

Zachodzące podczas rozwoju zarodkowego procesy różnicowania embrionalnych komórek macierzystych (ESC) prowadzą do powstania tak różnych tkanek, jak: nabłonkowa, łączna, nerwowa czy mięśniowa. Ponieważ prawidłowy proces różnicowania gwarantuje powstanie nie tylko prawidłowych komórek, ale także funkcjonalnych tkanek, które tworzą narządy, poznanie mechanizmów regulujących ten proces jest istotne zarówno dla zrozumienia prawidłowego rozwoju, jak i patologii, które mogą mu towarzyszyć.

Uzyskanie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSCs), które posiadają morfologię embrionalnych komórek macierzystych (ESC), i które można uzyskać poprzez przeprogramowanie komórek somatycznych, otworzyło nowy rozdział w badaniach mających na celu zrozumienie mechanizmów odzyskiwania pluripotencji i dodatkowo otwiera możliwość generowania specyficznych dla pacjenta pluripotencjalnych komórek macierzystych. Ponieważ komórki iPS można modyfikować genetycznie, w przyszłości mogą stać się dostępną terapią prowadzącą do wymiany zmutowanego genu na gen funkcjonujący prawidłowo.

Zanim jednak powstaną pierwsze terapie oparte na tej metodzie, należy przezwyciężyć trudności związane ze sposobem otrzymywania tych komórek. IPSy powstają na drodze przeprogramowania komórek somatycznych poprzez wprowadzenie czynników odpowiedzialnych za stan pluripotencji tj.: Oct3/4, Sox2, Lin28A i NANOG (OSLN). Dzieje się to poprzez wprowadzenie do komórek gospodarza za pomocą wirusa Sendai, nośnika genetycznego w postaci cDNA kodującego niezbędne czynniki do przeprogramowania. Zaletą tego wirusa jest to, że w przeciwieństwie do retrovirusów, nie wbudowuje się do genomu gospodarza i pozostaje w cytoplazmie, nie zmieniając informacji genetycznej komórek gospodarza. Wykorzystanie adenowirusów, czy wirusów związanych z adenowirusami, wzbudza również wiele wątpliwości. Pomimo, iż nie wymagają one integracji z genomem gospodarza i są bardzo skuteczne w dostarczaniu genów do komórek, w pewnych przypadkach, ich materiał genetyczny może być wbudowany przez komórkę. Dodatkowo, ze względu na obecność licznych genów wirusowych nadal są silnie immunogenne. To sprawia, że istnieje potrzeba opracowania nowej, bezpiecznej metody, która pozwoliłaby na przeprogramowanie komórek bez użycia wirusów.

W niniejszym projekcie proponujemy wykorzystanie potencjału polimerów gwieździstych, jako nośników w dostarczaniu białek do komórek, w celu ich przeprogramowania do komórek iPS. Do tej pory brak jest jakichkolwiek badań dotyczących przeprogramowania fibroblastów do komórek iPS, poprzez bezpośrednie wprowadzenie czynników pluripotencji: Oct3/4, Sox2, Lin28A and NANOG (OSLN) do komórek w postaci białek. Wdrożenie tej nowatorskiej metody pozwoliłoby na zwiększenie efektywności procesu przeprogramowania, a co najważniejsze na całkowite wykluczenie obecności wirusa w tym procesie. Wydajne i efektywne wprowadzenie tych białek do komórki, możliwe będzie dzięki zastosowaniu nietoksycznych dla komórek, nie wirusowych nośników, takich jak kationowe polimery gwieździste. Nośniki takie nie są ani immunogenne ani rakotwórcze. Dodatkowo pokonują zarówno bariery biologiczne jak i fizykochemiczne podczas transportu do cytoplazmy i dalej do jądra komórkowego.

Jednym z zastosowań indukowanych komórek pluripotencjalnych może być leczenie defektów genetycznych. Komórki somatyczne uzyskiwane są od osób chorych, a następnie poddane przeprogramowaniu. Tak uzyskane komórki iPS poddawane są modyfikacji genetycznej, w celu wprowadzenia prawidłowej wersji genu. Wyselekcjonowane komórki z prawidłową wersją genu są później różnicowane w komórki docelowe, co umożliwi ich wszczepienie do organizmu pacjenta bez ryzyka odrzucenia. Po przeszczepieniu komórki zaczynają produkować właściwy produkt genu i przyczyniają się do zmniejszenia objawów chorobowych.

Aby potwierdzić możliwość wykorzystania naszych komórek iPS, do modyfikacji genetycznych, w celu naprawy niefunkcjonującego genu, wykorzystamy komórki somatyczne od pacjentów cierpiących na wrodzoną łamliwość kości (*Osteogenesis imperfecta*; OI). Jest to schorzenie, którego przyczyną jest zaburzenie w budowie kolagenu, przez co kości mają większe predyspozycje do kruchości i łamliwości. Choroba ta jest zaburzeniem monogenowym, powstającym na skutek uszkodzenia jednego genu. W 95% procentach przypadków *Osteogenesis imperfecta* spowodowana jest mutacjami genów *COL1A1* lub *COL1A2*, które kodują łańcuchy alfa1 i alfa2 kolagenu typu I.

Naszym celem będzie naprawa mutacji wykrytej w DNA przeprogramowanych komórek, a następnie stransfekowanie ich polipleksami prawidłowego DNA z polimerem gwieździstym, jako nośnikiem materiału genetycznego. Zastosowanie takiego polimeru uchroni DNA przed jego degradacją nukleazami komórkowymi, co stanowi duży problem podczas transfekcji komórek eukariotycznych innymi wektorami. Klony z naprawioną mutacją zostaną poddane różnicowaniu do prekursorów osteoblastów i fibroblastów skóry, czyli komórek produkujących duże ilości prokolagenu typu I, w celu potwierdzenia skuteczności metody naprawy mutacji.

Powodzenie tego projektu stanowić będzie znaczący wkład w wykorzystanie zmodyfikowanych genetycznie komórek iPS, co uczyni tę metodę skuteczniejszą i w pełni bezpieczną dla pacjentów.