

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ**  
**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**  
**КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ**

**Виолета Стефанова Димитрова**

**Изследване на сигнални пътища в  
клетъчни култури, изолирани от  
нормална, човешка, апикална папила**

## **Автореферат**

на дисертационен труд за присъждане на образователна и  
научна степен  
„доктор“

Научна специалност: Биохимия

**Научен ръководител:**

**Акад. Проф. Д-р Ваньо Иванов Митев, дм, дбн**

**Научен консултант:**

**Гл. Ас. Антония Руменова Исаева, дб**

**Рецензенти:**

**Чл.-кор. проф. Румен Георгиев Панков, дбн**

**Доц. Мария Димитрова Драгнева, дб**

Дисертационният труд е написан на 136 страници и включва 51 фигури, 3 таблици и 2 схеми. Библиографският списък съдържа 136 литературни източника, всичките на латиница. Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от катедрен съвет на Катедрата по медицинска химия и биохимия при Медицински факултет на Медицински университет, София на г. (Протокол №366/30.01.2019).

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 14.05.2019. от 13:00 часа в Първа Аудитория на Медико-биологичния комплекс (МБК; бивш ПУЦ) на Медицински факултет, Медицински университет, София, ул. „Здраве“ 2, съгласно Заповед на ректора № РК36-478/28.03.2019г. пред научно жури в състав:

**Председател:**

1. Акад. проф. д-р Ваньо Иванов Митев, дм, дбн – вътрешен член за МУ-София, Катедра по медицинска химия и биохимия на Медицински факултет при МУ-София, научен ръководител на докторанта.

**Членове:**

2. Доц. Мария Димитрова Драгнева, дб – вътрешен член за МУ-София, Катедра по медицинска химия и биохимия на Медицински факултет при МУ-София.
3. Акад. проф. Иван Георгиев Иванов, дбн – външен член за МУ-София, Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ – Българска академия на науките.
4. Чл.-кор. проф. Румен Георгиев Панков, дбн – външен член за МУ-София, Софийски университет „Св. Климент Охридски“ – Биологически факултет.
5. Проф. Татяна Иванова Влайкова, дб – външен член за МУ-София, Тракийски университет – Стара Загора.

**Резервни членове:**

1. Доц. Валентин Стойчев Лозанов, дх – вътрешен резервен член за МУ-София, Катедра по медицинска химия и биохимия на Медицински факултет при МУ-София.
2. Проф. Ана Иванова Манева, дбн – външен резервен член за МУ-София, Фармацевтичен факултет, МУ-Пловдив

Материалите по защитата са на разположение в Катедрата по медицинска химия и биохимия (стая 308, МБК, ул. „Здраве“ 2, София) и са публикувани на интернет страницата на МУ-София.

София, 2019 г.

## Съдържание

I. Въведение.....	3
II. Цел и Задачи.....	3
III. Задачи:.....	3
III. Материали и Методи.....	4
III. 1. Материали:.....	4
III. 2. Методи.....	5
III. 2. 1. Ензимно-протеолитично изолиране на първични клетки от дентална човешка апикална папила от трети молар. ....	5
III. 2. 2. <i>In vitro</i> култивиране и пасажирание на изолираните първични клетки от дентална папила. ....	5
III. 2. 3. Магнитно сепарирание: Магнитно белязване на клетките за магнитно-активирано клетъчно разделяне (Magnetic labeling of cells for magnetic-activated cell sorting (MACS). ....	5
III. 2. 4. BrdU белязване на хетерогенни и фенотипно специфични (хомогенни) култури от апикална папила.....	5
III. 2. 5 si RNA медирано-заглушаване на каталитичната $\alpha$ и некаталитичната $\beta$ субединица СК2 в хетерогенни и хомогенни популации. ....	5
III. 2. 6 Третиране с рекомбинантен, човешки растежен фактор BMP4 .....	5
III. 2. 7. Имунофлуоресцентно оцветяване и микроскопия .....	5
III. 2. 9. Обработка на мултифлуоресцентните изображение и количественият анализ чрез алгоритъм.....	5
III. 2. 10. Статистически анализи. ....	6
IV. Резултати .....	6
V. Дискусия .....	53
VI. Изводи.....	57
VII. Приноси .....	57
VIII. Публикации и участия в научни форуми и проекти, свързани с дисертационния труд	57
IX. Използвани съкращения	58

## I. Въведение

Стволово-клетъчната биология се превърна във важна област в регенеративната медицина и тъканно инженерните терапии след откриването и характеризирането на възрастните мезенхимни стволови клетки (mesenchymal stem cells, MSCs). Денталните мезенхимни клетки са златен стандарт за костна реконструкция при хора и може да се използват за възстановяване на телесни дефекти в нискорискови терапевтични стратегии. Биоинженерните технологии разработени за възстановяване на зъби, значително ще допринесат за разбирането на процесите през ембриогенезата и ще насърчат бъдещите регенеративни терапии на органи, вместо сега провежданите трансплантации, в голямо разнообразие от органи, като: черен дроб, бъбрек и сърце. Концепцията за развитие на зъбното банкиране и презервацията на зъбни стволови клетки е доста обещаваща. По-нататъшни изследвания в областта имат потенциала да предизвестят нова ера на ефективно лечение на множество сериозни болести и биха се оказали много полезни за човечеството. Апикалната папила е разположена на върха на развиващ се постоянен човешки зъб и граничи със зъбната пулпа чрез горна (апикална) богата на клетки зона. Независимо, че е интензивно изследвана като източник на SCAP, почти нищо не е известно за фенотипно-специфичната сигнална регулация, протичаща в различните субпопулации от хетерогенния състав на апикалната папила. По литературни данни се знае, че клетките от апикална папила (SCAP) са способни да диференцират *in vitro* в одонтобласто - подобни клетки и да произвеждат дентин. Мезенхимните стволови клетки- (MSCs) произхождащи от зъбни тъкани, характерни за апикална папила са най-вероятно клетъчния източник на първичните одонтобласти за дентиновото формиране на корена *in vivo*. BMP4 е доказан одонтогенен фактор, който изпълнява ключова роля в клетъчната диференциация. Експресията на протеина BSP2, е вследствие на одонтобластна диференциация. В постнаталното развитие той повишава остеокластогенезата и следователно костната резорбция, което го прави решаващ за хомеостазата на костното ремоделиране и неговото отсъствие рефлектира върху хомеостазата на костната тъкан. Изоформите на PKC медиат втретклетъчната сигнална трансдукция на различни остеогенни регулатори. PKC alpha е въввлечена в почти всички клетъчни физиологии. Реакциите, предизвикани от активирането ѝ или свръх експресията на PKC alpha, варират в зависимост от типовете, а понякога и от условията на клетките. Установяване участието ѝ в BMP4 индуцираната одонтобластна диференциация би довело до изясняване на един от многото пътища в клетъчната сигнализация.

## II. Цел и Задачи

Цел: Изследване на сигнално трансдукционни пътища, поддържащи пролиферативната активност и/или прехода към остео/одонтогенна клетъчна диференциация, протичащи в различните хетерогенни фенотипове, изграждащи хетерогенния състав на апикална (дентална) папила.

### II. Задачи:

1. Фенотипизиране на хетерогенни култури от апикална папила въз основа на клетъчно повърхностната експресия на мезенхимните стволови маркери CD44, CD117, CD105, STRO-1 и втретклетъчната експресия на цитоскелетния белтък- Vimentin
2. Изследване на пролиферативната активност и самовъзобновяващия потенциал на клетъчни фенотипове от хетерогенния състав на апикална папила.

3. Изследване ролята на каталитичната ( $\alpha$ ) и некаталитичната ( $\beta$ ) субединица на протеин киназа СК2 в сигнализицията, поддържаща пролиферативната активност на клетъчни фенотипове от хетерогенния състав на апикална папила.
4. Изследване на BMP4-индуцирания остео/одонтогенен деференциационен потенциал на клетъчни фенотипове от хетерогенния състав на апикална папила.
5. Изследване ролята на каталитичната ( $\alpha$ ) и некаталитичната ( $\beta$ ) субединици на протеин киназа СК2 в трансдуцирането на остеогенния BMP4 сигнал в клетъчни фенотипове от хетерогенния състав на апикална папила.

### III. Материали и Методи

#### III. 1. Материали:

30 дентално папиларни експланта, изолирани чрез рутинна екстракция на здрав трети молар на пациенти между 14 и 18 години, чиито родители са инфирмирани и подписали информирано съгласие, в катедра по Орална и лицевочелюстна хирургия към Факултета по Дентална медицина на Медицински университет – София

колагеназа тип I(Sigma-Aldrich, USA) и диспазаза 1(LifeScan, USA)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM/F12) high glucose (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany)

fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich, USA)

penicillin и streptomycin (AppliChem, GmbH, Darmstadt, Germany)

Phosphate – buffered saline (PBS) (Lonza, Verviers, Belgium)

trypsin/EDTA (Gibco, Germany)

75 cm<sup>2</sup> културални матраци, мулти ямкови (12, 24, 96) културални плаки (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany)

BrdU (Santa Cruz Biotechnology, USA)

Човешки, рекомбинантен растежен фактор BMP4(Sigma-Aldrich, USA)

Xylenol Orange(Sigma-Aldrich, USA)-щедро предоставен от доц. И. Иванов от катедра Медицинска Химия и Биохимия, на МУ-София

DAPI (Santa Cruz Biotech, USA)

Hechst 3342(Santa Cruz Biotech, USA)

scrambled siRNA, CK2 $\alpha$  siRNA, CK2 $\beta$  siRNA(Santa Cruz Biotechnology, USA)

**Табл. 1.** Първични антитела, вторични-имунофлуоресцентно-белязани антитела, вторични-магнитно белязани антитела и si RNA Reagent System

Първични антитела	Вторични- имунофлуоресцентно- белязани антитела	Si RNA Reagent System Santa Cruz Biotechnology	Вторични-магнитно белязани антитела
BMPRIa-mouse monoclonal IgG-Santa Cruz Biotechnology	Donkey anti-goat IgG Cruz Fluor 647 Santa Cruz Biotechnology	Si RNA Transfection Medium	Anti-Mouse IgG MicroBeads MACS Miltenyi Biotec
BMPRII-goat polyclonal IgG-Santa Cruz Biotechnology	Chicken anti-rabbit IgG-FITC Santa Cruz Biotechnology	Si RNA Dilution Buffer	Anti-Rabbit IgG MicroBeads MACS Miltenyi Biotec
p-PKC $\alpha$ (ser 657) goat polyclonal IgG-Santa Cruz Biotechnology	Goat anti-mouse IgG 555 Santa Cruz Biotechnology	Si RNA Transfection Reagent	
PKC $\alpha$ -rabbit polyclonal IgG-	Goat anti-mouse IgG 488	Si RNA diluent	

Santa Cruz Biotechnology  
BSP2- rabbit polyclonal IgG-  
Santa Cruz Biotechnology  
BrdU-mouse monoclonal IgG  
Santa Cruz Biotechnology  
RUNX2 mouse monoclonal  
IgG Santa Cruz Biotechnology  
Osterix-rabbit polyclonal IgG-  
Santa Cruz Biotechnology  
Endoglin(CD105) rabbit-  
polyclonal IgG-Santa Cruz  
Biotechnology  
C-kit(CD117)- mouse  
monoclonal IgG Santa Cruz  
Biotechnology  
Phospho-Thr202/Tyr204  
ErK1,2-rabbit Ab Cell  
Signaling Technology  
ErK1,2-mouse monoclonal Ab  
Cell Signaling  
CD44 rabbit monoclonal IgG  
Santa Cruz Biotechnology  
Stro-1 mouse monoclonal IgG  
Santa Cruz Biotechnology

Santa Cruz Biotechnology  
Goat anti-rabbit IgG 555  
Santa Cruz Biotechnology

RNase –free H<sub>2</sub>O

### **III . 2. Методи**

III. 2. 1. Ензимно-протеолитично изолиране на първични клетки от дентална човешка апикална папила от трети молар.

III. 2. 2. In vitro култивиране и пасажирене на изолираните първични клетки от дентална папила.

III . 2. 3. Магнитно сепариране: Магнитно белязване на клетките за магнитно-активирано клетъчно разделяне (Magnetic labeling of cells for magnetic-activated cell sorting (MACS)).

III. 2. 4. BrdU белязване на хетерогенни и фенотипно специфични (хомогенни) култури от апикална папила:

III. 2. 5 si RNA медирано-заглушаване на каталитичната  $\alpha$  и некаталитичната  $\beta$  субединица СК2 в хетерогенни и хомогенни популации.

III. 2. 6 Третиране с рекомбинантен, човешки растежен фактор BMP4

III. 2. 7. Имунофлуоресцентно оцветяване и микроскопия на

III. 2. 7. 1. живи P1 хетерогенни култури: III. 2. 7. 2. фиксирани клетки и Xylenol orange маркирани. Приготвяна 20  $\mu$ M разтвор на Xylenol orange, с който клетките бяха инкубирани за 12 часа на 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в инкубатор.

III. 2. 7. 3. Пермебеализирани клетки.

III. 2. 8. Визуализиране на мултифлуоресцентните изображение.

Изображенията бяха получени при увеличение на обектива 20X и 60X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000 и прилагането на лазери с дължина на вълната 488 nm, 555 nm, 640 nm, 405 nm, необходими да възбудят съответно IgG-FITC-белязания протеин, IgG-CY5, IgG-CFL-647 и DAPI/Neochst 3342-белязаните ядра.

III. 2. 9. Обработка на мултифлуоресцентните изображение и количественият анализ чрез алгоритъм.

Цялата площ на всяка ямка беше анализирана и количествения анализ на относителната експресия беше изчислен чрез алгоритъм за идентифициране на DAPI/Neochst 3342-белязаните ядра (405 флуоресценция), спрямо 488 флуоресценция, или 640 имунофлуоресценция, или 555 имунофлуоресценция.

III. 2. 10. Статистически анализи.

*T-test, където стойността на P е по-малко или равно на 0.05-статистически достоверно:  $p^* \leq 0.001$  SigmaPlot Version 12.0 (Systat Software, San Jose, CA, USA)*

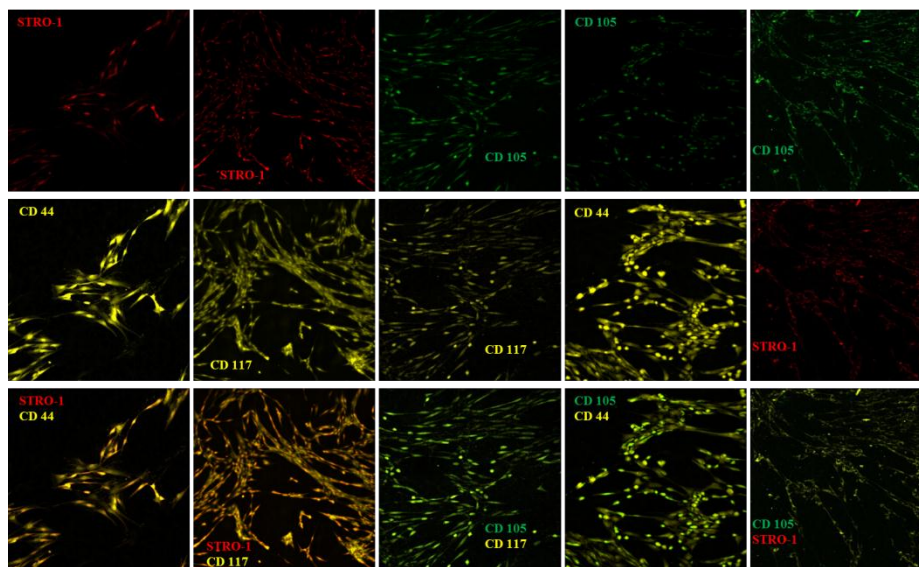
*Данните са анализирани чрез one-way ANOVA, SigmaPlot Version 12.0 (Systat Software, San Jose, CA, USA)*

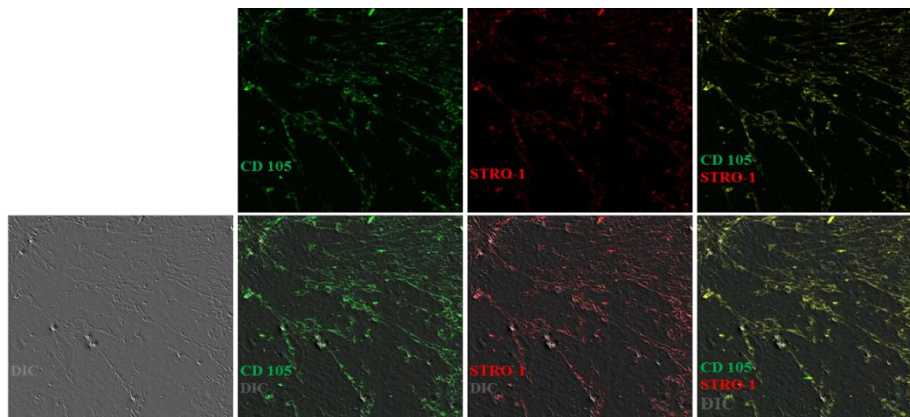
## IV. Резултати

### IV. 1. Фенотипизиране на хетерогенни култури от апикална папила въз основа на клетъчно повърхностната експресия на мезенхимните стволкови маркери CD44, CD117, CD105, STRO-1 и вътреклетъчната експресия на цитоскелетния белтък- Vimentin

*IV. 1. 1. Изследване на хетерогенния състав на P1 клетки от апикална папила за присъствието на CD44, CD117, CD105 и STRO-1 експресиращи маркери – клетки*

Експоненциално растящите в пълноценна хранителна среда клетъчни култури бяха индиректно имунофлуоресцентно маркирани срещу CD44, CD117, CD105 и STRO-1 и анализирани при подаване на CO<sub>2</sub> на In Cell Analyzer 6000

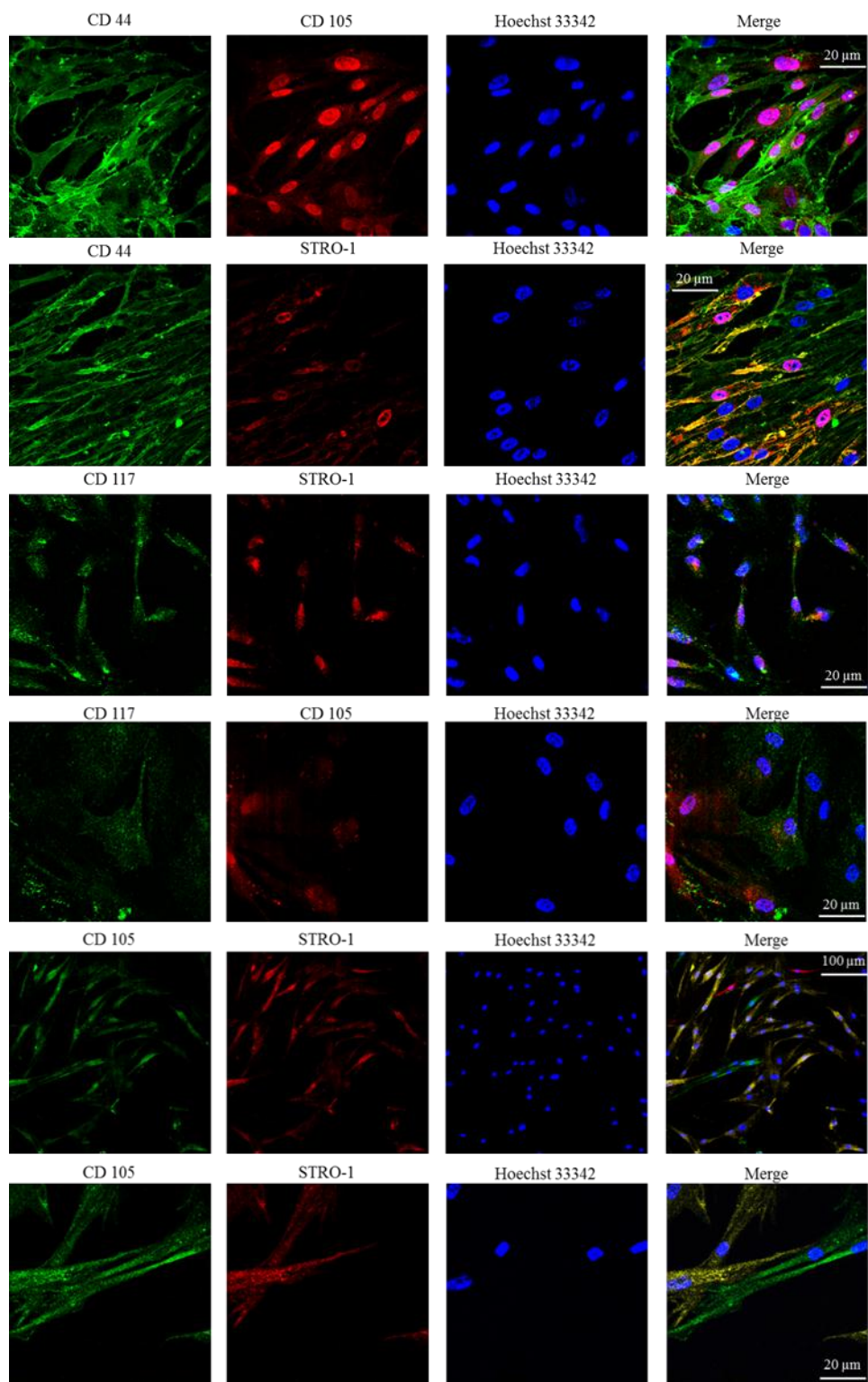




**Индиректен имунофлуорисцентен и диференциален интерферентен контраст (DIC) микроскопски анализ за клетъчно повърхностна експресия на CD44, CD117, CD105 и STRO-1 върху живи клетки, P1.** Увеличение 20X и при подаване на CO<sub>2</sub> на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000.

Виталното имунофлуоресцентно оцветяване показва широко разпространена експресия на CD44<sup>+</sup> и сравнително голям брой от положителните CD44<sup>+</sup> клетки, експресират и CD 105, докато сравнително малко количество от положителните CD44<sup>+</sup> клетки, експресират STRO-1. Едновременно с това всички положителни CD117<sup>+</sup> клетки експресират CD105 и относително голямо количество се наблюдава при STRO-1 експресиращите. Въз основа на експресиращите маркери разделяме клетките на CD 105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup>, CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup> и CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup>. Получените данни ясно показват фенотипната хетерогенност по отношение на клетъчно повърхностната експресия на мезенхимните маркери - CD44, CD117, CD105 и STRO-1 на hDAP.

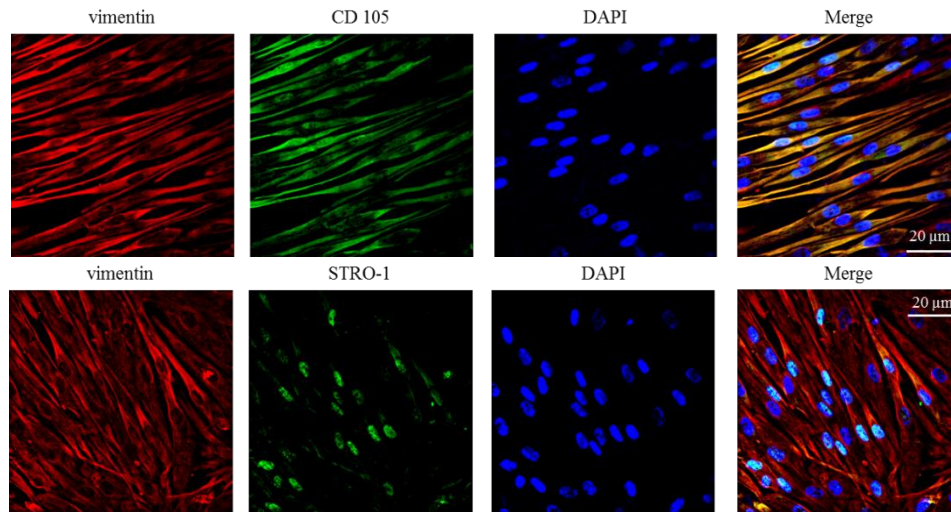
За да може да се определи още по прецизно и да се докаже кои клетки експресират съответните мезенхимни маркери, експоненциално растящите в пълноценна хранителна среда клетъчни култури бяха фиксирани в меки условия, за да не се наруши целостта на плазмената мембрана и бяха индиректно имунофлуоресцентно маркирани срещу клетъчно повърхностната експресия на CD44, CD117, CD105, STRO-1



**Индиректен имунофлуоресцентен микроскопски анализ на повърхностната експресия на CD44, CD117, CD105 и STRO-1 в клетки, изолирани от човешка апикална папила. Увеличение 20X и 60X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000**

*IV. 1.2. Изследване на вътреклетъчната локализация на цитоскелетния белтък Vimentin в клетки, експресиращи и неекспресиращи маркерите CD105 и STRO-1.*

Виментинът е цитоскелетен белтък характерен за всички до този момент клетки с мезенхимен произход, и който е използван от някои екипи като маркер за потвърждаване като не променен мезенхимен тип в *in vitro* културални условия. Поради това, експоненциално растящите хетерогенни култури бяха индиректно имунофлуоресцентно белязани срещу CD105, STRO-1 и цитоскелетния белтък Vimentin.



**Индиректен имунофлуоресцентен микроскопски анализ на повърхностната експресия на цитоскелетния белтък- Vimentin, CD105 и STRO-1 в клетки, изолирани от човешка апикална папила. Увеличение 60X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000**

От анализиранияте имунофлуоресценции се установава, че цитоскелетния белтък Vimentin, се експресира като при CD105 експресиращите клетки, така и при STRO-1-клетките, т.е. епигенетичните фактори действащи в хода на клетъчното култивиране не са повлияли върху мезенхимния фенотип на изследваните клетки, изолирани от апикална папила. Тъй като виментинът бе установен и в клетките неекспресиращи маркерите за стволовост се налага извода, че този цитоскелетен белтък не може да се използва като маркер за стволовост в клетките от тъканта.

*IV. 1. 3. Определяне числеността на фенотипно специфичните субпопулации в хетерогенния състав на P1 клетки от апикална папила.*

Анализ на броя на CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup>, CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup>, CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>-</sup> клетки чрез количествен анализ на мултифлуоресцентното белязване, описано в т. 1.1 и чрез индиректно магнитно-активирано клетъчно сортиране (Cell Sorting-MACs) на клетки, изолирани от дентална папила.

	CD44 <sup>+</sup> / CD117 <sup>+</sup> / CD105 <sup>+</sup>	CD44 <sup>+</sup> / CD117 <sup>+</sup> / CD105 <sup>-</sup>	CD44 <sup>+</sup> / CD117 <sup>+</sup> / STRO-1 <sup>+</sup>	CD44 <sup>+</sup> / CD117 <sup>+</sup> / STRO-1 <sup>-</sup>	CD105 <sup>+</sup> / STRO-1 <sup>-</sup>	CD105 <sup>+</sup> / STRO-1 <sup>+</sup>	CD105 <sup>-</sup> / STRO-1 <sup>+</sup>	CD105 <sup>-</sup> / STRO-1 <sup>-</sup>
P <sub>1</sub> , mean±SD, n=9, P* $<$ 0.05, P** $<$ 0.001	66% ± 0,0938 **	34% ± 0,0946 **	23,65% ± 0,1324 *	75,35% ± 0,1497 *	25,22% ± 0,0163 **	14,90% ± 0,0208 **	20,84% ± 0,0382 *	39,26% ± 0,0066 **

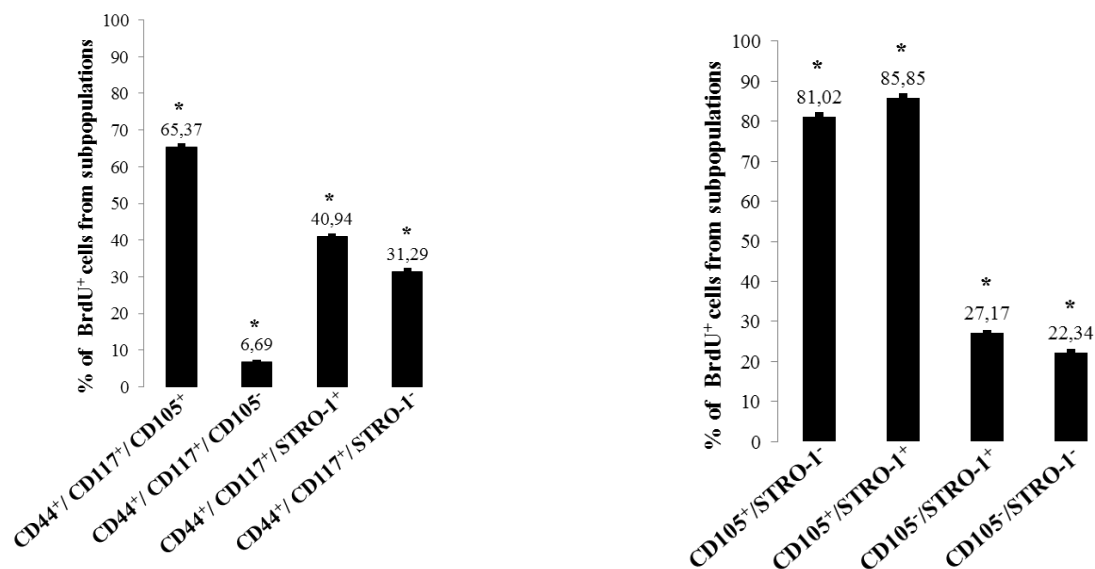
**Табл. 2. Проследяване броят на CD105<sup>+</sup>, CD105<sup>-</sup>, STRO-1<sup>+</sup>, STRO-1<sup>-</sup> и на CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup>, CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup>, CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>-</sup> клетки в хода на рутинното клетъчно пасажирание чрез Cell Sorting-MACs и чрез количествения анализ на мултифлуоресцентното белязване**

Половината от получените в хода на *in vitro* клетъчното култивиране клетки от P1 от апикална папила, бяха анализирани за броя на CD105<sup>+</sup>, CD105<sup>-</sup>, STRO-1<sup>+</sup>, STRO-1<sup>-</sup> и CD44<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup> чрез количествен анализ на индиректната мултиимунофлуоресценция, показана в т.1.1. А, другата половина бяха разделени на четири фенотипно-специфични популации CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup>, CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup>, CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>-</sup> чрез индиректно магнитно-активирано клетъчно сортиране (Cell Sorting-MACs). Получените мултифлуоресцентни микроскопски изображения бяха подложени на алгоритъм, при който бе установен броят на клетките експресиращи съответните маркери CD44<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup>, CD105 и STRO-1 - 66% от клетките положителни за CD105, експресират CD44 и CD117, 34% от клетките нямат CD105, експресират CD44 и CD117, при клетките, които са позитивни за STRO-1 едва 23,65% експресират CD44 и CD 117 и 75,35% се наблюдават при популацията от клетки, които не експресират STRO-1. От проведеното количествено индиректно магнитно сепариране бе установен броят на четирите фенотипа: при CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup> се установява, че 25,22% от STRO-1 негативни, са положителни за CD105, при двойно положителните CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup>, 14,90% експресират CD105 положителни, 20,84% са STRO-1 положителни във фенотипа CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup> и при двойно-негативните се установява най-голям процент 39,26%.

#### **IV. 2. Изследване на пролиферативната активност и самовъзобновяващия потенциал на клетъчни фенотипове от хетерогенния състав на апикална папила**

##### *IV. 2. 1. Изследване на инкорпорирането на BrdU в хетерогенния състав на последващи пасажи на клетки от апикална папила*

Експоненциално автокринно растящите клетки от последователни пасажи, достигайки до 60-65% конfluентност бяха инкубирани с 10μM BrdU в DMEM за 2,50 часа и индиректно имунофлуоресцентно белязани срещу инкорпориралият се в новосинтезираната ДНК верига BrdU и маркерите CD105 или STRO-1. Получените мултифлуоресцентни изображения бяха подложени на алгоритъм, като за всеки експеримент се изчислява цялата ямка и се установява процентът единични положителни и двойно положителни клетки на база алгоритъм за идентифициране на ядра на база DAPI багрило, BrdU-съдържаща ДНК (за 647 флуоресценция или 488 флуоресценция) и протеинова експресия на базата на 488 флуоресценция (за STRO-1) или 555 флуоресценция (за CD 105), съответно.



**Фиг. 1 и 2.** Проследяване на репликационна активност в хетерогенни и хомогенни субпопулации. Данните са анализирани чрез one-way ANOVA, SigmaPlot Version 12.0 (Systat Software, San Jose, CA, USA), където стойността на  $P$  е по-малко или равно на 0.05-статистически достоверно:  $p^* < 0.05$

Анализирането на инкорпорирането на BrdU в последователни пасажи показва постоянна фенотипно-детерминирана пролиферативна активност на изследваните популации. При  $CD44^+/CD117^+/CD105^+$  субпопулация, инкорпорирането на BrdU в новосинтезирана верига на ДНК е най-силно проявено - 65.37%, най-слабо инкорпориране се наблюдава във фенотипа, в който липсва мезенхимния маркер за  $CD105$ , едва 6.69%. В популацията, в която клетките експресират  $CD44^+/CD117^+/STRO-1$  се установява 40.94% и 31.29% в субпопулацията от клетки, която не експресира мезенхимния маркер -  $CD44^+/CD117^+/STRO-1^-$ . При анализирането на  $CD105^+/STRO-1^-$ ,  $CD105^+/STRO-1^+$ ,  $CD105^-/STRO-1^+$ ,  $CD105^-/STRO-1^-$  субпопулациите, получени чрез индиректно магнитно-активирано клетъчно сортиране (Cell Sorting-MACs) бе установено, че в двойно позитивния фенотип в най-голяма степен се инкорпорира BrdU - 85.85%, в популацията не експресираща STRO-1 клетки 81.02%, във фенотипа не експресиращ  $CD105$  - 27.17%, и в клетките, в които не се експресират и двата мезенхимни маркера  $CD105$  и  $STRO-1$ , 22.34%. Тези данни показват, че с най-висока пролиферативна активност са клетките, експресиращи  $CD105$ , последвани от фенотиповете експресиращи STRO-1, а слабо пролиферативно активни са  $CD105^-$ .

#### IV. 2. 2. Изследване числеността на фенотипно специфичните субпопулации в последователни пасажи.

След като бе установено, че изследваните клетъчни фенотипове се характеризират с постоянна фенотипно детерминирана активност бе изследван и техния самовъзобновяващ се потенциал чрез проследяване на числеността им в хода на пасажирането им.

	CD44 <sup>+</sup> / CD117 <sup>+</sup> / CD105 <sup>+</sup>	CD44 <sup>+</sup> / CD117 <sup>+</sup> / CD105 <sup>-</sup>	CD44 <sup>+</sup> / CD117 <sup>+</sup> / STRO-1 <sup>+</sup>	CD44 <sup>+</sup> / CD117 <sup>+</sup> / STRO-1 <sup>-</sup>	CD105 <sup>+</sup> / STRO-1 <sup>-</sup>	CD105 <sup>+</sup> / STRO-1 <sup>+</sup>	CD105 <sup>-</sup> / STRO-1 <sup>+</sup>	CD105 <sup>-</sup> / STRO-1 <sup>-</sup>
<b>P<sub>1</sub></b> , mean±SD, n=9, P* $<$ 0.05, P** $<$ 0.001	66% ± 0,0938 **	34% ± 0,0946 **	23,65% ± 0,1324 *	75,35% ± 0,1497 *	25,22% ± 0,0163 **	14,90% ± 0,0208 **	20,84% ± 0,0382 *	39,26% ± 0,0066 **
<b>P<sub>2</sub></b> , mean±SD, n=6, P* $<$ 0.05, P** $<$ 0.001	65% ± 0,2159 *	35% ± 0,1571 *	20,91% ± 0,0330 **	78,08% ± 0,0191 **	22,18% ± 0,0243 *	11,99% ± 0,0180 *	16,70% ± 0,0103 *	49,13% ± 0,0131 *
<b>P<sub>3</sub></b> , mean±SD, n=6, P* $<$ 0.05, P** $<$ 0.001	64% ± 0,2916 *	36% ± 0,2921 *	18,97% ± 0,0105 **	81,03% ± 0,0375 **	19,08% ± 0,0316 **	8,84% ± 0,0670 **	13,25% ± 0,0740 **	58,83% ± 0,0306 **
<b>P<sub>6</sub></b> , mean±SD, n=4, P* $<$ 0.05	23,08% ± 0,7309 *	76,92% ± 0,4980 *	9,93% ± 0,1904 *	90,07% ± 0,3024 *	14,42% ± 0,5042 *	3,81% ± 0,4210 *	8,20% ± 0,3507 *	73,79% ± 0,3806

**Табл. 3. Cell Sorting-MACs проследяване броят на CD44, CD117, CD105<sup>+</sup>, CD44, CD117, CD105<sup>-</sup>, CD44, CD117, STRO-1<sup>+</sup>, CD44, CD117, STRO-1<sup>-</sup> и на CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup>, CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup>, CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>-</sup> клетки в хода на рутинното клетъчно пасажирание.**

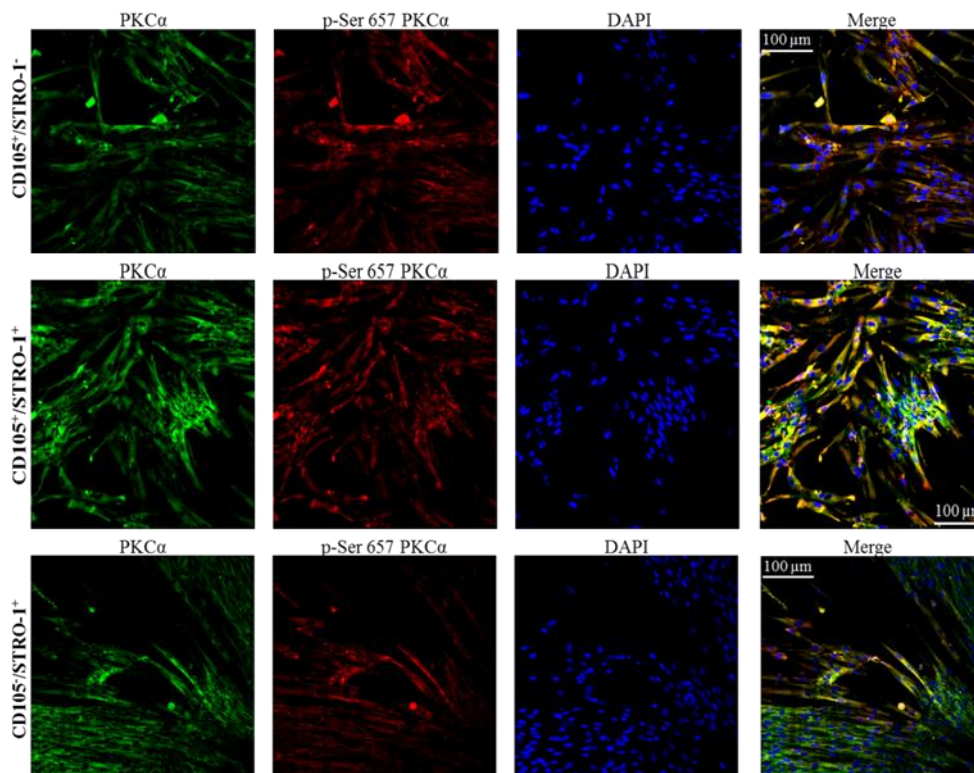
Епигенетичните фактори въздействащи по време на *in vitro* култивирането съвместно с фенотипно детерминираната репликационна активност определят потенциалът на самовъзобновяване на всички клетъчни фенотипове. Получените резултати показват, че само част от клетките от CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup>, CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup> фенотиповете са способни на самовъзобновяване по отношение на повърхностната експресия на CD105 и на STRO-1. И най-малък е процентът на способността за самовъзобновяване на клетките от CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup>, тъй като тяхната численост най-силно се редуцира в хода на пасажиранието. Твърде е вероятно дъщерните клетки, получени от деленето на CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup> да проявяват CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup> или CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup>, както и несъмнено CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>-</sup> фенотипове. Докато дъщерните клетки, получени от деленето на CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup> или на CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup> да администрират майчиния и CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>-</sup> фенотип.

Горе описаните резултати показват, че изследваните фенотипове се характеризират с фенотипно детерминиран самовъзобновяващ потенциал: като CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup> са с най-висок потенциал за самовъзобновяване, последван от CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup>, а най-слаб е на CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup> фенотипа. Въз основа на фенотипно специфичното редуциране на числеността на изследваните субпопулации, заедно с постоянната им фенотипно детерминирана пролиферативна активност, може да се изведе извода, че в трите фенотипа протича асиметрично делене, което е най-силно изявено в CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup>. Протичането на асиметрично делене в изследваните фенотипове обяснява прогресивното нарастване, числеността на неекспресиращите CD105 и STRO-1, клетки в последователно пасажирание на изследваните култури. Поради геометрично нарастващият брой на CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>-</sup> клетките, дължащо се на най-вероятно протичащото в другите фенотипове асиметрично делене, може да се изведе извода, че в неекспресиращите CD105 и STRO-1 клетки протича соматична митоза.

#### *IV. 2.3. Изследване на експресията и функционирането на PKC alpha и ERK1,2 в клетъчни култури от апикална папила.*

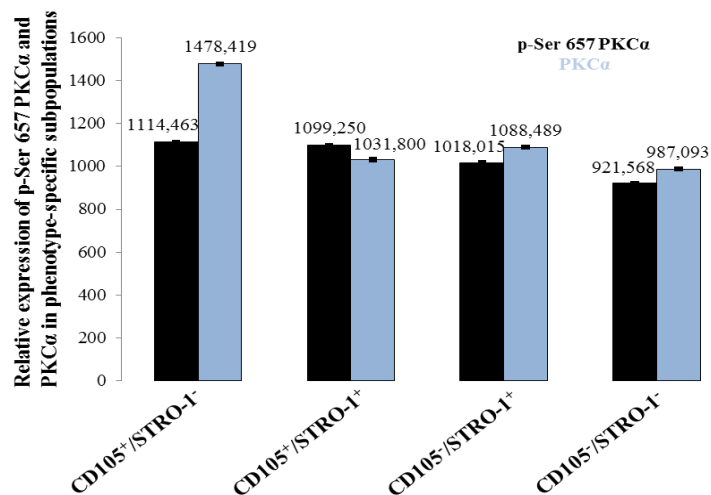
Поради установените разлики в пролиферативната активност на изследваните фенотипове бяха проведени и индиректни имунофлуоресцентни анализи за експресията и активността на много добре коментирани участници в регулацията, поддържаща пролиферативната клетъчна програма- ***PKC alpha* и *ERK1,2***

**Експресия, активност и субклетъчна локализация на PKC alpha в автокринни CD105/STRO-1<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup> и CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup> фенотипове.**



*Имунофлуоресцентно изследване на експресията, статуса на фосфорилиране и субклетъчната локализация на PKCalpha в експоненциално, автокринно растящи субпопулации CD105/STRO-1<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup> и CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup>. Увеличение 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000.*

Изображенията бяха получени при увеличение на обектива 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000 и прилагането на лазери с дължина на вълната 488 nm, 640nm, 405 nm, необходими да възбудят съответно IgG-FITC-белязаната PKCalpha, IgG-CFL-647-белязаната p-Ser-657-PKCalpha и DAPI-белязаните ядра. Цялата площ на всяка ямка беше анализирана и количествения анализ на относителната експресия на PKCalpha и p-Ser-657-PKCalpha бяха изчислени чрез алгоритъм за идентифициране на DAPI-белязаните ядра (405 флуоресценция), експресията на PKCalpha (488 флуоресценция) и p-Ser-657-PKCalpha (640 имунофлуоресценция) или идентифициране на DAPI-белязаните ядра (405 флуоресценция).

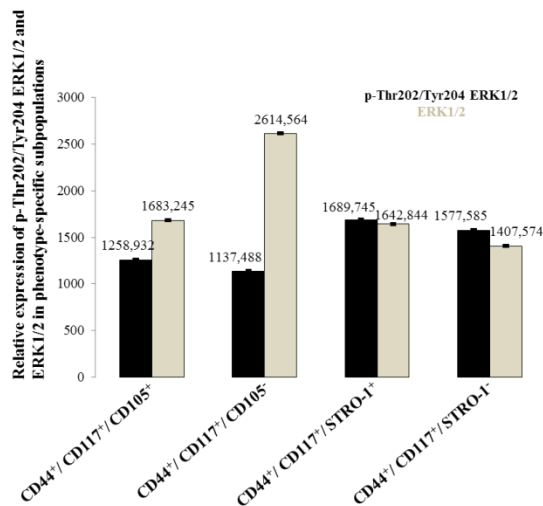


**Фиг. 3.** Определяне количествения анализ на експресията и статуса на фосфорилирането на PKC alpha и на p-Ser-657-PKCalpha.

Количественият анализ, показва че и в четирите фенотипа активността и експресията са в завишени количества, като най-голямо количество PKC alpha се експресира в субпопулацията на CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup>.

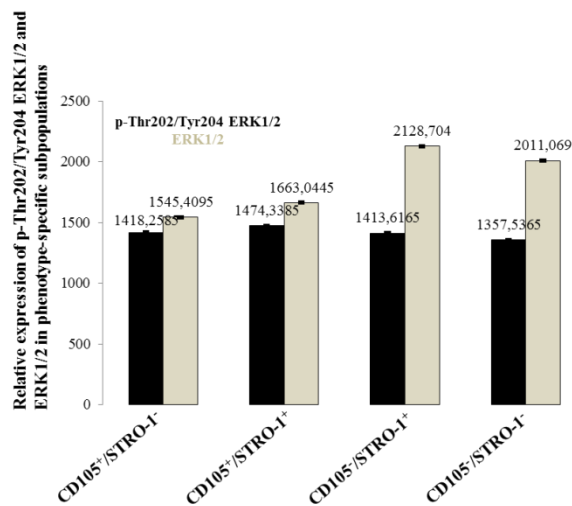
**Експресия, активност и субклетъчна локализация на ERK1,2 в автокринни CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup> и CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>-</sup> фенотипове.**

Изображенията бяха получени при увеличение на обектива 60X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000 и прилагането на лазери с дължина на вълната 488 nm, 555 nm, 405 nm, необходими да възбудят съответно IgG-FITC-белязаната **ERK1,2**, IgG-CY5-белязаната **p-Thr202/Tyr204 ERK1,2** и DAPI-белязаните ядра. Цялата площ на всяка ямка беше анализирана и количествения анализ на относителната експресия на **ERK1,2** и **p-Thr202/Tyr204 ERK1,2** бяха изчислени чрез алгоритъм за идентифициране на DAPI-белязаните ядра (405 флуоресценция), експресията на **ERK1,2** (488 флуоресценция) и **p-Thr202/Tyr204 ERK1,2** (555 имунофлуоресценция) или идентифициране на DAPI-белязаните ядра (405 флуоресценция).



**Фиг. 4.** Определяне количествения анализ на експресия и активност на ERK1,2 в хетерогенните фенотипове.

Въз основа на получените данни, бе установено че експресията на **ERK1,2** драстично се увеличава в популацията от клетки, която не експресира мезенхимния маркер CD105, докато активността на **p-Thr202/Tyr204 ERK1,2**, нараства в клетките експресиращи STRO-1<sup>+</sup>, така и на неекспресиращи STRO-1<sup>-</sup>.

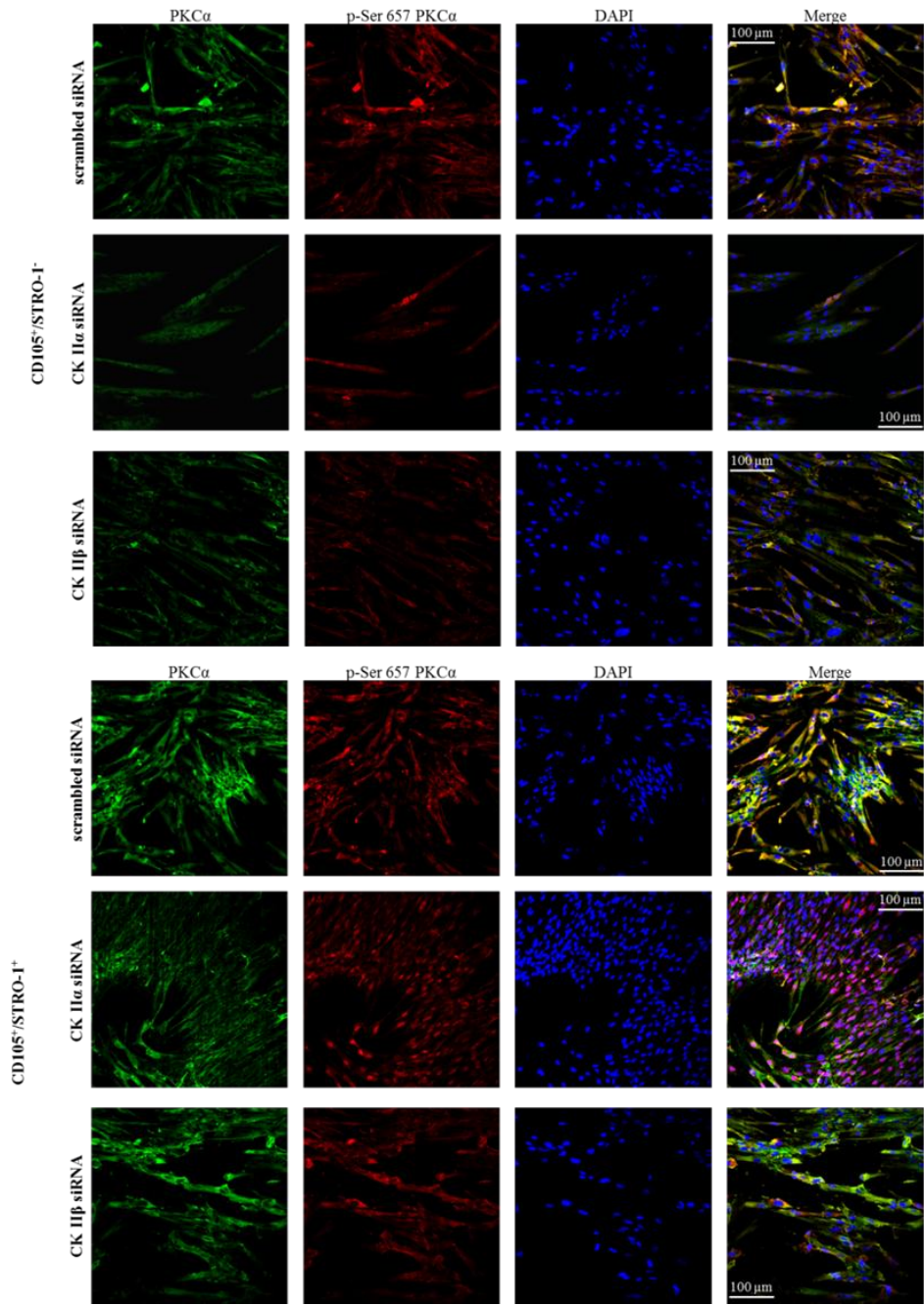


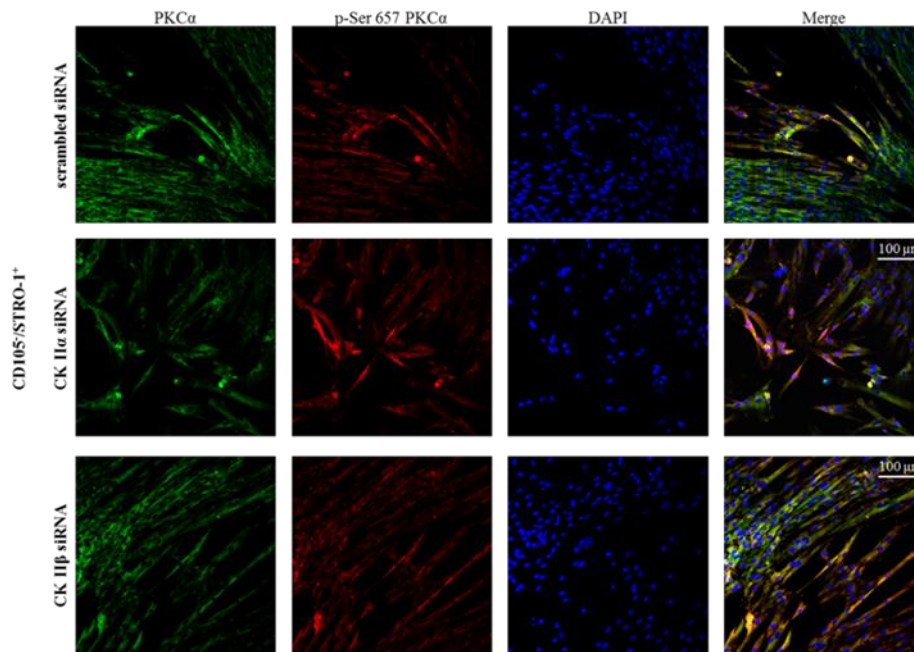
**Фиг. 5.** Определяне количествения анализ на експресия и активност на ERK1,2 в хомогенните субпопулации.

В изследваните фенотипове, получени вследствие на магнитно сепариране бе установено, че експресията на **ERK1,2** е завишена в популацията на CD105<sup>+</sup>/STRO<sup>+</sup> и двойно негативната CD105<sup>-</sup>/STRO<sup>-</sup>, докато активността на фосфорилираната форма на **p-Thr202/Tyr204 ERK1,2** се наблюдава в почти еднакви количества и в четирите субпопулации.

### **IV. 3. Изследване ролята на каталитичната ( $\alpha$ ) и некаталитичната ( $\beta$ ) субединица на протеин киназа СК2 в сигнализацията, поддържаща пролиферативната активност на клетъчни фенотипове от хетерогенния състав на апикална папила.**

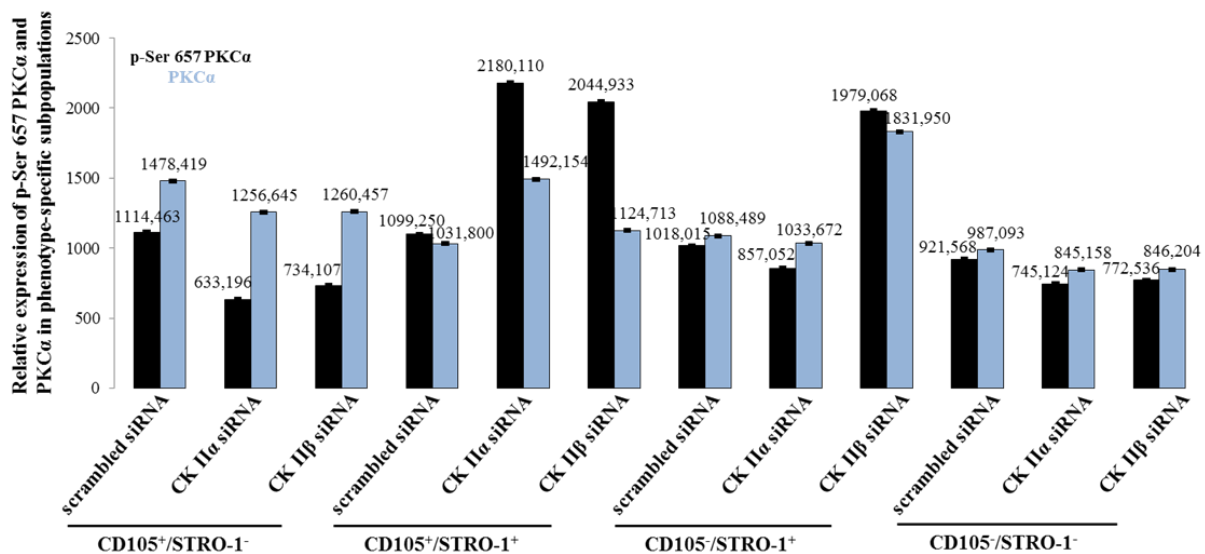
*IV. 3.1. Изследване на експресията и активността на РКС alpha при si RNA-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица ( $\alpha$ ) и при si RNA-медирано заглушаване на ендогенната некаталитична субединица ( $\beta$ ) в клетки от апикална папила.* Каталитичната или некаталитичната субединица на СК2 в експоненциално автокринно растящи клетки в хетерогенни култури или във фенотипно специфични хомогенни култури получени чрез MAC сепариране, беше *si RNA- медирано заглушена* и експресията и активността на РКС alpha бяха изследвани чрез индиректна имунофлуоресценция.





Индиректен имунофлуоресцентен микроскопски анализ на PKC alpha в siRNA СКII $\alpha$ -трансфектирани, siRNA СКII $\beta$ -трансфектирани и на посттрансфекционно BMP4-стимулирани hDAP. Увеличение 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000.

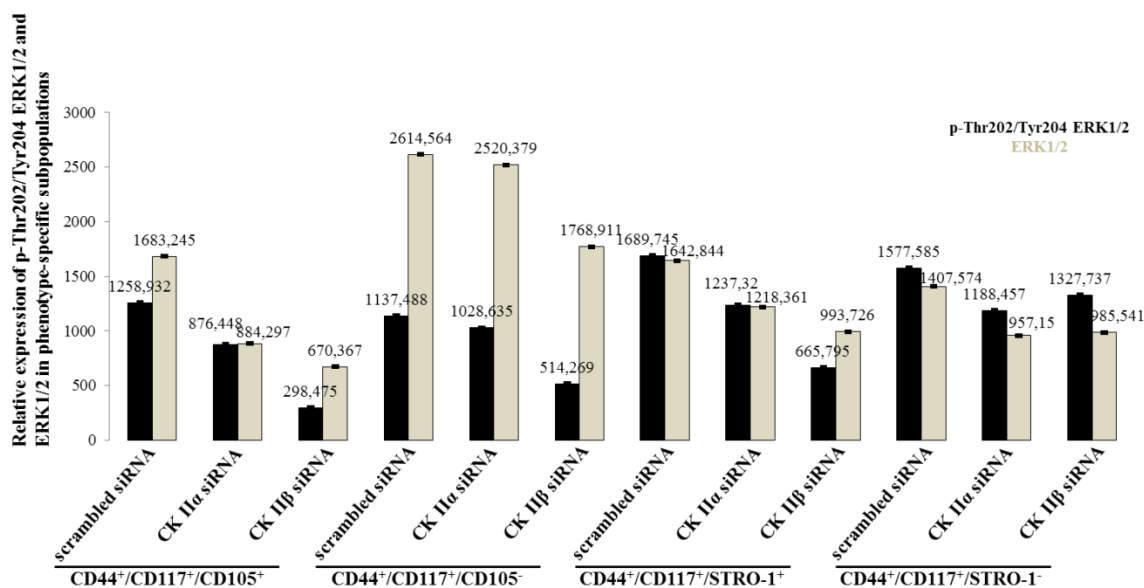
Изображенията бяха получени при увеличение на обектива 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000 и прилагането на лазери с дължина на вълната 488 nm, 640 nm, 405 nm, необходими да възбудят съответно IgG-FITC-белязаната PKCalpha, IgG-CFL-647-белязаната p-Ser-657-PKCalpha и DAPI-белязаните ядра. Цялата площ на всяка ямка беше анализирана и количествения анализ на относителната експресия на PKCalpha и p-Ser-657-PKCalpha бяха изчислени чрез алгоритъм за идентифициране на DAPI-белязаните ядра (405 флуоресценция), експресията на PKCalpha (488 флуоресценция) и p-Ser-657-PKCalpha (640 имунофлуоресценция) или идентифициране на DAPI-белязаните ядра (405 флуоресценция).



**Фиг. 6.** Определяне количествен анализ на статуса на фосфорилиране и експресия на РКС alpha в условия на *si RNA* – медирано- заглушаване на ендогенната каталитична субединица ( $\alpha$ ) и некаталитична ( $\beta$ ).

Въз основа на проведения количествен анализ се установи, че в популацията  $CD105^+/STRO-1^-$  при *si RNA* – медирано- заглушаване на ендогенната каталитична субединица ( $\alpha$ ) се наблюдава 4.24% инхибиране на фосфорилираната форма на p-Ser 657 PKCalpha, докато некаталитичната субединица ( $\beta$ ), оказва противоположен ефект. При експресията на РКС alpha се наблюдава потискане вследствие на *si RNA* – медирано- заглушаване на ендогенната каталитична субединица ( $\alpha$ ) с 47.5%, както и при некаталитичната субединица ( $\beta$ )-55%. В двойно позитивния фенотип  $CD105^+/STRO-1^+$  се установява стимулиращ ефект както на p-Ser 657 PKCalpha, така и на PKCalpha в резултат на *si RNA*–медирано- заглушаване на ендогенната каталитична субединица ( $\alpha$ ) и некаталитичната субединица ( $\beta$ ). В  $CD105^+/STRO-1^+$  при потискане на ( $\alpha$ ) субединицата, се повлиява както p-Ser 657 PKCalpha (30.9% инхибиране), така и PKCalpha (47.9% инхибиране). При *si RNA*–медирано- заглушаване на некаталитичната субединица ( $\beta$ ) се анализира стимулиращ ефект, както при p-Ser 657 PKCalpha, така и PKCalpha. В двойно негативния фенотип при *si RNA*–медирано- заглушаване на ендогенната каталитична субединица ( $\alpha$ ) и некаталитичната субединица ( $\beta$ ) се наблюдава потискане както на PKCalpha, така и на фосфорилираната й форма.

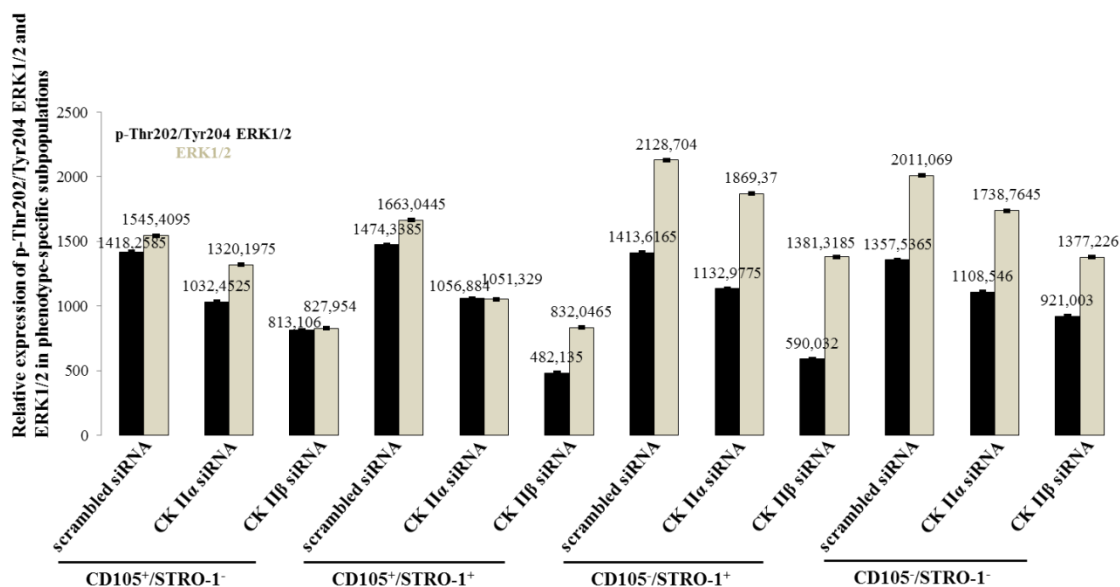
IV. 3 .2. Изследване на експресията и активността на ERK1,2 при *si RNA*-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица ( $\alpha$ ) и при *si RNA* - медирано заглушаване на ендогенната некаталитична субединица ( $\beta$ ) в клетки от апикална папила.



**Фиг. 7.** Изследване на експресията и активността на ERK1,2 при *si RNA*-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица ( $\alpha$ ) и при *si RNA* - медирано заглушаване на ендогенната некаталитична субединица ( $\beta$ ) в хетерогенни субпопулации.

Получените резултати, анализирани в хетерогенният състав на четирите популации от клетки на апикална папила, показват, че във фенотипа  $CD44^+/CD117^+/CD105^-$  значително се увеличава експресията на **ERK1,2** и че каталитичната субединица на CK2 ( $\alpha$ ) не повлиява върху неговото експресирание, докато при некаталитичната субединица на CK2 ( $\beta$ ) се наблюдава слабо понижаване спрямо контролата *si RNA*, същият ефект се установява и при активността на фосфорилирана форма на **p-Thr202/Tyr204 ERK1,2** - при *si RNA* - медирано заглушаване на

ендогенната некаталитична субединица ( $\beta$ )-намалява спрямо контролата *si RNA*. В клетките експресиращи и трите маркера  $CD44^+/CD117^+/CD105^+$  при *si RNA* - медирано заглушаване на ендогенната некаталитична субединица ( $\beta$ ) се установява почти 3 пъти понижаване на фосфорилираната форма на *ERK1,2* спрямо контролата, каталитичната субединица на *CK2* ( $\alpha$ ) понижават, както експресията, така и активността. В субпопулацията на  $CD44^+/CD117^+/STRO-1^+$  *p-Thr202/Tyr204 ERK1,2* и *ERK1,2* се експресират в еднакви количества в *si RNA* контролата и каталитичната субединица на *CK2* ( $\alpha$ ), понижават по един и същи начин както фосфорилираната форма, така и експресията на *ERK1,2*. При медирано заглушаване на некаталитична субединица ( $\beta$ ) активността на *p-Thr202/Tyr204 ERK1,2* намалява спрямо експресията на *ERK1,2*. В субпопулацията на  $CD44^+/CD117^+/STRO-1^+$  каталитичната ( $\alpha$ ), и некаталитичната ( $\beta$ ) субединица на *CK2* слабо повлияват *p-Thr202/Tyr204 ERK1,2* и *ERK1,2*.

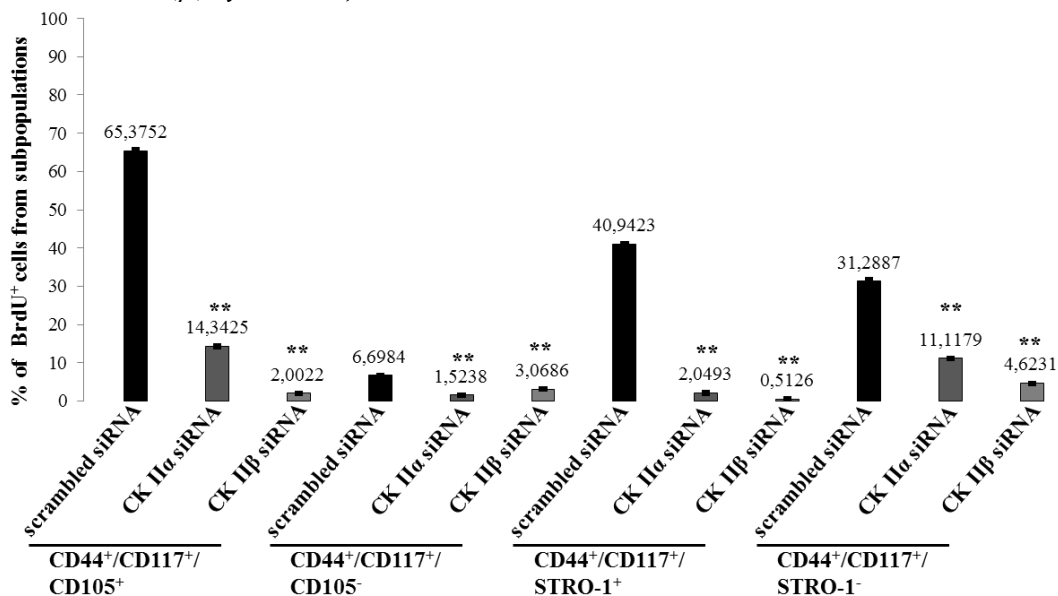


**Фиг. 8.** Изследване на експресията и активността на *ERK1,2* при *si RNA*-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица ( $\alpha$ ) и при *si RNA* - медирано заглушаване на ендогенната некаталитична субединица ( $\beta$ ) в хомогенни субпопулации.

В хомогенните субпопулации на  $CD105^+/STRO-1^-$  некаталитичната субединица на *CK2* ( $\beta$ ) понижават в почти еднаква степен както активността на фосфорилираната форма на *p-Thr202/Tyr204 ERK1,2*, така и експресията на *ERK1,2* спрямо *si RNA*-контролата. При *si RNA*-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица ( $\alpha$ ) активността на фосфорилираната форма на *p-Thr202/Tyr204 ERK1,2* се потиска повече, спрямо експресията на *ERK1,2* съпоставено с контролата. В двойно позитивния фенотип  $CD105^+/STRO-1^+$  каталитична субединица ( $\alpha$ ) инхибира в еднаква степен както *p-Thr202/Tyr204 ERK1,2*, така и експресията на *ERK1,2* спрямо *si RNA*-контролата. Некаталитичната субединица на *CK2* ( $\beta$ ) потиска почти 3 пъти активността на фосфорилираната форма на *p-Thr202/Tyr204 ERK1,2* спрямо контролата и почти 2 пъти намалява експресията на *ERK1,2*. В субпопулацията на  $CD105^-/STRO-1^+$  в контролните клетки се увеличават експресията на *ERK1,2* спрямо фосфорилираната форма на *p-Thr202/Tyr204 ERK1,2*, при *si RNA*-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица ( $\alpha$ ) минимално се понижават както *p-Thr202/Tyr204 ERK1,2*, така и експресията на *ERK1,2*. Некаталитичната субединица на *CK2* ( $\beta$ ) потиска почти 2 пъти фосфорилираната форма на *p-Thr202/Tyr204 ERK1,2* и слабо инхибира *ERK1,2*. В двойно негативната субпопулация  $CD105^-/STRO-1^-$  се установява стъпаловидно намаляване на *p-Thr202/Tyr204 ERK1,2* и *ERK1,2* спрямо *si*

RNA-контролата вследствие на *si* RNA-медирано заглушаване на каталитична субединица ( $\alpha$ ) и некаталитичната субединица на CK2 ( $\beta$ ).

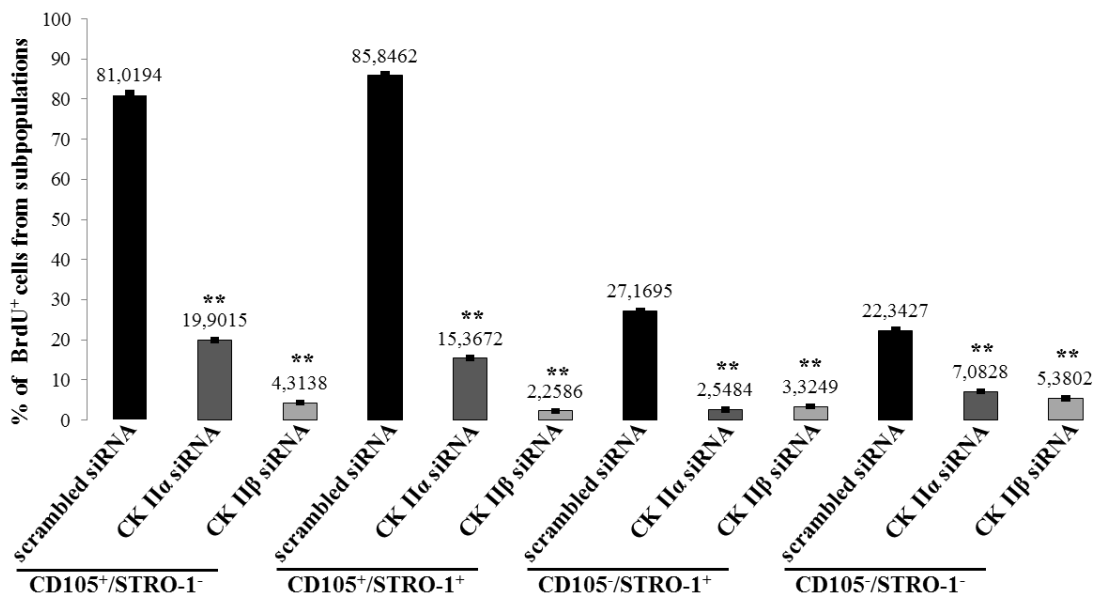
IV. 3. 3. Инкорпориране на *BdrU* в условия при *si* RNA-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица ( $\alpha$ ) и при *si* RNA-медирано заглушаване на некаталитичната ( $\beta$ ) субединица.



**Фиг. 9.** Определяне процентът пролиферативна активност в условия при *si* RNA-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица ( $\alpha$ ) и при *si* RNA-медирано заглушаване на некаталитичната ( $\beta$ ) субединица в хетерогенни субпопулации.

Данните са анализирани чрез one-way ANOVA, SigmaPlot Version 12.0 (Systat Software, San Jose, CA, USA), където стойността на *P* е по-малко или равно на 0.05-статистически достоверно:  $p^* \leq 0.001$

При изследване ролята на каталитичната  $\alpha$  и некаталитичната  $\beta$  субединица на протеин киназа CK2 в сигнализацията, поддържаща пролиферативната активност на клетъчните фенотипове **CD44<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>**, **CD44<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup>**, **CD44<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup>**, **CD44<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>STRO-1<sup>-</sup>** бе установено, че инхибиращият ефект вследствие на *si* RNA-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица ( $\alpha$ ) в **CD44<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>** е 78.1%, при некаталитичната ( $\beta$ ) субединица е 96.94%. При **CD44<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup>** субпопулация репресивния ефект вследствие на *si* RNA-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица ( $\alpha$ ) е 77.58%, при некаталитичната ( $\beta$ ) субединица е 54.30%. В популацията на **CD44<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>/STRO<sup>+</sup>** инхибирането при каталитична субединица ( $\alpha$ ) е 95.02%, докато при некаталитичната ( $\beta$ ) субединица е 98.75%. При субпопулацията **CD44<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>STRO-1<sup>-</sup>** инхибиращият ефект при каталитична субединица ( $\alpha$ ) е 64.47%, а при некаталитичната ( $\beta$ ) субединица 85.23%.



**Фиг. 10.** Определяне процентът пролиферативна активност в условия при *si RNA*-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица ( $\alpha$ ) и при *si RNA*-медирано заглушаване на некаталитичната ( $\beta$ ) субединица в хомогенни субпопулации.

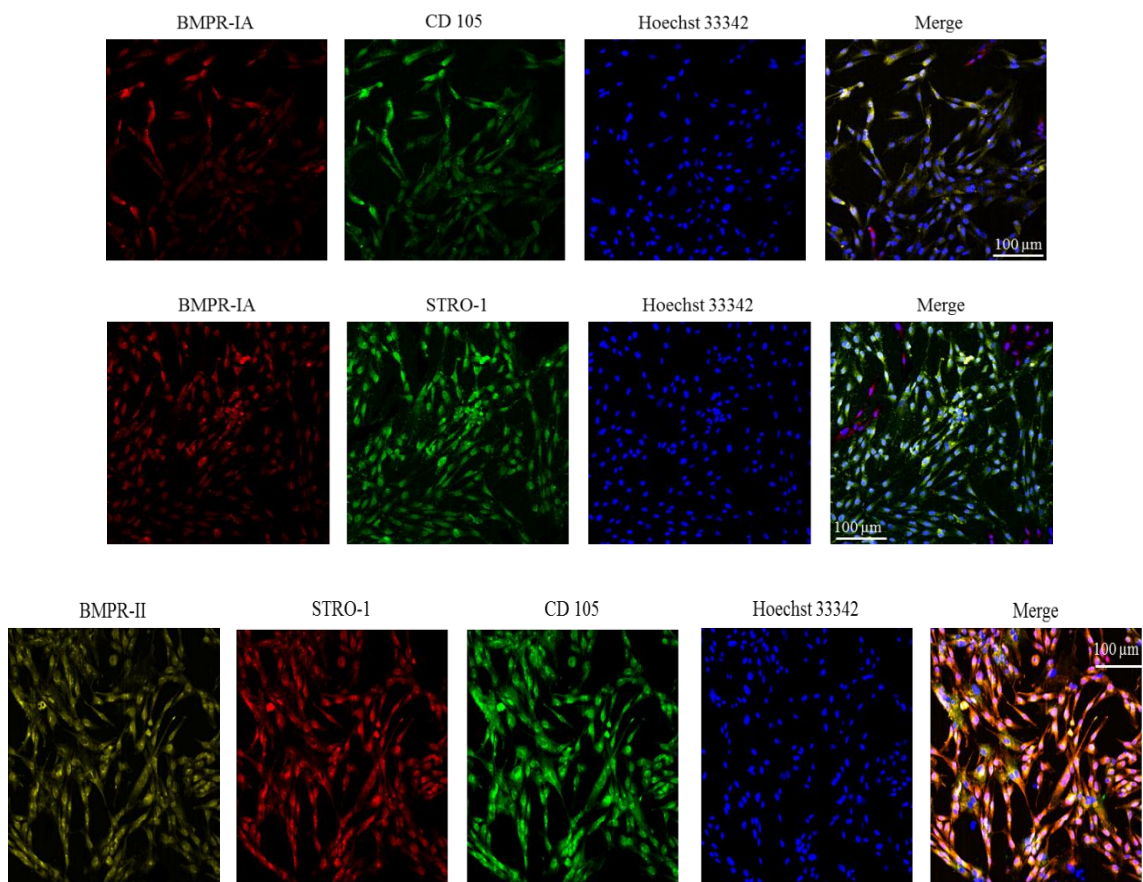
Данните са анализирани чрез one-way ANOVA, SigmaPlot Version 12.0 (Systat Software, San Jose, CA, USA), където стойността на  $P$  е по-малко или равно на 0.05-статистически достоверно:  $p^* \leq 0.001$

При изследване ролята на каталитичната  $\alpha$  и некаталитичната  $\beta$  субединица на протеин киназа CK2 в сигнализацията, поддържаща пролиферативната активност на клетъчните фенотипове вследствие инкорпорирането на BrdU в новосинтезираната ДНК-верига на **CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup>**, **CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup>**, **CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup>**, **CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>-</sup>** субпопулации бе установено, че инхибиращият ефект на *si RNA*-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица ( $\alpha$ ) в **CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup>** е 75.5%, при некаталитичната ( $\beta$ ) субединица е 94.7%. При двойно положителните **CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup>**, на *si RNA*-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица ( $\alpha$ ) е 82.1%, при некаталитичната ( $\beta$ ) субединица е 97.38%. В популацията на **CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup>** инхибиращият ефект при каталитична субединица ( $\alpha$ ) е 90.78%, докато при некаталитичната ( $\beta$ ) субединица е 87.75%. При двойно негативната субпопулация **CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>-</sup>** инхибиторният ефект при каталитична субединица ( $\alpha$ ) е 68.3%, а при некаталитичната ( $\beta$ ) субединица 76.01%.

#### **IV. 4. Изследване на BMP4-индуцирания остео/одонтогенен диференциационен потенциал на клетъчни фенотипове от хетерогенния състав на апикална папила.**

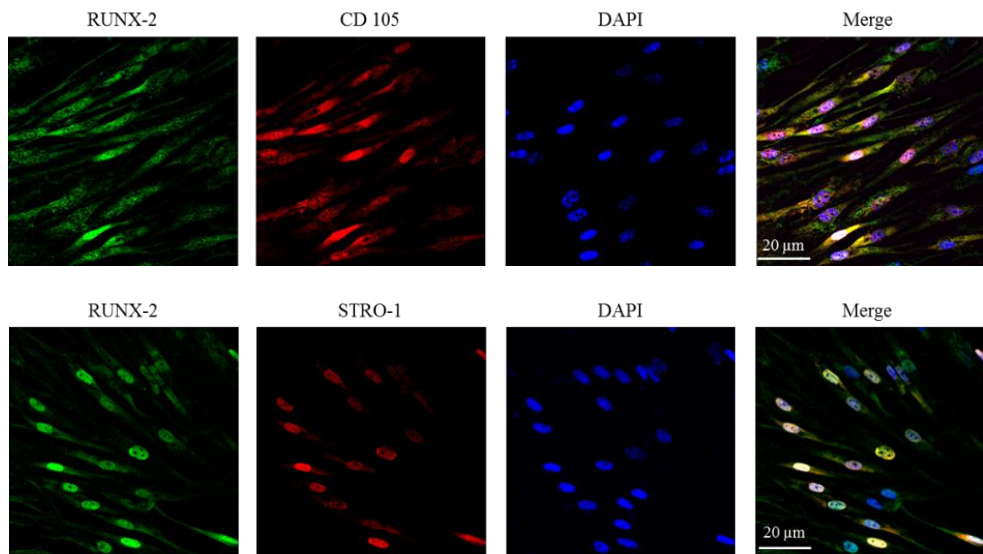
##### *IV. 4.1. Изследване на фенотиповете от апикална папила за клетъчно повърхностната експресия на BMPRIa и BMPRII и за вътреклетъчната експресия на транскрипционния фактор RUNX2 и OSTERIX.*

До настоящият момент не е изследвана експресията на рецепторните изоформи, отговорни за трансдуцирането на BMP4 растежния фактор, в изследваната тъкан. Заради това, експоненциално, автокринно растящите последователни пасажии от хетерогенните клетъчни култури от апикална папила бяха индиректно имунофлуоресцентно белязани срещу *BMPRIa* и стволото клетъчните маркери *CD105* или *STRO-1*, или срещу *BMPRII* и стволото клетъчните маркери.



Проведените мултифлуоресцентни анализи, доказват, че изоформата на рецептор Ia и рецептор II присъстват върху клетъчната повърхност на клетките, еспресиращи мезенхимните маркери CD105 и STRO-1.

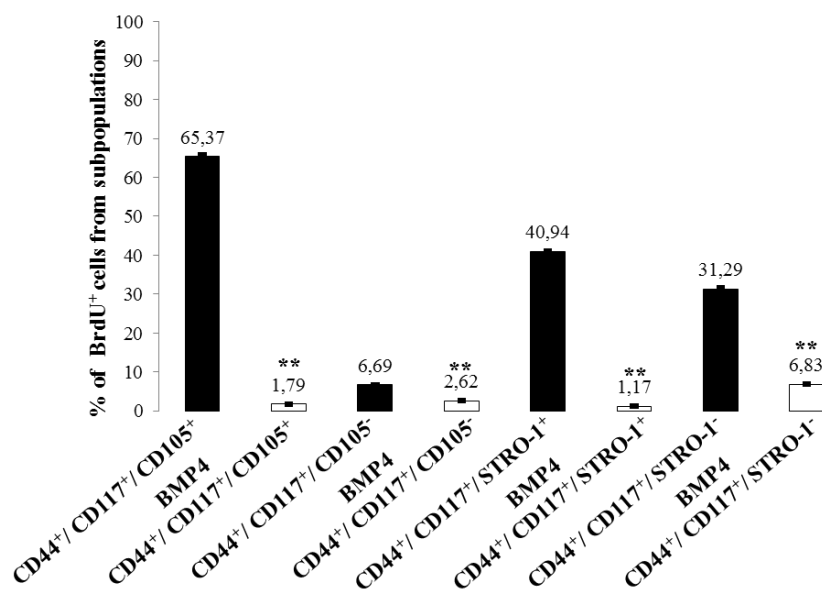
Тъй като BMP сигнала регулира остеогенната диференциация на мезенхимните клетки *in vivo* чрез контролиране експресията на „мастер“ гена *RUNX2*, който е отговорен за активирането на остеобластния специфичен транскрипционен фактор *Osterix*, бе изследвана вътреклетъчната експресия и на двата транскрипционни фактора



Имунофлуоресцентно оцветяване показва, че *RUNX-2* се експресира във всички клетъчни фенотипове от хетерогенния състав, независимо дали те експресират мезенхимните маркери CD105 и STRO-1, тъй като базалната експресия на транскрипционния фактор RUNX2 е характерен за всички клетки с мезенхимен произход и откриването му във всички фенотипове от хетерогенния състав на апикалната папила, показва, че епигенетичните фактори във входа на рутинното култивиране и пасажирание не променят мезенхимния фенотип.

#### IV. 4.2. Изследване на BMP4-индуцираният ефект върху пролиферативната активност на хетерогенния състав от апикална папила.

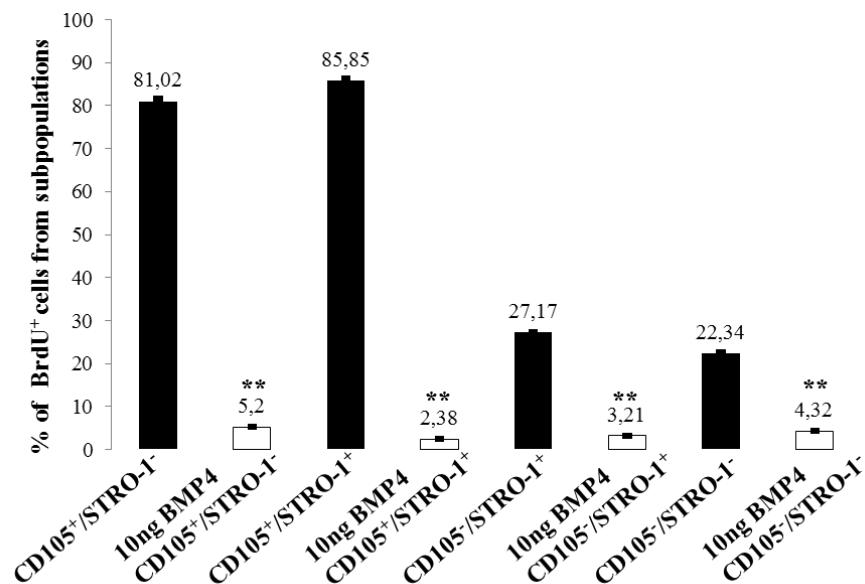
Експоненциално, автокринно растящите последователни пасажи от хетерогенните и хомогенни клетъчни култури от апикална папила, получени в резултат от двойно магнитно сепариране бяха подложени на 24 часова стимулация с 10 ng човешки рекомбинантен BMP4 растежен фактор. След изтичането на инкубационния период бе подаден BrdU за 2,5 часа, за да може да се установи репликационна активност.



**Фиг. 11.** Изследване на BMP4-индуцираният ефект върху пролиферативната активност на хетерогенния състав от апикална папила.

Данните са анализирани чрез one-way ANOVA, SigmaPlot Version 12.0 (Systat Software, San Jose, CA, USA), където стойността на *P* е по-малко или равно на 0.05-статистически достоверно: *p*<sup>\*</sup> < 0.001

В следствие на 24 часова стимулация с 10 ng човешки рекомбинантен BMP4 растежен фактор и след подаването на BrdU за 2.5 часа, се установи, че най-висока репликационна активност се наблюдава в клетките експресиращи CD44<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup> - 65.37%, последвани от субпопулацията на CD44<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup> - 40.94%. В субпопулацията, която е негативна за STRO-1 – репликационната активност е 31.29%, и най-слабо проявена е в клетките не експресиращи CD105<sup>-</sup> - 6.69%. Най-силно потискане на инкорпорирането на BrdU в новосинтезираната ДНК в следствие на стимулацията с BMP4 растежен фактор се наблюдава във фенотипа на CD44<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup> - 6.83%, последвано от 2.62% - в клетките, които не експресират CD105, клетките-позитивни за CD105 - 1.79% и най-слабо инхибиране се отчита в клетките –позитивни за STRO-1 - 1.17%.



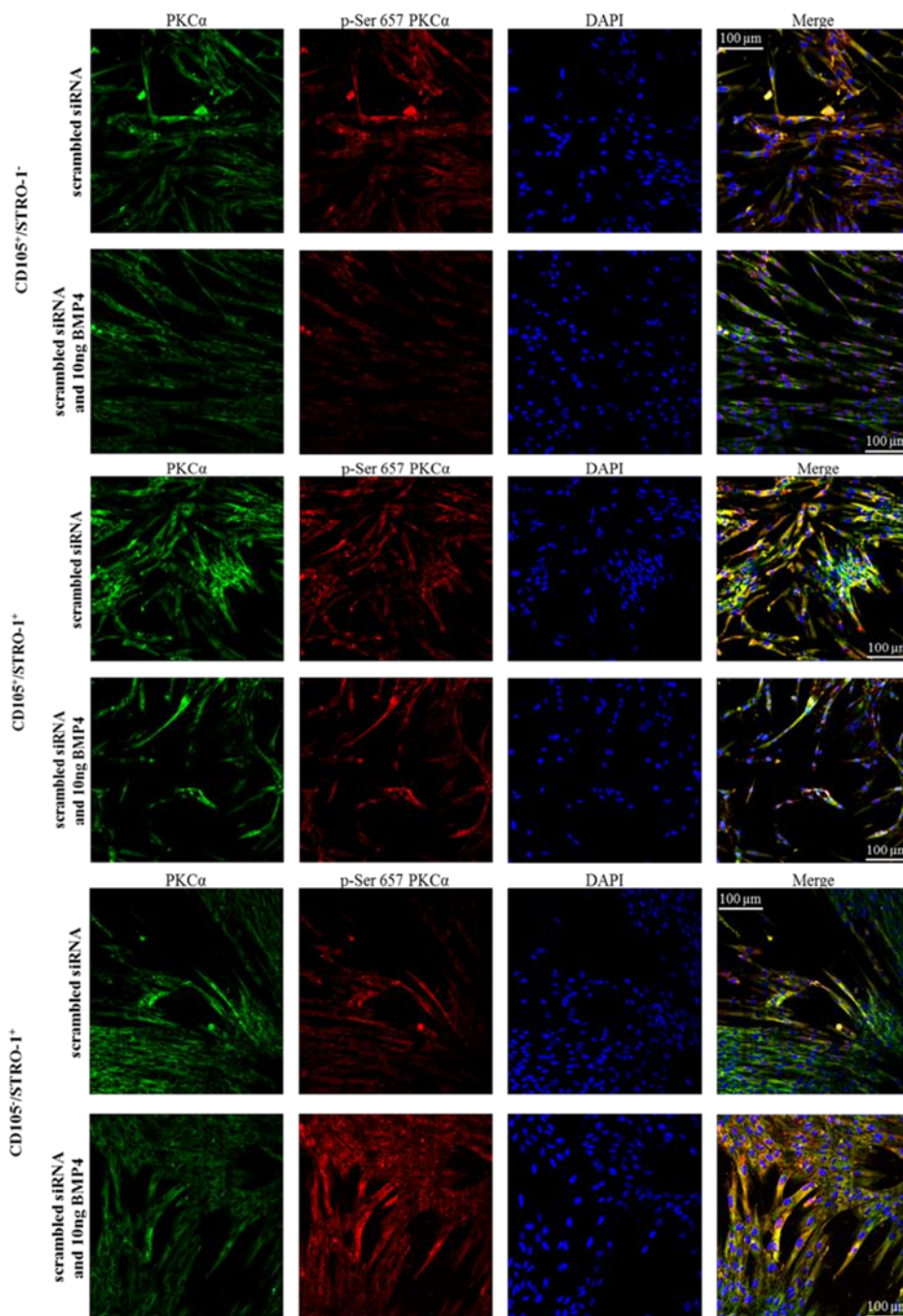
**Фиг. 12.** Изследване на BMP4-индуцираният ефект върху пролиферативната активност на хомогенния състав от апикална папила.

Данните са анализирани чрез one-way ANOVA, SigmaPlot Version 12.0 (Systat Software, San Jose, CA, USA) , където стойността на  $P$  е по-малко или равно на 0.05-статистически достоверно:  $p^* \leq 0.001$ .

В хомогенните субпопулации, получени в следствие на магнитното сепариране се отчита, че в двойно позитивната субпопулация на CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup> инкорпорирането на BrdU в новосинтезирана верига е най-много 85,85%, в субпопулацията не експресираща STRO-1 е 81.02%, последвани от 27.17% CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup> и при двойно негативните 22.34% CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>-</sup>. Най-силно потискане на репликационната активност при подаване на рекомбинантния човешки растежен фактор се установява при CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup> фенотипа-5.2, при двойно негативните 4.32% CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>-</sup>, следвани от 3.21%-STRO-1 позитивни и най-слаб инхибиращ ефект се наблюдава в двойно позитивната субпопулация на CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup> - 2.38%.

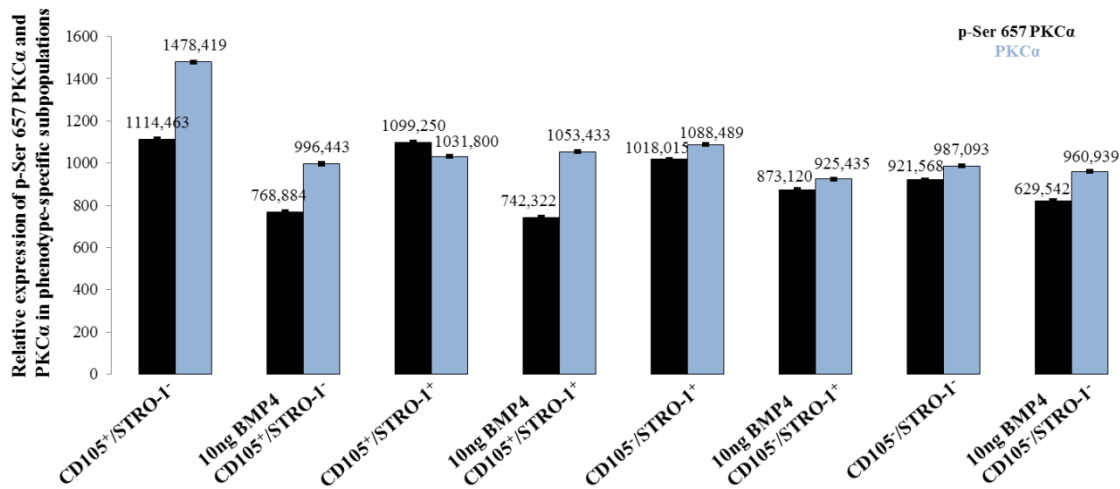
IV. 4 .3. Изследване на BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на PKC alpha и ERK1,2.

Експресия, активност и субклетъчна локализация на PKC alpha в автокринни и BMP4-третиранни CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup> и CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup> фенотипове.



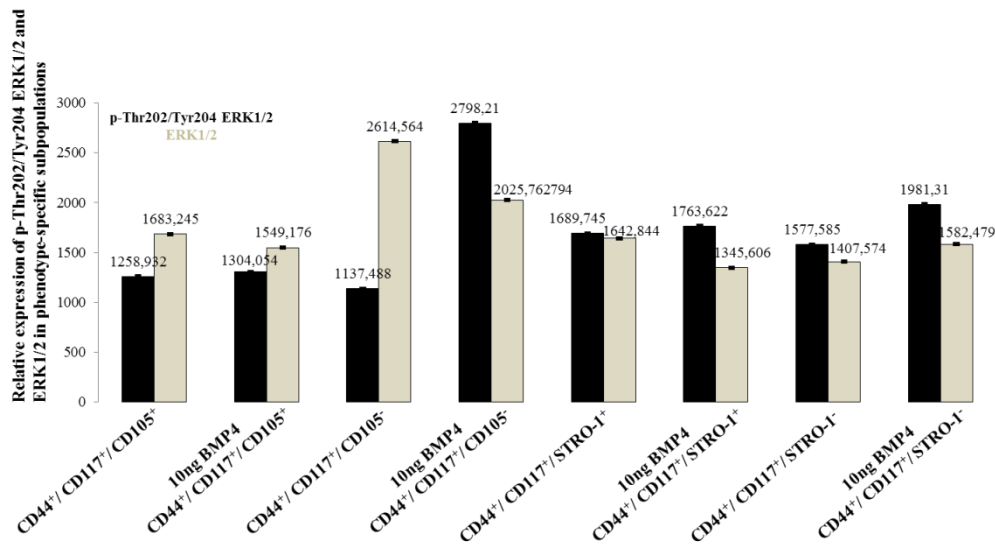
Индиректен имунофлуоресцентен микроскопски анализ на PKC alpha в автокринни и на посттрансфекционно BMP4-стимулирани hDAP. Увеличение 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000.

Въз основа на мултифлуоресцентните анализи, проведени чрез *IN Cell Analyzer 6000* се установява, че експресията и активността на PKC alpha е застъпена както в контролните клетки, така и в клетките стимулирани с BMP4.



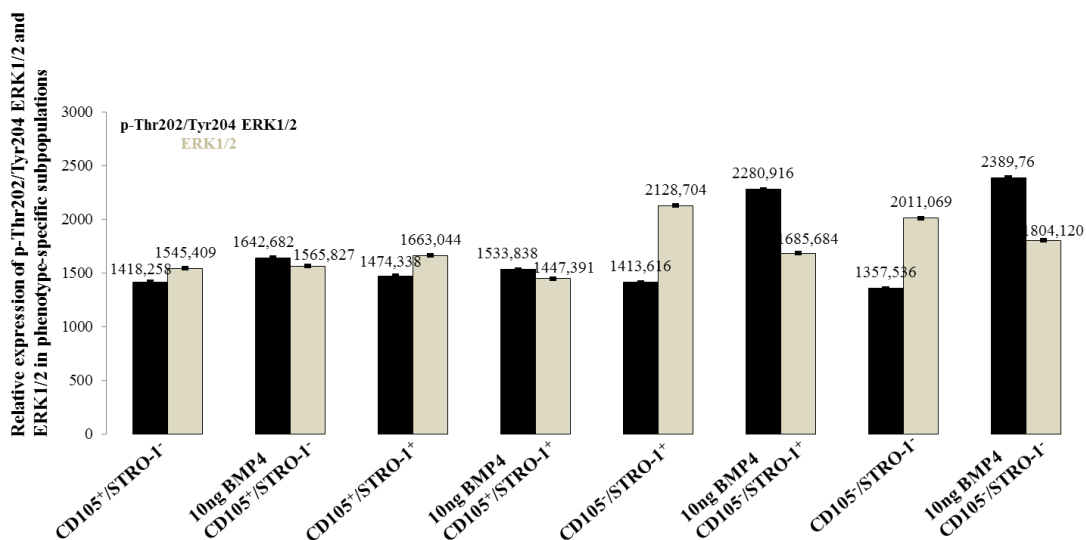
**Фиг. 13.** Изследване на BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на РКC alpha в хомогенни фенотипове.

Количественият анализ показва, че BMP4 влияе както на експресията на РКCalpha, така и на фосфорилираната ѝ форма. В CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup>, стимулирането с растежния фактор води до понижаване на експресията на p-Ser 657PKCα. В двойно-позитивния фенотип, активността намалява, докато експресията слабо се завишава. В клетките, експресиращи STRO-1, частично намалява както p-Ser 657PKCα, така и РКCalpha. В двойно негативните се наблюдава същият ефект - потискане на експресията и активността.



**Фиг. 14.** Изследване на BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на ERK1,2 в хетерогенни субпопулации.

В хетерогенният състав на четирите субпопулации експресията на ERK1,2 е най-силно застъпена в CD44<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>/CD105<sup>-</sup>, а фосфорилираната форма най-слабо се проявява, но в следствие на индуциране с растежния фактор BMP4, активността нараства почти 2 пъти, докато експресията слабо се понижава. Повишаване на активността се установява и във фенотипа на CD44<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup> при третиране с растежния фактор BMP4.



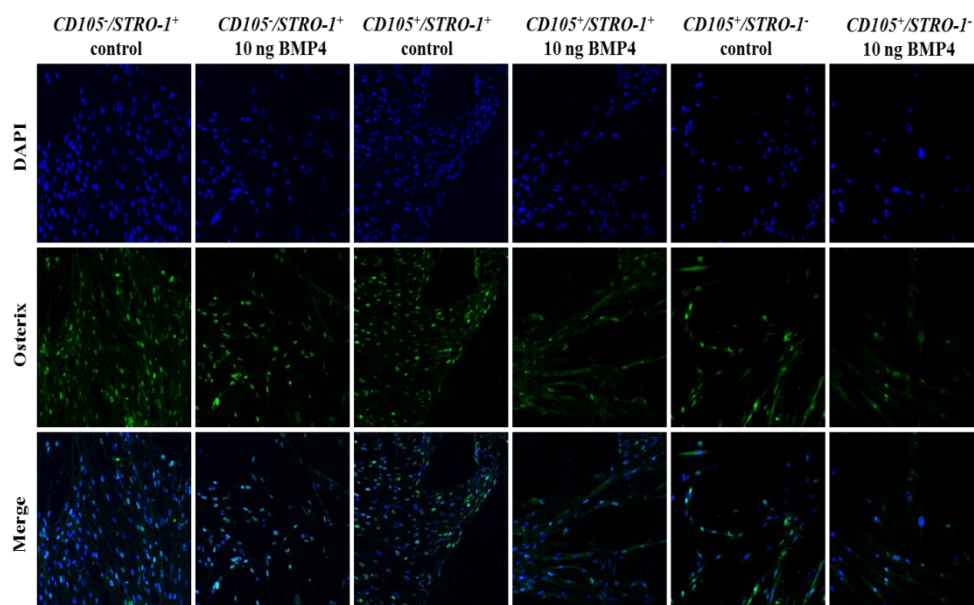
**Фиг. 15.** Изследване на BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на ERK1,2, в хомогенните фенотипове.

В хомогенните субпопулации, се установява фенотипно-специфична връзката между активността и експресията на ERK1,2. Експресията на ERK1,2 е най-силно проявена в CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup>, при поддаване на BMP4, активността се покачва значително. Такъв ефект се наблюдава и при двойно негативната субпопулация CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>-</sup>, завишено количество на фосфорилираната форма на ERK1,2. В останалите две субпопулации CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup> и CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup> активността и експресията са почти еднакви.

#### *IV. 4.4. Изследване на BMP4 индуцираният ефект върху експресията и вътреклетъчната локализация на транскрипционния фактор Osterix в клетъчни култури от апикална папила.*

До настоящият момент не е изследвана експресията на транскрипционния фактор *Osterix* в изследваната тъкан от дентална папила. Това е една от предпоставките за провеждането на мултифлуоресцентната микроскопия и количественият ѝ анализ.

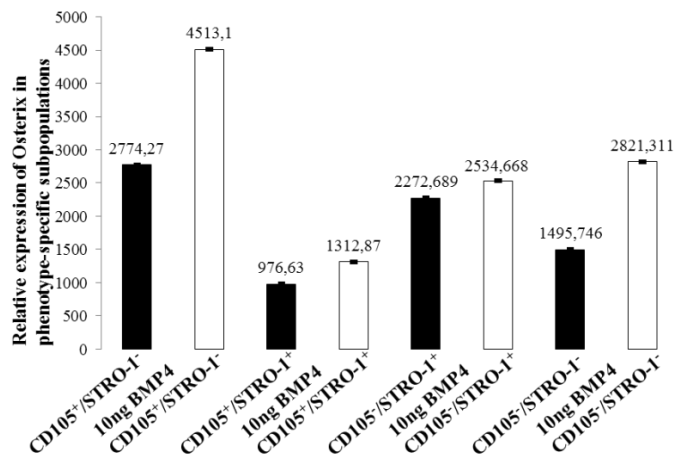
***Експресия и субклетъчна локализация на Osterix в автокринни и BMP4-третиранни CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup> и CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup> фенотипове.***



*Имунофлуоресцентно изследване на експресията и субклетъчната локализация на Osterix в експоненциално, автокринно растящи и третирани с BMP4 субпопулации, CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup> и CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup>. Увеличение 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000.*

Изображенията бяха получени при увеличение на обектива 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000 и прилагането на лазери с дължина на вълната 488 nm и 405 nm, възбуждащи Osterix-белязан с IgG-FITC и DAPI-белязаните ядра в двойно имунофлуоресцентно маркираните клетки. Цялата площ на всяка ямка беше анализирана и количествения анализ на относителната експресия на Osx бяха изчислени чрез алгоритъм за идентифициране на DAPI-белязаните ядра (405 флуоресценция), и на експресията на Osx (488 флуоресценция).

Експресията и вътреклетъчната локализация на транскрипционния фактор Osx, който е от съществено значение за преодонтбластната морфология и за одонтбластната диференциация, в експоненциално, автокринно растящите и третирани с BMP4 субпопулации CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup> и CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup>/ CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup>, получени в резултат на магнитно-активирано клетъчно разделяне, бяха имунофлуоресцентно микроскопски анализирани.

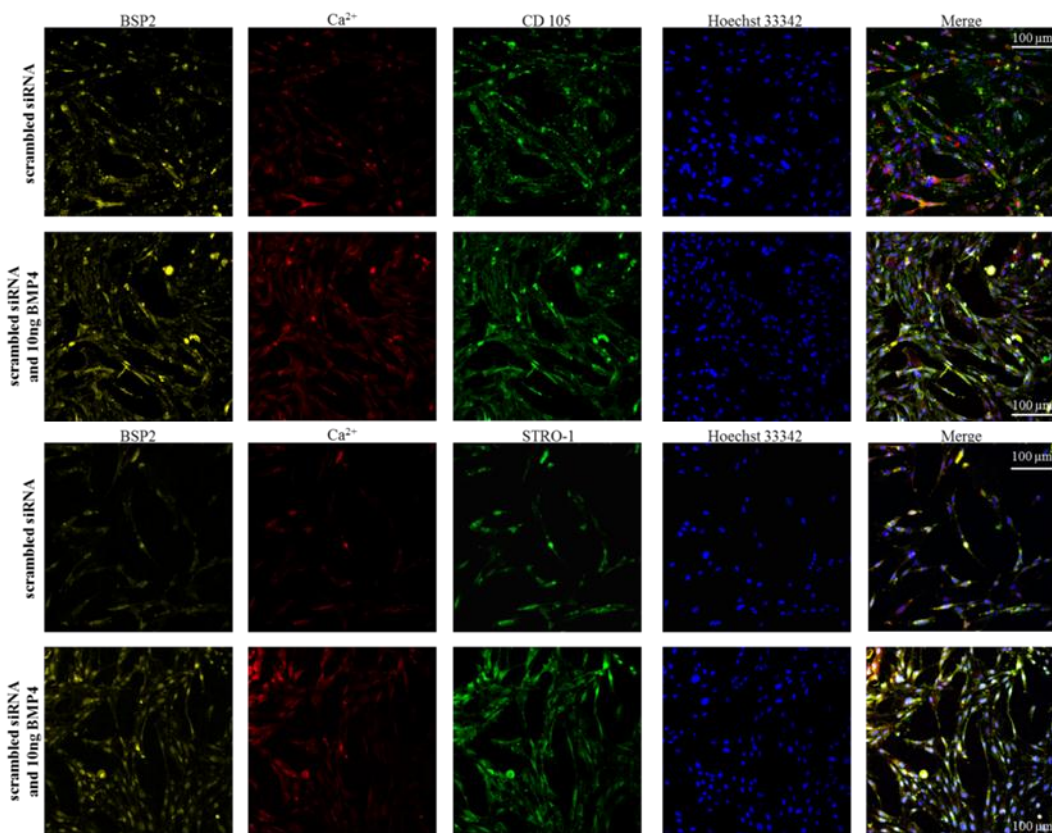


**Фиг. 16.** Количествен анализ за определяне базалната експресия на транскрипционния фактор *Osterix*.

Количественият анализ проведен въз основа на мултифлуоресцентната микроскопия на трите субпопулации, показва че, базалната експресия на транскрипционния фактор *Osterix* е фенотипно – специфично дедерминирана. Установява се, че най-много *Osterix* се експресира в  $CD105^+/STRO-1^-$ , последвано от  $CD105^-/STRO-1^+$  и най-малка базална експресия на *Osterix* се установява в двойно позитивния фенотип  $CD105^+/STRO-1^+$ .

Въз основа на проведения количествен анализ се установи, че BMP4 растежния фактор оказва активиращ ефект върху експресията и вътреклетъчната локализация на транскрипционния фактор *Osterix*. И в четирите изследвани субпопулации  $CD105^+/STRO-1^-$ ,  $CD105^+/STRO-1^+$ ,  $CD105^-/STRO-1^+$  се доказва, че в контролните клетки третирани с BMP4 растежния фактор, количеството на транскрипционния фактор *Osterix* се увеличава в сравнение с контролните- не третирани клетки.

*IV. 4. 5. Изследване на BMP4 индуцираният ефект върху клетъчно повърхностната експресията на BSP2 и калцификацията на екстрацелуларния матрикс.*

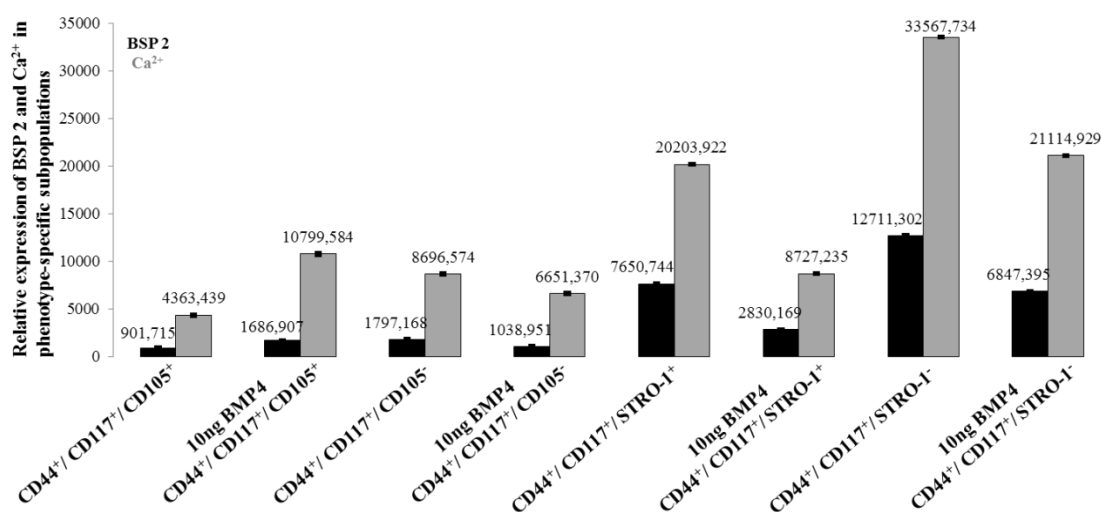


Индиректно имунофлуоресцентно микроскопско изследване на генната експресия на *BSP2* в контролни *si RNA* автокринно пролифериращи и в посттрансфекционно стимулирани с BMP4 растежен фактор, калцификацията на екстрацелуларния матрикс в  $CD105$  експресиращи и  $STRO1$  клетки.

Изображенията бяха получени при увеличение на обектива 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000 и прилагането на лазери с дължина на вълната 488 nm и 555nm 405 nm и 647 nm възбуждащи BSP-белязан с IgG-FITC,  $CD105$  и/или  $STRO-1$  с IgG-Cy5 и *Xylenol orange* с IgG-CFL и Hoechst -белязаните ядра в четворно имунофлуоресцентно

маркираните клетки. Цялата площ на всяка ямка беше анализирана и количествения анализ на относителната експресия на BSP2, CD105 и/или STRO1 и калциевия депозит бяха изчислени чрез алгоритъм за идентифициране на Neochst -белязаните ядра (405 флуоресценция), протеинова експресията на BSP2 (488 флуоресценция), CD105 или STRO-1(555флуоресценция) и калции (647 флуоресценция).

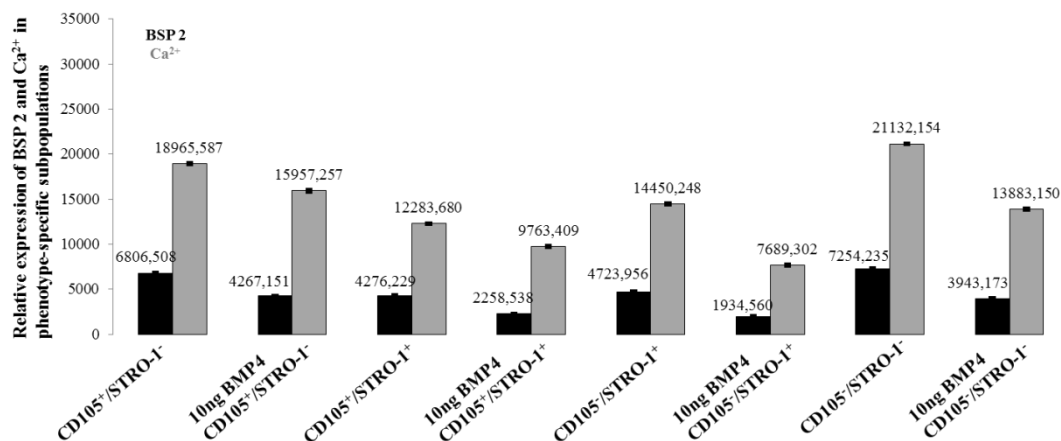
Мултифлуоресцентния анализ, детектиран чрез *IN Cell Analyzer 6000* отчита базална експресия на *BSP2* в контролните клетки. Установява се, че калциевите отлагания са повече в контролата третирана с 10ng рекомбинантен човешки растежен фактор BMP4, от колкото в нетретираните клетки. Доказва се също, че клетките които експресират по своята клетъчна повърхност BSP2, експресират и мезенхимния ствол marker CD105. Мултифлуоресцентното белязване, показва че клетките, които експресират BSP2, експресират и STRO-1 и че тяхното количество е повече в контролните клетки третиран с растежния фактор BMP4.



**Фиг. 17.** Количествен анализ за определяне базалната експресия на костния – сиало протеин в контролни, автокринно пролифериращи и в стимулиращи с растежен фактор в хетерогенни субпопулации.

В контролните клетки и на четирите субпопулации се установява, че базалната експресия на костния – сиало протеин варира в различни граници. Най-голямо количество BSP2 се експресира , в клетките нямащи STRO-1, последвани от клетките експресиращи STRO-1. В клетките негативни за мезенхимния ствол marker CD105, количеството на BSP2 е драстично намалено и най-слаба експресия се наблюдава във фенотипа CD44<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>

Количественият анализ показва, че се открива фенотипно-специфична връзка в изследваните хетерогенни субпопулации. Най-много калциеви депа са установени в CD44<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup> в следствие на което и количеството на костният – сиало протеин (BSP2) е в най-голяма степен завишено в не третираните клетки. При индуцирането с рекомбинантен човешки растежен фактор BMP4, количеството на калциевите отлагания, както и на костният – сиало протеин (BSP2) намаляват.



**Фиг. 18.** Количествен анализ за определяне базалната експресия на костния – сиало протеин в контролни, автокринно пролифериращи и в стимулиращи с растежен фактор в хомогенни субпопулации.

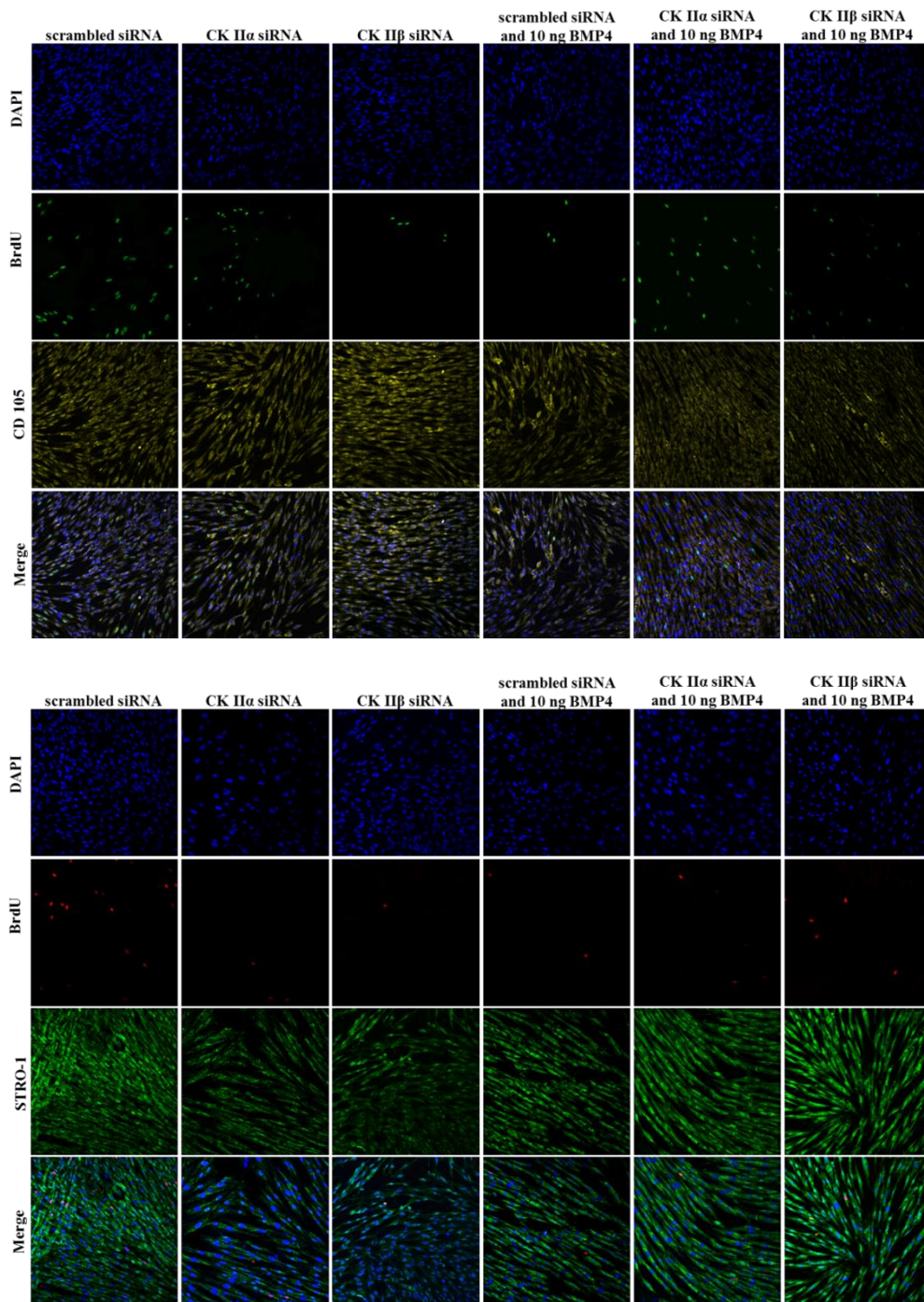
Количественият анализ за базалната експресия на костния –сиало протеин на четирите субпопулации, получени вследствие на проведеното магнитно двойно сепариране е още по-детайлно. Установява се, че най-голямо количество се експресира в двойно негативната субпопулация, последвано от субпопулацията, която не експресира STRO-1, но експресира CD105, следвана от CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup> и най-малко количество на BSP2 се установява в двойно позитивната субпопулация.

В хомогенните субпопулации се установява, че най-много калциеви отлагания се дедектират в CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>-</sup>, както и експресията на BSP2 се увеличава в сравнение с останалите фенотипове. При индуцирането с BMP4, количеството на калции и костният-сиало протеин намаляват.

#### **IV. 5. Изследване ролята на каталитичната ( $\alpha$ ) и некаталитичната ( $\beta$ ) субединици на протеин киназа CK2 в трансдуцирането на остеогенния BMP4 сигнал в клетъчни фенотипове от хетерогенния състав на апикална папила.**

##### *IV. 5. 1. Изследване на ролята на ( $\alpha$ ) и ( $\beta$ ) субединици на протеин киназа CK2 за трансдуцирането на BMP4-антипролиферативен ефект.*

Експоненциално, автокринно растящите клетъчни култури от апикална папила, в които експресията на ( $\alpha$ ) или ( $\beta$ ) е *si RNA*-медирано заглушена бяха стимулирани за 24h с BMP4 и BrdU за 2,5 часа за да се проследи репликационната активност.



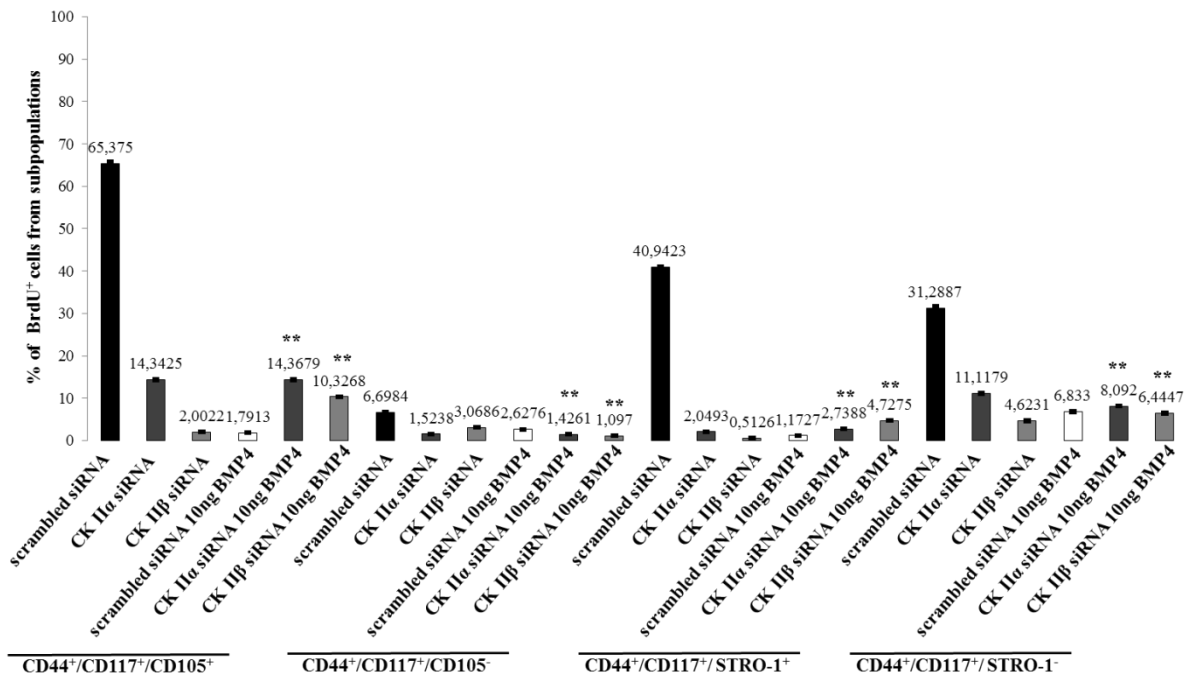
**Индиректен имунофлуоресцентен микроскопски анализ на BrdU инкорпурирането в CD105 и STRO-1<sup>+</sup> siRNA СКII $\alpha$ -трансфектирани, siRNA СКII $\beta$ -трансфектирани и на посттрансфекционно BMP4-стимулирани hDAP. Увеличение 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000.**

За изследване на участието на СКII $\alpha$  и на СКII $\beta$ , и на ефекта на растежния фактор BMP4 в регулацията на генната експресия на CD105 и репликационната активност на CD105<sup>+</sup> клетки, на трансфектираните както и на посттрансфекционно BMP4-стимулираните клетки бе подаден BrdU и неговото включване в новосинтезираната ДНК беше установено чрез индиректна тройна

имунофлуоресцентна микроскопия. Получените мултифлуоресцентни изображения бяха подложени на алгоритъм. За всеки експеримент се изчислява, цялата ямка и се установява процентът единични положителни и двойно положителни клетки на база алгоритъм за идентифициране на ядра на база DAPI багрило, BrdU-съдържаща ДНК (за 647 флуоресценция или 488 флуоресценция) и протеинова експресия на базата на 488 флуоресценция (за STRO-1) или 555 флуоресценция (за CD 105), съответно.

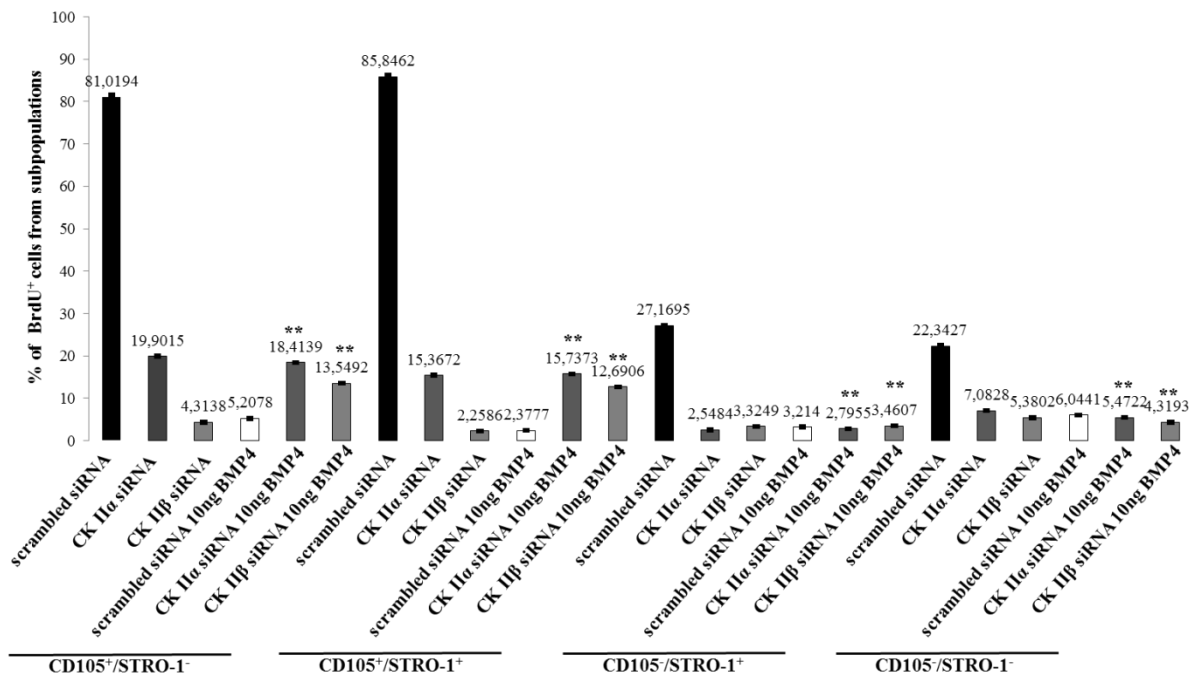
Трансфектирането на автокринно пролифериращи клетки с siRNA СКII $\alpha$  или с siRNA СКII $\beta$  води до значително намаляване на броя клетки инкорпорирани BrdU т. е. се наблюдава значимо понижаване на репликационната активност, която е най-силно проявено в siRNA СКII $\beta$ -трансфектираните клетки, в сравнение с репликационната активност на нетретираните клетки (scrambled siRNA). 24-часовото стимулиране с BMP4 има много ясно изразен отрицателен ефект върху ДНК синтезата. Това най-вероятно се дължи на пролиферационното действие на BMP4-индуцираната сигнализация. Репликационната активност на нестимулираните с BMP4 СКII $\alpha$ -трансфектирани клетки е еднаква с тази на посттрансфекционно BMP4-стимулираните, което доказва, че понижаването на белтъчната синтеза на каталитичната субединица е първичното събитие, водещо до потискане на ДНК синтезата и че BMP4-индуцираната сигнализация в тези условия не е част от регулацията на репликацията. Докато при посттрансфекционното стимулиране с BMP4 на СКII $\beta$ -трансфектираните клетки се установява повишаване на пролиферативната им активност в сравнение с нестимулираните с BMP4 СКII $\beta$ -трансфектирани клетки, което показва, че трансдукцията на BMP4 сигнала от сигналните мрежи, в които участва по-малко от нормалното СКII $\beta$  има малък положителен ефект върху ДНК синтезата.

24-часовото третиране с BMP4 има силен отрицателен ефект върху репликационната активност и на двата вида клетъчни популации, който е много по-силно изразен в STRO-1<sup>+</sup> клетки. Посттрансфекционното третиране с BMP4 не променя репликационната активност на STRO-1<sup>+</sup>СКII $\alpha$ -трансфектирани клетки в сравнение с тази на нестимулираните с BMP4 STRO-1<sup>+</sup>СКII $\alpha$ -трансфектирани клетки, но слабо понижава репликационната активност на STRO-1<sup>-</sup>СКII $\alpha$ -трансфектирани клетки спрямо тази на нестимулираните с BMP4 STRO-1<sup>-</sup>СКII $\alpha$ -трансфектирани клетки. Това доказва, че понижаването на белтъчната синтеза на каталитичната субединица е първичното събитие, водещо до потискане на ДНК синтезата в STRO-1<sup>+</sup>клетки и че BMP4-индуцираната сигнализация в тези условия не е част от регулацията на репликацията в STRO-1<sup>+</sup>клетки, но е част от регулацията на репликацията в STRO-1<sup>-</sup>. Посттрансфекционно стимулиране с BMP4 има отново негативен ефект върху репликационната активност на STRO-1<sup>+</sup>СКII $\beta$ -трансфектирани клетки, който е по-слаб спрямо ефекта на BMP4 върху ДНК синтезата в STRO-1<sup>+</sup>контролни (scrambled siRNA and 10 ng BMP4) клетки. Докато репликацията в BMP4-стимулираните STRO-1<sup>-</sup>СКII $\beta$ -трансфектирани клетки е почти равна на репликацията на BMP4-стимулираните STRO-1<sup>-</sup>контролни (scrambled siRNA и 10 ng BMP4) клетки. Подобно на по-горе описаните ефекти на потискането на каталитичната субединица, така и тези ефекти на потискането на некаталитичната субединица на СК2 са фенотипно-специфични по отношение на участието на BMP4-индуцираната сигнализация в регулацията на репликацията на STRO-1<sup>+</sup> клетки и на STRO-1<sup>-</sup> клетки.



**Фиг. 19.** Установяване на антипролиферативен ефект в хетерогенни фенотипове при условия на *si RNA* медирано заглушаване на каталитичната и некаталитичната субединица. Данните са анализирани чрез one-way ANOVA, SigmaPlot Version 12.0 (Systat Software, San Jose, CA, USA) , където стойността на *P* е по-малко или равно на 0.05-статистически достоверно:  $p^{**} < 0.001$

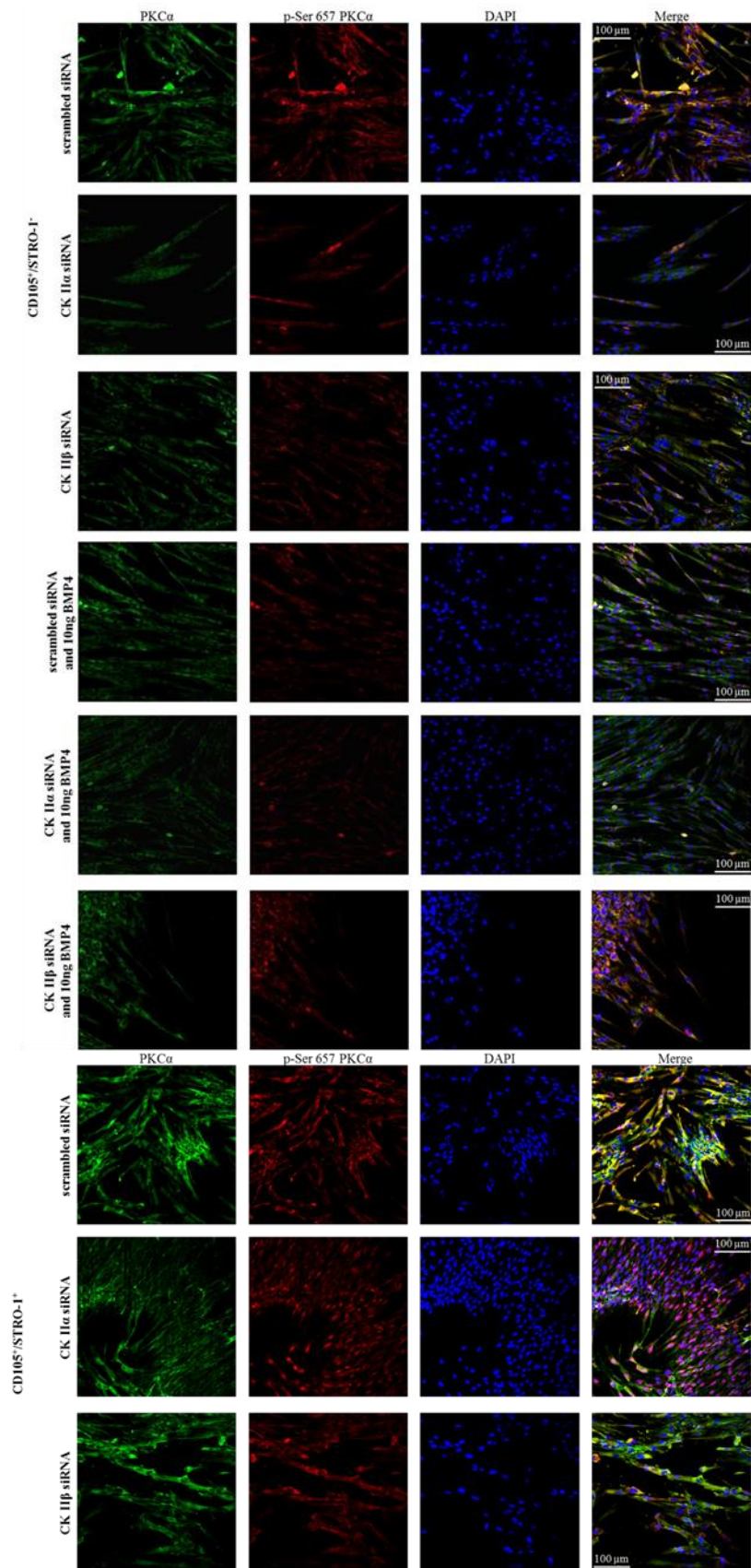
При *si RNA* медирано-заглушаване на каталитичната  $\alpha$  и некаталитичната  $\beta$  субединица в хетерогенните субпопулации и стимулирането им с BMP4 растежен фактор се стига до извода, че във фенотипа на CD44<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup> репликационната активност на каталитичната субединица се увеличава частично след подаване на растежния фактор, докато при некаталитичната почти 5 пъти се увеличава. В субпопулацията на клетките не експресиращи CD105 се наблюдава антипролиферативен ефект, както при  $\alpha$ , така и при  $\beta$  субединицата на протеин киназа CK2. В клетките позитивни за мезенхимния маркер STRO-1 репликационната активност на каталитичната субединица се увеличава сравнително малко след стимулирането ѝ с BMP4 докато при некаталитичната почти 4 пъти. Във фенотипа на CD44<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup> при *si RNA* медирано-заглушаване на каталитичната  $\alpha$  субединица се наблюдава инхибиране на пролиферативната активност вследствие на индуцирането ѝ с BMP4, докато при некаталитичната  $\beta$  субединица се установява слабо завишаване.

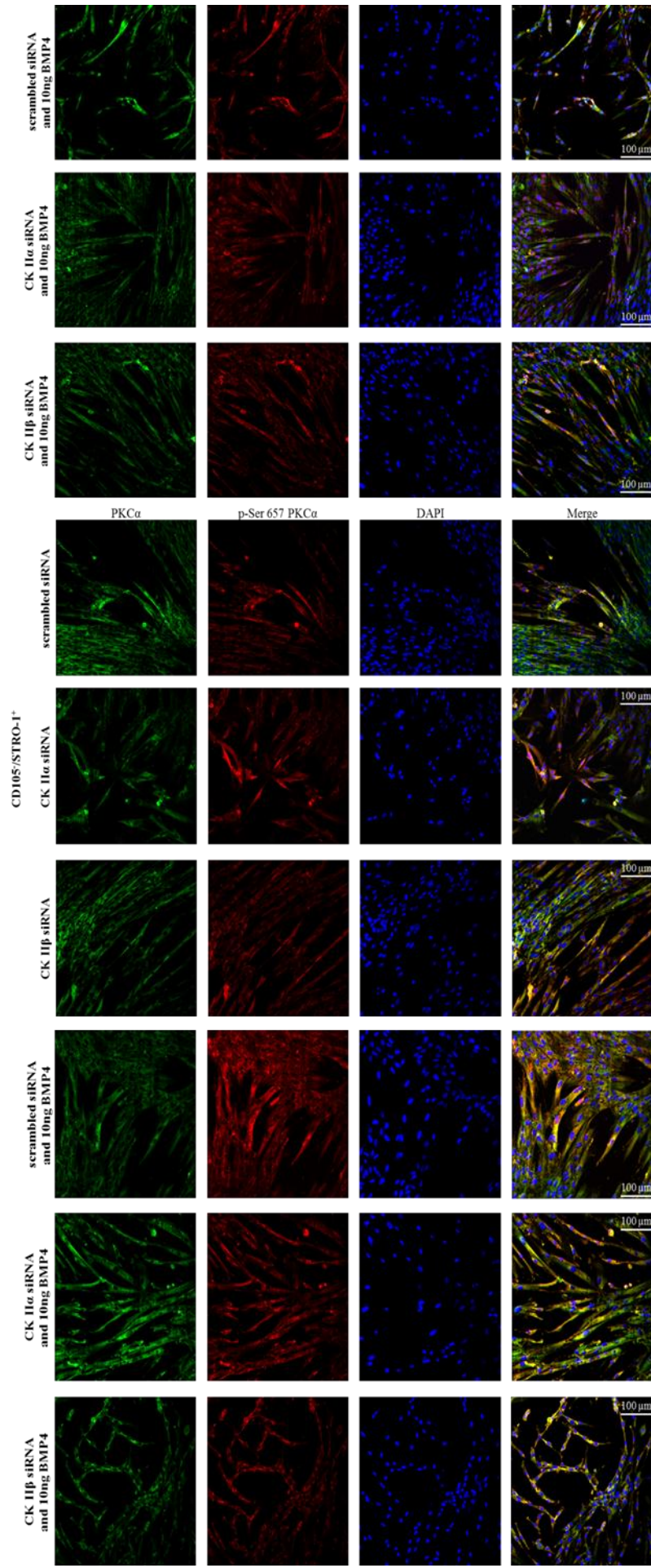


**Фиг. 20.** Установяване на антипролиферативен ефект в хомогенни фенотипове при условия на *si RNA* медирано заглушаване на каталитичната и некаталитичната субединица. Данните са анализирани чрез one-way ANOVA, SigmaPlot Version 12.0 (Systat Software, San Jose, CA, USA), където стойността на *P* е по-малко или равно на 0.05-статистически достоверно:  $p^{**} < 0.001$

В хомогенните субпопулации установяването на пролиферативната активност при *si RNA* медирано-заглушаване на каталитичната  $\alpha$  и некаталитичната  $\beta$  субединица и трансдуцирането на BMP сигнала е още по-детайлно. В субпопулацията на CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup>, пролиферативната активност намалява при заглушаването на  $\alpha$  субединицата и индуцирането ѝ с BMP4 растежен фактор, докато при  $\beta$  субединицата се наблюдава трикратно увеличаване на пролиферативната активност, вследствие на заглушаването и стимулирането ѝ с BMP4. В двойно позитивната субпопулация се дедектира минимално завишава на инкорпорирането на BrdU на  $\alpha$  субединицата и BMP4, при  $\beta$  субединица-индуцирането ѝ с BMP4 води до 6 пъти увеличаване на пролиферативната активност. Във фенотипа на CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup> се наблюдава много слабо завишаване на каталитичната и некаталитичната субединица на протеин киназа CK2 при условия на стимулиране с BMP4. В двойно негативната субпопулация се наблюдава анти-пролиферативен ефект при *si RNA* медирано-заглушаване на каталитичната  $\alpha$  и некаталитичната  $\beta$  субединица вследствие на индуцирането им с BMP4.

IV. 5. 2. Роля на  $\alpha$  и  $\beta$  субединицата на протеин киназа CK2 за BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на PKC и ERK1,2

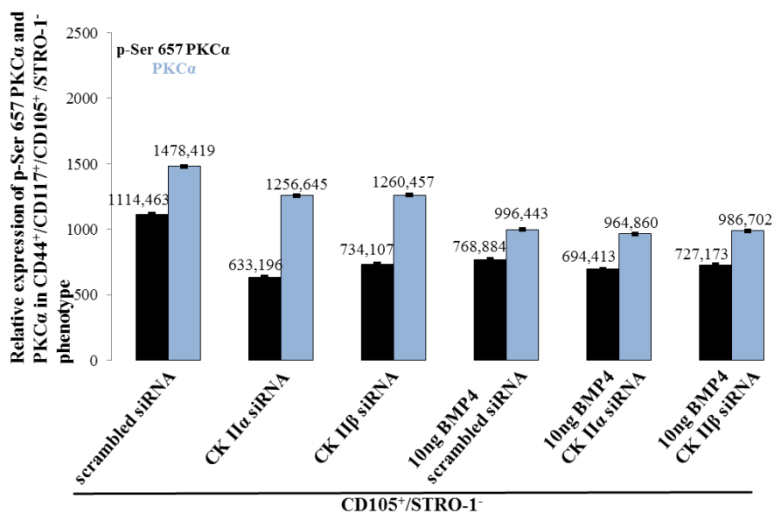




**Индиректна имунофлуоресцентна микроскопия на PKC  $\alpha$  и p-Ser 657PKC $\alpha$  в СКII $\alpha$ -трансфектирани и в СКII $\beta$ -трансфектирани автокринно пролифериращи и в посттрансфекционно стимулирани с BMP4 в CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup>; CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup>;CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup> фенотипове. Увеличение 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000**

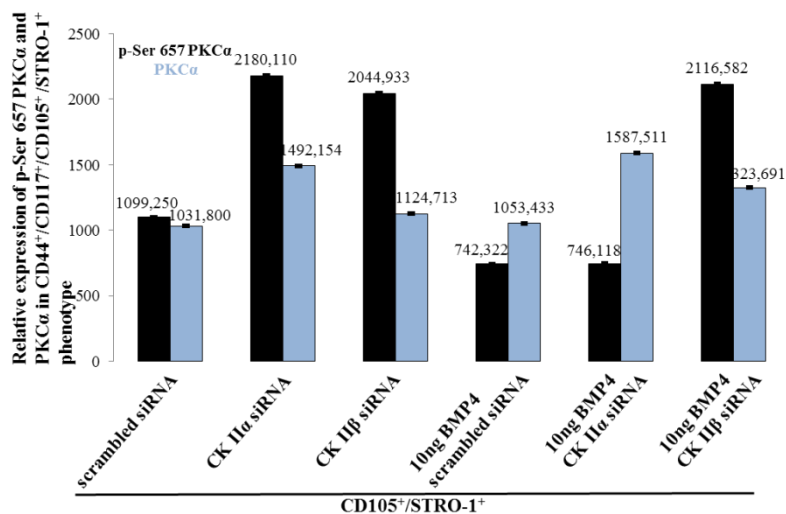
Изображенията бяха получени при увеличение на обектива 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000 и прилагането на лазери с дължина на вълната 488 nm, 640nm, 405 nm, необходими да възбудят съответно IgG-FITC-белязаната PKC $\alpha$ , IgG-CFL-647-белязаната p-Ser-657-PKC $\alpha$  и DAPI-белязаните ядра. Цялата площ на всяка ямка беше анализирана и количествения анализ на относителната експресия на PKC $\alpha$  и p-Ser-657-PKC $\alpha$  бяха изчислени чрез алгоритъм за идентифициране на DAPI-белязаните ядра (405 флуоресценция), експресията на PKC $\alpha$  (488 флуоресценция) и p-Ser-657-PKC $\alpha$  (640 имунофлуоресценция) или идентифициране на DAPI-белязаните ядра (405 флуоресценция).

Мултифлуоресцентния анализ показва, че при *si RNA* медирано заглушаване, на каталитичната и некаталитичната субединица на протеин киназа СК2 и стимулирането с BMP4 растежен фактор повлияват както на експресията на PKC, така и на фосфорилираната ѝ форма.



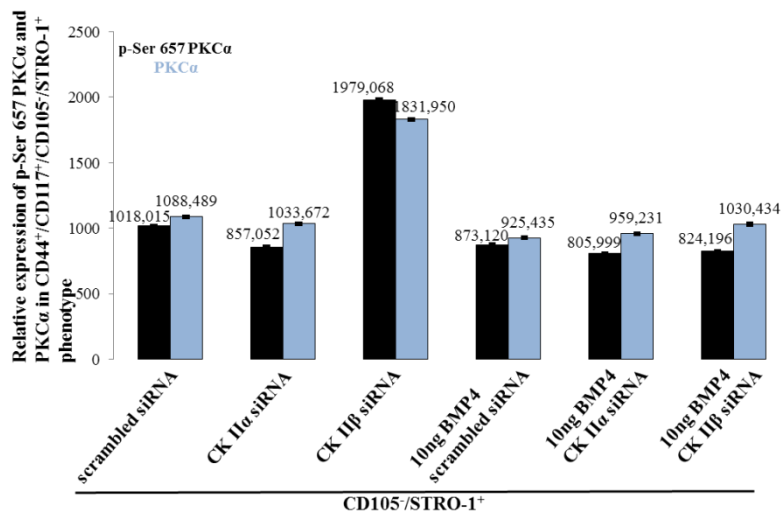
**Фиг. 21.** Роля на  $\alpha$  и  $\beta$  субединицата на протеин киназа СК2 за BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на PKC в CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup>

Количественият анализ доказва, че при заглушаване на каталитичната субединица и поддаването на BMP4 фосфорилираната форма слабо се завишава, докато експресията намалява. При  $\beta$  субединицата се наблюдава минимално повишаване.



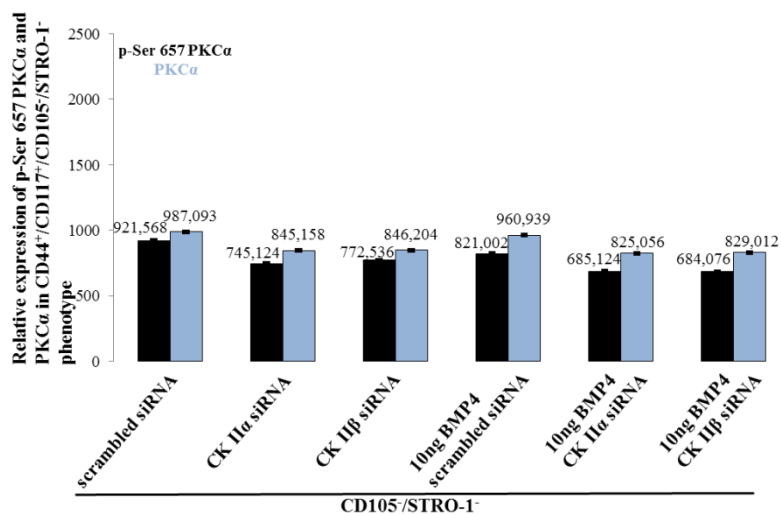
**Фиг. 22.** Роля на  $\alpha$  и  $\beta$  субединицата на протеин киназа СК2 за BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на РКС в CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup>

В двойно-позитивната субпопулация количественият анализ отчита, че фосфорилирана форма при заглушаването на каталитичната субединица и стимулирането с BMP4 почти 3 пъти намалява, докато експресията на РКС се увеличава. При  $\beta$  субединицата се наблюдава минимално завишаване както на РКС така и на p-Ser 657PKC $\alpha$ .



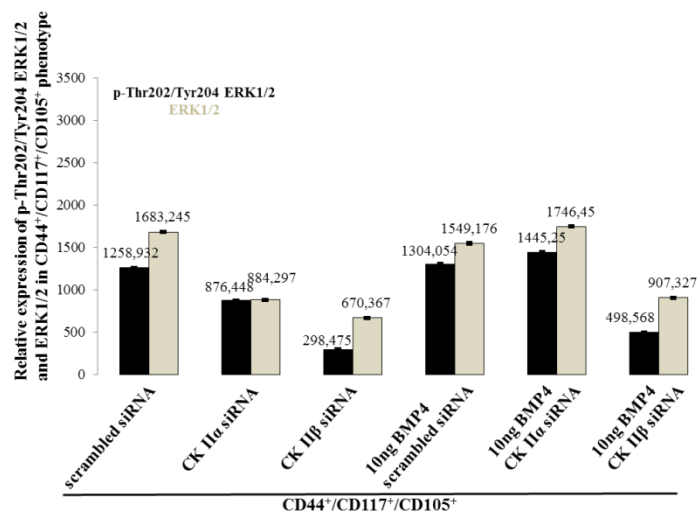
**Фиг. 23.** Роля на  $\alpha$  и  $\beta$  субединицата на протеин киназа СК2 за BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на РКС в CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup>.

Количественият анализ, установява, че в клетките експресиращи STRO-1 по своята повърхност при заглушаването на  $\alpha$  субединицата и подаването на BMP4, фосфорилираната форма и експресията минимално намаляват. При  $\beta$  субединицата почти 2 пъти намалява РКC $\alpha$  и p-Ser 657PKC $\alpha$  вследствие на стимулирането ѝ с BMP4.

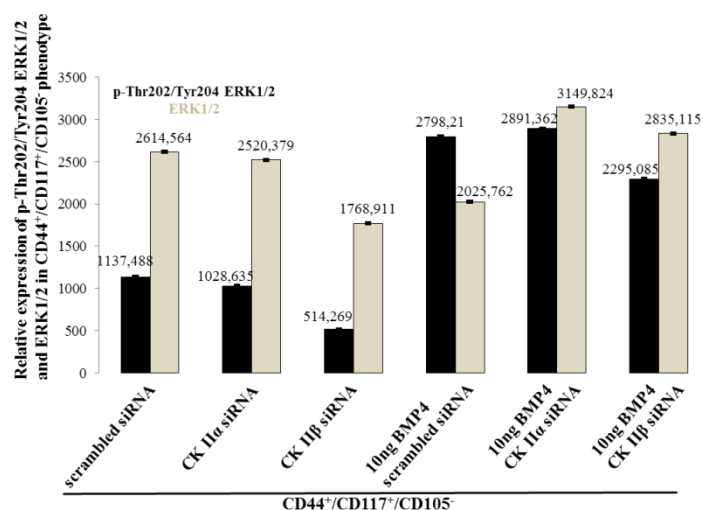


**Фиг. 24.** Роля на  $\alpha$  и  $\beta$  субединицата на протеин киназа СК2 за BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на PKC в CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>-</sup>.

При двойно-негативните при заглушавана на каталитичната субединица и поддаването на BMP4 фосфорилираната форма и експресията слабо намалява. Същият ефект се наблюдава и при  $\beta$  субединицата.

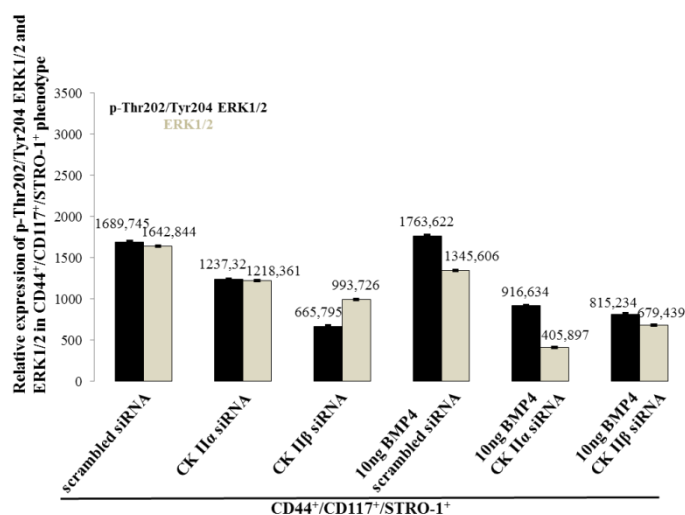


**Фиг. 25.** Роля на  $\alpha$  и  $\beta$  субединицата на протеин киназа СК2 за BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на ERK1, 2 в CD44<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>



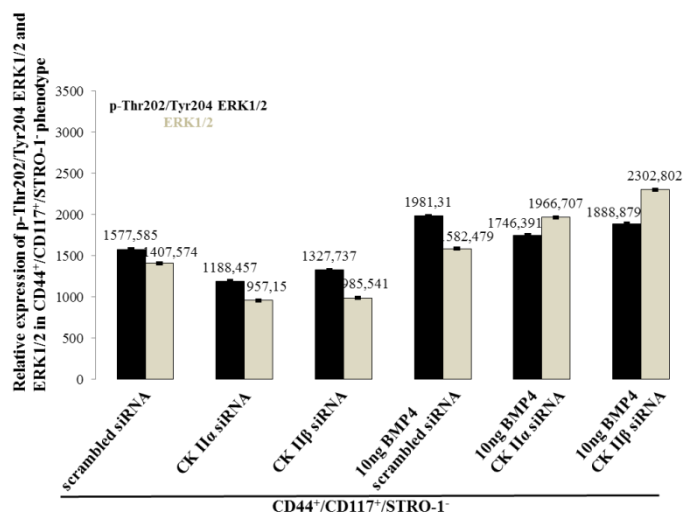
**Фиг. 26.** Роля на  $\alpha$  и  $\beta$  субединицата на протеин киназа CK2 за BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на ERK1, 2 в  $CD44^+/CD117^+/CD105^+$

В хетерогенният състав на фенотиповете на  $CD44^+/CD117^+/CD105^+$  и  $CD44^+/CD117^+/CD105^-$  при *si RNA* медираното-заглушаване както на каталитияната, така и на некаталитияната субединица и при стимулирането им с BMP4 експресията и фосфорилираната форма се увеличават.



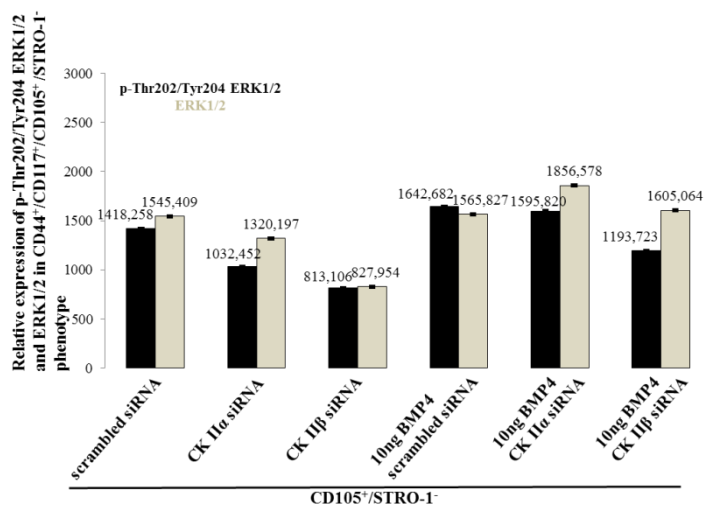
**Фиг. 27.** Роля на  $\alpha$  и  $\beta$  субединицата на протеин киназа CK2 за BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на ERK1, 2 в  $CD44^+/CD117^+/STRO-1^+$

В популацията на STRO-1 имащите клетки при стимулирането и заглушаването на каталитичната субединица активността на ERK1,2 намалява слабо, докато експресията почти 2 пъти намалява. При  $\beta$  субединицата активността се увеличава, докато експресията се понижава.

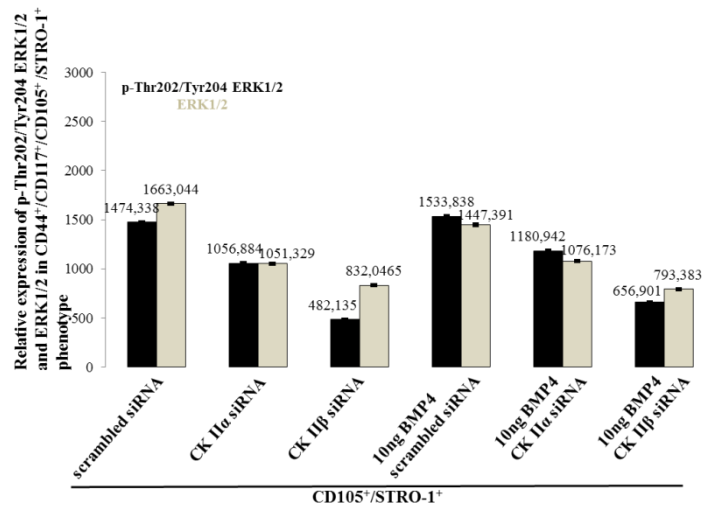


**Фиг. 28.** Роля на  $\alpha$  и  $\beta$  субединицата на протеин киназа CK2 за BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на ERK1, 2 в CD44/CD117/STRO-1<sup>-</sup>.

В клетки, не експресиращи STRO-1 по своята клетъчна повърхност се установява, че при заглушаването на каталитичната субединица и стимулирането с BMP4 активността и експресията на ERK1,2 се увеличават, същият ефект се наблюдава и при некаталитичната субединица на протеин киназа CK2.

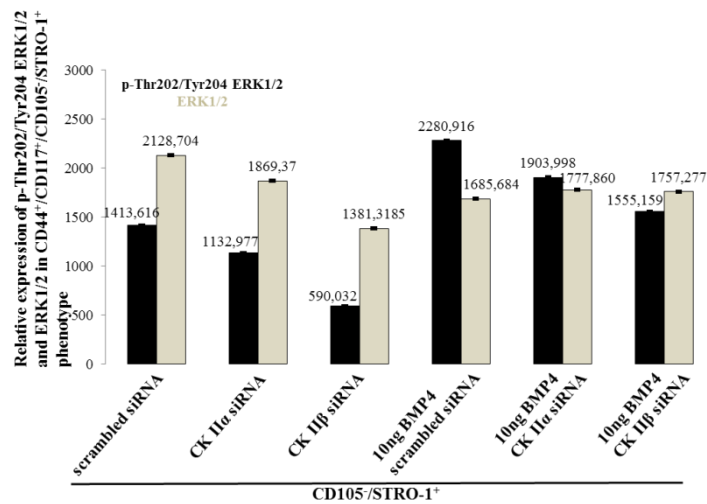


**Фиг. 29.** Роля на  $\alpha$  и  $\beta$  субединицата на протеин киназа CK2 за BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на ERK1, 2 в CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup>



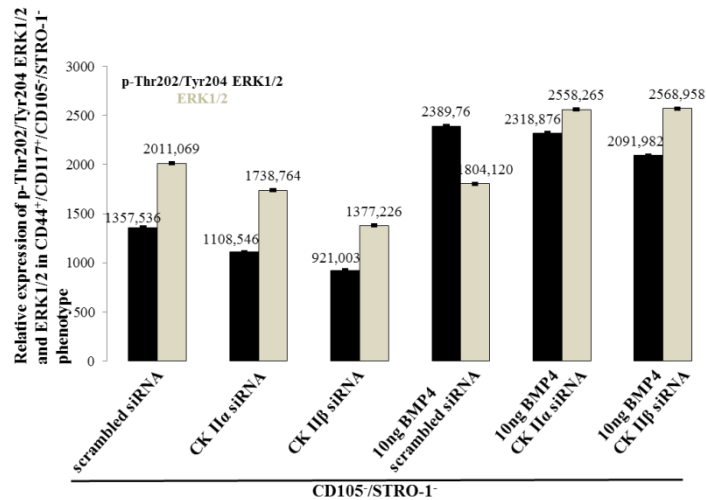
**Фиг. 30.** Роля на  $\alpha$  и  $\beta$  субединицата на протеин киназа CK2 за BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на ERK1, 2 в CD105/STRO-1<sup>+</sup>

В хомогенните субпопулации, получени вследствие на проведеното двойно магнитно сепариране се установява и че в двата фенотипа неекспресиращи и експресиращи STRO-1 по своята клетъчна повърхност активността и експресията на ERK1,2 се увеличават при *si RNA*медирано-заглушаване на каталитичната и некаталитичната субединица и поддаването на BMP4 растежния фактор.



**Фиг. 31.** Роля на  $\alpha$  и  $\beta$  субединицата на протеин киназа CK2 за BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на ERK1, 2 в CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup>.

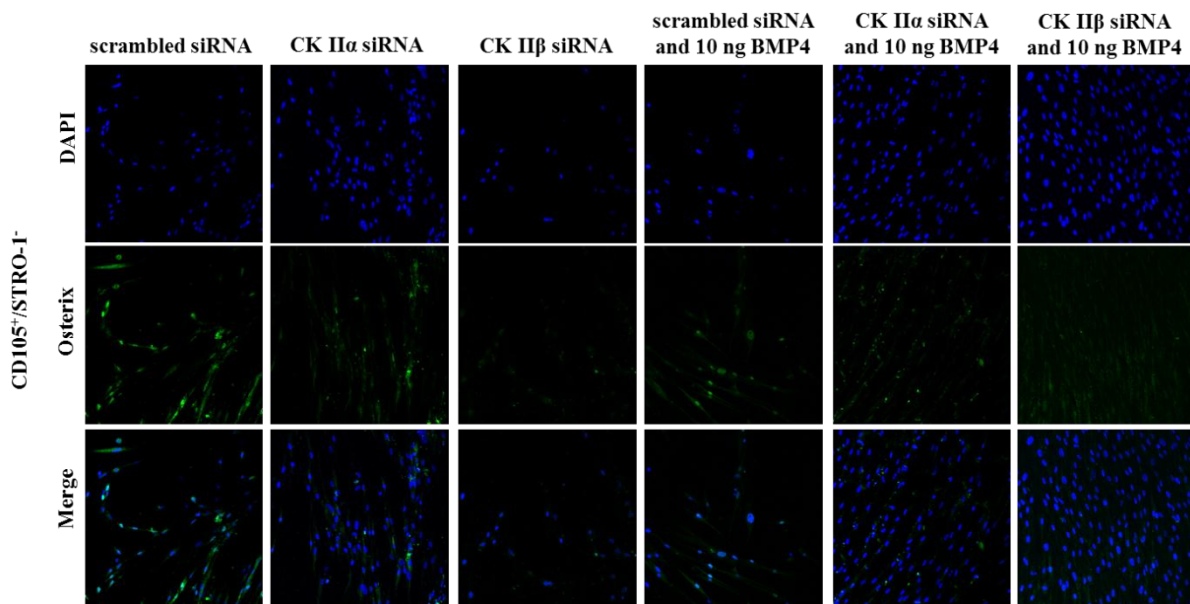
В популацията от клетки, които не експресират мезенхимния маркер CD105, но експресират STRO-1 активността и експресията на ERK1,2 се увеличават при *si RNA*медирано-заглушаване на каталитичната и некаталитичната субединица и поддаването на BMP4 растежния фактор.



**Фиг. 32.** Роля на  $\alpha$  и  $\beta$  субединицата на протеин киназа CK2 за BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на ERK1, 2 в CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup>.

В двойно-негативната субпопулация драстично се увеличават активността и експресията на ERK1,2 при *si RNA* медирано-заглушаване на каталитичната и некаталитичната субединица и поддаването на BMP4 растежния фактор.

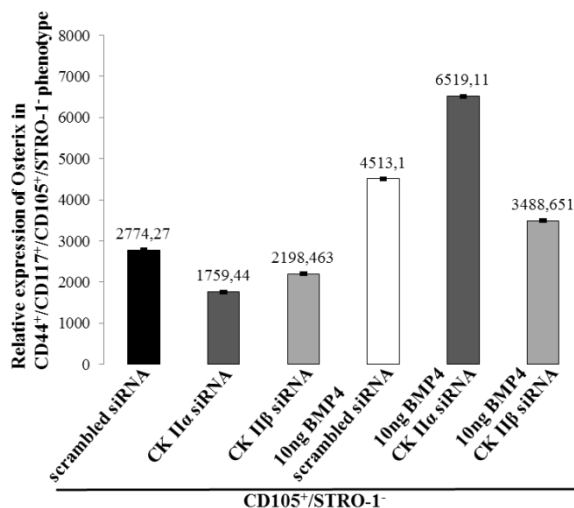
*IV. 5. 3. Роля на  $\alpha$  и  $\beta$  субединицата на протеин киназа CK2 на BMP4 индуцираният ефект върху експресията на транскрипционния фактор OSTERIX*



*Имунофлуоресцентно изследване на експресията и субклетъчната локализация на Osterix в СКIIα-трансфектирани и в СКIIβ-трансфектирани автокринно пролифериращи и в посттрансфекционно стимулирани с BMP4, в CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup> субпопулацията. Увеличение 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000.*

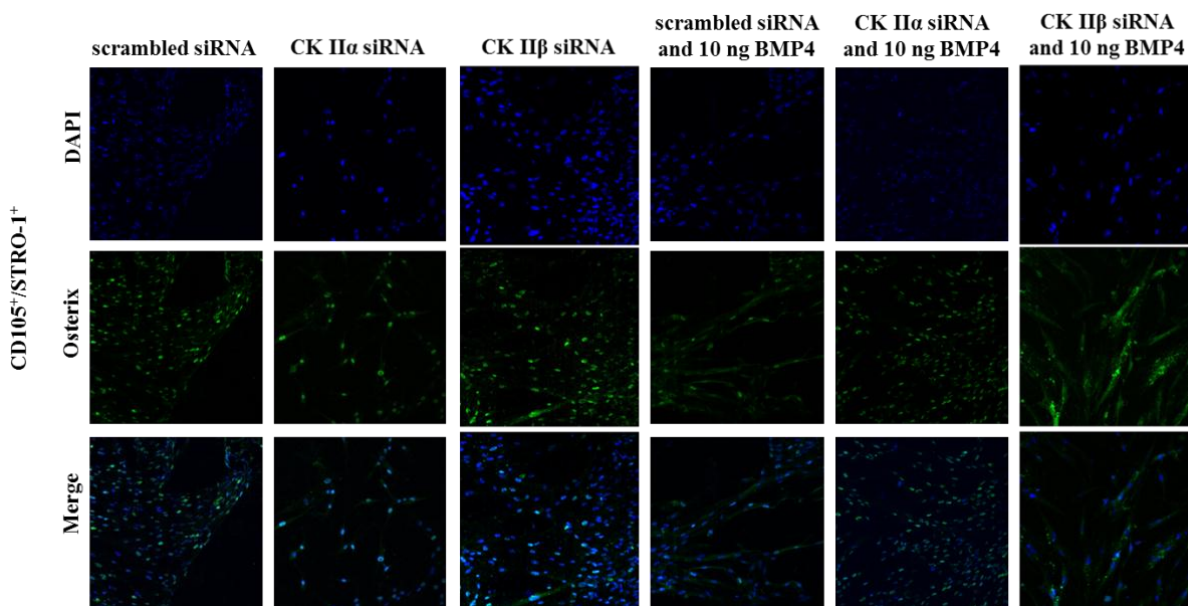
Изображенията бяха получени при увеличение на обектива 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000 и прилагането на лазери с дължина на вълната 488 nm и 405 nm, възбуждащи Osterix-белязан с IgG-FITC и DAPI-белязаните ядра в двойно имунофлуоресцентно маркираните клетки. Цялата площ на всяка ямка беше анализирана и

количествения анализ на относителната експресия на *Osx* бяха изчислени чрез алгоритъм за идентифициране на DAPI-белязаните ядра (405 флуоресценция), и на експресията на *Osx* (488 флуоресценция).



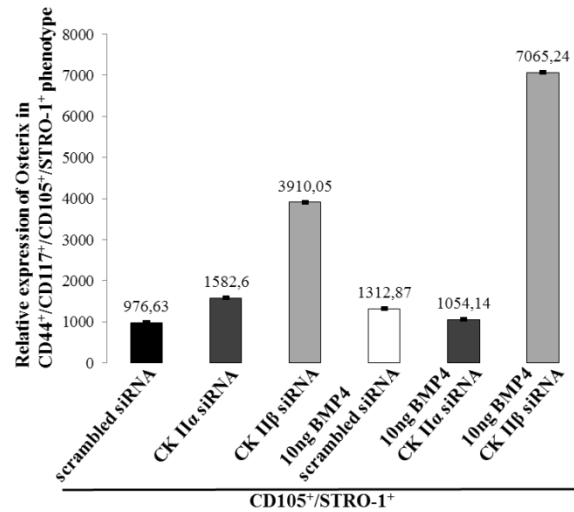
**Фиг. 33.** Определяне белтъчната експресия на транскрипционния фактор Osterix в *CD44<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>/STRO-1* при условия на *si RNA* медурано-заглушаване на каталитичната субединица (α) и некаталитичната субединица (β) и BMP4 индуцирания ефект.

При *si RNA* медурано-заглушаване на каталитичната субединица (α) се наблюдава потискане на експресията на Osterix спрямо контролата, докато при индуцирането с растежния фактор BMP4, експресията нараства почти 3 пъти. При некаталитичната отново се наблюдава потискане спрямо контролата и завишаване на експресия на *Osx* вследствие на третирането с рекомбинантния растежен фактор.



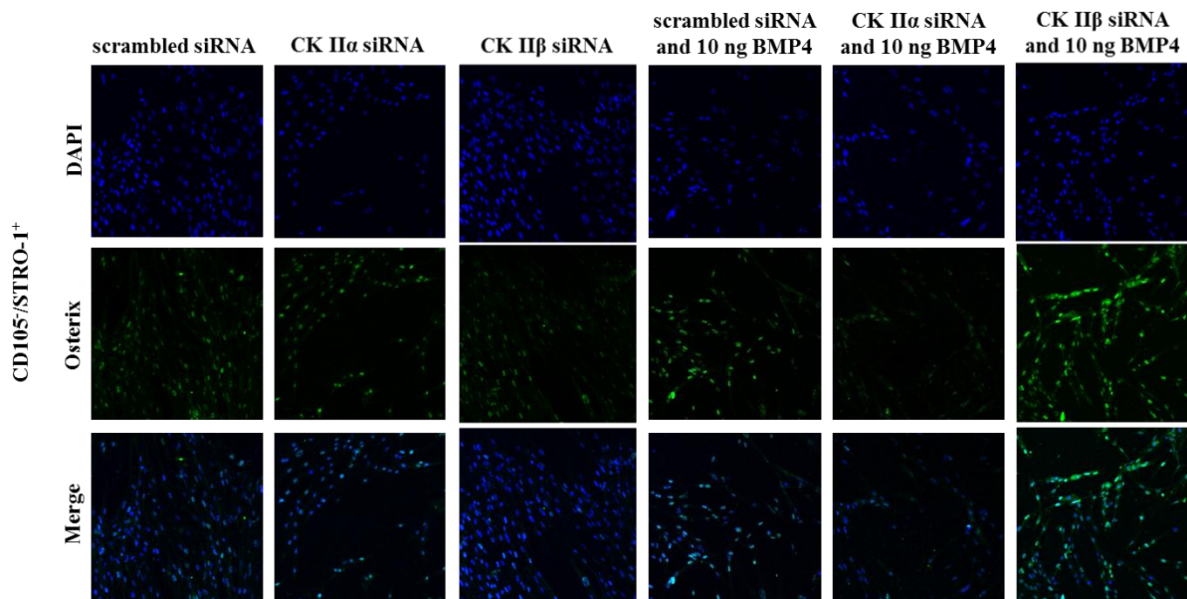
*Имунофлуоресцентно изследване на експресията и субклетъчната локализация на Osterix в СКIIα-трансфектирани и в СКIIβ-трансфектирани автокринно пролифериращи и в посттрансфекционно стимулирани с BMP4, в CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup> субпопулацията. Увеличение 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000.*

Изображенията бяха получени при увеличение на обектива 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000 и прилагането на лазери с дължина на вълната 488 nm и 405 nm, възбуждащи Osterix-белязан с IgG-FITC и DAPI-белязаните ядра в двойно имунофлуоресцентно маркираните клетки. Цялата площ на всяка ямка беше анализирана и количествения анализ на относителната експресия на *Osx* бяха изчислени чрез алгоритъм за идентифициране на DAPI-белязаните ядра (405 флуоресценция), и на експресията на *Osx* (488 флуоресценция).



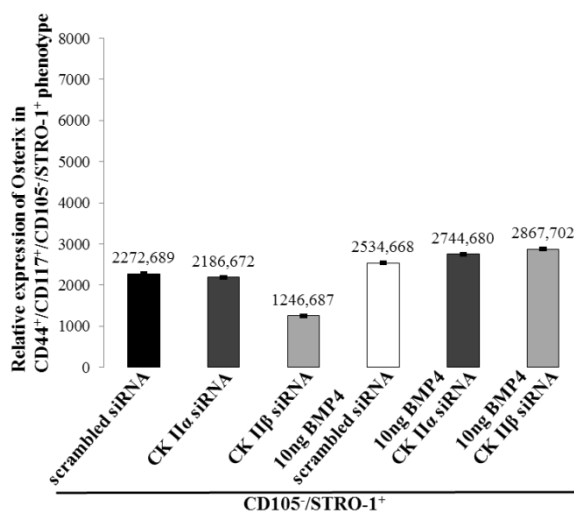
**Фиг. 34.** Определяне белтъчната експресия на транскрипционния фактор Osterix в  $CD44^+/CD117^+/CD105^+/STRO-1^+$  при условия на *si RNA* медурано-заглушаване на каталитичната субединица ( $\alpha$ ) и некаталитичната субединица ( $\beta$ ) и BMP4 индуцирания ефект.

В двойно позитивния фенотип се установява, че експресията на Osterix при *si RNA* медурано-заглушаване на каталитичната субединица ( $\alpha$ ) се завиша спрямо контролата, и намалява вследствие на индуцирането ѝ с BMP4. При некаталитичната субединица се наблюдава увеличаване на експресия при *si RNA* медурано-заглушаване и при посттрансфекционното ѝ стимулиране с BMP4.



**Имунофлуоресцентно изследване на експресията и субклетъчната локализация на Osterix в СКII $\alpha$ -трансфектирани и в СКII $\beta$ -трансфектирани автокринно пролифериращи и в посттрансфекционно стимулирани с BMP4, в CD105/STRO-1<sup>+</sup> субпопулацията. Увеличение 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000.**

Изображенията бяха получени при увеличение на обектива 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000 и прилагането на лазери с дължина на вълната 488 nm и 405 nm, възбуждащи Osterix-белязан с IgG-FITC и DAPI-белязаните ядра в двойно имунофлуоресцентно маркираните клетки. Цялата площ на всяка ямка беше анализирана и количествения анализ на относителната експресия на Osx бяха изчислени чрез алгоритъм за идентифициране на DAPI-белязаните ядра (405 флуоресценция), и на експресията на Osx (488 флуоресценция).



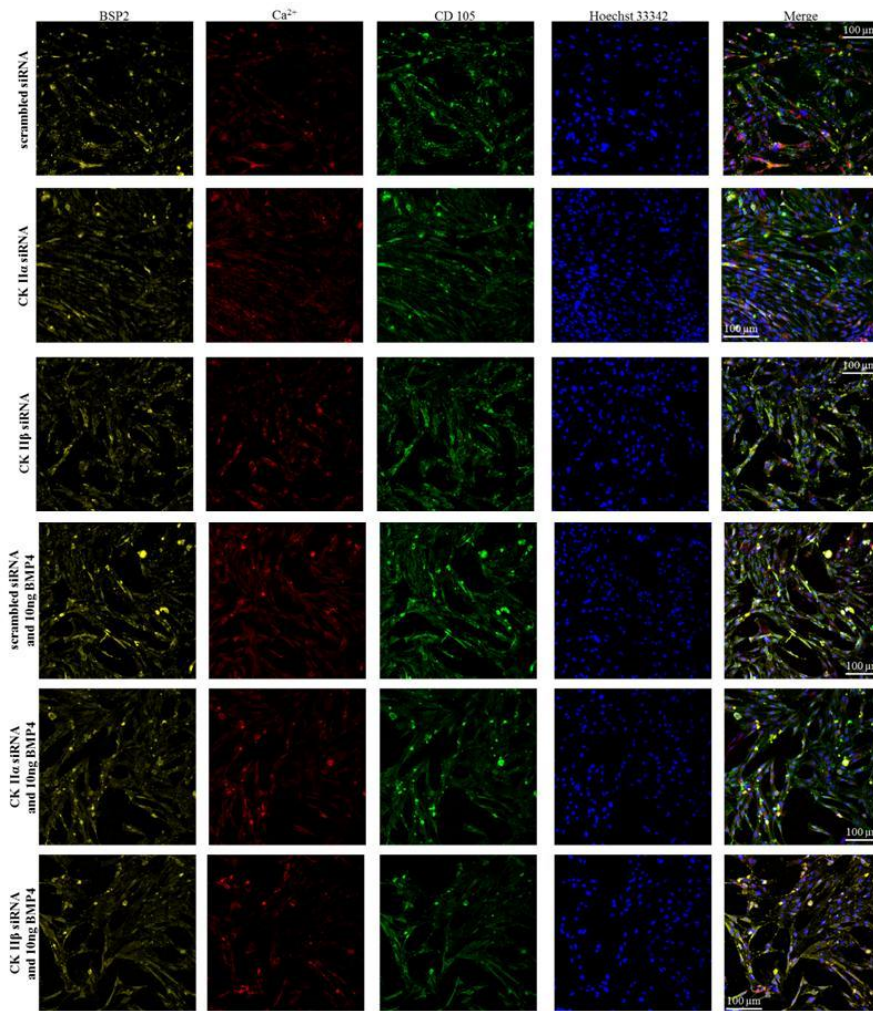
**Фиг. 35.** Определяне белтъчната експресия на транскрипционния фактор *Osterix* в CD44<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup> при условия на *si RNA* медирано-заглушаване на каталитичната субединица ( $\alpha$ ) и некаталитичната субединица ( $\beta$ ) и BMP4 индуцирания ефект.

При каталитичната и некаталитичната субединица се установява намаляване на белтъчната експресия, докато при посттрансфекционното ѝ стимулиране с BMP4 се наблюдава завишаване на експресията на Osterix.

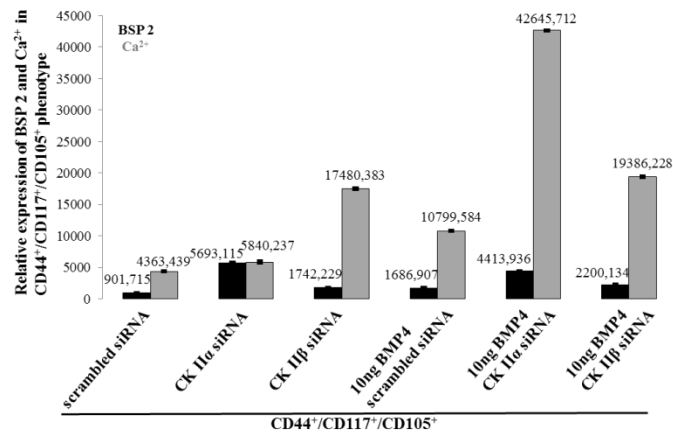
**IV. 5. 4. Роля на  $\alpha$  и  $\beta$  субединицата на протеин киназа CK2 за BMP4 индуцирания ефект върху клетъчно повърхностната експресия на BSP2 и калцификацията на екстрацелуларния матрикс.**

За първи път се доказва връзката на костния-сиало протеин BSP2 и калцификацията на екстрацелуларния матрикс в клетки, изолирани от дентална папила и експресиращи мезенхимните маркери CD105 и STRO-1 по своята клетъчна повърхност, при условия на *si RNA* медирано заглушаване на каталитичната и некаталитичната субединица и посттрансфекционно стимулирани с BMP4 растежен фактор.

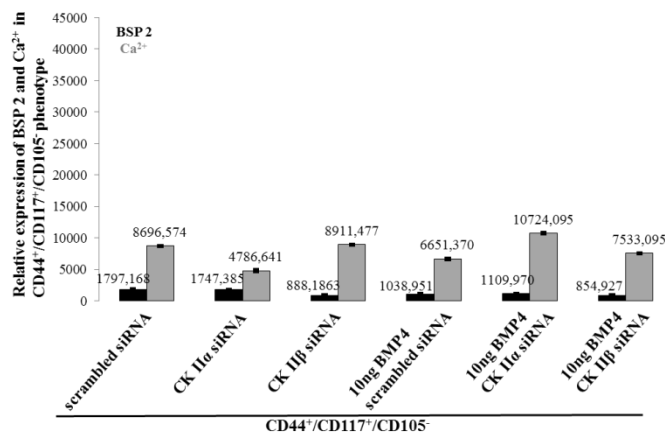
За целта, експоненциално растящите в пълноценна хранителна среда клетъчни култури бяха фиксирани и Xylenol orange маркирани срещу BSP2 и мезенхимните маркери CD105 и/или STRO-1.



Индиректна имунофлуоресцентна микроскопия на BSP в СКII $\alpha$ -трансфектирани и в СКII $\beta$ -трансфектирани автокринно пролифериращи и в посттрансфекционно стимулирани с BMP4 и калцификацията на екстрацелуларния матрикс в CD105 експресиращи клетки. Увеличение 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000

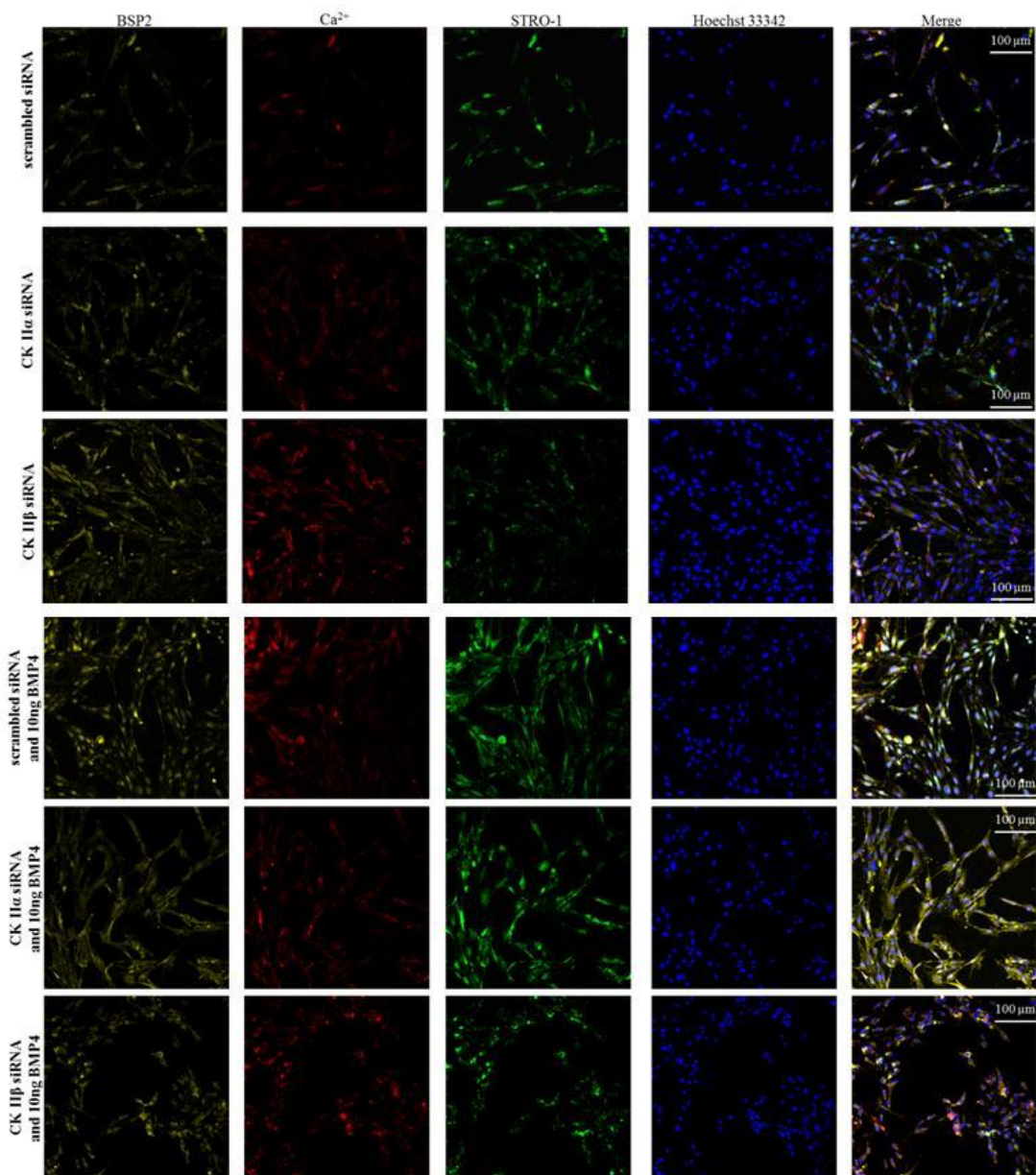


**Фиг. 36.** Роля на  $\alpha$  и  $\beta$  субединицата на протеин киназа СК2 за BMP4 индуцирания ефект върху клетъчно повърхностната експресия на BSP2 и калцификацията на екстрацелуларния матрикс в хетерогенни субпопулации.



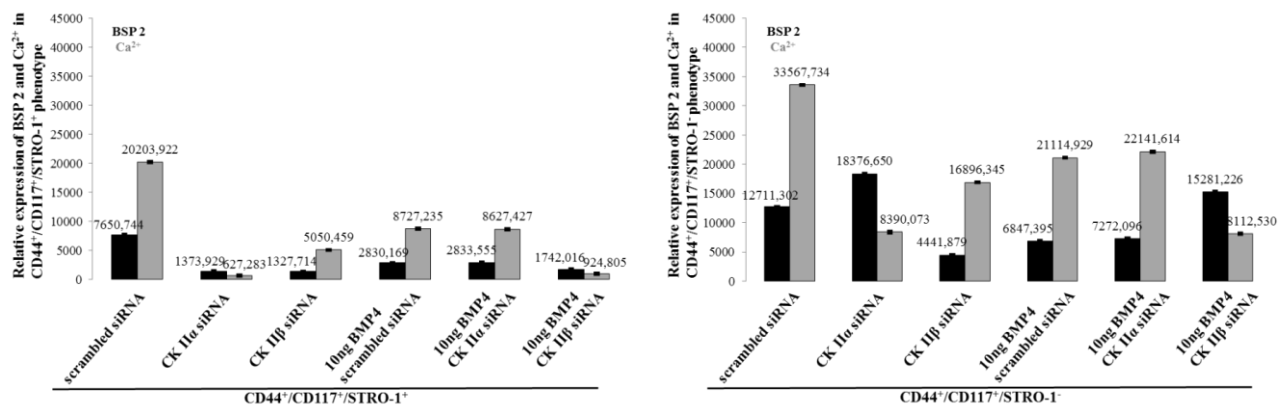
**Фиг. 37.** Роля на  $\alpha$  и  $\beta$  субединицата на протеин киназа СК2 за BMP4 индуцирания ефект върху клетъчно повърхностната експресия на BSP2 и калцификацията на екстрацелуларния матрикс в хетерогенни субпопулации.

В хетерогенните субпопулации, количественият анализ унаглеждава, че и в двата фенотипове, експресиращи и не експресиращи CD105 при *si RNA* медирано-заглушаване на каталитичната и некаталитичната субединица и поддаването на BMP4 растежния фактор калциевите депа се увеличават. Базалната експресия на костния – сиало протеин BSP2 в хетерогенната популация експресираща CD105 по своята клетъчна повърхност, нараства най-много при *si RNA* медираното заглушаване на каталитичната субединица ( $\alpha$ ) спрямо контролата *si RNA*. При посттранскрипционното стимулиране с растежния фактор BMP4, базалната експресия почти 4 пъти се завишава. При некаталитичната субединица ( $\beta$ ) слабо се повишава базалната експресия спрямо контролата, докато при BMP4 и при условия на *si RNA* медирано заглушаване на некаталитичната субединица се увеличава BSP2. Базалната експресия на BSP2 в клетките не експресиращи CD105 при условия на *si RNA* медираното заглушаване на каталитичната субединица ( $\alpha$ ) намалява спрямо контролата, докато при BMP4 и *si RNA* медираното заглушаване на каталитичната субединица ( $\alpha$ ) се наблюдава леко завишаване на костния- сиало протеин. При некаталитичната субединица ( $\beta$ ) се наблюдава намаляване на BSP2 спрямо контролата, както и в следствие на стимулирането ѝ с растежния фактор BMP4.



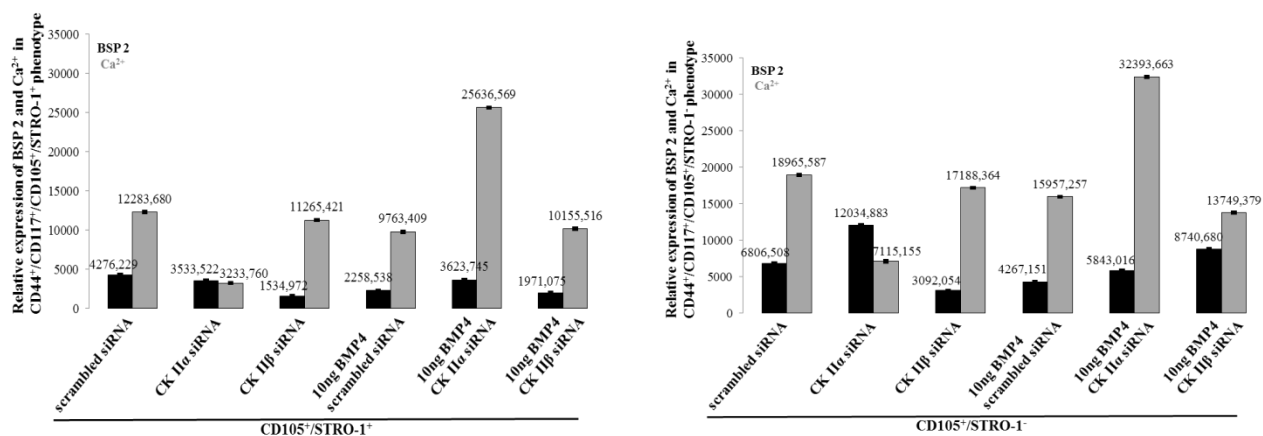
**Индиректна имунофлуоресцентна микроскопия на BSP в СКIIα-трансфектирани и в СКIIβ-трансфектирани автокринно пролифериращи и в посттрансфекционно стимулирани с BMP4 и калцификацията на екстрацелуларния матрикс в STRO-1 експресиращи клетки. Увеличение 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000**

Изображенията бяха получени при увеличение на обектива 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000 и прилагането на лазери с дължина на вълната 488 nm и 555nm 405 nm и 640 nm възбуждащи BSP-белязан с IgG-FITC, CD105 и/или STRO-1 с IgG-Cy5, *Xylenol orange* с IgG-CFL-647 и Neochst -белязаните ядра в четворно имунофлуоресцентно маркираните клетки. Цялата площ на всяка ямка беше анализирана и количествения анализ на относителната експресия на BSP2, CD105, STRO1 и калциевия депозитбяха изчислени чрез алгоритъм за идентифициране на Neochst -белязаните ядра (405 флуоресценция), и на експресията на BSP2 (488 флуоресценция), CD105 и/или STRO-1(555флуоресценция) и калции (647 флуоресценция).



**Фиг. 38 и 39.** Роля на  $\alpha$  и  $\beta$  субединицата на протеин киназа CK2 за BMP4 индуцирания ефект върху клетъчно повърхностната експресия на BSP2 и калцификацията на екстрацелуларния матрикс в хетерогенни фенотипове.

В популацията на STRO-1 експресиращите и не експресиращите клетки отново се наблюдава същият ефект, увеличаване на калциевите депа, с изключения при заглушаването на некаталитичната  $\beta$  субединица и в двата изследвани фенотипове-намаление на калциевите отлагания. Базалната експресия на BSP2 от хетерогенния състав на фенотиповете, експресиращи STRO-1 по своята клетъчна повърхност отчита, че костния-сиало протеин намалява при si RNA медираното заглушаване на каталитичната субединица спрямо контролата, и че при стимулирането ѝ с BMP4, количеството на BSP2 се завишава. При заглушаването на некаталитичната  $\beta$  субединица количеството на експресиращият протеин намалява, както и при подаването на растежния фактор. В субпопулацията на клетките, които не експресират мезенхимния маркер STRO-1 се наблюдава завишаване на BSP2 при si RNA медираното заглушаване на каталитичната субединица спрямо контролата, както и при стимулирането ѝ с BMP4. При некаталитичната субединица, базалната експресия намалява, докато при стимулирането ѝ с рекомбинантния човешки растежен фактор, количеството на експресиращия се протеин е почти 2 пъти завишен спрямо контролата.



**Фиг. 40 и 41.** Роля на  $\alpha$  и  $\beta$  субединицата на протеин киназа CK2 за BMP4 индуцирания ефект върху клетъчно повърхностната експресия на BSP2 и калцификацията на екстрацелуларния матрикс в хомогенни фенотипове.

В хомогенните субпопулации на клетките неекспресиращи и експресиращи STRO-1 по своята клетъчна повърхност, се установява от количественият анализ, че отново при si RNA медирано-

заглушаване на некаталитичната субединица и поддаването на BMP4 растежния фактор калциевите депа намаляват, докато при *si RNA*медирано-заглушаване на каталитичната субединица и стимулирането им с BMP4, калцият драстично се увеличава. В популацията от клетки, не експресиращи STRO-1 се доказва, че базалната експресия на BSP2 нараства както при *si RNA*медирано-заглушаване на каталитичната субединица, така и при поддаването на BMP4. При некаталитичната субединица намалява, количеството на експресиращия се белтък, докато при индуциране с BMP4 се увеличава почти 2 пъти. В популацията от клетки, имащи STRO-1 базалната експресия на BSP2 намалява при условия на *si RNA*медирано-заглушаване на каталитичната субединица спрямо контролата, докато при стимулирането ѝ с BMP4 се завишава. При некаталитичната субединица и при подаването на BMP4 се наблюдава намаляване на базалната експресия на BSP2.

## V. Дискусия

Апикалната папила представлява хетерогенна тъкан, слабо прикрепена към върха на развиващия се корен на човешките постоянни зъби, в която се намира популация от стволови / прогениторни клетки, наречени стволови клетки от апикална папила (SCAP).(115). Тази популация експресира няколко мезенхимни клетъчни маркери, като STRO-1, CD146, CD105, CD73, CD90, CD24, CD29, CD44 и CD49, но няма съответна информация за степента на тяхната пролиферация, експресиращи и не-експресиращи фенотипове в тъканта. Изолирането на първични клетки от дентална човешка апикална папила чрез протеолитично ензимно разграждане и тяхното *in vitro* култивиране ни дава възможност за изследване на потенциала на самообновяване на стволови/прогениторни клетки, намиращи се в получената хетерогенна култура. До този момент няма информация за способността на възобновяване на мезенхимните маркери на стволовите клетки STRO-1 и / или CD105 експресиращи клетки. Поради тази причина ние изследвахме маркерите CD44, CD117, STRO-1 и / или CD105 експресиращи клетки в първични култури. Имунофлуоресцентната микроскопия на живи клетки показва CD44<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>/CD105<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup>, CD117<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup> и субпопулации STRO-1<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup> и малък брой CD44<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup>, STRO-1<sup>+</sup>/CD105<sup>-</sup> и STRO-1<sup>-</sup>/CD105<sup>+</sup> клетки от хетерогенния състав на апикалната папила. Не са отчетени резултати на CD 44<sup>+</sup>/CD 105<sup>+</sup>, CD 44<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup>, CD 117<sup>-</sup>/CD105 експресиращи клетки. Бяха установени експресиите на CD105<sup>+</sup> или CD117<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup>. Тези резултати свидетелстват за това, че CD105<sup>+</sup> клетки, както и STRO-1<sup>+</sup> клетки са ко-експресиращи CD44 и / или CD117. Получените данни ясно показват фенотипната хетерогенност по отношение на клетъчно повърхностната експресия на мезенхимните маркери - CD44, CD117, CD105 и STRO-1 на hDAP. Анализиранието на инкорпорирането на BdrU в последователни пасажи показва постоянна фенотипно-детерминирана пролиферативна активност на изследваните популации. Въз основа на получените чрез индиректно магнитно-активирано клетъчно сортиране (Cell Sorting-MACs) **CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup>**, **CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup>**, **CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup>**, **CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>-</sup>** субпопулации бе установено, че в двойно позитивния фенотип в на-голяма степен се инкорпорира BrdU -85.85%. Въз основа на изследването на числеността на фенотипно специфичните субпопулации в последователни пасажи се стига до извода, че вероятно дъщерните клетки, получени от деленето на CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup> проявяват CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup> или CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup>, както и несъмнено CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>-</sup> фенотипове. Докато дъщерните клетки, получени от деленето на CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup> или на CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup> администрират майчиния и CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>-</sup> фенотип. Въз основа на фенотипно специфичното редуциране на числеността на изследваните субпопулации заедно с постоянната им фенотипно детерминирана пролиферативна активност може да се изведе извода, че в трите фенотипа протича асиметрично делене, без 105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>-</sup>, което е най-силно изявено в 105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup>. Протичането на асиметрично делене в изследваните фенотипове обяснява прогресивното нарастване, числеността на неекспресиращите мезенхимни маркери, клетки в последователно пасажирание на изследваните култури. В литературата се обсъждат два основни модела за делене на стволовите клетки: симетрично и асиметрично. Способността на стволовите клетки да се делят асиметрично, за да произведат една стволова и една нестволова дъщерна клетка, често се счита за една от определящите характеристики за стволовостта. Асиметричният модел предполага, че хомеостатичният контрол на запаса от стволови клетки се поддържа на ниво единични клетки, при което всяка стволова клетка произвежда копие от себе си плюс една диференцирана клетка. Механизмите, включени в асиметричните деления, са описани подробно в *Drosophila* и включват регулиране на клетъчната полярност и ориентация по отношение на нишата на стволови клетки. От инженерната перспектива този модел има предимството да поддържа постоянно нивото на популацията на стволови клетки.

Очевиден недостатък е невъзможността му да попълни запаса от стволови клетки в случай на нараняване. Този проблем естествено се решава от симетричния модел, който поддържа хомеостатичния контрол на ниво популация, а не на индивидуално клетъчно ниво. Там стволовите клетки са способни на два вида симетрични деления: разделение на пролиферацията, което води до създаването на две стволови клетки и разделение на диференциацията, което води до създаването на две диференцирани клетки. Решенията за диференциация/пролиферация се контролират от множество сигнали, излъчващи се от околните тъкани и самите стволови клетки. Счита се, че регулирането на стволовия клетъчен цикъл е от ключово значение за оркестрирането на обновяването на стволови клетки (116). Получените в хода на пасажирването чрез MACS данни за намаляване броя на CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup>, CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup> и за увеличаване на броя на CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>-</sup> клетки са в подкрепа на доказаното при стволовите клетки асиметрично делене, при което всеки от фенотиповете произвежда една дъщерна клетка със майчиния фенотип и една клетка неекспресираща изследваните клетъчно стволови маркери. Ние установихме, че общата пролиферативна способност на експоненциално растящите автокринни култури се поддържа главно чрез пролиферативна активност на CD105<sup>+</sup> клетки, последвана от STRO-1<sup>+</sup> клетки и най-малък е приносът на CD105<sup>-</sup> клетките. Тази информация за първи път разкрива специфичните за фенотипа пролиферативни нива на изследваната субпопулация и значително допринася за характеризирането на човешката апикална папила. Въпреки че апикалната папила е изследвана интензивно като източник на SCAPs, малко се знае за фенотипно-специфичното регулиране на пролиферацията на субпопулациите в хетерогенния състав. Тъй като е доказано, че BMP4 е одонтогенен както *in vitro*, така и *in vivo*, ние анализирахме неговия ефект върху специфичните за фенотипа пролиферативни активности на STRO-1<sup>+</sup>, STRO-1<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup> и CD105<sup>-</sup> субпопулации в експоненциално автокринно растящи култури. BMP4 регулира пролиферацията на всички изследвани субпопулации, но степента на антипролиферативния му ефект се проявява в зависимост от фенотипа. Редицата изследвания, доказващи че протеин киназа CK2 катализира фосфорилирането на множество протеини, необходими за успешното делене на клетката на две дъщерни клетки, показват нейното значение за протичането на всяка от фазите на клетъчния цикъл. Експерименти с антисенс олигонуклеотиди срещу субединиците на CK2, с инхибитори на активността ѝ, както и микроинжектирането на антигела срещу нея в клетки от бозайници, водят до инхибирането на клетъчния им цикъл, което доказва, че CK2 е необходима за G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>/S, и G<sub>2</sub>/M преходите (117). От натрупаните до този момент данни може да се направи извода, че ролята на CK2 в G<sub>1</sub>/S фазите на цикъла е да ги регулира (а, не да ги стимулира), тъй като тя е от една страна интегрална част от DNA damage checkpoint, отговорна за регулирането на p53 и на неговите регулатори, а от друга – си взаимодейства и фосфорилира протеините (включително и Cdk-инхибиторните белтъци), отговорни за G<sub>1</sub>/S checkpoint (117). Представените, резултати за инкорпурирането на BrdU в условията на понижена белтъчна експресия на каталитичната и на некаталитичната субединици на CK2 ясно показват, че нормалното функциониране и на двете субединици е необходимо за репликационната активност на клетките, композиращи hDAP. Същевременно отчетените разлики в антипролиферативните ефекти, предизвикани от СКIα-трансфекциите и от СКIβ-трансфекциите клетки, доказват както ефективността на проведената трансфекция, така и нееднозначното и специфично за каталитичната и съответно за некаталитичната субединица участие в регулацията на ДНК синтеза. Тези, специфични за двете функционално различни субединици, данни обогатяват информацията за тяхното специализирано участие в контрола и протичането на репликацията (118), и са солидна основа за бъдещи изследвания на конкретните молекулни механизми, осъществяващи отчетените инхибиторни ефекти. Описаните данни за репликационната активност са изцяло нова информация относно фенотипно-специфичните разлики на CD105<sup>+</sup> и STRO-1<sup>+</sup> клетките,

композиращи хетерогенната hDAP в условията на автокринна пролиферация. Няма литературни данни за пролиферативната активност на фенотиповете, изграждащи апикалната папила и проведените експерименти за първи път дават информация за функционирането на СК2 в клетки от тази тъкан. Също така до този момент не е изследвано значението ѝ за трансдуцирането на BMP4 сигнала в изследваната тъкан. Няколко изследвания показват участието на протеин киназа СК2 в регулирането на функционирането на хетеротетрамерния рецепторен комплекс, отговорен за свързването на екстрацелуларните BMPs. Регулаторната ѝ роля се изразява в свързване (протеин-протеин взаимодействие) чрез некаталитичната субединица към рецептори тип I от тетрамерния комплекс, което се прекратява при свързването на лиганда към рецептори тип I (119; 131) и чрез фосфорилиране на рецептори тип I от каталитичната субединица, което предотвратява активирането на рецептор тип I в отсъствието на лиганд (119;132). И нарушения в регулаторните механизми, осъществявани от СК2 водят до нелигандно-индуцирани промени в клетъчната физиология (119, 120, 121). Представените, резултати от проведените трансфекции показват, че фенотиповете, съставляващи изследваната клетъчна популация най-вероятно са под този регулаторен механизъм, но отговарят на нарушенията в него по фенотипно-специфичен начин. Генната експресия на PKC $\alpha$  в изследваните субпопулации е фенотипно специфична, като най-високи са белтъчните нива в CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup> субпопулацията, а най-ниски CD 105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup> субпопулацията. Експресираният изозим е функционално активен и в трите изследвани субпопулации и локализацията му е стриктно цитоплазмена, но активността му е фенотипно специфична, като с най-висока активност е PKC $\alpha$  в CD 105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup> субпопулацията, а най-слабо активирана е в CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup> субпопулацията. Остеоиндуктивният растежен фактор BMP4 потиска активността на PKC $\alpha$  в CD 105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup> и CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup> субпопулации, без да влияе на белтъчната ѝ експресия, и понижава белтъчната експресия на PKC $\alpha$  в CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup> субпопулацията, без да влияе на активността ѝ, което ясно демонстрира, че BMP4 се трансдуцира по фенотипно-специфични сигнални пътища в изследваните субпопулации. Наличието на фосфорилиране на Ser-657 от структурата на PKC $\alpha$  показва, че изозима е функционално активен и участва в регулацията на клетъчният цикъл на експоненциално автокринно растящите клетки. Като се вземе в предвид, че PKC $\alpha$  е добре установен и известен активен участник в сигнално-трансдукционният контрол на клетъчната пролиферация (122) от една страна, и от друга страна факта, че изследваните клетъчни култури са автокринно експоненциално растящи, може да се предположи, че и в трите, фенотипно различни субпопулации PKC $\alpha$  е функционално значим участник в автокринната регулация на тяхната пролиферативна активност, докато в отговор, индуциран от третирането им с BMP4 се наблюдава понижена експресията на PKC $\alpha$  в CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup> фенотипа, в резултат на която е и отчетената понижена степен на фосфорилирането ѝ, докато в другите два изследвани фенотипа, понижената степен на фосфорилирането ѝ се дължи на промяна в нейната регулация. Отчетеният негативен ефект върху активността на изозима, би могъл да се обясни с добре доказаната роля на BMP4 като индуктор към остеогенна/одонтогенна диференциация на мезенхимни стволово-клетъчни фенотипове от хистологичния състав на други зъбни структури (123, 134), а именно действието на BMP4 в третираните фенотипове би могло да е свързано с индуциране на прехода от пролиферация към остеогенна/одонтогенна диференциация. В полза на тази хипотеза е и факта, че PKC $\alpha$  потиска остеобластната диференциация, но подпомага пролиферацията на остеобластните клетки (124, 136), въз основа на което може да се предположи, че понижената активност на изозима може би е свързана с прехода към одонтобластна диференциация. BMP4-индуцираният инхибиторен ефект се изявява с различна сила в изследвани клетъчни субпопулации, което демонстрира, че BMP4 се трансдуцира в тях по фенотипно-специфични сигнални пътища. Третирането с BMP4 предизвиква фенотипно-специфични ефекти върху

експресия на BSP в трите изследвани фенотипа. BSP експресията беше непроменена в CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup> фенотипа, което би могло да се тълкува като липса на проостеогенна стимулация, но е спекулативно да се твърди, че приложената концентрация/продължителностна третиране с BMP4 не е проостеогенна, защото не са изследвани другите белтъци-маркери на диференциация, чиято експресия характеризира прехода към ранна диференциация. Генната експресия на транскрипционния фактор Osterix е фенотипно специфична за изследваните фенотипове, като с най-ниски белтъчни нива е CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup> субпопулацията, а със значимо по-голяма и съпоставима белтъчна експресия са CD 105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup> и CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup> субпопулациите. Osterix е локализиран както в цитоплазмата, така и в ядрото и в трите фенотипа. Osteoиндуктивният растежен фактор BMP4 стимулира генната експресия на Osterix и в трите фенотипа, но в различна степен – най-силно е повишена експресия на Osterix в CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup> субпопулацията, където транскрипционния фактор е разположен в ядрото, а най-слабо в CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup> субпопулацията, където няма промяна в локализацията му, което ясно демонстрира, че BMP4 се трансдуцира по фенотипно-специфични сигнални пътища в изследваните субпопулации. Предизвиканата от BMP4 силно увеличена генна експресия на Osterix от една страна и локализирането му в ядрото – от друга, в CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup> субпопулацията, показва, че този фенотип е най-вероятно със значително по-висок одонтогенен потенциал в сравнение с другите, два изследвани фенотипа, в които растежния фактор активира (но, в ниска степен) експресията на транскрипционния фактор, но той продължава да бъде с цитоплазмено-ядрена локализация т.е само част от него е способен да изпълни функцията си на регулатор на генната експресия. Проведеното имунофлуорисцентно изследване установи, че Osterix се експресира и в трите фенотипно различни субпопулации, а количествения анализ на получените имунофлуорисцентни изображения разкри, че относителната експресия на транскрипционния фактор е фенотипно-специфична - като най-слабо се експресира в CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup> фенотипа, а в другите два фенотипа стойностите на експресия на транскрипционния фактор са приблизително пет пъти по-високи. При третирането с BMP4 се наблюдава повишаване на експресията на Osterix и в трите, фенотипно различни субпопулации, като активирацият ефект е най-силно изразен в CD 105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup> субпопулацията, където бяха отчетени над петкратно по-високи стойности на експресия на Osterix в сравнение с нетретираните клетки. При CD105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>+</sup> и CD 105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup> субпопулациите ефекта на BMP4 е по-слабо изразен - относителната експресия на Osterix слабо се увеличава, като нарастването ѝ е по-значимо в CD 105<sup>+</sup>/STRO-1<sup>-</sup> клетките. 24-часовото присъствие на 10 ng BMP4 в автокринно пролифериращите клетки, предизвиква фенотипно-специфични ефекти върху BSP експресията и калция. Отчетените разлики в ефектът на растежния фактор върху генната експресия на BSP, в условията на увеличена белтъчната синтеза на каталитичната субединица, е отново стриктно фенотипно специфичен и разкрива, че от една страна - СК II $\alpha$  е участник в регулацията на BMP4-трансдуциращата сигнализация и в трите изследвани фенотипа, а от друга, че BMP4-трансдуциращата сигнализация води до фенотипно-специфична регулация на *bsp* гена. Стимулирането с BMP4 на СКII $\beta$ -трансфектираните клетки и от трите фенотипа води до значими промени в експресията на BSP, а от там и на калциевите отлагания съпоставена с експресията му в нестимулираните с BMP4 СКII $\beta$ -трансфектирани клетки. Но, съпоставяйки белтъчните нива на BSP в тези условия с нивата му в BMP4-стимулираните контролни (scrambled si RNA and 10 ng BMP4) клетки от трите фенотипа, се наблюдава, че ефектът от трансфекцията с СК II $\beta$  siRNA е същия, но по-силно изразен, като предизвикания от трансфекцията с СК II $\alpha$  siRNA. Тези данни взети заедно доказват, че протеин киназа СК2 – нейните субединици като част от холоензима и/или като свободни (извън холоензима) белтъци са от ключово значение за вътреклетъчното предаване на BMP4 сигнала и в трите изследвани фенотипа, както и че BMP4 оказва фенотипно-специфичен регулаторен ефект върху BSP експресията и калцификацията.

## VI. Изводи

- Фенотиповете  $CD44^+/CD117^+/CD105^+$ ;  $CD44^+/CD117^+/CD105^-$ ;  $CD44^+/CD117^+/STRO-1^+$ ; и  $CD44^+/CD117^+/STRO-1^-$  изолирани от човешка дентална папила, съдържащи се в хетерогенния състав на тъканта са със стриктно детерминирана пролиферативна активност (обуславяща се от фенотипно детерминирана експресия на *PKC alpha*; *ERK1,2* и тяхното функциониране), самовъзобновяващ се потенциал (асиметрично делене) и численост.
- От физиологична гледна точка протеин киназа *CK2*, участва в регулацията на пролиферацията на всички изследвани фенотипове, но ролите на каталитичната ( $\alpha$ ) и некаталитичната ( $\beta$ ) субединици са й фенотипно детерминирани.
- Остеогенния индуктор *BMP4*, повлиява физиологията (експресия на *PKC alpha*; *ERK1,2*, тяхното функциониране, репликационна активност, експресия на *Osterix*; изнасяне на *BSP2* екстрацелуарно и калцифициране на екстрацелуарния матрикс) на всички фенотипове, но по стриктно фенотипно - детерминиран начин и каталитичната ( $\alpha$ ) и некаталитичната ( $\beta$ ) субединица на протеин киназа *CK2* са участници във вътреклетъчната сигнализацията, по която той се трансдуцира.

## VII. Приноси

- За първи път е доказано присъствието на фенотиповете в хетерогенния състав на апикална папила и е установена тяхната пролиферативна активност, самовъзобновяващ се потенциал и численост.
- За първи път е изследвано участието на протеин киназа *CK2* в клетъчните фенотипове изграждащи хетерогенния състав на апикална папила и са установени ролите на каталитичната и некаталитичната субединица за сигнализацията, поддържаща пролиферативния капацитет и сигнализацията трансдуцираща *BMP4*.
- За първи път са изследвани за фенотипно детерминирана експресия на *Osterix*, *BSP2*, калцификацията на екстрацелуарния матрикс на изследваните фенотипове и ефектът на остеоиндуктора *BMP4* върху тях.

## VIII. Публикации и участия в научни форуми и проекти, свързани с дисертационния труд

Ishkitiev, N., Mitev, V., Rashkova, M., Tsikandelova, R., Mihaylova, Z., **Dimitrova, V.**, Mitova, N. Phenotypic characterization of deciduous teeth pulp stem cell populations. Problems of dental medicine (2016) 42 (1): 31-38.

**V. Dimitrova**, V. Mitev, A. Isaeva The  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of *CK2* are individually and phenotype-specifically involved in autocrine and *BMP4*-triggered regulation of proliferation of  $STRO-1^+$ ,  $STRO-1^-$ ,  $CD 105^+$  and  $CD 105^-$  cells within human apical papilla. "Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences" IF 0,27 accepted 2018 подпечат

**V. Dimitrova**, V. Mitev, A. Isaeva The effect of passage on  $STRO-1^+/CD 105^-$ ,  $STRO-1^+/CD 105^+$  and  $STRO-1^-/CD 105^+$  phenotypes during short-term cultivation (up to 6 passages) of primary culture of apical papilla, isolated from single donor. "Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences" IF 0,27 accepted 2018 подпечат

Nikolay Ishkitiev, **Violeta Dimitrova**, Rozaliya Tsikandelova, Zornitsa Mihaylova, Vanyo Mitev, Maria Dragneva, *BMP4* And *FGF8* Affect *DTPSC* Proliferation And Differentiation, W 1096, Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), 14-17 June 2017, Boston USA

Договор №ФНИ Б02/15 МОМН  
Договор №18/2015г, СМН при МУ- София  
Договор №10/2016г, СМНИ при МУ- София  
Договор №132/2018г, СМНИ при МУ- София

## **IX. Използвани съкращения**

MSCs - мезенхимни стволови клетки  
SCAP – стволови клетки от апикална папила  
BMP4 – Bone morphogenic proteins  
BSP2 – костен – сиало протеин  
(Runx2) Runt-related transcription factor 2  
(Dlx5) Distal-less homeobox 5  
(Osx) Osterix  
(PDGF) тромбоцитен растежен фактор  
(EGF) епидермален растежен фактор  
(IGF-1) инсулиноподобен растежен фактор-1  
CK2 – протеин киназа 2  
ERK1, 2 - the extracellular signal-regulated kinase ½