

Program rektora MU na podporu tvůrčí činnosti studentů

Podpora vynikajících diplomových / disertačních prací (kategorie A,B/C,D)

Dílě / závěrečná zpráva o výsledcích projektu¹ (Oddíl A) a posudek garanta (Oddíl B)

Identifikační kód projektu

2	0	0	7	1	4	3	1	a						
---	---	---	---	---	---	---	---	---	--	--	--	--	--	--

Základní údaje	
Kategorie projektu (čl. 2 odst. 1)	Podpora vynikajících diplomových prací v oborech zdravotnictví, přírodovědy a informatiky
Navrhovatel (jméno, příjmení, UČO)	Bc. Michaela Kunová, 106056
Kontakt (adresa, telefon, e-mail)	Opavská 959/49, Ostrava – Poruba, 708 00, +420 732 810 025, 106056@mail.muni.cz
Fakulta	Přírodovědecká
Studijní program – obor	N-BI BIMG – Molekulární biologie a genetika
Název projektu	Kultivace lidských embryonálních kmenových buněk v chemicky definovaných médiích – vývoj pro buněčné terapie
Akronym	HESTER
Vedoucí DP / Školitel DP (+UČO)	doc. Ing. Petr Dvořák, CSc. (47260)
VŠ – fakulta – pracoviště	Masarykova univerzita – Lékařská fakulta – Biologický ústav
Kontakt (adresa, telefon, e-mail)	Kamenice 5, 625 00, Brno pdvorak@med.muni.cz

Oddíl A – vyplňuje řešitel

Dílě / výsledné výstupy projektu

- XII. Setkání biochemiků a molekulárních biologů; 6. - 7. únor 2008; Brno, CZ
poster: „DEVELOPMENT OF A NEW CULTURE MEDIUM FOR HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS” (sborník abstraktů: ISBN 978-80-210-4526-2)
- 2nd Annual Consortium Meeting, ESTOOLS; 1. - 5. červen 2008; Budapešť, Maďarsko
poster: „CULTIVATION OF HUMAN ES CELLS IN THE CHEMICALLY DEFINED MEDIUM CONTAINING PLANT HYDROLYSATE“
- připravováno sepsání publikace
- plánovaná účast na 52. Studentské vědecké konferenci LF MU nebyla uskutečněna z důvodu příslušnosti k jiné fakultě
- další výstupy projektu jsou plně v souladu s předpokládanými.

¹ Formulář je shodný pro dílčí i závěrečnou zprávu. Nevhodnou variantu vždy přeškrtněte.

Odborná charakteristika dosažených výsledků

Lidské embryonální kmenové buňky (lidské ES buňky) jsou v současné době rutinně kultivovány za přítomnosti látek zvířecího původu. Kultivační médium obsahuje sérovou náhražku KnockOut Serum Replacement s obsahem hovězího albuminu a mastných kyselin a nezbytná podpůrná a výživová vrstva fibroblastů je původem z myších embryí. Snahy o použití pluripotentních lidských ES buněk v buněčných terapiích vylučují přítomnost jakékoliv látky zvířecího původu, jež je vždy potenciálním zdrojem patogenních a imunogenních molekul. Proto je v posledních letech vyvíjen silný tlak na vytvoření kultivačního systému, jež by tato nebezpečí odstranil a zároveň umožnil množení nediferencovaných pluripotentních a karyotypově normálních lidských ES buněk po dostatečně dlouhou dobu, potřebnou k jejich namnožení pro cílené diferenciaci v požadovaný buněčný typ.

Lidské ES buňky jsou však velmi citlivým buněčným typem a sebemenší změna kultivačních podmínek vede okamžitě ke snížení proliferace a viability a následné smrti již po několika málo pasážích (Rajala *et al.*, 2007). Nejúspěšnější plně definované kultivační systémy bez zvířecích proteinů jsou dnes založeny na použití vysokých koncentrací několika růstových faktorů (Beattie *et al.*, 2005; Yao *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2006), které však činí cenu média neúnosně vysokou a média nepoužitelné v rutinní kultivaci.

Hlavním cílem tohoto projektu bylo vytvoření kultivačního systému pro lidské ES buňky, zbaveného zvířecích proteinů a to použitím lidských předkožkových fibroblastů a rostlinného, plně definovaného produktu VegetaCell. VegetaCell je hydrolazát špaldového lepku, upravený ultracentrifugací a gelovou permeační chromatografií, takže obsahuje složky do velikosti max. 500 Da. Jde především o ionty, aminokyseliny s převahou L-glutaminu a tripeptidy. Složení tohoto produktu je definované a vychází ze studie prof. RNDr. Františka Fraňka, DrSc. Ten sledoval vliv jednoduchých tripeptidů na snížení hladiny apoptózy v kultuře hybridomových buněk, používaných k produkci monoklonálních protilátek (např. Franěk *et al.*, 2000)

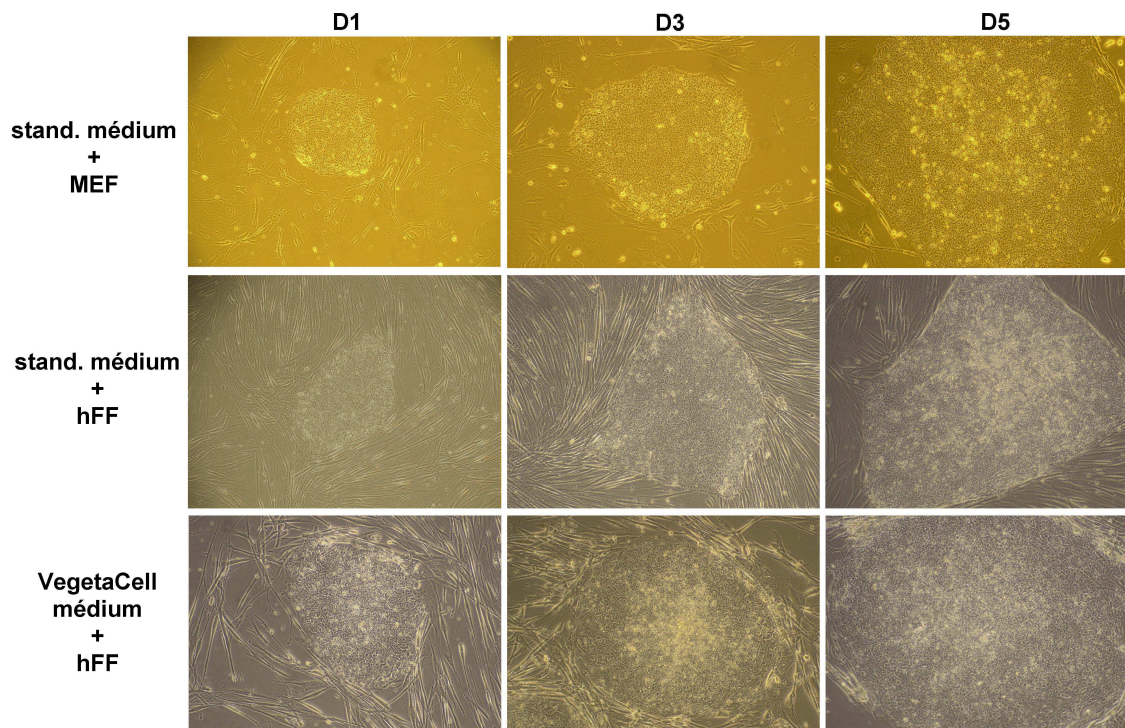
stručná charakteristika dosažených výsledků:

- lidské ES buňky byly ve standardním médiu úspěšně převedeny na kultivaci za použití lidských předkožkových fibroblastů
- bylo získáno velmi úzké rozmezí koncentrací VegetaCell a lidského sérového albuminu, ve kterém jsou lidské ES buňky za přídavku dalších, plně definovaných složek bez látek zvířecího původu (kys. askorbová, směs insulin-transezferin-selenium, cholesterol s obsahem mastných kyselin) schopny dlouhodobě proliferovat
- proliferace buněk v těchto nových médiích je porovnatelná s buňkami ve standardním médiu
- hladina apoptózy je v novém médiu snížena

Získané výsledky doplňují dlouhodobý koncept našeho pracoviště, kdy jedním z cílů je pochopení signalizačních drah vedoucích k dlouhodobému udržení pluripotentního a nediferencovaného stavu kultivovaných lidských ES buněk. Tyto dráhy jsou ovlivňovány mnoha endogenními i exogenními vlivy, především pak kultivačním prostředím. Složení a struktura podkladové vrstvy (Eiselleova *et al.*, 2008), ale i jednotlivé složky kultivačního média, především exogenně dodávaný cytokin FGF-2 (Dvorak *et al.*, 2005) jsou považovány za základní kameny kultivačního systému lidských ES buněk; jejich detailní působení však zatím není známo. Výsledky tohoto studentského projektu mohou tomuto pochopení napomoci a stát se základem nového kultivačního prostředí, vhodného i pro kultivaci tzv. „clinical-grade“ lidských ES buněk, použitelných v buněčných terapiích.

Charakteristika dosažených výsledků z hlediska projektu

- lidské ES buňky byly převedeny z rutinní kultivace na myších embryonálních fibroblastech (MEF) na podpůrnou vrstvu lidských předkožkových fibroblastů (hFF); to vedlo ke změně morfologie kolonií - původně kulaté kolonie byly kompaktnější a nadobily kapkovitého až hranatého tvaru (v souladu s publikovanými daty)
- z média pro lidské ES buňky byl odstraněn KnockOut Serum Replacement a namísto něj bylo testováno mnoho kombinací koncentrací VegetaCell a lidského sérového albuminu (HSA); nejlepší mikroskopicky hodnotitelné růstové vlastnosti vykazovaly buňky v rozmezí 5 a 10% VegetaCell a 5 a 10 g / L HSA
- médium bylo dále doplněno 10 ml / L komerční směsí insulin-transferrin-selenium (ITS), 1% cholesterolu (s obsahem mastných kyselin) a 50 mg / L kyseliny askorbové
- buňky kultivované v médiu s VegetaCell měly morfologii kolonií, interval mezi pasážemi a tím i míru proliferace (hodnotitelnou mikroskopicky) porovnatelnou s buňkami ve standardním médiu:



- pro další testy bylo zvoleno médium 5 - 5 (5% VegetaCell a 5 g / L HSA)

Proliferace a buněčný cyklus:

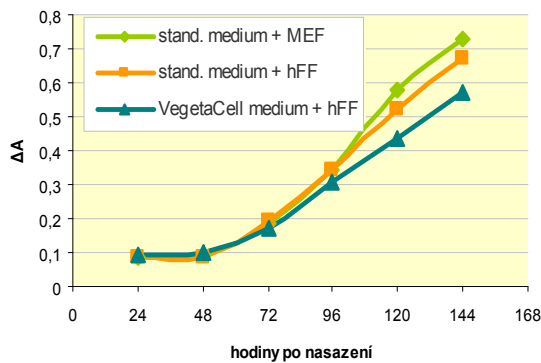
1. WST-1

- spektrofotometrické měření barevné změny média dané přeměnou tetrazoliové soli na formazan proliferujícími buňkami
- výsledky naznačují klesající proliferaci ve směru:

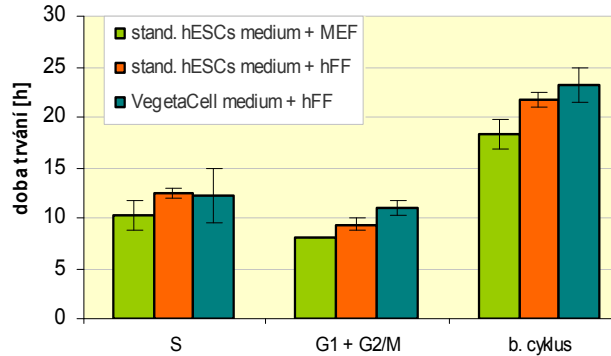
stand. médium + MEF → stand. médium + hFF → médium 5 - 5 + hFF

avšak rozdíly nebyly statisticky významné (two-tailed t-test; $p=0,05$)

Proliferace lidských ES buněk (WST-1)



Proliferace lidských ES buněk (BrdU)



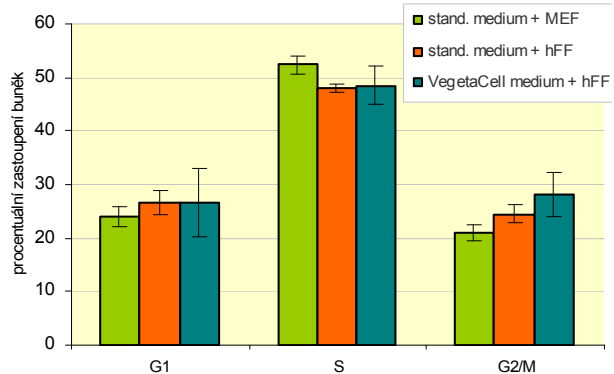
2. *in situ* inkorporace bromdeoxyuridinu (BrdU)

- inkorporace BrdU v různých časových intervalech → měření délky buněč. cyklu a S fáze
- pozorováno prodlužování buněčného cyklu ve směru:
stand. médium + MEF → stand. médium + hFF → médium 5 - 5 + hFF
což odpovídá výsledkům, získaným metodou WST-1

3. Značení DNA propidium jodidem (PI)

- značení DNA fixovaných buněk PI → analýza na průtokovém cytometru
- pozorováno snižování počtu buněk v S fázi ve stejném směru jako v předcházejících metodách a úměrně tomu zvyšování počtu buněk v ostatních fázích cyklu, což může být dáno zpomalením buněčného cyklu a tím i proliferace

Analýza buněčného cyklu (PI)

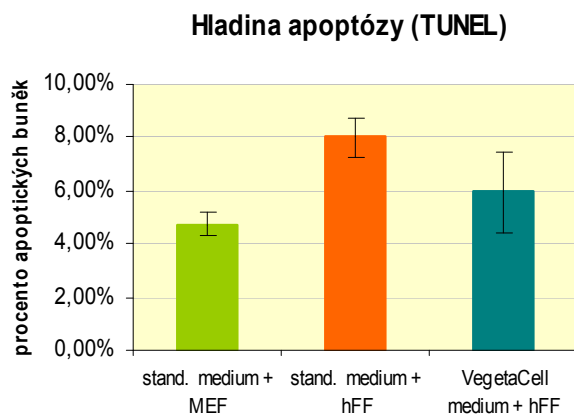


- výsledky proliferačních testů a analýz buněčného cyklu ukazují, že převedení buněk ve stand. médiu z MEF na hFF vede ke zpomalení proliferace a prodloužení buněčného cyklu; tento trend také pokračuje při převedení buněk do média VegetaCell, avšak rozdíly často nejsou statisticky významné (two-tailed t-test, $p=0,05$)
- případné zpomalení proliferace a prodloužení buněčného cyklu může být považováno za výhodu; lidské ES buňky mohou mít např. delší dobu na případné reparační mechanismy, což by vedlo k oddálení nástupu karyotypových abnormalit (myšlenku podporuje také to, že krátkodobě propagované a karyotypově normální lidské ES buňky mají oproti dlouhodobě propagovaným a karyotypově abnormálním buňkám výrazně delší buněčný cyklus)

Apoptóza:

1. *in situ* TUNEL

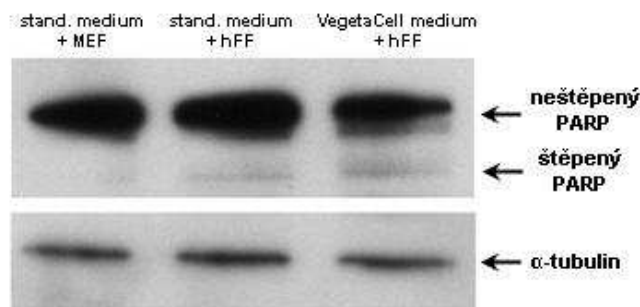
- *in situ* detekce dvouřetězcových zlomů DNA, vznikajících během apoptózy působením specifických endonukleáz



- převedení lidských ES buněk na hFF vedlo k prudkému zvýšení hladiny apoptózy v kultuře
- použití média VegetaCell hladinu apoptózy snížilo

2. Detekce štěpeného PARP

- SDS-PAGE a westernový přenos → detekce neštěpeného a štěpeného PARP

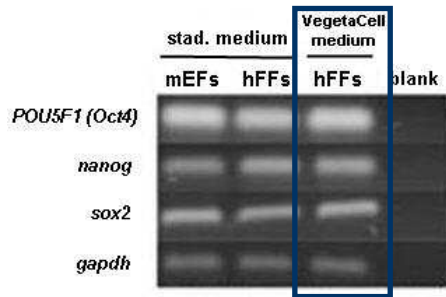


- nejslabší štěpení PARP bylo u buněk ve stand. médiu na MEF; převedení buněk na hFF vedlo ke zvýšení štěpení PARP; v médiu VegetaCell byla hladina štěpeného PARP podobná
- sledování apoptózy pomocí metod TUNEL a detekce štěpeného PARP ukazuje, že při použití hFF stoupá hladina apoptózy; použití média VegetaCell dle metody TUNEL vede ke snížení hladiny apoptózy
- pozorované snížení hladiny apoptózy v médiu VegetaCell podporuje myšlenku prof. Fraňka a jeho výzkum antiapoptických účinků některých oligopeptidů na hybridomové buňky

Expres markerových genů nediferencovaných lidských ES buněk:

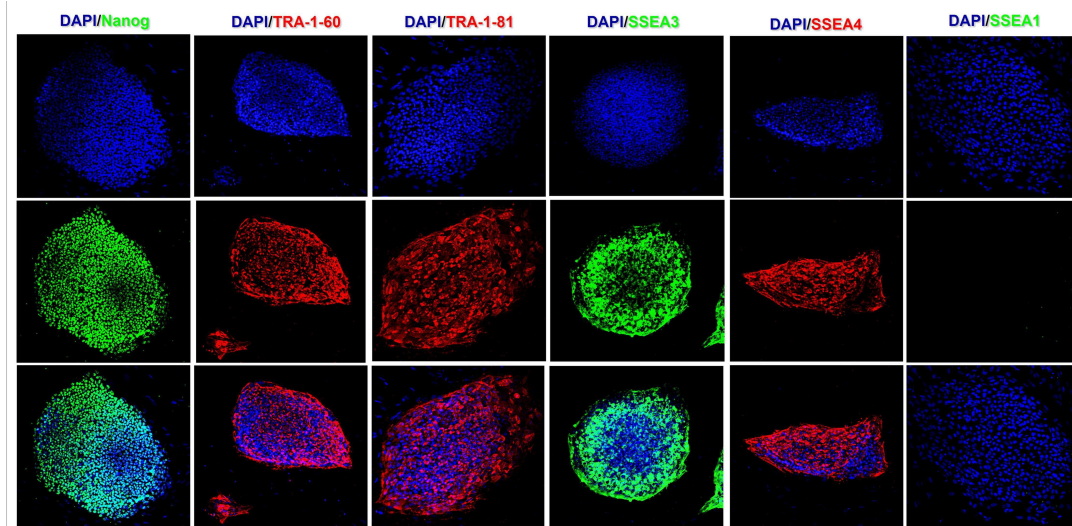
1. RT-PCR

- semikvantitativní RT-PCR → porovnání hladin mRNA pro specifické transkripční faktory nediferencovaných lidských ES buněk (Oct4, Sox2 a Nanog)
- exprese sledovaných transkripčních faktorů je na úrovni mRNA ve všech třech kultivačních podmínkách porovnatelná



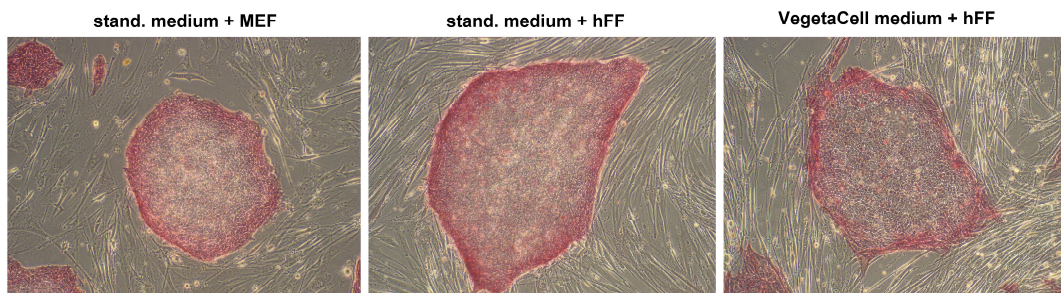
2. Immunofluorescenční analýza

- *in situ* detekce povrchových antigenů (SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81) a transkripčního faktoru Nanog, typických pro nediferencované lidské ES buňky a SSEA1, jehož exprese se objevuje již v raných fázích diferenciacce
- lidské ES buňky, kultivované v médiu VegetaCell, exprimovaly všechny sledované markery nediferencovaných ES buněk a zároveň byly negativní na SSEA1



3. Aktivita alkalické fosfatázy

- detekce aktivity enzymu alkalické fosfatázy pomocí barevné změny při rozkladu substrátu
- ve všech třech kultivačních podmínkách byla aktivita alkalické fosfatázy vysoká



SHRNUTÍ

- médium VegetaCell podporuje proliferaci nediferencovaných lidských ES buněk v míře porovnatelné s buňkami ve standardním médiu
- hladina apoptózy se zdá být při použití VegetaCell snížena

- data, získané v tomto projektu, byly v plné míře zahrnuty do diplomové práce

- cíle projektu, vytýčené v úvodní žádosti, byly splněny

- záměr testovat „Long IGF-I“ (insulin-like growth factor I), jež byl naznačen v průběžné zprávě, nemohl být z objektivních důvodů zahrnut do tohoto projektu (potíže dodavatele, jež produkt dodal až 6 měsíců po době objednání a pouhé 3 týdny před dokončením diplomové práce); studium efektu tohoto modifikovaného cytokinu na proliferaci a přežívání lidských ES buněk však bude testován v nejbližších měsících

Účast na odborných akcích v porovnání s plánem

plánované akce, aktivní účast:

- XII. Setkání biochemiků a molekulárních biologů; 6. - 7. únor 2008; Brno, CZ
poster: „DEVELOPMENT OF A NEW CULTURE MEDIUM FOR HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS“ (sborník abstraktů: ISBN 978-80-210-4526-2)
- 2nd Annual Consortium Meeting, ESTOOLS; 1. - 5. červen 2008; Budapešť, Maďarsko
poster: „CULTIVATION OF HUMAN ES CELLS IN THE CHEMICALLY DEFINED MEDIUM CONTAINING PLANT HYDROLYSATE“
- plánovaná účast na 52. Studentské vědecké konferenci LF MU nebyla uskutečněna z důvodu příslušnosti k jiné fakultě

Čerpání finančních prostředků (uvádět v tisících Kč na jedno desetinné místo)

	položka	přiděleno	čerpání
1	Stipendium pro řešitele	10,0	10,0
2	Cestovné	0,0	0,0
3	Studijní literatura, náklady na publikace	5,0	5,0
4	Materiál	45,0	45,0
5	Služby	0,0	0,0
6	Celkem	60,0	60,0

Zdůvodnění rozdílů v plánovaném čerpání finančních prostředků

Materiál

- 3 × A1653-10g **Human serum albumin** (Sigma - Aldrich; 2 × á 8.779,90 Kč, 1 × 9.093,40 Kč)
- 1 × T0665-100mg **Holo-transferrin, human** (Sigma - Aldrich; 3.005,80 Kč)
- 1 × S9133-1mg **Sodium selenite γ -irradiated** (Sigma - Aldrich; 2.056,80 Kč)
- 2 × 80136 **60 μ -dish ibitreat, sterile** (IBIDI; á 4.765,00 Kč)
- 1 × 94005 **Serological pipette 5 ml** (TPP; 1.297,10 Kč)
- 1 × 94010 **Serological pipette 10 ml** (TPP; 1.380,40 Kč)
- 1 × 94024 **Serological pipette 25 ml** (TPP; 1.273,30)

Lidský albumin je nezbytným přídavkem do bezsérového média. Jeho funkcí je usnadnění vazby FGF-2 a dalších látek k příslušným receptorům a zároveň odvod metabolitů. Stejně tak i transferrin a seleničitan sodný jsou pro kultivované buňky nezbytné.

μ -dishes jsou výborným povrchem pro pozorování imunocytochemických preparátů pod fluorescenčním a konfokálním mikroskopem. Na jinak rutinně používaných sklíčkách buňky velice špatně proliferují a běžný kultivační plast nemá vhodné optické vlastnosti pro pozorování preparátů.

Sterilizované sérologické pipety jsou nezbytným vybavením každé laboratoře, pracující s buněčnými a tkáňovými kulturami.

Studijní literatura

Sullivan et al., 2007, Human embryonic stem cells: The practical Handbook (4.381,10 Kč)

Jedná se o nejnovější odbornou monografii, pojednávající o lidských embryonálních kmenových buňkách se zaměřením na jejich kultivaci. Shrnuje všechny důležité informace metodologické postupy, které byly použity a postupně optimalizovány od první izolace lidských embryonálních kmenových buněk v roce 1998.

Alberts et al., 2002, Molecular biology of the cell; 4th edition (899,00 Kč)

Stipendium pro řešitele

Finance čerpány dle předpokladu.

Pozn.: ceny uváděny vč. 19% DPH

29. 5. 2008

Bc. Michaela Kunová

Oddíl B² - posudek vedoucího / školitele DP pro průběžné / závěrečné oponentní řízení**Odborná úroveň řešení projektu**

1	výborná, dosaženo originálních výsledků významných pro obor	×
2	velmi dobrá, dosaženo nadprůměrných výsledků s významem pro obor	
3	průměrná, dosaženo dílčích výsledků průměrné úrovně v rámci oboru	
4	nedostatečná, nebylo dosaženo dobrých výsledků v rámci oboru	
5	zcela nevyhovující nebo nelze z dílčí / závěrečné zprávy o projektu posoudit	

Řešitelka dokázala optimalizovat médium pro lidské ES buňky s obsahem plně definovaných látek bez zvířecích proteinů, které má potenciál stát se základem médií pro tzv. „clinical grade“ lidské ES buňky, použitelné v buněčných terapiích.

Cíle projektu a harmonogram

1	dílčí / výsledné cíle projektu dosaženy nad rámec předpokladů a harmonogramu	
2	dílčích / výsledných cílů projektu dosaženo v souladu s předpoklady a harmonogramem	×
3	dílčích / výsledných cílů dosaženo podle předpokladů s časovým skluzem	
4	dílčích / výsledných cílů dosaženo jen částečně	
5	dílčích / výsledných cílů není dosahováno	

Výsledky projektu byly získány plně v souladu s předpoklady.

Výstupy projektu

1	množství a úroveň výstupů projektu překračuje předpoklady návrhu	
2	množství a úroveň výstupů projektu odpovídají předpokladům návrhu	×
3	buď množství nebo úroveň výstupů projektu nedosahuje předpokladů návrhu	
4	množství i úroveň výstupů projektu zaostávají za předpoklady návrhu	
5	výstupy projektu jsou zcela nedostatečné v porovnání s předpoklady návrhu	

Množství výstupů naprosto odpovídá předpokladům návrhu a jejich úroveň je velmi vysoká.

² Vyplňuje odborný garant – vedoucí diplomové práce / školitel disertační práce. Kompletně vyplněný formulář (oddíl A i B) vkládá garant do Elektronického seznamu v Dokumentovém serveru ISMU, a to pro průběžné oponentní řízení vždy nejpozději k 31. prosinci daného akademického roku a pro závěrečné oponentní řízení nejpozději k 31.květnu daného akademického roku.

Čerpání finančních prostředků a jeho zdůvodnění		
1	čerpání velmi uvážlivé a přiměřené cílům projektu, zdůvodnění věcné a realistické	×
2	čerpání přiměřené cílům projektu, zdůvodnění vyžaduje upřesnit	
3	spotřeba prostředků vyšší než odpovídá výsledkům, zdůvodnění vyžaduje upřesnit	
4	čerpání neúsporné, v rozporu s dosahovanými výsledky	
5	přiměřenost čerpání nelze posoudit vzhledem k nedostatečnému zdůvodnění položek	
<p>Čerpání finančních prostředků plně odpovídalo požadavkům projektu.</p>		

Hodnocení projektu z hlediska úrovně budoucí diplomové / disertační práce		
1	výsledky projektu z hlediska DP vysoce nadstandardní a rozhodující pro její úroveň	×
2	výsledky projektu z hlediska DP nadprůměrné a důležité pro její úroveň	
3	výsledky projektu z hlediska DP průměrné, přispějí k její dobré úrovni	
4	výsledky projektu přispívají k zlepšení úrovně DP pouze okrajově	
5	výsledky projektu nepředstavují z hlediska DP žádný přínos	
<p>Výstupy projektu jsou plnohodnotnými daty a jejich význam vysoce překračuje běžnou úroveň diplomových prací.</p>		

Celkové hodnocení stavu řešení / řešení projektu ³		
1	vynikající výsledky, doporučuji nadále financovat / přijmout jako úspěšně ukončený	×
2	velmi dobré výsledky, doporučuji nadále financovat / přijmout jako úspěšně ukončený	
3	průměrné výsledky, další finanční prostředky redukovat / přijmout s výhradami	
4	podprůměrný projekt, financování zastavit / přijmout s vážnými výhradami	
5	špatný projekt, financování zastavit / hodnotit jako neúspěšně ukončený	
<p>Řešitelka zvládla velmi náročnou manipulaci s lidskými ES buňkami i další metody, používané v naší laboratoři a nezbytné k získání výstupů tohoto projektu. Data již byla prezentována na několika konferencích a v nejbližších měsících budou zahrnuty do připravované odborné publikace.</p>		

29. 5. 2008

doc. Ing. Petr Dvořák, CSc.

³ Varianty se týkají průběžného / závěrečného oponentního řízení. Nevhodné varianty přeškrtněte.