

## Sposób otrzymywania upigmentowanych komórek *in vitro* poprzez różnicowanie ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych

Wynalazek dotyczy sposobu różnicowania ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (ang. induced Pluripotent Stem cells – iPS) do komórek upigmentowanych. Uzyskiwane za pomocą tego protokołu komórki produkują czarny pigment – melaninę.

Melanina jest to naturalny barwnik skóry, którego dotychczasowe źródła są bardzo ograniczone. Melaninę izoluje się z biopsji skórnych lub włosów, jednak w bardzo małej ilości w i stanie mocno zdegradowanym. Dotychczasowe metody uzyskiwania komórek upigmentowanych *in vitro* są niezwykle mało wydajne.

Celem wynalazku jest dostarczenie wydajnego sposobu otrzymywania bogatych w melaninę komórek ludzkich.

Nieoczekiwanie określony powyżej cel został osiągnięty w niniejszym wynalazku.

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania upigmentowanych komórek *in vitro* poprzez różnicowanie ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych charakteryzujący się tym, że obejmuje następujące etapy:

- a) zawieszinę konfluentnych komórek iPS wysiewa się, korzystnie na szalkę uniemożliwiającą adhezję komórek, w medium do komórek iPS bez bFGF z inhibitorem Y27632, korzystnie w gęstości  $2-2,5 \times 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup>, a następnie hoduje się, korzystnie przez 4 dni, do wytworzenia ciałek embrioidalnych EB,
- b) uzyskane w etapie a) ciała embrioidalne EB zbiera się oraz wysiewa się, korzystnie na szalkę adherentną, i prowadzi hodowlę w medium do komórek iMEF, korzystnie przez 18 godzin,
- c) prowadzi się selekcję progenitorów w medium N1 zawierającym: suplement N2, korzystnie w jednokrotnym rozcieńczeniu, fibronektynę, korzystnie w stężeniu 250 ng/ml, roztwór antybiotyków zawierający penicylinę i streptomycynę P/S, korzystnie w stężeniu 100 U/ml / 100 µg/ml, rozpuszczone w pożywce DMEM/F12, korzystnie przez 10 dni, usuwając okresowo martwe komórki oraz uzupełniając składniki pożywki,
- d) uzyskane komórki progenitorów rozdysocjowuje się, wysiewa się, korzystnie w gęstości  $0,5 - 2 \times 10^5$ /cm<sup>2</sup>, na szalki pokryte lamininą i poli-ornityną oraz prowadzi się ich ekspansję, korzystnie przez 7 dni, w medium N2 zawierającym: suplement N2,

korzystnie w jednokrotnym rozcieńczeniu, lamininę, korzystnie w stężeniu 1 mg/ml, bFGF, korzystnie w stężeniu 20 µg/ml, FGF8, korzystnie w stężeniu 100 ng/ml, P/S, korzystnie w stężeniu 100 U/ml / 100 µg/ml, rozpuszczone w pożywce DMEM/F12, a uzyskane komórki przed ich wykorzystaniem w kolejnym etapie ewentualnie przechowuje się zamrożone w medium N2 z 10% DMSO w gęstości 2 miliony komórek/ml,

e) prowadzi się, korzystnie przez 7-16 dni, ostateczne różnicowanie komórek poprzez ich hodowlę w medium N3 zawierającym: suplement N2, korzystnie w jednokrotnym rozcieńczeniu, lamininę, korzystnie w stężeniu 1 mg/ml, dibutyrylo-cAMP, korzystnie w stężeniu 0,5 mM, kwas askorbinowy, korzystnie w stężeniu 200 µM, P/S, korzystnie w stężeniu 100 U/ml / 100 µg/ml, rozpuszczone w pożywce DMEM/F12, uzyskując ludzkie komórki upigmentowane melaniną.

Korzystnie, pożywki N1, N2 i N3 składają się wyłącznie ze wskazanych składników. Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie komórek uzyskiwanych w sposobie według wynalazku określonym powyżej do otrzymywania melaniny.

Prowadzona zgodnie z wynalazkiem hodowla komórkowa *in vitro* jest dogodnym, i jednocześnie nieograniczonym źródłem melaniny, dostępnej w formie niezdegradowanej. Znane sposoby uzyskiwania melaniny *in vitro* nie posiadają zbliżonej wydajności do uzyskiwanej zgodnie z wynalazkiem. Za pomocą wynalazku można uzyskać znaczące ilości pigmentu gotowego do badań biofizycznych w krótkim czasie i relatywnie niskim kosztem. Wyizolowana melanina może znaleźć wiele zastosowań przemysłowych, w tym jako substrat do opracowania nowej generacji naturalnych kremów chroniących przed promieniowaniem UV. Uzyskane komórki mogą także zostać wykorzystane do leczenia chorych na bielactwo jako naturalny substytut melanocytów. Protokół uzyskiwania komórek upigmentowanych zamieszczono poniżej.

Przykład 1. Sposób uzyskiwania wysoce upigmentowanych melaniną komórek ludzkich z ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych.

Wykorzystywano konfluentne komórki piPS (protein-iPS) zakupione od firmy System Bioscience (cat no.SC801A-1, SC802A-1) (Kim et al. 2009) lub linie wyprowadzone w Zakładzie Transplantologii CMUJ poprzez reprogramowanie komórek somatycznych dawców.

W pierwszym etapie konfluentne komórki iPS (Fig. 1A.) hodowane na warstwie odżywczej z komórek iMEF zbierano akutazą oraz wysiewano w postaci zawiesiny pojedynczych komórek na szalkę uniemożliwiającą adhezję komórek, w medium do komórek iPS bez bFGF z inhibitorem Y27632, w gęstości  $2-2,5 \times 10^4/\text{cm}^2$ . Następnie komórki iPS hodowano w zawieszynie przez 4 dni, aż do wytworzenia ciałek embrioidalnych EB (Fig. 1B.).

Skład medium do komórek iPS:

| <b>Składnik</b>   | <b>Stężenie</b>                 |
|---|---------------------------------|
| <b>KSR</b><br>(ThermoFisher Scientific)                                 | 20%                             |
| <b><math>\beta</math>-Mercaptoetanol</b><br>(Sigma-Aldrich)             | 0,1mM                           |
| <b>Non-essential Amino Acids</b><br>(ThermoFisher Scientific)           | 1X                              |
| <b>Penicylina/<br/>Streptomycyna (P/S)</b><br>(ThermoFisher Scientific) | 100 U/ml / 100 $\mu\text{g/ml}$ |
| <b>bFGF</b><br>(ThermoFisher Scientific)                                | 10 ng/ml                        |
| <b>DMEM/F12</b><br>(ThermoFisher Scientific)                            |                                 |

W kolejnym kroku ciała embrioidalne zebrano, zwirowano (300 rpm, 5 minut) oraz wysiano na szalkę adherentną o takiej samej powierzchni jak użyta szalka nieadherentna w medium do komórek iMEF.

Skład medium do komórek iMEF:

| Składnik                                 | Stężenie             |
|--|----------------------|
| Fetal Bovine Serum (EurX)                | 10%                  |
| L-glutamina<br>(ThermoFisher Scientific) | 2mM                  |
| P/S                                      | 100 U/ml / 100 µg/ml |
| DMEM 4,5g/l (Lonza)                      |                      |

Po ok. 18 godzinach rozpoczęto selekcję progenitorów (Fig. 1C.) zmieniając medium na **medium N1** o składzie:

| Składnik                                  | Stężenie             |
|---|----------------------|
| Suplement N2<br>(ThermoFisher Scientific) | 1x                   |
| Fibronektyna<br>(ThermoFisher Scientific) | 250 ng/ml            |
| P/S                                       | 100 U/ml / 100 µg/ml |
| DMEM/F12<br>(ThermoFisher Scientific)     |                      |

Selekcję w bezsurowiczym medium N1 prowadzono przez 10 dni co drugi dzień usuwając martwe komórki oraz podając świeże medium N1. Wykorzystano Suplement N2 oferowany przez firmę Life Technologies zawierający ludzkie: insulinę (0,1 mg/ml), holotransferynę (5 µg/ml), progesteron (20 µM), putrescynę (0,1 mM), selenian sodu (30nM) (stężenia końcowe, po rozcieńczeniu w medium).

W kolejnym kroku prowadzono ekspansję wyselekcjonowanych progenitorów (Fig. 1D.). Komórki rozdysocjowano trypsyną na pojedyncze komórki oraz wysiano w gęstości  $0,5 - 2 \times 10^5/cm^2$  na szalki pokryte lamininą i poli-ornityną.

Ekspansję komórek prowadzono przez 7 dni w **medium N2** o składzie:

| Składnik                                     | Stężenie             |
|--|----------------------|
| <b>Suplement N2</b>                          | 1x                   |
| <b>Laminina</b><br>(ThermoFisher Scientific) | 1 mg/ml              |
| <b>bFGF</b>                                  | 20 µg/ml             |
| <b>FGF8</b><br>(ThermoFisher Scientific)     | 100 ng/ml            |
| <b>P/S</b>                                   | 100 U/ml / 100 µg/ml |
| <b>DMEM/F12</b>                              |                      |

Progenitory mrożono w medium N2 z 10% DMSO w gęstości  $2 \times 10^6$  komórek/ml. Po zakończonej ekspansji przez 7-16 dni prowadzono terminalne różnicowanie komórek zmieniając medium z N2 na medium N3. Skład **medium N3** prezentuje poniższa tabela:

| Składnik                                   | Stężenie             |
|--|----------------------|
| <b>Suplement N2</b>                        | 1x                   |
| <b>Laminina</b>                            | 1 mg/ml              |
| <b>Dibutyrylo-cAMP</b><br>(Sigma-Aldrich)  | 0,5 mM               |
| <b>Kwas askorbinowy</b><br>(Sigma-Aldrich) | 200 µM               |
| <b>P/S</b>                                 | 100 U/ml / 100 µg/ml |
| <b>DMEM/F12</b>                            |                      |

W wyniku opisanej metody różnicowania w sposób bardzo powtarzalny rutynowo otrzymywano wysoce upigmentowane komórki (Fig. 1E-I.). Wydajność procesu różnicowania była zawsze podobna i pozwalała na uzyskanie znacznej liczby ( $>3 \times 10^6$ ) silnie upigmentowanych komórek.

Na fig. 1 zaprezentowano wyniki kolejnych etapów różnicowania komórek iPS do komórek upigmentowanych. A - Komórki piPS rosnące na warstwie odżywczej. B -

wielokomórkowe ciała embrioidalne EB w zawieszynie. C - wyselekcjonowane komórki NPC zostały poddane ekspansji (D). W ostatecznym etapie różnicowania komórki przyjmowały czarne zabarwienie (E-I)

Przykład 2. Charakterystyka uzyskanych komórek oraz izolowanego z nich pigmentu.

Uzyskiwany pigment został jednoznacznie zidentyfikowany jako melanina za pomocą elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) (Fig. 2A.) oraz barwienia Fontany-Masson'a (Fig. 2B.).

Uzyskane upigmentowane komórki zostały scharakteryzowane pod kątem analizy ekspresji genów za pomocą reakcji RT-PCR (Fig. 3.) oraz za pomocą barwienia immunocytochemicznego (ICC) (Fig. 4.).

Na fig. 3 została zaprezentowana ekspresja markerów na poziomie RNA. A- Upigmentowane komórki, w przeciwieństwie do komórek iPS, posiadają ekspresję markerów melanocytów (MITF-M, TRP1, TYR) B - W kolejnych etapach różnicowania komórek (A-F) spada ekspresja markerów embrionalnych (OCT-4, NANOG, TERT), a rośnie ekspresja markerów neuroektodermalnych (NURR1, TUJ-1, TH). *TERT* - telomeraza, *TUJ-1*- tubulina  $\beta$  III, *TH* - hydroksylaza tyrozyny *NURR1* - białko związane z receptorem jądrowym, Gen konstytutywny *GAPDH* posłużył jako kontrola pozytywna reakcji PCR.

Na fig. 4 została zaprezentowana ekspresja markerów na poziomie białka. Uzyskane komórki posiadają ekspresję markerów melanocytów – TRP1 oraz MITF (A i B). W otrzymanej heterogennej populacji komórek obecne są również neurony dopaminergiczne posiadające ekspresję TUJ-1 oraz TH (C i D).

Subkomórkowa lokalizacja melaniny została określona za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) (Fig. 5.)

Na fig. 5 została zaprezentowana subkomórkowa lokalizacja melaniny w uzyskanych komórkach. Melanina uorganizowana jest w organellach przypominających kolejne stadia rozwoju melanosomów ( I-IV w A). Organella te otoczone są podwójną błoną komórkową (B).

Uzyskane wyniki pozwalają jednoznacznie stwierdzić, że uzyskany pigment to melanina. Różnicowane upigmentowane komórki pod wieloma względami przypominają melanocyty (ekspresja markerów, profil ekspresji genów, obecność

błoniastych, wewnątrzkomórkowych organelli wypełnionych pigmentem). Jednak ilość upigmentowanych komórek oraz stopień upigmentowania uzyskanych komórek są nieoczekiwanie wysokie w porównaniu ze znanymi ze stanu techniki. Opisany sposób dostarcza bardzo dużych ilości niezwykle silnie upigmentowanych komórek, które mogą posłużyć do izolacji czystej, niezdegradowanej melaniny w dużych ilościach i relatywnie niskim kosztem.