



**INNOWACYJNA
GOSPODARKA**
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



KSIĄŻKA ABSTRAKTÓW

SZKOŁY ZIMOWEJ
dla doktorantów oraz pracowników
naukowych nieposiadających
tytułu naukowego doktora

organizowanej w związku z realizacją projektu
pn. „***Innowacyjne metody wykorzystania***
komórek macierzystych w medycynie”
(POIG.01.01.02-00-109/09)

współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu
Rozwoju Regionalnego Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka



SZKOŁA ZIMOWA

**DOTYCZĄCA OBRAZOWANIA MAKROCZĄSTECZEK,
KOMÓREK, TKANEK I NARZĄDÓW**

15-16 grudnia 2014r., Warszawa

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

WYBRANE ZAGADNIENIA

- **Fluorescencyjne obrazowanie aktywności makrocząsteczek**
 - **Obrazowanie struktur sub-komórkowych**
 - **Obrazowanie komórek macierzystych**
 - **Laserowa cytometria skaningowa**
 - **Przyżyciowa mikroskopia dwufotonowa**
 - **Mikroskopia elektronowa w 3D**
- **Wysokorozdzielcze obrazowanie ultrasonograficzne**
 - **Obrazowanie struktury i funkcji ludzkiego mózgu**

KOMITET ORGANIZACYJNY

prof. dr hab. Leszek Kaczmarek

dr Małgorzata Zawadzka

dr Artur Czupryn

prof. dr hab. Grzegorz Wilczyński

dr hab. Jakub Włodarczyk

prof. dr hab. Mariusz Ratajczak

mgr Katarzyna Fiedorowicz



**INNOWACYJNA
GOSPODARKA**
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



PATRONI HONOROWI

Rektor Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie
Prof. dr hab. Andrzej Ciechanowicz



Dyrektor Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
Prof. dr hab. Adam Szewczyk



instytut biologii doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN



Spis treści:

AD-O64.3: IFN- γ – TRAIL fusion protein. Use of two independent signaling pathways for a strong synergistic antitumor effect

Beata Chęcińska, Bartłomiej Żerek, Sebastain Pawlak, Anna Pieczykolan, Piotr Różga, Michał Szymanik, Albert Jaworski, Marlena Gałązka, Katarzyna Bukato, Wojciech Strożek, Jerzy Pieczykolan..... 7

ADEM czy MS? Przypadek stwardnienia rozsianego u młodej atletki wstępnie zdiagnozanej jako ostre rozsiane zapalenie mózgu i rdzenia

Urszula Skrobias, Anna Jamroz-Wiśniewska, Konrad Rejdak..... 7

Characterization of a novel group phosphodiesterase 9a inhibitors as putative therapeutics for cognitive dysfunction

Mikołaj Matłoka, Sylwia Janowska, Rafał Moszczyński, Jakub Majer, Małgorzata Borkowska, Paweł M. Boguszewski, Daria Zdzałik, Joanna Hucz-Kalitowska, Filip Stefaniak, Monika Lamparska-Przybysz, Krzysztof Dubiel, Maciej Wieczorek, Łukasz Bojarski..... 8

Effects of TKIs: sunitinib and sorafenib treatment on human kidney CSCs in 2D and 3D culture models

Zofia F. Bielecka, Cezary Szczylik, Anna M. Czarnecka 8

Efficient isolation of rare stem and precursor cell populations responding to the central nervous system traumatic injury by use of fluorescence activated cell sorting

Katarzyna Konarzewska,, Bartosz Wylot, Marta Brewińska - Olchowik, Katarzyna Piwocka, Małgorzata Zawadzka9

Fertilization-induced Ca²⁺ oscillations and cytoplasmic movements in maternally aged mammalian oocytes

Katarzyna Czajkowska, Anna Ajduk9

Genotoxic response of Human Umbilical Cord Blood Neural Stem Cells (HUCB-NSC) to methylmercury chloride treatment

Justyna Augustyniak, Zychowicz Marzena, Buzanska Leonora 10

Hodowla Komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej

Bartosz Sikora, Małgorzata Kimsa, Aleksandra Skubis, Jolanta Adamska, Urszula Mazurek10

Hodowla ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej w układzie kokultury z rąbkim rogówki

Skubis Aleksandra, Kimsa Małgorzata ,Sikora Bartosz ,Adamska Jolanta , Mazurek Urszula11

Hodowla pierwotna komórek macierzystych izolowanych z rąbka rogówki

Małgorzata Kimsa, Aleksandra Skubis, Bartosz Sikora, Jolanta Adamska, Urszula Mazurek.....11



<i>Isolation, identification and characterization of induced pluripotent stem cell-derived nano-sized extracellular vesicles</i>	
Marta Adamiak, Sylwia Bobis-Wozowicz, Zbigniew Madeja, Ewa Zuba-Surma	12
<i>Jednoczesna detekcja białek i mRNA przy użyciu immunofluorescencji oraz smRNA FISH</i>	
Jakub Kochan, Mateusz Wawro, Aneta Kasza	13
<i>MicroRNA-mediated regulation of expression of SRSF1 and hnRNPA1 in renal cancer</i>	
Joanna Bogusławska, Elżbieta Sokół, Hanna Kędzierska, Piotr Popławski, Beata Rybicka, Zbigniew Tański, Agnieszka Piekiełko-Witkowska.....	13
<i>Nanowłókna polikaprolakton/ chitozan jako rusztowania komórkowe do regeneracji tkanki chrzęstnej</i>	
Olga Urbanek, Dorota Kołbuk, Paweł Sajkiewicz	14
<i>Neuronal and glial progenitors obtained from human iPS cells on 3D modified collagen scaffolds – the tool for the neurodevelopmental and neurotoxicity studies</i>	
Marzena Zychowicz, Krystyna Pietrucha, Martyna Podobińska, Justyna Augustyniak, Hanna Winiarska, Leonora Bużańska	14
<i>Neuronal circuits of socially transferred fear</i>	
Karolina Rokosz, Ewelina Knapska	15
<i>Obrazowanie sztywności tkanek za pomocą złożenia fal o różnych częstotliwościach</i>	
Michał Byra, Andrzej Nowicki, Jerzy Litniewski, Janusz Wójcik	15
<i>Poszukiwanie endogennych czynników warunkujących fenotyp ludzkich fibroblastów z uszkodzonym szlakiem anemii Fanconiego</i>	
Ewelina M. Szmajda, Konrad Kosicki, Barbara Tudek, Elżbieta Speina	16
<i>Role of HAX-1 protein in cell migration and invasion</i>	
Ewelina Macech, Alicja Trębińska, Ryszard Konopiński, Ewa Grzybowska	17
<i>Self-adjuvanting influenza candidate vaccine carrying HA and M1 epitopes on a multivalent nanoplatform</i>	
I. Szurgot, E. Szolajska, David Laurin, B. Lambrecht, Jadwiga Chroboczek	17
<i>Stably fluorescently labeled cell lines as useful tool for cytotoxicity studies and coculture models</i>	
Karolina Ewa Zakrzewska, Anna Samluk, Krzysztof Dariusz Pluta, Dorota Genowefa Pijanowska	18
<i>Subpopulacje komórek iNKT we krwi obwodowej u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową</i>	
Małgorzata Waldowska, Justyna Woś, Wioleta Kowalska, Agnieszka Bojarska-Junak, Waldemar Tomczak	18



The proangiogenic factors profile of human amniotic membrane derived from diferent donors and different methods of delivery

Litwiniuk Małgorzata, Grzela Tomasz 19

The relationship between myeloid-derived suppressor cells, microrna and cancer stem cells in ovarian cancer

Karolina Okła, Justyna Surówka, Anna Wawruszak, Olga Ludera, Iwona Wertel 19

The role of SWI/SNF ATP-dependent chromatin remodeling complex in epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells

Elżbieta Sarnowska, Iga Jancewicz, Ewelina Macech, Paulina Kondrak, Katarzyna Pogoda, Wojciech Olszewski, Janusz Siedlecki, Tomasz Sarnowski20

Wpływ czynników wzrostowych uwalnianych przez ludzką owodnię na komórki śródbłonka pępowiny HUVEC

Zofia Grzywocz, Ewa Pius-Sadowska, Stanisława Sabalińska, Grażyna Hoser, Bogusław Machaliński, Jerzy Kawiak21

Wykorzystanie modyfikowanego białka GFP oraz modyfikowanego przeciwciała monoklonalnego anty CD20 do analizy białaczkowych linii B i T komórkowych

Marek Gryzik, Radosław Stachowiak, Jacek Bielecki, Jerzy Kawiak, Grażyna Hoser21

Very Small Embryonic-Like Stem Cells (VSELs) are activated by ischemic limb injury and may participate in tissue regeneration

Anna Łabędź-Masłowska, Elżbieta Karnas, Dominika Berdecka, Tomasz Brzozowski, Mariusz Z. Ratajczak, Zbigniew Madeja, and Ewa K. Zuba-Surma22

Zastosowanie biodegradowalnych membran półprzepuszczalnych w hodowlach komórkowych

Aleksandra Kutkowska, Ewa Łukowska, Andrzej Chwojnowski23



AD-O64.3: IFN- γ – TRAIL fusion protein. Use of two independent signaling pathways for a strong synergistic antitumor effect

Beata Chęcińska, Bartłomiej Żerek, Sebastain Pawlak, Anna Pieczykolan,
Piotr Różga, Michał Szymanik, Albert Jaworski, Marlena Gałązka,
Katarzyna Bukato, Wojciech Strożek,, Jerzy Pieczykolan
Adamed Sp. z o. o.

Obtained protein has well-defined secondary and quaternary structure and partially verified mechanism of action. The molecule showed in vitro specific cytotoxic effect on various cancer cell lines (IC50 below 0,1 ng/ml). New protein showed very low activity on normal cells. In vivo AD-O64.3 showed promising effect displaying significant tumor volume inhibition.

ADEM czy MS? Przypadek stwardnienia rozsianego u młodej atletki wstępnie zdiagnozanej jako ostre rozsiane zapalenie mózgu i rdzenia

Urszula Skrobas, Anna Jamroz-Wiśniewska, Konrad Rejda
1) Katedra i Klinika Neurologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, 2) Katedra i Zakład Anatomii Prawidłowej Człowieka 3

Wprowadzenie

Zarówno stwardnienie rozsiane (MS) jak i ostre rozsiane zapalenie mózgu i rdzenia (ADEM) są autoimmunologicznymi chorobami demielinizacyjnymi ośrodkowego układu nerwowego. Pacjenci z ADEM często mają zaburzenia psychiczne oraz dodatnie objawy oponowe. U większości pacjentów z SM stwierdza się dodatnie prążki oligoklonalne IgG w płynie mózgowo-rdzeniowym, które są rzadkie w ADEM. Wreszcie, MRI w MS pokazuje plaki demielinizacyjne w istocie białej, natomiast w zmiany w ADEM występują na pograniczu istoty białej i szarej.

Opis przypadku

22-letnia lekkoatletka została przyjęta do szpitala w Puławach z powodu parestezji, osłabienia mięśni kończyn dolnych oraz podwójnego widzenie. W związku z zaostreniem objawów Pacjentka została przeniesiona do szpitala PSK4 w Lublinie. Stan chorej gwałtownie się pogorszał. Badania MRI głowy ujawniły rozsiane ogniskowe zmiany o charakterze zapalnym w mózgu i rdzeniu kręgowym. Po pomyślnym leczeniu- stosowaniu dużych dawek kortykosteroidów i poprawie stanu klinicznego, pacjentka została odesłana do domu ze wstępnym rozpoznaniem ADEM. Jednakże, ze względu na kolejne zaostrenia w przebiegu choroby okazało się, że rozpoznanie wymaga weryfikacji i ostatecznie zdiagnozowano MS. Leczenie obejmowało metyloprednizolon oraz IFN-beta. Obecnie Pacjentka przyjmuje fingolimod.



Dyskusja

ADEM jest uderzająco podobny do MS pod względem klinicznym i patologicznym, dlatego bardzo ważna jest wnikliwa diagnostyka różnicowa i follow-up pacjentów.

Characterization of a novel group phosphodiesterase 9a inhibitors as putative therapeutics for cognitive dysfunction

Mikołaj Matłoka, Sylwia Janowska, Rafał Moszczyński, Jakub Majer, Małgorzata Borkowska, Paweł M. Boguszewski, Daria Zdzałik, Joanna Hucz-Kalitowska, Filip Stefaniak, Monika Lamparska-Przybysz, Krzysztof Dubiel, Maciej Wieczorek, Łukasz Bojarski
SMM, Warszawski Uniwersytet Medyczny; Celon Pharma S.A.

Disruption of neuronal nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate (NO/cGMP) pathway and alterations in cGMP dependent gene expression are linked to synapse dysfunction observed in aging and Alzheimer's disease. Inhibition of cGMP hydrolysis by phosphodiesterase 9A (PDE9A) was demonstrated to improve memory in preclinical models of cognition. In the present study we characterized activity and drug-like properties of a novel group of PDE9A inhibitors. Several inhibitors designed and synthesized in our laboratory were found to be potent PDE9A inhibitors with IC50s in the range of 14,2 to 72,7 nM. All these compounds displayed no substantial inhibition of other PDEs at concentrations equal to 15 x IC50 except of one that inhibited 66% of PDE1C activity. CPL204104 and CPL204015 were the most metabolically stable. CPL204015 caused a significant reduction of social investigation time in rat social recognition model of natural forgetting when administered orally in a dose of 3 mg/kg. Summarizing, a novel group of potent PDE9A inhibitors has been characterized. CPL204104 and CPL204015 were identified as the most promising candidates for further development. Both compounds were found orally available and brain penetrant. CPL204015 produced procognitive effects in rats.

Effects of TKIs: sunitinib and sorafenib treatment on human kidney CSCs in 2D and 3D culture models

Zofia F. Bielecka, Cezary Szczylik, Anna M. Czarnecka
Laboratorium Onkologii Molekularnej, Klinika Onkologii, Wojskowy Instytut Medyczny w Warszawie
/ Studium Medycyny Molekularnej WUM

Tyrosine kinase inhibitors play a crucial role in cancer therapy. This study shows the real-time effect of two TKIs: sunitinib and sorafenib treatment on "human kidney cancer stem cells" (HKCSCs). It was shown that 3D cell culture models better mimic tumor microenvironment than cells cultured in monolayer. This research reveals that HKCSCs are more vulnerable to both TKIs in normoxia conditions (~5% oxygen concentration), comparing to primary clear-cell renal cell



carcinoma 796-P cell line. The results show as well that small dosages of sunitinib results in a slight increase of aggressiveness in HKCSCs.

In this research, AMC and ZFB have been supported by the Lider NCBiR grant no. Lider/031/625/L-4/NCBR/2013.

Efficient isolation of rare stem and precursor cell populations responding to the central nervous system traumatic injury by use of fluorescence activated cell sorting

Katarzyna Konarzewska¹, Bartosz Wylot¹, Marta Brewińska - Olchowik², Katarzyna Piwocka²,
Malgorzata Zawadzka¹.

¹ Laboratory of Transcription Regulation, Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, Poland
² Laboratory of Cytometry, Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, Poland

The central nervous system is populated by a number of stem and progenitor cell populations which, when responding to the tissue injury, might have potential to support regenerative processes in damaged tissue. The aim of present study was to develop a strategy for highly effective and pure sorting of these unique populations. We used fluorescence activated cell sorting, which appears to be the ideal tool for efficient isolation of such populations. We have chosen mouse model of stab wound injury of cerebral cortex, of which 3 or 6 days after injury we were obtaining material for further analysis. Intact and injured brain cortex was dissociated and the cell suspension was cleared of myelin followed by the lineage-positive cells depletion. Rare populations of Sca1+lin-CD45- (so called very small embryonic-like stem cells) as well as Sca1+lin-CD45+ hematopoietic stem cells and oligodendrocyte precursor cells were sorted with FACS Aria I according to the specific cell markers. Using immunohistochemical staining and gene expression analysis we confirmed an identity of isolated populations. Proposed strategy of effective isolation of rare stem and precursor cell populations may be a useful tool for further functional studying their biology and differentiation potential in vitro and in vivo.

Fertilization-induced Ca²⁺ oscillations and cytoplasmic movements in maternally aged mammalian oocytes

Katarzyna Czajkowska, Anna Ajduk
Zakład Embriologii, Instytut Zoologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1,
02-096 Warszawa

Infertility in advanced reproductive age is a serious issue in our modern society, as the average age at which women decide to have children is constantly increasing. Problem with conceiving a child after the age of 35 years is related to oocyte aging in woman's organism (so called maternal aging). Maternal aging causes not only abnormalities in the nuclear apparatus, but also improper



functioning of several processes taking place in the cytoplasm. One of the mechanisms that involve cytoplasmic factors and is crucial for embryo development is homeostasis of calcium ions. During fertilization, sperm-induced calcium oscillations lead to completion of meiosis and onset of embryonic development. Interestingly, calcium oscillations induce contractions of actin cytoskeleton, which result in cytoplasmic movements. The dynamics of these movements is a predictor of developmental potential of oocytes. Results of our research prove that maternal aging affects the pattern of Ca²⁺ oscillations and the dynamics of cytoplasmic movements in fertilized oocytes of mouse. In oocytes of aged females the amplitude of calcium peaks was lower and the duration of particular peaks and the intervals between peaks were longer than in oocytes of young females. The basal speed of cytoplasmic movements was lower in oocytes exposed to maternal aging. These results highlight the importance of calcium homeostasis as a cytoplasmic factor in development of age-dependent infertility in females.

Genotoxic response of Human Umbilical Cord Blood Neural Stem Cells (HUCB-NSC) to methylmercury chloride treatment

Justyna Augustyniak, Zychowicz Marzena, Buzanska Leonora
Mossakowski Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, NeuroRepair Department,
Warsaw, Poland

Methylmercury chloride (MeHgCl) is one of six known up to date developmental neurotoxins. Our previous data indicated, that the degree of neurotoxic insult in Human Umbilical Cord Blood Neural Stem Cells (HUCB-NSC), caused by MeHgCl depends upon their developmental stage, the duration of exposure and the accumulated dose. We have also shown, that the niche surrogate such as 3D collagen scaffold and low oxygen level conditions change the response of HUCB-NSC to MeHgCl observed in typical 2D in vitro culture. In this report we are testing whether the treatment with MeHgCl induce also genotoxic effect in HUCB-NSC. The obtained data revealed that upon high dose of neurotoxin the cells responded with chromosomal abnormalities like: micronucleus (MN), nucleoplasmic bridge (NPBs) and nuclear bud formation (NBuds). Such abnormalities are related with: chromosome break or loss (MN), chromosomal rearrangement (NPBs) and gene amplification (NBuds), accordingly. The presence of binucleated cells (BN) in the culture treated with high doses of MeHgCl suggest disorders in the process of cytokinesis. Thus the neural progenitors derived from umbilical cord blood responded to MeHgCl treatment with abnormalities typical for genotoxic insult.

Hodowla Komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej

Bartosz Sikora, Małgorzata Kimsa, Aleksandra Skubis, Jolanta Adamska, Urszula Mazurek
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet
Medyczny w Katowicach, Zakład i Katedra Biologii Molekularnej.



Tkanka tłuszczowa pochodzi z listka zarodkowego jakim jest mezoderma i zawiera w swoim składzie populację mezenchymalnych komórek macierzystych ADSC (ang Adipose-Derived Stem Cells). Pobranie materiału przebiega z wykorzystaniem metod chirurgicznych, biopsji, liposukcji, metod laparoskopowych czy ultradźwięków. Izolacja komórek składa się z kilku zasadniczych etapów. Niezwykle ważne jest zastosowanie antybiotyków w celu wyeliminowania drobnoustrojów z tkanki uniemożliwiających prawidłową hodowlę w warunkach sterylnych. Konieczne jest także wykorzystanie zoptymalizowanej pożywki zapewniającej rozwój komórek tego typu. Do identyfikacji komórek macierzystych wykonywane są testy immunocytochemiczne lub reakcje łańcuchowej polimerazy z wykorzystaniem starterów specyficznych dla zdefiniowanych markerów, charakterystycznych dla danego typu komórek. Komórki tkanki tłuszczowej ocenia się na podstawie obecności markerów powierzchniowych tj CD90 i CD105.

Hodowla ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej w układzie kokultury z rąbkiem rogówki

Skubis Aleksandra, Kimsa Małgorzata ,Sikora Bartosz ,Adamska Jolanta , Mazurek Urszula
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet
Medyczny, Katedra i Zakład Biologii Molekularnej

Mezenchymalne komórki macierzyste (MSC - ang mesenchymal stem cells) dzięki swoim wielokierunkowym zdolnościom odnawiania i różnicowania w inne linie komórkowe budzą ogromne nadzieje w związku z możliwością zastosowania ich w medycynie regeneracyjnej.(MSC) należą do komórek multipotentnych, mogą przekształcić się przede wszystkim w osteoblasty, chondrocyty czy adipocyty. Jednakże liczne badania potwierdzają również ich zdolność różnicowania w inne typy komórek pochodzące ze wszystkich trzech linii zarodkowych. Są one obecne w szpiku kostnym, krwi pępowinowej, tkance tłuszczowej oraz mięśniach. Wykazują ekspresję antygenów CD73, CD90 oraz CD105.Kokultura czyli hodowla mieszana to metoda wykorzystująca dwa lub więcej typów komórek w hodowli oddziałujących na siebie. Zapewnia to lepszą wydajność hodowli.Jedną z hipotez zakłada, że plastyczność MSC jest na tyle obszerna, że wykazują one zdolność do różnicowania w komórki nabłonkowe rogówki. Może być to nowa droga w leczeniu ciężkich, nieodwracalnych uszkodzeń powstałych w wyniku urazów, zabiegów operacyjnych, czynników chemicznych oraz fizycznych.

Hodowla pierwotna komórek macierzystych izolowanych z rąbka rogówki

Małgorzata Kimsa, Aleksandra Skubis, Bartosz Sikora, Jolanta Adamska, Urszula Mazurek
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet
Medyczny w Katowicach, Katedra i Zakład Biologii Molekularnej



Okolo 60% chorób rogówki, będących przyczyną ślepoty rogówkowej, kwalifikuje się do przeszczepu. Istniejącym problemem jest jednak niedobór rogówek przeznaczonych do transplantacji. Wcześniejsze badania wykazały, że ksenotransplantacje rogówek pochodzących od świń mogą znaleźć zastosowanie kliniczne. Wykazano, że antygen Gal, którego obecność indukuje nadostre odrzucenie ksenogenicznego przeszczepu, jest prawie nieobecny w świńskiej rogówce. Komórki macierzyste rąbka rogówki (LESCs, ang. limbal epithelial stem cells) są komórkami o dużym potencjale proliferacyjnym i zdolnością tworzenia kolonii. Badania wykazały, że stanowią one tylko ok. 2-9% komórek rąbka *in vivo*. Hodowanie *ex vivo* komórek LESCs na odpowiednich podłożach, a następnie ich transplantacja stanowi obiecującą strategię terapeutyczną uszkodzeń rogówki. Celem pracy było otrzymanie i hodowla komórek rąbka rogówki pobranego od świń. Hodowle prowadzono w układzie monokultury w pożywce DMEM (pożywka Eagle'a w modyfikacji Dulbecco, ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium) wzbogaconej 10% FBS (płodowa surowica bydlęca, ang. fetal bovine serum) i gentamycyną (25mg/100ml). Optymalizacja hodowli komórek wywodzących się z rąbka rogówki, metod ich identyfikacji i stopnia zróżnicowania oraz opracowanie nowych podłoży dla hodowli tych komórek w warunkach *in vitro* w przyszłości może przyczynić się do zwiększenia bezpieczeństwa i liczby przeszczepów komórek nabłonka rąbka rogówki.

Isolation, identification and characterization of induced pluripotent stem cell-derived nano-sized extracellular vesicles

Marta Adamiak, Sylwia Bobis-Wozowicz, Zbigniew Madeja, Ewa Zuba-Surma
Department of Cell Biology, Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University, Krakow, Poland

Cells release nano-sized vesicles into their milieu by shedding from the plasma membrane or through secretion from endosomal compartments. Extracellular vesicles (EVs) contain bioactive molecules and can be detected in cell culture supernatants where they function as vehicles for intercellular communication. Here, we characterized the molecular composition of EVs collected by differential centrifugation of conditioned media harvested from the culture of induced pluripotent stem cells (iPSCs) and investigated the transfer of RNA via EVs. By Western blot we found that iPSC-derived EVs express exosomal proteins CD9 and CD63. We detected the presence of RNA in EVs and compared the level of transcripts related to pluripotency, angio- and cardiomyogenesis in EVs and iPSCs by real-time RT-PCR. The results showed that EVs are enriched in transcripts for Gata4 compared to their parental cell line. We investigated the transfer of mRNAs by incubation of murine EVs with human cells and subsequent analysis of gene expression levels in target cells. The transfer assay demonstrated that EVs can mediate the transfer of mRNAs from pluripotent donor cells to mature cells.

These findings suggest that stem cell-derived EVs are important mediators of signaling and may be potentially utilized as therapeutic tools for transferring bioactive components to target cells.



Jednoczesna detekcja białek i mRNA przy użyciu immunofluorescencji oraz smRNA FISH

Jakub Kochan, Mateusz Wawro, Aneta Kasza
Zakład Biochemii Komórki, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński

Nie tylko obecność RNA w konkretnych komórkach, ale jego lokalizacja wewnątrzkomórkowa decyduje o jego funkcji. W nowotworach, a także w przypadku innych schorzeń, transkrypty są często znajdowane w niewłaściwych dla nich lokalizacjach. Z tego powodu w ciągu ostatnich lat coraz więcej badań skupia się na analizie położenia RNA oraz poszukiwaniu metod obrazowania transkryptów.

Świadomość, że ekspresja genów w poszczególnych komórkach w sposób znaczący różni się od uśrednionego zachowania całej populacji przyczyniła się do rozwoju nowych metod pozwalających na ilościowe oznaczenie RNA w pojedynczych komórkach. Jedną z nich jest smRNA FISH – fluorescencyjna hybrydyzacja in situ do detekcji RNA połączona z analizą mikroskopową uzyskanych preparatów. Metoda ta pozwala na uzyskanie nieosiągalnej do tej pory czułości, specyficzności sygnału i znakomitej jakości obrazu. Jest to jedyna dostępna metoda pozwalająca na proste, precyzyjne i stosunkowo szybkie oznaczanie ilości RNA w utrwalonych komórkach.

Prawdziwe wyzwanie stanowi jednak połączenie smRNA FISH z immunofluorescencyjną detekcją białek. Przedstawiamy opracowaną i sprawdzoną w naszym laboratorium procedurę pozwalającą na jednoczesną detekcję białka oraz RNA opartą o metodę fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ do detekcji pojedynczych cząsteczek RNA (smRNA FISH). Połączenie tych metod otwiera nowy rozdział w badaniach oddziaływania białek z RNA, w tym na obrazowanie szczególnie interesujących świat naukowy w ostatnich latach białek regulujących czas półtrwania transkryptów.

MicroRNA-mediated regulation of expression of SRSF1 and hnRNPA1 in renal cancer

Joanna Bogusławska, Elżbieta Sokół, Hanna Kędzierska, Piotr Popławski, Beata Rybicka,
Zbigniew Tański, Agnieszka Piekielko-Witkowska
Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego

SRSF1 and hnRNPA1 are antagonistically acting splicing factors involved in constitutive and alternative splicing reactions. Our previous studies showed disturbances in expression of SRSF1 and hnRNPA1 in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), the most common type of renal cancer. Disturbed expression of the splicing factors in ccRCC may be caused by different factors, e.g. miRNAs. These short, non-coding RNA molecules regulate gene expression via binding to 3'UTRs of mRNAs, leading to inhibition of translation or degradation of transcript. In this work we hypothesize that SRSF1 and hnRNPA1 expression may be regulated by miRNAs in ccRCC. Our results indicate that in ccRCC cells miR-206 is a regulator of SRSF1 as well as hnRNPA1,



whereas miR-1 and miR-149-5p regulate hnRNPA1 expression. The studies were performed on ccRCC tissue samples, ccRCC-derived cell lines, transfections of miRNA mimics and negative controls and real-time PCR. Functional studies on direct interactions between the miRNAs and target 3'UTRs are currently being performed. To our knowledge this is the first study describing the role of miRNAs in the regulation of splicing factors in ccRCC. This project is supported by the programme of Polish Science

Foundation: PARENT/BRIDGE co-financed from European Union funds under Innovative Economy Operational Programme 2007-2013.

Nanowłókna polikaprolakton/ chitozan jako rusztowania komórkowe do regeneracji tkanki chrzęstnej

Olga Urbanek, Dorota Kołbuk, Paweł Sajkiewicz
Instytut Podstawowych Problemów Techniki PAN

Dwuskładnikowe nanowłókna polikaprolakton/ chitozan są obiecującą alternatywą dla regeneracji tkanki chrzęstnej. Chitozan charakteryzują się wysokim podobieństwem strukturalnym do glikozaminoglikanów (GAG), naturalnych składników macierzy zewnątrzkomórkowej oraz wysoką hydrofilowością, co korzystnie wpływa na adhezję i proliferację komórek. Polimer syntetyczny, jakim jest polikaprolakton, poprawia na właściwości mechaniczne formowanych włókien oraz czas degradacji hydrolitycznej rusztowania. Rusztowanie komórkowe w postaci elektroprzędzonych nanowłókien są także elementem biomimetycznego podejścia w projektowaniu rusztowań komórkowych, ze względu na wysokie podobieństwo do układu białek i polisacharydów w macierzy zewnątrzkomórkowej. Zarówno struktura jak i skład formowanych nanowłókien mogą wpływać na czas w jakim komórki osiagają właściwą im morfologię i podejmują swoje funkcje.

Neuronal and glial progenitors obtained from human iPS cells on 3D modified collagen scaffolds – the tool for the neurodevelopmental and neurotoxicity studies

Marzena Zychowicz, Krystyna Pietrucha, Martyna Podobińska, Justyna Augustyniak, Hanna Winiarska, Leonora Bużańska
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im.M. Mossakowskiego PAN

Since the induced pluripotent stem cells (iPSC) can be obtained from the adults, the regenerative medicine can be supported by new tools comprising autologous iPS-derived cells. The neurodegenerative diseases are in the scope of current research based on the iPS cells technology while biomaterials combined with the iPS derived cells can have a great potential to fulfill the demands of neuroregeneration of CNS. Here we describe the possibility of neural commitment and differentiation of iPSC as well as HUCB-NSC cells seeded onto the chemically



modified collagen scaffolds for establishing and standardization the in vitro “biomimetic” culture system. We have shown the possibility to derive neurally-differentiated cells from iPSC and their efficient co-culture on the shape-sponge collagen scaffolds that were modified by cross-linking. Moreover, the HUCB-NSCs seeded on these scaffolds were more resistant to the methylmercury treatment compared to the 2D culture conditions.

Our results indicate that collagen-based 3D microenvironment preferentially support neurally committed cells as compared to iPSC and may serve as an in vitro platform for further medical, pharmacological and toxicological applications.

The work is supported by statutory funds to MMRC and National Science Centre via Grant No DEC-2011/03/B/ST8/05867 and EIT+ BioMed 5.4 Project

Neuronal circuits of socially transferred fear

Karolina Rokosz, Ewelina Knapska
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

In our experimental model of between-subject transfer of fear, one rat (demonstrator) was subjected to fear conditioning. Afterwards back in the home cage it was allowed to interact with its cagemate (observer). As previous research has shown such interaction activates the central amygdala (CeA) of the observers to the higher level than observed in demonstrators. Therefore we hypothesize that CeA is involved in social fear transfer. The present study aimed at tracing neuronal projections in the CeA activated by social interaction with a fearful partner. To label activated neurons we used c-Fos immunohistochemistry and PSD-95:Venus fusion protein expressed under the control of a c-fos promoter in recently developed transgenic rats. The neuronal projections were visualized with anterograde and retrograde axonal transport tracers. We discovered strong activation in the following brain structures receiving projections from the CeA: dorsal raphe nuclei, substantia innominata and laterodorsal tegmental nucleus, substantia nigra, caudate putamen. All neurotransmitters found in these structures are recognized to be involved in modulation of attention, learning and memory. Using retrograde tracing we have found active projections to the CeA originating in the basolateral amygdala, hippocampus, insular cortex, prelimbic and infralimbic cortex.

Obrazowanie sztywności tkanek za pomocą złożenia fal o różnych częstotliwościach

Michał Byra, Andrzej Nowicki, Jerzy Litniewski, Janusz Wójcik
Instytut Podstawowych Problemów Techniki

Obok klasycznego obrazowania ultradźwiękowego tkanek rozwijają się konkurencyjne techniki diagnostyczne oparte często na nieco innym zjawisku fizycznym. Podstawą obrazowania



klasycznego jest odbicie fali dźwiękowej od warstw różniących się tak zwaną impedancją akustyczną będącą iloczynem lokalnej gęstości i prędkości dźwięku. Możliwe jest również obrazowanie sztywności tkanek (elastografia) za pomocą szeregu technik. Prezentacja dotyczyć będzie metody obrazowania sztywności, która wykorzystuje po temu złożenie fal o różnych częstotliwościach. Fale dźwiękowe jako fale mechaniczne rozchodzą się jako zaburzenia naprzemiennie zagęszczające i rozrzedzające ośrodek. W naszym przypadku wykorzystujemy dwa impulsy nadawcze, z czego każdy jest złożeniem dwóch fal. W pierwszym przypadku impuls obrazujący o wysokiej częstotliwości (np. 5MHz) jest nałożony na impuls modulujący o niskiej częstotliwości (np. 0.5MHz) w taki sposób, że nachodzi na impuls modulujący w momencie, kiedy ten ma największe dodatnie ciśnienie, czyli najbardziej zagęszcza tkankę. Przy drugim nadaniu odwracamy impuls modulujący, tak że teraz nachodzenie odbywa się w momencie największego rozrzedzenia. Ze względu na to, że tkanka jest strukturą nieliniową jeśli chodzi o propagację fal echa od impulsu obrazującego (niezmienianego), które powracają z każdego nadania różnią się między sobą, a różnica ech będąca miarą sztywności pozwala wygenerować inny obraz badanej tkanki.

Poszukiwanie endogennych czynników warunkujących fenotyp ludzkich fibroblastów z uszkodzonym szlakiem anemii Fanconiego

Ewelina M. Szmajda, Konrad Kosicki, Barbara Tudek, Elżbieta Speina
Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, Warszawa, Polska

Anemia Fanconiego (FA) jest skomplikowaną chorobą genetyczną, charakteryzującą się zwiększonym ryzykiem zachorowalności na nowotwory, głównie białaczki, oraz występowaniem wad rozwojowych. Komórki pacjentów są nadwrażliwe na egzogenne czynniki sieciujące DNA, co może wynikać z udziału białek szlaku FA w naprawie wiązań krzyżowych. Nie wiadomo jednak czy endogennie powstałe uszkodzenia DNA mogą być substratem dla szlaku FA. W badaniach *in vitro* produkty peroksydacji lipidów (LPO) prowadziły do powstawania wiązań DNA-DNA oraz DNA-białka, dlatego celem obecnych badań było określenie roli LPO w etiologii anemii Fanconiego. Unieśmiertelnione ludzkie fibroblasty z uszkodzonym szlakiem FA, FANCD2^{-/-} wykazały silną nadwrażliwość na wybrane produkty LPO: 4-hydroksynonenal (HNE), aldehyd krotonowy (CRO) oraz akroleinę (ACR). W odpowiedzi na HNE, komórki FANCD2^{-/-} wykazały ogromną indukcję dwuniciowych przerw w DNA oraz zaburzone ścieżki przekazywania sygnału o uszkodzeniach. Równocześnie analiza cyklu komórkowego pokazała akumulację komórek FANCD2^{-/-} w fazie G1 oraz subG1 a metoda obrazowania włókien DNA w mikroskopie konfokalnym uwidoczniała zahamowanie prędkości przesuwania się widełek replikacyjnych w stosunku do komórek o przywróconym fenotypie dzikim. Ponadto HNE indukował fenotyp przedwczesnego starzenia (senescencję) w obu liniach komórkowych, przy czym senescencja była wyraźnie słabsza w komórkach zmutowanych w genie FANCD2 przy równocześnie wyższym poziomie apoptozy w tych komórkach.

Praca była finansowana przez Narodowe Centrum Nauki UMO-2012/05/B/NZ5/01392.



Role of HAX-1 protein in cell migration and invasion

Ewelina Macech, Alicja Trębińska, Ryszard Konopiński, Ewa Grzybowska
The Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Department of
Molecular and Translational Oncology, Warsaw, Poland

It was proposed that the HAX-1 protein was engaged in many cellular processes like apoptosis, cell migration and adhesion. To further investigate its biological function we established the pairs of stable cell lines with silenced or normal expression of HAX-1 gene in HeLa, HEK293 and MDA-MB-231 cells. Through such a diversity of cell lines we provide the opportunity to test the influence of HAX-1 on various type of cells (epithelial and mesenchymal-like). Our results show that stable cell line with silenced HAX-1 derived from HeLa cells (miH1) is more invasive than the respective control cell line (mineg). Moreover, there are also differences between those cells in scratch assay tests and migration tests. In conclusion, our results support the thesis that HAX-1 protein is involved in processes like cell migration and invasion.

Self-adjuvanting influenza candidate vaccine carrying HA and M1 epitopes on a multivalent nanoplatform

I. Szurgot, E. Szolajska, David Laurin, B. Lambrecht, Jadwiga Chroboczek
Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, Polska

The traditional influenza vaccines, based on the induction of neutralizing antibodies against influenza surface glycoproteins have to be produced new every year. It is thought that the vaccine that could elicit cross-reactive T cells targeting conserved regions of viral proteins could confer broader protection across heterologous influenza strains. To meet these expectations we exploit the features of a virus-like particle, the adenoviral dodecahedron (Dd), for engineering a vaccine carrying both, hemagglutinin (HA) and the epitopes derived from highly conserved M1 matrix protein, for induction of neutralizing antibodies and, at the same time, of cross-reactive CTLs. The initial candidate vaccine containing immunodominant M1 epitopes strongly induced cell-mediated immunity both in vitro and in the animal model. In vitro tests showed that Dd carrying M1 epitopes is a potent activator of human myeloid dendritic cells (MDC). M1 peptides were efficiently presented in the context of HLA class II and cross-presented by the HLA class I molecules, activating both CD8+memory T cells and CD4+T. Importantly, upon chicken vaccination with Dd-M1 both cellular and humoral immune responses were elicited in the absence of an adjuvant. Our data show that the proposed vaccine is able to induce strong and possibly long-lasting cell-mediated immunity.



Stably fluorescently labeled cell lines as useful tool for cytotoxicity studies and coculture models

Karolina Ewa Zakrzewska, Anna Samluk, Krzysztof Dariusz Pluta, Dorota Genowefa Pijanowska
Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. M. Nałęczza PAN

Lentiviral vectors (LVs) have become a very useful tool for gene delivery in biomedical sciences, including cell engineering. LVs effectively transduce dividing and nondividing cells and stably integrate foreign DNA into the genome of the target cells. In this study, intended to genetically modify hepatoma C3A cells and human skin fibroblasts (HSF), we used HIV1-based vectors. This enabled us to generate stably labeled cell lines which are characterized by high-level expression of fluorescent proteins: EGFP and DsRed2. To ensure that the marker proteins did not have any negative impact on C3A and HSF performance we conducted several tests. When compared to untransduced cells, we observed no significant differences in morphology, viability, or capability of the hepatoma cells to albumin production. However, we noticed slightly lower growth rates of the engineered cells. Thus, our study showed that fluorescent protein expression was not considerably toxic to the tested cells nor impaired the major cell functions. We demonstrated the usefulness of the fluorescently labeled cells to investigate heterotypic cell-cell interactions in a liver coculture model. Additionally, cells stably expressing fluorescent markers can be used in a variety of studies based on bioimaging, such as cytotoxicity tests or in vivo experiments to track cell fate.

Subpopulacje komórek iNKT we krwi obwodowej u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową

Małgorzata Waldowska, Justyna Woś, Wioleta Kowalska, Agnieszka Bojarska-Junak,
Waldemar Tomczak
Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

„Klasyczne” komórki NKT znane również jako iNKT (inwariant NKT) stanowią specyficzną subpopulację limfocytów T. Pod względem obecności cząsteczek CD4 lub CD8 dzielą się na komórki CD4+CD8-, CD4-CD8+ lub CD4-CD8-. Ponadto, większość iNKT wykazuje fenotyp komórek aktywowanych oraz wykazują ekspresję receptorów typowych dla komórek NK (CD161). Komórki iNKT odgrywają kluczową rolę w odporności przeciwnowotworowej. Jednak, niewiele wiadomo o roli iNKT u pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową (PBL).

Badaniami objęto grupę 40 wcześniej nieleczonych chorych na PBL oraz 20 zdrowych dawców. Subpopulacje komórek iNKT zostały wyznakowane przy pomocy przeciwciał monoklonalnych anti-iNKT, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 oraz anti-CD161, a następnie oceniane w cytometrze przepływowym.

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono istotnie niższy odsetek komórek iNKT u chorych na



PBL niż u zdrowych dawców. Wykazano, że u pacjentów z PBL dominującą subpopulacją iNKT są komórki CD4-CD8-. Odsetek komórek iNKT z antygenem CD161 był istotnie niższy u chorych na PBL w porównaniu z odsetkiem tych limfocytów we krwi zdrowych dawców. Ponadto, w przeprowadzonych badaniach zaobserwowano istotne statystycznie różnice w ekspresji cząsteczki CD25+ i CD69+ pomiędzy grupami. U pacjentów z PBL wykazano istotną ujemną korelację pomiędzy odsetkiem limfocytów iNKT 161+ a odsetkiem komórek iNKT z ekspresją cząsteczki CD25 i CD69.

Wydaje się że zróżnicowanie subpopulacji komórek iNKT może być związane ze zmianą aktywności układu immunologicznego u chorych na PBL.

The proangiogenic factors profile of human amniotic membrane derived from diferent donors and different methods of delivery

Litwiniuk Małgorzata, Grzela Tomasz

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

The amniotic membrane, is used in chronic wound management. The amnion specimens, fresh and sterilized, contain numerous biologically active factors, which may influence tissue regeneration. However, the treatment effectiveness when using amnion dressings, differs significantly between studies and between individuals. That may depend on inter and intra donor variations of the amnion specimens. The aim of the study was to assess systematically the occurrence of proangiogenic factors in AM samples originating from different donations and different regions of the membrane. Two amniotic membranes were collected after spontaneous deliveries and one after the elective caesarian section. The cervical and placental area have been identified. The proteomic analysis of samples was performed using the Angiogenesis Proteome Profiler Microarray and analyzed using GelWorks 2D software. The protein microarray revealed significant amounts of angiogenin, coagulation factor III, DPPIV, endoglin, IGFBP 1-3, MMP-8, MMP-9, Serpin E-1, and TIMP-1 in all amnion samples. The amount of MMP9 and TIMP-1 differed between amnion samples obtained from various donors, as well as different areas of the membrane. Our study have confirmed the higher concentration of MMP-9 and reduced level of TIMP-1 in cervical zone in the amnion samples obtained after the spontaneous delivery, but not after the caesarian section. These studies require further investigation on a larger group of amniotic membrane samples.

The relationship between myeloid-derived suppressor cells, microrna and cancer stem cells in ovarian cancer

Karolina Okła, Justyna Surówka, Anna Wawruszak, Olga Ludera, Iwona Wertel
I Chair and Department of Oncological Gynaecology and Gynaecology, Medical University, al.
Raławickie 1; 20-059 Lublin, Poland



*The immune system in patients with cancer is negatively regulated by many different mechanisms. Among them, regulatory T cells and myeloid-derived suppressor cells (MDSC) play a prevailing role. MDSCs and cancer stem cells (CSCs) are important components of the tumor microenvironment and may define tumor phenotype and patient outcome. MDSCs have been shown to mediate immunosuppression, but the interaction with CSCs in ovarian cancer is not well understood. MDSCs enhance stemness by triggering expression of microRNA101 and suppressing the corepressor gene C-terminal binding protein-2 (CtBP2). MDSC not only inhibit the activity of the immune system, but also may modify the aggressiveness of the tumor cells, increasing their ability to grow invasive, migration and metastasis and to initiate the growth of tumor recurrence. MDSCs may activate the process of "return to roots" - reverse differentiation - the transformation of cancer cells in the cancer stem cells with characteristics similar to embryonic cells. The better understanding immune-associated cellular, molecular and clinical link among MDSCs, microRNA and CSCs can improve therapeutic efficiency. The study was supported by research grant: #N N407 160940 from the State Funds for Scientific Research National Science Centre (NCN). References: 1. Cui, T.X., Kryczek, I., Zhao, L., Zhao, E., Kuick, R., Roh, M.H., Vatan, L., Szeliga, W., Mao, Y., Thomas, D.G., et al. (2013). Myeloid-derived suppressor cells enhance stemness of cancer cells by inducing microRNA101 and suppressing the corepressor CtBP2. *Immunity* 39, 611–621. 2. Gabrilovich, D.I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 162–174. 3. Talmadge, J.E., and Gabrilovich, D.I. (2013). History of myeloid-derived suppressor cells. *Nat. Rev. Cancer* 13, 739–752.*

The role of SWI/SNF ATP-dependent chromatin remodeling complex in epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells

Elżbieta Sarnowska, Iga Jancewicz, Ewelina Macech, Paulina Kondrak, Katarzyna Pogoda,
Wojciech Olszewski, Janusz Siedlecki, Tomasz Sarnowski
Zakład Onkologii Molekularnej i Translacyjnej, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-
Curie w Warszawie

Epithelial to mesenchymal transition (EMT) is a process leading to the loss of epithelial cell characteristics and gain migratory and invasive properties manifested by the mesenchymal phenotype featured by reduced level of typical epithelial markers. In cancer cells, EMT is associated with increased aggressiveness, as well as invasive and metastatic potential. Preferentially EMT occurs in breast tumors with the basal-like phenotype and EMT markers expression is associated with poor prognosis. Triple negative breast cancer is a subtype of breast cancers that are associated with early recurrence and an aggressive metastatic progression. Tumors referred mostly as triple-negative cancers are usually classified as basal-like breast cancer (BLBC) which represents 10%–25% of all breast cancer tumors. BLBC is aggressive, metastatic and chemotherapy-resistant. In this type of cancer metabolic switch to glycolysis is observed. Furthermore, the epigenetic silencing of gene encoding fructose-1,6- biphosphatase (FPB1)



enzyme by the transcriptional repressor Snail protein is obligatory and characteristic for the development of BLBC. Our analysis of data deposited in ENCODE database indicated that SWI/SNF chromatin remodeling complex directly controls genes coding for glycolysis enzymes like e.g. FBP1 by targeting their promoter regions. We have also shown that Snail protein co-precipitates from HeLa cells with BAF155, a core subunit of SWI/SNF complex. Therefore, our study provided new evidences for an important regulatory function of SWI/SNF complexes in control of FBP1 expression and likely EMT process.

Wpływ czynników wzrostowych uwalnianych przez ludzką owodnię na komórki śródbłonka pępowiny HUVEC

Zofia Grzywocz, Ewa Pius-Sadowska, Stanisława Sabalińska, Grażyna Hoser, Bogusław Machaliński, Jerzy Kawiak

Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka „Innowacyjne metody wykorzystania komórek macierzystych w medycynie”, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

Wprowadzenie: Błona owodniowa składa się z 2 warstw: nabłonka z błoną podstawną i warstwy komórek mezenchymalnych. Owodnia wydziela czynniki, pełniące różnorodne funkcje m.in. czynniki o działaniu odnawiającym nabłonek, czynniki które mają właściwości anty-angiogenne i przeciwnowotworowe oraz czynniki immunomodulujące i przeciwzapalne. Cechy te powodują, że zarówno cała owodnia jak i obydwie populacje izolowanych z niej komórek są intensywnie badane z myślą o wykorzystaniu ich w transplantacjach i regeneracji narządów.

Celem pracy było zbadanie czynników wzrostu i ich receptorów wydzielanych przez błonę owodniową in vitro, oraz ich wpływu na komórki śródbłonka pępowiny.

Materiały i metody: Czynniki wzrostu i ich receptory wydzielane przez owodnie zostały analizowane testami macierzy białkowych: Raybio Human Cytokine Antybodies Array. Aktywność wykrytych czynników zbadano testem szramy na hodowli ludzkich komórek śródbłonka pępowiny (HUVEC). Podziały komórek HUVEC były charakteryzowane cytometrycznie.

Wyniki: Zaobserwowaliśmy wpływ badanych nadsączy z hodowli owodni, na zarastanie szramy, oraz na ekspresję wybranych markerów na komórkach HUVEC.

Wnioski: Uzyskane przez nas wyniki sugerują możliwość wykorzystania owodni jako źródła aktywnych czynników wzrostu w szeroko pojętej medycynie regeneracyjnej.

Wykorzystanie modyfikowanego białka GFP oraz modyfikowanego przeciwciała monoklonalnego anty CD20 do analizy białaczkowych linii B i T komórkowych

Marek Gryzik, Radosław Stachowiak, Jacek Bielecki, Jerzy Kawiak, Grażyna Hoser
Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka „Innowacyjne metody wykorzystania komórek macierzystych w medycynie” Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa, Polska



Przewlekła białaczka limfocytarna jest chorobą niejednorodną. U części chorych CLL ma łagodny przebieg, który wiąże się z wieloletnim okresem przeżycia bez zastosowania leczenia. U pozostałych chorych po początkowo łagodnym przebiegu obserwuje się progresję choroby. Czasem agresywny przebieg obserwuje się już od momentu rozpoznania. U pewnej grupy chorych podczas leczenia obserwuje się transformację CLL w agresywnego chłoniaka z dużych komórek B, w białaczkę prolimfocytową. Rituximab jest chimerycznym monoklonalnym przeciwciałem specyficznym wobec epitopu zlokalizowanego w pętli dużej antygenu CD20. Rituximab jest powszechnie używany w leczeniu białaczek B komórkowych mających antygen CD20. Green fluorescent protein (GFP) jest białkiem o masie 26,9 kDa mającym wewnątrz swojej struktury chromofor, który w wyniku wzbudzenia światłem niebieskim emituje zielone światło fluorescencyjne. Celem eksperymentu było wykorzystanie białka GFP związanego z przeciwciałem monoklonalnym anti-CD20 do znakowania i analizy ludzkich linii komórkowych B i T. W doświadczeniu użyto zmodyfikowane białko GFP mające na jednym z jego końców fragment 6-histydyn oraz zmodyfikowane komercyjne przeciwciało anti-CD20 zdolne do łączenia się z resztą 6-histydyn należącego do białka GFP. Dzięki tym modyfikacjom można było wykonać specyficzne barwienia wybranych linii komórkowych oraz przeprowadzić ich analizę mikroskopową oraz cytometryczną. Połączenie GFP z przeciwciałem może mieć zastosowanie w analizie komórek za pomocą technik mikroskopii oraz cytometrii przepływowej.

Very Small Embryonic-Like Stem Cells (VSELs) are activated by ischemic limb injury and may participate in tissue regeneration

Anna Łabędź-Masłowska, Elżbieta Karnas, Dominika Berdecka, Tomasz Brzozowski, Mariusz Z. Ratajczak, Zbigniew Madeja, and Ewa K. Zuba-Surma
Department of Cell Biology, Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University, Krakow, Poland

The goal of this study was to examine if acute tissue injury may stimulate both proliferation of quiescent VSELs in bone marrow (BM) and their mobilization into peripheral blood (PB). The other goal was to investigate regenerative potential of VSELs injected into ischemic tissues. C57BL/6 mice underwent a hind limb ischemia (LI) and were administrated with BrdU. The presence of BrdU+ VSELs (Sca-1+/Lin-/CD45-) and hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs; Sca-1+/Lin-/CD45+) in PB and BM was evaluated by flow cytometry at 2, 7, 14 and 28days following LI. Genetic status of VSELs following tissue injury was investigated by real-time PCR. The change in expression of angiogenesis-related proteins was evaluated by Milliplex MAP Kit. Then, eGFP VSELs sorted from ischemic and non-ischemic mice were injected at 2d following LI into injured tissues in WT mice. At 2, 7, 14 and 28days post transplantation, blood flow were measured by Laser Doppler System. Paraffin-embedded ischemic tissue sections were analyzed for eGFP VSELs presence. We found that the number of proliferating VSELs was significantly increased in BM of ischemic mice at 7d post injury. Elevated number of BrdU+ VSELs was accompanied with change in expression of genes guiding their proliferation. Moreover, VSELs injected into ischemic



tissues improved blood flow recovery. The data indicates vast impact of acute injury on activation of VSELs proliferation in vivo and possibility of their application in regenerative medicine.

Zastosowanie biodegradowalnych membran półprzepuszczalnych w hodowlach komórkowych

Aleksandra Kutkowska, Ewa Łukowska, Andrzej Chwojnowski
Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. M. Nałęcz

Membrany półprzepuszczalne, oprócz wykorzystania w procesach rozdzielania w przemyśle, mają także szerokie zastosowanie w inżynierii biomedycznej. Wykonuje się z nich między innymi podłoża, na których można prowadzić hodowle komórkowe. Membrana półprzepuszczalna może również posłużyć do enkapsulacji żywych komórek. W takim przypadku polimerowa powłoka pozwala na immunoizolację. Można również w membranie enkapsulować substancje biologicznie czynne. Porowatość membrany umożliwia uwalnianie czynnika terapeutycznego. Membrany półprzepuszczalne mają także zastosowanie przy opracowywaniu bio-sztucznych narządów. W tym celu przygotowuje się podłoża całkowicie lub częściowo biodegradowalne. Utworzenie odpowiedniej, porowatej struktury pozwala na stworzenie odpowiednich warunków do wzrostu komórek ludzkich, np. komórek skóry. W badaniach podjęto próbę utworzenia asymetrycznego, porowatego rusztowania z polimeru biodegradowalnego, które mogłoby być wykorzystane do trójwymiarowych hodowli komórkowych. Zweryfikowano jakie środki porotwórcze są najlepsze, aby zapewnić w membranie pory o odpowiedniej wielkości i kształcie. Sprawdzono także jak temperatura kąpieli żelującej oraz czas suszenia na powietrzu wpływają na morfologię otrzymanej membrany. Strukturę rusztowań zbadano za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej, a następnie rozpoczęto badania z udziałem keratynocytów. Zbadano żywotność po trzecim i po szóstym dniu hodowli. Na tej podstawie oceniono użyteczność poszczególnych membran w dalszych badaniach.

Biuro projektu:

Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie
Katedra i Zakład Fizjologii
Al. Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin
Tel.: 91/466 16 11 Fax: 91/466 16 12

Strona internetowa projektu:

WWW.STEMCELLS-PROJECT.EU