Zhang i in., 2009). Obecnie stosowane są również nowe, zaawansowane techniki inżynierii genetycznej oparte na wektorach lentiwirusowych, bazujące na elementach systemu CRISPR/Cas9 (**Rozdz. 1.3.4.**), takie jak system lentiwirusowych cząstek aktywacyjnych (LAPs) (**Rozdz. 4.3.2.**).



## 2. Założenia i cel pracy

Spośród szeregu schorzeń układu nerwowego, jednym z istotnych problemów klinicznych są choroby demielinizacyjne, charakteryzujące się uszkodzeniem otoczki mielinowej w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym. Do chorób demielinizacyjnych zaliczyć można m.in. leukodystrofie czy stwardnienie rozsiane. Zjawisko demielinizacji związane jest także z szeregiem chorób neurodegeneracyjnych, takich jak stwardnienie zanikowe boczne, czy z urazami mózgu i rdzenia kręgowego. Z uwagi na zróżnicowaną etiologię, schorzenia te manifestują się w postaci szeregu objawów neurologicznych, które upośledzają normalne funkcjonowanie pacjentów, stanowiąc jedno z głównych obciążeń współczesnego społeczeństwa. Brak skutecznej metody leczenia tych chorób skłania naukowców i klinicystów do poszukiwania nowych terapii w celu przywrócenia upośledzonych funkcji neuronów i regeneracji uszkodzonych struktur układu nerwowego. Głejowo-specyficzne komórki progenitorowe (GRPs) posiadają cechy wskazujące na ich duży potencjał do zastosowania w terapii regeneracyjnej schorzeń demielinizacyjnych. Dotychczasowe badania eksperymentalne, podobnie jak wyniki poprzednich badań prowadzonych w naszym zespole wykazały, że przeszczepy GRPs w zwierzęcych modelach chorób demielinizacyjnych powodują wytwarzanie mieliny i częściową kompensację deficytów neurologicznych oraz wydłużenie życia zwierząt. Jednak wciąż niedostateczna skuteczność terapeutyczna egzogennych progenitorów glejowych skłania badaczy do poszukiwań metod zwiększania właściwości regeneracyjnych tych komórek po podaniu *in vivo*. Takimi metodami są modyfikacje komórek prowadzące do nadekspresji genetycznych plejotropowych czynników wzrostu. W tym kontekście szczególne zainteresowanie wzbudza, kodowana przez gen *Nrg-1*, neuregulina-1 (NRG-1). Najnowsze badania wykazały wpływ neureguliny-1 na rozwój i stabilizację aksonów w obwodowym układzie nerwowym oraz ich mielinizację przez komórki Schwanna, a także zdolność do modulacji odpowiedzi immunologicznej po uszkodzeniach, co sugeruje jej istotne zaangażowanie w regenerację uszkodzonych struktur nerwowych.

Powyższe obserwacje stanowiły podstawę do zaprojektowania badań, będących przedmiotem niniejszej pracy doktorskiej.

**Celem moich badań** była weryfikacja hipotezy zakładającej, że nadekspresja neureguliny-1 w glejowo-specyficznych komórkach progenitorowych (GRPs) zmienia ich właściwości funkcjonalne, które mogą być istotne dla zwiększenia potencjału zastosowania GRPs w terapii chorób związanych z demielinizacją.

**Przedmiotem** prowadzonych przeze mnie badań były glejowo-specyficzne komórki progenitorowe izolowane z tkanki nerwowej płodów myszy (mGRPs). Modyfikacje genetyczne mGRPs w celu wywołania nadekspresji neureguliny-1 typu I (NRG-1 typu I) przeprowadzone zostały poprzez transdukcję komórek wektorami lentiwirusowymi kodującymi NRG-1 typu I. Badania dotyczyły analizy poziomu ekspresji NRG-1 w zmodyfikowanych mGRPs, ich fenotypu, oraz właściwości funkcjonalnych mGRPs-NRG-1 *in vitro*.

**Zadania te były realizowane** w poszczególnych etapach pracy doktorskiej:

- I etap miał na celu opracowanie metody izolacji i selektywnej hodowli glejowo-specyficznych komórek progenitorowych z tkanki nerwowej płodów myszy (mGRPs)
- II etap miał za zadanie optymalizację protokołu transdukcji mGRPs i przeprowadzenie transdukcji komórek w celu wywołania w nich nadekspresji neureguliny-1 przy pomocy wektorów lentiwirusowych
- Kolejne etapy dotyczyły oceny fenotypu i właściwości funkcjonalnych transdukowanych mGRPs w badaniach *in vitro*

### 3. Materiał badawczy

#### 3.1. Mysie glejowo-specyficzne komórki progenitorowe (mGRPs)

Przedmiot badań stanowiły mysie progenitory glejowe (mGRPs), izolowane z kory mózgowej płodów w 13-14 dniu rozwoju płodowego (E13-E14), obydwu płci, uzyskane od zdrowych, losowo dobranych, ciężarnych samic *Mus musculus* szczepu C57BL/6. Hodowla zwierząt prowadzona była w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN, zgodnie z wewnętrznym regulaminem Instytutu. Zwierzęta hodowane były w klimatyzowanym pomieszczeniu o stałej temperaturze 22°C, przy stałym cyklu dobowym (12 h faza jasna/12 h faza ciemna) i 50-55% wilgotności powietrza. Zwierzęta posiadały swobodny dostęp do wody i sterylizowanej paszy hodowlanej. Hodowla prowadzona była w standardowych, przezroczystych klatkach ze szkła akrylowego, wypełnionych ściółką, utrzymywanych w systemie klatek indywidualnie wentylowanych (ang. *individually ventilated cages*). Liczba zwierząt w poszczególnych klatkach wynosiła 4-5. Procedura izolacji mGRPs odbywała się w warunkach sterylnych, w oddzielnym pomieszczeniu.

#### 3.2. Mysie neurony zwojów korzeni grzbietowych (mDRGs)

W badaniach wykorzystywano mysie neurony zwojów korzeni grzbietowych (mDRGs), wyizolowane od zdrowych, losowo dobranych *Mus musculus* szczepu BALB/c, obydwu płci, w wieku 8-9 tygodni. Hodowla zwierząt prowadzona była w Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarni Doświadczalnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, zgodnie z wewnętrznym regulaminem Uniwersytetu. Zwierzęta hodowane były w klimatyzowanym pomieszczeniu o stałej temperaturze 20-24°C, przy stałym cyklu dobowym (12 h faza jasna/12 h faza ciemna) i 45-65% wilgotności powietrza, z 15-20 wymianami powietrza na godzinę. Zwierzęta posiadały swobodny dostęp do wody i sterylizowanej paszy hodowlanej. Hodowla prowadzona była w standardowych, przezroczystych klatkach ze szkła akrylowego, wypełnionych ściółką. Liczba zwierząt w poszczególnych klatkach wynosiła 4-5. Procedura izolacji mDRGs odbywała się w warunkach sterylnych, w oddzielnym pomieszczeniu.

### 4. Metody badań

#### 4.1. Izolacja mGRPs

W celu izolacji tkanki nerwowej z płodów, wykorzystano samice myszy szczepu C57BL/6 będące w 13-14 dniu ciąży (E13-E14), licząc od dnia, w którym zaobserwowano obecność czopa śluzowego w pochwie (E1). Myszy usypiano w narkozie izofluranowej (Iso-vet, Chanelle Pharma, Galway, Irlandia) i uśmiercano przez przerwanie rdzenia kręgowego. Po ustaniu odruchów zwierzęcia umieszczano je w sterylnej przestrzeni, w pozycji na plecach, obszar brzuszny dezynfekowano 70% roztworem alkoholu etylowego i rozcinano powłoki skórne w celu ekspozycji macicy. Następnie przecinane były rogi macicy, a wypreparowana macica, zawierająca płody, przenoszona była do szalki Petriego wypełnionej sterylną pożywką DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Z jednej ciężarnej samicy uzyskiwano średnio 8 płodów. Płody izolowano pojedynczo i przenoszono je do nowej szalki Petriego wypełnionej sterylną pożywką DMEM/F-12 a następnie dekapitowano. Głowy płodów przenoszono do nowej szalki Petriego wypełnionej sterylną pożywką DMEM/F-12. Dalsze procedury przeprowadzano z zastosowaniem mikroskopu dysekcijnego (Leica Microsystems, Wetzlar, Niemcy). W celu ekspozycji mózgowia rozcinano powłoki skórne głowy i usuwano opony mózgu. Następnie odcinano mózdzek i pień mózgu. Tak wypreparowany mózg stanowił materiał do izolacji komórek. Heterogenną mieszaninę komórek

uzyskiwano poprzez: (1) inkubację tkanki nerwowej w 10 ml odczynnika TrypLE™ (Thermo Fisher Scientific) z dodatkiem 10 µl DNazy I (DN25; Sigma, St. Louis, MO, USA) przez 10 minut; (2) wymieszanie, a następnie trawienie tkanki w 37°C przez 10 min; (3) dodanie 5 ml pożywki GRP Medium (skład pożywki zamieszczony w **Tab. 2**); (4) ponowne wymieszanie, a następnie wirowanie przy 300 × g przez 5 min; (5) odrzucenie nadsącza, zawieszenie osadu w 10 ml odczynnika TrypLE™ z dodatkiem 10 µl DNazy I, i inkubację w 37°C przez 10 min; (6) ponowne wymieszanie, a następnie wirowanie przy 300 × g przez 5 min; (7) odrzucenie nadsącza.

**Tabela 2.** Skład pożywki „GRP Medium” do hodowli mysich progenitorów glejowych (mGRPs)

Składnik pożywki	Objętość / masa	Producent	Numer katalogowy
DMEM/F-12	500 ml	Thermo Fisher Scientific	11320033
B27 (50X)	10 ml	Thermo Fisher Scientific	17504044
N2 (100X)	5 ml	Thermo Fisher Scientific	17502048
Albumina surowicy bydłej (ang. <i>bovine serum albumin</i> , BSA)	0,5 g	Sigma	A7030
Heparyna (50 mg/ml)	10,4 µl	Sigma	H3149
Penicylina/streptomycyna (10 000 U/ml)	5 ml	Thermo Fisher Scientific	15140122

#### 4.2. Selektywna hodowla pierwotna mGRPs

Wyizolowane komórki zawieszano w pożywce GRP Medium z dodatkiem 20 ng/ml zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF; Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA). Komórki wyizolowane z 8 płodów myszy wysiewano proporcjonalnie do 3 butelek hodowlanych T25 (Corning, Somerville, MA, USA) pokrytych poli-L-lizyną (PLL; Thermo Fisher Scientific) i lamininą (LAM; Thermo Fisher Scientific). Tak założoną hodowlę prowadzono w standardowych warunkach (37°C, 95% wilgotności, 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). Wymianę pożywki na świeżą przeprowadzano co 48 godzin. Hodowlę komórek monitorowano regularnie z użyciem odwróconego mikroskopu świetlnego (Carl Zeiss, Jena, Niemcy), a dokumentację prowadzono rejestrując obrazy komórek za pomocą aparatu fotograficznego (Canon, Tokio, Japonia). Po osiągnięciu przez komórki 80% konfluencji przeprowadzano pasaż. W tym celu odciągano pożywkę hodowlaną, przemywano komórki roztworem buforowanej fosforanem soli fizjologicznej o pH 7,4 (PBS; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), dodawano do komórek odczynnik TrypLE™ o temperaturze 37°C, i inkubowano w temp. 37°C przez 3-5 min. Po tym czasie enzym unieczynniano poprzez dodanie analogicznej objętości świeżej pożywki GRP Medium. Otrzymaną zawiesinę odwirowywano przy 300 × g przez 5 min, a po odrzuceniu nadsącza pozostałe w osadzie komórki liczone przy użyciu komory Bürkera i wysiewano do butelek hodowlanych T75 (Corning) pokrytych PLL/LAM, w gęstości 6 × 10<sup>4</sup> komórek/cm<sup>2</sup>. Komórki te określano, jako P1, po kolejnej procedurze pasażowania, jako P2 itd. Podczas pasażu komórki wybiórczo sprawdzono na obecność zakażenia bakteriami z rodzaju *Mycoplasma* za pomocą testu MycoSPY® (Biontix Laboratories, Monachium, Niemcy), zgodnie z protokołem producenta. Komórki zamrażano w gęstości 6 × 10<sup>6</sup> komórek/probówkę mrożeniową w komercyjnej pożywce do mrożenia ATCC Freezing Medium (ATCC, Manassas, VA, USA). Tak zamrożone komórki przenoszono na 24 godziny do temperatury -80°C, a następnie do -150°C do fazy gazowej ciekłego azotu, gdzie przechowywane były do czasu dalszych analiz.

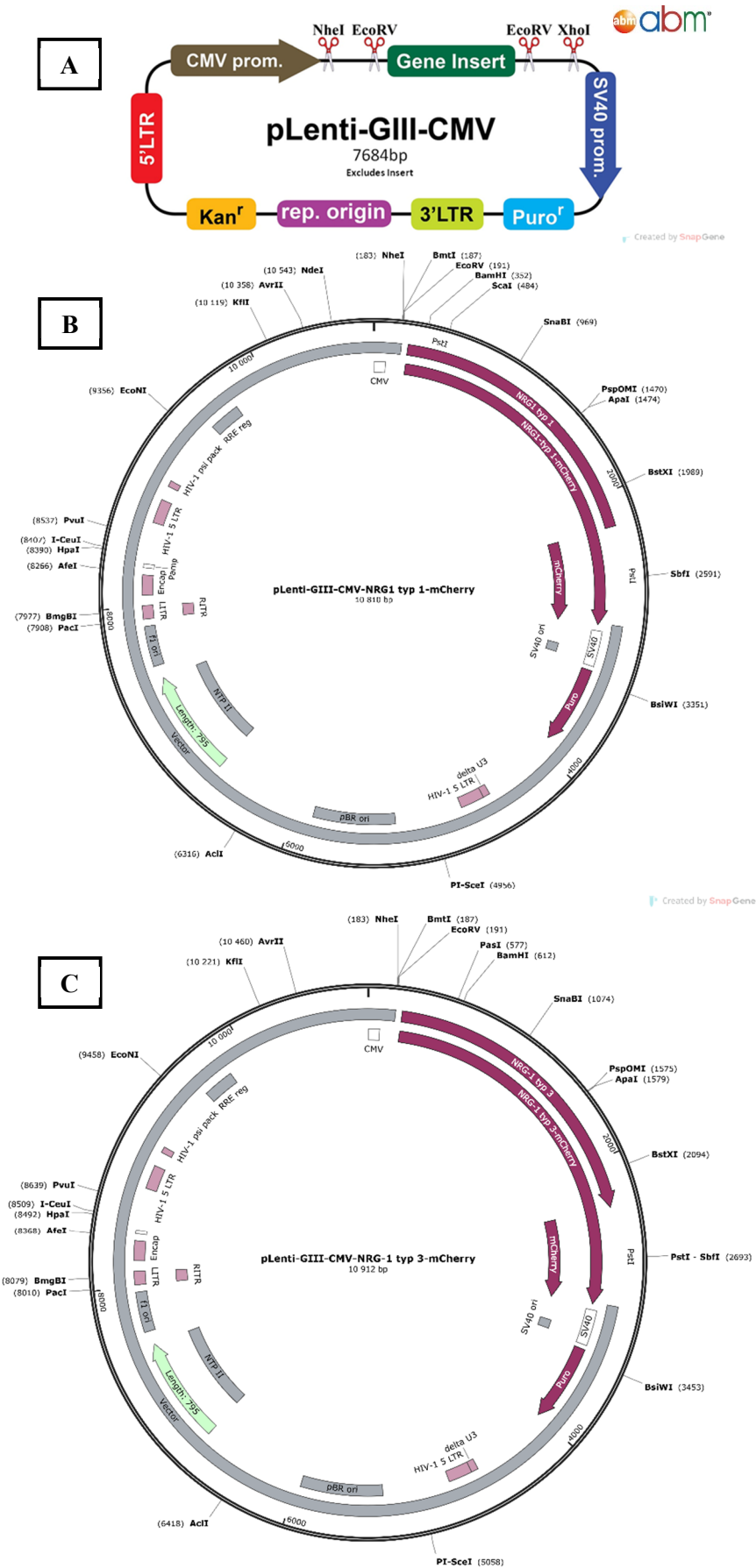
### 4.3. Nadekspresja NRG-1 w mGRPs

#### 4.3.1. Metody wywołania nadekspresji z użyciem lentiwirusowych wektorów ekspresyjnych

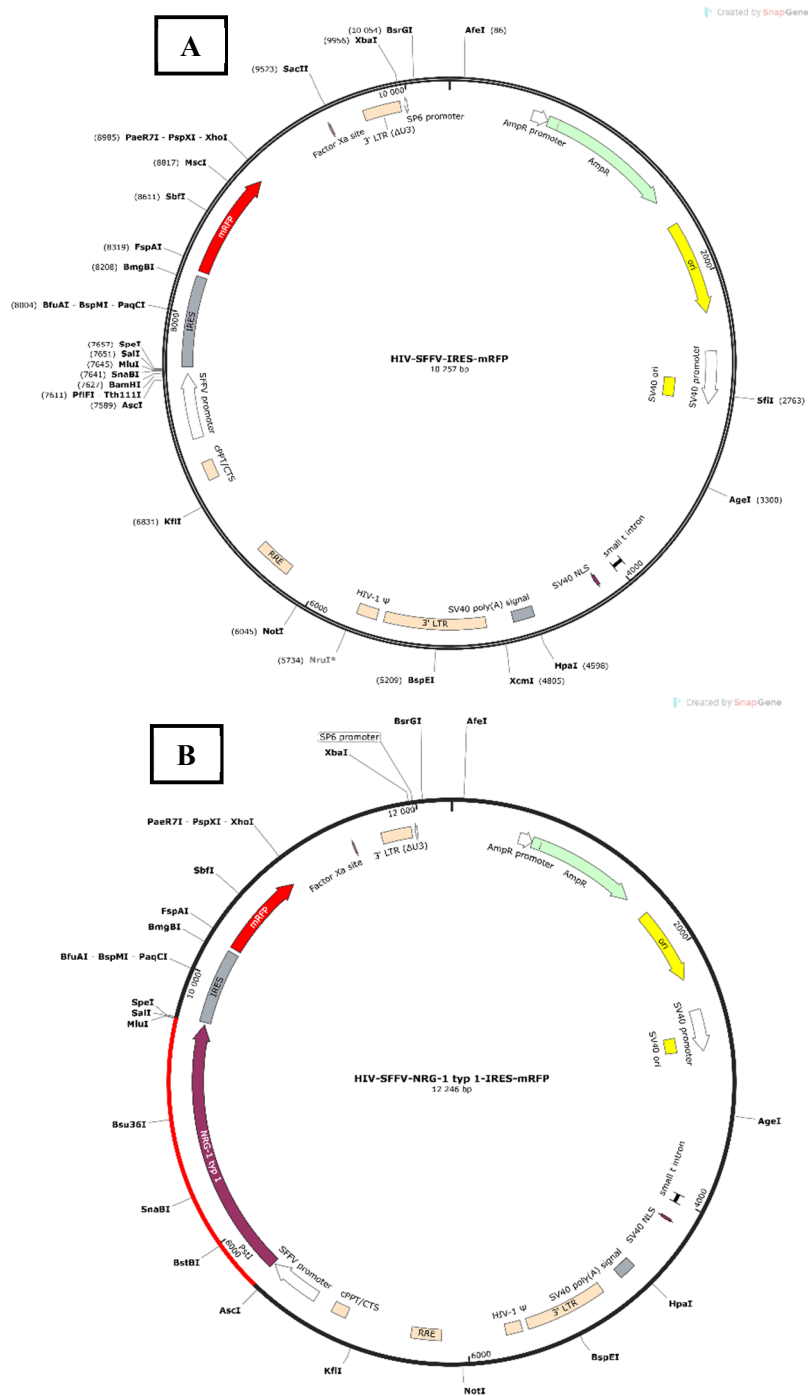
##### 4.3.1.1. Wektory lentiwirusowe

W celu wywołania nadekspresji NRG-1 w mGRPs wykorzystano dwa lentiwirusowe wektory ekspresyjne trzeciej generacji:

- wektor pLenti-GIII-CMV, dostarczony przez firmę Applied Biological Materials Inc. (ABM, Richmond, BC, Kanada) (**Ryc. 4A**), sklonowany i zsekwencjonowany przez firmę A&A Biotechnology (Gdańsk, Polska). Pod promotorem CMV umieszczona została sekwencja cDNA NRG-1 typu I z myszy, w fuzji z białkiem reporterowym mCherry pozwalającym na identyfikację komórek stransdukowanych (Shu i in., 2006), a pod promotorem SV40 gen oporności na puromycynę (Luna i in., 1988; Vara, Portela, Ortin i Jimenez, 1986). Równolegle, jako kontrolę sklonowano analogiczny wektor kodujący pod promotorem CMV sekwencję cDNA NRG-1 typu III z myszy, w fuzji z mCherry. Sekwencje cDNA mysiej NRG-1 typu I i NRG-1 typu III uzyskano od Dr. Markusa H. Schwab'a (Hannover Medical School, Hannover, Niemcy). Mapy genetyczne pełnych wektorów lentiwirusowych (pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry i pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ III-mCherry) przygotowano za pomocą oprogramowania SnapGene (GSL Biotech, Boston, MA, USA), i przedstawiono na **Ryc. 4B, C**.
- wektor HIV-SFFV-IRES-mRFP, dostarczony i sklonowany przez dr Agnieszkę Graczyk-Jarzynkę (Pracownia Immunologii, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk). Pod jednym promotorem SFFV (ang. *spleen focus-forming virus*) umieszczone zostały sekwencje cDNA NRG-1 typu I oraz białka reporterowego mRFP (ang. *monomeric red fluorescent protein*), pozwalającego na identyfikację komórek stransdukowanych, przedzielone sekwencją IRES (ang. *Internal Ribosome Entry Site*) (Pelletier i Sonenberg, 1988; Jang i in., 1988), umożliwiającą ko-ekspresję obydwu sekwencji pod kontrolą transkrypcyjną wspólnego promotora, lecz z niezależnie zachodzącą translacją. Jako kontrolę stosowano bazowy wektor kodujący samą sekwencję białka reporterowego mRFP (HIV-SFFV-IRES-mRFP). Mapy genetyczne wektorów lentiwirusowych HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP i HIV-SFFV-IRES-mRFP przygotowano za pomocą oprogramowania SnapGene i przedstawiono na **Ryc. 5A, B**.



**Rycina 4.** Mapy genetyczne wektorów lentiwirusowych (A) pLenti-GIII-CMV (<https://www.abmgood.com/>), (B) pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry i (C) pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ III-mCherry.



**Rycina 5.** Mapy genetyczne wektorów lentiwirusowych (A) HIV-SFFV-IRES-mRFP i (B) HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP.

#### 4.3.1.2. Przygotowanie wektorów lentiwirusowych

W celu przygotowania wektorów lentiwirusowych na szalkę o średnicy 10 cm (Nunc, Thermo Fisher Scientific) wysiewano 2,8 mln komórek HEK 293T i hodowano w pożywce DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Thermo Fisher Scientific) bez antybiotyków, w standardowych warunkach, do uzyskania przez komórki 30% konfluencji. W dniu transfekcji pożywkę zmieniano na OptiMEM™ (Thermo Fisher Scientific) z dodatkiem 5% płodowej surowicy bydlęcej (FBS, ang. *fetal bovine serum*), w objętości 9 ml/szalka. W oddzielnych naczyniach przygotowywano roztwory plazmidów [0,5 ml

OptiMEM™ + 4 µg plazmidu pakującego psPAX2 (Plasmid #12260; Addgene, Watertown, MA, USA) + 2,5 µg plazmidu pMD2.G (Plasmid #12259; Addgene), kodującego otoczkę z wirusa VSV-G + 4 µg odpowiedniego plazmidu (pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry, pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ III-mCherry, HIV-SFFV-IRES-mRFP lub HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP) oraz odczynnika do transfekcji [0,5 ml OptiMEM™ + 31,5 µl polietylenoiminy (PEI) w stężeniu 1 mg/ml]. Następnie roztwór PEI dodawano do roztworu plazmidu, mieszano i inkubowano przez 15 min w RT w celu utworzenia kompleksów. Na koniec, po 1 ml mieszaniny kompleksów plazmidów z PEI dodawano do komórek HEK 293T poprzez nakrapianie, do całkowitej objętości 10 ml. Tak transfekowane komórki inkubowano przez 16 h w standardowych warunkach hodowlanych. Po tym czasie pożywkę z mieszaniną transfekcyjną zamieniano na 6 ml świeżej pożywki DMEM z dodatkiem 5% FBS, bez antybiotyków. Hodowlę kontynuowano przez 48 h w standardowych warunkach. Po tym czasie pożywkę z komórek, zawierającą spakowane wektory wirusowe, zbierano, filtrowano przez filtr strzykawkowy o wielkości porów 0,45 µm, wirowano w celu zatężenia przy  $2\,500 \times g$  przez 16 h w 10°C, i zamrażano w temperaturze -80°C.

#### 4.3.1.3. Transdukcja mGRPs z użyciem LVs

W pierwszym dniu eksperymentu mGRPs w pasażu pierwszym wysiewano na 6-dołkowych szalkach hodowlanych (Corning) pokrytych PLL/LAM, w gęstości  $6 \times 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup>, w pożywce GRP Medium z dodatkiem 20 ng/ml bFGF. Hodowlę prowadzono w 3 ml pożywki do czasu osiągnięcia przez komórki 50% konfluencji. W dniu transdukcji mieszaninę spakowanych wektorów wirusowych (pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry, pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ III-mCherry, HIV-SFFV-IRES-mRFP lub HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP) rozmrażano na lodzie. Transdukcję rozpoczynano usuwając z każdego dołka hodowlanego po 1 ml pożywki i dodając przez nakrapianie po 1 ml odpowiedniej mieszaniny wektorów wirusowych. Na tym etapie, podczas optymalizacji protokołu transdukcji przetestowano także dwie modyfikacje, polegające na użyciu polibrenu (bromku heksadimetryny) oraz dodatkowy etap spinokulacji. Polibren zwiększa wiązanie pomiędzy kapsydem wirusa a błoną komórki poprzez zobojętnienie ładunku elektrycznego, tym samym zwiększając wydajność transdukcji. Zastosowanie polibrenu (nr kat. sc-134220, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) polegało na dodaniu go do pożywki hodowlanej w stężeniu 2 µg/ml przed rozpoczęciem transdukcji. Z kolei spinokulacja polega na wirowaniu naczynia zawierającego transdukowane komórki i mieszaninę wektorów wirusowych w celu fizycznej stymulacji wiązania wirusów do powierzchni komórek. Spinokulację prowadzono w warunkach 32°C przy  $500 \times g$  przez 1 h. Tak rozpoczętą transdukcję prowadzono w standardowych warunkach hodowlanych przez 24 godziny. Po tym czasie pożywkę z komórek usuwano, dodawano świeżą pożywkę GRP Medium z 20 ng/ml bFGF w objętości 2 ml, oraz ponownie po 1 ml odpowiedniej mieszaniny wektorów wirusowych przez nakrapianie. Transdukcję kontynuowano przez kolejne 24 godziny w standardowych warunkach hodowlanych. Po tym czasie całą pożywkę wymieniano na świeżą GRP Medium z 20 ng/ml bFGF, i kontynuowano hodowlę do osiągnięcia przez komórki 80% konfluencji. Następnie komórki pasażowano z użyciem odczynnika TrypLE™ na butelki hodowlane T25 w proporcji 1:3 i kontynuowano hodowlę przez kolejne 48 godzin. W każdym z trzech wariantów eksperymentalnych rozpoczynano regularne obrazowanie komórek z użyciem mikroskopu Axio Cell Observer SD z oprogramowaniem ZEN Black (Carl Zeiss) w Laboratorium Zaawansowanych Technik Mikroskopowych w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN, w celu identyfikacji ekspresji fluorescencyjnych białek reporterowych mCherry (CMV-NRG-1 typ I-mCherry i CMV-NRG-1 typ III-mCherry) lub mRFP (HIV-SFFV-IRES-mRFP i SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP). Po osiągnięciu przez komórki transdukowane wektorem SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP 80% konfluencji materiał zbierano i zamrażano (**Rozdz. 4.2**) lub analizowano przy pomocy technik RT-qPCR (ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym, ang. *real time quantitative polymerase chain reaction*)

(**Rozdz. 4.7**) oraz cytometrii przepływowej (**Rozdz. 4.6**). W przypadku komórek transdukowanych wektorami CMV-NRG-1 typ I-mCherry oraz CMV-NRG-1 typ III-mCherry, po osiągnięciu przez nie 80% konfluencji rozpoczynano selekcję antybiotykową poprzez dodanie do pożywki puromycyny (2 µg/ml; Santa Cruz Biotechnology). Po osiągnięciu przez wyselekcjonowane komórki 80% konfluencji materiał zbierano i zamrażano (**Rozdz. 4.2**) lub analizowano przy pomocy technik RT-qPCR (**Rozdz. 4.7**) oraz cytometrii przepływowej (**Rozdz. 4.6**).

#### 4.3.2. Metoda wywołania nadekspresji z użyciem lentiwirusowych cząstek aktywacyjnych

##### 4.3.2.1. System lentiwirusowych cząstek aktywacyjnych (LAPs)

W celu wywołania nadekspresji NRG-1 w mGRPs wykorzystano także system lentiwirusowych cząstek aktywacyjnych (ang. *lentiviral activation particles*, LAPs) (Koneremann i in., 2015). Cząstki aktywacyjne projektowane są dla konkretnego genu (w tym przypadku NRG-1) i kodują synergistyczny mediator aktywacji (ang. *synergistic activation mediator*, SAM). System oparty jest o mieszaninę trzech wektorów lentiwirusowych:

- Lenti dCas9-VP64-Blast, kodujący inaktywowaną nukleazę Cas9 (dCas9) połączoną z domeną aktywacyjną działającą w układzie trans (VP64), oraz gen oporności na blastycydynę;
- Lenti MS2-P65-HSF1-Hygro, kodujący białko fuzyjne MS2-P65-HSF1 zwiększające wydajność aktywacji transkrypcji, oraz gen oporności na hygromycynę;
- Lenti sgRNA (MS2)-Puro, kodujący: (i) 20-nukleotydową, niekodującą sekwencję gRNA (ang. *guide RNA*), kierującą kompleks SAM do specyficznego miejsca w genomie (w tym przypadku promotor NRG-1); (ii) rusztowanie gRNA (ang. *gRNA scaffold*) składające się z motywu pętli MS2, uczestniczące w wiązaniu białka MS2-P65-HSF1 w docelowym miejscu w genomie; (iii) genu oporności na puromycynę.

W wyniku jednoczesnej transdukcji w komórce docelowej wszystkich trzech wektorów wchodzących w skład systemu LAPs ekspresji ulega kompleks SAM. Wiąże się on w odległości 200-250 nukleotydów powyżej miejsca inicjacji transkrypcji i stymuluje wiązanie czynników transkrypcyjnych, zwiększając ekspresję genu, do którego zaprojektowana została sekwencja gRNA (w tym przypadku NRG-1).

Komercyjny zestaw: „Neuregulin-1 Lentiviral Activation Particles (Neuregulin-1-LAPs)” (nr kat. sc-431734-LAC), oraz dwa zestawy kontrolne „Control Lentiviral Activation Particles” (Control-LAPs) (nr kat. sc-437282) i „copGFP Control Lentiviral Particles” (copGFP-LAPs) (nr kat. sc-108084) zakupione zostały w firmie Santa Cruz Biotechnology. „Control Lentiviral Activation Particles” (Control-LAPs) zawierał analogiczną mieszaninę lentiwirusów w porównaniu do Neuregulin-1-LAPs, z różnicą polegającą na kodowaniu przez wektor Lenti sgRNA (MS2)-Puro niespecyficznej sekwencji gRNA (ang. *scrambled gRNA*). Natomiast copGFP-LAPs kodował białko reporterowe copGFP (białko zielonej fluorescencji z widłonoga, ang. *copepod green fluorescent protein*), pozwalające na określenie wydajności transdukcji poprzez wizualizację fluorescencji w komórkach stransdukowanych. W eksperymentach posłużono się również następującymi odczynnikami: puromycyna (nr kat. sc-108071), blastycydyna (nr kat. sc-495389), hygromycyna B (nr kat. sc-29067), oraz przeciwciało pierwszorzędowe anty-neuregulina-1 o izotypie IgG2b z myszy (nr kat. sc-393006) (Santa Cruz Biotechnology) (**Rozdz. 4.8.5.**).

##### 4.3.2.2. Transdukcja mGRPs z użyciem LAPs

System lentiwirusowych cząstek aktywacyjnych przetestowany został zgodnie z rekomendacjami producenta. W pierwszym dniu eksperymentu mGRPs w pasażu pierwszym



wysiewano na 6-dołkowych szalkach hodowlanych (Corning) pokrytych PLL/LAM, w gęstości  $6 \times 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup>, w pożywce GRP Medium z dodatkiem 20 ng/ml bFGF. Hodowlę prowadzono w 3 ml pożywki do czasu osiągnięcia przez komórki 50% konfluencji. Mieszanina Neuregulin-1-LAPs rozmrażana była w RT i mieszana była bezpośrednio przed użyciem przez pipetowanie. 10  $\mu$ l mieszaniny LAPs mieszano z 3 ml pożywki hodowlanej i наносono na powierzchnię komórek poprzez nakraplanie. Równolegle, oddzielne mGRPs na tej samej szalce hodowlanej posłużyły do przygotowania w analogiczny sposób dwóch niezależnych kontroli: (i) mGRPs + Control-LAPs: w celu sprawdzenia wpływu samej transdukcji lentiwirusowych cząstek aktywacyjnych na hodowlę mGRPs, oraz (ii) mGRPs + copGFP-LAPs: w celu określenia wydajności transdukcji. Tak zainicjowaną transdukcję prowadzono przez 24 godziny w standardowych warunkach hodowlanych. Następnego dnia pożywkę z wektorami lentiwirusowymi zastępowano świeżą pożywką hodowlaną i kontynuowano hodowlę przez kolejne 24 godziny. Kolejnego dnia komórki z szalki 6-dołkowej pasażowano z użyciem odczynnika TrypLE™ na butelki hodowlane T25 w proporcji 1:3 i kontynuowano hodowlę (2 butelki/wariant). Po 48 godzinach rozpoczynano selekcję antybiotykową w jednej z butelek/wariant. W tym celu mGRPs transdukowane Neuregulin-1-LAPs oraz mGRPs transdukowane Control-LAPs hodowano w pożywce z dodatkiem trzech antybiotyków: puromycyny (2  $\mu$ g/ml), hygromycyny B (200  $\mu$ g/ml) oraz blastycydyny (1  $\mu$ g/ml). Z kolei mGRPs transdukowane copGFP-LAPs hodowano w pożywce z dodatkiem puromycyny (2  $\mu$ g/ml). Po osiągnięciu przez komórki w drugiej butelce 80% konfluencji materiał zbierano i analizowano przy pomocy techniki Western Blot (**Rozdz. 4.8**), stosując przeciwciała pierwszorzędowe anti-neuregulina-1 z myszy. Równolegle na każdym etapie prowadzono obrazowanie komórek z użyciem mikroskopu Axio Cell Observer SD z oprogramowaniem ZEN Black (Carl Zeiss) w Laboratorium Zaawansowanych Technik Mikroskopowych w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN.

#### 4.4. Suplementacja mGRPs egzogenną neureguliną-1

W celu zbadania wpływu egzogennej neureguliny-1 na fenotyp mGRPs *in vitro* komórki hodowano w pożywce suplementowanej komercyjnym, rekombinowanym peptydem neureguliny-1 (rmNRG-1) z myszy (nr kat. 9875-NR-050, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). mGRPs z pierwszego pasaży rozmrażano i wysiewano do butelek hodowlanych T25 pokrytych PLL/LAM, w gęstości  $6 \times 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup>, w pożywce GRP Medium z dodatkiem 20 ng/ml bFGF, w trzech wariantach: (1) z dodatkiem 10 ng/ml peptydu rmNRG-1 (Gomis-Coloma i in., 2018); (2) z dodatkiem 50 ng/ml peptydu rmNRG-1 (Cornelison i in., 2018); (3) niesuplementowanych (kontrola). Hodowlę prowadzono równolegle w analogiczny sposób jak opisano powyżej, tj. w standardowych warunkach hodowlanych, z wymianą pożywki na świeżą, co 48 godzin, i pasażowaniem po osiągnięciu przez komórki 80% konfluencji z użyciem odczynnika TrypLE™. Suplementację prowadzono przez 10-14 dni, na przekroju dwóch kolejnych pasaży.

#### 4.5. Analiza fenotypowa komórek za pomocą badań immunocytochemicznych

Fenotyp mGRPs określono za pomocą barwień immunocytochemicznych (ICC). Komórki mGRPs wysiewano na 24-dołkowych szalkach hodowlanych (Corning) pokrytych PLL/LAM, w gęstości  $6 \times 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup>. Wymianę pożywki na świeżą przeprowadzono, co drugi dzień. Hodowlę prowadzono do uzyskania przez komórki 60% konfluencji. Następnie komórki utrwalano 4% roztworem paraformaldehydu (PFA; Sigma) przez 20 min w RT (temperatura pokojowa), przemywano trzykrotnie roztworem PBS, i inkubowano w roztworze blokującym (10% surowicy koziej, 5% BSA, 0,25% Triton X-100; Thermo Fisher Scientific, Waltham) przez 60 min w RT. Do barwienia przez noc w 4°C stosowano przeciwciała pierwszorzędowe scharakteryzowane w **Tab. 3**. Następnego dnia komórki płukano trzykrotnie w PBS i inkubowano przez 60 min w RT, w ciemności, z odpowiednimi przeciwciałami drugorzędowymi skoniugowanymi z fluorochromami, scharakteryzowanymi w **Tab. 4**.

Jądra komórek były barwione w roztworze 5 µg/ml 4',6-diamidyno-2-fenylindolu (DAPI; Thermo Fisher Scientific) przez 5 min w RT, w ciemności. Na preparaty komórkowe nakładano szkiełka nakrywkowe, zamykano przy użyciu preparatu Dako Fluorescence Mounting Medium (DAKO, Jena, Niemcy) i obrazowano przy użyciu mikroskopu Axio Cell Observer SD z oprogramowaniem ZEN Black (Carl Zeiss) w Laboratorium Zaawansowanych Technik Mikroskopowych w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN. Wszystkie barwienia wykonywano w trzech powtórzeniach, a barwienia komórek z użyciem tych samych przeciwciał powtarzano dwu- lub trzykrotnie.

**Tabela 3.** Lista przeciwciał pierwszorzędowych stosowanych w analizach immunocytochemicznych

Przeciwciało	Gospodarz	Typ	Izotyp	Stężenie	Producent	Numer katalogowy
anty-Olig1	królik	poliklonalne	IgG	1:500	Merck	AB15620
anty-Olig2	królik	poliklonalne	IgG	1:500	Merck	ABN899
anty-Ki67	mysz	monoklonalne	IgG1	1:1	Leica Biosystems	PA0118
anty-PDGFR $\alpha$	królik	poliklonalne	IgG	1:200	Santa Cruz Biotechnology	sc-338
anty-A2B5	mysz	monoklonalne	IgM	1:200	Merck	MAB312R
anty-GFAP	królik	poliklonalne	IgG	1:200	Dako	Z0334
anty-NG2	królik	poliklonalne	IgG	1:200	Merck	AB5320
anty-neuregulina-1	mysz	monoklonalne	IgG2b	1:100	Santa Cruz Biotechnology	sc-393006
anty- $\beta$ -tubulina III	mysz	monoklonalne	IgG2a	1:200	Sigma	T8578
anty-GalC	mysz	monoklonalne	IgG3	1:200	Merck	MAB342
anty-MBP	szczur	monoklonalne	IgG2a	1:200	BioRad	MCA409S

**Tabela 4.** Lista przeciwciał drugorzędowych stosowanych w analizach immunocytochemicznych

Przeciwciało	Gospodarz	Izotyp	Fluorochrom	Stężenie	Producent	Numer katalogowy
anty-kurczak	koza	IgG (H+L)	Alexa Fluor 488	1:500	Thermo Fisher Scientific	A11039
anty-mysz	koza	IgG1	Alexa Fluor 488	1:500	Thermo Fisher Scientific	A21121
anty-mysz	koza	IgG3	Alexa Fluor 488	1:500	Thermo Fisher Scientific	A21151
anty-mysz	koza	IgM	Alexa Fluor 488	1:500	Thermo Fisher Scientific	A21042
anty-szczur	koza	IgG (H+L)	Alexa Fluor 488	1:500	Thermo Fisher Scientific	A11006
anty-kurczak	koza	IgG (H+L)	Alexa Fluor 546	1:500	Thermo Fisher Scientific	A11040
anty-królik	koza	IgG (H+L)	Alexa Fluor 546	1:500	Thermo Fisher Scientific	A11035
anty-królik	koza	IgG (H+L)	Alexa Fluor 633	1:500	Thermo Fisher Scientific	A21070
anty-mysz	koza	IgG (H+L)	Alexa Fluor 633	1:500	Thermo Fisher Scientific	A21052

#### 4.6. Analiza fenotypowa mGRPs z użyciem cytometrii przepływowej

Fenotyp mGRPs analizowany był dodatkowo z użyciem cytometrii przepływowej. W tym celu, mGRPs wysiewano w butelkach hodowlanych T25 pokrytych PLL/LAM, w gęstości  $6 \times 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup>. Wymianę pożywki na świeżą przeprowadzano, co drugi dzień. Hodowlę prowadzono do uzyskania przez komórki 80% konfluencji, odklejone komórki liczone z użyciem komory Bürkera, przepłukiwano dwukrotnie z użyciem roztworu PBS, i wirowano przy  $300 \times g$  przez 5 min w RT. Następnie osad komórek zawieszano w roztworze PBS z dodatkiem 5 mM kwasu etylenodiaminotetraoctanowego (EDTA), 1-procentowej surowicy bydlęcej oraz odpowiednich przeciwciał sprzężonych z fluorochromami, zgodnie z zaleceniami producentów. 100 µl buforu wykorzystywano na każde  $5 \times 10^5$  komórek. Listę przeciwciał zastosowanych w analizie cytometrycznej przedstawiono w **Tab. 5**. Komórki zawieszono w buforze z przeciwciałami inkubowano w ciemności przez 30 min w RT. Po zakończeniu inkubacji, w celu usunięcia niezwiązanych przeciwciał zastosowano dwa cykle wirowania przy  $300 \times g$  przez 5 min w RT z wymianą buforu. Do uzyskanego osadu barwionych komórek dodawano na koniec 300 µl roztworu PBS. Pomiar fluorescencji komórek prowadzono z użyciem aparatu BD Canto II oraz oprogramowania FACSDiva software (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), stosując skompensowane parametry. Strategia bramkowania populacji na wykresach oparta była o porównanie sygnału fluorescencyjnego generowanego przez analizowane komórki względem populacji komórek negatywnych. Dodatkowo dokonywano pomiaru względnej wielkości (ang. *forward scatter*, FSC) oraz ziarnistości komórek (ang. *side scatter*, SSC). Intensywność fluorescencji przedstawiano, jako średnią dla  $10^4$  komórek, uzyskaną w dwóch powtórzeniach.

**Tabela 5.** Lista przeciwciał użytych w analizie z użyciem cytometrii przepływowej

Przeciwciało	Gospodarz	Typ	Izotyp	Fluorochrom	Producent	Numer katalogowy
anty-PDGFR $\alpha$	szczur	monoklonalne	IgG2a	BV421	BD Biosciences	562774
anty-A2B5	mysz	monoklonalne	IgM	Alexa Fluor 647	BD Biosciences	563776
anty-NG2	człowiek	monoklonalne	IgG1	Fikoerytryna (PE)	Miltenyi Biotec	130-123-730
anty-O4	człowiek	monoklonalne	IgG1	VioBright 515	Miltenyi Biotec	130-120-016

#### 4.7. Analiza ekspresji genu *NRG-1* w mGRPs z zastosowaniem metody RT-qPCR

##### 4.7.1. Izolacja RNA

Ekspresja mRNA wybranych genów w mGRPs analizowana była z użyciem metody ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *real-time quantitative polymerase chain reaction*, RT-qPCR). W tym celu, mGRPs hodowano w butelkach hodowlanych T75 pokrytych PLL/LAM. Wymianę pożywki na świeżą przeprowadzano co drugi dzień. Hodowlę prowadzono do uzyskania przez mGRPs 80% konfluencji, wtedy komórki zbierano, liczone je z użyciem komory Bürkera, i zwirowywano przy  $300 \times g$  przez 5 min w RT. 1 milion komórek zawieszano w 800 µl roztworu Fenzol (A&A Biotechnology), a następnie zamrażano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  do czasu dalszej analizy. Izolacja całkowitego RNA odbywała się z wykorzystaniem komercyjnego zestawu Total RNA Mini (A&A Biotechnology), zgodnie z zaleceniami producenta. Czystość i stężenie uzyskanych próbek RNA mierzono z użyciem spektrofotometru NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific). Do dalszych analiz wykorzystywano wyłącznie próbki RNA o proporcji współczynników  $A_{260}/A_{280} > 1,8$  i  $A_{260}/A_{230} > 1,8$ .

#### 4.7.2. Synteza cDNA

W celu syntezy komplementarnej nici cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji wykorzystywano zestaw High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), stosując za każdym razem 4 µg całkowitego RNA, zgodnie z zaleceniami producenta.

#### 4.7.3. Reakcja qPCR

Reakcje qPCR prowadzono w aparacie StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) z użyciem sond typu TaqMan (Applied Biosystems), zgodnie z zaleceniami producenta. Reakcje prowadzono w wodzie wolnej od RNaz w objętości 20 µl, a w skład mieszaniny reakcyjnej wchodziło: 200 ng cDNA, po 250 nM sond TaqMan, oraz po 500 nM starterów Forward i Reverse. Sekwencje użytych starterów zaprojektowano przy użyciu oprogramowania StepOne v2.2.2. (Applied Biosystems). Sekwencje użytych starterów zaprezentowano w **Tab. 6**.

**Tabela 6.** Lista sekwencji starterów i sond TaqMan użytych w reakcji RT-qPCR

Gen	Starter		Sekwencja sondy TaqMan
	Orientacja	Sekwencja 5' – 3'	
Neuregulina 1 typu I (NRG-1 typ I)	Forward (F)	GCTCGTGCTTCGGTGTGA	CCAGCTCTGAGTACTC
	Reverse (R)	CGTTCTTGAACCATTTGAATCTGA	
Apolipoproteina B (ApoB)	Forward (F)	CACGTCGGCTCCAGCATT	CCAATGGTCGGGCACTGCTCAA
	Reverse (R)	TCACCAGTCATTTCTGCCTTTG	

Równolegle analizowano ekspresję genu referencyjnego kodującego apolipoproteinę B (ApoB). Wszystkie reakcje RT-qPCR wykonywano w trzech powtórzeniach technicznych z użyciem oprogramowania StepOne v2.2.2.

#### 4.7.4. Analiza reakcji qPCR

Relatywny poziom ekspresji mRNA obliczano za pomocą oprogramowania Excel (Microsoft Office) z użyciem metody  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak i Schmittgen, 2001), zgodnie z poniższymi wzorami:

$$(1) Ct_{\text{genu badanego}} - Ct_{\text{genu referencyjnego}} = \Delta Ct;$$

$$(2) \Delta Ct_{\text{próbny}} - \Delta Ct_{\text{kalibratora}} = \Delta\Delta Ct;$$

$$(3) \text{stosunek: } 2^{-\Delta\Delta Ct};$$

gdzie Ct – cykl, w którym osiągnięto wartość progową fluorescencji. Jako kalibrator wykorzystywano natywne nie-transdukowane mGRPs. Wyniki normalizowano w oparciu o ekspresję genu referencyjnego kodującego ApoB. Analizy wykonywano w dwóch powtórzeniach i powtarzano trzykrotnie.

#### 4.8. Analiza ekspresji neureguliny-1 w mGRPs przy użyciu metody Western Blot

##### 4.8.1. Izolacja białka

Ekspresja wybranych białek w mGRPs analizowana była z użyciem metody Western Blot. W tym celu, mGRPs hodowano w naczyniach hodowlanych (Corning) pokrytych PLL/LAM. Wymianę pożywki na świeżą przeprowadzano, co drugi dzień. Hodowlę prowadzono do uzyskania przez mGRPs 80% konfluencji, wtedy komórki zbierano, liczone je z użyciem komory Bürkera, i zwirowywano przy  $300 \times g$  przez 5 min w RT. Nadsącz usuwano, a uzyskany osad komórek zamrażano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  do czasu dalszej analizy. W celu izolacji całkowitego białka do osadu komórek dodawano w objętości 1:10 bufor lizujący RIPA [10 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% Nonidet P40; 0,1% dodecylsulfian sodu (SDS); 1% Triton X-100; 0,1 mg/ml fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF)] z dodatkiem inhibitora proteaz i fosfataz (Sigma). Próbki homogenizowano za pomocą szklano-teflonowego homogenizatora ręcznego, a następnie inkubowano na lodzie przez 60 min. Otrzymane lizaty wirowano przez 30 min w  $4^{\circ}\text{C}$  przy  $13\,000 \times g$ , a uzyskany nadsącz przenoszono do czystej próbówki.

##### 4.8.2. Oznaczanie stężenia białka metodą Lowry'ego

Całkowite stężenie białka w nadsączu mierzono metodą Lowry'ego (Lowry, Rosebrough, Farr i Randall, 1951), wykorzystując komercyjny zestaw Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), zgodnie z zaleceniami producenta. Jako próbki referencyjne stosowano BSA w trzech stężeniach:  $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , oraz  $15 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Pomiary spektrofotometryczne wykonywano w objętości  $350 \mu\text{l}$  roztworu białka/dołek w szalce 96-dołkowej (Nunc; Thermo Fisher Scientific) z użyciem aparatu FLUOstar OMEGA (BMG Labtech, Ortenberg, Niemcy) przy długości fali 750 nm. Wartości absorbancji poszczególnych próbek przeliczano względem krzywej wzorcowej zależności absorbancji od stężenia białka za pomocą oprogramowania Excel (Microsoft Office).

##### 4.8.3. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym

W kolejnym etapie dokonywano denaturacji białek poprzez 5-minutową inkubację w temperaturze  $100^{\circ}\text{C}$  z barwnym buforem obciążającym o właściwościach redukujących ( $62,5 \text{ mM}$  Tris-HCl pH 6,8; 10% glicerol; 2% SDS; 1,5%  $\beta$ -merkaptioetanol; 0,05% błękit bromofenolowy), dodawanym w stosunku v:v 1:5 w stosunku do roztworu białka. Elektroforezę jednowymiarową prowadzono w żelu poliakrylamidowym (4% stężenie żelu zagęszczającego; 12% stężenie żelu rozdzielającego), w układzie nie ciągłym, za pomocą zestawu do elektroforezy wertykalnej Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad) w buforze elektrodowym (25 mM Tris; 192 mM glicyna; 0,5% SDS). Do studzienek żelu poliakrylamidowego nakładano po  $10 \mu\text{g}$  białka, a rozdział elektroforetyczny prowadzono przy stałym napięciu prądu wynoszącym  $15 \text{ V}/\text{cm}$  żelu. Dodatkowo na żel nakładano standard wielkości białek Color Prestained Protein Ladder, Broad Range (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Po zakończonym rozdziale żele przepłukiwano wodą dejonizowaną.

##### 4.8.4. Elektrotransfer białek na membranę nitrocelulozową

Mokry elektrotransfer rozdzielonych białek dokonywano na membranę nitrocelulozową Amersham Protran® 0.45  $\mu\text{m}$  NC (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) za pomocą zestawu Criterion Blotter (Bio-Rad) w buforze do transferu (25 mM Tris-HCl pH 8,3; 192 mM glicyna; 20% metanol). Membranę oraz żel umieszczano pomiędzy bibułami Whatman 3 mm i porowatymi materiałami dociskającym w kasecie aparatu, a aparat umieszczano na lodzie. Elektrotransfer prowadzono przez 60 min przy stałym natężeniu prądu wynoszącym 350 mA. Jakość rozdziału elektroforetycznego oceniano wizualnie poprzez obserwację stopnia migracji standardu wielkości białek z żelu na powierzchnię

membrany oraz odwracalne barwienie membrany 1-procentowym roztworem Ponceau S (Sigma) w 0,1-procentowym kwasie octowym. Na koniec membrany płukano w roztworze TBS-T (20 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20), po czym poddawano immunodetekcji.

#### 4.8.5. Immunodetekcja białek

Membrany blokowano z użyciem 5% roztworu odtłuszczonego mleka (Nestle, Vevey, Szwajcaria) w TBS-T, przez 60 min, w RT, na kołysce laboratoryjnej. Immunodetekcję białek prowadzono z zastosowaniem specyficznych przeciwciał pierwszorzędowych, których spis znajduje się w **Tab 7**. Inkubację z przeciwciałami pierwszorzędowymi prowadzono przez noc w temp. 4°C na kołysce laboratoryjnej. Następnego dnia membrany płukano trzykrotnie w roztworze TBS-T, a następnie inkubowano z roztworami przeciwciał drugorzędowych (**Tab. 8**), sprzężonych z peroksydazą chrzanową, zawieszonych w 2,5% roztworze odtłuszczonego mleka w TBS-T, przez 60 min, w RT, na kołysce laboratoryjnej. Dla uwidocznienia reakcji stosowano metodę wzmacnionej chemiluminescencji (ang. *enhanced chemiluminescence*, ECL), wykorzystując komercyjny zestaw ECL Western Blotting Detection System (GE Healthcare), zgodnie z zaleceniami producenta. Sygnał transferowano w ciemności na kliszę Hyperfilm-ECL (GE Healthcare). Poziom białka określano densytometrycznie w zakresie przebiegu liniowego z użyciem densytometru LKB Ultrascan XL, w oparciu o oprogramowanie GelScan i ImageQuantTL (Cytiva). Wyniki normalizowano w oparciu o ekspresję aktyny (AKT).

**Tabela 7.** Lista przeciwciał pierwszorzędowych użytych w celu immunodetekcji białek techniką Western Blot

Przeciwciało	Gospodarz	Typ	Izotyp	Stężenie	Producent	Numer katalogowy
anty-neuregulina-1 (NRG-1)	mysz	monoklonalne	IgG2b	1:100	Santa Cruz Biotechnology	sc-393006
anty-β aktyna (AKT)	królik	poliklonalne	IgG	1:5000	Thermo Fisher Scientific	PA1-16889

**Tabela 8.** Lista przeciwciał drugorzędowych użytych w technice Western Blot. Fab, region wiążący antygen (ang. *fragment, antigen-binding*)

Przeciwciało	Gospodarz	Izotyp	Koniugat	Stężenie	Producent	Numer katalogowy
anty-mysz	koza	IgG (specyficzne wobec Fab)	Peroksydaza chrzanowa	1:8000	Sigma	A2304
anty-królik	koza	IgG	Peroksydaza chrzanowa	1:4000	Sigma	A0545

#### 4.9. Analiza tempa wzrostu mGRPs

W celu oceny tempa wzrostu mGRPs, posłużono się komercyjnym zestawem Cell Counting Kit-8 (CCK-8; Dojindo, Tokio, Japonia), zgodnie z zaleceniami producenta. CCK-8 jest komercyjnym testem kolorymetrycznym określającym aktywność metaboliczną komórek w hodowli. Opiera się on na analizie aktywności dehydrogenazy, która redukuje rozpuszczalną w wodzie sól tetrazolową do formazanu. Formazan jest substancją barwną, a powstająca go ilość jest proporcjonalna do aktywności metabolicznej, co bezpośrednio koreluje z liczbą żywych komórek w hodowli. Intensywność zabarwienia pożywki hodowlanej powstającym formazanem jest mierzona za pomocą spektrofotometru przy długości światła fali 450 nm. Komórki wysiewano w gęstości  $6 \times 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup> na szalkach

96-dołkowych (Corning) pokrytych PLL/LAM, i analizowano w sekwencji czasowej przez 6 kolejnych dni. Hodowle prowadzono w pożywce GRP Medium z dodatkiem 20 ng/ml bFGF, a w przypadku komórek suplementowanych dodatkowo egzogenną neuregulina-1, z dodatkiem 10 ng/ml lub 50 ng/ml peptydu rmNRG-1, w standardowych warunkach hodowlanych. Na dwie godziny przed wykonaniem pomiaru do pożywki, w której hodowano komórki, dodawano odczynnik CCK-8 w stosunku objętościowym 1:10. Pomiar spektrofotometryczny prowadzono z użyciem aparatu FLUOstar OMEGA (BMG Labtech) przy długości fali 450 nm. Uzyskane wartości absorbancji przeliczono względem krzywej wzorcowej, wyznaczonej na podstawie pomiaru absorbancji mGRPs wysianych w różnych gęstościach. Uzyskane wyniki analizowano z użyciem oprogramowania Excel (Microsoft Office). Eksperyment wykonano w trzech niezależnych próbach, w trzech powtórzeniach.

#### 4.10. Analiza zdolności migracyjnych mGRPs *in vitro*

Badania miały charakter wstępny. Eksperymenty wykonywano we współpracy z Zespołem Dr. hab. inż. Macieja Trusiaka z Instytutu Mikromechaniki i Fotoniki Wydziału Mechatroniki Politechniki Warszawskiej. W celu oceny zdolności migracyjnych, mGRPs suplementowane rmNRG-1 przez 7 dni oraz kontrolne (niesuplementowane) pasażowano, i wysiewano w gęstości  $6 \times 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup> na szalkach hodowlanych 35 mm ze szklanym dnem o średnicy 20 mm (nr kat. D35-20-1-N; CellVis, Mountain View, CA, USA), pokrytych PLL/LAM, i hodowano w standardowej pożywce GRP Medium z dodatkiem 20 ng/ml bFGF, a w przypadku komórek suplementowanych dodatkowo egzogenną neuregulina-1, z dodatkiem 10 ng/ml lub 50 ng/ml peptydu rmNRG-1, w standardowych warunkach hodowlanych. Obrazowanie rozpoczynano po osiągnięciu przez komórki 50% konfluencji, z użyciem cyfrowej holograficznej mikroskopii bezsoczewkowej (LDHM, ang. *lensless digital holographic microscopy*), zgodnie z metodyką scharakteryzowaną w pracy Mirecki i wsp. (Mirecki i in., 2022).

LDHM jest metodą mikroskopową pozwalającą na bezinwazyjne obrazowanie w bardzo szerokim polu widzenia (brak limitacji wynikających ze stosowania obiektywu mikroskopowego) mikrostruktur takich jak komórki czy układy mikroelektroniczne. W odróżnieniu od klasycznej mikroskopii, która wykorzystuje układy soczewek do powiększania obrazu, LDHM bazuje na interferencji fali nierozproszonej przez próbkę z falą świetlną rozproszoną po kontakcie z próbką. Źródłem sygnału o obiekcie jest zatem poosiowa technika Gabora. Wynik interferencji, w postaci hologramu, rejestrowany jest w płaszczyźnie detektora, zatem układ wymaga numerycznej korekcji przeogniskowania. Na drodze numerycznej propagacji wstecznej, po uprzednio wyznaczonej odległości propagacji, otrzymywane jest ostre odwzorowane obiektu badanego w płaszczyźnie próbki. Na uwagę zasługują fakt, iż obrazowanie jest realizowane w przestrzeni zespolonego pola optycznego, zatem równo w dziedzinie amplitudy (kontrast determinowany przez lokalną absorpcję obiektu, jak w przypadku mikroskopii jasnego pola), jak i w dziedzinie fazy (kontrast determinowany przez lokalną refrakcję obiektu; fizycznie metoda jest czuła na zmiany zintegrowanej grubości optycznej próbki). LDHM pozwala zatem na dokładne obrazowanie i pomiary wymiarów próbki w czasie rzeczywistym bez konieczności jej utrwalania ani stosowania dodatkowych barwników. Negatywne efekty fotochemiczne są zatem w znacznej mierze zredukowane.

W celu analizy migracji komórek zastosowano klasyczny układ Gabora do nagrywania hologramów poosiowych, z modyfikacją mającą na celu zmniejszenie intensywności lasera fioletowego [lasery CNI MDL-III-405-20 mW,  $\lambda = 405$  nm, FWHM (szerokość połówkowa, ang. *full width at half maximum*) = 23 pm]. Obracający się, liniowy polaryzator znajdujący się między źródłem światła laserowego a obiektywem mikroskopu był używany do zmniejszenia intensywności i kontrolowania reżimu odpowiednio niskiego budżetu fotonowego. Światło zostało wprowadzone do jednomodowego światłowodu przez obiektyw mikroskopu ( $\times 20/0,4$ ). Ze względu na jego wąski rdzeń ( $f_i$  2,5-3,4  $\mu$ m), światłowód jednomodowy zapewniał wysokiej jakości, sferyczny promień światła. Próbka była

umieszczana blisko matrycy CMOS [kamera ALVIUM 1800 U-2050 m mono Bareboard, wielkość piksela  $2,4 \times 2,4 \mu\text{m}$ ,  $5496 \times 3672$  pikseli, FOV (pole widzenia, ang. *field of view*) =  $116 \text{ mm}^2$ ] w celu uzyskania wysokiej apertury numerycznej. Ze względu na szklaną osłonę kamery odległość ta wynosiła ok. 2 mm. Powiększenie takiego ustawienia wynosiło około  $M = 1$ , ze względu na znaczną odległość pomiędzy źródłem punktowym a matrycą CMOS (300 mm). Oświetleniem próbki i zbieraniem hologramów sterowano za pomocą oprogramowania w środowisku LabVIEW (National Instruments, Austin, TX, USA). Na uwagę zasługuje wykorzystanie metody ze składaniem hologramów w celu umożliwienia numerycznie zwiększonego stosunku sygnału do szumu w rekonstrukcji migrujących komórek, co wydatnie zwiększa wiarygodność wyników śledzenia i ich odporność na różnego rodzaju szумы.

Hologramy zapisywane były w odstępie 5 sekund. Obrazowanie prowadzono w trybie ciągłym przez 25 godzin, rejestrując średnią powierzchnię zajmowaną przez komórki i liczbę komórek oraz śledząc komórki na obszarze  $116 \text{ mm}^2$ . Uzyskane hologramy przetwarzano w środowisku MATLAB (Natick, MA, USA). Na podstawie dystansu pokonanego przez poszczególne komórki w czasie wyznaczano ich prędkość. Eksperyment przeprowadzono w jednym powtórzeniu biologicznym dla komórek kontrolnych (niesuplementowanych) oraz suplementowanych peptydem rmNRG-1 w stężeniach 10 ng/ml i 50 ng/ml.

#### 4.11. Analiza zdolności mielinizacji mGRPs *in vitro*

##### 4.11.1. Izolacja zwojów korzeni grzbietowych myszy

Procedura izolacji zwojów korzeni grzbietowych myszy przeprowadza była według zmodyfikowanego protokołu scharakteryzowanego w pracy Sleigh i wsp. (2016) (Sleigh, Weir i Schiavo, 2016). Myszy uśmiercono śmiertelną dawką Morbitalu (80 mg/kg masy ciała, *i.p.*). Po ustaniu odruchów zwierzęcia izolowano kręgosłup, a następnie odcinano wybrany odcinek obejmujący środkowe segmenty piersiowe do dolnych segmentów lędźwiowych L5-L6 rdzenia kręgowego. Kolejne etapy procedury odbywały się na lodzie. Wybrany odcinek kręgosłupa przecinano na dwie połowki w płaszczyźnie strzałkowej. Następnie izolowano pojedyncze zwoje poszczególnych korzonków wzdłuż obydwu połówek kręgosłupa, odcinając gałązki centralną i obwodową korzonka od każdego zwoju. Szczegóły metody izolacji zwojów korzeni grzbietowych stanowią przedmiot Wynalazku nr 16/22 pt. „Metoda izolowania rdzenia kręgowego gryzoni”, zarejestrowanego dnia 05.05.2022 w ramach jednostki organizacyjnej: Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej (Własność: Politechnika Gdańska). Izolacje przeprowadzane były każdorazowo z 2-3 myszy. Wyizolowane zwoje korzeni grzbietowych umieszczano na noc w pożywce Hibernat<sup>TM</sup>-A (Thermo Fisher Scientific) w temperaturze 4°C.

##### 4.11.2. Izolacja neuronów ze zwojów korzeni grzbietowych myszy (mDRGs)

Wyizolowane zwoje korzeni grzbietowych myszy stanowiły materiał do izolacji neuronów zwojów korzeni grzbietowych (mDRGs). W pierwszym etapie nadsącz z nad zwojów korzeni grzbietowych usuwano, a tkankę inkubowano w mieszaninie 100  $\mu\text{l}$  kolagenazy (0,1 U) / dyspazy (0,8 U) (Animal Free Collagenase/Dispase Blend I; nr kat. SCR139; Sigma) i 400  $\mu\text{l}$  roztworu PBS bez jonów wapnia i magnezu (DPBS; Thermo Fisher Scientific) w 37°C przez 60 min, co 5 min mieszając. Po opadnięciu strawionej tkanki nadsącz usuwano, zostawiając tkankę w minimalnej objętości roztworu. Następnie, strawioną tkankę zawieszano w 2 ml pożywki Hibernat<sup>TM</sup>-A. Po minucie, niestrawiona tkanka opadała na dno, a zawiesinę strawionych komórek przenoszono do nowej próbówki, zwirowywano przy  $200 \times \text{g}$  przez 5 min w RT, i usuwano nadsącz.



#### 4.11.3. Selektywna hodowla pierwotna mDRGs

Wyzolowane komórki ze zwojów korzeni grzbietowych myszy zawieszano w pożywce DRG Medium (skład pożywki określono w **Tab. 9**) z dodatkiem 25 ng/ml mysiego czynnika wzrostu nerwów (ang. *nerve growth factor*, NGF; Cat. #13290-010, Thermo Fisher Scientific), liczono je przy użyciu komory Bürkera, i wysiewano w gęstości  $10^5$  komórek/cm<sup>2</sup> na 24-dołkowe szalki hodowlane pokryte PLL/LAM. Tak założoną hodowlę prowadzono w standardowych warunkach hodowlanych. Wymianę pożywki na świeżą przeprowadzano, co 72 godziny. Hodowlę komórek monitorowano regularnie z użyciem odwróconego mikroskopu świetlnego (Carl Zeiss), a dokumentację prowadzono rejestrując obrazy komórek za pomocą aparatu fotograficznego (Canon).

**Tabela 9.** Skład pożywki „DRG Medium” do hodowli mysich neuronów zwojów korzeni grzbietowych (mDRGs)

Składnik pożywki	Objętość	Producent	Numer katalogowy
Neurobasal™	500 ml	Thermo Fisher Scientific	21103049
B27 (50X)	10 ml	Thermo Fisher Scientific	17504044
FBS	50 ml	Thermo Fisher Scientific	10500-064
GlutaMAX™ (100X)	5 ml	Thermo Fisher Scientific	35050061
Penicylina/streptomycyna (10 000 U/ml)	5 ml	Thermo Fisher Scientific	15140122

#### 4.11.4. Współhodowle mGRPs i mDRGs

W celu oceny zdolności mielinizacyjnych mGRPs *in vitro*, wykonano niezależne współhodowle kontrolnych i modyfikowanych mGRPs z neuronami mDRGs. W tym celu, w 7 dniu hodowli pierwotnej mDRGs, mGRPs hodowane równolegle zbierano, liczono je przy użyciu komory Bürkera, i wysiewano w gęstości  $6 \times 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup> na powierzchnię adherentnej hodowli mDRGs na szalce 24-dołkowej. W eksperymencie stosowano ponadto dwie równoległe kontrole: (i) pojedyncza hodowla mDRGs; (ii) pojedyncza hodowla mGRPs. Od tego momentu hodowle prowadzone były w pożywce DRG Medium z dodatkiem 25 ng/ml NGF, w standardowych warunkach hodowlanych. Wymianę pożywki na świeżą przeprowadzano, co 48 godzin. Eksperymenty prowadzono przez 7 dni. Po tym czasie komórki utrwalano 4-procentowym roztworem PFA przez 20 min w RT, przemywano trzykrotnie roztworem PBS, i analizowano immunocytochemicznie (**Rozdz. 4.5**).

#### 4.11.5. Analiza poziomu mielinizacji we współhodowli mGRPs i mDRGs

Do oceny poziomu mielinizacji wykorzystano procedurę zaproponowaną przez Kerman'a i wsp. (Kerman i in., 2015). W tym celu współhodowle mGRPs i mDRGs wybarwione immunocytochemicznie w kierunku uwidocznienia mielinizujących oligodendrocytów (MBP<sup>+</sup>) i neuronów ( $\beta$ -tubulina III<sup>+</sup>), obrazowane w mikroskopie fluorescencyjnym pod obiektywem 10 $\times$  przy stałej wartości parametrów zbierania obrazu (**Rozdz. 4.5**), analizowano z użyciem oprogramowania ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) i wtyczki „Computer-assisted Evaluation of Myelination (CEM)”, zaprojektowanej przez Kermana i Padmanabhana, pod kierownictwem Gage'a w Salk Institute, La Jolla, CA, USA. W skrócie: procedurę rozpoczynano od dekompozycji zbiorczych obrazów mikroskopowych na obrazy z poszczególnych kanałów. Na uzyskanych obrazach 16-bitowych z kanałów odpowiadających fluorescencji oligodendrocytów i neuronów ustawiano następnie

automatycznie wartość progową świecenia (ang. *threshold*) i przekształcano je na obrazy binarne (czarno-białe). Poziom mielinizacji definiowano, jako stopień kolokalizacji aksonów i oligodendrocytów. Uzyskane wartości procentowe mielinizacji analizowano z użyciem oprogramowania Excel (Microsoft Office).

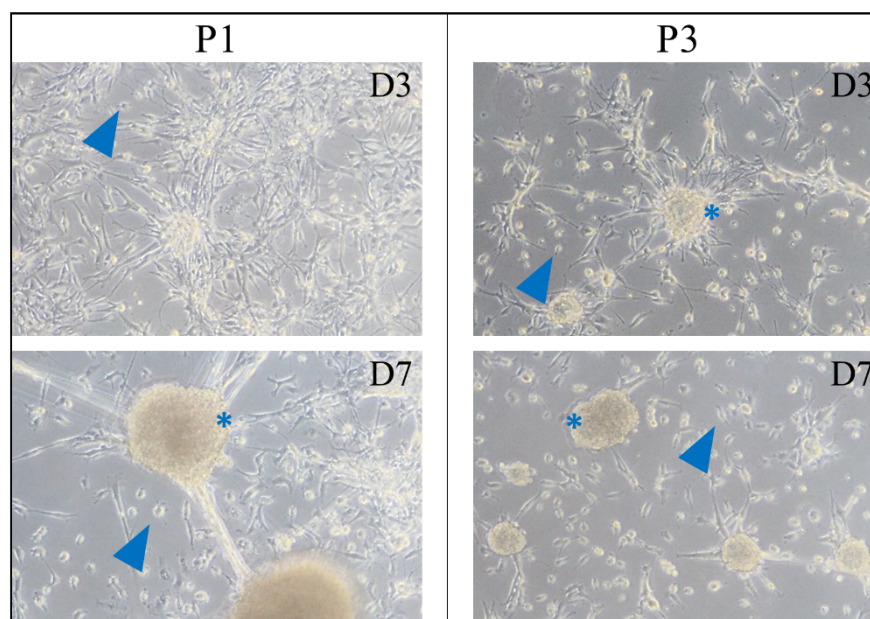
#### 4.12. Analiza statystyczna uzyskanych wyników

Wyniki przedstawiano, jako średnie arytmetyczne z 3 powtórzeń biologicznych, w ramach których wykonywano po 2-3 powtórzenia techniczne,  $\pm$  odchylenie standardowe (SD), chyba że w opisie zaznaczono inaczej. W celu sprawdzenia istotności statystycznych różnic pomiędzy średnimi przeprowadzano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test *post hoc* wielokrotnych porównań Tukey'a. Do wszystkich analiz stosowano program Graph Pad Prism 7.04 (San Diego, CA, USA). Poziom istotności mniejszy niż 0,05 przyjmowano za statystycznie istotny.

## 5. Wyniki badań

### 5.1. Ocena fenotypu natywnych mGRPs

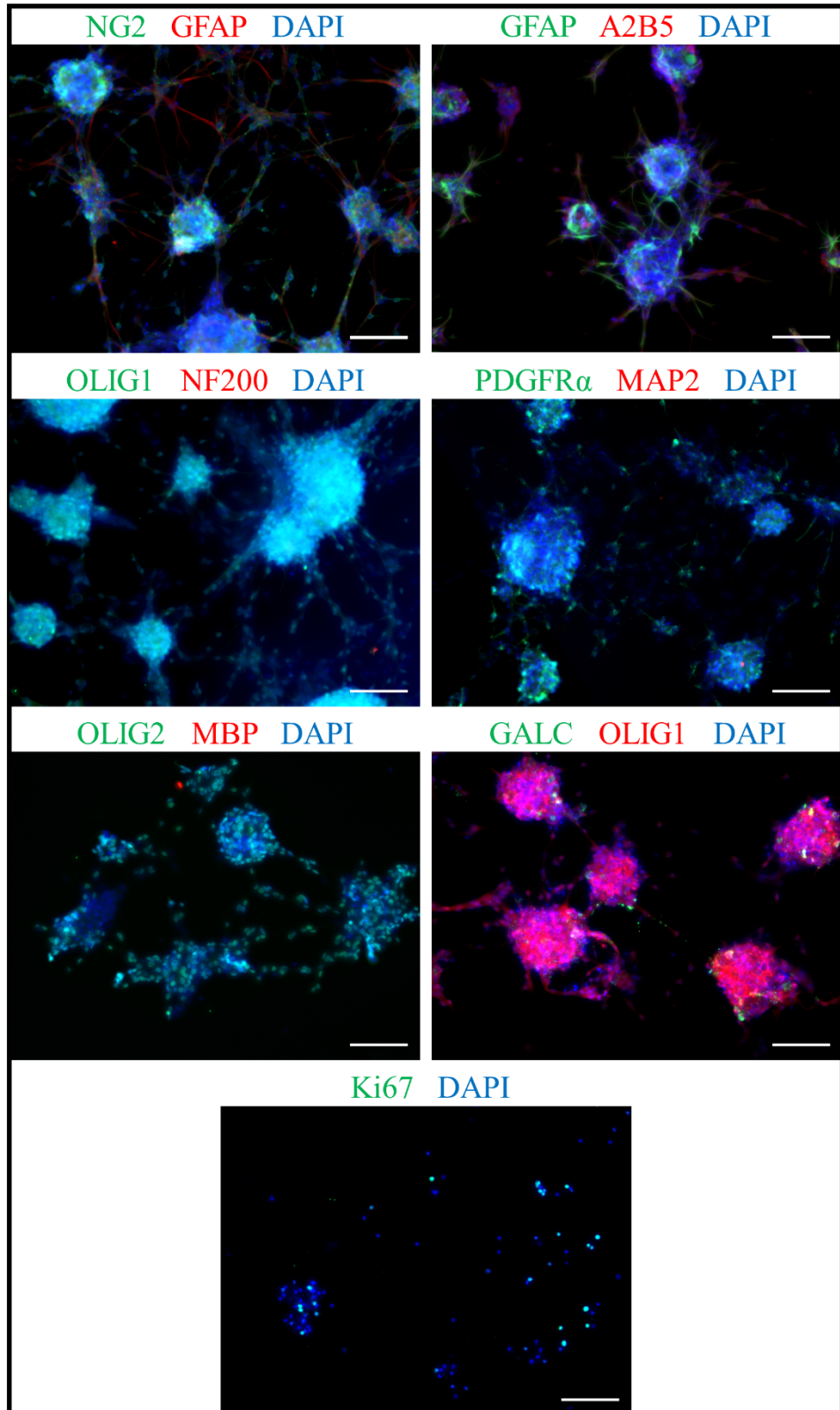
W badaniach wykorzystano zoptymalizowany protokół izolacji i hodowli mGRPs z tkanki nerwowej płodów myszy. W trakcie trwania hodowli oceniana była morfologia komórek. Stwierdzono obecność komórek o charakterystycznej, dwubiegunowej morfologii, rosnących w postaci pojedynczej warstwy (ang. *monolayer*). Część populacji komórek formowała charakterystyczne skupiska (sfery). Obserwowano także wzrost stopnia konfluencji komórek w hodowli (**Ryc. 6**).



**Rycina 6.** Ocena morfologii komórek w hodowli pierwotnej natywnych mGRPs. Przedstawiono reprezentatywne zdjęcia hodowli mGRPs w pasażu 1 i 3. Widoczne są charakterystyczne komórki o dwubiegunowej morfologii (niebieskie strzałki) oraz formujące się skupiska komórek (sfery, niebieskie gwiazdki). D, dzień w pasażu (D3, D7); P, numer pasażu (P1, P3). Zdjęcia wykonywano w świetle przechodzącym, powiększenie 100 $\times$ .

W celu oceny fenotypu komórek w hodowli wykonano barwienia immunocytochemiczne, stosując przeciwciała skierowane przeciwko antygenom charakterystycznym dla: progenitorów glejowych (anty-A2B5, -NG2, -OLIG1, -OLIG2, -PDGFR $\alpha$ ), komórek glejowych (anty-GFAP), neuronów (anty-MAP2, -NF200), niedojrzałych oligodendrocytów (anty-GALC), dojrzałych

oligodendrocytów (anty-MBP) i komórek proliferujących (anty-Ki67). Analiza jakościowa wykazała, iż w populacji obecne są progenitory glejowe o fenotypie A2B5<sup>+</sup>, NG2<sup>+</sup>, OLIG1<sup>+</sup>, OLIG2<sup>+</sup>, PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>, komórki GFAP<sup>+</sup>, oraz niewielka ilość niedojrzałych oligodendrocytów (GALC<sup>+</sup>) i komórek proliferujących (Ki67<sup>+</sup>). Nie stwierdzono obecności komórek wykazujących ekspresję antygenów charakterystycznych dla neuronów (NF200<sup>+</sup> i MAP2<sup>+</sup>) ani dojrzałych oligodendrocytów (MBP<sup>+</sup>) (**Ryc. 7**).



**Rycina 7.** Ocena fenotypu komórek w hodowli pierwotnej natywnych mGRPs. Przedstawiono reprezentatywne zdjęcia hodowli mGRPs w pasażu 2. Komórki barwiono immunocytochemicznie i obrazowano w mikroskopie fluorescencyjnym w celu uwidocznienia antygenów: progenitorów glejowych (A2B5, NG2, OLIG1, OLIG2, PDGFR $\alpha$ ), komórek glejowych (GFAP), neuronów (MAP2, NF200), niedojrzałych oligodendrocytów (GALC), dojrzałych oligodendrocytów (MBP) i komórek proliferujących (Ki67). Analiza jakościowa wykazała obecność progenitorów glejowych o fenotypie A2B5<sup>+</sup>, NG2<sup>+</sup>, OLIG1<sup>+</sup>, OLIG2<sup>+</sup>, PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>, komórek o fenotypie GFAP<sup>+</sup>, niewielką ilość niedojrzałych oligodendrocytów (GALC<sup>+</sup>) oraz komórek proliferujących (Ki67<sup>+</sup>). Nie stwierdzono

obecności neuronów o fenotypie NF200<sup>+</sup> i MAP2<sup>+</sup> ani dojrzałych oligodendrocytów o fenotypie MBP<sup>+</sup>. Zdjęcia wykonywano przy wzbudzeniu fluorochromów poprzez użycie wiązki światła o długości 488 nm (kolor zielony) i 546 nm (kolor czerwony). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (długość wiązki światła wzbudzenia: 405 nm, kolor niebieski). Hodowlę prowadzono w pożywce GRP Medium + bFGF. Skala 100  $\mu$ m.

## 5.2. Wywołanie nadekspresji NRG-1 w mGRPs z użyciem lentiwirusowych wektorów ekspresyjnych

W kolejnym etapie badań podjęto próbę wywołania konstytutywnej nadekspresji NRG-1 typu I w mGRPs poprzez transdukcję komórek wektorami lentiwirusowymi trzeciej generacji. Celem nadekspresji NRG-1 była poprawa właściwości terapeutycznych mGRPs, związana ze zmianą tempa wzrostu populacji, właściwości migracyjnych i mielinizacyjnych oraz zdolności tych komórek do różnicowania. Pierwsze eksperymenty służyły wytypowaniu wektora lentiwirusowego, który zapewniłby stabilny poziom nadekspresji NRG-1 przy jednoczesnym braku istotnego pogorszenia żywotności mGRPs. Transdukowane mGRPs analizowane były następnie pod kątem zmian morfologii i fenotypu, poziomu ekspresji NRG-1, tempa wzrostu populacji, zdolności migracyjnych i mielinizacyjnych, w porównaniu do komórek kontrolnych.

### 5.2.1. Wektor pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry

Badania rozpoczęto od przetestowania wektora pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry, kodującego pod promotorem CMV NRG-1 typu I w fuzji z fluorescencyjnym białkiem reporterowym mCherry, oraz optymalizacji protokołu transdukcji mGRPs. Jako kontrole zastosowano mGRPs transdukowane wektorem pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ III-mCherry, kodującym pod promotorem CMV NRG-1 typu III w fuzji z mCherry, oraz nietransdukowane mGRPs.

#### 5.2.1.1. Optymalizacja protokołu transdukcji mGRPs

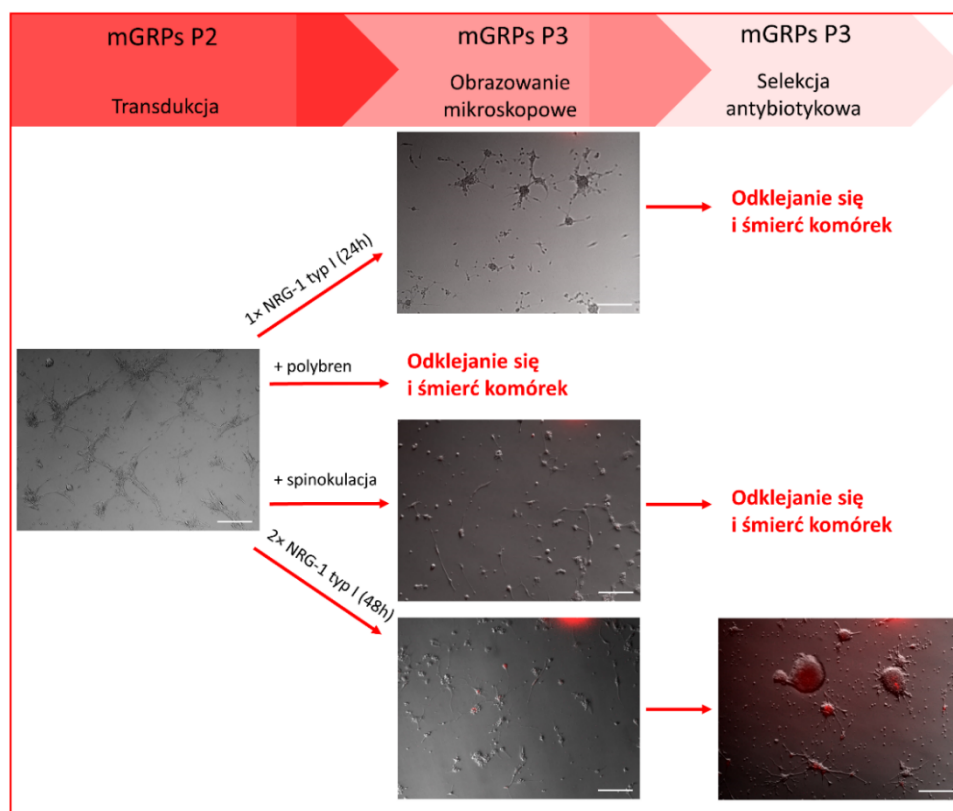
Przetestowano cztery warianty protokołu transdukcji (**Ryc. 8**):

**Wariat 1:** Pojedyncza, 24-godzinna transdukcja mGRPs bez stosowania polibrenu (bromku heksadimetryny) oraz spinokulacji. Obserwacja z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego podczas 7 dni hodowli mGRPs, w ich kolejnym pasażu po transdukcji, nie wykazała ekspresji białka reporterowego mCherry w populacji transdukowanych mGRPs. Rozpoczęcie selekcji antybiotykowej powodowało odklejanie się komórek od powierzchni naczynia hodowlanego i ich śmierć w ciągu 24 godzin.

**Wariant 2:** Pojedyncza, 12-godzinna transdukcja mGRPs z zastosowaniem polibrenu w stężeniu 2  $\mu$ g/ml. Obserwacja mGRPs z użyciem mikroskopu świetlnego w ciągu 12 h od rozpoczęcia transdukcji wykazała odklejanie się komórek od powierzchni naczynia hodowlanego i ich śmierć.

**Wariant 3:** Pojedyncza, 24-godzinna transdukcja z zastosowaniem spinokulacji w warunkach 32°C przy 500  $\times$  g przez 60 minut. Obserwacja z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego podczas 7 dni hodowli mGRPs, w ich kolejnym pasażu po transdukcji, nie wykazała ekspresji białka reporterowego mCherry w populacji transdukowanych mGRPs. Rozpoczęcie selekcji antybiotykowej powodowało odklejanie się komórek od powierzchni naczynia hodowlanego i ich śmierć w ciągu 24 godzin.

**Wariant 4:** Podwójna transdukcja dwiema dawkami wirusa (trwająca łącznie 48 godzin, zgodnie z metodyką opisaną w **Rozdz. 4.3.1.3.**), bez stosowania polibrenu oraz spinokulacji. Obserwacja z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego podczas 7 dni hodowli mGRPs, w ich kolejnym pasażu po transdukcji, wykazała obecność frakcji mGRPs z ekspresją białka reporterowego mCherry. Po rozpoczęciu selekcji pod kątem oporności na puromycynę, frakcja komórek pozostawała przyklejona do powierzchni naczynia hodowlanego i wykazywała ekspresję mCherry.



**Rycina 8.** Podsumowanie wyników optymalizacji transdukcji mGRPs wektorem pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry. Schemat przedstawia reprezentatywne zdjęcia z trzech etapów hodowli komórek: przed transdukcją, w kolejnym pasażu po transdukcji, oraz po selekcji antybiotykowej. Analogiczne wyniki otrzymano w przypadku komórek transdukowanych wektorem kontrolnym pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ III-mCherry (wyników nie zaprezentowano). P, numer pasażu (P2, P3). Zdjęcia wykonywano w świetle przechodzącym oraz przy wzbudzeniu fluorochromu poprzez użycie wiązki światła o długości 546 nm (kolor czerwony; mCherry). Skala 100  $\mu\text{m}$ .

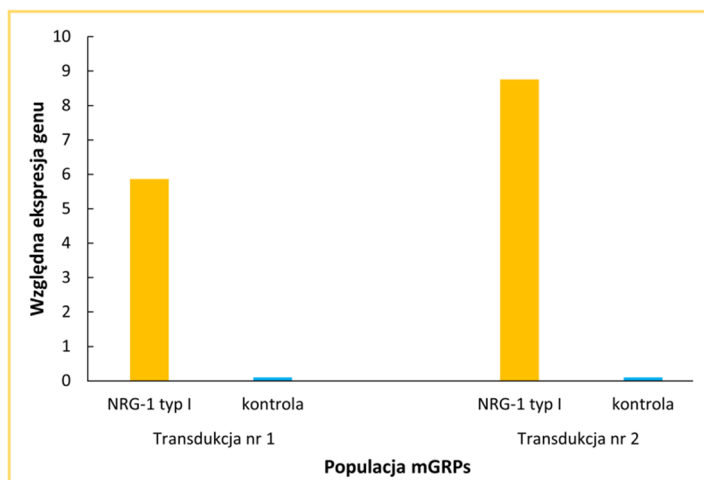
Podsumowując ten etap badań stwierdzono, iż:

- Pojedyncza, 24-godzinna transdukcja mGRPs wektorem pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry jest niewystarczająca do wywołania w mGRPs ekspresji białka reporterowego mCherry oraz nabycia przez komórki oporności na antybiotyk.
- Dodatek polibrenu w stężeniu 2  $\mu\text{g/ml}$  do mieszaniny transdukcijnej jest toksyczny dla mGRPs. Ponieważ rekomendowane stężenie polibrenu stosowanego podczas transdukcji mieści się w granicach 2-10  $\mu\text{g/ml}$  (Bao i in., 2018; Jacobsen i in., 2006; Lin, Correa, Lin i Caplan, 2011), a efekt cytotoksyczny obserwowany jest już w dolnym zakresie stężenia, zaniechano prób optymalizacji stężenia polibrenu.
- Dodatkowy etap spinokulacji w warunkach 32°C przy 500  $\times$  g przez 60 minut na pierwszym etapie transdukcji jest niewystarczający do wywołania w mGRPs ekspresji białka reporterowego mCherry oraz nabycia przez komórki oporności na antybiotyk.
- Podwójna transdukcja, trwająca łącznie 48 godzin, wywołuje we frakcji mGRPs ekspresję białka reporterowego mCherry oraz nadaje komórkom o fenotypie mCherry<sup>+</sup> oporność na antybiotyk.

Na podstawie powyższych wyników, w dalszych etapach badań mGRPs transdukowano w oparciu o **wariant protokołu nr 4**.

#### 5.2.1.2. Ocena poziomu ekspresji NRG-1 typu I w mGRPs transdukowanych wektorem pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry

W celu sprawdzenia poziomu ekspresji mRNA dla NRG-1 typu I w mGRPs transdukowanych wektorem pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry przeprowadzono analizy RT-qPCR. Materiał do analiz stanowiły komórki po selekcji antybiotykowej. Wyniki reakcji qPCR z dwóch niezależnych powtórzeń biologicznych zaprezentowano na **Ryc. 9**.



**Rycina 9.** Wyniki analizy RT-qPCR uzyskane dla mGRPs transdukowanych wektorem pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry (NRG-1 typ I), po dwóch niezależnych próbach transdukcji (Transdukcje nr 1 i nr 2). Jako odniesienie traktowano poziom ekspresji mRNA dla NRG-1 typu I wykrywany w mGRPs transdukowanych wektorem CMV-NRG-1 typ III-mCherry (kontrola), hodowanych równolegle. Poziom ekspresji mRNA obliczano z użyciem metody  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Wyniki normalizowano w oparciu o ekspresję genu referencyjnego, kodującego ApoB.

W wyniku przeprowadzonej analizy stwierdzono, iż poziom syntezy transkryptu dla NRG-1 typu I w obrębie dwóch powtórzeń był zróżnicowany. Dalsza hodowla mGRPs transdukowanych CMV-NRG-1 typ I skutkowała z kolei spontanicznym odklejaniem się komórek od powierzchni naczynia hodowlanego i ich śmiercią w pasażach 5-6; równolegle zaobserwowano także odklejanie się i śmierć komórek transdukowanych CMV-NRG-1 typ III, natomiast nietransdukowane mGRPs nie odklejały się i przeżywały. Podjęto również trzecią próbę transdukcji wektorem CMV-NRG-1 typ I-mCherry. W kolejnych powtórzeniach transdukcji komórki transdukowane odklejały się i umierały w ciągu 7 dni od zakończenia transdukcji (danych nie zaprezentowano), przed rozpoczęciem selekcji antybiotykowej i zebraniem materiału na analizę RT-qPCR. Kontrolne, nietransdukowane mGRPs przeżywały w hodowli i rosły w postaci adherentnej.

Podsumowując ten etap badań, mimo iż transdukcja mGRPs wektorem pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry jest możliwa, to komórki umierają w kolejnych pasażach po transdukcji. Nie można zatem wykluczyć, iż zastosowany promotor (CMV) nie jest odpowiedni dla mGRPs z hodowli pierwotnej. Pomiedzy transdukcjami występuje także zmienność w poziomie transkrypcji NRG-1. Ponadto, ponieważ wektor pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry koduje NRG-1 typu I w fuzji z białkiem reporterowym mCherry, ekspresja transgenu w komórce docelowej może być zaburzona. W

związku z tym zdecydowano się przetestować drugi system ekspresyjny oparty o wektor HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP.

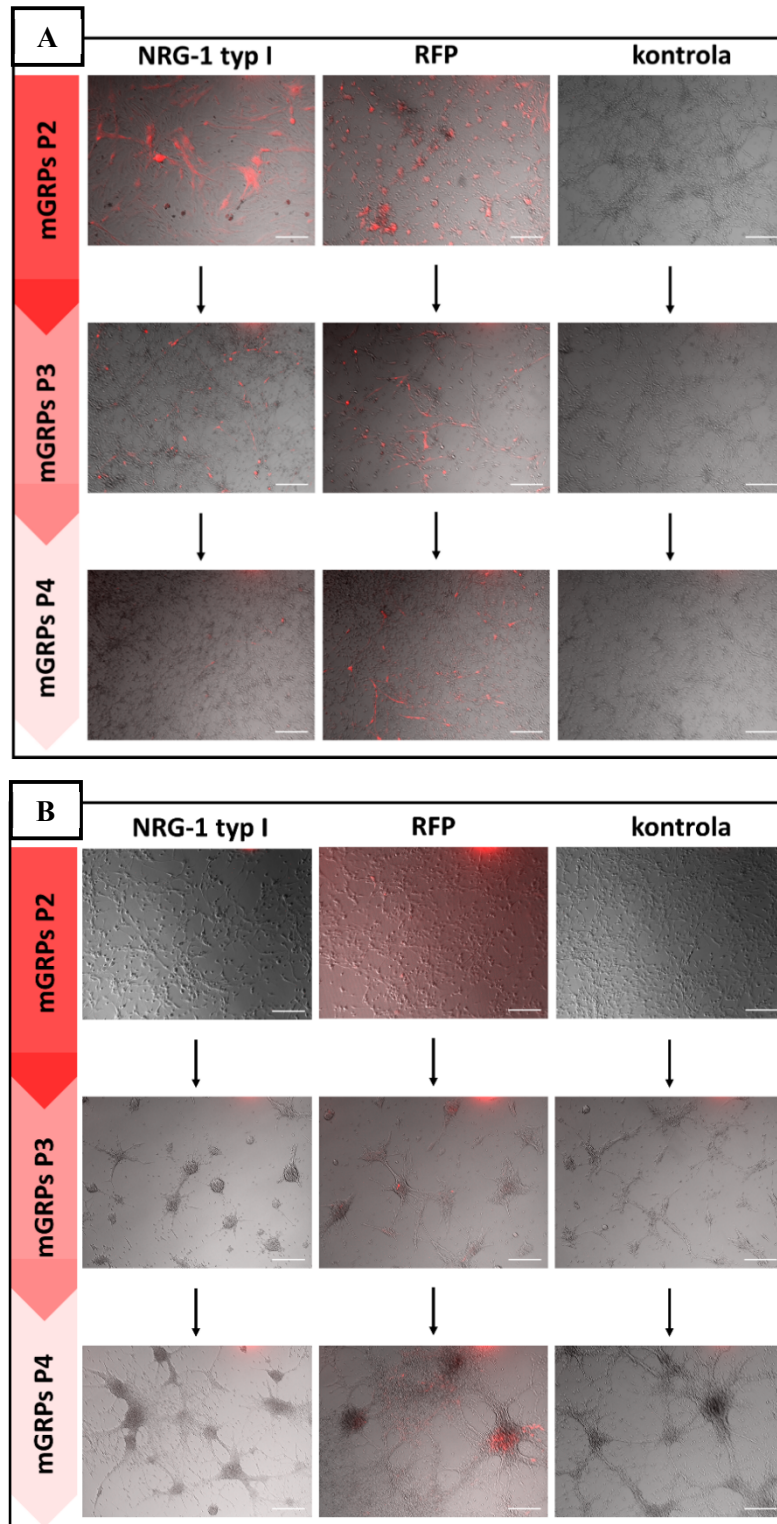
#### *5.2.2. Wektor HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP*

Podczas dalszych badań podjęto cztery próby transdukcji mGRPs wektorem HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP, w oparciu o wariant protokołu nr 4 zdefiniowany w **Rozdziale 5.2.1.1**. Jako kontrole stosowano mGRPs transdukowane wektorem HIV-SFFV-IRES-mRFP oraz nietransdukowane mGRPs. W porównaniu do wektora pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry, w wektorze HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP transgen znajdował się pod kontrolą transkrypcyjną alternatywnego promotora (SFFV). Ponadto, z uwagi na obecność sekwencji IRES, NRG-1 typu I nie ulegało ekspresji w fuzji z białkiem reporterowym mRFP. Należy zaznaczyć, iż wektor pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry nie kodował dodatkowo genu warunkującego oporność na antybiotyki.

##### *5.2.2.1. Ocena ekspresji białka reporterowego w mGRPs i mGRPs-NRG-1*

Obrazowanie komórek w mikroskopie fluorescencyjnym rozpoczynano po 24 godzinach od zakończenia transdukcji, i kontynuowano w kolejnych pasażach. W przypadku mGRPs transdukowanych wektorem SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP obecność białka reporterowego stwierdzono tylko przy transdukcji nr 1, lecz w kolejnych dwóch pasażach obserwowano stopniowy zanik fluorescencji (**Ryc. 10A**). Obecność białka reporterowego w kontrolnych mGRPs transdukowanych wektorem HIV-SFFV-IRES-mRFP stwierdzono przy każdej z czterech transdukcji. Kontrolne, nietransdukowane mGRPs nie wykazywały fluorescencji (**Ryc. 10A, B**).

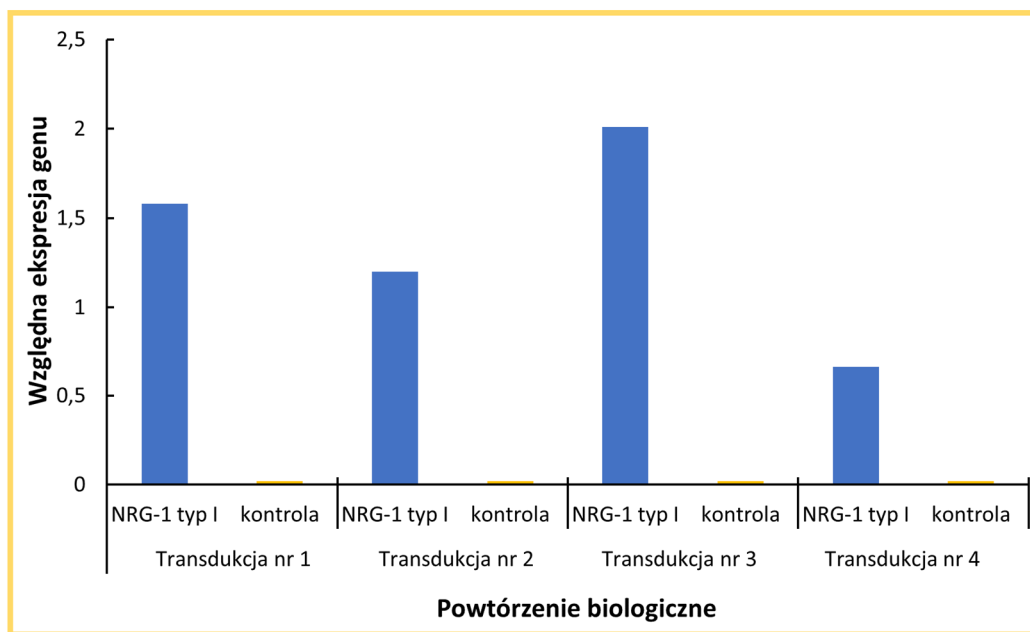




**Rycina 10.** Zdjęcia prezentują hodowlę mGRPs po transdukcjach wektorem HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP (NRG-1 typ I), HIV-SFFV-IRES-mRFP (RFP) oraz komórek nietransdukowanych (kontrola). **(A)** Transdukcja nr 1: widoczna jest fluorescencja w komórkach transdukowanych wektorem kodującym NRG-1 typu I, zanikająca na przekroju kolejnych pasaży. **(B)** Reprezentatywne zdjęcia dla transdukcji nr 2, 3, 4: brak fluorescencji w komórkach transdukowanych wektorem kodującym NRG-1 typu I. P, numer pasaży (P2, P3, P4). Transdukcję przeprowadzono w mGRPs w P2. Zdjęcia wykonywano w świetle przechodzącym oraz przy wzbudzeniu fluorochromu poprzez użycie wiązki światła o długości 546 nm (kolor czerwony; RFP). Skala 100  $\mu\text{m}$ .

### 5.2.2.2. Ocena poziomu ekspresji NRG-1 typu I w mGRPs transdukowanych wektorem HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP

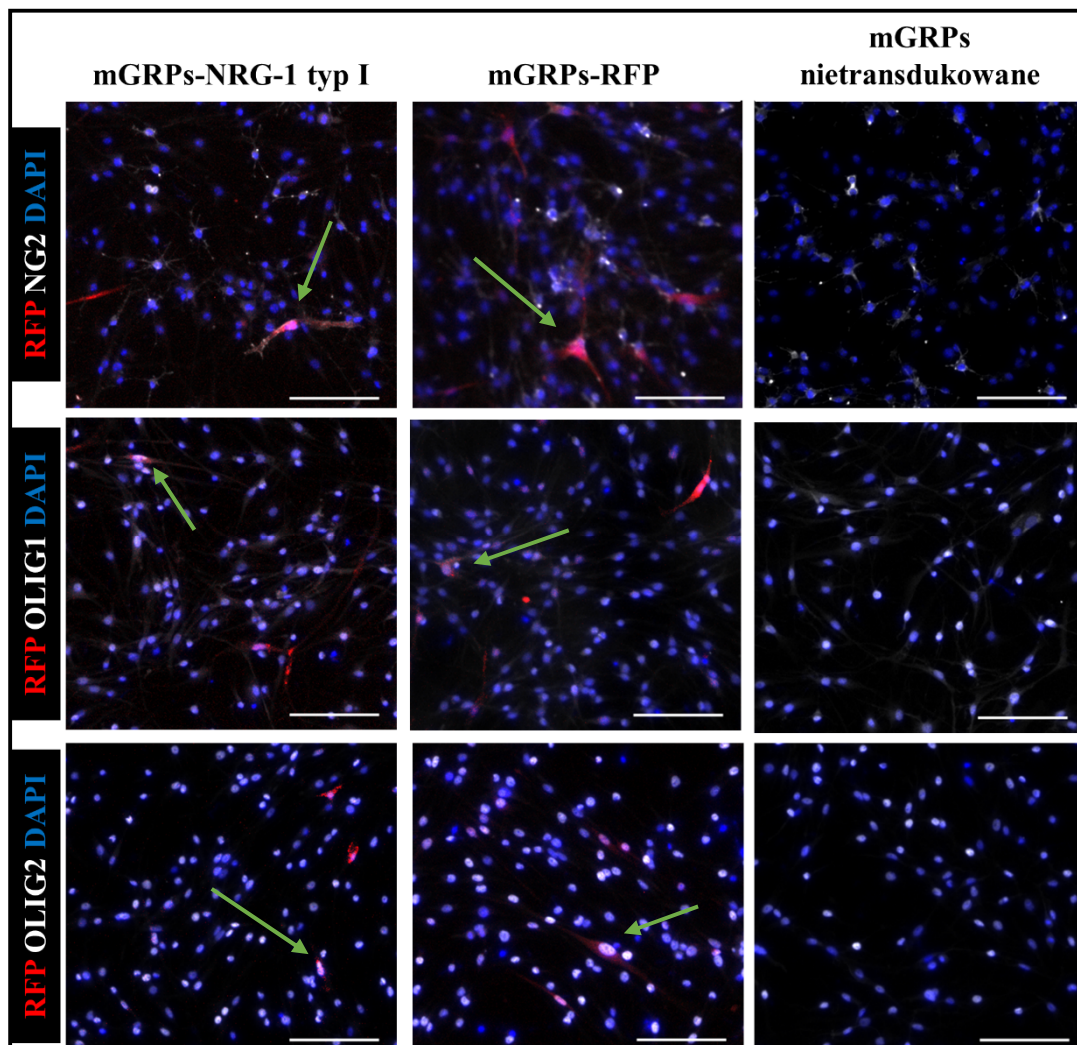
W celu analizy poziomu ekspresji transgenu (NRG-1 typu I) frakcja mGRPs przeznaczona była do wykonania badań techniką RT-qPCR. Badania te wykazały zróżnicowany poziom ekspresji mRNA dla NRG-1 typu I pomiędzy czterema transdukcjami z użyciem wektora HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP (**Ryc. 11**).



**Rycina 11.** Wyniki analizy RT-qPCR dla mGRPs transdukowanych wektorem HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP (NRG-1 typ I), po czterech niezależnych próbach transdukcji (Transdukcje nr 1-4). Jako odniesienie traktowano poziom ekspresji mRNA dla NRG-1 typu I, wykrywany w mGRPs transdukowanych wektorem HIV-SFFV-IRES-mRFP (kontrola). Poziom ekspresji mRNA obliczano z użyciem metody  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Wyniki normalizowano w oparciu o ekspresję genu referencyjnego, kodującego ApoB.

### 5.2.2.3. Ocena fenotypu mGRPs i mGRPs-NRG-1

W celu porównania fenotypu transdukowanych i nietransdukowanych mGRPs wykonano barwienia immunocytochemiczne komórek w kierunku uwidocznienia charakterystycznych antygenów progenitorów glejowych: NG2, OLIG1 i OLIG2. Analiza jakościowa zdjęć z transdukcji nr 1 wykazała obecność komórek o profilach NG2<sup>+</sup> mRFP<sup>+</sup>, OLIG1<sup>+</sup> mRFP<sup>+</sup> i OLIG2<sup>+</sup> mRFP<sup>+</sup>, co sugeruje, iż zarówno komórki transdukowane wektorem HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP, jak i HIV-SFFV-IRES-mRFP zachowują charakter progenitorów glejowych (**Ryc. 12**). W żadnej z prowadzonych hodowli nie stwierdzono obecności komórek z ekspresją antygenu charakterystycznego dla dojrzałych oligodendrocytów (MBP<sup>+</sup>) (danych nie zaprezentowano). Barwienie immunocytochemiczne komórek z użyciem przeciwciała skierowanego przeciwko neuregulinie-1 nie wykazało jej obecności w komórkach oraz na ich powierzchni (danych nie zaprezentowano). Analogiczne barwienia immunocytochemiczne wykonano również w przypadku mGRPs po transdukcjach nr 2, 3 i 4, również stwierdzając obecność komórek z ekspresją antygenów charakterystycznych dla progenitorów glejowych (NG2<sup>+</sup>, OLIG1<sup>+</sup> i OLIG2<sup>+</sup>). Jednak, jak wykazano na **Ryc. 10B**, po transdukcjach nr 2, 3 i 4 nie stwierdzono obecności mRFP w populacji mGRPs-NRG-1 typ I.



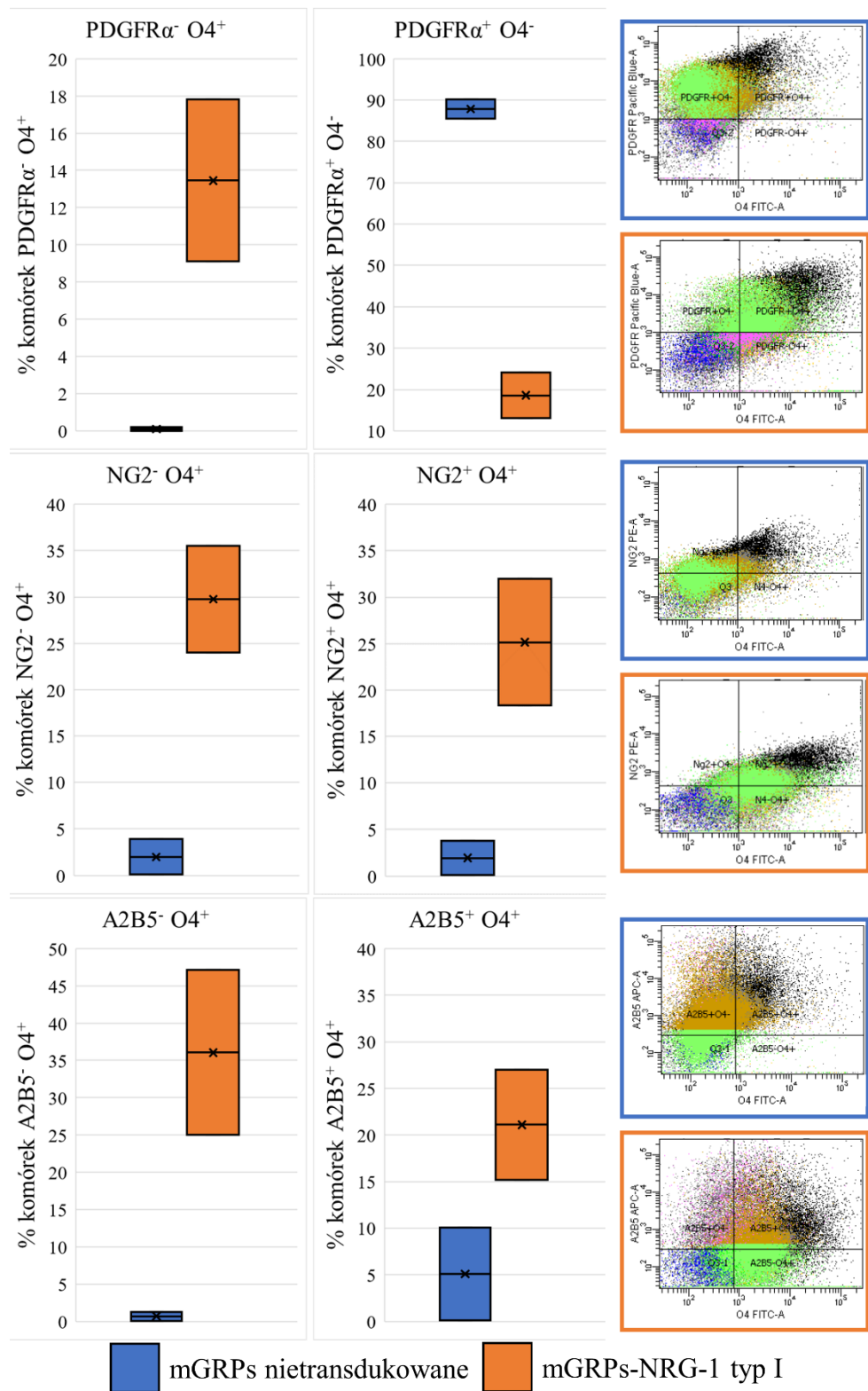
**Rycina 12.** Transdukcja nr 1: Reprezentatywne zdjęcia hodowli mysich progenitorów glejowych transdukowanych wektorem HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP (mGRPs-NRG-1 typ I), HIV-SFFV-IRES-mRFP (mGRPs-RFP) i nietransdukowanych. Komórki barwiono immunocytochemicznie i obrazowano w mikroskopie fluorescencyjnym w celu uwidocznienia charakterystycznych antygenów progenitorów glejowych: NG2, OLIG1 i OLIG2. Zielone strzałki wskazują transdukowane mGRPs z ekspresją białka reporterowego RFP. Zdjęcia wykonywano przy wzbudzeniu fluorochromów poprzez użycie wiązki światła o długości 546 nm (kolor czerwony) i 633 nm (kolor biały). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (długość wiązki światła wzbudzenia: 405 nm, kolor niebieski). Zdjęcia przedstawiają mGRPs w drugim pasażu po transdukcji. Hodowlę prowadzono w pożywce GRP Medium + bFGF. Skala 100  $\mu$ m.

Dalsze analizy fenotypowe mGRPs-NRG-1 typ I z zastosowaniem cytometrii przepływowej wykonane zostały dla dwóch powtórzeń biologicznych i miały charakter badań wstępnych. Planowane jest wykonanie trzeciego powtórzenia w celu przeprowadzenia analizy statystycznej. W dwóch przeprowadzonych dotychczas powtórzeń eksperymentu, w porównaniu do hodowli komórek nietransdukowanych, w hodowli komórek transdukowanych zaobserwowano następujące zmiany:

- (i) średnio mniej komórek o fenotypie GRPs: PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> O4<sup>-</sup> (87,85% komórek nietransdukowanych wobec 18,6% komórek transdukowanych);

(ii) średnio więcej komórek o bardziej dojrzałym fenotypie OPCs i niedojrzałych oligodendrocytów: PDGFR $\alpha$ <sup>-</sup> O4<sup>+</sup> (0,1% komórek nietransdukowanych wobec 13,45% komórek transdukowanych), NG2<sup>-</sup> O4<sup>+</sup> (2% komórek nietransdukowanych wobec 29,75% komórek transdukowanych) i A2B5<sup>-</sup> O4<sup>+</sup> (0,7% komórek nietransdukowanych wobec 36,05% komórek transdukowanych);

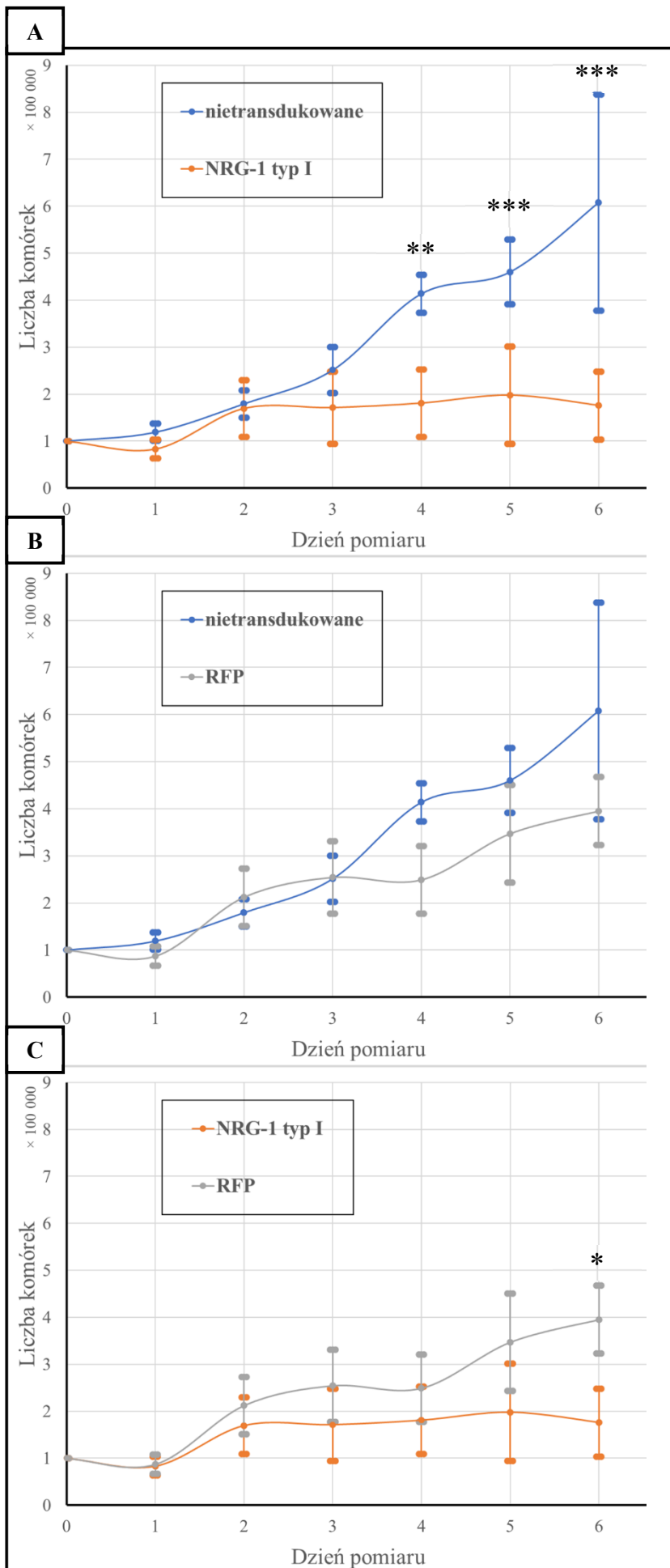
(iii) średnio więcej komórek o fenotypie pośrednim pomiędzy GRPs a OPCs: NG2<sup>+</sup> O4<sup>+</sup> (1,95% komórek nietransdukowanych wobec 25,15% komórek transdukowanych) i A2B5<sup>+</sup> O4<sup>+</sup> (5,1% komórek nietransdukowanych wobec 21,1% komórek transdukowanych).



**Rycina 13.** Wstępna analiza ilościowa fenotypu mGRPs-NRG-1 typ I za pomocą cytometrii przepływowej. W badaniach wykorzystano przeciwciała skierowane przeciwko antygenom glejowo-specyficznych komórek progenitorowych (anty-PDGFR $\alpha$ , -NG2) i bezpośrednich progenitorów oligodendrocytów/niedojrzałych oligodendrocytów (anty-O4). Dane na wykresach pudełkowych uwzględniają dwa powtórzenia biologiczne. Górna i dolna krawędź wykresu pudełkowego określa procentowy udział danej subpopulacji w analizowanej próbce; linia środkowa i symbol „x” określają średnią arytmetyczną z dwóch powtórzeń. Wykresy kropkowe prezentują dane źródłowe z reprezentatywnego powtórzenia biologicznego.

#### 5.2.2.4. Ocena tempa wzrostu mGRPs i mGRPs-NRG-1

W celu oceny wpływu nadekspresji NRG-1 typu I, samego wektora lentiwirusowego oraz samej procedury transdukcji na tempo wzrostu mGRPs, wykonano analizę liczebności populacji z użyciem zestawu CCK-8. Badania wykazały istotny spadek tempa wzrostu mGRPs z nadekspresją NRG-1 typu I w stosunku do komórek nietransdukowanych w dniach czwartym ( $p=0,0015$ ), piątym ( $p < 0,001$ ) i szóstym ( $p < 0,001$ ) eksperymencie (**Ryc. 14A**). Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w tempie wzrostu mGRPs nietransdukowanych i mGRPs transdukowanych wektorem kontrolnym kodującym RFP (**Ryc. 14B**). Natomiast w dniu szóstym stwierdzono spowolnienie tempa wzrostu mGRPs transdukowanych wektorem kodującym NRG-1 typu I, w stosunku do mGRPs transdukowanych wektorem kodującym RFP ( $p=0,0129$ ) (**Ryc. 14C**).



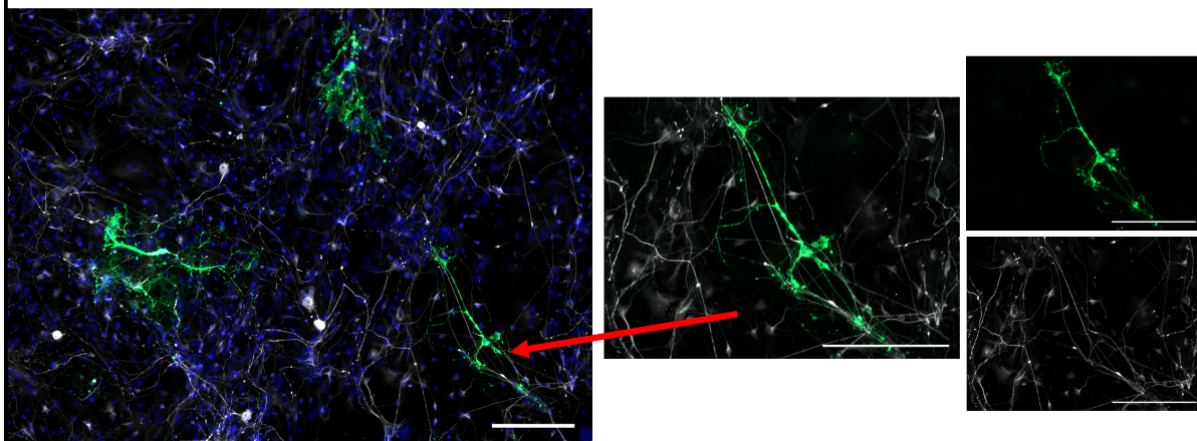
**Rycina 14.** Ocena tempa wzrostu populacji mGRPs w teście CCK-8: porównane zostały średnie wartości liczby komórek transdukowanych wektorem HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP (NRG-1 typ I), HIV-SFFV-IRES-mRFP (RFP) oraz nietransdukowanych. Komórki wysiano w dniu „0”. Pomiar prowadzono co 24 godziny przez 6 dni. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne  $\pm$  odchylenia standardowe (SD) z trzech powtórzeń biologicznych, w ramach których wykonano po trzy powtórzenia techniczne. Analizy komórek wykonano w drugim pasażu ich hodowli po transdukcji. **(A)** mGRPs nietransdukowane w stosunku do NRG-1 typu I: stwierdzono statystycznie istotne różnice w dniu: czwartym ( $p=0,0015$ ), piątym ( $p < 0,001$ ) i szóstym ( $p < 0,001$ ). **(B)** mGRPs nietransdukowane w stosunku do RFP: nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic. **(C)** NRG-1 typu I w stosunku do RFP: stwierdzono statystycznie istotną różnicę w dniu szóstym ( $p=0,0129$ ). Poziom istotności  $< 0,05$  przyjmowano za statystycznie istotny. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 5.2.2.5. Ocena zdolności mielinizacyjnych mGRPs i mGRPs-NRG-1 *in vitro*

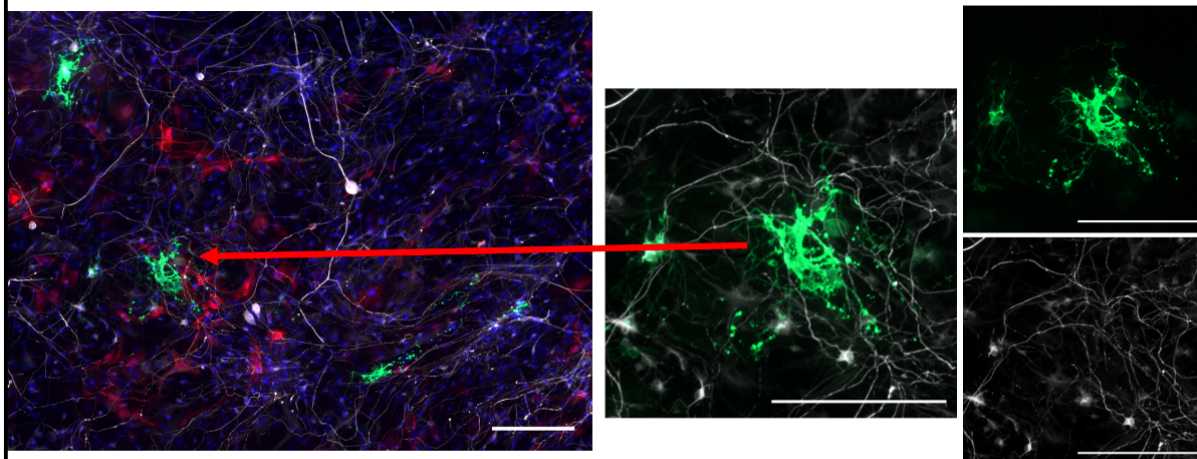
W celu oceny zdolności mielinizacyjnych mGRPs-NRG-1 *in vitro* przeprowadzona została współhodowla mGRPs-NRG-1 z mysimi neuronami zwojów korzeni grzbietowych (mDRGs) w warunkach stymulujących różnicowanie mGRPs. Obrazy oceniano przy pomocy barwienia immunocytochemicznego z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom charakterystycznym dla mielinizujących oligodendrocytów (MBP<sup>+</sup>) oraz neuronów ( $\beta$ -tubulina III<sup>+</sup>). Analiza jakościowa wykazała zachowanie przez transdukowane mGRPs zdolności do różnicowania w mielinizujące oligodendrocyty na poziomie porównywalnym do komórek nietransdukowanych (**Ryc. 15**). Ocena ilościowa stopnia mielinizacji aksonów przez oligodendrocyty zróżnicowane z transdukowanych mGRPs nie wykazała różnic w poziomie mielinizacji aksonów przez oligodendrocyty odróżnicowane z mGRPs-NRG-1 typ I, mGRPs-RFP, i mGRPs nietransdukowane. Aksony w hodowli natywnych, nie transdukowanych mDRGs pozostawały niezmielinizowane (**Ryc. 16**).



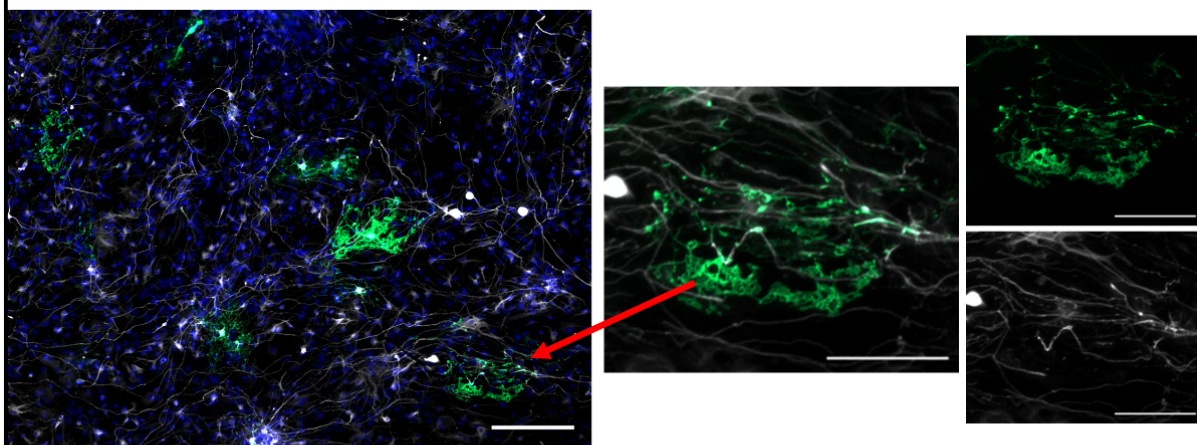
mGRPs-NRG-1 typ I + mDRGs



mGRPs-RFP + mDRGs



mGRPs nietransdukowane + mDRGs

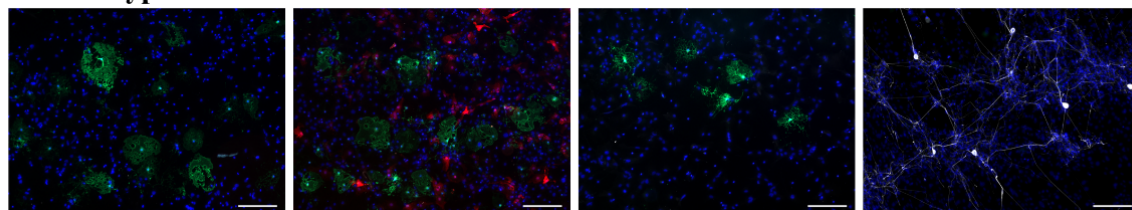


mGRPs-NRG-1  
typ I

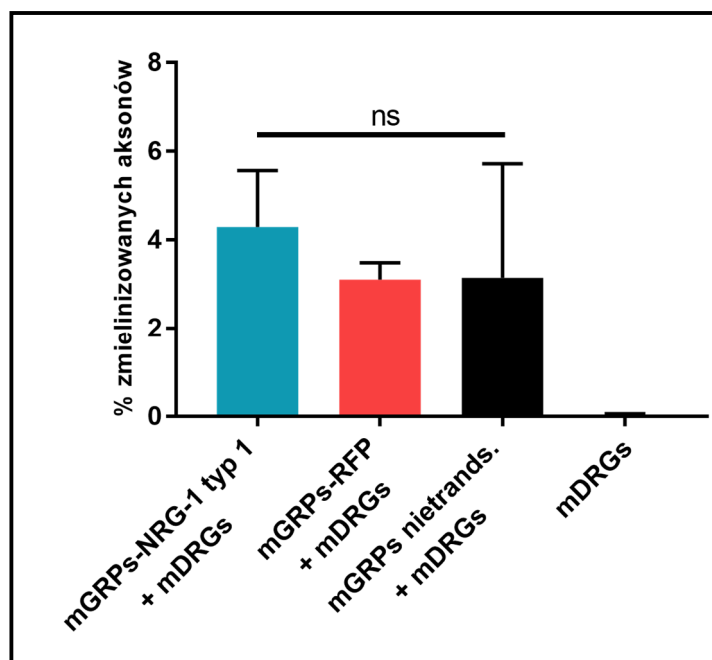
mGRPs-RFP

mGRPs  
nietransdukowane

mDRGs



**Rycina 15.** Reprezentatywne zdjęcia współhodowli mysich progenitorów glejowych (mGRPs) transdukowanych wektorem HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP (mGRPs-NRG-1 typ I), HIV-SFFV-IRES-mRFP (mGRPs-RFP) i nietransdukowanych, oraz mysich neuronów ze zwojów korzeni grzbietowych (mDRGs). Komórki barwiono immunocytochemicznie i obrazowano w mikroskopie fluorescencyjnym w celu uwidocznienia antygenów charakterystycznych dla neuronów ( $\beta$ -tubulina III<sup>+</sup>) oraz mielinizujących oligodendrocytów (MBP<sup>+</sup>), i białka reporterowego RFP. Czerwone strzałki wskazują przybliżenia obszarów mielinizacji aksonów przez oligodendrocyty. Zdjęcia wykonywano przy wzbudzeniu fluorochromów poprzez użycie wiązki światła o długości 488 nm (kolor zielony), 546 nm (kolor czerwony; RFP) i 633 nm (kolor biały). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (długość wiązki światła wzbudzenia: 405 nm, kolor niebieski). Pojedyncze hodowle mGRPs i mDRGs przedstawiono, jako kontrole. Zdjęcia wykonano na komórkach w drugim pasażu po transdukcji. Hodowlę prowadzono w warunkach stymulujących różnicowanie mGRPs. Skala 200  $\mu$ m.



**Rycina 16.** Analiza poziomu mielinizacji aksonów przez zróżnicowane mGRPs transdukowane wektorem HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP (mGRPs-NRG-1 typ I + mDRGs), HIV-SFFV-IRES-mRFP (mGRPs-RFP + mDRGs) i mGRPs nietransdukowane (mGRPs nietransd. + mDRGs). W hodowli samych mDRGs nie stwierdzono mielinizacji aksonów (mDRGs). Wyniki przedstawiono, jako średnie arytmetyczne  $\pm$  odchylenia standardowe (SD) z dwóch powtórzeń biologicznych, w ramach, których wykonano po trzy powtórzenia techniczne. Analizy wykonano na komórkach w drugim pasażu po transdukcji. Poziom istotności  $< 0,05$  przyjmowano za statystycznie istotny; ns, brak istotności statystycznej.

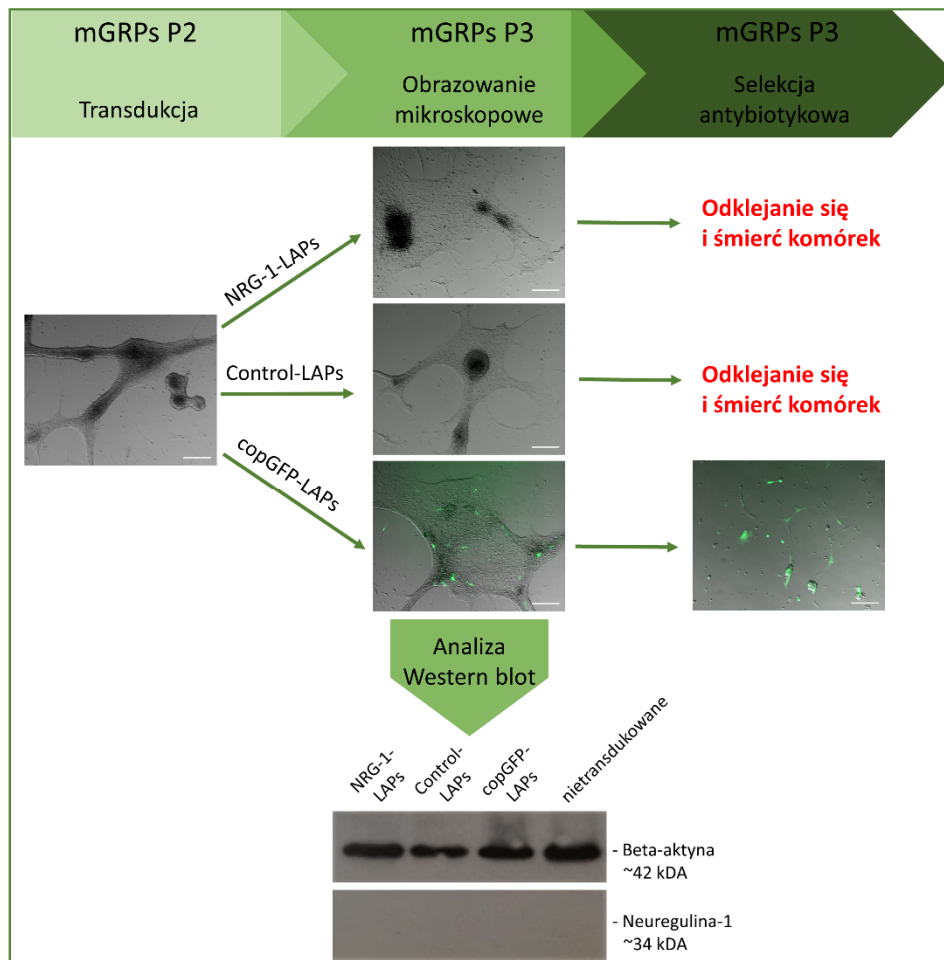
Podsumowując ten etap badań, transdukcja mGRPs wektorem HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP jest możliwa. W hodowli transdukowanych mGRPs obserwowane są komórki o fenotypie progenitorów glejowych, zachowujących zdolność do różnicowania w mielinizujące oligodendrocyty. Nie stwierdzono negatywnego wpływu samego wektora lentiwirusowego ani procedury transdukcji na tempo wzrostu i przeżywalność mGRPs. Nie stwierdzono obecności neureguliny-1 w komórkach oraz na ich powierzchni. Jednak populacja mGRPs z nadekspresją NRG-1 typ I cechuje się istotnym spadkiem tempa wzrostu w stosunku do komórek kontrolnych, a pomiędzy poszczególnymi próbami transdukcji występuje zmienność zarówno pod kątem ekspresji NRG-1 typ I, jak i białka reporterowego. Co więcej, identyfikacja białka reporterowego, na przekroju kolejnych pasażu po transdukcji, jest problematyczna, z uwagi na zastosowanie wektora bicystronowego z sekwencją IRES (**Rozdz. 6.3**). Uzyskanie za pomocą wektora HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP wystarczającej liczby mGRPs ze

stabilną nadekspresją egzogennej NRG-1 typu I do przeprowadzenia dalszych badań wydaje się zatem niemożliwe.

### 5.3. Nadekspresja NRG-1 w mGRPs z użyciem systemu lentiwirusowych cząstek aktywacyjnych

Wobec niepowodzeń związanych wywołaniem stabilnej nadekspresji NRG-1 przy użyciu tradycyjnych lentiwirusowych wektorów ekspresyjnych, w kolejnym etapie badań podjęto próbę wywołania w mGRPs nadekspresji endogennego genu NRG-1. W tym celu wykorzystano system lentiwirusowych cząstek aktywacyjnych (LAPs). W grupie eksperymentalnej mGRPs transdukowane były mieszaniną NRG-1-LAPs. Równolegle przygotowywane były trzy kontrole: (i) mGRPs transdukowane mieszaniną Control-LAPs; (ii) mGRPs transdukowane copGFP-LAPs; (iii) mGRPs nietransdukowane. Eksperymenty przeprowadzono w trzech powtórzeniach biologicznych, w dwóch powtórzeniach technicznych.

W kolejnym pasażu po transdukcji LAPs (pasaż 2), komórki obrazowane były w mikroskopie świetlnym oraz, w przypadku mGRPs transdukowanych copGFP-LAPs, dodatkowo w mikroskopii fluorescencyjnej. Część komórek przeznaczonych zostało na analizy Western Blot w kierunku identyfikacji neureguliny-1. Wyniki zaprezentowano na **Ryc. 17**.



**Rycina 17.** Podsumowanie transdukcji mGRPs lentiwirusowymi cząstkami aktywacyjnymi (LAPs). Analiza jakościowa oparta na obrazowaniu w świetle przechodzącym nie wykazała różnic morfologicznych pomiędzy grupami komórek w eksperymencie. Komórki mGRPs transdukowane copGFP-LAPs wykazywały ekspresję fluorescencyjnego białka reporterowego (copGFP, kolor zielony). Równolegle przeprowadzona analiza Western blot nie wykazała wzrostu poziomu ekspresji białka neureguliny-1 w żadnym z badanych układów. Selekcja

antybiotykowa powodowała odklejanie się i śmierć mGRPs transdukowanych NRG-1-LAPs i Control-LAPs. Komórki mGRPs transdukowane copGFP-LAPs z ekspresją białka reporterowego wykazały oporność na zastosowany antybiotyk i nie odkleiły się. Zdjęcia wykonywano w świetle przechodzącym oraz przy wzbudzeniu fluorochromu poprzez użycie wiązki światła o długości 488 nm (kolor zielony; copGFP). Skala 100  $\mu$ m.

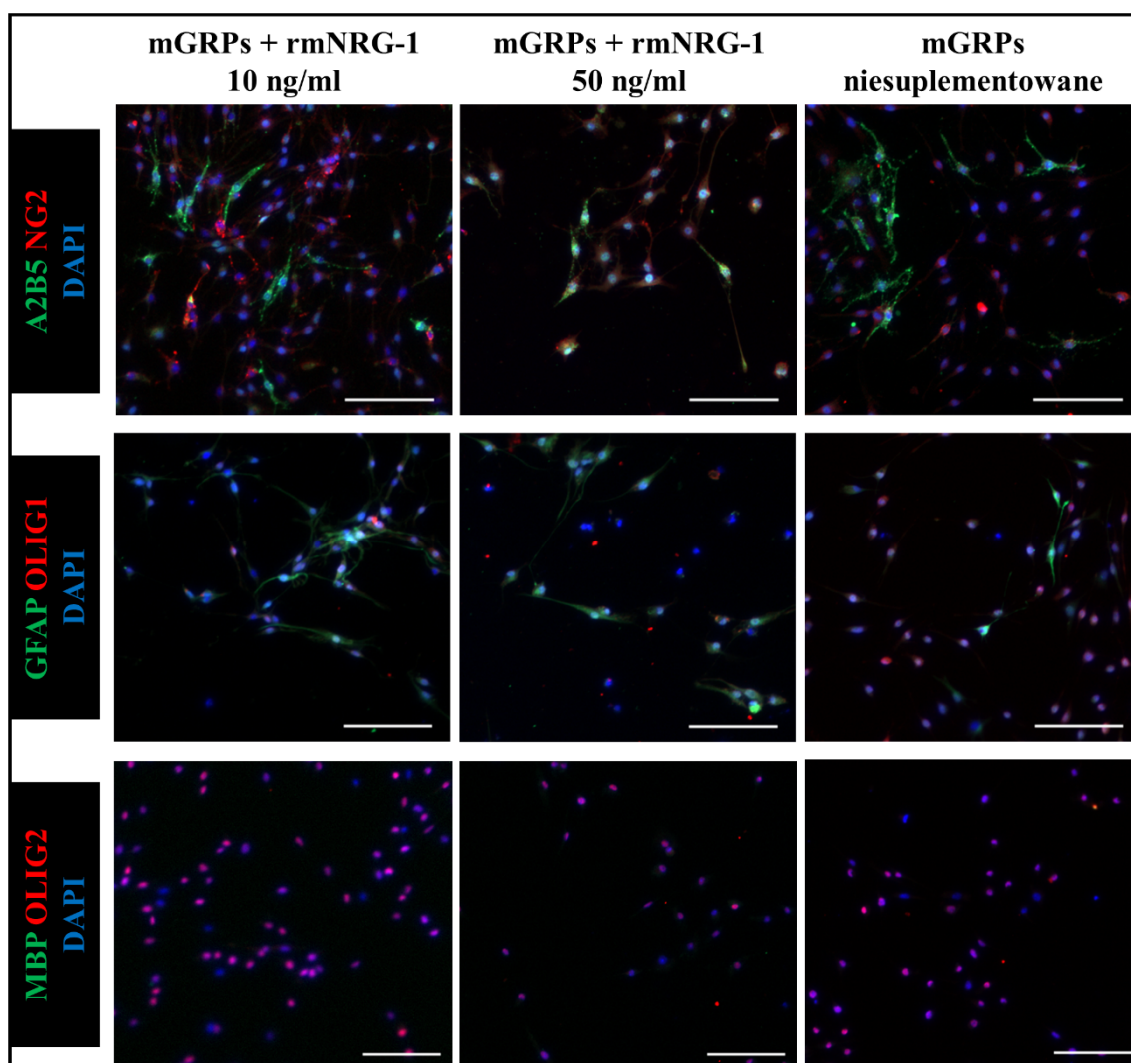
Podsumowując ten etap badań, jednoczesna transdukcja mGRPs trzema wektorami lentiwirusowymi wchodzącymi w skład systemu lentiwirusowych cząstek aktywacyjnych (LAPs) okazała się nieskuteczna. W związku z tym próba wywołania w mGRPs nadekspresji endogennej NRG-1 nie powiodła się.

#### 5.4. Suplementacja mGRPs egzogenną neuregulina-1

W celu sprawdzenia wpływu stymulacji endogenną neuregulina-1 na właściwości mGRPs *in vitro*, w ostatnim etapie badań przeprowadzono hodowlę mGRPs w standardowej pożywce hodowlanej GRP Medium + bFGF, suplementowanej dodatkowo rekombinowanym peptydem neuregulina-1 (rmNRG-1). Peptyd przetestowany został w dwóch stężeniach: 10 ng/ml oraz 50 ng/ml. Część badań miała charakter wstępny i są obecnie kontynuowane.

##### 5.4.1. Ocena wpływu neureguliny-1 na fenotyp mGRPs

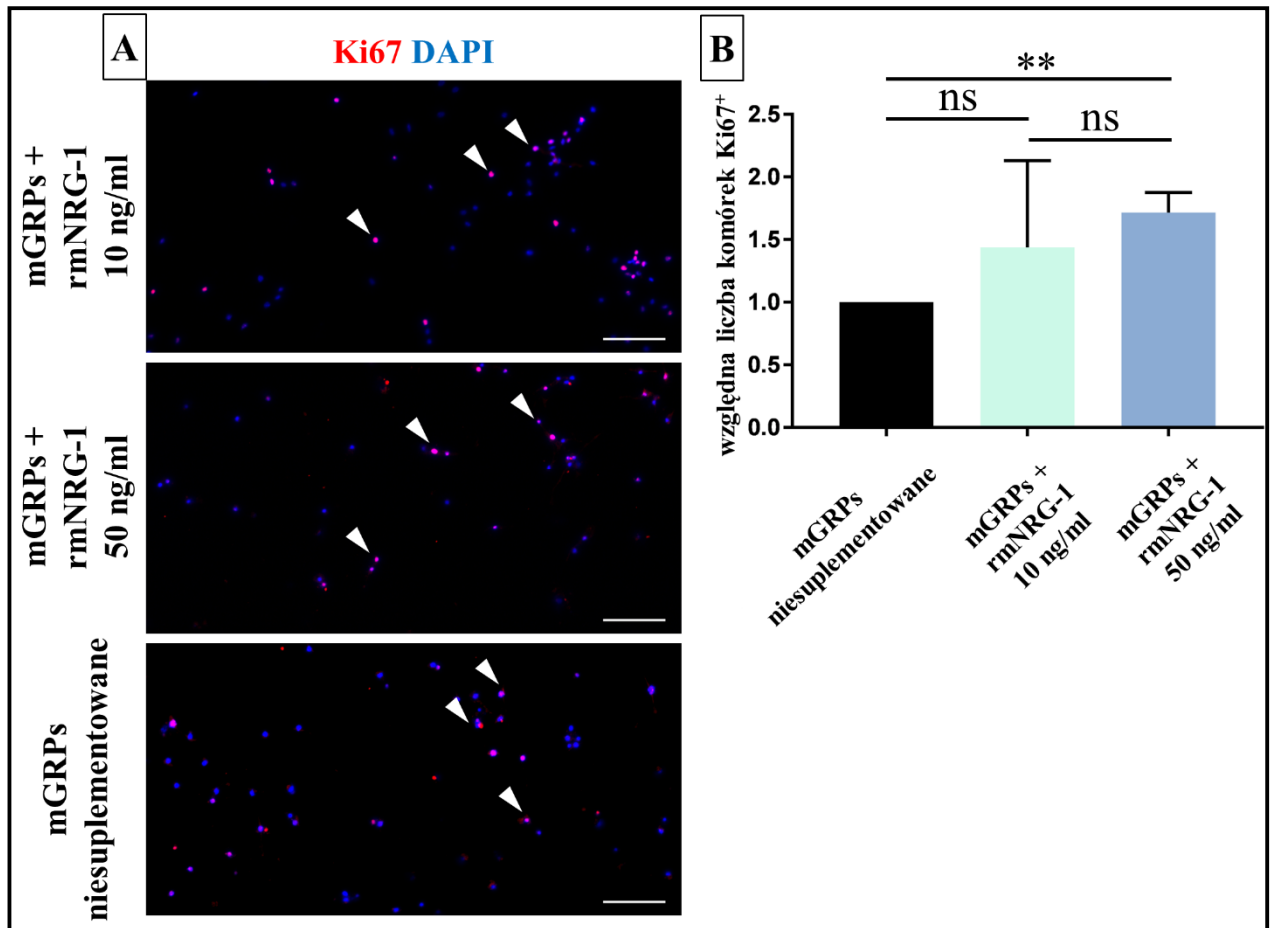
W celu porównania fenotypu mGRPs suplementowanych neuregulina-1 i mGRPs niesuplementowanych wykonano barwienia immunocytochemiczne komórek w kierunku uwidocznienia charakterystycznych antygenów progenitorów glejowych: NG2, A2B5, OLIG1, OLIG2, komórek glejowych (GFAP) i mielinizujących oligodendrocytów (MBP<sup>+</sup>). Analiza sugeruje, że komórki suplementowane zachowują charakter progenitorów glejowych (NG2<sup>+</sup>, A2B5<sup>+</sup>, OLIG1<sup>+</sup>, OLIG2<sup>+</sup>). We wszystkich badanych populacjach stwierdzono obecność komórek GFAP<sup>+</sup>. W żadnej z badanych populacji nie stwierdzono obecności dojrzałych oligodendrocytów o fenotypie MBP<sup>+</sup> (**Ryc. 18**).



**Rycina 18.** Reprezentatywne zdjęcia z trzech niezależnych hodowli mysich progenitorów glejowych (mGRPs) suplementowanych peptydem rmNRG-1 w stężeniu 10 ng/ml oraz 50 ng/ml, w stosunku do komórek kontrolnych (niesuplementowanych). Komórki barwiono immunocytochemicznie i obrazowano w mikroskopie fluorescencyjnym w celu uwidocznienia charakterystycznych antygenów progenitorów glejowych (A2B5<sup>+</sup>, NG2<sup>+</sup>, OLIG1<sup>+</sup> i OLIG2<sup>+</sup>) oraz dojrzałych oligodendrocytów (MBP<sup>+</sup>), a także komórek GFAP<sup>+</sup>. Zdjęcia wykonywano przy wzbudzeniu fluorochromów poprzez użycie wiązki światła o długości 488 nm (kolor zielony) i 546 nm (kolor czerwony). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (długość wiązki światła wzbudzenia: 405 nm, kolor niebieski). Hodowlę prowadzono w pożywce GRP Medium + bFGF. Skala 100  $\mu$ m.

#### 5.4.2. Ocena wpływu neureguliny-1 na proliferację mGRPs

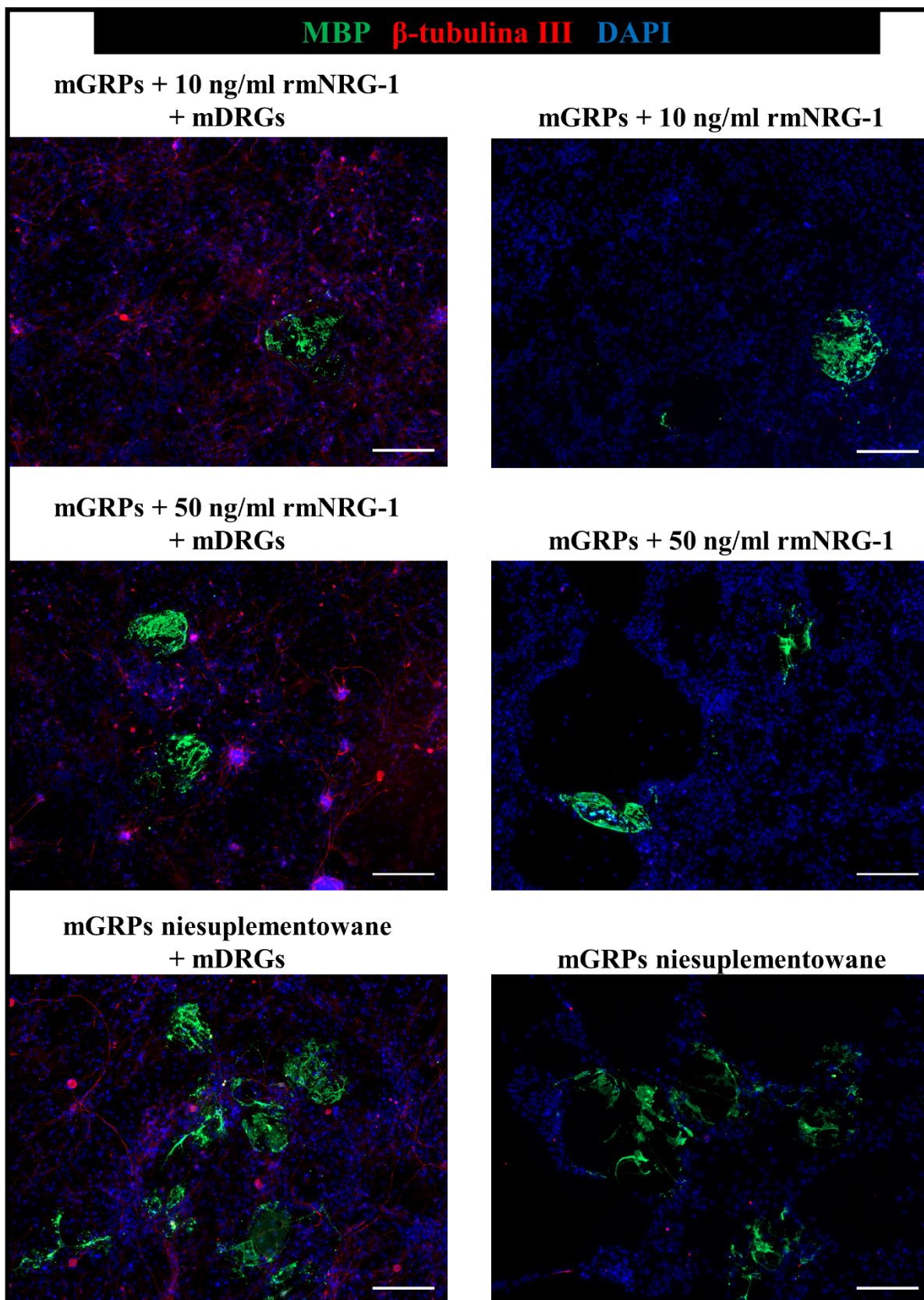
W celu sprawdzenia, czy suplementacja neureguliny-1 wpływa na proliferację mGRPs, wykonana została analiza ekspresji antygeny charakterystycznego dla komórek dzielących się - Ki67. Obecność komórek dzielących się stwierdzono w każdej z trzech populacji mGRPs: suplementowanych peptydem rmNRG-1 w stężeniu 10 ng/ml, 50 ng/ml, i kontrolnych (niesuplementowanych) (**Ryc. 19A**). Analiza ilościowa wykazała statystycznie istotny wzrost liczby komórek Ki67<sup>+</sup> w populacji mGRPs suplementowanych peptydem rmNRG-1 w stężeniu 50 ng/ml w stosunku do mGRPs niesuplementowanych (kontrolnych) ( $p=0,0015$ ) (**Ryc. 19B**).



**Rycina 19.** Analiza wpływu neureguliny-1 na proliferację mysich progenitorów glejowych (mGRPs). **(A)** Analiza jakościowa – reprezentatywne zdjęcia hodowli mGRPs suplementowanych peptydem rmNRG-1 w stężeniach 10 ng/ml oraz 50 ng/ml, w stosunku do komórek kontrolnych (niesuplementowanych). Komórki barwiono immunocytochemicznie w celu uwidocznienia antygenu charakterystycznego dla komórek dzielących się (Ki67<sup>+</sup>; białe strzałki). Zdjęcia wykonywano przy wzbudzeniu fluorochromu poprzez użycie wiązki światła o długości 546 nm (kolor czerwony). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (długość wiązki światła wzbudzenia: 405 nm, kolor niebieski). Hodowlę prowadzono w pożywce GRP Medium + bFGF. Skala 100  $\mu$ m. **(B)** Analiza ilościowa – względna liczba komórek dzielących się (Ki67<sup>+</sup>) w hodowli mGRPs suplementowanych rmNRG-1 w stężeniu 10 ng/ml oraz 50 ng/ml, w stosunku do komórek niesuplementowanych. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne  $\pm$  odchylenia standardowe (SD) z trzech powtórzeń biologicznych, w ramach których wykonano po trzy powtórzenia techniczne. Stwierdzono statystycznie istotne różnice pomiędzy mGRPs suplementowanymi rmNRG-1 w stężeniu 50 ng/ml a niesuplementowanymi ( $p=0,0015$ ). Poziom istotności  $< 0,05^*$  przyjmowano za statystycznie istotny.  $**0,01 > p > 0,001$ ; ns, brak istotności statystycznej.

#### 5.4.3. Ocena wpływu neureguliny-1 na zdolności mielinizacyjne mGRPs

W celu oceny wpływu suplementacji rmNRG-1 na zdolności mielinizacyjne mGRPs, wykonane zostały współhodowle z mDRGs, w warunkach stymulujących różnicowanie mGRPs (w pożywce hodowlanej pozbawionej bFGF). Obrazy oceniano przy pomocy barwienia immunocytochemicznego z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom charakterystycznym dla mielinizujących oligodendrocytów (MBP<sup>+</sup>) oraz neuronów ( $\beta$ -tubulina III<sup>+</sup>). Analiza jakościowa wykazała, że podczas hodowli w pożywce stymulującej różnicowanie komórek, suplementacja neureguliny-1 upośledza różnicowanie mGRPs do dojrzałych oligodendrocytów o fenotypie MBP<sup>+</sup>, a efekt ten jest niezależny od obecności w hodowli neuronów (mDRGs) (**Ryc. 20**).



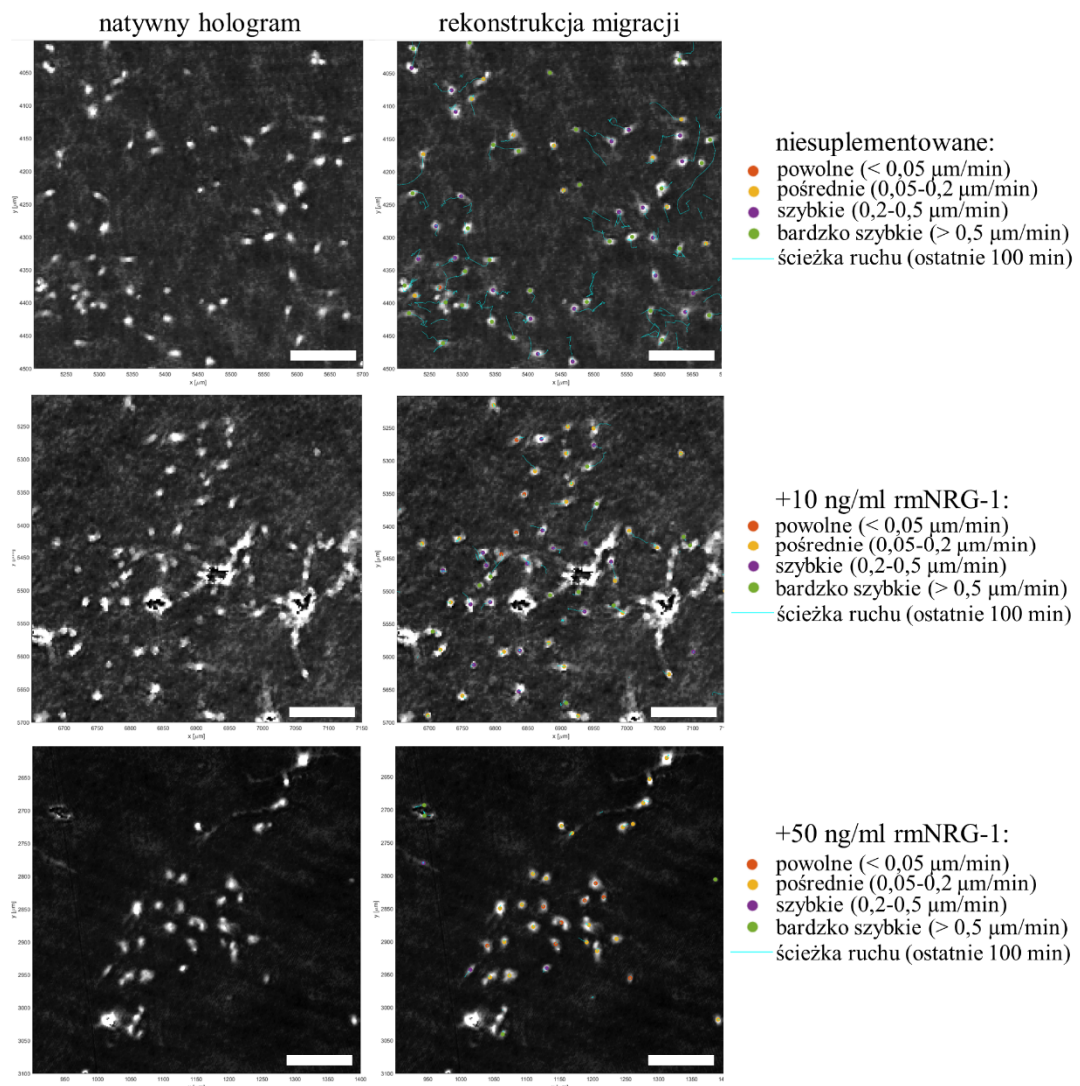
**Rycina 20.** Reprezentatywne zdjęcia współhodowli mGRPs suplementowanych neuregulina-1 w stężeniach 10 ng/ml (mGRPs + 10 ng/ml rmNRG-1), 50 ng/ml (mGRPs + 50 ng/ml rmNRG-1) i mGRPs kontrolnych (mGRPs niesuplementowane), oraz mDRGs. Komórki barwiono immunocytochemicznie i obrazowano w mikroskopie fluorescencyjnym w celu uwidocznienia antygenu charakterystycznego dla neuronów ( $\beta$ -tubulina III<sup>+</sup>) oraz mielinizujących oligodendrocytów (MBP<sup>+</sup>). Zdjęcia wykonywano przy wzbudzeniu fluorochromów poprzez

użycie wiązki światła o długości 488 nm (kolor zielony) i 546 nm (kolor czerwony). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (długość wiązki światła wzbudzenia: 405 nm, kolor niebieski). Pojedyncze hodowle mGRPs i mDRGs przedstawiono, jako kontrole. Zdjęcia wykonano na komórkach w drugim pasażu po rozpoczęciu suplementacji rmNRG-1. Hodowlę prowadzono w warunkach stymulujących różnicowanie mGRPs. Skala 200  $\mu\text{m}$ .

#### 5.4.4. Ocena wpływu neureguliny-1 na zdolności migracyjne mGRPs

Jako ostatnie zaprezentowane są wyniki badań wstępnych, dotyczących analizy zdolności migracyjnych mGRPs suplementowanych neuregulina-1 przeprowadzonej za pomocą cyfrowej holograficznej mikroskopii bezsoczewkowej (LDHM), uzyskane we współpracy z Zespołem Dr. hab. inż. Macieja Trusiaka (Instytut Mikromechaniki i Fotoniki Wydziału Mechatroniki Politechniki Warszawskiej). W momencie powstawania niniejszej rozprawy doktorskiej eksperymenty zostały przeprowadzone w jednym powtórzeniu biologicznym dla komórek kontrolnych (niesuplementowanych) i suplementowanych rmNRG-1 w stężeniach 10 ng/ml oraz 50 ng/ml. Dalsze badania są w toku.

Analizę obrazów rozpoczęto od przypisania komórek do jednej z czterech grup, w zależności od prędkości migracji: powolne ( $< 0,05 \mu\text{m}/\text{min}$ ), pośrednie ( $0,05\text{-}0,2 \mu\text{m}/\text{min}$ ), szybkie ( $0,2\text{-}0,5 \mu\text{m}/\text{min}$ ) i bardzo szybkie ( $> 0,5 \mu\text{m}/\text{min}$ ). Reprezentatywne fragmenty rekonstrukcji holograficznych uzyskanych dla komórek niesuplementowanych i suplementowanych rmNRG-1 w stężeniach 10 ng/ml oraz 50 ng/ml przedstawiono na **Ryc. 21**.





**Rycina 21.** Reprezentatywne fragmenty rekonstrukcji holograficznych migrujących mGRPs kontrolnych (niesuplementowane), suplementowanych neuregulina-1 w stężeniach 10 ng/ml (+10 ng/ml rmNRG-1) i 50 ng/ml (+50 ng/ml rmNRG-1), w 10 godzinie obrazowania za pomocą LDHM. W zależności od prędkości migracji komórki w każdej z trzech populacji przypisywano do jednej z czterech grup: powolne ( $< 0,05 \mu\text{m}/\text{min}$ ), pośrednie ( $0,05\text{-}0,2 \mu\text{m}/\text{min}$ ), szybkie ( $0,2\text{-}0,5 \mu\text{m}/\text{min}$ ) i bardzo szybkie ( $> 0,5 \mu\text{m}/\text{min}$ ). Skala  $100 \mu\text{m}$ .

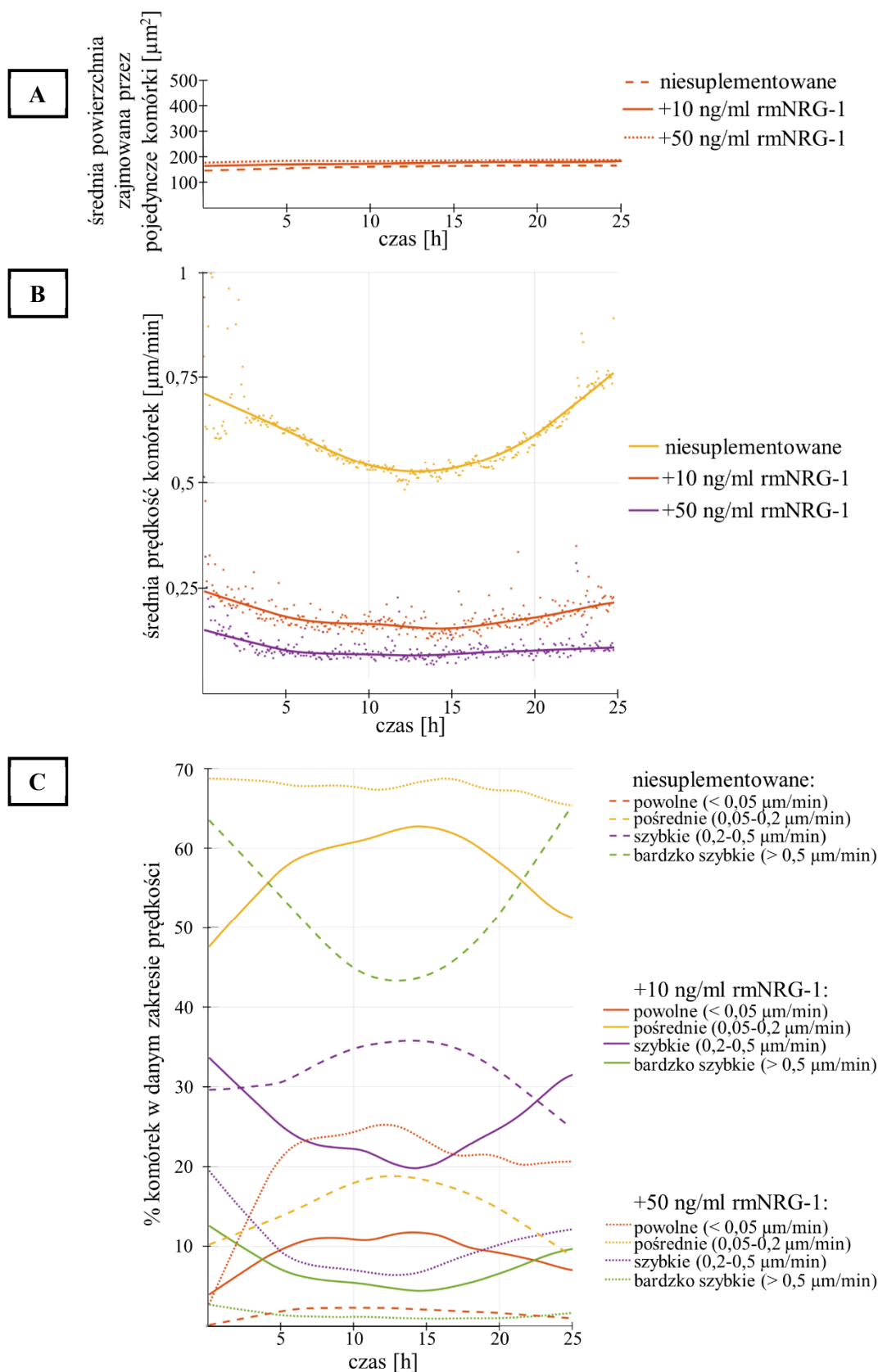
Wyniki badań sugerują, że średnia powierzchnia zajmowana przez pojedyncze komórki w obrębie trzech badanych populacji była porównywalna i wynosiła ok.  $170 \mu\text{m}^2$  (**Ryc. 22A**). Wstępne pomiary prędkości komórek zwracają natomiast uwagę na potencjalnie niższą średnią prędkość komórek suplementowanych peptydem rmNRG-1 w stężeniach 10 ng/ml i 50 ng/ml ( $0,125\text{-}0,25 \mu\text{m}/\text{min}$ ) w porównaniu do średniej dla komórek niesuplementowanych ( $0,5\text{-}0,75 \mu\text{m}/\text{min}$ ) przez cały okres pomiaru (**Ryc. 22B**).

Dalsze analizy sugerują, iż w momencie rozpoczęcia pomiaru ok. 63% komórek kontrolnych stanowiły komórki bardzo szybkie, w połowie okresu pomiarowego frakcja ta spadała do ok. 44%, a z końcem pomiaru wracała do poziomu z początku pomiaru. W momencie rozpoczęcia pomiaru szybkie komórki kontrolne stanowiły ok. 30% całkowitej populacji komórek kontrolnych, w połowie okresu pomiarowego frakcja ta wzrastała do ok. 35%, a z końcem pomiaru spadała do 25%. Frakcja komórek kontrolnych o pośredniej prędkości wynosiła ok. 10% na początku badania, 18% w połowie, i ponownie ok. 10% na końcu badania. Z kolei frakcja powolnych komórek kontrolnych stanowiła nie więcej niż 3% przez cały okres pomiaru (**Ryc. 22C**).

W momencie rozpoczęcia pomiaru ok. 12% komórek suplementowanych 10 ng/ml rmNRG-1 stanowiły komórki bardzo szybkie, w połowie okresu pomiarowego frakcja ta spadała do ok. 5%, a z końcem pomiaru wzrastała do ok. 10%. W momencie rozpoczęcia pomiaru szybkie komórki stanowiły ok. 34% całkowitej populacji komórek suplementowanych 10 ng/ml rmNRG-1, w połowie okresu pomiarowego frakcja ta spadała do ok. 20%, a z końcem pomiaru wzrastała do ok. 32%. Frakcja komórek suplementowanych 10 ng/ml rmNRG-1 o pośredniej prędkości wynosiła ok. 48% na początku badania, 63% w połowie, i ok. 51% na końcu badania. Z kolei frakcja powolnych komórek suplementowanych 10 ng/ml rmNRG-1 stanowiła ok. 4% na początku pomiaru, ok. 12% w połowie, i ok. 8% na końcu pomiaru (**Ryc. 22C**).

Z kolei przez cały okres pomiaru ok. 2-3% komórek suplementowanych 50 ng/ml rmNRG-1 stanowiły komórki bardzo szybkie. W momencie rozpoczęcia pomiaru szybkie komórki stanowiły ok. 20% całkowitej populacji komórek suplementowanych 50 ng/ml rmNRG-1, w połowie okresu pomiarowego frakcja ta spadała do ok. 8%, a z końcem pomiaru wzrastała do ok. 12%. Frakcja komórek suplementowanych 50 ng/ml rmNRG-1 o pośredniej prędkości wynosiła ok. 65-69% przez cały okres badania. Z kolei frakcja powolnych komórek suplementowanych 50 ng/ml rmNRG-1 stanowiła ok. 3% na początku pomiaru, ok. 23% w połowie, i ok. 20% na końcu pomiaru (**Ryc. 22C**).

Reasumując, komórki bardzo szybkie stanowiły najmniejszy procent populacji mGRPs suplementowanych neuregulina-1 w stężeniu 50 ng/ml. W populacji mGRPs +50 ng/ml rmNRG-1 stwierdzono także największy procent komórek o pośredniej prędkości.



**Rycina 22.** Wyniki wstępnej analizy migracji mGRPs suplementowanych neureguliną-1 w stężeniach 10 ng/ml (+10 ng/ml rmNRG-1) i 50 ng/ml (+50 ng/ml rmNRG-1), w porównaniu do kontrolnych mGRPs (niesuplementowane), przeprowadzonej z użyciem LDHM. **(A) Średnia powierzchnia zajmowana przez pojedyncze komórki.** Pomiary sugerują, iż średnia powierzchnia zajmowana przez mGRPs w obrębie wszystkich trzech populacji była podobna i wynosiła ok.  $170 \mu\text{m}^2$ . **(B) Średnia prędkość komórek.** Analiza wstępna sugeruje, iż przez cały okres pomiaru średnia prędkość mGRPs niesuplementowanych była wyższa niż mGRPs

suplementowanych rmNRG-1. Liniami ciągłymi oznaczono trendy. **(C) Procent komórek w danym zakresie prędkości.** W zależności od prędkości komórki w każdej z trzech populacji przypisywano do jednej z czterech grup: powolne ( $< 0,05 \mu\text{m}/\text{min}$ ), pośrednie ( $0,05-0,2 \mu\text{m}/\text{min}$ ), szybkie ( $0,2-0,5 \mu\text{m}/\text{min}$ ) i bardzo szybkie ( $> 0,5 \mu\text{m}/\text{min}$ ). Liniami przerywanymi (mGRPs niesuplementowane), ciągłymi (mGRPs +10 ng/ml rmNRG-1) i kropkowanymi (mGRPs +50 ng/ml rmNRG-1) oznaczono trendy w każdej grupie. Przedstawione wyniki oparto na jednym powtórzeniu biologicznym. Hologramy zapisywane były w odstępach 5 sekund. Czas pomiaru wynosił 25 godzin.

Podsumowując ostatni etap badań, stwierdzono, że suplementacja mGRPs egzogennym peptydem neuregulina-1 ma zróżnicowany wpływ na właściwości komórek w hodowli *in vitro*. W warunkach hamujących różnicowanie komórek (pożywka GRP Medium + bFGF), w hodowli mGRPs suplementowanej neuregulina-1 wykazano obecność progenitorów glejowych i brak dojrzałych oligodendrocytów. W tych samym warunkach stwierdzono także, że neuregulina-1 w stężeniu 50 ng/ml istotnie zwiększa liczbę komórek proliferujących w hodowli. Ponadto wykazano, że w warunkach stymulujących różnicowanie mGRPs (pożywka DRG Medium + NGF; brak bFGF) suplementacja neuregulina-1 zmniejszała poziom różnicowania mielinizujących oligodendrocytów, a efekt widoczny był zarówno w hodowli samych mGRPs, jak i we współhodowli z neuronami. Ostatecznie, przeprowadzona wstępna analiza migracji pojedynczych komórek sugeruje, że w warunkach hamujących różnicowanie suplementacja neuregulina-1 spowalnia migrację komórek w hodowli mGRPs.

Na podstawie wstępnych wyników badań wydaje się, że suplementacja mGRPs egzogennym rekombinowanym peptydem neuregulina-1 zmieniała fenotyp mGRPs i zwiększała ich proliferację, ale pogarszała zdolności migracyjne. Efekt ten mógł być zależny zarówno od stężenia peptydu, jak i od warunków hodowli. Dalsze badania są w toku.

## 6. Dyskusja

W przeszłości komórki glejowe uznawano za pomocnicze względem neuronów, traktowanych jako zasadniczy element funkcjonalnego układu nerwowego. Ten pierwotny dogmat miał swoje początki w badaniach Rudolfa Virchowa opublikowanych w książce „Die Cellularpathologie” z 1856 roku (<https://www.gutenberg.org/cache/epub/44921/pg44921-images.html>; stan na dzień 21.04.2023), i na lata przypisał glejowi wyłącznie funkcje pasywnej tkanki łącznej, stanowiącej rusztowanie i źródło składników odżywczych dla neuronów. Jednak późniejsze badania zwróciły uwagę na różnorodność komórek glejowych, jak i mnogość pełnionych przez nie funkcji. Odkryty został m.in. udział astrocytów, oligodendrocytów i komórek Schwanna w regeneracji układu nerwowego po uszkodzeniach, zaangażowanie mikrogleju w regulację odpowiedzi immunologicznej, oraz udział ependymocytów w tworzeniu płynu mózgowo-rdzeniowego i formowaniu BBB. Przepływ „fal wapniowych”, umożliwiający transmisję sygnału pomiędzy astrocytami, porównany został do przewodnictwa elektrycznego w sieciach neuronalnych (Volterra, Liaudet i Savtchouk, 2014; Stobart i in., 2018). Pierwotna „doktryna neuronu” z czasem zaczęła ustępować miejsca „glio-centriczności”, zwracającej większą uwagę na homeostazę pomiędzy poszczególnymi komórkami tkanki nerwowej i na współdziałanie zarówno neuronów, jak i gleju w procesy poznawcze, mechanizmy uczenia się i pamięci (Robertson, 2018). W ostatnich latach szczególne zainteresowanie wzbudzają także eksperymentalne terapie komórkowe oparte o przeszczepy egzogennych komórek glejowych u pacjentów cierpiących na choroby demielinizacyjne (Srivastava, Bulte, Walczak i Janowski, 2018).

W niniejszych rozprawie doktorskiej podjąłem badania nad udziałem GRPs w regeneracji OUN. GRPs stanowią subpopulację komórek glejowych, charakteryzującą się zdolnością do samoodnowy i różnicowania zarówno w OPCs, będącymi bezpośrednimi prekursorami oligodendrocytów, oraz w prekursorach astrocytów, o zdolności do różnicowania w astrocyty typu I i typu II (Raff, Miller i Noble, 1983). GRPs występują w obrębie OUN na etapie rozwoju płodowego i po urodzeniu organizmu, współtworząc homeostazę w populacji komórek glejowych, stanowiąc źródło mielinizujących oligodendrocytów oraz uczestnicząc w odpowiedzi immunologicznej i transmisji synaptycznej (Bergles i in., 2000; Lin i Bergles, 2004; Rasband i Macklin, 2012; Falcão i in., 2018). Jak dowiodły badania Rao i wsp., w warunkach *in vitro* zachowują one zdolność do różnicowania przez relatywnie długi czas (Rao, Noble i Mayer-Pröschel, 1998). Z kolei eksperymenty zespołu Mayer-Pröschela wykluczyły posiadanie przez nie zdolności do różnicowania w neurony, nawet w przypadku transplantacji w okolice nisz neurogennych w mózgu dorosłych osobników (Herrera i in., 2001). Wydaje się, zatem, że GRPs stanowią populację pośrednią pomiędzy NSCs, a niedojrzałymi komórkami glejowymi.

Liczne badania dowiodły przydatności GRPs w leczeniu chorób demielinizacyjnych i związanych bezpośrednio z uszkodzeniem neuronów, m.in. w leukodystrofiach, stwardnieniu zanikowym bocznym i urazach rdzenia kręgowego (Goldman, 2017). Jednak, jak sugerują poprzednie badania naszego zespołu, zasadniczym ograniczeniem zastosowania terapeutycznego GRPs jest ich niski potencjał migracyjny oraz względnie długi czas niezbędny do wykazania potencjału mielinizacyjnego przez zróżnicowane z nich oligodendrocyty (Lyczek i in., 2017; Srivastava i in., 2018; Stanaszek i in., 2021), w szczególności po przeszczepie do niesprzyjającego, „wrogiego” mikrośrodowiska chorobowego, jak zademonstrowano w naszych poprzednich badaniach (Stanaszek i in., 2022). W związku z tym, celem badań, stanowiących podstawę mojej rozprawy doktorskiej, było zwiększenie potencjału migracyjnego i mielinizacyjnego mGRPs. W tym celu zaplanowane zostało wywołanie w mGRPs nadekspresji NRG-1. Jak wykazały liczne badania, jest ona zaangażowana w mielinizację na poziomie rozwoju płodowego i remielinizację po urodzeniu, oraz dojrzewanie i migrację oligodendrocytów. Jako nośniki genetyczne wykorzystałem z kolei wektory lentiwirusowe, skuteczne w wywoływaniu stabilnych nadekspresji genetycznych w komórkach eukariotycznych (Tolmachov,

Tolmachova i A., 2011). Ostatni, niezrealizowany etap badań, zakładał eksperymenty *in vivo*, w tym analizę potencjału terapeutycznego mGRPs z nadekspresją NRG-1 (mGRP-NRG-1) w mysim modelu leukodystrofii - myszach *shiverer* (Readhead i in., 1987).

### 6.1. Optymalizacja warunków izolacji i hodowli mGRPs

W moich badaniach, izolacja mGRPs przeprowadzona została z tkanki nerwowej z płodów myszy w 13-14 dniu rozwoju płodowego. Płód stanowi relatywnie wszechstronne źródło komórek progenitorowych, umożliwiających bezpośrednie założenie hodowli pierwotnej w warunkach *in vitro* (Fujiki i in., 2009). W porównaniu do komórek z tkanek osobnika dorosłego, komórki z tkanek płodu cechuje wyższy potencjał proliferacyjny i większa podatność na czynniki stymulujące różnicowanie (Bhattacharya, 2004). Z kolei, w porównaniu do izolacji i różnicowania ESCs oraz zastosowania iPSCs, hodowla pierwotna pozwala znacznie szybciej uzyskać pożądane populacje komórek progenitorowych, a poszczególne komórki przechodzą przez mniej stadiów pośrednich przed osiągnięciem pełnej dojrzałości. Ogranicza to ryzyko pojawienia się niepożądanych zmian genetycznych i epigenetycznych, co ma szczególnie duże znaczenie w przypadku potencjalnego zastosowania klinicznego. Co więcej, jeśli przeszczepione do pacjenta zostaną nie w pełni zróżnicowane ESCs i iPSCs istnieje również ryzyko nowotworzenia, z uwagi na ich nieograniczony potencjał proliferacyjny. Jednakże, w porównaniu do ESCs i iPSCs, niższy potencjał proliferacyjny komórek progenitorowych, takich jak GRPs, może utrudniać uzyskanie ich wystarczającej liczby na potrzeby terapeutyczne (Homem, Repic i Knoblich, 2015). W moich badaniach, tkanka nerwowa z płodu wydawała się, zatem optymalnym wyborem pomiędzy czasem hodowli wymaganym do uzyskania funkcjonalnych GRPs, a zachowaniem przez nie zdolności do proliferacji i potencjału terapeutycznego, związanego ze zdolnością do różnicowania w funkcjonalne komórki glejowe. Warto jednak zaznaczyć, że o ile użycie tkanek z płodów jest akceptowalne w przypadku badań podstawowych, to wzbudza jednak wątpliwości natury etycznej, a zatem, w przypadku ewentualnego zastosowania klinicznego, bardziej wskazane byłoby wykorzystanie alternatywnego źródła GRPs.

Z kolei jako bezpośrednie źródło GRPs wybrałem rozwijający się mózg, mimo, iż na poziomie rozwoju płodowego obecność GRPs stwierdzono także w rozwijającym się rdzeniu kręgowym. Podyktowane jest to faktem istnienia pewnych różnic w rozwoju prekursorów komórek glejowych podczas rozwoju zarodkowego pomiędzy mózgiem i rdzeniem kręgowym (Vallstedt, Klos i Ericson, 2005). Różnice te związane są zarówno z czynnikami wewnętrznymi, takimi jak profil transkrypcyjny dojrzewających komórek, jak i zewnętrznymi, takimi jak ekspozycja na czynniki troficzne i wzrostowe oraz właściwości macierzy zewnątrzkomórkowej w danym obszarze (Finkel i in., 2021). W efekcie, pomiędzy GRPs wyizolowanymi z mózgu, a GRPs z rdzenia kręgowego mogą istnieć różnice w przeżywalności i fenotypie *in vitro* oraz zdolności do migracji i integracji po przeszczepie. Hodowla pierwotna założona z komórek z konkretnego, zdefiniowanego obszaru dojrzewającego OUN powinna cechować się, zatem wyższym stopniem homogenności aniżeli połączona frakcja komórek z mózgu i rdzenia kręgowego.

Selektywna hodowla *in vitro* mGRPs w moich badaniach prowadzona była w wystandaryzowanej pożywce hodowlanej, w skład której wchodził m.in. bFGF oraz heparyna. Obecność bFGF jest niezbędna w trakcie różnicowania się komórek glejowych na poziomie rozwoju zarodkowego (Sugimori i in., 2008), oraz w procesie różnicowania ESCs (Nistor i in., 2005) i iPSCs do progenitorów glejowych (Wang i in., 2013c). Obecność bFGF w pożywce hodowlanej umożliwia utrzymanie GRPs w stanie progenitorowym, gdyż jak wskazują badania, progenitory glejowe umieszczone w pożywce bez tego czynnika różnicują w oligodendrocyty w ciągu 3 dni (McKinnon, Matsui, Dubois-Dalcq i Aaronsont, 1990; McKinnon i in., 1993). W swoich badaniach również stwierdziłem różnicowanie się mGRPs do dojrzałych oligodendrocytów *in vitro* po umieszczeniu

komórek w pożywce hodowlanej bez bFGF. Z kolei, jak wykazał Stringer i wsp., heparyna stymuluje wzrost GRPs i stanowi unikatowy marker progenitorów linii glejowej (Stringer i in., 1999).

Przeprowadzona przeze mnie analiza fenotypowa populacji uzyskanej z hodowli pierwotnej natywnych mGRPs wskazuje na pewien poziom heterogenności uzyskanych komórek, gdyż obok glejowo-specyficznych komórek progenitorowych zaobserwowałem także progenitory oligodendrocytów i niedojrzałe oligodendrocyty. Podobnej obserwacji dokonał zespół Macieja Kurpisza, przeprowadzając analizę cytometryczną komórek w hodowlach pierwotnych GRPs izolowanych z myszy i psów, oraz linii komórkowej QSV40 ludzkich komórek glejowych. W przypadku mGRPs, badania wykazały m.in. ekspresję jednego z antygenów progenitorów glejowych, A2B5, przez 70,7% komórek w hodowli, i brak komórek z ekspresją polisialowanej neuralnej cząsteczki adhezyjnej (PSA-NCAM<sup>+</sup>, ang. *polysialylated neural cell adhesion molecule*) - antygeny komórek neuralnych, oraz brak komórek GFAP<sup>+</sup>. Należy jednak zaznaczyć, iż w przytoczonych badaniach źródłem mGRPs była tkanka nerwowa z rdzenia kręgowego płodów myszy (Klimczak i in., 2019). Z kolei heterogenny profil fenotypowy komórek w hodowli natywnych mGRPs uzyskanych w mojej pracy pokrywał się z fenotypem mGRPs z rozwijającego się mózgu płodów myszy zademonstrowanym w pracy Lyczek i wsp., gdzie, w wyniku analizy immunocytochemicznej, również stwierdzono obecność progenitorów glejowych o fenotypie A2B5<sup>+</sup>, NG2<sup>+</sup>, OLIG1<sup>+</sup>, OLIG2<sup>+</sup>, PDGFRα<sup>+</sup> i komórek GFAP<sup>+</sup>, przy jednoczesnym braku dojrzałych oligodendrocytów o fenotypie MBP<sup>+</sup> (Lyczek i in., 2017).

## 6.2. Wybór neureguliny-1

Badania zespołu Piotra Walczaka sugerują, że niemodyfikowane mysie progenitory glejowe cechuje ograniczony potencjał migracyjny po przeszczepie allogenicznym, przy jednoczesnym zachowaniu przez nie zdolności do różnicowania w mielinizujące oligodendrocyty (Lyczek i in., 2017). Inne badania sugerują natomiast, iż w przypadku przeszczepu ksenogenicznego, w warunkach *in vivo* zdolność migracji progenitorów glejowych pochodzenia ludzkiego jest wysoka, jednakże czas ich różnicowania w mielinizujące oligodendrocyty jest relatywnie długi w stosunku do czasu życia myszy-biorców, stanowiących model choroby demielinizacyjnej (Lepore i in., 2011; Lyczek i in., 2017). Warto jednak podkreślić, iż już iniekcja niemodyfikowanych GRPs powoduje intensywną mielinizację i wydłużenie życia myszy *shiverer*, stanowiących model leukodystrofii. Duże znaczenie dla skuteczności terapeutycznej GRPs w przypadku podania domózgowego okazuje się mieć miejsce ich iniekcji (Windrem i in., 2008; Stanaszek i in., 2021). Natomiast iniekcje wielomiejscowe wydają się optymalną strategią terapii komórkowej z użyciem psich GRPs (cGRPs) (wyniki własne, nieopublikowane). Niesprzyjające mikrośrodowisko w tkance objętej zwyrodnieniem może jednak pogarszać funkcjonowanie i przeżywalność egzogennych komórek terapeutycznych (Hardison i in., 2006), czego dowodzą także nasze poprzednie badania, przeprowadzone w zwierzęcym modelu ALS (Stanaszek i in., 2022). W związku z tym, istotnym wydaje się zwiększenie potencjału regeneracyjnego przeszczepianych progenitorów glejowych poprzez ich modyfikację w warunkach *in vitro*.

W niniejszej rozprawie doktorskiej podjąłem próbę modyfikacji mGRPs poprzez nadekspresję genu kodującego neuregulinę-1 oraz, niezależnie, suplementację egzogennym rekombinowanym peptydem - neuregulina-1. Pewne doniesienia zwracają bowiem uwagę na zaangażowanie neureguliny-1 w migrację komórek glejowych i mielinizację OUN zarówno w trakcie rozwoju zarodkowego (Le Douarin i Dupin, 2003), jak również w okresie dorosłości (Kataria, Alizadeh i Karimi-Abdolrezaee, 2019). Neuregulina-1 jest kluczowym białkiem sygnałowym regulującym wszystkie etapy rozwoju komórek Schwanna w obwodowym układzie nerwowym i oligodendrocytów w OUN. W przypadku obwodowego układu nerwowego, neuregulina-1 stymuluje dojrzewanie NCCs w kierunku glejowym (Shah, 1994), jak również wpływa na dojrzewanie i migrację komórek Schwanna (Miyamoto i in.,

2017). Z kolei deficyt NRG-1 uniemożliwia powstanie prekursorów komórek Schwanna (Wolpowitz i in., 2000).

W kontekście przeciwdziałania wpływowi na komórki po przeszczepie wrogiego mikrośrodowiska obszaru objętego zwyrodnieniem uwagę zwraca natomiast zdolność neureguliny-1 do modulacji odpowiedzi immunologicznej. Eksperymenty Kataria i wsp. dowiodły, iż suplementacja peptydem NRG-1 typu  $\beta 1$  łagodzi przebieg stwardnienia rozsianego poprzez regulację aktywności monocytów i makrofagów, limfocytów Th1 i mikrogleju (Kataria i in., 2021). Z kolei badania Li i wsp. pokazały, że suplementacja NRG-1 ogranicza nadmierną aktywację komórek mikrogleju, towarzyszącą farmakologicznemu uszkodzeniu mózgu (Li i in., 2015b).

Znamiennym jest jednak fakt, iż w wyniku ekspresji genu *Nrg-1* u ludzi powstać może aż ok. 33 różnych izoform białkowych (Chou i Ozaki, 2010), różniących się lokalizacją, a co za tym, idzie funkcjami (Zhang i in., 2017b). U człowieka sam gen *Nrg-1* ma długość 2,6 Mbp i składa się z 21 egzonów, co realistycznie uniemożliwia jego całościowe wklonowanie do pojedynczego wektora ekspresyjnego. W przypadku nadekspresji dobór wyjściowej sekwencji dla odpowiedniej izoformy neureguliny-1 wydaje się zatem kluczowy. Literatura przeglądowa sugeruje istotny udział typów I i III neureguliny-1 w dojrzewaniu i funkcjonowaniu komórek mielinizujących i samej mielinizacji w OUN (Mei i Xiong, 2008; Kataria, Alizadeh i Karimi-Abdolrezaee, 2019). Brinkmann i wsp. zademonstrowali, iż przejściowa nadekspresja zarówno NRG-1 typu I, jak i NRG-1 typu III prowadzi do hypermielinizacji w OUN (Brinkmann i in., 2008). Z kolei Stassart i wsp. pokazali, że nadekspresja zarówno NRG-1 typu I, jak i NRG-1 typu III wzmacnia remielinizację po uszkodzeniu nerwów obwodowych (Stassart i in., 2013). Zasadniczą różnicą pomiędzy typem I a typem III NRG-1 jest organizacja N-końca, na którym, w przypadku typu I, obecna jest domena immunoglobulinowa, pozwalająca na oddziaływanie parakryne oraz autoparakryne. W przypadku typu III na N-końcu obecna jest natomiast domena bogata w cysteinę (CRD), a sama NRG-1 typu III zakotwiczona jest na stałe w błonie komórkowej, co powoduje jej bezpośrednie oddziaływanie na otaczające komórki (Esper, Pankonin i Loeb, 2006; Kataria, Alizadeh i Karimi-Abdolrezaee, 2019). W kontekście nadekspresji konkretnej izoformy NRG-1 w komórkach terapeutycznych stosowanych do przeszczepu w chorobach demielinizacyjnych bardziej zasadnym wydaje się zatem wybór typu I NRG-1. GRPs z nadekspresją NRG-1 typu I mogłyby potencjalnie wydzielac syntetyzowane białko na zewnątrz komórki, wpływając tym samym na endogenne komórki glejowe gospodarza i modulując lokalne mikrośrodowisko przeszczepu. Skuteczność takiej strategii zastosowania GRPs dowiedziona została przez Kondo i wsp. w mysim modelu ALS, gdzie czynniki wydzielane przez egzogenne progenitory glejowe stymulowały endogenne mechanizmy neuroprotekcjne (Kondo i in., 2014).

W pracy Jabłońskiej i wsp. także podjęto próbę poprawy właściwości terapeutycznych GRPs, związanych z ich niewystarczającą zdolnością do zasiedlania mózgu po podaniu dotętniczym. W tym celu wywołano w mGRPs przejściową nadekspresję podjednostek  $\alpha 4$  i  $\beta$  bardzo późnego antygeny 4 (VLA-4), który, po połączeniu ze swoim ligandem – cząstką adhezji komórkowej śródbłonna naczyniowego typu pierwszego (VCAM-1), pośredniczy w transporcie leukocytów przez naczynia. Eksperymenty *in vitro* z użyciem komory mikroprzepływowej oraz przeszczepu w szczurzym modelu udaru niedokrwienego (MCAO) dowiodły zwiększonej zdolności do adhezji i migracji mGRPs z nadekspresją VLA-4 (Jablonska i in., 2018). Z kolei w celu zwiększenia zdolności astrocytów do przeciwdziałania ekscytotoksyczności związanej z akumulacją glutaminy po SCI, Li i wsp. wykorzystali w swoich badaniach GRPs z nadekspresją transportera glutaminy 1 (GLT1). Stransdukowane GRPs przeszczepione zostały do obszaru lezji w odcinku szyjnym rdzenia kręgowego, gdzie różnicowały w astrocyty, które odpowiedzialne są za homeostazę glutaminy. W porównaniu do astrocytów zróżnicowanych z nietransdukowanych GRPs, astrocyty z nadekspresją GLT-1 istotnie

zmniejszyły obszar lezji i zapobiegły odnerwieniu oraz utracie funkcji przepony (Li i in., 2015a). Przytoczone badania dowodzą możliwości skutecznej manipulacji genetycznej GRPs, umożliwiającej poprawę ich zdolności adhezyjnych i migracyjnych, oraz poprawę funkcji zróżnicowanych z nich komórek.

Jak zademonstrowano natomiast w pracy Xie i wsp., pozytywne efekty modyfikacji genetycznych można zaobserwować także w przypadku OPCs. Ko-transplantacja OPCs z nadekspresją czynnika regulatorowego mieliny (MRF) i komórek Schwanna zwiększyły mielinizację i spowodowały częściowe przywrócenie funkcji lokomotorycznych u szczurów z uszkodzonym rdzeniem kręgowym. Efekt terapeutyczny powiązany został z działaniem MRF, który zaangażowany jest w proces dojrzewania oligodendrocytów i mielinizację (Xie i in., 2016). Badanie dowodzi możliwości zwiększenia potencjału mielinizacyjnego progenitorów oligodendrocytów *in vivo* poprzez synergistyczny efekt nadekspresji białka zaangażowanego w proces mielinizacji i oddziaływania z innym rodzajem komórek gwałowych.

### 6.3. Wybór wektora lentiwirusowego

Właściwy dobór nośnika genetycznego stanowi kluczowy etap modyfikacji genetycznych komórek. Przy doborze nośnika należy uwzględnić m.in. typ modyfikowanej komórki, w tym aktywność endogennych promotorów, która, w przypadku konstytutywnych ekspresji, może sugerować umieszczenie transgenu pod kontrolą transkrypcyjną promotora aktywnego w danym typie komórki (Beckervordersandforth i in., 2010). Uwzględnić należy także rozmiar dostarczanego transgenu, który decyduje o maksymalnej wielkości wektora. Wydajność transdukcji jest bowiem odwrotnie proporcjonalna do wielkości transdukowanego konstrukt (Canté-Barrett i in., 2016). Istotnym czynnikiem jest także samo źródło transdukowanych komórek, bowiem transdukcja komórek z hodowli pierwotnej jest z reguły trudniejsza i mniej wydajna niż transdukcja linii komórkowych, co wynika często z ograniczonej zdolności do podziałów komórek pierwotnych przed osiągnięciem senescencji (Hare, Collins, Cuddington i Mossman, 2016) oraz pewnego poziomu heterogenności w populacji. Projektowany wektor powinien posiadać także sekwencję reporterową, pozwalającą na przyżyciową identyfikację komórek stransdukowanych.

W przytoczonej pracy Jabłońskiej i wsp., zmiana właściwości GRPs wywołana została poprzez transfekcję komórek plazmidami DNA kodującymi podjednostki  $\alpha 4$  i  $\beta$  VLA-4. Jednakże, zastosowana metoda transfekcji zapewnia jedynie przejściową nadekspresję transgenu w stransfekowanej komórce (Jablonska i in., 2018), co może ograniczać jej zastosowanie w leczeniu chorób przewlekłych. Alternatywnym podejściem jest użycie wektorów wirusowych. Przykładem takiego podejścia jest transdukcja z użyciem wektorów związanych z adenowirusami (AAV), tak jak w przytoczonych badaniach Li i wsp., dotyczących nadekspresji GLT1 w GRPs (Li i in., 2015a). Wektory AAV nie integrują do genomu gospodarza pozostając w komórce w postaci episomów, co zmniejsza ryzyko mutagenyzy. Jednocześnie zapewniają one stabilną nadekspresję transgenu w komórkach nie-dzielących się (Nayak i Herzog, 2010; David i Doherty, 2017). Mimo, iż nie-integrujące wektory AAV są skuteczne w wywoływaniu nadekspresji genetycznej w komórkach eukariotycznych, w przypadku potrzeby uzyskania stabilnej nadekspresji zarówno w komórkach dzielących jak i nie-dzielących się lepszym wyborem wydają się integrujące wektory lentiwirusowe. W przypadku wektorów lentiwirusowych wielkość kodowanego transgenu może być także większa niż w przypadku wektorów AAV (Do Minh, Sharon, Chahal i Kamen, 2019). W związku z tym, w swoich badaniach jako nośnik genetycznych wykorzystalem wektory lentiwirusowe. Ich głównymi zaletami są: (i) zdolność do stabilnej integracji zarówno do genomu komórek dzielących, jak i nie dzielących się; (ii) stabilny poziom ekspresji transgenu po integracji wirusa do genomu gospodarza; (iii) niska immunogenność. W przytoczonej



pracy Xie i wsp., wektor lentiwirusowy wykorzystany został do wywołania nadekspresji MRF w OPCs, stabilnej także po przeszczepieniu transdukowanych komórek do zwierząt (Xie i in., 2016).

W badaniach, stanowiących przedmiot mojej rozprawy doktorskiej, przetestowałem dwa wektory lentiwirusowe: pLenti-GIII-CMV, w którym transgen znajdował się pod kontrolą transkrypcyjną promotora z ludzkiego cytomegalowirusa (CMV), i HIV-SFFV-IRES-mRFP, wyposażony w promotor SFFV. Obydwa typy promotorów traktowane są jako „silne” (ang. *strong promoters*), pozwalając na wydajną, konstytutywną ekspresję regulowanych transgenów (Rintz i in., 2022). Należy zaznaczyć, iż całkowity rozmiar zastosowanego ostatecznie wirusa pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry był mniejszy (10 810 pz) niż wirusa HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP (12 246 pz), jednak mimo to, zajęcie procesu transdukcji stwierdziłem w obydwu przypadkach.

Jak zaprezentowano w literaturze, promotor CMV cechuje się kompatybilnością z wieloma typami komórek ssaczych (Bäck i in., 2019). Wektor pLenti-GIII-CMV posiadał także pod konstytutywnym promotorem SV40 gen *pac* kodujący N-acetylotransferazę puromycyny warunkujący oporność na puromycynę, a więc umożliwiający selekcję antybiotykową stransdukowanych komórek (Luna i in., 1988). W moich badaniach, w toku klonowania do wektora pLenti-GIII-CMV wprowadzona została sekwencja NRG-1 typu I w fuzji z sekwencją kodującą białko reporterowe mCherry, pozwalające na bezinwazyjną identyfikację stransdukowanych komórek przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej.

Uzyskane przeze mnie wyniki transdukcji mGRPs z użyciem wektora opartego o pLenti-GIII-CMV okazały się jednak niezadowalające. Stransdukowane mGRPs wykazywały ekspresję mCherry oraz były odporne na puromycynę, jednak w toku dalszej hodowli umierały. Śmierć stransdukowanych komórek mogła być spowodowana samą konstrukcją białka fuzyjnego NRG-1 typu I-mCherry. Ponieważ obecność białka reporterowego stwierdziłem w komórkach, a w warunkach fizjologicznych NRG-1 typu I stanowi sekrecyjną izoformę NRG-1, można przypuszczać, iż częściowo upośledzone zostało wydzielanie białka fuzyjnego z komórek, z czasem prowadząc do jego akumulacji, skutkującej cytotoksycznością. Reeves i wsp. zaobserwowali podobny efekt cytotoksyczności modyfikowanej rodopsyny poddanej konstytutywnej nadekspresji w komórkach HEK 293S (Reeves, Callewaert, Contreras i Khorana, 2002).

W celu weryfikacji hipotezy o toksyczności wysokiego stężenia takiego białka fuzyjnego dla komórek zasadnym byłoby zaprojektowanie alternatywnego wektora wirusowego, w którym transgen znajduje się pod kontrolą transkrypcyjną indukowalnego promotora. Taką metodę skutecznie zastosowali Massie i wsp., transdukując komórki z ludzkich linii komórkowych wektorem adenowirusowym, w którym pod kontrolą promotora indukowanego tetracykliną umieszczono toksyczne białko  $\Delta R1$ . Po aktywacji promotora komórki były zdolne do ekspresji toksycznego białka w ilości dochodzącej nawet do 10% ich całkowitej frakcji białkowej, zanim ostatecznie umierały (Massie i in., 1998). Jednocześnie, jak zasugerował Zhang i wsp., zastosowanie promotora CMV mogłoby być bardziej adekwatne w przypadku linii komórkowych i komórek w późnym stadium różnicowania (Zhang i in., 2017a). W innych badaniach pokazano natomiast, iż w przypadku transdukowania iPSCs wektorami adenowirusowymi zaopatrzonymi w promotor CMV, promotor CMV często ulegał unieczynnieniu na drodze metylacji DNA w krótkim czasie po transdukcji (Brooks i in., 2004; Tashiro i in., 2009).

Z trwałymi modyfikacjami genetycznymi nierozzerwalnie związane jest także ryzyko zaburzenia funkcjonowania komórek, w tym transformacji nowotworowej, prowadzącej do nowotworzenia. Badania dowodzą, iż miejscem integracji wektorów lentiwirusowych jest z reguły obszar jednostek transkrypcyjnych (Larsen i in., 2018; Singh, Bedwell i Engelman, 2022; Winans i in., 2022), jednak

dobór konkretnego locus nie jest możliwy. W związku z tym, integracja wektorów lentiwirusowych prowadzić może do aktywacji protoonkogenów lub inaktywacji anty-onkogenów. Przykładowo, badania Hacein-Bey-Abina i wsp. dowiodły, że przeszczep transdukowanych, autologicznych komórek CD34<sup>+</sup> ze szpiku kostnego, w których integracja wektora wirusowego nastąpiła do locus protoonkogeny LMO2, przyczynił się do rozwoju białaczki u biorców (Hacein-Bey-Abina i in., 2003). Ponadto, transdukcja komórek wektorami lentiwirusowymi prowadzić może do jednoczesnej integracji kilku kopii transgeny do genomu pojedynczej komórki, co może powodować niestabilność genetyczną komórek (Woods, 2003), potencjalnie skutkującą ich apoptozą (Zhivotovsky i Kroemer, 2004). Zjawiska te stanowią potencjalne wytłumaczenie śmierci mGRPs transdukowanych przez mnie wektorem pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry.

Drugim przetestowanym w moich badaniach wektorem lentiwirusowym był HIV-SFFV-IRES-mRFP. W odróżnieniu od pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry, wektor HIV-SFFV-IRES-mRFP posiadał sekwencję IRES, dzięki której wklonowana w kolejnym etapie sekwencja NRG-1 typu I była kodowana niezależnie od sekwencji białka reporterowego, jednak pod kontrolą transkrypcyjną wspólnego promotora. Ponadto, ekspresja transgeny znajdowała się pod kontrolą transkrypcyjną promotora SFFV. Te dwa czynniki mogły mieć kluczowe znaczenie dla optymalnej i stabilnej transdukcji mGRPs. Jak dowiedziono wcześniej w licznych doniesieniach, promotor SFFV może zostać zastosowany zarówno do krótkookresowej, jak i długookresowej, stabilnej nadekspresji genetycznej, wywołanej poprzez transdukcję wektorami lentiwirusowymi niezróżnicowanych komórek w hodowli pierwotnej m.in. psich mezenchymalnych komórek macierzystych (Gautam i in., 2016) i mysich hematopoetycznych komórek macierzystych (Piras i in., 2020). Z kolei w badaniach zespołu Kuhlmana, policistronowy wektor lentiwirusowy kodujący pod promotorem SFFV sekwencje białek SOX10, OLIG2, NKX6.2 i białka reporterowego RFP, pozwolił na skuteczne zróżnicowanie progenitorów neuralnych do dojrzałych oligodendrocytów w warunkach *in vitro* (Ehrlich i in., 2017).

W moich badaniach, zróżnicowany poziom ekspresji białka reporterowego mRFP, zaobserwowany w komórkach transdukowanych HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP, mógł wynikać bezpośrednio z konstrukcji samego wektora, tj. obecności sekwencji IRES. Niezależne badania Mizuguchi i wsp. oraz Hennecke i wsp. dowodzą często występującej, słabszej ekspresji białka, którego sekwencja kodująca umieszczona jest poniżej IRES w wektorach bicistronowych, przy zachowaniu stałego poziomu ekspresji transgeny umieszczone powyżej IRES, tj. bezpośrednio poniżej promotora (Mizuguchi i in., 2000; Hennecke, 2001). Warto podkreślić, że w moich badaniach, mimo zróżnicowanej ekspresji reportera, analizy RT-qPCR komórek po niezależnych transdukcjach wykazały jednak ekspresję mRNA dla NRG-1 typu I, a w toku dalszej hodowli nie stwierdziłem spontanicznej śmierci komórek, tak jak w przypadku transdukcji wektorem pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry.

Jak zaznaczyłem, zastosowany przez mnie wektor HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP nie kodował dodatkowo genu warunkującego oporność na antybiotyki. W przypadku dodania kolejnej sekwencji genetycznej istniało bowiem realne ryzyko spadku wydajności transdukcji, gdyż wielkość tego wektora wynosiła już ponad 12 000 pz. Ponadto, ponieważ kodowane przez wektor białko (NRG-1 typu I) miało formę sekrecyjną, przy założeniu odpowiednio wysokiego tempa wzrostu komórek w hodowli, otrzymanie nawet mieszanej (heterogennej) populacji komórek stransdukowanych i nie-stransdukowanych potencjalnie pozwoliłoby mi na zbadanie parakrynnego wpływu NRG-1 typu I, poddanej nadekspresji, na fenotyp mGRPs. W przypadku wykazania pozytywnego wpływu nadekspresji NRG-1 typu I na mGRPs możliwe byłoby jednak zaprojektowanie alternatywnego wektora, kodującego gen warunkujący oporność na antybiotyki.

Jak wspominałem, transdukcja wektorami lentiwirusowymi prowadzić może do integracji kilku kopii transgeny do genomu pojedynczej komórki (Woods, 2003). W mojej pracy, powyższy efekt

również może tłumaczyć zróżnicowany poziom ekspresji mRNA dla NRG-1 typu I pomiędzy poszczególnymi transdukcjami, a także zmienny poziom ekspresji białka reporterowego mRFP w przypadku transdukcji wektorem HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP. Należy jednak zaznaczyć, iż przeprowadzona przeze mnie pierwotna analiza fenotypowa wykazała już pewien poziom heterogenności komórek w populacji natywnych mGRPs, co pozwala przypuszczać, iż wydajność transdukcji mogła być zróżnicowana zarówno pomiędzy poszczególnymi komórkami w obrębie jednej hodowli, jak również pomiędzy hodowlami. Analogiczny efekt zaobserwowano już w pracy Hines i wsp., gdzie wydajność transdukcji wektorów lentiwirusowych w hodowlach pierwotnych komórek ludzkiego nowotworu piersi wahała się w granicach od 14 do 99% (Hines, Yaswen i Bissell, 2015).

#### 6.4. Optymalizacja procedury transdukcji mGRPs wektorem lentiwirusowym kodującym NRG-1

W toku optymalizacji protokołu transdukcji wirusowej przetestowałem trzy modyfikacje. Pierwsza z nich oparta była o zastosowanie polibrenu (bromku heksadimetryny) - polikationu, który poprawia wiązanie kapsydu wirusa z błoną komórki poprzez zobojętnienie ładunku elektrycznego, co może poprawić wydajność transdukcji (Davis, Morgan i Yarmush, 2002). Jednakże, wiele badań zwraca uwagę na jego potencjalną toksyczność, co zostało zaobserwowane w przypadku hodowli *in vitro* neuronów (Bao i in., 2018), limfocytów T (Costello i in., 2000) i mezenchymalnych komórek macierzystych (Pay i in., 2018). Rekomendowane stężenie polibrenu stosowanego w celu zwiększenia wydajności transdukcji wynosi pomiędzy 2  $\mu\text{g/ml}$  a 10  $\mu\text{g/ml}$  (Jacobsen i in., 2006; Lin i in., 2011; Bao i in., 2018). W swoich badaniach przetestowałem tylko stężenie w dolnej granicy, 2  $\mu\text{g/ml}$ , jednak już ono okazało się toksyczne dla mGRPs. Prawdopodobnie efekt związany był z faktem prowadzenia transdukcji na komórkach z hodowli pierwotnej, które są bardziej wrażliwe na zmiany warunków otoczenia i cechują się większą heterogennością niż linie komórkowe ([https://scope.dge.carnegiescience.edu/SCOPE\\_41/SCOPE\\_41\\_2.02\\_Chapter\\_7\\_75-98.pdf](https://scope.dge.carnegiescience.edu/SCOPE_41/SCOPE_41_2.02_Chapter_7_75-98.pdf); stan na dzień 24.04.2023). W przypadku dalszych prób chemicznej optymalizacji transdukcji mGRPs na rynku dostępne są również alternatywne wobec polibrenu, polikationowe związki zdolne do poprawy wydajności transdukcji, cechujące się teoretycznie niższą toksycznością, takie jak siarczan protaminy (Pay i in., 2018) czy DEAE [2-(dietyloamino)etanol]-dekstran (Amadeo, Hanson, Murray i Taylor, 2022). Jednakże, jak zauważa Denning i wsp., wszystkie związki polikationowe stosowane w celu zwiększenia wydajności transdukcji mogą prowadzić do niespecyficznego wiązania nieaktywnych cząstek przez transdukowane komórki, prowadząc do zafałszowania rzeczywistej wydajności reakcji (Denning i in., 2013).

Druga przetestowana przeze mnie modyfikacja protokołu transdukcji oparta była o dodatkowy etap wirowania naczynia hodowlanego zawierającego mGRPs i zawiesinę wirusów, określanego jako spinokulacja, w celu fizycznej stymulacji wiązania wirusów do powierzchni transdukowanych komórek. Co więcej, jak pokazują badania Guo i wsp., siła odśrodkowa generowana podczas wirowania powoduje przejściową reorganizację cytoszkieletu transdukowanych komórek poprzez zmiany aktywności aktyny i kofiliny, co sprzyja wiązaniu i wnikananiu wirusa do infekowanych komórek (Guo, Wang, Yu i Wu, 2011). Sama procedura wirowania jest mało inwazyjna i nie zaobserwowałem jej szkodliwości dla mGRPs, jednak nie przyniosła ona skutku w postaci poprawy wydajności transdukcji. Jak zauważa Amadeo i wsp., wyraźna poprawa wydajności transdukcji jest dostrzegalna, bowiem zwykle w przypadku połączenia metody chemicznej (dodatek polikationu) oraz fizycznej (spinokulacja) (Amadeo i in., 2022). Przykładowo, skuteczność spinokulacji w połączeniu z polibrenem dowiedziona została np. poprzez poprawę wydajności transdukcji komórek z linii 293F z nerki płodu (Liu i in., 2017). Jednak, z uwagi na toksyczność samego polibrenu wobec mGRPs, w moich badaniach takie podejście eksperymentalne nie było możliwe.

Skuteczną transdukcję mGRPs zaobserwowałem dopiero po zastosowaniu trzeciej modyfikacji protokołu, polegającej na dwukrotnej inkubacji mGRPs z zawiesiną wirusów. Każda z inkubacji trwała 24 godziny i prowadzona była ze świeżo rozmrożoną mieszaniną wirusów. W efekcie mGRPs eksponowane były na wirusy przez 48 godzin. Protokół wielokrotnej transdukcji był skuteczny także w przypadku innych, odpornych na transdukcję komórek z hodowli pierwotnej, takich jak ludzkie hematopoetyczne komórki macierzyste CD34<sup>+</sup> (Schott i in., 2019) oraz komórki NK (Carlsten i Childs, 2015). Jak zauważa Geschwind i wsp., dłuższa ekspozycja na wirusy zwiększa poziom ich absorpcji do powierzchni komórek (Geschwind, Lu i Federoff, 1994). Stosowane w moich badaniach mGRPs pochodziły z hodowli pierwotnej, co mogło oznaczać ich większą heterogenność niż w przypadku linii komórkowej. Zastosowanie podwójnej transdukcji mogło dać zatem szansę większej liczbie typów komórek w hodowli na skuteczną adsorpcję wirusa. Wreszcie podwójna transdukcja mogła doprowadzić do wielokrotnej infekcji pojedynczej komórki przez kilka cząstek wirusowych, co mogło okazać się kluczowe dla uzyskania oporności na antybiotyki lub ekspresji fluorescencyjnego białka reporterowego.

### 6.5. Charakterystyka mGRPs z nadekspresją NRG-1

Udana transdukcja mGRPs wektorem lentiwirusowym HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP, kodującym NRG-1 typu I oraz białko reporterowe mRFP, przedzielone sekwencją IRES, w oparciu o protokół podwójnej, 48-godzinnej transdukcji, pozwoliła mi zbadać wpływ nadekspresji NRG-1 typu I na fenotyp komórek w hodowli pierwotnej mGRPs.

Badania rozpocząłem od analiz immunocytochemicznych, których wyniki wykazały, iż w warunkach hamujących różnicowanie mGRPs (pożywka GRP Medium + bFGF), zarówno w populacji komórek transdukowanych wektorem kodującym NRG-1, jak i w populacji komórek transdukowanych wektorem kontrolnym kodującym samo białko reporterowe, obecne są progenitory glejowe. W populacji badanych komórek nie stwierdziłem obecności dojrzałych oligodendrocytów o fenotypie MBP<sup>+</sup>. Analiza immunocytochemiczna wykazała, że żywka hamująca różnicowanie zapobiegła różnicowaniu zarówno transdukowanych, jak i nietransdukowanych mGRPs w dojrzałe oligodendrocyty o fenotypie MBP<sup>+</sup>. Z kolei, w hodowlach mGRPs prowadzonych w żywce stymulującej różnicowanie (pożywka DRG Medium + NGF; brak bFGF), zaobserwowałem dojrzewanie oligodendrocytów o fenotypie MBP<sup>+</sup>. Podobnej obserwacji dokonali McKinnon i wsp., stwierdzając różnicowanie progenitorów glejowych do dojrzałych oligodendrocytów *in vitro* w ciągu 3 dni po usunięciu bFGF (McKinnon i in., 1990, 1993). W moich badaniach nadekspresja NRG-1 typu I nie upośledziła zdolności mGRPs do różnicowania w dojrzałe oligodendrocyty. Co istotne, nie stwierdziłem znamionnego wpływu samej procedury transdukcji wirusowej oraz wektora kontrolnego, kodującego samo białko reporterowe, na tempo wzrostu, przeżywalność i fenotyp mGRPs w hodowli *in vitro*.

W dalszych badaniach fenotypu komórek wykorzystałem cytometrię przepływową, porównując fenotyp mGRPs-NRG-1 typu I i kontrolnych, nietransdukowanych mGRPs. Analiza wykazała, że w populacji mGRPs transdukowanej wektorem HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP występuje średnio mniej progenitorów glejowych, natomiast więcej OPCs i niedojrzałych oligodendrocytów oraz komórek różnicujących o fenotypie pośrednim pomiędzy GRPs a OPCs, w porównaniu do populacji komórek kontrolnych. Brinkmann i wsp. w swoich badaniach wyprowadzili transgeniczną linię myszy, u których nadekspresji ulegała NRG-1 typu I, a ekspresja kodującego ją genu kontrolowana była przez promotor Thy1.2, aktywny w neuronach. Badacze zaobserwowali hypermielinizację w obrębie OUN, jednak nie wykazali różnic w liczbie oligodendrocytów o fenotypie CCI<sup>+</sup> (ang. *anti-adenomatous polyposis coli clone CCI*) w obrębie spoidła wielkiego mózgu (Brinkmann i in., 2008). Moje badania wskazują natomiast, iż nadekspresja NRG-1 typu I w mGRPs stymuluje różnicowanie tych komórek w kierunku oligodendrocytów nawet w obecności czynnika hamującego różnicowanie (bFGF), jednak w warunkach

stymulujących różnicowanie (brak bFGF), oligodendrocyty zróżnicowane z mGRPs-NRG-1 typu I nie wykazują większej zdolności do mielinizacji.

Uzyskane przeze mnie wyniki sugerują, że wywołanie konstytutywnej nadekspresji NRG-1 typu I stymuluje różnicowanie mGRPs w kierunku oligodendrocytów. Jest jednak prawdopodobne, że demonstracja pełnego potencjału terapeutycznego mGRPs-NRG-1 może wymagać innego układu doświadczalnego. Wartościowe byłoby, zatem wyprowadzenie linii zwierząt transgenicznych z nadekspresją NRG-1 typu I, znajdującą się jednak pod kontrolą promotora genu specyficznego dla GRPs, takiego jak PDGFR $\alpha$ , z ekspresją indukowalną dodatkowo np. obecnością tetracykliny, tak jak w systemie Tet-On, i zbadanie fenotypu tych komórek w warunkach fizjologicznych oraz w warunkach demielinizacji, spowodowanej przykładowo podaniem lizolecytyny (Birgbauer, Rao i Webb, 2004).

W perspektywie stymulacji różnicowania mGRPs, w wyniku nadekspresji NRG-1 typu I, zaobserwowany przeze mnie spadek tempa wzrostu komórek w hodowli mGRPs-NRG-1 typu I nie jest zaskakujący. Przykładem analogicznego zjawiska, w którym różnicowaniu komórek towarzyszy spowolnienie ich proliferacji, jest proces neurogenezy zachodzącej w mózгах dorosłych ssaków (ang. *adult neurogenesis*), m.in. w SVZ. Jak opisaliśmy to w naszej wcześniejszej pracy, w procesie tym uczestniczą m.in. (i) „uśpione” NSCs (ang. *quiescent NSCs*), cechujące się znikomą aktywnością proliferacyjną, (ii) „aktywowane” NSCs (ang. *activated NSCs*), wykazujące wysoką aktywność proliferacyjną, zdolne do różnicowania we (iii) wciąż dzielące się progenitory przejściowe (ang. *intermediate progenitor cells*), które różnicują w (iv) neuroblasty, które z czasem zaczynają tracić zdolność proliferacji, migrując wzdłuż donosowego strumienia migracyjnego (RMS) do opuszki węchowej, gdzie ostatecznie różnicują w (v) dojrzałe, nie dzielące się interneurony (Płatek i in., 2022). Ponadto, jak wspomniałem wcześniej, receptory ErbB4 dla neureguliny-1 ulegają ekspresji na powierzchni rozwijających się neuroblastów w niszy neurogennej w SVZ oraz wzdłuż RMS (Anton i in., 2004). Jednakże, jak wskazuje Wang i wsp., tylko neuroblasty zasiedlające SVZ wykazują zdolność proliferacji, jednak podczas migracji wzdłuż RMS, ich proliferacja ustaje, czemu towarzyszy ekspozycja na gradient neureguliny-1 (Wang i in., 2011; Ghashghaei i in., 2006). Mogłoby to więc sugerować, iż wpływ wywierany przez nadekspresję NRG-1 typu I na mGRPs, polegający na spadku tempa ich wzrostu przy stymulacji różnicowania, jest analogiczny do wpływu wywieranego przez neureguliny-1 na niedojrzałe neuroblasty w procesie neurogenezy w mózгах dorosłych ssaków, szczególnie, iż ekspresja receptorów ErbB4 zachodzi także na powierzchni progenitorów glejowych (Bartus i in., 2019).

Jak wspomniałem, stosując techniki immunocytochemiczne, nie stwierdziłem obecności neureguliny-1 w komórkach transdukowanych wektorem HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP oraz na ich powierzchni. Wynik ten nie jest zaskakujący, gdyż NRG-1 typu I stanowi izoformę sekrecyjną neureguliny-1, zatem jej ewentualna identyfikacja wymagałaby dodatkowych analiz. Paradoksalnie, jednak, zaobserwowany przeze mnie pozytywny wpływ konstytutywnej nadekspresji NRG-1 typu I na różnicowanie mGRPs *in vitro* wiązał się z negatywnym wpływem na tempo wzrostu mGRPs, co w praktyce uniemożliwiło mi otrzymanie wystarczającej liczby mGRPs-NRG-1 typu I na potrzeby badań *in vivo* w zwierzęcych modelach demielinizacji.

#### 6.6. Zastosowanie systemu lentiwirusowych cząstek aktywacyjnych w celu wywołania nadekspresji endogennej NRG-1 w mGRPs

Podczas moich dalszych prób wywołania nadekspresji NRG-1 w mGRPs wykorzystałem także system LAPs. System ten, zaproponowany przez Konermann i wsp., polega na wprowadzeniu do komórki docelowej wektorów lentiwirusowych integrujących do genomu, kodujących synergistyczny mediator aktywacji, który stymuluje wiązanie czynników transkrypcyjnych do obszaru promotorowego

konkretnego genu, zwiększając poziom jego ekspresji (Koneremann i in., 2015). Zatem w przeciwieństwie do tradycyjnych systemów ekspresyjnych, w których do genomu wprowadzona zostaje dodatkowa kopia genu, system LAPs stymuluje nadekspresję endogennego genu. W ten sposób skuteczność LAPs dowiedziona została m.in. poprzez nadekspresję genu NRF2 w komórkach nowotworu mózgu (Parkhurst i in., 2022), genu IFITM1 w komórkach nowotworu piersi (Lui i in., 2017), czy genu QKI w komórkach nowotworu prostaty (Han i in., 2022).

Ponieważ system LAPs, wykorzystany w moich badaniach, oparty jest o zastosowanie nośników genetycznych w postaci trzech wektorów lentiwirusowych, jego skuteczność uzależniona jest od efektywnej ko-transdukcji komórek wszystkimi trzema wektorami jednocześnie, odzwierciedlonej w postaci nabycia przez transdukowane komórki oporności na trzy różne antybiotyki. Zatem zastosowanie LAPs wciąż stanowi wyzwanie w przypadku komórek opornych na transdukcję, takich jak mGRPs. Z drugiej strony, system nie usuwa jednej z głównych wad integrujących wektorów lentiwirusowych, jakim jest ryzyko mutagenyzy po transdukcji. Ponadto, w przeciwieństwie do nadekspresji wywołanej integracją egzogennej kopii genu po transdukcji tradycyjnym wektorem lentiwirusowym, system LAPs wykazuje oddziaływanie na endogenny gen na poziomie transkrypcyjnym, a zatem nie jest możliwe jego zaadaptowanie do nadekspresji tylko jednej, konkretnej izoformy neureguliny-1 (np. NRG-1 typu I).

W moich badaniach, system LAPs, ukierunkowany na nadekspresję endogennego genu NRG-1 z myszy, został zaprojektowany i zamówiony w firmie komercyjnej - Santa Cruz Biotechnology. Ko-transdukcja mGRPs przetestowana została przeze mnie z użyciem mieszaniny trzech wektorów wirusowych, w stężeniu rekomendowanym przez producenta, w oparciu o ustalony protokół transdukcji. Jednak, w celu dodatkowej poprawy wydajności ko-transdukcji, producent zaleca także zastosowanie polibrenu, który, jak wykazano na wcześniejszych etapach moich badań, jest toksyczny dla mGRPs już w dolnym zakresie stężeń (2  $\mu\text{g/ml}$ ). Podjęte przeze mnie próby ko-transdukcji mGRPs mieszaniną LAPs bez zastosowania polibrenu były bezowocne, czego dowodzi brak nabycia oporności na antybiotyki przez transdukowane komórki. Co ciekawe, warto zwrócić uwagę, że w przeciwieństwie do moich badań, przytoczone powyżej trzy prace z wykorzystaniem LAPs w celu wywołania nadekspresji genetycznych, oparte były wyłącznie o transdukcje linii komórek nowotworowych (Lui i in., 2017; Han i in., 2022; Parkhurst i in., 2022).

#### 6.7. Charakterystyka mGRPs suplementowanych egzogenną neuregulina-1

Niezadowolające wyniki prób nadekspresji NRG-1 stanowiły podstawę do przeprowadzenia przeze mnie dodatkowych eksperymentów, których celem była zmiana właściwości mGRPs poprzez suplementację komórek egzogennym, plejotropowym czynnikiem wzrostu - peptydem neuregulina-1. Skuteczność takiego podejścia eksperymentalnego została już wielokrotnie zademonstrowana w badaniach *in vitro* i *in vivo* (Bruno, Miller i Lim, 2013). W pracy Sawickiej i wsp. udowodniliśmy, że suplementacja hodowli keratynocytów i fibroblastów syntetycznym peptydem, imunofanem, stymulowała proliferację tych komórek *in vitro*. Z kolei *in vivo*, wpływ imunofanu na właściwości keratynocytów i fibroblastów został przez nas zademonstrowany w mysim modelu gojenia rany (Sawicka i in., 2020).

W celu suplementacji mGRPs, w swoich obecnych badaniach wykorzystałem komercyjny, rekombinowany peptyd neuregulina-1 z myszy (rmNRG-1). Wang i wsp. dowiedli, iż *in vitro* suplementacją neuregulina-1 stymuluje proliferację komórek Schwanna (Wang, Wang, Zhong i Shen, 2013a), a pozytywny efekt powiązany został z aktywacją przez neuregulina-1 MAP-kinaz EKR1 i ERK2 (Rahmatullah i in., 1998). Suplementacja egzogenną neuregulina-1 zwiększała także proliferację, migrację i zdolności adhezyjne komórek nowotworowych (Momeny i in., 2015). Peptyd rmNRG-1

zakupiony został w firmie komercyjnej - R&D Systems, i przetestowany został przeze mnie w dwóch stężeniach: 10 ng/ml i 50 ng/ml, które dobrane zostały w oparciu o, odpowiednio, prace Gomis-Coloma i wsp. (Gomis-Coloma i in., 2018) i Cornelison i wsp. (Cornelison i in., 2018), gdzie rmNRG-1 stanowił suplement w pożywkach stosowanych w hodowlach pierwotnych komórek Schwanna.

Zgodnie z oficjalną kartą charakterystyki, zastosowany przeze mnie peptyd rmRNG-1 obejmował sekwencję aminokwasową Ser20-Lys246 mysiej neureguliny-1, a w wyniku jego elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących uzyskiwane są produkty o masie cząsteczkowej wynoszącej 42-49 kDa (<https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/9875-nr.pdf?v=20230518>; stan na dzień 12.05.2023); dokładna sekwencja aminokwasowa stanowi natomiast tajemnicę producenta. Karta charakterystyki sugeruje ponadto, iż peptyd dostarczany jest w postaci nieaktywnej pro-neureguliny-1 - proleku (ang. *prodrug*), co pozwala przypuszczać, iż jego aktywacja może następować dopiero w wyniku cięcia proteolitycznego i przyjęcia określonej struktury przestrzennej po kontakcie z komórkami (Rautio i in., 2008). Natomiast przewidzenie, której izoformie neureguliny-1, z funkcjonalnego punktu widzenia, odpowiadać mogłaby rmNRG-1 z firmy R&D Systems w hodowli mGRPs, wymagałoby przeprowadzania złożonych analiz z zastosowaniem metod fizykochemicznych i molekularnych, wykraczających poza zakres prowadzonych prac. Do tych pierwszych należą m.in. dyfraktometria rentgenowska oraz spektroskopia w podczerwieni i spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (Luchinat i Banci, 2018; Bigham i in., 2022), a do drugich - np. analiza proteolityczna i rozdział elektroforetyczny produktów proteolizy (Koth, Orlicky, Larson i Edwards, 2003). Przy założeniu, że peptyd rmNRG-1 charakteryzuje się obecnością domen funkcjonalnych (np. domeny immunoglobulinowej i domeny EGF), analizy te, przeprowadzone dla próbki peptydu przed i po kontakcie z komórkami, mogłyby potwierdzić lub wykluczyć obecność pewnych fragmentów sekwencji sygnałowych, sekwencji odpowiadających za zakotwiczenie w błonie lub sekrecję. Pozwoliłoby to na dokładniejsze określenie losów peptydu w hodowli komórkowej oraz lepsze poznanie jego oddziaływania z mGRPs *in vitro*. Bez przeprowadzania powyższych analiz należało jednak założyć, iż funkcjonalnie, zastosowany peptyd rmNRG-1 mógł odzwierciedlać działanie różnych izoform neureguliny-1, w tym zarówno izoform sekrecyjnych, jak i błonowych.

Pomimo braku wiedzy, której izoformie neureguliny-1 odpowiadał peptyd rmNRG-1 z firmy R&D Systems, zastosowanie tego peptydu w przytoczonych pracach Gomis-Coloma i wsp. (Gomis-Coloma i in., 2018) i Cornelison i wsp. (Cornelison i in., 2018) wskazuje jednak, iż wykazuje on aktywność *in vitro* i może być skutecznie zastosowany jako czynnik wzrostu w hodowli komórek glejowych. Należy przy tym zaznaczyć, iż wyniki otrzymane z użyciem takiego peptydu mogą nie odzwierciedlać wyników uzyskanych w wyniku nadekspresji w komórce sekwencji kodującej konkretną izoformę białka. Ponadto, zasadnym byłoby przetestowanie wpływu na hodowlę mGRPs jeszcze szerszego zakresu stężeń neureguliny-1 oraz różnego czasu stymulacji komórek. Jednak, jak zaznaczyłem, badania miały charakter wstępny.

W swoich badaniach postanowiłem sprawdzić wpływ neureguliny-1 na hodowle pierwotne mGRPs w warunkach hamujących ich różnicowanie (pożywka GRP Medium + bFGF) i stymulujących ich różnicowanie (pożywka DRG Medium + NGF; brak bFGF). Uzyskane przeze mnie wyniki wstępne zdają się sugerować, że wpływ egzogennej neureguliny-1 na fenotyp i właściwości mGRPs w hodowli *in vitro* jest niejednoznaczny, i może być zależny zarówno od stężenia peptydu, jak i od warunków hodowli.

Moje badania sugerują, iż w warunkach hamujących różnicowanie suplementacja neuregulina-1 nie miała wpływu na różnicowanie się mGRPs do dojrzałych oligodendrocytów. Co jednak ciekawe, w warunkach stymulujących różnicowanie obecność neureguliny-1 pogarszała różnicowanie się progenitorów glejowych do dojrzałych oligodendrocytów, a efekt ten był niezależny od obecności w

hodowli drugiego typu komórek - neuronów (mDRGs). Warto przy tym zaznaczyć, iż w moich badaniach stymulacja mGRPs neuregulina-1 rozpoczęta została jeszcze przed założeniem współhodowli z mDRGs i zmianą pożywki na stymulującą różnicowanie. Zatem biorąc pod uwagę fakt, że w warunkach fizjologicznych ekspresja sekrecyjnych form neureguliny-1 zachodzi także w neuronach (Raabe i in., 2004; Bernstein i in., 2006), i stanowi ona czynnik stymulujący różnicowanie oligodendrocytów (Simons i Trajkovic, 2006), można spekulować, iż stymulacja neuregulina-1 progenitorów glejowych w obecności bFGF, przed założeniem ich współhodowli z neuronami, mogła stanowić dla nich sprzeczny sygnał, który ostatecznie pozbawił je zdolności do zróżnicowania w dojrzałe oligodendrocyty. Przewlekłą ekspozycję mGRPs na egzogenną neuregulina-1 można porównać także do zjawiska „wyczerpania” limfocytów T (ang. *T-cell exhaustion*), związanego z ich zróżnicowaniem przy jednoczesnym upośledzeniu ich funkcji. W wyniku przewlekłej ekspozycji limfocytów T na antygen dochodzi, bowiem do utraty ich zdolności cytotoksycznych i zwiększonej ekspresji receptorów hamujących reakcję immunologiczną (ang. *immune checkpoints*) (Bevilacqua, Li i Ho, 2022), co jest zjawiskiem powszechnie obserwowanym w mikrośrodku nowotworu (Woroniecka i in., 2018) i może być modelowane w warunkach *in vitro* (Philipp i in., 2022).

Jak wykazały badania Stassart i wsp., poziom ekspresji neureguliny-1 typu I, stanowiącej izoformę sekrecyjną, wzrasta w wyniku demielinizacji nerwów obwodowych (Stassart i in., 2013). Zwiększona ekspresja NRG-1 w obwodowym układzie nerwowym stwierdzona została także przez Carroll i wsp., po uszkodzeniu obwodowych aksonów, motoneuronów i neuronów zwojów korzeni grzbietowych (Carroll i in., 1997). Badania te mogą sugerować, że w celu stymulacji dojrzewania mielinizujących oligodendrocytów, neuregulina-1 musiałaby działać w warunkach demielinizacji. W moich badaniach zarówno hodowle mGRPs, jak i późniejsze współhodowle mGRPs i mDRGs prowadzone były w warunkach optymalnych dla wzrostu komórek i mielinizacji aksonów. Nie można jednak wykluczyć, iż eksperymenty *in vitro* oparte o suplementację neureguliny-1 w warunkach demielinizacji, spowodowanej przykładowo traktowaniem neuronów w hodowli lizocetyną (Birgbauer, Rao i Webb, 2004), mogłyby skutkować innym wynikiem.

Jak wykazałem w swoich badaniach, suplementacja mGRPs egzogenną neuregulina-1 w stężeniu 50 ng/ml znacząco zwiększyła w hodowli odsetek proliferujących komórek o fenotypie Ki67<sup>+</sup>, w porównaniu do hodowli niesuplementowanych mGRPs. Pozytywny wpływ suplementacji neuregulina-1 na proliferację pewnych typów komórek został już wielokrotnie zaprezentowany w literaturze. Lin i wsp. zbadali wpływ 48-godzinnej suplementacji izoformami 1 $\alpha$  i 1 $\beta$  neureguliny-1 na proliferację linii komórek ludzkiego glejaka. W tym celu przeprowadzona została analiza immunocytochemiczna z użyciem przeciwciała specyficznego wobec antygenu PCNA (ang. *proliferating cell nuclear antigen*), stanowiącego marker komórek proliferujących. Badacze zaobserwowali ścisłą korelację pomiędzy stężeniem suplementowanej neureguliny-1, a ekspresją przez komórki nowotworowe białka CHL1 (bliskiego homologu L1, ang. *close homolog of L1*). Z kolei ekspresja CHL1 powiązana została wprost z ekspresją przez komórki PCNA. Ponadto, w dalszych badaniach zasugerowano, że wpływ NRG-1 na proliferację komórek glejaka mógł następować na drodze aktywacji ścieżki sygnałowej MAPK/ERK, bowiem NRG-1 $\alpha$  i 1 $\beta$  zwiększały poziom ekspresji ufosforylowanej formy kinazy ERK1/2 (p-ERK1/2) (Lin i in., 2020).

Wpływ suplementacji neuregulina-1 na proliferację komórek wykazano także w badaniach *in vivo*. W pracy zespołu Bennetta, fragment neureguliny  $\beta$ 1 odpowiadający domenie EGF (aminokwasy 177-244) podany został na drodze intratekalnej, poprzez punkcję lędźwiową, w szczurzym modelu uszkodzenia nerwów obwodowych. W celu określenia liczby komórek, które przeszły fazę replikacji DNA w określonym czasie po iniekcji neureguliny-1, dootrzewnowo podany został także analog tymidyny, BrdU (5-bromo-2'-deoksyurydyna). BrdU ulega wbudowaniu do łańcucha DNA komórek



przechodzących proces podziału, a następnie może zostać zidentyfikowany na drodze barwienia immunohistochemicznego, za pomocą specyficznych przeciwciał. Badacze zaobserwowali wzrost poziomu inkorporacji BrdU w obrębie komórek rogu grzbietowego rdzenia kręgowego u zwierząt nastrzykiwanych neuregulina-1, w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Dalsze analizy wykazały, iż ponad 95% komórek BrdU<sup>+</sup> stanowiły komórki mikrogleju. Z kolei zastosowanie specyficznego inhibitora receptora erbB2 dla neureguliny-1 (PD168393) przed podaniem neureguliny-1, ograniczało liczbę komórek mikrogleju o fenotypie BrdU<sup>+</sup> o 60-70%, a ponadto zmniejszało w nich ekspresję ufosforylowanej formy kinazy białkowej p38 ścieżki sygnałowej MAPK (p-p38 MAPK), powiązanej z proliferacją (Calvo i in., 2010). Te i inne badania (Jardé i in., 2020; Kataria i in., 2021) sugerują zatem, że suplementacja egzogenną neuregulina-1 może stymulować proliferację komórek na drodze aktywacji ścieżki sygnałowej MAPK/ERK.

Do zbadania wpływu suplementacji neureguliny-1 na migrację mGRPs, w swojej pracy zastosowałem mikroskopię LDH, opartą na mikroskopii holograficznej Gabora. Ta technika została wykorzystana do wizualizacji i analizy komórek *in vitro* po raz pierwszy dzięki naszej współpracy z naukowcami z Instytutu Mikromechaniki i Fotoniki Wydziału Mechatroniki Politechniki Warszawskiej. Metoda ta pozwala na przyżyciowe obrazowanie ruchliwych komórek bez stosowania soczewek ani dodatkowych znaczników fluorescencyjnych, i dotychczas znalazła już zastosowanie w wielu dziedzinach badań biomedycznych, w tym m. in. do detekcji pasożytów w świeżych próbkach krwi (Romero, Monaldi i Alanís, 2012) i badaniu mobilności ludzkich plemników (Su, Xue i Ozcan, 2012).

Cyfrowa rekonstrukcja hologramów pozwoliła mi na indywidualną analizę zachowania poszczególnych komórek w hodowli mGRPs przez relatywnie długi czas, z wysoką częstotliwością zbierania obrazu (25-godzinny czas pomiaru z 5-sekundowym interwałem zbierania pojedynczych obrazów). Rejestracja komórek przeprowadzana była w standardowych warunkach hodowlanych, w naczyniach hodowlanych pokrytych PLL/LAM. Zaletą takiego podejścia eksperymentalnego była możliwość analizowania wpływu na migrację mGRPs wyłącznie jednej zmiennej, w tym przypadku, obecności w pożywce egzogennej neureguliny-1. Inną, często stosowaną metodą badania migracji komórek jest tzw. „test zarastania rysy” (ang. *scratch assay*), w uproszczeniu oparty na: (i) wykonaniu rysy w jednowarstwowej hodowli komórek (ang. *monolayer*), za pomocą tipsa lub innego wystandaryzowanego narzędzia, (ii) dalsza hodowla komórek, a na końcu (iii) obrazowanie i pomiar stopnia zarośnięcia rysy. W założeniu tempo zarastania rysy powinno korelować z tempem migracji komórek w hodowli, jednak ich proliferacja oraz stopień uszkodzenia mechanicznego mogą utrudniać wiarygodną analizę wyników i powtarzalność eksperymentu (Liang, Park i Guan, 2007). Co więcej, jak sugerują liczne badania, wykonywanie rysy na naczyniu hodowlanym pokrytym białkami macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *surface coating*) może uszkodzić warstwę tych białek, zaburzając migrację badanych komórek (Ashby i Zijlstra, 2012; Shabestani Monfared, Ertl i Rothbauer, 2020) (<https://ibidi.com/content/282-creating-the-gap>; stan na dzień 10.05.2023). Ponieważ LDHM pozwoliła na rejestrację dynamiki pojedynczych mGRPs w standardowo prowadzonej hodowli, nie istniało ryzyko uszkodzenia powierzchni PLL/LAM, a wyniki mogły zostać skompensowane o ewentualną proliferację komórek, zachodzącą w trakcie trwania pomiarów.

Wstępne wyniki badań zaprezentowane w mojej pracy doktorskiej wskazują na spadek tempa migracji komórek w hodowli pierwotnej mGRPs suplementowanych egzogenną neuregulina-1 zarówno w stężeniu 10 ng/ml, jak i 50 ng/ml. Podobny efekt zaobserwowano w badaniach *in vitro* zespołu Bai, opartych na suplementacji linii komórkowych ludzkiego gruczolakoraka płuc (ang. *lung adenocarcinoma*) egzogenną neuregulina-1 (Wang i in., 2018b). Analiza migracji, przeprowadzona przez tych autorów, z użyciem dwukomorowych szalek hodowlanych typu *transwell*, wykazała, że dodatek neureguliny-1 do pożywki znacząco zmniejszał liczbę komórek nowotworowych zdolnych do

przejścia przez błonę komory, w porównaniu do komórek kontrolnych, których większa liczba migrowała na stronę spodnią błony. Co ciekawe jednak, odwrotny efekt, w postaci stymulacji migracji komórek nowotworowych, zaobserwowano w przypadku wyciszenia ekspresji endogennej kopii genu NRG-1 za pomocą siRNA po zakończeniu suplementacji egzogenną neuregulina-1. Stosując analizę Western Blot, badacze powiązali otrzymany wynik z ze spadkiem ekspresji ufosforylowanych form kinaz AKT (p-AKT) i ERK1/2 (p-ERK1/2), towarzyszący wyciszeniu ekspresji genu NRG-1.

Wyniki otrzymane w moich badaniach stoją jednak w sprzeczności z pewnymi danymi literaturowi, dowodzącymi pozytywnego wpływu suplementacji egzogenną neuregulina-1 na migrację komórek Schwanna, w komorach migracyjnych typu *transwell* (Chang i in., 2013). Warto jednak zaznaczyć, iż w przytoczonych badaniach Chang i wsp., rekombinowana neuregulina-1 zastosowana została jako chemoatraktant dla migrujących komórek Schwanna, a suplementacja ograniczona była jedynie do czasu trwania migracji komórek w komorach (24 godziny). W moich badaniach, suplementacja migrujących mGRPs neuregulina-1 prowadzona była zarówno w pasażu poprzedzającym wysianie komórek w celu obrazowania z użyciem mikroskopii LDH, jak również podczas trwania całego okresu obrazowania (łącznie powyżej 7 dni). Jest, zatem prawdopodobne, że zaobserwowane przeze mnie pogorszenie się tempa migracji mysich progenitorów glejowych wynikało z długotrwałej suplementacji neureguliny-1, mogącej mieć głęboki wpływ na fenotyp komórek w hodowli. Nie można jednak wykluczyć, że zbadanie doraźnego wpływu suplementacji neureguliny-1, jako chemoatraktanta dla mGRPs wyłącznie w czasie trwania testu migracji, mogłoby skutkować innym wynikiem.

## 7. Podsumowanie

- optymalizacja warunków izolacji i hodowli pierwotnej mGRPs pozwoliła mi na uzyskanie populacji progenitorów glejowych o fenotypie A2B5<sup>+</sup>, NG2<sup>+</sup>, OLIG1<sup>+</sup>, OLIG2<sup>+</sup>, PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>
- mGRPs transdukowane wektorem lentiwirusowym pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry, kodującym NRG-1 typu w fuzji z białkiem reporterowym mCherry, wykazywały zróżnicowany poziom syntezy transkryptu dla NRG-1 typu I; dalsza hodowla mGRPs transdukowanych tym wektorem skutkowała spontanicznym odklejaniem się i śmiercią komórek w kolejnych pasażach
- mGRPs transdukowane wektorem HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP, kodującym niezależnie NRG-1 typu i białko reporterowe mRFP, wykazywały zróżnicowany poziom ekspresji mRNA dla NRG-1 typ I. Analiza fenotypowa wykazała, że w populacji mGRPs transdukowanej tym wektorem występuje mniej progenitorów glejowych, natomiast więcej OPCs i niedojrzałych oligodendrocytów oraz komórek różnicujących o fenotypie pośrednim pomiędzy GRPs a OPCs, w porównaniu do populacji komórek kontrolnych. Z kolei analiza poziomu mielinizacji aksonów przez mGRPs transdukowane wektorem HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP i mGRPs kontrolne nie wykazała między nimi istotnych różnic w zdolności do mielinizacji. Populacja mGRPs transdukowanych HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP cechowała się niskim tempem wzrostu komórek, co uniemożliwiło mi uzyskanie dostatecznej liczby mGRPs z nadekspresją NRG-1 typu I do przeprowadzenia dalszych badań
- transdukcja mGRPs lentiwirusowymi cząstkami aktywacyjnymi, zaprojektowanymi w celu nadekspresji endogennego genu kodującego NRG-1 (NRG-1-LAPs), nie powiodła się
- suplementacja mGRPs egzogennym peptydem neuregulina-1 miała zróżnicowany wpływ na fenotyp komórek w hodowli *in vitro*. W warunkach hamujących różnicowanie komórek, w hodowli mGRPs suplementowanej neuregulina-1 stwierdziłem obecność progenitorów glejowych i brak dojrzałych oligodendrocytów. W tych samym warunkach okazało się, że neuregulina-1 istotnie zwiększa liczbę komórek proliferujących (Ki67<sup>+</sup>) w hodowli. Natomiast w warunkach stymulujących różnicowanie mGRPs, suplementacja neuregulina-1 zmniejszała poziom ich różnicowania do mielinizujących oligodendrocytów o fenotypie MBP<sup>+</sup>, a efekt widoczny był zarówno w hodowli samych mGRPs, jak i we współhodowli z neuronami. Wstępne pomiary prędkości komórek zwracają uwagę na potencjalnie niższą średnią prędkość migracji mGRPs suplementowanych peptydem rmNRG-1, w porównaniu do średniej prędkości dla komórek niesuplementowanych

## 8. Wnioski

- nadekspresja NRG-1 typu I, wywołana poprzez transdukcję mGRPs wektorami lentiwirusowymi, powoduje spadek tempa wzrostu tych komórek i stymuluje ich różnicowanie w kierunku oligodendrocytów, nie stwierdziłem jednak istotnego wpływu nadekspresji NRG-1 typu I na właściwości mielinizacyjne mGRPs
- moje wstępne badania dotyczące stymulacji mGRPs egzogennym rekombinowanym peptydem neuregulina-1 sugerują zwiększoną proliferację i spowolnienie migracji suplementowanych mGRPs, przy jednoczesnym spadku zdolności tych komórek do różnicowania w dojrzałe oligodendrocyty
- wyniki badań przedstawionych w mojej rozprawie doktorskiej wskazują, że wpływ neureguliny-1 na właściwości funkcjonalne mGRPs jest zależny od zastosowanego układu doświadczalnego.

## 9. Spis piśmiennictwa

- Ahn, J.H., Chen, B.H., Shin, B.N., Cho, J.H., Kim, I.H., Park, J.H., Lee, J.C., Tae, H.J., Lee, Y.L., Lee, J., Byun, K., Jeong, G.-B., Lee, B., Kim, S.U., Kim, Y.-M., Won, M.-H. i Choi, S.Y., 2016. Intravenously Infused F3.Olig2 Improves Memory Deficits via Restoring Myelination in the Aged Hippocampus Following Experimental Ischemic Stroke. *Cell Transplantation*, 25(12), s. 2129–2144.
- Ahuja, C.S., Wilson, J.R., Nori, S., Kotter, M.R.N., Druschel, C., Curt, A. i Fehlings, M.G., 2017. Traumatic spinal cord injury. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), s. 17018.
- Alexander, G.M., Erwin, K.L., Byers, N., Deitch, J.S., Augelli, B.J., Blankenhorn, E.P. i Heiman-Patterson, T.D., 2004. Effect of transgene copy number on survival in the G93A SOD1 transgenic mouse model of ALS. *Molecular Brain Research*, 130(1–2), s. 7–15.
- Amadeo, F., Hanson, V., Murray, P. i Taylor, A., 2022. DEAE-Dextran Enhances the Lentiviral Transduction of Primary Human Mesenchymal Stromal Cells from All Major Tissue Sources Without Affecting Their Proliferation and Phenotype. *Molecular Biotechnology*. [online] Dostępne na: <<https://link.springer.com/10.1007/s12033-022-00549-2>> [dostęp 15.05.2023].
- Ammann-Schnell, L., Groeschel, S., Kehrer, C., Frölich, S. i Krägeloh-Mann, I., 2021. The impact of severe rare chronic neurological disease in childhood on the quality of life of families—a study on MLD and PCH2. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 16(1), s. 211.
- Anton, E.S., Ghashghaei, H.T., Weber, J.L., McCann, C., Fischer, T.M., Cheung, I.D., Gassmann, M., Messing, A., Klein, R., Schwab, M.H., Lloyd, K.C.K. i Lai, C., 2004. Receptor tyrosine kinase ErbB4 modulates neuroblast migration and placement in the adult forebrain. *Nature Neuroscience*, 7(12), s. 1319–1328.
- Ashby, W.J. i Zijlstra, A., 2012. Established and novel methods of interrogating two-dimensional cell migration. *Integrative Biology*, 4(11), s. 1338.
- Askari, N., Yaghoobi, M.M., Shamsara, M. i Esmaceli-Mahani, S., 2014. Human Dental Pulp Stem Cells Differentiate into Oligodendrocyte Progenitors Using the Expression of Olig2 Transcription Factor. *Cells, Tissues, Organs*, 200(2), s. 93–103.
- Bäck, S., Dossat, A., Parkkinen, I., Koivula, P., Airavaara, M., Richie, C.T., Chen, Y.-H., Wang, Y. i Harvey, B.K., 2019. Neuronal Activation Stimulates Cytomegalovirus Promoter-Driven Transgene Expression. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 14, s. 180–188.
- Bao, F., Shi, H., Gao, M., Yang, L., Zhou, L., Zhao, Q., Wu, Y., Chen, K., Xiang, G., Long, Q., Guo, J., Zhang, J. i Liu, X., 2018. Polybrene induces neural degeneration by bidirectional Ca<sup>2+</sup> influx-dependent mitochondrial and ER-mitochondrial dynamics. *Cell Death & Disease*, 9(10), s. 966.
- Bartus, K., Burnside, E.R., Galino, J., James, N.D., Bennett, D.L.H. i Bradbury, E.J., 2019. ErbB receptor signaling directly controls oligodendrocyte progenitor cell transformation and spontaneous remyelination after spinal cord injury. *Glia*, 67(6), s. 1036–1046.
- Bartus, K., Galino, J., James, N.D., Hernandez-Miranda, L.R., Dawes, J.M., Fricker, F.R., Garratt, A.N., McMahon, S.B., Ramer, M.S., Birchmeier, C., Bennett, D.L.H. i Bradbury, E.J., 2016. Neuregulin-1 controls an endogenous repair mechanism after spinal cord injury. *Brain*, 139(5), s. 1394–1416.
- Beckervordersandforth, R., Tripathi, P., Ninkovic, J., Bayam, E., Lepier, A., Stempfhuber, B., Kirchoff, F., Hirrlinger, J., Haslinger, A., Lie, D.C., Beckers, J., Yoder, B., Irmeler, M. i Götz, M.,

2010. In Vivo Fate Mapping and Expression Analysis Reveals Molecular Hallmarks of Prospectively Isolated Adult Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 7(6), s. 744–758.

Beites, C.L., Kawauchi, S., Crocker, C.E. i Calof, A.L., 2005. Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium. *Experimental Cell Research*, 306(2), s. 309–316.

Belin, S., Ornaghi, F., Shackleford, G., Wang, J., Scapin, C., Lopez-Anido, C., Silvestri, N., Robertson, N., Williamson, C., Ishii, A., Taveggia, C., Svaren, J., Bansal, R., Schwab, M.H., Nave, K., Fratta, P., D'Antonio, M., Poitelon, Y., Feltri, M.L. i Wrabetz, L., 2019. Neuregulin 1 type III improves peripheral nerve myelination in a mouse model of congenital hypomyelinating neuropathy. *Human Molecular Genetics*, 28(8), s. 1260–1273.

Benjamin, E.J., Virani, S.S., Callaway, C.W., Chamberlain, A.M., Chang, A.R., Cheng, S., Chiuve, S.E., Cushman, M., Dellinger, F.N., Deo, R., de Ferranti, S.D., Ferguson, J.F., Fornage, M., Gillespie, C., Isasi, C.R., Jiménez, M.C., Jordan, L.C., Judd, S.E., Lackland, D., Lichtman, J.H., Lisabeth, L., Liu, S., Longenecker, C.T., Lutsey, P.L., Mackey, J.S., Matchar, D.B., Matsushita, K., Mussolino, M.E., Nasir, K., O'Flaherty, M., Palaniappan, L.P., Pandey, A., Pandey, D.K., Reeves, M.J., Ritchey, M.D., Rodriguez, C.J., Roth, G.A., Rosamond, W.D., Sampson, U.K.A., Satou, G.M., Shah, S.H., Spartano, N.L., Tirschwell, D.L., Tsao, C.W., Voeks, J.H., Willey, J.Z., Wilkins, J.T., Wu, J.H.Y., Alger, H.M., Wong, S.S. i Muntner, P., 2018. Heart Disease and Stroke Statistics—2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, [online] 137(12). Dostępne na: <<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIR.0000000000000558>> [dostęp 20.11.2022].

Berdyński, M., Miszta, P., Safranow, K., Andersen, P.M., Morita, M., Filipek, S., Żekanowski, C. i Kuźma-Kozakiewicz, M., 2022. SOD1 mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis analysis of variant severity. *Scientific Reports*, 12(1), s. 103.

Bergles, D.E., Roberts, J.D., Somogyi, P. i Jahr, C.E., 2000. Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature*, 405(6783), s. 187–191.

Bernstein, H.-G., Lendeckel, U., Bertram, I., Bukowska, A., Kanakis, D., Dobrowolny, H., Stauch, R., Krell, D., Mawrin, C., Budinger, E., Keilhoff, G. i Bogerts, B., 2006. Localization of neuregulin-1 $\alpha$  (heregulin- $\alpha$ ) and one of its receptors, ErbB-4 tyrosine kinase, in developing and adult human brain. *Brain Research Bulletin*, 69(5), s. 546–559.

Bevilacqua, A., Li, Z. i Ho, P., 2022. Metabolic dynamics instruct CD8<sup>+</sup> T-cell differentiation and functions. *European Journal of Immunology*, 52(4), s. 541–549.

Bhattacharya, N., 2004. Fetal cell/tissue therapy in adult disease: a new horizon in regenerative medicine. *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology*, 31(3), s. 167–173.

Bigham, N.P., Huang, Z., Spivey, J., Woods, J.J., MacMillan, S.N. i Wilson, J.J., 2022. Carboxylate-Capped Analogues of Ru265 Are MCU Inhibitor Prodrugs. *Inorganic Chemistry*, 61(43), s. 17299–17312.

Birgbauer, E., Rao, T.S. i Webb, M., 2004. Lysolecithin induces demyelination in vitro in a cerebellar slice culture system. *Journal of Neuroscience Research*, 78(2), s. 157–166.

Biswas, S., Chung, S.H., Jiang, P., Dehghan, S. i Deng, W., 2019. Development of glial restricted human neural stem cells for oligodendrocyte differentiation in vitro and in vivo. *Scientific Reports*, 9(1), s. 9013.

Blakemore, W.F., 1974. Pattern of remyelination in the CNS. *Nature*, 249(457), s. 577–578.

Blennow, K., Brody, D.L., Kochanek, P.M., Levin, H., McKee, A., Ribbers, G.M., Yaffe, K. i Zetterberg, H., 2016. Traumatic brain injuries. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1), s. 16084.

- Bluhmki, E., Chamorro, Á., Dávalos, A., Machnig, T., Sauce, C., Wahlgren, N., Wardlaw, J. i Hacke, W., 2009. Stroke treatment with alteplase given 3·0–4·5 h after onset of acute ischaemic stroke (ECASS III): additional outcomes and subgroup analysis of a randomised controlled trial. *The Lancet Neurology*, 8(12), s. 1095–1102.
- Blyth, B.J. i Bazarian, J.J., 2010. Traumatic Alterations in Consciousness: Traumatic Brain Injury. *Emergency Medicine Clinics of North America*, 28(3), s. 571–594.
- Bonkowsky, J.L., Nelson, C., Kingston, J.L., Filloux, F.M., Mundorff, M.B. i Srivastava, R., 2010. The burden of inherited leukodystrophies in children. *Neurology*, 75(8), s. 718–725.
- Borrenberghs, D., Dirix, L., De Wit, F., Rocha, S., Blokken, J., De Houwer, S., Gijssbers, R., Christ, F., Hofkens, J., Hendrix, J. i Debysier, Z., 2016. Dynamic Oligomerization of Integrase Orchestrates HIV Nuclear Entry. *Scientific Reports*, 6(1), s. 36485.
- Brinkmann, B.G., Agarwal, A., Sereda, M.W., Garratt, A.N., Müller, T., Wende, H., Stassart, R.M., Nawaz, S., Humml, C., Velanac, V., Radyushkin, K., Goebbels, S., Fischer, T.M., Franklin, R.J., Lai, C., Ehrenreich, H., Birchmeier, C., Schwab, M.H. i Nave, K.A., 2008. Neuregulin-1/ErbB Signaling Serves Distinct Functions in Myelination of the Peripheral and Central Nervous System. *Neuron*, 59(4), s. 581–595.
- Brooks, A.R., Harkins, R.N., Wang, P., Qian, H.S., Liu, P. i Rubanyi, G.M., 2004. Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *The Journal of Gene Medicine*, 6(4), s. 395–404.
- Brown, C.A., Lally, C., Kupelian, V. i Flanders, W.D., 2021. Estimated Prevalence and Incidence of Amyotrophic Lateral Sclerosis and SOD1 and C9orf72 Genetic Variants. *Neuroepidemiology*, 55(5), s. 342–353.
- Bruno, B.J., Miller, G.D. i Lim, C.S., 2013. Basics and recent advances in peptide and protein drug delivery. *Therapeutic Delivery*, 4(11), s. 1443–1467.
- Brüstle, O., Jones, K.N., Learish, R.D., Karam, K., Choudhary, K., Wiestler, O.D., Duncan, I.D. i McKay, R.D., 1999. Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5428), s. 754–756.
- Cadotte, D.W. i Fehlings, M.G., 2011. Spinal Cord Injury: A Systematic Review of Current Treatment Options. *Clinical Orthopaedics & Related Research*, 469(3), s. 732–741.
- Caiazzo, M., Dell'Anno, M.T., Dvoretzkova, E., Lazarevic, D., Taverna, S., Leo, D., Sotnikova, T.D., Menegon, A., Roncaglia, P., Colciago, G., Russo, G., Carninci, P., Pezzoli, G., Gainetdinov, R.R., Gustincich, S., Dityatev, A. i Broccoli, V., 2011. Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature*, 476(7359), s. 224–227.
- Caiazzo, M., Giannelli, S., Valente, P., Lignani, G., Carissimo, A., Sessa, A., Colasante, G., Bartolomeo, R., Massimino, L., Ferroni, S., Settembre, C., Benfenati, F. i Broccoli, V., 2015. Direct conversion of fibroblasts into functional astrocytes by defined transcription factors. *Stem Cell Reports*, 4(1), s. 25–36.
- Calaora, V., Rogister, B., Bismuth, K., Murray, K., Brandt, H., Leprince, P., Marchionni, M. i Dubois-Dalcq, M., 2001. Neuregulin Signaling Regulates Neural Precursor Growth and the Generation of Oligodendrocytes *In Vitro*. *The Journal of Neuroscience*, 21(13), s. 4740–4751.
- Calvo, M., Zhu, N., Tsantoulas, C., Ma, Z., Grist, J., Loeb, J.A. i Bennett, D.L.H., 2010. Neuregulin-ErbB Signaling Promotes Microglial Proliferation and Chemotaxis Contributing to Microgliosis and Pain after Peripheral Nerve Injury. *The Journal of Neuroscience*, 30(15), s. 5437–5450.

- Canté-Barrett, K., Mendes, R.D., Smits, W.K., Van Helsdingen-van Wijk, Y.M., Pieters, R. i Meijerink, J.P.P., 2016. Lentiviral gene transfer into human and murine hematopoietic stem cells: size matters. *BMC Research Notes*, 9(1), s. 312.
- Carlsten, M. i Childs, R.W., 2015. Genetic Manipulation of NK Cells for Cancer Immunotherapy: Techniques and Clinical Implications. *Frontiers in Immunology*, [online] 6. Dostępne na: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2015.00266/abstract>> [dostęp 15.05.2023].
- Carroll, S.L., Miller, M.L., Frohnert, P.W., Kim, S.S. i Corbett, J.A., 1997. Expression of Neuregulins and their Putative Receptors, ErbB2 and ErbB3, Is Induced during Wallerian Degeneration. *The Journal of Neuroscience*, 17(5), s. 1642–1659.
- de Carvalho, M., Swash, M. i Pinto, S., 2019. Diaphragmatic Neurophysiology and Respiratory Markers in ALS. *Frontiers in Neurology*, 10, s. 143.
- Cervera, L., Gòdia, F., Tarrés-Freixas, F., Aguilar-Gurrieri, C., Carrillo, J., Blanco, J. i Gutiérrez-Granados, S., 2019. Production of HIV-1-based virus-like particles for vaccination: achievements and limits. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(18), s. 7367–7384.
- Chang, H.-M., Shyu, M.-K., Tseng, G.-F., Liu, C.-H., Chang, H.-S., Lan, C.-T., Hsu, W.-M. i Liao, W.-C., 2013. Neuregulin Facilitates Nerve Regeneration by Speeding Schwann Cell Migration via ErbB2/3-Dependent FAK Pathway. *PLoS ONE*, 8(1), s. e53444.
- Chastain, E.M.L., Duncan, D.S., Rodgers, J.M. i Miller, S.D., 2011. The role of antigen presenting cells in multiple sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1812(2), s. 265–274.
- Chen, Y.H., Keiser, M.S. i Davidson, B.L., 2018. Viral Vectors for Gene Transfer. *Current Protocols in Mouse Biology*, 8(4), s. e58.
- Chiò, A., Mora, G. i Lauria, G., 2017. Pain in amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet Neurology*, 16(2), s. 144–157.
- Chou, C.-F. i Ozaki, M., 2010. *In silico* analysis of neuregulin 1 evolution in vertebrates. *Bioscience Reports*, 30(4), s. 267–275.
- Cockrell, A.S. i Kafri, T., 2007. Gene delivery by lentivirus vectors. *Molecular Biotechnology*, 36(3), s. 184–204.
- Cornelison, R.C., Gonzalez-Rothi, E.J., Porvasnik, S.L., Wellman, S.M., Park, J.H., Fuller, D.D. i Schmidt, C.E., 2018. Injectable hydrogels of optimized acellular nerve for injection in the injured spinal cord. *Biomedical Materials (Bristol, England)*, 13(3), s. 034110.
- Costello, E., Munoz, M., Buetti, E., Meylan, P.R.A., Diggelmann, H. i Thali, M., 2000. Gene transfer into stimulated and unstimulated T lymphocytes by HIV-1-derived lentiviral vectors. *Gene Therapy*, 7(7), s. 596–604.
- David, R.M. i Doherty, A.T., 2017. Viral Vectors: The Road to Reducing Genotoxicity. *Toxicological Sciences*, 155(2), s. 315–325.
- Davis, H.E., Morgan, J.R. i Yarmush, M.L., 2002. Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. *Biophysical Chemistry*, 97(2–3), s. 159–172.

Dawson, M.R.L., Polito, A., Levine, J.M. i Reynolds, R., 2003. NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 24(2), s. 476–488.

Denning, W., Das, S., Guo, S., Xu, J., Kappes, J.C. i Hel, Z., 2013. Optimization of the Transductional Efficiency of Lentiviral Vectors: Effect of Sera and Polycations. *Molecular Biotechnology*, 53(3), s. 308–314.

Deumens, R., Koopmans, G.C. i Joosten, E.A.J., 2005. Regeneration of descending axon tracts after spinal cord injury. *Progress in Neurobiology*, 77(1–2), s. 57–89.

Dewan, M.C., Rattani, A., Gupta, S., Baticulon, R.E., Hung, Y.-C., Panchak, M., Agrawal, A., Adeleye, A.O., Shrimel, M.G., Rubiano, A.M., Rosenfeld, J.V. i Park, K.B., 2019. Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *Journal of Neurosurgery*, 130(4), s. 1080–1097.

Do Minh, A., Sharon, D., Chahal, P. i Kamen, A.A., 2019. Cell Transfection. W: *Comprehensive Biotechnology*. [online] Elsevier, s. 383–390. Dostępne na: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444640468000239>> [dostęp 15.05.2023].

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. i Horwitz, E., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), s. 315–317.

Dooves, S., Lefterink, P.S., Krabbenborg, S., Breeuwsma, N., Bots, S., Hillen, A.E.J., Jacobs, G., van der Knaap, M.S. i Heine, V.M., 2019. Cell Replacement Therapy Improves Pathological Hallmarks in a Mouse Model of Leukodystrophy Vanishing White Matter. *Stem Cell Reports*, 12(3), s. 441–450.

Douvaras, P. i Fossati, V., 2015. Generation and isolation of oligodendrocyte progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Nature Protocols*, 10(8), s. 1143–1154.

Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R.J., Nguyen, M., Trono, D. i Naldini, L., 1998. A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. *Journal of Virology*, 72(11), s. 8463–8471.

Ehrlich, M., Mozafari, S., Glatza, M., Starost, L., Velychko, S., Hallmann, A.-L., Cui, Q.-L., Schambach, A., Kim, K.-P., Bachelin, C., Marteyn, A., Hargus, G., Johnson, R.M., Antel, J., Sternecker, J., Zaehres, H., Schöler, H.R., Baron-Van Evercooren, A. i Kuhlmann, T., 2017. Rapid and efficient generation of oligodendrocytes from human induced pluripotent stem cells using transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [online] 114(11). Dostępne na: <<https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1614412114>> [dostęp 15.05.2023].

Erickson, S.L., O’Shea, K.S., Ghaboosi, N., Loverro, L., Frantz, G., Bauer, M., Lu, L.H. i Moore, M.W., 1997. ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2- and heregulin-deficient mice. *Development*, 124(24), s. 4999–5011.

Esper, R.M., Pankonin, M.S. i Loeb, J.A., 2006. Neuregulins: Versatile growth and differentiation factors in nervous system development and human disease. *Brain Research Reviews*, 51(2), s. 161–175.

Falcão, A.M., van Bruggen, D., Marques, S., Meijer, M., Jäkel, S., Agirre, E., Samudyata, null, Floriddia, E.M., Vanichkina, D.P., Ffrench-Constant, C., Williams, A., Guerreiro-Cacais, A.O. i Castelo-Branco, G., 2018. Disease-specific oligodendrocyte lineage cells arise in multiple sclerosis. *Nature Medicine*, 24(12), s. 1837–1844.



- Fan, B., Wei, Z., Yao, X., Shi, G., Cheng, X., Zhou, X., Zhou, H., Ning, G., Kong, X. i Feng, S., 2018. Microenvironment Imbalance of Spinal Cord Injury. *Cell Transplantation*, 27(6), s. 853–866.
- Farhangi, S., Dehghan, S., Totonchi, M. i Javan, M., 2019. In vivo conversion of astrocytes to oligodendrocyte lineage cells in adult mice demyelinated brains by Sox2. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 28, s. 263–272.
- Fessler, R.G., Ehsanian, R., Liu, C.Y., Steinberg, G.K., Jones, L., Lebkowski, J.S., Wirth, E.D. i McKenna, S.L., 2022. A phase 1/2a dose-escalation study of oligodendrocyte progenitor cells in individuals with subacute cervical spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery. Spine*, s. 1–9.
- Finkel, Z., Esteban, F., Rodriguez, B., Fu, T., Ai, X. i Cai, L., 2021. Diversity of Adult Neural Stem and Progenitor Cells in Physiology and Disease. *Cells*, 10(8), s. 2045.
- Fledrich, R., Akkermann, D., Schütza, V., Abdelaal, T.A., Hermes, D., Schäffner, E., Soto-Bernardini, M.C., Götze, T., Klink, A., Kusch, K., Krueger, M., Kungl, T., Frydrychowicz, C., Möbius, W., Brück, W., Mueller, W.C., Bechmann, I., Sereda, M.W., Schwab, M.H., Nave, K.-A. i Stassart, R.M., 2019. NRG1 type I dependent autocrine stimulation of Schwann cells in onion bulbs of peripheral neuropathies. *Nature Communications*, 10(1), s. 1467.
- Fledrich, R., Stassart, R.M., Klink, A., Rasch, L.M., Prukop, T., Haag, L., Czesnik, D., Kungl, T., Abdelaal, T.A.M., Keric, N., Stadelmann, C., Brück, W., Nave, K.-A. i Sereda, M.W., 2014. Soluble neuregulin-1 modulates disease pathogenesis in rodent models of Charcot-Marie-Tooth disease 1A. *Nature Medicine*, 20(9), s. 1055–1061.
- Ford, H., 2020. Clinical presentation and diagnosis of multiple sclerosis. *Clinical Medicine*, 20(4), s. 380–383.
- Fricker, F.R., Lago, N., Balarajah, S., Tsantoulas, C., Tanna, S., Zhu, N., Fageiry, S.K., Jenkins, M., Garratt, A.N., Birchmeier, C. i Bennett, D.L.H., 2011. Axonally Derived Neuregulin-1 Is Required for Remyelination and Regeneration after Nerve Injury in Adulthood. *The Journal of Neuroscience*, 31(9), s. 3225–3233.
- Fujiki, Y., Johnson, K.L., Peter, I., Tighiouart, H. i Bianchi, D.W., 2009. Fetal Cells in the Pregnant Mouse Are Diverse and Express a Variety of Progenitor and Differentiated Cell Markers1. *Biology of Reproduction*, 81(1), s. 26–32.
- Gage, F.H., 2000. Mammalian neural stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5457), s. 1433–1438.
- Gautam, P., Recino, A., Foale, R.D., Zhao, J., Gan, S.U., Wallberg, M., Calne, R. i Lever, A.M.L., 2016. Promoter optimisation of lentiviral vectors for efficient insulin gene expression in canine mesenchymal stromal cells: potential surrogate beta cells: Insulin expression in MSCs. *The Journal of Gene Medicine*, 18(10), s. 312–321.
- Gauthier, M.-K., Kosciuczyk, K., Tapley, L. i Karimi-Abdolrezaee, S., 2013. Dysregulation of the neuregulin-1-ErbB network modulates endogenous oligodendrocyte differentiation and preservation after spinal cord injury. *European Journal of Neuroscience*, 38(5), s. 2693–2715.
- Geschwind, M.D., Lu, B. i Federoff, H.J., 1994. Expression of Neurotrophic Genes from Herpes Simplex Virus Type 1 Vectors: Modifying Neuronal Phenotype. W: *Methods in Neurosciences*. [online] Elsevier, s. 462–482. Dostępne na: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780121852917500333>> [dostęp 15.05.2023].
- Ghashghaei, H.T., Weber, J., Pevny, L., Schmid, R., Schwab, M.H., Lloyd, K.C.K., Eisenstat, D.D., Lai, C. i Anton, E.S., 2006. The role of neuregulin–ErbB4 interactions on the proliferation and

- organization of cells in the subventricular zone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(6), s. 1930–1935.
- Gil, J.-E., Woo, D.-H., Shim, J.-H., Kim, S.-E., You, H.-J., Park, S.-H., Paek, S.H., Kim, S.-K. i Kim, J.-H., 2009. Vitronectin promotes oligodendrocyte differentiation during neurogenesis of human embryonic stem cells. *FEBS Letters*, 583(3), s. 561–567.
- Givogri, M.I., Galbiati, F., Fasano, S., Amadio, S., Perani, L., Superchi, D., Morana, P., Del Carro, U., Marchesini, S., Brambilla, R., Wrabetz, L. i Bongarzone, E., 2006. Oligodendroglial progenitor cell therapy limits central neurological deficits in mice with metachromatic leukodystrophy. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(12), s. 3109–3119.
- Goldman, S.A., 2017. Progenitor cell-based treatment of glial disease. *Progress in Brain Research*, 231, s. 165–189.
- Goldman, S.A. i Kuypers, N.J., 2015. How to make an oligodendrocyte. *Development (Cambridge, England)*, 142(23), s. 3983–3995.
- Gomis-Coloma, C., Velasco-Aviles, S., Gomez-Sanchez, J.A., Casillas-Bajo, A., Backs, J. i Cabedo, H., 2018. Class IIa histone deacetylases link cAMP signaling to the myelin transcriptional program of Schwann cells. *Journal of Cell Biology*, 217(4), s. 1249–1268.
- Gossen, M. i Bujard, H., 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(12), s. 5547–5551.
- Gouvarchin Ghaleh, H.E., Bolandian, M., Dorostkar, R., Jafari, A. i Pour, M.F., 2020. Concise review on optimized methods in production and transduction of lentiviral vectors in order to facilitate immunotherapy and gene therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 128, s. 110276.
- Grumbles, R.M. i Thomas, C.K., 2017. Motoneuron Death after Human Spinal Cord Injury. *Journal of Neurotrauma*, 34(3), s. 581–590.
- Guo, F., Maeda, Y., Ma, J., Xu, J., Horiuchi, M., Miers, L., Vaccarino, F. i Pleasure, D., 2010. Pyramidal neurons are generated from oligodendroglial progenitor cells in adult piriform cortex. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(36), s. 12036–12049.
- Guo, J., Wang, W., Yu, D. i Wu, Y., 2011. Spinoculation Triggers Dynamic Actin and Cofilin Activity That Facilitates HIV-1 Infection of Transformed and Resting CD4 T Cells. *Journal of Virology*, 85(19), s. 9824–9833.
- Haas, C. i Fischer, I., 2013. Human astrocytes derived from glial restricted progenitors support regeneration of the injured spinal cord. *Journal of Neurotrauma*, 30(12), s. 1035–1052.
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M.P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C.S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J.I., De Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L.E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T.H., Le Deist, F., Fischer, A. i Cavazzana-Calvo, M., 2003. *LMO2* -Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1. *Science*, 302(5644), s. 415–419.
- Han, H., Park, C.K., Choi, Y.-D., Cho, N.H., Lee, J. i Cho, K.S., 2022. Androgen-Independent Prostate Cancer Is Sensitive to CDC42-PAK7 Kinase Inhibition. *Biomedicines*, 11(1), s. 101.

- Hardison, J.L., Nistor, G., Gonzalez, R., Keirstead, H.S. i Lane, T.E., 2006. Transplantation of glial-committed progenitor cells into a viral model of multiple sclerosis induces remyelination in the absence of an attenuated inflammatory response. *Experimental Neurology*, 197(2), s. 420–429.
- Hare, D., Collins, S., Cuddington, B. i Mossman, K., 2016. The Importance of Physiologically Relevant Cell Lines for Studying Virus–Host Interactions. *Viruses*, 8(11), s. 297.
- Heiman-Patterson, T.D., Deitch, J.S., Blankenhorn, E.P., Erwin, K.L., Perreault, M.J., Alexander, B.K., Byers, N., Toman, I. i Alexander, G.M., 2005. Background and gender effects on survival in the TgN(SOD1-G93A)1Gur mouse model of ALS. *Journal of the Neurological Sciences*, 236(1–2), s. 1–7.
- Hennecke, M., 2001. Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 29(16), s. 3327–3334.
- Herrera, J., Yang, H., Zhang, S.-C., Proschel, C., Tresco, P., Duncan, I.D., Luskin, M. i Mayer-Proschel, M., 2001. Embryonic-Derived Glial-Restricted Precursor Cells (GRP Cells) Can Differentiate into Astrocytes and Oligodendrocytes in Vivo. *Experimental Neurology*, 171(1), s. 11–21.
- Hines, W.C., Yaswen, P. i Bissell, M.J., 2015. Modelling breast cancer requires identification and correction of a critical cell lineage-dependent transduction bias. *Nature Communications*, 6(1), s. 6927.
- Hitoshi, S., Seaberg, R.M., Kosciuk, C., Alexson, T., Kusunoki, S., Kanazawa, I., Tsuji, S. i Van Der Kooy, D., 2004. Primitive neural stem cells from the mammalian epiblast differentiate to definitive neural stem cells under the control of Notch signaling. *Genes & Development*, 18(15), s. 1806–1811.
- Homem, C.C.F., Repic, M. i Knoblich, J.A., 2015. Proliferation control in neural stem and progenitor cells. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(11), s. 647–659.
- Houtman, J.J. i Fleming, J.O., 1996. Pathogenesis of mouse hepatitis virus-induced demyelination. *Journal of Neurovirology*, 2(6), s. 361–376.
- Hu, B.-Y., Du, Z.-W. i Zhang, S.-C., 2009. Differentiation of human oligodendrocytes from pluripotent stem cells. *Nature Protocols*, 4(11), s. 1614–1622.
- Hu, Z., Li, T., Zhang, X. i Chen, Y., 2009. Hepatocyte growth factor enhances the generation of high-purity oligodendrocytes from human embryonic stem cells. *Differentiation*, 78(2–3), s. 177–184.
- Hughes, E.G., Kang, S.H., Fukaya, M. i Bergles, D.E., 2013. Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain. *Nature Neuroscience*, 16(6), s. 668–676.
- Izrael, M., Zhang, P., Kaufman, R., Shinder, V., Ella, R., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., Chebath, J. i Revel, M., 2007. Human oligodendrocytes derived from embryonic stem cells: Effect of noggin on phenotypic differentiation in vitro and on myelination in vivo. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 34(3), s. 310–323.
- Jablonska, A., Shea, D.J., Cao, S., Bulte, J.W., Janowski, M., Konstantopoulos, K. i Walczak, P., 2018. Overexpression of VLA-4 in glial-restricted precursors enhances their endothelial docking and induces diapedesis in a mouse stroke model. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 38(5), s. 835–846.

- Jacobsen, F., Hirsch, T., Mittler, D., Schulte, M., Lehnhardt, M., Druecke, D., Homann, H.H., Steinau, H.U. i Steinstraesser, L., 2006. Polybrene improves transfection efficacy of recombinant replication-deficient adenovirus in cutaneous cells and burned skin. *The Journal of Gene Medicine*, 8(2), s. 138–146.
- Jang, S.K., Kräusslich, H.G., Nicklin, M.J., Duke, G.M., Palmenberg, A.C. i Wimmer, E., 1988. A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *Journal of Virology*, 62(8), s. 2636–2643.
- Jardé, T., Chan, W.H., Rossello, F.J., Kaur Kahlon, T., Theocharous, M., Kurian Arackal, T., Flores, T., Giraud, M., Richards, E., Chan, E., Kerr, G., Engel, R.M., Prasko, M., Donoghue, J.F., Abe, S., Pheesse, T.J., Nefzger, C.M., McMurrick, P.J., Powell, D.R., Daly, R.J., Polo, J.M. i Abud, H.E., 2020. Mesenchymal Niche-Derived Neuregulin-1 Drives Intestinal Stem Cell Proliferation and Regeneration of Damaged Epithelium. *Cell Stem Cell*, 27(4), s. 646-662.e7.
- Jean Harry, G. i Toews, A.D., 1998. Myelination, Dysmyelination, and Demyelination. W: *Handbook of Developmental Neurotoxicology*. [online] Elsevier, s. 87–115. Dostępne na: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780126488609500078>> [dostęp 21.04.2023].
- Jin, Y., Neuhuber, B., Singh, A., Bouyer, J., Lepore, A., Bonner, J., Himes, T., Campanelli, J.T. i Fischer, I., 2011. Transplantation of human glial restricted progenitors and derived astrocytes into a contusion model of spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*, 28(4), s. 579–594.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. i Charpentier, E., 2012. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337(6096), s. 816–821.
- Jolly, A.E., Bălăeș, M., Azor, A., Friedland, D., Sandrone, S., Graham, N.S.N., Zimmerman, K. i Sharp, D.J., 2021. Detecting axonal injury in individual patients after traumatic brain injury. *Brain*, 144(1), s. 92–113.
- Kang, S.-M., Cho, M.S., Seo, H., Yoon, C.J., Oh, S.K., Choi, Y.M. i Kim, D.-W., 2007. Efficient induction of oligodendrocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 25(2), s. 419–424.
- Kastin, A.J., Akerstrom, V. i Pan, W., 2004. Neuregulin-1-β1 enters brain and spinal cord by receptor-mediated transport: Neuregulin-1-β1 and the blood-brain barrier. *Journal of Neurochemistry*, 88(4), s. 965–970.
- Kataria, H., Alizadeh, A. i Karimi-Abdolrezaee, S., 2019. Neuregulin-1/ErbB network: An emerging modulator of nervous system injury and repair. *Progress in Neurobiology*, 180, s. 101643.
- Kataria, H., Alizadeh, A., Shahriary, G.M., Saboktakin Rizi, S., Henrie, R., Santhosh, K.T., Thliveris, J.A. i Karimi-Abdolrezaee, S., 2018. Neuregulin-1 promotes remyelination and fosters a pro-regenerative inflammatory response in focal demyelinating lesions of the spinal cord. *Glia*, 66(3), s. 538–561.
- Kataria, H., Hart, C.G., Alizadeh, A., Cossoy, M., Kaushik, D.K., Bernstein, C.N., Marrie, R.A., Yong, V.W. i Karimi-Abdolrezaee, S., 2021. Neuregulin-1 beta 1 is implicated in pathogenesis of multiple sclerosis. *Brain*, 144(1), s. 162–185.
- Kent, M., Brilliant, A., Erickson, K., Meehan, W. i Howell, D., 2020. Symptom Presentation After Concussion and Pre-existing Anxiety Among Youth Athletes. *International Journal of Sports Medicine*, 41(10), s. 682–687.

- Kerman, B.E., Kim, H.J., Padmanabhan, K., Mei, A., Georges, S., Joens, M.S., Fitzpatrick, J.A.J., Jappelli, R., Chandross, K.J., August, P. i Gage, F.H., 2015. *In vitro* myelin formation using embryonic stem cells. *Development*, 142(12), s. 2213–2225.
- Kessaris, N., Fogarty, M., Iannarelli, P., Grist, M., Wegner, M. i Richardson, W.D., 2006. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nature Neuroscience*, 9(2), s. 173–179.
- Kim, H., Walczak, P., Kerr, C., Galpoththawela, C., Gilad, A.A., Muja, N. i Bulte, J.W.M., 2012. Immunomodulation by transplanted human embryonic stem cell-derived oligodendroglial progenitors in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 30(12), s. 2820–2829.
- Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M.J., Ji, H., Ehrlich, L.I.R., Yabuuchi, A., Takeuchi, A., Cunniff, K.C., Hongguang, H., McKinney-Freeman, S., Naveiras, O., Yoon, T.J., Irizarry, R.A., Jung, N., Seita, J., Hanna, J., Murakami, P., Jaenisch, R., Weissleder, R., Orkin, S.H., Weissman, I.L., Feinberg, A.P. i Daley, G.Q., 2010. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*, 467(7313), s. 285–290.
- Kjeldgaard, A., Soendergaard, P.L., Wolffbrandt, M.M. i Norup, A., 2023. Predictors of caregiver burden in caregivers of individuals with traumatic or non-traumatic brain injury: A scoping review. *NeuroRehabilitation*, 52(1), s. 9–28.
- Kleindorfer, D.O., Towfighi, A., Chaturvedi, S., Cockroft, K.M., Gutierrez, J., Lombardi-Hill, D., Kamel, H., Kernan, W.N., Kittner, S.J., Leira, E.C., Lennon, O., Meschia, J.F., Nguyen, T.N., Pollak, P.M., Santangeli, P., Sharrief, A.Z., Smith, S.C., Turan, T.N. i Williams, L.S., 2021. 2021 Guideline for the Prevention of Stroke in Patients With Stroke and Transient Ischemic Attack: A Guideline From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, [online] 52(7). Dostępne na: <<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/STR.0000000000000375>> [dostęp 21.04.2023].
- Klimczak, A., Kozłowska, U., Sanford, J., Walczak, P., Malysz-Cymborska, I. i Kurpisz, M., 2019. Immunological Characteristics and Properties of Glial Restricted Progenitors of Mice, Canine Primary Culture Suspensions, and Human QSV40 Immortalized Cell Lines for Prospective Therapies of Neurodegenerative Disorders. *Cell Transplantation*, 28(9–10), s. 1140–1154.
- Kondo, T., Funayama, M., Tsukita, K., Hotta, A., Yasuda, A., Nori, S., Kaneko, S., Nakamura, M., Takahashi, R., Okano, H., Yamanaka, S. i Inoue, H., 2014. Focal transplantation of human iPSC-derived glial-rich neural progenitors improves lifespan of ALS mice. *Stem Cell Reports*, 3(2), s. 242–249.
- Konermann, S., Brigham, M.D., Trevino, A.E., Joung, J., Abudayyeh, O.O., Barcena, C., Hsu, P.D., Habib, N., Gootenberg, J.S., Nishimasu, H., Nureki, O. i Zhang, F., 2015. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 517(7536), s. 583–588.
- Koth, C.M., Orlicky, S.M., Larson, S.M. i Edwards, A.M., 2003. Use of Limited Proteolysis to Identify Protein Domains Suitable for Structural Analysis. W: *Methods in Enzymology*. [online] Elsevier, s. 77–84. Dostępne na: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687903680055>> [dostęp 21.05.2023].
- Kramer, R., Bucay, N., Kane, D.J., Martin, L.E., Tarpley, J.E. i Theill, L.E., 1996. Neuregulins with an Ig-like domain are essential for mouse myocardial and neuronal development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(10), s. 4833–4838.
- Krencik, R., Weick, J.P., Liu, Y., Zhang, Z.-J. i Zhang, S.-C., 2011. Specification of transplantable astroglial subtypes from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, 29(6), s. 528–534.

- Lam, J.K.W., Chow, M.Y.T., Zhang, Y. i Leung, S.W.S., 2015. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 4, s. e252.
- Larsen, K.P., Mathiharan, Y.K., Kappel, K., Coey, A.T., Chen, D.-H., Barrero, D., Madigan, L., Puglisi, J.D., Skiniotis, G. i Puglisi, E.V., 2018. Architecture of an HIV-1 reverse transcriptase initiation complex. *Nature*, 557(7703), s. 118–122.
- Lasiene, J., Komine, O., Fujimori-Tonou, N., Powers, B., Endo, F., Watanabe, S., Shijie, J., Ravits, J., Horner, P., Misawa, H. i Yamanaka, K., 2016. Neuregulin 1 confers neuroprotection in SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis mice via restoration of C-boutons of spinal motor neurons. *Acta Neuropathologica Communications*, 4(1), s. 15.
- Laurent, L.C., Ulitsky, I., Slavin, I., Tran, H., Schork, A., Morey, R., Lynch, C., Harness, J.V., Lee, S., Barrero, M.J., Ku, S., Martynova, M., Semechkin, R., Galat, V., Gottesfeld, J., Izzisua Belmonte, J.C., Murry, C., Keirstead, H.S., Park, H.-S., Schmidt, U., Laslett, A.L., Muller, F.-J., Nievergelt, C.M., Shamir, R. i Loring, J.F., 2011. Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell Stem Cell*, 8(1), s. 106–118.
- Le Douarin, N.M. i Dupin, E., 2003. Multipotentiality of the neural crest. *Current Opinion in Genetics & Development*, 13(5), s. 529–536.
- Ledford, H. i Callaway, E., 2020. Pioneers of revolutionary CRISPR gene editing win chemistry Nobel. *Nature*, 586(7829), s. 346–347.
- Lee, S. i Kim, H.-J., 2015. Prion-like Mechanism in Amyotrophic Lateral Sclerosis: are Protein Aggregates the Key? *Experimental Neurobiology*, 24(1), s. 1–7.
- Lee, Y., Kim, C.-Y., Lee, H.J., Kim, J.G., Han, D.W., Ko, K., Walter, J., Chung, H.-M., Schöler, H.R., Bae, Y.M. i Ko, K., 2018. Two-Step Generation of Oligodendrocyte Progenitor Cells From Mouse Fibroblasts for Spinal Cord Injury. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, s. 198.
- Lee, Y., Morrison, B.M., Li, Y., Lengacher, S., Farah, M.H., Hoffman, P.N., Liu, Y., Tsingalia, A., Jin, L., Zhang, P.-W., Pellerin, L., Magistretti, P.J. i Rothstein, J.D., 2012. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature*, 487(7408), s. 443–448.
- Leong, S.Y., Rao, V.T.S., Bin, J.M., Gris, P., Sangaralingam, M., Kennedy, T.E. i Antel, J.P., 2014. Heterogeneity of oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 1(4), s. 272–283.
- Lepore, A.C., O'Donnell, J., Kim, A.S., Williams, T., Tuteja, A., Rao, M.S., Kelley, L.L., Campanelli, J.T. i Maragakis, N.J., 2011. Human glial-restricted progenitor transplantation into cervical spinal cord of the SOD1 mouse model of ALS. *PloS One*, 6(10), s. e25968.
- Lepore, A.C., Rauck, B., Dejea, C., Pardo, A.C., Rao, M.S., Rothstein, J.D. i Maragakis, N.J., 2008. Focal transplantation-based astrocyte replacement is neuroprotective in a model of motor neuron disease. *Nature Neuroscience*, 11(11), s. 1294–1301.
- Li, K., Javed, E., Hala, T.J., Sannie, D., Regan, K.A., Maragakis, N.J., Wright, M.C., Poulsen, D.J. i Lepore, A.C., 2015a. Transplantation of glial progenitors that overexpress glutamate transporter GLT1 preserves diaphragm function following cervical SCI. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 23(3), s. 533–548.
- Li, S., Zheng, J., Chai, L., Lin, M., Zeng, R., Lu, J. i Bian, J., 2019. Rapid and Efficient Differentiation of Rodent Neural Stem Cells into Oligodendrocyte Progenitor Cells. *Developmental Neuroscience*, 41(1–2), s. 79–93.

- Li, Y., Gautam, A., Yang, J., Qiu, L., Melkounian, Z., Weber, J., Telukuntla, L., Srivastava, R., Whiteley, E.M. i Brandenberger, R., 2013. Differentiation of oligodendrocyte progenitor cells from human embryonic stem cells on vitronectin-derived synthetic peptide acrylate surface. *Stem Cells and Development*, 22(10), s. 1497–1505.
- Li, Y., Lein, P.J., Ford, G.D., Liu, C., Stovall, K.C., White, T.E., Bruun, D.A., Tewolde, T., Gates, A.S., Distel, T.J., Surlles-Zeigler, M.C. i Ford, B.D., 2015b. Neuregulin-1 inhibits neuroinflammatory responses in a rat model of organophosphate-nerve agent-induced delayed neuronal injury. *Journal of Neuroinflammation*, 12(1), s. 64.
- Liang, C.-C., Park, A.Y. i Guan, J.-L., 2007. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, 2(2), s. 329–333.
- Lin, P., Correa, D., Lin, Y. i Caplan, A.I., 2011. Polybrene Inhibits Human Mesenchymal Stem Cell Proliferation during Lentiviral Transduction. *PLoS ONE*, 6(8), s. e23891.
- Lin, S. i Bergles, D.E., 2004. Synaptic signaling between GABAergic interneurons and oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature Neuroscience*, 7(1), s. 24–32.
- Lin, W., Ou, G., Lin, J., Yi, S., Yao, W., Pan, H. i Zhao, W., 2020. Neuregulin 1 enhances cell adhesion molecule L1 like expression levels and promotes malignancy in human glioma. *Oncology Letters*. [online] Dostępne na: <<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2020.11548>> [dostęp 15.05.2023].
- Liu, C., Hu, X., Li, Y., Lu, W., Li, W., Cao, N., Zhu, S., Cheng, J., Ding, S. i Zhang, M., 2019. Conversion of mouse fibroblasts into oligodendrocyte progenitor-like cells through a chemical approach. *Journal of Molecular Cell Biology*, 11(6), s. 489–495.
- Liu, F.-F., Stone, J.R., Schuldt, A.J.T., Okoshi, K., Okoshi, M.P., Nakayama, M., Ho, K.K.L., Manning, W.J., Marchionni, M.A., Lorell, B.H., Morgan, J.P. i Yan, X., 2005. Heterozygous knockout of neuregulin-1 gene in mice exacerbates doxorubicin-induced heart failure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 289(2), s. H660–H666.
- Liu, T., Jia, P., Ma, H., Reed, S.A., Luo, X., Larman, H.B. i Schultz, P.G., 2017. Construction and Screening of a Lentiviral Secretome Library. *Cell Chemical Biology*, 24(6), s. 767–771.e3.
- Liu, Y.P. i Berkhout, B., 2014. HIV-1-Based Lentiviral Vectors. W: E. Vicenzi i G. Poli, red., *Human Retroviruses, Methods in Molecular Biology*. [online] Totowa, NJ: Humana Press, s. 273–284. Dostępne na: <[https://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-670-2\\_22](https://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-670-2_22)> [dostęp 21.04.2023].
- Livak, K.J. i Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> Method. *Methods*, 25(4), s. 402–408.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. i Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), s. 265–275.
- Luchinat, E. i Banci, L., 2018. In-Cell NMR in Human Cells: Direct Protein Expression Allows Structural Studies of Protein Folding and Maturation. *Accounts of Chemical Research*, 51(6), s. 1550–1557.
- Lui, A.J., Geanes, E.S., Ogony, J., Behbod, F., Marquess, J., Valdez, K., Jewell, W., Tawfik, O. i Lewis-Wambi, J., 2017. IFITM1 suppression blocks proliferation and invasion of aromatase inhibitor-resistant breast cancer in vivo by JAK/STAT-mediated induction of p21. *Cancer Letters*, 399, s. 29–43.

- Lujan, E., Chanda, S., Ahlenius, H., Südhof, T.C. i Wernig, M., 2012. Direct conversion of mouse fibroblasts to self-renewing, tripotent neural precursor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(7), s. 2527–2532.
- Lukomska, B., Stanaszek, L., Zuba-Surma, E., Legosz, P., Sarzynska, S. i Drela, K., 2019. Challenges and Controversies in Human Mesenchymal Stem Cell Therapy. *Stem Cells International*, 2019, s. 9628536.
- Luna, S.D.L., Soria, I., Pulido, D., Ortín, J. i Jiménez, A., 1988. Efficient transformation of mammalian cells with constructs containing a puromycin-resistance marker. *Gene*, 62(1), s. 121–126.
- Lyczek, A., Arnold, A., Zhang, J., Campanelli, J.T., Janowski, M., Bulte, J.W.M. i Walczak, P., 2017. Transplanted human glial-restricted progenitors can rescue the survival of dysmyelinated mice independent of the production of mature, compact myelin. *Experimental Neurology*, 291, s. 74–86.
- Mahoney, S.O., Chowdhury, N.F., Ngo, V., Imms, P. i Irimia, A., 2022. Mild Traumatic Brain Injury Results in Significant and Lasting Cortical Demyelination. *Frontiers in Neurology*, 13, s. 854396.
- Mäier, B., Desilles, J.P. i Mazighi, M., 2020. Intracranial Hemorrhage After Reperfusion Therapies in Acute Ischemic Stroke Patients. *Frontiers in Neurology*, 11, s. 599908.
- Majchrzak, M., Drela, K., Andrzejewska, A., Rogujski, P., Figurska, S., Fiedorowicz, M., Walczak, P., Janowski, M., Lukomska, B. i Stanaszek, L., 2019. SOD1/Rag2 Mice with Low Copy Number of SOD1 Gene as a New Long-Living Immunodeficient Model of ALS. *Scientific Reports*, 9(1), s. 799.
- Manley, N.C., Priest, C.A., Denham, J., Wirth, E.D. i Lebkowski, J.S., 2017. Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cells: Preclinical Efficacy and Safety in Cervical Spinal Cord Injury. *Stem Cells Translational Medicine*, 6(10), s. 1917–1929.
- Marballi, K., Quinones, M.P., Jimenez, F., Escamilla, M.A., Raventós, H., Soto-Bernardini, M.C., Ahuja, S.S. i Walss-Bass, C., 2010. In vivo and in vitro genetic evidence of involvement of neuregulin 1 in immune system dysregulation. *Journal of Molecular Medicine*, 88(11), s. 1133–1141.
- Marmarou, A., Foda, M.A.A.-E., Brink, W.V.D., Campbell, J., Kita, H. i Demetriadou, K., 1994. A new model of diffuse brain injury in rats: Part I: Pathophysiology and biomechanics. *Journal of Neurosurgery*, 80(2), s. 291–300.
- Marques, S., Zeisel, A., Codeluppi, S., van Bruggen, D., Mendanha Falcão, A., Xiao, L., Li, H., Häring, M., Hochgerner, H., Romanov, R.A., Gyllborg, D., Muñoz Manchado, A., La Manno, G., Lönnerberg, P., Floriddia, E.M., Rezayee, F., Ernfors, P., Arenas, E., Hjerling-Leffler, J., Harkany, T., Richardson, W.D., Linnarsson, S. i Castelo-Branco, G., 2016. Oligodendrocyte heterogeneity in the mouse juvenile and adult central nervous system. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6291), s. 1326–1329.
- Martin, G.R., 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(12), s. 7634–7638.
- Massie, B., Couture, F., Lamoureux, L., Mosser, D.D., Guilbault, C., Jolicoeur, P., Bélanger, F. i Langelier, Y., 1998. Inducible Overexpression of a Toxic Protein by an Adenovirus Vector with a Tetracycline-Regulatable Expression Cassette. *Journal of Virology*, 72(3), s. 2289–2296.
- Matjusaitis, M., Wagstaff, L.J., Martella, A., Baranowski, B., Blin, C., Gogolok, S., Williams, A. i Pollard, S.M., 2019. Reprogramming of Fibroblasts to Oligodendrocyte Progenitor-like Cells Using CRISPR/Cas9-Based Synthetic Transcription Factors. *Stem Cell Reports*, 13(6), s. 1053–1067.



- McKinnon, R.D., Matsui, T., Dubois-Dalcq, M. i Aaronson, S.A., 1990. FGF modulates the PDGF-driven pathway of oligodendrocyte development. *Neuron*, 5(5), s. 603–614.
- McKinnon, R.D., Smith, C., Behar, T., Smith, T. i Dubois-Dalcq, M., 1993. Distinct effects of bFGF and PDGF on oligodendrocyte progenitor cells. *Glia*, 7(3), s. 245–254.
- McTigue, D.M. i Tripathi, R.B., 2008. The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. *Journal of Neurochemistry*, 107(1), s. 1–19.
- Medvedev, S.P., Shevchenko, A.I. i Zakian, S.M., 2010. Induced Pluripotent Stem Cells: Problems and Advantages when Applying them in Regenerative Medicine. *Acta Naturae*, 2(2), s. 18–28.
- Mei, L. i Nave, K.-A., 2014. Neuregulin-ERBB Signaling in the Nervous System and Neuropsychiatric Diseases. *Neuron*, 83(1), s. 27–49.
- Mei, L. i Xiong, W.-C., 2008. Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(6), s. 437–452.
- Michailov, G.V., Sereda, M.W., Brinkmann, B.G., Fischer, T.M., Haug, B., Birchmeier, C., Role, L., Lai, C., Schwab, M.H. i Nave, K.-A., 2004. Axonal Neuregulin-1 Regulates Myelin Sheath Thickness. *Science*, 304(5671), s. 700–703.
- Mikaeili Agah, E., Parivar, K. i Joghataei, M.T., 2014. Therapeutic effect of transplanted human Wharton's jelly stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cells (hWJ-MSC-derived OPCs) in an animal model of multiple sclerosis. *Molecular Neurobiology*, 49(2), s. 625–632.
- Milone, M.C. i O'Doherty, U., 2018. Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia*, 32(7), s. 1529–1541.
- Mirecki, B., Rogalski, M., Arcab, P., Rogujski, P., Stanaszek, L., Józwick, M. i Trusiak, M., 2022. Low-intensity illumination for lensless digital holographic microscopy with minimized sample interaction. *Biomedical Optics Express*, 13(11), s. 5667.
- Miyamoto, Y., Torii, T., Tanoue, A., Kawahara, K., Arai, M., Tsumura, H., Ogata, T., Nagao, M., Terada, N., Yamamoto, M., Takashima, S. i Yamauchi, J., 2017. Neuregulin-1 type III knockout mice exhibit delayed migration of Schwann cell precursors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 486(2), s. 506–513.
- Mizuguchi, H., Xu, Z., Ishii-Watabe, A., Uchida, E. i Hayakawa, T., 2000. IRES-Dependent Second Gene Expression Is Significantly Lower Than Cap-Dependent First Gene Expression in a Bicistronic Vector. *Molecular Therapy*, 1(4), s. 376–382.
- Mòdol-Caballero, G., Herrando-Grabulosa, M., Verdés, S., García-Lareu, B., Hernández, N., Francos-Quijorna, I., López-Vales, R., Bosch, A. i Navarro, X., 2021. Gene Therapy Overexpressing Neuregulin 1 Type I in Combination With Neuregulin 1 Type III Promotes Functional Improvement in the SOD1G93A ALS Mice. *Frontiers in Neurology*, 12, s. 693309.
- Mokhtarzadeh Khangahi, A., Satarian, L., Deng, W., Baharvand, H. i Javan, M., 2018. In vivo conversion of astrocytes into oligodendrocyte lineage cells with transcription factor Sox10; Promise for myelin repair in multiple sclerosis. *PLoS One*, 13(9), s. e0203785.
- Momeny, M., Saunus, J.M., Marturana, F., McCart Reed, A.E., Black, D., Sala, G., Iacobelli, S., Holland, J.D., Yu, D., Da Silva, L., Simpson, P.T., Khanna, K.K., Chenevix-Trench, G. i Lakhani, S.R., 2015. Heregulin-HER3-HER2 signaling promotes matrix metalloproteinase-dependent blood-brain-barrier transendothelial migration of human breast cancer cell lines. *Oncotarget*, 6(6), s. 3932–3946.

- Morcuende, S., Muñoz-Hernández, R., Benítez-Temiño, B., Pastor, A.M. i De La Cruz, R.R., 2013. Neuroprotective effects of NGF, BDNF, NT-3 and GDNF on axotomized extraocular motoneurons in neonatal rats. *Neuroscience*, 250, s. 31–48.
- Mothe, A.J. i Tator, C.H., 2008. Transplanted neural stem/progenitor cells generate myelinating oligodendrocytes and Schwann cells in spinal cord demyelination and dysmyelination. *Experimental Neurology*, 213(1), s. 176–190.
- Muffat, J., Li, Y., Yuan, B., Mitalipova, M., Omer, A., Corcoran, S., Bakiasi, G., Tsai, L.-H., Aubourg, P., Ransohoff, R.M. i Jaenisch, R., 2016. Efficient derivation of microglia-like cells from human pluripotent stem cells. *Nature Medicine*, 22(11), s. 1358–1367.
- Najm, F.J., Lager, A.M., Zaremba, A., Wyatt, K., Caprariello, A.V., Factor, D.C., Karl, R.T., Maeda, T., Miller, R.H. i Tesar, P.J., 2013. Transcription factor-mediated reprogramming of fibroblasts to expandable, myelinogenic oligodendrocyte progenitor cells. *Nature Biotechnology*, 31(5), s. 426–433.
- Naldini, L., Blömer, U., Gage, F.H., Trono, D. i Verma, I.M., 1996a. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(21), s. 11382–11388.
- Naldini, L., Blömer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M. i Trono, D., 1996b. In Vivo Gene Delivery and Stable Transduction of Nondividing Cells by a Lentiviral Vector. *Science*, 272(5259), s. 263–267.
- Namchaw, P., Wen, H., Mayrhofer, F., Chechneva, O., Biswas, S. i Deng, W., 2019. Temporal and partial inhibition of GLI1 in neural stem cells (NSCs) results in the early maturation of NSC derived oligodendrocytes in vitro. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), s. 272.
- Nave, K.-A. i Salzer, J.L., 2006. Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Current Opinion in Neurobiology*, 16(5), s. 492–500.
- Nayak, S. i Herzog, R.W., 2010. Progress and prospects: immune responses to viral vectors. *Gene Therapy*, 17(3), s. 295–304.
- Neudert, C., Oliver, D., Wasner, M. i Borasio, G.D., 2001. The course of the terminal phase in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology*, 248(7), s. 612–616.
- Nistor, G.I., Totoiu, M.O., Haque, N., Carpenter, M.K. i Keirstead, H.S., 2005. Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation. *Glia*, 49(3), s. 385–396.
- Nout, Y.S., Culp, E., Schmidt, M.H., Tovar, C.A., Pröschel, C., Mayer-Pröschel, M., Noble, M.D., Beattie, M.S. i Bresnahan, J.C., 2011. Glial restricted precursor cell transplant with cyclic adenosine monophosphate improved some autonomic functions but resulted in a reduced graft size after spinal cord contusion injury in rats. *Experimental Neurology*, 227(1), s. 159–171.
- Nowak, B., Andrzejewska, A., Rogujski, P., Zawadzki, M., Walczak, P., Dorobek, M., Lukomska, B. i Janowski, M., 2022. Imaging of Stem Cell Therapy for Stroke and Beyond. W: S.S. Raza, red., *Regenerative Therapies in Ischemic Stroke Recovery*. [online] Singapore: Springer Nature Singapore, s. 137–156. Dostępne na: <[https://link.springer.com/10.1007/978-981-16-8562-0\\_6](https://link.springer.com/10.1007/978-981-16-8562-0_6)> [dostęp 20.11.2022].
- Nunes, M.C., Roy, N.S., Keyoung, H.M., Goodman, R.R., McKhann, G., Jiang, L., Kang, J., Nedergaard, M. i Goldman, S.A., 2003. Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain. *Nature Medicine*, 9(4), s. 439–447.

- Okamoto, K., Mizuno, Y. i Fujita, Y., 2008. Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology*, 28(2), s. 109–115.
- Okita, K., Ichisaka, T. i Yamanaka, S., 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448(7151), s. 313–317.
- Olsson, T., Barcellos, L.F. i Alfredsson, L., 2017. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*, 13(1), s. 25–36.
- Ozerdem, U. i Stallcup, W.B., 2003. Early contribution of pericytes to angiogenic sprouting and tube formation. *Angiogenesis*, 6(3), s. 241–249.
- Pang, Q.-M., Chen, S.-Y., Xu, Q.-J., Fu, S.-P., Yang, Y.-C., Zou, W.-H., Zhang, M., Liu, J., Wan, W.-H., Peng, J.-C. i Zhang, T., 2021. Neuroinflammation and Scarring After Spinal Cord Injury: Therapeutic Roles of MSCs on Inflammation and Glial Scar. *Frontiers in Immunology*, 12, s. 751021.
- Parkhurst, A., Wang, S.Z., Findlay, T.R., Malebranche, K.J., Odabas, A., Alt, J., Maxwell, M.J., Kaur, H., Peer, C.J., Figg, W.D., Warren, K.E., Slusher, B.S., Eberhart, C.G., Raabe, E.H. i Rubens, J.A., 2022. Dual mTORC1/2 inhibition compromises cell defenses against exogenous stress potentiating Obatoclax-induced cytotoxicity in atypical teratoid/rhabdoid tumors. *Cell Death & Disease*, 13(4), s. 410.
- Pay, S.L., Qi, X., Willard, J.F., Godoy, J., Sankhavaram, K., Horton, R., Mitter, S.K., Quigley, J.L., Chang, L.-J., Grant, M.B. i Boulton, M.E., 2018. Improving the Transduction of Bone Marrow-Derived Cells with an Integrase-Defective Lentiviral Vector. *Human Gene Therapy Methods*, 29(1), s. 44–59.
- Paz-Zulueta, M., Parás-Bravo, P., Cantarero-Prieto, D., Blázquez-Fernández, C. i Oterino-Durán, A., 2020. A literature review of cost-of-illness studies on the economic burden of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 43, s. 102162.
- Pelletier, J. i Sonenberg, N., 1988. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*, 334(6180), s. 320–325.
- Pereira, L.A., 2000. SURVEY AND SUMMARY A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acids Research*, 28(3), s. 663–668.
- Philipp, N., Kazerani, M., Nicholls, A., Vick, B., Wulf, J., Straub, T., Scheurer, M., Muth, A., Hänel, G., Nixdorf, D., Sponheimer, M., Ohlmeyer, M., Lacher, S.M., Brauchle, B., Marcinek, A., Rohrbacher, L., Leutbecher, A., Rejeski, K., Weigert, O., Von Bergwelt-Baildon, M., Theurich, S., Kischel, R., Jeremias, I., Bücklein, V. i Subklewe, M., 2022. T-cell exhaustion induced by continuous bispecific molecule exposure is ameliorated by treatment-free intervals. *Blood*, 140(10), s. 1104–1118.
- Piras, G., Montiel-Equihua, C., Chan, Y.-K.A., Wantuch, S., Stuckey, D., Burke, D., Prunty, H., Phadke, R., Chambers, D., Partida-Gaytan, A., Leon-Rico, D., Panchal, N., Whitmore, K., Calero, M., Benedetti, S., Santilli, G., Thrasher, A.J. i Gaspar, H.B., 2020. Lentiviral Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy Rescues Clinical Phenotypes in a Murine Model of Pompe Disease. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 18, s. 558–570.
- Pluchino, S., Gritti, A., Blezer, E., Amadio, S., Brambilla, E., Borsellino, G., Cossetti, C., Del Carro, U., Comi, G., 't Hart, B., Vescovi, A. i Martino, G., 2009. Human neural stem cells ameliorate autoimmune encephalomyelitis in non-human primates. *Annals of Neurology*, 66(3), s. 343–354.
- Platek, R., Rogujski, P., Mazuryk, J., Wiśniewska, M.B., Kaczmarek, L. i Czupryn, A., 2022. Impaired Generation of Transit-Amplifying Progenitors in the Adult Subventricular Zone of Cyclin D2 Knockout Mice. *Cells*, 11(1), s. 135.

- Ponath, G., Park, C. i Pitt, D., 2018. The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis. *Frontiers in Immunology*, 9, s. 217.
- Priest, C.A., Manley, N.C., Denham, J., Wirth, E.D. i Lebkowski, J.S., 2015. Preclinical safety of human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors supporting clinical trials in spinal cord injury. *Regenerative Medicine*, 10(8), s. 939–958.
- Raabe, T.D., Deadwyler, G., Varga, J.W. i Devries, G.H., 2004. Localization of neuregulin isoforms and erbB receptors in myelinating glial cells. *Glia*, 45(2), s. 197–207.
- Raff, M.C., Miller, R.H. i Noble, M., 1983. A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature*, 303(5916), s. 390–396.
- Raffaele, S., Boccazzi, M. i Fumagalli, M., 2021. Oligodendrocyte Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Mechanisms and Therapeutic Perspectives. *Cells*, 10(3), s. 565.
- Rahmatullah, M., Schroering, A., Rothblum, K., Stahl, R.C., Urban, B. i Carey, D.J., 1998. Synergistic Regulation of Schwann Cell Proliferation by Heregulin and Forskolin. *Molecular and Cellular Biology*, 18(11), s. 6245–6252.
- Rao, M.S., Noble, M. i Mayer-Pröschel, M., 1998. A tripotential glial precursor cell is present in the developing spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(7), s. 3996–4001.
- Rao, M.V. i Nixon, R.A., 2003. Defective neurofilament transport in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis: a review. *Neurochemical Research*, 28(7), s. 1041–1047.
- Rasband, M.N. i Macklin, W.B., 2012. Chapter 10 - Myelin Structure and Biochemistry. W: S.T. Brady, G.J. Siegel, R.W. Albers i D.L. Price, red., *Basic Neurochemistry (Eighth Edition)*. [online] New York: Academic Press, s. 180–199. Dostępne na: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123749475000109>> [dostęp 23.01.2019].
- Rautio, J., Kumpulainen, H., Heimbach, T., Oliyai, R., Oh, D., Järvinen, T. i Savolainen, J., 2008. Prodrugs: design and clinical applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(3), s. 255–270.
- Readhead, C., Popko, B., Takahashi, N., Shine, H.D., Saavedra, R.A., Sidman, R.L. i Hood, L., 1987. Expression of a myelin basic protein gene in transgenic shiverer mice: correction of the dysmyelinating phenotype. *Cell*, 48(4), s. 703–712.
- Reekmans, K., Praet, J., Daans, J., Reumers, V., Pauwels, P., Van der Linden, A., Berneman, Z.N. i Ponsaerts, P., 2012. Current challenges for the advancement of neural stem cell biology and transplantation research. *Stem Cell Reviews and Reports*, 8(1), s. 262–278.
- Reeves, P.J., Callewaert, N., Contreras, R. i Khorana, H.G., 2002. Structure and function in rhodopsin: High-level expression of rhodopsin with restricted and homogeneous N-glycosylation by a tetracycline-inducible N-acetylglucosaminyltransferase I-negative HEK293S stable mammalian cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(21), s. 13419–13424.
- Reich, D.S., Lucchinetti, C.F. i Calabresi, P.A., 2018. Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 378(2), s. 169–180.
- Riedhammer, C. i Weissert, R., 2015. Antigen Presentation, Autoantigens, and Immune Regulation in Multiple Sclerosis and Other Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*, [online] 6. Dostępne na: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2015.00322/abstract>> [dostęp 28.03.2023].

- Rintz, E., Higuchi, T., Kobayashi, H., Galileo, D.S., Wegrzyn, G. i Tomatsu, S., 2022. Promoter considerations in the design of lentiviral vectors for use in treating lysosomal storage diseases. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 24, s. 71–87.
- Rivers, L.E., Young, K.M., Rizzi, M., Jamen, F., Psachoulia, K., Wade, A., Kessar, N. i Richardson, W.D., 2008. PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. *Nature Neuroscience*, 11(12), s. 1392–1401.
- Robertson, J., 2018. The Gliocentric Brain. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), s. 3033.
- Robinson, A.P., Harp, C.T., Noronha, A. i Miller, S.D., 2014. The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS. W: *Handbook of Clinical Neurology*. [online] Elsevier, s. 173–189. Dostępne na: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978044452001200008X>> [dostęp 21.04.2023].
- Rodrigues, G.M.C., Gaj, T., Adil, M.M., Wahba, J., Rao, A.T., Lorbeer, F.K., Kulkarni, R.U., Diogo, M.M., Cabral, J.M.S., Miller, E.W., Hockemeyer, D. i Schaffer, D.V., 2017. Defined and Scalable Differentiation of Human Oligodendrocyte Precursors from Pluripotent Stem Cells in a 3D Culture System. *Stem Cell Reports*, 8(6), s. 1770–1783.
- Romero, G.G., Monaldi, A.C. i Alanís, E.E., 2012. Digital holographic microscopy for detection of *Trypanosoma cruzi* parasites in fresh blood mounts. *Optics Communications*, 285(6), s. 1613–1618.
- Roy, N.S., Wang, S., Harrison-Restelli, C., Benraiss, A., Fraser, R.A., Gravel, M., Braun, P.E. i Goldman, S.A., 1999. Identification, isolation, and promoter-defined separation of mitotic oligodendrocyte progenitor cells from the adult human subcortical white matter. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(22), s. 9986–9995.
- Ruiz-Sánchez, F.J., do Rosário Martins, M., Soares, S., Romero-Morales, C., López-López, D., Gómez-Salgado, J. i Jiménez-Cebrián, A.M., 2022. Impact of Multiple Sclerosis and Its Association with Depression: An Analytical Case-Control Investigation. *Healthcare*, 10(11), s. 2218.
- Ryu, W.-S., 2017. Retroviruses. W: *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*. [online] Elsevier, s. 227–246. Dostępne na: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128008386000175>> [dostęp 21.04.2023].
- Sacson, R.A., Bunton-Stasyshyn, R.K.A., Fisher, E.M.C. i Fratta, P., 2013. Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis? *Brain*, 136(8), s. 2342–2358.
- Sachdeva, G., D’Costa, J., Cho, J.E., Kachapati, K., Choudhry, V. i Arya, S.K., 2007. Chimeric HIV-1 and HIV-2 lentiviral vectors with added safety insurance. *Journal of Medical Virology*, 79(2), s. 118–126.
- Salikhova, D., Bukharova, T., Cherkashova, E., Namestnikova, D., Leonov, G., Nikitina, M., Gubskiy, I., Akopyan, G., Elchaninov, A., Midiber, K., Bulatenco, N., Mokrousova, V., Makarov, A., Yarygin, K., Chekhonin, V., Mikhaleva, L., Fatkhudinov, T. i Goldshtein, D., 2021. Therapeutic Effects of hiPSC-Derived Glial and Neuronal Progenitor Cells-Conditioned Medium in Experimental Ischemic Stroke in Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), s. 4694.
- Sato, T., Sato, F., Kamezaki, A., Sakaguchi, K., Tanigome, R., Kawakami, K. i Sehara-Fujisawa, A., 2015. Neuregulin 1 Type II-ErbB Signaling Promotes Cell Divisions Generating Neurons from Neural Progenitor Cells in the Developing Zebrafish Brain. *PLOS ONE*, 10(5), s. e0127360.
- Sawicka, J., Dzierżyńska, M., Wardowska, A., Deptuła, M., Rogujski, P., Sosnowski, P., Filipowicz, N., Mieczkowska, A., Sass, P., Pawlik, A., Hać, A., Schumacher, A., Gucwa, M., Karska, N.,

- Kamińska, J., Płatek, R., Mazuryk, J., Zieliński, J., Kondej, K., Młynarz, P., Mucha, P., Skowron, P., Janus, Ł., Herman-Antosiewicz, A., Sachadyn, P., Czupryn, A., Piotrowski, A., Piękna, M. i Rodziejewicz-Motowidło, S., 2020. Immunofan-RDKVYR Peptide-Stimulates Skin Cell Proliferation and Promotes Tissue Repair. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(12), s. E2884.
- Schlimgen, R., Howard, J., Wooley, D., Thompson, M., Baden, L.R., Yang, O.O., Christiani, D.C., Mostoslavsky, G., Diamond, D.V., Duane, E.G., Byers, K., Winters, T., Gelfand, J.A., Fujimoto, G., Hudson, T.W. i Vyas, J.M., 2016. Risks Associated With Lentiviral Vector Exposures and Prevention Strategies. *Journal of Occupational & Environmental Medicine*, 58(12), s. 1159–1166.
- Schmucker, J., Ader, M., Brockschneider, D., Brodarac, A., Bartsch, U. i Riethmacher, D., 2003. erbB3 is dispensable for oligodendrocyte development in vitro and in vivo. *Glia*, 44(1), s. 67–75.
- Schoenwolf, G.C. i Alvarez, I.S., 1989. Roles of neuroepithelial cell rearrangement and division in shaping of the avian neural plate. *Development (Cambridge, England)*, 106(3), s. 427–439.
- Schott, J.W., León-Rico, D., Ferreira, C.B., Buckland, K.F., Santilli, G., Armant, M.A., Schambach, A., Cavazza, A. i Thrasher, A.J., 2019. Enhancing Lentiviral and Alpharetroviral Transduction of Human Hematopoietic Stem Cells for Clinical Application. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 14, s. 134–147.
- Shabestani Monfared, G., Ertl, P. i Rothbauer, M., 2020. An on-chip wound healing assay fabricated by xurography for evaluation of dermal fibroblast cell migration and wound closure. *Scientific Reports*, 10(1), s. 16192.
- Shah, N., 1994. Glial growth factor restricts mammalian neural crest stem cells to a glial fate. *Cell*, 77(3), s. 349–360.
- Shinkai, Y., 1992. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell*, 68(5), s. 855–867.
- Shu, X., Shaner, N.C., Yarbrough, C.A., Tsien, R.Y. i Remington, S.J., 2006. Novel Chromophores and Buried Charges Control Color in mFruits. *Biochemistry*, 45(32), s. 9639–9647.
- Sim, F.J., McClain, C.R., Schanz, S.J., Protack, T.L., Windrem, M.S. i Goldman, S.A., 2011. CD140a identifies a population of highly myelinogenic, migration-competent and efficiently engrafting human oligodendrocyte progenitor cells. *Nature Biotechnology*, 29(10), s. 934–941.
- Simons, M. i Trajkovic, K., 2006. Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *Journal of Cell Science*, 119(21), s. 4381–4389.
- Singh, P.K., Bedwell, G.J. i Engelman, A.N., 2022. Spatial and Genomic Correlates of HIV-1 Integration Site Targeting. *Cells*, 11(4), s. 655.
- Sleigh, J.N., Weir, G.A. i Schiavo, G., 2016. A simple, step-by-step dissection protocol for the rapid isolation of mouse dorsal root ganglia. *BMC Research Notes*, 9(1), s. 82.
- Smethurst, P., Newcombe, J., Troakes, C., Simone, R., Chen, Y.-R., Patani, R. i Sidle, K., 2016. In vitro prion-like behaviour of TDP-43 in ALS. *Neurobiology of Disease*, 96, s. 236–247.
- Smith, K.J., Bostock, H. i Hall, S.M., 1982. Saltatory conduction precedes remyelination in axons demyelinated with lysophosphatidyl choline. *Journal of the Neurological Sciences*, 54(1), s. 13–31.
- Sommer, I. i Schachner, M., 1981. Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. *Developmental Biology*, 83(2), s. 311–327.

- Son, M., Kim, D.Y. i Kim, C.-H., 2022. Disease Modeling of Rare Neurological Disorders in Zebrafish. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), s. 3946.
- Srivastava, R.K., Bulte, J.W.M., Walczak, P. i Janowski, M., 2018. Migratory potential of transplanted glial progenitors as critical factor for successful translation of glia replacement therapy: The gap between mice and men. *Glia*, 66(5), s. 907–919.
- Stanaszek, L., Majchrzak, M., Drela, K., Rogujski, P., Sanford, J., Fiedorowicz, M., Gewartowska, M., Frontczak-Baniewicz, M., Walczak, P., Lukomska, B. i Janowski, M., 2021. Myelin-Independent Therapeutic Potential of Canine Glial-Restricted Progenitors Transplanted in Mouse Model of Dysmyelinating Disease. *Cells*, 10(11), s. 2968.
- Stanaszek, L., Rogujski, P., Drela, K., Fiedorowicz, M., Walczak, P., Lukomska, B. i Janowski, M., 2022. Transplantation of Human Glial Progenitors to Immunodeficient Neonatal Mice with Amyotrophic Lateral Sclerosis (SOD1/rag2). *Antioxidants*, 11(6), s. 1050.
- Stassart, R.M., Fledrich, R., Velanac, V., Brinkmann, B.G., Schwab, M.H., Meijer, D., Sereda, M.W. i Nave, K.-A., 2013. A role for Schwann cell-derived neuregulin-1 in remyelination. *Nature Neuroscience*, 16(1), s. 48–54.
- Stefansson, H., Petursson, H., Sigurdsson, E., Steinthorsdottir, V., Bjornsdottir, S., Sigmundsson, T., Ghosh, S., Brynjolfsson, J., Gunnarsdottir, S., Ivarsson, O., Chou, T.T., Hjaltason, O., Birgisdottir, B., Jonsson, H., Gudnadottir, V.G., Gudmundsdottir, E., Bjornsson, A., Ingvarsson, B., Ingason, A., Sigfusson, S., Hardardottir, H., Harvey, R.P., Lai, D., Zhou, M., Brunner, D., Mutel, V., Gonzalo, A., Lemke, G., Sainz, J., Johannesson, G., Andresson, T., Gudbjartsson, D., Manolescu, A., Frigge, M.L., Gurney, M.E., Kong, A., Gulcher, J.R. i Stefansson, K., 2002. Neuregulin 1 and Susceptibility to Schizophrenia. *The American Journal of Human Genetics*, 71(4), s. 877–892.
- Stobart, J.L., Ferrari, K.D., Barrett, M.J.P., Stobart, M.J., Looser, Z.J., Saab, A.S. i Weber, B., 2018. Long-term In Vivo Calcium Imaging of Astrocytes Reveals Distinct Cellular Compartment Responses to Sensory Stimulation. *Cerebral Cortex*, 28(1), s. 184–198.
- Stringer, S.E., Mayer-Proschel, M., Kalyani, A., Rao, M. i Gallagher, J.T., 1999. Heparin Is a Unique Marker of Progenitors in the Glial Cell Lineage. *Journal of Biological Chemistry*, 274(36), s. 25455–25460.
- Su, T.-W., Xue, L. i Ozcan, A., 2012. High-throughput lensfree 3D tracking of human sperms reveals rare statistics of helical trajectories. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(40), s. 16018–16022.
- Su, W.-M., Cheng, Y.-F., Jiang, Z., Duan, Q.-Q., Yang, T.-M., Shang, H.-F. i Chen, Y.-P., 2021. Predictors of survival in patients with amyotrophic lateral sclerosis: A large meta-analysis. *eBioMedicine*, 74, s. 103732.
- Sugimori, M., Nagao, M., Parras, C.M., Nakatani, H., Lebel, M., Guillemot, F. i Nakafuku, M., 2008. *Ascl1* is required for oligodendrocyte development in the spinal cord. *Development (Cambridge, England)*, 135(7), s. 1271–1281.
- Sundberg, M., Hyysalo, A., Skottman, H., Shin, S., Vemuri, M., Suuronen, R. i Narkilahti, S., 2011. A xeno-free culturing protocol for pluripotent stem cell-derived oligodendrocyte precursor cell production. *Regenerative Medicine*, 6(4), s. 449–460.
- Sundberg, M., Skottman, H., Suuronen, R. i Narkilahti, S., 2010. Production and isolation of NG2+ oligodendrocyte precursors from human embryonic stem cells in defined serum-free medium. *Stem Cell Research*, 5(2), s. 91–103.

- Sundquist, W.I. i Krausslich, H.-G., 2012. HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(7), s. a006924–a006924.
- Sussman, E.S., Pendharkar, A.V., Ho, A.L. i Ghajar, J., 2018. Mild traumatic brain injury and concussion: terminology and classification. W: *Handbook of Clinical Neurology*. [online] Elsevier, s. 21–24. Dostępne na: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444639547000033>> [dostęp 21.04.2023].
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. i Yamanaka, S., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), s. 861–872.
- Takahashi, K. i Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), s. 663–676.
- Talbott, E.O., Malek, A.M. i Lacomis, D., 2016. The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. W: *Handbook of Clinical Neurology*. [online] Elsevier, s. 225–238. Dostępne na: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128029732000136>> [dostęp 28.03.2023].
- Tang, Y., Yu, P. i Cheng, L., 2017. Current progress in the derivation and therapeutic application of neural stem cells. *Cell Death & Disease*, 8(10), s. e3108.
- Tashiro, K., Inamura, M., Kawabata, K., Sakurai, F., Yamanishi, K., Hayakawa, T. i Mizuguchi, H., 2009. Efficient Adipocyte and Osteoblast Differentiation from Mouse Induced Pluripotent Stem Cells by Adenoviral Transduction. *Stem Cells*, 27(8), s. 1802–1811.
- Taveggia, C., Thaker, P., Petrylak, A., Caporaso, G.L., Toews, A., Falls, D.L., Einheber, S. i Salzer, J.L., 2008. Type III neuregulin-1 promotes oligodendrocyte myelination. *Glia*, 56(3), s. 284–293.
- Temple, S., 2001. The development of neural stem cells. *Nature*, 414(6859), s. 112–117.
- Thier, M., Wörsdörfer, P., Lakes, Y.B., Gorris, R., Herms, S., Opitz, T., Seiferling, D., Quandel, T., Hoffmann, P., Nöthen, M.M., Brüstle, O. i Edenhofer, F., 2012. Direct conversion of fibroblasts into stably expandable neural stem cells. *Cell Stem Cell*, 10(4), s. 473–479.
- Tolmachov, O., Tolmachova, T. i A., F., 2011. Designing Lentiviral Gene Vectors. W: K. Xu, red., *Viral Gene Therapy*. [online] InTech. Dostępne na: <<http://www.intechopen.com/books/viral-gene-therapy/designing-lentiviral-gene-vectors>> [dostęp 22.04.2023].
- Totoiu, M.O., Nistor, G.I., Lane, T.E. i Keirstead, H.S., 2004. Remyelination, axonal sparing, and locomotor recovery following transplantation of glial-committed progenitor cells into the MHV model of multiple sclerosis. *Experimental Neurology*, 187(2), s. 254–265.
- Tourbah, A., Linnington, C., Bachelin, C., Avellana-Adalid, V., Wekerle, H. i Baron-Van Evercooren, A., 1998. Inflammation promotes survival and migration of the CG4 oligodendrocyte progenitors transplanted in the spinal cord of both inflammatory and demyelinated EAE rats. *Journal of Neuroscience Research*, 50(5), s. 853–861.
- Tripathi, R.B., Rivers, L.E., Young, K.M., Jamen, F. i Richardson, W.D., 2010. NG2 glia generate new oligodendrocytes but few astrocytes in a murine experimental autoimmune encephalomyelitis model of demyelinating disease. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(48), s. 16383–16390.
- Trono, D. red., 2002. *Lentiviral Vectors*. Current Topics in Microbiology and Immunology. [online] Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Dostępne na: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-56114-6>> [dostęp 21.04.2023].



Uchida, N., Chen, K., Dohse, M., Hansen, K.D., Dean, J., Buser, J.R., Riddle, A., Beardsley, D.J., Wan, Y., Gong, X., Nguyen, T., Cummings, B.J., Anderson, A.J., Tamaki, S.J., Tsukamoto, A., Weissman, I.L., Matsumoto, S.G., Sherman, L.S., Kroenke, C.D. i Back, S.A., 2012. Human neural stem cells induce functional myelination in mice with severe dysmyelination. *Science Translational Medicine*, 4(155), s. 155ra136.

Vallstedt, A., Klos, J.M. i Ericson, J., 2005. Multiple Dorsoventral Origins of Oligodendrocyte Generation in the Spinal Cord and Hindbrain. *Neuron*, 45(1), s. 55–67.

Vanderver, A., Simons, C., Helman, G., Crawford, J., Wolf, N.I., Bernard, G., Pizzino, A., Schmidt, J.L., Takanohashi, A., Miller, D., Khouzam, A., Rajan, V., Ramos, E., Chowdhury, S., Hambuch, T., Ru, K., Baillie, G.J., Grimmond, S.M., Caldovic, L., Devaney, J., Bloom, M., Evans, S.H., Murphy, J.L.P., McNeill, N., Fogel, B.L., the Leukodystrophy Study Group, Schiffmann, R., van der Knaap, M.S., Taft, R.J., Gropman, A.L., Rosser, T., Pearl, P.L., Fung, E., Parikh, S., Cohen, B.H., Reggin, J.D., Yalcinkaya, C., Shafir, Y., MarcDiFazio, Freilich, E., Lourenco, C.M., Tesi-Rocha, C., Desai, J., Amartino, H., Weaver, K.N., Long, V., Gambello, M.J., Cirillo, M.L., Kahn, I., Gill, D., Gieron, M., de Los Reyes, E., Lavenstein, B., Lanpher, B.C. i Kurlleman, G., 2016. Whole exome sequencing in patients with white matter abnormalities. *Annals of Neurology*, 79(6), s. 1031–1037.

Vara, J.A., Portela, A., Ortin, J. i Jimenez, A., 1986. Expression in mammalian cells of a gene from *Streptomyces alboniger* conferring puromycin resistance. *Nucleic Acids Research*, 14(11), s. 4617–4624.

Vartanian, T., Corfas, G., Li, Y., Fischbach, G.D. i Stefansson, K., 1994. A role for the acetylcholine receptor-inducing protein ARIA in oligodendrocyte development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(24), s. 11626–11630.

Vartanian, T., Fischbach, G. i Miller, R., 1999. Failure of spinal cord oligodendrocyte development in mice lacking neuregulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(2), s. 731–735.

Vartanian, T., Goodearl, A., Viehöver, A. i Fischbach, G., 1997. Axonal Neuregulin Signals Cells of the Oligodendrocyte Lineage through Activation of HER4 and Schwann Cells through HER2 and HER3. *Journal of Cell Biology*, 137(1), s. 211–220.

Vaskova, E.A., Stekleneva, A.E., Medvedev, S.P. i Zakian, S.M., 2013. „Epigenetic memory” phenomenon in induced pluripotent stem cells. *Acta Naturae*, 5(4), s. 15–21.

Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z.P., Kokubu, Y., Südhof, T.C. i Wernig, M., 2010. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*, 463(7284), s. 1035–1041.

Vink, C.A., Counsell, J.R., Perocheau, D.P., Karda, R., Buckley, S.M.K., Brugman, M.H., Galla, M., Schambach, A., McKay, T.R., Waddington, S.N. i Howe, S.J., 2017. Eliminating HIV-1 Packaging Sequences from Lentiviral Vector Proviruses Enhances Safety and Expedites Gene Transfer for Gene Therapy. *Molecular Therapy*, 25(8), s. 1790–1804.

Volterra, A., Liaudet, N. i Savtchouk, I., 2014. Astrocyte Ca<sup>2+</sup> signalling: an unexpected complexity. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(5), s. 327–335.

Vos, T., Lim, S.S., Abbafati, C., Abbas, K.M., Abbasi, M., Abbasifard, M., Abbasi-Kangevari, M., Abbastabar, H., Abd-Allah, F., Abdelalim, A., Abdollahi, M., Abdollahpour, I., Abolhassani, H., Aboyans, V., Abrams, E.M., Abreu, L.G., Abrigo, M.R.M., Abu-Raddad, L.J., Abushouk, A.I., Acebedo, A., Ackerman, I.N., Adabi, M., Adamu, A.A., Adebayo, O.M., Adekanmbi, V., Adelson, J.D., Adetokunboh, O.O., Adham, D., Afshari, M., Afshin, A., Agardh, E.E., Agarwal, G., Agesa, K.M., Aghaali, M., Aghamir, S.M.K., Agrawal, A., Ahmad, T., Ahmadi, A., Ahmadi, M., Ahmadi, H., Ahmadpour, E., Akalu, T.Y., Akinyemi, R.O., Akinyemiju, T., Akombi, B., Al-Aly, Z., Alam, K.,

Alam, N., Alam, S., Alam, T., Alanzi, T.M., Albertson, S.B., Alcalde-Rabanal, J.E., Alema, N.M., Ali, M., Ali, S., Alicandro, G., Alijanzadeh, M., Alinia, C., Alipour, V., Aljunid, S.M., Alla, F., Allebeck, P., Almasi-Hashiani, A., Alonso, J., Al-Raddadi, R.M., Altirkawi, K.A., Alvis-Guzman, N., Alvis-Zakzuk, N.J., Amini, S., Amini-Rarani, M., Aminorroaya, A., Amiri, F., Amit, A.M.L., Amugsi, D.A., Amul, G.G.H., Anderlini, D., Andrei, C.L., Andrei, T., Anjomshoa, M., Ansari, F., Ansari, I., Ansari-Moghaddam, A., Antonio, C.A.T., Antony, C.M., Antriyandarti, E., Anvari, D., Anwer, R., Arabloo, J., Arab-Zozani, M., Aravkin, A.Y., Ariani, F., Ärnlov, J., Aryal, K.K., Arzani, A., Asadi-Aliabadi, M., Asadi-Pooya, A.A., Asghari, B., Ashbaugh, C., Atnafu, D.D., Atre, S.R., Ausloos, F., Ausloos, M., Ayala Quintanilla, B.P., Ayano, G., Ayanore, M.A., Aynalem, Y.A., Azari, S., Azarian, G., Azene, Z.N., Babae, E., Badawi, A., Bagherzadeh, M., Bakhshaei, M.H., Bakhtiari, A., Balakrishnan, S., Balalla, S., Balassyano, S., Banach, M., Banik, P.C., Bannick, M.S., Bante, A.B., Baraki, A.G., Barboza, M.A., Barker-Collo, S.L., Barthelemy, C.M., Barua, L., Barzegar, A., Basu, S., Baune, B.T., Bayati, M., Bazmandegan, G., Bedi, N., Beghi, E., Béjot, Y., Bello, A.K., Bender, R.G., Bennett, D.A., Bennitt, F.B., Bensor, I.M., Benziger, C.P., Berhe, K., Bernabe, E., Bertolacci, G.J., Bhageerathy, R., Bhala, N., Bhandari, D., Bhardwaj, P., Bhattacharyya, K., Bhutta, Z.A., Bibi, S., Biehl, M.H., Bikbov, B., Bin Sayeed, M.S., Biondi, A., Biriha, B.M., Bisanzio, D., Bisignano, C., Biswas, R.K., Bohlouli, S., Bohluli, M., Bolla, S.R.R., Bolor, A., Boon-Dooley, A.S., Borges, G., Borzi, A.M., Bourne, R., Brady, O.J., Brauer, M., Brayne, C., Breitborde, N.J.K., Brenner, H., Briant, P.S., Briggs, A.M., Briko, N.I., Britton, G.B., Bryazka, D., Buchbinder, R., Bumgarner, B.R., Busse, R., Butt, Z.A., Caetano dos Santos, F.L., Cámera, L.L.A., Campos-Nonato, I.R., Car, J., Cárdenas, R., Carreras, G., Carrero, J.J., Carvalho, F., Castaldelli-Maia, J.M., Castañeda-Orjuela, C.A., Castelpietra, G., Castle, C.D., Castro, F., Catalá-López, F., Causey, K., Cederroth, C.R., Cercy, K.M., Cerin, E., Chandan, J.S., Chang, A.R., Charlson, F.J., Chattu, V.K., Chaturvedi, S., Chimed-Ochir, O., Chin, K.L., Cho, D.Y., Christensen, H., Chu, D.-T., Chung, M.T., Cicuttini, F.M., Ciobanu, L.G., Cirillo, M., Collins, E.L., Compton, K., Conti, S., Cortesi, P.A., Costa, V.M., Cousin, E., Cowden, R.G., Cowie, B.C., Cromwell, E.A., Cross, D.H., Crowe, C.S., Cruz, J.A., Cunningham, M., Dahlawi, S.M.A., Damiani, G., Dandona, L., Dandona, R., Darwesh, A.M., Daryani, A., Das, J.K., Das Gupta, R., das Neves, J., Dávila-Cervantes, C.A., Davletov, K., De Leo, D., Dean, F.E., DeCleene, N.K., Deen, A., Degenhardt, L., Dellavalle, R.P., Demeke, F.M., Demsie, D.G., Denova-Gutiérrez, E., Dereje, N.D., Derveniz, N., Desai, R., Desalew, A., Dessie, G.A., Dharmaratne, S.D., Dhungana, G.P., Dianatinasab, M., Diaz, D., Dibaji Forooshani, Z.S., Dingels, Z.V., Dirac, M.A., Djalalinia, S., Do, H.T., Dokova, K., Dorostkar, F., Doshi, C.P., Doshmangir, L., Douiri, A., Doxey, M.C., Driscoll, T.R., Dunachie, S.J., Duncan, B.B., Duraes, A.R., Eagan, A.W., Ebrahimi Kalan, M., Edvardsson, D., Ehrlich, J.R., El Nahas, N., El Sayed, I., El Tantawi, M., Elbarazi, I., Elgendy, I.Y., Elhabashy, H.R., El-Jaafary, S.I., Elyazar, I.R., Emamian, M.H., Emmons-Bell, S., Erskine, H.E., Eshрати, B., Eskandari, S., Esmailnejad, S., Esmailzadeh, F., Esteghamati, A., Estep, K., Etemadi, A., Etisso, A.E., Farahmand, M., Faraj, A., Fareed, M., Faridnia, R., Farinha, C.S. e S., Farioli, A., Faro, A., Faruque, M., Farzadfar, F., Fattahi, N., Fazlzadeh, M., Feigin, V.L., Feldman, R., Fereshtehnejad, S.-M., Fernandes, E., Ferrari, A.J., Ferreira, M.L., Filip, I., Fischer, F., Fisher, J.L., Fitzgerald, R., Flohr, C., Flor, L.S., Foigt, N.A., Folley, M.O., Force, L.M., Fornari, C., Foroutan, M., Fox, J.T., Freitas, M., Fu, W., Fukumoto, T., Furtado, J.M., Gad, M.M., Gakidou, E., Galles, N.C., Gallus, S., Gamkrelidze, A., Garcia-Basteiro, A.L., Gardner, W.M., Geberemariam, B.S., Gebrehiwot, A.M., Gebremedhin, K.B., Gebreslassie, A.A.A.A., Gershberg Hayoon, A., Gething, P.W., Ghadimi, M., Ghadiri, K., Ghafourifard, M., Ghajar, A., Ghamari, F., Ghashghae, A., Ghiasvand, H., Ghith, N., Gholamian, A., Gilani, S.A., Gill, P.S., Gitimoghaddam, M., Giussani, G., Goli, S., Gomez, R.S., Gopalani, S.V., Gorini, G., Gorman, T.M., Gottlich, H.C., Goudarzi, H., Goulart, A.C., Goulart, B.N.G., Grada, A., Grivna, M., Grosso, G., Gubari, M.I.M., Gughani, H.C., Guimaraes, A.L.S., Guimarães, R.A., Guled, R.A., Guo, G., Guo, Y., Gupta, R., Haagsma, J.A., Haddock, B., Hafezi-Nejad, N., Hafiz, A., Hagins, H., Haile, L.M., Hall, B.J., Halvaei, I., Hamadeh, R.R., Hamagharib Abdullah, K., Hamilton, E.B., Han, C., Han, H., Hankey, G.J., Haro, J.M., Harvey, J.D., Hasaballah, A.I., Hasanzadeh, A., Hashemian, M., Hassanipour, S., Hassankhani, H., Havmoeller, R.J., Hay, R.J., Hay, S.I., Hayat, K., Heidari, B., Heidari, G., Heidari-Soureshjani, R., Hendrie, D., Henrikson, H.J., Henry, N.J., Herteliu, C., Heydarpour, F., Hird, T.R., Hoek, H.W., Hole, M.K., Holla, R., Hoogar, P., Hosgood, H.D., Hosseinzadeh, M., Hostiuc, M., Hostiuc, S., Househ, M., Hoy, D.G., Hsairi, M., Hsieh, V.C., Hu, G., Huda, T.M., Hugo, F.N., Huynh, C.K., Hwang, B.-F., Iannucci, V.C., Ibitoye,

S.E., Ikuta, K.S., Ilesanmi, O.S., Ilic, I.M., Ilic, M.D., Inbaraj, L.R., Ippolito, H., Irvani, S.S.N., Islam, M.M., Islam, M., Islam, S.M.S., Islami, F., Iso, H., Ivers, R.Q., Iwu, C.C.D., Iyamu, I.O., Jaafari, J., Jacobsen, K.H., Jadidi-Niaragh, F., Jafari, H., Jafarinaia, M., Jahagirdar, D., Jahani, M.A., Jahanmehr, N., Jakovljevic, M., Jalali, A., Jalilian, F., James, S.L., Janjani, H., Janodia, M.D., Jayatilleke, A.U., Jeemon, P., Jenabi, E., Jha, R.P., Jha, V., Ji, J.S., Jia, P., John, O., John-Akinola, Y.O., Johnson, C.O., Johnson, S.C., Jonas, J.B., Joo, T., Joshi, A., Jozwiak, J.J., Jürisson, M., Kabir, A., Kabir, Z., Kalani, H., Kalani, R., Kalankesh, L.R., Kalhor, R., Kamiab, Z., Kanchan, T., Karami Matin, B., Karch, A., Karim, M.A., Karimi, S.E., Kassa, G.M., Kassebaum, N.J., Katikireddi, S.V., Kawakami, N., Kayode, G.A., Keddie, S.H., Keller, C., Kereselidze, M., Khafaie, M.A., Khalid, N., Khan, M., Khatab, K., Khater, M.M., Khatib, M.N., Khayamzadeh, M., Khodayari, M.T., Khundkar, R., Kianipour, N., Kieling, C., Kim, D., Kim, Y.-E., Kim, Y.J., Kimokoti, R.W., Kisa, A., Kisa, S., Kissimova-Skarbek, K., Kivimäki, M., Kneib, C.J., Knudsen, A.K.S., Kocarnik, J.M., Kolola, T., Kopec, J.A., Kosen, S., Koul, P.A., Koyanagi, A., Kravchenko, M.A., Krishan, K., Krohn, K.J., Kuate Defo, B., Kucuk Bicer, B., Kumar, G.A., Kumar, M., Kumar, P., Kumar, V., Kumares, G., Kurmi, O.P., Kusuma, D., Kyu, H.H., La Vecchia, C., Lacey, B., Lal, D.K., Laloo, R., Lam, J.O., Lami, F.H., Landires, I., Lang, J.J., Lansingh, V.C., Larson, S.L., Larsson, A.O., Lasrado, S., Lassi, Z.S., Lau, K.M.-M., Lavados, P.M., Lazarus, J.V., Ledesma, J.R., Lee, P.H., Lee, S.W.H., LeGrand, K.E., Leigh, J., Leonardi, M., Lescinsky, H., Leung, J., Levi, M., Lewington, S., Li, S., Lim, L.-L., Lin, C., Lin, R.-T., Linehan, C., Linn, S., Liu, H.-C., Liu, S., Liu, Z., Looker, K.J., Lopez, A.D., Lopukhov, P.D., Lorkowski, S., Lotufo, P.A., Lucas, T.C.D., Lugo, A., Lunevicius, R., Lyons, R.A., Ma, J., MacLachlan, J.H., Maddison, E.R., Maddison, R., Madotto, F., Mahasha, P.W., Mai, H.T., Majeed, A., Maled, V., Maleki, S., Malekzadeh, R., Malta, D.C., Mamun, A.A., Manafi, A., Manafi, N., Manguerra, H., Mansouri, B., Mansournia, M.A., Mantilla Herrera, A.M., Maravilla, J.C., Marks, A., Martins-Melo, F.R., Martopullo, I., Masoumi, S.Z., Massano, J., Massenbourg, B.B., Mathur, M.R., Maulik, P.K., McAlinden, C., McGrath, J.J., McKee, M., Mehndiratta, M.M., Mehri, F., Mehta, K.M., Meitei, W.B., Memiah, P.T.N., Mendoza, W., Menezes, R.G., Mengesha, E.W., Mengesha, M.B., Mereke, A., Meretoja, A., Meretoja, T.J., Mestrovic, T., Miazgowski, B., Miazgowski, T., Michalek, I.M., Mihretie, K.M., Miller, T.R., Mills, E.J., Mirica, A., Mirrakhimov, E.M., Mirzaei, H., Mirzaei, M., Mirzaei-Alavijeh, M., Misganaw, A.T., Mithra, P., Moazen, B., Moghadaszadeh, M., Mohamadi, E., Mohammad, D.K., Mohammad, Y., Mohammad Gholi Mezerji, N., Mohammadian-Hafshejani, A., Mohammadifard, N., Mohammadpourhodki, R., Mohammed, S., Mokdad, A.H., Molokhia, M., Momen, N.C., Monasta, L., Mondello, S., Mooney, M.D., Moosazadeh, M., Moradi, G., Moradi, M., Moradi-Lakeh, M., Moradzadeh, R., Moraga, P., Morales, L., Morawska, L., Moreno Velásquez, I., Morgado-da-Costa, J., Morrison, S.D., Mosser, J.F., Mouodi, S., Mousavi, S.M., Mousavi Khaneghah, A., Mueller, U.O., Munro, S.B., Muriithi, M.K., Musa, K.I., Muthupandian, S., Naderi, M., Nagarajan, A.J., Nagel, G., Naghshtabrizi, B., Nair, S., Nandi, A.K., Nangia, V., Nansseu, J.R., Nayak, V.C., Nazari, J., Negoii, I., Negoii, R.I., Netsere, H.B.N., Ngunjiri, J.W., Nguyen, C.T., Nguyen, J., Nguyen, M., Nguyen, M., Nichols, E., Nigatu, D., Nigatu, Y.T., Nikbakhsh, R., Nixon, M.R., Nnaji, C.A., Nomura, S., Norrving, B., Noubiap, J.J., Nowak, C., Nunez-Samudio, V., Ofoi, A., Oancea, B., Odell, C.M., Ogbo, F.A., Oh, I.-H., Okunga, E.W., Oladnabi, M., Olagunju, A.T., Olusanya, B.O., Olusanya, J.O., Oluwasanu, M.M., Omar Bali, A., Omer, M.O., Ong, K.L., Onwujekwe, O.E., Orji, A.U., Orpana, H.M., Ortiz, A., Ostroff, S.M., Otstavnov, N., Otstavnov, S.S., Øverland, S., Owolabi, M.O., P A, M., Padubidri, J.R., Pakhare, A.P., Palladino, R., Pana, A., Panda-Jonas, S., Pandey, A., Park, E.-K., Parmar, P.G.K., Pasupula, D.K., Patel, S.K., Paternina-Caicedo, A.J., Pathak, A., Pathak, M., Patten, S.B., Patton, G.C., Paudel, D., Pazoki Toroudi, H., Peden, A.E., Pennini, A., Pepito, V.C.F., Peprah, E.K., Pereira, A., Pereira, D.M., Perico, N., Pham, H.Q., Phillips, M.R., Pigott, D.M., Pilgrim, T., Pilz, T.M., Pirsaeheb, M., Plana-Ripoll, O., Plass, D., Pokhrel, K.N., Polibin, R.V., Polinder, S., Polkinghorne, K.R., Postma, M.J., Pourjafar, H., Pourmalek, F., Pourmirza Kalhori, R., Pourshams, A., Poznańska, A., Prada, S.I., Prakash, V., Pribadi, D.R.A., Pupillo, E., Quazi Syed, Z., Rabiee, M., Rabiee, N., Radfar, A., Rafiee, A., Rafiei, A., Raggi, A., Rahimi-Movaghar, A., Rahman, M.A., Rajabpour-Sanati, A., Rajati, F., Ramezanzadeh, K., Ranabhat, C.L., Rao, P.C., Rao, S.J., Rasella, D., Rastogi, P., Rathi, P., Rawaf, D.L., Rawaf, S., Rawal, L., Razo, C., Redford, S.B., Reiner, R.C., Reinig, N., Reitsma, M.B., Remuzzi, G., Renjith, V., Renzaho, A.M.N., Resnikoff, S., Rezaei, N., Rezai, M. sadegh, Rezapour, A., Rhinehart, P.-A., Riahi, S.M., Ribeiro, A.L.P., Ribeiro, D.C., Ribeiro, D., Rickard, J., Roberts, N.L.S., Roberts, S., Robinson, S.R., Roever, L., Rolfe, S., Ronfani,

L., Roshandel, G., Roth, G.A., Rubagotti, E., Rumisha, S.F., Sabour, S., Sachdev, P.S., Saddik, B., Sadeghi, E., Sadeghi, M., Saeidi, S., Safi, S., Safiri, S., Sagar, R., Sahebkar, A., Sahraian, M.A., Sajadi, S.M., Salahshoor, M.R., Salamati, P., Salehi Zahabi, S., Salem, H., Salem, M.R.R., Salimzadeh, H., Salomon, J.A., Salz, I., Samad, Z., Samy, A.M., Sanabria, J., Santomauro, D.F., Santos, I.S., Santos, J.V., Santric-Milicevic, M.M., Saraswathy, S.Y.I., Sarmiento-Suárez, R., Sarrafzadegan, N., Sartorius, B., Sarveazad, A., Sathian, B., Sathish, T., Sattin, D., Sbarra, A.N., Schaeffer, L.E., Schiavolin, S., Schmidt, M.I., Schutte, A.E., Schwebel, D.C., Schwendicke, F., Senbeta, A.M., Senthilkumaran, S., Sepanlou, S.G., Shackelford, K.A., Shadid, J., Shahabi, S., Shaheen, A.A., Shaikh, M.A., Shalash, A.S., Shams-Beyranvand, M., Shamsizadeh, M., Shannawaz, M., Sharafi, K., Sharara, F., Sheena, B.S., Sheikhtaheri, A., Shetty, R.S., Shibuya, K., Shiferaw, W.S., Shigematsu, M., Shin, J.I., Shiri, R., Shirkoohi, R., Shrimel, M.G., Shuval, K., Siabani, S., Sigfusdottir, I.D., Sigurvinsdottir, R., Silva, J.P., Simpson, K.E., Singh, A., Singh, J.A., Skiadaresi, E., Skou, S.T., Skryabin, V.Y., Sobngwi, E., Sokhan, A., Soltani, S., Sorensen, R.J.D., Soriano, J.B., Sorrie, M.B., Soyiri, I.N., Sreeramareddy, C.T., Stanaway, J.D., Stark, B.A., Ștefan, S.C., Stein, C., Steiner, C., Steiner, T.J., Stokes, M.A., Stovner, L.J., Stubbs, J.L., Sudaryanto, A., Sufiyan, M.B., Sulo, G., Sultan, I., Sykes, B.L., Sylte, D.O., Szócska, M., Tabarés-Seisdedos, R., Tabb, K.M., Tadakamadla, S.K., Taherkhani, A., Tajdini, M., Takahashi, K., Taveira, N., Teagle, W.L., Teame, H., Tehrani-Banihashemi, A., Teklehaimanot, B.F., Terrason, S., Tessema, Z.T., Thankappan, K.R., Thomson, A.M., Tohidinik, H.R., Tonelli, M., Topor-Madry, R., Torre, A.E., Touvier, M., Tovani-Palone, M.R.R., Tran, B.X., Travillian, R., Troeger, C.E., Truelsen, T.C., Tsai, A.C., Tsatsakis, A., Tudor Car, L., Tyrovolas, S., Uddin, R., Ullah, S., Undurraga, E.A., Unnikrishnan, B., Vacante, M., Vakilian, A., Valdez, P.R., Varughese, S., Vasankari, T.J., Vasseghian, Y., Venketasubramanian, N., Violante, F.S., Vlassov, V., Vollset, S.E., Vongpradith, A., Vukovic, A., Vukovic, R., Waheed, Y., Walters, M.K., Wang, J., Wang, Y., Wang, Y.-P., Ward, J.L., Watson, A., Wei, J., Weintraub, R.G., Weiss, D.J., Weiss, J., Westerman, R., Whisnant, J.L., Whiteford, H.A., Wiangkham, T., Wiens, K.E., Wijeratne, T., Wilner, L.B., Wilson, S., Wojtyniak, B., Wolfe, C.D.A., Wool, E.E., Wu, A.-M., Wulf Hanson, S., Wunrow, H.Y., Xu, G., Xu, R., Yadgir, S., Yahyazadeh Jabbari, S.H., Yamagishi, K., Yaminfirooz, M., Yano, Y., Yaya, S., Yazdi-Feyzabadi, V., Yearwood, J.A., Yeheyis, T.Y., Yeshitila, Y.G., Yip, P., Yonemoto, N., Yoon, S.-J., Yoosefi Lebni, J., Younis, M.Z., Younker, T.P., Yousefi, Z., Yousefifard, M., Yousefinezhadi, T., Yousuf, A.Y., Yu, C., Yusefzadeh, H., Zahirian Moghadam, T., Zaki, L., Zaman, S.B., Zamani, M., Zamanian, M., Zandian, H., Zangeneh, A., Zastrozhin, M.S., Zewdie, K.A., Zhang, Y., Zhang, Z.-J., Zhao, J.T., Zhao, Y., Zheng, P., Zhou, M., Ziapour, A., Zimsen, S.R.M., Naghavi, M. i Murray, C.J.L., 2020. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, 396(10258), s. 1204–1222.

Walczak, P., All, A.H., Rumpal, N., Gorelik, M., Kim, H., Maybhate, A., Agrawal, G., Campanelli, J.T., Gilad, A.A., Kerr, D.A. i Bulte, J.W.M., 2011. Human glial-restricted progenitors survive, proliferate, and preserve electrophysiological function in rats with focal inflammatory spinal cord demyelination. *Glia*, 59(3), s. 499–510.

Walton, C., King, R., Rechtman, L., Kaye, W., Leray, E., Marrie, R.A., Robertson, N., La Rocca, N., Uitdehaag, B., van der Mei, I., Wallin, M., Helme, A., Angood Napier, C., Rijke, N. i Baneke, P., 2020. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Multiple Sclerosis Journal*, 26(14), s. 1816–1821.

Wang, C., Liu, F., Liu, Y.-Y., Zhao, C.-H., You, Y., Wang, L., Zhang, J., Wei, B., Ma, T., Zhang, Q., Zhang, Y., Chen, R., Song, H. i Yang, Z., 2011. Identification and characterization of neuroblasts in the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult human brain. *Cell Research*, 21(11), s. 1534–1550.

Wang, H., Barnes, C.O., Yang, Z., Nussenzweig, M.C. i Bjorkman, P.J., 2018a. Partially Open HIV-1 Envelope Structures Exhibit Conformational Changes Relevant for Coreceptor Binding and Fusion. *Cell Host & Microbe*, 24(4), s. 579-592.e4.

- Wang, H.-B., Wang, X.-P., Zhong, S.-Z. i Shen, Z.-L., 2013a. Novel method for culturing Schwann cells from adult mouse sciatic nerve in vitro. *Molecular Medicine Reports*, 7(2), s. 449–453.
- Wang, J., Bushman, J., Wang, X., Mayer-Proschel, M., Johnson, M. i Noble, M., 2013b. Oligodendrocyte/Type-2 Astrocyte Progenitor Cells and Glial-Restricted Precursor Cells Generate Different Tumor Phenotypes in Response to the Identical Oncogenes. *The Journal of Neuroscience*, 33(42), s. 16805–16817.
- Wang, R., Chu, C., Wei, Z., Chen, L., Xu, J., Liang, Y., Janowski, M., Stevens, R.D. i Walczak, P., 2021. Traumatic brain injury does not disrupt costimulatory blockade-induced immunological tolerance to glial-restricted progenitor allografts. *Journal of Neuroinflammation*, 18(1), s. 104.
- Wang, S., Bates, J., Li, X., Schanz, S., Chandler-Militello, D., Levine, C., Maherali, N., Studer, L., Hochedlinger, K., Windrem, M. i Goldman, S.A., 2013c. Human iPSC-derived oligodendrocyte progenitor cells can myelinate and rescue a mouse model of congenital hypomyelination. *Cell Stem Cell*, 12(2), s. 252–264.
- Wang, Y., Ning, Z., Zhou, X., Yang, Z., Tang, H., Xu, M., Wang, X., Zhao, J. i Bai, Y., 2018b. Neuregulin1 acts as a suppressor in human lung adenocarcinoma via AKT and ERK1/2 pathway. *Journal of Thoracic Disease*, 10(6), s. 3166–3179.
- Wernig, M., Zhao, J.-P., Pruszak, J., Hedlund, E., Fu, D., Soldner, F., Broccoli, V., Constantine-Paton, M., Isacson, O. i Jaenisch, R., 2008. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(15), s. 5856–5861.
- Wert, G. de i Mummery, C., 2003. Human embryonic stem cells: research, ethics and policy. *Human Reproduction*, 18(4), s. 672–682.
- Wiedenheft, B., Sternberg, S.H. i Doudna, J.A., 2012. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 482(7385), s. 331–338.
- Winans, S., Yu, H.J., De Los Santos, K., Wang, G.Z., KewalRamani, V.N. i Goff, S.P., 2022. A point mutation in HIV-1 integrase redirects proviral integration into centromeric repeats. *Nature Communications*, 13(1), s. 1474.
- Windrem, M.S., Nunes, M.C., Rashbaum, W.K., Schwartz, T.H., Goodman, R.A., McKhann, G., Roy, N.S. i Goldman, S.A., 2004. Fetal and adult human oligodendrocyte progenitor cell isolates myelinate the congenitally dysmyelinated brain. *Nature Medicine*, 10(1), s. 93–97.
- Windrem, M.S., Schanz, S.J., Guo, M., Tian, G.-F., Washco, V., Stanwood, N., Rasband, M., Roy, N.S., Nedergaard, M., Havton, L.A., Wang, S. i Goldman, S.A., 2008. Neonatal chimerization with human glial progenitor cells can both remyelinate and rescue the otherwise lethally hypomyelinated shiverer mouse. *Cell Stem Cell*, 2(6), s. 553–565.
- Windrem, M.S., Schanz, S.J., Morrow, C., Munir, J., Chandler-Militello, D., Wang, S. i Goldman, S.A., 2014. A competitive advantage by neonatally engrafted human glial progenitors yields mice whose brains are chimeric for human glia. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(48), s. 16153–16161.
- Wolpowitz, D., Mason, T.B.A., Dietrich, P., Mendelsohn, M., Talmage, D.A. i Role, L.W., 2000. Cysteine-Rich Domain Isoforms of the Neuregulin-1 Gene Are Required for Maintenance of Peripheral Synapses. *Neuron*, 25(1), s. 79–91.

- Woods, N.-B., 2003. Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: risk of insertional mutagenesis. *Blood*, 101(4), s. 1284–1289.
- Woroniecka, K., Chongsathidkiet, P., Rhodin, K., Kemeny, H., Dechant, C., Farber, S.H., Elsamadicy, A.A., Cui, X., Koyama, S., Jackson, C., Hansen, L.J., Johanns, T.M., Sanchez-Perez, L., Chandramohan, V., Yu, Y.-R.A., Bigner, D.D., Giles, A., Healy, P., Dranoff, G., Weinhold, K.J., Dunn, G.P. i Fecci, P.E., 2018. T-Cell Exhaustion Signatures Vary with Tumor Type and Are Severe in Glioblastoma. *Clinical Cancer Research*, 24(17), s. 4175–4186.
- Xie, X.-M., Shi, L.-L., Shen, L., Wang, R., Qi, Q., Wang, Q.-Y., Zhang, L.-J., Lü, H.-Z. i Hu, J.-G., 2016. Co-transplantation of MRF-overexpressing oligodendrocyte precursor cells and Schwann cells promotes recovery in rat after spinal cord injury. *Neurobiology of Disease*, 94, s. 196–204.
- Xu, L., Ryu, J., Hiel, H., Menon, A., Aggarwal, A., Rha, E., Mahairaki, V., Cummings, B.J. i Koliatsos, V.E., 2015. Transplantation of human oligodendrocyte progenitor cells in an animal model of diffuse traumatic axonal injury: survival and differentiation. *Stem Cell Research & Therapy*, 6, s. 93.
- Xu, L., Shen, P., Hazel, T., Johe, K. i Koliatsos, V.E., 2011. Dual transplantation of human neural stem cells into cervical and lumbar cord ameliorates motor neuron disease in SOD1 transgenic rats. *Neuroscience Letters*, 494(3), s. 222–226.
- Xu, L., Yan, J., Chen, D., Welsh, A.M., Hazel, T., Johe, K., Hatfield, G. i Koliatsos, V.E., 2006. Human neural stem cell grafts ameliorate motor neuron disease in SOD-1 transgenic rats. *Transplantation*, 82(7), s. 865–875.
- Yamashita, M. i Emerman, M., 2004. Capsid Is a Dominant Determinant of Retrovirus Infectivity in Nondividing Cells. *Journal of Virology*, 78(11), s. 5670–5678.
- Yamashita, T., Miyamoto, Y., Bando, Y., Ono, T., Kobayashi, S., Doi, A., Araki, T., Kato, Y., Shirakawa, T., Suzuki, Y., Yamauchi, J., Yoshida, S. i Sato, N., 2017. Differentiation of oligodendrocyte progenitor cells from dissociated monolayer and feeder-free cultured pluripotent stem cells. *PloS One*, 12(2), s. e0171947.
- Yandava, B.D., Billingham, L.L. i Snyder, E.Y., 1999. „Global” cell replacement is feasible via neural stem cell transplantation: evidence from the dysmyelinated shiverer mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(12), s. 7029–7034.
- Yang, N., Zuchero, J.B., Ahlenius, H., Marro, S., Ng, Y.H., Vierbuchen, T., Hawkins, J.S., Geissler, R., Barres, B.A. i Wernig, M., 2013. Generation of oligodendroglial cells by direct lineage conversion. *Nature Biotechnology*, 31(5), s. 434–439.
- Yang, W.-S., Lin, T.-Y., Chang, L., Yeh, W.W., Huang, S.-C., Chen, T.-Y., Hsieh, Y.-T., Chen, S.-T., Li, W.-C., Pan, C.-C., Campbell, M., Yen, C.-H., Chen, Y.-M.A. i Chang, P.-C., 2020. HIV-1 Tat Interacts with a Kaposi’s Sarcoma-Associated Herpesvirus Reactivation-Upregulated Antiangiogenic Long Noncoding RNA, LINC00313, and Antagonizes Its Function. *Journal of Virology*, 94(3), s. e01280-19.
- Zanazzi, G., Einheber, S., Westreich, R., Hannocks, M.-J., Bedell-Hogan, D., Marchionni, M.A. i Salzer, J.L., 2001. Glial Growth Factor/Neuregulin Inhibits Schwann Cell Myelination and Induces Demyelination. *Journal of Cell Biology*, 152(6), s. 1289–1300.

Zare, L., Baharvand, H. i Javan, M., 2019. Trichostatin A Promotes the Conversion of Astrocytes to Oligodendrocyte Progenitors in a Defined Culture Medium. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 18(1), s. 286–295.

Zawadzka, M., Rivers, L.E., Fancy, S.P.J., Zhao, C., Tripathi, R., Jamen, F., Young, K., Goncharevich, A., Pohl, H., Rizzi, M., Rowitch, D.H., Kessler, N., Suter, U., Richardson, W.D. i Franklin, R.J.M., 2010. CNS-resident glial progenitor/stem cells produce Schwann cells as well as oligodendrocytes during repair of CNS demyelination. *Cell Stem Cell*, 6(6), s. 578–590.

Zhang, H.-T., Fan, J., Cai, Y.-Q., Zhao, S.-J., Xue, S., Lin, J.-H., Jiang, X.-D. i Xu, R.-X., 2010. Human Wharton's jelly cells can be induced to differentiate into growth factor-secreting oligodendrocyte progenitor-like cells. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 79(1), s. 15–20.

Zhang, L., Qu, Y., Yang, C., Tang, J., Zhang, X., Mao, M., Mu, D. i Ferriero, D., 2009. Signaling pathway involved in hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  regulation in hypoxic-ischemic cortical neurons in vitro. *Neuroscience Letters*, 461(1), s. 1–6.

Zhang, M., Niibe, K., Kondo, T., Kamano, Y., Saeki, M. i Egusa, H., 2017a. Gene Delivery and Expression Systems in Induced Pluripotent Stem Cells. W: K. Sasaki, O. Suzuki i N. Takahashi, red., *Interface Oral Health Science 2016*. [online] Singapore: Springer Singapore, s. 121–133. Dostępne na: <[http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-1560-1\\_11](http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-1560-1_11)> [dostęp 15.05.2023].

Zhang, S.C., Lundberg, C., Lipsitz, D., O'Connor, L.T. i Duncan, I.D., 1998. Generation of oligodendroglial progenitors from neural stem cells. *Journal of Neurocytology*, 27(7), s. 475–489.

Zhang, Z., Huang, J., Shen, Y. i Li, R., 2017b. BACE1-Dependent Neuregulin-1 Signaling: An Implication for Schizophrenia. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, s. 302.

Zhivotovsky, B. i Kroemer, G., 2004. Apoptosis and genomic instability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(9), s. 752–762.

Zivelonghi, C. i Tamburin, S., 2018. Mechanical thrombectomy for acute ischemic stroke: the therapeutic window is larger but still "time is brain». *Functional Neurology*, 33(1), s. 5–6.