MASARYKOVA UNIVERZITA

Přírodovědecká fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno 2017 **Kateřina Kutálková**

MASARYKOVA UNIVERZITA
Přírodovědecká fakulta
Ústav experimentální biologie
Oddělení genetiky a molekulární biologie

PŘÍPRAVA LIDSKÝCH INDUKOVANÝCH PLURIPOTENTNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK Z ENDOTELIÁLNÍCH BUNĚK POMOCÍ EPISOMÁLNÍ REPROGRAMACE

Diplomová práce

Kateřina Kutálková

VEDOUCÍ PRÁCE: doc. RNDr. Irena Krontorád Koutná, Ph.D. **Brno 2017**

Bibliografický záznam

Autor:	Bc. Kateřina Kutálková Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Ústav experimentální biologie
Název práce:	Příprava lidských indukovaných pluripotentních kmenových buněk z endoteliálních buněk pomocí episomální reprogramace
Studijní program:	Biologie
Studijní obor:	Lékařská genetika a molekulární diagnostika pro odborné pracovníky v laboratorních metodách
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Irena Krontorád Koutná, Ph.D.
Akademický rok:	2016/2017
Počet stran:	72
Klíčová slova:	endoteliální buňky; HSVEC; episomální reprogramace; iPSC

Bibliographic Entry

Author: Bc. Kateřina Kutálková
Faculty of Science, Masaryk University
Department of Experimental Biology

Title of Thesis: Derivation of human induced pluripotent stem cell from endothelial cell using episomal reprogramming

Degree Programme: Biology

Field of Study: Medical Genetics and Molecular Diagnostics

Supervisor: doc. RNDr. Irena Krontorád Koutná, Ph.D.

Academic Year: 2016/2017

Number of Pages: 72

Keywords: Endothelial cells; HSVEC; episomal reprogramming; iPSC

Abstrakt

Diplomová práce se zaměřuje na vnitřní výstelku cévního systému – endotel. Tento orgán se přímo či nepřímo zapojuje do řady fyziologických i patologických procesů. Pro regenerativní medicínu mohou být potenciálně přínosné *in vitro* expandované endoteliální buňky. V této práci byly enzymatickým způsobem izolovány endoteliální buňky z lidských vén. Získané buněčné linie byly charakterizovány průtokovou cytometrií a funkčními testy.

Kultivovat dostatečná množství zdravých endoteliálních buněk pro případné klinické aplikace může být obtížné. Je ovšem možné připravit pacientsky specifické pluripotentní buňky a ty následně diferencovat. Druhou částí této práce je derivace linií indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPSCs) z připravených endoteliálních linií a ověření jejich pluripotence pomocí exprese markerů, spontánní i řízenou diferenciací.

Abstract

This diploma thesis is focused on endothelium, the inner lining of vascular system. This organ is directly and indirectly involved in many physiological and pathological processes. *In vitro* expanded endothelial cells could be beneficial to regenerative medicine. In this thesis, endothelial cells were enzymatically isolated from human saphenous veins. Obtained cell lines were characterized by flow cytometry and functional tests.

Cultivating a sufficient number of healthy endothelial cells for potential clinical applications could be trying. It is, however, possible to prepare patient specific pluripotent cells and differentiate them afterwards. The second part of this thesis focuses on derivation of induced pluripotent stem cell (iPSCs) lines from prepared endothelial lines and checking their pluripotency by marker expression and spontaneous and directed differentiation.

MASARYKOVA UNIVERZITA
Přírodovědecká fakulta

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Akademický rok: 2015/2016

Ústav: Ústav experimentální biologie

Studentka: Bc. Kateřina Kutálková

Program: Biologie

Obor: Lékařská genetika a molekulární diagnostika pro odborné pracovníky v laboratorních metodách

Ředitel *Ústavu experimentální biologie* PřF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje diplomovou práci s tématem:

Téma práce: Příprava lidských indukovaných pluripotentních kmenových buněk z endoteliálních buněk pomocí episomální reprogramace

Téma práce anglicky: Derivation of human induced pluripotent stem cell from endothelial cell using episomal reprogramming

Oficiální zadání:
Lidské indukované pluripotentní kmenové buňky (hiPSCs) umožňují přípravu autologních buněk specifických pro různé tkáně pacienta. V dnešní době jsou přednostně připravovány z lidských fibroblastů nebo CD34+ buněk derivovaných z kostní dřeně. V poslední době je diskutována problematika epigenetické paměti zdrojových buněk ve vztahu k reprogramaci a následné diferenciaci. Cílem diplomové práce je objasnit vztah mezi epigenetickou pamětí zdrojových buněk a následnou diferenciační kapacitou získaných hiPSCs. Diplomant se bude v průběhu řešení diplomové práce věnovat episomální reprogramaci lidských endoteliálních buněk z různých typů endotelií (cévy, žíly, kapiláry). Práce bude zahrnovat zvládnutí dvou náročných technik: přípravy primokultur a následnou episomální reprogramaci do hiPSCc. Finálním krokem práce bude ověření pluripotence resp. diferenciační kapacity všech připavených hiPSC klonů.

Jazyk závěrečné práce: čeština

Vedoucí práce: doc. RNDr. Irena Krontorád Koutná, Ph.D.

Datum zadání práce: 30. 10. 2015

V Brně dne: 19. 11. 2015

Souhlasím se zadáním (podpis, datum):

Bc. Kateřina Kutálková **studentka**	doc. RNDr. Irena Krontorád Koutná, Ph.D. **vedoucí práce**	prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc. **ředitel Ústavu experimentální biologie**

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce doc. RNDr. Ireně Krontorád Koutné, Ph.D. za vedení a podnětné rady v průběhu vypracování mé diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala celému kolektivu laboratoře CBIA, jmenovitě Mgr. Barbaře Šalingové a Mgr. Evě Vavřečkové za to, že mě seznámily se základními technikami laboratorní praxe, Mgr. Pavlu Šimarovi, Ph.D. za osvětlení práce s pluripotentními buňkami a Bc. Daniele Řehákové za vysvětlení imunocytochemie.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracoval/a samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Brno 10. května 2017 …….

Kateřina Kutálková

Obsah

1. Úvod a problematika 11
1.1. Endotel 12
1.1.1. Histologie krevních cév 12
1.1.2. Tvorba cév 13
1.1.3. Struktura endoteliálních buněk 14
1.1.4. Izolace endoteliálních buněk 17
1.1.5. Identifikace 17
1.2. Kmenové buňky 19
1.2.1. Historie výzkumu pluripotentních kmenových buněk 20
1.2.2. Vlastnosti pluripotentních kmenových buněk 20
1.2.3. Indukované pluripotentní kmenové buňky 22
1.2.4. Reprogramační metody 22
1.2.5. Epigenetická paměť 24
2. Cíle diplomové práce 25
3. Materiály a metody 26
3.1. Biologický materiál 26
3.2. Buněčné kultury 26
3.2.1. Derivace primokultur 26
3.2.2. Kultivace linií 27
3.2.3. Příprava linií iPSCs 27
3.3. Metody 28
3.3.1. Průtoková cytometrie 28
3.3.2. LDL assay 29
3.3.3. Trubičková assay 29
3.3.4. Magnetická imunoseparace 30
3.3.5. Doubling time 30
3.3.6. Testované povrchy 31
3.3.7. Spontánní diferenciace iPSCs 31
3.3.8. Řízená diferenciace do tří zárodečných listů 32
3.3.9. Imunocytochemie 33
3.3.10. In vivo tvorba teratomů 34
3.4. Použité roztoky a media 35
3.4.1. Transportní medium 35
3.4.2. EGM 36

3.4.3. Pasážovací medium 36
3.4.4. mTeSR 36
3.4.5. BPEL 37
3.4.6. Roztoky 37
3.5. Schéma experimentu 38
4. Výsledky 39
4.1. Derivace primárních endoteliálních kultur 39
4.2. Morfologie 42
4.3. Testování povrchů pro růst endotelií 44
4.4. Povrchové markery endotelií 45
4.5. LDL assay 51
4.6. Trubičková assay 52
4.7. Příprava linií iPSCs 53
4.8. Povrchové markery iPSCs 55
4.9. Jaderné markery iPSCs 56
4.10. Spontánní diferenciace iPSCs 57
4.11. Řízená diferenciace iPSCs 59
5. Diskuze 61
6. Souhrn 66
7. Summary 67
8. Literatura 68

Seznam zkratek

Zkratka	Plné původní znění	Plné české znění
AGEs	advanced glycation endproducts	pokročilé produkty glykace
BMP	bone morphogenic protein	kostní morfogenetický protein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Dulbeccovo modifikované Eaglovo medium
EB	embryoid bodies	embryoidní tělíska
ECC	embryoid carcinoma cells	buňky embryonálního karcinomu
ESC	embryonic stem cells	embryonální kmenové buňky
FGF	fibroblast growth factor	fibroblastový růstový faktor
GM-CSF	granulocyte and macrophage colony stimulating factor	granulocytární a makrofágový faktor stimulující kolonie
hESC	human embryonic stem cells	lidské embryonální kmenové buňky
HSVEC	human saphenous vein endothelial cells	lidské endoteliální buňky z vény safény
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells	lidské endoteliální buňky z pupečníkové žíly
ICM	inner cell mass	vnitřní buněčná masa
iPSCs	induced pluripotent stem cells	indukované pluripotentní kmenové buňky
LIF	leukemia inhibitory factor	leukemii inhibující faktor
LDL	low density lipoprotein	lipoprotein o nízké hustotě
mESC	mouse embryonic stem cells	myší embryonální kmenové buňky
PAI	plasminogen activator inhibitor	inhibitor aktivátoru plasminogenu
PDL	population doubling level	
RT	room temperature	pokojová teplota
SMC	smooth muscle cell	buňka hladké svaloviny
TE	trypsin + EDTA	
TFA	tube formation assay	trubičková esej
tPA	tissue plasminogen activator	tkáňový aktivátor plasminogenu
WNT	wingless type	

1. Úvod a problematika

Kardiovaskulární onemocnění jsou v současné době jedním z hlavních zdravotních obtíží moderních civilizací. Endotel, buněčná vrstva na rozhraní krve a tkání, hraje při vývoji těchto nemocí zásadní vliv. Velký pokrok v porozumění fyziologickým i patologickým stavům znamenalo ustavení prvních *in vitro* endoteliálních kultur v sedmdesátých letech. Velkým překvapením bylo, že se podstatně liší buňky artérií, vén a mikrovaskulatury, a to i z téhož cévního typu, ale jiné orgánové lokalizace.

In vitro kultury jsou široce užívaným laboratorním modelem, ať už vzniku a vývoje onemocnění, vlivu nových léků nebo angiogeneze v průběhu ontogeneze i maligních stavů. Kromě toho se staly důležitým milníkem v tkáňovém inženýrství – např. je možné endoteliálními buňkami osidlovat uměle vytvořené konstrukty a tím vytvářet cévní náhrady s minimální trombogenitou.

I pro buněčné terapie má endotel velký potenciál. Aplikace vhodných endoteliálních buněk by mohla zajistit rychlé obnovení prokrvení a zlepšit vyhlídky pacientů po ischemických příhodách. Slibným přístupem je příprava endoteliálních buněk diferenciací buněk kmenových. Tím by se eliminovala nutnost odebírat pacientovi cévu, navíc by se teoreticky připravily zdravé buňky v jakémkoli potřebném množství.

V první části této práce se zaobírám popisem a vlastnostmi endoteliálních buněk, způsoby jejich izolace a následné identifikace v in vitro kulturách. Další částí teoretické kapitoly je rozbor kmenových buněk se zvláštním zaměřením na indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC).

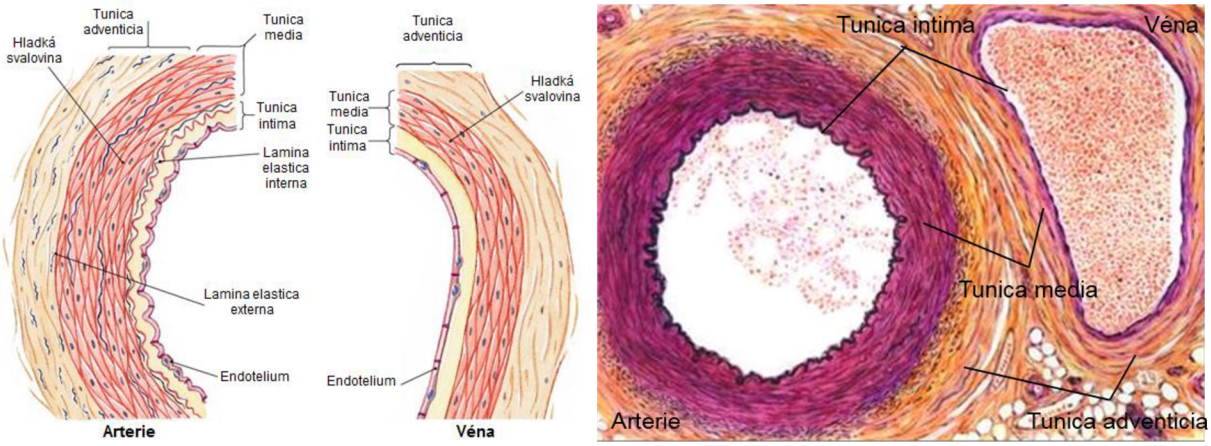
Praktická část se věnuje izolaci, ustavení primárních buněčných kultur a kultivaci buněk z žíly dolní končetiny (*V. saphena magna*). Další částí práce je reprogramace primárních kultur do iPSCs a přesná charakterizace získaných klonů/linií iPSCs.

1.1. Endotel

Endotel je vrstvou buněk, která tvoří vnitřní výstelku krevních i lymfatických cév a také srdečních dutin. U dospělého člověka přibližně sestává z 6 x 10^{13} buněk, pokrývá až 7 m^2 a dohromady váží 1 kg. Vzniká oploštěním rozvětvených mezenchymových buněk, jedná se o sekundární epitel odvozený z mezodermu, třetího zárodečného listu. Je tvořen navzájem komplexně propojenými endoteliálními buňkami. Hlavní funkcí je vytvořit aktivní bariéru mezi krevním oběhem a okolními tkáněmi, zapojuje se také do regulace krevního srážení, imunitních a zánětlivých reakcí, produkuje mnohé cytokiny a ovlivňuje průtok krve. Jeho dysfunkce je spojena s patologickými procesy – aterosklerózou, kardiovaskulárními onemocněními, poruchami koagulace, hypertenzí a nádorovým bujením. Nádorové buňky vykazují preferenční adhezi k endotelu ve specifických orgánech a tím endotel nepřímo ovlivňuje i metastázování (Cines *et al.*, 1998).

1.1.1. Histologie krevních cév

Cévní stěna (Obr. 1) je tvořena třemi vrstvami – *tunica intima*, *tunica media* a *tunica adventitia*. Mezi těmito vrstvami mohou být zřetelně odlišené přechody.



Obrázek č.1: Schematické a histologické zachycení cévní stěny arterie a vény (http://droualb.faculty.mjc.edu/Lecture%20Notes/Unit%204/FG22_01.jpg, upraveno; https://s3.amazonaws.com/classconnection/676/flashcards/4903676/png/artery_and_vein_-_non-dense_elastic_ct1336784035867-15381A3B6C155A0A886.png, upraveno)

Endotel tvoří jediná vrstva buněk v *tunice intimě*, obklopující vnitřní povrch cévy. Zevní povrch těchto buněk zpravidla spočívá na bazální lamině. Pod endotelem je subendotelová vrstva řídkého vaziva, ve které se mohou vyskytovat buňky hladkého svalstva (SMC). *Tunica media* je z větší části tvořena šroubovitě vinutými koncentrickými vrstvami

hladké svaloviny, které jsou doplněny proměnlivým množstvím elastických i kolagenních vláken a proteoglykanů. *Tunica adventitia* sestává z podélně orientovaných kolagenních a elastických vláken. Ve velkých cévách je pro tuto vrstvu typická přítomnost *vasa vasorum* – drobných cév, vyživujících oblasti příliš vzdálené od lumen, aby byly zásobeny difúzí. Adventicia postupně přechází do vaziva orgánu, kterým céva prochází. Složení, velikost, a dokonce přítomnost jednotlivých tunic se liší dle typu cévy. Nejjednodušší stavbu mají kapiláry, s větší velikostí cév vzrůstá i jejich složitost.

Kapiláry jsou jednoduché trubice lemované tenkou cytoplasmou endotelu. V nejužších kapilárách stačí jediná buňka k vystlání celé lumen. Od okolní tkáně jsou odděleny sítí retikulárních vláken. V těsné blízkosti kapilár jsou uloženy fibroblasty, makrofágy, mezenchymové buňky a pericyty. Pericyty svými dlouhými rozvětvenými výběžky obemykají stěnu kapilár. Kontrakcí výběžků je regulován průsvit těchto nejmenších cév, čímž pericyty zastávají funkci *tunica media*.

Společným znakem arterií je dominantní *tunica media* tvořená až 40 vrstvami hladkých svalových elementů. Intimu od medie odděluje *lamina elastica interna*. V tepnách většího kalibru se vyskytuje také *lamina elastica externa*, oddělující medii od adventicie. U arterií elastického typu je *tunica media* systémem koncentricky uspořádaných elastických membrán, jejichž počet s věkem narůstá.

Venuly jsou typické tenkou medií a silnou kolagenní adventicií, větší kalibry vén ve své medii obsahují malé svazečky svalových buněk. Vény velkého kalibru se výrazně liší svou adventicií – v ní je uložena svalovina, bránící přílišnému roztažení cévy. V cévách končetin jsou vény vybaveny chlopněmi – poloměsíčitými záhyby *tunica intima*, z obou stran krytými endotelem (Junqueira *et al.*, 2002).

1.1.2. Tvorba cév

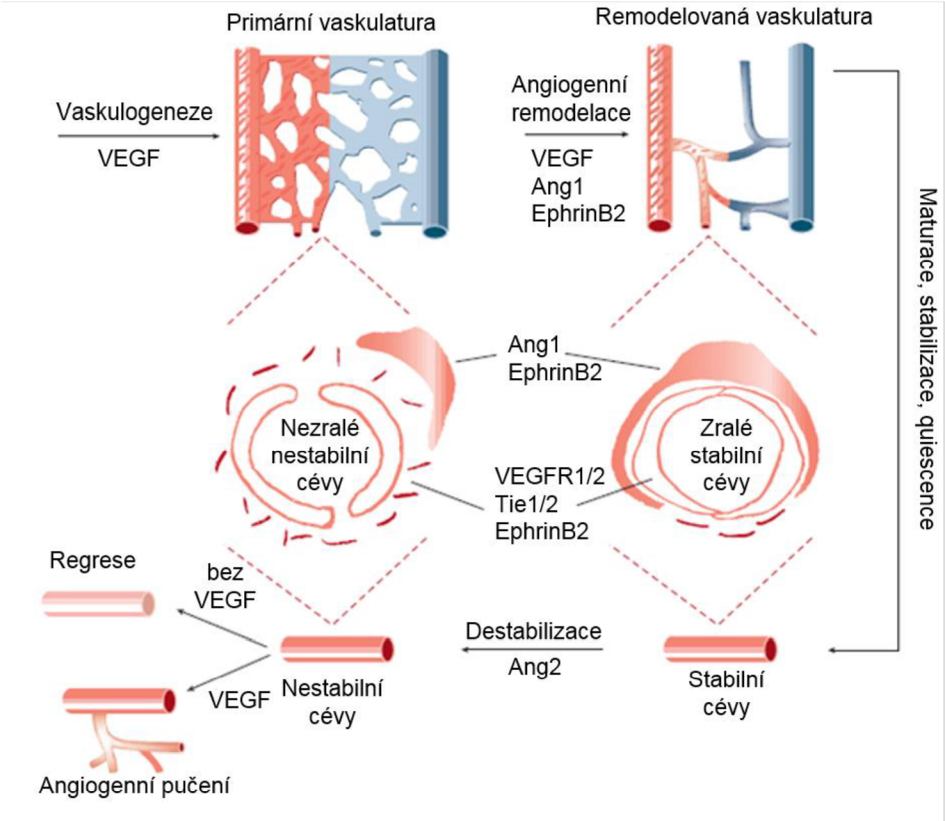
Tvorba cév může probíhat několika různými způsoby (Obr. 2). Kardiovaskulární je prvním orgánovým systémem, který se formuje v embryu během gastrulace. *De novo* organizace endoteliálních buněk do cév za nepřítomnosti preexistujících struktur se označuje jako vaskulogeneze. Takto vzniklé cévy se spojují a vzniká primitivní tubulární síť. V této primární síti jsou založeny hlavní cévy, jako jsou aorta a velké žíly.

Vaskulogenezí založená primární struktura je postupně přeměňována angiogenní remodelací – expanzí i redukcí existujících cév. Zároveň se vyvíjí i stavba cévních stěn –

endoteliální buňky se pevně propojují s podpůrnými buňkami a extracelulární matrix a získávají znaky podobné maturované vaskulatuře (Cines *et al.*, 1998).

Další variantou vzniku cév je angiogeneze. Předpokladem k angiogenní tvorbě cév je již existující vaskulatura. Maturovaná cévní stěna je nejprve destabilizována, aby z ní následně mohly vyrůstat nové cévní výběžky do avaskulárního prostředí. Vznikající cévy jsou opět nezralé a musí projít remodelací, aby dosáhly plně funkčního, maturovaného stavu.

Angiogeneze fyziologicky zodpovídá za vaskularizaci jistých konkrétních tkání během vývoje (neurální trubice, sítnice) a za naprostou většinu nových cév vznikajících u dospělých, včetně těch účastnících se na vaskularizaci nádorů (Yancopoulos *et al.*, 2000).



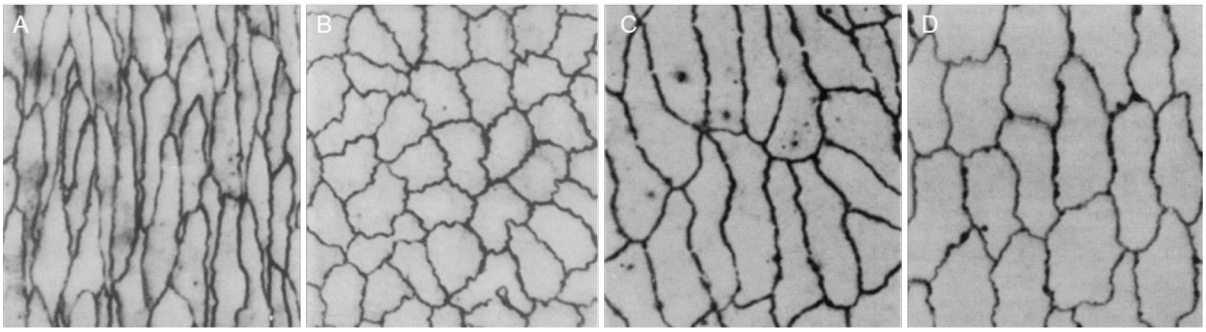
Obrázek č.2: Schéma vzniku cév s hlavními vaskulogenními a angiogenními faktory (Yancopoulos *et al.*, 2000; upraveno).

1.1.3. Struktura endoteliálních buněk

Endoteliální buňky mohou v závislosti na odlišné regulaci v prostoru i čase získávat různé fenotypy. Pro tento fenomén se vžil termín „heterogenita endoteliálních buněk“. Fenotypová heterogenita přináší minimálně dvě výhody. Zaprvé umožňuje endotelu přizpůsobit se nejrůznějším potřebám okolních tkání a zadruhé je to cesta, jak se adaptovat na různá mikroprostředí – od extrémně hypoxického a hyperosmolárního prostředí ve dřeni

ledviny po důkladně prokysličené prostředí pulmonálních alveolů. Tudíž fenotypová heterogenita není ani tak charakterizací existujícího buněčného fenotypu jako spíše jednou ze základních vlastností, kterou tyto buňky vykazují (Aird, 2007a).

Tvar endoteliálních buněk velmi závisí na prostředí, dokonce je jím aktivně ovlivňován. Typicky se jedná o ploché polygonální buňky (ačkoli mohou být v jistých venulách zakulacené až kuboidní), jejichž mocnost se pohybuje mezi 0,1 µm (v kapilárách) a 1 mm (v aortě). V rovných segmentech cév jsou buňky i jejich jádra protaženy ve směru proudění krve. V krysím modelu jsou buňky aorty dlouhé a úzké (55x10 µm), buňky pulmonální tepny kratší, širší (30x14 µm) a obdélníkového tvaru, buňky pulmonální žíly velké a okrouhlého tvaru, buňky dolní duté žíly dlouhé, úzké, obdélníkové (Obr. 3) (Kibria *et al.*, 1980). Buňky v arteriolách jsou delší než jejich žilní protějšky a mají větší povrch.



Obrázek č.3: Tvar endoteliálních buněk v různých cévách v krysím modelu. Okraje buněk byly barveny stříbrem, zvětšeno 1000x. A – aorta; B – plicní kmen; C – dolní dutá žíla; D – plicní žíla (Kibria *et al.*, 1980; upraveno).

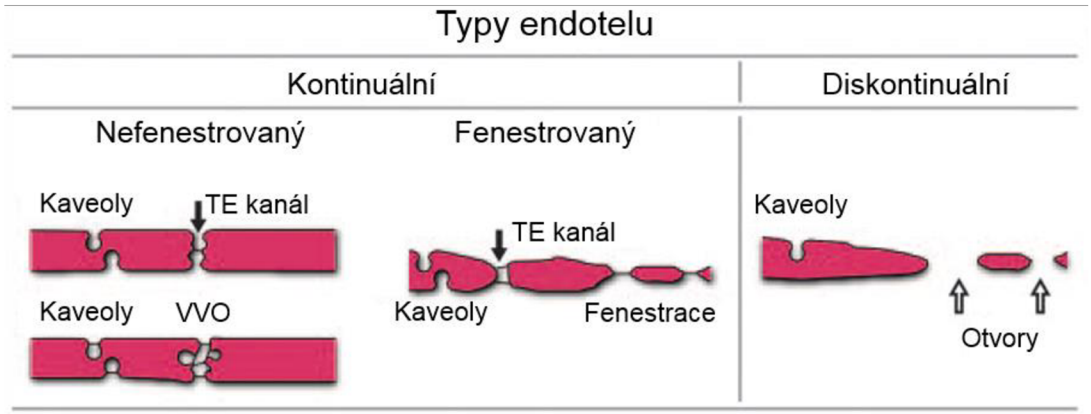
Endoteliální buňky aktivně transportují látky mezi krví a okolními tkáněmi a jednotlivé komponenty endocytární dráhy jsou v nich pozorovatelné – tvořící se i kompletní klathrinové váčky a lysozomy. Touto cestou jsou pohlcovány nespecifické složky okolí nebo specifické cíle, které jsou vychytávány za účasti receptorů. Receptorová endocytóza je zodpovědná za příjem LDL (low density lipoprotein; lipoproteiny o nízké hustotě), transferinu, albuminu, ceruloplasminu a AGEs (advanced glycation end products; pokročilé produkty glykace). Na příjem těchto molekul jsou zvláště specializované buňky v jaterních sinusoidách.

Kromě endocytózy se endoteliální buňky aktivně účastní transcytózy, tedy přepravě molekul z krevního řečiště do okolní tkáně přímo prostupem skrz buňky. Transcytóza využívá specializované struktury – kaveoly a vesikulo-vakuolární organely. Nejvíce kaveolů vzniká v buňkách kapilár.

Pro funkce endotelu jsou nezbytné funkční buněčné spoje, z nichž dva typy jsou považovány za zásadní. Těsné spoje (tvořící zona occludens) se nalézají u apikální strany buněk. Brání volnému pronikání molekul do prostoru mezi jednotlivými buňkami (paracelulárnímu transportu) a zároveň napomáhají k udržování polarity mezi luminálním a abluminálním povrchem. I v četnosti a distribuci těsných spojů je možno pozorovat rozdíly podle lokalizace v krevním řečišti – ve velkých tepnách existuje dobře vyvinutý systém, zatímco v kapilárách a venulách jsou buňky propojeny poměrně volně. Endotelie zapojené do hematoencefalické bariéry jsou na těsné spoje obzvláště bohaté. Druhým důležitým druhem buněčných spojů jsou adherentní spoje.

Endotel může být kontinuální nebo diskontinuální (Obr. 4). Kontinuální endotel se dále dělí na fenestrovaný a nefenestrovaný. Fenestrace jsou malé transcelulární póry o průměru 70 nm, které prostupují přes celou tloušťku buňky. Většina fenestrací je přerušena 5-6nm nemembranózní diaphragmou. Díky glykokalyx nesou fenestrace záporný náboj. Nefenestrovaný kontinuální endotel nalézáme v tepnách, žílách a kapilárách v mozku, kůži, srdci a plicích. Fenestrovaný kontinuální endotel se vyskytuje tam, kde je zapotřebí zvýšené filtrace nebo více transendoteliálního transportu, např. kapiláry exokrinních i endokrinních žláz.

Diskontinuální endotel se vyznačuje přítomností větších otvorů o velikosti 100-200 nm, které postrádají diaphragmu. Bazální membrána přiléhající k endoteliálním buňkám je jen slabě vyvinuta. Diskontinuální epitelová vrstva se typicky nachází v jaterních sinusoidách (Angelis *et al.*, 1996).



Obrázek č.4: Typy kapilárního endotelu. TE kanál – transendoteliální kanál; VVO – vesikulo-vakuolární orgány (Aird, 2007b).

Místně specifické vlastnosti nejsou fixované, naopak, během embryogeneze i postnatálního vývoje se dynamicky proměňují. Tato dynamika byla pozorována

na hlodavcích: cévy v mozku jsou až do druhého týdne embryonálního vývoje fenestrované a jednotlivé buňky mají jen minimum těsných spojů. Buňky v jaterních kapilárách u krys přiléhají k souvislé bazální membráně a namísto velkých otvorů mají drobné, diaphragmou potažené fenestrace (Bankston and Pino, 1980).

1.1.4. Izolace endoteliálních buněk

Pro izolaci endoteliálních buněk bylo vypracováno několik základních přístupů, které jsou pro účely konkrétních studií modifikovány. Nejčastěji se používají enzymatické metody – po důkladném promytí jsou cévy vystaveny působení enzymů, jako jsou kolagenáza (Gosling *et al.*, 1998; Jaffe *et al.*, 1973; Marin *et al.*, 2001), trypsin (Chen *et al.*, 2004) a další (Tokunaga *et al.*, 1989). Při použití vhodné koncentrace enzymu a ideální doby inkubace je kontaminace jinými buněčnými typy zanedbatelná.

Do živného media je možné vložit celý vzorek tkáně, endoteliální stranou přivrácenou k povrchu misky. Proliferující buňky migrují ven ze tkáně. Tímto postupem se získá velké množství buněk i z minimálního množství tkáně. Může dojít k nežádoucí přítomnosti jiných buněčných typů (Huang *et al.*, 2003).

Cévní tkáň může být rozmělněna směsí kolagenázy a trypsinu. Získané fragmenty se následně vysejí na misky (Donnini *et al.*, 2000).

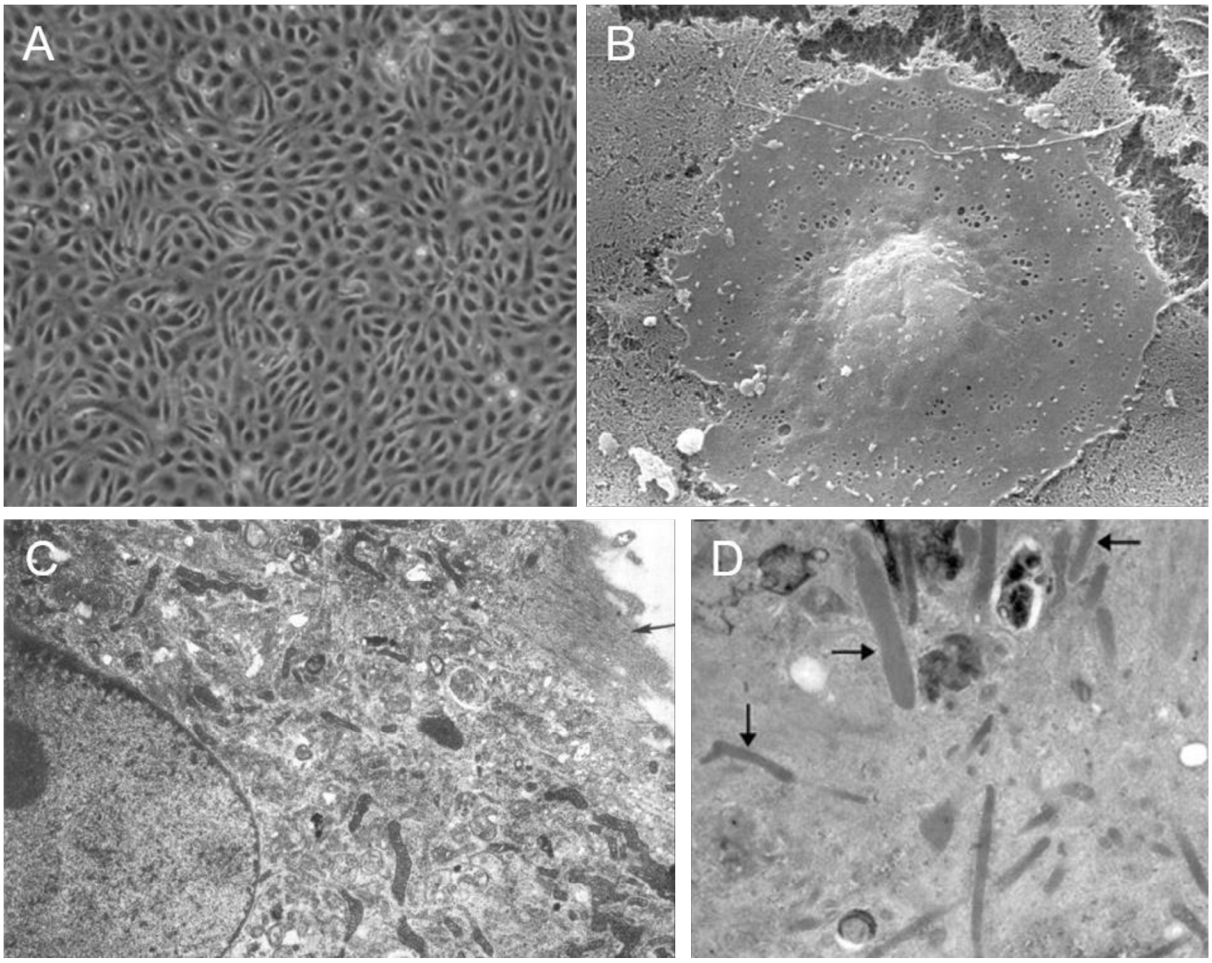
Pro izolaci endoteliálních buněk z mikrovaskulatury (typicky z dermis nebo tukové tkáně) je zapotřebí tkáň rozmělnit, často kombinací mechanických a enzymatických postupů, a následně separovat žádoucí buňky. K samotné separaci se používá fluorescenčního značení nebo navázání magnetických částic (Hewett, 2016; Jackson *et al.*, 1990; Mason *et al.*, 2007).

1.1.5. Identifikace

Nejjednodušší, ovšem zároveň nejméně účinnou metodou k identifikaci izolovaných buněk je zhodnocení morfologické. Endoteliální buňky tvoří *in vitro* souvislou monovrstvu s typickým vzhledem připomínajícím kočičí hlavy. Jednotlivé buňky jsou homogenní velikosti, polygonální, s centrálně uloženým jádrem a nejasně definovanými okraji (Obr. 5A) (Jaffe *et al.*, 1973).

Ve skenovacím elektronovém mikroskopu jsou buňky velké, ploché a s jasnými okraji a viditelnými interdigitacemi (Obr. 5B). Buňky mají na povrchu, zvláště v perinukleární oblasti, početné prohlubně a výstupky. Zobrazeny transmisním elektronovým mikroskopem mají endotelie velká množství cytoplasmatických vezikul, prominentní Golgiho aparát,

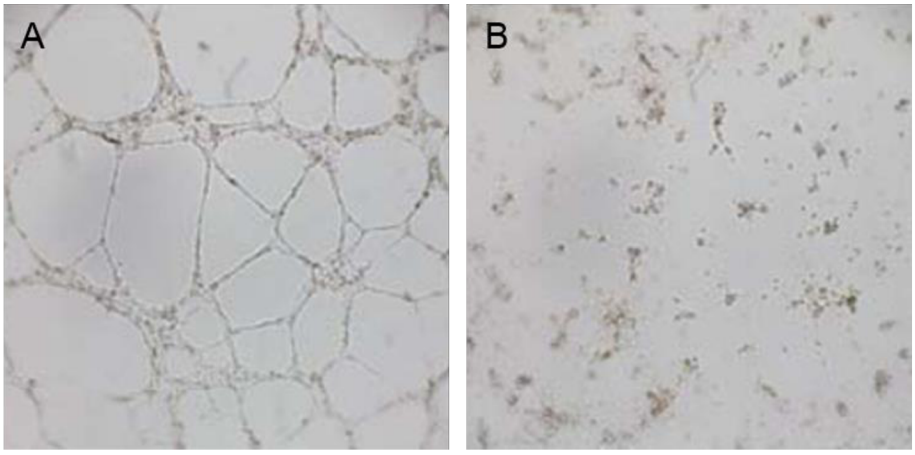
množství hrubého i hladkého endoplasmatického retikula, stejně tak shluky volných ribozomů. Cytoplasmu dále vyplňují jemná filamenta, mikrotubuly a mitochondrie (Obr. 5C). Pro identifikaci jsou zvláště významná oválná nebo tyčinkovitá Weibel-Paladeho granula, která se jinde než v endoteliích nenachází (Obr. 5D) (Jaffe *et al.*, 1973).



Obrázek č.5: Morfologie endoteliálních buněk. A – vzhled endoteliálních buněk pod světelným mikroskopem (http://cellsystems.de/cells-and-media/c/normal-human-umbilical-vein-endothelial-cells-huvec); B – endoteliální buňka v SEM. Centrálně umístěné jádro obklopené plochou cytoplasmou s viditelnými fenestracemi (Wisse *et al.*, 2010); C – endoteliální buňka v TEM. Četné nepravidelné mitochondrie, jemná filamenta těsně pod cytoplasmatickou membránou (šipka) (Jaffe *et al.*, 1973); D – četná Weibel-Paladeho granula uvnitř cytoplasmy (šipky) (Valentijn *et al.*, 2011).

Čistota kultury se určuje pomocí průtokové cytometrie. Standardně měřené markery jsou CD31, CD144, CD34, CD54, CD62E, CD106, von Willebrandův faktor. Toutéž metodou se detekuje také absorpce acetylovaného LDL (Ataollahi *et al.*, 2014; Baudin *et al.*, 2007). Kromě přítomnosti endoteliálních buněk je možné prokázat nepřítomnost buněčných kontaminant, např. α-aktin z hladkých svalů nebo desmin, protein intermediárních filament v pericytech (Hewett and Murray, 1993).

V endoteliálních buňkách je možné imunofluorescenčně barvit aktomycin. Endotelie exprimují krevní antigeny skupiny AB0, prokazatelné reakcí s rostlinnými lektiny. Dále je možné sledovat produkci prokoagulačních i antikoagulačních faktorů, např. tkáňový aktivátor plasminogenu (t-PA), inhibitor PA (PAI), produkci granulocytárního a makrofágového faktoru stimulujícího kolonie, vasodilatačních a vasokonstrikčních faktorů. Funkčním testem je trubičková esej (TFA) – tvorba kapilárám podobných struktur na vhodné extracelulární matrix (Obr. 6) (Donnini *et al.*, 2000).



Obrázek č.6: TFA. A – pozitivní výsledek TFA; B – negativní výsledek TFA (Tang *et al.*, 2009).

1.2. Kmenové buňky

Kmenové buňky jsou definovány dvěma základními vlastnostmi: schopností sebeobnovy a schopností liniově specifické diferenciace (Boiani and Schöler, 2005). Kmenových buněk je celá řada, rozeznáváme buňky totipotentní, pluripotentní, multipotentní a unipotentní.

Zygota a blastomery mají potenciál se proměnit ve veškeré embryonální i extraembryonální tkáně, jsou tedy totipotentní (Kelly, 1977). Skutečně pluripotentní (tj. schopné diferencovat do všech tří zárodečných listů a dát tak vzniknout všem buňkám daného jedince) kmenové buňky se *in vivo* nacházejí pouze v přechodném období vývoje ve stadiu blastocysty, přirozeně záhy diferencují. Pro jejich udržení *in vitro* je zapotřebí křehká rovnováha kultivačních podmínek.

Ve většině tkání a orgánů dospělého organismu se v klidovém stavu nacházejí adultní kmenové buňky. Dokáží diferencovat v omezené množství buněčných typů (unipotentní pouze v jeden jediný) a slouží jako zdroj buněk pro obnovu a správné fungování dané tkáně. Pro homeostázu jsou absolutně klíčové.

1.2.1. Historie výzkumu pluripotentních kmenových buněk

Ve výzkumu kmenových buněk bylo několik zásadních milníků. Prvním byly pokusy s teratomy z padesátých let (Stevens and Little, 1954). Teratomy v sobě mají mimo jiné nediferencované buňky, schopné diferencovat do buněk všech tří zárodečných listů a zároveň si zachovat svou vlastní nezralost – vlastnosti odpovídající buňkám časného embrya (Yu and Thomson, 2008). Tyto studie odhalily kultivační podmínky podporující setrvání buněk v nediferencovaném stavu, základní předpoklad pro kultivaci dalších kmenových buněk.

Embryonální kmenové buňky (ESC) jsou odvozeny z embryí ve stadiu blastocysty, kdy jsou již odlišeny buňky trofoblastu a vnitřní buněčné masy (ICM). ESC si zachovávají normální karyotyp a tvoří chiméry. Mezi izolací myších ESC (mESC) (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981) a lidských ESC (hESC) uběhlo 17 let. Po celou dobu se sice izolovat buňky z ICM lidských embryí dařilo, docházelo však pouze k jejich diferenciaci. K úspěšné dlouhodobé kultivaci hESC vedla až optimalizace kultivačních podmínek. mESC se kultivují v mediu s přídavkem leukemii inhibujícího faktoru (LIF), ovšem hESC klíčové komponenty signalizační dráhy LIF takřka neexprimují. Naopak je pro ně důležitá signalizace pomocí fibroblastového růstového faktoru (FGF) a transformujícího růstového faktoru (TGF)-β (Thomson *et al.*, 1998).

Naklonování ovce Dolly (Wilmut *et al.*, 1997) prokázalo, že je i u savců možná reprogramace somatické buňky do totipotentního stavu. Přenos jader somatických buněk je u vyšších primátů, tedy i člověka, technicky obtížný, málo účinný a eticky problematický postup.

První změnu somatické buňky v buňku kmenovou bez použití embryí popsali Takahashi a Yamanaka. Uměle navozenou expresí 4 transkripčních faktorů převedli fibroblasty do stavu připomínajícího ESC a nazvali je indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSCs) (Takahashi and Yamanaka, 2006).

1.2.2. Vlastnosti pluripotentních kmenových buněk

Pro existenci a zachování kmenovosti je zapotřebí celá řada faktorů, přicházejících jak z vnějšího prostředí, tak ze signalizačních drah uvnitř buněk. Kromě běžných signalizací (např. z extracelulární matrix, zprostředkované integriny) jsou známy exogenní faktory modulující pluripotenci *in vivo* i *in vitro*. Mezi ně patří ligandy, receptory a také inhibitory signálních drah FGF, TGF-β/kostního morfogenetického proteinu (BMP), Nodal a Wingless type (WNT) (Sato *et al.*, 2003).

Signalizace se v jádře zapojí do transkripční aktivace nebo inhibice genů udržujících pluripotenci. Dosud bylo identifikováno několik zásadních genů, ale ačkoli jsou pro pluripotenci nezbytné, žádný ji nedokáže sám o sobě udržet. Vede se polemika, zda takový gen, jakýsi klíčový regulátor, vůbec existuje (Boiani and Schöler, 2005).

Transkripční faktor Oct3/4 (alternativní názvy téhož genu jsou *Oct3* nebo *Pou5f1*) obsahuje homeodoménu, s jejíž pomocí se váže na DNA v místech specifické oktamerní sekvence a v závislosti na okolních sekvencích aktivuje či inaktivuje transkripci. Exprimován je již od časných embryonálních fází, ve stadiu blastocysty se vyskytuje pouze v buňkách ICM a v následném vývoji vymizí (Pesce and Schöler, 2001). Oct3/4 působí v součinnosti s dalšími faktory. Sox-2 patří do rodiny proteinů schopných ovlivňovat transkripci a architekturu chromatinu (Pevny and Lovell-Badge, 1997). Sox-2 s Oct3/4 tvoří heterodimer a společně se podílejí na aktivaci dalších faktorů přispívajících pluripotenci, např. FGF4 (Boyer *et al.*, 2005). Dalším homeodoménovým transkripčním faktorem je Nanog (pojmenovaný po Tír nan Og, zemi věčně mladých z keltské mytologie). Nanog se stará o udržení vysoké hladiny Oct3/4 (Hyslop *et al.*, 2005) a zároveň je zpětnovazebně kontrolován – v promotoru Nanogu se nachází enhancer pod kontrolou heterodimeru Oct3/4-Sox-2 (Kuroda *et al.*, 2005).

Oct3/4, Sox-2 a Nanog pracují velmi koordinovaně. Jejich exprese vede k udržení pluripotence, ale také určují, jaký bude další osud diferencujících buněk. Zcela zásadní roli mají totiž jejich poměrná množství. V nepřítomnosti Oct3/4 způsobí Nanog diferenciaci do trofoektodermu, za obrácené situace vzniká primitivní endoderm. V primitivním ektodermu jejich hladiny poklesají a umožňují tak další diferenciaci (Boiani and Schöler, 2005).

iPSCs odpovídají ESC svojí morfologií, podmínkami kultivace, povrchovými markery, expresí genů, in vitro diferencují do všech tří zárodečných listů a po injekci do imunokompromitovaných myší tvoří teratomy (Tabulka 1).

povrchové a jaderné antigeny	lidské pluripotentní kmenové buňky		lidské pluripotentní kmenové buňky
SSEA1	-	**Enzymatická aktivita**	
SSEA3/4	+	Alkalická fosfatáza	+
TRA1-60/81	+	Telomeráza	+
TRA2-54	+	**Růstové podmínky v kultuře**	
GCTM-2	+	závislost na LIF	-
TG343	+	FGF4	-
TG30	+	**Růstová charakteristika**	
CD9	+	Schopnost tvořit trofoblast	+
CD133	+	*In vivo* tvorba teratomů	+
OCT3/4	+	*In vitro* charakteristika	ploché, volně uspořádané agregáty
NANOG	+		
SOX2	+	tvorba EB	+

Tabulka č.1: Nejběžněji používané markery pluripotence (Boiani and Schöler, 2005)

1.2.3. Indukované pluripotentní kmenové buňky

iPSCs jsou buňky připravované z buněk somatických pomocí reprogramace. Reprogramací je míněno navození exogenní exprese faktorů pluripotence. Tento proces má extrémně malou účinnost (obvykle se pohybuje v rozmezí 0,01-0,1 %) a je také časově náročný, celý proces trvá až několik týdnů. Reprogramovat se dají různé buněčné typy, ovšem s různou účinností. Čím nezralejší, kmenovější buňka je, tím méně epigenetických změn je třeba k dosažení pluripotence (Eminli *et al.*, 2009; Hanna *et al.*, 2008).

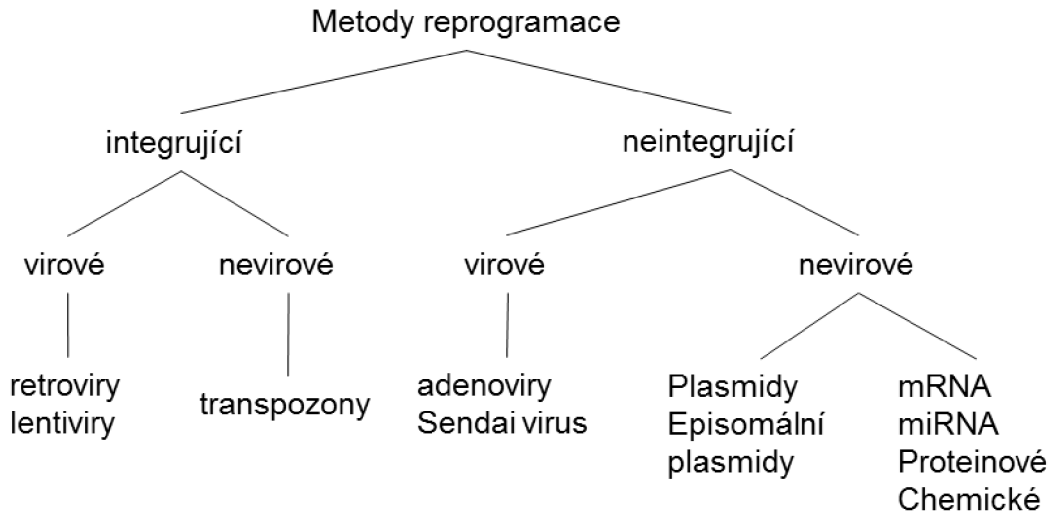
Studie provedené na myších fibroblastech ukázaly, že proces reprogramování obnáší definovanou sekvenci změn. Nejprve dochází ke ztrátě markerů původní somatické buňky a změně morfologie, podobně jako pro mezenchymálně epiteliální tranzici. Následně se objeví markery časné pluripotence (SSEA-1, alkalická fosfatáza…) a markery skutečné pluripotence – Oct3/4, Nanog – se exprimují až poté, co buňka není závislá na exogenních faktorech (Stadtfeld *et al.*, 2008a). Dokonce ani poté nemusí být reprogramace kompletní – iPSCs v časné a pozdní pasáži mají znatelné rozdíly v délkách telomer, stejně jako ve vzorcích metylace (Chin *et al.*, 2009; Marion *et al.*, 2009).

1.2.4. Reprogramační metody

První odvození linie myších iPSCs se podařilo díky ektopické expresi koktejlu 24 transkripčních faktorů – Ecat1, Dppa5, Fbxo15, Nanog, ERas, Dnmt31, Ecat8, Gdf3, Sox15, Dppa4, Dppa2, Fthl14, Sall4, Oct3/4, Sox2, Rex1, Utf1, Tcl1, Dppa3, Klf4, β katenin, c-Myc,

Stat3 a Grb2. Postupným vyřazováním byly určeny čtyři z nich, které postačovaly k reprogramaci – Oct3/4, Sox-2, Klf4 a c-Myc (Takahashi and Yamanaka, 2006). O rok později byla stejná kombinace využita i k reprogramaci lidských buněk (Takahashi *et al.*, 2007). Zároveň však byly lidské fibroblasty reprogramovány i jinými faktory – Oct3/4, Sox-2, Nanog a Lin28 (Yu *et al.*, 2007). Výsledky obou skupin naznačovaly, že Oct3/4 a Sox-2 jsou zásadní, a další jen umocňují jejich dopad a dají se alternovat.

Základní dělení vektorů (Obr. 7) je na integrující a neintegrující. Integrující mají vyšší úspěšnost reprogramace, ale zároveň se náhodně začleňují do DNA, často několikanásobně. Neintegrující jsou pro případné klinické využití vhodnější – nehrozí poškození genomu ani zbytková exprese z vektoru, která negativně ovlivňuje diferenciační potenciál (Simara *et al.*, 2013).



Obrázek č.7: Schematické zachycení reprogramačních metod

Prvním používaným integrujícím vektorem se staly retroviry. Metoda je limitována požadavkem aktivně se dělících buněk pro transdukci – nedělící se buňky, jako jsou neurony, jsou vůči retrovirové reprogramaci odolné (Takahashi *et al.*, 2007).

Lentivirové vektory, také integrující, jsou schopny infikovat dělící se i nedělící se buňky, a navíc mají vyšší klonovací kapacitu (Yu *et al.*, 2007).

Transpozony jsou nevirovou variantou integrujících vektorů. Dokáží zajistit dlouhodobou expresi nesených genů a následně se po přidání transpozázy vyštěpit. Transpozony jsou schopny vytvářet iPSCs se srovnatelnou účinností jako retroviry (Matteo *et al.*, 2012).

Z neintegrativních virů jsou pro reprogramaci vhodné adenoviry (Stadtfeld *et al.*, 2008b), které mají ovšem velmi nízkou účinnost, a Sendai viry (Nakanishi and Otsu, 2012).

Sendai je negativní RNA virus a replikuje se pouze v cytoplasmě, pro lidské buňky není patogenní. Nevýhodné jsou kvůli obtížné eliminaci z buněk.

Jako neintegrativní vektory se dají použít plasmidy (Okita *et al.*, 2008). Jde o jednoduchý postup, nevyžadující tvorbu virových částic, ale má i své nevýhody. Účinnost reprogramace za použití plasmidů je nižší než s použitím virů. Kromě toho je zapotřebí opakovaných cyklů transfekce, jelikož se plasmidy ztrácejí s každým dělením buněk. Problém slabé a krátké exprese nesených genů se dá řešit pomocí episomálních plasmidů, které jsou schopny se replikovat (Yu *et al.*, 2009).

Kromě exprese genů z klasických vektorů se zkoumají další přístupy, zahrnující RNA a malé molekuly. Účinnost takových reprogramačních strategií je zatím velmi malá.

1.2.5. Epigenetická paměť

Při srovnávání linií iPSCs s ESC, stejně jako při srovnávání jednotlivých linií iPSCs mezi sebou, byla pozorována heterogenita v transkripčních i epigentických profilech a odlišná schopnost diferencovat do různých zárodečných linií (Bar-Nur *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2010). Tento fenomén byl vysvětlován různě – také jako artefakt reprogramace (Lister *et al.*, 2011), odlišnostmi v kultivačních podmínkách (Newman and Cooper, 2010) a epigenetickou pamětí (Kim *et al.*, 2010; Lister *et al.*, 2011; Ohi *et al.*, 2011). Epigenetickou pamětí je popsán jev, kdy si buňky i přes úspěšnou reprogramaci uchovaly jistý otisk svého předchozího epigenetického stavu, což může mít závažný dopad na případné medicínské využití iPSCs. Pozitivní, pokud zdrojové buňky z určité tkáně dokáží přednostně podporovat fenotyp žádoucí, např. iPSCs z kožních buněk budou snadno diferencovat do kožních progenitorů. Negativem by naopak byla neschopnost snadné diferenciace do jiného buněčného typu, než byl původní zdrojový.

Ačkoli v této otázce doposud není dosaženo shody, novější výzkumy se přiklánějí k variantě, že pozorované rozdíly jsou z větší části způsobeny genetickým pozadím iPSCs, tedy variabilitou mezi dárci zdrojových buněk, a přestože jistý efekt zdrojové tkáně byl zaznamenán, jedná se spíše o minoritní jev (Kajiwara *et al.*, 2012; Kyttälä *et al.*, 2016; Rouhani *et al.*, 2014).

2. Cíle diplomové práce

1) Izolace endoteliálních buněk z *V. saphena magna*, založení primokultur.
2) Potvrzení endoteliálního charakteru získaných linií pomocí fenotypových znaků a funkčních testů. Sledování stability těchto markerů v průběhu kultivace až do dosažení senescence.
3) Reprogramace endoteliálních buněk na iPSCs s využitím episomálních vektorů.
4) Charakterizace odvozených iPSCs a ověření jejich pluripotence.

3. Materiály a metody

3.1. Biologický materiál

K izolaci endoteliálních buněk byly použity části *V. saphena magna*, získané na I. chirurgické klinice Fakultní nemocnice u sv. Anny při plánovaných operačních zákrocích. Všichni pacienti stvrdili svým podpisem informovaný souhlas o vědeckém využití odstraněných tkání.

Endoteliální linie nazvané HSVEC1 – HSVEC6 byly založeny z izolátů buněk z vén.

Linie iPCS byly odvozeny z HSVEC1 a HSVEC3, dále bylo pracováno s klony nazvanými EN G (vzniklé z linie HSVEC1) a C3 C (vzniklé z linie HSVEC3).

3.2. Buněčné kultury

3.2.1. Derivace primokultur

Protokol izolace vycházel z modifikovaných protokolů podle Ataollahi a Baudina (Ataollahi *et al.*, 2014; Baudin *et al.*, 2007).

Odběr cév probíhal ve Fakultní nemocnici standardním lékařským postupem pro operaci varixů. Finální postup zpracování cévy přímo na sále byl následující: odebraná část žíly o velikosti 2-5 centimetrů byla naplněna transportním mediem, na obou koncích pevně stažena nití a ponořena do zbytku media v transportní nádobě. Okamžitě byla převezena na pracoviště k dalšímu zpracování. Délka transportu nepřesáhla 60 minut.

Po vynětí z transportního roztoku byla céva opláchnuta PBS (Sigma). Nit byla šetrně odstraněna a céva důkladně prohlédnuta. Jakkoli poškozená tkáň byla odstřižena. Vnitřní část byla důkladně promyta PBS, dokud protékající tekutina nezůstávala čirá, bez zjevného zabarvení erytrocyty. Následně byla cévní stěna podélně rozstřihnuta. Lumen bylo pokryto 0,2% roztokem kolagenázy II (Gibco). Enzym působil 30 minut, v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5% CO_2.

Po inkubaci byla kolagenáza s uvolněnými buňkami opláchnuta kultivačním mediem EGM (Lonza). Suspenze buněk byla centrifugována při 200 g/pokojové teplotě (RT)/ 5 min. Pelet byl rozsuspendován v 1 ml EGM. Počet buněk a jejich viabilita byla zjištěna pomocí přístroje Countess (Invitrogen) po barvení 0,4% trypanovou modří (Invitrogen). Všechny získané buňky byly nasazeny na T25 Nunc Easy Flask (ThermoFisher Scientific) s povrchem

Nunclon delta. Následující den bylo medium vyměněno a poté každý druhý den až do dosažení cca 80% konfluence.

3.2.2. Kultivace linií

Před první pasáží byly buňky zhodnoceny pod světelným mikroskopem. Při výskytu izolovaných morfologicky odlišných kolonií byly tyto nežádoucí buňky mechanicky odstraněny, při rozsáhlejší kontaminaci byla použita magnetická imunoseparace (kapitola 3.3.4.).

Buňky byly pasážovány enzymaticky, kombinací trypsin-EDTA (TE) (Gibco) při 80-90% konfluenci. Nejprve byly dvakrát promyty PBS a následně překryty předehřátým TE. Inkubace probíhala za RT po dobu nutnou k uvolnění buněk od podkladu. Buňky byly sesbírány do pasážovacího media a centrifugovány (400 g/RT/3 min). Po rozsuspendování v 1 ml kultivačního media byly spočítány a nasazeny na Petriho misku o průměru 35 mm (PM35, ThermoFisher Scientific) potaženou želatinou (Sigma-Aldrich). Nasazeno bylo 3000 viabilních buněk/cm^2, u kultury ve vyšší pasáži s pomalejším růstem byl počet nasazovaných buněk navýšen na 5000 buněk/cm^2.

Při pasážování buněk primokultury a následných 2-3 pasáží byly nevyužité buňky zamraženy.

Kultivace probíhala tak dlouho, dokud kultura nedosáhla senescence. Pro každou z kultivovaných linií byl určen population doubling level (PDL), tedy kolikrát došlo ke zdvojnásobení počtu buněk, podle vzorce:

$$n = 3{,}32\ (\log n2 - \log n1) + X$$

(n = celkový PDL; n2 = počet sklizených buněk; n1 = počet nasazených buněk; X = PDL buněk z předchozí pasáže)

Po celou dobu kultivace probíhala fotodokumentace růstu a morfologie buněk fotoaparátem Olympus Camedia C – 5060 ADUS, v pravidelných intervalech byly ověřovány markery endoteliálnosti.

3.2.3. Příprava linií iPSCs

Reprogramace probíhala pomocí Epi5 Episomal iPSCs Reprogramming Kit (ThermoFisher Scientific), s použitím dodaných roztoků a podle doporučení výrobce.

Endoteliální buňky v nízké pasáži byly sklizeny a rozsuspendovány v Resuspension buffer na koncentraci 1x10^7 buněk/1ml. Z této suspenze bylo odebráno 10 µl do zkumavky,

kde bylo přidáno po 1 µl reprogramovacích vektorů (Oct3/4, Sox-2, Lin28, Klf4, L-Myc) a vektoru s p53+EBNA. K elektroporaci byl použit Neon Transfection System (ThermoFisher Scientific) při parametrech uvedených v tabulce 2.

Parametry elektroporace	
Napětí pulzu (V)	1 400
Délka pulzu (ms)	20
Počet pulzů	2
Koncentrace buněk (buněk/ml)	1 000 000
Objem suspenze (µl)	10

Tabulka č.2: Parametry elektroporace využité k reprogramaci endoteliálních buněk

Po dokončené elektroporaci byly buňky přeneseny na předem připravené misky potažené Matrigelem (Corning) s mediem EGM. Medium bylo vyměňováno každý den.

Šestý den po elektroporaci bylo EGM zaměněno za mTeSR (StemCell) a poté denně vyměňováno po dobu 4 týdnů. Kolonie reprogramovaných buněk byly pasážovány mechanicky – jehlou při sledování preparačním mikroskopem – pro odlišení jednotlivých klonů, v další kultivaci enzymaticky. Jednu hodinu před pasážováním byl do media přidán ROCK inhibitor (StemCell) v ředění 1:1000. Kolonie iPSCs byly dvakrát promyty EDTA (Invitrogen). Další EDTA byly převrstveny a přemístěny do inkubátoru. Inkubace probíhala tak dlouho, než se buňky při krajích kolonií začaly uvolňovat. EDTA byla odsáta a kolonie s použitím mTeSRu odděleny od podkladu. Buňky byly nasazeny na novou misku obvykle v poměru 1:20.

Účinnost reprogramace v procentech byla spočítána jako:

$$\frac{počet\ klonů\ iPSC}{počet\ původních\ buněk} \cdot 100$$

3.3. Metody

3.3.1. Průtoková cytometrie

Pro analýzu exprese povrchových markerů byla využita průtoková cytometrie. Sklizené endoteliální buňky byly promyty PBS a centrifugovány (400 g/RT/3 min), iPSCs byly nejprve sklizeny pomocí EDTA, suspenze byla centrifugována (300 g/RT/4 min) a pelet rozsuspendován v 1 ml TrypLe (Gibco). Po pětiminutové inkubaci byl TrypLe inaktivován přidáním 10 ml PBS a suspenze znovu centrifugována. Pelet byl rozsuspendován v chlazeném barvícím pufru PBS/BSA/EDTA a rozdělen po 100 µl do cytometrických zkumavek.

Do každé zkumavky byla přidána protilátka v příslušném ředění (Tabulka č. 3, 4). Jedna zkumavka byla ponechána bez barvení jako kontrola. Inkubovalo se 15 minut ve tmě při 4 °C. Do všech zkumavek byl přidán 1 ml chlazeného PBS a následně byly centrifugovány (300 g/4 °C/4 min). Supernatant byl opatrně odstraněn a pelet rozsuspendován v 300 µl chlazeného PBS.

Analýza vzorků probíhala na přístroji BD FACS CantoII (BD Biosciences) softwarem BD FACSDiva (BD Biosciences) a Flowing Software (Turku Centre for Biotechnology).

marker	ředění	fluorochrom	výrobce
CD31	5:100	APC	Miltenyi Biotec
CD34	5:100	PE	Miltenyi Biotec
CD144	5:100	PE	Miltenyi Biotec
CD309	5:100	PE	Miltenyi Biotec

Tabulka č.3: Protilátky pro analýzu markerů endoteliálních buněk

marker	ředění	fluorochrom	výrobce
SSEA-4	4:100	PE	R&D Systems
Tra-1-60	4:100	PE	Miltenyi Biotec
Tra-1-81	4:100	PE	Miltenyi Biotec

Tabulka č.4: Protilátky pro analýzu markerů iPSCs

3.3.2. LDL assay

Buňky byly nasazeny na 12 jamkovou destičku. Po dosažení optimální konfluence jim bylo přidáno medium s DiI-Ac-LDL (Alpha Diagnostics) o koncentraci 50 µl/ml. Po čtyřhodinové inkubaci ve 37 °C byly buňky sklizeny pomocí TE, centrifugovány (300 g/RT/4 min), promyty v PBS a znovu centrifugovány. Pelet obarvených buněk byl rozsuspendován v 300 µl chlazeného PBS a analyzován na průtokovém cytometru.

3.3.3. Trubičková assay

Do jamek 96 jamkové destičky bylo chlazenými špičkami opatrně naneseno 10 µl Geltrexu (ThermoFisher Scientific) tak, aby se předešlo vzniku vzduchových bublin. Po 30min inkubaci v 37 °C byl ztuhlý Geltrex převrstven 50 µl buněčné suspenze. Od každé linie bylo použito 3000, 5000 a 7000 buněk na jamku. Destička byla inkubována ve vlhké komůrce při 37 °C. TFA bylo možno vyhodnocovat po 6 hodinách nebo na druhý den.

3.3.4. Magnetická imunoseparace

Sklizené buňky byly po centrifugaci rozsuspendovány v 60 µl pufru PBS/BSA/EDTA, 20 µl FcR Blocking Reagent (Miltenyi Biotec) a 20 µl CD31 MicroBeads (Miltenyi Biotec). Po 15 min inkubace při 4 °C byly buňky znovu centrifugovány a resuspendovány v 0,5 ml pufru.

Separační kolonka byla umístěna do magnetického pole v MidiMACS Separátoru a promyta 0,5 ml pufru. Buněčná suspenze byla nanesena na kolonku a 3x promyta 0,5 ml pufru. Kolonka s navázanými buňkami byla odebrána z magnetického pole a umístěna nad sběrnou zkumavku. Na kolonku byl nanesen 1 ml pufru a celý objem byl okamžitě protlačen pístem. Sesbírané buňky byly centrifugovány, rozsuspendovány v kultivačním mediu, spočítány a nasazeny pro další kultivaci.

3.3.5. Doubling time

V páté pasáži byly endoteliální buňky nasazeny na želatinou potažené jamky a sklízeny první, třetí, pátý a sedmý den, pro každý den byly buňky nasazeny v triplikátu. Z průměrných počtů sklizených buněk byla v programu MS Excel vytvořena růstová křivka. Z časového úseku, ve kterém se buňky nacházely v exponenciální fázi růstu, byl vypočítán doubling time (průměrná doba, za jakou se buňky jedenkrát rozdělí) a směrodatná odchylka podle vzorce:

$$DT = \frac{t \cdot \log 2}{\log n2 - \log n1}$$

(DT = doubling time; t = délka kultivace v hodinách; n2 = výsledný počet buněk; n1 = vstupní počet buněk)

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}(DT_i - \overline{DT})^2}$$

(σ = směrodatná odchylka; N = počet hodnot; $\overline{DT}$ = průměrná hodnota doubling time; DT_i = hodnota DT o pořadí i)

$$V = \frac{\sigma}{\overline{DT}} \cdot 100$$

(V = relativní směrodatná odchylka; σ = směrodatná odchylka; $\overline{DT}$ = průměrná hodnota doubling time)

3.3.6. Testované povrchy

Endoteliální buňky byly v triplikátech nasazeny na čtyři různé povrchy – želatina, kolagen, fibronectin (Sigma-Aldrich) a Nunclon delta – a sklízeny první, třetí, pátý a sedmý den. Pro každý povrch byla vytvořena růstová křivka a vypočítán doubling time, jako v části 3.3.5.

3.3.7. Spontánní diferenciace iPSCs

Pro ověření spontánní diferenciace iPSCs byla použita tvorba embryoidních tělísek (EB). iPSCs, po hodinové inkubaci s ROCK inhibitorem, byly sklizeny pomocí EDTA. Sklizené buňky byly centrifugovány (300 g /4 min/ RT) a rozsuspendovány v mediu BPEL. Tvorba EB probíhala v 96 jamkové destičce s kulatým dnem a nízkopřilnavým povrchem. Okrajové jamky byly naplněny 150 µl sterilní vody pro udržení optimální vlhkosti. Do vnitřních jamek bylo napipetováno 100 µl buněčné suspenze tak, aby na každou jamku vyšlo 5000–10000 buněk. Destičky byly po dobu sedmi dní v inkubátoru při teplotě 37 °C, přičemž v průběhu inkubace jim bylo dvakrát vyměněno medium.

Po týdnu byla vytvořená EB přenesena do 4 jamkových destiček, na krycí sklíčka (Thermo Scientific) potažená Matrigelem. EB byla přesouvána pipetou s ustřiženou špičkou na jedno sklíčko 3-4 EB. Další týden byly inkubovány, aby se EB přichytila k povrchu a proliferující buňky porostly sklíčko.

Po 14 dnech od založení EB byly získané buňky fixovány – studeným 4% paraformaldehydem (Sigma-Aldrich), po dobu 20 minut. Po promytí (3x, 5 min, 700 µl PBS) byly jamky překryty 500 µl 0,2% Tritonu X (Sigma-Aldrich), který po třicetiminutové inkubaci za RT zajistil dostatečnou permeabilizaci. Po promytí (3x, 5 min, 700 µl PBST (Sigma-Aldrich)) byly buňky inkubovány jednu hodinu při RT s blokovacím pufrem.

Z blokovacího pufru byla sklíčka přenesena do primární protilátky. Ta byla předem připravena – do skleněných Petriho misek byl vložen navlhčený filtrační papír, na něj umístěny čtverce parafilmu a na každý parafilm bylo pipetou naneseno 50 µl roztoku protilátek ředěných v blokovacím pufru, u kontrol pouze 50 µl blokovacího pufru. Použité protilátky jsou uvedeny v tabulce 5. Petriho miska byla umístěna do vlhké komůrky a buňky přes noc inkubovány s protilátkami.

Primární protilátky	Ředění	Druh	Výrobce	Zárodečný list
α-Aktin	1:200	myš	SantaCruz Biotechnologies	Mezoderm
Brachyury	1:200	králík	SantaCruz Biotechnologies	Mezoderm
FoxA2	1:100	koza	R&D Systems	Endoderm
Sox17	1:50	myš	R&D Systems	Endoderm
Otx2	1:200	myš	SantaCruz Biotechnologies	Ektoderm
β3-Tubulin	1:200	myš	SantaCruz Biotechnologies	Ektoderm

Tabulka č.5: Primární protilátky pro imunohistochemické barvení spontánní diferenciace

Druhý den byla sklíčka promyta (3x, 5min, 700 µl PBST) a přenesena do 50 µl ředěné sekundární protilátky (Tabulka 6). Od tohoto okamžiku se pracovalo výlučně v šeru. Po dvouhodinové inkubaci byla sklíčka promyta (2x, 5 min, 700 µl PBST), inkubována 10 minut při RT s 300 µl DAPI a znovu promyta (2x, 5 min, 700 µl PBST). Na podložní sklíčka bylo pipetou naneseno 15 µl Moviolu. Krycí sklíčka, buňkami dolů, byla jemně přitisknuta do Moviolu. Po dvou až třech hodinách bylo možné buňky snímat fluorescenčním mikroskopem Zeiss Axiovert 200M (Carl Zeiss) s použitím CoolSNAP HQ2 CCD kamery (Photometrics) a softwaru Acquiarium (CBIA, FI, MUNI).

Sekundární protilátky	Ředění	Druh	Fluorochrom	Výrobce
Anti-mouse	1:500	Koza	Alexa 488	Invitrogen
Anti-rabbit F(ab)2	1:500		Alexa 555	Cell Signalling
Anti-goat	1:200	Osel	NL 557	R&D Systems

Tabulka č.6: Sekundární protilátky pro imunohistochemické barvení spontánní diferenciace

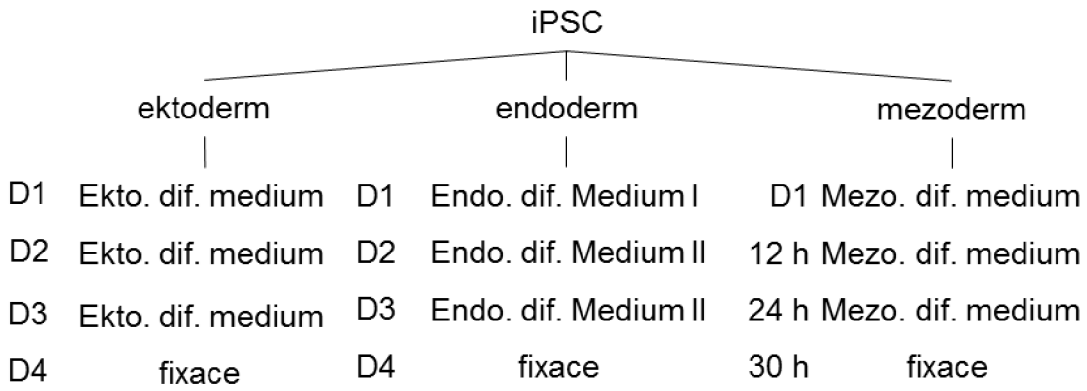
3.3.8. Řízená diferenciace do tří zárodečných listů

Pro tento experiment byla využita komerční sada „Human Pluripotent Stem Cell Functional Identification Kit“ od výrobce R&D Systems. Postupovalo se podle pokynů výrobce.

Buňky byly nasazeny na krycí sklíčka ve 4 jamkové destičce. Pro každou linii bylo zapotřebí 6 sklíček – pro každý zárodečný list i nediferencovaná kontrola. Do dosažení 50% konfluence byly buňky pěstovány v mediu mTeSR. Diferenciační media byla připravena z bazálního diferenciačního media (Tabulka 7) s příslušným doplňkem v 500násobném ředění. Media se měnila podle schématu na obrázku 8, v objemu 0,5 ml. Zároveň s výměnou diferenciačních medií se měnil i mTeSR u nediferencovaných kontrol.

Bazální medium	50 ml
50x Bazální medium	1 ml
RPMI	49 ml
Pen/Strep	250 µl
Glutamin	500 µl

Tabulka č. 7: Složení bazálního media pro diferenciaci



Obrázek č.8: Schéma výměn diferenciačních medií

Barvilo se dle standardního protokolu pro barvení buněk na sklíčkách (kapitola 3.3.7.), použité protilátky jsou shrnuty v tabulce 8, pro barvení jader bylo použito DAPI. Snímalo se na mikroskopu Zeiss Axiovert 200M s použitím CoolSNAP HQ2 CCD kamery a softwaru Acquiarium.

Primární protilátka	Zárodečný list	Ředění	Druh	Výrobce
Otx2	ektoderm	1:10	koza	R&D Systems
Brachyury	mezoderm	1:10	koza	R&D Systems
Sox17	endoderm	1:10	koza	R&D Systems
Sekundární protilátka	**Fluorochrom**	**Ředění**	**Druh**	**Výrobce**
anti-goat	NorthernLights 557	1:200	osel	R&D Systems

Tabulka č. 8: Použité primární a sekundární protilátky

3.3.9. Imunocytochemie

Buňky byly nasazeny na 4 jamkovou destičku, tři až pět dní před barvením. Pro toto měření bylo zapotřebí 6 jamek – 4 antigeny (Tabulka 9) a 2 negativní kontroly pro barvení sekundární protilátkou.

Po dosažení optimální velikosti kolonií bylo odsáto medium a buňky promyty 700 µl PBS. Pro fixaci bylo použito 350 µl studeného 4% paraformaldehydu po dobu 15 minut při RT. Permeabilizace a blokování probíhalo stejně jako při barvení buněk na sklíčkách (kapitola 3.3.7.), nicméně pro barvení protilátkami byl použit jiný postup.

Blokovací pufr byl odstraněn a místo něj bylo do jamek přidáno 350 µl roztoku primární protilátky ředěné v blokovacím pufru, ke kontrolám pouze čistý blokovací pufr. Použité protilátky jsou uvedeny v tabulce 3. Destičky byly zalepeny parafilmem a inkubovány přes noc při 4 °C.

Primární protilátka	Ředění	Druh	Výrobce
Oct3/4	1:200	Myš	Santa Cruz
Nanog	1:200	Králík	Cell Signalling
Sox-2	1:33	Myš	R&D Systems
SSEA4	1:400	Myš	R&D Systems

Tabulka č. 9: Primární protilátky použité při imunocytochemickém barvení

Druhý den byly buňky promyty (3x, 5min, 700 µl PBST) a překryty 400 µl ředěné sekundární protilátky (Tabulka 10). Od tohoto okamžiku se pracovalo výlučně v šeru. Po dvouhodinové inkubaci destičky promyty (2x, 5 min, 700 µl PBST), inkubovány 10 minut při RT s 300 µl DAPI a znovu promyty (2x, 5 min, 700 µl PBST). Snímalo se fluorescenčním mikroskopem Zeiss Axiovert 200M s použitím CoolSNAP HQ2 CCD kamery a softwaru Acquiarium.

Sekundární protilátka	Ředění	Druh	Fluorochrom	Výrobce
Anti-mouse	1:400	Koza	Alexa 488	Invitrogen
Anti-rabbit F(ab)$_2$	1:400		Alexa 488	Cell Signalling

Tabulka č. 10: Sekundární protilátky použité při imunohistochemickém barvení

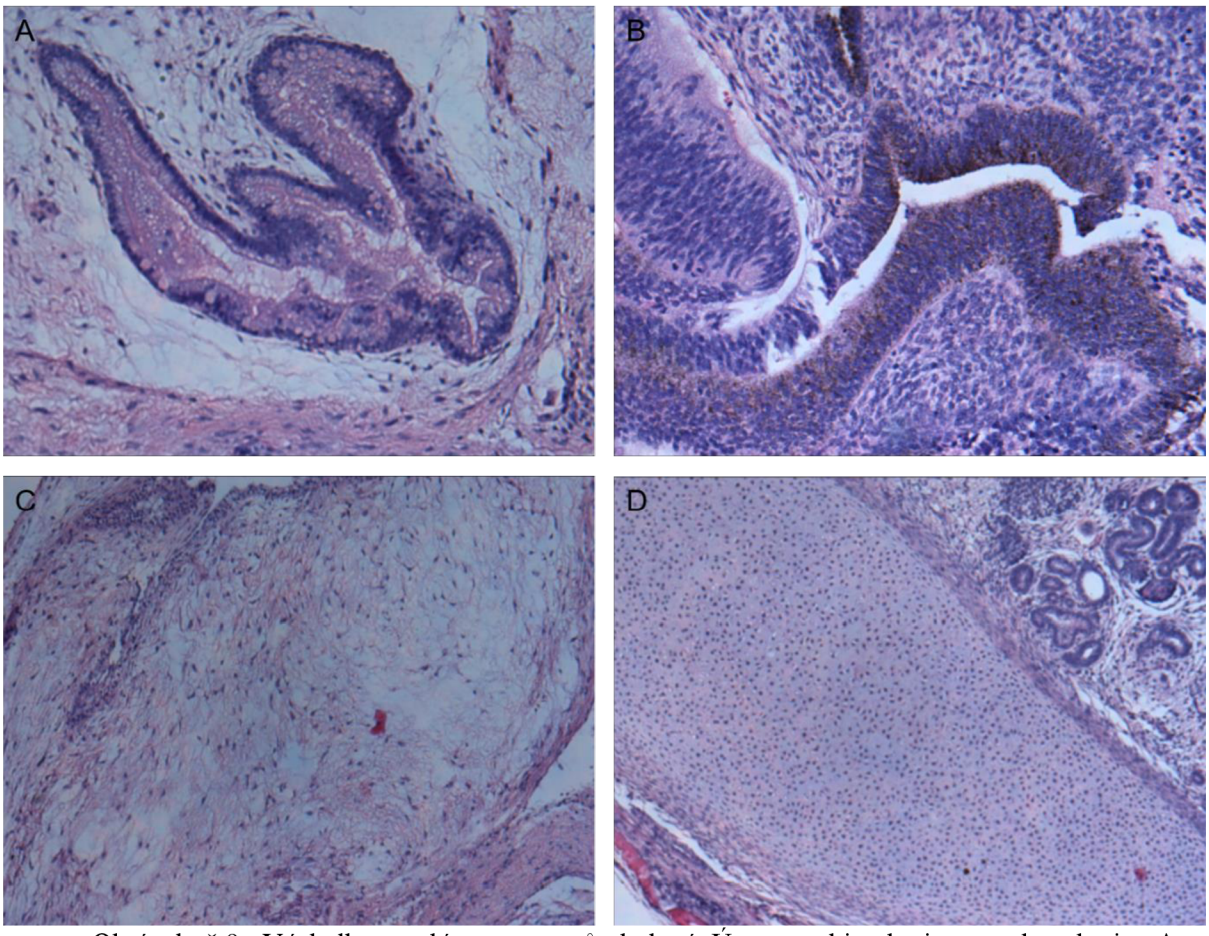
3.3.10. *In vivo* tvorba teratomů

Pro otestování schopnosti iPSCs tvořit *in vivo* teratomy byla použita modifikovaná metoda dle Zhang (Zhang *et al.*, 2012).

iPSCs byly pěstovány na Petriho misce o průměru 60 mm potažené Matrigelem. Buňky se nechaly narůst do vysoké konfluence. V den sklízení byl k buňkám přidán ROCK inhibitor a po hodině byly sklizeny enzymaticky, EDTA. mTeSRem se oddělily shluky buněk od povrchu. Sklizené buňky byly centrifugovány (300 g/4 min/4 °C), rozsuspendovány v 5 ml chlazeného PBS a znovu centrifugovány. Pelet byl rozsuspendován ve 40 µl chlazeného PBS a suspenze přenesena do 1,5ml zkumavky. Bylo přidáno 40 µl Matrigelu a po jemném promíchání pipetou byla zkumavka umístěna do ledu. Takto připravená suspenze iPSCs v Matrigelu byla co nejrychleji transportována do zvěřince a intramuskulárně injikována do imunokompromitovaných myší.

Po osmi týdnech byly myši usmrceny. V místě vzniklého teratomu byla nastřižena kůže a samotný teratom opatrně vypreparován.

Analýza tkáně, potvrzující přítomnost všech tří zárodečných listů, byla provedena na Ústavu histologie a embryologie (Obr. 9).



Obrázek č.9: Výsledky analýzy teratomů dodané Ústavem histologie a embryologie. A – žlázový epitel – entoderm; B – pigmentový epitel neuroektodermového původu; C – mezoderm; D – chrupavka, mezonefrické tubuly a sběrací kanálky – mezoderm.

3.4. Použité roztoky a media

3.4.1. Transportní medium

Pro transport odebrané žíly z pracoviště FNUSA do laboratoře bylo použito Dulbeccovo modifikované Eaglovo medium (DMEM) se sníženým obsahem glukózy, se složením podle tabulky 11. Po rozpuštění práškových složek bylo mediu upraveno pH na 7,4. Před použitím bylo filtrováno přes membránu s prostupností 0,2 µm.

Transportní medium	Výrobce	1 l
DMEM-LG	Sigma-Aldrich	10 g
$NaHCO_3$	Sigma-Aldrich	3,7 g

Tabulka č. 11: Složení transportního media

3.4.2. EGM

Na kultivaci endoteliálních buněk bylo použito medium EGM-2 (Lonza) se složením uvedeným v tabulce 12.

EGM-2	Výrobce	
EBM	Lonza	dle výrobce
EGF	Lonza	dle výrobce
VEGF	Lonza	dle výrobce
IGF	Lonza	dle výrobce
Kyselina askorbová	Lonza	dle výrobce
Hydrocortizon	Lonza	dle výrobce
FGF-b	Lonza	dle výrobce
Heparin	Lonza	dle výrobce
FBS	Sigma-Aldrich	10%
ZellShield	Minerva Biolabs	1%

Tabulka č. 12: Složení kultivačního media EGM-2

3.4.3. Pasážovací medium

Pro inaktivaci TE během pasážování bylo použito bazální endoteliální medium bez přidaných cytokinů, se složením dle tabulky 13.

	Výrobce	
EBM	Lonza	89%
FBS	Sigma-Aldrich	10%
ZellShield	Minerva Biolabs	1%

Tabulka č. 13: Složení pasážovacího media

3.4.4. mTeSR

Medium bylo připraveno podle pokynů výrobce, poměry jednotlivých složek jsou uvedeny v tabulce 14.

mTeSR	Výrobce	
mTeSR basal	StemCell	89%
mTeSR supplement	StemCell	10%
ZellShield	StemCell	1%

Tabulka č. 14: Složení media mTeSR

3.4.5. BPEL

V prvním kroku byl připraven PVA mix, následně se smíchaly všechny ostatní složky (Tabulka 15), ke kterým se nakonec přidal i PVA mix.

PVA mix	Výrobce	Na 100 ml BPEL
IMDM	Gibco	10 ml
Ham F-12	Gibco	10 ml
5% PVA	Sigma-Aldrich	5 ml
SynteChol (500x)	Sigma-Aldrich	0,2 ml
Kyselina linoleová (10000x)	Sigma-Aldrich	10 µl
Kyselina linolenová (10000x)	Sigma-Aldrich	10 µl

BPEL medium	Výrobce	100 ml
PVA mix		
IMDM	Gibco	33 ml
Ham F-12	Gibco	33 ml
35% BSA	Sigma-Aldrich	0,71 ml
kyselina L-askorbová (30mg/ml)	Sigma-Aldrich	167 µl
α-monothioglycerol	Sigma-Aldrich	0,3 ml
L-Glutamin	Gibco	1 ml
ZellShield	Minerva Biolabs	1 ml
PFHM	Gibco	5 ml
ITS (100x)	Gibco	1 ml

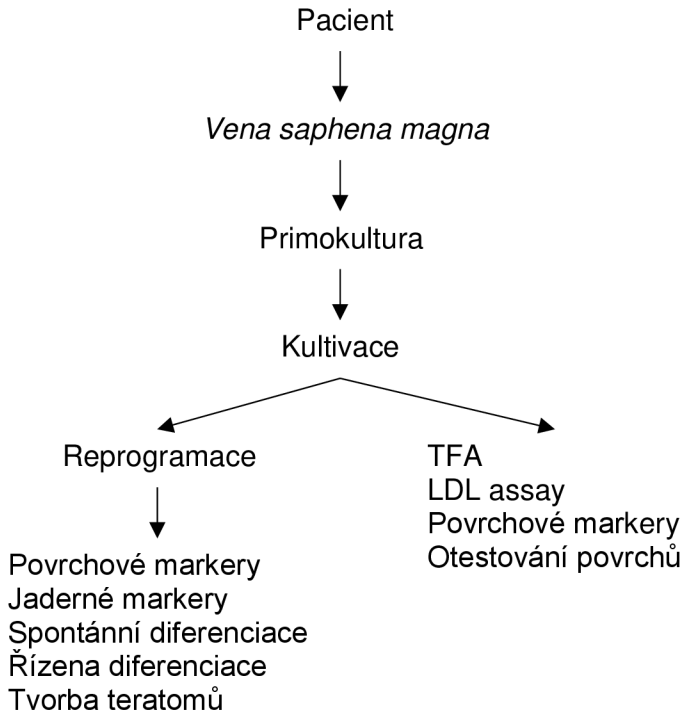
Tabulka č. 15: Složení PVA mixu a BPEL media

3.4.6. Roztoky

- **PBS** – naředěno z 10xPBS (Sigma-Aldrich), sterilizováno v autoklávu.
- **Barvící pufr PBS/BSA/EDTA** –1x PBS (Sigma Aldrich), 2 mM EDTA (Invitrogen), 0,5 % BSA (Sigma-Aldrich).
- **Kolagenáza II** – 0,3 % kolagenáza II z Clostridium histolyticum (Gibco) v Hanksově bazálním mediu.

- **5% PVA** – 2 g PVA byly přidány do MiliQ vody. Přes noc byl roztok nechaný ve 4 °C. Druhý den byl umístěn na 4-8 hodin do vodní lázně, 37°C. Do dalšího dne nebo do úplného rozpuštění PVA byl roztok inkubován ve 4 °C.
- **PBST** – 0,1 % TWEEN (Sigma-Aldrich) v 1xPBS.
- **Triton X** – 0,2 % Tritonu X v PBST.
- **Blokovací pufr** – 2,5% BSA (Sigma-Aldrich) v PBST.
- **TE** – 10xTE naředěno 1xPBS a filtrováno.
- **EDTA** – 0,1µM roztok EDTA (Gibco) v 1xPBS na.

3.5. Schéma experimentu



4. Výsledky

4.1. Derivace primárních endoteliálních kultur

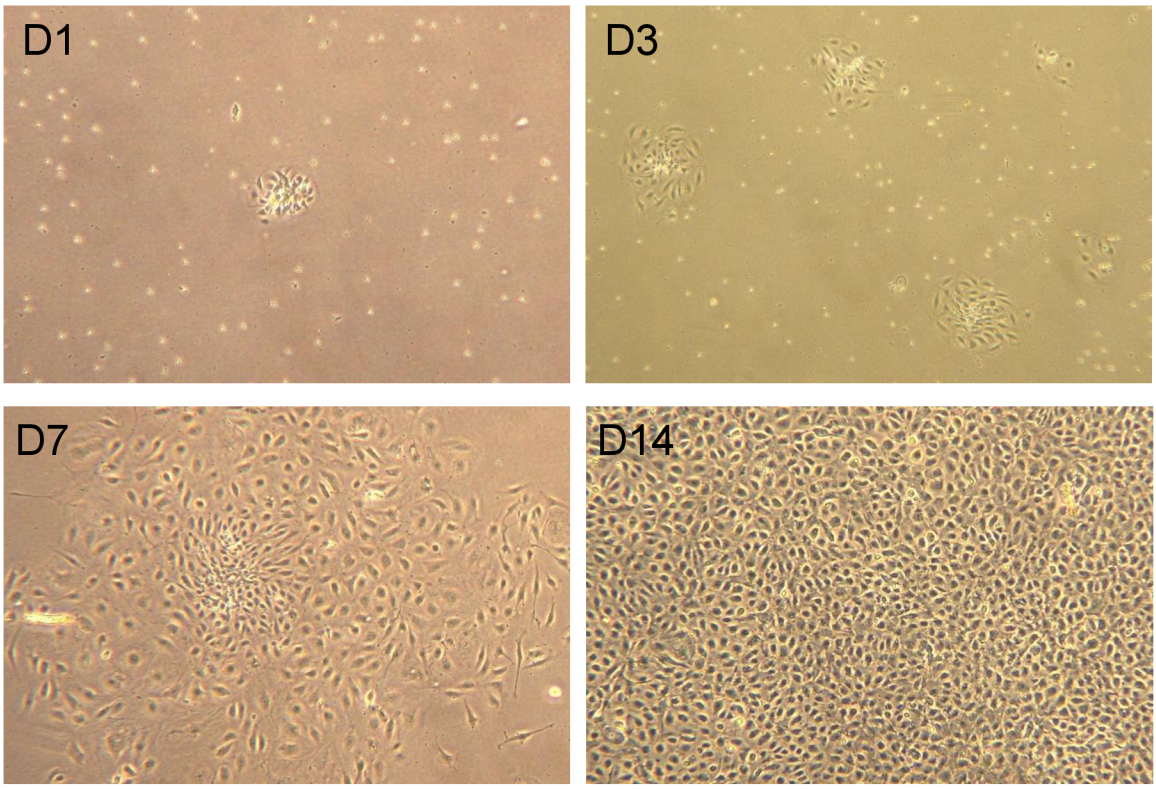
Podařilo se izolovat endoteliální buňky z 6 vén (vena safena magna), linie byly nazvány HSVEC1 – HSVEC6 (Human Saphenous Vein Endotelial Cells). Z prvního pokusu, nazvaného HSVEC0, se žádné buňky získat nepodařilo. Tato véna saféna byla při operativním zákroku otočena naruby, což poškodilo lumen cévy. Na základě tohoto zjištění byl změněn standardní operační postup, popsaný v kapitole 3.2.1.

Izolace HSVEC1 byla nejúspěšnější. Véna saféna o délce cca 5 cm byla pevná a pružná, po rozstřižení a překrytí kolagenázou se sama uzavírala. Po odmytí bylo medium zakalené uvolněnými buňkami. Další izolace měly nižší úspěšnost (tabulka č. 16), cévy byly o délce cca 2 cm, s viditelnými krevními sraženinami a málo pružnou cévní stěnou.

Linie	Celkový počet buněk	Počet viabilních buněk	Viabilní buňky na cm vény
HSVEC1	10 000 000	710 000	142 000
HSVEC2	390 000	23 400	11 700
HSVEC3	340 000	26 500	13 250
HSVEC4	560 000	16 800	8 400
HSVEC5	80 000	10 400	6 950
HSVEC6	72 500	7 250	4 850

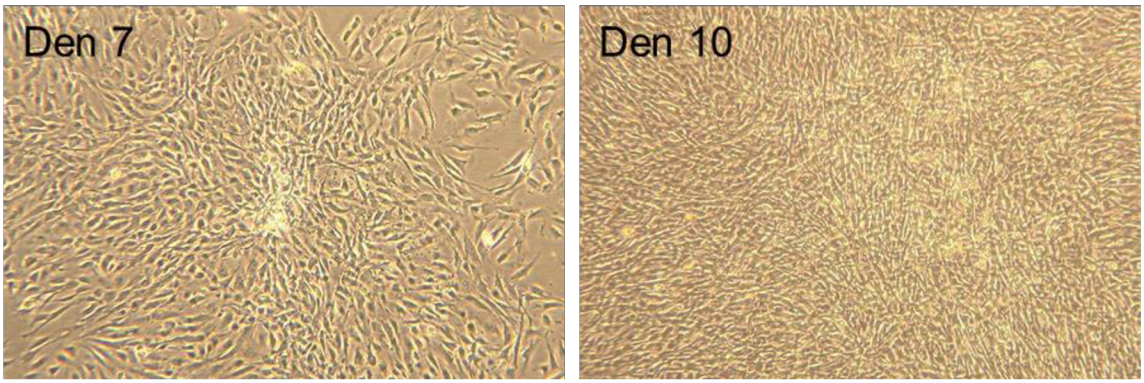
Tabulka č. 16: Počty buněk získané při jednotlivých izolacích. Celkový počet buněk je silně zkreslen přítomností erytrocytů. Počet buněk na cm vény je přibližný, samotné cévy nebyly přesně změřeny.

V prvních dnech po izolaci byly k vidění jednotlivé izolované buňky a jejich shluky rozrůstající se do drobných kolonií. Buňky měly zprvu nejasnou morfologii a až po dosažení vyšší konfluence nabývaly typických tvarů (Obr. 10). Erytrocyty, které se při izolaci nepodařilo odstranit, se přichytily k povrchu kultivačních nádob a v průběhu několika dní samovolně vymizely. Délka kultivace primární kultury se lišila, od deseti po sedmnáct dní.



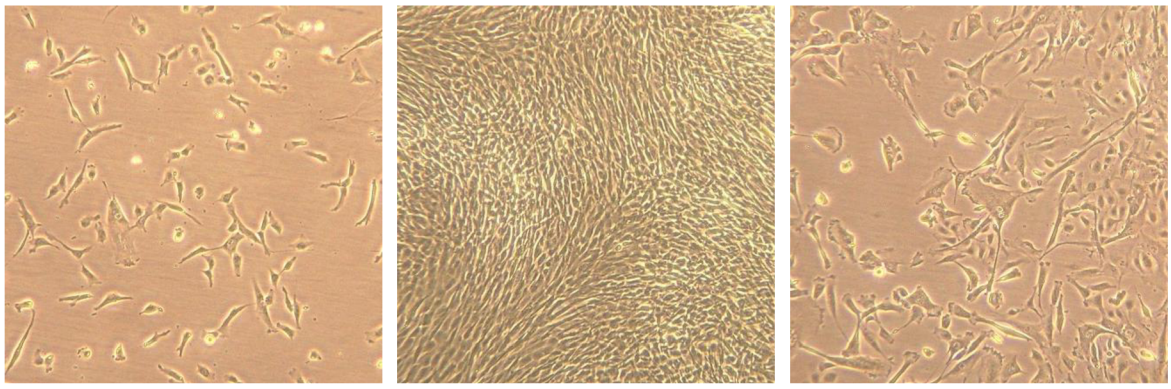
Obrázek č.10: Linie HSVEC6 v 0.p. Zvětšeno 40x.

Při izolaci linie HSVEC3 se objevila kolonie buněk odlišné morfologie, připomínající fibroblasty – úzké a protáhlé, se zřetelnými okraji a rostoucí v překrývajících se vrstvách (Obr. 11). Tato kolonie byla mechanicky odstraněna, zbylé endoteliální buňky zpasážovány enzymaticky.



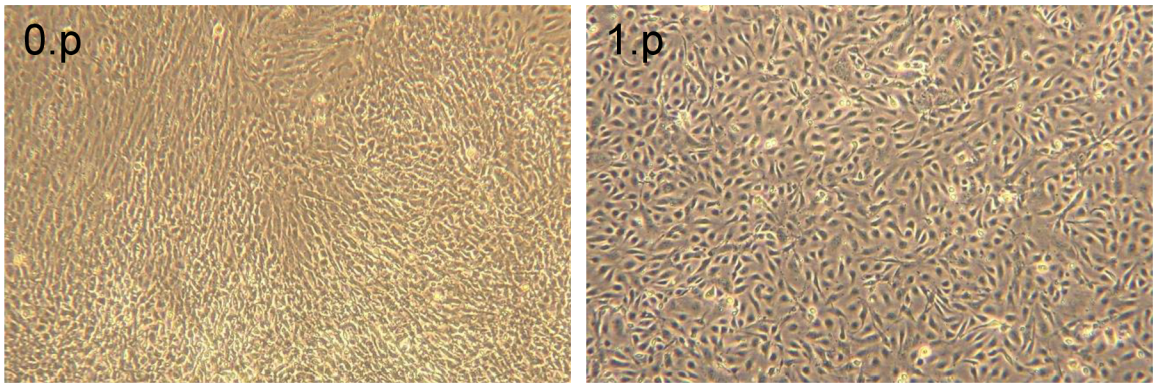
Obrázek č.11: Linie HSVEC3 v 0.p. Kolonie buněk odlišné morfologie. Zvětšeno 40x.

U linie HSVEC4 byla primokultura silně kontaminována jinými buněčnými typy (Obr. 12). Kolonie buněk endoteliální morfologie byly místy promíseny nejen s buňkami podobnými fibroblastům, ale také roztroušenými buňkami, které k sobě těsně nepřiléhaly, byly protažené a u konců často rozšířené (svým tvarem odpovídaly SMC). Nežádoucí buňky nebylo možné mechanicky odstranit. Endoteliální kolonie byly pečlivě vybrány a mechanicky pasážovány.



Obrázek č.12: Linie HSVEC4 v 0.p. Buňky odlišných morfologií. Zvětšeno 40x.

U primokultury HSVEC5 byla mechanicky odstraněna kolonie fibroblastových buněk. V první pasáži byla pozorována difúzní kontaminace (Obr. 13), potvrzená i průtokovou cytometrií. Pro separaci byl použit povrchový marker CD31.

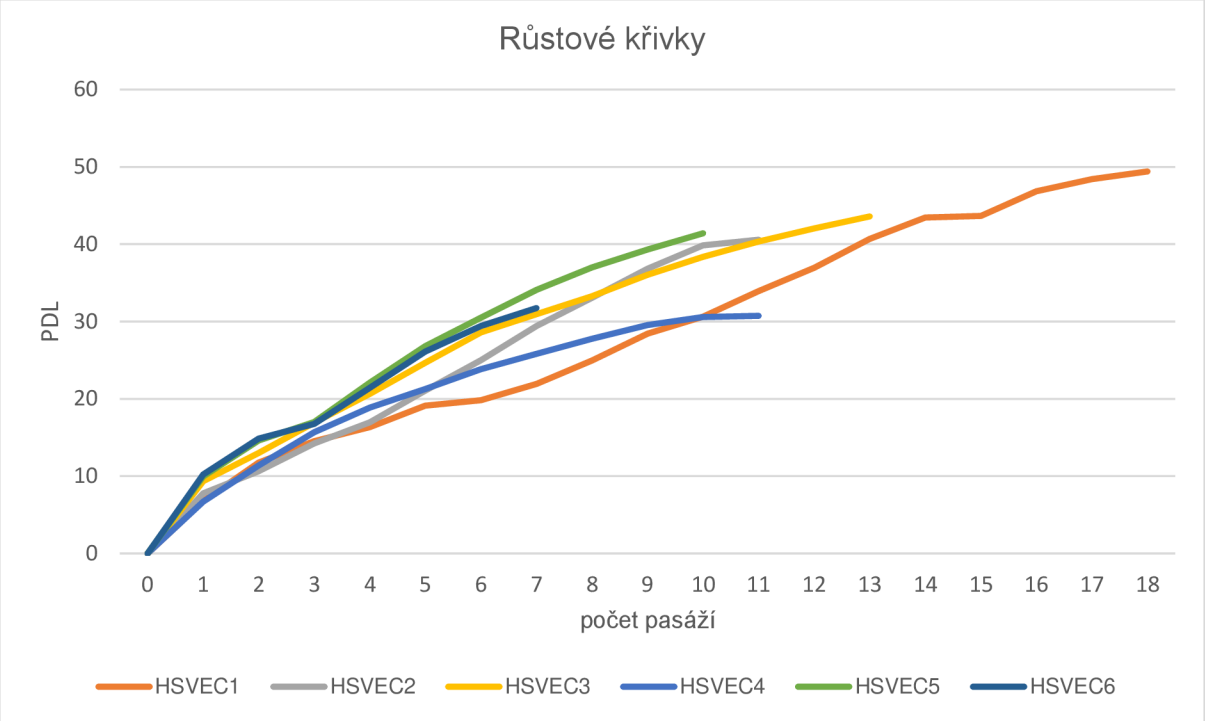


Obrázek. č.13: Linie HSVEC5. V 0.p se objevila kolonie buněk fibroblastové morfologie. I po jejím odstranění byla 1.p morfologicky heterogenní. Zvětšeno 40x.

Každá linie byla kultivována až do dosažení senescence, tedy bylo sklizeno stejné nebo menší množství buněk, než bylo nasazeno. Souhrn růstových vlastností všech linií je uveden v tabulce 16, vývoj růstových parametrů v čase je graficky znázorněn na obrázku 14.

Linie	Počet pasáží	PDL	Teoretický počet získaných buněk	Doubling time v 5. pasáži (hod)
HSVEC1	19	48	2,00 x 10^20	20,79 ± 5,2
HSVEC2	12	42	1,03 x 10^17	27,93 ± 2,1
HSVEC3	13	44	4,66 x 10^17	31,22 ± 3,4
HSVEC4	12	31	3,61 x 10^13	25,55 ± 1,2
HSVEC5	10	41	2,29 x 10^16	21,45 ± 2,6
HSVEC6	8	32	3,11 x 10^13	25,79 ± 1,6

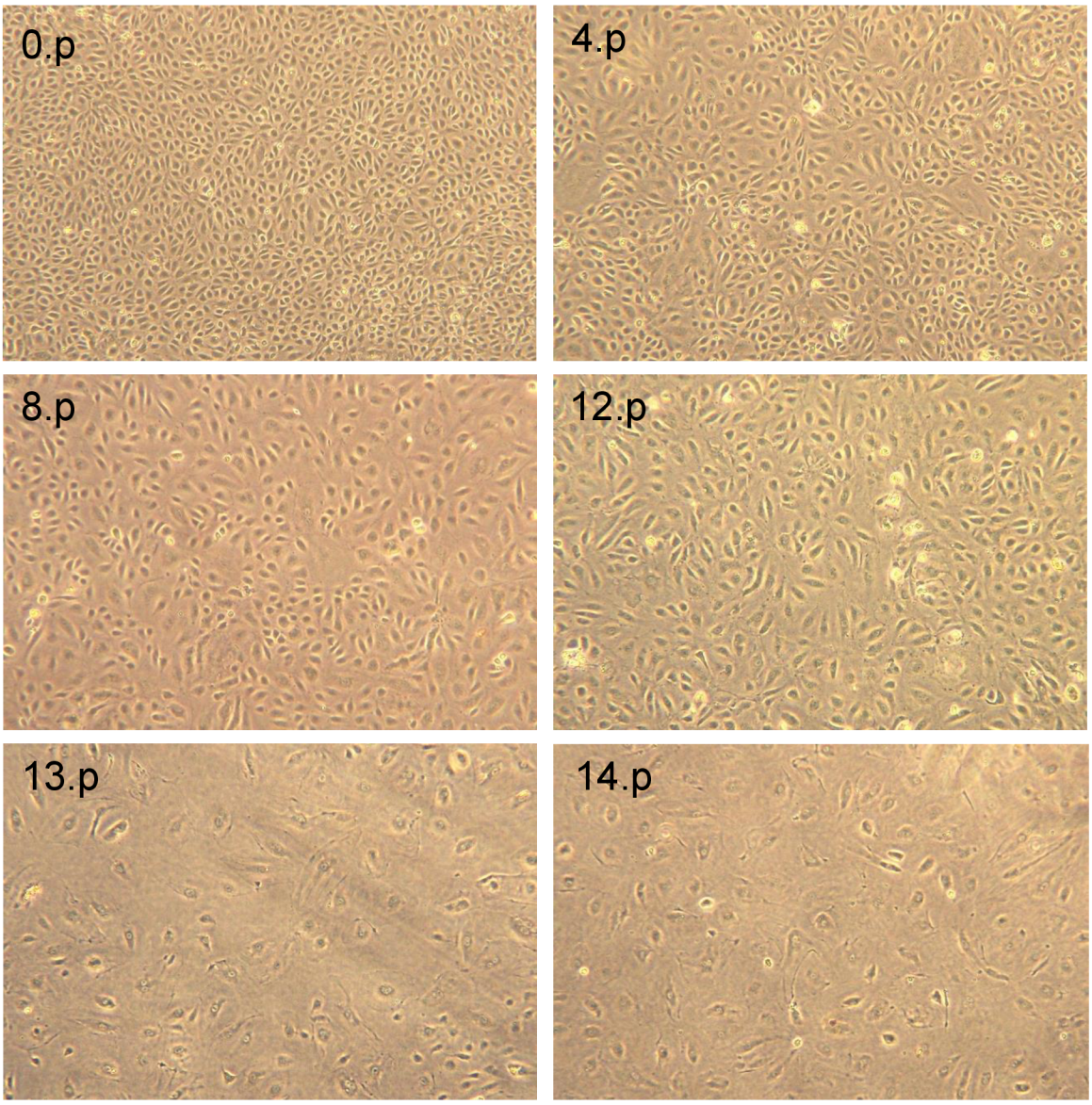
Tabulka č. 16: Růstové charakteristiky všech šesti endoteliálních linií. Teoretický počet získaných buněk byl vypočítán z počtu izolovaných buněk a PDL.



Obrázek č.14: Srovnání potence jednotlivých linií.

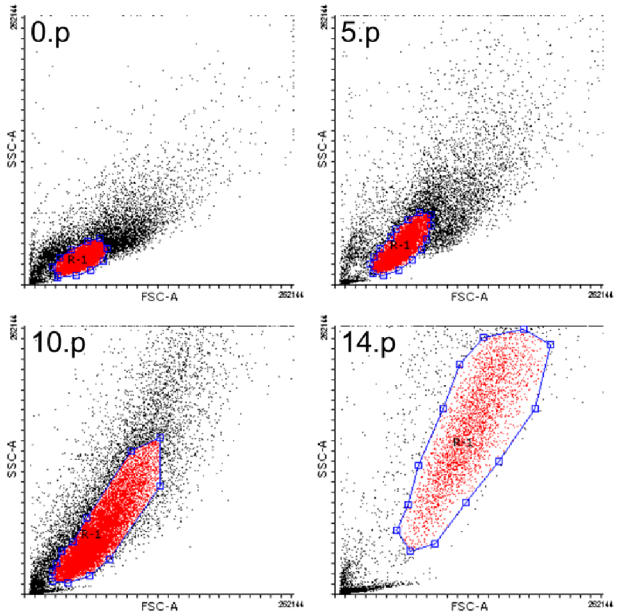
4.2. Morfologie

Endoteliální buňky v nízké pasáži byly drobné, homogenní, těsně přitisknuté k sobě navzájem, se zřetelným jádrem a málo definovanými okraji. Se vzrůstající pasáží se morfologie proměňovala – buňky se zvětšovaly, byly heterogennější, objevily se protáhlé až výběžkovité buňky a mezi jednotlivými buňkami byly stále širší rozestupy (Obr. 15). Se zvyšujícím se počtem pasáží také klesal počet pozorovaných mitóz. U všech linií se morfologie vyvíjela stejně, ke změnám docházelo jiným tempem.



Obrázek č.15: Linie HSVEC3 v průběhu pasáží. Zvětšeno 40x.

Změna morfologie byla pozorovatelná i při průtokové cytometrii. Populace buněk pro analýzu se z malé dobře definované oblasti v časných pasážích přesunuly do širokého pole odlišných velikostí v pasáži vysoké (Obr. 16).



Obrázek č.16: Srovnání dot plotů z analýzy průtokové cytometrie mezi stoupajícími pasážemi linie HSVEC3.

4.3. Testování povrchů pro růst endotelií

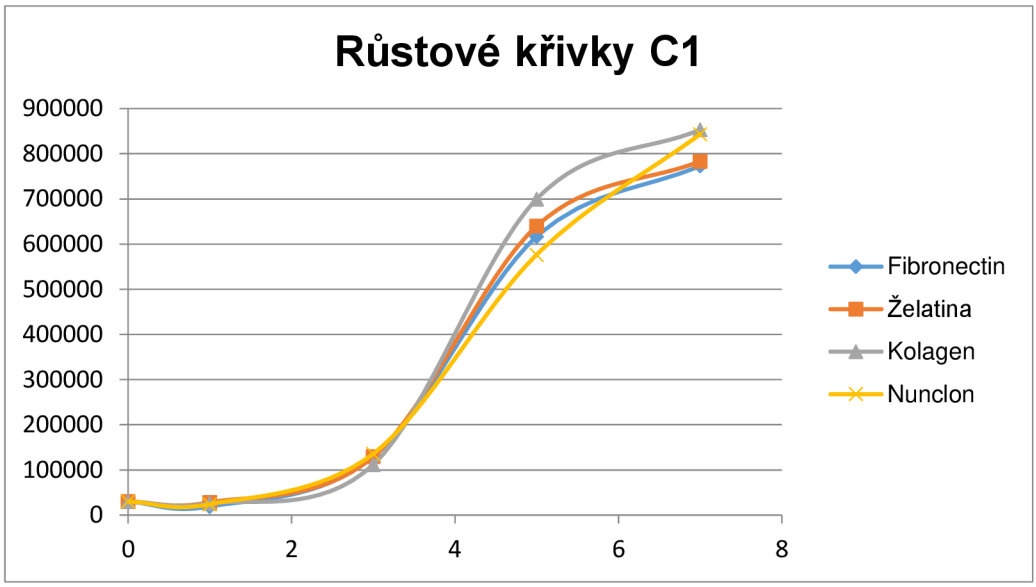
Pro srovnávání povrchů byly použity dvě linie, C1 a C2. Průměrné počty buněk sklizené z různých povrchů v jednotlivé dny a k nim náležející relativní chyby jsou uvedeny v tabulce č. 17 a vizualizovány v příslušných grafech (Obr. 17). Ze získaných růstových křivek byl odvozen doubling time (tabulka č. 18).

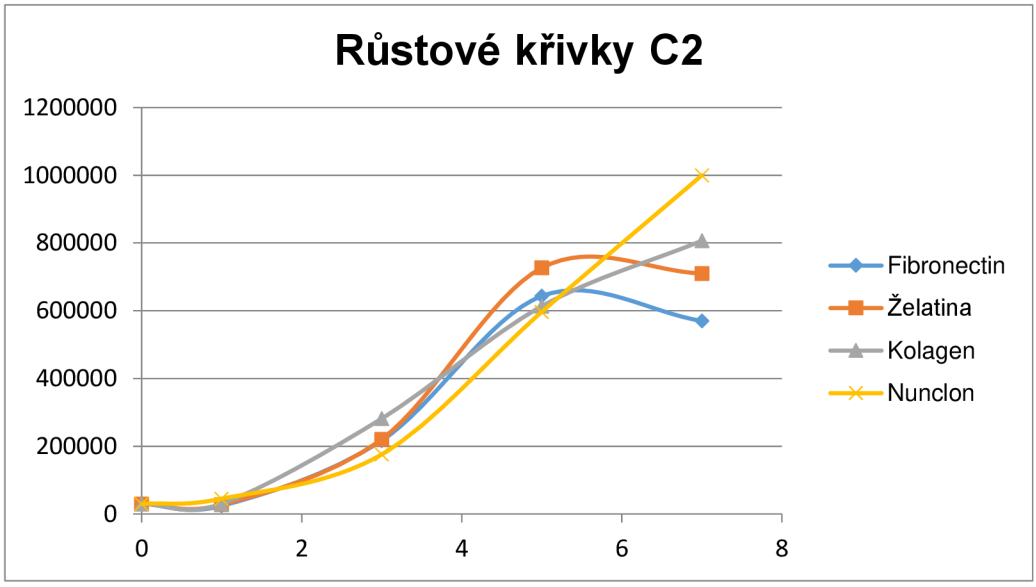
C1	fibronectin	V (%)	želatina	V (%)	kolagen	V (%)	Nunclon	V (%)
Den 0	30 000		30 000		30 000		30 000	
Den 1	19 167	16	28 167	18	25 833	25	24 167	18
Den 3	129 167	2	129 167	17	160 000	2	135 833	10
Den 5	616 667	9	640 000	25	700 000	13	576 667	7
Den 7	773 333	3	783 333	8	853 333	10	843 333	9
C2								
Den 0	30 000		30 000		30 000		30 000	
Den 1	24 167	18	27 500	20	30 000	7	45 000	8
Den 3	216 667	12	220 833	7	281 667	12	175 833	16
Den 5	643 333	21	726 667	6	613 333	7	596 667	10
Den 7	570 000	3	710 000	30	806 667	8	1 000 000	8

Tabulka č. 17: Počty sklizených buněk na jednotlivých površích; V = relativní směrodatná odchylka.

	Doubling time (hod)			
	fibronectin	**želatina**	**kolagen**	**Nunclon**
C1	21,28 ± 1,3	20,79 ± 5,2	18,14 ± 2,3	23,01 ± 2
C2	30,57 ± 10,1	27,93 ± 2,1	42,75 ± 8	27,23 ± 4,7

Tabulka č.18: Doubling time na jednotlivých površích uvedenou směrodatnou odchylkou.



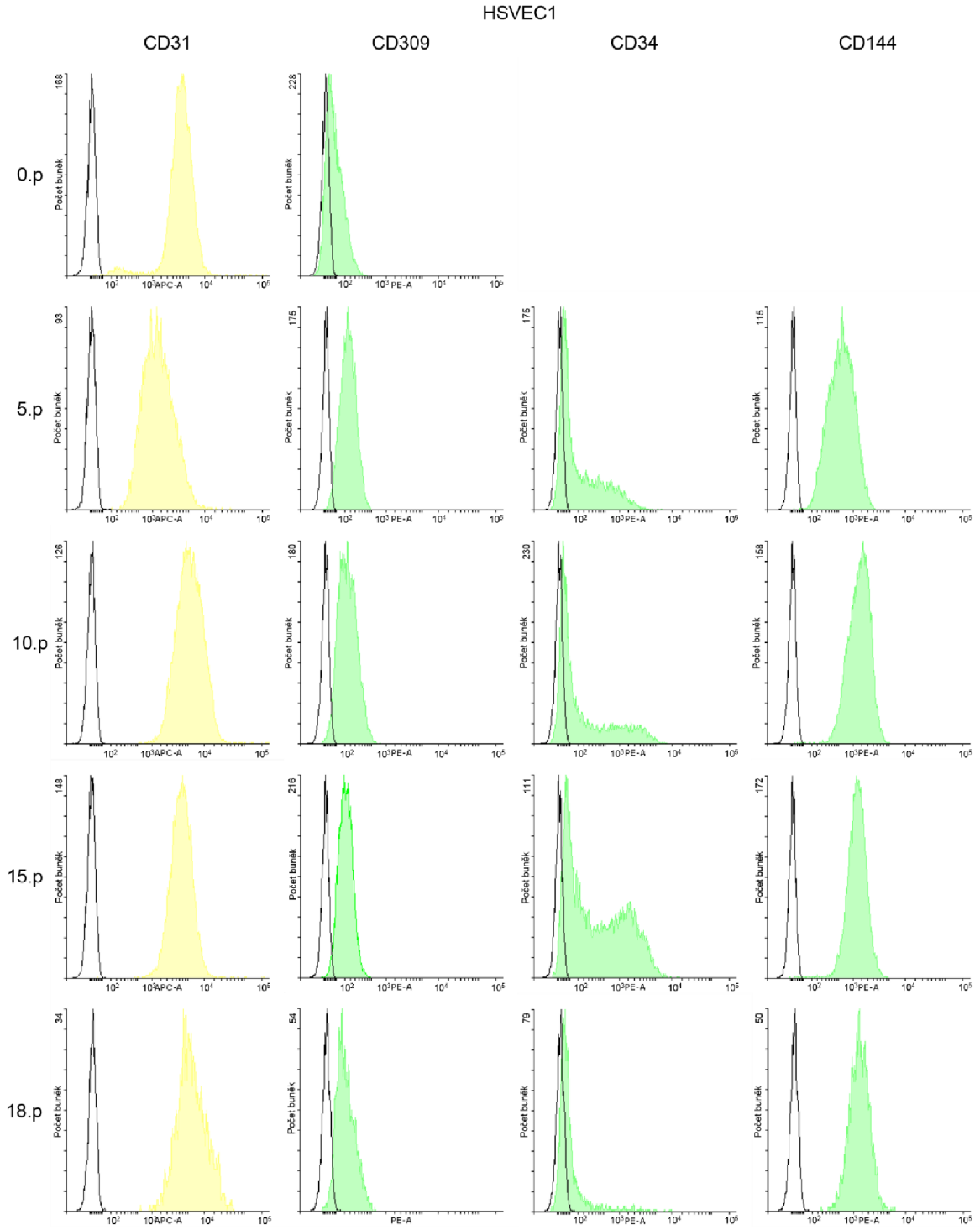


Obrázek č.17: Růstové křivky znázorňující růst linií C1 a C2 na různých površích.

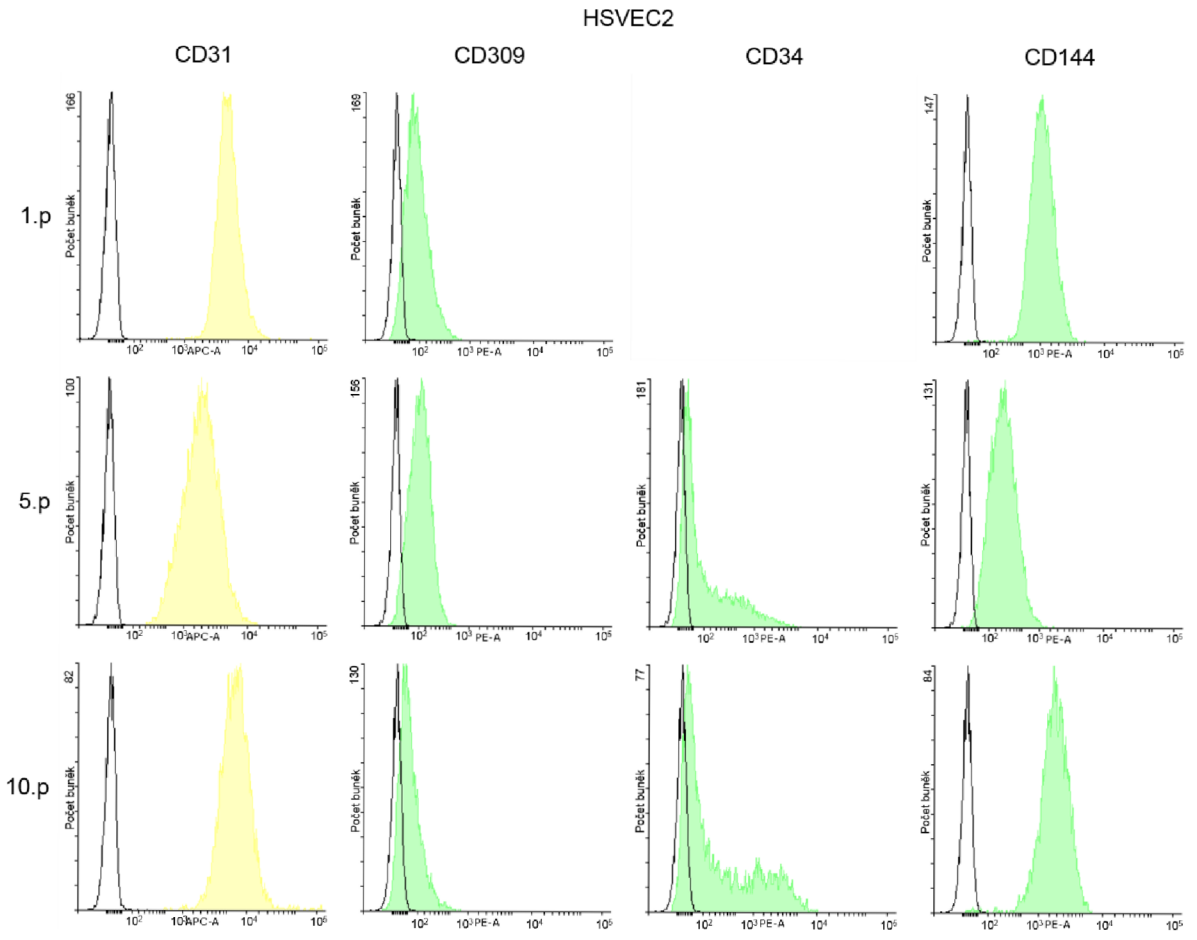
4.4. Povrchové markery endotelií

U všech linií byla v pravidelných intervalech sledována exprese markerů CD31, CD34, CD144 a CD309. CD31, CD144 a CD309 vykazovaly napříč liniemi a stářím kultury srovnatelnou expresi – silně pozitivní CD31 i CD144 s velice malou, ovšem stabilně

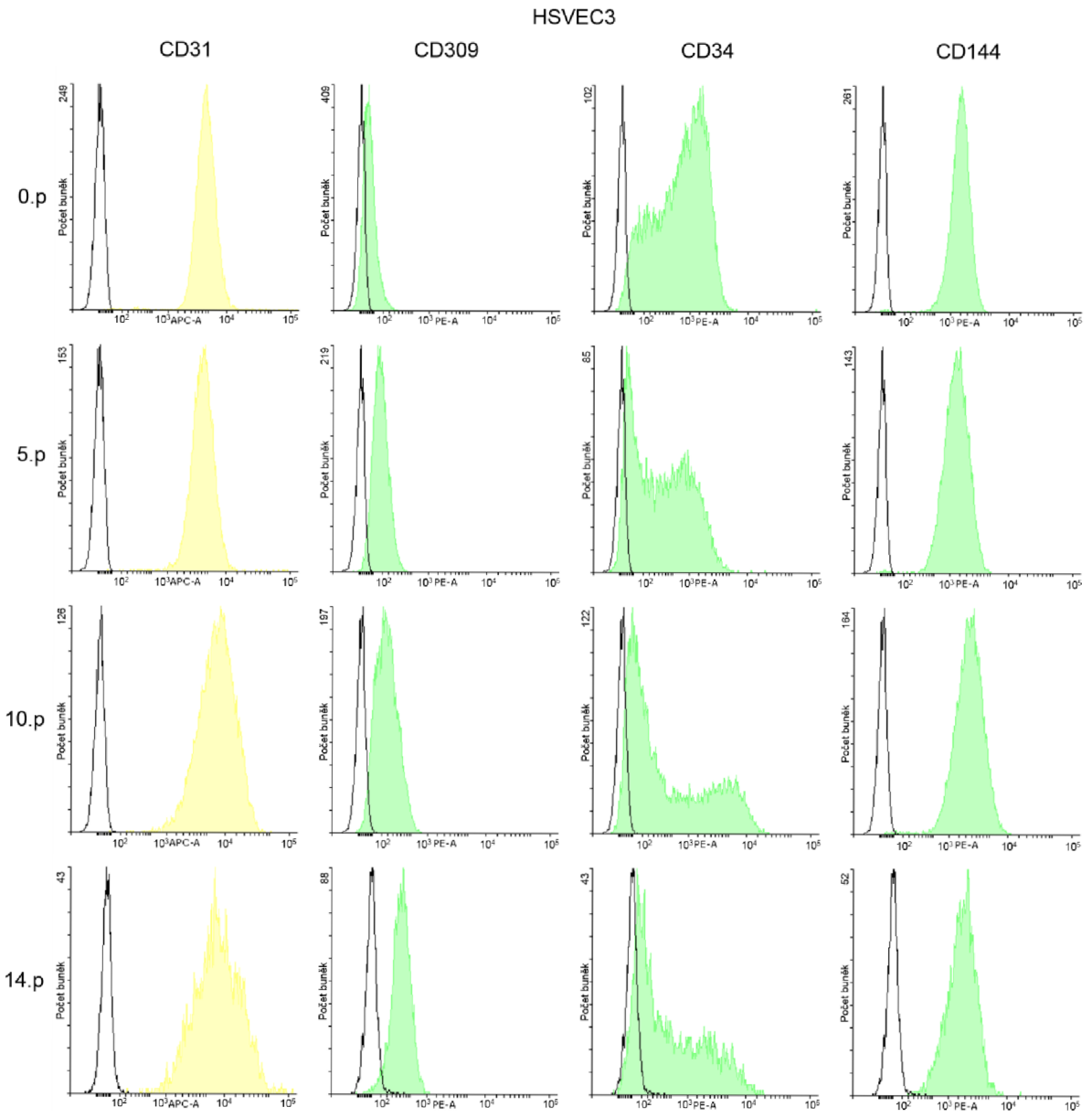
nenulovou expresí CD309. U CD34 se mezi sebou znatelně lišily linie i jednotlivé pasáže navzájem (Obr. 18-22).



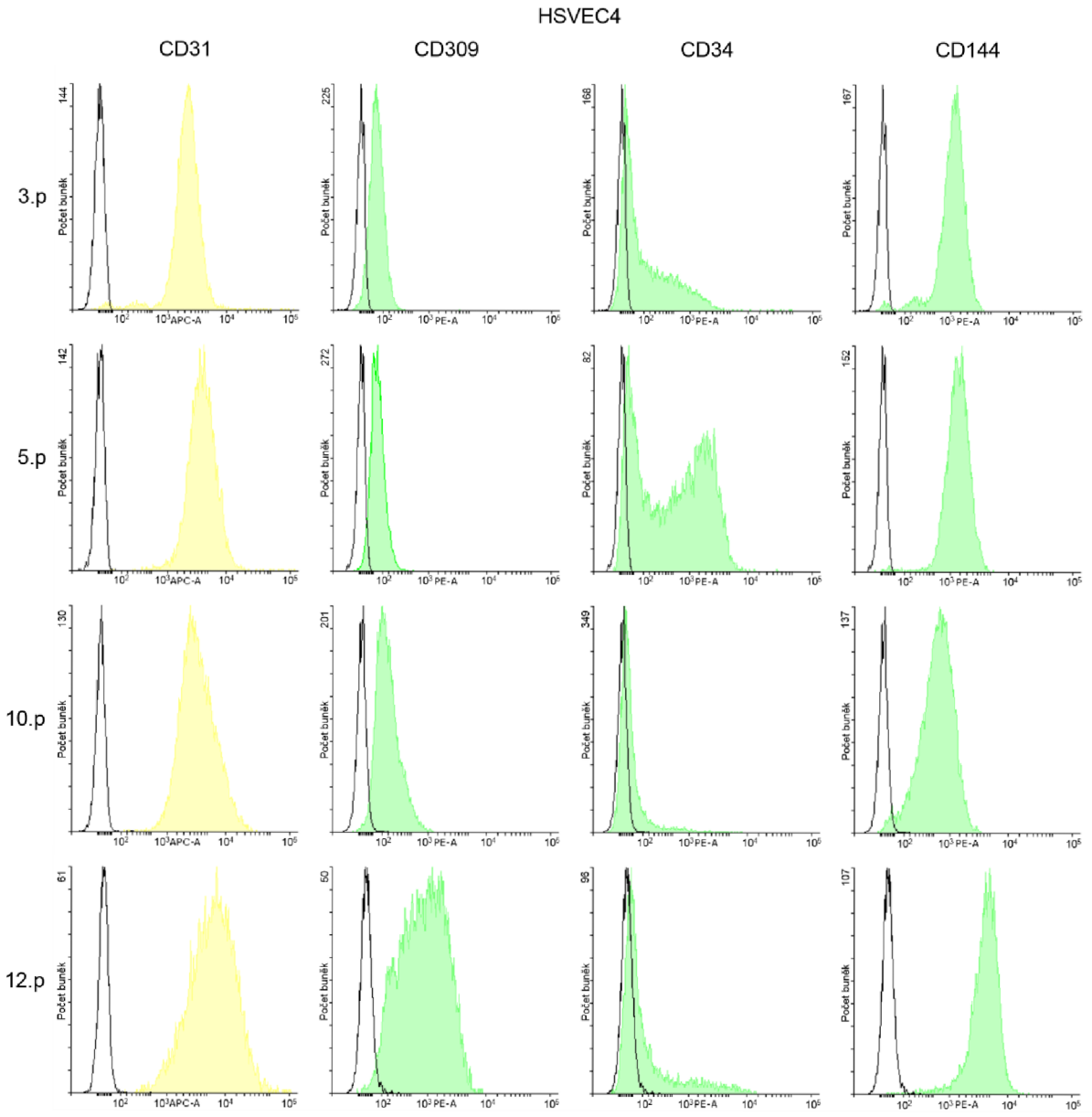
Obrázek č.18: Exprese povrchových markerů CD31, CD309, CD34 a CD144 u linie HSVEC1.



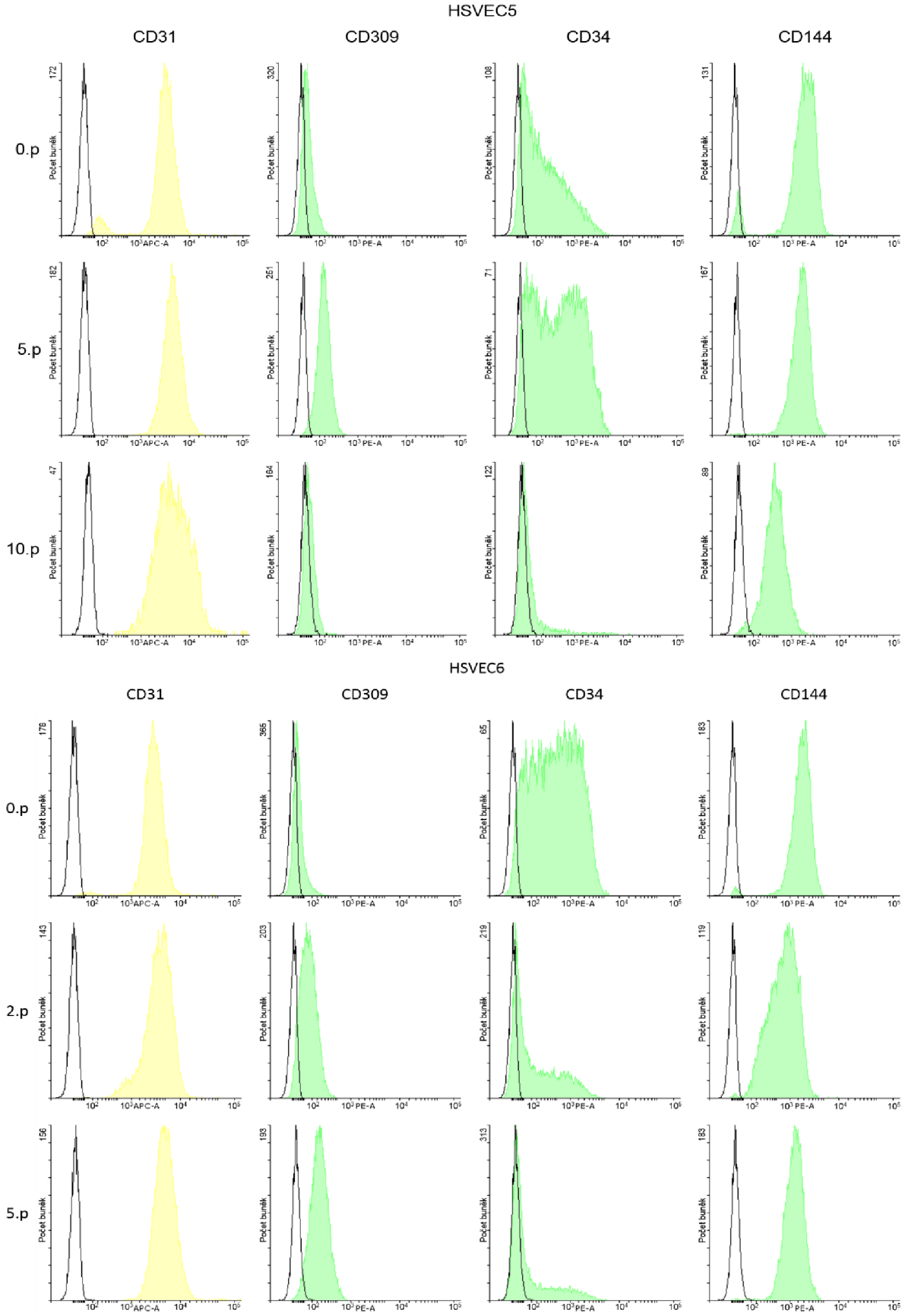
Obrázek č.19: Exprese povrchových markerů CD31, CD309, CD34 a CD144 u linie HSVEC2.



Obrázek č.20: Exprese povrchových markerů CD31, CD309, CD34 a CD144 u linie HSVEC3.



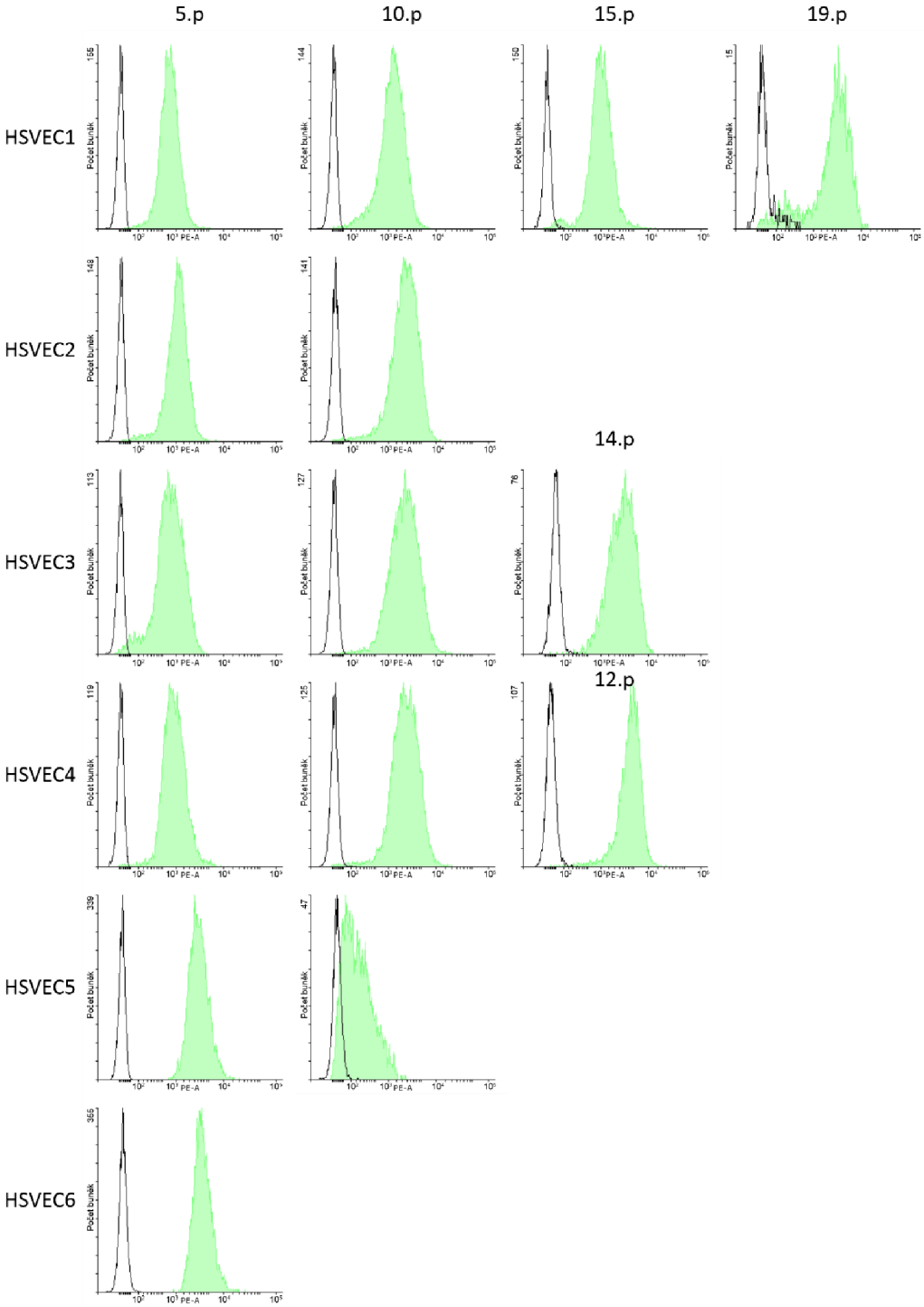
Obrázek č.21: Exprese povrchových markerů CD31, CD309, CD34 a CD144 u linie HSVEC4.



Obrázek č.22: Exprese povrchových markerů CD31, CD309, CD34 a CD144 u linie HSVEC5 a HSVEC6.

4.5. LDL assay

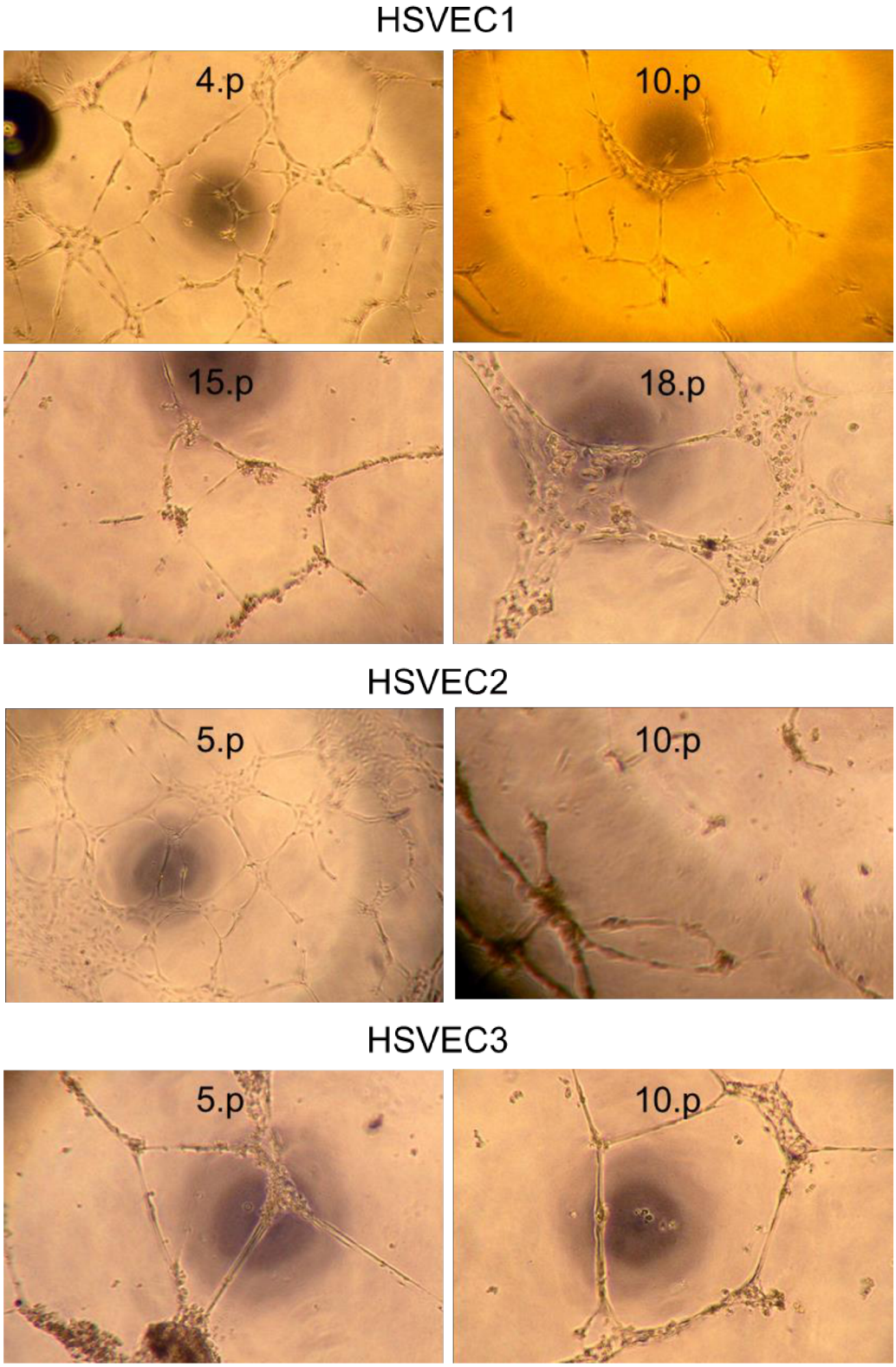
Schopnost buněk přijímat LDL se v průběhu kultivace neměnila, i ve vysoké pasáži, kdy se jednalo o morfologicky heterogenní, velké a senescentní buňky stále vykazovaly jasnou pozitivitu v LDL assayi. Výjimkou je HSVEC5 v 10.p, kde byla exprese jen mírně odlišná od negativní kontroly (Obr. 23).

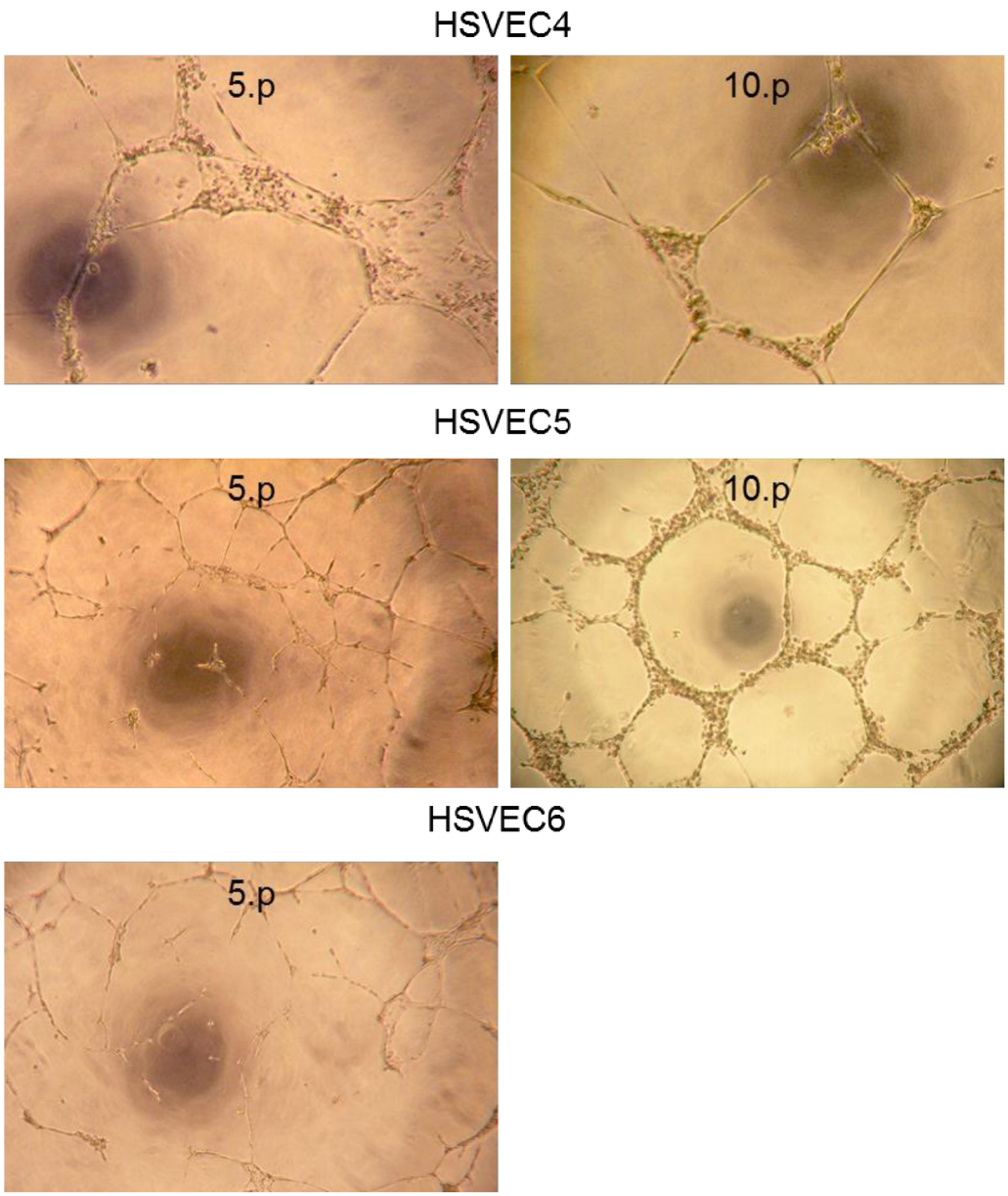


Obrázek č.23: Výsledky LDL assaye u stoupajících pasáží linií HSVEC.

4.6. Trubičková assay

Buňky stabilně tvořily síťovité útvary již během několika hodin po nanesení na Geltrex. Tuto schopnost si zachovaly až do vysoké pasáže. U 10.p linie HSVEC2 vznikly trubičky jen omezeně, u okraje jamky (Obr. 24).

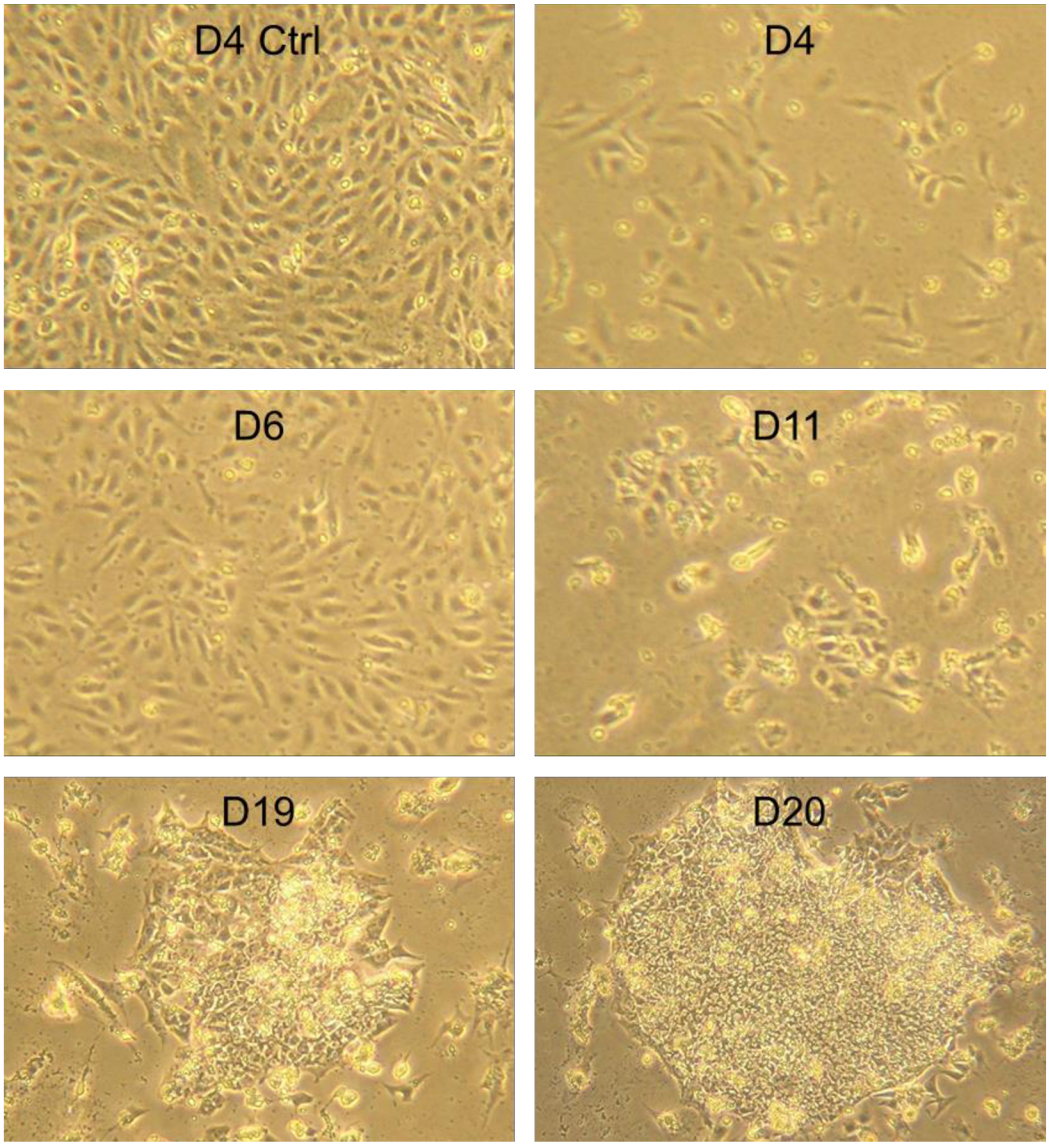




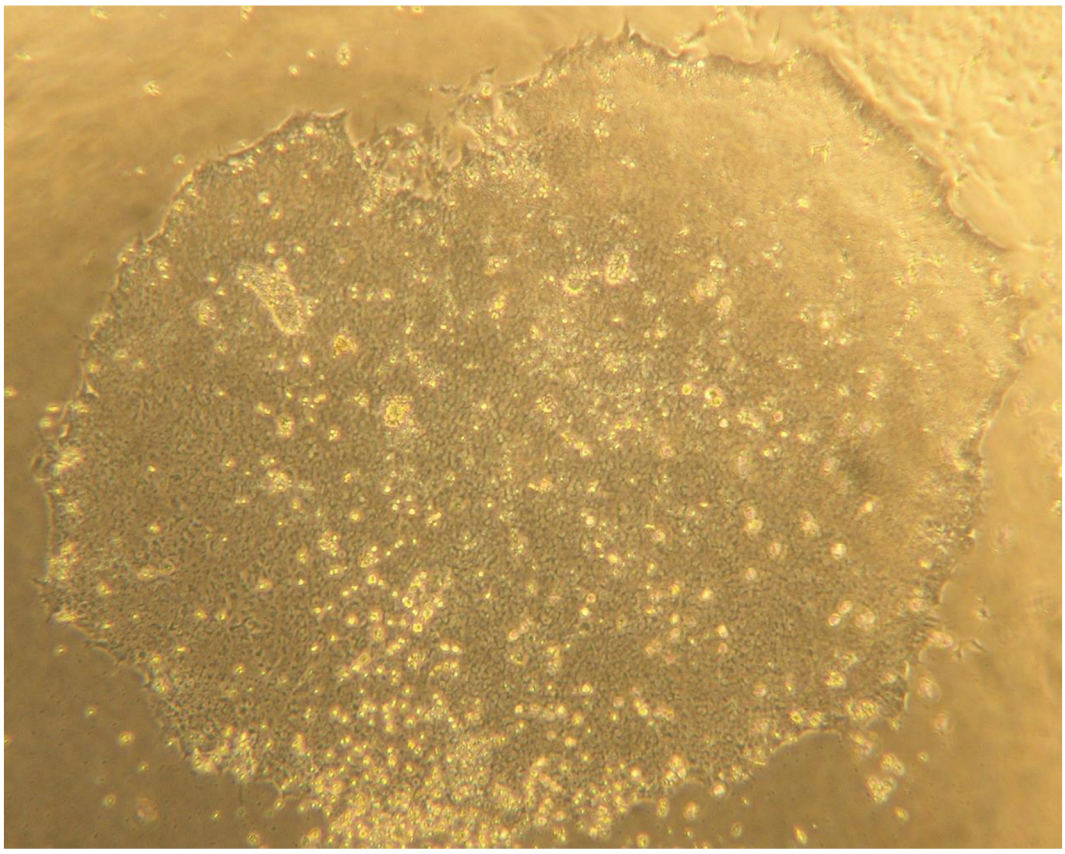
Obrázek č.24: Linie HSVEC tvořící síťovité útvary při TFA. Zvětšeno 40x.

4.7. Příprava linií iPSCs

Pro derivaci iPSCs byly vybrány linie HSVEC1, HSVEC2 a HSVEC3. V 6 dnech následujících po elektroporaci, stále v mediu EGM, přibývalo buněk endoteliální morfologie. Změnou media na mTeSR došlo k jejich rapidnímu úbytku. Mezi zbylými přisedlými buňkami se některým morfologie postupně měnila (Obr. 25). Po mechanickém pasážování vybraných klonů byly získány kolonie s typickým vzhledem iPSCs (Obr. 26).



Obrázek č.25: Morfologické změny v průběhu reprogramace linie HSVEC1. Kontrolou jsou buňky, které prošly elektroporací bez přidaného reprogramačního vektoru. Zvětšeno 40x.



Obrázek č.26: Kolonie iPSCs z linie HSVEC1 v 1. pasáži. Zvětšeno 40x.

Reprogramace linie HSVEC2 nebyla úspěšná. Po změně kultivačního media došlo k postupnému uvolnění všech buněk a neobjevila se žádná kolonie pluripotentních buněk.

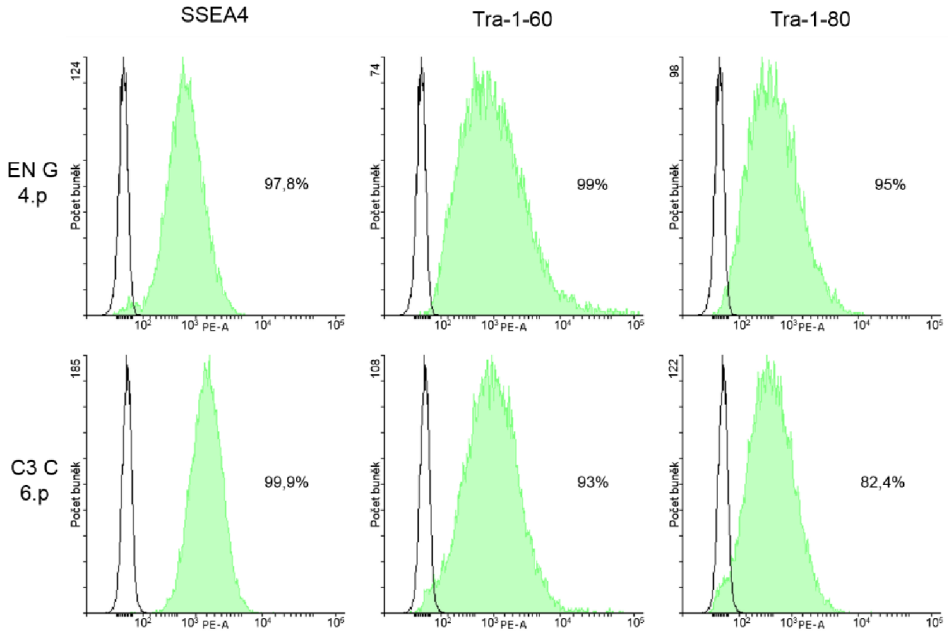
Souhrn získaných stabilních klonů ze všech reprogramací je v tabulce 19.

Endoteliální linie	Klony	Charakterizované klony	Úspěšnost reprogramace (%)
HSVEC1	C, G	EN-G	0,002
HSVEC2			0
HSVEC3	A, B, C, D, E, G, H, I, J	C3-C	0,009

Tabulka č.19: Klony iPSCs získané z jednotlivých reprogramací.

4.8. Povrchové markery iPSCs

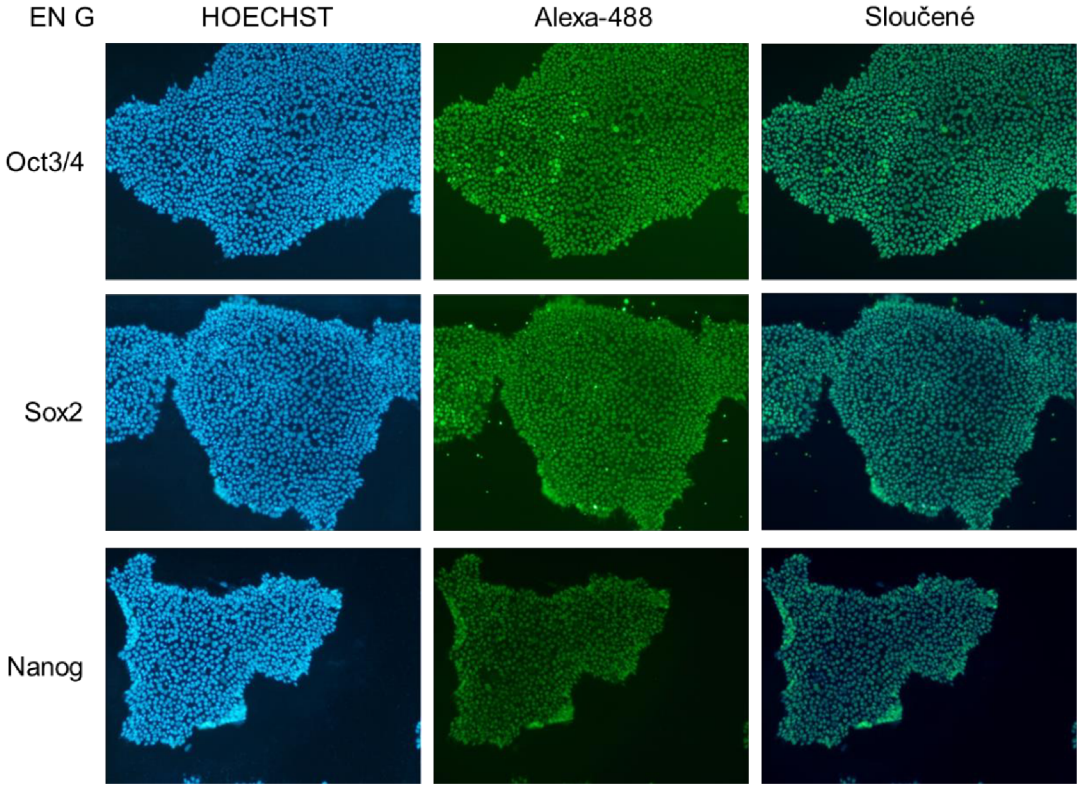
U linií získaných z obou úspěšných reprogramací byla v nízké pasáži prokázána exprese typických povrchových markerů pluripotence – SSEA4, Tra-1-60 a Tra-1-81. Histogramy z průtokové cytometrie jsou na obrázku 27.



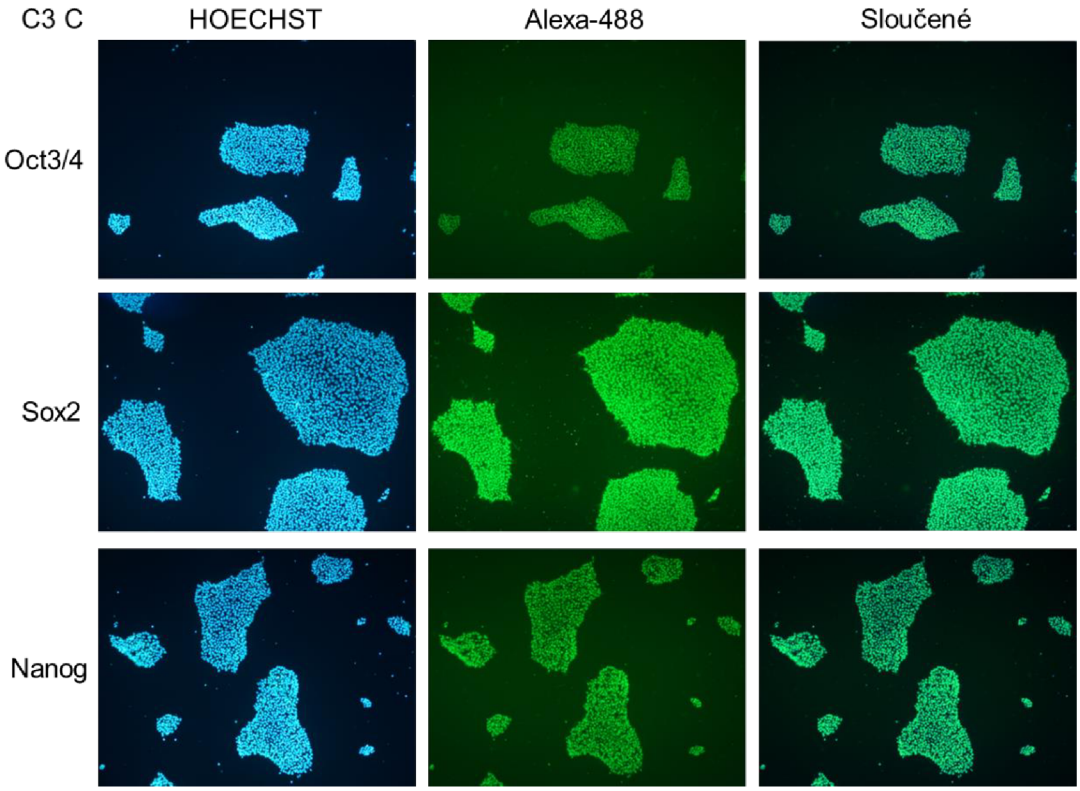
Obrázek č.27: Exprese povrchových markerů SSEA1, Tra-1-60 a Tra-1-80 u klonů EN G a C3 C.

4.9. Jaderné markery iPSCs

U obou linií iPSCs byla pozorována homogenní exprese všech tří pozorovaných jaderných markerů – Oct3/4, Sox2 i Nanog (Obr. 28 a Obr. 29).



Obrázek č.28: Exprese jaderných markerů pluripotence u linie EN G.



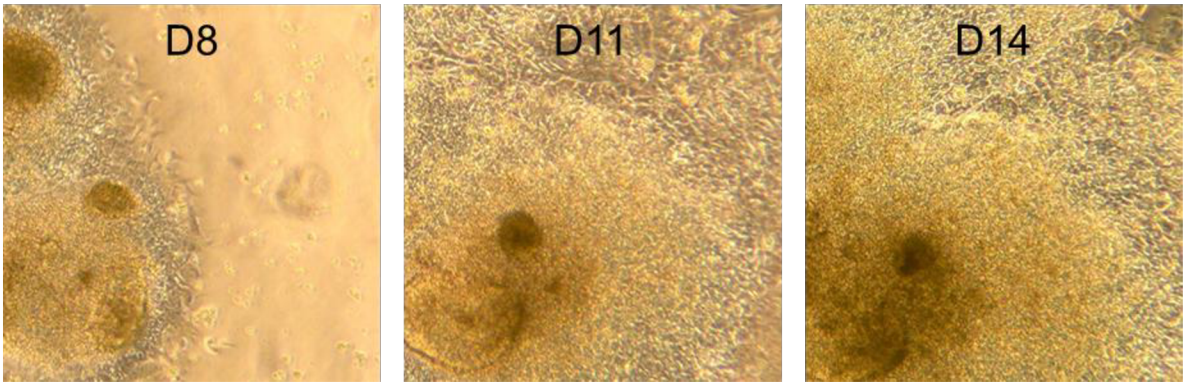
Obrázek č.29: Exprese jaderných markerů pluripotence u linie C3C.

4.10. Spontánní diferenciace iPSCs

Shluky iPSCs v jamkách s kulatým dnem tvořily už po 24 hodinách kompaktní útvar s jasně definovanými okraji – embryoidní tělísko (EB). Okolo něj zůstávalo množství buněk, které se do tvorby EB nezapojily. Po sedmi dnech bylo EB denzní, množství nezapojených buněk bylo díky výměnám media nízké (Obr. 30).

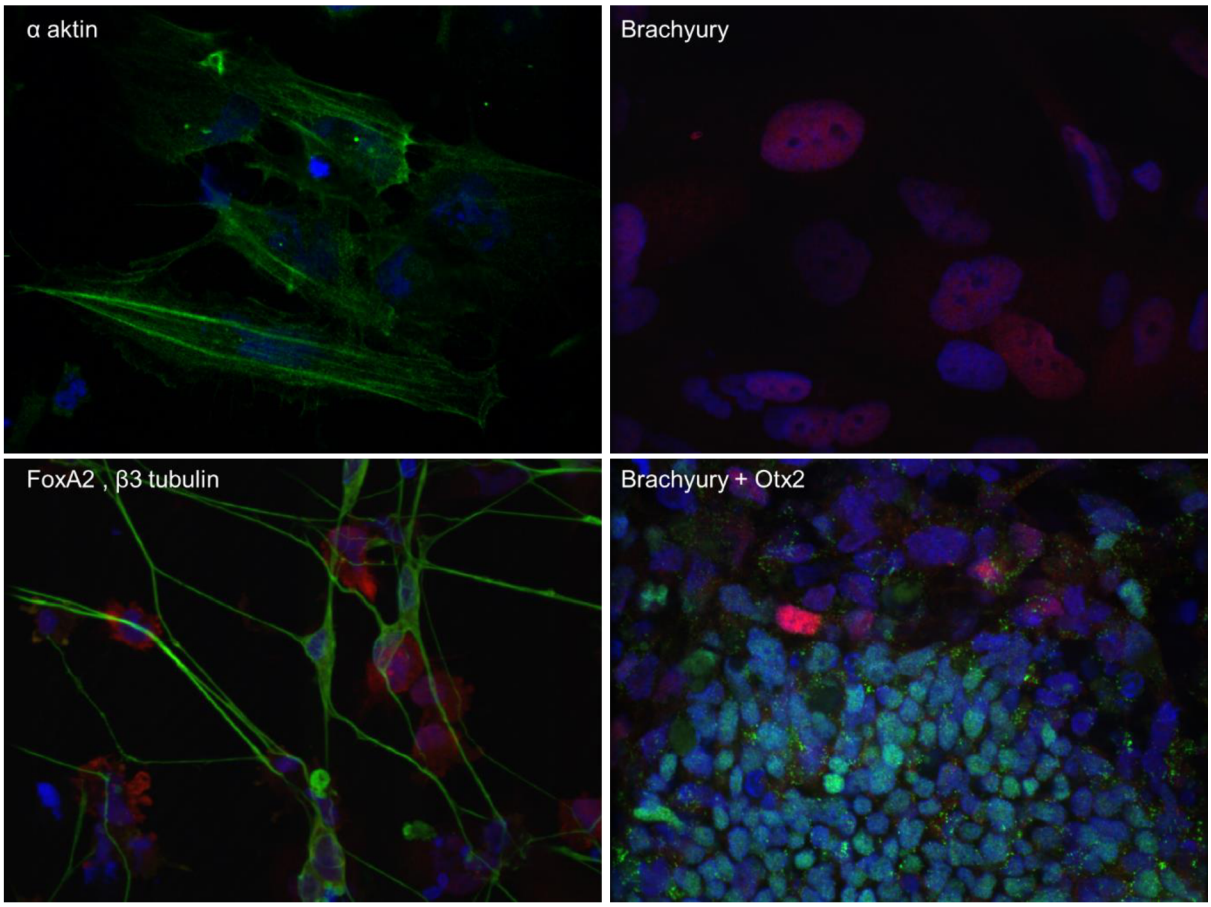
Obrázek č.30: EB v průběhu prvního týdne kultivace.

Dobře vytvořená tělíska se po přenosu na sklíčka potažená matrigelem přichytila a do jejich okolí se rozrůstaly buňky různých morfologií (Obr. 31).

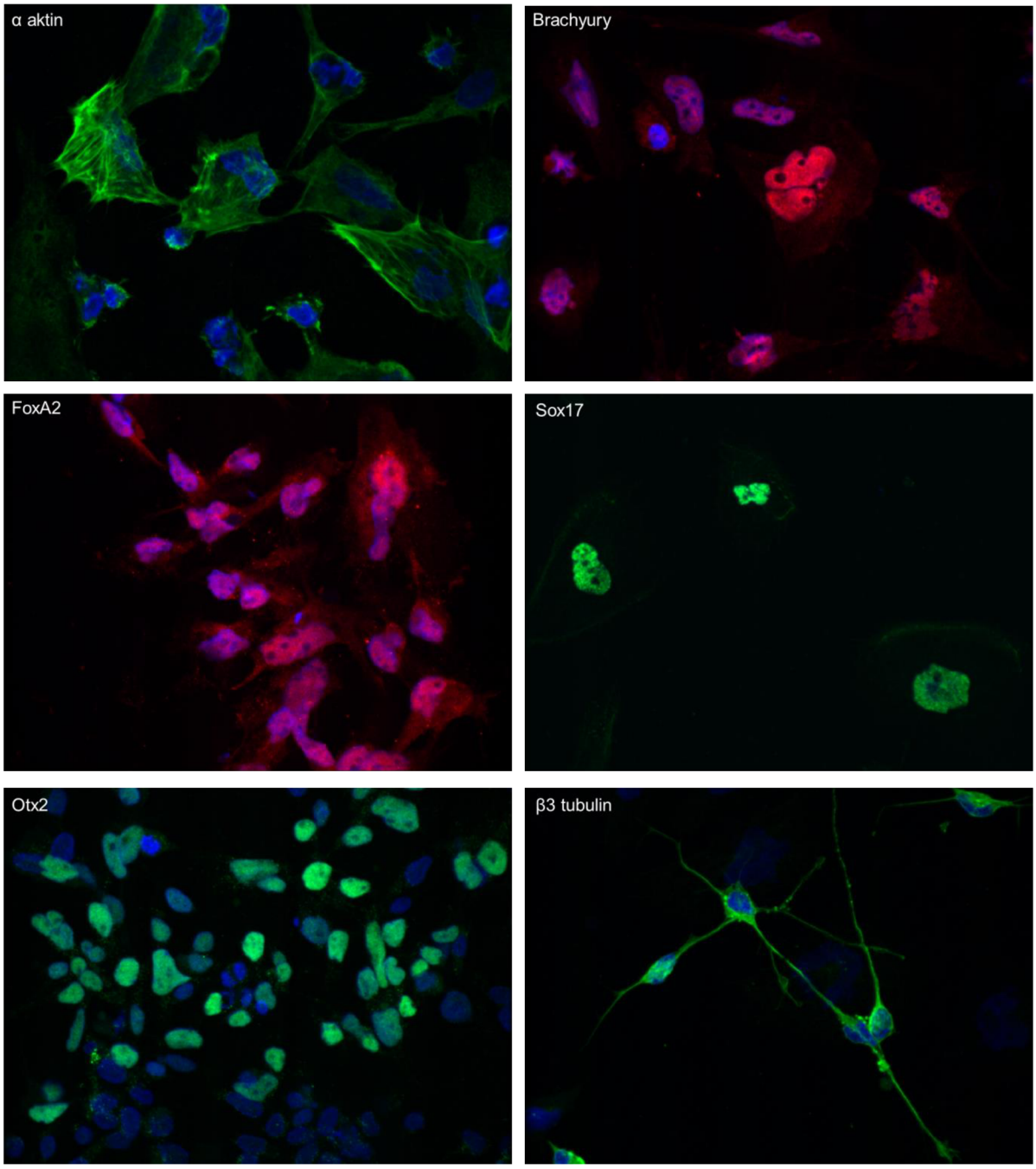


Obrázek č.31: EB v průběhu druhého týdne kultivace.

Po fixaci a barvení byly EB vzniklé z obou linií iPSCs snímány konfokálním mikroskopem. U linie EN G se podařilo prokázat markery α aktin, Brachyury (mezoderm), β3 tubulin, Otx2 (ektoderm) a FoxA2 (endoderm) (Obr. 32). Druhý marker endodermu, SOX17, se prokázat nepodařilo. U linie C3 C byly prokázány všechny markery (Obr. 33).



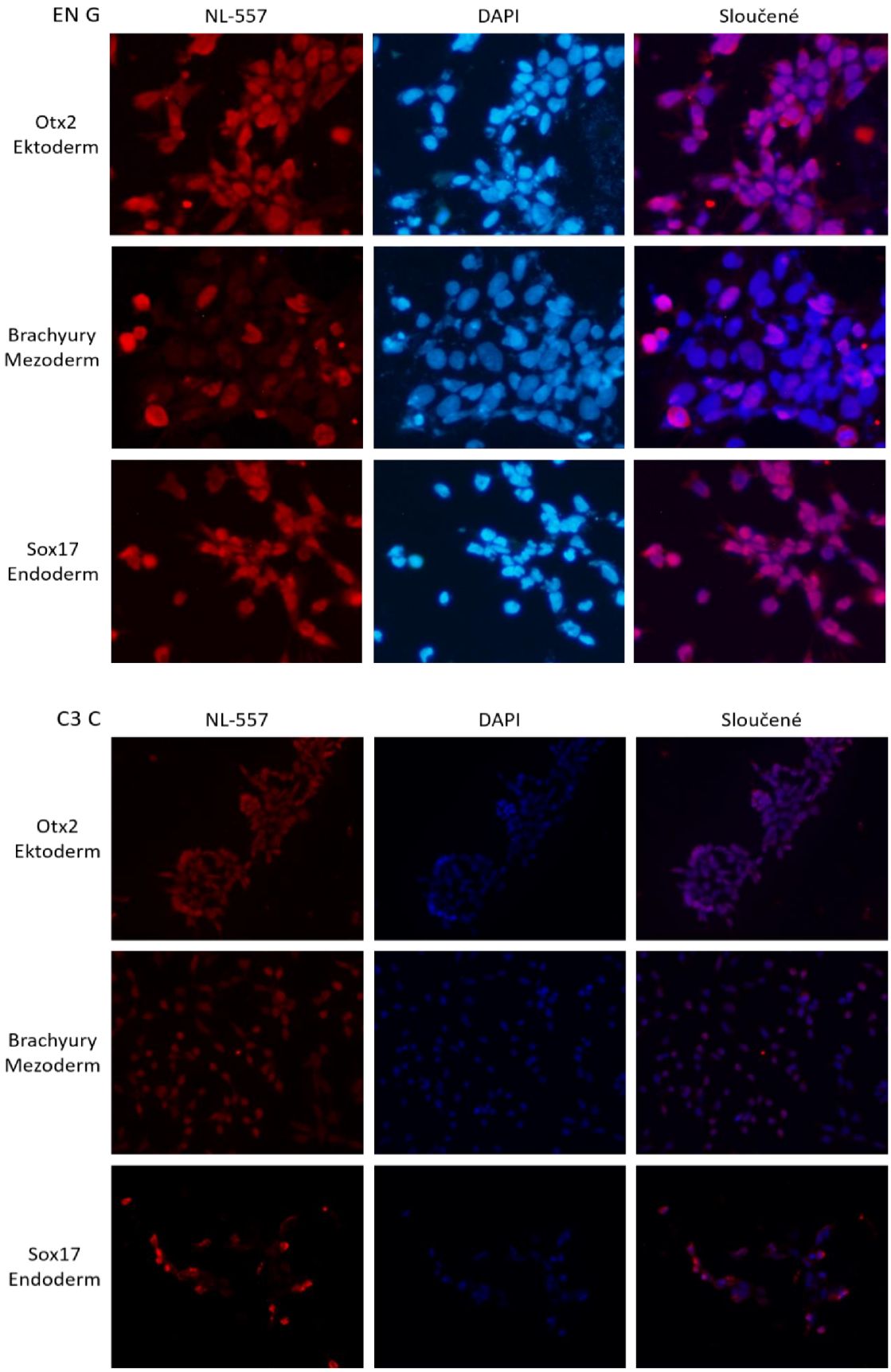
Obrázek č.32: Spontánní diferenciace klonu EN G. Snímáno 40x objektivem. DAPI – modrá; α aktin – zelená; Brachyury – červená; FoxA2 – červená; β3 tubulin – zelená; Otx2 – zelená.



Obrázek č.33: Spontánní diferenciace klonu C3 C. DAPI – modrá; α aktin – zelená; Brachyury – červená; Sox17 – zelená; FoxA2 – červená; Otx2 – zelená; β3 tubulin – zelená.

4.11. Řízená diferenciace iPSCs

Po přidání diferenciačních medií ke koloniím iPSCs došlo k intenzivnímu úbytku buněk a ke změnám morfologie. Po imunocytochemickém obarvení je v jádrech viditelná exprese markerů daných zárodečných listů a to u obou diferencovaných linií (Obr. 34).



Obrázek č.34: Exprese jaderných markerů Otx2, Brachyury a Sox17 u buněk linie EN G a C3 C.

5. Diskuze

Pro izolaci endoteliálních buněk jsem zvolila námi modifikovanou metodu založenou na protokolech Ataollahi *et al.* (2014) a Baudin *et al.* (2007). Cévy byly velikosti a stavu, ve kterém by jejich zpracování konvenčním způsobem (kanylace a promývání) bylo obtížně proveditelné. I když není zcela jasné, co určuje úspěšnost izolace, dá se předpokládat, že šetrnost operačního zákroku, rychlost napuštění transportním roztokem a nepřítomnost trombotických změn patří k nejdůležitějším faktorům. Viabilní buňky se podařilo izolovat z každé cévy – de facto z odpadního materiálu.

Nejúspěšnější izolace byla z nejdelší vény, která zároveň vykazovala nejnižší počet trombotických změn – růžová, pevná, elastická, bez viditelných poškození. Ostatní izolace byly z kratších úseků cév, které i přes totožný transport a zpracování měly odlišnou kvalitu. Všichni dárci byli na operativní léčbě varixů, jejich komorbidity nejsou známy – zdravotní stav by spolu s věkem dárců mohl mít zásadní vliv na úspěšnost izolace a kultivace.

Odlišné buněčné typy kontaminující primární kultury – morfologicky odpovídající fibroblastům a SMC, tedy elementům cévní stěny – se u všech linií podařilo eliminovat. Samotné kultivační podmínky podporovaly přednostně růst endoteliálních buněk, nežádoucí kolonie přesto vznikaly. Podle individuální situace (počet a velikost kolonií, jejich případné prorůstání do endoteliální monovrstvy) byly odstraněny mechanicky nebo magnetickou imunoseparací.

Buňky v kultuře dosahovaly PDL 31-48. Z malého množství izolovaných buněk, řádově v desítkách tisíc, je tak možné získat až 10^{16} buněk. Pro srovnání, lidské aortální endoteliální buňky vydrží přibližně 30 PDL (Donnini *et al.*, 2000), lidské endoteliální buňky pupečníkové žíly (HUVEC) až 60 PDL (Maier *et al.*, 1990). Buňky si do PDL 20-30 zachovávaly stabilní morfologii, poté začaly postupně přecházet do senescence.

Doubling time měřený v páté pasáži není pro danou kulturu vypovídajícím parametrem. Linie HSVEC1, která dosáhla PDL 48, měla doubling time 20,79 hod, zatímco pro linii HSVEC3 s PDL 44 byl doubling time 31,22 hod, nejvyšší ze všech pozorovaných. Aby byla výpovědní hodnota vyšší, bylo by třeba doubling time měřit při určitém PDL, nikoli určité pasáži.

Z porovnání čtyř různých kultivačních povrchů nelze vytvořit závěr, který povrch je preferenční z hlediska buněčné expanze. Porovnání bylo komplikováno i odlišným chováním dvou testovacích kultur. Povrch Nunclon dává lepší výsledky při delší kultivaci a vyšší konfluenci buněk, ale pro optimální kultivaci jsem pasážovala již při konfluenci 80-90 %,

v exponenciální fázi růstu. Pro dlouhodobou kultivaci jsem z níže uvedených objektivních důvodů zvolila misky potažené želatinou. Doubling time na tomto povrchu byl pro obě linie druhým nejkratším, s želatinou se snadno manipuluje a má výrazně kratší dobu přípravy.

Identifikace buněčného typu byla založena na přítomnosti standardizovaných povrchových markerů CD31 a CD144 (Hofbauer *et al.*, 2014). Markery zůstávaly v průběhu kultivace jasně pozitivní. Jednotky procent negativních populací v primokultuře se kultivací vyředily, v jediném případě, kdy kontaminace přesáhla 5 % byla použita magnetická imunoseparace. Marker CD309 (receptor VEGF) si udržoval stabilní slabou (dim) expresi. Exprese CD309 pravděpodobně odráží množství VEGF v kultivačním mediu.

U markeru CD34 se napříč pasážemi a liniemi neprojevil žádný trend. Interpretaci tohoto jevu komplikuje fakt, že se CD34 nachází jak na endoteliálních progenitorech, tak na některých buňkách definitivního endotelu. Kolísání markeru je tedy hypoteticky kombinací dynamických změn v zastoupení jednotlivých frakcí (progenitorových buněk může být nejvíce v nulté pasáži a spolu s diferenciací ve zralý endotel jich ubývat; nebo mohou díky vyšší proliferační kapacitě zvětšovat své zastoupení v populaci) a zároveň se do jeho exprese mohou promítat vnější faktory v průběhu kultivace. Ačkoli je funkce tohoto proteinu jen málo známá, je dáván do souvislosti s buněčnými adhezemi – na jeho expresi může tedy mít vliv i konfluence kultury (Sidney *et al.*, 2014).

Funkční testy, absorpce acetylovaného LDL a TFA, také potvrdily endoteliální charakter kultivovaných buněk. Ve světelném mikroskopu se TFA obtížně fotografuje – silná vrstva Geltrexu a malá plocha jamky způsobují, že je jen část pozorovaného pole zaostřená. Po tvorbě trubiček je možné buňky obarvit fluorescenčním barvivem a pozorovat na fluorescenčním mikroskopu. Touto metodou by byly buňky ostře ohraničené a analýzou obrazu by bylo možné kvantifikovat jejich angiogenní schopnosti.

Pro přípravu iPSCs jsem zvolila reprogramační metodu s použitím epizomálních vektorů. V naší laboratoři je tato metodika zavedená a má mnohé výhody, v prvé řadě se vektor neintegruje do genomu. I přes nižší úspěšnost reprogramace vznikají iPSCs svým fenotypem velmi blízké ESC. Vektor se spontánně eliminuje průměrnou rychlostí 5 % za dělení, úplně vymizí do 14. pasáže (Matz, 2016). Oproti reprogramaci virem Sendai, také neintegrativní metodě, není zapotřebí připravovat a pracovat s viry a vzniklé buňky nejsou imunogenní.

V literatuře není dosud popsaná reprogramace HSVEC, ale jiné typy endoteliálních buněk reprogramovány byly, převážně HUVEC – HUVEC mají oproti adultním endoteliálním buňkám vyšší proliferační kapacitu a snadněji se převádějí

do nediferencovaného stavu. Podle zvolené reprogramační metody se liší i úspěšnost – retrovirovými vektory 2,5-3 %, retrovirovými vektory v hypoxickém prostředí až 4 % (Panopoulos *et al.*, 2011), epizomálními plasmidy v přítomnosti inhibitorů 2,5 % (Matz *et al.*, 2015). Pro srovnání, endoteliální progenitorové buňky $CD34^+$ dávají vzniknout iPSCs s úspěšností 0,22% při použití retrovirových vektorů (Geti *et al.*, 2012).

Mnou pozorované účinnosti byly 0,002 % z linie HSVEC1 a 0,009 % z linie HSVEC3, což odpovídá uváděné účinnosti pro epizomální reprogramaci 0,003 – 0,006 %. Přidáním malých molekul, specifických inhibitorů, do media v průběhu reprogramace by bylo možné účinnost zvýšit. Výrazně podpůrný efekt má také hypoxie, která by měla být v budoucnu do protokolu zařazena.

U linie HSVEC2 se nepodařilo získat ani jediný klon iPSCs. Tato linie byla méně kvalitní než další dvě. Dosáhla sice podobného PDL, ale buňky během kultivace rychleji měnily morfologii a potřebovaly delší dobu, než dosáhly optimální konfluence. Neúspěch reprogramace se dá tedy přisoudit nižší proliferační kapacitě a celkové horší kondici buněk.

Získané linie byly podrobeny testům pluripotence, v rozsahu, jaký by byl nezbytný pro zařazení do databáze kmenových buněk (Peterson *et al.*, 2011). Markery se stanovovaly po několika pasážích, kdy už je reprogramace dokončená a buněčný fenotyp stabilizovaný. Povrchové markery byly stanoveny za použití průtokové cytometrie. Oproti imunocytochemické analýze je touto metodou možná i kvantifikace. U linie EN G byla výrazná exprese všech tří pozorovaných markerů (SSEA-4, Tra-1-60, Tra-1-80). Linie C3 C byla v markeru Tra-1-80 pozitivní jen v 83,4 %. Zbylé buňky ale netvořily jasně odlišenou negativní subpopulaci; buňky tvořily na histogramu populaci, která svou nejnižší expresí zasahovala do negativní kontroly. Oba další markery byly pozitivní, linie tedy byla uznána za pluripotentní.

Mezi pozorované povrchové markery by bylo vhodné zařadit i negativní marker SSEA-1. SSEA-1 se na lidských pluripotentních buňkách, na rozdíl od myších, vůbec nenachází (Paulitschek *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2008).

Z pozorovaných jaderných proteinů má nejvyšší vypovídací schopnost Nanog. Oct3/4 a Sox2 jsou sice pro pluripotenci zcela nepostradatelné, ale jejich exprese v nízké pasáži může pocházet z přetrvávajících vektorů. Oproti tomu Nanog se na mnou použitých vektorech nenachází a jeho exprese je tak přesvědčivým důkazem endogenní exprese pluripotentních genů.

U obou linií byla exprese jaderných markerů homogenní, napříč celými koloniemi. Zvýšená fluorescence Sox2 a Nanog po okrajích kolonie EN G je způsobena odloučením buněk od povrchu a jejich nahuštění v jiné rovině.

Kombinací povrchových a jaderných markerů byl prokázán fenotyp pluripotentních buněk, pro další využití je ale zásadní schopnost diferenciace. Zkoušela jsem tři různé postupy – spontánní a řízenou diferenciaci a *in vivo* tvorbu teratomů. Tvorba teratomů je nejstringentnější test pluripotence dostupný pro lidské kmenové buňky, ale je časově náročný a vyžaduje pokusná zvířata. Další dva testy jsou sice méně validní, protože jsou zatíženy *in vitro* kultivačními podmínkami, zároveň jsou však méně náročné a rychlejší.

V současné době není jasné, jestli jsou nutné všechny testovací postupy. Některé z bank kmenových buněk vyžadují pouze teratomy, jiným stačí *in vitro* diferenciace, a další vyžadují kombinaci obojího (Peterson *et al.*, 2011). Bylo prokázáno, že některé kmenové buňky *in vitro* diferencují do všech tří zárodečných listů, teratomy však v plné míře tvořit nedokáží (Inamdar *et al.*, 2008; Mikkola *et al.*, 2006). Na druhou stranu, když jsou kmenové buňky schopny diferencovat, ale samovolně netvoří teratomy, mohou být méně agresivnější a tím i vhodnější pro buněčnou terapii.

Tvorba embryoidních tělísek probíhala spolehlivě u obou linií. Zvolená délka kultivace – 7 dní v nízkopřilnavých 96 jamkových destičkách a 7 dní na sklíčkách potažených Matrigelem – vedla k pozorovatelné diferenciaci do tří zárodečných listů. Bylo by však zapotřebí provést důkladnou optimalizaci metody, otestovat jak délka kultivace a množstvích nasazených buněk ovlivňuje expresi sledovaných markerů.

U protilátek barvících proteiny cytoskeletu, α aktin (mezoderm) a β3 tubulin (ektoderm), byla snadná identifikace pozitivních buněk. α aktin měl sice slabé pozadí v cytoplasmě, ale v pozitivních buňkách byla zřetelně zformovaná cytoskeletární filamenta. β3 tubulin označoval buňky výrazně odlišné morfologie – z malého buněčného těla vybíhaly dlouhé rozvětvené výběžky, vzájemně se spojující do útvarů nápadně připomínajících neuronové sítě. Fluorescence těchto buněk byla velice silná.

Použité jaderné markery nebyly v některých případech jasně vyhodnotitelné. Brachyury (mezoderm) je buď exprimován v mnoha buněčných typech, nebo použitá protilátka vykazovala vysoké pozadí. Na celé EB připadalo jen několik buněk se zřetelně identifikovatelnou fluorescencí. Obdobně se choval také marker FoxA2 (entoderm). Buňky pozitivní na Otx2 (ektoderm) se vyskytovaly v clusterech obklopených negativní populací, nejčastěji v těsné blízkosti masy EB. Naproti tomu Sox17 (entoderm) pozitivní jádra se nejčastěji nacházela v buňkách nejdále vycestovaných z EB.

Pro dobře reprodukovatelné výsledky spontánní diferenciace by bylo vhodné zvážit změnu některých markerů. Například FoxA2 se nachází ve všech orgánech entodermálního původu, ale zároveň se účastní vývoje dopaminergních neuronů (pozorovala jsem jejich koexpresi v některých buňkách pozitivních na β3 tubulin). Ideální by byla kombinace proteinů typických pro časnou a pozdní fázi diferenciace daného zárodečného listu. V budoucnu by bylo tedy vhodnější kromě šesti markerů použitých v této diplomové práci použít Pax6, Nestin (ektoderm), VEGFR2 (mezoderm) a α fetoprotein (entoderm) (Haile *et al.*, 2015; Matz *et al.*, 2015).

Řízená diferenciace přinesla totožné výsledky jako diferenciace spontánní. Obě linie byly schopny produkovat buňky všech tří zárodečných listů. Buňky podstupující diferenciaci se i morfologicky projevovaly odlišně. iPSCs směřující do entodermu masivně podléhaly apoptóze a po imunocytochemickém barvení byla většina zbylých buněk pozitivní na Sox17. Buňky ektodermální linie se udržovaly v koloniích, těsných shlucích buněk, zatímco mezodermální diferenciace vedla k buňkám rovnoměrně pokrývajícím sklíčko.

Pro charakterizaci dalších linií a klonů bude třeba zvážit, jestli řízenou diferenciaci nadále provádět s využitím komerční sady, která je od výrobce standardizovaná, ale není možné protokol upravovat, nebo jestli vytvořit vlastní diferenciační protokol. Pro efektivní porovnání spontánní diferenciace s řízenou by bylo vhodné používat stejné sady markerů.

Teratomová esej byla provedena pouze u linie EN G. iPSCs z linie HSVEC3 byly ustanoveny až později, kdy už nebylo možné je připojit do testované sady. Pozitivní nález derivátů všech tří zárodečných listů v teratomech potvrdil, že EN G jsou v požadované kvalitě.

Tato diplomová práce jasně prokázala, že je možno ze zbytkového materiálu z *V. saphena magna* izolovat kvalitní, expanze schopné endoteliální buňky, které mohou být použity pro regenerativní medicínu. Zároveň se však potvrdilo, že expanzní potenciál není neomezený. V kombinaci s reprogramací do iPSCs se otvírají neomezené možnosti klinického využití.

6. Souhrn

Téma diplomové práce: Příprava lidských indukovaných pluripotentních kmenových buněk z endoteliálních buněk pomocí episomální reprogramace

V teoretické části diplomové práce jsem se věnovala dvěma tematickým celkům: endotelu a kmenovým buňkám. Endotel je orgánová struktura, jejíž funkce je nezbytná pro udržení homeostázy. Jeho poruchy jsou spojovány s civilizačními chorobami, jako je hypertenze, ateroskleróza a další kardiovaskulární onemocnění. Tvoří ho ploché buňky navzájem propojené těsnými spoji. Jejich cytoplasma obsahuje četná vezikula, podílející se na transportu molekul mezi krví a tkáněmi. Buňky jsou charakteristické svým fenotypem, zvláště proteiny na svém povrchu, a také funkčními vlastnostmi, jako je např. angiogeneze.

Kmenové buňky jsou v dnešním pojetí skupinou buněk, lišících se především svým diferenciačním potenciálem. Mezi pluripotentní, tedy schopné tvořit všechny tři zárodečné listy, se řadí i iPSCs. iPSCs jsou vytvářeny z adultních somatických buněk, což je z etického pohledu velká výhoda oproti embryonálním kmenovým buňkám. Jsou výborným laboratorním modelem širokého spektra onemocnění a také přinášejí mnohé možnosti pro buněčné terapie.

Cílem této práce bylo připravit primokultury endoteliálních buněk a následně je s použitím epizomálních vektorů reprogramovat na iPSCs.

Podařilo se ustavit šest linií endoteliálních buněk. U všech izolátů bylo dosaženo vysoké čistoty kultury, ověřené expresí CD31 a CD144. Linie vykazovaly stabilní expresi markerů, až do dosažení senescence si udržovaly stabilně 100% pozitivitu. Zároveň si zachovávaly i funkční schopnosti – angiogeneze a absorpce LDL.

Ze dvou endoteliálních linií byly reprogramovány iPSCs s účinností 0,002 – 0,009 %. Získané buňky měly typickou morfologii – drobné buňky s velkým poměrem jádro : cytoplasma tvořící homogenní kolonie. Průtokovou cytometrií byla ověřena exprese SSEA-1, Tra-1-60 a Tra-1-80, imunocytochemicky exprese jaderných markerů Oct3/4, Sox2 a Nanog. Funkční testy, zahrnující spontánní a řízenou diferenciaci, stejně jako teratomová *in vivo* esej, potvrdily schopnost reprogramovaných buněk diferencovat do všech tří zárodečných listů.

Připravené linie, endoteliální i iPSCs, jsou v rámci CBIA využívány pro další výzkumy.

7. Summary

Diploma thesis topic: Derivation of human induced pluripotent stem cell from endothelial cell using episomal reprogramming

The theoretical part of this thesis is comprised of two major topics: endothelium and stem cells. Endothelium is an organ structure vital for maintaining homeostasis. Its malfunctions are related to lifestyle diseases such as hypertension, atherosclerosis and other cardiovascular diseases. It consists of flat cells interconnected with tight junctions. Their cytoplasm contains numerous vesicles pertaining to molecular transport between blood and tissue. The cells are characteristic by their phenotype, mostly surface proteins, and by functional properties such as angiogenesis.

In current understanding the stem cells consist of broad range of cellular types, differing mostly in their differentiation potential. iPSCs are pluripotent, capable of creating all three germ layers. iPSCs are derived from adult somatic cells, making them ethically superior to embryonal stem cells. They are excellent laboratory model for diseases and bring many possibilities for cellular therapies.

The goal of this thesis was to prepare primocultures of endothelial cells and reprogram them into iPSCs using episomal vectors.

Six lines of endothelial cells were established. All isolates were highly pure, verified by CD31 and CD144 expression. Established lines shown stable expression of markers until senescence. They also kept functional properties as angiogenesis and LDL absorption.

Two endothelial lines were reprogrammed into iPSCs with efficiency 0,002 – 0,009 %. Acquired cells shown a typical morphology of tiny cells with high nucleus : cytoplasm ratio, forming homogenous colonies. Expression of SSEA-1, Tra-1-60 and Tra-1-80 was confirmed by flow cytometry, expression of nuclear markers Oct3/4, Sox2 and Nanog by immunocytochemistry. Functional tests of both spontaneous and directed differentiation and teratoma formation confirmed ability of these cells to form all three germ layers.

The created lines, both endothelial and iPSCs, ale further used in the CBIA laboratories.

8. Literatura

Aird, W.C., 2007a. Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium I. Structure, Function, and Mechanisms. Circ. Res. 100, 158–173.

Aird, W.C., 2007b. Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium II. Representative Vascular Beds. Circ. Res. 100, 174–190.

Angelis, E.D., Moss, S.H., Pouton, C.W., 1996. Endothelial cell biology and culture methods for drug transport studies. Adv. Drug Deliv. Rev., Latest developments in modern drug delivery 18, 193–218.

Ataollahi, F., Pingguan-Murphy, B., Moradi, A., Bakar Wan Abas, W.A., Chua, K.H., Abu Osman, N.A., 2014. New method for the isolation of endothelial cells from large vessels. Cytotherapy 16, 1145–1152.

Bankston, P.W., Pino, R.M., 1980. The development of the sinusoids of fetal rat liver: Morphology of endothelial cells, Kupffer cells, and the transmural migration of blood cells into the sinusoids. Am. J. Anat. 159, 1–15.

Bar-Nur, O., Russ, H.A., Efrat, S., Benvenisty, N., 2011. Epigenetic Memory and Preferential Lineage-Specific Differentiation in Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Human Pancreatic Islet Beta Cells. Cell Stem Cell 9, 17–23.

Baudin, B., Bruneel, A., Bosselut, N., Vaubourdolle, M., 2007. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. Nat. Protoc. 2, 481–485.

Boiani, M., Schöler, H.R., 2005. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6, 872–881.

Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., Gifford, D.K., Melton, D.A., Jaenisch, R., Young, R.A., 2005. Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. Cell 122, 947–956.

Chen, S.F., Segal, M., Agarwal, A., 2004. "Lumen digestion" technique for isolation of aortic endothelial cells from heme oxygenase-1 knockout mice. Biotechniques 37, 84–+.

Chin, M.H., Mason, M.J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., Ambartsumyan, G., Aimiuwu, O., Richter, L., Zhang, J., Khvorostov, I., Ott, V., Grunstein, M., Lavon, N., Benvenisty, N., Croce, C.M., Clark, A.T., Baxter, T., Pyle, A.D., Teitell, M.A., Pelegrini, M., Plath, K., Lowry, W.E., 2009. Induced Pluripotent Stem Cells and Embryonic Stem Cells Are Distinguished by Gene Expression Signatures. Cell Stem Cell 5, 111–123.

Cines, D.B., Pollak, E.S., Buck, C.A., Loscalzo, J., Zimmerman, G.A., McEver, R.P., Pober, J.S., Wick, T.M., Konkle, B.A., Schwartz, B.S., Barnathan, E.S., McCrae, K.R., Hug, B.A., Schmidt, A.-M., Stern, D.M., 1998. Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders. Blood 91, 3527–3561.

Donnini, D., Perrella, G., Stel, G., Ambesi-Impiombato, F.S., Curcio, F., 2000. A new model of human aortic endothelial cells in vitro. Biochimie 82, 1107–1114.

Eminli, S., Foudi, A., Stadtfeld, M., Maherali, N., Ahfeldt, T., Mostoslavsky, G., Hock, H., Hochedlinger, K., 2009. Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. Nat. Genet. 41, 968–976.

Evans, M.J., Kaufman, M.H., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 292, 154–156.

Geti, I., Ormiston, M.L., Rouhani, F., Toshner, M., Movassagh, M., Nichols, J., Mansfield, W., Southwood, M., Bradley, A., Rana, A.A., Vallier, L., Morrell, N.W., 2012. A Practical and Efficient Cellular Substrate for the Generation of Induced

Pluripotent Stem Cells from Adults: Blood-Derived Endothelial Progenitor Cells. Stem Cells Transl. Med. 1, 855–865.

Gosling, M., Harley, S.L., Turner, R.J., Carey, N., Powell, J.T., 1998. Human Saphenous Vein Endothelial Cells Express a Tetrodotoxin-resistant, Voltage-gated Sodium Current. J. Biol. Chem. 273, 21084–21090.

Haile, Y., Nakhaei-Nejad, M., Boakye, P.A., Baker, G., Smith, P.A., Murray, A.G., Giuliani, F., Jahroudi, N., 2015. Reprogramming of HUVECs into Induced Pluripotent Stem Cells (HiPSCs), Generation and Characterization of HiPSCs-Derived Neurons and Astrocytes. PLOS ONE 10, e0119617.

Hanna, J., Markoulaki, S., Schorderet, P., Carey, B.W., Beard, C., Wernig, M., Creyghton, M.P., Steine, E.J., Cassady, J.P., Foreman, R., Lengner, C.J., Dausman, J.A., Jaenisch, R., 2008. Direct Reprogramming of Terminally Differentiated Mature B Lymphocytes to Pluripotency. Cell 133, 250–264.

Hewett, P., 2016. Isolation and Culture of Human Endothelial Cells from Micro- and Macro-vessels, in: Martin, S.G., Hewett, P.W. (Eds.), Angiogenesis Protocols, Methods in Molecular Biology. Springer New York, pp. 61–76.

Hewett, P.W., Murray, J.C., 1993. Human microvessel endothelial cells: Isolation, culture and characterization. Vitro Cell. Dev. Biol. - Anim. 29, 823–830.

Hofbauer, P., Riedl, S., Witzeneder, K., Hildner, F., Wolbank, S., Groeger, M., Gabriel, C., Redl, H., Holnthoner, W., 2014. Human platelet lysate is a feasible candidate to replace fetal calf serum as medium supplement for blood vascular and lymphatic endothelial cells. Cytotherapy 16, 1238–1244.

Huang, H., McIntosh, J., Hoyt, D.G., 2003. An efficient, nonenzymatic method for isolation and culture of murine aortic endothelial cells and their response to inflammatory stimuli. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 39, 43–50.

Hyslop, L., Stojkovic, M., Armstrong, L., Walter, T., Stojkovic, P., Przyborski, S., Herbert, M., Murdoch, A., Strachan, T., Lako, M., 2005. Downregulation of NANOG Induces Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Extraembryonic Lineages. STEM CELLS 23, 1035–1043.

Inamdar, M.S., Venu, P., Srinivas, M. s., Rao, K., VijayRaghavan, K., 2008. Derivation and Characterization of Two Sibling Human Embryonic Stem Cell Lines From Discarded Grade III Embryos. Stem Cells Dev. 18, 423–434.

Jackson, C.J., Garbett, P.K., Nissen, B., Schrieber, L., 1990. Binding of human endothelium to Ulex europaeus I-coated Dynabeads: application to the isolation of microvascular endothelium. J. Cell Sci. 96, 257–262.

Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G., Minick, C.R., 1973. Culture of Human Endothelial Cells Derived from Umbilical Veins. IDENTIFICATION BY MORPHOLOGIC AND IMMUNOLOGIC CRITERIA. J. Clin. Invest. 52, 2745–2756.

Junqueira, C.L., Carneiro, J., Kelley, R.O., 2002. Základy histologie. H+H.

Kajiwara, M., Aoi, T., Okita, K., Takahashi, R., Inoue, H., Takayama, N., Endo, H., Eto, K., Toguchida, J., Uemoto, S., Yamanaka, S., 2012. Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 109, 12538–12543.

Kelly, S.J., 1977. Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. J. Exp. Zool. 200, 365–376.

Kibria, G., Heath, D., Smith, P., Biggar, R., 1980. Pulmonary endothelial pavement patterns. Thorax 35, 186–191.

Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M.J., Ji, H., Ehrlich, L.I.R., Yabuuchi, A., Takeuchi, A., Cunniff, K.C., Hongguang, H., Mckinney-Freeman, S., Naveiras, O., Yoon, T.J., Irizarry, R.A., Jung, N., Seita,

J., Hanna, J., Murakami, P., Jaenisch, R., Weissleder, R., Orkin, S.H., Weissman, I.L., Feinberg, A.P., Daley, G.Q., 2010. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. Nature 467, 285–290.

Kuroda, T., Tada, M., Kubota, H., Kimura, H., Hatano, S., Suemori, H., Nakatsuji, N., Tada, T., 2005. Octamer and Sox Elements Are Required for Transcriptional cis Regulation of Nanog Gene Expression. Mol. Cell. Biol. 25, 2475–2485.

Kyttälä, A., Moraghebi, R., Valensisi, C., Kettunen, J., Andrus, C., Pasumarthy, K.K., Nakanishi, M., Nishimura, K., Ohtaka, M., Weltner, J., Van Handel, B., Parkkonen, O., Sinisalo, J., Jalanko, A., Hawkins, R.D., Woods, N.-B., Otonkoski, T., Trokovic, R., 2016. Genetic Variability Overrides the Impact of Parental Cell Type and Determines iPSCs Differentiation Potential. Stem Cell Rep. 6, 200–212.

Lister, R., Pelizzola, M., Kida, Y.S., Hawkins, R.D., Nery, J.R., Hon, G., Antosiewicz-Bourget, J., O'Malley, R., Castanon, R., Klugman, S., Downes, M., Yu, R., Stewart, R., Ren, B., Thomson, J.A., Evans, R.M., Ecker, J.R., 2011. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. Nature 471, 68–73.

Maier, J., Voulalas, P., Roeder, D., Maciag, T., 1990. Extension of the Life-Span of Human Endothelial-Cells by an Interleukin-1-Alpha Antisense Oligomer. Science 249, 1570–1574.

Marin, V., Kaplanski, G., Grès, S., Farnarier, C., Bongrand, P., 2001. Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells. J. Immunol. Methods 254, 183–190.

Marion, R.M., Strati, K., Li, H., Tejera, A., Schoeftner, S., Ortega, S., Serrano, M., Blasco, M.A., 2009. Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell 4, 141–154.

Martin, G.R., 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78, 7634–7638.

Mason, J., Lidington, E., Yarwood, H., 2007. Isolation and Analysis of Large and Small Vessel Endothelial Cells, in: Cope, A. (Ed.), Arthritis Research, Methods in Molecular Medicine. Humana Press, pp. 305–321.

Matteo, M.D., Belay, E., Chuah, M.K., VandenDriessche, T., 2012. Recent developments in transposon-mediated gene therapy. Expert Opin. Biol. Ther. 12, 841–858.

Matz, P., 2016. Human induced pluripotent stem cell–based modeling of hepatogenesis. Humboldt-Universität zu Berlin, Lebenswissenschaftliche Fakultät.

Matz, P., Wruck, W., Adjaye, J., 2015. Comparative induction of pluripotency in human umbilical vein endothelial cells and dermal fibroblasts and further differentiation into Hepatocytes. Z. Für Gastroenterol. 53, A2_13.

Mikkola, M., Olsson, C., Palgi, J., Ustinov, J., Palomaki, T., Horelli-Kuitunen, N., Knuutila, S., Lundin, K., Otonkoski, T., Tuuri, T., 2006. Distinct differentiation characteristics of individual human embryonic stem cell lines. BMC Dev. Biol. 6, 40.

Nakanishi, M., Otsu, M., 2012. Development of Sendai Virus Vectors and their Potential Applications in Gene Therapy and Regenerative Medicine. Curr. Gene Ther. 12, 410–416.

Newman, A.M., Cooper, J.B., 2010. Lab-Specific Gene Expression Signatures in Pluripotent Stem Cells. Cell Stem Cell 7, 258–262.

Ohi, Y., Qin, H., Hong, C., Blouin, L., Polo, J.M., Guo, T., Qi, Z., Downey, S.L., Manos, P.D., Rossi, D.J., Yu, J., Hebrok, M., Hochedlinger, K., Costello, J.F., Song, J.S., Ramalho-Santos, M., 2011. Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. Nat. Cell Biol. 13, 541–549.

Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., Yamanaka, S., 2008. Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors. Science 322, 949–953.

Panopoulos, A.D., Ruiz, S., Yi, F., Herrerías, A., Batchelder, E.M., Belmonte, J.C.I., 2011. Rapid and Highly Efficient Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Umbilical Vein Endothelial Cells. PLOS ONE 6, e19743.

Paulitschek, C., Schulze-Matz, P., Hesse, J., Schmidt, T., Wruck, W., Adjaye, J., Schrader, J., 2017. Generation and characterization of two iPSCs lines from human epicardium-derived cells. Stem Cell Res. 20, 50–53.

Pesce, M., Schöler, H.R., 2001. Oct-4: Gatekeeper in the Beginnings of Mammalian Development. STEM CELLS 19, 271–278.

Peterson, S., Loring, J.F., Wesselschmidt, R.L., Schwartz, P.H., 2011. Human Stem Cell Manual: A Laboratory Guide. Academic Press.

Pevny, L.H., Lovell-Badge, R., 1997. Sox genes find their feet. Curr. Opin. Genet. Dev. 7, 338–344.

Rouhani, F., Kumasaka, N., Brito, M.C. de, Bradley, A., Vallier, L., Gaffney, D., 2014. Genetic Background Drives Transcriptional Variation in Human Induced Pluripotent Stem Cells. PLOS Genet. 10, e1004432.

Sato, N., Sanjuan, I.M., Heke, M., Uchida, M., Naef, F., Brivanlou, A.H., 2003. Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse. Dev. Biol. 260, 404–413.

Sidney, L.E., Branch, M.J., Dunphy, S.E., Dua, H.S., Hopkinson, A., 2014. Concise Review: Evidence for CD34 as a Common Marker for Diverse Progenitors. Stem Cells Dayt. Ohio 32, 1380–1389.

Simara, P., Motl, J.A., Kaufman, D.S., 2013. Pluripotent stem cells and gene therapy. Transl. Res., Gene Therapy for Human Disease: Clinical Advances and Challenges 161, 284–292.

Stadtfeld, M., Maherali, N., Breault, D.T., Hochedlinger, K., 2008a. Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. Cell Stem Cell 2, 230–240.

Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., Hochedlinger, K., 2008b. Induced Pluripotent Stem Cells Generated Without Viral Integration. Science 322, 945–949.

Stevens, L., Little, C., 1954. Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 40, 1080–1087.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. Cell 131, 861–872.

Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. Cell 126, 663–676.

Tang, C., Shao, X., Sun, B., Huang, W., Zhao, X., 2009. The Effect of Self-Assembling Peptide RADA16-I on the Growth of Human Leukemia Cells in Vitro and in Nude Mice. Int. J. Mol. Sci. 10, 2136–2145.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M., 1998. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. Science 282, 1145–1147.

Tokunaga, O., Fan, J.L., Watanabe, T., 1989. Atherosclerosis- and age-related multinucleated variant endothelial cells in primary culture from human aorta. Am. J. Pathol. 135, 967–976.

Valentijn, K.M., Sadler, J.E., Valentijn, J.A., Voorberg, J., Eikenboom, J., 2011. Functional architecture of Weibel-Palade bodies. Blood 117, 5033–5043.

Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., Campbell, K.H.S., 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature 385, 810–813.

Wisse, E., Braet, F., Duimel, H., Vreuls, C., Koek, G., Olde Damink, S.W., van den Broek, M.A., De Geest, B., Dejong, C.H., Tateno, C., Frederik, P., 2010. Fixation methods for electron microscopy of human and other liver. World J. Gastroenterol. 16, 2851.

Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J., Holash, J., 2000. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. Nature 407, 242–248.

Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I.I., Thomson, J.A., 2009. Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences. Science 324, 797–801.

Yu, J., Thomson, J.A., 2008. Pluripotent stem cell lines. Genes Dev. 22, 1987–1997.

Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I.I., Thomson, J.A., 2007. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. Science 318, 1917–1920.

Zhang, W.Y., de Almeida, P.E., Wu, J.C., 2012. Teratoma formation: A tool for monitoring pluripotency in stem cell research, in: StemBook. Harvard Stem Cell Institute, Cambridge (MA).

Zhao, Yang, Yin, X., Qin, H., Zhu, F., Liu, H., Yang, W., Zhang, Q., Xiang, C., Hou, P., Song, Z., Liu, Y., Yong, J., Zhang, P., Cai, J., Liu, M., Li, H., Li, Y., Qu, X., Cui, K., Zhang, W., Xiang, T., Wu, Y., Zhao, Yiding, Liu, C., Yu, C., Yuan, K., Lou, J., Ding, M., Deng, H., 2008. Two Supporting Factors Greatly Improve the Efficiency of Human iPSCs Generation. Cell Stem Cell 3, 475–479.