

Kształtując przyszłość: Wpływ zmian morfologicznych na delaminację i determinację losu trzustkowych progenitorów endokrynnych

Trzustka jest narządem składającym się z przedziału zewnątrzwydzielniczego i hormonalnego. Podczas gdy część zewnątrzwydzielnicza wydziela enzymy wspomagające trawienie, komórki endokryne wspólnie regulują homeostazę glukozy we krwi. Komórki β (beta) są szczególnie ważne, ponieważ wytwarzają insulinę w odpowiedzi na zmieniający się poziom glukozy we krwi, aby utrzymać ją na zdrowym poziomie. W cukrzycy komórki β są albo tracone, albo nieprawidłowo działają, co prowadzi do poważnych problemów zdrowotnych. Ukierunkowane różnicowanie IPKM (ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych) stanowi atrakcyjną platformę dla medycyny regeneracyjnej do badania mechanizmów i terapii dla cukrzycy. Umożliwia badanie mechanizmów rozwojowych w kontekście ludzkim, które są utrudnione przez niedobór i niejednoznaczność etyczną ludzkich tkanek płodowych dostępnych do badań. Dekada opracowywania i udoskonalania protokołów różnicowania ludzkich PKM w kierunku trzustki zaowocowała nie tylko wydajnym i niezawodnym generowaniem różnych typów komórek progenitorowych trzustki z PKM, ale także opracowaniem protokołów różnicowania 3D umożliwiających badanie zdarzeń morfologicznych. Ostatecznie komórki β pochodzące z ludzkich PKM mogą pewnego dnia posłużyć jako terapia komórkowa dla pacjentów z cukrzycą. Jednak pomimo ogromnego postępu, zastosowanie w medycynie praktycznej i szeroko zakrojonych badaniach jest utrudnione przez niepełne zrozumienie sygnałów kontrolujących wytwarzanie komórek β . W tym celu kluczowe jest zrozumienie procesów rozwojowych trzustki, które można przełożyć na wytwarzanie ludzkich komórek β *in vitro*.

Celem niniejszego projektu jest odkrycie nowych sygnałów regulujących proces delaminacji i określania losu komórek progenitorów endokrynnych (PE) trzustki, które są niezbędnym etapem podczas powstawania komórek endokrynnych. **Proponujemy tutaj, że procesy te są ze sobą powiązane, a mianowicie zmiany morfologiczne i sygnały mechanistyczne podczas delaminacji PE wpływają na specyfikację losu komórek.** Skupiamy się na genie AMOTL2 (Angiomotin-Like 2), który, jak stwierdziliśmy, jest podwyższony w nowo zidentyfikowanej subpopulacji delaminujących PE u myszy, specyficznie w e16.5 (embryonic day, dniu embrionalnym 16.5), ale nie w e14.5 (dniu embrionalnym 14.5). Wykazano, że PE z e16.5 są bardziej podatne do tworzenia komórek β , najbardziej poszukiwanego typu komórek w terapii cukrzycy. **Następnie stawiamy hipotezę, że AMOTL2 jest istotnym regulatorem ścieżki sygnałowej Hippo i jej efektora, białka YAP, o których wiadomo, że biorą udział zarówno w delaminacji PE, jak i deklaracji do komórek endokrynnych w trzustce. Sugerujemy również, że AMOTL2 reguluje wielkość i kształt komórek w ludzkich PKM, również w sposób zależny od YAP.**

Wygenerowaliśmy nokaut genu AMOTL2 w ludzkich PKM i zauważyliśmy zmienioną morfologię komórek i kolonii, oraz nadmierną konfluencję, która jak sugerujemy, wynika ze zwiększonego rozmiaru komórek. Wykorzystamy trójwymiarowe (3D) różnicowanie ludzkich PKM, aby uzyskać wgląd w zmiany morfologiczne komórek z brakiem AMOTL2 oraz ich znaczenie dla rozwoju trzustki u człowieka. Hipotezę przetestujemy w następujących zadaniach:

- 1) **Zmiennokształtne: rola AMOTL2 w morfologii komórek i kolonii w ludzkich PKM i na wczesnych etapach różnicowania w kierunku trzustki**, gdzie potwierdzimy przyczynę nadmiernej konfluencji – czy jest to zwiększenie podziałów komórkowych, śmierci komórek, czy rozmiaru komórek. Ocenimy również, czy wielkość i kształt komórek zależą od ich gęstości w hodowli. Ponadto zbadamy mechanizm leżący u podstaw tych zmian. Naszym głównym kandydatem jest ścieżka sygnałowa Hippo, ale sprawdzimy również zaangażowanie innych ścieżek sygnałowych.
- 2) **Kształtując przyszłość: Jak morfologia komórek wpływa na procesy różnicowania trzustki i określania losu komórek**, w których skupimy się na PE, komórkach, bez których nie ma komórek β . Sprawdzimy ile PE powstaje i czy powstają w odpowiednim czasie. Ponownie sprawdzimy podziały i śmiertelność, oraz wielkość komórek, ponieważ mogą się one różnić w zależności od rodzaju komórek. Następnie skoncentrujemy się na procesie delaminacji i poszukamy związanego z nim mechanizmu. Następnie sprawdzimy, czy PE z nokautem AMOTL2 mogą generować komórki β i czy komórki te są zdolne do wydzielania insuliny w odpowiedzi na zmieniający się poziom glukozy, co jest charakterystyczne dla normalnych komórek β . Zbadamy to najpierw metodami *in vitro*, w hodowli komórkowej, a następnie *in vivo*, przeszczepiając nasze wyhodowane komórki β myszom z cukrzycą, aby sprawdzić, czy są one w stanie przywrócić kontrolę nad poziomem glukozy we krwi.