

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było opracowanie wydajnego protokołu otrzymywania komórek o cechach charakterystycznych dla chondrocytów w procesie różnicowania ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (ang. *human induced pluripotent stem cells*, hiPSCs) *in vitro*. Komórki te w przyszłości będą mogły stanowić źródło autologicznych komórek wykorzystywanych w leczeniu takich schorzeń jak osteoartroza. Pierwszym krokiem było reprogramowanie komórek somatycznych do linii hiPSCs, która wykazuje cechy charakterystyczne dla pluripotencjalnych komórek macierzystych (ang. *stem cells*, SCs), jak zdolność do różnicowania w pochodne trzech listków zarodkowych, w tym do mezodermy.

Opracowany protokół jest nowatorski, ponieważ eliminuje konieczność przeprowadzania etapów pośrednich, takich jak tworzenie kul zarodkowych, oraz umożliwia otrzymanie progenitorów chondrocytów w 21 dni przy zastosowaniu zaledwie pięciu egzogennych czynników wzrostowych. Uzyskane progenitory chondrocytów wykazują obecność markerów charakterystycznych dla funkcjonalnych chondrocytów, takich jak: kolagen typu II, agrekan, CD44 oraz CD151. Ponadto otrzymane komórki wykazują silnie obniżony poziom markerów odpowiedzialnych za podtrzymanie stanu pluripotencji.

Analiza danych uzyskanych metodą mikromacierzy RNA potwierdziła, że uzyskano komórki, które utraciły cechy charakterystyczne dla pluripotencjalnych SCs. Komórki ulegające chondrogeniezie *in vitro* aktywują ścieżki sygnałowe odgrywające kluczową rolę w tworzeniu i formowaniu kończyn oraz we wczesnej szkieletogenezie, co wskazuje na otrzymanie wczesnych chondrocytów. Jest wysoce prawdopodobne, że progenitory chondrocytów po podaniu do stawu kolagenowego będą mogły ulegać terminalnemu różnicowaniu *in vivo* w sprzyjającym mikrośrodowisku.

Ponadto dane uzyskane za pomocą metody mikromacierzy RNA wskazują na uruchamianie ścieżek sygnałowych związanych z powstałymi uszkodzeniami DNA (ang. *DNA damage response*, DDR), a w konsekwencji na aktywację ścieżki p53. Stanowi to dowód na to, że proces różnicowania *in vitro* indukuje stres w komórkach. Może to w istotny sposób wpływać na bezpieczeństwo stosowania zróżnicowanych komórek w praktyce klinicznej.

Uzyskane wyniki w znaczący sposób przyczyniają się do opracowania wydajnego protokołu stanowiącego źródło autologicznych progenitorów chondrocytów. Co więcej, dzięki analizom danych za pomocą metody mikromacierzy RNA, uzyskano nową wiedzę na temat biologii hiPSCs podlegających różnicowaniu *in vitro*, co ma istotny wpływ na rozwój medycyny regeneracyjnej.

Abstract

The aim of the study was to establish an efficient protocol of obtaining chondrocyte-like cells derived from human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) during differentiation *in vitro*. These differentiated cells will constitute an attractive source of autologous cells used in treatment of many currently unresponsive diseases such as osteoarthritis. The first step involved the generation of hiPSCs from somatic cells in reprogramming process. The obtained hiPSCs demonstrated features characteristic of pluripotent stem cells, among others the capacity to differentiate into derivatives of three primary germ layers including mesoderm.

The established protocol involves a novel approach because it eliminates the need for performing additional steps such as formation of embryoid bodies and allows for obtaining chondrogenic progenitors within 21 days in the presence of only five growth factors. The generating chondrocyte-like cells reveal characteristics of functional chondrocytes such as: type II collagen, aggrecan, CD44 and CD151. Moreover, the received hiPSC-derived cells demonstrate significantly decreased level of markers responsible for maintenance of pluripotency state.

Microarray expression studies confirm that cells generated during chondrogenesis *in vitro* are deprived of hiPSC-specific markers. The cells undergoing differentiation process *in vitro* activate pathways engaged in formation of limbs and embryonic skeletogenesis, what suggests obtaining chondrocytes from early stages of chondrogenesis. It is highly likely that chondrogenic progenitors after implementation into knee joint involving advantageous microenvironment will terminally differentiated *in vivo* to the mature chondrocytes.

Furthermore, data derived from microarray study indicate the activation of signaling pathways induced in response to DNA damage (DNA damage response, DDR), and consequently p53 signaling pathway. Conceivably, the differentiation process *in vitro* constitutes a strong stress for cells. It may have a great impact on the safety level of application of these cells in clinical practice.

These results significantly contribute to the establishment of efficient protocol that constitutes a promising source of autologous chondrogenic progenitors. Additionally, the microarray expression studies provided a new knowledge concerning fate of hiPSCs undergoing differentiation *in vitro*, what has a great influence on development of regenerative medicine.