Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk

mgr Marta Budzińska

Autologiczne komórki pochodzenia miogennego od pacjentów dystroficznych poddane modyfikacji genetycznej jako nowa strategia poprawy struktury i funkcji mięśni szkieletowych w chorobie Duchenne'a

ROZPRAWA DOKTORSKA

Akceptuję

.....

(Data i podpis Kierownika pracy)

Poznań 2024

Słowa kluczowe: Dystrofia mięśniowa Duchenne'a, komórki macierzyste, inżynieria genetyczna Praca doktorska wykonana w Zakładzie Biologii Rozrodu i Komórek Macierzystych Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk

oraz

w ramach Międzynarodowych Studiów Doktoranckich

Kierownik i opiekun pracy: prof. dr hab. n. med. Maciej Kurpisz

Finansowanie badań zawartych w pracy doktorskiej: OPUS 2017/25/B/NZ5/01131 Narodowe Centrum Nauki Autologiczne komórki pochodzenia miogennego od pacjentów dystroficznych poddane korekcie genetycznej i zasocjowane z biodegradowalnymi nanokapsułami jako nowa formuła terapii choroby Duchenne'a.

Niniejszą pracę dedykuję mojemu dziadkowi, Bernardowi Glapiakowi

- dziękuję za pasję i miłość do wiedzy, którą we mnie zaszczepiłeś.

Załącznik nr 1.

OŚWIADCZENIE AUTORA/AUTORÓW PRACY

Oświadczam, że moja praca pt.:

Autologiczne komórki pochodzenia miogennego od pacjentów dystroficznych poddane modyfikacji genetycznej jako nowa strategia poprawy struktury i funkcji mięśni szkieletowych w chorobie Duchenne'a

a. została przygotowana przeze mnie samodzielnie,*

b. nie narusza praw autorskich w rozumieniu ustawy z dnia 4 lutego 1994 roku o prawie autorskim i prawach pokrewnych (Dz. U. Nr 24, poz. 83 z późn. zm.) oraz dóbr osobistych chronionych prawem,

c. nie zawiera danych i informacji, które uzyskałem w sposób niedozwolony,

d. nie była podstawą nadania dyplomu uczelni wyższej lub tytułu zawodowego ani mnie ani innej osobie.

Ponadto oświadczam, że treść pracy przedstawionej przeze mnie do obrony, zawarta na przekazywanym nośniku elektronicznym, jest identyczna z jej wersją drukowaną.

....., dnia.....

.....

podpis studenta

* Uwzględniając merytoryczny wkład promotora (w ramach prowadzonego seminarium dyplomowego).

| Spis rycin i tabel | iii |
|--|-------|
| Wykaz stosowanych skrótów | vi |
| Wykaz stosowanych symboliBłąd! Nie zdefiniowano zakła | adki. |
| I WSTĘP | 1 |
| 1.1. Wprowadzenie | 1 |
| 1.2. Podłoże molekularne DMD | 2 |
| 1.3. Budowa mięśni szkieletowych | 4 |
| 1.4. Prawidłowy skurcz mięśni szkieletowych | 6 |
| 1.5. Skurcz mięśni w przebiegu DMD | 6 |
| 1.6. Przewlekły stan zapalny w mięśniach u chorych na DMD | 6 |
| 1.7. Środowisko redox w mięśniach chorych na DMD | 7 |
| 1.8. Rola ścieżki sygnałowej STARS oraz SRF w mięśniach u chorych na DMD. | 9 |
| 1.9. Konsekwencje braku dystrofiny w skurczu mięśni w przebiegu DMD | 10 |
| 1.10. Obecny schemat oraz perspektywy leczenia DMD | 11 |
| II ZAŁOŻENIA I CEL PRACY | 14 |
| III MATERIAŁY I METODY | 15 |
| 3.1. Materiał | 15 |
| 3.1.1.a Charakterystyka grup badanych | 15 |
| 3.1.1.b Model mysi <i>mdx</i> | 16 |
| 3.1.2. Odczynniki | 16 |
| 3.1.3. Sprzęt i aparatura badawcza | 17 |
| 3.2. Metody | 19 |
| 3.2.1. Charakterystyka komórek iPSc | 20 |
| 3.2.2. Przeprowadzenie różnicowania z komórek iPSc do HIDEMs | 20 |
| 3.2.3. Charakterystyka komórek HIDEMs | 20 |
| 3.2.4. Izolacja DNA/RNA/białko | 21 |
| 3.2.5. Barwienie immunofluorescencyjne | 21 |
| 3.2.6. Ocena komórek HIDEMs w cytometrze przepływowym | 23 |
| 3.2.7. Ocena ekspresji genów z użyciem techniki Real-Time PCR | 24 |
| 3.2.8. Transfekcja komórek wektorem lentiwirusowym | 26 |
| 3.2.9. Transdukcja komórek HIDEMs | 29 |
| 3.2.10. Badanie całkowitej pojemności antyoksydacyjnej w homogenizacie komórkowym z HIDEMs | 29 |

Spis treści

| 3.2.11. Badanie aktywności katalazy w homogenizacie komórkowym z HIDEMs3 |
|--|
| 3.2.12. Badanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w homogenizacie komórkowym z HIDEMs |
| 3.2.13. Testy na bieżni (myszy mdx) |
| 3.2.14. Podanie komórek HIDEMs do mięśni myszy mdx |
| 3.2.15. Analiza statystyczna wyników |
| IV WYNIKI |
| 4.1. Charakterystyka komórek IPSc |
| 4.2. Różnicowanie komórek IPSc do komórek HIDEMS |
| 4.3. Charakterystyka komórek HIDEMs |
| 4.4. Transdukcja komórek HIDEMs za pomocą konstrukcji lentiwirusowej4 |
| 4.5. Ocena aktywności enzym ów antyoksydacyjnych oraz całkowitej pojemności antyoksydacyjnej w homogenizatach komórek HIDEMs40 |
| 4.6. Ocena poziomu ekspresji genów wchodzących w skład ścieżki sygnałowej STARS4 |
| 4.7. Podanie komórek HIDEMs do mięśni myszy mdx4 |
| 4.7. Analiza wyników myszy mdx na bieżni4 |
| V DYSKUSJA |
| VI WNIOSKI |
| VII PIŚMIENNICTWO |
| STRESZCZENIE |
| ABSTRACT |

Spis rycin i tabel

Ryc. 6 Potwierdzenie wystąpienia mutacji punktowych u myszy mdx w genie *Dmd* w sekwencjonowaniu Sangera. W rekcji 1) wykryto mutację C > T. Podobnie w reakcji 2) zaobserwowano mutację punktową T > A. Protokół genotypowania przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta

[https://www.jax.org/Protocol?stockNumber=018018&protocolID=21940; https://www.jax.org/Protocol?stockNumber=018018&protocolID=19801]......16

| Ryc. 7 Schemat budowy plazmidu PAX niezbęzdnego do stworzenia funkcjonalnej konstrukcji lentiwirusowej |
|--|
| Ryc. 8 Budowa plazmidu MD2G niezbęzdnego do stworzenia funkcjonalnej konstrukcji lentiwirusowej |
| Ryc. 9 Schemat budowy plazmidu zawierającego sekwencję μDYS, pLV[Exp]EF1A > {uDys}:T2A:EGFP(ns):Puro. Plazmid zawiera sekwencję reporterową EGFP(ns) 28 |
| Ryc. 10 Plazmid reporterowy pEGFP-C1 wykorzystywany w procesie komórek HIDEMs, umożliwiający wzbudzenie nadeskpresji białka zielonej fluorescencji (ang. Green fluorescent protein, GFP) w komórkach eukariotycznych, dla określenia wydajności procesu transfekcji |
| Ryc. 11 Ekspresja czynników (genów) pluripotencji (<i>C-MYC</i> , <i>NANOG</i> , <i>OCT4</i> , <i>SOX2</i>) w warunkach <i>in vitro</i> w reakcji qPCR dla podstawowych badanych populacji indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych. Względna ekspresja genów została znormalizowana wobec genów referencyjnych: (<i>GAPDH</i> , <i>ACTB</i>). Gwiazdki oznaczają poziomy istotności statystycznej: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***). Numery arabskie oznaczają kodowane próbki komórek od poszczególnych pacjentów (Materiały i Metody) |
| Ryc. 12 Barwienie immunofluorescencyjne komórek iPSc. Komórki zostały sprawdzone pod względem obecności białek OCT4, SOX2, SSEA, Tra, C-MYC oraz NANOG. Komórki badano na etapie 10-tego pasażu. Obrazy uzyskano dzięki mikroskopii za pomocą Leica DMi 8 microscope (Leica Microsystems, Germany), w 40x powiększeniu. A: barwienie DAPI (niebieski) + OCT4 (czerwony), Merge – obraz połączony. B: barwienie DAPI (niebieski) + SOX2 (czerwony) + SSEA (zielony), Merge – obraz połączony. C: barwienie DAPI (niebieski) + C-MYC (czerwony) + Tra (zielony), Merge – obraz połączony. D: barwienie DAPI (niebieski) + SOX2 (czerwony) + SSEA (zielony), Merge – obraz połączony. Numery arabskie oznaczają kodowane próbki komórek od poszczególnych pacjentów (Materiały i Metody) |
| Ryc. 13 Różnice w morfologii komórek iPSc oraz HIDEMS w liniach komórkowych otrzymanych po reprogramowaniu komórek mięśniowych od pacjentów z DMD. Komórki iPSc były obserwowane na 10. pasażu <i>in vitro</i> (hodowla na płytce 6-dołkowej), a komórki HIDEMs na 2. pasażu (hodowla we flaszce 75cm2. Zdjęcia wykonano za pomocą JuLI FL analyzer (NanoEntek) w 4x powiększeniu. Numery arabskie oznaczają kodowane próbki komórek od poszczególnych pacjentów (Materiały i Metody) |
| Ryc. 14 Wyniki poziomu ekspresji markerów (genów) mezenchymalnych <i>ANPEP</i> (CD 13), <i>CD 44</i> (CD 44), <i>ITGA2</i> (CD49b), <i>MCAM</i> (CD146), <i>NT5E</i> (CD73) and <i>PTPRC</i> (CD45) w komórkach pacjentów z DMD oraz populacji od zdrowej osoby kontrolnej. Geny referencyjne: <i>ACT</i> , <i>HPRT</i> , <i>GAPDH</i> . Gwiazdki oznaczają poziomy istotności statystycznej: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***). Wyniki uzyskano wykorzystując jednostronny test ANOVA. Numery arabskie oznaczają kodowane próbki komórek od poszczególnych pacjentów (Materiały i Metody) |
| Ryc. 15 Barwienie immunofluorescencyjne markerów mezenchymalnych w komórkach kontrolnych i komórkach HIDEMs pozyskanych od pacjentów z DMD. Komórki badano w 3. pasażu hodowli komórkowej in vitro. Obrazy uzyskano przy użyciu |

badano w 3. pasażu hodowli komórkowej in vitro. Obrazy uzyskano przy użyciu mikroskopu Leica DMi 8 (Leica Microsystems, Niemcy) z 40-krotnym powiększeniem. A: barwienie DAPI (niebieski) + CD 44 (czerwony), CD 105 (zielony), Merge – obraz

połaczony. B: barwienie DAPI (niebieski) + CD 146 (czerwony) + CD 45 (zielony), Merge – obraz połączony. C: barwienie DAPI (niebieski) + CD 73 (czerwony) + CD 31 (zielony), Merge – obraz połączony. D: barwienie DAPI (niebieski) + CD 13 (czerwony), Merge – obraz połączony. Numery arabskie oznaczają kodowane próbki od poszczególnych pacjentów (Materiały i Metody)......42 Ryc. 16 Wyniki badań białkowych markerów mezenchymalnych z zastosowaniem Ryc. 17 Ekspresja µDYS przed i po transdukcji w komórkach HIDEMs. Wszystkie transdukowane badane populacje komórek wykazały zwiększenie ekspresji µDYS. Względna ekspresja genów była normalizowana względem genów referencyjnych: (GAPDH, ACTB). Gwiazdki oznaczają poziomy istotności statystycznej: p < 0.05 (*), p < 0.01 (**), p < 0.001 (***). Wyniki oceniano statystycznie wykorzystując jednostronny test ANOVA. Liczby arabskie – 194 oznacza próbki z populacji kontrolnej, zaś pozostałe próbki komórek pozyskane od poszczególnych pacientów z DMD. Numery arabskie oznaczają kodowane próbki od poszczególnych pacjentów Ryc. 18 Komórki HIDEMs po transdukcji. Komórki obserwowano 7 dnia po transdukcji (100 x 20 mm Tissue Culture Dish, Falcon). Zdjecia wykonano za pomoca mikroskopu JuLI FL analyzer (NanoEntek, Seul, Korea) w 4X powiększeniu. Widoczna fluorescencja potwierdziła wydajność transdukcji. Objaśnienia: WT – wild type, GFP – transdukcja białkiem Green fluorescent protein, µDYS – transdukcja konstrukcją z Ryc. 19 Ocena aktywności enzymów antyoksydacyjnych CAT, SOD oraz TAC w homogenizatach komórek HIDEMs. Gwiazdki oznaczają poziomy istotności statystycznej: p < 0.05 (*), p < 0.01 (**), p < 0.001 (***). Wyniki opracowano wykorzystując jednostronny test ANOVA. Numery arabskie oznaczają kodowane próbki od poszczególnych pacjentów (Materiały i Metody). 46 Ryc. 20 Porównanie poziomu ekspresji genów uczestniczących w ścieżce sygnałowej STARS w komórkach HIDEMs przed i po transdukcji lentiwirusowej. Względna ekspresja genów została znormalizowana wobec genów referencyjnych: (GAPDH, ACTB). Gwiazdki oznaczają poziomy istotności statystycznej: p < 0.05 (*), p < 0.01(**), p < 0.001 (***). Wyniki uzyskano wykorzystując jednostronny test ANOVA. Numery arabskie oznaczają kodowane próbki od poszczególnych pacjentów (Materiały Ryc. 21 Wyniki testów myszy mdx na bieżni w trakcie ośmiotygodniowej obserwacji. A) Średni dystans pokonany przez zwierzęta w trakcie eksperymentu z podziałem na analizowane grupy, z i bez interwencji. B) Średnia liczba wstrząsów elektrycznych przyjętych przez zwierzęta w trakcie eksperymentu z podziałem na analizowane grupy, Ryc. 22 A: Porównanie średniej długości przebytego dystansu z całej, 8-tygodniowej obserwacji w grupach badanych myszy. B: Porównanie średniej liczby porażeń prądem (szoków elektrycznych) w trakcie trwania biegu myszy z całej, 8-tygodniowej

| Tabela 1. Nowe strategie leczenia DMD. | 12 |
|--|---------|
| Tabela 2. Charakterystyka pacjentów uczestniczących w badaniach | 15 |
| Tabela 3. Lista przeciwciał użytych w barwieniu immunofluorescencyjnym | 22 |
| Tabela 4. Lista przeciwciał użytych w ocenie z wykorzystaniem cytometrii przepływowej | 23 |
| Tabela 5. Lista używanych starterów wyprodukowanych komercyjnie | 24 |
| Tabela 6. Lista starterów zaprojektowanych wraz z oczekiwaną wielkością produktu. | 26 |
| Tabela 7. Statystyka opisowa wyników pokonanego dystansu biegowego w trakcie badań w modelu myszy <i>mdx</i> | 48 |
| Tabela 8. Statystyka opisowa liczby porażeń prądem w trakcie badań w modelu myszy <i>mdx</i> . | y 48 |

Wykaz stosowanych skrótów

| μDYS | sekwencja mikrodystrofiny | | |
|----------------------|---|--|--|
| μDYS | mikrodystrofina | | |
| 1 HO-1 | oksygenaza hemowa (ang. heme oxygenase 1) | | |
| AAV | adenowirusy (ang. adeno-associated virus) | | |
| ACTB | gen kodujący beta-aktynę (ang. beta-actin) | | |
| ADP | adenozyno-5'-difosforan (ang. adenosine diphosphate) | | |
| ANPEP (CD 13) | gen kodujący antygen CD 13 - błonową alanylo-aminopeptydazę (ang. membrane alanyl aminopeptidase) | | |
| АР | fosfataza alkaliczna (ang. alkaline phosphatase) | | |
| АТР | adenozyno-5'-trójfosforan (ang. adenosine triphosphate) | | |
| BMD | dystrofia mięśniowa Beckera | | |
| САТ | katalaza (ang. <i>catalase</i>) | | |
| CD 13 | antygen CD 13 | | |
| CD 146 | antygen CD 146 | | |
| CD 31 | antygen CD 31 | | |
| CD 44 | antygen CD 44 | | |
| <i>CD 44</i> (CD 44) | gen kodujący antygen CD 44 (ang. CD 44 antigen) | | |
| CD 45 | antygen CD 45 | | |
| CD 73 | antygen CD 73 | | |
| CD105 | antygen CD 105 | | |
| СК | kinaza kreatynowa (ang. creatine kinase) | | |
| DAPC | kompleks białkowy związany z dystrofiną (ang. <i>dystrophin glycoprotein complex</i>) | | |
| DB | region wiążący dystroglikan (ang. dystroglycan binding) | | |
| DMD | dystrofia mięśniowa Duchenne'a (ang. Duchenne muscular dystrophy) | | |
| DMD | gen dystrofiny (ang. dystrophin gene) | | |

| DNA | kwas deoksyrybonukleinowy (ang. deoxyribonucleic acid) |
|-----------------------|--|
| ER | siateczka śródplazmatyczna (ang . endoplasmic reticulum) |
| FDA | Agencja Żywności i Leków (ang. Food and Drug Administration) |
| GAPDH | gen kodujący dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego (ang. glyceraldehy- de 3-phosphate dehydrogenase) |
| GFP | białko zielonej fluorescencji (ang. green fluorescent protein) |
| GPx | peroksydaza glutationowa (ang. glutathione peroxidase) |
| GR | reduktaza glutationowa (ang. glutathione reductase) |
| GSH | zredukowana monomeryczna forma glutationu (ang. monomeric glutathione) |
| GSSG | utleniona forma glutationu disiarczkowego (ang. glutathione disulfide) |
| HIDEMs | ludzkie komórki mesoangioblasto-podobne pochodzące z komórek iPSc (ang. human iPS cell-derived mesoangioblast-like cells) |
| HPRT 1 | gen kodujący fosforybozylotransferazę hipoksantynowoguaninową (ang. hy- poxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) |
| iPSc | indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (ang. <i>induced pluripotent stem cells</i>) |
| <i>ITGA2</i> (CD 49b) | gen kodujący antygen CD 49b (ang. integrin alpha-2) |
| LDH | dehydrogenaza mleczanowa (ang. lactate dehydrogenase) |
| LGMD | mięśniowa dystrofia obręczowo-kończynowa (ang. limb girdle muscular dys- trophy) |
| <i>MCAM</i> (CD 146) | gen kodujący antygen CD 146 (ang. <i>Melanoma Cell Adhesion Molecule</i>) – anty- gen adhezyjny komórek czerniaka |
| MD | dystrofia mięśniowa (and. muscle dystrophy) |
| MINA (C-MYC) | gen kodujący białko proto-onkogenne C-MYC (ang. Myc proto-oncogene protein) |
| MOI | stosunek liczby cząstek wirusa do liczby infekowanych komórek (ang. <i>multiplici-ty of infection</i>) |
| mPTP | przepuszczalne, przejściowe pory mitochondrialne (ang. <i>mitochondrial permeabi-</i> <i>lity transition pore</i>) |
| MRFT-A | czynnik transkrypcyjny związany z miokardyną (ang. <i>myocardin-related trans-cription factor A</i>) |
| MRFTA | gen kodujący transkrypcyjny czynnik A związany z miokardyną (ang. <i>myocardin-related transcription factor A</i>) |

| NANOG | gen kodujący białko homeodomenowe NANOG (ang. homeobox protein NA- NOG) | |
|---------------------|--|--|
| NF-κB | czynnik jądrowy wzmacniający ekspresję łańcuchów lekkich kappa aktywowa- nych komórek B (ang. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>) | |
| NF-κB | gen kodujący czynnik transkrypcyjny NF-kB (ang. nuclear factor kappa-light- chain-enhancer of activated B cells) | |
| NOS1 | neuronalna syntaza tlenku azotu (ang. nitric oxide synthase isoform 1) | |
| NOS1 | gen kodujący neuronalną syntazę tlenku azotu (ang. Nitric oxide synthase 1) | |
| <i>NT5E</i> (CD 73) | gen kodujący antygen CD 73 (ang. ecto-5'-nucleotidase) (ekto 5' nukleotydazę) | |
| POU5F1 (OCT4) | gen kodujący czynnik transkrypcyjny 4 wiążący oktamer (ang. octamer-binding transcription factor 4) | |
| PTPRC (CD 45) | gen kodujący receptor typu C białka fosfatazy tyrozynowej (antygen CD 45) (ang. <i>protein tyrosine phosphatase, receptor type C</i>) | |
| RhoA | białko A homolog rodziny genu Ras (ang. the Ras homolog gene family member A protein) | |
| RhoA | gen kodujący białko A homolog rodziny genu Ras (ang. the Ras homolog gene family member A protein) | |
| RNA | kwas rybonukleinowy (ang. ribonucleic acid) | |
| ROD | domena centralna (ang. rod domain) | |
| ROS | reaktywne formy tlenu (ang. reactive oxygen species) | |
| SDB | region wiążący syntropinę i dystrobrewinę (ang. synthropin and dystrobrevin binding) | |
| SERCA | Siateczkowo-endoplazmatyczna ATP-aza zależna od wapnia, (ang. sar- co/endoplasmic reticulum calcium ATPase) | |
| SMA | rdzeniowy zanik mięśni (ang. spinal muscular atrophy) | |
| SOD | dysmutaza ponadtlenkowa (ang. superoxide dismutase) | |
| SOX2 | gen kodujący czynnik transkrypcyjny SRY (region determinujący płeć Y)-box 2 (ang. SRY (sex determining region Y)-box 2) | |
| SRF | surowiczy czynnik odpowiedzi (ang. serum response factor) | |
| SRF | gen kodujący surowiczy czynnik odpowiedzi (ang. serum response factor) | |
| SSEA4 | białko specyficzne dla antygenu embrionalnego 4 (ang. <i>Stage-specific embryonic antigen-4</i>) | |
| STARS | aktywator mięśni poprzecznie prążkowanych ścieżki sygnałowej Rho (ang. stria- ted muscle activator of Rho signaling) | |

| STARS | gen kodujący aktywator mięśni poprzecznie prążkowanych ścieżki sygnałowej RhoA (ang. Striated muscle activator of Rho signalling) |
|-------------------|--|
| STARS | ścieżka sygnałowa aktywatora mięśni poprzecznie prążkowanych RhoA (ang. Striated muscle activator of Rho signalling) |
| ТА | mięśień piszczelowy przedni (ang. tibialis anterior muscle) |
| TAC | całkowita pojemność antyoksydacyjna (ang. total antioxidant capacity) |
| ТАТА | sekwencja TATA (ang. TATA sequence) |
| TBP | gen kodujący białko wiążące TATA (ang. the TATA-binding protein) |
| TGFβ | transformujący czynnik wzrostu β (ang. <i>transforming growth factor</i> β) |
| TLR | receptor Toll-podobny (ang. Toll-like receptor) |
| TNF-a | czynnik martwicy nowotworu alfa (ang. tumor necrosis factor alpha) |
| TRA1-60 | antygen TRA1-60 receptor komórek T alfa (ang. T cell receptor alpha locus) |
| UC-MSC | pępowinowe mezenchymalne komórki macierzyste (ang. <i>umbilical cord mesen-chymal stem cells</i>) |
| α-, β-, γ-, δ- SG | sarkoglikany (ang. α -, β -, γ -, δ - sarcoglycan) |
| α-DG | α-dystroglikan (ang. <i>α-dystroglycan</i>) |
| β-DG | β-dystroglikan (ang. β-dystroglycan) |

I WSTĘP

1.1. Wprowadzenie

Dystrofia mięśniowa Duchenne'a (DMD) jest chorobą recesywną, związaną z chromosomem X, występującą z częstotliwością ok. 1 na 3500 - 6000 urodzeń męskich (1). Spowodowana jest przez mutację w genie kodującym białko dystrofinę, której obecność powoduje przesunięcie ramki odczytu (ORF). Uszkodzenia w obrębie genu powodują hamowanie lub produkcję nieprawidłowego białka, którego brak lub dysfunkcja objawia się postępującą degeneracją mięśni szkieletowych, prowadząc do poważnych zaburzeń oddychania i rytmu serca. Konsekwencją tych stanów jest przedwczesna śmierć pacjentów przed trzydziestym rokiem życia (2).

DMD rozpoznawana jest w dzieciństwie, najczęściej ok. 2-3 roku życia. Chłopcy dotknięci chorobą mają problemy z chodzeniem i bieganiem, wykazują obniżoną sprawność motoryczną w porównaniu ze zdrowymi dziećmi. Ok. 5 roku życia objawy są już nasilające się, pojawiają się przykurcze ścięgna Achillesa, powodując tzw. kaczkowaty chód i tendencję do chodzenia na palcach. Problemy związane z poruszaniem się przybierają z wiekiem na sile, prowadząc często do utraty zdolności chodzenia u progu okresu dorastania. Niemożliwe staje się samodzielne utrzymanie prostej pozycji kręgosłupa, co prowadzi do jego deformacji. W dalszym przebiegu choroby pojawiają się problemy z oddychaniem, w niektórych przypadkach ujawnia się również kardiomiopatia rozstrzeniowa, która charakteryzuje się poszerzeniem i upośledzeniem kurczliwości najczęściej lewej komory serca. Osoby chore na DMD wymagają stałej opieki, obecna terapia skupia się na wspomaganiu oddychania oraz podawaniu leków sterydowych.

Możliwe jest wystąpienie mutacji w genie dystrofiny, które nie prowadzą do zmiany ORF. Konsekwencją takiego stanu jest produkcja skróconej, ale funkcjonalnej wersji białka dystrofiny, która jest charakterystyczna dla osób z dystrofią mięśniową Beckera (BMD) Choroba ta ma łagodniejszy przebieg niż DMD, a jej rozpoznanie następuje często po ukończeniu 5 roku życia. Pacjenci z łagodniejszą postacią dystrofii mięśniowej (BMD) zachowują sprawność motoryczną, która będąc niewiele obniżona pozostaje podobna do sprawności zdrowych rówieśników, uzyskują też zbliżoną długość życia do zdrowych osób.

Wczesne wykrycie DMD umożliwia włączenie terapii, hamując wystąpienie kolejnych objawów. Jednak jak wskazano wcześniej, postęp choroby wydaje się być nieunikniony, a obecne standardowe podejście skupione jest na działaniu objawowym. Poszukuje się uniwersalnej terapii, która spowodowałaby zatrzymanie rozwoju DMD i umożliwiła pacjentom życie podobne do chorych na BMD.

1.2. Podłoże molekularne DMD

Dystrofia mięśniowa (zarówno DMD jak i BMD) występuje w wyniku mutacji w genie dystrofiny, położonym na chromosomie X w *locus* Xp21. Gen dystrofiny jest największym znanym ludzkim genem, (2,5 mln nukleotydów). W swojej budowie zawiera 79 eksonów (3), szczegółową budowę genu przedstawiono na rys. 1.



Ryc. 1 Schematyczna budowa białka oraz genu dystrofiny. Opracowano według: Olson (4). A) Białko dystrofiny składa się z domeny wiążącej aktynę (ang. Actin binding domain 1, ABD1), 24 domen funkcjonalnych tworzących domenę centralną (ang. Rod domains, ROD), regionów zawiasowych (ang. Hinge H1- H4), regionu wiążącego dystroglikan (ang. Dystroglycan binding, DB) oraz regionu wiążącego syntropinę i dystrobrewinę (ang. Syntrophin and dystrobrevin binding, SDB). B) gen dystrofiny składa się z 79 eksonów, kolory korespondują z domenami funkcjonalnymi białka wsazanymi w podpunkcie A.

Wielkość genu wpływa na mnogość możliwości wystąpienia mutacji, a stanowczą większość stanowią duże zmiany genetyczne, w tym: delecje (68%) czy duplikacje (11%) jednego lub większej liczby eksonów. Pozostałą grupę stanowią niewielkie mutacje obejmujące jeden ekson, punktowe lub związane z miejscami alternatywnego składania mRNA (5). Delecje pojawiające się w obrębie genu dystrofiny występują najczęściej w obszarze eksonów 44-54 (ok. 60% delecji) i eksonów 3-16 (ok. 15% delecji). W około 20% przypadków DMD, choroba występuje w związku z tzw. małymi mutacjami, z których niemal połowa stanowi mutacje typu nonsens. Około 30% małych mu-

tacji to oligonukleotydowe delecje, duplikacje, delecje z insercjami, które ujawniają kodony stop. Resztę małych mutacji stanowią mutacje związane z zaburzeniami prawidłowego składania mRNA (ang. splicing mutations). W przypadku duplikacji w genie *DMD* najczęściej dochodzi do duplikacji eksonu 2 i położonych za nim eksonów, częstotliwość występowania duplikacji maleje w kierunku końca 3'. Różnice w występowaniu i rozmieszczeniu mutacji świadczą o różnym mechanizmie ich powstawania.

W BMD delecje w obrębie genu *DMD* odpowiadają za ok. 80% przypadków, a duplikacje 5-10%, za pozostałe odpowiedzialne są małe mutacje (6). Mutacje wpływające na składanie mRNA występują częściej w BMD niż w DMD (7). W ok. 2-3% przypadków DMD/BMD w genie DMD nie udaje się wykryć zmian lub wykrywa się zmiany o niepewnej patogenności. Przypadki te podejrzewane są o podłoże związane z mutacjami intronowymi, które mogą wpływać na składanie mRNA lub są przypadkami dystrofii obręczowo-kończynowej (LGMD) o obrazie klinicznym podobnym do DMD/BMD.

W obrębie genu *DMD* znajduje się siedem promotorów - trzy z nich są zlokalizowane przy końcu 5' i pozwalają na powstanie pełnej długości izoform dystrofiny – ich ekspresja przebiega w neuronach korowych, komórkach Purkinjego czy mięśniach. Izoforma mięśniowa dystrofiny składa się z kilku domen, w których skład wchodzą: domena związana z aktyną (ABD), domena centralna (ROD), domeny łącznikowe (H1-H4), domena wiążąca dystroglikan (DB) oraz domena wiążąca syntropinę i dystrobrewinę (ryc. 1). Stwierdzono, że najwięcej mutacji (76%) w obrębie genu *DMD* dotyczy miejsc kodujących ABD, kolejne występują w eksonach kodujących ROD oraz SDB (8). Dystrofina oddziałuje z wieloma białkami cytoszkieletu (z których niezwykle istotna jest aktyna) oraz z błoną komórkową miocytu (sarkolemmą). Ponadto, jest kluczowym białkiem wchodzącym w skład dużego kompleksu białkowego związanego z dystrofiną (DAPC). W jego skład wchodzą również: α-dystroglikan i laminina-2, β-dystroglikan i α -, β -, γ -, δ -sarkoglikany z przylegającym sarkospanem oraz α 1-, β 1- syntropiny, α dystrobrewina i neuronalna syntaza tlenku azotu (NOS1).



Ryc. 2 Schemat budowy sarkolemmy wraz z kompleksem białkowym związanym z dystrofiną (ang. dystrophin glycoprotein complex, DAPC). Opracowano według: (9) Objaśnienia: α -DG - α -dystroglikan (ang. α -dystroglycan) β -DG - β -dystroglikan (ang. β -dystroglycan), α -SG, β -SG, γ -SG, δ -SG - α -, β -, γ -, δ -sarkoglikan (ang. α -, β -, γ -, δ - sarcoglycan), NOS1 - neuronalna syntaza tlenku azotu (ang. nitric oxide synthase 1), Cys – region bogaty w cysteinę (ang. cysteinę rich region), N-końcowe powtórzenia spektryny (ang. N-terminal spectrin repeats).

Przesunięcie ORF w obrębie odczytu genu *DMD* może prowadzić do przerwania transkrypcji lub do powstania skróconego białka dystrofiny. Rodzaj mutacji ma zatem kluczowe znaczenie dla fenotypu choroby, która może mieć przebieg cięższy (DMD) lub łagodniejszy (BMD). Nieprawidłowości w odczycie, które umożliwiają zachowanie ORF skutkują powstaniem skróconej wersji białka w postaci mini- bądź mikrodystrofiny, która zachowuje swoją funkcjonalność, ponieważ traci domeny ROD, ale wykazuje obecność domen wiążących białko (ABD1, DB, SBD). Możliwość wytworzenia skróconej, ale funkcjonalnej wersji dystrofiny stała się obiektem badań nad możliwością stworzenia sztucznej konstrukcji zawierającej najważniejsze dla funkcjonowania białka fragmenty genu, co w efekcie mogłoby prowadzić do zmiany fenotypu z DMD na BMD.

1.3. Budowa mięśni szkieletowych

Tkanka mięśniowa ma unikatową zdolność do skurczu dzięki obecności w jej strukturze białek kurczliwych. W podziale mięśni wyróżnia się mięśnie poprzecznie prążkowane (mięśnie szkieletowe i mięsień sercowy) oraz mięśnie gładkie. Mięśnie szkieletowe

tworzą wielojądrzaste, wrzecionowate komórki, o równoległym rozmieszczeniu włókien względem siebie. W budowie miocytu wyszczególnia się sarkolemmę, której wgłębienia tworzą kanaliki T docierające do wnętrza komórki, w okolice siateczki sarkoplazmatycznej, których podstawową funkcją jest przenoszenie potencjałów czynnościowych. Sarkoplazma tworzy wnętrze komórki mięśniowej, stanowi funkcjonalne i strukturalne środowisko procesów wewnątrzkomórkowych. Zlokalizowane są tu miofibryle (włókienka mięśniowe) zbudowane z filamentów grubych (tworzą je cząsteczki miozyny) oraz cienkich (w ich skład wchodzi aktyna, tropomiozyna oraz troponiny I, C, T).

Miozyna składa się z dwóch skręconych spiralnie łańcuchów, których N-końcowe fragmenty tworzą tzw. Głowy miozyny, wykazujące aktywność kinazy ATPazowej oraz tzw. miejsca aktywne, zdolne do wiązania się z miejscami aktywnymi aktyny. Aktyna jest zbudowana z dwóch skręconych łańcuchów białek, z którymi związane są cząstecz-ki adenozyno-5'-difosforanu (ADP).



Struktura mięśnia szkieletowego, poprzecznie prążkowanego

Ryc. 3 Schemat budowy mięśnia szkieletowego oraz włókna mięśniowego. Sarkomer stanowi podstawową jednostkę strukturalno-czynnościową komórki mięśniowej, ograniczony liniami granicznymi-Z. W trakcie spoczynku widoczna jest strefa H, w której centrum przebiega linia M (tworzoną przez miomezynę, odpowiadająca za uporządkowane położenie miofilamentów grubych w sarkomerze).

1.4. Prawidłowy skurcz mięśni szkieletowych

Skurcz mięśnia polega na przesuwaniu się względem siebie filamentów – aktynowych i miozynowych. Impuls nerwowy docierający do miocytów powoduje depolaryzację sarkolemmy, co prowadzi do uwolnienia jonów wapnia. Jony te, przyłączają się do tropoprzyłączenie niny odsłaniając aktyny, umożliwia centrum aktywne co głów miozyny do cząsteczek aktyny. Proces ten wymaga dostarczenia energii w postaci adenozyno-5'-trójfosforanu (ATP). Przyłączenie głów miozynowych do filamentu cienkiego, umożliwia przesunięcie się filamentów względem siebie. Mechanizm skurczu wiąże się z wewnątrzkomórkowym działaniem dużych sił mechanicznych i wymaga on odpowiedniej stabilizacji, którą zapewnia dystrofina łącząc filamenty aktynowe z białkami cytoszkieletu i sarkolemmą.

1.5. Skurcz mięśnia w przebiegu DMD

Brak połączenia błony komórkowej z białkami cytoszkieletu przy nieobecności dystrofiny wywołuje uszkodzenie sarkolemmy. Konsekwencją braku integralności błon jest wzrost ich przepuszczalności, dochodzi do uwolnienia z komórki cząsteczek m.in. kinazy kreatynowej (CK) oraz dehydrogenazy mleczanowej (LDH). Odwrotnie, do komórki zaczynają napływać jony wapnia (Ca²⁺), których nadmiar powoduje zaburzenie gospodarki wapniowej, niezbędnej dla prawidłowego funkcjonowania mięśni. Przyjmuje się jednak, że samo uszkodzenie sarkolemmy nie jest główną przyczyną wzmożonego napływu jonów wapnia do komórki. Błona komórkowa miocytów zawiera kanały wapniowe, które wykazują wzmożoną aktywność w przebiegu DMD. Ponadto wychwyt Ca²⁺ zdaje się być nieprawidłowy ze względu na wyciekanie tychże jonów z siateczki śródplazmatycznej (ER) czy obniżenie aktywności Ca²⁺-ATPazy zlokalizowanej w siateczce śródplazmatycznej (SERCA, ang. sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase). Nadmiar jonów Ca²⁺ w komórce uruchamia z kolei aktywację zależnych od wapnia proteaz – kalpainy i fosfolipazy A2, które są odpowiedzialne za proteolityczną degradację białek i uszkodzenie sarkolemmy (10).

1.6. Przewlekły stan zapalny w mięśniach u chorych na DMD

W przebiegu DMD obserwowana jest dysfunkcja mitochondriów i zwiększona produkcja reaktywnych form tlenu (ROS), które indukują szlaki związane z apoptozą i nekrozą włókien mięśniowych (3) Uszkodzenie włókien mięśniowych natychmiast wywołuje reakcję zapalną. Następnie aktywacji ulegają białka o charakterze cytoprotekcyjnym i antyzapalnym, należą do nich: oksygenaza hemowa 1 (HO-1, ang. heme oxygenase 1), która powoduje rozkład prooksydacyjnego hemu (obecnego w mioglobinie uwalnianej z uszkodzonych komórek) do biliwerdyny, tlenku wegla i jonów żelaza (Fe^{2+}). Dodatkowo we wczesnej odpowiedzi zapalnej uwalniane są tzw. alarminy, do których należą cząsteczki RNA aktywujące mechanizmy nieswoistej odpowiedzi zapalnej dzięki interakcji z receptorami rozpoznającymi wzorce, w tym receptorami Toll-podobnymi (TLR) (11). Aktywacja receptora TLR7 jest związana z nasileniem aktywności prozapalnego szlaku sygnałowego związanego z aktywowaniem czynnika transkrypcyjnego NF-kB, (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), który indukuje produkcję cytokin prozapalnych oraz chemokin rekrutujących komórki odpowiedzi nieswoistej i/lub tzw. wrodzonej. Napływające makrofagi M1 odpowiadają za fagocytozę włókien nekrotycznych, produkują również wolne rodniki, przyczyniając się do aktywacji czynnika martwicy nowotworu (TNF, ang. tumor necrosis factor) jak i zarówno NF-kB. Czasteczki te indukują kolejne białka prozapalne, których aktywność prowadzi do uszkodzenia włókien mięśniowych. Aktywność makrofagów M1 jest hamowana przez makrofagi typu M2, które produkują cytokiny przeciwzapalne, a także transformujący czynnik wzrostu β (TGF β , ang. transforming growth factor β), który indukuje zwiększoną syntezę kolagenu przez fibroblasty co wywołuje jednak niekorzystne włóknienie mięśni (12). W odpowiedzi zapalnej w mięśniach u chorych na DMD uczestniczą także komórki tuczne, które pobudzają nekrozę w tkance poprzez uwalnianie histaminy oraz prozapalnego TNF- α .

1.7. Środowisko redox w mięśniach u chorych na DMD

Brak dystrofiny powoduje znaczącą destabilizację środowiska redox w miocytach u chorych na DMD. Aktywność związana ze skurczem mięśni wywołuje zwiększoną produkcję ROS wspierającą odpowiedź zapalną (13). Wykazano, że w komórkach mięśni u chorych na DMD oraz w modelu zwierzęcym u myszy *mdx* występuje podwyższona (kompensacyjnie) aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz podwyższony poziom ulegającego oksydacji glutationu (14–16).Obserwowany charakter zmian w mięśniach u chorych na DMD wskazuje na ich reaktywny charakter. System ten nie jest jednak wydolny i wystarczający do ustabilizowania środowiska redox. Dodatkowo napływ neutrofili i ich zwiększone uwalnianie ROS powodują dalsze uszkodzenia miocytów. Niezwykle ważny udział w stresie oksydacyjnym ma również zwiększony napływ jonów Ca²⁺. Ich obecność prowadzi do otwierania porów mitochondrialnych (mPTP, ang. mitochondrial permeability transition pore) i zahamowania syntezy ATP, co skutkuje skierowaniem komórki na ścieżkę indukowanej śmierci (17).



Ryc. 4 Schemat powstawania reaktywnych form tlenu w układach biologicznych. Opracowano według Frączek i wsp. (18). SOD - dysmutaza ponadtlenkowa (ang. superoxide dismutase), GPx – peroksydaza glutationowa, GR – reduktaza glutationowa (ang. Glutathione reductase), GSH – zredukowana forma glutationu (ang. monomeric glutathione), GSSG – utleniona forma glutationu (ang. Glutathione disulfide), $O^{2^{-}}$ - anionorodnik ponadtlenkowy, H_2O_2 – nadtlenek wodoru, OH• - rodnik hydroksylowy, NADP⁺ fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (ang. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate), NADPH - zredukowana forma fosforanu dinukleotydu nikotyno-amidoadeninowego (ang. nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form), Fe²⁺- kation żelaza II, Cu²⁺- kation miedzi II.

Przedstawiciele grupy ROS są produktami ubocznymi redukcji tlenu cząsteczkowego (O_2) jak nadtlenek wodoru (H_2O_2) i tlen singletowy $(^1O_2)$ lub rodnik hydroksylowy (18). Natomiast anionorodnik ponadtlenkowy (O_2^{\bullet}) jest zaangażowany w wiele procesów metabolicznych. Uczestniczy w reakcjach związanych z komórkowym metabolizmem tlenu, co skutkuje powstawaniem dodatkowych reaktywnych form tlenu. Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) uczestniczy w procesie dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego enzymatycznie lub spontanicznie. H_2O_2 i O_2 są produktami tego procesu. Podczas wybuchu tlenowego komórki fagocytujące wytwarzają powstający H_2O_2 , który stanowi pewne niebezpieczeństwo dla sąsiednich komórek, ponieważ może dyfundować przez błony komórkowe. Ponadto, łatwo reaguje z O_2^{\bullet} i metalami przejściowymi (takimi jak

żelazo, miedź i kobalt), tworząc rodnik hydroksylowy OH^{*}. Ponieważ wyżej wymienione procesy zachodzą nawet wtedy, gdy stężenie metali przejściowych jest niskie, są one wiązane przez białka organizmu, a ich obecność w stanie wolnym w osoczu może powodować utrzymywanie się stresu oksydacyjnego. Za zachowanie homeostazy w tym dynamicznym układzie odpowiadają również inne enzymy i nieenzymatyczne aktywne cząsteczki, których łączna suma potencjału antyokstydacynjego może być określona nazwą całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC).

Eksperymenty z użyciem terapii antyoksydacyjnej u myszy mdx ujawniły pozytywne prewencyjne działanie przeciw uszkodzeniom mięśni poprzez redukcję stresu oksydacyjnego oraz hamowanie aktywności NF-κB. Z drugiej strony, występowanie ROS jest niezbędne w prawidłowym funkcjonowaniu komórek mięśniowych, gdyż stanowią one ważne cząsteczki sygnałowe mające wpływ na aktywację wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych oraz możliwą naprawę mięśni. Przykłady te wspierają słuszność poszukiwania dodatkowych informacji dotyczących działania ROS w przebiegu DMD jako ważnych elementów wpływających na patogenezę choroby.

1.8. Rola ścieżki sygnałowej STARS oraz SRF w mięśniach u chorych na DMD.

RhoA (ang. the Ras homolog gene family member A protein) jest niewielką hydrolazą guanozyno-5'-trifosforanu, która reguluje wiele funkcji komórkowych, w tym organizację cytoszkieletu, oraz transkrypcję genów odpowiedzialnych za wzrost i rozwój komórki (19,20). Doniesienia wskazują, że ścieżka sygnałowa aktywatora mięśni poprzecznie prążkowanych RhoA (STARS ang. striated muscle activator of Rho signaling), może pełnić istotną rolę w zachowaniu prawidłowej funkcji mięśni i jest regulatorem osi sygnałowej MRFT-A/SRF (21). Surowiczy czynnik odpowiedzi (SRF ang. Serum response factor) jest ważnym i wysoce konserwatywnym celem sygnałowym ścieżki sygnałowej STARS i jest związany z przebudową i rozwojem mięśni szkieletowych oraz pełni rolę regulacyjną dla ekspresji genów odpowiedzialnych za wzrost i różnicowanie komórki mięśniowej, włączając w to miogenezę (22,23). Aktywacja SRF następuje poprzez działanie hydrolaz guanozyno-5'-trifosforanu, w tym ścieżki STARS oraz dynamiczną pracę włókien aktynowych (24,25). MRTF-A, (ang. myocardin-related transcription factor A) jest kluczowym koaktywatorem SRF (26). Aktywacja osi MRFT-A/SRF zależna od Rho może nastąpić poprzez jakikolwiek zewnątrzkomórkowy sygnał, który będzie prowadzić do polimeryzacji aktyny. Geny mające miejsce wiązania z SRF należą do istotnych dla komórki mięśniowej genów, takich jak gen dystrofiny, alfa-aktyny oraz tropomiozyny (22).



Ryc. 5 Ścieżka sygnałowa STARS. Opracowano według: Lamon I wsp. (22). Poprzez interakcję z RhoA, STARS wywołuje polimeryzację aktyny z monomerycznej G-aktyny do polimerycznej Faktyny oraz stymuluje aktywność SRF poprzez przemieszczenie MRFT-A z cytoplazmy do jądra komórkowego. Objaśnienia: RHOA - białko A homolog rodziny genu Ras (ang. *the Ras homolog gene family member A protein*), STARS - aktywator mięśni poprzecznie prążkowanych ścieżki sygnałowej Rho (ang. *striated muscle activator of Rho signaling*), MRFT-A - czynnik transkrypcyjny MRFTA związany z miokardyną (ang. *myocardin-related transcription factor A*), SRF - surowiczy czynnik odpowiedzi (ang. *serum response factor*).

Zaburzenia osi MRTF-A/SRF wywołują zwiększoną apoptozę miofibroblastów (27). Aktywność ścieżki sygnałowej STARS jest ważnym punktem przecięcia dla sygnałów różnicujących miofibroblasty dlatego może prowadzić do korzystnych dla pacjentów chorych na DMD zmian (27).

1.9. Konsekwencje braku dystrofiny w skurczu mięśni w przebiegu DMD

Dystrofina pełni ważną rolę w utrzymaniu prawidłowej struktury i funkcji mięśni. Jej brak lub znaczne uszkodzenie zaburza stabilizację skurczu mięśni oraz powoduje zakłó-

cenia w funkcjonowaniu wielu ścieżek sygnałowych. Brak stabilizacji skurczu wywołuje uszkodzenie włókien mięśniowych, co aktywuje molekularne mechanizmy stanu zapalnego a następnie regeneracji. Pojawiające się następnie zjawiska nie są zsynchronizowane i przebiegają w różnym czasie w obrębie tkanki. Jest to dodatkowe utrudnienie, które wpływa niekorzystnie na włókna mięśniowe. W chorym mięśniu jednocześnie dochodzi do uszkodzenia, stanu zapalnego oraz procesów pro-regeneracyjnych w sąsiadujących ze sobą włóknach mięśniowych. DMD ma złożony charakter, który ostatecznie prowadzi do zastąpienia włókien mięśniowych tkanką łączną, co obniża potencjał funkcjonalny mięśni z każdym kolejnym cyklem skurcz-stan zapalny- upośledzona regeneracja (3). Prowadzi to do akumulacji tkanki łącznej w miejscu tkanki mięśniowej, a w konsekwencji do osłabienia funkcji mięśnia.

1.10. Obecny schemat oraz perspektywy leczenia DMD

Obecnie systemy ochrony zdrowia proponują pacjentom chorym na DMD leczenie objawowe, mające złagodzić stan zapalny lub ograniczyć postęp choroby. Głównymi związkami stosowanymi w leczeniu DMD są kortykosteroidy (glikokortykoidy), a wśród nich: prednizon, prednizolon i deflazakort. Leki te mają osłabić progresję choroby, przedłużając zdolność do samodzielnego poruszania się średnio o 2–3 lata oraz poprawiając funkcjoę serca. Ich działanie opiera się przede wszystkim na osłabieniu odpowiedzi zapalnej przez hamowanie ścieżki zależnej od NF-κB (28). Ich stosowanie prowadzi jednak do wystąpienia skutków ubocznych, wśród których może pojawić się przyrost masy ciała, zahamowanie wzrostu, niewydolność nadnerczy, które mają wpływ na życie chorych. Dodatkowo, w leczeniu DMD wykorzystuje się fizjoterapię oraz urządzenia wspomagające np. respiratory. Ze względu na znaczne ograniczenia i brak komfortu chorych oraz niesatysfakcjonujące rezultaty leczenia (średnia życia pacjentów z DMD wynosi ok. 35 lat), poszukiwanie skutecznego leku na DMD staje się celem badań na całym świecie.

Obecnie proponowane jest poszukiwanie terapii łączonych, wykorzystujących jednocześnie strategie celujące w przyczynę genetyczną oraz osłabiające drugorzędowe skutki DMD (29). Trudności w prowadzeniu badań dostarcza różnorodność możliwych mutacji, które mogą mieć wpływ na ekspresję dystrofiny. Również rozmiar genu (największy znany ludzki gen) sprawia, że transport prawidłowej kopii genu jest bardzo utrudniony. Celem części badań jest znalezienie rozwiązania prowadzącego do zastępczejprodukcji funkcjonalnej dystrofiny, tym samym starania skupiają się na znalezieniu sposobu na zamianę fenotypu pacjenta DMD na łagodniejszą formę np. BMD. Inne pomysły dotyczą poszukiwań substytutu białka, które mogłoby je zastąpić i przejąć jego funkcję (Tabela 1). Ze względu na różnorodność mutacji w genie *DMD* poszukiwanie innych czynników, bardziej uniwersalnych osłabiających przebieg jest również uzasadnione.



| | Strategie mające odtworzyć produkcję dystrofiny | | Strategie mające zastąpić funkcje dystrofiny | |
|-----------|---|--|--|---|
| Metoda | Oligonukleotydy antysensowe | System edycji genów CRISPR/Cas9 | Dostarczanie genów tzw. mini / mikrodystrofiny | Nadekspresja utrofiny |
| Działanie | Ominięcie przedwczesnych kodonów STOP poprzez utworzenie stabilnego dupleksu lub trypleksu, który pozwala na prowadzenie dalszej pracy polimerazy i zachowanie ORF | Wycięcie małych mutacji w obrębie genu DMD celem odtworzenia prawidłowej ORF | Skrócone, ale funkcjonalne formy dystrofiny, zawierającej jedynie niezbędne dla pełnionej funkcji domeny | Utrofina jest białkiem działającym w czasie rozwoju zarodka, jej ekspresja zanika po urodzeniu, celem terapii jest jej nadekspresja celem zastąpienia dystrofiny |

Badania nad komórkami macierzystymi od lat cieszą się niesłabnącym zainteresowaniem ze względu na swój duży potencjał terapeutyczny oraz możliwość zastosowania w wielu dziedzinach medycyny. W przypadku badań nad DMD próbowano wykorzystywać przeszczepy mezoangioblastów, które stanowią pulę komórek prekursorowych dla komórek mięśniowych (30). Wykorzystano ich możliwość do podania systemowego i późniejszej kolonizacji mięśni w celu wsparcia prawidłowej odbudowy mięśnia. Inne badania dotyczyły użycia komórek macierzystych szpiku oraz komórek pochodzących z krwi pępowinowej. Zastosowanie terapii komórkowych z wykorzystaniem komórek pacjentów chorych na DMD celem ich modyfikacji i późniejszego autologicznego przeszczepu niesie za sobą duży potencjał ze względu na brak konieczności wprowadzania terapii immunosupresyjnej.

Zastosowanie nukleotydów antysensowych powiodło się w badaniach Komaki i wsp. (31), w których zastosowano systemową administrację antysensowych nukleotydów NS-065/NCNP-01 w celu ominięcia zmutowanego eksonu 53 u japońskich chłopców dla przywrócenia prawidłowej ORF. Wszyscy badani pacjenci wykazali zwiększenie ekspresji mRNA dystrofiny (która była krótsza od wersji dystrofiny u osoby zdrowej). Rozwiązanie może być zatem ograniczone do określonej grupy pacjentów. Potter i wsp. zaproponowali systemową administrację konstrukcji genetycznej rA-

AVrh74.MHCK7.mikrodystrofiny z wykorzystaniem wektorów adenowirusowych (AAV), na modelach mysich *mdx* (32). Również Mendell i wsp. (33) zaproponowali systemowe podawanie pacjentom konstrukcji genetycznej zawierającej sekwencję mikrodystrofiny (μDYS) z wykorzystaniem AAV. Czterej pacjenci wykazali stabilność transdukcji i poprawę funkcjonalną mięśni oraz zmniejszenie poziomu CK we krwi w ciągu roku od podania. Badanie to potwierdziło pozytywny efekt interwencji oraz minimalne skutki uboczne. Duże nadzieje dla pacjentów z chorobami neuromięśniowymi niesie za sobą powodzenie leczenia rdzeniowego zaniku mięśni (SMA). Jednokrotne podanie preparatu Zolgensma zawierającego konstrukcję SMN1 AC005031 z prawidłową (alternatywną) kopią genu SMN noworodkom okazało się kluczowe dla ich przeżycia osobniczego (34).

Randomizowane, podwójnie ślepe badania kliniczne o numerze NCT05096221 przeprowadzone na 125 chłopcach z DMD, z mutacjami w eksonach 18-79 wykazały pożądane skutki dla zastosowania połączenia konstrukcji AAV z sekwencją mikrodystrofiny. Konstrukcja została podana chorym jednorazowo, dożylnie i procedura została oficjalnie zaakceptowana jako lek przez amerykańską Agencję Żywności i leków (FDA) w terapii chorych na DMD w wieku 4-5 lat.

II ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Ze względu na zróżnicowane mutacje u pacjentów z DMD poszukuje się uniwersalnego podejścia, którego zastosowanie mogłoby objąć dużą grupę chorych. Duże nadzieje pokłada się w indukowanych pluripotencjalnych komórkach macierzystych (iPSc), które uzyskiwane są poprzez reprogramowanie geentyczne ze zróżnicowanych komórek somatycznych. Ze względu na swój macierzysty charakter mogą one zostać wtórnie zróżnicowane do pożądanych komórek mięśniowych. Populację wyjściową może stanowić pula prekursorowych komórek mezoangioblastopodobnych(HIDEMs), zdolnych do przenikania przez naczynia krwionośne oraz mogących stanowić uzupełnienie rezerwuaru komórek macierzystych w mięśniach dystroficznych.

W niniejszej pracy zaproponowano sprawdzenie wpływu połączonej terapii komórkami macierzystymi z zastosowaniem konstrukcji lentiwirusowej dla sekwencji mikrodystrofiny (μDYS) jako możliwie uniwersalnej strategii, mającej także wpływ na drugorzędowe objawy DMD.

Celem pracy było utworzenie linii indukowanych komórek mezenchymalnych modyfikowanych mikrodystrofiną, zdolnych do poprawy funkcji mięśni szkieletowych.

Cele szczegółowe:

- 1. Efektywne zróżnicowanie komórek iPSc do komórek HIDEMs
- Przeprowadzenie transdukcji w komórkach HIDEMs z użyciem konstrukcji lentiwirusowej zawierającego sekwencję dla µDYS
- Analiza biochemiczna parametrów stresu oksydacyjnego oraz ekspresji genów wchodzących w skład ścieżki sygnałowej STARS w komórkach HIDEMs przed i po transdukcji µDYS
- 4. Transplantacja modyfikowanych μDYS komórek HIDEMs do mięśni myszy dystroficznych *mdx* i analiza wyników w modelu mysim *mdx/scid*

III MATERIAŁY I METODY

3.1. Materiał

3.1.1.a Charakterystyka grup badanych

Badania prowadzono z wykorzystaniem komórek mięśniowych pobranych od czterech chłopców z DMD w wieku 8 – 15 lat, które przeprogramowano za pomocą wirusa Sendai (CytoTune 2.0 kit, Invitrogen, Thermo Fisher, USA) do iPSc, które stanowiły materiał wyjściowy dla badań ujętych w niniejszej pracy.

Wszyscy pacjenci pozostawali pod opieką poradni genetycznych, różnili się zarówno w obrębie mutacji jak i objawianego fenotypu, dlatego każdego pacjenta traktowano jako osobną "grupę" badaną.

| | Pacjent 34 | Pacjent 38 | Pacjent 39 | Pacjent 40 | Pacjent kontrolny |
|------------------------|--|--|---------------------------------|---|----------------------|
| Wiek | 11 | 12 | 15 | 8 | 18 |
| Mutacja w genie DMD | Delecja eksonów 8- 22 (poza ORF) | Delecja ek- sonów 51-57 (zachowana ORF) | Duplikacja eksonów 53- 57 | Delecja ekso- nów 2-17 (poza ORF) Delecja ekso- nów 30-44 (zachowana ORF) | |
| Dziedziczenie | De novo | Dziedziczona | Dziedziczona | Dziedziczona | |
| Fenotyp | Porusza się na wózku inwalidzkim od 9 roku życia | Porusza się samodzielnie, niekiedy wy- maga wspar- cia | Tetraplegia | Tetraplegia | |

| Tabela 2. | Charakterystyka | nacientów | uczestniczących w | hadaniach. |
|------------|------------------|-----------|-------------------|------------|
| I abcia 2. | Charakter ystyka | pacjenton | uczestniczących w | Dauamacn. |

Przed oddaniem materiału do badań, opiekunowie prawni podpisywali świadomą zgodę na użycie materiału biologicznego dla celów naukowych. Próbki biopsji cienkoigłowej mięśni uzyskano przez pobranie w szpitalu MedPolonia, Poznań. Informacje na temat uczestników badań były anonimowo kodowane dla ochrony danych osobowych.

Wszystkie wyniki badań przedstawione w niniejszej pracy powstały w ramach realizacji projektu badawczego OPUS 2017/25/B/NZ5/01131, finansowanego ze środków Naro-

dowego Centrum Nauki. Projekt uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej przy Wielkopolskiej Izbie Lekarskiej w Poznaniu (nr uchwały: 199/2019 z dnia 18.09.2019 r.).

3.1.1.b Model mysi *mdx*

W badaniach wykorzystano myszy B10ScSn.Cg-Prkdc<scid> Dmd<mdx>/J z Jackson Laboratory, USA. Pary rozrodowe stanowiły myszy o genotypie heterozygoty. Propozycja badań na zwierzętach uzyskała zgodę Lokalnej Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu nr 59/2021. Instytut Genetyki Człowieka PAN posiada pozwolenie na prowadzenie hodowli modelu myszy *mdx*. W badaniu wzięły udział 8-10 tygodniowe samce *mdx* podzielone na grupę kontrolną, grupę której podano komórki HIDEMs bez modyfikacji oraz tzw. "SHAM". Finalna grupa testowa przeszła zabieg podania komórek HIDEMs modyfikowanych sekwencją mikrodystrofiny - μDYS . Grupę kontrolną, odniesienie wobec myszy *mdx* stanowiły myszy zdrowe C57BL. W grupach badano 4 samców (n=4).

Myszy *mdx* zostały przebadane w celu potwierdzenia wystąpienia mutacji w genie Dmd. Potwierdzenie obecności mutacji przedstawiono na Ryc. 6



Ryc. 6 Potwierdzenie wystąpienia mutacji punktowych u myszy mdx w genie *Dmd* w sekwencjonowaniu Sangera. W rekcji 1) wykryto mutację C > T. Podobnie w reakcji 2) zaobserwowano mutację punktową T > A. Protokół genotypowania przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta [https://www.jax.org/Protocol?stockNumber=018018&protocolID=21940; https://www.jax.org/Protocol?stockNumber=018018&protocolID=19801].

3.1.2. Odczynniki

| Odczynniki chemiczne: | | |
|--|--|--|
| Formaldehyd | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA | |
| Eozyna | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA | |
| Ludzki czynnik wzrostu fibroblastów | Gibco, Thermofisher, Leicestershire, Wielka Brytania | |
| 2-merkaptoetanol | Gibco, Thermofisher, Leicestershire, Wielka Brytania | |
| Etanol 96% | POCH, Gliwice, Polska | |
| Penicylina - Streptomycyna | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA | |
| Hematoksylina Harrisa | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA | |
| L-Glutamina | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA | |
| PBS z Ca ²⁺ i Mg ²⁺ | Lonza, Bazylea, Szwajcaria | |
| Non-essential amino acid solution | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA | |
| Fetal Bovine Serum – płodowa surowi- ca bydlęca | Life Technologies, Thermofisher, Waltham, MA, USA | |
| Medium Essential 8 | Life Technologies, Thermofisher, Waltham, MA, USA | |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA | |
| MegaCell Dulbecco's Modified Eagle Medium | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA | |
| Inhibitor ROCK | STEMCELL Technologies, Kolonia, Niemcy | |
| Trypsyna | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA | |
| Geltrex | Life Technologies, Thermofisher, Waltham, MA, USA | |
| 0.5 M kwas wersenowy | Fisher Scientific, Thermofisher, Waltham, MA, USA | |
| DMEM:F12 (Dulbecco's Modified Ea- gle Medium/Nutrient Mixture F-12) | Gibco, Fisherscientific, Loughborough, Leicestershire, Wielka Brytania | |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA | |
| Normalna surowica kozia | Gibco, Fisherscientific, Loughborough, Leicestershire, Wielka Brytania | |
| Polibren | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA | |
| Puromycyna | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA | |
| Plazmidy - transfekcja: | | |
| PAX – plazmid pakujący | Addgene, Watertown, MA, USA | |
| MD2G – plazmid otoczki | Addgene, Watertown, MA, USA | |
| μDys – plazmid zawierający sekwencję mikrodystrofiny | Addgene, Watertown, MA, USA | |
| GFP – plazmid zaiwerający sekwencję zielonego białka fluorescencji | Addgene, Watertown, MA, USA | |

| Zestawy testów: | |
|---|---|
| Lenti-X qRT-PCR Titration Kit – te- staw do określenia miana wirusów | Takara Bio, San Jose, CA, USA |
| AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit - zestaw uniwersalny do ekstrakcji DNA/RNA/białko | Qiagen, Venlo, Holandia |
| QIAquick Gel Extraction Kit – zestaw do ekstrakcji kwasów nukleinowych z żelu | Qiagen, Venlo, Holandia |
| iScript [™] Reverse Transcription Su- permix – zestaw do odwrotnej tran- skrypcji | Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA |
| SsoAdvanced [™] SYBR ® Green supermix – zestaw do qPCR | Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA |
| Antioxidant Assay Kit – zestaw do oznaczenia całkowitej pojemności an- tyoksydacyjnej | Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA |
| Catalase Assay Kit – zestaw do ozna- czenia aktywności katalazy | Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA |
| Superoxide Dismutase Assay Kit – zestaw do oznaczenia aktywności dy- smutazy ponadtlenkowej | Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA |

| Media hodowlane | do różnicowania | komórek HIDEMS: |
|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | |

| 1. DISSOCIATION MEDIUM (medium dysocjacyjne) /50 ml | |
|---|--|
| 0.5ml FBS (1%) | |
| 50µl EDTA (0.5mM) | |
| 100µl β-Me (0.1mM) | |
| + 49,35 ml PBS | |
| 2. COMMITMENT MEDIUM (medium początkowe) /50 ml | |
| 5ml FBS (10%) | |
| 0.5ml Glut (2nM) | |
| 0.5ml AA (1%) | |
| 100µl β-Me (0.1mM) | |
| + 43,9 ml MEM alpha Nucleosides | |
| 3. PROLIFERATION MEDIUM (medium proliferacyjne) /50ml | |
| 2.5ml FBS (5%) | |
| 0.5ml Glut (2mM) | |
| 0.5ml AA (1%) | |
| 0.5ml NEAA (1%) | |
| 50μl β-Me (0.05mM) | |
| 2.5 µl bFGF (5ng/ml) | |
| + 45,95 ml MEM alpha Nucleosides | |

| Probówki o pojemności 1,5 mL | Eppendorf, Hamburg, Niemcy | |
|--|---|--|
| Probówki o pojemności 15 mL | BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA | |
| Płytki 6-dołkowe | Corning, Fisherscientific, Loughborough, Leicestershire, Wielka Brytania | |
| Płytki 12-dołkowe | Corning, Fisherscientific, Loughborough, Leicestershire, Wielka Brytania | |
| Szalki 15-centymetrowe | Corning, Fisherscientific, Loughborough, Leicestershire, Wielka Brytania | |
| Szalki 10-centymetrowe | Corning, NY, Fisherscientific, Loughbor- ough, Leicestershire, Wielka Brytania | |
| Flaszki 25 cm ² | Corning, NY, Fisherscientific, Loughbor- ough, Leicestershire, Wielka Brytania | |
| Flaszki 75 cm ² | Corning, NY, Fisherscientific, Loughbor- ough, Leicestershire, Wielka Brytania | |
| Końcówki do mikropipet | Medlab-Products, Raszyn, Polska | |
| Mikropipety jednokanałowe | Eppendorf, Hamburg, Niemcy | |
| Mikropipety wielokanałowe | Eppendorf, Hamburg, Niemcy | |
| Waga laboratoryjna | Sartorius, Goettingen, Niemcy | |
| Wytrząsarka | Scientific Industries, Bohemia, NY, USA | |
| Inkubator z CO ₂ | Heraeus Holdin GmbH, Hannau, Niemcy | |
| Łaźnia wodna | AJL Electronic, Kraków, Polska | |
| Wirówka 5810 R | Eppendorf, Hamburg, Niemcy | |
| Wirówka 5424 R | Eppendorf, Hamburg, Niemcy | |
| Termoblok z wytrząsaniem z nadstaw- ką do płytek 96-dołkowych | Eppendorf, Hamburg, Niemcy | |
| Spektrofotometr do płytek 96- dołkowych | BioTek, Winooski, VT, USA | |
| Mikroskop świetlny DM 2000 | Leica Microsystems, Wetzlar, Niemcy | |
| Cytometr przepływowy CytoFLEX S flow cytometer | Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA | |
| Mikroskop Leica DMi 8 | Leica Microsystems, Germany | |
| JuLI FL | NanoEntek, Seul, Korea | |
| Licznik komórkowy TC20 | Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA | |
| CFX384 Touch [™] Real-time PCR detection system | Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA | |
| Homogenizator IKA T10 basic | Scientific Laboratory Supplies, Staufen, Niemcy | |
| Bieżnia (Mouse treadmill) dla myszy | Ugo Basile, Gemonio, Włochy | |

3.1.3. Sprzęt i aparatura badawcza

3.2. Metody

3.2.1. Charakterystyka komórek iPSc

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem pierwotnej zawiesiny komórek mięśniowych pobranych od pacjentów z DMD i przeprogramowanych do iPSc, które stanowiły materiał wyjściowy dla badań ujętych w niniejszej pracy. Komórki hodowano wewnątrz mikrodołków pokrytych roztworem geltrexu (100 µl geltrex/10 ml DMEM:F12) na pytkach 6-dołkowych w inkubatorze, w warunkach 5 % CO₂, 37°C i 95% wilgotności, w medium Essential 8 (2 ml/dołek), które wymieniano codziennie. Komórki pasażowano po uzyskaniu 80-90% konfluencji odklejając je od podłoża za pomocą 1 ml roztworu 100 mM EDTA w PBS. Odklejone komórki zalewano świeżym medium Essential 8, a następnie przenoszono 100-150 µl zawiesiny do nowego dołka. Po pasażu dodawano inhibitor RHO (ROCK) w koncentracji 1µl inhibitora ROCK/1 ml nowego medium.

Stabilne linie komórkowe poddawano weryfikacji na poziomie ekspresji genów pluripotencji oraz sprawdzano obecność czynników pluripotencji za pomocą odpowiednich barwień komórkowych analizując obraz w mikroskopie florescencyjnym.

3.2.2. Przeprowadzenie różnicowania z komórek iPSc do HIDEMs

Różnicowanie komórek iPSc do komórek HIDEMs zostało wykonane zgodnie z protokołem Maffioletti i wsp. (35). Proces był podzielony na 4 etapy i trwał 4 tygodnie w warunkach hipoksji (5 % CO₂, 3,5 % O₂, 37°C). W procesie wykorzystano różne składowe medium hodowlanego, celem ukierunkowania procesu różnicowania w kierunku komórek HIDEMs zgodnie z opublikowanym protokołem. W ostatnim etapie hodowli komórki przenoszono z płytek 6-dołkowych do flaszki 25 cm², a po uzyskaniu konfluencji przenoszono je do flaszek o powierzchni 75 cm².

3.2.3. Charakterystyka komórek HIDEMs

Komórki HIDEMs hodowane były w warunkach hipoksji (5 % CO₂, 3,5 % O₂, 37°C) we flaszkach o powierzchni 75 cm². Komórki pasażowano po uzyskaniu 80-90% konfluencji, przemywając je 5 ml PBS, a następnie odklejano za pomocą 3 ml roztworu 100 mM trypsyny w PBS. Zawiesinę komórek zalewano 7 ml medium hodowlanego, inaktywując działanie trypsyny. Wykonywano pasaż 3 ml zawiesiny / 7 ml medium hodowlanego / flaszka 75 cm². Medium hodowlane zmieniano co 2 dni. Stabilne linie komórkowe poddawano weryfikacji na poziomie ekspresji genów oraz białek powierzchniowych charakterystycznych dla komórek mezenchymalnych za pomocą Real-Time PCR, oraz analiz barwień immunocytochemicznych i w cytometrze przepływowym.

3.2.4. Izolacja DNA/RNA/białko

Komórki iPSc oraz HIDEMs odklejano od podłoża z użyciem odczynników wykorzystywanych do pasażu komórek. Zawiesinę komórkową przenoszono do plastikowych probówek o objętości 15 ml i uzupełniano medium do osiągnięcia objętości 10 ml. Komórki wirowano 1000 obr/min, 10 min), usuwano supernatant i zawieszano je w objętości 1 ml PBS. Komórki wirowano (3500 obr/min, 5 min) usuwano supernatant. Osad komórkowy zawieszano w medium krioprotekcyjnym i bankowano w temperaturze -80°C, po zebraniu odpowiedniej liczby próbek. Następnie wykonywano izolację z użyciem zestawu AllPrep, a uzyskane materiały biologiczne bankowano w zalecanych przez producenta warunkach (DNA: - 20 °C, RNA: - 80 °C, białko: - 80 °C).

3.2.5. Barwienie immunofluorescencyjne

W celu wykonania barwień immunofluorescencyjnych komórki iPSc oraz HIDEMs poddane pasażowi przenoszono na płytkę 12-dołkową, w każdym dołku znajdowało się uprzednio przygotowane okrągłe szkiełko nakrywkowe. Komórki hodowano aż do osiągnięcia przez nie konfluencji na poziomie ok 60-70%. Następnie płytki przenoszono na lód, komórki przemywano dwukrotnie w 1 ml PBS / dołek (po 5 min inkubacji); po przemyciu komórki poddawano utrwaleniu z użyciem 4% roztworu paraformaldehydu i inkubowano przez 15 min. Po skończonej inkubacji komórki powtórnie przemywano dwukrotnie 1 ml PBS / dołek (po 5 min inkubacji). Utrwlone preparaty komórkowe przechowywano w - 20 °C aż do uzyskania odpowiedniej liczby próbek.

Szkiełka pokryte komórkami umieszczano w przygotowanych wcześniej komorach do barwienia, zachowując stałą wilgotność preparatów. Szkiełka przemywano 0,5 ml PBS / 5 min / szkiełko, po usunięciu płynu nakładano na szkiełka roztwór 0,1% Triton X-100 w PBS i inkubowano komórki przez 15 min. Następnie usuwano płyn i nakładano 1% roztwór surowicy koziej w 0,1% roztworze Triton X-100 w PBS i inkubowano przez 1h. Po inkubacji usuwano płyn i nakładano roztwór 0,5 ml 0,1% Triton X-100 w PBS zawierający przeciwciało pierwszorzędowe w rozcieńczeniu zalecanym przez pro-
ducenta. Komórki inkubowano przez 24h w temperaturze pokojowej, po inkubacji płukano komórki dwukrotnie używając PBS. Następnie usuwano płyn i nakładano roztwór zawierający przeciwciało drugorzędowe zgodnie z zaleceniami producenta. Komórki inkubowano przez 1h, następnie usuwano płyn i dwukrotnie płukano komórki za pomocą PBS. Po usunięciu buforu szkiełka odwracano i umieszczano za pomocą pęsety na szkiełku podstawowym. Barwienia immunofluorescencyjne prowadzono w warunkach ograniczonego dostępu światła z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego. Użyte przeciwciała opisano w Tabeli 3.

| Marker | Antygen | Przeciwciało |
|----------------------------------|---------|--|
| | AP | Fosfataza alkaliczna, ab126820, Abcam, Cam- bridge, Wielka Brytania |
| | CD 13 | Anti-CD 13, ab227663, Abcam, Cambridge, Wielka Brytania |
| | CD 31 | Anti -CD 31, ab9498, Abcam, Cambridge, Wiel- ka Brytania |
| Cechy komórek mezenchy- | CD 44 | Anti-CD 44, ab189524, Abcam, Cambridge, Wielka Brytania |
| mainych | CD 45 | Anti-CD 45, ab821, Abcam, Cambridge, Wielka Brytania |
| | CD 73 | Anti-CD 73, ab133582, Abcam, Cambridge, Wielka Brytania |
| | CD105 | Anti-CD 105, ab11414, Abcam, Cambridge, Wielka Brytania |
| | CD 146 | Anti-CD 146, ab75769, Abcam, Cambridge, Wielka Brytania |
| | C-MYC | Anti-c-Myc ab32072, Abcam, Cambridge, Wiel- ka Brytania |
| | NANOG | Anti-Nanog, ab21624, Abcam, Cambridge, Wielka Brytania |
| Cechy komórek pluripotentnych | OCT4 | Anti-Oct4, ab19857, Abcam, Cambridge, Wiel- ka Brytania |
| | SOX2 | Anti-SOX2, ab97959, Abcam, Cambridge, Wielka Brytania |
| | SSEA4 | Anti-SSEA4, ab16287, Abcam, Cambridge, |

| Tabela 3. Lista | przeciwciał | użytych w | barwieniu | immunofluor | escencyjnym |
|-----------------|-------------|-----------|-----------|-------------|-------------|
| | 1 | | | | |

| | | Wielka Brytania | |
|---------------|-------------------|--|--|
| | TRA1-60 | Anti-TRA-1-60, ab16288, Abcam, Cambridge, Wielka Brytania | |
| Fluorescencja | Ms AlexaFluor 488 | ab130113, Abcam, Cambridge, Wielka Brytania | |
| | Rb AlexaFluor 594 | ab150076, Abcam, Cambridge, Wielka Brytania | |

3.2.6. Ocena komórek HIDEMs w cytometrze przepływowym

Komórki HIDEMs odtrawiano według protokołu, liczbę komórek ustalano za pomocą licznika komórek; do oceny wykorzystywano 200 tys. komórek. Komórki zawieszano w 100 µl mieszaniny 2 % FBS w PBS "staining buffer". Do zawiesiny dodawano przeciwciała, prowadząc w ciemności inkubację przez 20 min. Po tym czasie komórki płukano 1 ml "staining buffer" i wirowano komórki w warunkach 1000 obr/min przez 10 min. Następnie usuwano supernatant i uzupełniano probówki z osadem komórkowym do objętości 0,5ml. Tak przygotowaną zawiesinę poddawano analizie z zastosowaniem cytometru przepływowego. Listę używanych przeciwciał umieszczono w Tabeli 4.

| Marker | Antygen | Przeciwciało | | | |
|----------------------------|---------|---|--|--|--|
| | AP | PE Mouse anti-Human Alkaline Phosphatase, 561433, BD Pharmigen, San Jose, CA, USA | | | |
| | CD 13 | APC Mouse Anti-Human CD13, 557454, BD Phar- migen, San Jose, CA, USA | | | |
| | CD 31 | PE Mouse Anti-Human CD31, 555446, BD Pharmingen, San Jose, CA, USA | | | |
| Cechy komórek mezenchy- | CD 44 | FITC Mouse Anti-Human CD44, 555478, BD Pharmingen, San Jose, CA, USA | | | |
| malnych | CD 45 | APC Mouse Anti-Human CD45, 555485, BD Pharmingen, San Jose, CA, USA | | | |
| | CD 49b | FITC Mouse Anti-Human CD49b, 555498, BD Phar- migen, San Jose, CA, USA | | | |
| | CD 56 | CD56-PC5, A07789, Beckman Coulter, Indianapolis, USA | | | |
| | CD 73 | APC Mouse anti-Human CD73, 560847, BD Pharmingen, San Jose, CA, USA | | | |
| | CD105 | PE Mouse anti-Human CD105, 560839, BD Pharmingen, San Jose, CA, USA | | | |

| | CD 146 | PE Mouse Anti-Human CD146, 550315) BD Pharmingen, San Jose, CA, USA |
|--|----------------------------|---|
| | lgG1 lsotype con- trol | FITC Mouse IgG1 Isotype control, 555748, BD Pharmigen, San Jose, CA, USA |
| | IgG1 Mouse-PC5 | IgG1 Mouse-PC5, A07798, Beckman Coulter, Indi- anapolis, USA |
| Kontrola IgG2b к Isotype Control | | FITC Mouse IgG2b κ Isotype Control, 555742, BD Pharmingen, San Jose, CA, USA |
| | lgG1, к lsotype Control | APC Mouse IgG1, κ Isotype Control, 555751 BD Pharmingen, San Jose, CA, USA |
| | lgG1, к lsotype Control | PE Mouse IgG1, κ Isotype Control, 554680, BD Pharmingen, San Jose, CA, USA |

3.2.7. Ocena ekspresji genów z użyciem techniki Real-Time PCR

Materiałem biologicznym do badań było 3 µg RNA uzyskane z komórek w procesie izolacji, poddane przepisaniu na cDNA z użyciem zestawu iScript[™] Reverse Transcription Supermix w 60 µl objętości płynu. W badaniu użyto gotowych do użycia starterów komercyjnych dla wybranych genówfirmy Bio-Rad przedstawionych w Tabeli 5. A także zaprojektowanych w programie Primer-BLAST i dostarczonych przez firmę Genomed (Kraków, Polska) ujętych w Tabeli 6. Wartość Ct (treshold cycle) określone była z użyciem termocyklera CFX384 Touch [™] Real-time PCR detection system. Wszystkie próbki analizowno w duplikatach, a relatywną ekspresję genów obliczono z użyciem oprogramowania GeNorm software w odniesieniu do co najmniej dwóch genów referencyjnych.

| Gen | Nazwa produktu firmy Bio-Rad, miasto, kraj | | | |
|-----------------------|--|--|--|--|
| ANPEP (CD 13) | PrimePCR SYBR Green Assay: ANPEP, Human, Hercules, California 94547, USA | | | |
| <i>CD 44</i> (CD 44) | PrimePCR SYBR Green Assay: CD 44, Human, California 94547, USA | | | |
| <i>ITGA2</i> (CD 49b) | PrimePCR SYBR Green Assay: ITGA2, Human, California 94547, USA | | | |
| <i>MCAM</i> (CD 146) | PrimePCR SYBR Green Assay: MCAM, Human, California 94547, USA | | | |

| Tabela 5. Lista | użvwanych | starterów | wvprodukowan | vch komercvinie |
|------------------|-----------|-------------|------------------|-----------------|
| I ubelu et Libtu | alynanyen | Star ter om | ", produito " di | you nomereyjnie |

| <i>NT5E</i> (CD 73) | PrimePCR SYBR Green Assay: NT5E, Human, California 94547, USA |
|----------------------|--|
| PTPRC (CD 45) | PrimePCR SYBR Green Assay: PTPRC, Human, California 94547, USA |
| ACTB | PrimePCR SYBR Green Assay: ACTB, Human, California 94547, USA |
| GAPDH | PrimePCR SYBR Green Assay: GAPDH, Human, California 94547, USA |
| HPRT 1 | PrimePCR SYBR Green Assay: HPRT1, Human, California 94547, USA |
| <i>POU5F1</i> (OCT4) | PrimePCR SYBR Green Assay: POU5F1, Human, California 94547, USA |
| SOX2 | PrimePCR SYBR Green Assay: SOX2, Human, California 94547, USA |
| NANOG | PrimePCR SYBR Green Assay: NANOG, Human, California 94547, USA |
| MINA (C-MYC) | PrimePCR SYBR Green Assay: MINA, Human, California 94547, USA |
| GAPDH | PrimePCR SYBR Green Assay: GAPDH, Human, California 94547, USA |
| TBP | PrimePCR SYBR Green Assay: TBP, Human, California 94547, USA |

| Target Gene | Sequence (5'->3') | Length of PCR |
|-------------|----------------------------------|------------------|
| | Forward: CAGGTACGAGAGGGATGCTG | 110 nt |
| STARS | Reverse: GGTTGGCACATTTTCTCCTCC | |
| | Forward: GAAGAGAGCCAGACTAGCCG | 100 |
| MRF1A2 | Reverse: TTCACCTGGCCCACAATGATG | 132 nt |
| BUO | Forward: TCTGTCCCAACGTGCCCATCAT | 118 nt |
| кно | Reverse: CTGCCTTCTTCAGGTTTCACCG | |
| NE LD | Forward: GCAGCACTACTTCTTGACCACC | 120 nt |
| INF -KD | Reverse: TCTGCTCCTGAGCATTGACGTC | 150 m |
| TNE « | Forward: CCAGGCAGTCAGATCATCTTCTC | 144 nt |
| INF-a | Reverse: TTATCTCTCAGCTCCACGCCA | |
| SRF | Forward: CCTCAACTCGCCAGACTCTC | 143 nt |
| | Reverse: CCGGCTTCAGTGTGTCCTTG | |
| μDYS | Forward: TCAGCAGAAAGAAGCCACGA | 172 nt |
| | Reverse: AGGCTGCTGCTTATGTCACCACC | 1/2 11 |

Tabela 6. Lista starterów zaprojektowanych wraz z oczekiwaną wielkością produktu, Genomed, Warszawa, Polska.

3.2.8. Transfekcja komórek wektorem lentiwirusowym w celu namnożenia konstrukcji

Pakowanie wektora lentiwirusowego rozpoczynano na dzień przed doświadczeniem poczynając od rozłożenia na szalce o powierzchni 15-cm² 25x10⁶ komórek HEK293T zdolnych do jego sekrecji. W dniu doświadczenia przygotowywano mieszaninę reakcyjną zawierającą CaCl₂, plazmidy: pakujący PAX, otoczki MD2G oraz plazmid zawierający sekwencję μ DYS w grupach badanych lub GFP w grupach kontrolnych w stosunku 4:3:1 (PAX:MD2g:GFP/ μ DYS) dodawanych do medium hodowlanego. W 48 h po transfekcji medium zawierające konstrukcję lentiwirusową zbierano znad komórek pakujących i filtrowano za pomocą filtra o średnicy porów 0.45 μ m. W celu zagęszczenia wirusa używano koncentratora typu Millipore, używając parametrów wirowania: 10,000 x g, 1 h, 4°C. Zagęszczone cząsteczki lentiwirusowe zamrażano używając metody snap-freeze i przechowywano w – 80°C. RNA wirusa było izolowane i poddawane weryfikacji uzywając zestawu Lenti-X qRT-PCR Titration Kit. Wielkość infekcji MOI, (multiplicity of infection) zostało ustalone używając 5 różnych stężeń wirusa, aby zoptymalizować produkcję dla komórek HIDEMs (36).



Ryc. 7 Schemat budowy plazmidu PAX niezbęzdnego do stworzenia funkcjonalnej konstrukcji lentiwirusowej.



Ryc. 8 Budowa plazmidu MD2G niezbęzdnego do stworzenia funkcjonalnej konstrukcji lentiwirusowej.



Ryc. 9 Schemat budowy plazmidu zawierającego sekwencję μDYS, pLV[Exp]EF1A > {uDys}:T2A:EGFP(ns):Puro. Plazmid zawiera sekwencję reporterową EGFP(ns).



Ryc. 10 Plazmid reporterowy pEGFP-C1 wykorzystywany w procesie komórek HIDEMs, umożliwiający wzbudzenie nadeskpresji białka zielonej fluorescencji (ang. Green fluorescent protein, GFP) w komórkach eukariotycznych, dla określenia wydajności procesu transfekcji.

3.2.9. Transdukcja komórek HIDEMs

Komórki HIDEMs modyfikowane były za pomocą konstrukcji lentiwirusowych. W tym celu na dzień przed doświadczeniem rozkładano komórki w koncentracji 8x10⁵ na szalkę 10-cm². W dzień doświadczenia wykonywano transdukcję poprzez dodanie przygotowanych wcześniej konstrukcji lentiwirusowych do medium hodowlanego z dodatkiem polibrenu. W 24 h po transdukcji, komórki przemywano świeżym medium zawierającym konstrukcję z wektorem wirusowym. W 48 h po transdukcji medium było usuwane, a komórkom dodawano świeże medium hodowlane, które było zmieniane co 2 dni. Po tygodniu od transdukcji sprawdzano obecność komórek GFP-pozytywnych za pomocą aparatu Juli FL, następnie dokonywano selekcji antybiotykowej z użyciem puromycyny. Selekcja prowadzona była do czasu uzyskania 100% śmiertelności w grupie komórek kontrolnych (bez dodatku konstrukcji lentiwirusowej) (36).

3.2.10. Badanie całkowitej pojemności antyoksydacyjnej w homogenizatach komórkowych HIDEMs – badanie wykonano na podstawie protokołu producenta (709001, Cayman Chemical)

Homogenizacji próbek dokonywano poprzez zawieszenie osadu komórkowego przygotowując w stężeniu 1 mln komórek / 0,5 ml PBS, a następnie używano homogenizator z mocą obrotów 10 000 obr/min, w czasie 2 min.

Do badania całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC) w homogenizatach komórkowych HIDEMs wykorzystano metodę opartą na generowaniu kationorodnika ABTS^{®+} w wyniku reakcji 2,2'-azyno-disulfinianie 3-etylbenztiazoliny (ABTS[®]) z peroksydazą (metmioglobina) i H₂O₂. Poziom antyoksydantów w próbie określano na podstawie intensywności niebiesko-zielonego zabarwienia kationorodnika ABTS^{®+}, mierzonego przy długości fali 405 nm.

Do mieszaniny zawierającej 10 µl homogenizatu (lub odpowiedniego standardu), 10 µl metmioglobiny i 150 µl Chromogenu (ABTS[®]) dodawano 40 µl H₂O₂. Płytkę inkubowano w termobloku z wytrząsaniem, w temperaturze pokojowej przez kolejne 5 minut. Po zakończeniu inkubacji mierzono absorbancję przy długości fali 405 nm. Pojemność antyoksydacyjna próbek była miarą zdolności Troloxu do odbarwiania kationorodnika ABTS^{®+}. Pojemność antyoksydacyjną w próbce obliczano korzystając z równania regresji liniowej dla próbek standardowych:

Pojemność antyoksydacyjna (mM) =
$$\left[\frac{\text{Absorbancja}-(y-\text{punkt przecięcia z osią y})}{\text{nachylenie}}\right] \times 10$$

Wyniki podawano jako ekwiwalent Troloxu w mM. Wszystkie oznaczenia były wykonywane w dwóch powtórzeniach.

3.2.11. Badanie aktywności katalazy w homogenizacie komórkowym z HIDEMs badanie wykonano na podstawie protokołu producenta (707002, Cayman Chemical)

Do badania aktywności katalazy wykorzystano metodę opartą na reakcji enzymu z metanolem i H_2O_2 . Powstający w tej reakcji formaldehyd wchodził w reakcję kolorymetryczną z chromogenem, 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazolem (Purpald), dając fioletowe zabarwienie mierzone przy długości fali 540 nm.

Do mieszaniny zawierającej 100 μ l Assay Buffer, 30 μ l metanolu i 20 μ l homogenizatu komórkowego (lub odpowiedniego standardu) dodawano 20 μ l H₂O₂. Płytkę inkubowano w termobloku z wytrząsaniem, w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Reakcję zatrzymywano przez dodanie 30 μ l NaOH. Następnie dodawano 30 μ l chromogenu i płytkę kolejny raz inkubowano w termobloku z wytrząsaniem, w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Na końcu dodawano 10 μ l nadjodanu potasu i płytkę ponownie inkubowano w termobloku z wytrząsaniem, w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Na końcu dodawano 10 μ l nadjodanu potasu i płytkę ponownie inkubowano w termobloku z wytrząsaniem, w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Po zakończeniu inkubacji mierzono absorbancję przy długości 540 nm. Zawartość formaldehydu w próbce obliczano korzystając z równania regresji liniowej dla próbek standardowych:

Formaldehyd (
$$\mu$$
M) = $\left[\frac{\text{Absorbancja}-(y-\text{punkt przecięcia z osią y})}{\text{nachylenie}}\right] \times \frac{0,17 \text{ ml}}{0,02 \text{ ml}}$

Następnie obliczano aktywność CAT z następującego wzoru:

Aktywność CAT =
$$\frac{\mu M \text{ Formaldehyd}}{20 \text{ min}} \times \text{rozcieńczenie próbki} \left[\frac{\frac{n \text{mol}}{\text{min}}}{\text{ml}} \right]$$

Wszystkie oznaczenia były wykonywane w dwóch powtórzeniach.

3.2.12. Badanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w homogenizatach komórek HIDEMs - badanie wykonano na podstawie protokołu producenta (706002, Cayman Chemical)

Do badania aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) wykorzystano metodę opartą na reakcji między ksantyną i oksydazą ksantynową, w wyniku której powstawał O₂[•], reagujący z solami tetrazolu, prowadząc do wytworzenia czerwonego formazanu, umożliwiającego pomiar absorbancji przy długości fali 450 nm.

Do mieszaniny zawierającej 200 µl soli tetrazolowej i 10 µl homogenizatu komórkowego (lub odpowiedniego standardu) dodawano 20 µl oksydazy ksantynowej i płytkę inkubowano w termobloku z wytrząsaniem, w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Po zakończeniu inkubacji mierzono absorbancję przy długości 450 nm. Aktywność katalazy w próbkach obliczano korzystając z równania regresji liniowej dla próbek standardowych:

SOD
$$\left(\frac{\mu M}{ml}\right) = \left[\frac{współczynnik liniowy - (y-punkt przecięcia z osią y)}{nachylenie}\right] \times \frac{0,23 \text{ ml}}{0,01 \text{ ml}}$$

Wszystkie oznaczenia były wykonywane w dwóch powtórzeniach.

3.3 Metody in vivo - Mysi model dystrofii mięśniowej Duchenne'a

3.3.1 Podanie komórek HIDEMs do mięśni kończyny tylnej myszy mdx

Po 8 tygodniach obserwacji w grupie kontrolnej *mdx* przygotowano pozostałe grupy myszy *mdx* do interwencji. W tym celu odtrawiono komórki HIDEMs zmodyfikowane uprzednio μ DYS zgodnie z przedstawionym wcześniej protokołem, a nastepnie zawieszano je w koncentracji 0,5 mln w PBS w objętości 100 μ l. Tak przygotowaną zawiesinę podawano w znieczuleniu wziewnym (izofluran) domięśniowo, do obu mięśni piszczelowych przednich myszy. W grupie SHAM zastosowano taki sam sposób podania lecz z solą fizjologiczną.

3.3.2. Testy na bieżni (myszy WT oraz mdx)

Aby zweryfikować efekt terapeutyczny myszy raz w tygodniu poddawano wysiłkowi fizycznemu na bieżni - 5 min, 12m/min celem określenia sprawności fizycznej gryzoni (37). Konstrukcja bieżni umożliwiała bieg tylko w jedną stronę, w przypadku próby ucieczki bądź braku aktywności zwierzę było rażone szokiem elektrycznym o często-

tliwości 1 Hz i natężeniu 0,5 A. Uzyskano informacje o dystansie oraz liczbie impulsów elektrycznych przyjętych przez zwierzę w czasie eksperymentu. W przypadku długiego braku aktywności bądź wielokrotnym przyjęciu impulsu w krótkim czasie urządzenie przerywało eksperyment zapobiegając traumatyzacji myszy.

3.4. Analiza statystyczna wyników

Doświadczenia w badaniach *in vitro* związane z oceną ekspresji genów wykonywane były w dwóch powtórzeniach. Poziom ekspresji genów wyznaczany był za pomocą metody Δ Ct i algorytmu GeNorm, który określał najbardziej stabilne i wiarygodne pary genów referencyjnych, wyznaczając wartość M (średnia), a ulegające ekspresji w badanych próbkach biologicznych. Na tej podstawie wyliczany był współczynnik normalizacji. Poziom ekspresji genów dla poszczególnych próbek oceniano w oparciu o wartości cyklu progowego Ct. Odnoszone były one do kontroli, którą stanowiły komórki pacjenta zdrowego, normalizowane w oparciu o współczynnik normalizacji – wyznaczany na podstawie poziomu ekspresji conajmniej dwóch genów referencyjnych *ACTB* i *GAPDH* (Real-Time PCR dla ludzkich genów). Do obliczeń statystycznych wykorzystano program GraphPad Prism (GraphPad Prism 7 Software, San Diego, CA, USA), używając odpowiednich testów statystycznych (jednostronny test ANOVA), różnice uznawano za istotne statystycznie przy p < 0.05.

IV WYNIKI

4.1. Charakterystyka komórek iPSc

Przeprowadzona charakterystyka komórek iPSc potwierdziła występowanie u komórek cech pluripotencji zarówno na poziomie transkrypcji mRNA (ryc. 11), jak i na poziomie ekspresji białek (ryc. 12). Wszystkie badane próbki badanych populacji komórek uzyskały pewną aczkolwiek różnorodną ekspresję czynników pluripotencji, za wyjątkiem genu *SOX2*, który wykazywał niezmienną ekspresję we wszystkich badanych próbkach wobec populacji kontrolnej.



Ryc. 11 Ekspresja czynników (genów) pluripotencji (*C-MYC*, *NANOG*, *OCT4*, *SOX2*) w warunkach *in vitro* w reakcji qPCR dla podstawowych badanych populacji indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych. Względna ekspresja genów została znormalizowana wobec genów referencyjnych: (*GAPDH*, *ACTB*). Gwiazdki oznaczają poziomy istotności statystycznej: p < 0.05 (*), p < 0.01 (**), p < 0.001 (***). Numery arabskie oznaczają kodowane próbki komórek od poszczególnych pacjentów (Materiały i Metody).

| | DAPI (niebieski) | OCT4 (czerwony) | Merge |
|---------|------------------|-----------------|-------|
| Control | | | |
| 34 p | | | |
| 38 p | | | |
| 39 p | | | |
| 40 p | | | |

A

50 µm

| | DAPI (niebieski) | SOX2 (czerwony) | SSEA (zielony) | Merge |
|--------------|------------------|--|----------------|-------|
| Con- trol | Contra Stand | in the second se | | |
| 34 p | | | | |
| 38 p | | | | |
| 39 p | | | | |
| 40 p | | | | |

B



| (| ۲ |
|---|---|
| J | ` |

| | DAPI (niebieski) | Tra (zielony) | C-MYC (czer- wony) | Merge | |
|--------------|------------------|---------------|-----------------------|-------|--|
| Con- trol | | | | | |
| 34 p | | | | | |
| 38 p | | | | | |
| 39 p | | | | | |
| 40 p | | | | | |



| | DAPI (niebieski) | NANOG (czerwony) | Merge |
|---------|------------------|------------------|-------|
| Control | | | |
| 34 p | | | |
| 38 p | | | |
| 39 p | | | |
| 40 p | | | |



Ryc. 12 Barwienie immunofluorescencyjne komórek iPSc. Komórki zostały sprawdzone pod względem obecności białek OCT4, SOX2, SSEA, Tra, C-MYC oraz NANOG. Komórki badano na etapie 10-tego pasażu. Obrazy uzyskano dzięki mikroskopii za pomocą Leica DMi 8 microscope (Leica Microsystems, Germany), w 40x powiększeniu. A: barwienie DAPI (niebieski) + OCT4 (czerwony), Merge – obraz połączony. B: barwienie DAPI (niebieski) + SOX2 (czerwony) + SSEA (zielony), Merge – obraz połączony. C: barwienie DAPI (niebieski) + C-MYC (czerwony) + Tra (zielony), Merge – obraz połączony. D: barwienie DAPI (niebieski) + SOX2 (czerwony) + SSEA (zielony), Merge – obraz połączony. Numery arabskie oznaczają kodowane próbki komórek od poszczególnych pacjentów (Materiały i Metody).

4.2. Różnicowanie komórek iPSc do komórek HIDEMS

Podczas procesu różnicowania komórkowego obserwowano zmiany w wielkości i morfologii kolonii komórkowych. Na początku hodowli *in vitro* komórki iPSc były zgrupowane, z gęstą cytoplazmą i centralnie położonymi jądrami. Podczas różnicowania ich cytoplazma wydłużała się, a jądra ulegały decentralizacji. Proces ten był zgodny z protokołem opisanym przez Maffioletti i wsp. Komórki od pacjentów 40 p HIDEMs zostały uznane za najbardziej problematyczne. Zawierały one znacznie więcej cytoplazmy i przyjmowały bardziej okrągły kształt niż pozostałe linie komórkowe. Podjęto 3 próby różnicowania komórek od pacjenta nr 40 p w HIDEMs, lecz po drugim pasażowaniu *in vitro* we wszystkich próbach obserwowano brak proliferacji, co w konsekwencji zakończyło się brakiem niezbędnej charakterystyki tych komórek. Zaobserwowano również, że na komórki od pacjenta 39, także przestawały proliferować w granicach 5-tego pasażu, co miało wpływ na dalszą charakterystyką biologiczną tych komórek.



50 µm

Ryc. 13 Różnice w morfologii komórek iPSc oraz HIDEMS w liniach komórkowych otrzymanych po reprogramowaniu komórek mięśniowych od pacjentów z DMD. Komórki iPSc były obserwowane na 10. pasażu *in vitro* (hodowla na płytce 6-dołkowej), a komórki HIDEMs na 2. pasażu (hodowla we flaszce 75cm2. Zdjęcia wykonano za pomocą JuLI FL analyzer (NanoEntek) w 4x powiększeniu. Numery arabskie oznaczają kodowane próbki komórek od poszczególnych pacjentów (Materiały i Metody).

4.3. Charakterystyka komórek HIDEMs

Poziom ekspresji markerów charakterystycznych dla komórek HIDEMs był zróżnicowany u poszczególnych pacjentów z DMD i istotnie różnił się od populacji kontrolnej. Wyniki zostały potwierdzone przez barwienia immunocytologiczne i cytometrię przepływową, wskazując na zróżnicowany charakter uzyskanych zawiesin komórkowych. HIDEMs od pacjenta 38 miały najbardziej zbliżony poziom ekspresji markerów mezenchymalnych do populacji kontrolnej HIDEMs (Ryc. 8). Natomiast komórki HIDEMs od pacjenta 40 reprezentowały największe różnice w poziomach ekspresji badanych markerów względem innych próbek czy populacji kontrolnej.



Ryc. 14 Wyniki poziomu ekspresji markerów (genów) mezenchymalnych *ANPEP* (CD 13), *CD 44* (CD 44), *ITGA2* (CD49b), *MCAM* (CD146), *NT5E* (CD73) and *PTPRC* (CD45) w komórkach pacjentów z DMD oraz populacji od zdrowej osoby kontrolnej. Geny referencyjne: *ACT*, *HPRT*, *GAPDH*. Gwiazdki oznaczają poziomy istotności statystycznej: p < 0.05 (*), p < 0.01 (**), p < 0.001 (***). Wyniki uzyskano wykorzystując jednostronny test ANOVA. Numery arabskie oznaczają kodowane próbki komórek od poszczególnych pacjentów (Materiały i Metody).

Obecność białek markerowych badano za pomocą barwień immunofluorescencyjnych, które potwierdziły mezenchymalny charakter komórek HIDEMs (ryc. 5). Wyniki analizy komórek od pacjenta 40 nie zostały uzyskane z powodu braku należytej proliferacji komórek HIDEMs. Badane komórki HIDEMs były CD 44, CD 146, CD 73 i CD 13 pozytywne, podczas gdy słaby sygnał fluorescencji był obecny w 34 i 38, co było podobne w profilu do kontrolnej populacji komórek. Sygnały CD 45 i CD 31 były bardzo słabe we wszystkich badanych populacjach komórek HIDEMs (Tabela 8).

| | DAPI (niebieski) | CD44 (czerwony) | CD 105 (zielony) | Merge |
|--------------|------------------|-----------------|------------------|-------|
| Con- trol | | | | |
| 34 p | | | | |
| 38 p | | • % | | |
| 39 p | | | | |

B

50 µm

| | DAPI (niebieski) | CD 146 (czer- wony) | CD 45 (zielony) | Merge |
|--------------|------------------|------------------------|-----------------|---------------------------------------|
| Con- trol | | | s | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · |
| 34 p | . | | | |

А



С

50 µm

| | DAPI (niebieski) | CD 73 (czer- wony) | CD 31 (zielony) | Merge |
|--------------|------------------|-----------------------|-----------------|-------|
| Con- trol | | | 1.6.3 | |
| 34 p | | | . aa. | 20.88 |
| 38 p | | | s. m. s | |
| 39 p | | | | |

50 µm



50 µm

Ryc. 15 Barwienie immunofluorescencyjne markerów mezenchymalnych w komórkach kontrolnych i komórkach HIDEMs pozyskanych od pacjentów z DMD. Komórki badano w 3. pasażu hodowli komórkowej in vitro. Obrazy uzyskano przy użyciu mikroskopu Leica DMi 8 (Leica Microsystems, Niemcy) z 40-krotnym powiększeniem. A: barwienie DAPI (niebieski) + CD 44 (czerwony), CD 105 (zielony), Merge – obraz połączony. B: barwienie DAPI (niebieski) + CD 146 (czerwony) + CD 45 (zielony), Merge – obraz połączony. C: barwienie DAPI (niebieski) + CD 73 (czerwony) + CD 31 (zielony), Merge – obraz połączony. D: barwienie DAPI (niebieski) + CD 13 (czerwony), Merge – obraz połączony. Numery arabskie oznaczają kodowane próbki od poszczególnych pacjentów (Materiały i Metody).

Komórki HIDEMs weryfikowano również za pomocą cytometrii przepływowej. Komórki były CD 49b, CD 44, CD 13, CD 73, CD 105 łącznie z fosfatazą alkaliczną (AP) dodatnie. Komórki HIDEMs od pacjentów z DMD miały fenotyp podobny do populacji kontrolnej. Jednak ekspresja poszczególnych antygenów różniła się pomiędzy poszczególnymi populacjami komórek. Wyniki uzyskano w 2 powtórzeniach biologicznych. Stosowane barwienia były wykrywane w różnych kanałach fluorescencji, charakterystycznych dla poszczególnych widm (APC, FITC, PC5.5, PE). Do analizy każdego stosowano odpowiednie przeciwciało kontrolne, brak sygnału wskazywał na specyficzność stosowanych barwień. Wyniki

D

uzyskane z powyższej analizy były zbieżne z uzyskaną charakterystyką komórek HIDEMs przez Maffioletti i wsp.





Ryc. 16 Wyniki badań białkowych markerów mezenchymalnych z zastosowaniem cytometrii przepływowej.

4.4. Transdukcja komórek HIDEMs za pomocą konstrukcji lentiwirusowej.

Względna ekspresja μDYS potwierdziła transdukcję komórek HIDEMs. u wszystkich badanych pacjentów z DMD, za wyjątkiem pacjenta 40, u którego nie można było uzyskać wystarczającej dla dalszych badań liczby komórek. W przypadku pacjenta 39 trudno było uzyskać wystarczającą liczbę komórek, co spowodowało pominięcie transdukcji z konstrukcją zawierającą GFP.



Ryc. 17 Ekspresja µDYS przed i po transdukcji w komórkach HIDEMs. Wszystkie transdukowane badane populacje komórek wykazały zwiększenie ekspresji µDYS. Względna ekspresja genów była normalizowana względem genów referencyjnych: (*GAPDH*, *ACTB*). Gwiazdki oznaczają poziomy istotności statystycznej: p < 0.05 (*), p < 0.01 (**), p < 0.001 (***). Wyniki oceniano statystycznie wykorzystując jednostronny test ANOVA. Liczby arabskie – 194 oznacza próbki z populacji kontrolnej, zaś pozostałe próbki komórek pozyskane od poszczególnych pacjentów z DMD. Numery arabskie oznaczają kodowane próbki od poszczególnych pacjentów (Materiały i Metody).

| | WT | | WT GFP | | μDYS | |
|---------|----|----|--------|-------------|------|--|
| Pacjent | BF | FL | BF | FL | BF | FL |
| 194 | | | | 1 Alexandre | | |
| 38 | | | | | | 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1 |

50µm

Ryc. 18 Komórki HIDEMs po transdukcji. Komórki obserwowano 7 dnia po transdukcji (100 x 20 mm Tissue Culture Dish, Falcon). Zdjecia wykonano za pomocą mikroskopu JuLI FL analyzer (NanoEntek, Seul, Korea) w 4X powiększeniu. Widoczna fluorescencja potwierdziła wydajność transdukcji. Objaśnienia: WT – wild type, GFP – transdukcja białkiem Green fluorescent protein, μDYS – transdukcja konstrukcją z sekwencją mikrodystrofiny, BF – kanał jasnego pola, FL – kanał fluorescencji.

4.5. Ocena aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz całkowitej pojemności antyoksydacyjnej w homogenizatach uzyskanych z komórek HIDEMs.

Aktywność CAT i TAC zmniejszyły się w lizatach komórkowych po transdukcji konstrukcji lentiwirusowej zawierającej sekwencję dla mikrodystrofiny. Aktywność CAT była statystycznie znamienie niższa (p < 0,0001) w lizatach komórkowych uzyskanych od pacjentów 34 i 38 w porównaniu z komórkami HIDEMs bez transdukcji. Całkowita pojemność antyoksydacyjna była również znamiennie zmniejszona (p < 0,0001) w lizatach komórkowych od pacjentów 34 i 38 w porównaniu z komórkami kontrolnymi bez transdukcji z mikrodystrofiną. Komórki od pacjenta 39 nie osiągały znaczących różnic w badaniu przed i po transdukcji, manifestując śladowe aktywności CAT bez względu na wykonanie transdukcji. Zaobserwowano znamiennie zwiększoną aktywność SOD w lizatach transdukowanych mikrodystrofiną komórek HIDEMs od pacjentów 34 i 38 (ryc. 18).







Ryc. 19 Ocena aktywności enzymów antyoksydacyjnych CAT, SOD oraz TAC w homogenizatach komórek HIDEMs. Gwiazdki oznaczają poziomy istotności statystycznej: p < 0.05 (*), p < 0.01 (**), p < 0.001 (***). Wyniki opracowano wykorzystując jednostronny test ANOVA. Numery arabskie oznaczają kodowane próbki od poszczególnych pacjentów (Materiały i Metody).

4.6. Ocena poziomu ekspresji genów wchodzących w skład ścieżki sygnałowej STARS

Względna ekspresja genów wchodzących w skład ścieżki sygnałowej STARS wzrosła statystycznie znamiennie w wyniku transdukcji lentiwirusowej μDYS w komórkach od pacjenta 38 za wyjątkiem genów *MRFTA* i *STARS*. W komórkach od pozostałych pacjentów z DMD po transdukcji komórek HIDEMs z mikrodystrofinąnie zaobserwowano wyników znamienne statystycznie. Zwraca uwagę znamienne statystycznie podwyższenie ekspresji genów *SRF*, *NFKB1* i *TNFA* u pacjenta 38.



Ryc. 20 Porównanie poziomu ekspresji genów uczestniczących w ścieżce sygnałowej STARS w komórkach HIDEMs przed i po transdukcji lentiwirusowej. Względna ekspresja genów została znormalizowana wobec genów referencyjnych: (*GAPDH*, *ACTB*). Gwiazdki oznaczają poziomy istotności statystycznej: p < 0.05 (*), p < 0.01 (**), p < 0.001 (***). Wyniki uzyskano wykorzystując jednostronny test ANOVA. Numery arabskie oznaczają kodowane próbki od poszczególnych pacjentów (Materiały i Metody).

4.7. Podanie komórek HIDEMs do mięśni kończyn tylnych myszy mdx

Po uzyskaniu wyników z charakterystyki biologicznej komórek HIDEMs od poszczególnych pacjentów z DMD, tj. dokonaniu analizy wyników poziomów ekspresji genów dla ścieżki sygnałowej STARS oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych wyselekcjonowano komórki HIDEMs od pacjenta 38 w celu przygotowania ich do przeszczepu do mięśni kończyny tylnej u myszy *mdx*. Zwierzętom w grupie badanej w stanie anestezji wziewnej (mieszanka tlenu i izofluranu) była podana zawiesina komórkowa do mięśnia piszczelowego przedniego obu kończyn, procedurę z roztworem soli fizjologicznej (w grupie myszy SHAM) w tej samej objętości płynu do identycznych miejsc. Myszom kontrolnym *mdx* nie podawno żadnych iniekcji.

4.8. Analiza wyników myszy mdx na bieżni

Tabela 7. Statystyka opisowa wyników pokonanego dystansu biegowego w trakcie badań w modelu myszy *mdx*.

| | Myszy WT (n = 4) | Myszy mdx kontrolne (n = 4) | Myszy mdx SHAM (n = 4) | Myszy mdx po podaniu komórek HIDEMS + uDys (n = 4) | Myszy mdx po podaniu komórek HIDEMS (n = 4) |
|---------------------------|---------------------|-----------------------------------|---------------------------|---|---|
| Minimum | 58 | 2 | 3 | 2 | 2 |
| Maximum | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |
| Mediana | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |
| Średnia | 59,92 | 49,25 | 49,34 | 47,94 | 44,16 |
| Odchylenie standardowe | 0,37 | 21,32 | 19,45 | 21,85 | 23,61 |

Tabela 8. Statystyka opisowa liczby porażeń prądem w trakcie badań w modelu myszy mdx.

| | Myszy WT (n = 4) | Myszy mdx kontrolne (n = 4) | Myszy mdx SHAM (n = 4) | Myszy mdx po podaniu komórek HIDEMS + uDys (n = 4) | Myszy mdx po podaniu komórek HIDEMS (n = 4) |
|---------------------------|---------------------|-----------------------------------|---------------------------|---|---|
| Minimum | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Maximum | 12 | 100 | 88 | 40 | 96 |
| Mediana | 1 | 1 | 3 | 2 | 35 |
| Średnia | 1,53 | 10,94 | 13,72 | 5,53 | 40,56 |
| Odchylenie standardowe | 2,38 | 24,80 | 21,03 | 9,21 | 32,87 |

Obserwacje zachowań myszy *mdx* ujawniły znaczne różnice osobnicze w długości pokonywanego dystansu na bieżni. Minimalny odcinek, jaki pokonywały myszy *mdx* z grup badanych wyniósł 2 m, natomiast myszy zdrowe (WT) wykazały minimalny dystans 58 m. Średni dystans w grupach badanych myszy *mdx* był zbliżony. Odchylenie standardowe w grupach badanych (21,32; 19,45; 21,85; 23,61, odpowiednio do Tabeli 7) odbiegało znacznie od wyniku grupy myszy WT (0,37). Różnicom w pokonanym dystansie towarzyszyły również różnice w liczbie porażeń elektrycznych (Tabela 8). W grupie myszy WT zaobserwowano maksymalny wynik 12, podczas gdy osobniki w grupie myszy kontrolnych *mdx* uzyskiwały wynik nawet do 100 porażeń, co urządzenie interpretowało jako zagrożenie dla życia zwierzęcia i natychmiast kończyło eksperyment. Obserwacje pokonanego dystansu w grupach badanych ujawniły wpływ czynników behawioralnych na wynik testów. Myszy, które wielokrotnie były rażone prądem uczyły się mechanizmu podjętego monitorowania, zgodnie z którą przyjęcie długotrwałego, pojedynczego porażenia kończyło eksperyment, wobec czego przestawały one podejmować próby biegu, aby uniknąć wielokrotnego rażenia prądem.



Ryc. 21 Wyniki testów myszy *mdx* na bieżni w trakcie ośmiotygodniowej obserwacji. A) Średni dystans pokonany przez zwierzęta w trakcie eksperymentu z podziałem na analizowane grupy, z i bez interwencji. B) Średnia liczba wstrząsów elektrycznych przyjętych przez zwierzęta w trakcie eksperymentu z podziałem na analizowane grupy, z i bez interwencji.

Myszy shocks porównanie



Ryc. 22 A: Porównanie średniej długości przebytego dystansu z całej, 8-tygodniowej obserwacji w grupach badanych myszy. B: Porównanie średniej liczby porażeń prądem (szoków elektrycznych) w trakcie trwania biegu myszy z całej, 8-tygodniowej obserwacji.

Pomimo tych wszystkich faktów związanych z formułą "uczenia się" testu biegowego myszy. U badanych myszy *mdx* zaobserwowano tendencję do obniżania liczby szoków elektrycznych u myszy *mdx* po interwencji transdukowanymi mikrodystrofiną komórkami HI-DEMs w porównaniu do poszczególnych grup myszy *mdx* (Ryc. 20).

V DYSKUSJA

Od wielu lat dystrofia mięśniowa Duchenne'a jest przedmiotem intensywnych badań zarówno podstawowych, jak i klinicznych. Po wielu nieudanych próbach, leczenie DMD przestaje koncentrować się na leczeniu objawowym, a dzięki nowym odkryciom zaczyna skupiać się na genetycznym, przyczynowym podłożu choroby. Najtrudniejszym wyzwaniem wydaje się być mnogość wariantów mutacji w genie kodującym dystrofinę, które sprawiają, że uniwersalne rozwiązanie medyczne pozostaje nieuchwytne. Celem niniejszej pracy było utworzenie linii indukowanych prekursorowych komórek mezenchymalnych tzw. mezoangioblastów (HIDEMs) zmodyfikowanych sekwencją mikrodystrofiny i potencjalnie, zdolnych do poprawy funkcji mięśni szkieletowych u pacjentów z DMD celem weryfikacji, czy taka strategia może być prospektywnie wykorzystana w przyczynowym leczeniu różnych wariantów genetycznych DMD.

Różnorodność możliwych mutacji w genie *DMD* zwraca uwagę badaczy w kierunku substytucji dystrofiny innym białkiem, które mogłoby przejąć jego funkcję. Dużą wagę i nadzieję pokłada się w związku z tym w zastosowaniu mikrodystrofiny, jako sztucznej konstrukcji, która zawiera jednak domeny funkcjonalne dystrofiny, a zatem może ona z powodzeniem zastąpić ją w dystroficznych komórkach mięśniowych. Problem stanowi jednak wielkość sekwencji DNA dla efektorowego białka, która mimo swojej krótszej formy w postaci mikrodystrofiny wciąż stanowi wyzwanie w projektowaniu efektywnych konstrukcji wektorowych.

W niniejszej pracy wykorzystano komórki iPSc, które zostały zreprogramowane z dystroficznych komórek mięśniowych pochodzących od pacjentów z DMD. Uzyskane linie komórkowe były pluripotencjalne i stabilne, nie wykazywały cech spontanicznego różnicowania. Wyniki ekspresji podstawowych genów pluripotencji potwierdziły ich macierzysty charakter. Ekspresja produktów białkowych świadczących o cechach pluripotencji również została potwierdzona w testach immunofluorescencji. Kolejnym ważnym etapem było przeprowadzenie różnicowania komórek iPSc do komórek mezoangioblastopodobnych, HIDEMs. W procesie różnicowania wykorzystano protokół Maffioletti i wsp. (35). Proces różnicowania był wieloetapowy i trwał 4 tygodnie. W trakcie prowadzenia hodowli, często na etapie 3 tygodnia, kiedy to komórki przechodziły z formy wykazującej cechy macierzyste do komórek mezoangioblastopodobnych następowało zahamowanie proliferacji i transformacja komórek w innym, niepożadanym kierunku, o czym świadczyły zmiany w morfologii (widoczne znaczne powiększenie jąder komórkowych i cytoplazmy, owalny kształt komórki) oraz zanik dalszej proliferacji. Największe problemy w procesie różnicowania wykazywały komórki od pacjentów 39 oraz 40 (pacjenci tetraplegiczni o znacznie upośledzonym fenotypie). Osiągnięcie charakteru mezenchymalnego przez komórki HIDEMs zostało potwierdzone za pomocą analizy ekspresji genów, immunofluorescencji oraz cytometrii przepływowej. Komórki HI-DEMs wykazywały również problemy w hodowli in vitro przy przechodzeniu do większej skali naczynia hodowlanego (np. z płytki 6 – dołkowej do flaszki). Wpływ na prowadzenia hodowli in vitro miał także typ wzrostu komórek, które agregowały się ze sobą tworząc tzw. "gniazda wzrostu". Cecha ta znacznie utrudniała pasażowanie komórek ze wzgledu na ich nierównomierne rozproszenie we flaszce hodowlanej oraz ze względu na występujące zlepy komórkowe (co utrudniało badania cytometryczne oraz ekstrakcję DNA/RNA/białko). Warto nadmienić, że grupa Maffioletti i wsp. była historycznie jedyną, która prowadziła wcześniej badania z użyciem komórek HIDEMs, stad uzyskane przez nas wyniki możemy odnieść jedynie do przedstawionego przez nich protokołu.

W niniejszej pracy zastosowano konstrukcję lentiwirusową zawierającą sekwencję μDYS celem transdukcji komórek HIDEMs. Osiągnięto nadekspresję mikrodystrofiny we wszystkich badanych liniach komórkowych oraz w komórkach od osoby zdrowej. Największą nadekspresję mikrodystrofiny uzyskano w komórkach od pacjenta 38, natomiast najmniejszą wykazywały komórki od pacjenta 39 (przy braku testów dla znacznie upośledzonego pacjenta 40), a poziomy osiągniętych nadekspresji mikrodystrofiny u pacjentów z DMD były znacząco niższe od nadekspresji μDYS uzyskanej w komórkach od pacjenta kontrolnego.

Dla terapii komórkowej z zastosowaniem mikrodystrofiny najbardziej obiecujące wydaje się zastosowanie wektorów adenowirusowych. Potter i wsp. przeprowadzili wstępne próby z ogólnoustrojowymi iniekcjami konstrukcji rAAVrh74.MHCK7.microdystrophin u myszy *mdx* jako rodzaj badania przedklinicznego (32). W niniejszej pracy zostały wykorzystane komórki mioblastów od pacjentów z DMD przeprogramowane do komórek iPSc, z których następnie zróżnicowano populację komórek do stadium HI-DEMs. Następnie przeprowadzono transdukcję lentiwirusową z μDYS , aby uzyskać komórki prekursorowe dla mięśni szkieletowych. Takie podejście dawałoby możliwość spersonalizowanego leczenia, bez niebezpiecznych i trwałych reakcji ze strony układu odpornościowego. Badania te są podobne do strategii Mendell i wsp. (33), w której wykonywano dożylne wstrzyknięcia w celu dostarczenia konstrukcji AAV zawierające μDYS pacjentom z DMD. Czterech pacjentów potwierdziło stabilność transdukcji i wykazało poprawę funkcjonalną oraz obniżone poziomy kinazy kreatynowej, które utrzymywały się przez 1 rok. Badanie to wykazało pozytywny wynik interwencji, która może być dobrze tolerowana i mieć minimalne skutki uboczne. Duże nadzieje dla pacjentów z DMD niesie za sobą zgoda FDA dla terapii NCT05096221 z zastosowaniem konstrukcji AAV z sekwencją mikrodystrofiny. Zastosowanie jednorazowej, podanej dożylnie dawki przyniosło pozytywne wyniki u 125 chłopców z mutacjami w eksonach 18-79. Podanie zostało zatwierdzone do leczenia pacjentów z DMD w wieku od 4 do 5 lat.

Transfer konstrukcji genowych wydaje się obecnie być najbardziej obiecującym podejściem molekularnym w leczeniu chorób nerwowo-mięśniowych. Do tej pory np. wykazano, że podanie pojedynczej dawki genu SMN (SMN1 AC005031) niemowlętom z rdzeniowym zanikiem mięśni (SMA) typu 1 przy użyciu Zolgensma (adenowirus serotyp 9) ma kluczowe znaczenie dla przeżycia tych pacjentów powoduje transkrypcję alternatywnej wersji białka [32,33]. W świetle tych ustaleń, trwające próby i badania dostarczają niezbędnych informacji do dalszych podejść badawczych, dając nadzieję na skuteczne leczenie DMD w zakresie korekty pierwotnej, genetycznej przyczyny choroby.

W przedstawionych badaniach wykorzystano specyficzne, pochodzące od pacjentów komórki mięśniowe, reprogramowane do iPSc, a następnie zróżnicowane do HIDEMs, które poddawano modyfikacji wektorem lentiwirusowym zawierającym konstrukcję μDYS . Głównym celem tego podejścia jest zahamowanie utraty komórek u osobydotkniętej chorobą dysfunkcji tkanki mięśni szkieletowych. Prowadzone dotąd badania kliniczne z przeszczepami mioblastów były zwykle ograniczone do lokalnego podawania domięśniowego u pacjentów z dystrofią mięśniową (MD) (38). Komórki mezoangioblastów zostały uznane za możliwe do użycia, ponieważ mogą być dostarczane systemowo (przenikają przez naczynia krwionośne) i kolonizować mięśnie. Początkowo planowane było podanie komórek HIDEMs również dożylnie, jednak przez ich nie dające się przezwyciężyć właściwości zlepiania się między sobą i trudnościach w przygotowaniu adekwatnej zawiesiny komórkowej odstąpiono od podania dożylnego ze względu na brak możliwości technicznych (podawanie przez żyły ogonowe) zwracając uwagę na ryzyko wywołania u zwierzęcia zatoru. Cossu i wsp. przeprowadzili systemową transplantację mezoangioblastów, która okazała się częściowo skuteczna w klinicznych próbach fazy I-II u pacjentów DMD (30). Wyniki przedstawione w niniejszej dysertacji sugerują, że zamiast kompatybilnej trasplantacji samych komórek HIDEMs, właśnie połączenie terapii komórkowej i genowej może być właściwym kierunkiem dla kolejnych podejść terapeutycznych. Wydaje się jednak, że wartość takiej strategii może być związana z rodzajem mutacji w konkretnym przypadku DMD. W przedstawionych w dysertacji badaniach określony fenotyp był ściśle związany z procesem hodowli *in vitro* komórek i miał wpływ na powodzenie hodowli. Obecnie prowadzone badania kliniczne skupiają się na wykorzystaniu mezenchymalnych komórek macierzystych pępowiny (UC-MSC), nr: NCT02235844. Podobne badania przeprowadzone w Indiach wykazało, że podanie UC-MSC nie tylko spowodowało stabilizację siły mięśniowej ale też nie wykazało szkodliwych skutków dla pacjentów z DMD (39).

W przedstawionych w dysertacji badaniach nie uzyskano wyników testów immunofluorescencyjnych i cytometrii przepływowej w komórkach od pacjenta 40 (HIDEMs), z zaawansownaym patogennym fenotypem (tetraplegia) i złożonymi mutacjami w różnych regionach genu DMD. Komórki od tego pacjenta odpowiadały na bodźce różnicujące do komórek HIDEMs, ale przy drugim pasażu in vitro proces proliferacji zostawał gwałtownie zahamowany. Dystrofina jest białkiem, które wspiera błonę komórkową i zapobiega jej uszkodzeniom. Różnice w morfologii komórek HIDEMs u pacjenta 40 można wyjaśnić złożonością mutacji DMD i przez to zaawansowanym szkodliwym fenotypem. Miały one wpływ na dobrostan HIDEMs, u których nie można było zapewnić prawidłowego fenotypu w odbywającej się hodowli in vitro. Komórki HIDEMs są znamiennie większe i znacznie bardziej wydłużone niż iPSc, co czyni je bardziej podatnymi na uszkodzenia cytoszkieletu. Poważne problemy pojawiały się również w hodowli in vitro komórek pacjenta 39 (tetraplegia). Mimo innych mutacji w genie DMD niż u pacjenta 40, pacjent 39 również objawiał ciężki patologiczny fenotyp choroby. Rzutowało to także na morfologie hodowanych in vitro komórek HIDEMs, które w trakcie kolejnych pasaży traciły zdolność do dalszej proliferacji, co znacznie zmniejszyło ich dostępność dla dalszych badań.

Próbowano zbadać wpływ transdukcji lentiwirusowej z sekwencją μDYS na środowisko redoks w komórkach HIDEMs. W literaturze pojawiały się informacje o istotnie podwyższonych poziomach ROS i enzymów antyoksydacyjnych w mięśniach szkieletowych u pacjentów z DMD i u myszy *mdx* (14,40,41). W badaniach przedstawionych w dysertacji była zauważalna znamienna statystycznietendencja sugerująca, że interwencja lentiwirusowa zmniejszyła poziom stresu oksydacyjnego. W homogenizatach komórek HIDEMs od pacjentów 34 oraz 38 (o łagodnym fenotypie) aktywność CAT oraz TAC były wyraźnie zmniejszone w porównaniu do komórek niepoddanych transdukcji lentiwirusowej. Odkrycia te sugerują wspierającą rolę µDYS dla regulacji środowiska redoks, które jest odzwierciedlone w produkcji ROS. Jednakże aktywność SOD znacznie wzrastało w tych samych homogenizatach komórkowych (komórki HIDEMs po transdukcji μDYS), co może pośrednio wskazywać na zwiększenie wydajności mitochondriów w transdukowanych komórkach. Powyższe wyniki wskazują na pozytywny wpływ transdukcji sekwencji DNA dla mikrodystrofiny na środowisko redoks w komórkach HIDEMs.

Udowodniono, że GTPazy Rho podlegają regulacji środowiska redoks komórki (42). RhoA odgrywa ważną rolę w aktywacji kilku regulatorów transkrypcji, w tym NF-kB. Zaobserwowano, że aktywacja RhoA jest związana ze zwiększoną ekspresją c-Myc w wyniku aktywacji NF-κB (43,44). Jak wspomniano wcześniej, czynnik transkrypcyjny NF-kB jest ważnym regulatorem reakcji prozapalnej. W komórkach HIDEMs u pacjenta 38 stwierdzono wzrost ekspresji NF-kB w transdukowanych mikrodystrofiną komórkach. Z jednej strony było to nieoczekiwane ze względu na udowodniony pozytywny związek NF-kB z ROS, z drugiej zaś strony aktywność NF-kB podlega zwrotnie regulacji przez RhoA. W świetle tych wyników może się wydawać, że reakcje antyoksydacyjne w komórkach DMD wydają się hamować prozapalny szlak aktywacji NF-kB, ale ten czynnik transkrypcyjny podlega właśnie regulacji przez RhoA, którego ekspresja była podwyższona w transdukowanych μDYS komórkach od pacjenta 38. Ekspresja mRNA TNF-A w komórkach pacjenta 38 także była istotnie zwiększona, co może wydawać się przeciwne do obserwowanych oniżonych efektów ROS w komórkach po modyfikacji mikrodystrofiny. Jednakże wykazano, że TNF-α jest (oprócz licznych innych działań) odpowiedzialny za stymulację wiązania SRF do elementu odpowiedzi surowiczej (SRE) przez co stymuluje on ekspresję genu C-FOS odpowiedzialnego za regulację wzrostu w komórkach satelitowych (45). Uzyskane wyniki moga być zatem zgodne z przytoczona inna formuła oddziaływania TNF-α.

Zwiększona ekspresja SRF po transdukcji lentiwirusowej µDYS u pacjenta 38, może wspierać komórki o łagodnym fenotypie DMD i być interesującym punktem odniesie-

nia dla dalszych badań *in vivo* w modelu myszy *mdx*. Sadler i wsp. zaobserwowali znacznie obniżony poziom mRNA i białek uczestniczących w szlaku STARS, w mięśniu piszczelowym przednim (TA) z niedoborem dystrofiny w modelu mdx i mięśniu czworogłowym od pacjentów z DMD (46). Nadekspresja ludzkiego STARS (hSTARS) w mięśniach TA u myszy mdx zwiększała maksymalną izometryczną siłę o 13%, bez zmian we włóknach mięśniowych lub ich morfologii. Obecność podwyższonej ekspresji genów należących do ścieżki sygnałowej STARS miała zatem pozytywny wpływ na mięśnie u myszy *mdx*, wspierając ich funkcjonowanie i regenerację. W prowadzonych obserwacjach behawioralnych można było zauważyć zmniejszenie długości pokononanego dystansu u myszy *mdx* względem myszy WT. Nie zaobserwowno różnic pomiędzy myszami *mdx* po podaniu komórek HIDEMs transdukowanych μDYS względem myszy *mdx* kontrolnymi. Myszy badane w tej grupie miały także wykazały najmniejsza liczbe porażeń prądem, co może świadczyć o pozytywnym efekcie zastosowanej terapii. Warto jednak zaznaczyć, że na wyniki mogła mieć wpływ formuła "uczenia się przez zwierzęta mechanizmu testu biegowego na bieżni, w trakcie którego myszy "wolały" przyjąć jedno długie porażenie prądem zamiast powtórnego biegu, uświadamiając sobie, że urządzenie za chwilę wyłączy się (ze względu na zagrożenie dla życia zwierzęcia), co wielokrotnie doświadczały w poprzednich testach. Zwracano także uwagę w przeszłości na problemy z zastosowaniem modelu mysiego *mdx* ze względu na manifestowanie słabszych, niewspółmiernych do ludzkiego objawów DMD. Może to zatem stanowić istotną przyczynę dla ujawnionego braku różnic w wynikach uzyskanych względem siebie u zwierzat *mdx* z i bez interwencji komórkowej. Istotne dla niniejszej pracy było założenie, że w wyniku przeszczepu komórek HIDEMs modyfikowanych μDYS uda się uzyskać łagodnieszy fenotyp choroby, podobny do BMD. Na brak różnic w wynikach uzyskanych przez zwierzęta *mdx* przed i po zastosowaniu podania komórek HIDEMs po transdukcji μDYS może mieć zatem także wpływ zastosowania niedoskonałego modelu dystrofii mięśniowej, który nie ujawniał adekwatnej zmiany fenotypowej pomimo prawdopodobnych różnic na poziomie molekularnym. Brak uzyskania różnic znamiennych statystycznie mógł być także związany ze zbyt małą liczbą zwierząt biorących udział w eksperymencie, co miało swoje odzwierciedlenie w wysokich odchyleniach standardowych dla pokonanego dystansu. Dodatkowo można podejrzewać, że kolejne pokolenia myszy wykazywały bardziej zaawansowany fenotyp choroby, tym samym grupy myszy mdx, uzyskiwane w różnych pokoleniach, pomimo standardowo utrzyma-
nego wieku zsierząt wchodzących w doświadczenie znacznie różniły się w fenotypie choroby. Ponad to, warto podkreślić, że DMD istotnie jest chorobą, której skutki kumulują się w czasie, co z wiekiem wpływa na pogorszenie zdrowia, a następnie powoduje śmierć pacjenta.

Podsumowując, badania nad potencjalnymi przyczynowymi strategiami terapeutycznymi, w chorobie DMD stanowią duże wyzwanie ze względu na wielkość genu *DMD*, różnorodność zmian mutacyjnych w sekwencji DNA oraz złożoność obrazu fenotypowego, zapewne związanego z funkcją i ekspresją innych genów. Prowadzone badania z użyciem sekwencji μDYS dają jednak nadzieję na skuteczne leczenie pacjentów o różnym podłożu genetycznym choroby, jakkolwiek o łagodnej formie fenotypowej. Dodatkowa analiza wtórnych efektów schorzenia (redoks) może pomóc w ukierunkowaniu dalszych badań nad znalezieniem kompleksowego podejścia terapeutycznego.

VI WNIOSKI

- Skuteczność procesu różnicowania komórek iPSc do komórek HIDEMS wiązała się z fenotypem pierwotnego schorzenia u pacjentów z DMD 9fenotyp łagodny i ciężki).
- 2. Transdukcja komórek HIDEMs konstrukcją lentiwirusową zawierającą sekwencję μDYS została potwierdzona w genetycznie zreprogramowanych komórkach mięśniowych pozyskanych od pacjentów chorych na DMD, których przyczyną były różne mutacje w obrębie genu *DMD*.
- W komórkach autologicznych HIDEMs, które poddano transdukcji mikrodystrofiną, zaobserwowano znamiennie istotny wpływ modyfikacji genetycznej na ekspresję genów wchodzących w skład ścieżki sygnałowej STARS.
- 4. Wykazano znaczące zmiany w aktywności antyoksydacyjnej w homogenizatach komórek HIDEMs przed i po transdukcji, które mogą świadczyć o pozytywnym wpływie µDYS na środowisko redox.
- 5. Nie zauważono istotnych różnic w długości pokonywanego dystansu przed i po podaniu modyfikowanych genetycznie komórek HIDEMs myszom *mdx*, zaobserwowano jednak statystycznie znamienną tendencję do spadku liczby porażeń, u myszy *mdx*, łagodny fenotyp dystrofii mięśniowej może uniemożliwiać pojawienie się znamiennych różnic.

VII PIŚMIENNICTWO

- 1. Mendell JR, Shilling C, Leslie ND, Flanigan KM, Al-Dahhak R, Gastier-Foster J, et al. Evidence-based path to newborn screening for duchenne muscular dystrophy. Ann Neurol. 2012 Mar;71(3):304–13.
- 2. Lisak RP, Truong DD, Carroll WM, Bhidayasiri R. International Neurology: A Clinical Approach. International Neurology: A Clinical Approach. 2010.
- 3. Duan D, Goemans N, Takeda S, Mercuri E, Aartsma-Rus A. Duchenne muscular dystrophy. Nature Reviews Disease Primers. 2021.
- 4. Olson EN. Toward the correction of muscular dystrophy by gene editing. Proc Natl Acad Sci U S A. 2021;
- 5. Bladen CL, Salgado D, Monges S, Foncuberta ME, Kekou K, Kosma K, et al. The TREAT-NMD DMD global database: Analysis of more than 7,000 duchenne muscular dystrophy mutations. Hum Mutat. 2015;
- 6. Tuffery-Giraud S, Béroud C, Leturcq F, Yaou R Ben, Hamroun D, Michel-Calemard L, et al. Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: A model of nationwide knowledgebase. Hum Mutat. 2009;
- 7. Kesari A, Pirra LN, Bremadesam L, McIntyre O, Gordon E, Dubrovsky AL, et al. Integrated DNA, cDNA and protein studies in Becker muscular dystrophy show high exception to the reading frame rule. Hum Mutat. 2008;
- 8. Bagchi A. Domain Wise Distribution of Mutations in Dystrophin Protein and Duchenne Muscular Dystrophy. Gene Technol. 2015;
- 9. The Dictionary of Cell & Molecular Biology. The Dictionary of Cell & Molecular Biology. 2013.
- Imbert N, Cognard C, Duport G, Guillou C, Raymond G. Abnormal calcium homeostasis in Duchenne muscular dystrophy myotubes contracting in vitro. Cell Calcium. 1995;18 (3): 177-86.
- Chen YW, Nagaraju K, Bakay M, McIntyre O, Rawat R, Shi R, et al. Early onset of inflammation and later involvement of TGFβ in Duchenne muscular dystrophy. Neurology. 2005;
- 12. Podkalicka P, Myszka M, Dulak J, Łoboda A. Molekularne mechanizmy dystrofii mięśniowej Duchenne'a i nowe możliwości terapeutyczne. Postepy biochemii. 2022.
- 13. Fittipaldi S, Dimauro I, Mercatelli N, Caporossi D. Role of exercise-induced reactive oxygen species in the modulation of heat shock protein response. Free Radical Research. 2014. p. 48 (1): 52-70.
- Dudley RWR, Khairallah M, Mohammed S, Lands L, Des Rosiers C, Petrof BJ. Dynamic responses of the glutathione system to acute oxidative stress in dystrophic mouse (mdx) muscles. Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol. 2006;291 (3): R704-10.
- 15. Kaczor JJ, Hall JE, Payne E, Tarnopolsky MA. Low intensity training decreases markers of oxidative stress in skeletal muscle of mdx mice. Free Radic Biol Med.

2007;

- 16. Renjini R, Gayathri N, Nalini A, Bharath MMS. Oxidative damage in muscular dystrophy correlates with the severity of the pathology: Role of glutathione metabolism. Neurochem Res. 2012;
- Rybalka E, Timpani CA, Cooke MB, Williams AD, Hayes A. Defects in mitochondrial ATP synthesis in dystrophin-deficient Mdx skeletal muscles may be caused by complex I insufficiency. PLoS One. 2014;(12): e115763. doi: 10.1371/journal.pone.0115763.
- 18. Frączek M, Kurpisz M. System redoks w nasieniu męskim i peroksydacyjne uszkodzenia plemników The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa. Postep Hig Med Dosw. 2005;
- 19. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. Nature. 2002.
- 20. Sorokina EM, Chernoff J. Rho-GTPases: New members, new pathways. Journal of Cellular Biochemistry. 2005.
- Lamon S, Wallace MA, Russell AP. The STARS signaling pathway: A key regulator of skeletal muscle function. Pflugers Archiv European Journal of Physiology. 2014.
- 22. Chai J, Tarnawski AS. Serum response factor: Discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. Journal of Physiology and Pharmacology. 2002.
- 23. Lamon S, Wallace MA, Léger B, Russell AP. Regulation of STARS and its downstream targets suggest a novel pathway involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. J Physiol. 2009;
- 24. Hill CS, Wynne J, Treisman R. The Rho family GTPases RhoA, Racl, and CDC42Hsregulate transcriptional activation by SRF. Cell. 1995;
- 25. Sotiropoulos A, Gineitis D, Copeland J, Treisman R. Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. Cell. 1999;
- 26. Miralles F, Posern G, Zaromytidou AI, Treisman R. Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. Cell. 2003;
- Sisson TH, Ajayi IO, Subbotina N, Dodi AE, Rodansky ES, Chibucos LN, et al. Inhibition of myocardin-related transcription factor/serum response factor signaling decreases lung fibrosis and promotes mesenchymal cell apoptosis. Am J Pathol. 2015;
- 28. Kourakis S, Timpani CA, Campelj DG, Hafner P, Gueven N, Fischer D, et al. Standard of care versus new-wave corticosteroids in the treatment of Duchenne muscular dystrophy: Can we do better? Orphanet J Rare Dis. 2021;
- 29. Cordova G, Negroni E, Cabello-Verrugio C, Mouly V, Trollet C. Combined therapies for Duchenne muscular dystrophy to optimize treatment efficacy. Frontiers in Genetics. 2018.
- Cossu G, Previtali SC, Napolitano S, Cicalese MP, Tedesco FS, Nicastro F, et al. Intra- arterial transplantation of HLA - matched donor mesoangioblasts in Duchenne muscular dystrophy. EMBO Mol Med. 2015;
- 31. Komaki H, Nagata T, Saito T, Masuda S, Takeshita E, Sasaki M, et al. Systemic

administration of the antisense oligonucleotide NS-065/NCNP-01 for skipping of exon 53 in patients with Duchenne muscular dystrophy. Sci Transl Med. 2018;

- 32. Potter RA, Griffin DA, Heller KN, Peterson EL, Clark EK, Mendell JR, et al. Dose-Escalation Study of Systemically Delivered rAAVrh74.MHCK7.microdystrophin in the mdx Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy. Hum Gene Ther. 2021;
- Mendell JR, Sahenk Z, Lehman K, Nease C, Lowes LP, Miller NF, et al. Assessment of Systemic Delivery of rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin in Children with Duchenne Muscular Dystrophy: A Nonrandomized Controlled Trial. JAMA Neurol. 2020;
- Lowes LP, Alfano LN, Arnold WD, Shell R, Prior TW, McColly M, et al. Impact of Age and Motor Function in a Phase 1/2A Study of Infants With SMA Type 1 Receiving Single-Dose Gene Replacement Therapy. Pediatr Neurol. 2019;
- 35. Maffioletti SM, Gerli MFM, Ragazzi M, Dastidar S, Benedetti S, Loperfido M, et al. Efficient derivation and inducible differentiation of expandable skeletal myogenic cells from human ES and patient-specific iPS cells. Nat Protoc. 2015;
- Fiedorowicz K, Rozwadowska N, Zimna A, Malcher A, Tutak K, Szczerbal I, et al. Tissue-specific promoter-based reporter system for monitoring cell differentiation from iPSCs to cardiomyocytes. Sci Rep. 2020;
- Rodgers BD, Bishaw Y, Kagel D, Ramos JN, Maricelli JW. Micro-dystrophin Gene Therapy Partially Enhances Exercise Capacity in Older Adult mdx Mice. Mol Ther Methods Clin Dev. 2020;
- Périé S, Trollet C, Mouly V, Vanneaux V, Mamchaoui K, Bouazza B, et al. Autologous myoblast transplantation for oculopharyngeal muscular dystrophy: A phase I/IIa clinical study. Mol Ther. 2014;
- 39. Rajput BS, Chakrabarti SK, Dongare VS, Ramirez CM, Deb KD. Human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of Duchenne muscular dystrophy: Safety and feasibility study in India. J Stem Cells. 2015;
- 40. Austin L, de Niese M, McGregor A, Arthur H, Gurusinghe A, Gould MK. Potential oxyradical damage and energy status in individual muscle fibres from degenerating muscle diseases. Neuromuscul Disord. 1992;
- 41. Hauser E, Hoger H, Bittner R, Widhalm K, Herkner K, Lubec G. Oxyradical damage and mitochondrial enzyme activities in the mdx mouse. Neuropediatrics. 1995;
- 42. Aaron Hobbs G, Zhou B, Cox AD, Campbell SL. Rho GTPases, oxidation, and cell redox control. Small GTPases. 2014.
- Kim JG, Choi KC, Hong CW, Park HS, Choi EK, Kim YS, et al. Tyr42 phosphorylation of RhoA GTPase promotes tumorigenesis through nuclear factor (NF)-κB. Free Radic Biol Med. 2017;
- Kim JG, Kim MJ, Choi WJ, Moon MY, Kim HJ, Lee JY, et al. Wnt3A Induces GSK-3β Phosphorylation and β-Catenin Accumulation Through RhoA/ROCK. J Cell Physiol. 2017;
- 45. Li YP. TNF-α is a mitogen in skeletal muscle. Am J Physiol Cell Physiol.

2003;285(2 54-2).

46. Sadler KJ, Gatta PAD, Naim T, Wallace MA, Lee A, Zaw T, et al. Striated muscle activator of Rho signalling (STARS) overexpression in the mdx mouse enhances muscle functional capacity and regulates the actin cytoskeleton and oxidative phosphorylation pathways. Exp Physiol. 2021;

STRESZCZENIE

Wstęp: Choroba Duchenne'a (DMD) jest obiektem wieloletnich badań zarówno podstawowych, jak i klinicznych. Obecna wiedza pozwala skupić się na poszukiwaniu nowych terapeutycznych rozwiązań mających na celu leczenie przyczynowe, zamiast leczenia objawowego. Ze względu na różnorodność mutacji w genie *DMD* poszukuje się uniwersalnego podejścia, mającego wpływ na zastosowanie wspólnej terapii dla wsparcia funkcji mięśni szkieletowych. Celem niniejszego badania było opracowanie linii komórek mezoangioblastycznych modyfikowanych konstrukcją lentiwirusową zawierają sekwencję dla mikrodystrofiny (*µDYS*), które mogłyby poprawić funkcję mięśni szkieletowych pacjentów z dystrofią mięśniową Duchenne'a o różnym podłożu genetycznym.

Materiał i metody: W badaniach wykorzystano indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (iPSc), przeprogramowane z komórek mięśniowych pozyskanych od chorych na DMD chłopców o fenotypach łagodnym i ciężkim (n=4) oraz od osoby zdrowej (kontrola), które zróżnicowano w komórki o charakterze mezenchymalnym (HIDEMs). Następnie zastosowano lentiwirusową konstrukcję zawierającą sekwencję dl µDYS do transdukcji komórek HIDEMs. Obserwowano wpływ transdukcji na ścieżkę sygnałową aktywatora mięśni poprzecznie prążkowanych RhoA (STARS) oraz parametry stresu oksydacyjnego, w celu zbadania drugorzędowych skutków rozwoju DMD. Transdukowane komórki podano myszom mdx (n=4), a następnie sprawdzono wpływ zastosowanej terapii na długość pokonanego dystansu oraz liczbę przyjętych przez zwierzę szoków elektrycznych podczas eksperymentów na bieżni w odniesieniu do grupy SHAM (n=4) oraz myszy zdrowych (kontrolnych, n=4).

Wyniki: Wykazano pluripotentny charakter komórek iPSc, a następnie wyhodowane autologiczne komórki iPSc od poszczególnych pacjentów i kontroli zróżnicowano do komórek HI-DEMs, potwierdzając ich mezenchymalny charakter. Komórki poddano transdukcji lentiwirusowej zawierająsej sekwencję μDYS , uzyskując jej nadekspresję we wszystkich badanych liniach komórkowych za wyjątkiem pacjenta tetraplegicznego. Zbadano poziomy ekspresji genów wchodzących w skład ścieżki sygnałowej STARS. Stwierdzono wzrost ekspresji *SRF NFKB1* i *TNFA* jedynie w komórkach u pacjenta 38 (p < 0,001). Zbadano również poziom aktywności enzymów katalazy (CAT) i dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) oraz poziom całkowitej pojemności antyoksydacyjnej w homogenizatach komórek HIDEMs transdukowanych mikrodystrofiną i bez. Stwierdzono spadek aktywności CAT oraz TAC oraz wzrost aktywności SOD u pacjentów 34 oraz 38 (p < 0,001) o łagodnym fenotypie. Transdukowane komórki zostały przeszczepione myszom *mdx* do mięśnia piszczelowego przedniego. Myszy *mdx* poddano testom na bieżni, nie uzyskując istotnych różnic w pokonanym dystansie u myszy kontrolnych wobec myszy poddanych terspii komórkowej. Zaobserwowano znamiennie niższą liczbę szoków elektrycznych u myszy poddanych interwencji HIDEMs z mikrodystrofiną.

Wnioski: Wyniki sugerują, że zastosowanie transdukcji komórek konstrukcją lentiwirusową zawierającą sekwencję μDYS może wpływać na zmniejszenie stresu oksydacyjnego w komórkach. Jednak oddziaływanie to uzyskiwało znamienność statystyczną w komórkach pobranych od pacjentów o łagodnym przebiegu choroby DMD.

ABSTRACT

Introduction:. Duchenne disease (DMD) has been the hot topic for many years. For both fundamental and clinical research. Current knowledge allows us to focus on new therapeutic strategies to cure the genetic cause of the disease instead of symptomatic treatment. Due to the diversity of mutations in the DMD gene, a universal approach is being sought, applicable in unified therapy. The aim of this study was to develop mesoangioblast cell lines modified with a lentiviral construct containing the microdystrophin sequence (μDYS), which could potentially improve skeletal muscle function in DMD patients with different genetic background.

Material and Methods: Induced pluripotent stem cells (iPSc), derived from dystrophic cells of boys with DMD (n=4, of mild and severe phenotype) and healthy person (control), were differentiated into mesenchymal-like cells (HIDEMs). A lentiviral construct containing the μDYS sequence was then used to transduce HI-DEMs cells, and the effects of transduction on the striated muscle activator RhoA (STARS) signaling pathway and oxidative stress parameters were observed as the second-order effects of DMD development. Transduced cells were administered to *mdx* mice (n=4), and the effect of the treatment on the distance traveled and the number of electrical shocks received by the animal during treadmill experiments was checked against a group of SHAM (n=4) and healthy (control, n=4) mice.

Results: The pluripotent nature of received iPSc cells was demonstrated, then the cultured *in vitro* cells from all the DMD patients and control were differentiated into HIDEMs cells, confirming their mesenchymal-like characteristics. Cells were then subjected to lentiviral transduction containing the μDYS sequence, achieving its overexpression in all the cell lines tested with exception of cells derived from tetraplegic patient. The expression levels of genes included in the STARS signaling pathway were checked. An increase in SRF expression was found only in patient 38 cells with mild DMD phenotype (p < 0.001). The activity levels of the enzymes catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), as well as the level of total antioxidant capacity in homogenates of HIDEMs cells were also examined, and a decrease in CAT and TAC activities and an increase in SOD activity were found in patients 34 and 38 (p < 0.001). Transduced cells were transplanted into mice into the *tibialis anterior* muscle. Mice were subjected to treadmill tests, yielding a significant differences in distance covered by control mice versus *mdx* mice with HIDEMs cells with/without transduction with microdystrophin did not reveal differences in a treadmill reached distance, however significantly disminished the number of electric shocks in a group at *mdx* mice subjected to transduced HIDEMs cell intervention.

Conclusions: The results suggest that the use of cell therapy including HIDEMs transduction with a lentiviral construct containing the μDYS sequence may have the effect the level of oxidative stress and its regulatory STARS signaling pathway. However, the significant differences were found only in the cells derived from DMD patients with mild phenotype.