UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI
Ústav patologické fyziologie

MOŽNOSTI A VÝZNAM DLOUHODOBÉ KULTIVACE EMBRYONÁLNÍCH BUNĚK RŮZNÝCH ŽIVOČIŠNÝCH DRUHŮ

Mgr. Zbyněk Houdek

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program Fyziologie a patologické fyziologie

Plzeň 2012

Disertační práce byla vypracována v rámci prezenčního a kombinovaného studia doktorského studijního programu Fyziologie a patologické fyziologie na Ústavu patologické fyziologie Lékařské fakulty UK v Plzni.

Autor:

Mgr. Zbyněk Houdek

Školitel:

Doc. MUDr. František Vožeh, CSc.
Lékařská fakulta UK v Plzni, Ústav patologické fyziologie, Plzeň

Oponenti:

Doc. RNDr. Bártová Eva, Ph.D.
Biofyzikální ústav, AV ČR, Brno

Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.
1. LF UK, Fyziologický ústav, Praha

Obhajoba se koná
dne: 15.3. 2012
čas: 14:00
místo: 1. LF UK, Fyziologický ústav, Praha

Tato práce vznikla za podpory výzkumného záměru VZ MSM 0021620816, grantů IGA MZd NR/ 9135-3, COST B 30/2007 OC 152 MŠMT a COST OC 10038. Studie byla dále podpořena projekty SVV 260 806/2010, SVV 262805/2011 a SVV 262806/2011.

S disertační prací je možné se seznámit na děkanátu LF UK v Plzni, Husova 3, 306 05 Plzeň (tel.: +420 377 593 400).

Předseda komise pro obhajoby disertačních prací v oboru Fyziologie a patologické fyziologie:

Doc. MUDr. František Vožeh, CSc.

Obsah

1 Seznam použitých zkratek.....5
2 Abstrakt.....7
3 Abstract.....8
4 Úvod.....9
4.1 Embryonální buňky a jejich typy.....9
4.2 Charakterizace kmenových buněk.....10
4.3 Leukemický inhibiční faktor (LIF) a jeho funkce.....10
4.4 LIF a jeho vliv na ES a EC buňky.....11
4.5 Diferenciace embryonálních kmenových buněk *in vitro* 11
4.6 Buněčná terapie a neurotransplantace.....12
5 Východiska a cíle.....14
5.1 Kultivace, neurodiferenciace a následná charakterizace myších ES buněk.....14
5.2 Transplantace nediferencovaných EC P19 buněk a z nich odvozených diferencovaných neurálních progenitorů (NPG) do CNS modelových laboratorních myší s neurodegenerativním onemocněním.....14
5.3 Studium mutací v genu pro LIF a jejich vztahu k plodnosti žen 14
6 Materiál a metody.....15
6.1 Kultivace, neurodiferenciace a následná charakterizace myších ES buněk.....15
6.2 Transplantace nediferencovaných EC P19 buněk a z nich odvozených NPG do CNS modelových laboratorních myší s neurodegenerativním onemocněním.....20
6.3 Studium mutací v genu pro LIF a jejich vztahu k plodnosti žen 22
7 Výsledky.....24
7.1 Kultivace, neurodiferenciace a následná charakterizace myších ES buněk.....24
7.2 Transplantace nediferencovaných EC P19 buněk a z nich odvozených NPG do CNS modelových laboratorních myší s neurodegenerativním onemocněním.....27
7.3 Studium mutací v genu pro LIF a jejich vztahu k plodnosti žen 30
8 Diskuze.....31
8.1 Charakterizace myších ES buněk.....31
8.2 Transplantace EC P19 buněk do mozečku myší...32

8.1 Studium mutací v genu pro LIF a jejich vztahu k plodnosti žen 35
9 Závěry 36
9.1 Kultivace, neurodiferenciace a následná charakterizace myších ES buněk 36
9.2 Transplantace EC P19 buněk do mozečku myší ...36
9.3 Závěry pro praxi ve studii mutací v genu pro LIF a jejich vztahu k plodnosti žen 37
10 Seznam použité literatury 37
11 Přehled publikační činnosti 44
11.1 Články v časopisech 44
11.2 Postery na odborných setkáních 45
11.3 Prezentace na odborných setkáních 46

1 Seznam použitých zkratek

AFP	α-fetoprotein
BMP	kostní morfogenní protein
CMP	cevní mozková příhoda
CNS	centrální nervový systém
D0-D15	1.-15. den kultivace nebo diferenciace buněk
DAPI	4´, 6-diamidino-2-fenylindol dihydrochlorid
DMEM	základní kultivační médium
DMEM/F12	bezsérové diferenciační médium
EBs	embryoidní tělíska
EC	embryonální karcinomové buňky
EG	primordiální zárodečné buňky
EpiSCs	kmenové buňky epiblastu
ES	embryonální kmenové buňky
FBS	fetální bovinní sérum
FITC	fluoresceinizothiokyanát
GATA	transkripční faktor
GFAP	gliální fibrilární kyselý protein
GFP	zeleně fluoreskující protein
hES	lidské embryonální kmenové buňky
HPRT	housekeeping gen
HSCs	hematopoetické kmenové buňky
ICM	buňky embryoblastu
IHC a ICC	imunohistochemie a imunocytochemie
IL	interleukin
IVF	*in vitro* fertilizace
Lc	Lurcher
LeX	karbohydrátový povrchový epitop Lewis-X
LIF	leukemický inhibiční faktor
MAP-2	protein nacházející se v těle a dendritech neuronů
MASH-1	gen exprimovaný v diferencujících neuronech
Nanog	transkripční faktor
N-CAM	protein na povrchu neuronů
NPG	neuroprogenitory
Oct-3/4	transkripční faktor
PAX-6	gen pro transkripční faktor
PBS	fyziologický roztok
PCOS	syndrom polycystických ovárií
PD	Parkinsonova choroba
r.t.	pokojová teplota

RA	kyselina retinová
RT-qPCR	reverzní transkripce - kvantitativní real-time polymerázová řetězová reakce
SSEA	povrchové karbohydrátové epitopy
WB	western blot
WT	wild type

2 Abstrakt

Embryonální buňky uvnitř blastocysty, které se dále dělí a diferencují v buňky všech tkání organismu se nazývají embryonální kmenové (ES) buňky. Využití lidských ES buněk formou transplantací je jednou z možných cest regenerativní medicíny.

Předložená práce zahrnuje studium 2 různých linií myších pluripotentních buněk - embryonálních karcinomových buněk (EC) P19 a ES buněk linie D3. Buňky jsme kultivovali v základním kultivačním médiu s fetálním bovinním sérem (FBS) a navíc u ES buněk s leukemickým inhibičním faktorem (LIF). Tyto složky zajišťují jejich pluripotenci a sebeobnovu. Následovala jejich neurodiferenciace změnou kultivačního média, bez FBS a u ES buněk i bez LIF. Naopak do média byla přidávána k indukci neurodiferenciace retinová kyselina (RA) a u ES buněk byla navíc zařazena kultivace embryoidních tělísek (EBs). Pluripotence a neurodiferenciace buněk byla ověřena molekulárně-biologickými metodami, kterými byly zjištěny u obou linií nediferencovaných buněk markery pluripotence a po jejich neurodiferenciaci přítomnost neuronálních markerů.

Následovaly transplantace, při nichž byly myší EC P19 buňky trvale transfekované genem pro zeleně fluoreskující protein (GFP) aplikovány do zdravého mozečku myší typu wild (WT) a postiženého mozečku myší typu Lurcher (Lc). Byly použity nediferencované buňky (P19) a od nich odvozené neuroprogenitory (NPG) a hodnoceno bylo přežívání, morfologie a lokalizace transplantátu.

Přežívání obou typů GFP pozitivních transplantátů bylo srovnatelné a nezávislé na typu myši. Přežívání NPG i P19 buněk bylo významně nižší u myší Lc než u myší WT. Destrukce uvnitř transplantátu byly zjištěny pouze v transplantátech s NPG, expanze byla přítomna vždy po aplikaci P19 buněk a méně u NPG. Transplantované buňky nemigrovaly a nešířily se v rámci mozečku. Fenotyp GFP pozitivních transplantovaných buněk byl prokázán imunohistochemicky přítomností neuronálních markerů. Z hlediska lokalizace se transplantát vyskytoval u myší WT převážně v mozečku, ale u myší Lc vždy mimo mozeček s neurodegenerací.

LIF jsme se dále věnovali v širším kontextu – význam tohoto cytokinu v časné embryogenezi a tím pádem i v plodnosti je široce zkoumán i u lidí a nejen na buněčných liniích. Zkoumali jsme tedy i význam LIF na plodnost a věnovali jsme se přímé korelaci mutací

v genu pro LIF s plodností žen. Vyšetřovali jsme mutace v genu pro LIF jak v populaci infertilních žen, tak v kontrolní populaci zdravých plodných žen. U 15 neplodných žen byla nalezena identická mutace v exonu 3 na pozici 3400 genu pro LIF, která vede při translaci k záměně valinu za methionin v kodónu 64 (V64M), jež je součástí AB kličky LIF proteinu, klíčové oblasti v interakci s receptorem pro LIF. Následně byl zkoumán vliv této mutace na úspěšnost léčby neplodnosti těchto žen ve srovnání se skupinou neplodných žen bez mutace.

3 Abstract

Embryonic cells inside the blastocyst, which divide and differentiate into cells of all tissues of organism, are called embryonic stem (ES) cells. Using the ES cells for transplantations is one the potential ways in regenerative medicine.

The present study deals with two different lines of mouse pluripotent cells: embryonic carcinoma (EC) cells line P19 and ES cells line D3. The *in vitro* cultivation was performed in basal cultivation medium with fetal bovine serum (FBS) and in addition of leukemia inhibitory factor (LIF) in case of ES cells. The neurodifferentiation was induced by medium without FBS and without LIF in case of ES cells and supported by retinoic acid in case of P19 cells and embryoid bodies cultivation in case of ES cells. Pluripotency and neurodifferentiation of the cells were confirmed by presence of molecular markers of pluripotency and neurodifferentiation in both lines in nondifferentiated and differentiated states.

Mouse EC P19 cells were transfected by gene for green fluorescent protein (GFP) and used for transplantation in cerebellum of wild type (WT) and Lurcher (Lc) mutant mice. Nondifferentiated cells (P19) and neuroprogenitors (NPG) derived from these cells were used. The study followed the survival, morphology and localization of the grafts.

The survival of both types of GFP grafts was similar in both types of mouse. Survival of NPG and P19 cells was significantly lower in cerebellum of Lc than WT mice. Destructions of grafts were found only in NPG grafts; expansions were more frequent in grafts with P19 cells, than in NPG grafts. The transplanted cells didn't migrate nor spread into cerebellum. The phenotype of GFP transplanted cells was confirmed by presence of neuronal markers

by using immunohistochemistry. Grafts were localized in WT mouse mainly in cerebellum on the contrary to Lc mouse, where they were localized outside the degenerated cerebellum only.

Part of the presented study was focused on the characteristic of LIF and its impact on early embryogenesis. This also means its importance for fertility which is deeply investigated also in humans and not only in cell lines. So the part of the study was dedicated to the correlation of the LIF gene status and fertility in women. We investigated the prevalence of the LIF gene mutations in the population of infertile and control healthy fertile women. In fifteen infertile women the potentially functional LIF gene mutation, the G to A transitions at the position 3400 leading to the valin to methionin exchange at codon 64 (V64M) in the AB loop region of the LIF protein, were detected. Finally, the possible impact of this mutation on the infertility treatment outcome was followed.

4 Úvod

4.1 Embryonální buňky a jejich typy

První embryonální buňky vzniklé z oplozeného vajíčka se nazývají blastomery a mají schopnost vytvářet a diferencovat se v dceřiné buňky všech 3 zárodečných listů (ektoderm, mesoderm a entoderm) a také v buňky extraembryonálních tkání. Tyto buňky jsou stejně jako zygota totipotentní. Pak následuje stadium moruly a dále u savců blastocysty, jež obsahuje embryoblast, ze kterého jsou odvozeny embryonální kmenové buňky (ES-embryonic stem cells). Embryonální kmenové buňky jsou pluripotentní. Mezi embryonální buňky s vysokou schopností diferenciace náleží též primordiální zárodečné buňky (EG-embryonic germ c.) a nakonec embryonální nádorové buňky (EC-embryonic carcinoma c.). Pluripotentní buňky lze *in vitro* za určitých laboratorních podmínek nejen diferencovat v buňky ektodermu, mesodermu a entodermu, ale také nekonečně množit [Filip et al., 2006]. U myší byly odvozeny kmenové buňky epiblastu (epiblast stem cells-EpiSCs) [Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007].

Každá tkáň dospělého organismu obsahuje malou subpopulaci buněk, které jsou schopné sebeobnovy a neomezené proliferace, tzv. multipotentní adultní kmenové buňky. V léčbě jsou nejvíce

používány lidské hematopoetické kmenové buňky (HSCs), které jsou získávány z kostní dřeně [Filip et al., 2006].

4.2 Charakterizace kmenových buněk

ES buňky jako pluripotentní buňky není možné využívat bez jejich detailní *in vitro* charakterizace. Ta se provádí u jednotlivých linií ES buněk např. z důvodu zvýšení bezpečnosti buněčné terapie před jejich transplantací [Gersh et al., 2009]. Jsou studovány jejich vedlejší účinky a další problémy spojené s přežíváním a funkčností transplantátu (např. nízké přežívání či naopak neomezená proliferace a vznik tumorů). Mezi některé molekulární znaky, které charakterizují pluripotentní embryonální buňky lidí a myší náleží např.:

SSEA-1 (stage-specific embryonic antigen) - povrchový antigen (glykosfingolipid) blastomer, vznikajících při rýhování embryoblastu (ICM-inner cell mass) a trofektodermu pozdní blastuly nebo moruly myši. Charakteristický povrchový karbohydrát ES a EC buněk, jenž je u myší zastoupen epitopem Lewis X [Muramatsu et al., 2008].

Oct-3/4 - transkripční faktor rodiny POU, který je exprimován v totipotentních a pluripotentních buňkách, kam náleží i EC a ES buňky [Gardner et al., 2006].

4.3 Leukemický inhibiční faktor (LIF) a jeho funkce

LIF je vysoce glykosylovaný protein (38-67 kDa), který byl jako jeden z prvních používán pro kultivaci ES buněk. Náleží mezi cytokiny rodiny interleukinu 6 (IL-6). Cytokiny této rodiny se v dospělém organismu uplatňují v krvetvorném, nervovém, kardiovaskulárním a endokrinním systému a také při změnách kostní a tukové tkáně [Kotasová, 2009].

LIF má velice důležitou úlohu i v embryo-endometriální komunikaci savců [např. Herrler et al., 2003; Stewart et al., 1992]. Předpokládalo se, že vysoká hladina exprese LIF by mohla být indikátorem připraveného endometria u fertilní ženy. Avšak během studií byly zjištěny velice rozdílné výsledky týkající se hladin exprese LIF v

endometriu pacientek. Dokonce ani po vyloučení dalších příčin infertility (ovariální, tubární a andrologický faktor a endometrióza), není samotné zjištění hladiny LIF dostačující pro stanovení potenciálu implantace embrya u žen s idiopatickou infertilitou. To je v kontrastu s klíčovou rolí LIF v endometriu myší [Aghajanova, 2010].

4.4 LIF a jeho vliv na ES a EC buňky

ES buňky mají schopnost sebeobnovy, která je charakteristická pro všechny typy kmenových buněk. U myších ES buněk je tato vlastnost závislá na signálech cytokinů LIF nebo BMP4 (kostní morfogenní protein 4). Navíc na této vnější regulaci genové exprese se podílí ještě přítomnost vnitřních transkripčních faktorů nediferencovaného stavu, jako jsou Oct-3/4 a Nanog [Chambers a Smith, 2004].

Lidské ES buňky tedy, stejně jako myší, exprimují Oct-3/4 a Nanog, ale podmínky ve směru sebeobnovy lidských ES buněk za přítomnosti Nanog nejsou ještě zcela jasné. Lidské ES buňky mají, navíc schopnost sebeobnovy i bez vnějšího přidávání LIF [Thomson et al., 1998; Reubinoff et al., 2000].

4.5 Diferenciace embryonálních kmenových buněk in vitro

Podíl diferencovaných ES buněk v laboratorních podmínkách je většinou mnohem menší, než *in vivo*. Nezastupitelnou roli při tomto procesu zaujímá metoda embryoidních tělísek (EBs – embryoid bodies), při které dochází k odstranění LIF a ES buňky se kultivují ve visící kapce [např. Wiles, 1993; Dang et al., 2004]. Výsledkem tohoto procesu může být jednak chaotická struktura nebo může docházet k diferenciaci ES buněk v buňky svalové, keratinocyty, melanocyty, neurony, gliové, epitelové, hematopoetické buňky, buňky secernující inzulin a mohou vytvořit i žloutkový váček. Při této spontánní diferenciaci je efektivita její indukce velice odlišná, a tak byly vypracovány postupy, jak ji zefektivnit. Jedním z nich je přidávání různých cytokinů, prodiferenciačních induktorů a růstových faktorů.

U EC buněk indukuje neurální diferenciaci např. bezsérové prostředí a umocňuje působení prodiferenciačního induktoru RA [např. Jones-Villeneuve et al., 1983; Pacherník et al., 2005], o níž je známo, že *in vitro* podporuje diferenciaci pluripotentních buněk různými směry [Phillips et al., 2004]. Také u ES buněk způsobuje RA neurogenezi [Bain et al., 1995; Fraichard et al., 1995].

4.6 Buněčná terapie a neurotransplantace

V současné době jsou vkládány velké naděje do léčebných postupů založených na transplantaci kmenových buněk. Pro buněčnou terapii jsou vhodné nemoci, které jsou následkem destrukce či dysfunkce určitého omezeného počtu typů buněk. Mezi tyto nemoci patří např. Parkinsonova nemoc (PD), jejímž důsledkem je destrukce dopaminergních neuronů v oblasti *substantia nigra* středního mozku [Filip et al., 2006]. Přínos transplantace kmenových buněk pacientům s Huntigtonovou choreou, s cévní mozkovou příhodou (CMP) či s míšním poraněním je v současnosti ověřován v rámci mnoha studií na laboratorních zvířatech nebo i formou klinických studií [např. Zhang et al., 1996; Kim a de Vellis, 2009]. Transplantace embryonální tkáně je v klinické praxi používána od 80. let 20. století k léčbě PD [Björklund a Lindvall, 2000]. Mezi neurodegenerativní choroby patří i dědičné ataxie, které postihují mozeček, jeho spoje a případně další části nervového systému [Cendelín, 2008].

K objasnění skutečnosti, který typ kmenových buněk bude pro neurotransplantace nejvodnější, je tato buněčná terapie prováděna s různými typy ES buněk na experimentálních modelech laboratorních zvířat např. s mozečkovou degenerací [Kim a de Vellis, 2009].. K nejznámějším přirozeným mutantům s degenerací mozečku patří myši typu Lc. Tyto myši jsou modelem olivocerebelární degenerace, kdy heterozygoti nesou mutaci genu pro δ2 podjednotku glutamátového receptoru. Tato porucha vyvolává apoptózu Purkyňových buněk, která následně vede k sekundárnímu úbytku granulárních buněk mozečku a neuronů dolní olivy. Důsledkem této degenerace jsou ataxie, poruchy prostorového učení a orientace [Cendelín, 2008].

Jednou z možností je transplantace neuronů nebo neuroprogenitorů diferencovaných z kmenových buněk pocházejících z teratokarcinomu [např. Brinster, 1974; Hara et al., 2008].

Zralé neurony je možno charakterizovat podle jedinečné morfologie, což není *in vitro*, ale ani *in vivo* vždy dostačující. Proto je třeba dokazovat přítomnost obecných neuronálních znaků imunocytochemicky nebo imunohistochemicky [Filip et al., 2006] např.:

MAP-2 (microtubule-associated protein 2) - mRNA a protein jsou lokalizovány v dendritech, ale ne vždy v tělech neuronů, což dokazuje, že nově syntetizovaná RNA je transportována do dendritů diferencujících neuronů, kde dochází k proteosyntéze [Dehmelt a Halpain, 2004].

Kalbindin (calcium-binding protein) - protein exprimovaný Purkyňovými buňkami mozečku. Může zlepšovat pohybovou koordinaci. Podílí se na formování synapsí mezi těmito buňkami mozečku. Dále ho mohou exprimovat i další neurony mozku [Barski et al., 2003].

5 Východiska a cíle

5.1 Kultivace, neurodiferenciace a následná charakterizace myších ES buněk

5.1.1 Kultivace, neurodiferenciace a následná charakterizace myších EC P19 buněk

Nediferencované EC P19 buňky byly kultivovány v sérovém médiu, pak byly diferencovány pomocí RA a média bez séra do stadia NPG a neuronů. Všechna stadia byla charakterizována na přítomnost znaků pomocí imunocytochemie, RT-qPCR a WB.

5.1.2 Kultivace, neurodiferenciace a následná charakterizace myších ES D3 buněk

Nediferencované myší ES buňky linie D3 byly kultivovány v sérovém médiu s LIF. Neurodiferenciace byla započata tvorbou EBs v médiu bez LIF a pak byla indukována RA v bezsérovém médiu a dokončena v médiu bez RA. Obě stadia byla charakterizována na přítomnost markerů imunocytochemicky a WB.

5.2 Transplantace nediferencovaných EC P19 buněk a z nich odvozených diferencovaných neurálních progenitorů (NPG) do CNS modelových laboratorních myší s neurodegenerativním onemocněním

EC P19 buňky byly trvale transfekovány genem pro GFP. Tyto elementy byly transplantovány do mozečků dospělých myší typu Lc kmene B6CBA a typu WT téhož kmene. Bylo sledováno jejich přežívání.

5.3 Studium mutací v genu pro LIF a jejich vztahu k plodnosti žen

Stanovili jsme výskyt mutací v genu pro LIF ve sledované populaci neplodných žen a porovnali jej s kontrolní populací plodných žen bez mutace.

6 Materiál a metody

6.1 Kultivace, neurodiferenciace a následná charakterizace myších ES buněk

6.1.1 Kultivace, neurodiferenciace a následná charakterizace myších EC P19 buněk

Kultivace nediferencovaných EC P19 buněk

Linie myších buněk EC P19 byla získána z European Collection of Cell Culture, Wiltshire, UK. Tyto buňky byly kultivovány v nediferencovaném stavu v kultivačním médiu (Dulbecco's modified Eagle's medium-DMEM) s FBS, penicilinem a streptomycinem (GIBCO BRL, Chemos CZ, Prague, Czech Republic) [Pacherník et al., 2005; Hong et al., 2008].

Neurodiferenciace EC P19 buněk

Diferenciace EC P19 buněk v neuronální buňky byla provedena v bezsérovém médiu DMEM/F12 (1:1) s antibiotiky. Neurogeneze byla indukována RA v médiu po 2 dny ($c= 5x10^{-7}$ M, Sigma, Prague, Czech Republic) a pak bez RA [Pacherník et al., 2005; Houdek et al., 2010].

Charakterizace nediferencovaných a diferencovaných EC P19 buněk

EC P19 buňky byly charakterizovány RT-qPCR (reverzní transkripce - kvantitativní real-time polymerázová řetězová reakce), imunocytochemicky a WB nejprve v nediferencovaném stavu (D0), pak po 3 dnech diferenciace (D3 - stadium NPG) a nakonec po 10 dnech neurodiferenciace (D10).

RT-qPCR

Celková RNA byla ze vzorků získána užitím izolačního kitu Fast RNA Pro Green Kit (Q-BIOgene, Irvine, CA, USA). Reverzní transkripce

(RT) byla provedena ze 3 μg celkové RNA reverzní transkriptázou Superscript III (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Sekvence použitých primerů (GeneriBiotech, Hradec Králové) jsou uvedeny v tab. 1 [Ešner et al., 2002; Hong et al., 2008].

Jako housekeeping gen byl zvolen HPRT (gen pro hypoxanthin fosforibosyltransferásu) [např. Sellner a Turbett, 1996; Specht et al., 2001].

Gen pro α-fetoprotein (AFP) - znak diferenciace v buňky entodermálního původu při vývoji EBs [Lafuste et al., 2002].

Gen GATA-4 - marker buněk raného entodermálního původu a vývoj kardiomyocytů [Holtzinger et al., 2010].

Gen Brachyury - esenciální transkripční faktor vývoje buněk mesodermálním směrem [např. Kispert a Hermann, 1993; Pekkanen-Mattila et al., 2010].

Výsledky kvantifikace exprese vybraných genů jsou udány jako relativní (vztažené k expresi HPRT genu) a byly získány za užití $2^{-\Delta Ct}$ přístupu [Koike et al., 2007].

Tab. 1 – Primery užité pro analýzu exprimovaných genů

Gen	Forward primer	Reverse primer	Délka (bp)
PAX-6	5'-TGCCCTTCCATCTTTGCTTG-3'	5'-TCTGCCCGTTCAACATCCTTAG-3'	178
MASH-1	5'-CTCGTCCTCTCCGGAACTGATG-3'	5'-CGACAGGACGCCCGCCTGAAAG-3'	303
Brachyury	5'-GAGAGAGAGCGAGCCTCCAAAC-3'	5'-GCTGTGACTGCCTACCAGAATG-3'	230
GATA-4	5'-GAAAACGGAAGCCCAAGAACC-3'	5'-TGCTGTGCCCATAGTGAGATGAC-3'	186
AFP	5'-ATGTATGCCCCAGCCATTCTGTCC-3'	5'-GAGATAAGCCTTCAGGTTTGACGC-3'	466
HPRT	5'-CTTGCTGGTGAAAAGGACCTCTC-3'	5'-CAAATCAAAAGTCTGGGGACGC-3'	350

Imunocytochemie (ICC)

Nediferencované a diferencované EC P19 buňky byly kultivovány dle příslušných výše uvedených protokolů na speciálních krycích sklíčkách. Byly opláchnuty fyziologickým roztokem (PBS) a fixovány paraformaldehydem (t=4℃). Poté byly permeabilizová ny roztokem PBS s detergenty. Pak byl aplikován blokovací roztok a byly značeny primárními protilátkami (viz tab. 2, t= 4℃). Potom byly propláchnuty roztokem Tweenu 20 v PBS. Dále byly přeznačeny při r.t. příslušnými sekundárními protilátkami dle tab. 2 v roztoku PBS s FBS a s Tweenem 20. Nakonec byly označené zality montovacím médiem s DAPI (MILIPORE) a pozorovány fluorescenčním mikroskopem Olympus BX 41. U nediferencovaných EC buněk byl stanoven povrchový marker LeX antigen (protilátka FORSE-1).

Tab. 2 – Protilátky a jejich ředění použité při imunocytochemii

EC a ES buňky	Primární protilátky	Ředění	Sekundární protilátky	Ředění
Nediferencované	Hybridoma FORSE-1 (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa)	1:1	anti-mouse IgG+IgM (FITC, Invitrogen)	1:750
	Oct-3/4 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)	1:200	anti-mouse IgG Alexa Fluor 568 (Invitrogen)	1:200
Diferencované	MAP-2 (SIGMA-ALDRICH)	1:500	anti-mouse IgG (FITC, SIGMA-ALDRICH)	1:150

Western blot (WB)

Buňky byly promyty PBS a zlyzovány pufrem (Tris-HCl a glycerol) s roztokem dodecyl sulfátu sodného (SDS). Koncentrace proteinů byla určována použitím DC Protein Assay Kit (Bio-Rad) a SDS-PAGE. Po elektroforéze byly separované proteiny detekovány užitím primárních a sekundárních protilátek a vizualizovány dle návodu ECL+Plus reagent (Amersham Pharmacia Biotech). Použité protilátky: myší monoklonální protilátka proti N-CAM (neural-cell adhesion molecule; C0678, SIGMA-ALDRICH), myší monoklonální protilátka proti β-III tubulinu (11-264-C100, ExBio), králičí polyklonální protilátka proti p27 (sc-528, Santa Cruz Biotech.), králičí polyklonální protilátka proti Oct-3/4 (sc-9081, Santa Cruz Biotech.) a

králičí polyklonální protilátka proti cdk4 (sc-260, Santa Cruz Biotech.).

6.1.2 Kultivace, neurodiferenciace a následná charakterizace myších ES D3 buněk

Kultivace nediferencovaných mES D3 buněk

Také linie myších ES buněk D3 byla získána z European Collection of Cell Culture, Wiltshire, UK. Tyto buňky byly kultivovány na mitomycinem C ošetřených myších embryonálních fibroblastech v DMEM obsahujícím FBS a LIF. Pak byly tyto buňky adaptovány na kultivaci bez podpůrných fibroblastů.

Neurodiferenciace myších mES D3 buněk

Neurodiferenciace ES buněk byla započata vytvořením embryoidních tělísek (EBs) na neadhesivních miskách v DMEM médiu bez LIF. EBs byla přenesena na standardní kultivační misky. Neurodiferenciace byla indukována na 1 misce výměnou média DMEM/F12 a na 2 dny přidáním RA (c= 5 x10^{-7}M) [Bain et al., 1995; Okabe et al., 1996; Pacherník et al., 2002a], zatímco do 2. ne. Potom byly všechny ES D3 buňky diferencovány v bezsérovém médiu 8 dní.

Charakterizace nediferencovaných a diferencovaných ES D3 buněk

ES D3 buňky byly charakterizovány imunocytochemicky v nediferencovaném stavu (D0), po 15 dnech diferenciace (D15). Western blot byl prováděn u obou diferenciačních pokusů 7., 11., 13. a nakonec 15. den diferenciace (D15).

Imunocytochemie (ICC)

Nediferencované a diferencované mES D3 buňky byly kultivovány dle uvedených protokolů. Potom byly opláchnuty PBS a fixovány v paraformaldehydu (t=4℃). Po té byly permeabilizová ny roztokem

PBS s detergenty, pak byl aplikován blokovací roztok (t= 4℃). Značení buněk primárními protilátkami probíhalo v blokovacím roztoku (tab. 2, navíc β-III tubulin, SIGMA-ALDRICH=1:500, t=4℃). Následně byly buňky propláchnuty roztokem Tweenu 20 v PBS. Potom byly přeznačeny sekundárními protilátkami v roztoku PBS s FBS a Tweenem 20 (tab. 2, navíc anti-mouse IgG, FITC, SIGMA-ALDRICH=1:150). Nenavázané sekundární protilátky byly vymyty roztokem Tweenu 20 v PBS. Označené buňky byly zality montovacím médiem s DAPI (MILIPORE) a pozorovány fluorescenčním mikroskopem Olympus BX 41.

Western blot (WB)

Analyzované buňky byly promyty PBS a zlyzovány pufrem (Tris-HCl, glycerol) s roztokem SDS. Koncentrace proteinů byla určována použitím DC Protein Assay Kit (Bio-Rad) a analyzovány pomocí SDS-PAGE. Po elektroforéze byly separované proteiny detekovány užitím primárních a sekundárních protilátek a vizualizovány dle návodu ECL+Plus reagent (Amersham Pharmacia Biotech). Byly použity protilátky: myší monoklonální protilátka proti N-CAM (neural-cell adhesion molecule; C0678, Sigma), myší monoklonální protilátka proti isotypu neuronálně-specifického β-III tubulinu (11-264-C100, ExBio) a králičí polyklonální protilátka proti cdk4 (sc-260, Santa Cruz Biotech).

6.2 Transplantace nediferencovaných EC P19 buněk a z nich odvozených NPG do CNS modelových laboratorních myší s neurodegenerativním onemocněním

6.2.1 Kultivace nediferencovaných a permanentní transfekce EC P19 buněk

Kultivace EC P19 buněk byla prováděna *in vitro* za výše uvedených podmínek. Permanentní transfekce buněk byla provedena užitím GFP plasmidu (Clontech Laboratories, Inc.) dle návodu CalPhos^{TM} Mammalian Transfection Kit.

6.2.2 **Diferenciace NPG EC P19 buněk**

Trvale transfekované EC P19 buňky byly diferencovány uvedenou kultivací do stadia NPG. Následně byly NPG transplantovány do mozečku myší.

6.2.3 **Pokusná zvířata**

Celkem 101 dospělých laboratorních myší typu WT a Lc kmene B6CBA bylo chováno za standardních podmínek konvenčního chovu. 25 myším typu WT a 25 myším typu Lc byly transplantovány nediferencované EC P19 buňky. 26 myší typu WT a 25 myší Lc dostalo NPG.

6.2.4 **Transplantace**

Transplantace byla provedena v celkové anestezii směsí ketaminu a xylazinu aplikovanou intraperitoneálně (i.p.). V okcipitální kosti ve střední čáře mezi lambdou a úpony šíjových svalů myši (bregma – 7,0 mm) byl vyvrtán otvor o průměru do 2 mm. Mikrostříkačkou Hamilton byl do jejího mozečku injikován 1 µl suspenze (50 000 buněk v DMEM).

6.2.5 **Histopatologické vyhodnocení transplantací**

21 dnů po transplantaci byly pokusné myši usmrceny hlubokou anestezií (tiopental i.p.) a transkardiálně perfundovány PBS. Postfixovány byly několik dnů v paraformaldehydu. Kryoprotekce probíhala v roztoku sacharózy, pak byly mozečky krájeny na kryostatu na 40 µm silné frontální řezy a vyšetřeny a vyfotografovány fluorescenčním mikroskopem. U GFP pozitivních transplantátů byla posuzována lokalizace a základní morfologie. Každý 2. řez byl obarven hematoxylin-eosinem a zbylé řezy byly obarveny dle Nissla.

6.2.6 **Imunohistochemie (IHC)**

15 laboratorním myším WT byly obdobně transplantovány GFP NPG. 2 měsíce po transplantaci byly myši usmrceny a jejich mozky zpracovány obdobně na jednotlivé řezy. Vybrané GFP řezy byly

obarveny fluorescenční imunohistochemickou metodou, tak abychom identifikovali transplantované buňky pozitivní na MAP-2 (neurony), GFAP (astrocyty) a kalbindin (Purkyňovy buňky):

Na řezy byl aplikován blokovací roztok (kozí serum, Tween, FBS v PBS, r.t.). Značení primárními protilátkami probíhalo v PBS (anti-GFAP-Cy3 produced in mouse, SIGMA-ALDRICH, ředění 1:800; anti-MAP-2, SIGMA-ALDRICH, ředění 1:400; anti-calbindin, SIGMA-ALDRICH, ředění 1:1000 produced in rabbit). Potom byly řezy propláchnuty roztokem PBS, pak byly přeznačeny sekundární protilátkou v roztoku PBS (goat anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 568, Invitrogen, ředění 1:200). Nenavázaná sekundární protilátka byla vymyta roztokem PBS za stejných podmínek. Obarvené řezy byly zality montovacím médiem s DAPI (MILIPORE). Takto připravené preparáty byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem Olympus BX 41.

6.2.7 **Statistické vyhodnocení**

V jednotlivých skupinách myší bylo hodnoceno přežívání a výskyt typických morfologických charakteristik transplantátu (lokalizace, expanse a destrukce). Statistická významnost rozdílů mezi skupinami myší byla hodnocena Fisherovým testem. Za statisticky významné byly považovány rozdíly, pro které platí $p<0,05$.

Všechny pokusy byly prováděny se souhlasem Odborné komise pro práci s pokusnými zvířaty LF UK v Plzni a v souladu s etickými a právními normami ČR.

6.3 Studium mutací v genu pro LIF a jejich vztahu k plodnosti žen

Bylo vyšetřeno celkem 151 infertilních a 205 plodných žen a na výskyt mutací jsme použili elektroforézu probíhající v teplotním gradientu (TGGE) s následnou sekvenací všech TGGE pozitivních vzorků. Soubor infertilních žen jsme rozdělili dle příčin sterility na 2 skupiny: ovariální, tubární a andrologický faktor (n=107); idiopatická infertilita a endometrióza (n=44).

6.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR) a vyšetřování mutací v genu pro LIF

Pro vyšetření DNA jsme používali TGGE. Analyzovány byly kódující oblasti a exon-intronové spoje genu. Exon 3 byl rozdělen pro potřeby TGGE na 3 části, tak jsme vyšetřovali 5 PCR fragmentů. Za účelem vytvoření termostabilních domén byly primery modifikovány pomocí Poland java script přidáním GC svorek (www.biophys.uni-duesseldorf.de/POLAND/poland.html) viz tab. 3. PCR produkty byly kontrolovány na agarózovém gelu.

Tab. 3 – Použité primery

Exon	Jméno	Sekvence 5 '→ 3'
E1	E1F-GC	*CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCG CCCCCGCCCGCTATGATGCACCTCAAACAA**
	E1R	*GGGGCGGGTGTATTTA**
E2	E2F	*GCCACCCTTTCCTGCCTTTCTAC***
	E2R-GC	*CGGGCGGGGGCGGCGGGCCGGGCGCGGGG CGCGGCGGGCGTCCCTGCCATCTCCTGTCAGT ATC***
E3.1	E3.1F-GC	*CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCG CCCCCGCCCGACAATTCCAGATGCTTACAGGG ****
	E3.1R- GC	*GCGGG GCCAAGGTACACGACTATGC***
E3.2	E3.2F	*CCCAACAACCTGGACAAGCTATG***
	E3.2R-GC	*CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGCCCCGCCG CCCCCGCCCCCCGTAGGTCACGTCCACATG***
E3.3	E3.3F-GC	*CCCGC CCTCCTTAGCAACGTGCTGT**
	E3.3R-GC	*CGGGCGGGGGCGGCGGGCCGGGCGCGGGG CGCGGCGGGCGACATCTGGACCCAACTCCTG**

Vyhledávání mutací bylo prováděno analýzou heteroduplexů na TGGE (Biometra, Goettingen, Germany) za použití paralelních akrylamidových gelů (1 hod. 30 min.). Teplotní gradienty byly pro každý fragment specifické. DNA byla detekována metodou barvení stříbrem.

Všechny pozitivní vzorky jsme následně sekvenovali na sekvenátoru ABI Prism 310 (PE/Applied Biosystems, Foster City, USA).

Statistické zhodnocení rozdílu mezi skupinou s mutacemi a skupinou infertilních žen bez mutací bylo provedeno pomocí Fisherova exaktního testu pro čtyřpolní tabulky.

Studie byla schválena etickou komisí LF UK v Plzni a všechny pacientky podepsaly informovaný souhlas.

7 Výsledky

7.1 Kultivace, neurodiferenciace a následná charakterizace myších ES buněk

7.1.1 Kultivace, neurodiferenciace a následná charakterizace myších EC P19 buněk

Získané hodnoty kvantifikačního stanovení exprese vybraných genů jsou udány jako relativní C_t a relativní počty kopií (R) jsou uvedeny v následující tab. 4:

Tab. 4 – Výsledky kvantifikace mRNA - C_t hodnoty a relativní počty kopií (R)

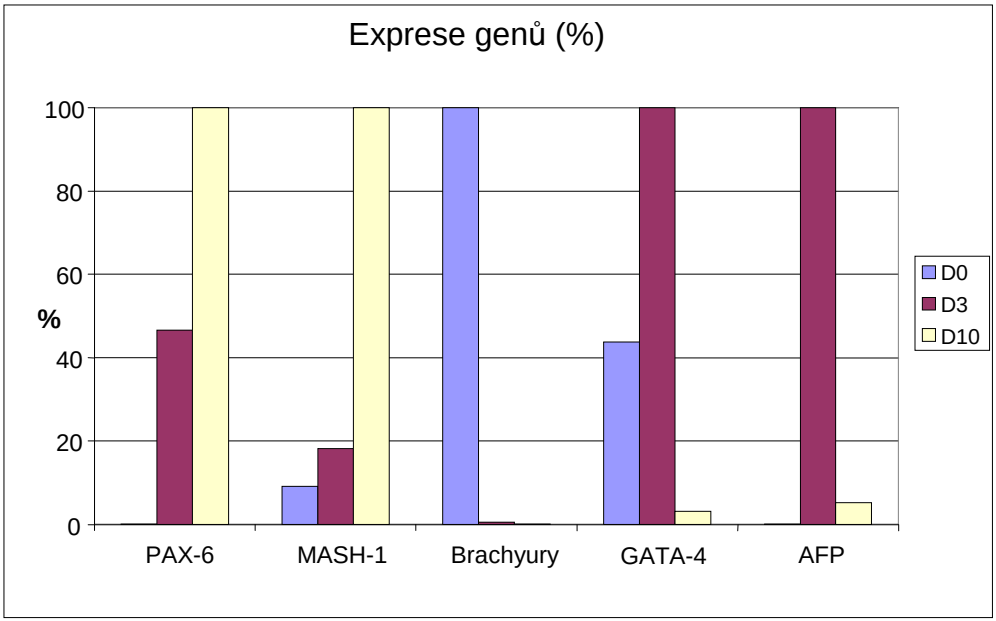
Gen	Den	Průměrná C_t	R
HPRT	D0	19.15	-
	D3	19.55	-
	D10	19.70	-
Pax-6	D0	32.30	0.00011
	D3	22.50	0.12941
	D10	21.55	0.27739
Brachyury	D0	21.70	0.17076
	D3	29.65	0.00091
	D10	32.75	0.00012
Mash-1	D0	29.75	0.00064
	D3	29.00	0.00143
	D10	26.85	0.00704
GATA-4	D0	29.75	0.00064
	D3	29.00	0.00143
	D10	34.15	0.00005
AFP	D0	36.45	0.00001
	D3	25.50	0.01618
	D10	29.90	0.00085

Pro jednodušší porovnání získaných hladin exprese jednotlivých genů v různých stadiích diferenciace EC buněk, byly jejich relativní hodnoty přepočítány na procentuální viz obr. 1.

Hladiny exprese genů PAX-6 a MASH-1 rostly a naopak exprese genu Brachyury klesala během neurodiferenciace. Hladiny exprimovaných genů GATA-4 a AFP byly nejvyšší po indukci diferenciace RA [Babuška et al., 2010].

Nediferencované EC buňky byly imunocytochemicky pozitivně testovány na přítomnost markerů pluripotence - Oct-3/4 a antigen LeX. Během diferenciace (D10) postupně převládají kolonie buněk s neuronálním fenotypem. EC buňky se nejprve zakulatí, tvoří výběžky a nakonec se organizují v kolonie tvaru neurosfér s neurity. Tento charakter buněk byl imunocytochemicky potvrzen přítomností

markeru MAP-2. Dále byly tyto buňky shledány pozitivními na další neuronální markery - N-CAM a β III-tubulin pomocí WT.



Obr. 1- Graficky zpracované výsledky kvantifikace mRNA, které jsou vyjádřené v procentech, kdy nejvyšší hodnota exprese markeru není zaznamenána, jelikož přesahuje 100 %

7.1.2 **Kultivace, neurodiferenciace a následná charakterizace myších ES D3 buněk**

Nediferencované myší kmenové buňky linie D3 byly v kultuře kulovité a bez výběžků. Imunocytochemicky u nich byla prokázána přítomnost markerů pluripotence – Oct-3/4 a LeX antigen.

Výsledkem diferenciace pomocí RA byl růst buněčných výběžků v průběhu 7 až 15 dní a změna v neuronální fenotyp buněk. Neuronální diferenciaci potvrzovala i imunocytochemicky prokázaná

přítomnost markerů MAP-2 a β-III tubulinu. S využitím WB byla u této diferenciace potvrzena pozitivita i na neuronální marker N-CAM. WB provedený v lyzátech elementů diferencovaných bez indukce RA ukázal na nízkou pozitivitu neuronálního markeru N-CAM a na negativitu β-III tubulinu. Neefektivnost tohoto postupu neurodiferenciace potvrdila i morfologie buněk, které byly bez neuronálních výběžků.

7.2 Transplantace nediferencovaných EC P19 buněk a z nich odvozených NPG do CNS modelových laboratorních myší s neurodegenerativním onemocněním

Transplantované nediferencované buňky P19 i NPG vytvářely ložiska fluoreskujících buněk v oblasti aplikace.

Transplantované buňky se nešířily do vzdálenějších oblastí mozečku příjemce. Někdy neměl fluoreskující transplantát ostrou hranici oproti ostatnímu okolí, jindy byla naopak patrná ostrá hranice a komprese okolních struktur tímto útvarem.

Přežití transplantovaných buněk

U myší shodného typu 3 týdny po aplikaci nebyl v přežívání transplantátů složených z NPG a nediferencovaných buněk statisticky významný rozdíl viz tab. 5. Při srovnání přežívání transplantátu z NPG bylo zjištěno významně vyšší přežívání u myší typu WT (p= 0,0078) než u mutantů Lc. U myší typu WT transplantovaných pro imunohistologii, kterým byly aplikovány pouze NPG, byly 2 měsíce po jejich aplikaci objeveny transplantáty u 11 z 15 myší (73,3%).

Morfologie transplantátu

Z hlediska sledované morfologie transplantátu byl expanzivní charakter vždy přítomen po aplikaci nediferencovaných buněk (tab. 6, 7) na rozdíl od NPG, kde byla expanze výrazně nižší. Ve skupinách transplantovaných myší WT byla expanze významně

častější po aplikaci nediferencovaných buněk v poměru k NPG (p= 0,0017).

Tab. 5 – Přežívání transplantovaných stadií EC P19 buněk v různých skupinách myší

Přežívání transplantátu	Celkový počet myší (n)	ano	ne	ano (%)	ne (%)
WT - neuroprogenitory	26	14	12	53,8	46,2
WT - P19	25	8	17	32,0	68,0
Lc - neuroprogenitory	25	4	21	16,0	84,0
Lc - P19	25	4	21	16,0	84,0

Tab. 6 – Morfologická charakteristika a lokalizace transplantátů ve skupině myší typu WT po aplikaci NPG a nediferencovaných EC buněk

WT		NPG	P19
Expanze (%)	ano	28,6	100,0
	ne	71,4	0,0
Destrukce (%)	ano	42,9	0,0
	ne	57,1	100,0
Lokalizace (%)	mozeček	78,6	87,5
	mesencefalon	14,3	0,0
	jiná	7,1	12,5

Tab. 7 – Morfologická charakteristika a lokalizace transplantátů ve skupině myší typu Lc po aplikaci NPG a nediferencovaných EC buněk

Lc		NPG	P19
Expanze	ano	50	100
(%)	ne	50	0
Destrukce	ano	25	0
(%)	ne	75	100
Lokalizace	mozeček	0	0
(%)	mesencefalon	50	75
	jiná	50	25

Destrukce v transplantátu se vyskytovala po transplantaci NPG bez ohledu na typ myši jako příjemce (tab. 6 a 7). Nikdy se však nevyskytla po transplantaci nediferencovaných buněk P19.

Lokalizace transplantátu

Po aplikaci NPG i nediferencovaných buněk do mozečků myší byly GFP pozitivní buňky nalezeny ve středu mozečku u většiny myší typu WT (tab. 6, 7). U mutantů Lc byl transplantát lokalizován vždy mimo mozeček (mezencefalon, hranice mezencefala a mozkového kmene). Pokud byl transplantát v kontaktu s mozečkem myši Lc, tak do něj nikdy nevrůstal. Jeho ohraničení vzhledem k mozečku bylo zřetelné, ale směrem k mezencefalu naopak nevýrazné. Lokalizace obou stadií transplantovaných buněk v mezencefalu myší typu Lc byla natolik odlišná oproti lokalizaci transplantátu v mozečku myší typu WT, že hodnoty Fisherova testu výrazně přesahují hladinu významnosti ($p< 0,05$ - NPG: Lc vs WT je $p=0,0049$; P19: Lc vs WT je $p=0,0101$).

Funkčnost transplantátu

Funkčnost transplantovaných buněk byla ověřena fluorescenční imunohistologií, kdy byly nalezeny GFP buňky, které byly zároveň obarveny na MAP-2 (neurony), GFAP (astrocyty) a kalbindin

(Purkyňovy buňky). V transplantátech byly takto identifikovány všechny jmenované buněčné typy, které byly nejen pozitivní na jmenované markery, ale odpovídající byla i jejich morfologie.

7.3 Studium mutací v genu pro LIF a jejich vztahu k plodnosti žen

Ve skupině plodných žen nebyla nalezena žádná mutace v genu pro LIF. Ve skupině 151 infertilních žen bylo zjištěno 15 žen, které měly transici G za A na pozici 3400 genu pro LIF, která vede při translaci k záměně valinu za methionin v kodónu 64 (V64M), jež je součástí AB kličky LIF proteinu, klíčové oblasti pro interakci s LIFR. Tato mutace by mohla vést ke snížení plodnosti žen [Giess et al., 1999]. Těchto 15 žen jsme rozdělili dle výskytu imunopatologií na skupiny A a B. Ve skupině A byly 4 s idiopatickou infertilitou a 3 s endometriózou (n=7), ve skupině B byly 3 pacientky se syndromem polycystických ovárií (PCOS), 3 s andrologickým faktorem, 1 s tubárním faktorem a 1 s hyperprolaktinémií (n=8). U infertilních žen (n=136) bez mutace byla jejich infertilita způsobena u 10 z nich endometriózou, u 27 idiopatickou infertilitou (C, n=37), 41 pacientek mělo andrologický, 28 tubární faktor a 30 PCOS (D, n=99).

7 z 15 pozitivních žen otěhotnělo po IVF léčbě, z toho 5 hned při prvním IVF cyklu (viz. tab. 8), z čehož plyne hodnota PR v celé skupině 47%. Z těchto 7 vyléčených pacientek nebyla ani u 1 diagnostikována idiopatická neplodnost a pouze u 1 pacienky byla potvrzena endometrióza. Ostatní vyléčené pacientky trpěly PCOS, andrologickým a tubárním faktorem. Mezi skupinami A a B je statisticky signifikantní rozdíl v PR IVF (P=1,1%).

Porovnání úspěšnosti IVF léčby mezi ženami s diagnózou idiopatické neplodnosti a endometriózy s mutací a bez ní (pozitivní, n=7 a bez mutace, n=37) prokázalo u pozitivních žen nižší PR (14%), než ve skupině bez ní (49%), ale z důvodu malých počtů pacientek ve skupinách je tento rozdíl nesignifikantní (P=11%). Rozdíly PR mezi jednotlivými počty diagnostikovaných pacientek jsou statisticky nevýznamné v rámci skupiny neplodných žen bez mutace.

Tab. 8 - Infertilní ženy s mutací v genu pro LIF

Věk	Příčina neplodnosti	Typ infertility	Výsledek 1. cyklu IVF léčby
Skupina A, PR=14%			
30	Idiopatická inf.	Primární	Neotěhotněla
39	Idiopatická inf.	Primární	Neotěhotněla
40	Idiopatická inf.	Sekundární	Neotěhotněla
34	Idiopatická inf.	Primární	Neotěhotněla
39	Endometrióza	Primární	Neotěhotněla
33	Endometrióza	Primární	Neotěhotněla
33	Endometrióza	Sekundární	Otěhotněla
Skupina B, PR=75%			
27	PCOS	Primární	Neotěhotněla
28	PCOS	Primární	Otěhotněla
28	PCOS	Sekundární	Otěhotněla
31	Androlog. faktor	Primární	Otěhotněla
31	Androlog. faktor	Primární	Otěhotněla
24	Androlog. faktor	Primární	Otěhotněla
31	Tubární faktor	Primární	Neotěhotněla
33	Hyperprolaktinémie	Sekundární	Otěhotněla

8 Diskuze

8.1 Charakterizace myších ES buněk

8.1.1 Charakterizace EC P19 buněk

Pro charakterizaci EC P19 buněk v nediferencovaném stavu a ve stadiích diferenciace (D3, D10) pomocí RA v bezsérovém médiu byly vybrány 3 různé molekulárně-biologické metody: RT-qPCR, imunocytochemie a WB, které používají i jiní autoři [Pacherník et al., 2007]. Těmito metodami byly stanoveny základní markery pluripotence (proteiny Oct-3/4, antigen LeX) a u NPG a především u neuronálních buněk byla zaznamenána exprese genů - PAX-6, MASH-1 a přítomnost proteinů MAP-2, N-CAM a β-III tubulinu jako neurálních markerů.

Hladina exprese genu Brachyury byla nejvyšší v D0 a pak klesala (D3, D10), což odpovídá výskytu tohoto transkripčního faktoru pro diferenciaci ES buněk mesodermálním směrem [Pan a Thomson, 2007]. Jeho exprese klesá po indukci diferenciace buněk. Naopak rostla hladina exprese genů PAX-6 a MASH-1, jako neurodiferenciačních markerů [např. Bauwens et al., 2008; Yang et al., 2008]. Také výskyt proteinu MAP-2 je dobrým znakem výsledné neurodiferenciace buněk (D10). Hladina exprese genu GATA-4 rostla po indukci diferenciace buněk a byla nejvyšší 3. den (D3), pak klesala, protože jde o transkripční faktor, který je marker diferenciace buněk entodermálního charakteru [Soudais et al., 1995; Xie et al., 2010] a také diferenciace v kardiomyocyty [Pikkarainen et al., 2004]. Podobně exprese AFP vzrostla po indukci neurodiferenciace, protože indukce diferenciace pomocí RA má tento efekt [Taube et al., 2010]. Pomocí WB byla ověřena neurodiferenciace EC buněk 10. den (D10), kdy byly přítomny důležité neurální markery N-CAM a β-III tubulin [Pacherník et al., 2007].

8.1.2 **Charakterizace ES D3 buněk**

Naše myší kmenové buňky linie D3 byly v nediferencovaném stavu oválné až kulovité a bez výběžků. Jejich charakteristická schopnost pluripotence byla potvrzena imunocytochemicky přítomností charakteristických markerů Oct-3/4 a LeX antigenu [Lovell-Badge, 2007; Muramatsu et al., 2008].

Následně jsme vyzkoušeli jejich diferenciaci v neuronální buňky a to indukcí RA a přes stadium EBs v médiu bez LIF [např. Bain et al., 1995; Pacherník et al., 2002a]. Nerodiferenciace ES buněk byla potvrzena morfologicky, dle výběžků a imunocytochemicky přítomností markerů MAP-2 a β-III tubulinu a nakonec WB, kdy byly vzorky pozitivní na N-CAM, další neuronální marker.

8.2 Transplantace EC P19 buněk do mozečku myší

Je všeobecně známo, že schopnost regenerace CNS je ve srovnání s ostatními tkáněmi velmi omezená [Gould a Gross, 2002; Dyer, 2003]. ES buňky jsou jedním ze slibných zdrojů diferencovaných

neuronálních buněk, které mohou být užity k léčbě neurodegenerativních chorob [Ronaghi et al., 2010].

EC kmenové buňky linie P19 se dají ireverzibilně diferencovat do stadia NPG a následně neuronů [Pacherník et al., 2005]. Tato a další linie EC kmenových buněk se úspěšně používaly k transplantacím do CNS laboratorních zvířat bez postižení [např. Wojcik et al., 1993; Staines et al., 1996], do modelových laboratorních zvířat s neurodegenerací [např. Baker et al., 2000; Garbuzova-Davis et al., 2002] a též do lidských pacientů s CMP [např. Meltzer et al., 2001; Hara et al., 2007].

Naše studie je první, která sleduje osud myších EC P19 GFP buněk transplantovaných do postiženého mozečku myší Lc a hodnotí přežívání, morfologii a lokalizaci těchto transplantátů.

Přežití transplantovaných buněk

Naše studie potvrdila, že NPG přežívají srovnatelně s nediferencovanými EC buňkami v obou typech myší. Na druhou stranu, přežívání NPG i nediferencovaných buněk je významně menší u myší typu Lc než u myší WT. Přestože přežívání NPG u myší typu WT není statisticky významně vyšší než u nediferencovaných EC buněk, jsou tyto výsledky v rozporu s daty získanými v podobných studií, kde transplantované NPG přežívají méně než nediferencované ES buňky [Hildebrand et al., 2005; Gulino et al., 2010].

Morfologie transplantátu

Destrukce byla zjištěna pouze v transplantátech pocházejících z NPG bez ohledu na typ transplantovaných myší. U transplantátů z nediferencovaných buněk se destrukce vůbec nevyskytla. Předpokládáme, že destrukce transplantátu mohou souviset se stupněm diferenciace transplantovaných buněk a s výskytem apoptózy. Dalším zajímavým poznatkem je souvislost přítomnosti destrukce u transplantátů z NPG s nižším výskytem expanze v tomto typu transplantátu. Expanze jsou přítomny ve všech případech transplantovaných nediferencovaných buněk a méně u transplantovaných NPG. Předpokládáme, že důležitá může být

přítomnost neurogeninu (proneurální transkripční faktor), který hraje hlavní roli v neuronální diferenciaci v mnoha oblastech CNS a u P19 buněk je velice nestabilní [Vosper et al., 2007].

Námi transplantované elementy nemigrovay a nešířily se v rámci mozečku, což je v rozporu s dřívějšími experimenty s transplantovanými granulárními a Purkyňovými buňkami [Kawamura et al., 1988]. U vybraných myší, kterým byly transplantovány NPG, byla provedena též imunohistologická analýza toho, do jakých buněčných typů se transplantované buňky, v hostitelské tkáni mozečku, diferencovaly. Ta odhalila jejich diferenciaci v neurony (MAP-2), astrocyty (GFAP) a dokonce i Purkyňovy buňky (kalbindin).

Z naší i dalších studií plyne [Houdek et al., 2011; Garbuzova-Davis et al., 2002], že použití EC buněk pro transplantaci může být přínosné, avšak až po jejich diferenciaci, aby netvořily karcinomy.

Pokud hodnotíme pouze přežívání transplantovaných buněk do mozečku Lc, tak výsledky této práce lze srovnat např. s výsledky transplantací embryonální mozečkové tkáně stejným myším [Cendelín, 2008]. Přežívání transplantátu se v jeho práci zvyšovalo v souvislosti s aplikací embryonálních buněk mozečku dospělým myším typu Lc, což je rozdílné od našich nálezů, kde bylo přežívání výrazně nižší.

Při porovnání lokalizace, se transplantát v naší práci vyskytoval u myší typu WT převážně v mozečku a u myší typu Lc vždy mimo něj. Ve studii věnované transplantacím embryonální mozečkové tkáně do cerebela myší, byl transplantát také nalezen na různých místech [Cendelín, 2008]. Většinou to bylo na povrchu nebo v přímo v mozečku. Vzácně se transplantát vyskytl na ventrálním nebo laterálním povrchu pontu nebo dorzálně od mozečku jak u myší typu WT, tak Lc.

Pro transplantace byla v minulosti využívána i lidská linie EC buněk NTera 2/Dl (NT2), kterou lze s pomocí dlouhodobé kultivace s RA také diferencovat do neuronálního fenotypu z 95% [Pleasure et al., 1992]. Tyto diferencované buňky byly nejprve transplantovány do modelových myší [např. Trojanowski et al., 1997; Garbuzova-Davis et al., 2002], potkanů [např. Willing et al., 1999; Hara et al., 2007] a

nakonec i lidským pacientům postižených CMP [Kondziolka et al., 2005].

Morfologie transplantátů z NPG jak v naší, tak ve výše uvedených studiích, vykazuje méně podobné výsledky, protože transplantované P19 buňky nemají velkou kapacitu se šířit do vzdálenějších oblastí mozečku. Transplantované NT2N buňky přežívají ve zvířecím modelu CMP sice v podobné míře, ale velice dobře se integrují do hostitelského CNS [např. Bliss et al., 2006]. Nevytvářejí žádné tumory v imunosuprimovaném poškozeném mozku potkanů, naopak zlepšují jeho funkčnost [např. Mallory et al., 1999]. Ve většině uvedených prací s NT2N buňkami byla zjištěna různá zlepšení transplantovaných zvířat v behaviorálních a/nebo kognitivních testech [Hara et al., 2008]. Stejně i my jsme zařadili obdobné testování do plánu budoucích experimentů.

Při porovnání výsledků naší transplantační studie, pokud jde o lokalizaci transplantátu EC P19 buněk u myší typu Lc s již výše zmiňovanými transplantacemi NT2N buněk do zvířecích modelů lidských onemocnění, bylo zjištěno, že se v podstatě neliší. Hara aj. uvádí, že pokud se jedná o transplantace nediferencovaných NT2 buněk nebo diferencovaných NT2N buněk do zdravého mozku, pak je vliv mikroprostředí na lokalizaci transplantovaných buněk minimální [Hara et al., 2008]. Naopak, poškozený mozek s patologickým mikroprostředím (zvířecí model CMP) může upozornit na nevhodné podmínky cíleného místa a pozměnit tím místo úchytu transplantátu [např. Nishino a Borlongan, 2000].

8.1 Studium mutací v genu pro LIF a jejich vztahu k plodnosti žen

Výsledky dřívějších studií prokázaly, že frekvence mutací v genu pro LIF je ve skupině neplodných žen signifikantně vyšší, ve srovnání se zkoumanou populací plodných žen [Giess et al., 1999; Carp, 2004]. Jak plyne i z naší studie, bodová záměna G za A na pozici 3400 genu pro LIF neznamená, že žena nebude moci být úspěšně léčena pomocí IVF.

7 z 15 infertilních žen, nesoucích tuto mutaci byly diagnostikovány jako pacientky s idiopatickou neplodností nebo endometriózou.

Domníváme se, že to by mohl být důvod, proč pouze 1 z těchto žen po prvním IVF cyklu otěhotněla. Naopak ženy s mutací s PCOS, andrologickým faktorem a hyperprolaktinémií neotěhotněly při prvním embryotransferu pouze 2. Zdá se, že na ženy s idiopatickou neplodností a endometriózou mají vliv další imunopatologie (např. přítomnost embryotoxických cytokinů) a jejich interakce s mutacemi v genu pro LIF [např. Ulčová-Gallová et al., 1996; Kučera et al., 2004].

Náš soubor 15 neplodných žen s identickou mutací v genu pro LIF je největší, jaký byl v literatuře popsán. K přesnějším statistickým analýzám, je však zapotřebí mít vzorek těchto žen ještě početnější.

9 Závěry

9.1 Kultivace, neurodiferenciace a následná charakterizace myších ES buněk

Myší ES buňky, jmenovitě linie EC P19 a ES D3, byly úspěšně kultivovány *in vitro*. Pluripotence takto kultivovaných buněk byla potvrzena molekulárně-biologickými metodami, jejichž výsledky prokázaly přítomnost specifických markerů: proteiny Oct-3/4 a antigen LeX. Následně byla optimalizována jejich neurodiferenciace, která byla indukována RA. Neuronální charakter diferencovaných buněk byl opět ověřen rostoucí expresí genů PAX-6, MASH-1 a proteinů NCAM, β-III tubulinu a MAP-2, které náleží mezi neuronální markery. Naopak během neurodiferciace poklesla exprese genů Brachyury a GATA-4, jež jsou markery mesodermálního a entodermálního vývoje buněk. Tyto znaky byly doloženy neuronálním fenotypem diferencovaných buněk.

9.2 Transplantace EC P19 buněk do mozečku myší

Tato transplantační studie je první, která sleduje osud myších EC P19 GFP buněk transplantovaných do zdravého (WT) a postiženého mozečku myší (Lc) a hodnotí jejich přežívání, morfologii, lokalizaci a funkčnost. K transplantaci byly použity jak GFP P19 buňky, tak od nich odvozené NPG. V rámci jednoho typu myší bylo přežívání obou typů transplantátu srovnatelné. Přežívání NPG i nediferencovaných EC buněk je nižší u myší typu Lc než u myší bez neurodegenerací,

ale statistické významnosti dosahuje pouze po aplikaci NPG. Transplantát vykazuje známky destrukce i expanze vůči hostitelské tkáni. Destrukce byly zjištěny pouze v transplantátech pocházejících z NPG bez ohledu na typ transplantovaných myší. Předpokládáme, že tyto destrukce mohou souviset se stupněm diferenciace transplantovaných buněk a s výskytem apoptózy. Expanze transplantátu je přítomna ve všech případech aplikace nediferencovaných buněk a méně u NPG. Transplantované P19 buňky neměly tendenci migrovat a šířit se v rámci mozečku. Funkčnost transplantovaných buněk byla ověřena u vybraných myší s transplantovanými NPG imunohistochemicky. Tato analýza prokázala přítomnost GFP transplantovaných buněk v hostitelské tkáni mozečku, které byly zároveň pozitivní na neuronální markery MAP-2 (neurony), GFAP (astrocyty) a kalbindin (Purkyňovy buňky). Z hlediska lokalizace transplantovaných buněk u myší typu WT se vyskytoval transplantát převážně v mozečku, naopak a u myší typu Lc vždy mimo něj, nejčastěji v mezencefalu. Z toho vyplývá, že mozeček mutantů Lc se zdá být méně příznivým prostředím pro transplantované P19 buňky než zdravý mozeček.

9.3 Závěry pro praxi ve studii mutací v genu pro LIF a jejich vztahu k plodnosti žen

Naše studie vlivu mutace v genu pro LIF na neplodnost žen ústí v otázku týkající se možné suplementace kultivačních a transferových médií tímto a jinými cytokiny při IVF léčbě pacientek.

10 Seznam použité literatury

Aghajanova, L. Update on the role leukemia inhibitory factor in assisted reproduction. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* Jun. 2010, vol. 22, no 3, s. 213-219.

Bain, G.; Gottlieb, D.I. Neural cells derived by in vitro differentiation of P19 and embryonic stem cells. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 1998, vol. 5, no. 2–3, s. 175-178.

Bain, G.; Kitchens, D.; Yao, M.; Huettner, J.E.; Gottlieg, D.I. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev. Biol.* Apr. 1995, vol. 168, no. 2, s. 342-357.

Baker, K.A.; Hong, M.; Sadi, D.; Mendez, I. Intrastriatal and intranigral grafting of hNT neurons in the 6-OHDA rat model of

Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* Apr. 2000, vol. 162, no. 2, s. 350-360.

Barski, J.J.; Hartmann, J.; Rose, Ch.R.; Hoebeek, F.; Mörl, K.; Noll-Hussong, M.; De Zeeuw, C.I.; Konnerth, A.; Meyer, M. Calbindin in Cerebellar Purkinje Cells Is a Critical Determinant of the Precision of Motor Coordination. *J. Neurosci.* Apr. 2003, vol. 23, no. 8, s. 3469-3477.

Bauwens, C.L.; Peerani, R.; Niebruegge, S.; Woodhouse, K.A.; Kumacheva, E.; Husain, M.; Zandstra, P. W. Control of human embryonic stem cell colony and aggregate size heterogeneity influences differentiation trajectories. *Stem Cells.* Sep. 2008, vol. 26, no. 9, s. 2300-2310.

Björklund, A.; Lindvall, O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat. Neurosci.* Jun. 2000, vol. 3, no. 6, s. 537-544.

Bliss, T.M.; Kelly, S.; Shah, A.K.; Foo, W.C.; Kohli, P.; Stokes, C.; Sun, G.H.; Ma, M.; Masel, J.; Kleppner, S.R.; Schallert, T.; Palmer, T.; Steinberg, G.K. Transplantation of hNT neurons into the ischemic cortex: cell survival and effect on sensorimotor behavior. *J. Neurosci. Res.* May 2006, vol. 83, no. 6, s. 1004-1014.

Brinster, R.L. The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development. *J. Exp. Med.* Oct. 1974, vol. 140, no. 4, s. 1049-1056.

Brons, I.G.; Smithers, L.E.; Trotter, M.W.; Rugg-Gunn, P.; Sun, B.; Chuva de Sousa Lopes, S. M.; Howlett, S. K.; Clarkson, A.; Ahrlund-Richter, L.; Pedersen, R. A. aj. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature.* Jul. 2007, vol. 7150, no. 448, s. 191-195.

Cendelín, J. Vliv transplantace tkáně mozečku a fyzické aktivity na schopnost prostorové orientace u mutantních myší typu Lurcher. Plzeň, 2008. 78 s. Disertační práce (PhD). Univerzita Karlova. Lékařská fakulta v Plzni. Ústav patologické fyziologie.

Dang, S.M.; Gerecht-Nir, S.; Chen, J.; Itskovitz-Eldor, J.; Zandstra, P. W. Controlled, scalable embryonic stem cell differentiation culture. *Stem Cells*. Dec. 2004, vol. 22, no. 3, s. 275-282.

Dehmelt, L.; Halpain, S. Actin and Microtubules in Neurite Initiation: Are MAPs the Missing Link? *J. Neurobiol.* Jan. 2004, vol. 58, no. 1, s. 18-33.

Dyer, M.A. Regulation of proliferation, cell fate specification and differentiation by the homeodomain proteins Prox1, Six3, and Chx10 in the developing retina. *Cell Cycle.* Jul.-Aug. 2003, vol. 2, no. 4, s. 350-357.

Ešner, M.; Pacherník, J.; Hampl, A.; Dvořák, P. Targeted disruption of fibroblast growth factor receptor-1 blocks maturation of visceral endoderm and cavitation in mouse embryoid bodies. *Int. J. Dev. Biol.* Sep. 2002, vol. 46, no. 6, s. 817-825.

Filip, S.; Mokrý, J.; Hruška, I. *Kmenové buňky.* Praha: Galén, 2006. 223 s. ISBN 80-7262-401-6.

Fraichard, A.; Chassande, O.; Bilbaut, G.; Dehay, C.; Savatier, P.; Samarut, J. In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J. Cell Sci.* Oct. 1995, vol. 108, s. 3181-3188.

Garbuzova-Davis, S.; Willing, A.E.; Milliken, M.; Saporta, S.; Zigova, T.; Cahill, D.W.; Sanberg, P.R. Positive effect of transplantation of hNT neurons (NTera 2/D1 cell-line) in a model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* Apr. 2002, vol. 174, no. 2, s. 169-180.

Gardner, R.L. *Essentials of Stem Cell Biology: ES-like Cells in Other Species.* In Lanza, R.; Gearhart, J.; Hogan, B.; Melton, D.; Pedersen, R.; Thomson, J.; Thomas, E.D.; West, M. (ed.). *Elsevier Academic Press.* Burligton (USA). 2006, s. 2-4. ISBN-13: 978-0-12-088-442-1. ISBN-10:0-12-088442-9.

Gersh, B.J.; Simari, R.D.; Behfar, A.; Terzic, C.M.; Terzic, A. Cardiac cell repair therapy: a clinical perspective. *Mayo Clin. Proc.* Oct. 2009, vol. 84, no. 10, s. 876-892.

Giess, R.; Tanasescu, I.; Steck, T.; Sendtner, M. Leukaemia inhibitory factor gene mutations in infertile women. *Mol. Hum. Reprod.* Jun. 1999, vol. 5, no. 6, s. 581–586.

Gould, E.; Gross, C.G. Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *J. Neurosci.* Feb. 2002, vol. *22*, no. 3, s. 619-623.

Gulino, R.; Litrico, L.; Leanza, G. Long-term survival and development of fetal ventral spinal grafts into the motoneuron-depleted rat spinal cord: Role of donor age. *Brain Res.* Apr. 2010, vol. 1323, s. 41-47.

Hara, K.; Matsukawa, N.; Yasuhara, T; Xu, L.; Yu, G.; Maki, M.; Kawase, T.; Hess, D.C.; Kim, S.U.; Borlongan, C.V.. Transplantation of post-mitotic human neuroteratocarcinoma-overexpressing Nurr1

cells provides therapeutic benefits in experimental stroke: in vitro evidence of expedited neuronal differentiation and GDNF secretion. *J. Neurosci. Res.* May 2007, vol. 85, no. 6, s. 1240-1251.

Hara, K.; Yasuhara, T.; Maki, M. aj. Neural progenitor NT2N cell lines from teratocarcinoma for transplantation therapy in stroke. *Prog. Neurobiol.* Jul. 2008, vol. 85, no. 3, s. 318-334.

Herrler, A.; von Rango, U.; Beier, H.M. Embryo–Maternal signaling: how the embryo starts talking to its mother to accomplish implantation. *Reprod. Biomed. Online.* Mar. 2003, vol. 6, no. 2, s. 244-256.

Hildebrand, M.S. *et al.* Survival of partially differentiated mouse embryonic stem cells in the scala media of the guinea pig cochlea. *J. Assoc. Res. Otolaryngol*. Dec. 2005, vol. 6, no. 4, s. 341-354.

Holtzinger, A.; Rosenfeld, G.E.; Evans, T. Gata4 directs development of cardiac-inducing endoderm from ES cells. *Dev. Biol.* Jan. 2010, vol. 337, no. 1, s. 63-73.

Hong, S.; Heo, J.; Lee, S.; Heo, S.; Kim, S.S.; Lee, Y.; Kwon, M.; Hong, S. Methyltransferase-inhibition interferes with neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Dec. 2008, vol. 377, no. 3, s. 935-940.

Houdek, Z.; Cendelín, J.; Kulda, V.; Vožeh, F.; Babuška, V.; Hatina, J.; Hájková, L.; Králíčková, M.; Zech, N.; Pacherník, J.; Uher, P. Neurální diferenciace myších embryonálních karcinomových a embryonálních kmenových buněk pomocí kyseliny retinové – Pilotní studie. *Plzeň. Lék. Sborn.* 2010, roč. 76, s. 37-40.

Chambers, I.; Smith, A. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene.* Sep. 2004, vol. 23,no. 43, s. 7150-7160.

Jones-Villeneuve, E.M.; Rudnicki, M.A.; Harris, J.F.; McBurney, M.W. Retinoic acid-induced neural differentiation of embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* Dec. 1983, vol. 3, no. 12, s. 2271-2279.

Kawamura, K.; Nanami, T.; Kikuchi, Y.; Kitakami, A. Grafted granule and Purkinje cells can migrate into the mature cerebellum of normal adult rats. *Exp. Brain Res.* 1988, vol. 70, no. 3, s. 477-484.

Kim, S.U.; de Vellis J. Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: a review. *J. Neurosci. Res.* Aug. 2009, vol. 87, no. 10, s. 2183-2200.

Kispert, A.; Herrmann, B.G. Immunohistochemical analysis of the Brachyury protein in wild-type and mutant mouse embryos. *Dev. Biol.* Jan. 1994, vol. 161, no. 1, s. 179-193.

Koike, M.; Sakaki, S.; Amano, Y.; Kurosawa, H. Characterization of embryoid bodies of mouse embryonic stem cells formed under various culture conditions and estimation of differentiation status of such bodies. *J. Biosci. Bioeng*. Oct. 2007, vol. 104, no. 4, 294-299.

Kondziolka, D.; Steinberg, G.K.; Wechsler, L.; Meltzer, C.; Elder, E.; Gebel, J.; DeCesare, S.; Jovin, T.; Zafonte, R.; Leibrowitz, J.; Flickinger, J.C.; Tong, D.; Marks, M.; Jamieson, C.; Luu, D. Bell-Stephens, T.; Teraoka, J. Neurotransplantation for patients with subcortical motor stroke: a phase 2 randomized trial. *J. Neurosurg*. Jul. 2005, vol. 103, no. 1, s. 38-45.

Kotasová , H.; Veselá , I.; Kučera, J.; Houdek, Z.; Procházková, J.; Králičková, M.; Pacherník, J. Phosphoinositide 3-kinase inhibition enables retinoic acid-induced neurogenesis in monolayer culture of embryonic stem cells. *J. Cel. Biochem.* [online]. Feb. 2012, vol. 113, no. 2, s. 563-570.

Kotasová, H. Regulace diferenciace embryonálních pluripotentních buněk prostřednictvím receptoru gp130. Brno, 2009. 74 s. Diplomová práce (Mgr.). Masarykova univerzita. Přírodovědecká fakulta.

Kučera, E.; Madar, J.; Jirásek, J.E. aj. Imunopatologické a histopatologické aspekty ektopické implantace. *Čes. Gynek.* 2004, roč. 69, Suppl. 1, s. 3-8.

Lafuste, P.; Robert, B.; Danan J.L. aj. Alphafetoprotein gene expression in early and full-term human trophoblast. *Placenta.* Sep.-Oct. 2002, vol. 23, no. 8-9, s. 600-612.

Lovell-Badge, R. Many ways to pluripotency. *Nat. Biotechnol.* Oct. 2007, vol. 25, no. 10, s. 1114-1116.

Mallory, M.; Honer, W.; Hsu, L.; Johnson, R.; Rockenstein, E.; Masliah, E. In vitro synaptotrophic effects of cerebrolysin in NT2N cells. *Acta Neuropathol.* May 1999, vol. 97, no. 5, s. 437-446.

Meltzer, C.C.; Kondziolka, D.; Villemagne, V.L. aj. Serial {18F} fluorodeoxyglucose positron emission tomography after human neuronal implantation for stroke. *Neurosurgery.* Sep. 2001, vol. 49, no.3, s. 586-592.

Muramatsu, H.; Kusano, T.; Sato, M.; Oda, Y.; Kobori K.; Muramatsu, T. Embryonic stem cells deficient in I β1,6-*N* acetylglucosaminyltransferase exhibit reduced expression of

embryoglycan and the loss of a Lewis X antigen, 4C9. *Glycobiology*. Mar. 2008, vol. 18, no. 3, s. 242-249.

Nishino, H.; Borlongan, C.V. Restoration of function by neural transplantation in the ischemic brain. *Prog. Brain Res.* 2000, vol. 127, s. 461-476.

Pacherník, J.; Bryja, V.; Ešner, M.; Kubala, L.; Dvořák, P.; Hampl, A. Neural differentiation of pluripotent mouse embryonal carcinoma cells by retinoic acid: Inhibitory effect of serum. *Physiol. Res.* 2005, vol. 54, s. 115-122.

Pacherník, J.; Ešner, M.; Bryja, V.; Dvořák, P.; Hampl, L.A. Neural differentiation of mouse embryonic stem cells growth in monolayer. *Reprod. Nutr. Dev.* Jul.-Aug. 2002a, vol. 42, no. 4, s. 317-326.

Pacherník, J.; Horváth, V.; Kubala, L.; Dvořák, P.; Kozubík, A.; Hampl, A. Neural differentiation potentiated by the leukaemia inhibitory factor through STAT3 signalling in mouse embryonal carcinoma cells. *Folia Biol. (Praha).* Sep. 2007, vol. 53, no. 5, s. 157-163.

Pacherník, J.; Horváth, V.; Kubala, L.; Dvořák, P.; Kozubík, A.; Hampl, A. Neural differentiation potentiated by the leukaemia inhibitory factor through STAT3 signalling in mouse embryonal carcinoma cells. *Folia Biol. (Praha).* Sep. 2007, vol. 53, no. 5, s. 157-163.

Pan, G.; Thomson, J.A. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res.* Jan. 2007, vol. 17, no. 1, s. 42-49.

Pekkanen-Mattila, M.; Kerkelä, E.; Tanskanen, J.M.; Pietilä, M.; Pelto-Huikko, M. aj. Substantial variation in the cardiac differentiation of human embryonic stem cell lines derived and propagated under the same conditions-a comparison of multiple cell lines. *Ann. Med.* 2009, vol. 41, no. 5, s. 360-370.

Pernas-Alonso, R.; Morelli, F.; di Porzio, U.; Perrone-Capano, C. Multiplex semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction of low abundance neuronal mRNAs. *Brain Res. Brain Res. Protoc. Dec.* 1999, vol. 4, no. 3, s. 395-406.

Phillips, B.W.; Vernochet, C.; Iéhlé, C.; Dani, C. Handbook of Stem Cells: Differentiation of Embryonic Stem Cells into Adipose Cells. In Lanza R.; Gearhart, J.; Hogan, B.; Melton, D.; Pederson, R.; Thomson, J. (ed.). *Elsevier Academic Press.* Burlington (USA), 2004, s. 329-335. ISBN: 0-12436642-2 (vol. 1).

Pikkarainen, S.; Tokola, H.; Kerkela, R.; Ruskoaho, H. GATA transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovasc. Res.* Aug. 2004, vol. 63, no. 2, s. 196-207.

Pleasure, S.J.; Page, C.; Lee, V., M. Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTera 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. *J. Neurosci.* May 1992, vol. 12, no. 5, s. 1802-1815.

Reubinoff, B.E.; Pera, M.F.; Fong, C.Y.; Trounson, A.; Bongso, A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.* Apr. 2000, vol. 18, no. 4, s. 399-404.

Ronaghi, M.; Erceg, S.; Moreno-Manzano, V.; Stojkovic, M. Challenges of stem cell therapy for spinal cord injury: human embryonic stem cells, endogenous neural stem cells, or induced pluripotent stem cells? *Stem Cells.* Jan. 2010; vol. 28, no. 1, s. 93-99.

Sellner, L.N.; Turbett, G.R. The presence of a pseudogene may affect the use of HPRT as an endogenous mRNA control in RT-PCR. *Mol. Cell. Probes.* Dec. 1996, vo. 10, no. 6, s. 481-3.

Soudais, C.; Bielinska, M.; Heikinheimo, M.; MacArthur, C.A.; Narita, N.; Saffitz, J.E., Simon, M.C.; Leiden, J.M.; Wilson, D.B. Targeted mutagenesis of the transcription factor GATA-4 gene in mouse embryonic stem cells disrupts visceral endoderm differentiation in vitro. *Development.* Nov. 1995, vol. 121, no. 11, s. 3877-3888.

Staines, W.A.; Craig, J.; Reuhl, K.; McBurney, M.W. Retinoic acid treated P19 embryonal carcinoma cells differentiate into oligodendrocytes capable of myelination. *Neuroscience.* Apr. 1996, vol. 71, no. 3, s. 845-853.

Stewart, C.L.; Kaspar, P.; Brunet, L.J.; Bhatt, H.; Gadi, I.; Köntgen, F.; Abbondanzo, S.J. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature.* Sep. 1992, vol. 6390, no. 359, s. 76-79.

Taube, J.H.; Allton, K.; Duncan, S.A.; Shen, L.L.; Barton, M.C. FOXA-1 functions as a pioneer transcription factor at transposable elements to activate AFP during differentiation of embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* May 2010, vol. 285, no. 21, s. 16135-16144.

Thomson, J.A.; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S.S.; Waknitz, M.A.; Swiergiel, J.J.; Marshall, V.S.; Jones, J.M. Embryonic stem cell lines

derived from human blastocysts. *Science.* Nov. 1998, vol. 5391, no. 282, s. 1145-1147.

Ulčová-Gallová, Z.; Novotný, Z.; Bouše, V. aj. Sledování některých faktorů imunity v séru a v peritoneální tekutině u laparoskopovaných žen. II. Protilátky proti spermiím a zona pellucida. *Čes. Gynek.* 1996, roč. 61, č. 3, s. 139-141.

Wiles, M.V. Embryonic stem cell differentiation in vitro. Methods Enzymol. 1993, vol. 225, s. 900-918.

Willing, A.E.; Sudberry, J.J.; Othberg, A.I.; Saporta, S.; Poulos, S.G.; Cameron, D.F.; Freeman, T.B.; Sanberg, P.R. Sertoli cells decrease microglial response and increase engraftment of human hNT neurons in the hemiparkinsonian rat striatum. *Brain Res. Bull.* Mar. 1999, vol. 48, no. 4, s. 441-444.

Wojcik, B.E.; Nothias, F.; Lazar, M.; Jouin, H.; Nicolas, J.; Peschanski, M. Catecholaminergic neurons result from the intracerebral implantation of embryonal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Feb. 1993, vol. 90, no. 4, s.1305-1309.

Xie, D.; Chen, C.C.; Ptaszek, L.M.; Xiao, S.; Cao, X. aj. Rewirable gene regulatory networks in the preimplantation embryonic development of three mammalian species. *Genome Res.* Jun. 2010, vol. 20, no. 6, s. 804-815.

Yang, Y.; Zhang, L.; Wei, Y.; Wang, H.; Fukuma, M.; Xu, H.; Xiong, W.; Zheng, J. Neural differentiation arrest in embryonal carcinoma cells with forced expression of EWS-FLI1. *J. Neurooncol.* Nov. 2008, vol. 90, no. 2, s. 141-150.

Zhang, W.; Lee, W.H.; Triarhou, L.C. Grafted cerebellar cells in a mouse model of hereditary ataxia express IGF-I system genes and partially restore behavioral function. *Nat. Med.* Jan. 1996, vol. 2, no. 1, s. 65-71.

11 Přehled publikační činnosti

11.1 Články v časopisech

Novotný, Z.; Křížan, J.; Šíma, R.; Šíma, P.; Uher, P.; Zech, N.; Hűttelová, R.; Baborová, P.; Ulčová-Gallová, Z.; Šubrt, I.; Ulmanová, E.; **Houdek, Z.**; Rokyta, Z.; Babuška V.; Králíčková, M. Leukemia inhibitory factor (LIF) gene mutations in women diagnosed with unexplained infertility and endometriosis have a negative impact on

the IVF outcome. A pilot study. *Folia Biol. (Praha).* 2009, vol. 55, no. 3, s. 92-97. [IF 0.729]

Babuška, V.; Kulda, V.; **Houdek, Z.**; Pešta, M.; Cendelín, J.; Zech, H.N.; Pacherník, J.; Vožeh, F.; Uher, P.; Králíčková, M. Characterization of P19 cells during retinoic acid induced differentiation, *Prague Med. Rep.* 2010, vol. 111, no. 4, s. 288-298. [RIV]

Houdek, Z.; Cendelín, J.; Kulda, V.; Vožeh, F.; Babuška, V.; Hatina, J.; Hájková, L.; Králíčková, M.; Zech, N.; Pacherník, J.; Uher, P. Neurální diferenciace myších embryonálních karcinomových a embryonálních kmenových buněk pomocí kyseliny retinové – Pilotní studie. *Plzeň. Lék. Sborn.* 2010, roč. 76, s. 37-40. [RIV]

Houdek, Z.; Cendelín, J.; Kulda, V.; Babuška, V.; Vožeh, F.; Hatina, J.; Králíčková, M.; Zech, N.; Veselá, I.; Pacherník, J.; Uher, P. The comparison of P19-derived neuroprogenitors and naive cells survival after intracerebellar application in B6CBA mice. *Folia Biol. (Praha).* 2011, vol. 57, no. 4, s. 162-169. [IF 0.729]

Kotasová , H.; Veselá , I.; Kučera, J.; **Houdek, Z.**; Procházková, J.; Králičková, M.; Pacherník, J. Phosphoinositide 3-kinase inhibition enables retinoic acid-induced neurogenesis in monolayer culture of embryonic stem cells. *J. Cel. Biochem.* [online]. Feb. 2012, vol. 113, no. 2, s. 563-570 [cit. 2012-1-24]. Dostupný z WWW: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcb.23380/abstract;jsessionid=39C1BE807FD6BFE838C43EAEB21C9FC1.d02t04>. [IF 3.122]

11.2 Postery na odborných setkáních

Houdek, Z.; Králíčková, M.; Šíma, R.; Šíma, P.; Křížan, J.; Váchalová, L.; Babuška, V.; Uher, P. Mutace v genu pro leukemický inhibiční faktor (LIF) v populaci neplodných žen – jejich prevalence a vliv na léčbu neplodnosti. XII. Kongres českých a slovenských imunologů, Praha, ČR, 29. 10. 2008.

Králíčková, M.; Martínek, P.; **Houdek, Z.**; Šíma, R.; Hes, O.; Rokyta, Z.; Babuška, V.; Uher, P. Mutace v genech pro interleukin 11 (IL-11) a leukemický inhibiční faktor (LIF) a přítomnost NK buněk v endometriu – jak spolupracují a ovlivňují fertilitu? XII. Kongres českých a slovenských imunologů, Praha, ČR, 29. 10. 2008.

Houdek, Z.; Cendelín, J.; Kulda, V.; Králíčková, M.; Vožeh, F.; Babuška, V.; Hatina, J.; Pacherník, J.; Zech, N.; Uher P. Comparison of survival and further differentiation of P19-derived neuroprogenitors

and P19 naive cells in a model of neurodegeneration. Pilot results. Joint Conference of the Czech and Slovak Neuroscience Societies, Praha, ČR, 1.-4. 10. 2009.

Pitule, P.; Čedíková, M.; **Houdek, Z.**; Cendelín, J.; Kulda, V.; Králíčková, M.; Vožeh, F.; Babuška, V.; Pacherník, J.; Zech, N.; Uher, P. The comparison of the survival of P19-derived neuroprogenitors and P19 naive cells after intracerebellar application in a mice model with and without neurogeneration. 8th International Stem Cell School in Regenerative Medicine, Stockholm, Sweden, 3.-5. 9. 2010.

Čedíková, M.; Krákorová, K.; Pitule, P.; **Houdek, Z.**; Cendelín, J.; Kulda, V.; Králíčková, M.; Vožeh, F.; Babuška, V.; Pacherník, J.; Zech, N.; Uher, P. Immunohistological characterization of grafted tissue after neurotransplantation in the mouse model of cerebellar degeneration. A pilot study. XX. Biologické dny, Plzeň, ČR, 25.-27.10. 2011.

Houdek, Z.; Cendelín, J.; Králíčková, M.; Čedíková, M.; Babuška, V.; Kulda, V.; Hatina, J.; Vožeh, F. Intracerebellar transplantation of P19 carcinoma stem cells and P19-derived neuroprogenitors in Lurcher mutant and wild type mice. XX. Biologické dny, Plzeň, ČR, 25.- 27.10. 2011.

11.3 Prezentace na odborných setkáních

Svatoň, M.; Řehoř, L., **Houdek, Z.**; Kulda, V.; Králíčková, M. Neurodiferenciace myších kmenových buněk. 49. Studentská vědecká konference LF UK v Plzni, Plzeň, ČR, 6. 5. 2009.

Kralíčková, M.; Uher, P.; Šíma, R.; Hűttelová, R.; Baborová, P.; **Houdek, Z.**; Zech, N.H. Leukemia inhibitory factor (*LIF*) gene mutations in women diagnosed with idiopathic infertility and endometriosis have a negative impact on the IVF/ICSI outcome. European Congress of Reproductive Immunology, 16-20. 9. 2009, Greece, Marathon.

Houdek, Z.; Cendelín, J.; Kulda, V.; Babuška, V.; Vožeh, F.; Králíčková, M.; Hatina, J.; Uher, P.; Zech, N.; Pacherník, J. The comparison of P19-derived neuroprogenitors and undifferentiated cells survival after intracerebellar application into B6CBA mice. 45. Mezinárodní kongres anatomie: Morphology 2009, Plzeň, ČR, 7.-9. 9. 2009.

Králíčková, M.; **Houdek, Z.**; Šíma, R.; Uher, P.; Hůttelová, R.; Baborová, P.; Křížan, J.; Šíma, P.; Zech, N. The developmental potential of embryo and the success of infertility treatment correlate with the presence of leukemia inhibitory factor (LIF) gene mutations and natural killer T (NKT) cells in follicular fluid in infertile women. 45. Mezinárodní kongres anatomie: Morphology 2009, Plzeň, ČR, 7.-9. 9. 2009.

Houdek, Z.; Cendelín, J.; Kulda, V.; Králíčková, M.; Vožeh, F.; Babuška, V.; Hatina, J.; Zech, N.; Pacherník, J.; Uher, P. Does the neurodegeneration in lurcher mutant mice affect the survival and further differentiation of P19-derived neuroprogenitors? Pilot results. World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig, Germany, 29.-31.10. 2009.

Houdek, Z.; Kulda, V.; Veselá, I. Srovnání přežívání neuroprogenitorů a nediferncovaných EC buněk linie P19 po intracerebelární transplantaci myším. 50. Studentská vědecká konference LF UK v Plzni, Plzeň, ČR, 12. 5. 2010.

Houdek, Z.; Kulda, V.; Veselá, I. The comparison of P19-derived neuroprogenitors and naive cells survival after intracerebellar application in B6CBA mice. 7th International Medical Postgraduate Conference Hradec Kralove, Hradec Kralové, ČR, 18.- 20. 11. 2010.

Čedíková, M.; Pitule, P.; **Houdek, Z.**; Cendelín, J.; Kulda, V.; Vožeh, F.; Babuška, V.; Pacherník, J.; Uher, P.; Kralíčková, M. Vliv neurodegenerace na přežívání neuroprogenitorů a nediferencovaných EC buněk linie P19 po intracerebelární transplantaci u myší. Diagnostika, léčba a prevence závažných civilizačních onemocnění, Plzeň, ČR, 25. 11. 2010.

Babuška, V.; Kulda, V.; **Houdek, Z.**; Pešta, M.; Cendelín, J.; Zech, N.; Pacherník, J.; Vožeh, F.; Uher, P.; Králíčková, M. Charakterizace EC buněk v průběhu indukované neurodiferenciace. 20. Neuroontogenetický diskusní den, Praha, ČR, 14. 12. 2010.

Houdek, Z.; Cendelín, J.; Kulda, V.; Králíčková, M.; Babuška, V.; Vožeh, F. Transplantace embryonálních karcinomových (EC) kmenových buněk linie P19 a z nich odvozených neuroprogenitorů do mozečku myší typu Lurcher a wild. 20. neuroontogenetický diskusní den, Praha, ČR, 14. 12. 2010.

Houdek, Z.; Kulda, V.; Čedíková, M. Transplantace embryonálních karcinomových kmenových buněk a odvozených neuroprogenitorů do mozečku myší lurcher a wild. 51. Studentská vědecká konference LF UK v Plzni, Plzeň, ČR, 19. 5. 2011.

Čedíková, M.; Babuška, V.; Cendelín, J.; **Houdek, Z.;** Pitule, P.; Vožeh, F.; Králíčková, M.; Uher, P. Výsledky neurotransplantace kmenových buněk u myší s a bez neurodegenerativního onemocnění. Experimentální výzkum v medicíně a jeho klinická aplikace, Plzeň, ČR, 3.11.2011.

Babuška, V.; Cendelín, J.; **Houdek, Z.**; Kulda, V.; Čedíková, M.; Králíčková, M.; Vožeh, F. Transplantace neuroprogenitorů u myší typu Lurcher a její vliv na motorické schopnosti. 21. neuroontogenetický diskusní den, Praha, ČR, 13. 12. 2011.

Houdek, Z.; Cendelín, J.; Kulda, V.; Babuška, V.; Čedíková, M.; Králíčková, M.; Vožeh, F. Porovnání vývoje dvou typů transplantátů do mozečku myší Lurcher a wild kmene B6CBA z pohledu imunohistologie. 21. neuroontogenetický diskusní den, Praha, ČR, 13. 12. 2011.